

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H03014

研究課題名(和文) マイクロRNAを切り口とした歯周病・糖尿病によるアルツハイマー病への影響

研究課題名(英文) Effects of periodontitis and diabetes on Alzheimer disease; aspects of miRNA

研究代表者

江國 大輔 (Ekuni, Daisuke)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：70346443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ワイルドタイプおよびアルツハイマー病(AD)モデルタイプマウスを用いて、歯周病と糖尿病がADに与える影響を調べることであった。それぞれのタイプの6ヶ月齢雄性マウスを使用し、対照群、歯周病群、糖尿病群、歯周病+糖尿病群の4群に分けた。ADマウスでのみ、対照群と歯周病+糖尿病群の間に有意差があった。統合解析の結果から、miR-693-3pとNeurogenic differentiation 1 (Neurod1)に着目した。免疫染色を行い、脳内でのNeurod1の発現を調べたところ、対照群と比較して歯周病+糖尿病群では発現量が少なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症は日本を含む各国の大きな健康課題である。認知症の原因の7割を占めるアルツハイマー病のメカニズムは不明な点が多。近年、遺伝子発現を調節するマイクロRNAが注目されるようになり、新しい診断マーカーや治療ターゲットとして研究が進んでいる。本研究結果から、歯周病と糖尿病の複合作用によって、遺伝子レベルとタンパク質レベルの両方で、脳におけるNeurod1の発現が抑制されていたことがわかった。miR-693-3pとNeurod1による制御がアルツハイマー病の促進に関与していることが示唆された。歯周病と糖尿病によるアルツハイマー病促進のメカニズムの解明に貢献できる可能性があり、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effects of periodontitis and diabetes on Alzheimer disease (AD) using wild-type mice and AD model mice. In each type, 6-month-old mice were used. The mice were divided into 4 groups: control, periodontitis, diabetes, and periodontitis + diabetes groups. In only AD mice, there is a significant difference in Y-maze test between the control and periodontitis + diabetes groups. We focused on miR-693-3p and Neurogenic differentiation 1 (Neurod1) based on a result of miRNA-mRNA pairing analysis. In mice brain, the expression level of Neurod1 in the periodontitis + diabetes group was smaller than that in the control group.

研究分野：社会歯科学

キーワード：マイクロRNA アルツハイマー病 歯周病 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

認知症は、日本を含む各国の大きな健康課題である。認知症の原因の7割を占めるのがアルツハイマー病で、世界的に最も多い神経変性疾患である (Plassman et al., 2007)。世界のアルツハイマー病の患者数は2050年に1億人を超えると予想されており (Brookmeyer et al., 2007)。その治療だけでなく、発症予防と早期発見の重要性が認識されている。

アルツハイマー病の発症メカニズムは不明な点が多いが、二つの説が有力視されている(神経毒性を持つアミロイドベータの凝集が発症の引き金となる説、および過剰にリン酸化されたタウタンパク質の蓄積による神経原繊維変化であるという説)。しかし、これらをターゲットにした新薬の治験の成功率は極めて低く、承認数は少ないのが現状である。さらなるメカニズムの解明が待たれる。一方、アルツハイマー病のリスク因子には慢性炎症(歯周病など)・生活習慣病(糖尿病など)などが挙げられる (Hersi et al., 2017) が、データが不足している。

近年、遺伝子発現を調節するマイクロRNAが注目されるようになり、新しい診断マーカーや治療ターゲットとして研究が進んでいる。アルツハイマー病においても、抗マイクロRNAが新しい治療薬となりうることが示唆されている (Zhao et al., 2016)。一方、申請者らのグループは、ラット歯周病モデルで血清中のマイクロRNA発現が歯周病の病態によって変動することを明らかにした (Tomofuji et al., 2016)。また、その中には、アルツハイマー病に関連するマイクロRNA (Delay et al., 2011) が含まれていた。しかし、マイクロRNAを切り口とした歯周病・糖尿病とアルツハイマー病との関連を調べた研究は少ない。

そこで、本研究課題では「歯周病によって歯周組織に生じたマイクロRNAが、血液を介して脳の遺伝子発現に異常を来し、その結果、アルツハイマー病が発症・重症化する。さらに、血液中のマイクロRNAの増加は糖尿病によっても起こり、歯周病由来のマイクロRNAと相加・相乗効果がある。」という学術的な問いを設定した。この問いを解決できれば、アルツハイマー病の発症予防・重症化予防に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ワイルドタイプおよびアルツハイマー病モデルモデルマウスを用いて、歯周病と糖尿病がアルツハイマー病の発症・進行にどのような影響を与えるかを、マイクロRNAを切り口に調べることであった。

3. 研究の方法

1. ワイルドタイプマウスを用いた研究

1) 6ヶ月齢の雄のワイルドタイプマウスを使用し、対照群、歯周病群、糖尿病群、歯周病+糖尿病群の4群とした。

対照群は通常食で飼育した。歯周炎群にはベースライン時に両側上顎第二臼歯と下顎第一臼歯に歯周病を惹起させるため絹糸を巻いて(イソフルランによる吸入麻酔下で巻く)、通常食を与えた。糖尿病群は高脂肪高蔗糖食 (D12331; 58 kcal% fat from coconut oil + 28 kcal% sucrose, Research Diet) を与えた。歯周病+糖尿病群では、絹糸を臼歯に巻き付けて歯周炎を惹起して高脂肪高蔗糖食を与えた。

