

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890161

研究課題名(和文) 食細胞の時計システムに着目した歯周パラインフラメーションの脳炎症誘導機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of relationship between periodontal tissue para-inflammation induced neuroinflammation and phagocytic activity regulation by circadian clock system

研究代表者

岡田 亮 (Okada, Ryo)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70633105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周パラインフラメーションが認知機能低下を促進する詳細な機構を明らかにするため、歯周病モデル動物の確立とその認知機能解析を試みた。マウスに歯周病菌を投与して歯周病を惹起させると、歯周組織および大脳皮質において炎症性サイトカインが発現し、マウスの腹腔へ歯周病病原菌のLPSを投与すると、学習行動を評価する試験の結果が悪化した。また、歯周病菌投与後、歯周組織よりマクロファージを、脳よりミクログリアをそれぞれ回収し、炎症性サイトカイン遺伝子発現レベルを定量すると、これらの発現量が日内変動を示した。以上より食細胞の機能および認知機能低下が体内時計による制御を受けている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of cognitive impairment by chronic inflammatory periodontal disease, also known as para-inflammation disease, we developed animal models of periodontal disease. After the application of *P. gingivalis* (PG) to periodontal tissues, proinflammatory cytokines were expressed at the periodontal tissue and cerebral cortex, and intraperitoneal administration of PG caused cognitive impairment.

Microglia involved in cognitive impairment by producing proinflammatory cytokines under neuroinflammatory conditions. And recent studies showed that the abilities of microglia showed circadian rhythm. After the application of PG, proinflammatory cytokine mRNA expression levels in brain microglia and periodontal tissue macrophages showed circadian rhythm. These results suggested that circadian rhythm of proinflammatory cytokine gene expressions by periodontal tissue and brain phagocytes may affect periodontal tissue inflammation and cognitive impairment progression.

研究分野：機能系基礎歯科学

科研費の分科・細目：研究活動スタート支援

キーワード：歯学 歯周パラインフラメーション 脳炎症 食細胞 体内時計

### 1. 研究開始当初の背景

近年、アルツハイマー病や認知症といった学習、記憶障害の発症や進行と歯周病との関連性が指摘されており、歯周病の特徴である口腔内での慢性炎症状態（パラインフラメーション）が認知機能低下に関わる可能性が示唆されている。歯周病を含む末梢慢性炎症（パラインフラメーション）により脳内食細胞であるミクログリアが活性化し、脳炎症を原因とする認知機能障害が引き起こされることが知られているが、そのメカニズムには不明な点が多い。最近、マクロファージのサイトカイン産生能が体内時計により制御されており、末梢慢性炎症の程度には日内リズムがあることが明らかとなっている。このような末梢炎症の日内リズムが歯周病にも存在し、歯周病による脳炎症の誘発に大きく関与している可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

(1) 歯周病においてマクロファージならびにミクログリアの活動（サイトカイン産生能、貪食能）に日内リズムはあるのか、さらに(2) 歯周病に伴う脳炎症に日内リズムはあるのかを明らかにし、体内時計によるマクロファージ/ミクログリアの制御という観点から、歯周パラインフラメーションがどのようにして重大な脳炎症および認知機能低下を誘導するのかという謎を解き明かす。

### 3. 研究の方法

はじめに、歯周病および歯周病により誘導されると予想される脳炎症、認知機能低下といった症状に日内リズムが存在するかどうかを検討する。一定周期で明暗リズムの切り替わる環境下で飼育した歯周病モデルマウスの歯周組織を組織学的に解析し、歯周病進行程度を評価すると共に、マウスの作業記憶を測定し、認知機能の変化を経時的に検討する。次に、歯周組織あるいは脳における炎症に関与するマクロファージ、ミクログリアの炎症性サイトカイン産生活活性や貪食活性の日内リズムを調べ、歯周病の進行に伴いどのように変化するか解析を行う。さらに、炎症性サイトカイン産生や貪食反応に関わる遺伝子の中で発現レベルに日内リズムを示すものを探索し、歯周病罹患時に時計遺伝子がどのように食細胞の活性を制御するかを調べる。

### 4. 研究成果

(1) C57BL/6N マウス(24ヶ月齢、雌性)の左側第一大臼歯の遠心端歯肉に *Porphyromonas gingivalis* (PG,  $1 \times 10^9$  CFU/mL) を1日1回、20日間連続注入し、12時間周期で明暗の切り替わる条件下で飼育した。右側の第一大臼歯の遠心端歯肉には対照としてPBSを注入した。PGを注入して10日後、20日後の明条件時および暗条件時に左右の第一大臼歯を含むマウスの下顎骨をそれぞれ摘出して歯槽骨の骨梁構造解析を行った。その結果、下顎歯槽骨の破壊が確認された。

