

C57BL/6 マウスにおける実験的歯周炎および加齢と認知機能低下との  
関連性

令和5年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

藤本 芳樹

## 【諸言】

歯周炎は、主に歯周病原細菌によって引き起こされる感染性炎症性疾患であり、歯槽骨吸収を伴う歯周組織破壊を認める。歯周病原細菌の有する LPS などの病原因子は免疫細胞に作用し、様々な酵素やサイトカインの産生を亢進することで歯周組織破壊を引き起こすことが報告されている。また、歯周組織で上昇した炎症性メディエーターが血流を介して全身循環へ流入する。その結果、引き起こされた全身の慢性炎症は全身疾患に影響を与えることが報告されている。

アルツハイマー型認知症 (AD) 及び関連認知症 (ADRD) は、一般的な認知症疾患であり、記憶・学習能力の低下を示す。慢性的な感染状態による慢性的全身性炎症が神経炎症の一因となり、認知症に見られる神経変性変化やアミロイド β (Aβ) の沈着を促進する可能性があることが示唆されている。

歯周炎と認知症の相関関係は多くの研究で示されている。歯周病原細菌の影響で産生される炎症性サイトカインは、血行性に脳に移行し脳内のミクログリアを活性化させ神経炎症を引き起こす可能性があることが報告されている。しかし、歯周炎を誘発した老齢マウスにおいて *P. g* が Aβ 蓄積、脳内炎症、認知症の発症や進行、及び遺伝子発現の変化に与える影響は明らかにされていない。

本研究の目的は、*P. g* により実験的歯周炎を惹起した若齢あるいは老齢の C57BL/6 マウスに対し、行動試験、病理学的所見及び RNA-Seq を用いて、*P. g* が認知機能の低下に与える影響を検討することである。

## 【方法】

### 1. マウスへの *P. g* の経口投与

若齢群 (10 週齢) と老齢群 (80 週齢) の C57BL/6 マウスをそれぞれ、若齢群 (n=7)、若齢+*P. g* 群 (n=7)、老齢群 (n=13)、老齢+*P. g* 群 (n=13) の 4 群に分類した。*P. g* (ATCC33277 株) は嫌氣的条件下で血液寒天培地を用いて 5 日間培養した。*P. g* を投与した 2 群は *P. g*+2.0% Carboxy methyl cellulose (CMC) 懸濁液 ( $1.0 \times 10^9$  CFU) を週に 3 回、5 週間経口投与し、それ以外の 2 群には CMC のみを投与した。

### 2. 歯槽骨吸収量の評価

半切除した上顎骨の歯肉及び結合組織を除去し，ドライスケルを作製した．歯槽骨吸収量は第 1，第 2 大臼歯のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの露出根面の面積を ImageJ を用いて測定した．

### 3. 学習・記憶の評価

学習・記憶の評価には，自発的交替行動を短期記憶として測定した

$$\cdot \text{交替行動率 (\%)} = \text{交替行動数} \div (\text{総アーム進入回数} - 1) \times 100$$

### 4. 錐体細胞数の評価

右脳を 10%ホルマリン溶液で固定した後，パラフィン包埋し，厚さ 5 $\mu\text{m}$  の切片を作製し H.E 染色を行った．海馬の CA1 及び CA3 領域（CA1：300 $\mu\text{m}$ ×100 $\mu\text{m}$ ，CA3：200 $\mu\text{m}$ ×200 $\mu\text{m}$ ）の錐体細胞数を測定した．

### 5. ELISA を用いた A $\beta$ 42 の評価

左側大脳皮質からタンパク質を抽出した後に，ELISA を用いて A $\beta$ 42 を定量化した．

### 6. RNA-Seq を用いた遺伝子発現量の評価

左側海馬（若齢群：n=7，若齢+*P. g* 群：n=7，Old：n=7，老齢+*P. g* 群：n=7）から mRNA を抽出し，次世代シーケンサー（Illumina）による RNA-Seq を行った．得られたデータは，Integrated Differential Expression and Pathway analysis（iDEP.951）を使用して解析し，マッピング後に遺伝子発現量を算出し DEGs の検出及び GO 解析を行った．

### 7. RT-qPCR を用いた遺伝子発現量の評価

左側海馬（老齢群：n=6，老齢+*P. g* 群：n=6）から mRNA を抽出し，逆転写酵素を用いて cDNA を合成した．RNA-Seq の結果から標的遺伝子を選択し，RT-qPCR を用いて再現性の確認を行った．

## 【結果】

老齢+*P. g* 群は，他の群と比較して学習・記憶能力に有意な低下を認めた．老齢群は若齢群，及び若齢+*P. g* 群と比較して，歯槽骨吸収量に有意な増加を認めた．また，老齢+*P. g* 群は他の群と比較して，歯槽骨吸収量に有意な増加を認めた．海馬の CA1 領域の錐体細胞数は，群間での有意差は認められなかった．CA3 領域の錐体細胞数は，若齢+*P. g* 群と比較し老齢+*P. g* 群では有意に減少した．A $\beta$  の検出量は，若齢+*P. g* 群と比較し老齢+*P. g* 群では有意に増加した．Heatmap 及び PCA から，各群はそれぞれ異なる集団としてクラスタリングされていることが示された．DEGs から，老齢群と比較し老齢+*P. g* 群で 2 倍以上の発現増加あるいは 0.5 倍以下の発現低下を示した遺伝子がそれぞれ 762 遺伝子，622 遺伝子検出された（FDR<0.05）．GO

解析及び Network 解析から、老齢+*P. g*群は老齢群と比較して、シナプスの活動調整に関わるいくつかの GO の有意な上昇と、ATP 産生やミトコンドリア合成に関わる機能などの GO の有意な低下を認めた。RT-qPCR から、*SCRN1* 及び *NSMF* は老齢群と比較し老齢+*P. g*群で有意に増加した。

#### 【考察】

老齢での *P. g* 感染および歯周炎は、認知機能の低下と関連している可能性が示唆された。また、老齢での *P. g* 感染は若齢での *P. g* 感染と比較して、Aβ42 の蓄積を増加させ、さらに神経細胞の減少を生じる可能性があることが示唆された。RNA シークエンス (RNA-Seq) を用いて老齢+*P. g*群と老齢群の遺伝子発現を比較した結果に基づき RT-qPCR を行った。*SCRN1* は AD 発症の前段階である神経原線維変化に関連する重要な因子である可能性が示唆されている。*SCRN1* は AD 患者脳内において発現が増加していることが示されている。本研究では RNA-Seq では遺伝子発現量が減少し、PCR では発現量が増加する結果となったことから、*P. g* 感染が *SCRN1* の発現量に影響するか否かについては更なる検証が必要である。*NSMF* は Jacob 遺伝子に関連する遺伝子である、Jacob 遺伝子発現の増加は cAMP 応答性エレメント結合タンパク質の転写活性を破壊し、神経細胞死を引き起こすことでシナプス活動に影響を及ぼすことが報告されている。本研究で *NSMF* は RNA-Seq、及び RT-qPCR で発現量が増加したことから、*NSMF* は老齢の *P. g* 感染によりシナプスの情報伝達に影響する可能性がある。

#### 【結論】

老齢の C57BL/6 マウスに対する *P. g* の経口投与は、歯槽骨の吸収増加、認知機能の低下及び多くの遺伝子の発現量の変化と関連を示した。海馬 (CA3) の神経細胞数の減少及び Aβ42 の蓄積は *P. g* 感染下で加齢により影響を受ける可能性が示唆された。その背景として、神経変性に関連する *NSMF* の発現の増加やシナプス情報伝達に影響する可能性が示唆された。