

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861555

研究課題名(和文) 活性化ミクログリアの表現型スイッチ制御による歯周病に関連した認知症制圧法の開発

研究課題名(英文) Regulation of periodontal disease-related cognitive impairment by controlling microglial phenotype change

研究代表者

岡田 亮 (Okada, Ryo)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：70633105

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)：ミクログリアの表現型を脳障害型(M1)へ誘導した際のカテプシンB遺伝子発現量変化を調べたが、本遺伝子は表現型変化の方法の違いにより発現量が増大することもある、変化しないこともあり、カテプシンBはある特定の刺激に応じて発現が誘導され、ミクログリアの表現型変化に関与する可能性が示唆された。

また、歯周病原菌とヒト脳血管内皮細胞との共培養を行い、血管内皮細胞における遺伝子発現パターン変化を網羅的に解析したところ、多くの炎症促進性因子をコードする遺伝子の発現が高まったことから、歯周病原菌に対する脳血管内皮細胞の応答が脳内のミクログリア等の細胞の機能や挙動に影響を与える可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cathepsin B is a lysosomal cysteine protease, and its expression level is elevated at several immune cell types under inflammatory conditions. To clarify the roles of this enzyme on microglial phenotype change, pro-inflammatory M1 phenotype was induced to microglia, and Cathepsin B mRNA expression level was evaluated. This gene expression level was elevated by stimulation with E.coli LPS, but not changed by stimulation with Interferon-. These results indicated that this protease expression is regulated by some particular stimulations. Next, I examined the possibility that periodontal disease-causing bacterium change mammalian brain cell phenotypes by direct interaction. By brain endothelial cell culture with Porphyromonas gingivalis, various inflammatory cytokines were expressed in this mammalian cell. These results suggested that bacteria sensing brain endothelial cells may induce inflammatory conditions and change some brain cell phenotypes at local area in brain.

研究分野：生化学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：ミクログリア カテプシンB 歯周病

1. 研究開始当初の背景

歯周病は中高年の 80%以上が罹患する国民病であり、歯を失う最も大きな要因である。さらに、歯周病が心臓疾患、糖尿病など様々な全身疾患に関与しており、最近では特に中高年者において認知症のリスク因子となることが明らかにされており、注目を集めている。しかし、歯周病がどのようにして認知機能低下に関わるのか、未だ解明されていない。

これまでに申請者の所属する研究室での末梢慢性炎症モデルを用いた解析結果により、末梢組織での炎症に伴い若齢動物では脳における免疫担当細胞であるマイクログリアが活性化して抗炎症性サイトカインを産生し、脳保護的に働くのに対し、中高年の脳ではマイクログリアが炎症性サイトカイン産生を促して脳炎症を誘発することで脳機能低下を引き起こすことが明らかとなった。また、末梢炎症にตอบสนองして活性化したマイクログリアの表現型が若齢と中高年で大きく異なることから、末梢炎症に起因する脳障害性の表現型への誘導と脳機能低下には老化が重要な因子として働くことが示された(図 1)。よって、口腔内のマイクロ・インフラメーションである歯周病に起因する認知症の発症、進行にはマイクログリアが重要な役割を果たし、さらに、マイクログリアにおいて老化に関わる因子がマイクログリアへの炎症促進性の表現型誘導を規定していると考えられる。

