

アルツハイマー病修飾因子としての歯周病の可能性に関する研究 (24-9)

主任研究者 松下 健二 国立長寿医療研究センター 部長

**【研究要旨】**

我々は歯周病がADの病態に及ぼす影響を検討するため、アルツハイマー病モデルマウスに *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) を感染させた実験的歯周炎モデルを作製し、*P.g.* 投与群と非投与群における行動変化および脳内の病態を比較した。その結果、*P.g.* 投与群では、非投与群に比べてより高度な歯槽骨吸収を認め、歯周病の発症を確認した。*P.g.* 投与群では、行動試験においても認知機能の低下を認めた。また、脳内におけるA $\beta$ の沈着面積は*P.g.* 投与群で有意に広く、A $\beta$ 量も有意に高かった。さらに、*P.g.* 投与群の脳内では、非投与群と比較して有意に高くIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の増加が認められた。以上の結果より、歯周病はアルツハイマー病の病態増悪に関与している可能性が示唆された。

主任研究者

松下 健二 国立長寿医療研究センター 部長

分担研究者

道川 誠 名古屋市立大学 教授

野口 英俊 愛知学院大学 教授

A. 研究目的

超高齢社会に突入した我が国では認知症患者数は300万人を越え、その解決は急務であるが、その半数以上を占めるアルツハイマー病(AD)の根本的な予防・治療法はない。病因分子A $\beta$ 沈着は認知機能の正常な高齢者にも認められること、最近のアミロイド・イメージング研究から、認知機能障害発症前に脳内A $\beta$ 蓄積が出現することが明らかになり、ADをA $\beta$ 蓄積の慢性疾患として捉えることが可能である。こうした考え方に一致して、近年孤発性ADの後天的危険因子として糖尿病・脂質異常症や歯周病といった生活習慣病との関連性が指摘されている。我々はAD発症における歯周病の関与に着目し、脳外に病態の首座を持つ歯周病がいかにして脳内AD分子病態に関与するかの分子機構を解明し、ADの早期診断・予防・治療法の開発に役立てることを目指す。

## B. 研究方法

### 1) APP-Tg マウスに歯周病を起こさせる実験系の確立

歯周病群は *P. g* 菌 (*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株) を 2.5% CMC (Carboxy methylcellulose) に懸濁して *P. g* 菌懸濁液 ( $1 \times 10^{10}$  CFU) を 1 日おきに計 5 回、58 および 62 週齢マウスの口腔内に直接投与した。その後、5 週間飼育することにより実験的歯周炎を惹起した。なお、細菌懸濁液の代わりに PBS で同様の処置を施したものを対照群とした。口腔内プラークに対し qPCR を行うことにより *P. g* 菌の感染の確立を確認した。また、歯周病の評価は、CT および歯周組織の形態学的解析により評価した。

### 2) 歯周病を発症させた 63 週齢 APP-Tg マウスの学習行動試験実施

歯周病群 12 匹、対照群 10 匹に対し、Novel objection test と Passive avoidance test を実施した。

### 3) APP-Tg マウス脳 AD 病態の評価

APP-Tg マウス (58 週齢) に歯周病を惹起させ、63 週齢時に認知機能検査を行い、69 週齢でと殺し、脳内 Ab 沈着ならびに Ab 量を免疫組織化学的方法と ELISA 法により定量した。さらに、脳内の炎症炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  濃度を ELISA 法で評価した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、愛知学院大学歯学部動物指針に従って行われた。また、本実験は同大学動物実験委員会での動物実験倫理審査規定により承認された (動物実験計画承認番号: AGUD159 号、229 号)。

## C. 研究結果

歯周病を感染させて、63~69 週まで長期にわたり飼育させたマウスの解析から、次のことが明らかになった。

1) *P. gingivalis* を口腔内に感染させた 63~69 週齢の APP-Tg マウスでは下顎骨吸収が顕著であった。(図 1)

