



# 歯周病菌による脳・腸バリア破綻に基づくAD型認知症増悪機序 —ジンジパイン-PAR2シグナリングによる脳・腸バリア機能変容—

## 1. 研究の目的

(1) 歯周病がアルツハイマー型認知症を増悪する2つの経路が想定される。一つは全身循環経路で、歯肉血管より全身循環系に入った主要な歯周病菌のジンジバリス菌が脳内に侵入し、ミクログリア活性化により脳炎症を惹起し、認知機能を低下させる経路である(図1:全身循環ルート)。二つ目は唾液経路で、唾液と伴に飲み込まれたジンジバリス菌が腸内細菌叢の攪乱を起こし、変容した腸内細菌代謝産物が認知機能を低下させる経路である(図2:唾液ルート)。ジンジバリス菌が産生分泌する歯周破壊酵素であるジンジパインは、プロテアーゼ活性化受容体2(PAR2)の活性化による密着結合タンパク質(ZO-1、オクルディンなど)の局在

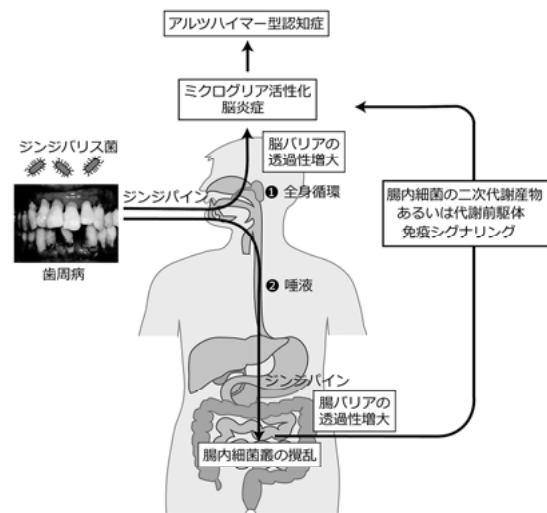


図1: 想定されるジンジパイン作用経路の模式図

変化、あるいは密着結合タンパク質の直接的分解を行うことが考えられる。本研究では、ジンジパインが脳・腸バリア機能を変容させ認知機能低下を引き起こす可能性を解析し、歯周病がアルツハイマー型認知症の増悪因子となるメカニズムを明らかにする。一方、ジンジバリス菌は恒常的にジンジパインやリポ多糖類などほぼ全ての病原因子を含む外膜小胞(OMVs)を恒常的に分泌している。そこでジンジバリス菌に加え、OMVsの役割についても解析する。

## 2. 研究の計画

(1) ジンジバリス菌感染あるいはOMVs添加による脳・腸バリアの「細胞」レベルでの *in vitro* 解析

- ① ヒト脳血管内皮由来細胞(hCMEC/D3細胞)を用いた脳バリア機能変容ならびにそのメカニズムに関する解析
- ② ヒト結腸腺がん由来細胞(Caco-2細胞)を用いた腸バリア機能変容ならびにそのメカニズムに関する解析

(2) ジンジバリス菌感染あるいはOMVs添加による脳・腸バリア機能ならびに認知機能変化のマウス「個体レベル」での *in vivo* 解析

- ① 脳・腸バリア機能の解析
- ② ステップスルー受動回避試験ならびに新奇物体探索行動試験を用いた認知機能の解析

## 3. 研究の成果

(1) ジンジパインの脳バリア機能変容メカニズムの解明

- ① ジンジバリス菌感染あるいはジンジバリス菌培養上清の適応によりhCMEC/D3細胞の透過性が有意に増大した。この透過性増大はアルギニンジンジパイン(Rgp)阻害剤KYT1とリジンジンジパイン(Kgp)阻害剤KYT36の併用によりほぼ完全に抑制され、RgpならびにKgpの作用によりhCMEC/D3細胞の単層バリアの透過性が増大することが明らかとなった。

