

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 27 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862051

研究課題名(和文) 関節リウマチ発症における歯周病原細菌由来シトルリン化酵素 PAD の影響

研究課題名(英文) The effect of PAD derived from periodontopathogenic bacteria in rheumatoid arthritis

研究代表者

應原 一久 (Ouhara, Kazuhisa)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80550425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯周炎は歯周病原細菌の感染によって惹起される種々の生体応答の結果、歯周組織が慢性的に破壊される疾患である。さらに歯周炎が歯周組織局所だけではなく糖尿病や動脈硬化症へ影響することが分子レベルで明らかにされつつある。これらの免疫応答を強く引き起こす細菌として *Porphyromonas gingivalis* (Pg) が知られている。これまでに、Pg の歯周組織への感染が関節リウマチ (RA) へ影響することも疫学で示されている。本研究は、Pg 由来シトルリン化酵素によって生成されるシトルリン化タンパク質の RA 発症への影響について、*in vitro*、*in vivo* として臨床サンプルを使用した研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is caused by the interaction between host immune response and bacterial challenge. Rheumatoid arthritis (RA) is also inflammatory disease caused by the increase of autoantigen against citrullinated protein (CP). The correlation between periodontitis and RA is the acceptable fact via the elevated level of CP produced by *Porphyromonas gingivalis* (Pg). In this study, the new target of leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (LRG1), which is not affected by inflammatory cytokine, was focused on. The LRG1 was detected in patients' sera and showed the correlation with the level of anti-CP antibody. The production of LRG1 in mice RA model was induced by the additional infection of Pg. The mRNA expression of LRG1 was induced by the Pg stimulation in HGF. The mRNA expression of IL-8 was strongly induced by the addition of LRG1 in HGF. These results showed that LRG1 might be a new target for diagnosis and treatment of periodontitis and RA.

研究分野：歯周病態学

キーワード：歯周炎 リウマチ 歯周病原細菌

## 1. 研究開始当初の背景

感染とは宿主の体内または表層に微生物や病原物質が定着し、増殖する状態である。またその結果、宿主に何らかの異常な反応が引き起こされたものが感染症と定義されている。

歯周炎は口腔内における感染症で、グラム陰性の歯周病原細菌と宿主の相互作用の結果、歯周組織の破壊が惹き起こされることが特徴である。細菌は硬組織である歯面に定着し、菌体外多糖、唾液由来の無機塩類とともに石灰化した細菌性バイオフィルムを形成し、宿主由来抗菌物質、消毒薬、そして抗菌薬に対して抵抗性を示して慢性感染となる。この構造物に対して宿主は、非特異的な自然免疫および特異的な獲得免疫を活性化させて排除しようとする。しかし、感染が持続すると、炎症によって歯周組織の破壊が引き起こされる。さらに深部への細菌感染が生じた結果、歯周組織の慢性炎症が急性発作を繰り返すことによって歯周組織破壊が進行し、歯の脱落に至る。

歯周病原細菌の中でも *Porphyromonas gingivalis* (Pg) が歯周炎の発症や進行に強く関与している。Pg は様々な病原因子を有しており、ジンジパインと呼ばれるタンパク分解酵素、LPS や外膜タンパク質によって炎症反応が惹起され、歯周組織が破壊される。宿主側は Pg の感染に対して、IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを産生して応答する。この炎症が持続することによって、破骨細胞活性化因子 RANKL が増加し、炎症性の骨吸収が引き起こされる。また Pg の慢性的な感染は、歯周組織局所に対する影響だけではなく、糖尿病、動脈硬化、肥満、肝炎、

心臓血管障害、そして慢性関節リウマチ(RA)等と関連が報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* がリウマチの発症にどのようにするのかそのメカニズムを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

Pg は、歯周炎の主な原因菌として注目されている[14]。近年、歯周炎は糖尿病などの様々な全身疾患との関連が報告されており[15]、また疫学研究から、歯周炎は Pg の歯周組織への感染を通じて、関節リウマチ (RA) の発症や悪化のリスクとなることが報告されている。本研究では、RA モデルである SKG マウスに laminarin (LA) の腹腔内投与によって関節炎を誘導し、また同時に Pg を腹腔から感染させて、全身的な影響を検討した。

## 4. 研究成果

LA の腹腔内投与と同時に Pg を接種した SKG マウス群 (Pg+LA 群) は、関節炎を LA 単独で誘導した群(LA 群)と比較して早期に重度の関節炎が認められた。また、Pg+LA 群は LA 群と比較すると、血清中の臨床的マーカー (抗 CCP 抗体産生および MMP-3 産生) や炎症性サイトカイン産生の有意な上昇が認められた。

以上のことから、Pg 感染は、関節炎を誘導した SKG マウスにおいて、関節炎病態の増悪に関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1. Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering

therapy for bone regeneration.  
Kittaka M, Kajiya M, Shiba H,  
Takewaki M, Takeshita K, Khung R,  
Fujita T, Iwata T, Nguyen TQ,  
**Ouhara K**, Takeda K, Fujita T,  
Kurihara H.

Cytotherapy. 2015 Mar 2. pii:  
S1465-3249(15)00048-1.  
doi:10.1016/j.jcyt.2015.01.007. 査読  
あり

2. The differential expression of mgl mRNA  
by Porphyromonas gingivalis affects the  
production of methyl mercaptan.

**Ouhara K**, Iwasaki Y, Kajiya M, Savitri IJ,  
Kitagawa M, Tokunaga N, Shintani T, Ogawa I,  
Hino T, Fujita T, Shiba H, Kurihara H.

