

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】

歯周炎は、口腔内でおこる慢性炎症性疾患である。主要な歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は歯周炎の発症および進行に強く関与している。近年、歯周炎は糖尿病、呼吸器疾患、および Alzheimer's disease (AD) 等の全身性疾患の危険因子であることが示唆されている (Arigbede et al., 2012; Noble et al., 2014; Wu & Nakanishi, 2014)。

AD の病態機序としてはアミロイド・カスケード仮説が有力である。amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) はアミロイド前駆体タンパク質 ( $\beta$ -amyloid precursor protein: APP) のプロセッシングによって産生される。産生された  $A\beta$  の余剰蓄積により脳内に老人斑が形成され、過リン酸化タウを主構成成分とした神経原線維変化がそこに生じ、最終的に神経細胞脱落がおこることで、認知機能および記憶を制御する脳の領域に影響を及ぼし脳障害に至る (Querfurth & LaFerla, 2010)。現在、多くの AD 研究はこの仮説に基づき進められている。余剰に蓄積した  $A\beta$  を分解する酵素としては membrane metallo-endopeptidase (MME) が知られており、AD の脳内では MME 発現が低下していることが報告されている。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 (Kamer et al., 2015)、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 (Montagne et al., 2015)。

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。

## 【材料および方法】

### 1. 動物

実験動物には C57BL/6J および老化促進モデルマウス (Senescence-Accelerated Mouse, SAM) を用いた。北海道医療大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

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

C57BL/6J および SAM における *P. gingivalis* 菌の脳内移行について、電気泳動法に

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 に *P. gingivalis* 由来 LPS を 5.0 mg/kg の濃度で 3 日毎に、30 日間および 90 日間投与し、最終投与より 3 日後に屠殺した。同様の方法で 6-10 週齢の SAM に対しても 3 日毎に 90 日間投与した。屠殺後、30 日、90 日間 LPS 投与された C57BL/6J および SAM 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. マイクロアレイ解析

30 日間 *P. gingivalis* 由来 LPS を投与した C57BL/6J の海馬から抽出した RNA はマイクロアレイ解析を行い、得られた結果を AD 関連リスク遺伝子結果と照合し、該当する遺伝子を検出した。

### 5. mRNA 発現解析

マイクロアレイ結果から得られた AD 関連リスク遺伝子の mRNA 発現変化は、定量的 real-time PCR (RT-PCR) 法により解析した。

### 6. 組織学的観察

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

### 7. 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、SAM 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数カ所抽出し蛍光強度の測定を行った。

### 8. 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。

### 9. IL-10 刺激下での海馬細胞培養

海馬細胞培養にはマウス（胎生 16 日）由来凍結神経細胞（WAKO）を用い、IL-10 刺激による MME の mRNA 発現変化を解析した。

## 10. 統計分析

得られた結果はすべて、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。

### 【結果および考察】

#### 1. *P. gingivalis* の脳内移行への影響について

実験結果から、C57BL/6J マウスおよび SAMP8 では BBB を通過して *P. gingivalis* が脳内まで波及していることは確認されなかった。*P. gingivalis* 由来 LPS を腹腔内に投与した C57BL/6J マウスでは血液中に LPS が移行していることは確認されている (Harada et al., 2018)。このことから、一過性に *P. gingivalis* 菌体あるいは血液中のエンドトキシンレベルや炎症性サイトカインが上昇し全身臓器に循環はするが、これらの要因のみで脳内へ侵入することは容易ではない。そのため、*P. gingivalis* のもつエンドトキシンやそれによって引き起こされた炎症により放出されたサイトカインとともに加齢変化や免疫異常など、ほかの宿主要因や環境要因が間接的に脳内に影響を及ぼしていることが考えられる。

#### 2. *P. gingivalis* 由来 LPS 投与における MME 遺伝子発現変化

本研究では MME に着目し LPS 投与による遺伝子発現変化について検討した。老化促進マウス SAMP8 に対して *P. gingivalis* 由来 LPS 投与した実験では、MME mRNA が有意な発現低下を示していたことから LPS 投与により影響することが確認された。LPS が SAMP8 の BBB を通過し、少なからず MME に影響を与えている可能性が示唆された。*P. gingivalis* 由来 LPS 投与時の MME の発現減少には加齢変化や免疫機能の低下も関わっている可能性も考えられる。

