

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24073

研究課題名(和文) 歯周病原細菌による腸管上皮フコシル化抑制が関節リウマチを増悪させる機序の解明

研究課題名(英文) Inhibition of intestinal epithelial fucosylation by periodontopathogenic bacteria exacerbates rheumatoid arthritis

研究代表者

濱本 結太 (Hamamoto, Yuta)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：00848476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)： RAモデルマウスに歯周病原細菌(*Porphyromonas gingivalis*, Pg)を口腔感染させると、関節炎が増悪する。今回このPg感染マウスにおいて、腸内細菌叢の変化と、腸組織中の炎症性サイトカインの増加や、RAの自己抗体産生の原因となるシトルリン化蛋白(CP)の増加を認めた。更に、変化した腸内細菌を新しいRAモデルマウスに移植すると、Pgを感染させていない移植マウスで、Pg感染群と同様の腸内細菌叢の変化や炎症性変化が再現された。Pg感染により腸内細菌叢が変化することで、腸内の炎症性変化やCP産亢進を引き起こし、RA発症に先立った自己抗体産生の足場となっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RAは、発症に先立って自己抗体が産生されることがわかっており、その環境因子として、喫煙による肺組織の炎症や歯周病による歯周組織の炎症がこれまでに報告されている。今回の研究で、歯周病原細菌の感染により腸内細菌叢の変化、腸組織中の炎症性変化とRAの自己抗体産生の原因となるCPの産生亢進が認められた。つまり歯周病原細菌の感染による腸内環境の変化が、RAの自己抗体産生の足場となっており、新規の環境因子である可能性が示唆された。

RAと歯周炎の好発年齢は類似しており、早期からの歯科介入による歯周病予防や治療が、RAの発症や病状悪化を予防することに対して非常に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Previous reports have demonstrated that arthritis was exacerbated by orally infection with periodontopathogenic bacteria (*Porphyromonas gingivalis*, Pg) in RA mice model. In this study, we found that the Pg-infected mice showed altered intestinal microflora, increased inflammatory cytokines in intestinal tissues, and increased citrullinated protein (CP), which is responsible for the production of autoantibodies in RA. Furthermore, fecal microbiota transplantation from Pg-infected mice into a new RA mice model reproduced the same intestinal microbiota and inflammatory changes as Pg-infected group in recipient mice. These results suggest that the changes in the intestinal microbiota caused by Pg infection lead to inflammatory changes and increased CP production in the intestine, which may serve as a scaffold for the production of autoantibodies prior to the onset of RA.

研究分野：歯周治療学

キーワード：歯周病 関節リウマチ 腸内細菌叢の変化

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は、好発年齢 (40 歳前後の中年期) 病態 (局所的に硬組織と軟組織の破壊をきたす慢性炎症性疾患である) 病因 (宿主の免疫応答が関連する) において歯周炎と類似する点が多く、関連が示唆されてきた。中でも、特に *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 感染と関連していることがこれまでの報告で明らかとなっている。実際に、RA 患者は非 RA 患者と比べて血清中の Pg に対する抗体が多いことや、Pg に対する抗体を持つ RA 患者は、そうでない RA 患者と比べて、血清中の RA の原因となる自己抗体 (anti-cyclic citrullinated peptide, ACPA) が多いことが、疫学研究で明らかとなっている。しかし、これらがどのようなメカニズムで関連しているのか、詳しいことは未だに解明されていない。

これまでに当研究室では、RA モデルマウスに Pg を腹腔内に感染させることで、関節炎が増悪することを明らかにした。しかし、Pg は歯周病原細菌であり、通常歯周炎の感染部位に存在するため、より歯周炎の状態をより模した Pg 口腔感染 RA モデルマウスを作製し、腹腔感染モデル同様、関節炎が増悪することを明らかにした。更に、補体因子である C5a が Pg 感染による関節炎の増悪に関連している可能性があることも明らかにした。

一方近年、消化管の入り口である口腔内の細菌感染により、下部消化管である腸内の細菌叢が変化することが報告された。腸内には 100 兆から 1000 兆個、約 1000 種類もの常在菌が存在しており、複雑な免疫応答・免疫寛容により腸内細菌叢を形成し、恒常性を維持している。腸内細菌叢が乱れ恒常性を失うと、炎症性大腸疾患等の自己免疫疾患を引き起こすことが知られており、また、その難治症例に対しては、健常者からの腸内細菌叢移植により、腸内細菌叢の多様性の回復と疾患の良好な予後が報告されている。このように、宿主の健康維持のためにも、腸内細菌叢の恒常性維持は非常に重要であるといえる。加えて、RA は過剰な自己免疫に関連して関節組織が破壊される自己免疫疾患である。以上のことを踏まえて、Pg 感染により腸内細菌叢が変化し、その結果引き起こされる免疫異常や炎症性変化が過剰な免疫応答を誘発し、関節炎増悪に影響しているのではないかという仮説のもと研究を行った。