Oral Dis. 2015 Feb 23. doi: 10.1111/odi.12326.  
[Epub ahead of print] I 査読あり

3. Irsogladine maleate inhibits  
Porphyromonas gingivalis-mediated  
expression of toll-like receptor 2 and  
interleukin-8 in human gingival epithelial  
cells.

Savitri IJ, **Ouhara K**, Fujita T, Kajiya M,  
Miyagawa T, Kittaka M, Yamakawa M, Shiba  
H, Kurihara H. J Periodontal Res. 2014 Sep 20.  
doi: 10.1111/jre.12231. [Epub ahead of print]  
査読あり

4. Smad2 is involved in Aggregatibacter  
actinomycetemcomitans-induced  
apoptosis.

Yoshimoto T, Fujita T, **Ouhara K**, Kajiya M,  
Imai H, Shiba H, Kurihara H.

J Dent Res. 2014 Nov;93(11):1148-54. doi:  
10.1177/0022034514550041. Epub 2014 Sep 5.  
査読あり

5. LL37 induces VEGF expression in dental  
pulp cells through ERK signalling.

Khung R, Shiba H, Kajiya M, Kittaka M,  
**Ouhara K**, Takeda K, Mizuno N, Fujita T,  
Komatsuzawa H, Kurihara H. Int Endod J.  
2014 Aug 5. doi: 10.1111/iej.12365. [Epub  
ahead of print] 査読あり

6. Amphotericin B down-regulates  
Aggregatibacter  
actinomycetemcomitans-induced  
production of IL-8 and IL-6 in human  
gingival epithelial cells.

Imai H, Fujita T, Kajiya M, **Ouhara K**,  
Miyagawa T, Matsuda S, Shiba H, Kurihara H.

Cell Immunol. 2014 Aug;290(2):201-8. doi:  
10.1016/j.cellimm.2014.07.001. Epub 2014 Jul  
11. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 1 件)

1. 広島大学病院口腔検査センターにお  
ける Porphyromonas gingivalis に対する血清  
抗体価検査  
**應原一久**、新谷智章、内田雄士、加治屋  
幹人、北川雅恵、小川郁子、藤田 剛、

- 日野孝宗、柴 秀樹、栗原 英見  
第 7 回日本口腔検査学会総会・学術大会  
(2014 年 9 月 9 日 岡山)
- 2 . *Porphyromonas gingivalis* 感染は関節リウマチモデルマウスにおいて関節炎症状を増悪させる  
山川真宏、應原一久、加治屋幹人、橘高瑞穂、武田克浩、藤田貴子、藤田 剛、柴 秀樹、栗原 英見  
第 57 回春季日本歯周病学会学術大会  
(2014 年 5 月 24 日、岐阜)
- 3 . *Porphyromonas gingivalis* 感染は関節リウマチモデルマウスにおいてその病態を増悪する  
山川真宏、應原一久、山崎聡士、杉山英二、栗原英見  
第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2014 年 4 月 27 日、東京)
- 4 . *Porphyromonas gingivalis* 由来シトルリン化酵素によって生成されるシトルリン化タンパク質の関節リウマチ発症への影響  
山川真宏、應原一久、加治屋幹人、橘高瑞穂、藤田 剛、柴 秀樹、栗原英見  
The 53rd General Session of the Korean Academy of Periodontology (2013 年 11 月 24 日、ソウル、韓国)
- 5 . Possible IgG Transportation mechanism mediated by Neonatal Fc Receptor (FcRn) expressed in gingival epithelial cells  
Kazuhisa Ouhara, Mikihito Kajiya, Tsuyoshi Fujita, Hideki Shiba, Hidemi Kurihara  
The 53rd General Session of the Korean Academy of Periodontology (2013 年 11 月 24 日)、ソウル、韓国)
- 6 . 糖化最終産物レセプターの歯肉上皮細胞への影響  
内田雄士、應原一久、藤田 剛、加治屋幹人、柴 秀樹、栗原英見  
第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会  
(2013 年 9 月 22 日、前橋)
- 7 . *Porphyromonas gingivalis* 感染が関節リウマチ発現に及ぼす影響についての実験的解析  
山川真宏、應原一久、加治屋幹人、橘高瑞穂、藤田 剛、柴 秀樹、栗原英見  
第 10 回アジア太平洋歯周病学会 (2013 年 9 月 4 日、奈良)
- 8 . *Porphyromonas gingivalis* 感染が関節リウマチ発現に及ぼす影響についての実験的解析  
山川真宏、應原一久、加治屋幹人、橘高瑞穂、藤田 剛、柴 秀樹、栗原英見  
第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会  
(2013 年 6 月 28 日、福岡)
- 9 . 炎症性サイトカインはヒト歯肉上皮細胞において Lipid raft を介して発現する  
今井 遥香、藤田 剛、應原一久、加治屋 幹人、内田 雄士、宮川 剛史、吉本 哲也、柴 秀樹、栗原 英見  
第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会  
(2013 年 6 月 28 日、福岡)
- 10 . TGF- $\beta$ 1 が歯肉上皮細胞のアポトーシスシグナル、E-cadherin に与える影響  
吉本哲也、藤田 剛、應原一久、加治屋幹人、宮川剛史、今井遥香、柴 秀樹、栗原英見  
第 56 回春季日本歯周病学会学術大会  
(2013 年 5 月 31 日、東京)
- 11 . Profiling of cytokine production in exudative fluids from various periapical lesions for establishment of novel treatment strategy  
Kazuhisa Ouhara, Yuushi Uchida, Tsuyoshi Fujita, Masae Kitagawa, Ikuko Ogawa, Hideki Shiba, Hidemi Kurihara  
第 9 回世界歯内療法会議 (2013 年 5 月 26 日、東京)
- 6 . 研究組織  
(1) 研究代表者  
應原 一久 (Ouhara Kazuhisa )  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号： 80550425