2) ベースライン、1ヶ月後、2ヶ月後にY字型の迷路試験を行い、認知機能を確認した

(Saito et al., 2014)

- 3) 2 ヶ月後にマウスを屠殺して、脳を摘出した。
- 4) 脳の病理標本を用いて、アミロイドベータの発現について免疫組織学的検討を行った。

2 . アルツハイマー病モデルマウスを用いた研究

- 1) 6 か月齢の雄のアルツハイマー病モデルマウス(B6-AppNL-F/NL-F/J, B6-AppNL-G-F/NL-G-F/J) を使用し、同様に 4 群とした。
- 2) ベースライン、1 ヶ月後、2 ヶ月後に Y 字型の迷路試験を行い、認知機能を確認した。
- 3) 2 ヶ月後にマウスを屠殺して、脳を摘出した、脳の一部は病理組織学的評価用に、残りは遺伝子解析用に分けて保存した。
- 4) 脳におけるマイクロ RNA およびメッセンジャー RNA の発現を網羅的に解析するため次世代シーケンスを用いて探索した。それぞれ 1.5 倍以上変動したものを選択して、統合解析を行った。
- 5) 脳の病理標本を用いて、アミロイドベータおよび次世代シーケンスの解析結果をもとにした関連シグナル発現について免疫組織学的検討を行った。

4 . 研究成果

1 . ワイルドタイプマウスを用いた研究

- 1) Y 字型の迷路試験を行い、対照群、歯周病群、糖尿病群、歯周病 + 糖尿病群の 4 群比較を行った。Tuckey 法による統計分析を行った結果、4 群間に有意な差はなかった($P > 0.05$)。
- 2) 摘出した脳標本上のアミロイドベータ発現を調べた。4 群とも発現は認められなかった。

2 . アルツハイマー病モデルマウスを用いた研究

- 1) Y 字型の迷路試験を行い、対照群、歯周病群、糖尿病群、歯周病 + 糖尿病群の 4 群比較を行った。B6-AppNL-F/NL-F/J マウスを用いた場合、4 群間に有意な差はなかった($P > 0.05$)。次に、B6-AppNL-G-F/NL-G-F/J マウスを用いた場合の結果を図に示す。Tuckey 法による統計分析を行った結果、対照群と歯周病 + 糖尿病群の間に有意な差が認められた($P = 0.011$)。

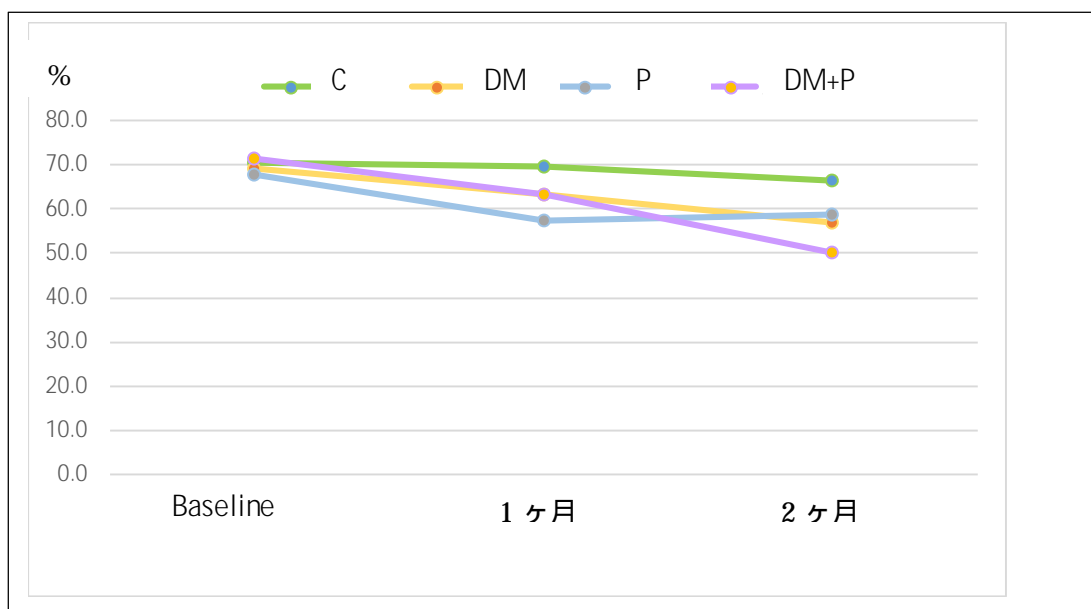


図 5 Y 字型の迷路試験の結果

C; 対照群、DM; 糖尿病群、P; 歯周炎群、DMP; 糖尿病 + 歯周炎群

2) B6-AppNL-G-F/NL-G-F/J マウスの脳におけるマイクロ RNA とメッセンジャーRNA の発現について、次世代シーケンスを用いて統合解析した結果、対照群と歯周病 + 糖尿病群との間で 1.5 倍以上の変動があったメッセンジャーRNA は 1466 個であった。統合解析の結果、6 種類のメッセンジャーRNA が選択された。もっとも発現比が減少した Neurogenic differentiation 1 (Neurod1 ; 脳の発生過程でニューロン産生に関わる遺伝子) に着目した。これを制御するマイクロ RNA は miR-693-3p であり、その発現が対照群と比較して歯周病 + 糖尿病群では、増加していた。

3) B6-AppNL-G-F/NL-G-F/J マウスの脳の病理標本を用いて、アミロイドベータおよび次世代シーケンスの解析結果をもとにした関連シグナル発現について免疫組織学的検討を行った。

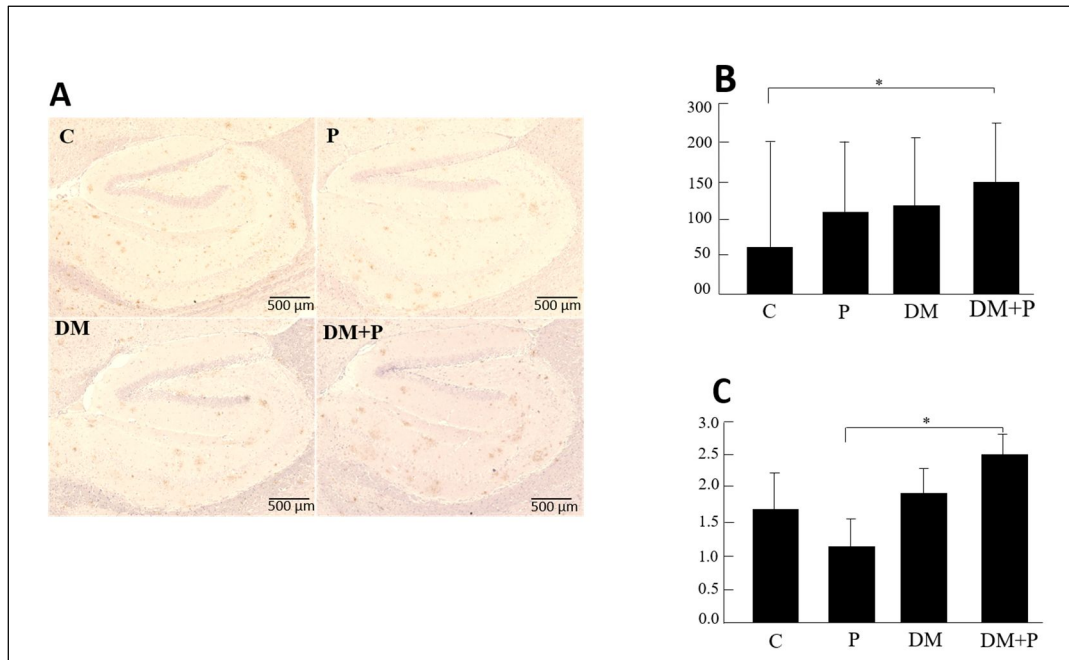


図6 アミロイドベータの免疫染色の結果

C; 対照群、DM; 糖尿病群、P; 歯周炎群、DMP; 糖尿病 + 歯周炎群

A : 免疫染色像 B : アミロイドベータ沈着数 C : アミロイドベータ沈着面積

*t 検定 (P<0.05)

パラフィン包埋を行った脳から、薄切切片を作製した。先行研究で使用されているアミロイドベータの 1 次抗体を購入して、予備染色の結果をもとに、免疫染色を行った。その結果、歯周病 + 糖尿病群の海馬におけるアミロイドベータの集積部位数は、対照群と比較して有意に高値を示した。また、Klüver-Barrera 染色を行い、神経細胞数を計測した。その結果、歯周病 + 糖尿病群の海馬における神経細胞数は、対照群と比較して低値を示した。

4) Neurod1 抗体を用いて免疫染色を行い、海馬における発現を調べた。その結果、対照群と比較して歯周病 + 糖尿病群では、発現量が少なかった。遺伝子レベルとタンパク質レベルの両方で、Neurod1 の発現が抑制されており、miR-693-3p と Neurod1 による制御がアルツハイマー病の促進に関与していることが示唆された。歯周病と糖尿病によるアルツハイマー病促進のメカニズムの解明に貢献できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Islam Md Monirul, Daisuke Ekuni, Kota Kataoka, Daiki Fukuhara, Yoko Uchida-Fukuhara, Momoko Nakahara, Manabu Morita
2. 発表標題 Effects of diabetes mellitus and periodontitis on Alzheimer disease
3. 学会等名 第70回日本口腔衛生学会総会
4. 発表年 2021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	森田 学 (Morita Manabu) (40157904)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	友藤 孝明 (Tomofuji Takaaki) (80335629)	朝日大学・歯学部・教授 (33703)	
研究分担者	片岡 広太 (Kataoka Kota) (80744185)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	米田 俊樹 (Yoneda Toshiki) (60756071)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------