また、RA の自己抗体である ACPA はシトルリン化蛋白 (CP) に対する自己抗体であるが、RA 患者では、関節炎発症の数年前から体内で ACPA が産生され始めていることがわかっている。体内で CP を産生するには Peptidyl arginine deiminase (PAD) という酵素が必要である。CP 産生の環境因子としてこれまでに歯周炎と喫煙が報告されている。内在性の PAD は炎症などで活性化されるため、歯周組織や肺組織局所の炎症反応により活性化された PAD により、組織中で CP が産生され、その結果 ACPA 産生の足場となっている可能性が考えられている。これらのことから、Pg 感染により腸内細菌叢が変化することによって引き起こされる腸内の炎症性変化が、腸組織中で PAD を活性化させ、更に腸組織中で CP 産生が亢進すれば、一連のカスケードが ACPA 産生の新規の環境因子となりうると仮定した。

一方、Pg は PAD を唯一保有する細菌として知られている。そのため、Pg に感染すること自体が、PgPAD による歯周組織のシトルリン化を引き起こし、その結果 RA 増悪に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

歯周炎が RA を増悪するメカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、Pg 感染による腸内細菌叢の変化と腸組織の炎症性変化に着目し、研究を行った。また、Pg 感染 RA モデルマウスの腸内組織中の CP の産生量を調べることにより、Pg 感染とその後引き起こされる腸内の炎症性変化が、ACPA 産生に関わる新規の環境因子である可能性を明らかにすることを目的とした。更に、PgPAD がノックアウトされた菌株を作製し同様の実験を行うことで、PgPAD が関節炎増悪に関連しているかどうか調べることを目的とした。

3. 研究の方法

用いた RA モデルマウスは、ラミナリンの腹腔投与によりヒトの関節炎と類似した関節炎を発症する SKG マウスを用いた。Pg は、線毛の遺伝子 FimA の型により 5 つの種類に分類されるが、本研究では、当研究室で行った先行研究により SKG マウスに対して最も病原性を示した、Pg W83 (FimA type IV) の菌株を用いた。10⁸ CFU cells の濃度で 2%カルボキシメチルセルロースに懸濁した Pg W83 を週 2 回 SKG マウスの口腔内に塗布し、6 週間後に分析した。また実験開始時に、関節炎発症群の SKG マウスにはラミナリン 10mg を腹腔内に投与した。歯槽骨吸収の程度は、軟組織を除去した顎骨を用いて、セメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を測り分析した。関節炎の程度は Arthritis score と距骨周囲組織の HE 染色を用いて分析した。更に歯肉組織、足関節組織中の IL-6 量を分析し、炎症状態を評価した。また採取した新鮮便から細菌の DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって腸内細菌叢の変化を分析した。更に、回腸を中心に上下 1cm の部位の小腸、大腸組織をそれぞれ採取しホモ

ジナイズを行い、炎症性サイトカインである IL-6 と、RA の自己抗原である CP の産生量を分析した。

また、各マウスから得られた新鮮便を、10 mg / ml の濃度になるように 20%グリセロールで調整し、移植サンプルを作製した。これらの移植サンプルを、レシピエントの SKG マウスに腸内細菌叢移植 (fecal microbiota transplantation, FMT) し、Pg 感染によって引き起こされた腸内細菌叢の変化や腸内の炎症性変化が、レシピエントマウスで再現されるか検討した。分析方法は前述と同じ方法を用いた。

更に、PgPAD をノックアウトした Pg 菌株を用いて、SKG マウスに対する口腔感染実験を行った。PgPAD のノックアウトには電気穿孔法を用いた。技術的な問題から、本実験では PgATCC33277 (FimA type II) の菌株を用いた。これまで同様、歯槽骨吸収、関節炎、各組織中の CP 産生量を分析した。