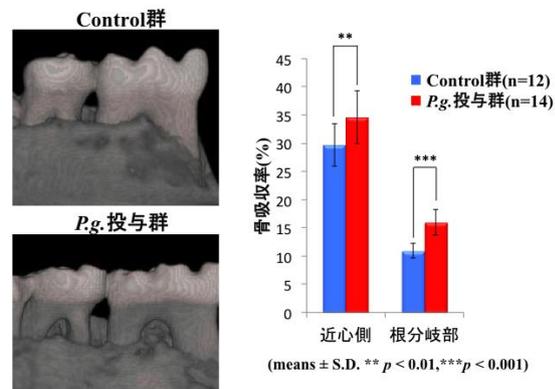


図1. *P. g* 菌投与による歯槽骨吸収

2) *P. gingivalis* を口腔内に感染させた 63~67 週齢の APP-Tg マウスにおける学習行動試験では、歯周病を発症していないマウスに比して明らかに認知機能障害が増悪していた。(図 2)

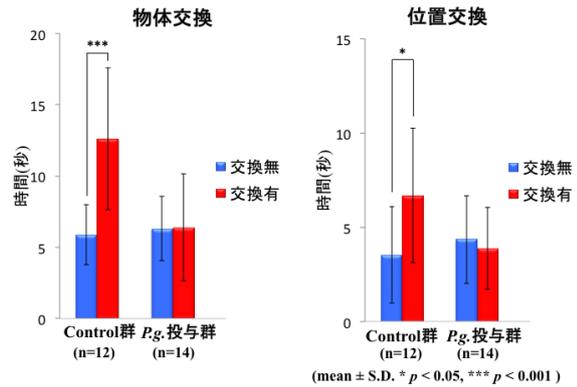


図2. Novel objection test

3) *P. gingivalis* を口腔内に感染させた 63~69 週齢の APP-Tg マウス脳における抗 Ab 抗体染色では、沈着する老人斑の数と断面積が、非歯周病グループに比較して有意に増加していた。(図 3)

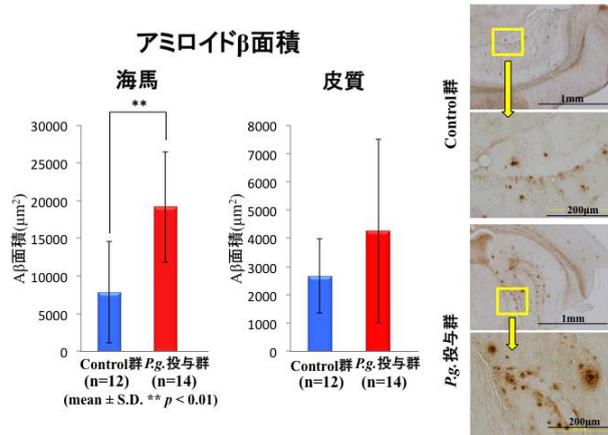


図3. 脳内のアミロイドβ染色

4) *P. gingivalis* を口腔内に感染させた 63~69 週齢の APP-Tg マウス脳を ELISA 解析したところ、Aβ1-40, Aβ1-42 とも非歯周病グループに比較して有意に増加していた。(図 4)

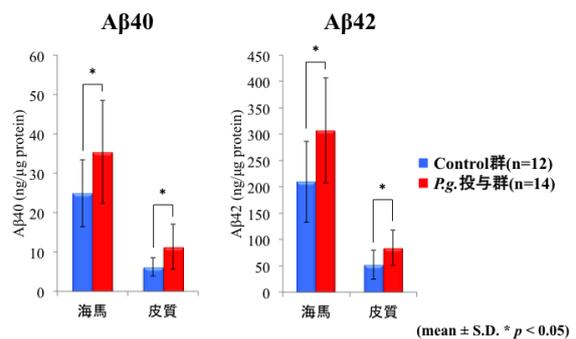


図4. 脳内アミロイドβの濃度

5) *P. gingivalis* を口腔内に感染させた 63~69 週齢の APP-Tg マウス脳内の IL-1β および TNF-α 濃度を ELISA で解析した結果、両

