

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11681

研究課題名(和文) 口腔内病原菌内毒素による海馬のエピジェネティック修飾の網羅的検索

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of epigenetic modification in hippocampus by oral pathogen endotoxin

研究代表者

安彦 善裕 (ABIKO, Yoshihiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：90260819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来内毒素 Lipopolysaccharide(LPS)による、脳の海馬でのエピジェネティクス修飾について網羅的に観察することを目的とする。LPSをマウスに1ヶ月間投与後、海馬を摘出し解析した結果、アルツハイマー病発症に関与する遺伝子であるMMEの発現変化にはIL-10が関与しており、LPSによる持続的な刺激が血清中のIL-10濃度低下およびMMEの減少につながり、アミロイド蓄積を引き起こすことによってアルツハイマー病の病態進行に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病に関わる病原菌が様々な全身疾患の誘因や増悪因子となることが明らかとなっている。近年、歯周病原菌がアルツハイマー病の発症増悪に関与することが示唆されてきているが、そのメカニズムは未だに明らかとなっていない。本研究は、口腔内細菌のアルツハイマー病の発症、進行への関与とその病態の解明につながる極めて独創的な研究である。これらの研究成果は、病態の発症・進行に関わる新たな原因の究明に貢献するのみならず、エピジェネティクスを対象とした創薬、いわゆるエピゲノム創薬のためのデータとしても活用できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to comprehensively observe epigenetic modification in the hippocampus of the brain by the endotoxin Lipopolysaccharide (LPS) derived from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. After administration of LPS to mice for 1 month, the hippocampus was isolated and analyzed. As a result, IL-10 was involved in the change in expression of MME, a gene involved in the onset of Alzheimer's disease, and persistent stimulation by LPS was observed in serum. It was suggested that it might be involved in the progression of Alzheimer's disease by causing amyloid accumulation, which leads to a decrease in IL-10 concentration and a decrease in MME.

研究分野：臨床口腔病理学

キーワード：口腔内病原菌内毒素 海馬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの疾病の発症には素因や遺伝的要因を始めとした内因と、環境因子のような外因が関わっている。環境因子により影響を受ける遺伝子の表現系に、エピジェネティクスがある。エピジェネティクスは、DNA の塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現が変化する現象であり、その代表的なものに DNA メチル化修飾やヒストンの化学修飾がある。これらのエピジェネティクス遺伝子修飾は、これまで発がんに関わる研究について行われてきたが、最近になり、糖尿病、アレルギー疾患、自己免疫疾患、精神疾患などの発症への関与も指摘されてきている。

口腔領域では、主として口腔がんをターゲットとしたエピジェネティクス修飾について報告が多く、最近申請者は、歯周病をはじめとした他の口腔内の疾患発症へのエピジェネティクスの関与について、総説にて知見を概観した (Abiko Y, et al. J Oral Biosci. Review, 2014.)。歯周病が全身疾患などの誘因となり全身の健康を脅かしていることを示す科学的根拠は集積されつつあり、これまでに糖尿病、心血管系疾患、歯性感染症をはじめ様々な疾患との関与が指摘されてきている。最近になり、歯周病原菌のアルツハイマー病への関与が示唆されてきている (道川誠, 日本臨床 (解説) 2014; Singhrao SK et al. Mediator Inflamm. Review, 2015)。その機序として、1) 歯周病原菌が血流を介し直接伝播し、毒性因子を放出する経路、2) 炎症部位から放出された炎症性分子 (サイトカイン) が血流によって標的臓器や細胞に運ばれ、炎症が波及する経路、3) 口腔内の刺激が神経系を介して脳内に波及する経路、などが示唆されてきているが、その詳細は未だ不明である。

最近、口腔内の病原菌の中には脳内に入り込み、アミロイド斑の沈着を促進する場合のあることや、アルツハイマー病の剖検例の脳の多くに歯周病原菌である *P.gingivalis* の存在が示されたことなどから (Poole S et al. J. Alzheimer Dis, 2013)、先述の機序 1) を支持する意見が出されてきている (道川誠, 日本臨床 (解説) 2014)。このことから申請者は、歯周病原菌のアルツハイマー病の増悪因子の一つに、口腔内病原菌の内毒素による脳のエピジェネティクス修飾があるとの仮説を立てた。アルツハイマー病の脳障害は、脳内で記憶、学習機能に大きく関わっている海馬の障害から始まると言われている。すなわち、海馬における脳神経細胞の減少や海馬の萎縮などがある。このことから、アルツハイマー病の病態を解明するために、これまで主に海馬をターゲットとした研究が行われてきており、様々な脳疾患において海馬におけるエピジェネティクス修飾に関する研究も多い (Hunter RG et al. Proc. Natl Acad Sci USA, Review, 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、口腔内病原菌の内毒素による、脳の海馬でのエピジェネティクス修飾を網羅的に観察することを目的とする。

