

論 文 要 旨

歯周病原菌 *P. gingivalis* 由来 Lipopolysaccharide が

マウス海馬に与える影響

平成 30 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

森 川 哲 郎

## 【緒 論】

Alzheimer's disease (AD) は、65 歳以上に発症すると言われている。AD 発症に関与する遺伝子としてはアミロイド前駆体タンパク質や amyloid $\beta$ peptide (A $\beta$ ) を分解する酵素である membrane metallo-endopeptidase (MME) が知られている。AD の病態進行の要因として、末梢での炎症により炎症性サイトカイン産生が認知機能低下に影響していることや、抗炎症性サイトカインである interleukin (IL) -10 や非ステロイド性消炎鎮痛剤が AD 進行を抑制することが報告されており、炎症と AD の病態進展との関連性が示唆されている。最近の研究では、歯周炎と脳内での A $\beta$  蓄積との間に正の相関が認められており、AD の病態と歯周炎との関連性が注目されている。

脳には血液脳関門 (Blood Brain Barrier: BBB) があり、血液中から脳組織への物質の移行は、厳密に制限されている。ヒト脳の初期の加齢変化として BBB 障害があり、その影響は脳の海馬から始まると言われている。また、正常なヒトの脳組織には見られない *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が、AD 患者の剖検脳組織において検出されたとの報告があり、*P. gingivalis* が AD の病態を悪化させている可能性がある。歯周炎に罹患した患者の歯周組織において MME が上昇しているとの報告があり、歯周炎は MME に影響を及ぼしていると考えられる。

本研究では、*P. gingivalis* が AD の病態に対してどのような影響を与えているかを明らかにすることとした。C57BL/6J マウスと加齢に伴い学習、記憶障害と末梢免疫機能の低下や BBB が障害されているという特徴をもつ Senescence-Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8) を用いて、海馬組織での MME 遺伝子発現の影響について検討した。また、C57BL/6J マウスと SAMP8 の海馬組織での局在および形態学的な変化について観察した。さらに、サイトカインによる海馬への直接的な影響について、マウス海馬神経細胞を用い IL-10 による MME 遺伝子発現変化について検討した。

## 【材料および方法】

### 1. 動物

実験動物には北海道医療大学動物実験倫理委員会の承認の元, C57BL/6J マウスと SAMP8 を用いて実施した.

## 2. *P. gingivalis* の培養とマウスでの脳内移行について

C57BL/6J マウスおよび SAMP8 における *P. gingivalis* 菌の脳内移行について, PCR 法により *P. gingivalis* の検出を行った.

## 3. *P. gingivalis* 由来 LPS の投与

海馬への影響を検証するため, 6-10 週齢の C57BL/6J マウス, SAMP8 に *P. gingivalis* 由来 LPS を 5.0 mg/kg の濃度で 3 日毎に, 90 日間投与し, 最終投与より 3 日後に屠殺した. 屠殺後, C57BL/6J マウスおよび SAMP8 より左右両側の海馬を摘出し, 一方を 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液で 24 時間固定し, 他方は total RNA を抽出した.

## 4. MME の mRNA 発現解析

mRNA 発現変化を定量的 real-time PCR (RT-PCR) 法により解析した.

## 5. 組織学的観察

海馬の形態学的変化を観察するため Hematoxylin eosin 染色および Congo-Red 染色を行った.

## 6. 免疫組織化学的観察

*P. gingivalis* 由来 LPS 投与による MME の発現変化を観察するため, SAMP8 の海馬組織で蛍光免疫組織化学染色を行った. また, 蛍光強度を定量化し評価するために, 海馬の CA3 領域よりを無作為に 3 カ所抽出し蛍光強度の測定を行った.

## 7. IL-10 血中濃度測定

血液中の IL-10 濃度を測定するために, *P. gingivalis* 由来 LPS を投与 60 分後のマウス心臓からサンプルを採取し, IL-10 濃度測定を ELISA にて行った.

## 8. IL-10 刺激下での海馬細胞培養

マウス海馬神経細胞を用い, IL-10 刺激による MME の mRNA 発現変化を解析した.

## 9. 統計分析

統計分析は, Mann-Whitney U 検定にて比較・検討し, 有意水準  $p < 0.05$  を有意差ありとした.

## 【結 果】

### 1. *P. gingivalis* 菌の脳内移行への影響

腹腔内に投与した *P. gingivalis* 菌は C57BL/6J と SAMP8 の海馬からは検出されなかった。

### 2. MME の mRNA 発現解析

LPS を投与した SAMP8 での MME の mRNA 発現変化は、対照群と比較して低いことが確認された ( $p < 0.05$ )。一方、LPS 投与をした C57BL/6J マウスでの MME の mRNA 発現は対照群と比較して LPS 投与群では発現低下傾向を示したが、有意差は認められなかった。

### 3. 海馬の組織形態学的観察

C57BL/6J と SAMP8 の形態学的分析から、明らかな急性炎症所見、細胞形態の変化やアミロイド沈着などは見られなかった。

### 4. 海馬の免疫組織化学的観察

SAMP8 の海馬で MME の発現変化について、蛍光免疫組織化学染色により評価した。その結果、海馬の CA3 領域において LPS 投与群では CA3 領域にびまん性の蛍光発現が低下していることが確認された。さらに、同部の蛍光強度を定量化し評価したところ、LPS 投与群では低かったことが確認された ( $p < 0.05$ )。

### 5. IL-10 血中濃度の評価

LPS を投与した C57BL/6J および SAMP8 の IL-10 血中濃度は、C57BL/6J と比較して SAMP8 において低かった ( $p < 0.05$ )。

### 6. IL-10 添加による海馬神経細胞の MME の mRNA 発現解析

IL-10 添加群では対照群に比べて、発現増加が認められた ( $p < 0.05$ )。

## 【結 論】

LPS の刺激による血清中の IL-10 濃度の低下が A $\beta$  分解遺伝子である MME の発現変化に関与し、MME の減少によるアミロイドの蓄積が AD の病態進行に影響している可能性が示唆された。