

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09599

研究課題名(和文) 歯周炎で誘導されるRNA結合蛋白HuRを介した関節リウマチ悪化メカニズムの解明

研究課題名(英文) The induced RNA-binding protein, HuR targets of IL-6 mRNA and enhances its stabilization in periodontitis

研究代表者

應原 一久 (Ouhara, Kazuhisa)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：80550425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合タンパク質は、mRNAの安定性を調節する。その1つのHuRは、様々な炎症性疾患の進行に関与している。IL-6は、HuRによって制御され、歯周炎でも上昇する。本研究では、歯周炎の進行におけるHuRの関与を検討した。歯周炎組織の免疫染色で、HuRの強い染色が認められ、培養歯肉上皮細胞では、歯周病原性細菌*P. gingivalis*刺激で増加し、IL-6も上昇した。マウス歯周炎モデルにおいてHuR阻害剤であるケルセチンの投与によって、IL-6のHuRによる増強を阻害した結果、骨吸収を阻害した。これらからHuRがIL-6を制御した結果、炎症反応を調節することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果から、歯周炎を始めとする炎症性の疾患(関節リウマチ、糖尿病、炎症性腸疾患)の炎症増悪メカニズムとしてmRNAをターゲットとした新規治療が得られた。mRNAは新型コロナウイルスに対するワクチンに利用されるなど限界広く一般にも知られている分子であるが、ケルセチンのような阻害薬を応用することで、炎症性疾患の治療に有効である可能性が示唆された。歯周炎は国民の80%が罹患している国民病であり、高齢者はセルフケアが難しく、今後歯周炎予防にこのようなmRNA抑制をターゲットにしたものが開発可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：RNA-binding proteins regulate mRNA stability by binding to mRNA. HuR is involved in the progression of inflammatory diseases. IL-6 is a major inflammatory cytokine regulated by HuR binding to mRNA. Periodontitis is also an inflammatory disease caused by IL-6. The involvement of HuR in the progression of PD was assessed using in vitro and in vivo experiments. Immunohistochemistry of inflamed periodontal tissue showed strong staining of HuR. HuR mRNA and protein level was increased by *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Luciferase activity was increased in HuR-over-expressing OBA-9. Down-regulation of HuR by siRNA resulted in a decrease in mRNA expression and production of IL-6. In contrast, the over-expression of HuR increased IL-6 mRNA expression and production in OBA-9. The HuR inhibitor, quercetin, suppressed bone resorption in ligature-induced periodontitis model mice as a result of down-regulation of IL-6. These results show that HuR modulates inflammatory responses by regulating IL-6.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯周炎 RNA結合タンパク質 歯周病原細菌 ケルセチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、歯周病原性細菌 Pg をはじめとする細菌感染に対する生体の防御反応の結果引き起こされる慢性炎症性疾患でサイトカインネットワークが過剰な免疫応答を惹起している。また関節リウマチ (RA) は、関節の破壊をきたす炎症性疾患で、シトルリン化タンパク質 (CP) の増加とそれに対する自己抗体 (抗 CCP 抗体) が関節、血清中に増加し、その結果、過剰な免疫応答が組織破壊を引き起こす。RA の原因遺伝子に関する解析 (GWAS 解析) から臨床で用いられる分子標的薬のターゲットとなっている IL-6 や TNF- $\alpha$  以外にも IL-10、INF- $\gamma$ 、GM-CSF のようなサイトカインや制御性 T 細胞 (Treg) が関与していることが明らかになり、新たな標的分子として創薬分野で情報が応用されている。臨床研究等から歯周炎と RA は密接に関係しており、サイトカインを介した慢性炎症が双方向的に影響していることが示唆されている (J Periodontol. 2013 Dec;84(12))。増悪メカニズムは複数の可能性が考えられるが、その中でも、関節破壊に関与する骨髄由来単球系細胞表面に破骨細胞活性化因子 RANKL のレセプター (RANK) が強発現しており、炎症で誘導された RANKL によって、高頻度で破骨細胞への分化が進んでいることに着目した。また、その RANKL 産生には様々なサイトカインが関与しているが、臨床的にも、動物実験でも IL-6 が強く誘導されている。そこで、本研究課題では IL-6 に着目した。IL-6 は歯周組織、関節組織構成細胞から炎症時に産生される主要な炎症性サイトカインである。central dogma において、DNA から mRNA の転写に始まり、立体的なタンパク質構造が完成するまでは様々なステップが必要である。しかし、*in vitro* の実験系で、mRNA とタンパク量には相関が認められないことが多く、その原因として mRNA 安定性に関与するメカニズムが報告されている。mRNA に結合して、mRNA の分解を促進するタンパクとしては、TTP、TIA-1、TIAA、Regnase-1、そして CCR4-NOT complex が同定され、mRNA の安定化に関与するタンパクは、HuR が報告されている (BMC Pulm Med. 2016 May 23;16(1):84.)。これらのタンパク質は mRNA 3' 末端の特異的領域に結合し、mRNA の分解、安定化 (分解抑制) に関与する。しかし、mRNA の安定化が *in vivo* で引き起こされているのか不明な点が多く、これらのタンパク質群が今後新規治療対象として有効である可能性が高い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周炎が関節リウマチ (RA) 増悪に与える因子を明らかにするために、歯周病原細菌 *P. gingivalis* によって誘導された mRNA 結合タンパク HuR による IL-6 mRNA の安定化が IL-6 分泌量を増加させ、歯周炎、RA 両方の疾患の病態形成に関与していることを明らかにする、HuR 増加によって誘導された IL-6 が分泌促進させる破骨細胞活性化因子 sRANKL が引き起こす、関節組織や、歯周組織の破骨細胞活性化にも着目する。特に RA 患者で上昇するシトルリン化タンパクとこれに結合する抗 CCP 抗体から生成される免疫複合体が骨破壊に影響することを明らかにすることである。については、IL-6 mRNA 活性化を luciferase assay で評価する系を用いて不死化歯肉上皮細胞株 OBA-9 で *P. gingivalis* 刺激、サイトカイン刺激で HuR が mRNA レベル、タンパクレベルで誘導されることを確認する。また、細胞に HuR を強制発現させることで、HuR が mRNA 末端に結合し、IL-6 mRNA 分解を抑制していることを mRNA、タンパクレベルで検討する。さらに歯周炎患者の組織を免疫染色することで、HuR が炎症部位に特異的に発現していることを確認する。については RA モデルマウスを確立し、患者由来 B 細胞より単離した mRNA から *in vitro* で合成した抗 CCP モノクローナル抗体 (確立済) を用いた実験系で検討する。

