

論文の全文要約

実験的歯周炎マウスにおける海馬領域の炎症反応

古玉 大祐

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

博士課程 医歯薬学専攻

2019 年度

主指導教員：栗原 英見 教授
(医系科学研究科 歯周病態学)

【目的】

認知症は記憶障害、見当識障害、認知機能障害や行動心理障害を伴う症候群である。2030年には、世界中で約7470万人の認知症患者が存在すると予測されている。日本では高齢化に伴い、認知症患者数は増加しており、2025年には患者数は700万人に到達し、高齢者の5人に1人が認知症を発症すると予測されている。認知症の60～70%をアルツハイマー型認知症（AD）が占めると報告されている。ADは患者本人だけでなく、家族や社会の大きな問題であり、そのメカニズムの解明、治療法の開発は喫緊の課題である。

ADは海馬の萎縮、老人斑（アミロイド β の沈着）、神経原線維変化を特徴とした慢性的な神経変性疾患であり、緩やかに進行する。AD患者の脳組織でアミロイド β の沈着、神経原線維変化などの病理学的変化は臨床症状が現れる20～30年前から出現していると報告されている。歯周炎の罹患数は30～40歳代にかけて著しく増加する。このことは、脳組織の病理学的変化と歯周炎との間に何らかの関係がある可能性を示唆する。この関連が明らかになれば、歯周病治療によって認知症の発症を遅らせることが可能となり、さらに、AD治療の新規ターゲットの探索につながる可能性もある。

ADの病態に関わる因子の一つに脳組織の炎症がある。脳組織内の炎症はアミロイド β の産生、神経原線維変化、神経細胞障害や細胞死を誘導し、AD発症の素因になると考えられている。また糖尿病などの全身的な慢性炎症による、血流中の炎症性サイトカインの産生は脳血液関門（BBB）の透過性を亢進し、脳組織の炎症を引き起こしていることが報告されている。

本研究では歯周組織の炎症が脳の炎症に及ぼす影響を解明することを目的に、絹糸結紮歯周炎モデルマウスの脳の変化を詳細に検討した。

【材料と方法】

1. 絹糸結紮歯周炎モデル

実験は 6-8 週齢の c57BL/6 の雌マウスを用いた。5-0 絹糸を用いて上顎両側第二臼歯に結紮し歯周炎を発症させた群を歯周炎症群とした。絹糸を結紮しない群を歯周健全群とした。

2. 歯周炎症群の歯周組織、血清中における炎症性サイトカインの検討

歯周炎症群（結紮 1, 4, 8 週間）と歯周健全群の歯肉中の *Il6*、*Il1b*、*Tnfa* の mRNA の発現量を real time PCR で調べた。血清中の IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 の濃度は ELISA を用いて解析した。

3. 海馬における炎症性サイトカインの発現

3-1. 絹糸結紮 1 週間後の歯周炎症群の海馬を剖出し、海馬の *Il6*、*Il1b*、*Tnfa* の mRNA 発現量を real time PCR で調べた。

3-2. 血中の IL-6 が海馬における *Il1b* 発現に与える影響

① 歯周健全群に、1000 ng/mice の recombinant IL-6 または生理食塩水を尾静脈から投与し、海馬の *Il1b* の mRNA 発現量の変化を調べた。

② 歯周炎症群に、絹糸結紮当日、3 日目に IL-6 の中和抗体、または対照としてラット IgG を尾静脈から投与し、海馬の *Il1b* の mRNA 発現量の変化を調べた。

4. 歯周炎症群の海馬における BBB 構成タンパクの発現

4-1. 絹糸結紮 1 週間後の海馬を剖出し、海馬における tight junction 関連遺伝子 (*Cldn5*, *Ocln*, *Tjp1*) の mRNA 発現量を real time PCR で調べた。

4-2. 絹糸結紮 1 週間後の全脳を剖出し、組織切片を作成し、CD31（血管内皮細胞の指標分子）と Cldn5 を蛍光色素標識抗体による二重染色を行い、血管内皮細胞の Cldn5 発現を蛍光顕微鏡下で観察した。

5. 血中 IL-6 が海馬血管内皮細胞の Cldn5 発現に対する影響

歯周炎症群マウスに、絹糸結紮当日、3 日後に IL-6 の中和抗体または対照としてラット IgG を尾静脈から投与し、投与 7 日後に全脳を剖出し、実験 4-2 と同様の方法で血管内皮細胞の Cldn5 発現を観察した。

6. 歯周炎症群の BBB の透過性亢進に対する検討

歯周健常群、または絹糸結紮 7 日目の歯周炎症群マウスに biotin 標識 3000D の dextran を尾静脈から投与し、投与 10 分後に全脳を剖出した。組織切片を作成し、CD31 を蛍光色素標識抗体による染色を行い、dextran が血管内から脳組織内へ漏出している像を観察した。

【結果】

1. 歯周炎モデルマウスの歯周組織と全身の炎症に及ぼす影響

- 1) 歯周炎症群では歯肉組織中で *Il6*、*Il1b*、*Tnfa* の mRNA 発現が絹糸結紮後 1 週間目で有意に高かった。
- 2) 歯周炎症群で血清中の IL-6 の発現が有意に高かった。

2. 歯周炎症群が海馬領域の炎症に及ぼす影響

- 1) 歯周炎症群は海馬領域で *Il1b* の mRNA 発現が有意に高かった。

- 2) recombinant Murine IL-6 の血中投与は海馬領域で *I11b* の mRNA 発現を上昇させた。
 - 3) anti-mouse IL-6 antibody の血中投与は、歯周炎症群で生じる海馬領域の *I11b* の mRNA 発現を抑制した。
3. 歯周炎が海馬領域における血液脳関門（Blood-Brain Barrier : BBB）に及ぼす影響
- 1) 歯周炎症群で海馬領域の *Cldn5* の発現量は低かった。
 - 2) anti-mouse IL-6 antibody の血中投与は、歯周炎症群で生じる海馬領域の *Cldn5* の発現量低下を抑制した。
 - 3) 歯周炎症群で有意に血管外へ蛍光・biotin 標識 3,000D の蛍光を発する面積が広がった。

【考察】

本研究の結果から歯周組織の炎症によって誘導された血中の IL-6 によって、海馬領域の血管内皮細胞膜上の *Cldn5* の発現を低下させ、BBB の透過性が亢進した。また、これにより海馬領域で炎症反応が誘導された。

歯周炎を早期に治療し慢性炎症を取り除くことによって、海馬領域の炎症反応を抑制出来れば、AD 発症時期を遅らせることが出来、相対的な AD 患者数の減少に繋がる可能性があると考ええる。