(2) 歯周病菌を注入して10日後、20日後

の明条件時および暗条件時の歯周病モデルマウスの作業記憶の測定を6方向の放射状アームを備えた水迷路装置を用いて行い、歯周病発症時の認知機能の変化に日内リズムが存在するのか検討した。一つのアームに透明のプラットホームを置き、それ以外のアームにマウスを入れてプラットホーム以外のアームに入ったエラー回数の測定を行った。訓練は1日4回行い、プラットホームを入れるアームは一定としマウスを入れるアームは毎回変えた。4回の訓練後、30分間の休憩を挟み保持テストを行い、作業記憶に対する影響を解析した。その結果、歯周病菌の投与により、作業記憶の保持程度が有意に低下することが明らかとなった。

(3) 歯周病菌を注入して10日後、20日後の明条件時および暗条件時の歯周組織および肝臓よりマクロファージを回収し、時計遺伝子 (Pers, Crys, CLOCK, BMAL1, Rev-Erb 等) およびサイトカイン遺伝子 (il-1, il-6, il-12, TNF- 等) の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR にて経時的に定量し、歯周病発症の有無および進行度により上記遺伝子の発現パターンがどのように変化するか解析を行った。歯周病菌を注入することにより時計遺伝子発現パターンの継時的な変化は見られなかった。一方、サイトカイン遺伝子の発現には歯周病菌投与により増加傾向が見られ、その発現パターンには日内変動を示すものもあった。

(4) 歯周病菌を注入して10日後、20日後の明条件時および暗条件時の歯周病モデルマウスおよび関節炎モデルマウス脳内におけるサイトカイン (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-, TGF- $\beta$ 1 等) の発現レベルをウエスタンブロットングにより経時的に定量し、歯周病および関節炎発症時のサイトカイン発現パターンの日内変動について検討を行った。炎症性サイトカインと呼ばれる IL-1, TNF- といったものは歯周病菌投与により発現量が増加し、日内変動を示す蛍光が見られた。一方、その他のサイトカインについては、歯周病菌投与に伴う発現量の変化やその発現レベルの日内変動が見られなかった。

(4) 歯周病菌を注入して10日後、20日後の明条件時および暗条件時の歯周病モデルマウスおよび関節炎モデルマウス脳内よりミクログリアを回収した。ミクログリアは脳組織中より CD11b マイクロビーズを用いた magnetic cell sorting (MACS) 法により単離した。ミクログリアにおける時計遺伝子 (Pers, Crys, CLOCK, BMAL1, Rev-Erb 等) およびサイトカイン遺伝子 (il-1, il-6, il-12, TNF- 等) の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR あるいはウエスタンブロットングにて経時的に定量し、歯周病および関節炎発症の有無により上記遺伝子の発現パターンがどのように変化するか解析を行った。単離したミクログリアでは Per1, Per2、

BMAL1、そして Rev-Erb といいた時計遺伝子や、il-6 といったサイトカイン遺伝子の発現に日内リズムが存在していることを確認した。さらに、歯周病菌の投与により、炎症性サイトカインである IL-1、TNF- の遺伝子発現レベルの増加と日内変動をリアルタイム PCR にて検出することができた。

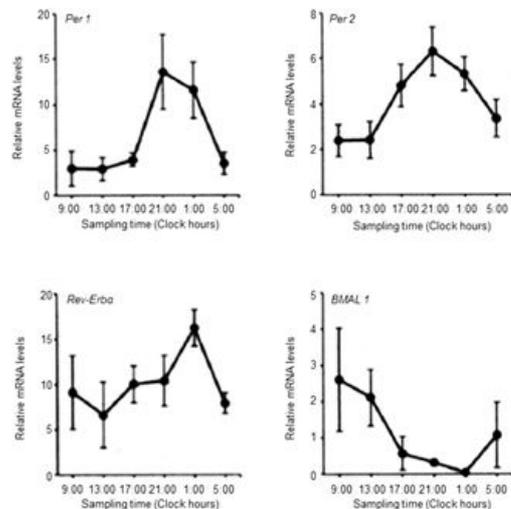


図 ミクログリアにおける時計遺伝子発現の日内リズム

さらに、食細胞特異的に発現し、免疫応答などに関与することの知られるカテプシン S の遺伝子発現もミクログリアにおいて時計遺伝子の制御のもと日内変動を示すことが明らかとなった。カテプシン S は細胞内および細胞外で活性を示すプロテアーゼであり、様々な免疫反応の実行部隊として作用する。歯周病菌投与時の脳内ミクログリア、および歯周組織マクロファージにおいてもその機能が炎症やサイトカイン産生を促進している可能性が考えられ、解析を続行している。

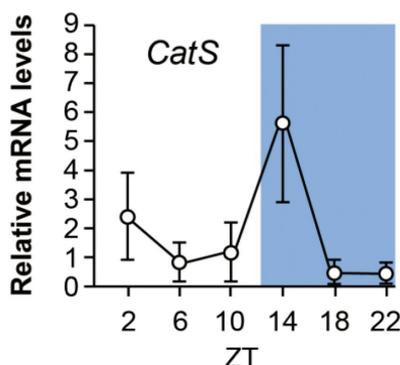


図 ミクログリアにおけるカテプシン S 遺伝子発現の日内リズム

以上より、歯周病菌感染およびその病因因子への暴露による認知機能低下について検証を行うことができ、また、脳内のミクログリアや歯周組織のマクロファージ等、食細胞の

機能および認知機能低下が体内時計による制御を受けている可能性が示唆された。

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 8 件)

The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S. Yoshinori Hayashi, Satoru Koyanagi, Naoki Kusunose, Ryo Okada, Zhou Wu, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kiyoharu Ukai, Shinichi Kohsaka, Kazuhide Inoue, Shigehiro Ohdo, Hiroshi Nakanishi., *Sci. Rep.*, 3 巻, PP 2744, 2013.

Differential pathways for interleukin-1 production activated by chromogranin A and amyloid in microglia. Zhou Wu, Li Suna, Sadayuki Hashioka, Sheng Yub, Claudia Schwab, Ryo Okada, Yoshinori Hayashi, Patrick L. McGeer, Hiroshi Nakanishi., *Neurobiol. Aging*, 34 巻, PP 2715-2725, 2013.

Possible involvement of aiPLA2 in the phosphatidylserine-containing liposomes induced production of PGE2 and PGD2 in microglia. Fumiko Takayama, Zhou Wu, Hong Mei Ma, Ryo Okada, Yoshinori Hayashi, Hiroshi Nakanishi., *J. Neuroimmunol.*, 262 巻, PP 121-124, 2013.

Diurnal spatial rearrangement of microglial processes through the rhythmic expression of P2Y12 receptors. Yoshinori Hayashi, Satoru Koyanagi, Naoki Kusunose, Fumiko Takayama, Ryo Okada, Zhou Wu, Shigehiro Ohdo, Hiroshi Nakanishi., *J. Neurol. Disord.*, 1 巻, PP 2, 2013.

Brazilian green propolis suppresses the hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- B activation in microglia. Zhou Wu, Aiqin Zhu, Fumiko Takayama, Ryo Okada, Yicong Liu, Yuka Harada, Shizheng Wu, Hiroshi Nakanishi., *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2013 巻, PP 906726, 2013.

Phosphatidylserine recognition and induction of apoptotic cell clearance by Drosophila engulfment receptor Draper. Tran Thanh Tung, Kaz Nagaosa, Yu Fujita, Asana Kita, Hiroki Mori, Ryo Okada, Saori Nonaka, Yoshinobu Nakanishi., *J. Biochem.*, 153 巻, PP 483-491, 2013.

Apoptosis-dependent externalization and involvement in apoptotic cell clearance of DmCaBP1, an endoplasmic reticulum protein of Drosophila. Ryo Okada, Kaz Nagaosa, Takayuki Kuraishi, Hiroshi Nakayama, Naoko Yamamoto, Yukiko Nakagawa, Naoshi

Dohmae, Akiko Shiratsuchi, Yoshinobu Nakanishi., J. Biol. Chem., 287 巻, PP 3138-3146, 2012.

Integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila embryos. Kaz Nagaosa, Ryo Okada, Saori Nonaka, Kazuki Takeuchi, Yu Fujita, Tomoyuki Miyasaka, Junko Manaka, István Ando, Yoshinobu Nakanishi., J. Biol. Chem., 286 巻, PP 25770-25777, 2011.

〔その他〕

ホ ム ペ ー ジ 等  
[http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/koza/koku\\_jotai\\_seigyō/koku\\_kinou\\_bunshi/kenkyugaiyo.html](http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/koza/koku_jotai_seigyō/koku_kinou_bunshi/kenkyugaiyo.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 亮 (OKADA, Ryo)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：70633105