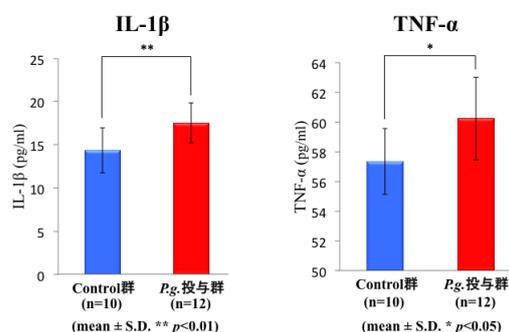


図5. 脳内の炎症性サイトカイン濃度

サイトカイン濃度が非歯周病グループに比較して有意に増加していた。(図5)

#### D. 考察と結論

本研究の結果は、歯周病の慢性感染が脳内アルツハイマー病分子病態の増悪を誘導することを示しており、本解析を継続・終了させることにより、その因果関係を明らかにできる。この関係が明らかになれば、歯周病の予防・治療を積極的に行う科学的根拠を提供することになり、歯周病の予防・治療が真に有効なアルツハイマー病予防法として確立され、国民の福祉に大きく貢献できる。

今後に残された科学的に課題として、どのようなカスケードあるいは分子メカニズムによって「歯周病の慢性感染が脳内アルツハイマー病分子病態の増悪させる」のかを解明する必要がある。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Miyamoto Y, Noguchi H, Yukawa H, Oishi K, Matsushita K, Iwata H, Hayashi S: Cryopreservation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Med* 3:89-95, 2012.
- 2) Komatsu T, Nagano K, Sugiura S, Hagiwara M, Tanigawa N, Abiko Y, Yoshimura F, Furuichi Y, and Matsushita K: E-selectin Mediates *Porphyromonas gingivalis* Adherence to Human Endothelial Cells. *Infect Immun* 80:2570-2576 2012.

##### 2. 学会発表

- 1) 川井絢矢、磯田竜太郎、大内謙二、稲富 聡、松下健二：「ヤマブシタケ抽出物の口腔領域応用に向けた基礎研究」日本薬学会大 133 年会 2013/3/28, 横浜
- 2) 萩原真、国分栄仁、杉浦進介、小松寿明、多田浩之、磯田竜太郎、谷川順美、加藤佳子、石田直之、小林かおる、石原和幸、松下健二：「Vinculin と Rab5 か？ 関与するエント？ サイトーシス機構の解明」日本農芸化学会 2013/3/26, 仙台
- 3) 多田浩之、松下健二、松山孝司、野口和行、島内英俊、清浦有祐：「ジンジパインによるアレルギー性サイトカイン誘導をターゲットとしたアレルギー疾患の制御」第 29 回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い 2013/1/12, 東京
- 4) 萩原真、国分栄仁、杉浦進介、小松寿明、多田浩之、磯田竜太郎、谷川順美、加藤佳子、小林かおる、石原和幸、松下健二：「vinculin は宿主細胞において Rab5

の活性を調節し、*Staphylococcus aureus* の細胞内移行に関与する」 第 35 回日本分子生物学会 2012/12/14 福岡

- 5) Yamada K and Matsushita K: 「High concentration of glucose activates migration and proliferation of human skin keratinocytes through inducing active release of HMGB1.」 The Clinical Symposium on Advances in Skin & Wound Care. Oct 23, 2012, Las Vegas, USA.
- 6) 萩原真、磯田竜太郎、加藤佳子、石田直之、小林かおる、松下健二: 「一酸化窒素を制御する食品由来因子の探索」 第 45 回日本食生活学会大会 2012/10/13 北九州
- 7) 多田浩之、島内英俊、松下健二: 「*Porphyromonas gingivalis* ジンジパインはヒト歯肉上皮細胞から IL-33 を誘導する」 第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会 2012/9/23 つくば
- 8) 多田浩之、島内英俊、松下健二: 「*Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞の interleukin-33 発現誘導」 第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2012/9/16 郡山
- 9) Tada H, Shimauchi H, Matsushita K: 「Expression of interleukin-33 induced by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival epithelial cells.」 First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species. Aug 28, 2012, Nagasaki.
- 10) 多田浩之、島内英俊、松下健二: 「*Porphyromonas gingivalis* によるヒト歯肉上皮細胞からの interleukin-33 発現誘導」 第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会 2012/6/29, 沖縄
- 11) Yamada K and Matsushita K: 「High glucose concentration induces active release of HMGB1 in human skin keratinocytes」 9th International Conference on Innate Immunity, June 23, Rhodes, Greece.
- 12) Nakatsuka Y, Nagasawa T, Yumoto Y, Nakazawa F, Matsushita K, Furuichi Y: 「Effects of sword bean extract on the oral bacteria and progression of rat experimental periodontitis by *Porphyromonas gingivalis*.」 7th Conference of the European Federation of Periodontology June 6, 2012, Vienna, Austria.
- 13) 加藤佳子、杉浦進介、石田直之、石原裕一、野口俊英、松下健二: 「歯肉上皮細胞への *Porphyromonas gingivalis* 侵入機構における ICAM-1 及び Rab5 の関与」 第 55 回日本歯周病学会春季学術大会 2012/5/18, 札幌

