

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15684

研究課題名(和文) 可視化した歯周病菌の脳内移行ならびに脳炎症惹起機序に関する生体イメージング解析

研究課題名(英文) Analysis of Porphyromonas gingivalis-induced neuroinflammation by multi-photon imaging of microglia dynamics

研究代表者

中西 博 (Nakanishi, Hiroshi)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20155774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：二光子共焦点レーザー顕微鏡を用いて生きたマウスにおいて追跡することでジンジバリス菌の脳内浸潤メカニズムならびに脳炎症惹起メカニズムを解析した。ミクログリアに蛍光タンパク質GFPを発現するCX3CR1マウスを用いた蛍光生体イメージングにより、脳内感染したジンジバリス菌に向けてミクログリアがヌクレオチドの一種UDPに対するP2Y6受容体を介して突起を伸ばし取り囲むことを突き止めた。さらにミクログリアの反応は夜間(マウスの活動期)では昼間(非活動期)と比べて低下していた。突起伸展反応の日内変動は、分子時計によるP2Y6受容体発現量の日内変動に連動していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we have first shown that cortical microglia extend their processes towards focally injected Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis). The focally injected P. gingivalis-induced microglial process extension was significantly increased during the light (sleeping) phase than the dark (waking) phase. In contrast, focally injected ATP-induced microglial process extension was significantly increased during the dark phase than the light phase. Furthermore, in contrast to P2Y12 receptor-mediated mechanism of ATP-induced microglial process extension, P. gingivalis-mediated microglial process extension was mediated by P2Y6 receptors. Therefore, P. gingivalis infiltrated in the brain parenchyma may induce the secretion of UDP from microglia at the site of infiltration, UDP, in turn, induces the process extension of neighboring microglia.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ジンジバリス菌 ミクログリア 生体蛍光イメージング 突起伸展 P2Y6受容体

### 1. 研究開始当初の背景

予備軍を含めると認知症は 800 万人 (65 歳では 4 人に 1 人) いると推定されている。アルツハイマー病の発症を 5 年遅くできた場合、アルツハイマー病患者は半減できるという試算がある。根本的な治療薬のないこともあり、アルツハイマー病を「治す」から「予防する」への転換も注目されている。このアルツハイマー病の予防において、生活習慣の改善による生活習慣の予防が最も重要と考えられている。アルツハイマー病の発症ならびに進展において脳内ミクログリアによって引き起こされる過剰な脳炎症が深く関与していることが知られている。しかし、歯周病はアルツハイマー病の重要な増悪因子であることが示唆されているが、脳内への感染経路ならびに感染した歯周病菌に対するミクログリアの反応についてこれまで十分に分かっていない。

### 2. 研究の目的

マウスにフラビンモノヌクレオチド結合蛍光タンパク質を過剰発現させることで可視化したジンジバリス菌を口腔感染し、二光子共焦点レーザー顕微鏡を用いて生きたマウスにおいて追跡することでジンジバリス菌の脳内浸潤メカニズムならびに脳炎症惹起メカニズム明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

二光子共焦点レーザー顕微鏡を用いて口腔感染した可視化したジンジバリス菌を追跡することで以下の 2 点を研究期間内に明らかにする。①ジンジバリス菌が脳内に移行する様子を捉える。さらに、②脳内に浸潤したジンジバリス菌が脳内ミクログリアを活性化し、脳炎症を惹起する様子を捉える。

### 4. 研究成果

① ジンジバリス菌が脳内に移行する様子を捉える：ジンジバリス菌におけるフラビンモノヌクレオチド結合蛍光タンパク質の過剰発現は当初計画通りに進めたが、蛍光強度が弱く二光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた生体内での検出には至らなかった。そこで次に蛍光色素で直接的にジンジバリス菌を可視化する方法も検討した。培養系では蛍光色素で可視化されたジンジバリス菌をミクログリアが貪食する様子を観察することができた。しかし、生体イメージング法では蛍光色素で可視化したジンジバリス菌を捉えることはできなかった。

② 脳内に浸潤したジンジバリス菌が脳内ミクログリアを活性化し、脳炎症を惹起する様子を捉える：次に、ミクログリアに蛍光タンパク質 GFP を発現する遺伝子改変マウスである CX3CR1-GFP マウスを用いた蛍光生体イメージング法により、脳内に注入したジン

ジバリス菌に対するミクログリアの反応を解析した。その結果、脳内に局所注入したジンジバリス菌に向けて注入部周囲のミクログリアが突起を伸展した。興味深いことに、ジンジバリス菌の注入により誘発されるミクログリアの突起伸展反応は夜間 (ZT14: マウスの活動期) では昼間 (ZT2: 非活動期) と比べて有意に低下していた (図 1)。

