

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18999

研究課題名(和文) 歯周組織で誘導されるHuRおよびエクソソームを介した関節リウマチ増悪機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of rheumatoid arthritis exacerbation mediated by HuR and exosomes induced in periodontal tissue

研究代表者

宗永 修一 (Munenaga, Syuichi)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：20825327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、歯周病原細菌の刺激により歯周組織におけるHuRおよびエクソソーム産生量の変動するかを検討した。

1) HuRはmRNAの安定化に関与するタンパク質である。歯肉上皮細胞中のHuRは歯周病原細菌の刺激により上昇した。また炎症性サイトカインであるIL-6上昇も認めた。歯周炎マウスの歯周組織においても同様の結果を認めた。

2) エクソソームは細胞から分泌される直径40nmから100nmの小胞であり、唾液、血液などの体液中に認められる。歯肉上皮細胞が放出するエクソソーム量は歯周病原細菌の刺激により上昇した。エクソソームを精製し、歯肉上皮細胞の培養下に添加したところ、炎症性サイトカインの上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、歯周組織構成細胞が歯周病原細菌の刺激を受けることでHuRおよびエクソソームが上昇する結果を得た。また、実験マウスでも同様の傾向を示した。

歯周病は、関節の腫脹や疼痛を主症状とする関節リウマチ(RA)への関与が示唆されている。HuRの関与により上昇するIL-6やエクソソーム中に含まれる因子はRA増悪に関与する。歯周病細菌の刺激を受けている歯周病患者では、HuRやエクソソームが恒常的に上昇し、RA増悪に関与している可能性が考えられる。

このような機序が明らかになることで、歯周病治療がRA治療の一助となること、およびHuRやエクソソームを標的とした新たな治療につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated whether the production of HuR and exosomes in periodontal tissues fluctuates due to stimulation by periodontopathic bacteria.

1) HuR is a protein involved in the stabilization of mRNA. HuR in gingival epithelial cells was elevated by stimulation with periodontopathic bacteria. In addition, the production of IL-6, an inflammatory cytokine, was also increased. Similar results were observed in the periodontal tissue of periodontitis mice.

2) Exosomes are vesicles secreted from cells with a diameter of 40 nm to 100 nm and are found in body fluids such as saliva and blood. The amount of exosomes released by gingival epithelial cells was increased by stimulation with periodontopathic bacteria. An increase of inflammatory cytokines was observed by addition of exosomes to the culture of gingival epithelial cells.

研究分野：歯周病態学

キーワード：歯周病 関節リウマチ HuR エクソソーム

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、歯周病原細菌の侵襲によって宿主免疫応答が起こることで宿主-細菌相互作用が成立し、歯周組織が破壊される感染症である。近年、歯周炎と糖尿病をはじめとする全身疾患との関係がますます明らかになっている。歯周病は40歳以上の約8割が罹患している疾患である。関節リウマチ(RA)の推定患者数は本邦では約100万人である。過去の疫学研究から、歯周炎はRAの発症や病態悪化のリスクとなることが報告されている。RA患者血清において *Porphyromonas gingivalis* (Pg) に対する抗体価は健常者と比較し有意に高い。超高齢社会を迎えた本邦において、歯周炎およびRA患者は今後も増加していくと考えられるため、Pg感染とRAの関係を分子レベルで解明することは、歯周治療がRAの補助的な治療になり得ることを示し、歯科医療が口腔のみならず全身の健康に寄与していることを示す上で極めて重要である。

申請者はこれまでに、RAモデルマウスがPg感染を伴うとRA症状が悪化することを報告し、歯周炎によるRA増悪への影響を明らかにしてきた。また、RA増悪メカニズムの一つとして、Pg感染により増加した補体因子C5aが関節局所で破骨細胞分化を亢進させることでRA増悪に関与することも明らかにした。しかし、Pgは数多くの病原因子を有している。そのため、C5a以外の因子の関与が疑われており、全容の解明には様々な因子に着目する必要がある。そこで申請者は、mRNA結合タンパク質であるHuR、および血行性に全身に移行する小胞であるエクソソームに着目した。

1) HuRによるIL-6 mRNA制御がRAに影響しているのか

RA増悪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。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、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。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質としては、TTP、TIA-1、TIAA、Regnase-1、およびCCR4-NOT complexが同定されている。mRNAの安定化に関与するタンパク質はHuRが報告されている。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、安定化に関与する。しかし、mRNAの安定化がin vivoで実際に引き起こされているのか不明な点が多く、今後新規治療対象として有効である可能性が高い。本研究では、Pgなどの歯周病原細菌の感染により歯周組織中にHuRおよびIL-6が上昇するのか、また上昇するのであればRA増悪に関与するかを検討する。

2) 歯周組織で産生されたエクソソームが関節組織に到達しRAに影響しているのか

エクソソームは細胞から分泌された脂質二重膜で囲まれた直径40nmから100nmの小胞である。唾液、血液などの体液中に多く局在しており、培養細胞からも産生される。その内容物は細胞由来のタンパク質、DNA、RNA(mRNA、tRNA、microRNA)など多岐にわたることが報告されている。Pg感染によって歯周組織に増加したC5aなどがエクソソームに内包され、関節局所に到達しRA増悪に関与している可能性がある。本研究では、Pg感染により生じたエクソソーム内にHuRやC5aが内包されているか、またそのエクソソームが関節局所に到達し関節の炎症増悪に関与しているかを検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

1) Pgなどの歯周病原細菌の感染により歯周組織にHuRおよびIL-6が上昇するのか、上昇するのであればRA増悪に関与するか

2) Pg感染により生じたエクソソーム内にHuRやC5aが内包されているか、またそのエクソソームが関節局所に到達し関節の炎症増悪に関与しているか

を明らかにすることである。

本研究課題で得られる知見から、HuRを含めたmRNA結合タンパク質群およびエクソソームが治療の新たな分子標的となり、今後の新規分子標的薬の開発に寄与できる。

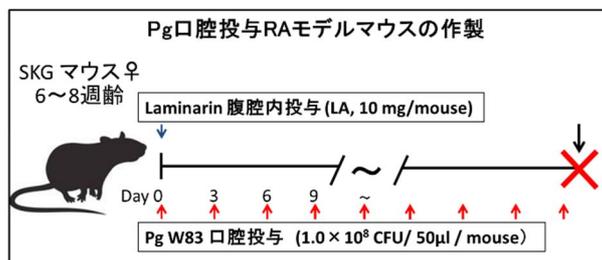
3. 研究の方法

申請者はすでにPg口腔投与RAモデルマウスを確立している(右図)。具体的にはSKGマウス(日本クレア)の6~8週齢の雌に、 α -グルカンであるLaminarin(LA)(10 mg/mouse)を腹腔内投与することで関節炎を誘導する。Pg口腔投与群として2% carboxymethyl cellulose(CMC)含有PBS 50 μ l中にPg W83を 10^8 CFUを懸濁後、綿球に含ませ3日おきに口腔内に留置する。実

実験開始 42 日後に屠殺し解析する。

実験 Pg 感染により生じた HuR が RA に及ぼす影響の解析

Pg 口腔投与 RA モデルマウスの歯周組織での HuR 増加をタンパク質レベルで確認する。その後、HuR inhibitor 投与時の HuR タンパク量、IL-6 産生量を ELISA で評価する。また、RA 症状を arthritis score、組織学的な関節破壊 (HE 染色、TRAP 染色)、関節における炎症性サイトカイン産生 (BioPlex による網羅的解析)、骨破壊 (micro-CT) に関して評価する。



実験 歯周組織、関節組織、および血液中のエクソソーム解析

Pg 口腔投与 RA モデルマウスにおける未処理群、Pg 単独投与群、LA 単独投与群、Pg+LA 投与群の歯周組織、関節組織、および血清中のエクソソームを精製する。エクソソームの検出は抗 CD9 モノクローナル抗体を用いる。エクソソーム中の mRNA、microRNA、DNA についてマイクロアレイ解析を行う。また、エクソソーム中に HuR などの mRNA 安定化タンパク質や C5a が内包されているか解析する。

実験 培養細胞系で産生されるエクソソームの解析

初代培養歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、滑膜由来線維芽細胞に Pg を接触させ、上清中に産生されるエクソソームを実験と同様に回収する。エクソソーム内容物はマイクロアレイ解析およびプロテインアレイ解析で網羅的に行う。

4. 研究成果

本研究から、以下の結果を得た。

- 1) Pg 口腔投与 RA モデルマウスの歯周組織で HuR の上昇と、それに伴う IL-6 の増加が認められた。Pg 口腔投与 RA モデルマウスでは他群と比較して arthritis score が上昇しており、関節炎の増悪が認められた。その関節組織を組織学的に解析したところ、関節周囲に高度の炎症細胞浸潤像が認められ、パンヌスといわれる肉芽組織の形成も認められた。またサフラニン染色により軟骨細胞の染色性の低下が、骨破壊が生じている部位には数多くの TRAP 陽性細胞が認められた。Micro-CT においても関節を構成する距骨の骨破壊の増悪が認められた。これらの関節炎増悪所見は、HuR 阻害剤であるケルセチンを投与することで抑制されることも確認した。
- 2) 実験マウスの血清からエクソソームを分離した。そのエクソソームの検出には抗 CD9 モノクローナル抗体を用いた。それぞれの群のエクソソーム中の C5a 内包量を検討したが、各群における明らかな差異は認めなかった。
- 3) 分離した各群のエクソソームを歯肉線維芽細胞培養中に加えた後に、培養上清を回収し炎症性サイトカイン量を ELISA にて解析した。Pg 口腔投与 RA モデルマウスにおける Pg+LA 投与群のエクソソームを加えた群は、その他のモデルマウス群の血清を加えたものと比較し培養上清中の IL-6 の上昇が認められた。

以上のことから、Pg 感染した歯周組織において増加した HuR は RA 増悪に関与する IL-6 産生量を増加させ RA の関節炎増悪にも関与する可能性が示唆された。また、関節炎が増悪したマウスのエクソソームの刺激により歯肉線維芽細胞の IL-6 産生量が上昇していたことから、RA の病態がエクソソームを介して歯周炎の増悪にも関与する可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mizuno Noriyoshi, Iwata Tomoyuki, Ohsawa Ryosuke, Ouhara Kazuhisa, Matsuda Shinji, Kajiya Mikihiro, Matsuda Yukiko, Kume Kodai, Tada Yui, Morino Hiroyuki, Yoshimoto Tetsuya, Ueki Yasuyoshi, Mihara Keichiro, Sotomaru Yusuke, Takeda Katsuhiko, Munenaga Syuichi	4. 巻 525
2. 論文標題 Optineurin regulates osteoblastogenesis through STAT1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 889 ~ 894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.03.028	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 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------