### 3 . 研究の方法

以下の実験を計画した。

計画 HuR を介した IL-6 mRNA 安定化メカニズムを *in vitro* 実験系で明らかにする。

不死化歯肉上皮細胞株 OBA-9 を用いて、*P. gingivalis* 刺激時の炎症性サイトカイン IL-6 と HuR mRNA の誘導を定量的 PCR で確認する。また、ルシフェラーゼレポータシステムで IL-6 上流の活性化領域を検出する計を確立しており、細胞内で上昇した HuR の影響を検討する。更に HuR について siRNA を用いて抑制させることで IL-6 産生量への影響を検討する。

計画 HuR を介した IL-6 mRNA 安定化の RA 発症への影響を *in vivo* で明らかにする。

ラミナリン誘導関節炎誘導マウスに *P.gingivalis* 感染させ、歯周炎、関節炎を発症させ、歯周組織、関節組織、血中での HuR 量を mRNA、タンパクレベルで検討する。また HuR 抑制剤ケルセチンで IL-6 を介した歯周炎、関節炎の症状へどのような影響があるのか検討する。

計画 歯周組織で PgCP と抗 CCP 抗体で構成される免疫複合体が増加することを明らかにする。

Pg 由来 peptidyl arginine deamidase(PAD)で生成された CP の局在、抗 CCP 抗体の局在、両者からなる免疫複合体の局在を計画 のマウスで組織学的に検討する

計画 CP、抗 CCP 抗体で構成される IC の破骨細胞分化への関与を *in vitro* で明らかにする。

*In vitro* で PgCP を ACPA で免疫複合体を作製施肥、マウス骨髄由来単球系細胞で破骨細胞分化実験を行い、IC が破骨細胞分化へ与える影響を検討する。

