

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23030

研究課題名(和文)脳に到達した歯周病原菌の細胞外小胞は、アルツハイマー病の発症・進行に関与するか？

研究課題名(英文)Are extracellular vesicles of periodontal pathogens that reach the brain involved in the onset and progression of Alzheimer's disease?

研究代表者

瀬山 真莉子(SEYAMA, Mariko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：30875787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Porphyromonas gingivalis (Pg) の細胞外小胞(outer membrane vesicles, OMVs)に着目し、歯周病とアルツハイマー病との関連性を検証した。Pg OMVs 投与マウスの認知機能に異常は認められなかった。同マウスの脳では、Pg OMVs含有gingipainや、ミクログリア活性化が検出された。脳萎縮や脱髄などの病的所見は認められなかった。ヒトミクログリア細胞株HMC-3において、Pg OMVsはgingipain 依存的に炎症性サイトカインの遺伝子発現を亢進した。以上は、Pg OMVsがアルツハイマー病に関与する可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、歯周病がアルツハイマー病を悪化させる分子機序や科学的根拠の一端が提示された。この結果を社会に還元し、「アルツハイマー病の予防・治療における、口腔ケア(口腔健康管理)や歯周治療の重要性」を啓発して行きたい。

研究成果の概要(英文)：Periodontal diseases affect the pathology of Alzheimer's diseases, whereas the molecular mechanisms have not been elucidated. In this study, we verified whether OMVs released from Porphyromonas gingivalis (Pg OMVs) implicated in Alzheimer's diseases. The injection of Pg OMVs for 12 weeks did not affect the cognitive function in the mice. In the brain of Pg OMVs-injected mice, the gingipains contained on Pg OMVs were detected, and microglia were activated. The pathological findings such as atrophy and demyelination were not observed. In human microglia HMC-3 cells, Pg OMVs decreased the gene expression of inflammatory cytokines. These results suggested that Pg OMVs which were produced in periodontal diseases may affect Alzheimer's diseases by delivering their virulence factor gingipains to the brain.

研究分野：歯周病

キーワード：歯周病原菌 アルツハイマー病 細胞外小胞 神経炎症 ミクログリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会である本邦では、2025年には認知症を患う高齢者が約700万人になると推計されており、その約半数を占めるアルツハイマー病の病態解明と有効な予防・治療法の開発は喫緊の課題である。多くの疫学的研究により、歯周病がアルツハイマー病の発症リスクを高めることが報告されているが、その詳細な分子機構は未だ不明である。

一方で、歯周病は歯周病菌感染により起こる口腔内疾患でありながら、認知症や糖尿病、呼吸器疾患などの多種の全身疾患発症リスクを上げる。我々は、「口腔と全身を繋ぎ、全身の病態を制御する歯周病由来の因子があるはず」と考え、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg)が分泌する膜小胞 (Outer membrane vesicles, OMVs) に着目した。歯周病原菌の OMVs は、互いの細菌同士に作用して歯垢形成を促進し、歯肉上皮細胞の増殖や付着を抑制して、歯周病を進行させる。しかしながら、歯周病菌の OMVs が全身性疾患に及ぼす影響については、ほとんど研究されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Pg OMVs がアルツハイマー病を悪化させるか検討し、その分子機構を解明することである。

3. 研究の方法

(1) Pg OMVs 抽出

Porphyromonas gingivalis ATCC33277 (以下, Pg) を 0.5 % yeast extract, 10 mg/mL hemin, 1 mg/mL 2-methyl-1, 4-naphthoquinone (vitamin K3) を含む Brain Heart Infusion 培地を用いて、インキュベーター中で 37 °C, 72 時間嫌気培養した。上清を回収し、0.22 µm Ministart NML/HY/SRP (Satorius, Germany) を用いて濾過した。得られたサンプルを Amicon Ultra-15 Centrifugal filters (Merck, Germany) を用いて濃縮し、Total Exosome isolation (Invitrogen, USA) を用いて Pg OMVs を抽出した。

(2) マウスの行動解析

マウス (Balb/c, 雌, 30 週齢) の腹腔内に、Pg OMVs (5 mg protein/匹) を週 2 回の頻度で 12 週間連続投与した。マウスの認知機能を、オープンフィールド試験と Y 字型迷路試験により判定した。オープンフィールド試験では、40 cm 角のオープンフィールド中央に 20 cm 角の枠を設定した。フィールド周囲を探索する回数 (回転数) から自発運動量を、中央枠内への侵入時間から不安や恐怖などの情動機能を判定した。Y 字型迷路試験では、マウスが各アームに侵入した回数 (総アーム進入回数) と、連続して異なるアームに進入した回数から、交替行動率 (交替行動率 (%) = 交替行動数 ÷ (総アーム進入回数 - 2) × 100) を算出し、短期記憶について評価した。

(3) 脳組織における Pg OMVs の検出及び病態変化

Pg OMVs を腹腔内に連続投与したマウスから脳を摘出し、1.5 µm 厚の連続組織切片を作成した。抗ジンジパイン抗体を用いて免疫染色を行った。また、Hematoxylin-Eosin 染色 (以下, HE 染色) や Kluver-barrera 染色 (KB 染色) により、ニューロンの脱髄や脳萎縮を判定した。ミクログリアに特異的に発現する蛋白質である Iba1 に対する免疫染色を行い、ミクログリアの形態変化を観察した。

(4) ミクログリアにおける *Pg* OMV の炎症誘導能

ヒトミクログリア細胞株 HMC-3 を用いて通法に従い培養した。*Pg* OMVs を添加し、3 時間後に RNAiso Plus (TaKaRa Bio Inc, Japan) を用いて RNA を抽出した後、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix を用いて cDNA を作製した。炎症に関与する遺伝子 (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-a) の発現をリアルタイム PCR 法で検出した (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems)。

4. 研究成果

(1) マウスの行動解析

マウスは通常、広い新奇環境下に置かれた場合、探索行動を行い、オープンフィールド装置内の周辺部を好んで歩行する行動パターンを示す。つまり、認知機能が正常であれば、周回数は多くなり、中央枠内に留まる時間は短くなる。

各群における周回数は、PBS 投与群で 4.50 ± 2.43 、*Pg* OMVs 投与群 2.11 ± 1.79 であり、有意差は無かった ($p=0.063$ 、図 1a)。枠内停滞時間は、PBS 投与群で 13.00 ± 12.85 (秒)、*Pg* OMVs 投与群 29.69 ± 20.47 (秒) であり、有意差は無かった ($p=0.122$ 、図 1b)。

マウスは、新規性を好み、直前に行ったところは避けるという習性がある。空間認知・記憶が弱くなると、同じアームに何度も入ったり、直前に侵入したアームに再度入るようになる。この習性を利用して、Y 字型迷路試験では作業記憶率を評価する。つまり、認知機能が正常であれば、交替行動率は高くなる。各群における交替行動率は、PBS 投与群で 54.61 ± 10.64 、*Pg* OMVs 投与群 62.79 ± 8.54 であり、有意差は無かった ($p=0.171$ 、図 1c)。

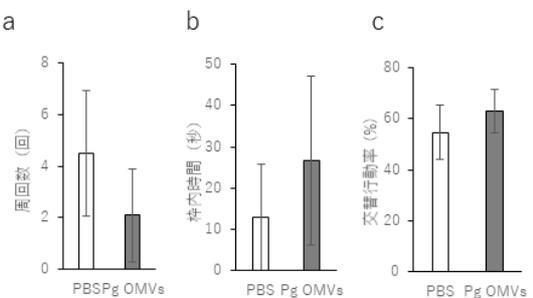


図1 行動試験結果

(2) 脳組織における *Pg* OMVs の検出及び病態変化

Pg OMVs 投与群のマウス脳において、側脳室周辺、脈絡叢から gingipain 陽性の反応が見られた。側脳室周辺と、その近隣にある海馬において Iba1 に強陽性のミクログリアが検出された。*Pg* OMVs 投与群では、アメーバ状に形態変化したミクログリアが多く観察された (現在、論文投稿準備中)。

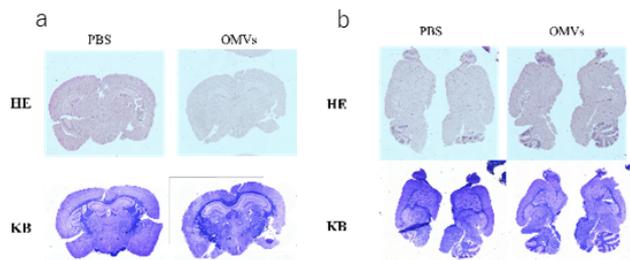


図2 マウス脳のHE染色・KB染色

HE 染色や KB 染色の結果より、各群の脳前頭断面図および矢状断面図において脳の萎縮や脱髄などは認められなかった (図 2)。

(3) ミクログリアにおける *Pg* OMV の炎症誘導能

HMC-3 細胞において、*Pg* OMVs 添加群では、PBS 群と比較して IL-6, IL-8, TNF- α の遺伝子発現の亢進が認められた。Gingipain 欠損型 *Pg* から抽出した OMVs では、これらの遺伝子発現の亢進は認められなかった (現在、論文投稿準備中)。

以上の結果より、*Pg* OMV は今回の投与条件 (期間・頻度・濃度) ではマウス認知機能に影響を及ぼさないと結論した。一方で、脳組織における解析から、*Pg* OMV は gingipain をマウス脳へ移行させ、神経炎症を亢進させると考えられた。また、培養マイクログリアでの解析結果より、

Pg OMV が含有する *gingipain* が神経炎症を誘導すると示唆された。歯周病がアルツハイマー病の発症リスクを高める機序をさらに詳細に追及するために、*Pg* OMVs の投与条件や行動試験手技を改善し、マウス認知機能に対する長期的影響を再検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Kayo, Yoshida Kaya, Fujiwara Natsumi, Seyama Mariko, Ono Kisho, Kawai Hotaka, Guo Jiajie, Wang Ziyi, Weng Yao, Yu Yaqiong, Uchida-Fukuhara Yoko, Ikegame Mika, Sasaki Akira, Nagatsuka Hitoshi, Kamioka Hiroshi, Okamura Hirohiko, Ozaki Kazumi	4. 巻 1867
2. 論文標題 Extracellular vesicles of <i>P. gingivalis</i> -infected macrophages induce lung injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 166236 - 166236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2021.166236	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 吉田 佳世, 吉田 賀弥, 瀬山 真莉子, 尾崎 和美
2. 発表標題 歯周病原菌感染マクロファージの細胞外小胞が肺炎を誘導する可能性の検証
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------