

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

石田 直之

論文題目

歯周病とアルツハイマー病の関連性に関する研究

緒言

アルツハイマー病は1906年にドイツのアロイスアルツハイマー博士によって初めて報告された疾患である。高齢者における認知症の原因として現在最も割合が高く、世界中で約2700万人が罹患していると報告されている。アルツハイマー病は記憶(特に近時記憶)、学習・判断・コミュニケーション能力が徐々に破壊されていくことが特徴で、主な病態として、アミロイドβ(Aβ)と呼ばれるタンパク質が凝集して構成される老人斑が脳組織に沈着することが知られている。また、近年の研究により、アルツハイマー病は慢性の炎症性疾患であることが判明している。

昨今、生活習慣病であり、慢性炎症性疾患でもある2型糖尿病がアルツハイマー病の病態を増悪させることが注目されており、その機序としてインスリン不足による脳活動と認知機能の低下が示唆されている。一方、糖尿病とともに生活習慣病の1つとして考えられている歯周病とアルツハイマー病との関係については、これまでほとんど報告されてこなかったが、近年、アルツハイマー病患者の脳内から、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)のリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS)が検出されるなど、アルツハイマー病と歯周病との関連性を示唆する報告が散見されてきている。しかし、歯周病がアルツハイマー病に影響を及ぼすメカニズムについては全く明らかにされていない。

今回、歯周病がアルツハイマー病の病態に与える影響とそのメカニズムを明らかにすることを目的に、アルツハイマー病モデルマウスの口腔内に *P. gingivalis* を投与して実験的歯周炎を惹起し、同マウスの認知機能や脳内のアルツハイマー病病態への影響を検討した。

材料と方法

実験動物には C57BL/6 をバックグラウンドとし、ヒトアミロイド前駆タンパク質(APP)を発現するトランスジェニックアルツハイマー病モデルマウス(APP-Tg マウス)を用いた。本実験では、雌 APP-Tg マウスを 62 週齢まで加齢させ、同マウスの口腔内に 2.5 %カルボキシメチルセルロース溶液を用いて調製した *P. gingivalis* (ATCC 33277 株)菌体浮遊液 (1×10^9 CFU/回/匹)を 1 日おきに計 5 回経口投与した。

実験的歯周炎の惹起後 35 日目に、マウスの認知機能を評価するために新奇物体認識試験を行った。本試験はマウスの好奇心を利用した記憶学習試験の一つで、物体の形状や配置を覚えさせ、一定時間後覚えさせた物体の一部を交換したり移動したりした時の反応を観察するものである。試験中のマウスの行動を動画で記録し、マウスが物体に鼻を付いたり、物体上に登ったりした時間を物体探索行動とし、その時間を計測してマウスの認知機能評価を行った。

菌体投与終了後 75 日目に同マウスを屠殺し、下顎骨及び脳を摘出した。

マウス下顎骨の形態学的観察・吸収率の計測は Micro Computer Tomography を使用し、下顎第二臼歯周囲の近心側と根分岐部の歯槽骨吸収を舌側から観察した。

マウスの脳は右脳を組織学的解析に使用し、左脳は下記の生化学的解析に使用した。右脳は 10 % 中性緩衝ホルマリン液にて浸漬固定した後パラフィン包埋し、ミクロトームにて厚さ 5 μm の連続切片を作製した。その後、Anti-Human Amyloid β (N) (82E1) Mouse IgG MoAb Biotin 抗体を用いて免疫染色を行い、 $A\beta$ が沈着している面積を測定した。

摘出した左脳を海馬と皮質に分離し、それぞれをホモジネートして得られたライセートを用い、マウス脳内の $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、および $\text{IL-1}\beta$ の産生レベルを ELISA 法で解析した。

APP-Tg マウスの血清と脳ライセートに含まれるエンドトキシン量はエンドトキシン特異的試薬であるエンドスペシー ES-50M セットを用いて測定した。なお、エンドトキシンの標準試料には Control Standard Endotoxin (*E. coli* O113 由来 LPS)を用いた。

野生型 63 週齢雌 C57BL/6 マウスの口腔内に、APP-Tg マウスと同じスケジュールで *P. gingivalis* を投与した。屠殺後、同マウスより血清を採取し、腸内皮細胞間のタイトジャンクション機能の維持に関与する Zonulin タンパク質を ELISA 法を用いて定量した。

株化ミクログリア 6-3 細胞培養系にフィブリル化させた 10 μM Amyloid

β -Protein (Human, 1-42)を添加した。6時間後、*P. gingivalis* 由来 LPS を添加し、更に 24 時間培養した。その後、培養上清中の TNF- α 、IL-1 β 量を ELISA 法により定量した。