#### 3. *P. gingivalis* 由来 LPS 投与における MME のタンパク発現について

*P. gingivalis* 由来 LPS 投与マウスにおける MME のタンパク発現変化を検討するため、MME 抗体を用いた免疫蛍光染色法を行った。その結果、海馬の CA3 領域において蛍光強度の減少がみられた。これらのことから、MME のタンパク発現においても MME mRNA 発現の変化と同様に、加齢によって *P. gingivalis* 由来 LPS の感受性が高まることによる影響を受けている可能性が示唆された。

#### 4. 海馬の組織観察について

H&E による C57BL/6J マウスおよび SAMP8 海馬の組織標本の観察では、明らかな急性炎症所見や細胞形態の変化は見られず、AD で見られるような退行性の変化も認められなかった。また、Congo-Red 染色による観察においても C57BL/6J マウスおよび SAMP8 共にアミロイド沈着は観察されなかった。*P. gingivalis* 由来 LPS 投与により A $\beta$  沈着に影響を与えるのではなく A $\beta$  沈着の促進に影響を与えている可能性が考えられる。

#### 5. 血中 IL-10 濃度と MME との関連性について

*P. gingivalis* 由来 LPS を投与し 1 時間後に血中 IL-10 濃度を測定したところ SAMP8 では C57BL/6J マウスと比べ、IL-10 の濃度が有意に低下していることが確認された。IL-10 は神経炎症を有意に低下させ、神経新生を高め、空間認知機能障害を改善する抗炎症性サイトカインとして知られている (Kiyota et al., 2012)。海馬神経細胞に IL-10 を添加した実験からは IL-10 添加群では対照群に比べて MME の有意な発現増加が認められた。この結果は、IL-10 が MME 発現を亢進させ、AD 進行及び発症を抑制する可能性を示唆している。

### 【結 論】

AD 関連リスク遺伝子である MME の発現変化には IL-10 が関与しており、*P. gingivalis* 由来 LPS による持続的かつ軽微な刺激により血清中の IL-10 濃度の低下が影響し、A $\beta$  分解遺伝子 MME の減少によるアミロイドの蓄積が AD の病態進行に関与している可能性が示唆された。

### 【文献】（10 編以内）

Arigbede AO, Babatope BO & Bamidele MK. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. J Indian Soc Periodontol 16: 487-491, 2012.

Harada F, Uehara O, Morikawa T, Hiraki D, Onishi A, Toraya S, Adhikari BR, Takai R, Yoshida K, Sato J, Nishimura M, Chiba I, Wu CZ & Abiko Y. Effect of systemic administration of lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* on gene expression in mice kidney. Med Mol Morphol 51: 156-165, 2018.

- Kamer AR, Pirraglia E, Tsui W, Rusinek H, Vallabhajosula S, Mosconi L, Yi L, McHugh P, Craig RG, Svetcov S, Linker R, Shi C, Glodzik L, Williams S, Corby P, Saxena D & de Leon MJ. Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. *Neurobiol Aging* 36: 627-633, 2015.
- Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ & Ikezu T. AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther* 19: 724-733, 2012.
- Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, Halliday MR, Sagare AP, Zhao Z, Toga AW, Jacobs RE, Liu CY, Amezcua L, Harrington MG, Chui HC, Law M & Zlokovic BV. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* 85: 296-302, 2015.
- Noble JM, Scarmeas N, Celenti RS, Elkind MS, Wright CB, Schupf N & Papapanou PN. Serum IgG antibody levels to periodontal microbiota are associated with incident Alzheimer disease. *PLoS One* 9: e114959, 2014.
- Querfurth HW & LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362: 329-44, 2010.
- Wu Z & Nakanishi H. Connection between periodontitis and Alzheimer's disease: possible roles of microglia and leptomeningeal cells. *J Pharmacol Sci* 126: 8-13, 2014.