② ジンジバリス菌感染により、hCMEC/D3 細胞の密着結合タンパク質であるオクルディンならびに ZO-1 は有意に減少したが、VE-カドヘリンには変化は認められなかった。Kgp 欠損株の感染では、ZO-1 は有意に減少したがオクルディンには有意な変化は認められなかった。一方、Kgp/Rgp 欠損株の感染では、オクルディンならびに ZO-1 の有意な変化は認められなかった (図 2)。ジンジバリス菌野生株、Kgp 欠損株ならびに Kgp/Rgp 欠損株の培養上清を用いた実験でも、ほぼ同様の結果が得られた。

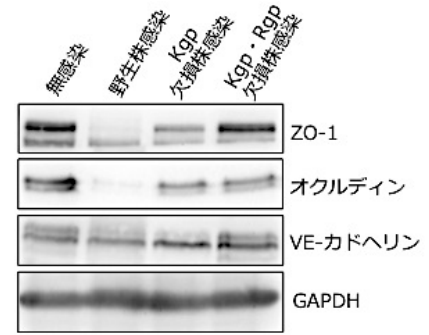


図 2 ジンジバリス菌感染によるhCMEC/D3細胞の密着結合タンパク質分解

- ③ Kgp ならびに Rgp は hCMEC/D3 細胞の PAR2 を活性化し、下流シグナル分子の ERK1/2 を活性化したが、PAR2 活性化ならびにその下流シグナルは Kgp と Rgp によるオクルディンならびに ZO-1 の分解に関与しないことが明らかとなった。
- ④ Kgp ならびに Rgp が直接的にオクルディンならびに ZO-1 を分解する可能性について検討した結果、Kgp は単独でオクルディンの直接的な分解に関与し、Kgp と Rgp の協調作用が ZO-1 の直接的な分解に関与することが明らかとなった。
- ⑤ 抗ジンジバリス菌抗体を用いた免疫染色により、ジンジバリス菌感染あるいは OMVs の添加により Kgp ならびに Rgp は hCMEC/D3 の細胞質に局在することが分かった。

## (2) ジンジバリス菌の腸管バリア機能変容メカニズムの解明

- ① ジンジバリス菌感染ではCaco-2細胞の透過性に変化は認められなかったが、OMVsのapical側への添加により透過性は有意に増大した (図 3)。また、Kgp/Rgp欠損株から調整したOMVsのapical側への添加では透過性増大は認められなかった。
- ② OMVs添加によりCaco-2細胞の密着結合タンパク質であるオクルディンならびにZO-1のタンパク質量の有意な変化は認められなかった。

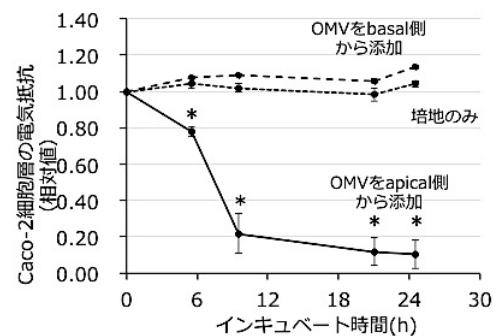


図 3 OMV添加時のCaco-2細胞層の電気抵抗値の経時変化

以上の結果より、「ジンジバリス菌から分泌されたKgpならびにRgpを含むOMVsがヒト脳血管内皮細胞のhCMEC/D3細胞に取り込まれ、KgpならびにRgpが細胞内からオクルディンならびにZO-1を分解し、脳バリア透過性を増大する」という新知見が得られた。さらに、OMVsはヒト腸管上皮細胞のCaco-2細胞に取り込まれKgpならびにRgp依存的に透過性を有意に増大させた。しかし、オクルディンならびにZO-1の分解は認められなかった。このことから、「腸管上皮細胞において、KgpならびにRgpはPAR2活性化によりオクルディンならびにZO-1の内在化を誘導することで透過性を増大させた」可能性が考えられる。このように、KgpならびにRgpは異なったメカニズムで脳ならびに腸バリア機能を障害することが示唆された。