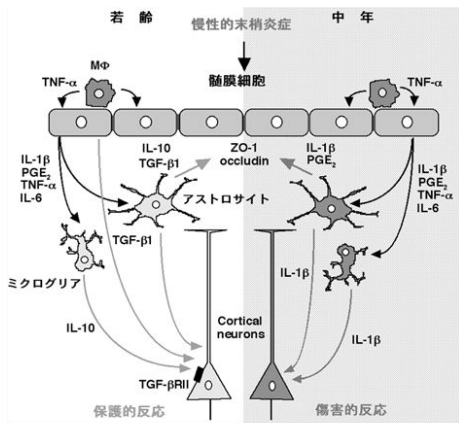


図1. 末梢炎症に伴うマイクログリアの活性化

近年、機能的に異なる M1 型と M2 型の 2 種類のマイクログリアの存在が知られるようになり、マイクログリアの挙動を理解する上で重要視されている(図 2)。M1 型のマイクログリアは脳障害型の表現型を示し、炎症性サイトカインを産生することでニューロンにダメージを与え、その機能を低下させる。一方、M2 型のマイクログリアは保護型の表現型を示し、細胞増殖、組織修復を促進する因子を産生し、ニューロンに保護的に働く。これら 2 種の表現型の中からどちらが誘導されるかにより、脳機能へ与える影響が大きく異なるため、活性化マイクログリアでは「表現型スイッチ (phenotype switch)」と呼ばれる巧妙な調節機構が M1 型、M2 型のどちらの表現型を誘導

するか制御していると考えられている。従って、歯周病罹患時に若年ではマイクログリアに M2 型への表現型を誘導するスイッチが入るが、中高年では老化に関わる因子が M1 型へ誘導するようスイッチを切り替えると予想される。しかし、具体的にどのような因子によりスイッチが制御されているのか、実態は全く分かっていない。

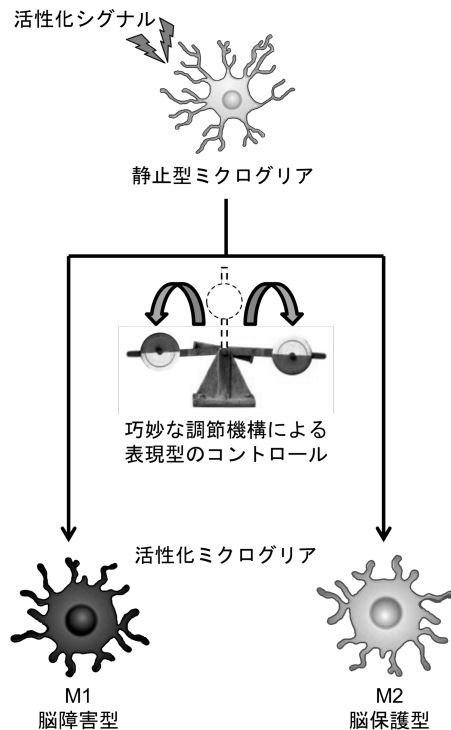


図2 活性化マイクログリアの表現型調節

申請者が所属していた研究室ではマイクログリアにおいて老化に関わる 2 つの因子を見出してきた。その 1 つはリソソーム性プロテアーゼであるカテプシン B である。カテプシン B は老化に伴い脳内の酵素活性が高まることが明らかとなっており、活性化マイクログリアにおいてカスパーゼ 1 前駆体の切断と活性化カスパーゼ 1 の産生に関与して(図 3)、IL-1 等の炎症性サイトカインの産生・分泌を促す。最近、カスパーゼ 1 の活性を抑制すると、マイクログリアは M1 型への誘導が阻害され、M2 タイプへの誘導が促されることが報告されており、カスパーゼ 1 はマイクログリア表現型を制御する重要な因子であると予想され、カテプシン B が活性化マイクログリアの表現型スイッチの実行因子である可能性が考えられる。

老化に関わる 2 つ目の因子はミトコンドリア電子伝達系の複合体 I である。申請者の所属する研究室における解析により、中枢に所在する他の細胞と比べ、マイクログリアのミトコンドリアは老化の過程で酸化傷害を受けやすいことを見出した。ミトコンドリアの酸化傷害は複合体 I の活性低下により生じる過剰量の活性酸素種が主な原因であり、産生された活性酸素種によりマイクログリアにおい

て NF- κ B 等の転写因子が活性化され、炎症性サイトカインの産生、分泌を促すことで老化に伴うミクログリアの脳障害的な機能の発現に関わる(図 4)。近年、電子伝達系複合体 I の活性阻害剤を投与すると、ミクログリアの M2 型への分化が著しく抑えられることも報告されており、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 I がミクログリア表現型スイッチの実行因子であると予想される。