### 4 . 研究成果

計画 について、

IL-6 mRNA 3' 末端を組み込んだルシフェラーゼシステムを確立し、歯周病原細菌 *P. gingivalis* で刺激した歯肉上皮細胞での反応を検討したところ、細胞内で増加した HuR が IL-6 mRNA の安定化を促進していることが明らかになった。

計画 について

関節リウマチ用モデルマウスで *P.gingivalis* を口腔感染させるとともに、HuR 阻害剤であるケルセチンを口腔投与した。6 週間後の歯槽骨吸収と、関節炎スコアはケルセチン投与群で有意に低下した。

計画 について

計画 のマウスの歯周組織中の ACPA、CP、IC 量を ELISA をで測定したところ、Pg 口腔感染群は ACPA、CP、IC 量を量の増加が認められた。また組織像でも同様の傾向が得られた。

計画 について

マウス大腿骨由来単球細胞に s RANKL と M-CSF 添加した破骨細胞分化実験に ACPA を添加し、その影響を観察した。ACPA 添加により、破骨細胞分化が促進された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Sands R. Warren, Verbeke Catia S., Ouhara Kazuhisa, Silva Eduardo A., Hsiong Susan, Kawai Toshihisa, Mooney David	4. 巻 91
2. 論文標題 Tuning cytokines enriches dendritic cells and regulatory T cells in the periodontium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1475 ~ 1485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.19-0411	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 該当する
1. 著者名 Kaneda-Ikeda Eri, Iwata Tomoyuki, Mizuno Noriyoshi, Nagahara Takayoshi, Kajiya Mikihiro, Ouhara Kazuhisa, Yoshioka Minami, Ishida Shu, Kawaguchi Hiroyuki, Kurihara Hidemi	4. 巻 38
2. 論文標題 Regulation of osteogenesis via miR-101-3p in mesenchymal stem cells by human gingival fibroblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 442 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-019-01080-2	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 Memida T, Matsuda S, Kajiya M, Mizuno N, Ouhara K, Fujita T, Hirata S, Yoshida Y, Sugimoto T, Nishi H, Kawaguchi H, Sugiyama E, Kurihara H.	4. 巻 Oct 4;8(10).
2. 論文標題 Multiple External Root Resorption of Teeth as a New Manifestation of Systemic Sclerosis-A Cross-Sectional Study in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 pii: E1628.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8101628.	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 Motoike Souta, Kajiya Mikihiro, Komatsu Nao, Horikoshi Susumu, Ogawa Tomoya, Sone Hisakatsu, Matsuda Shinji, Ouhara Kazuhisa, Iwata Tomoyuki, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Ikeya Makoto, Kurihara Hidemi	4. 巻 20
2. 論文標題 Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes Generated with Xeno-Free Conditions Facilitate Bone Regeneration via Direct and Indirect Osteogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3970 ~ 3970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20163970	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 Matsuda S, Okanobu A, Hatano S, Kajiya M, Sasaki S, Hamamoto Y, Iwata T, Ouhara K, Takeda K, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H.	4. 巻 Nov;23(11):
2. 論文標題 Relationship between periodontal inflammation and calcium channel blockers induced gingival overgrowth-a cross-sectional study in a Japanese population.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Oral Investig.	6. 最初と最後の頁 4099-4105.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-019-02846-8	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 Matsuda S., Memida T., Mizuno N., Ogawa I., Ouhara K., Kajiya M., Fujita T., Sugiyama E., Kurihara H.	4. 巻 51
2. 論文標題 Reparative bone-like tissue formation in the tooth of a systemic sclerosis patient	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Endodontic Journal	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iej.12914	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 Motoike Souta, Kajiya Mikihiro, Komatsu Nao, Takewaki Manabu, Horikoshi Susumu, Matsuda Shinji, Ouhara Kazuhisa, Iwata Tomoyuki, Takeda Katsuhiko, Fujita Tsuyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 9
2. 論文標題 Cryopreserved clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes retain osteogenic capacity and induce bone regeneration	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-018-0826-0	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 Fujita Tsuyoshi, Yoshimoto Tetsuya, Kajiya Mikihiro, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Takemura Tasuku, Akutagawa Keiichi, Takeda Katsuhiko, Mizuno Noriyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 54
2. 論文標題 Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 66 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2017.11.003	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 Sasaki Shinya, Takeda Katsuhiko, Takewaki Manabu, Ouhara Kazuhisa, Kajiya Mikihiro, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 90
2. 論文標題 BDNF/HMW-HA complex as an adjunct to nonsurgical periodontal treatment of ligature-induced periodontitis in dogs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 98 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/JPER.18-0070	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 Munenaga Syuichi, Ouhara Kazuhisa, Hamamoto Yuta, Kajiya Mikihiro, Takeda Katsuhiko, Yamasaki Satoshi, Kawai Toshihisa, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Sugiyama Eiji, Kurihara Hidemi	4. 巻 20
2. 論文標題 The involvement of C5a in the progression of experimental arthritis with Porphyromonas gingivalis infection in SKG mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-018-1744-3	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 該当する

