

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03109

研究課題名(和文) 歯周病原細菌感染症としての精神疾患発症機構の解明

研究課題名(英文) Identification of novel mechanism associating psychiatric disorders with periodontitis

研究代表者

照沼 美穂 (Terunuma, Miho)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50615739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内感染症である歯周病は、うつ病との関連性が示されている。しかし、口腔内細菌が脳内に及ぼす影響やうつ病発症機序を示す報告はほとんどない。申請者は、歯周病患者が一過性に菌血症を発症することに着目し、グラム陰性嫌気性菌である *Poryphromonas gingivalis* 菌 (Pg菌) をマウスの尾静脈から投与した菌血症マウスを作製して脳内や行動の解析を行った。その結果、菌血症マウスがうつ様行動を示すことを確認し、さらに視床下部および正中隆起における神経炎症や細胞形態の変化、血管透過性の亢進などを見出した。また、炎症を誘導するシグナルの阻害剤を投与するとマウスのうつ様行動が軽減することも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は古くから知られている口腔内疾患であるが、様々な身体的疾患との関連性が言われ始めたのは最近のことである。本研究は日本国内で増加しているうつ病に着目し、歯周病原細菌が直接的にうつ病発症に関わることを明らかにすることを目的に行った。歯周病患者の口腔内清掃や歯科治療時に菌血症を一過性に発症することが知られていることから、本研究では歯周病原細菌性菌血症マウスを作製し、このマウスがうつ様行動を示すことを明らかにしたほか、その原因にまで追求している。本研究の成果は、歯周病の予防や歯科治療の重要性を発信することにつながる。

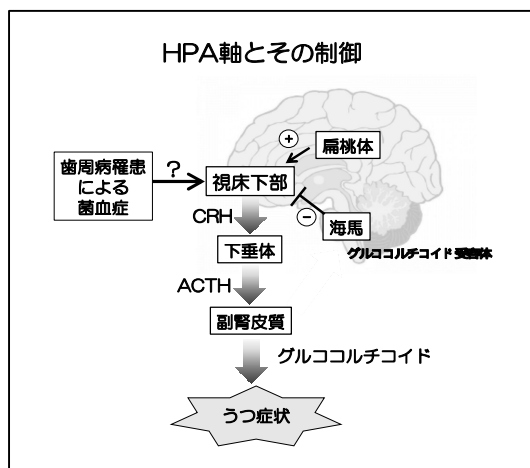
研究成果の概要(英文)：Periodontitis is known to be associated with depression. However, how oral microbiota affects brain function is largely unknown. We thus developed mouse model of bacteremia by injecting *Poryphromonas gingivalis* through tail vein and examined their behavior and the brain. We found that bacteremic mice express depressive-like behavior. Furthermore, we found neuroinflammation in the hypothalamus and median eminence, altered cell morphology in these region as well as increased vascular permeability. In addition, we observed reduced depressive-like behavior by injecting some anti-inflammatory drugs.

研究分野：神経化学、生化学、薬理学

キーワード：歯周病 Pg菌 うつ様行動 グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

感染症の1つである歯周病は、グラム陰性嫌気性菌であるPg菌を含むいくつかの口腔内細菌が炎症を惹起することで発症すると考えられている。アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病、うつ病などの精神・神経疾患は、脳の炎症所見である神経炎症が認められる疾患であり、感染症の1つである歯周病との関連性が報告されてきた(Schwarz et al, *J Neurol*, 2006; Laforgia et al, *Int J Med Sci*, 2015; Harding et al, *Front Aging Neurosci*, 2017)。しかし、これらの研究はほとんどが限られた集団における疫学研究に止まっており、歯周病原細菌感染による脳疾患発症の病態生理学的な分子機序の解明は十分になされていない。AD患者の脳からPg菌の16s rRNAやPg菌産生タンパク質分解酵素ジンジパインが検出されたこと(Dominy et al, *Science Advances*, 2019)、そして、口腔内細菌は歯科治療や歯磨きなどでも血液中に侵入し、菌血症を発症させる(Daly et al, *J Periodontol*, 2001; Lockhart et al, *Circulation*, 2008)ことから、申請者は、「血管内に侵入したPg菌は脳に作用する」との仮説を立てた。Pg菌をマウスの尾静脈から直接注入して脳の炎症の有無を免疫組織学的に観察したところ、Pg菌の注入後24時間で、中枢の免疫担当細胞が視床下部で顕著に増加した。このことから、Pg菌性菌血症により、視床下部は機能変化するのではないかと考えた。また、視床下部はストレス反応の中核でもあり、視床下部-下垂体-副腎皮質系(HPA軸)を介した内分泌反応の亢進は、うつ病の発症と深く関連している(Selye, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1998; Otte et al, *Nat Rev Dis Primers*, 2016)。そこで、歯周病原細菌性菌血症によるうつ様行動には、HPA軸が関与すると考えた。