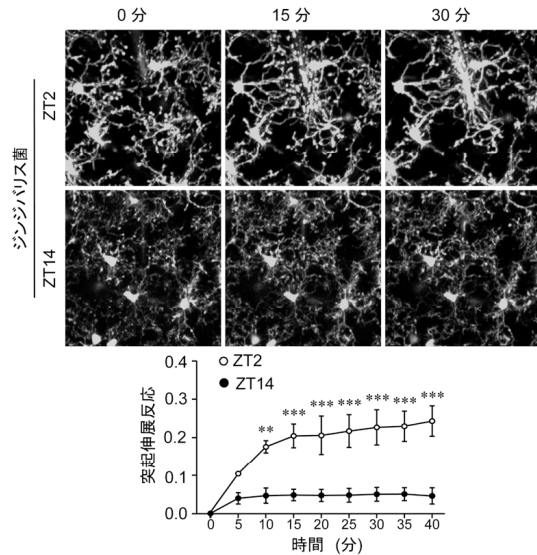


図1 ジンジバリス菌の注入により誘発されるミクログリアの突起伸展とその日内変化

さらに、ジンジバリス菌の注入により誘発されるミクログリアの突起伸展反応はヌクレオチドの一種 UDP に対する P2Y<sub>6</sub> 受容体の選択的阻害剤 MRS2578 により有意に抑制された。また、UDP の注入により同様にミクログリア突起伸展が惹起された。また、ジンジバリス菌と共培養することでミクログリアは UDP を産生分泌することが明らかとなった (図 2)。

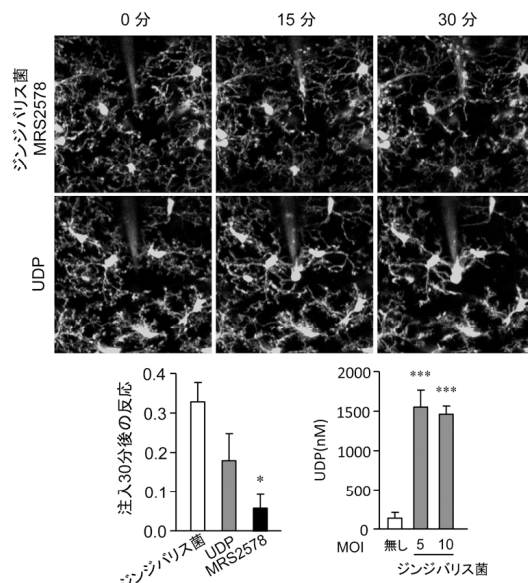


図2 ジンジバリス菌の注入により誘発されるミクログリアの突起伸展はUDP-P2Y<sub>6</sub>受容体を介した反応

以上の結果より脳内に感染したジンジバリス菌は局所のミクログリアに UDP を産生分泌させ、拡散した UDP は周囲のミクログリアの P2Y<sub>6</sub> 受容体を活性化することで突起伸展を誘発することが明らかとなった。さらに、ミクログリアの突起伸展反応は日内変化を示した。この日内変化はミクログリアの分子時計による P2Y<sub>6</sub> 受容体発現量の日内変化に連動していると考えられる (図 3、Takayama et al. *Sci Rep* 6 : 30006)。ミクログリアはジンジバリス菌を食食し、その活性化が脳炎症を引き起こす。このため、P2Y<sub>6</sub> 受容体発現量の日内変動が、脳炎症が起こると不都合な時間帯 (ニューロン活動の活発な活動期) にミクログリアがジンジバリス菌を食べることを規制するゲート機構になっていると考えられる。

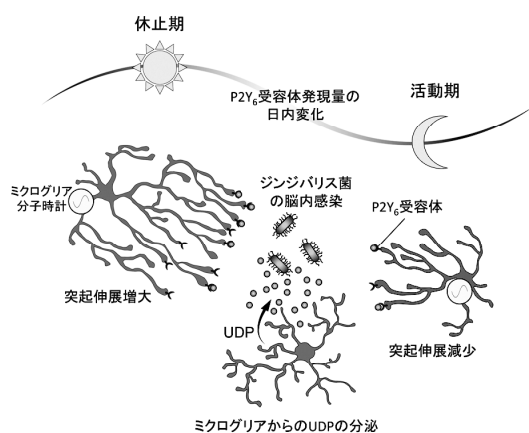


図3 シンジバリス菌の脳内感染により誘発されるUDP-P2Y<sub>6</sub>受容体を介したミクログリアの突起伸展反応の日内変化

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Ni J, Wu Z, Meng J, Zhu A, Zhong X, Wu S, Nakanishi H. The neuro-protective effects of Brazilian Green Propolis on neurodegenerative damage in human neuronal SH-SY5Y cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2017:7984327, 2017. doi: 10.1155/2017/7984327.
- ② Harada Y, Takayama F, Tanabe K, Ni J, Hayashi Y, Yamamoto K, Wu Z, Nakanishi H. Overexpression of cathepsin E interferes with neuronal differentiation of P19 embryonal teratocarcinoma cells by degradation of N-cadherin. *Cell Mol Neurobiol* 37, 437-443, 2017. doi: 10.1007/s10571-016-0376-x.
- ③ Wu Z, Yu J, Zhu A, Nakanishi H. Nutrient, microglia aging, and brain aging. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 7498528, 2016. doi: 10.1155/2016/7498528.

- ④ Li X, Wu Z, Ni J, Liu Y, Meng J, Yu W, Nakanishi H, Zhou Y. Cathepsin B regulates collagen expression by fibroblasts via prolonging TLR2/NF-kB activation. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 7894247, 2016. doi: 10.1155/2016/7894247.
- ⑤ Takayama F, Hayashi Y, Wu Z, Liu Y, Nakanishi H. Diurnal dynamic behavior of microglia in response to infected bacteria through the UDP-P2Y<sub>6</sub> receptor system. *Sci Rep* 6: 30006, 2016. doi: 10.1038/srep30006.
- ⑥ Hayashi Y, Morinaga S, Zhang J, Satoh Y, Meredith A, Nakata T, Wu Z, Kohsaka S, Inoue K, Nakanishi H. BK channels in microglia are required for morphine-induced hyperalgesia. *Nat Commun* 7: 11687, 2016. doi: 10.1038/ncomms11697.
- ⑦ Hayashi Y, Morinaga S, Liu X, Zhang J, Wu Z, Yokoyama T, Nakanishi H. An EP2 agonist facilitates NMDA-induced outward currents and inhibits dendritic beading through activation of BK channels in mouse cortical neurons. *Mediators Inflamm* 2016, 5079597, 2016. doi: 10.1155/2016/5079597.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Yicong Liu, Zhou Wu, Hiroshi Nakanishi, Gingipains induce microglial migration through activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2)、2017年3月24日、95th Annual Meeting of International Association for Dental Research (IADR2017), San Francisco (USA)
- ② Jie Meng, Junjun Ni, Zhou Wu, Aiqun Zhu, Hiroshi Nakanishi, IL-10 plays a pivotal role in anti-inflammatory effects of *Pheum tanguticum* in activated microglia、2017年3月17日、第90回日本薬理学会年会、長崎ブリックホール (長崎)
- ③ 武 洲、中西 博、歯周病と認知機能：増悪機序の解明と今後の展望、2017年3月17日、第90回日本薬理学会年会 (年会企画シンポジウム：口腔ブレインサイエンスに学ぶ健康長寿)、長崎新聞文化ホール (長崎)
- ④ Yicong Liu, Zhou Wu, Tomoko Kadowaki, Hiroshi Nakanishi, The critical roles of gingipains in cell migration and inflammatory response of microglia through activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2)、2017年3月17日、第90回日本薬理学会年会、長崎ブリックホール (長崎)
- ⑤ Ryo Okada, Yuka Harada, Zhou Wu, Ryo Yamasaki, Hiroshi Nakanishi, Possible involvement of cathepsin H in the negative regulation of T cell activation in experimental autoimmune

encephalomyelitis (EAE), 2016年12月3日、第21回グリア研究会、千里ライフサイエンスセンター (大阪)

- ⑥ Junjun Ni, Zhou Wu, Hiroshi Nakanishi, Microglia facilitate brain aging and cognitive impairment through cathepsin B-dependent oxidative and inflammatory responses, 2016年12月3日、第21回グリア研究会、千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- ⑦ 劉 訳聡、武 洲、門脇知子、中西 博、Arg- ならびに Lys-gingipain による protease-activated receptor-2 (PAR-2) の活性化を介したミクログリアの細胞遊走誘導、2016年11月26日、第69回日本薬理学会西南部会、松山大学 (愛媛)
- ⑧ 孟ジェイ、武 洲、朱 愛琴、中西 博、ミクログリアにおけるIL-10産生分泌を介したRheum tanguticumの抗炎症作用、2016年11月26日、第69回日本薬理学会西南部会、松山大学 (愛媛)
- ⑨ Hiroshi Nakanishi, Pathological roles of microglial cathepsins in chronic pain, XVth Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control (招待講演) 2016年9月20日、Portrz, Slovenia
- ⑩ 武 洲、中西 博、歯周病菌感染による脳内アルツハイマー様病態の誘発メカニズム、第58回歯科基礎医学会学術大会 (サテライトシンポジウム: 健康長寿社会を目指す口腔ブレインサイエンスの最前線)、2016年8月24日、札幌コンベンションセンター (札幌)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

[http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/koza/koku\\_jotai\\_seigyo/koku\\_kinou\\_bunshi/kenkyugaiyo.html](http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/koza/koku_jotai_seigyo/koku_kinou_bunshi/kenkyugaiyo.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 博 (Nakanishi, Hiroshi)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号：20155774

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

高山 扶美子 (TAKAYAMA, Fumiko)