

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11983

研究課題名（和文）新たな歯周炎・リウマチ関連機序の解明 - NET誘導性カルバミル化ペプチドの関与 -

研究課題名（英文）Analysis of the role of carbamylated peptide and NET for the association between periodontitis and rheumatoid arthritis

研究代表者

小林 哲夫 (Kobayashi, Tetsuo)

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号：00215344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、歯周炎と関節リウマチ（RA）の新たな関連機序を解明するため、RA患者群と年齢・性別・喫煙・歯周状態が同程度の対照者群を対象に血清中のカルバミル化ペプチド（CarP）および好中球細胞外トラップ（NETs）の発現についてプロファイリングを行うことである。その結果、RA患者群のCarPおよびNETsの血清濃度は対照者群と比べて有意に高い値を示した。また、CarPおよびNETsの血清濃度は歯周炎重症度と正の相関を示し、歯周病治療によって有意に低下した。以上の結果から、血清のペプチドカルバミル化とNETs形成を介した歯周炎とRAの関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで歯周炎と関節リウマチ（RA）関連報告の殆どは、翻訳後修飾シトルリン化を介した関連機序に関するものであった。しかし、シトルリン化陰性でも歯周炎とRAを併発する症例は相当数実在し、シトルリン化のみでは説明限界があった。そこで本研究では、好中球細胞外トラップ（NETs）形成に伴う別の翻訳後修飾カルバミル化について検証した。その結果、NETsおよびカルバミル化を介した歯周炎とRAの関連が国内外で初めて実証された。これは、新たなRA病因論につながる点で学術的独自性が高いといえる。さらに、口腔ケアや歯周病治療によってRA改善が将来的に期待される点で社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to assess the novel mechanisms linking periodontitis and rheumatoid arthritis (RA) by profiling of serum levels of carbamylated peptide (CarP) and neutrophil extracellular traps (NETs) in the patients with RA and the age-, gender-, smoking status-, and periodontal condition-matched controls. The results indicated that the patients with RA showed significantly higher levels of CarP and NETs than the controls. The data also showed that the serum levels of CarP and NETs were significantly correlated positively with periodontitis severity and were significantly decreased after periodontal treatment in the patients with RA. These results suggest an interrelationship between periodontitis and RA through serum peptide carbamylation and NETs formation.

研究分野：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎 関節リウマチ カルバミル化 好中球細胞以外トラップ 関連機序

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の開始当初時は、歯周炎と関節リウマチ (RA) の関連報告は約 200 編にものぼり、その報告の殆どが、翻訳後修飾の 1 つであるシトルリン化、およびシトルリン化変換酵素 (PAD) の発現を介した関連機序に関するものであった。本研究代表者らの研究グループも、RA 患者群における歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* PAD に対する血清抗体価ならびにシトルリン化ペプチド血清濃度が対照者群と比較して増加していることを報告した (引用文献)。また、*P. gingivalis* PAD に対する血清抗体はシトルリン化ペプチド産生を制御することにより RA 患者のサイトカイン標的治療の反応性に影響を及ぼすことも報告した (引用文献)。しかしながら、シトルリン化と PAD 発現が陰性の場合でも、歯周炎・RA の併発症例は相当数実在したことから、シトルリン化と PAD 発現のみでは歯周炎・RA 関連機序の説明には限界があり、新たな関連機序をさらに解明する必要性があった。

近年、シトルリン化とは異なる翻訳後修飾のカルバミル化、およびその誘導元的好中球細胞外トラップ (NETs) が RA に関与することが報告された (引用文献)。NETs は好中球細胞外に形成される格内クロマチン網であり、感染防御機構の一端を担う。また、NETs 抗菌成分は、血中チオシアン酸をシアン酸へ触媒することによって、蛋白リシン残基からホモシトルリンを産生し、その結果、カルバミル化ペプチドが産生される。このカルバミル化ペプチド発現と RA の関連性については論争中であり、歯周炎患者におけるカルバミル化ペプチドの発現について未だ解析が成されていない。

以上の学術的背景から、従来の本研究代表者らの研究成果の「歯周炎・*P. gingivalis* 感染 PAD・シトルリン化ペプチド発現亢進 RA」とは別に、「歯周炎 NETs 形成 カルバミル化ペプチド産生 RA」という新たな歯周炎・RA 関連機序が考えられ、本研究において検証する必要性があるとの研究着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周炎と関節リウマチ (RA) の新たな関連機序を解明するため、RA 患者群および年齢・性別・喫煙・歯周状態が同程度の対照者群を設定し、カルバミル化ペプチドおよび NETs の血清濃度、シトルリン化ペプチドに対する血清抗体価について各々プロファイリングを行うことである。その後、各プロファイリング結果を、(1) 群間比較、(2) 歯周炎併発 RA 患者を対象に歯周病治療前後で比較、(3) 歯周炎・RA 臨床指標との相関性、について統計解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 群間比較：

