

論文審査の要旨

報告番号	総研第 661 号	学位申請者	平 沙 祐 里
審査委員	主 査	中 田 匡 宣	学 位
	副 査	杉 村 光 隆	副 査
	副 査	西 谷 佳 浩	副 査
			博 士 (歯 学)
			齋 藤 充
			前 田 綾

Oxytocin but not vasopressin rescue decreased KCC2 expression after oral bacteria LPS treatment in PC-12 and rat primary cells

(バソプレシンではなく、オキシトシンが、ラット初代培養細胞及び PC-12 細胞において口腔内細菌由来 LPS により誘発される KCC2 の減少を改善する)

神経細胞は、成熟に伴い細胞膜上の K^+ -Cl⁻共輸送体(KCC2)の発現量を増大し、細胞内 Cl⁻濃度を低減する事で、作用が興奮性から抑制性へと変化(GABA スイッチ)する。一方、幼少期ストレスは発達障害等の発症への関与が報告されており、我々はこれ迄、幼少期ストレスは GABA スイッチのタイミングを変化させ、中枢神経の正常な発達の阻害を生じること等を報告している。今回、炎症もストレスの 1 つであり、中枢神経系の炎症は精神疾患の原因になり得るといふ神経炎症仮説、及び、神経炎症を引き起こすグラム陰性菌のリポ多糖(LPS)が全身疾患の発症にも関与していること、発達障害の発症を抑制する因子として、自閉症症状の改善効果が報告されているオキシトシン(OXT)、及び、受容体が種々の精神疾患と関連を指摘されているバソプレシン(AVP)が挙げられていることから、学位申請者らは、口腔内細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)、*Fusobacterium nucleatum* (*F.n.*)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a.*) と腸内細菌である大腸菌 O26, O55, O127 株由来の LPS を 10 µg/mL の濃度で PC-12 細胞に 1 時間処理後、NGF を含む神経分化培地で 5 日間培養し、分化した PC-12 細胞における KCC2 の発現を免疫染色にて調べた。また、ラット初代培養細胞を用いて *P.g.* の LPS 処理を行い、同様に KCC2 の発現変化を調べた。次に、*P.g.* の LPS 処理下にて、LPS 受容体 Toll-like receptor 4 (TLR4)、炎症性サイトカイン IL-1β、KCC2 転写抑制遺伝子 RE1-silencing transcription factor (REST) の遺伝子発現変化を定量 PCR で調べた。また、核の局在により KCC2 の遺伝子発現を抑制する REST、methyl CpG binding protein 2 (MECP2) の細胞内局在が *P.g.* の LPS 処理で変化するかを免疫染色で調べた。更に細胞膜の電位変化を DiBAC₄(3)、GABA 機能変化を GABA 受容体アゴニストのムシモールと Fluo-4 を用いた Ca²⁺ imaging で調べた。そして、OXT または AVP (1 µM) を LPS 処理前に 30 分間処理し、KCC2 と GSK3β の発現変化を指標に、TLR4 シグナリングに関与する GSK3β 及び OXT と AVP の効果を調べた。また、TLR2, TLR4, IL-1β, IL-6, GSK3β の siRNA を用いて遺伝子ノックダウン実験を行い、これら分子の KCC2 発現への関与を検討した。その結果、以下の知見を得た。

- (1) ラット初代培養細胞と PC-12 細胞に *P.g.* の LPS 処理を行うと双方において KCC2 の発現が減少した。PC-12 細胞において、KCC2 の発現は大腸菌由来 LPS 処理では減少しなかったが、歯周病原菌由来 LPS では *P.g.*, *F.n.*, *A.a.* の LPS 全ての処理で有意に減少した。
- (2) PC-12 細胞に *P.g.* の LPS を処理すると、TLR4, IL-1β, REST の発現が上昇し、TLR4, IL-1β の遺伝子発現をノックダウンすると、*P.g.* の LPS を処理しても KCC2 の発現は減少しなかった。一方、TLR2, IL-6 のノックダウンは KCC2 発現に影響を及ぼさなかった。GSK3β 遺伝子をノックダウンすると、*P.g.* の LPS を処理しても KCC2 の発現は減少せず、IL-1β の発現も増加しなかった。
- (3) *P.g.* の LPS 処理で REST 及び MECP2 の核への局在が増加した。
- (4) DiBAC₄(3)による細胞膜電位の状態の解析で、*P.g.* の LPS 処理により細胞膜内がコントロールに比べ負に帯電していると考えられた。また、ムシモール投与に対する細胞内の Ca²⁺反応は、コントロール群と比較し *P.g.* の LPS 処理群で蛍光強度が強かったことから、*P.g.* の LPS により GABA スイッチが遅れることが示唆された。
- (5) OXT は *P.g.* の LPS 処理により減少した KCC2 の発現を改善したが、AVP は改善しなかった。更に OXT は、*P.g.* LPS 処理により増加した IL-1β と GSK3β の発現を抑制した。

以上より、歯周病原菌由来 LPS は TLR4, GSK3β, IL-1β, MECP2, REST を介して KCC2 の発現を抑制していること、これらが治療のターゲットになり得る事、OXT が KCC2 の発現低下を回復させることが示唆された。

本研究の成果は、炎症による KCC2 の発現抑制に起因する疾患の新規治療法・予防法開発の基礎となり得るものであり、臨床的意義も高いと考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

なお、学位論文公開審査後に、副査よりテーシス形式論文について文法等の修正の指摘があったため、修正し提出した。