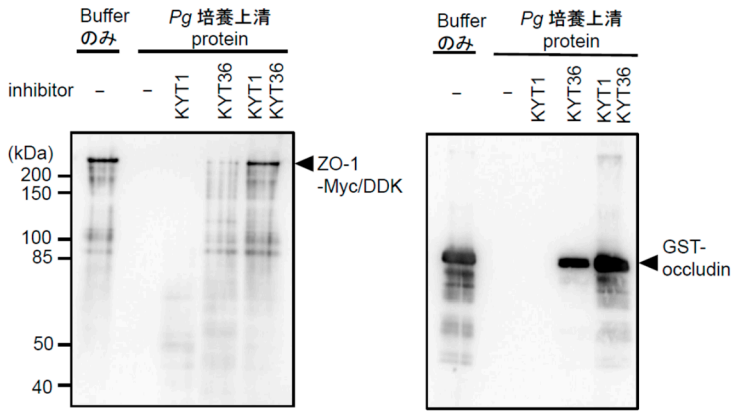
158　歯周病による腸管バリア破綻がもたらす認知障害の機序	野中　さおり

【目的】近年、唾液と共に飲み込まれて腸内に達した歯周病菌が腸内細菌の組成を変え、異常な組成の腸内細菌由来の分子が脳に移行してアルツハイマー病を発症させると予想されている。それには、腸内細菌由来の分子が強固な腸管バリアを通って全身循環系に移行する必要があるが、その機構は不明である。本研究は、歯周病菌による腸管バリアの破綻機構を解明し、そのマウスの認知機能障害に対する関与を調べることを目的とした。我々の研究グループは、代表的な歯周病菌であるジンジバリス菌が分泌する歯周組織破壊酵素「ジンジパイン」がミクログリアの protease-activated receptor2（PAR2）を活性化することを報告している。さらに、PAR2 の活性化により腸上皮細胞や腎糸球体の血管内皮細胞の透過性が増大することが知られていた。このことから、我々は「飲み込まれて腸内に移行したジンジバリス菌が産生するジンジパインが PAR2 を活性化して、腸上皮細胞の密着結合の構造的変容を促し、透過性を高める」という着想に至った。本研究では、この検証とそのアルツハイマー病様の認知障害に対する関与を調べることを目的とした。
【方法】研究当初は PAR2 の関与を予想していたが、「ジンジパインによる脳バリア破綻の仕組み」を調べている過程で、ジンジパインは PAR2 を介さず密着結合タンパク質の ZO-1 やオクルディンを直接分解することが示唆された。そこで、ジンジパインによる腸上皮バリア破綻も同じ仕組みである可能性が高いと予想し、それを検証する方針に切り替えた。具体的には、分泌性のジンジパインを含むジンジバリス菌の培養上清からタンパク質を硫安沈殿により濃縮し、それを ZO-1 及びオクルディンの組換えタンパク質とインキュベート後、これらタンパク質の減少が見られるか、及びそれがジンジパインの阻害剤（KYT1 及び KYT36）で阻害されるかを、反応産物に対する抗 ZO-1 抗体及び抗オクルディン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより調べた。
【結果】ZO-1 及びオクルディンの組換えタンパク質は、ジンジバリス菌の培養上清由来タンパク質（*Pg* 培養上清 protein）との混合で分解された。ジンジパインには、切断認識配列の異なる 2 種類があり、Arg-ジンジパインはアルギニンの後、Lys-ジンジパインはリジンの後のペプチド結合をそれぞれ切断する。これらタンパク質の分解に対する Arg-ジンジパイン阻害剤の KYT1 及び、Lys-ジンジパイン阻害剤の KYT36 の効果を調べた結果、ZO-1 は Arg-ジンジパインと Lys-ジンジパインの両方が協調して、また、オクルディンについては、主に Lys-ジンジパインが直接分解すると考えられた（下図）。ZO-1 やオクルディンのアミノ酸配列を調べたところ、ジンジパインによる切断認識配列はすべて細胞質内にあった。よって、ジンジパインは腸上皮細胞の細胞質内に侵入してこれらの密着結合構成タンパク質を分解し、腸バリアの透過性を上げていると考えられた。ジンジバリス菌のようなグラム陰性細菌は、outer membrane vesicles（OMVs）と呼ばれる小胞を外膜から切り出すような形で分泌し、様々な病原性因子を宿主細胞へと運ぶことが知られている。今後は、ジンジパインが OMV に結合した形で腸上皮細胞内に侵入して腸上皮バリアの破綻を促すかを *in vitro* 及び *in vivo* の実験系で調べると共に、OMV 上のジンジパインがジンジバリス菌の経口投与時にマウスで引き起こされるアルツハイマー病様の認知機能障害を促進するかを検証していく。

ジンジパインによる ZO-1 及びオクルディンの直接分解



158. 歯周病による腸管バリア破綻がもたらす認知障害の機序

野中　さおり

安田女子大学 薬学部 薬学科 薬理学分野

Key words：ジンジバリス菌，ジンジパイン，ZO-1，オクルディン

緒　言

アルツハイマー病の原因として「アミロイドカスケード仮説」が広く支持されている。しかし、これまでこの仮説に基づいてアミロイドβとその関連分子を標的とした多くの薬剤が開発されてきたが、未だ臨床研究によってその効果が証明された根本的治療薬は得られていない。これは「アミロイドカスケード仮説」が家族性アルツハイマー病に基づいて構築された仮説であり、99%以上は未だに原因不明の孤発性アルツハイマー病であるためと考えられる。そのような中で、アルツハイマー病の剖検脳において主要な歯周病菌であるジンジバリス菌の LPS が検出された［1］。さらに、アルツハイマー病と歯周病との関連性に関するコホート研究において、歯周病の罹患はアルツハイマー病患者の認知機能低下を促進することが明らかとなり［2］、歯周病が孤発性アルツハイマー病の原因の一つであることが示唆されている。

歯周病がアルツハイマー病を引き起こすメカニズムの詳細はわかっていないが、我々の研究グループを中心に解析が進められており、脳内食細胞であるミクログリアがもたらす脳内炎症が中心的な役割を果たすことが明らかとなった。

一方、アルツハイマー病の発症に関わるとして、近年、注目されてきているのが腸内細菌である。最近、アミロイドβの過剰発現を誘導した遺伝性アルツハイマー病のモデルマウスは、野生型のマウスと腸内細菌の組成が異なることが発見された。実際、腸内細菌の組成を正常化するマンノオリゴ糖 GV-971 が認知機能障害を改善するとして、現在、中国で臨床試験のフェーズⅢまで進んでいる［3］。また、代表的な歯周病菌であるジンジバリス菌を経口投与されたマウスでは、腸内細菌叢の組成が変わるとの報告もある［4］。以上のことは、歯周病患者が唾液と共にジンジバリス菌を大量に飲み込むことでジンジバリス菌が腸内に到達、それにより、腸内細菌の組成が変わることがアルツハイマー病の発症に関わることを示唆するが、その仕組みの詳細は不明である。

腸内細菌の組成が脳に作用してアルツハイマー病をもたらすならば、異常な組成の腸内細菌叢由来の分子が、腸内から全身循環系へ、さらには、脳実質内に移行してミクログリアに作用し脳内炎症をひきおこすことが考えられる。しかし、腸上皮細胞どうしは密着結合で強固につながっているため、細菌成分などを含む物質の透過が厳しく制限されている。ジンジバリス菌を経口投与されたマウスでは、腸内細菌由来のエンドトキシンが血中から検出されるようになることから［4］、ジンジバリス菌が感染すると、腸上皮細胞のバリア機能が低下することは明らかだが、その仕組みはわかっていない。

我々の研究グループは、ジンジバリス菌が分泌する歯周組織破壊酵素「ジンジパイン」がミクログリアの protease-activated receptor2（PAR2）を活性化し、細胞膜辺縁部の actin 重合を引き起こすことで細胞遊走を引き起こすことを明らかにしている［5，6］。actin は密着結合の構成成分のひとつである。さらに、PAR2 の活性化により腸上皮細胞や腎糸球体の血管内皮細胞の透過性は増大する［7，8］。このことから、我々は「飲み込まれて腸内に移行したジンジバリス菌が産生するジンジパインが PAR2 を活性化して、腸上皮細胞の密着結合の構造的変容を促し、透過性を高める」という着想に至った。本研究では、これを検証すること及び、そのアルツハイマー病様の認知機能障害に対する関与を調べることを目的とした。

方　法

1. ジンジバリス菌の培養上清による密着結合構成分子 ZO-1 及びオクルディンの分解

「ジンジパインによる脳バリア破綻の仕組み」を調べている過程で、ジンジバリス菌の野生株（ATCCC33277 株）を脳血管内皮細胞株 hCMEC/D3 細胞に感染させると、密着結合構成タンパク質の ZO-1 やオクルディンの発現減少が見られ、その発現減少はジンジパインの欠損菌株（KDP136 株）では見られないことがわかり、ジンジパインがこれらタンパク質を分解することが示唆された。しかし、予想に反して、ジンジバリス菌の感染による ZO-1 やオクルディンの発現減少は PAR2 アンタゴニストや PAR2 下流の情報伝達分子の ERK1/2 の阻害剤で抑制されず、PAR2 は密着結合の破壊に関与しないことが示唆された。

そのため、腸上皮細胞でも PAR2 を介さず、ジンジパインが ZO-1 やオクルディンを直接分解する可能性が高いと考え、それを調べる方針に切り替えた。具体的には、分泌性のジンジパインを含むジンジバリス菌の培養上清からタンパク質を硫安沈殿により濃縮し、それを ZO-1 及びオクルディンの組換えタンパク質とインキュベート後、これらタンパク質の減少が見られるか、及びそれがジンジパインの阻害剤（KYT1 及び KYT36）で阻害されるかを、反応産物に対する抗 ZO-1 抗体及び抗オクルディン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより調べた。

結果及び考察

1. ジンジパインによる ZO-1 及びオクルディンの直接分解

ZO-1 及びオクルディンの組換えタンパク質を、ジンジバリス菌の培養上清から抽出したタンパク質（*Pg* 培養上清 protein）とインキュベートしたところ、反応生成物の ZO-1 及びオクルディンのシグナルが減少した。ジンジパインには、切断認識配列の異なる 2 種類があり、Arg-ジンジパインはアルギニンの後、Lys-ジンジパインはリジンの後のペプチド結合をそれぞれ切断する。Arg-ジンジパイン阻害剤の KYT1 及び、Lys-ジンジパイン阻害剤の KYT36 のそれぞれ単独、または両方の存在下で同じ実験を行ったところ、培養上清タンパク質による ZO-1 の減少はそれぞれ単独の阻害剤の存在下ではあまり抑制されず、両方の存在下では完全に抑制された。一方、オクルディンの減少は、KYT1 の存在下では抑制されなかったが、KYT36 の存在下では抑制され、両方の阻害剤の存在下ではさらに抑制されたが KYT36 単独の場合の阻害程度とあまり変わらなかった（図 1）。以上より、ZO-1 は Arg-ジンジパインと Lys-ジンジパインの両方が協調して、そして、オクルディンについては、主に Lys-ジンジパインが直接分解すると考えられた。

以上より、当初の予想どおり、PAR2 を介した経路ではなかったが、ジンジバリス菌が分泌するプロテアーゼのジンジパインが密着結合構成タンパク質の ZO-1 及び、オクルディンを直接分解することが示された。ZO-1 は膜の裏打ちタンパク質として細胞質内に存在する。また、オクルディンは膜貫通タンパク質であるが、その分解に主に関わると考えられた Lys-ジンジパインの切断認識配列の Lys は細胞外領域に存在しなかった（図 2）。よって、ジンジパインは腸上皮細胞の細胞質内に侵入してこれらの密着結合構成タンパク質を分解し、腸バリアの透過性を上げていると考えられた。ジンジバリス菌のようなグラム陰性細菌は、outer membrane vesicles（OMVs）と呼ばれる小胞を外膜から切り出すような形で分泌し、様々な病原性因子を宿主細胞へと運ぶことが知られている。ジンジバリス菌の OMV 表面にはジンジパインが存在すること及び、これはエンドサイトーシスで細胞質内に取り込まれることから［9, 10］、ジンジパインは OMV に結合した形で腸上皮細胞内に取り込まれて腸バリア破綻を引き起こす可能性が高い。今後はこれを検証するため、蛍光ラベルしたジンジバリス菌野生株由来の OMV が腸上皮細胞株（Caco-2 細胞）内に取り込まれるか及び、この時、Caco-2 細胞層の ZO-1 及びオクルディンの減少及び透過性の向上が見られるかを調べる。また、この時、ジンジパイン欠損株由来の OMV 添加時ではそれらが阻害されるかを調べ、ジンジパインの関与を調べる。さらに、マウスへの野生株 OMV の経口投与で腸バリア破綻が起こるかを検証すると共に、OMV がジンジバリス菌の経口投与時に見られる認知機能障害を促進するか、及びこれらの現象がジンジパイン欠損株由来の OMV 投与時は阻害されるかどうかも調べ、*in vivo* におけるジンジパイン及びその運び屋である OMV の腸バリア破綻及びアルツハイマー型認知症への関与を検証していく。

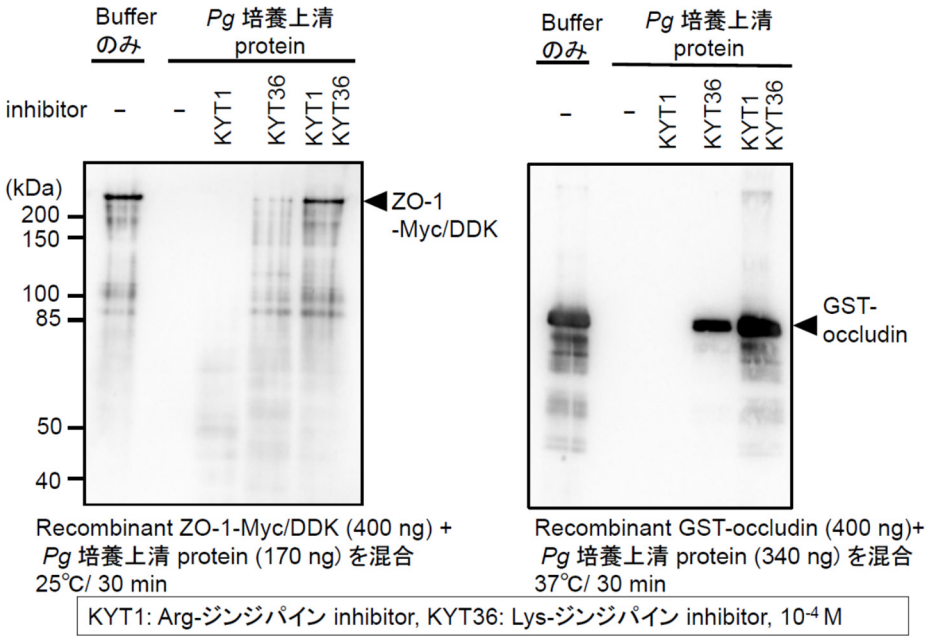


図 1. ジンジパインによる密着結合構成タンパク質 ZO-1 及びオクルディンの直接分解

ジンジバリス菌野生株の培養上清に含まれるタンパク質を硫安沈殿により濃縮し、ヒト由来 ZO-1-Myc/DDK または、GST-オクルディンの組換えタンパク質と混合した。各密着結合タンパク質（400 ng）は、それぞれ 25℃（ZO-1）及び、37℃（オクルディン）で 30 分間、ジンジパイン阻害剤（KYT1：Arg-ジンジパイン阻害剤、KYT36：Lys-ジンジパイン阻害剤、10^{-4}M ずつ）の存在下、または非存在下で培養上清タンパク質（*Pg* 培養上清 protein）とインキュベートした。その後、反応生成物に対する抗 ZO-1 抗体及び抗オクルディン抗体に対するウエスタンブロッティングを行った。

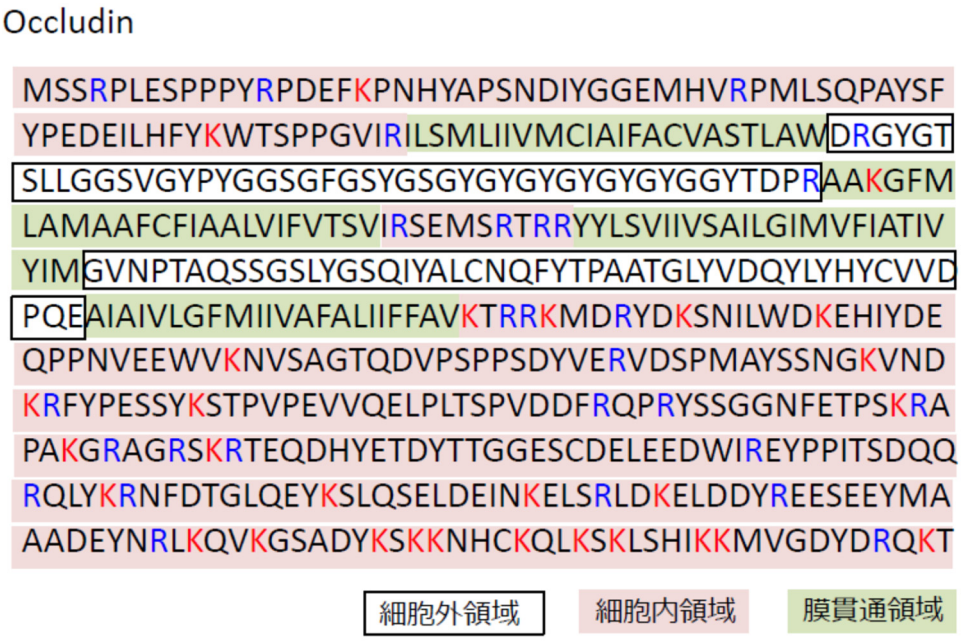


図 2. オクルディンのアミノ酸配列

細胞外領域にリジン-ジンジパインの切断認識配列であるリジン（K）が存在しない。

共同研究者

本研究の共同研究者は、安田女子大学薬学部薬学科薬理学研究室の中西博教授である。

文　献

1） Poole S, Singhrao SK, Kesavalu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. J Alzheimers Dis. 2013;36（4）:665-77. PMID: 23666172 DOI: 10.3233/JAD-121918.

2） Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, Fuller J, Ibbett P, Raybould R, Thomas R, Puenter U, Teeling J, Perry VH, Holmes C. Periodontitis and cognitive decline in Alzheimer's disease. PLoS One. 2016 Mar 10;11（3）:e0151081. PMID: 26963387 DOI: 10.1371/journal.pone.0151081.

3） Wang X, Sun G, Feng T, Zhang J, Huang X, Wang T, Xie Z, Chu X, Yang J, Wang H, Chang S, Gong Y ,Ruan L , Zhang G, Yan S , Lian W, Du C, Yang D , Zhang Q, Lin F ,Liu, Zhang JH, Ge C, Xiao S, Ding J , Geng M. Sodium oligomannate therapeutically remodels gut microbiota and suppresses gut bacterial amino acids-shaped neuroinflammation to inhibit Alzheimer's disease progression. Cell Res. 2019 Oct;29（10）:787-803. PMID: 31488882 DOI: 10.1038/s41422-019-0216-x.

4） Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. Sci Rep. 2014 May 6;4:4828. PMID: 24797416 DOI: 10.1038/srep04828.

5） Liu Y, Wu Z, Nakanishi Y, Ni J, Hayashi Y, Takayama F, Zhou Y, Kadowaki , Nakanishi H. Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and an inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2 in mice. Sci Rep. 2017 Sep 18;7（1）:11759. PMID: 28924232 DOI: 10.1038/s41598-017-12173-1.

6） Nonaka S, Nakanishi H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* induce microglia migration through endosomal signaling by protease-activated receptor 2. Neurochem Int. 2020 Nov;140:104840. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32858090 DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104840.

7） Jacob C, Yang P-C, Darmoul D, Amadesi S, Saito T, Cottrell GS, Coelho A-M, Singh P, Grady EF, Perdue M, Bunnett NW. Mast cell tryptase controls paracellular permeability of the intestine. Role of protease-activated receptor 2 and beta-arrestins. J Biol Chem. 2005 Sep 9;280（36）:31936-48. Epub 2005 Jul 18. PMID: 16027150 DOI: 10.1074/jbc.M506338200.

8） Kumar Vr S, Darisipudi MN, Steiger S, Devarapu SK, Tato M, Kukarni OP, Mulay SR, Thomasova D, Popper B, Demleitner J, Zuchtriegel G, Reichel C, Cohen CD, Lindenmeyer MT, Liapis H, Moll S, Reide E , Stitt AW, Schott B, Gruner S, Haap W, Ebeling M, Hartmann G, Anders HJ. Cathepsin S cleavage of protease-activated receptor-2 on endothelial cells promotes microvascular diabetes complications. J Am Soc Nephrol. 2016 Jun;27（6）:1635-49. Epub 2015 Nov 13. PMID: 26567242 DOI: 10.1681/ASN.2015020208.

9） Okamura H, Hirota K ,Yoshida K 3 , Weng Y, He Y, Shiotsu N, Ikegame M, Uchida-Fukuhara Y, Airi Tanai A, Guo J. Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*: Novel communication tool and strategy. Jpn Dent Sci Rev. 2021 Nov;57:138-146. Epub 2021 Aug 26. PMID: 34484474 DOI: 10.1016/j.jdsr.2021.07.003.

10） Furuta N, Tsuda K, Omori H, Yoshimori T, Yoshimura F, Amano A. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. Infect Immun. 2009 Oct;77（10）:4187-96. Epub 2009 Aug 3. PMID: 19651865 DOI: 10.1128/IAI.00009-09.