インフォームドコンセントが得られた RA 患者 40 名、歯周炎患者 30 名、および健常者 43 名を対象に RA 検査および歯周検査を実施後、血液を採取した。血液より血清を抽出し、すべての血清検体および検査結果について個人情報保護の観点から匿名化した。次いで、血清検査として、抗環状シトルリン化ペプチド (CCP) 血清抗体価、リウマトイド因子 (RF)、C 反応性タンパク (CRP)、カルバミル化ペプチドおよび NETs 血清濃度を ELISA 法にて定量した。各検査結果の群間比較については、各データの正規性分布を検定後に、Kruskal-Wallis test および Scheffe ' s test にて統計学的有意性を検定した。

(2) 歯周炎併発 RA 患者を対象に歯周病治療前後で比較：

インフォームドコンセントが得られた RA 患者 40 名を対象に RA 検査および歯周検査を実施後、中等度から重度の歯周炎を併発した RA 患者 22 名を対象に血液を採取した。その後、歯周病治療としてプラークコントロールおよび超音波スケーラーによる歯肉縁上歯石除去を行った。治療 2 ヶ月後に、同様な検査と血液採取を行った。血液より血清を抽出し、すべての血清検体、検査結果を匿名化した。血清検査として、抗 CCP 血清抗体価、RF、CRP、カルバミル化ペプチドおよび NETs の血清濃度について ELISA 法にて定量した。歯周病治療の前後の比較については、各データの正規性分布検定後に、Wilcoxon signed rank test にて統計学的有意性を検定した。

(3) 歯周炎・RA 臨床指標との相関性：

インフォームドコンセントが得られた RA 患者 40 名、歯周炎患者 30 名、および健常者 43 名を対象に RA 検査および歯周検査を実施後、血液を採取した。血液より血清を抽出して、すべての血清検体および検査結果を匿名化した。次いで、血清検査として、抗 CCP 血清抗体価、RF、CRP、カルバミル化ペプチドおよび NETs の血清濃度について ELISA 法にて定量した。血清検査と歯周炎および RA の臨床指標との相関解析については、各データの正規性分布を検定後、単変量解析 Spearman ' s rank correlation coefficient および多重ロジスティック回帰分析を用いて、統計学的有意性を検定した。

4. 研究成果

(1) 群間比較:

RA 患者群 (40 名)、歯周炎患者群 (30 名) および健常者群 (43 名) を対象に臨床・血清検査結果について群間比較した。その結果、交絡因子である年齢、性別、喫煙状態に有意な群間差が認められない状況下において、RA 患者群および歯周炎患者群のカルバミル化ペプチド血清濃度は健常者群と比較して有意に高い値を示した。この結果は、RA 患者のカルバミル化ペプチドに対する血清抗体価が健常者より増加していたという過去の報告(引用文献)と一致する。また、RA 患者と同様に歯周炎患者でもカルバミル化ペプチド産生が亢進していることが国内外で初めて示唆された。一方、RA 患者群の NETs 血清濃度については歯周炎患者群および健常者群と比較して有意に高い値を示した。この結果は、RA 患者において NETs 形成亢進の結果、カルバミル化ペプチド産生も亢進していることを示唆している。しかし、歯周炎患者ではカルバミル化ペプチド産生は亢進したが、NETs 濃度は健常者と同等であった。この歯周炎患者での結果は、血液好中球由来 NETs レベルは歯周炎患者と健常者とで同等という報告(引用文献)と一致しており、その原因として、歯周炎患者血清好中球の歯周ポケット内細菌刺激に対する自己防衛反応後の影響や NETs 分解機構の関与の可能性が考えられる。

(2) 歯周炎併発 RA 患者を対象に歯周病治療前後で比較:

中等度・重度歯周炎を併発した RA 患者 22 名を対象に臨床・血清検査結果について歯周病治療前後で比較した。その結果、RA 投薬の種類・濃度に有意な変化が認められない状況下において、カルバミル化ペプチドおよび NETs の血清濃度は、治療前と比較して治療後に有意に低下した。この結果から、カルバミル化ペプチド産生は歯周病治療に伴う歯周炎改善に影響されることが国内外で初めて示唆された。カルバミル化ペプチドの減少は、歯周炎症改善に伴うカルバミル化誘導酵素 myeloperoxidase の放出抑制が一因として考えられる。また、本研究結果は歯周炎患者血液好中球由来 NETs レベルが歯周病治療に影響されるという報告(引用文献)と一致する。

(3) 歯周炎・RA 臨床指標との相関性:

RA 患者 40 名、歯周炎患者 30 名、健常者 43 名の計 113 名について、カルバミル化ペプチドおよび NETs 血清濃度と歯周炎・RA 臨床指標との相関解析を行った。その結果、単変量解析 Spearman's rank correlation coefficient によって、カルバミル化ペプチドおよび NETs 血清濃度は歯周炎重症度の指標であるプロービング深さ・臨床的アタッチメントレベルと有意な正の相関を示した。また、多重ロジスティック回帰分析でも同様に、カルバミル化ペプチド・NETs の血清濃度は中等度・重度歯周炎と有意な関連を示した。一方、RA 疾患活動性指標の DAS28-CRP は NETs 血清濃度と有意な正の相関を示したが、カルバミル化ペプチド濃度との関連は認められなかった。その原因としては、カルバミル化ペプチド陽性者の頻度が比較的少ない(32%)ことが影響していると考えられる。また、NETs 血清濃度は抗 CCP 血清抗体価と正の相関を示したことから、NETs はシトルリン化ペプチドの供給源として RA に関与している可能性も示唆された。

以上の研究成果から、血清のカルバミル化ペプチドと NETs 形成を介した歯周炎と RA の関連が示唆された。

<引用文献>

- Shimada A, Kobayashi T, Ito S, Okada M, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Expression of anti-*Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase immunoglobulin G and peptidylarginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol Res*. 2016;51(1):103-111.
- Kobayashi T, Ito S, Kobayashi D, Shimada A, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Serum Immunoglobulin G Levels to *Porphyromonas gingivalis* Peptidylarginine Deiminase Affect Clinical Response to Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drug in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154182.
- Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GMC, van Veelen PA, Levarht NEW, van der Helm-van Mil AHM, Cerami A, Huizinga TWJ, Toes REM, Trouw LA. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:17372-17377.
- Chowdhury CS, Giaglis S, Walker UA, Buser A, Hahn S, Hasler P. Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res Ther*. 2014;16:R122.
- White PC, Chicca IJ, Cooper PR, Milward MR, Chapple ILC. Neutrophil extracellular traps in periodontitis: a web of intrigue. *J Dent Res*. 2016;95(1):26-34.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamashita Y, Kobayashi T, Ito S, Kaneko C, Murasawa A, Ishikawa H, Tabeta K.	4. 巻 30(6)
2. 論文標題 The periodontal inflamed surface area is associated with the clinical response to biological disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: a retrospective study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 990-996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2019.1680100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Ishikawa H, Yoshie H	4. 巻 3
2. 論文標題 Effects of tofacitinib on the clinical features of periodontitis in patients with rheumatoid arthritis: two case reports.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Rheumatology	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41927-019-0062-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi T, Kido J, Ishihara Y, Omori K, Ito S, Matsuura T, Bando T, Wada J, Murasawa A, Nakazono K, Mitani A, Takashiba S, Nagata T, Yoshie H.	4. 巻 89(3)
2. 論文標題 The KCNQ1 gene polymorphism as a shared genetic risk for rheumatoid arthritis and chronic periodontitis in Japanese adults: A pilot case-control study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 315-324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.17-0412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko C, Kobayashi T, Ito S, Sugita N, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: A pilot case-control study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0192365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0192365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林哲夫
2. 発表標題 関節リウマチ発症の環境要因としての歯周病
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林哲夫
2. 発表標題 トファシチニブ投与により歯周病の病状改善を認めた関節リウマチの2例
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子千尋
2. 発表標題 関節リウマチ患者におけるPISA, RA活動度および好中球細胞外トラップ血清レベルの関連性
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林哲夫
2. 発表標題 JAK阻害薬による関節リウマチ患者の歯周病の改善
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林哲夫
2. 発表標題 オーラルケアとフレイル
3. 学会等名 日本リウマチ学会中部支部学術集会 第31回中部リウマチ学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林哲夫
2. 発表標題 歯周病治療による関節リウマチ活動度と血清カルバミル化蛋白レベルの低下
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi T
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase as a risk factor for the response to cytokine targeted therapy in patients with rheumatoid arthritis
3. 学会等名 EuroPerio 9 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林哲夫
2. 発表標題 歯周炎が関節リウマチ発症に及ぼす影響
3. 学会等名 日本臨床歯周病学会第36回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子千尋
2. 発表標題 歯周炎・関節リウマチ患者におけるカルバミル化蛋白血清レベルと歯周治療の影響
3. 学会等名 第61回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子千尋
2. 発表標題 関節リウマチ患者におけるカルバミル化蛋白・好中球細胞外トラップの血清レベルと歯周炎重症度との関連
3. 学会等名 日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会（第149回）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 哲夫
2. 発表標題 関節リウマチ患者におけるbiologic DMARDs (bDMARDs) 治療反応性予測因子の解析
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林 哲夫
2. 発表標題 歯周炎と全身疾患（糖尿病・関節リウマチ）に共通するリスク遺伝子の解析
3. 学会等名 第60回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林 哲夫
2. 発表標題 歯周病と関節リウマチ - 現状と展望、歯科の役割 -
3. 学会等名 日本歯周病学会60周年記念京都大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下 萌
2. 発表標題 関節リウマチ患者におけるPISAと生物学的製剤治療反応性との関連
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kaneko C
2. 発表標題 Effect of periodontal treatment on serum levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular trap in patients with rheumatoid arthritis.
3. 学会等名 EuroPerio 9 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野
http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/obs/per/index_j.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------