野生型 C57BL/6 仔マウスの脳より神経細胞を分離した。得られた神経細胞を 4 日間培養した後、同培養系に *P. gingivalis* 由来 LPS を添加してさらに 24 時間培養した。その後、同培養上清中に放出された A β 40、A β 42 量を ELISA 法により定量した。

結果

P. gingivalis を口腔内投与した APP-Tg マウスの歯槽骨変化を観察した。その結果、同マウスは *P. gingivalis* 非投与 APP-Tg マウスと比較して歯槽骨吸収率が有意に増加していた。

APP-Tg マウスの認知機能を新奇物体認識試験により評価した結果、*P. gingivalis* 非投与群では交換あるいは位置を変えた物体に興味を示している時間が有意に長かった。一方、*P. gingivalis* 投与群では、物体に興味を示している時間は交換の前後で有意な差は認められなかった。

APP-Tg マウス脳の A β 沈着面積を免疫染色法で解析した結果、海馬における A β の沈着面積は *P. gingivalis* 投与群の方が *P. gingivalis* 非投与群と比較して有意に増加した。また、皮質においても *P. gingivalis* 投与群の方が *P. gingivalis* 非投与群と比較して A β 沈着面積の増加傾向が認められたが、

統計学的な有意差は見られなかった。

APP-Tg マウスにおける海馬および皮質の A β 沈着量を定量した結果、*P. gingivalis* 投与群が *P. gingivalis* 非投与群に比べて A β 40 と A β 42 沈着量の有意な増加が見られた。

APP-Tg マウスの脳における IL-1 β 、TNF- α 量を定量した結果、IL-1 β 、TNF- α 産生量が共に *P. gingivalis* 非投与群に比べて *P. gingivalis* 投与群で有意に増加した。

APP-Tg マウスの脳と血清中におけるエンドトキシン量を定量した結果、*P. gingivalis* 投与群の方が *P. gingivalis* 非投与群に比べて脳および血清中のエンドトキシン量が有意に増加した。

野生型加齢マウスの血清 Zonulin 量を測定した結果、*P. gingivalis* 投与群において *P. gingivalis* 非投与群に比べて有意に高い Zonulin 濃度の増加が認められた。

A β 42 と *P. gingivalis* 由来 LPS をミクログリア培養系に添加した結果、両物質を同時添加することによって、それぞれの単独投与の場合と比べて TNF- α 、IL-1 β の発現量が著しく増加した。

マウス脳神経細胞培養系に *P. gingivalis* 由来 LPS を添加した時の A β 40、A β 42 の産生を解析した。その結果、LPS を 1、10 μ g/ml 添加した時に有意に高い A β 40 の産生増加が認められた。また、LPS を 10 μ g/ml で刺激した時に A β 42 の産生が有意に増加した。

考察

本研究の結果から、マウス口腔内に *P. gingivalis* を投与したことによって脳等の遠隔の臓器に影響が及んだと考えられる。ヒトにおいても、歯周病が重篤化することにより、*P. gingivalis* を含む歯周病原細菌が口腔内で増殖し、歯肉あるいは他の経路で体内に侵入することで様々な臓器に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究において、*P. gingivalis* が口腔から腸管内に移行すると、血中の Zonulin タンパク質量が増加していたことから、腸管のタイトジャンクションが障害され、*P. gingivalis* もしくは腸内細菌の LPS が血中に移行して全身を循環する可能性があると考えられる。血中に侵入した LPS は血液脳関門を透過して脳内に移行し、脳内の免疫を掌るミクログリアを活性化したことが考えられる。本研究では、 $A\beta$ が沈着している脳内に LPS が移行したことによってミクログリアが過剰に活性化され、その結果 TNF- α 、IL-1 β の産生量が増加した。さらに、LPS によって神経細胞からの $A\beta_{40}$ 、 $A\beta_{42}$ の産生が増加した結果、神経細胞障害が引き起こされ、最終的に認知機能障害が増悪した可能性があると考えられる。

まとめ

本研究結果より、口腔内から侵入した *P. gingivalis* が腸タイトジャンクション機能に影響を与え、血中に LPS が侵入して脳内に移行した結果、脳内に存在していた $A\beta$ と LPS の相互作用によって炎症が増悪され、脳神経細

(論文内容の要旨)

No. 7

愛知学院大学

胞からの A β 40, 42 の産生量も増加し、認知機能障害の増悪に至ったという可能性が考えられる。すなわち、歯周病がアルツハイマー病の病態を悪化させるリスクファクターの一つとなる可能性が示唆された。

平成27年 1月15日