1. 著者名 Komatsu Nao, Kajiya Mikihiro, Motoike Souta, Takewaki Manabu, Horikoshi Susumu, Iwata Tomoyuki, Ouhara Kazuhisa, Takeda Katsuhiko, Matsuda Shinji, Fujita Tsuyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 9
2. 論文標題 Type I collagen deposition via osteoinduction ameliorates YAP/TAZ activity in 3D floating culture clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-018-1085-9	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 Akutagawa Keiichi, Fujita Tsuyoshi, Ouhara Kazuhisa, Takemura Tasuku, Tari Misako, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Kuramitsu Shohei, Mizuno Noriyoshi, Shiba Hideki, Kurihara Hidemi	4. 巻 68
2. 論文標題 Glycyrrhizic acid suppresses inflammation and reduces the increased glucose levels induced by the combination of Porphyromonas gulae and ligature placement in diabetic model mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 30 ~ 38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2018.12.045	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 Hamamoto Yuta, Ouhara Kazuhisa, Munenaga Syuichi, Shoji Mikio, Ozawa Tatsuhiko, Hisatsune Jyunzo, Kado Isamu, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Kawai Toshihisa, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Hirata Shintaro, Tanimoto Kotaro, Nakayama Koji, Kishi Hiroyuki, Sugiyama Eiji, Kurihara Hidemi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Porphyromonas gingivalis infection on gut dysbiosis and resultant arthritis exacerbation in mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-020-02348-z	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 該当する

1. 著者名 Ozawa Tatsuhiko, Ouhara Kazuhisa, Tsuda Reina, Munenaga Syuichi, Kurihara Hidemi, Kohno Hiroki, Hamana Hiroshi, Kobayashi Eiji, Taki Hirofumi, Tobe Kazuyuki, Sugiyama Eiji, Muraguchi Atsushi, Kishi Hiroyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Physiologic Target, Molecular Evolution, and Pathogenic Functions of a Monoclonal Anti-Citrullinated Protein Antibody Obtained From a Patient With Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2040 ~ 2049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41426	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 應原 一久、宗永 修一、平田 信太郎、杉山 英二、栗原 英見
2. 発表標題 関節リウマチ患者由来抗シトルリン化ペプチド抗体を用いた破骨細胞分化抑制作用について
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 Kazuhisa Ouhara
2. 発表標題 A human ACPA monoclonal antibody is preferably localized at inflammatory gingival tissue and activates osteoclastogenesis in Porphyromonas gingivalis infected SKG mouse
3. 学会等名 2018 american collage of rheumatology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 應原 一久
2. 発表標題 The localization of ACPA derived from RA patient in periodontal tissue of mouse periodontitis model
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 應原 一久
2. 発表標題 歯周病原細菌に対する歯周組織局所の免疫応答が及ぼす全身疾患への影響に関する研究
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	小澤 龍彦 (Ozawa Tatsuhiko)  (10432105)	富山大学・学術研究部医学系・准教授  (13201)	
研究分担者	杉山 英二 (Sugiyama Eiji)  (70179167)	広島大学・病院(医)・教授  (15401)	
研究分担者	藤田 剛 (Fujita Tsuyoshi)  (80379883)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授  (15401)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	庄子 幹郎  (Shoji Mikio)		

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		
米国	The Forsyth Institute	Nova Southeastern University	