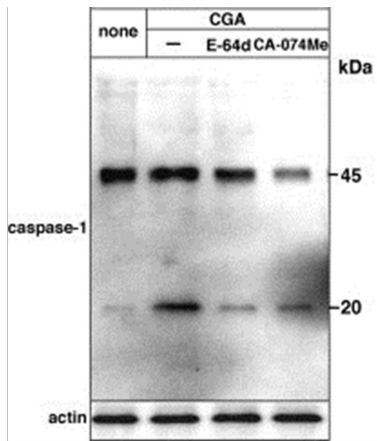


図3 カテプシンBによるカスパーゼ1の切断

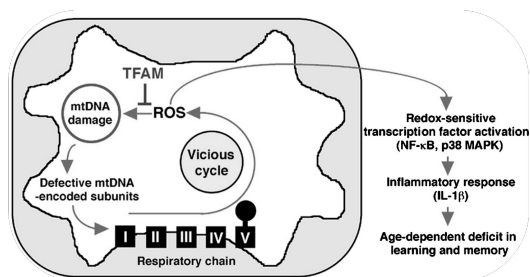


図4 ミトコンドリア傷害によるミクログリアの活性化

以上の事から、カテプシン B ならびにミトコンドリア電子伝達系の複合体 I が活性化ミクログリアの表現型スイッチに関与しており、老化に伴いこれらの因子の活性が変化することにより、歯周病等の慢性マイクロ・インフラメーション発症時に誘導されるミクログリアの表現型の違いが生じるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究ではカテプシン B ならびにミトコンドリア複合体 I に着目し、中高年者の歯周病罹患に伴う脳障害型 (M1) ミクログリア誘導の詳細なメカニズムを解き明かし、認知症の新たな予防・治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

ミクログリアの表現型スイッチとして、炎症性サイトカイン産生に関わるリソソーム性プロテアーゼであるカテプシン B に着目して解析を行った。野生型マウス由来のミクログリア細胞株を大腸菌 LPS またはインターフェロン で一定時間刺激した後に total RNA

を回収し、これを鋳型とした RT-PCR (リアルタイム PCR) により脳障害型 (M1) マーカーの一つとして知られる *iNOS* 遺伝子、脳保護型 (M2) マーカーの一つとして知られている *Arginase* 遺伝子、そしてカテプシン B 遺伝子を検出し、その存在量を定量した。

また、研究開始時には想定していなかったものの、歯周病原菌あるいはその構成成分が血流に乗って脳へ到達した際、脳血管にどのような影響があらわれるのかという点に関する解析も行った。これは歯周病原菌が歯周組織の出血箇所から血管内へ侵入して、血流に乗って全身を循環し、様々な組織における病変に関与する可能性が指摘されていることによる。脳に歯周病原菌が到達した場合は血管内皮細胞等の脳血管を構築する細胞がはじめに応答するものと予想され、その応答によってはミクログリアをはじめとする脳内の細胞の機能や表現型にも影響を与える可能性が考えられる。

そこで歯周病の発症と進行に最も寄与するもののひとつとして知られている *Porphyromonas gingivalis* の ATCC33277 株とヒト脳血管内皮由来の株細胞との共培養を行い、回収した細胞の total RNA を鋳型として cDNA を合成し、マイクロアレイで共培養により変動した遺伝子発現パターン網羅的に解析した。また、脳血管は血管内皮細胞の他に周皮細胞 (ペリサイト) やアストロサイト等の細胞により構成され、周皮細胞やアストロサイトはバリア機能等の脳血管に特徴的な機能を支持する活性を持つ液性因子を産生、放出している。例えば、周皮細胞が産生、放出した TGF- β を血管内皮細胞が受容することで、血管内皮細胞間のタイトジャンクションの形成、維持が促されるとされている。血管内皮細胞の *Porphyromonas gingivalis* への応答に対し、周皮細胞等が産生、放出する液性因子はどのような影響を与えるのか明らかにするため、TGF- β 存在下で培養したヒト脳血管内皮由来の株細胞と *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株の共培養を行い、以上の解析と同じようにマイクロアレイにて発現量が変動する遺伝子を網羅的に解析した。さらに、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株を生菌のまま、あるいは加熱処理により死滅させてから以上の細胞株との共培養に用い、以上の解析と同じようにマイクロアレイにて発現量が変動する遺伝子を網羅的に解析して、*Porphyromonas gingivalis* を構成する成分のうち、どのようなものが血管内皮細胞の応答を誘導しているのか探った。

