

2022年度（第47回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	安 田 女 子 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	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—	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①歯周病、②アルツハイマー型認知症、③ジンジパイン、④脳・腸管バリア機能		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 西 博	安田女子大学薬学部	教 授	実験計画の立案・総括、免疫組織化学的解析、データ解析、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
野 中 さ お り	安田女子大学薬学部	講 師	ジンジバリス菌ならびにマウスの維持・管理、マウス認知機能の解析、腸内細菌叢のメタゲノム解析
北 澤 健 生	安田女子大学薬学部	准 教 授	脳・腸バリア機能に関する培養細胞ならびにマウス個体レベルでの解析
羽 鳥 勇 太	安田女子大学薬学部	講 師	脳血管内皮細胞ならびに腸管上皮細胞におけるジンジパイン—PAR2シグナリングの解析、酸化ストレスの時空間的解析

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

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1:①全身循環を介したルート)。二つ目は唾液経路で、唾液と共に飲み込まれたジンジバリス菌が腸内フローラの変容が生じ、変容した腸内細菌代謝産物や免疫シグナルが認知機能を低下させる(図1:②唾液を介したルート)。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。

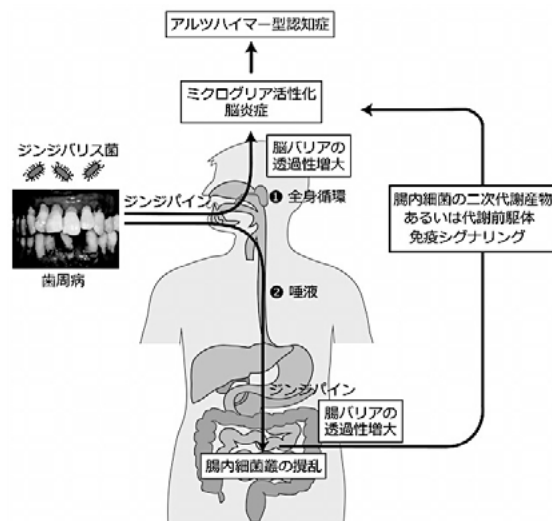


図1: 想定されるジンジパイン作用経路の模式図

本研究では、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ことを目的に以下の研究を行った。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。研究の過程でOMVsがジンジパインを脳・腸に運ぶキャリアとして働くという新知見が得られたため、OMVsに関する研究項目を追加した。

2. 研究の計画

- 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
 - ヒト脳血管内皮細胞(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
 - 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
- 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
 - 脳・腸バリア機能の解析
 - ステップスルー受動回避試験を用いた認知機能の解析

3. 研究の成果

- 脳バリア機能変容メカニズムの解明: 「細胞レベル」での *in vitro* 解析
 - 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。
 - 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ZO-1ならびに

オクルディン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、ZO-1 ならびにオクルディン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。

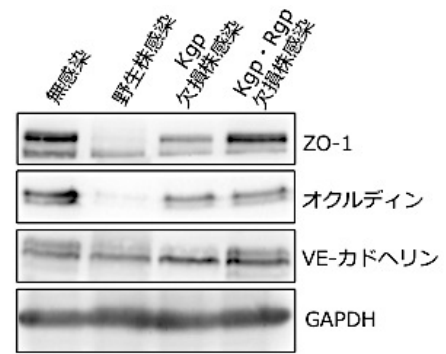


図2 ジンジバリス菌感染によるhCMEC/D3細胞の密着結合タンパク質分解

- 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 ZO-1 ならびにオクルディン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 ZO-1 ならびにオクルディン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 抗ジンジパイン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) 脳バリア機能変容メカニズムの解明：「マウス個体レベル」での *in vivo* 解析

ジンジバリス菌野生株から調整した OMVs を尾静脈内投与したマウスにエバンスブルーを腹腔内投与した。24 時間後、エバンスブルーは脳実質内にもわずかに浸潤が認められた。

以上の結果より、「ジンジバリス菌から分泌された OMVs により全身循環ルートで脳に運ばれた Kgp ならびに Rgp は脳血管内皮細胞内に取り込まれ、ZO-1 ならびにオクルディンを直接分解し、脳バリア透過性を増大させる」ことが明らかになった。

(3) 腸バリア機能変容メカニズムの解明：「細胞レベル」での *in vitro* 解析

① 経上皮電気抵抗測定による透過性の解析

Caco2の単層培養系を用い、経上皮電気抵抗の測定により膜透過性を解析した。野生株から調整したOMVsの管腔側 (apical側) への添加により透過性は有意に増大したが、基底膜側 (basal側) からの添加では変化はなかった (図3)。一方、Kgp/Rgp 欠損株から調整したOMVsの管腔側 (apical側) への添加では透過性増大は認められなかった。

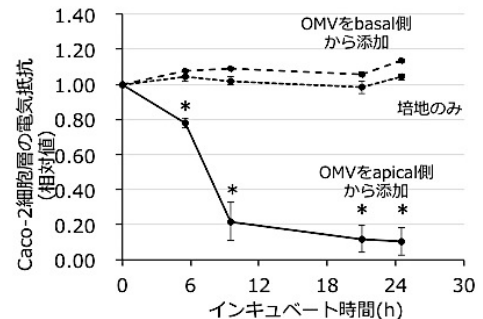


図3 OMV添加時のCaco-2細胞層の電気抵抗値の経時変化

② 腸バリア機能の「細胞レベル」での *in vitro* 解析：密着結合タンパク質の分解

OMVs添加後、Caco-2細胞のZO-1ならびにオクルディンのタンパク質量は有意に減少した。Kgp/Rgp欠損株から調整したOMVsでは、有意な変化は認められなかった (図4)。