2. 研究の目的

本研究は、()細菌の何が視床下部の炎症に関与するのか、()視床下部における細菌の局在の有無や炎症の開始点、()血液脳関門の有無による視床下部炎症の違い、の3つを明らかにし、Pg菌が視床下部の炎症を惹起する分子基盤に迫ることを目的とする。加えて、Pg菌による視床下部の炎症とうつ症状との関連性も明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 菌血症モデルマウスの作製

白色マウス(Balb/cマウス)の尾静脈からPg菌を注入したPg菌性菌血症マウスを研究に用いた。歯周病患者では、菌血症は断続的に発症すると考えられることから、Pg菌を複数回投与するプロトコルを作成した。

(2) Pg菌の検出

血液中のPg菌は、血液寒天培地に塗布して培養することで検出した。マウスの組織内のPg菌は、16s rRNA解析を行って、その存在の有無を検討した。

(3) 視床下部の炎症の評価

視床下部のミクログリア数や形態の変化、サイトカインなどの炎症マーカーの測定をqPCRや免疫組織染色にて検討した。

(4) 炎症部位における血管の観察と血管外漏出の有無の確認

血管構成細胞のタイトジャンクションを構成するclaudinやoccludinの発現量を免疫組織染色法にて検討したほか、血管内皮細胞と接する細胞の形態変化を観察した。また、有窓血管のマーカーの発現量も検討した。血管のバリア機能は、尾静脈から注入したHRPやデキストランの血管外漏出の有無によって破綻の有無を評価した。また、正中隆起上部に位置する第3脳室を構成する細胞の発現量なども免疫組織学的に検討した。

(5) マウスの行動解析

Pg 菌性菌血症マウスのうつ様行動の有無は、うつ様行動評価に用いられる強制水泳試験、学習記憶試験、自発運動活性測定、尾懸垂試験、ショ糖優先試験を行い、精神状態を評価した。同時に体重変化、食欲なども解析した。

4 . 研究成果

(1) Pg 菌投与マウスの視床下部炎症と免疫応答の経時的解析

Pg 菌の濃度および投与回数を変えながら確実にかつ安定的に視床下部に炎症が生じるプロトコルを確立した。Pg 菌を静脈内に投与すると、Pg 菌は投与後 1 時間の血液内では生存していたが、24 時間以内に消滅することがわかった。また、糞便中に Pg 菌は検出されなかった。

このマウスでは、視床下部底部に位置する、バリア機能を有する血液脳関門を持たず、直接血中の物質に暴露される脳室周囲器官の 1 つである正中隆起において炎症が亢進していた。この部位は、マウスの尾静脈から horseradish peroxidase(HRP)を注入して追跡すると、HRP は正中隆起で強く検出された場所と一致していた(Ueno et al, *Acta Neurol Scand* 1994; *Neuropathol* 2000)。また、脾臓の肥大も認められた。しかし、これまで炎症の報告がある肝臓には炎症所見は認められなかった。視床下部の炎症所見の他にも、血液中での複数の炎症性サイトカインの亢進も認められた。さらに、正中隆起の血管透過性の亢進、つまりはバリア機能の破綻も確認できた。

視床下部および正中隆起の炎症所見としては、活性型ミクログリアの増加、ミクログリアの形態変化が認められた。この時、特定の領域における神経細胞の cFos の発現増加も観察できている。一方、ストレスに関係する受容体の発現変化は認められていない。現在、ストレスホルモンの測定を行っている。

(2) Pg 菌投与マウスの行動解析

Pg 菌性菌血症マウスでは、体重や食欲に大きな変化は認められていない。しかし、複数の行動実験においてうつ様行動が認められた。一方で、認知機能や不安行動などには変化は認められていない。

(3) Pg 菌投与マウスの視床下部の炎症性シグナリング阻害の効果の検討

Pg 菌投与マウスで認められた視床下部の炎症を阻害した時にうつ様行動が減少するかどうかを確認した。阻害剤には、(1)で亢進が認められたサイトカインの受容体に対する阻害剤を用いた。結果、うつ様行動の減少が認められた。今後、さらに深く阻害効果を検討する予定である。

引用文献：

- 1) Schwarz et al: Increased periodontal pathology in Parkinson's disease. *J Neurol*, 2006, May;253(5):608-11.
- 2) Laforgia et al: Assessment of Psychopathologic Traits in a Group of Patients with Adult Chronic Periodontitis: Study on 108 Cases and Analysis of Compliance during and after Periodontal Treatment. *Int J Med Sci*, 2015, Oct 4;12(10):832-9.
- 3) Harding et al: Exploring the Association between Alzheimer's Disease, Oral Health, Microbial Endocrinology and Nutrition, *Front Aging Neurosci*, 2017, Dec 1:9:398.
- 4) Dominy et al: Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Science Advances*, 2019, Jan 23;5(1):eaau3333.
- 5) Daly et al: Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. *J Periodontol*, 2001, Feb;72(2):210-4.
- 6) Lockhart et al: Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation*, 2008, Jun 17;117(24):3118-25.
- 7) Selye: A syndrome produced by diverse noxious agents. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1998, Spring;10(2):230-1.
- 8) Otte et al: Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers*, 2016 Sep 15:2:16065.
- 9) Ueno et al: Accumulation of blood-borne horseradish peroxidase in medial portions of the mouse hippocampus. *Acta Neurol Scand* 1994, Dec;90(6):400-4.
- 10) Ueno et al: Accumulation of blood-borne horseradish peroxidase in medial portions of the mouse hippocampus. *Acta Neuropathol*. 2000 Apr;99(4):385-92.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Komatsu Ayaka, Iida Izumi, Nasu Yusuke, Ito Genki, Harada Fumiko, Kishikawa Sari, Moss Stephen J., Maeda Takeyasu, Terunuma Miho	4. 巻 298
2. 論文標題 Ammonia induces amyloidogenesis in astrocytes by promoting amyloid precursor protein translocation into the endoplasmic reticulum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101933 ~ 101933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Izumi Iida, Kohtarou Konno, Rie Natsume, Manabu Abe, Masahiko Watanabe, Kenji Sakimura, Miho Terunuma	4. 巻 14
2. 論文標題 Behavioral analysis of kainate receptor KO mice and the role of GluK3 subunit in anxiety	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-55063-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 那須優介、多部田康一、照沼美穂
2. 発表標題 マウスを用いた歯周病原細菌性菌血症がもたらす脳内変化の解析
3. 学会等名 第62回新潟生化学懇話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 那須優介、多部田康一、照沼美穂
2. 発表標題 歯周病原細菌性菌血症による脳内・脳機能変化の解析
3. 学会等名 第63回新潟生化学懇話会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Miho Terunuma
2. 発表標題 Induction of astrocyte senescence by ammonia.
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会/第44回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Nasu, Ayaka Komatsu, Izumi Iida, Koichi Tabeta, Miho Terunuma
2. 発表標題 Ammonia induces amyloidogenesis in astrocytes by promoting amyloid precursor protein translocation into the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 The 34th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>血液中のアムモニア値が上昇すると脳内でのアミロイド の産生が増加することを発見 https://www.niigata-u.ac.jp/news/2022/137933/</p>

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	多部田 康一 (Tabeta Koichi) (20401763)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	市木 貴子 (Ichiki Takako) (30778519)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	飯田 和泉（渡辺和泉） (Iida Izumi) (80751031)	東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員 (12601)	

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