4. 研究成果

ミクログリアの表現型スイッチとして、炎症性サイトカイン産生に関わるリソソーム性プロテアーゼであるカテプシン B に着目して解析を行った。野生型マウス由来のミクログリア細胞株を LPS で刺激したところ、脳障

害型 (M1) マーカーの一つとして知られる *iNOS* 遺伝子 mRNA 発現量が飛躍的に増加した。この際、カテプシン B 遺伝子の mRNA 発現量も同時に増大することが確認された。ところが LPS と同じくミクログリア表現型を脳障害型 (M1) へと誘導すると考えられているインターフェロン- γ にて本細胞を刺激したところ、LPS の場合と異なり、カテプシン B 遺伝子 mRNA 発現量には大きな変化は見られなかった。以上の結果より、カテプシン B は、ある特定の遺伝子発現制御を受けており、LPS の受容体として知られている Toll 様受容体の様な自然免疫に関係する受容体の活性化に伴い発現誘導される可能性が見いだされた。一方でミクログリアの表現型を脳保護型 (M2) へと誘導すると言われている IL-4 で野生型ミクログリア由来細胞株を刺激したところ、脳保護型 (M2) マーカーの一つとして知られている *Arginase* 遺伝子 mRNA の発現量が大幅に増大するものの、カテプシン B 遺伝子 mRNA 発現量には大きな変化がなかったことから、カテプシン B は主に脳障害型 (M1) への表現型誘導時に重要な役割を果たしているものと考えられた。

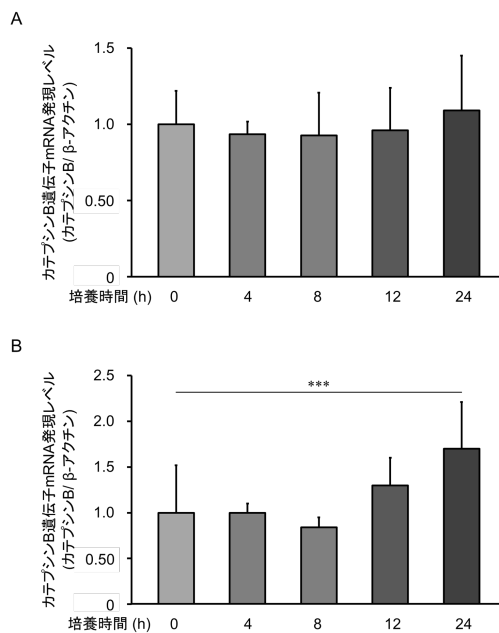


図5. インターフェロン- γ または大腸菌LPS存在下で培養したマウスミクログリア由来細胞株におけるカテプシンB遺伝子発現レベルの変化
100 μ g/mL インターフェロン γ (A) または1.0 μ g/mL 大腸菌LPS (B) 存在下で培養した細胞株におけるカテプシンB遺伝子mRNA発現量をリアルタイムPCRで定量し、培養0時間の値を1.0としたときの相対値として示した。*** $p < 0.0010$, one-way ANOVA

以上の解析と並行して、歯周病原菌あるいはその構成成分が血流に乗って脳へ到達した際、脳血管にどのような影響があらわれるのかを調べていた。歯周病罹患時には、歯周組織において炎症が惹起され、出血箇所から歯周病原菌、あるいは菌の構成成分が血管内へ侵入して、血流に乗って全身を循環するのではないかとされている。このように

して脳に到達した菌あるいはその構成成分に対して、血管内皮細胞等の脳血管を構築する細胞がはじめに応答するものと予想され、その応答によってはミクログリアをはじめとする脳内の細胞の機能や表現型にも影響を与えるのではないかと予想された。