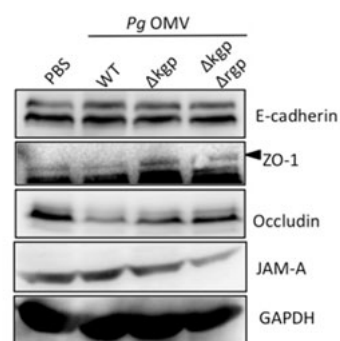


図4 ジンジバリス菌由来OMVsによるCaco2細胞の密着結合タンパク質に分解

③ Cy5 で蛍光標識した OMVs を用いた解析により、OMV はエンドサイトーシスにより Caco-2 細胞に取り込まれ、Kgp ならびに Rgp は初期エンドソームから細胞質に移行することが明らかとなった。

(4) 腸バリア機能変容メカニズムの解明：「マウス個体レベル」での *in vivo* 解析

① 若年 (2ヶ月齢) ならびに中年 (14ヶ月齢) マウスに、野生株または Kgp/Rgp 欠損株由来 OMVs を経口ゾンデにより一日おきに8週間経口投与した。経口的に、若年ならびに中年

マウスに FITC-デキストランを経口投与し、尾静脈から採取した血液中の FITC-デキストラン由来の蛍光を計測することで腸バリア機能透過性の変化を解析した。その結果、若年ならびに中年マウスにおいて、野生株由来 OMVs の経口投与により腸バリアの透過性の増大傾向が認められたが、Kgp/Rgp 欠損株由来 OMVs では透過性の増大傾向は認められなかった。

- ② 腸バリア透過性増大が認められる野生株から調整した OMVs の経口投与により、若年ならびに中年マウスの腸管を摘出し、調整した可溶性分画について密着結合タンパク質に対する抗体を用いたウェスタン解析を行った。その結果、ZO-1 ならびにオクルディンのタンパク質量の有意な低下が認められたが、Kgp/Rgp 欠損株由来 OMVs では認められなかった。

以上の結果より、「ジンジバリス菌から分泌された OMVs により唾液ルートで腸に運ばれた Kgp ならびに Rgp は腸管上皮細胞に取り込まれ、ZO-1 ならびにオクルディンを直接分解し、腸バリア透過性を増大させる」ことが明らかになった。また、若齢ならびに中年マウスにおいて同程度の腸バリアの透過性増大が生じることが明らかとなった。

(5) ステップスルー受動回避試験を用いた学習・記憶機能の解析

野生株から調整した OMVs の経口投与により、1週間目に中年マウスでは学習・記憶機能の有意な低下が認められたが、若齢マウスでは認められなかった。腸バリアの透過性増大は若齢ならびに中年マウスで認められた。この結果より、「腸バリアよりも脳バリア障害が中年マウスにおける学習・記憶機能低下の要因となる」可能性が示唆された。現在、脳バリアの透過性増大、学習・記憶機能ならびに脳炎症の関係を解析中である。

4. 研究の反省・考察

(1) 「ジンジパインが 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。ジンジパイン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パイン依存的に増大することが確認できた。しかし、「ジンジパインによる hCMEC/D3 細胞の PAR2 活性化は透過性増大には関与しておらず、ジンジパインによる直接的な密着結合タンパク質 (ZO-1 ならびにオクルディン) 分解で透過性が増大する」ことを突き止めた (*Neurochem Int.* 154:105282, 2022)。
- ② Caco-2 細胞の透過性もジンジパイン依存的に増大することが確認でき、ジンジパインによる直接的な密着結合タンパク質 (ZO-1 ならびにオクルディン) の分解が認められた。一方、透過性の増大に PAR2 は関与しないことが明らかとなった (論文準備中)。

(2) 学習・記憶機能の低下が認められる中年マウスでは低下の認められない若年マウスと比較してジンジパインによるバリア障害が強く表れると予想し解析を行った。しかし、若齢ならびに中年マウスで同程度の腸バリア透過性増大が認められた。一方、マウスを用いた脳バリア機能に関する実験では、実験手技的な問題により脳バリア機能を定量化するまでに至らなかった。この結果より、「腸バリアよりも脳バリア障害が中年マウスにおける学習・記憶機能低下の要因となる」可能性が示唆された。今後、この可能性について検証する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① 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.
- ② 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 β production in Alzheimer' s disease. *Aging Cell*, 00:e13565, 2022.

- ③ 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.
- ④ Hatori Y, Kanda Y, Nonaka S, Nakanishi H, Kitazawa T: ATP13A2 modifies mitochondrial localization of overexpressed TOM20 to autolysosomal pathway. *PLoS One*, 17:e0276823, 2022.
- ⑤ Inoue E, Minatozaki S, Katsuta Y, Nonaka S, Nakanishi H: Human β -defensin 3 inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced oxidative and inflammatory responses of microglia by suppression of cathepsins B and L. *Int J Mol Sci*, **23**:15099, 2022.
- ⑥ Matsumoto A, Kitazawa T, Hatori Y, Nakanishi H, Watanabe C, Takashima T, Murakami M: Targeting cellular gaps using Janus nanoparticles containing cationic polymers and surfactant lipids. *Drug Discov Ther*, 17:104–113, 2023.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし