

博士論文

咬合不調和によるアルツハイマー型認知症

関連分子の発現と認知能への影響

(The effects of occlusal disharmony on the  
expression of Alzheimer disease related molecules  
and cognitive ability )

前芝 宗尚

## 参考論文

- 題 名 Occlusal disharmony transiently decrease cognition via cognitive suppressor molecules and partially restores cognitive ability via clearance molecules
- 掲載誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications
- 第 594 巻 P.74～80
- 発行年月 2022 年 2 月
- 著 者 名 Munehisa Maeshiba , Hiroshi Kajiya , Takashi Tsutsumi , Keisuke Migita , Kazuko Goto-T , Yuri Kono , Takashi Tsuzuki , Jun Ohno

## 目次

---

要旨	P 1-2
緒言	P 3-4
材料と方法	P 5-11
結果	P 12-21
考察	P 22-25
結語	P 25
謝辞	P 35

## 要旨

---

【目的】咬合不調和は、末梢器官におけるサイトカインやステロイドホルモンの分泌や交感神経の活性化だけでなく、中枢神経系における神経伝達物質の放出にも影響を与えることが報告されている。しかしながら、咬合不調和が認知能力を低下させるかどうかは明らかにされていない。そこで、我々は咬合性不調和の1つである過剰咬合が脳内のアルツハイマー型認知症関連分子の発現を介して認知能力を低下させるという仮説を立てた。本研究では、咬合不調和と脳内のサイトカイン発現、認知能を制御する分子の発現、および学習・記憶認知能の影響との関係性を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

若齢 2 ヶ月齢マウスと高齢 12 ヶ月齢マウスを用いて過剰咬合モデルマウスを作成後、マウスを無処置(コントロール)群、過剰咬合負荷後 1 週間群、4 週間群に分け、認知能を行動科学的実験にて評価した。同時に、アルツハイマー型認知症関連分子の発現変化と海馬における局在性の違いに関して調べた。

### 【結果】

過剰咬合負荷は、2 ヶ月齢マウスでは負荷 1 週間後に血清および海馬における IL-18 の発現を劇的に増加させたが、12 ヶ月齢マウスでは負荷による変化はほとんどなかった。また、アミロイド  $\beta$ (1-42)とリン酸化タウの産生量は 2 ヶ月齢マウスの海馬領域で過剰咬合負荷 1 週間後に有意に上昇したが、12 ヶ月齢マウスでは変化はなかった。2 ヶ月齢マウスの社会的認知能および長期的認知能は、過剰咬合負荷 1 週間後に 12 ヶ月齢マウスのレベルに近い一過性の認知能低下を誘発し、その後の認知能抑制物質を排除する分子の発現の増加を介して元の発現レベルに近い状態にまで回復した。

### 【結論】

過剰咬合を用いた咬合不調和において、血清や海馬において IL-18 の発現が上昇し、同時にアミロイド  $\beta$  やリン酸化タウなどの認知能抑制分子の蓄積が誘発されることによ

り認知能の低下が起こる可能性が示唆された。さらに、その後認知能抑制物質のクリアランスタンパク質の発現が増加することで、若齢 2 ヶ月齢マウスでは一過性に認知能が低下した後、回復する傾向にあった。一方、高齢 12 ヶ月齢マウスでは咬合不調和による影響がほとんどない可能性が示唆された。

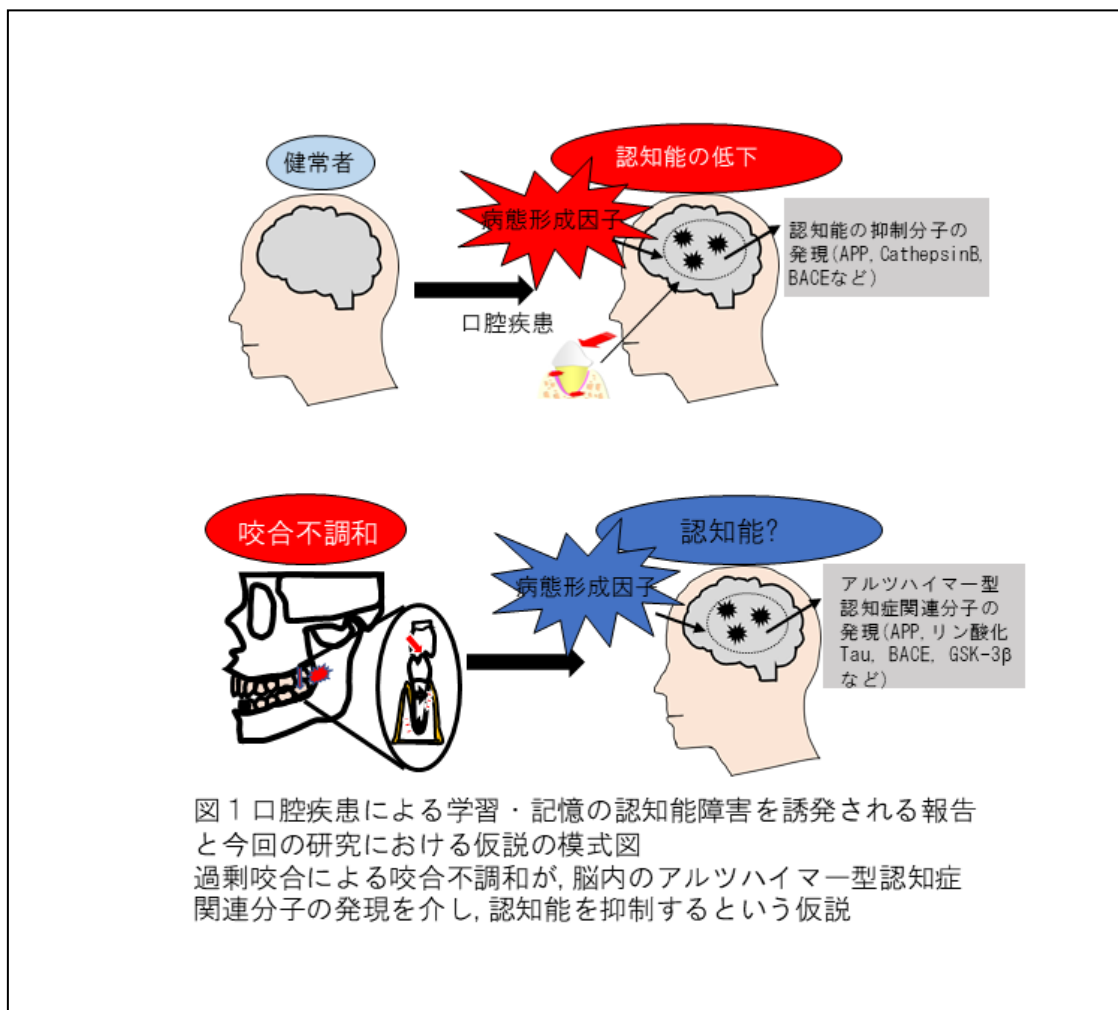
## 緒言

---

咬合不調和は、歯の喪失または歯列不正によって誘発され、咬合力または歯軸方向に異常な状態を引き起こす。さらに、咬合不調和は成人の場合、発音や咀嚼の困難、顔面変形、社会性の低下、口腔保健の QOL の低下と関連している[1]。最近、多くの研究者が、咬合不調和が血清中のコルチゾール濃度を上昇させ[2-4]、マウスが交感神経の過活動を介して心房細動などの循環機能障害を誘発することを報告している[5]。さらに、ラットでは、咬合不調和により視床下部でのノルアドレナリン放出や海馬でのアセチルコリン放出の低下が見られ、メカニカルストレスが自律神経の活性化や学習・記憶の障害を誘発することが示唆されている[6, 7]。アルツハイマー型認知症 (AD) は、最も一般的な認知症のタイプであり、脳内でのアミロイド B (Aβ) の産生、凝集、オリゴマー構築の顕著な変化を誘発し、リン酸化タウを含む神経原線維のもつれを伴うことが知られている。また、Aβ の分解酵素であるネプリライシン、インスリン分解酵素、および KLK7 などは、AD の進行を防ぐことが明らかになって来ている [8, 9]。さらに、エンドサイトーシス分子であるリポタンパク質受容体関連タンパク質 (LRP1) や脱リン酸化酵素プロテインホスファターゼ 2A (Ppp2ca) は、神経炎症時に高リン酸化されたタウタンパク質を減少させることも報告されている[10, 11]。したがって、AD に伴う認知症は、脳内における Aβ とタウの蓄積と分解、これらの分子のクリアランスのバランスに依存していると考えられている。

我々は、マウスを使用した過剰咬合による不調和が歯根膜組織におけるケモカインなどの炎症性因子の分泌や歯槽骨の吸収を促進し、咬合性外傷を引き起こすことを既に報告した[12, 13]。また、口腔疾患と認知能力の関係に着目した最近の研究では、*Porphyromonas gingivalis* とその成分であるリポ多糖が脳内のアミロイド前駆体タンパク質 (APP) 分解酵素を活性化し、Aβ 産生を増加させることが明らかになった [14, 15]。さらに、歯を喪失した咬合不調和や咬合力異常を伴う咀嚼機能障害は、神経変性

を介して認知症を促進させることが報告されている[16, 17]. しかしながら, 咬合不調和が学習・記憶などの認知能を低下させるかどうかについては, ほとんど明らかではない. そこで私たちは, 過剰咬合による咬合不調和が脳内の AD 関連分子の発現を介して認知能を抑制するという仮説を立てた. この仮説を検証するために, 咬合不調和と海馬におけるサイトカインや認知制御分子の発現および認知における学習・記憶の障害との関係を明らかにするために, 過剰咬合モデルマウスを用いて咬合不調和による海馬におけるサイトカインや認知制御分子の発現および認知における学習・記憶の障害との関係について検討した (図 1).



## 材料と方法

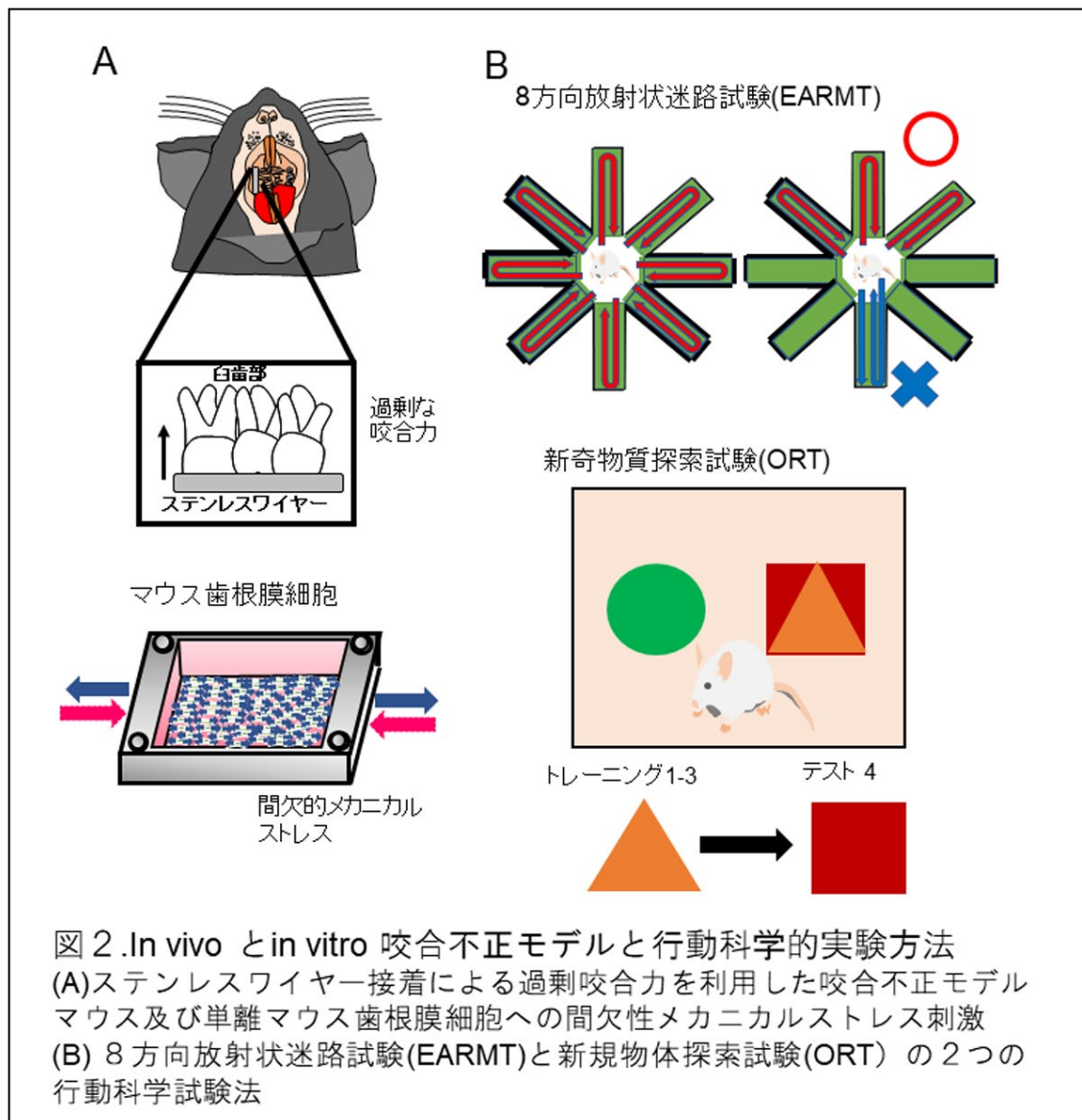
---

### 早期接触負荷による *In vivo* 過剰咬合モデル

2 ヶ月齢 (n=40) または 12 ヶ月齢 (n=40) の C57BL/6 雄マウスを SLC 株式会社 (日本, 静岡県) から購入した. 2 ヶ月齢および 12 ヶ月齢の雄マウスは, 若年および高齢相当のマウスをモデルとして使用した[18, 19]. 食餌 (CE2, CLEA Japan CO LTD, Japan) および水は自由に摂取でき, 動物は福岡歯科大学アニマルセンターSPF 室において, 12 時間:12 時間の明暗サイクルで飼育した. 過剰咬合モデルを作成するために, イソフルラン (50mg/kg, Pfizer, New York, NY, USA) を用いて麻酔し, 上顎右側臼歯 3 本にメチルメタクリレート樹脂 (Super-Bond ; Sun Medical Inc., 日本, 滋賀) を用いてステンレスワイヤー (直径 0. 3mm) にて接着処置した (図 2A). 生後 2 ヶ月と 12 ヶ月のマウスを過剰咬合負荷の 0, 1, 及び 4 週間後の 3 群に分け行動観察した. マウスの体重が減少し始めた場合は直ちに安楽死させることとした.

また, 一部の行動科学的実験には, アルツハイマー型認知症モデルマウスを用いた. このマウスは, App 遺伝子のアミロイド  $\beta$  (A $\beta$ )配列をヒト化に変え, 家族性アルツハイマー型認知病変異の Arctic 変異を加えた 3 重変異のノックインマウス(C57BL/6-App<sup><tm3(NL-G-F)></sup>; AppKI(3))とそのコントロールとして用いられる変異単独ノックインマウス(C57BL/6-App<sup><tm1(NL)></sup>; AppKI(1))であり, 国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センターより譲渡して頂き使用した [20]. この AppKI(3)のホモマウスは生存性, 繁殖性があり, A $\beta$ (1-42)の産生比率を高め, 若齢 2 ヶ月齢からアミロイド斑が形成され, 神経炎症およびシナプスの脱落が認められることが報告されている. さらに, AppKI(3)ホモマウスは 6 ヶ月齢から行動科学的実験の 1 つである Y 字迷路において行動異常が認められることも報告されている. 一方, AppKI(1)ホモマウスは 6 ヶ月齢からアミロイド斑の形成が認められるものの, Y 字迷路において 18 ヶ月齢以降で行動異常が認められる. これらの KI マウスを野生型マウス(C57BL/6)マウスと比較した.





### 間欠的メカニカルストレスを利用した *In vitro* 過剰咬合モデル

2 ヶ月齢または 12 ヶ月齢の C57BL/6 雄マウスから歯根膜細胞を単離し、初代培養した. マウス(n=5)はイソフルランを用いて麻酔を施行し、下顎正中線交叉部を切開して左右に半切し、周辺組織から剥離した. その後、実体顕微鏡を用いて下顎第一大臼歯周囲の歯槽骨に付着している歯根膜を切開して抜歯し、臼歯を PBS にて洗浄, D-MEM 培養液 (和光, 日本, 大阪) に保存した. その後, 2mg/mL コラゲナーゼ (和光) と 0.25%

トリプシン（和光）を用いて酵素処理を行い、37℃で15分間インキュベートし臼歯の表面からPDL細胞を採取した。その後、さらにコラゲナーゼとトリプシンを含むD-MEMをチューブに追加し、さらに2時間インキュベート後回収した。その後、PDL細胞を400gで5分間遠心分離し、20%ウシ胎児血清、100U/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシンを含むD-MEMを用いて5%二酸化炭素/95%空気の加湿ガス混合気中37℃で培養を行った。マウスPDL細胞はサブコンフルエントまで培養後、50 cm<sup>2</sup>のシリコンチャンバー内で5×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>の密度で播種した。このシリコンチャンバーを伸展装置（STB-140, Strex 社, 大阪）に装着し、間欠的な一軸伸展（60秒/リターン、29秒/レストタイム、1.6mm延伸長、105%延伸比）を0, 1, 3, 5日にて与えた。

#### **RNA単離と定量性RT-PCR法**

TRIzol 試薬（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて、細胞からトータルRNAを抽出した。SuperScript II 逆転写酵素（Thermo Fisher Scientific）を用いて、3 μg の total RNA からプロトコールに従って相補的 DNA（cDNA）を合成した。定量性 RT-PCR 分析は、Thunderbird SYBR qPCR Mix 試薬（東洋紡績株式会社, 大阪, 日本）を使用し CFX-96 Real-Time System およびソフトウェア（Bio-Rad 社, カリフォルニア, 米国）を用い、各々の遺伝子に特異的なプライマー（表 1）を用いて行った。反応条件は、94℃で60秒の初期変性後、95℃で15秒の変性、60℃で15秒のアニーリング、72℃で45秒の伸長を40サイクル行った。β-actin は、使用した mRNA 濃度の違いによる増幅のばらつきを抑制するために内部標準として用いた。遺伝子発現の相対的変化の算出には delta cycle threshold 法を用いた。相対的な mRNA の発現は、β-actin の発現レベルに対する標的 mRNA の比率として標準化した。

表 1 定量性 RT-PCR に使用した遺伝子特異的なプライマー

Genes	Forward and reverse primers (5'–3')	Position	Product size (bp)	Acc No
IL-1 $\beta$	5'-gtggcagctacctgtgtctt	306–325	97	NM_008361
	5'-agtcacagaggatgggtctt	403–384		
TNF- $\alpha$	5'-agccgatgggtgttaccttg	509–528	98	NM_001278601
	5'-atagcaaatacggtgacggt	607–588		
App	5'-actctgtgccagccaatacc	2029–2048	87	NM_001198823
	5'-gaacctggtcgagtgggtcag	2116–2097		
Tau	5'-tggacctgagcaaagtgacc	1090–1109	81	NM_001038609
	5'-tttacttccacctggccacc	1171–1152		
Bace1	5'-ccttccgcataccatcctt	1448–1467	113	NM_001145947
	5'-taacagtgcccgatgatgac	1561–1542		
Gsk-3 $\beta$	5'-gcgggacccaaatgtcaaac	2593–2612	107	NM_001347232
	5'-gggataaggatggtggccag	2700–2681		
Mme	5'-ggatgcctctgttgagccat	634–653	82	NM_001357335
	5'-tggtctcgggaatgacgttg	716–697		
Klk7	5'-ctccaggagtgcaagaagg	742–761	72	NM_0011872
	5'-agagtcaggaatgccagcac	814–795		
Lrp1	5'-accagtgctatacatcgcg	12064–12083	106	NM_008512
	5'-tatgcggacactctcatcgc	12170–12151		
Ppp2ca	5'-tgtgtgacttgctgtgtca	809–828	74	NM_019411
	5'-aggtataaccagctccccga	883–864		
$\beta$ -actin	5'-atgccaacacagtgtgtct	990–1009	89	NM_07393
	5'-tgctaggagccagagcagta	1079–1060		

bp, base pairs; Acc No, accession number

### **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 解析**

マウス血清およびマウス PDL 細胞の培養上清 IL-18 の発現量を解析するために、  
各々の採取チューブに全血 (n=5), あるいは培養細胞上清(n=5)を採取し, 3,500rpm で  
30 分間遠心分離後, -80℃で保存した. 血清および培養上清中の IL-18 濃度は, ELISA  
キット (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて, プロトコールの指  
示に従って測定した. 吸光度は, マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm で測定し  
た. IL-18 濃度の検量線は, 0~800pg/mL の範囲で以下のような相関性を示した.  
 $OD_{450nm}=0.0026 \times IL-1 \text{ 濃度 (pg/mL)} + 0.3399$  ; (相関係数=0.996).

### **Western Blot 解析**

サンプルは 20 mM Tris-HCl, pH=7.5, 200 mM NaCl, 1% Triton-X, 1 mM  
dithiothreitol, およびプロテアーゼ阻害剤(Roche, Basel, Switzerland)を含む緩衝溶  
液で細胞を溶解した. サンプル中のタンパク質含有量は, プロトコールに従ってプロテ  
インアッセイキットを用いて測定した (Thermo Fisher Scientific 社). サンプルのタ  
ンパク質 (20 $\mu$ g) を 5-20%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (富士フ  
ィルム, 大阪) で電気泳動した後, ポリフッ化ビニリデン膜 (メルクミリポア社, ダル  
ムシュタット, ドイツ) に 100V で 1 時間, 4℃で電気泳動した. この膜を, APP (Cell  
Signaling Technology (CST), Tokyo, Japan, No. 2452), Amyloid- $\beta$  (CST, No.  
1497), Tau (CST, No. 4019), グリコーゲンシンターゼキナーゼ (GSK-3 $\beta$  CST,  
No. 12456),  $\beta$ -セクレターゼ (BACE CST, No. 606), KLK7 (RSD; No. AF2624),  
リン酸化タウ(Ser404) (CST, No. 35834), IL-1 (CST, No. 12242), および  $\beta$ -actin  
(Sigma-Aldrich Co, 東京, 日本; No. A5441) を, 0. 01%のアジ化ナトリウムと 5%  
のスキムミルクに加えた Tris-Buffered Saline with Tween (TBST : 10mM tris-HCl,  
50mM NaCl, 0. 25% Tween-20) で 1 : 500 に希釈し, 4℃で一晩インキュベーショ

ンした. その後, 5%脱脂粉乳-TBST で希釈 (1 : 2000) した西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギまたは抗マウス IgG を用いて 1 時間インキュベートし, LAS 4000 システム (GE, Arlington Heights, IL, USA) を用いて強化化学発光溶液で現像した. 各タンパク質産物のシグナル強度を ImageJ ソフトウェア (バージョン 1. 49, NIH, Bethesda, MD) を用いて定量的に測定し,  $\beta$ -actin のシグナル強度と比較して標準化した.

### 蛍光免疫染色法

マウスをイソフルランで麻酔し, 生理食塩水で心臓を灌流後, 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1M リン酸緩衝生理食塩水にて灌流固定を行った. 脳組織は 4°C で 2 日間固定置換し, 凍結ミクロトームで冠状切片を 20 $\mu$ m の厚さで切り出した. 切片は, ウェスタンブロット分析に使用したのと同じのものを使用し, これら一次抗体とともに 4°C において加湿チャンバー内で一晩インキュベートした. 抗体は, Alexa Fluor 標識 IgG 二次抗体 (1 $\mu$ g/mL, Thermo Fisher Scientific 社製) と室温で 30 分間インキュベートすることで可視化した. 核の染色は, 4, 6-ジアミノ-2-フェニルインドール色素 (同仁堂, 熊本, 日本) を用いて行った. 主に海馬領域, 特に短期記憶や学習に関連する CA1, CA3, および歯状回領域に注目して観察した.

一部の実験では, 標本を凍結組織切片作製用包埋剤 (O. C. T. Compound) にて包埋し, ドライアイス/イソペンタンで凍結した. Frigocut CM3050S クライオスタット (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて, 連続した脳切片 (厚さ 6 $\mu$ m) を作製した. 染色した切片を BZ-X710 顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した.

### 行動科学的実験解析

今回の実験では, 2 種類の行動科学的テストをビデオ録画と手動による目視下で評価

を行った。社会性と長期的記憶の検査では、8 方向性放射状迷路試験 (EARMT) を用いた (図 2B)。8 本のアームを持つ中央のプラットフォーム (SHINFACTORY, Fukuoka, Japan) を壁で囲み、遮音・遮光された部屋に設置したものである。放射状迷路に慣れるために、試験の 1 日前から装置内でマウスを自由に運動させた。慣れさせた後、1 日 1 回の試験を 3 日間行った。マウスは迷路内を自由に移動させ、すべてのアームに入るまでの時間をビデオ撮影にて計測した。一度進入したことのあるアームに再び入った場合は、記憶エラーとして評価した。各マウスを評価した後、装置を 70%エタノールで徹底的に消毒した。

また、学習と記憶の種々の側面を調べるために、行動テストとして新規物質探索試験 (ORT) を用いた。この行動科学的試験は 4 日間 (トレーニング 3 日, テスト 1 日) 行い、トレーニング中の 10 分間において、マウスは三角と丸の物体を自由に探索させた。それぞれの物体に触れた回数をカウントし、各物体に触れた回数の比率を算出した。テスト期間は、三角形のトレーニング用物体を新規のテスト用の四角形の物体に置き換え、四角と丸の物体をマウスが触った回数の比率を、学習と短期記憶の指標として評価した。これは、マウスが習性上、新しい物体を好むため見慣れた物体よりも多くの時間を新規物体に触れることに費やすことを利用した検査である。各マウスを評価した後、同様に装置と物体を 70%エタノールで徹底的に洗浄した。この検査法は比較的ストレスが少なく、効率的なマウスの短期記憶のテストであり、薬理的、生物学的、あるいは神経心理学的変化を検出する方法である。

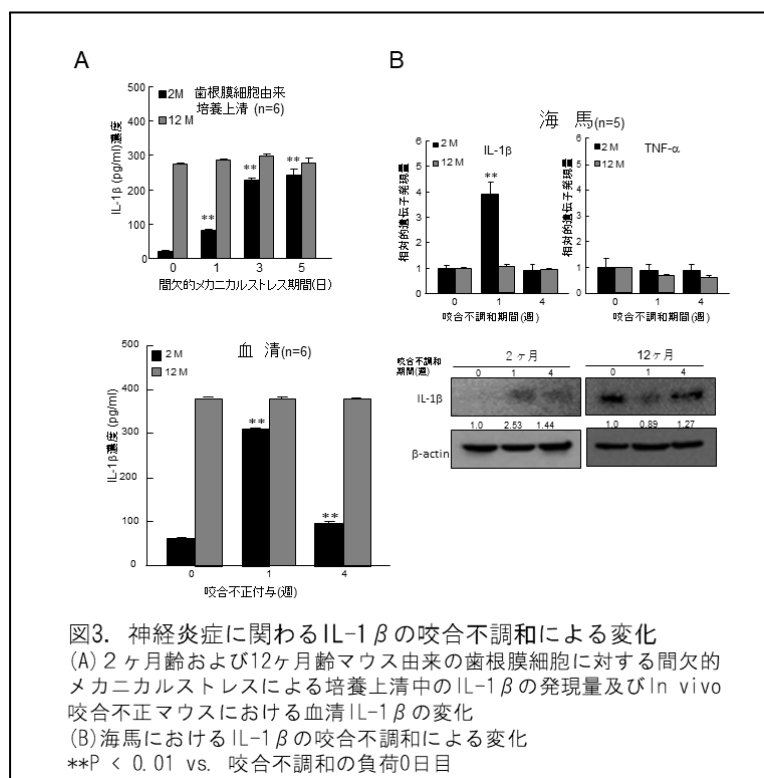
### 統計解析

データは、(n) 細胞数の平均値と標準誤差 ( $\pm$  SE) で表した。有意差は、必要に応じペアの一元配置分散分析および Scheffe の多重比較検定を用いて分析した。P < 0. 05 の値以下の場合には有意であると考えた。

## 結 果

### In vitro 過剰咬合モデルにおける 2 ヶ月齢, 12 ヶ月齢マウス PDL 細胞の IL-1 $\beta$ 発現に対するメカニカルストレスの発現変化

我々の研究も含め多くの報告では, 咬合不調和は, インターロイキン, ケモカイン, ステロイドホルモンなどの様々な種類の炎症性因子を発現増加することが報告されている[4, 12, 13, 20-22]. これらの因子の一つである IL-1 $\beta$  は, AD の神経炎症性サイトカインと関連していることが報告されている[23, 24]. 最初に, In vitro 過剰咬合モデルとして, 2 ヶ月齢マウスと 12 ヶ月齢マウス PDL 細胞を用いて, 間欠的なメカニカルストレス 0, 1, 3, 5 日にて培養上清中の IL-1 $\beta$  の発現変化を ELISA 法により調べた (図 3A). メカニカルストレスは, 2 ヶ月齢マウス PDL 細胞の IL-1 $\beta$  の発現量を, ストレス負荷後 3 日目で有意に増加させ, 5 日後まで発現の上昇は続いた. 一方, 12 ヶ月齢マウス PDL 細胞の IL-1 $\beta$  の発現量は, ストレスが無い状態で, もともと 2 ヶ月齢マウスよりも非常に高く, メカニカルストレスの影響を受けなかった.



咬合不調和は、若年マウスの血清および海馬における IL-1 $\beta$  を一過性に増加させたが、  
高齢のマウスでは一定であった

次に、咬合不調和が若齢マウスと高齢マウスの IL-1 $\beta$  の発現に及ぼす影響を明らかにするために、2 ヶ月齢と 12 ヶ月齢のマウスを使用して、過剰咬合負荷後 0, 1, 4 週目の in vivo 過剰咬合モデルマウスにおいて誘発される IL-1 $\beta$  発現レベルを ELISA 法により調べた。2 ヶ月齢と 12 ヶ月齢のマウスでは、過剰咬合負荷の前後で体重に有意な差は認められなかった。過剰咬合は、2 ヶ月齢マウスの血清中の IL-1 $\beta$  の発現を負荷後 1 週間で有意に増加させ、4 週間後には発現は劇的に減少した。一方、12 ヶ月齢マウスの血清中の IL-1 $\beta$  の発現は、過剰咬合負荷が無い状態で既に、2 ヶ月齢マウスよりも高く、過剰咬合負荷の影響を受けなかった。また、過剰咬合負荷は、1 週間後の 2 ヶ月齢マウスの海馬において、IL-1 $\beta$  mRNA およびタンパク質の発現を有意に増加させたが、Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  の発現には影響を与えなかった (図 3B)。一方、12 ヶ月齢のマウスの海馬における IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の発現には、過剰咬合の負荷は影響を与えなかった。

咬合不調和は、若齢 2 ヶ月齢マウスにのみ、Amyloid- $\beta$  や Tau などの認知機能抑制分子とその関連分子の発現を誘発した

咬合不調和に対する海馬領域での認知能関連分子の発現を明らかにするために、定量的 RT-PCR 法とウェスタンブロッティング法を用いて、アルツハイマー型認知症関連分子である A $\beta$  と Tau, およびそれらを調節するタンパク質の発現量と時間経過を調べた。生後 2 ヶ月齢マウスのこれらの分子元来の基礎発現レベルは、12 ヶ月齢マウスの基礎レベル比べて有意に低かった (図 4A)。さらに、App, Tau,  $\beta$ -secretase (BACE), GSK-3 $\beta$  の mRNA の発現は、2 ヶ月齢マウスでは負荷 1 週間後に増加し、負荷 4 週間後には徐々に減少していたが、12 ヶ月齢マウスでは負荷による影響はほとんどなかった。



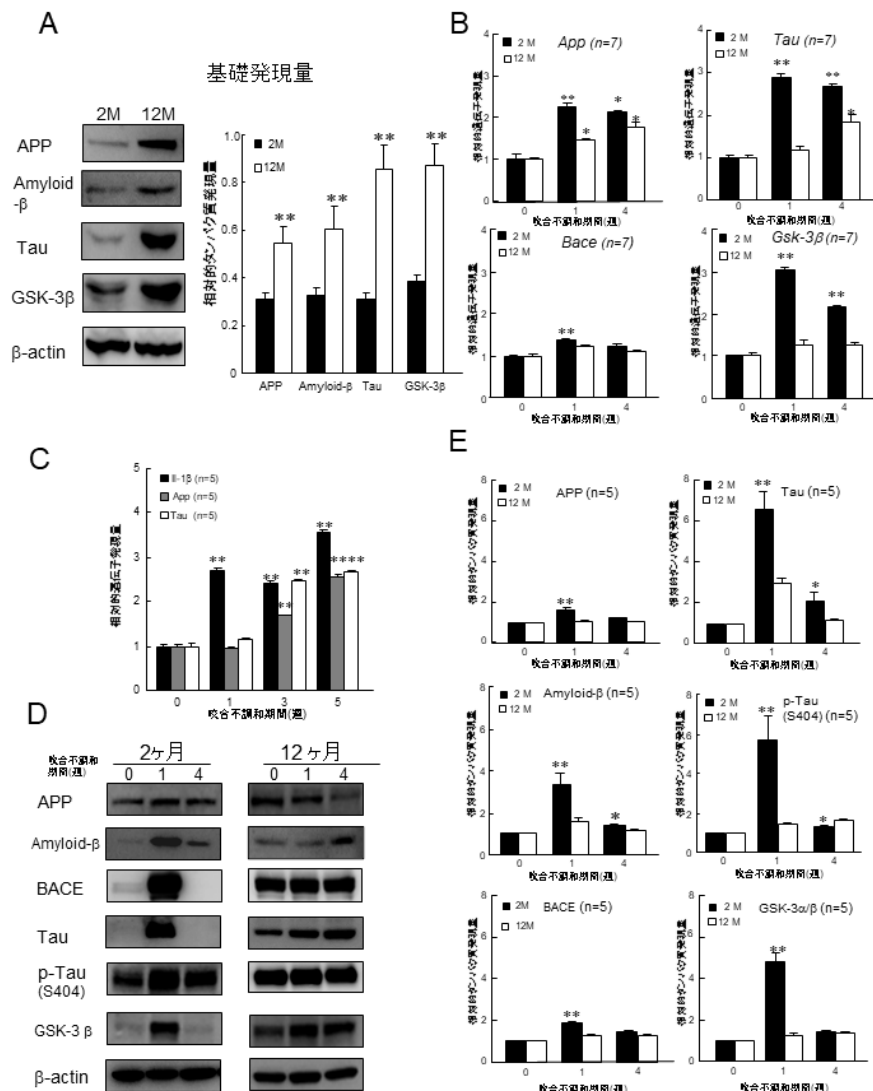


図4. 海馬における月齢によるアルツハイマー型認知症関連物質と咬合不調による変化

(A)2ヶ月齢と12ヶ月齢マウスの認知能抑制分子の基礎的発現量

(B)咬合不調による海馬での認知能抑制分子遺伝子の発現変化, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 咬合不調と負荷0日目

(C)咬合不調による海馬でのIL-1βの発現と認知能抑制分子遺伝子

(D&E)咬合不調による海馬での認知能抑制分子のタンパク質の発現変化

た (図 4B). これらの認知能を抑制するタンパク質分子の発現パターンは, mRNA の発現結果に類似していた. さらに, これら認知能抑制物質遺伝子の発現は IL-1β の発現に引き続いて誘発された (図 4C). また, これら認知能抑制分子の中でも, 特にリン酸化タウ (Ser404) の発現は, 生後 2 ヶ月齢マウスの海馬で負荷 1 週間後に一過性に増加したが, 負荷 4 週間後には減少していた (図 4D&4E).

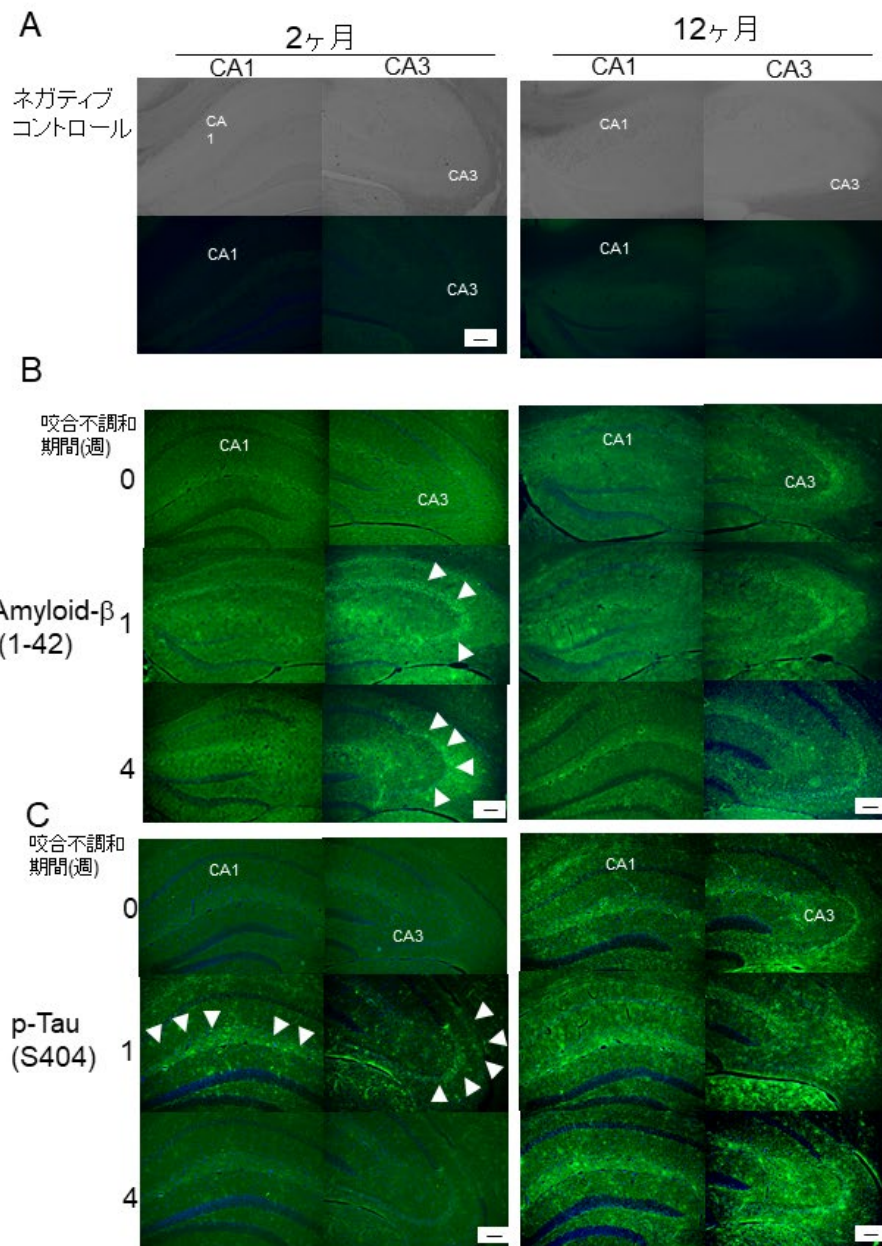


図5. 海馬での咬合不調和によるアルツハイマー型認知症関連物質発現の局在性の変化

(A)2ヶ月齢と12ヶ月齢マウスの海馬のネガティブコントロール

(B)海馬のCA1とCA3領域での咬合不調和によるアルツハイマー型認知症関連分子の発現変化

さらに、蛍光免疫染色法を用いて、咬合不正負荷後の認知能抑制分子の局在を調べた。まず、抗体の特異性と自家蛍光を確認したところ、ネガティブコントロールでは顕著な蛍光は認められなかった (図 5A)。2ヶ月齢マウスの海馬全体では、過剰咬合負荷前

に A $\beta$  や Tau とリン酸化タウの染色で顕著な蛍光は検出されなかった。しかし、1 週間後には、特に海馬の CA3 領域で A $\beta$  の発現が検出された。同時にリン酸化タウ (Ser404) の有意な発現が海馬の CA1 および CA3 領域で負荷 1 週間後に認められた。(図 5B)。一方、12 ヶ月齢マウスは、無負荷の状態で A $\beta$  とリン酸化タウの発現が元々高く、2 ヶ月齢のマウスの海馬全体では過剰咬合負荷の影響は認められなかった。

咬合不調和は、若齢 2 ヶ月齢マウスでは認知機能抑制分子の排除に関するタンパクの発現が一時的に増加したが、高齢 12 ヶ月齢マウスではほとんど影響がなかった

A $\beta$  の沈着や凝集は、脳内のミクログリアによる貪食やアストロサイトなどが分泌するいくつかの分解酵素によって制御されている[8, 9, 25]。そこで、過剰咬合負荷後の海馬におけるこれらの A $\beta$  を分解するタンパク質の発現を調べた。2 ヶ月齢マウスでは、海馬における Mme (ネプリライシン) と Klk7 の mRNA の発現が認められたが、12 ヶ月齢マウスではこれらの発現変化は認められなかった (図 6A)。また、タウタンパク質取り込み輸送体 Lrp1 やタウタンパク質脱リン酸化酵素 Ppp2ca (プロテインホスファターゼ 2) などのタウタンパク質の排除に関わる分子群の発現も、2 ヶ月齢マウスでは過剰咬合負荷後に発現増加したが、12 ヶ月齢マウスでは発現変化は認められなかった。さらに、2 ヶ月齢マウスでは 1 週間後に過剰咬合負荷によって KLK7 タンパク質の発現が劇的に増加した (図 6B)。しかし、12 ヶ月齢マウスでは発現変化は認められなかった。また、A $\beta$  と排除分子 KLK7 の海馬における局在に関して調べてみると、2 ヶ月齢マウスの海馬 CA3 領域では、過剰咬合負荷 1 週間後の KLK7 の発現が A $\beta$  の発現に一部共局在していた (図 6C)。

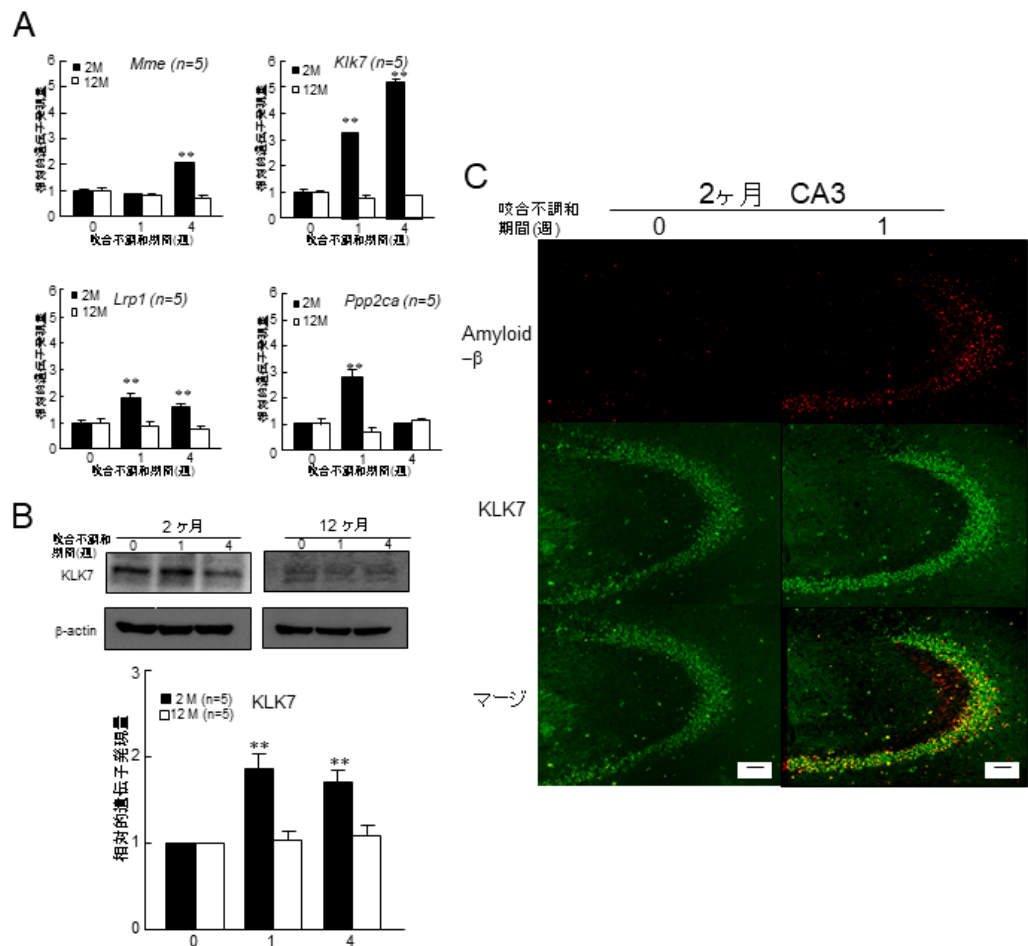


図 6. 海馬における認知能抑制物質の分解・排泄にかかわる分子の咬合不調和による変化

(A) 2ヶ月齢と12ヶ月齢マウスの抑制分子除去にかかわる分子遺伝子の発現量の変化

(B) 咬合不調和による海馬での認知能抑制物質分解酵素KLK7の発現変化, \*\* $P < 0.01$  vs. 咬合不調和負荷0日目

(C) 咬合不調和による海馬CA3領域でのAmyloid- $\beta$ とKLK7の共局在

2 ヶ月齢マウスの過剰咬合負荷後，社会的および長期的認知能力が一時的に低下したが，12 ヶ月のマウスでは低下しなかった

最後に，咬合不調和後の認知能を評価するために，EARMT および ORT を用いて，社会的認知能力および長期的認知能力に対する過剰咬合負荷の影響を調べた．EARMT では，若年 2 ヶ月齢マウスでは，試行を反復するとマウスが 8 つのアームに滞在する総時間とエラー数が徐々に減少したが，12 ヶ月マウスではほとんど変化が見られなかった（図 7A）．さらに，EARMT ではマウス 8 つのアームに滞在する総時間は，2 ヶ月齢のマウスの方が 12 ヶ月齢のマウスよりも短かった．次に，2 ヶ月齢のマウスに過剰咬合負荷を与えると，1 週間で 12 ヶ月齢マウスのレベルまで有意に増加し，その後負荷前付近まで減少した．また，2 ヶ月齢マウスのエラー数は，負荷後 1 週間で 12 ヶ月齢マウスのエラー数とほぼ同じレベルまで一過性に増加した．一方，12 ヶ月齢マウスでは，8 つのアームに滞在する総時間やエラー数に，過剰咬合負荷の前後で有意な差は見られなかった．

さらに ORT での 2 ヶ月齢マウスは，負荷をかける前の新しい物体を探索する頻度が，負荷をかけた 1 週間後に劇的に減少し，その後負荷前の探索頻度に向かってわずかに回復した（図 7B）．しかし，12 ヶ月齢のマウスにおいて頻度は過剰咬合負荷の影響を受けなかった．

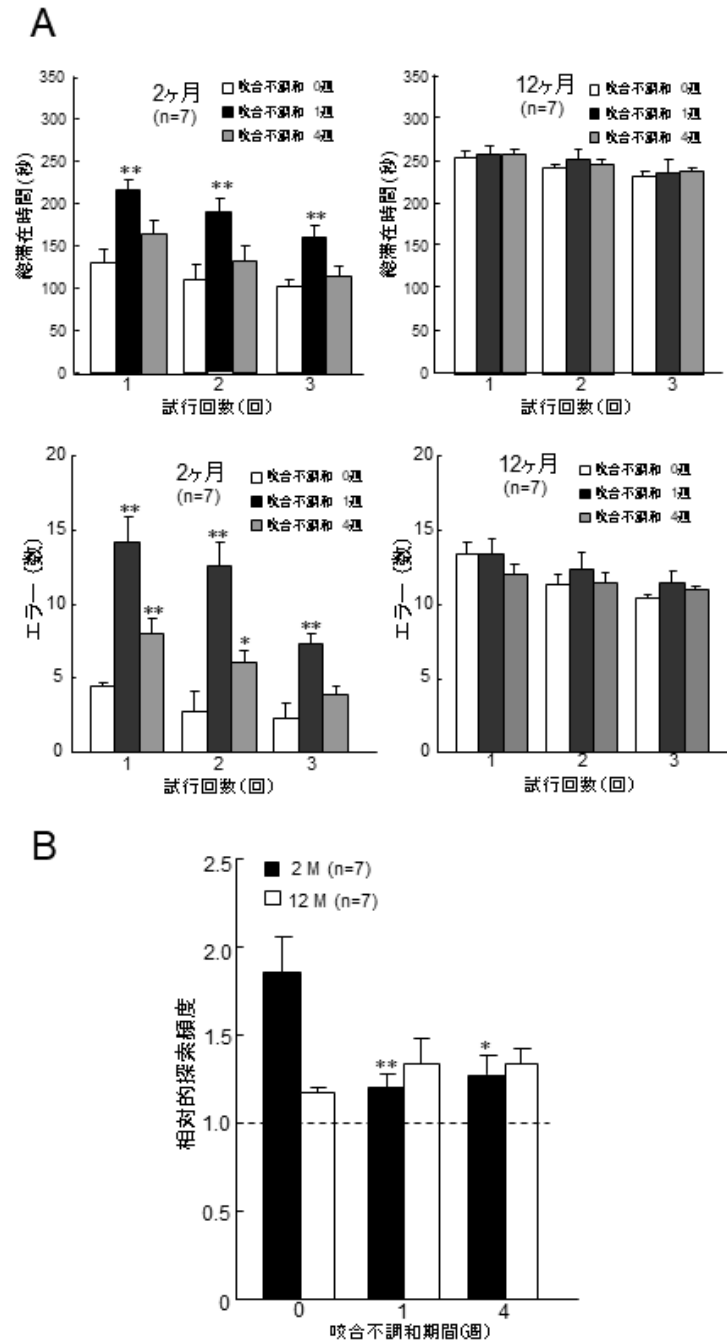


図 7. 2ヶ月齢と12ヶ月齢の咬合不調和による行動科学的变化  
 (A)8方向性放射状迷路試験(EARMT)を用いた咬合不調和による変化,  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 咬合不調和負荷0日目  
 (B)新規物質探索試験(ORT)を用いた咬合不調和による変化,  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 咬合不調和負荷0日目

## 認知症モデルマウスにて若齢 2 ヶ月齢マウスにおいて過剰咬合負荷後認知機能の低下が見られた

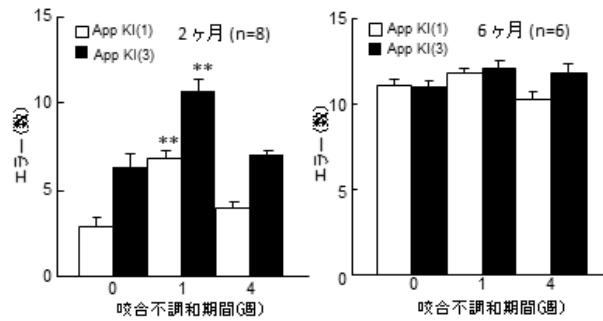
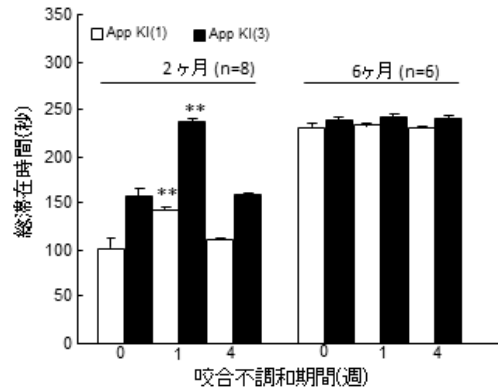
APP タンパク質過剰発現による認知症モデルマウス(C57BL/6-App<sup>tm3(NL-G-F)/Tcs</sup>;AppKI(3))およびそのコントロールマウス(C57BL/6-App<sup>tm1(NL)/Tcs</sup>;AppKI(1))を用い、過剰咬合負荷が認知能に与える影響の評価を野生型マウスと同様の行動科学的実験を用いて行った。AppKI(3)モデルマウスは6ヶ月齢から認知症発症するモデルマウスである。

EARMT を用いた 8 アーム総滞在時間は、AppKI(3)および AppKI(1)の若齢 2 ヶ月齢マウス両群とも、過剰咬合負荷 1 週間後に一過性の時間延長が認められた (図 8A)。しかしながら、2 ヶ月齢では AppKI(3)マウスの方が AppKI(1)マウスより滞在時間は長かった。また、AppKI(3)および AppKI(1)の両群の 6 ヶ月齢マウスでは、両群の 2 ヶ月齢マウスに比較して、元来負荷前の滞在時間が延長しており、過剰咬合による影響は認められなかった。また、AppKI(3)および AppKI(1)の 2 ヶ月齢マウス両群のエラー数も、負荷後 1 週間で一過性に増加した。一方、これら両群の 6 ヶ月齢マウスでは、滞在する総時間やエラー数に過剰咬合負荷の前後で有意な差は見られなかった。

さらに ORT を用いた場合、AppKI(3)および AppKI(1)の両群 2 ヶ月齢のマウスは、負荷をかける前の新規物体を探索する頻度が、負荷をかけた 1 週間後に減少し、その後負荷前の探索頻度に向かって回復した (図 8B)。しかし、AppKI(3)および AppKI(1)の 6 ヶ月齢のマウスにおいて頻度は過剰咬合負荷の影響を受けなかった。

これら KI マウスを用いた過剰咬合による認知能への影響の結果は、野生型マウスを用結果と類似していた。

A



B

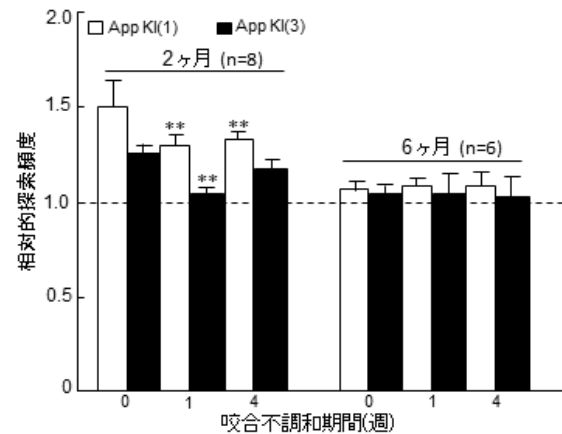


図 8. アルツハイマー型認知症モデルマウス(AppKI(3))とそのコントロールマウス(AppKI(1)) の咬合不調和による行動科学的变化

(A)8方向性放射状迷路試験(EARMT)を用いた咬合不調和による変化, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. 咬合不調和負荷0日目

(B)新規物質探索試験(ORT)を用いた咬合不調和による変化, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. 咬合不調和負荷0日目



## 考察

---

我々は、過剰咬合モデルマウスを用いて、IL-18 の発現、アルツハイマー型認知症関連分子、および認知能に及ぼす咬合不調和の影響を調べた。アルツハイマー型認知症 (AD) は、凝集・沈着したアミロイド  $\beta$  (A $\beta$ ) を含むプラークと、リン酸化したタウを含む神経原線維のもつれが特徴である。さらに、AD の病因には神経炎症が関係していると言われている[26]。疫学調査でも、炎症と AD のリスクとの間に相関関係があることが示されている[27]。さらに、AD 患者の血漿、脳、脳脊髄液では、炎症性サイトカインが上昇している[28]。炎症性サイトカインの中でも、IL-18 は、神経炎症のリスクを高め、AD やパーキンソン病に関与している可能性があると報告されている[29]。強力な炎症性サイトカインである IL-18 は、ミクログリアやアストロサイトで産生され、AD 患者で発現量が増加している[30]。さらに、ミクログリアの活性化による神経細胞の APP の過剰発現に IL-18 が関与することで、AD を特徴づける神経病理学的変化が認められている[31]。さらに、早期に発症した AD 患者の血清中の IL-18 濃度は、同年齢の健常対照者の血清中の IL-18 濃度と比較して高いことも示されている[23]。今回の実験では、IL-18 の基礎レベルは、高齢マウスの方が若齢マウスよりも有意に高いことがわかった。さらに、過剰咬合負荷により、若齢マウスの血清や海馬では IL-18 の発現が一過性に上昇したが、高齢マウスでは発現量は一定であった。また、海馬における A $\beta$  および Tau の mRNA の発現は、過剰咬合負荷後に IL-18 の mRNA の発現に追従することもわかった。今回の結果から、若齢 2 ヶ月齢マウスに限っては、過剰咬合負荷が IL-18 の発現を亢進させ、認知能力の少なくとも部分的な低下をもたらすことが示唆された。しかし、高齢 12 ヶ月齢マウスでは基礎的な IL-18 レベルが元々高いため、過剰咬合荷重は認知能力にほとんど影響を与えないかもしれない。歯周病は歯槽骨の破壊を引き起こし、最終的には歯の喪失につながるということが知られている。慢性歯周炎や歯の喪失は、近年、A $\beta$  の蓄積、神経変性、認知能力の低下など、AD に類似した表現型を誘導することが報告

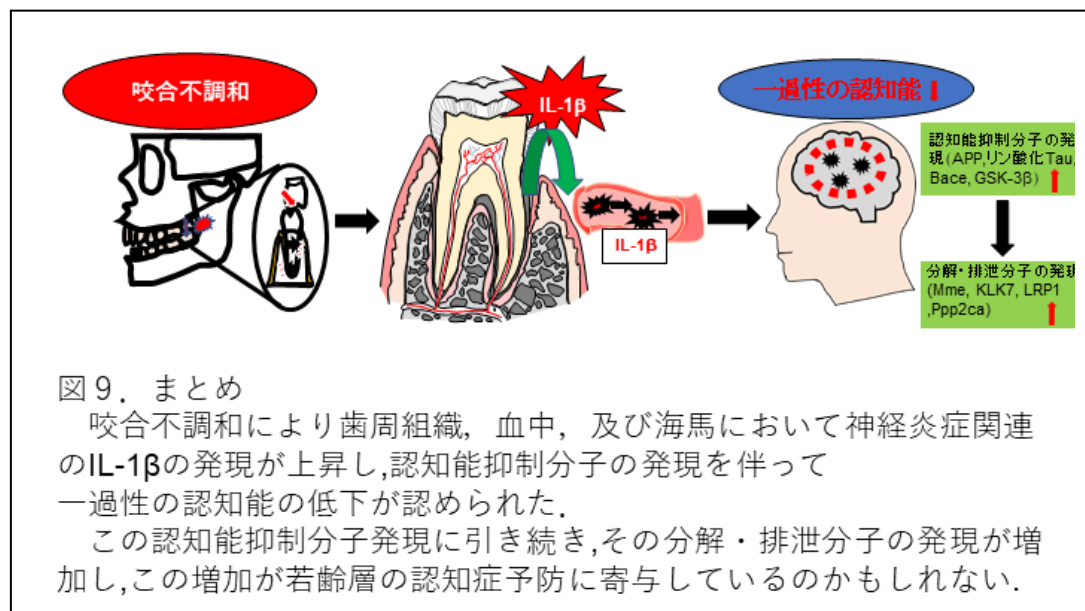
されている[14, 16]. 我々は, 若齢 2 ヶ月齢マウスの海馬において, 過剰咬合負荷による咬合不調和が, A $\beta$  とリン酸化タウの産生を同時に上昇させ, これらの関連酵素の発現を変化させることを発見した. また, EARMT と ORT による行動科学的実験において, 過剰咬合負荷後の若齢 2 ヶ月齢マウスの認知能が一過性に低下することがわかった. 若齢 2 ヶ月齢マウスの認知能力低下の時間経過は, 海馬における認知抑制分子の発現とほぼ一致していた. 過剰咬合負荷は, AD に関連する認知抑制分子の発現だけでなく, それらの分解・消去分子であるネプリライシン, KLK7, Lrp1, Ppp2ca などの mRNA の発現を, 高齢 12 ヶ月齢マウスではなく若齢 2 ヶ月齢マウスにておいてのみ発現増加した. AD に伴う認知症は, 脳内での A $\beta$  とリン酸化タウの産生と分解・消去のバランスに依存していることが知られている. したがって, 今回の研究では, 若齢マウスの過剰咬合負荷後の A $\beta$  の産生増加が, 認知症の進行リスクを少なくとも部分的に悪化させたと考えられる. 一方, 若齢 2 ヶ月齢マウスに比べて学習・記憶能力がすでに低下していた高齢 12 ヶ月齢マウスでは, 過剰咬合負荷は A $\beta$  およびリン酸化タウの産生や認知能行動テストの結果にほとんど影響を与えなかった. 過剰咬合による咬合不調和は, AD 患者ではなく, 軽度認知障害あるいは認知症の前臨床段階にある患者においてのみ, 認知症進行の重大な危険因子であることが示唆されている. したがって, 正確な咬合は, 若年者や軽度認知障害患者(MCI)の人々の認知症の進行を予防する上で重要な役割を果たすと考えられる. さらに, IL-1 $\beta$  レベルは, AD 患者および MCI の Mini-Mental State Examination スコアおよびその他の認知変数と逆相関することが報告されている[32]. 今回のデータでは, 過剰咬合負荷による IL-1 $\beta$  が認知機能抑制分子の産生を増加させ, その結果, 認知能力が低下することが示された. A $\beta$  は,  $\beta$ -セクレターゼによる App の逐次的なタンパク質分解によって生成される[33]. タウは, AD を含むタウオパチーと呼ばれる認知症の発症にも中心的な役割を果たしている. タウは, GSK-3 や CDK5 などのプロリン指向型キナーゼ[34-36], タウ-チューブリンキナーゼや微小

管親和性制御キナーゼなどの非プロリン指向型キナーゼ[37, 38], Fyn や Abl キナーゼなどのチロシンキナーゼ[39, 40]の 3 種類のキナーゼによってリン酸化される. いくつかの遺伝子変異を有する家族性 AD は, A $\beta$  とリン酸化タウの産生と凝集の増加を特徴とすることが知られているが, AD 患者の中には, A $\beta$  の脳内での産生速度が増加するのではなく, クリアランス速度が低下することが報告されている[41]. このように, AD は A $\beta$  とリン酸化タウの産生, クリアランス, 凝集の割合のバランスを反映している. このバランスは, AD の有効な治療法を開発する上で重要な要素である[42]. A $\beta$  を分解する酵素としては, ネプリライシン, インスリン分解酵素, KLK7 などが同定されており, LRP1 は, タウのエンドサイトーシスとそれに続く拡散を制御することが示されている. LRP1 を発現低下させることで, 神経細胞間のタウの伝播を効果的に抑制できることがわかった. さらに, リン酸基の除去による脱リン酸化はホスファターゼによって行われる. Ppp2ca は, タウの脱リン酸化活性全体の約 71%を占める主要な酵素である[43]. App/PS1 トランスジェニックマウスに BMP-9 を経鼻投与すると, 7 日後に A $\beta$  のクリアランスが増加することが報告されている[44]. タウのクリアランスは, 血中の脳細胞に LRP1 が取り込まれることで数時間後に活性化することが報告されている[45, 46]. 我々の実験では, Mme, Klk7, Lrp1, および Ppp2ca 遺伝子とそれらの A $\beta$  およびリン酸化されたタウのクリアランス分子も, 若いマウスでは過剰咬合負荷時に発現が上昇したが, 高齢のマウスでは上昇しなかった. 今回の実験では, 若齢マウスでは過剰咬合負荷 1 週間後に A $\beta$  の発現が増加し, 4 週間後にはほとんど消失した. また, APP タンパク質過剰発現による認知症モデルマウス(C57BL/6-App<sup>tm3(NL-G-F)Tcs</sup>;AppKI(3))およびそのコントロールマウス(C57BL/6-App<sup>tm1(NL)Tcs</sup>;AppKI(1))を用いて同様に行動科学的実験にて野生型マウス(C57BL/6)マウスと比較した. この結果, KI マウスを用いた咬合不調和による認知能への影響は, 野生型マウスを用いた結果と類似していた.

以上のことから、若齢マウスの認知機能の低下は、A $\beta$  およびリン酸化タウ排泄分解分子の発現増加によって回復する可能性が示唆された。

## 結語

過剰咬合による咬合不調和は、若齢層では歯周組織、血清および海馬における IL-1 $\beta$  の発現を有意に増加させ、その結果、アルツハイマー型認知症関連分子 A $\beta$  やリン酸化タウなどの産生を伴う一過性の認知能力の低下が見られた（図 9）。一方、高齢層では、咬合不調和による影響はなかった。APP タンパク質過剰発現によるアルツハイマー型認知症モデルマウスとの比較した結果においても類似した結果となり、認知抑制分子の発現は、若齢層では認知症の進行を防ぐためにその分解・排泄タンパク質の増加に寄与しているのかもしれない。



## 引用文献

- [1] Choi SH, Kim BI, Cha JY, Hwang CJ. 2015. Impact of malocclusion and common oral diseases on oral health-related quality of life in young adults. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015; 147:587-95. doi: 10. 1016/j. ajodo. 2014. 12. 025.
- [2] Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tonosaki K, Saito S. Evidence for involvement of glucocorticoid response in the hippocampal changes in aged molarless SAMP8 mice. *Behav Brain Res.* 2002; 131:125-9. doi: 10. 1016/s0166-4328(01)00378-3.
- [3] Kubo KY, Yamada Y, Iinuma M, Iwaku F, Tamura Y, Watanabe K et al. Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice. *Neurosci Lett.* 2007; 414:188-91. doi: 10. 1016/j. neulet. 2006. 12. 020.
- [4] Shimizu Y, Khan M, Kato G, Aoki K, Ono T. Occlusal disharmony-induced stress causes osteopenia of the lumbar vertebrae and long bones in mice. *Sci Rep.* 2018;8:173. doi: 10. 1038/s41598-017-18037-y.
- [5] Suita K, Yagisawa Y, Ohnuki Y, Umeki D, Nariyama M, Ito A et al. Effects of occlusal disharmony on susceptibility to atrial fibrillation in mice. *Sci Rep.* 2020; 10:13765. doi: 10. 1038/s41598-020-70791-8.

- [6] Yoshihara T, Yawata Y. Lesions of the ventral ascending noradrenergic bundles decrease the stress response to occlusal disharmony in rats. *Neurosci Lett.* 2011;503:43-7. [doi: 10.1016/j.neulet.2011.08.004.](#)
- [7] Katayama T, Mori D, Miyake H, Fujiwara S, Ono Y, Takahashi T et al. Effect of bite-raised condition on the hippocampal cholinergic system of aged SAMP8 mice. *Neurosci Lett.* 2012;520:77-81. [doi: 10.1016/j.neulet.2012.05.035.](#)
- [8] Nalivaeva NN, Belyaev ND, Kerridge C, Turner AJ. Amyloid-clearing proteins and their epigenetic regulation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:235. [doi: 10.3389/fnagi.2014.00235.](#)
- [9] Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T et al. Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice. *EMBO Mol Med.* 2018;10:e8184. [doi: 10.15252/emmm.201708184.](#)
- [10] Rauch JN, Luna G, Guzman E, Audouard M, Challis C, Sibih YE, et al. LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature* 2020;580:381-85. [doi: 10.1038/s41586-020-2156-5.](#)
- [11] Gong CX, Iqbal IG, Iqbal K. Dephosphorylation of Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau by protein phosphatase-2A. *Neuroscience.* 1994;61:765-72. [doi:](#)

10. 1016/0306-4522(94)90400-6.

[12] Goto KT, Kajiya H, Nemoto T, Tsutsumi T, Tsuzuki T, Sato H et al. Hyperocclusion stimulates osteoclastogenesis via CCL2 expression. J Dent Res. 2011;90:793-98. doi: 10. 1177/0022034511400742.

[13] Tsutsumi T, Kajiya H, Goto KT, Takahashi Y, Okabe K. Hyperocclusion up-regulates CCL3 expression in CCL2- and CCR2-deficient mice. J Dent Res. 2013;92:65-70. doi: 10. 1177/0022034512467803.

[14] Wu Z, Ni J, Liu Y, Teeling JL, Takayama F, Collcutt A et al. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis in mice. Brain Behav Immun. 2017;65:350-61. doi: 10. 1016/j. bbi. 2017. 06. 002.

[15] Wu Z, Deshpande T, Henning L, Bedner P, Seifert G, Steinhäuser C. Cell death of hippocampal CA1 astrocytes during early epileptogenesis. Epilepsia. 2021;62:1569-83. doi: 10. 1111/epi. 16910.

[16] Goto T, Kuramoto E, Dhar A, Wang RPH, Seki H, Iwai H et al. Neurodegeneration of Trigeminal Mesencephalic Neurons by the Tooth Loss Triggers the Progression of Alzheimer's Disease in 3×Tg-AD Model Mice. J Alzheimers Dis. 2020; 76:1443-59. doi: 10. 3233/JAD-200257.

- [17] Ekuni D, Endo Y, Tomofuji T, Azuma T, Irie K, Kasuyama K et al. Effects of apoE deficiency and occlusal disharmony on amyloid-beta production and spatial memory in rats. PLoS One. 2013;8:e74966. [doi: 10. 1371/journal. pone. 0074966.](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074966)
- [18] Shoji H, Takao K, Hattori S, Miyakawa T. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. Mol Brain. 2016;9:11. [doi: 10. 1186/s13041-016-0191-9.](https://doi.org/10.1186/s13041-016-0191-9)
- [19] Wu Ni J, Liu Y, Teeling JL, Takayama F, Collicutt A, Ibbett P, Nakanishi H. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice, Brain Behav Immun. 2017;65:350-361. [doi: 10. 1016/j. bbi. 2017. 06. 002.](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.002)
- [20] Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itoharu et al. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. Nat Neurosci. 2014;17:661-3. [doi: 10.1038/nn.3697.](https://doi.org/10.1038/nn.3697)
- [21] Mark I, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D et al. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. PLoS One. 2016;11:e0151081. [doi: 10. 1371/journal. pone. 0151081.](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151081)
- [22] McDevitt MJ, Russell CM, Schmid MJ, Reinhardt RA. Impact of increased occlusal



- contact, interleukin-1 genotype, and periodontitis severity on gingival crevicular fluid IL-1beta levels. *J Periodontol.* 2003;74:1302-07. [doi: 10. 1902/jop. 2003. 74. 9. 1302.](#)
- [23] Ekuni D, Tomofuji, T, Irie K, Azuma T, Endo Y, Kasuyama K et al. Occlusal disharmony increases amyloid- $\beta$  in the rat hippocampus. *Neuromolecular Med.* 2011;13(3):197-203. [doi: 10. 1007/s12017-011-8151-0.](#)
- [24] Dursun E, Gezen-Ak D, Hanağası H, Bilgiç B, Lohmann E, Ertan S et al. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol.* 2015;283:50-7. [doi: 10. 1016/j. jneuroim. 2015. 04. 014.](#)
- [25] Kitazawa M, Cheng D, Tsukamoto MR, Koike MA, Wes PD, Vasilevko V et al. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol.* 2011;187:6539-49. [doi: 10. 4049/jimmunol. 1100620.](#)
- [26] Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E et al. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med.* 2000;6:143-150. [doi: 10. 1038/72237.](#)
- [27] Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 2010; 140: 918-34. \_

doi: 10. 1016/j. cell. 2010. 02. 016.

- [28] Szekely CA, Green RC, Breitner JCS, Østbye T, Beiser AS, Corrada MM et al.  
No advantage of A beta 42-lowering NSAIDs for prevention of Alzheimer dementia in six  
pooled cohort studies. *Neurology*. 2008;70:2291-98. doi: 10. 1212/01. wnl. 0000313933.  
17796. f6.
- [29] Fortenza OV, Diniz BS, Talib LL, Mendonça VA, Ojopi EB, Gattaz WF et al.  
Increased serum IL-1beta level in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment.  
*Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;28:507-12. doi: 10. 1159/000255051.
- [30] Brosseron F, Krauthausen M, Kummer M, Heneka MT. Body fluid cytokine levels  
in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Mol*  
*Neurobiol*. 2014;50:534-44. doi: 10. 1007/s12035-014-8657-1.
- [31] McGeer PL, McGeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease.  
*Neurobiol Aging*. 2001;22:799-809. doi: 10. 1016/s0197-4580(01)00289-5.
- [32] Griffin WST, Liu L, Li Y, Mrak RE, Barger SW. Interleukin-1 mediates Alzheimer  
and Lewy body pathologies. *J Neuroinflammation*. 2006. ;3:5.  
doi: 10. 1186/1742-2094-3-5.
- [33] Forlenza OV, Diniz BS, Talib LL, Mendonça VA, Ojopi EB, Gattaz WF et al.  
Increased serum IL-1beta level in Alzheimer's disease and mild cognitive

- impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2009;28:507-12. [doi: 10. 1159/000255051.](#)
- [34] Barucker C, Harmeier A, Weiske J, Fauler B, Albring KF, Prokop S et al. Nuclear translocation uncovers the amyloid peptide A $\beta$ 42 as a regulator of gene transcription. *J Biol Chem*. 2014;289:20182-191. [doi: 10. 1074/jbc. M114. 564690.](#)
- [35] Martin L, Latypova X, Wilson CM, Magnaudeix A, Perrin ML, Yardin C et al. Tau protein kinases: involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 2013; 12:289-309. [doi: 10. 1016/j. arr. 2012. 06. 003.](#)
- [36] Martin ML, Jurado J, Hernández F, Avila J. GSK-3 $\beta$ , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci*. 2014;7:46. [doi: 10. 3389/fnmol. 2014. 00046.](#)
- [37] Kimura T, Ishiguro K, Hisanaga SI. Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front Mol Neurosci*. 2014;7:65. [doi: 10. 3389/fnmol. 2014. 00065.](#)
- [38] Tomizawa K, Omori A, Ohtake A, Sato K, Takahashi M. Tau-tubulin kinase phosphorylates tau at Ser-208 and Ser-210, sites found in paired helical filament-tau. *FEBS Lett*. 2001;492:221-7. [doi: 10. 1016/s0014-5793\(01\)02256-6.](#)
- [39] Matenia D, Mandelkow EM. The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci*. 2009;34:332-42. [doi: 10. 1016/j. tibs. 2009. 03. 008.](#)

- [40] Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K, Fang SM et al. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2004;24:2304-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4162-03.2004.
- [41] Derkinderen P, Scales TME, Hanger DP, Leung KY, Byers HL, Ward MA et al. Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosinekinase. *J Neurosci*. 2005; 25:6584-93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1487-05.2005.
- [42] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010;330:1774. doi: 10.1126/science.1197623.
- [43] Karran E, Mercken M, Strooper BD. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10:698-712. doi: 10.1038/nrd3505.
- [44] Liu F, Iqbal IG, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*. 2005;22:1942-50. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x.
- [45] Wang Z, Xiong L, Wan W, Duan L, Bai X, Zu H. Intranasal BMP9 ameliorates Alzheimer disease-like pathology and cognitive deficits in APP/PS1 transgenic mice. *Front*

Mol Neurosci 2017;10:32. doi: 10. 3389/fnmol. 2017. 00032

- [46] Yamada K, Hashimoto T, Yabuki C, Nagae Y, Tachikawa M, Strickland DK, Liu Q, Bu G, Basak JM, Holtzman DM, Ohtsuki S, Terasaki T, Iwatsubo T. The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid beta peptides in an in vitro model of the blood-brain barrier cells. J Biol Chem.

## 倫理面への配慮

---

本研究では, 福岡歯科大学にて, 動物実験委員会 (実験動物委員会承認番号 福岡歯科大学・福岡医療短期大学・福岡看護動物実験委員会 19006, 19911) の承認を得た計画に基づき, マウスを用いた. すべての動物は NIH のガイドラインの Animal Research に準拠して使用した. さらに, ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) の前臨床動物実験のガイドラインに準拠した.

また, 動物愛護の観点に最大限配慮し, Western blotting, RT-PCR を行うにあたりマウスの脳海馬の採取, およびマウスの脳における蛍光免疫染色を行うために脳採取, ELISA を行うために心臓より血液採取, 歯根膜の採取を行った.

## 謝辞

---

本研究は, 福岡歯科大学・口腔医学研究センター大野 純先生, 福岡歯科大学・細胞分子生物学講座 鍛冶屋 浩先生, 福岡歯科大学・咬合修復学講座 都築 尊先生をはじめ諸先生方にご指導いただき, 行うことができた. また, 福岡大学・薬学部・医薬品情報学教室 右田啓介先生の協力・指導の下、研究を行うことができた.

本研究の遂行にあたり, ご指導・ご支援頂いた先生方に心より御礼申し上げる.

## 共同研究者一覧

鍛冶屋 浩<sup>1, 3)</sup>, 堤 貴司<sup>4)</sup>, 右田 啓介<sup>5)</sup>,  
後藤加寿子<sup>6)</sup>, 河野 祐里<sup>1)</sup>, 松尾 幸信<sup>1)</sup>,  
都築 尊<sup>2)</sup>, 大野 純<sup>1)</sup>

---

福岡歯科大学・口腔医学研究センター<sup>1)</sup>,  
福岡歯科大学・咬合修復学講座<sup>2)</sup>,  
福岡歯科大学・細胞分子生物学講座<sup>3)</sup>,  
福岡歯科大学・総合歯科学講座<sup>4)</sup>,  
福岡大学・薬学部・医薬品情報学教室<sup>5)</sup>  
福岡医療短期大学・歯科衛生士科<sup>6)</sup>