### 3. 総説

- 1) 多田浩之、島内英俊、松下健二: *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインによるヒト歯肉上皮細胞における IL-33 発現誘導. エンドトキシン・自然免疫研究., 15:45-48,

2012.

- 2) 松下健二: 第2章3 「慢性炎症－慢性炎症の分子的共通基盤」慢性炎症としての歯周病へのアプローチ－生涯を通して患者さんの QOL に貢献するために. 野口俊英 (編) 医歯薬出版 印刷中.
- 3) 松下健二: 第2章4 「自然炎症としての歯周病」慢性炎症としての歯周病へのアプローチ－生涯を通して患者さんの QOL に貢献するために. 野口俊英 (編) 医歯薬出版 印刷中.
- 4) 松下健二: 第2章5 「血管の炎症からみる歯周病」慢性炎症としての歯周病へのアプローチ－生涯を通して患者さんの QOL に貢献するために. 野口俊英 (編) 医歯薬出版 印刷中.

#### 4. 著書

- 1) Tanigawa N, Takeda Y, Sunghwa F, Ninomiya M, Hagiwara M, Koketsu M, Matsushita K:Morrisonide derivative regulates E-selectin expression in human endothelial cells. In Interface Oral Health Science 2011, Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N (Eds).Springer, New York, pp161-163, 2012.
- 2) Nishihira T, Nishitani M, Sato T, Abiko Y, Matsushita K, Hamada M, Sakashita R:Community Oral Health promotion program fostering self-management for elderly people. In Interface Oral Health Science 2011,, Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N (Eds), Springer, New York, pp317-319, 2012.
- 3) Isoda R and Matsushita K:The role of protein oxidative modification in periodontal diseases. Studies on Gingivitis and Periodontal Disesease. Armstrong D (Ed), Springer, New York, in press.

#### 5. 新聞・報道等

- 1) 松下健二: 読売新聞、平成 24 年 7 月 28 日朝刊、「口の中から健康に 歯周病 「不治の病」第 18 回口腔保健シンポジウム」
- 2) 松下健二: 読売新聞、平成 24 年 7 月 8 日朝刊、「歯と健康テーマにシンポ... 大林素子さんら参加」
- 3) 松下健二: 読売新聞、平成 24 年 6 月 1 日朝刊、「Yomiuri Information 考えよう！全身の健康は口腔から」
- 4) 松下健二: 日歯広報、平成 24 年 5 月 15 日、「口腔と全身管理を考える」

#### 6. その他

- 1) 松下健二: 健康寿命の鍵は、口の健康！ 歯周病と全身の密接な関係. 歯っぴいスマイル, 20:5-7, 2012.

7. シンポジウム、特別講演

- 1) 松下健二：「口は禍のもと～口腔から考える全身医療」第 12 回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム 18, 2012/6/23, 横浜.
- 2) 松下健二：「超高齢社会における歯周病対策」第 55 回日本歯周病学会春季学術大会 シンポジウム, 2012/5/18, 札幌.
- 3) 松下健二：「老年期、衰退期を想定した基礎歯科医学の考え方」第 54 回歯科基礎医学会学術大会 日本学術会議主催シンポジウム, 2012/9/16, 郡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし