

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462849

研究課題名(和文) 歯周病原因菌感染が腹膜透析に及ぼす影響

研究課題名(英文) Influence of periodontal disease-causing bacteria infection on peritoneal dialysis

研究代表者

今井 優樹 (IMAI, Masaki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30440936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、歯周病が腹膜障害を増悪することでPD離脱患者が増加するのではないかと仮説を立て、歯周病原因菌感染とPDに関わる組織障害との関連について検討した。PD患者から得られたPD排液に歯周病原因菌が検出できるかどうかを試みたところ歯周病原因菌は検出できなかった。

次に、細菌感染とアナフィラトキシンの濃度の上昇が直接的に炎症反応の悪化させることを明らかにするため、低濃度LPS存在下又は非存在下でC5aまたはC5adesArgをラットに投与した。その結果、アナフィラトキシン単独では顕著な炎症応答は検出できなかったが、LPSを低濃度で前投与後アナフィラトキシンを投与すると強力な炎症反応が誘導された。

研究成果の概要(英文)：To assess influence of periodontal disease-causing bacteria infection on peritoneal dialysis (PD), we investigated the relationship between periodontal pathogenic bacterial infection and the tissue damage associated with PD were examined. We tried to detect periodontitis causative bacteria in peritoneal dialysis from patients. However, *P. gingivalis* which is a periodontitis causing bacterium could not be detected.

Next, rat C5a and C5adesArg were prepared in order to clarify in the model animals that bacterial infection and elevation of the concentration of anaphylatoxin directly exacerbate the inflammatory response. When C5a and C5adesArg were administered to rats, a marked inflammatory response was not detected with anaphylatoxin alone. As contrast, C5a administration with low concentration of LPS induced a strong inflammatory response. Interestingly, C5adesArg, that is inactivated C5a also enhanced inflammatory response when pre-administration of low concentration LPS.

研究分野：免疫学

キーワード：腹膜透析 歯周病

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)などの歯周病細菌によって引き起こされる歯周組織の慢性炎症性疾患で、成人の80%以上が罹患し国民病である。また、近年、歯周病と全身疾患との関連が注目され、全身の健康維持に歯周治療がどう貢献するかという点が重要視されるようになってきた。歯周病と慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)との関連についても現在報告が増えており、糖尿病患者は歯周病になりやすく、糖尿病の進行とともに歯周病は重篤化する。また、透析の際には、骨ミネラル代謝異常などが関与しながら歯周病への罹患リスクが高まる。さらに、CKD患者は口腔内に多くの問題を抱え、口腔乾燥症等が認められる上、歯周病の進行が腎機能の低下と相関することなどから、腎機能障害が歯周病を進行させることが明らかになった。しかしながら、歯周病がCKDを含んだ腎機能障害に悪影響を及ぼすという報告はほとんどない。

日本の透析人口は30万人を超え、毎年増加する一方である。腹膜透析(以下PD)は血液浄化法の一方法で、血液透析と比べて、残腎機能の保持、心血管系に関わる合併症発症の遅延、医療経済の改善などに利点があり、自宅や会社で透析ができ、通院が月1~2回と少ないために社会復帰が比較的容易なことが特徴である。また、高齢化社会の進展に伴い、糖尿病を原疾患とする患者の増加、在宅療法希望者の増加にともない、PD療法を選択する社会背景は増加している。一方、PDの長期継続により、細菌による腹膜炎、非生理的な透析液による腹膜の線維化並びに硬化、腹膜中皮細胞の脱落などの腹膜機能低下、血管新生、血管壁の線維化等の形態学的変化をもたらすことで、除水能の腹膜機能障害が問題となり、PD継続が困難になる。これらの障害は各種増殖因子やサイトカイン産生が関与していると考えられている。また、腹膜の劣化が進行すると、被嚢性腹膜硬化症(encapsular peritoneal sclerosis: EPS)という重篤で致死率の高い合併症が引き起こされる。このEPSは未だに全貌が明らかになっておらず、有効な治療法も確立されていないのが現状である。

2. 研究の目的

腹膜障害の発症機序を解析してきた課程で、歯周病が引き起こす慢性炎症機構が腹膜障害発症機構に類似している。例えば、PD継続に伴う長期透析液暴露や反復性腹膜炎に対する生体防御反応は、歯周病感染によるものとはほぼ一緒に炎症性サイトカイン産生や各種増殖因子産生等を引き起こす。また、歯周病の重症度及び腹膜劣化のマーカーの一つとしてともにCRPが使用されることも同様である。しかしながら、二つの疾患の関連は全く明らかにされていない。そこで、我々は、歯周病が、PDの長期継続によって

誘導される腹膜劣化を増幅し、PDの早期離脱やESPを発症させてしまうのではないかと考え、(1)歯周病原因菌感染の有無とPDの離脱時期の関連性について統計学的に差があるか、(2)歯周病原因菌に多く含まれる炎症誘導物質であるLPSが非常に低濃度でも全身性の炎症を惹起するかどうかを検討した。

3. 研究の方法

PD患者から得られたPD排液中の細菌感染の選別は遺伝子解析による微生物同定法を用いた。

PD排液中の炎症メディエーターの検討では、サイトカインや増殖因子(VEGF-A、VEGF-C、CTGF)の解析はELISA法で、補体活性化レベルをC5a、C4a、C3aの3つを同時に計測できるCBAアナフィラトキシンkitで測定した。

遺伝子組み換えラットC5aとC5adesArgの作製は、遺伝子工学技術によりそれぞれの蛋白を発現するベクターを構築した。それらのベクターはLPSのコンタミを大きく低減させたタンパク発現用大腸菌にトランスフォーメーションし、ラットC5aとC5adesArgを含んだ大腸菌を回収した。界面活性剤で破碎後、カラムで目的蛋白を回収し、精製純度をSDS-PAGE及びウエスタンブロッティング法で確認した。

ラットモデルを用いた低濃度LPSによる全身性炎症の惹起はLPS及びC5aまたはC5adesArgの投与による直腸体温変化により同定した。

4. 研究成果

(1)歯周病原因菌感染の有無とPDの離脱時期の関連性

歯周病原因菌の感染と腹膜透析患者の腹膜障害の進行との関連性及びそのメカニズムを解明するため、腹膜透析患者94名から腹膜透析排液を回収し、*P. gingivalis*の検出を試みたところ、すべての検体において不検出であった。次に腹膜透析患者において他のバクテリア感染の有無を調べたところ、94名中35名(37%)が細菌感染は陰性であった。残りの48名は何らかの細菌感染があったが、歯周病原因菌である*P. gingivalis*は検出できなかった。主な細菌は、常在菌である *coagulase-negative staphylococci* (14.9%)、*Staphylococcus* 属(13.8%)、*Enterococcus* 属(7.4%)であった。

一方、腹膜透析継続患者と離脱患者の腹膜透析排液中の補体活性化レベルを検討したところ、腹膜透析継続患者と離脱患者のday3及びday5では腹膜透析排液中のアナフィラトキシン濃度が高い傾向があったものの、有意な差が見られなかった。しかしながら、day1では腹膜透析継続患者のC4a値が離脱患者と比較すると有意に高く、補体古典経路が早期に活性化されると予後が良くなる可能性が示唆された。一方、C5a、C4a及びC3aとIL-6やCRPなど他の炎症マーカーと比較した

ところ相関が見られず、独立した動態をとることが明らかになった。

(2)低濃度 LPS による全身性炎症の惹起

細菌感染とアナフィラトキシンの濃度の上昇が直接的に炎症反応の悪化させることをモデル動物で明らかにするため、遺伝子組み換えラット C5a と C5adesArg を作製し、ラットに投与したところ、アナフィラトキシン単独では、顕著な炎症応答は検出できなかったが、*P. gingivalis* 等の毒素である LPS を低濃度で前投与後ラット C5a を投与すると強力な炎症反応が誘導された。また、C5a が不活化されたフォームと考えられていた C5adesArg においても、低濃度 LPS を前投与すると炎症反応が誘導された。これらの結果により、低濃度 LPS の存在下で補体系が活性化されると炎症反応の増強することが明らかとなり、歯周病菌由来の LPS が血中に僅かでも存在すると腹膜透析に影響を与える可能性が示唆された。

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 3 件)

Mizuno T, Yoshioka K, Mizuno M, Shimizu M, Nagano F, Okuda T, Tsuboi N, Maruyama S, Nagamatsu T, Imai M. Complement component 5 promotes lethal thrombosis. *Sci Rep*. 7: 42714. (2017) doi: 10.1038/srep42714. 査読有

Tuboly E, Futakuchi M, Varga G, Érces D, Tökés T, Mészáros A, Kaszaki J, Suzui M, Imai M, Okada A, Okada N, Boros M, Okada H. C5a inhibitor protects against ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Microbiol Immunol*. 60(1): 35-46 (2016)doi: 10.1111/1348-0421.12338. 査読有

Sei Y, Mizuno M, Suzuki Y, Imai M, Higashide K, Harris CL, Sakata F, Iguchi D, Fujiwara M, Kodera Y, Maruyama S, Matsuo S, Ito Y. Expression of membrane complement regulators, CD46, CD55 and CD59, in mesothelial cells of patients on peritoneal dialysis therapy. *Mol Immunol*, 65(2): 302-9. (2015) doi: 10.1016/j.molimm.2015.02.005. 査読有

[学会発表](計 16 件)

Mizuno M, Sei Y, Kobayashi K, Shigemoto E, Suzuki Y, Sakata F, Imai M, Maruyama S, Matsuo S, Ito Y. Expression of membrane complement regulators in patients dependent on peritoneal dialysis therapy and regulation of

complement activation in peritoneal dialysate. The 8th Asia Pacific Chapter Meeting of International Society for Peritoneal Dialysis, March 22nd-25th, 2017, Guangzhou, (China)

Imai M, Odanaka M, Takayama S, Ohta R, Yamazaki S. The complement anaphylatoxin C5adesArg still induce the acute inflammatory response. The Cold Spring Harbor Asia conference on Frontiers of Immunology in Health & Disease, October 3rd-6th, 2016, Awaji, (Japan)

Mizuno M, Yoshioka K, Mizuno M, Tsuboi N, Maruyama S, Nagamatsu T, Imai M. C5 promotes histone-induced lethal thromboembolism. The XXVI International Complement Workshop, September 4th-8th, 2016, Kanazawa, (Japan)

Imai M, Odanaka M, Takayama S, Ohta R, Yamazaki S. The complement anaphylatoxin C5adesArg still induce the acute inflammatory response. The XXVI International Complement Workshop, September 4th-8th, 2016, Kanazawa, (Japan)

河村剛至, 太田里永子, 山本博之, 今井優樹, 松浦凌太, 松山悟, 佐古兼一, 羽二生久夫, 岡田秀親, 松田佳和, 好中球エラストラーゼによる新規カルボキシペプチダーゼRの生成、日本薬学会第136年会、2016年3月26-29日、パシフィコ横浜他(神奈川県横浜市)

Odanaka M, Yamazaki S, Nishioka A, Takayama S, Imai M, Morita A. Phenotype analysis of Ultra Violet B (UVB)-expanded Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells in the skin. 第44回日本免疫学会総会・学術集会、2015年11月18-20日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Yamazaki S, Imai M, Nishioka A, Odanaka M, Morita A. Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells with decreased motility accumulate in aged lymphoid tissue. 第44回日本免疫学会総会・学術集会、2015年11月18-20日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Takayama S, Odanaka M, Ohta R, Imai M, Yamazaki S. Differential roles of complement anaphylatoxin C5a and C5adesArg. 第44回日本免疫学会総会・学術集会、2015年11月18-20日、札幌コン

ペンションセンター(北海道札幌市)

Odanaka M, Yamazaki S, Nishioka A, Kasuya S, Takayama S, Imai M, Morita A. Phenotype analysis of Foxp3 + CD4 + regulatory T cells and dendritic cells in the skin after Ultraviolet B exposure. 14th International Workshop on Langerhans Cells, November 5th- 8th, 2015, Kyoto, (Japan)

Tsujimura K, Ohta R, Imai M, Yamazaki S. Analysis of C5a receptor expression on the various subsets of dendritic cells. 14th International Workshop on Langerhans Cells, November 5th- 8th, 2015, Kyoto, (Japan)

今井優樹, 岡田秀親, C5a-C5a 受容体を標的にした創薬の展望、第 52 回日本補体学会(招待講演)、2015 年 8 月 21-22 日、名古屋大学医学部 (愛知県名古屋市)

辻村幸平、太田里永子、今井優樹、山崎小百合、C5a 第 2 レセプター C5L2 の発現解析、第 52 回日本補体学会、2015 年 8 月 21-22 日、名古屋大学医学部 (愛知県名古屋市)

河村剛至、太田里永子、今井優樹、大澤真以、今井由美、塩見友祐、賀来美和子、佐古兼一、羽二生久夫、岡田秀親、岡田則子、松田佳和 好中球エラストラーゼにより活性化する新規カルボキシペプチダーゼ R の解析、第 52 回日本補体学会、2015 年 8 月 21-22 日、名古屋大学医学部 (愛知県名古屋市)

河村剛至、太田里永子、今井優樹、大澤真以、今井由美、塩見友祐、賀来美和子、佐古兼一、羽二生久夫、松田佳和 線溶抑制を起こさずに炎症を抑制する変異型 proCPR 作製の試み、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25-28 日、神戸学院大学他(兵庫県神戸市)

Ohta R, Imai M, The production of a recombinant bispecific monoclonal antibody against both the complement inhibitor CD59 and the tumor-associated antigen MUC1. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014 年 12 月 10-12 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

河村剛至、大澤真以、今井由美、松田佳和、太田里永子、今井優樹、羽二生久夫、岡田則子、岡田秀親 好中球エラストラーゼによるプロカルボキシペプチダーゼ R 活性化機構の解析、第 51 回補体シンポジウム、2014 年 8 月 22-23 日、神戸常盤大学 (兵庫県神戸市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今井 優樹 (IMAI Masaki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号 : 30440936

(2)研究分担者

太田 里永子 (OHTA Rieko)
愛知県がんセンター研究所・研究員
研究者番号 : 30452460

(4)研究協力者

水野 正司 (MIZUNO Masashi)