4 . 研究成果

これまでの報告通り、Pg を感染させ関節炎を発症させた SKG マウス (Pg/LA 群) では、非感染で関節炎を発症させた群と比較して、早期から Arthritis score の増加を認め、6 週の時点で有意に関節炎が増悪した。距骨周囲の HE 染色においても、Pg/LA 群では、RA 特有の炎症性細胞浸潤であるパンヌス形成を認めた。更に Pg 感染により、歯槽骨の吸収が引き起こされた。加えて、Pg 感染により腸内細菌叢の変化を認め、特に Pg/LA 群では、*Bacteroidetes* 門と *Deferribacteria* 門に属する細菌の有意な増加と、*Firmicutes* 門に属する細菌の有意な減少を認めた。更に Pg/LA 群において、歯肉、足関節、血清、小腸組織、大腸組織の各組織中の IL-6 量と CP 量が有意に増加した。以上の結果から、Pg 感染により関節炎が増悪した SKG マウスでは、腸内細菌叢が変化し、各組織中で炎症性変化と CP 産生亢進を認め、一連の変化が関節炎増悪に関与している可能性が示唆された。

また、Pg/LA 群から FMT を受けたレシピエント SKG マウスでは、より早期から Arthritis score の増加を認め、距骨周囲の著しいパンヌス形成を認めた。更に、レシピエントマウスには Pg の直接的な暴露はなかったにもかかわらず、Pg/LA 群で認めた腸内細菌叢の変化と同様の変化が FMT により再現された。以上の結果から、Pg 感染により変化した腸内細菌叢や炎症性変化自体が、直接関節炎増悪に関与している可能性が示唆された。

PgPAD をノックアウトした Pg 菌株を感染させた SKG マウス (KO 群) では、ワイルドタイプの Pg を感染させた群 (WT 群) と比べて、歯槽骨吸収や関節炎の程度が減弱した。各位組織中の CP 産生量は WT 群では有意な増加を示したが、KO 群では有意差を示さなかった。以上のことから、各組織中の CP 産生に関与し、RA における関節炎増悪に影響している可能性が示唆された。また、PgPAD は歯周組織における Pg 感染にも重要な役割を担っている可能性が示唆された。

本研究から、Pg 感染による腸内細菌叢の変化と腸内の炎症性変化が、関節炎増悪に関与している可能性が示唆された。また、Pg 感染によって引き起こされる腸内の炎症性変化が CP 産生を促進し、ACPA 産生の足場となる可能性が示唆された。つまり、腸内環境が RA 発症に先立った ACPA 産生に関わる新規の環境因子である可能性が示された。一方で、Pg が保有している PgPAD の作用により組織中の CP 産生が亢進し、Pg 感染自体が ACPA 産生の足場となる可能性が示唆された。

本研究から、歯周炎、特に Pg 感染が RA における関節炎増悪に関与していることが明らかとなり、歯周治療が関節炎の増悪抑制につながる可能性が示唆された。しかし、実際ヒトの RA の場合、関節炎が発症する前に産生される ACPA 量と比べて、発症してから産生される ACPA の量は桁違いに多い。つまり、歯周治療は、既に発症した関節炎に対して有効であるとは言えない。一方で、関節炎を発症する前から歯周治療を開始し、関節炎発症に先立った ACPA 産生の足場となってしまうことを未然に防止できれば、歯周治療の効果は大きいと言える。前述のとおり、歯周炎と RA は好発年齢が近似しており、早期からの歯科介入により歯周炎の発症予防や治療を行うことが、RA 発症の予防や増悪防止に有効である可能性が示唆された。

本研究は、歯周炎が RA を増悪するメカニズムの 1 つとして、Pg 感染による腸内細菌叢の変化と、腸内の炎症性変化が関連している可能性を明らかにした点が有意義であると考えられる。加えて、歯周治療を早期から行うことが、歯周炎の発症を防ぐとともに、関節炎の発症を抑制することに繋がり、全身の健康に寄与する可能性を報告した点が、非常に有意義といえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 249-263
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧本結太、應原一久、宗永修一、加治屋幹人、水野智仁、藤田剛、栗原英見
2. 発表標題 関節リウマチモデルマウスにおけるPorphyromonas gingivalis感染が腸内細菌叢と関節炎増悪に与える影響
3. 学会等名 第103回広島大学歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宗永修一、應原一久、瀧本結太、加治屋幹人、水野智仁、藤田剛、杉山英二、栗原英見、河口浩之
2. 発表標題 歯周炎および歯周病原細菌Porphyromonas gingivalis感染と関節リウマチの関連について
3. 学会等名 第103回広島大学歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧本結太
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis感染による腸内細菌叢の変化が関節リウマチ増悪に与える影響
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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