そこで歯周病の発症と進行に最も寄与するもののひとつとして知られている *Porphyromonas gingivalis* とヒト脳血管内皮由来の株細胞との共培養を行い、回収した細胞の total RNA を鋳型として cDNA を合成し、マイクロアレイで共培養により変動した遺伝子発現パターンを解析した。その結果、*Porphyromonas gingivalis* との共培養により、CCL20 等のケモカインや IL-1、IL-6 等の炎症性サイトカイン等、多くの炎症促進性因子をコードする遺伝子の発現が高まっていることが確認された。カテプシン B 遺伝子の発現が大きく変動することはなかった。以上より、歯周組織より血流に乗って脳血管に到達した *Porphyromonas gingivalis* に脳血管内皮細胞が応答し、炎症性サイトカイン等を産生されることで、脳内のミクログリア等の細胞の機能や挙動に影響を与える可能性が示された。

次に *Porphyromonas gingivalis* に応答した脳血管内皮細胞において、こうした炎症促進因子の産生が導かれるメカニズムについて検討を行った。脳血管は血管内皮細胞の他に周皮細胞 (ペリサイト) やアストロサイト等の細胞により構成される。周皮細胞やアストロサイトはバリア機能等の脳血管に特徴的な機能を支持する活性を持つ液性因子を産生、放出している。血管内皮細胞はこうした因子を受容することで脳血管の機能が脳血管のバリア機能が支持され、適切な脳内環境を維持することができる。例えば、周皮細胞が産生、放出した TGF- β を血管内皮細胞が受容することで、血管内皮細胞間のタイトジャンクションの形成、維持が促されるとされている。血管内皮細胞の *Porphyromonas gingivalis* への応答に対し、周皮細胞等が産生、放出する液性因子はどのような影響を与えるのか明らかにするため、TGF- β 存在下で培養したヒト脳血管内皮由来の株細胞と *Porphyromonas gingivalis* の共培養を行い、以上の解析と同じようにマイクロアレイにて発現量が変動する遺伝子を網羅的に解析した。CCL20 等のケモカインや IL-1、IL-6 等の炎症性サイトカインをコードする遺伝子の発現量は *Porphyromonas gingivalis* との共培養により増加するが、これは TGF- β 存在下で培養した細胞においても観察された。これだけではなく、脳血管のバリア機能を障害することで知られる *MMP-9* 遺伝子の発現が、TGF- β 存在下で培養と *Porphyromonas gingivalis* との共培養を両方行った場合にのみ誘導されることが明らかになった。血流に乗って脳へ到達した歯周病原菌に対する脳血管構成細胞の応答を理解するため

には、単なる菌と宿主細胞の相互作用だけで説明できるものではなく、脳内の様々な種類の細胞間の相互作用も考慮することが重要であることが分かった。

さらに、*Porphyromonas gingivalis* を生菌のまま、あるいは加熱処理により死滅させてから以上の細胞株との共培養に用いたところ、生菌でも加熱処理菌でも、CCL20 等のケモカインや IL-1、IL-6 等の炎症性サイトカインをコードする遺伝子の発現が誘導された。ただ、生菌の方がこうした遺伝子の発現量が高くなる傾向が観察された。したがって、ヒト脳血管内皮細胞において、歯周病原性細菌の構成因子のうち加熱処理により失活するものと失活しないものによって炎症促進因子の発現が誘導されていることになり、歯周病原性細菌の複数の構成因子が脳血管を構成する細胞との相互作用に関与していることが示唆された。

以上より、血流に乗って脳血管へ到達した歯周病原性菌に対する応答として脳血管を構成する血管内皮細胞が炎症促進性因子を産生し、こうした因子をミクログリアが受容することで活性化す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1件)

岡田 亮、武 洲、Aiqin Zhu、倪 軍軍、Jingqi Zhang、吉嶺 嘉人、Christoph Peters、Paul Saftig、中西 博、Cathepsin D deficiency induces oxidative damage in brain pericytes and impairs the blood-brain barrier、Molecular and Cellular Neuroscience、査読あり、64巻、2015、51-60
DOI: 10.1016/j.mcn.2014.12.002

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.uoeh-u.ac.jp/University/dept/medicine/seitaibussitukagaku.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡田 亮 (OKADA, Ryo)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：70633105

(2)研究分担者
該当者なし

(3)連携研究者
該当者なし

(4)研究協力者
該当者なし