3. 研究の方法

1. 動物

実験動物には北海道医療大学動物実験倫理委員会の承認の元、C57BL/6J マウスと老化促進モデルマウス (SAMP8) を用いて実施した。

2. *P. gingivalis* の培養とマウスでの脳内移行について

C57BL/6J マウスおよび SAMP8 における *P. gingivalis* 菌の脳内移行について、PCR 法により *P. gingivalis* の検出を行った。

3. *P. gingivalis* 由来 LPS の投与

海馬への影響を検証するため、6-10 週齢の C57BL/6J マウス、SAMP8 に *P. gingivalis* 由来 LPS を 5.0 mg/kg の濃度で 3 日毎に、90 日間投与し、最終投与より 3 日後に屠殺した。屠殺後、C57BL/6J マウスおよび SAMP8 より左右両側の海馬を摘出し、一方を 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液で 24 時間固定し、他方は total RNA を抽出した。

4. MME の mRNA 発現解析

mRNA 発現変化を定量的 real-time PCR (RT-PCR) 法により解析した。

5. 免疫組織化学的観察

P. gingivalis 由来 LPS 投与による MME の発現変化を観察するため、SAMP8 の海馬組織で蛍光免疫組織化学染色を行った。また、蛍光強度を定量化し評価するために、海馬の CA3 領域よりを無作為に 3 カ所抽出し蛍光強度の測定を行った。

6. IL-10 血中濃度測定

血液中の IL-10 濃度を測定するために、*P. gingivalis* 由来 LPS を投与 60 分後のマウス心臓からサンプルを採取し、IL-10 濃度測定を ELISA にて行った。

7. IL-10 刺激下での海馬細胞培養

マウス海馬神経細胞を用い、IL-10 刺激による MME の mRNA 発現変化を解析した。

8. 統計分析

統計分析は、Mann-Whitney U 検定にて比較・検討し、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

1. MME の mRNA 発現解析

LPS を投与した SAMP8 での MME の mRNA 発現変化は、対照群と比較して低いことが確認された (図 1)。

2. 海馬の免疫組織化学的観察

SAMP8 の海馬で MME の発現変化について、蛍光免疫組織化学染色により評価した。その結果、海馬の CA3 領域において LPS 投与群では CA3 領域にびまん性の蛍光発現が低下していることが確認された(図 2)。さらに、同部の蛍光強度を定量化し評価したところ、LPS 投与群では低かったことが確認された(図 3)。

3. IL-10 血中濃度の評価

LPS を投与した C57BL/6J および SAMP8 の IL-10 血中濃度は、C57BL/6J と比較して SAMP8 において低かった(図 4)。

4. IL-10 添加による海馬神経細胞の MME の mRNA 発現解析

IL-10 添加群では対照群に比べて、発現増加が認められた(図 5)。

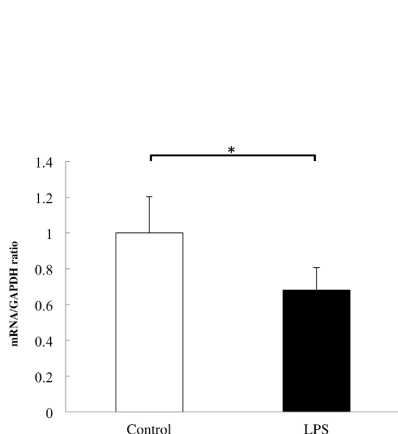


図 1 MME の mRNA 発現解析のグラフ (n=4)

P. gingivalis 由来 LPS を投与した SAMP8 の海馬において RT-PCR 法による MME の mRNA の発現解析を行ったところ、対照群と比較して *P. gingivalis* 由来 LPS 投与群では MME の mRNA 発現が有意に発現低下していることが確認された (* p<0.05)。

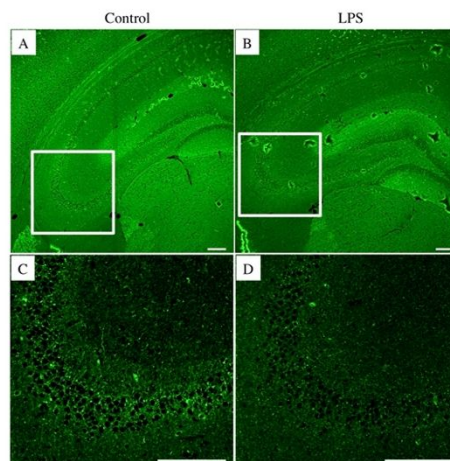


図 2 Anti-CD10 (MME) antibody を用いた蛍光免疫組織化学染色 (bar=100 μm) *P. gingivalis* 由来 LPS および対照群として生理食塩水を投与した SAMP8 に対して、Anti-CD10 (MME) antibody を用い蛍光免疫組織化学染色を行った結果、海馬の CA3 領域において対象群では緑に発光する MME が確認できるが、*P. gingivalis* 由来 LPS 投与群では発光が低下していることが確認された。(A: 対照群, B: *P. gingivalis* 由来 LPS 投与群, C: 対照群の強拡大, D: *P. gingivalis* 由来 LPS 投与群の強拡大)

