

# 学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 689 号	論文提出者 石田 直之
論文題目  アルツハイマー病と歯周病との関連性に関する研究	

## 緒言

アルツハイマー病は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、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ある。アルツハイマー病の主な病態として、アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) 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、糖尿病などの生活習慣病とアルツハイマー病との関連性が注目されているが、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。しかし、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。その一方、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

### 1. 実験動物と *P. gingivalis* の投与

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 *P. gingivalis* (ATCC 33277 株)を  $1 \times 10^9$  CFU/回/匹で投与した。

### 2. マウスの認知機能評価

*P. gingivalis* を投与した後、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あり、マウスの行動を解析することで認知機能の評価した。

### 3. マウス下顎骨の骨吸収率計測

マウス下顎骨の骨吸収率計測には、Micro Computer Tomography を使用した。得られた画像の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。

### 4. マウス脳の解析

マウスの脳は右脳を組織学的解析に使用し、左脳は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て連続切片を作製した。その後 A $\beta$  の免疫染色を行い、A $\beta$  が沈着している面積を測定した。

左脳は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、TNF- $\alpha$ 、および IL-1 $\beta$  の産生量を ELISA 法で定量した。

#### 5. マウス血清、脳内のエンドトキシン濃度解析

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とエンドトキシン標準試料を用いて定量を行った。

#### 6. マウス血清中の Zonulin 量解析

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。

#### 7. ミクログリア培養系における炎症性サイトカイン産生量解析

株化ミクログリア 6-3 細胞培養系に 10  $\mu$ M Amyloid  $\beta$ -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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  量を ELISA 法により定量した。

#### 8. マウス脳神経細胞培養系における A $\beta$ 40, 42 産生量解析

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 $\beta$ 40、A $\beta$ 42 量を ELISA 法により定量した。

## 9. 統計学的解析

Zonulin 定量、神経細胞培養系における A $\beta$  40, 42 産生量定量における検定には one-way ANOVA を使用した。その他の全ての結果の解析には Student *t*-test を用いた。  $p < 0.05$  をもって有意とした。

### 結果

#### 1. APP-Tg マウスにおける骨吸収率の評価

*P. gingivalis* を口腔内投与したマウスの歯槽骨吸収率を観察した結果、同マウスは *P. gingivalis* マウスと比較して歯槽骨吸収率が有意に増加していた。

#### 2. APP-Tg マウスにおける *P. gingivalis* 投与による認知機能の比較

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。よって、 *P. gingivalis* 非投与群と比較して *P. gingivalis* 投与群において、認知機能が有意に低下した。

#### 3. APP-Tg マウス脳における *P. gingivalis* 投与による A $\beta$ 沈着量の比較

APP-Tg マウス脳のア $\beta$ 沈着面積を免疫染色法で解析した結果、海馬におけるア $\beta$ 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 $\beta$  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。また、APP-Tg マウスにおける海馬および皮質の A $\beta$  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 $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 沈着量の有意な増加が見られた。

#### 4. APP-Tg マウス脳における *P. gingivalis* 投与による IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 量の比較

APP-Tg マウスの脳における IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  量を定量した結果、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  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。

#### 5. APP-Tg マウス脳、血清中における *P. gingivalis* 投与によるエンドトキシン量の比較

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。

#### 6. 野生型加齢マウス血清中における *P. gingivalis* 投与による Zonulin 量の比較

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。

#### 7. ミクログリア培養系における A $\beta$ 42 と *P. gingivalis* 由来 LPS を同時添加

した際の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  産生量の比較

A $\beta$ 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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  の発現量が著しく増加した。

8. マウス脳神経細胞培養系における *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激時の A $\beta$  産生量比較

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 $\beta$ 40、A $\beta$ 42 の産生を解析した。その結果、LPS を 1、10  $\mu$ g/ml 添加した時に有意に高い A $\beta$ 40 の産生増加が認められた。また、LPS を 10  $\mu$ g/ml で刺激した時に A $\beta$  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。*P. gingivalis* が遠隔の臓器に影響を与えた経路として、血中の Zonulin タンパク質量が増加していたことから、*P. gingivalis* によって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 が血中に侵入した可能性があると考えられる。A $\beta$  が沈着している脳内に血中から 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た結果、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  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、脳神経細胞からの A $\beta$  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。