## 4. 研究の反省・考察

- (1) 「ジンジバリス菌がPAR2活性化により脳・腸バリアの透過性を高める」という作業仮説に基づいて研究を開始した。ジンジバリス菌は脳バリアでは密着結合タンパク質の直接的な分解、腸バリアではPAR2活性化による密着結合タンパク質の内在化という異なったメカニズムで透過性を増大しており、作業仮説にこだわり過ぎたためメカニズムを突き止めるのに時間を費やしてしまった。
- ① hCMEC/D3細胞の透過性がジンジバリス菌依存的に増大することが確認できた。しかし、「ジンジバリス菌によるhCMEC/D3細胞のPAR2活性化は透過性増大には関係しておらず、ジンジバリス菌による直接的な密着結合タンパク質 (オクルディンならびにZO-1) 分解で透過性が増大する」ことを突き止めた (Nonaka et al., *Neurochem Int.* 154:105282, 2022)。
- ② 一方、Caco-2細胞の透過性もジンジバリス菌依存的に増大することが確認でき、ジンジバリス菌による直接的な密着結合タンパク質 (オクルディンならびにZO-1) 分解で透過性が

増大することが予想された。しかし、密着結合タンパク質（オクルディンならびにZO-1）分解は認められなかった。最近、PAR2活性化により密着結合タンパク質（オクルディンならびにZO-1）の内在化により透過性が増大することが示唆する実験結果が得られた（論文準備中）。

(2)培養細胞を用いた脳・腸バリア機能の解析は予定通り進んでいるが、マウス個体を用いた脳・腸バリア機能の解析の進行は予定より若干遅れている。

- ① 全浸循環ルート（マウス尾静脈内投与）：ジンジバリス菌ならびにOMVsのマウス尾静脈内投与の予備実験を行っているが、尾静脈内投与が予想外に難しく、安定的な尾静脈内投与ができていないため研究が遅れている。尾静脈注入用のシリンジならびにマウス固定器を用いることで成功率が上がってきている。
- ② 唾液ルート（マウス経口投与）：ジンジバリス菌ならびにOMVsのマウスへの経口投与の予備実験も開始している。
- ③ 認知機能解析：マウス個体を用いた実験では、脳・腸バリアの機能解析だけではなく、認知機能解析も行う予定のため認知機能解析装置（ステップスルー受動回避試験装置ならびに新奇物体探索行動装置）のセットアップを完了した。

## 5. 研究発表

(1)学会誌等

- ① Nakanishi H, Ni J, Nonaka S, Hayashi Y. Microglial circadian clock regulation of microglial structural complexity, dendritic spine density and inflammatory response. *Neurochem Int.* 142:104905, 2021.
- ② Tanaka J, Takahashi H, Yano H, Nakanishi H. Generation of CSF-1 independent ramified microglia from leptomeninges *in vitro*. *Cells* 10:24, 2021.
- ③ Ni J, Zhang X, Reinheckel T, Turk V, Nakanishi H. Cathepsin H deficiency decreases hypoxia-ischemia-induced hippocampal atrophy in neonatal mice through attenuated TLR3/INF- $\beta$  signaling. *J. Neuroinflammation* 18:176, 2021.
- ④ Hayashi Y, Kato H, Nonaka K, Nakanishi H. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth attenuate neuropathic tactile allodynia in mice through distinct from sigrec-9/MCP-1-mediated tissue-repairing mechanism. *Sci Rep* 11:20053, 2021.
- ⑤ Liu Y, Li H, Hu J, Wu Z, Meng J, Hayashi Y, Nakanishi H, Qing H, Ni J. Differential expression and distinct roles of proteinase-activated receptor 2 in microglia and neurons in neonatal mouse brain after hypoxia-ischemic injury. *Mol Neurobiol.* 59:717-730, 2022.
- ⑥ Xie Z, Meng J, Kong W, Wu Z, Lan F, Narengaowa, Hayashi Y, Qinghu Yang Q, Bai Z, Nakanishi H, Qing H, Ni J. Microglial cathepsin E plays a role in neuroinflammation and amyloid  $\beta$  production in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 00:e13565, 2022.
- ⑦ Nonaka S, Kadowaki T, Nakanishi H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* induce increased permeability of human cerebral microvascular endothelial cells through intracellular degradation of tight junction proteins. *Neurochem Int.* 154:105282, 2022.

(2)口頭発表

なし

(3)出版物

なし