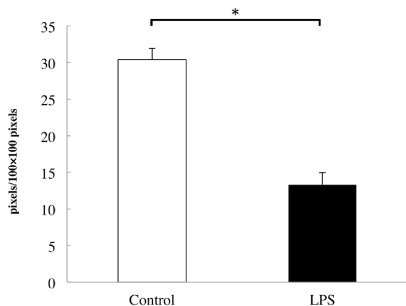


図 3 画像解析・定量評価 (n=3)

P. gingivalis 由来 LPS および対照群として NS を投与した SAMP8 に対して、Anti-CD10 (MME) antibody を用い蛍光免疫組織化学染色し、蛍光強度を画像処理ソフトを用いて定量化し評価した。対照群に比べ *P. gingivalis* 由来 LPS 投与群では有意に MME の発現が低下していることが確認された (* p<0.05)。

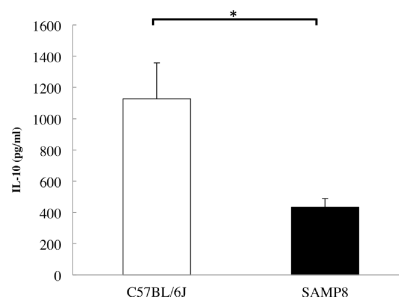


図 4 血中 IL-10 濃度の評価 (n=5)

P. gingivalis 由来 LPS 投与後 1 時間での C57BL/6J マウスと SAMP8 の血中 IL-10 濃度を ELISA 法にて測定した。C57BL/6J と SAMP8 を比べたところ SAMP8 では有意に低下していることが確認された (* p<0.05)。

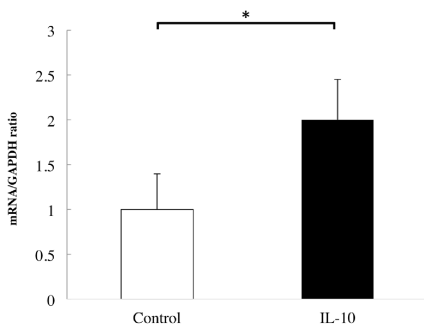


図 5 IL-10 添加によるマウス海馬神経細胞の MME の mRNA 発現解析 (n=3) 海馬神経細胞に IL-10 を添加し 3 日間培養し、全 RNA を抽出し MME の mRNA の発現レベルを測定した結果 IL-10 添加群では対照群に比べて有意な発現増加が認められた (* p<0.05)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森川 哲郎, 植原 治, 原田 文也, Durga Paudel, 大西 綾, 平木 大地, Puja Neopane, Bhoj Raj Adhikari, 宇津宮 雅史, 吉田 光希, 佐藤 惇, 西村 学子, 安彦 善裕
2. 発表標題 マウス海馬のP.gingivalis由来LPS投与による遺伝子発現の網羅的解析
3. 学会等名 第28回日本口腔内科学会・第31回日本口腔診断学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森川 哲郎, 植原 治, 原田 文也, Durga Paudel, 大西 綾, 平木 大地, Puja Neopane, Bhoj Raj Adhikari, 宇津宮 雅史, 吉田 光希, 佐藤 惇, 西村 学子, 安彦 善裕
2. 発表標題 歯周病原菌 P.gingivalis (P.g) 由来 Lipopolysaccharide (LPS)によるマウス海馬の遺伝子発現に与える影響
3. 学会等名 第27回日本口腔内科学会・第30回日本口腔診断学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tetsuro Morikawa, Osamu Uehara, Fumiya Harada, Durga Paudel, Aya Onishi, Daichi Hiraki, Puja Neopane, Bhoj Raj Adhikari, Masafumi Utsunomiya, Koki Yoshida, Jun Sato, Michiko Nishimura and Yoshihiro Abiko
2. 発表標題 Genome-wide analysis of the gene related to Alzheimer's disease in mouse hippocampus stimulated with Lipopolysaccharide derived from P. gingivalis.
3. 学会等名 第65回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植原 治 (UEHARA Osamu) (00709248)	北海道医療大学・歯学部・助教 (30110)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	太田 亨 (OHTA Tohru) (10223835)	北海道医療大学・健康科学研究所・教授 (30110)	
研究 分 担 者	道川 誠 (MICHIKAWA Makoto) (40270912)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授 (23903)	