

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592843

研究課題名(和文)EBウイルスによる難治性歯周病発症機序の解明

研究課題名(英文)Etiological elucidation of periodontal disease attributed to EBV

研究代表者

今井 健一 (IMAI, kenichi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：60381810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、Epstein Barr virus (EBV)の歯周疾患への関与が示唆されており、われわれは慢性歯周炎患者の病変部から高率にEBVを検出すること、病態の進行に伴いEBVとP.gingivalisなどの共感染が認められることを見出した。さらに、細菌の代謝産物酪酸がEBVを再活性化、歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカインの産生を強く誘導することを解明し、細菌とEBVの負の連鎖が歯周病発症と進展において重要な役割を担っている事が示唆された。歯周病の予防と治療において新たにウイルス感染を考慮する必要性の分子基盤を提示することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous human herpesvirus that usually results in latent infection of B cells. Interestingly, increasing evidence has accumulated over the past 10 years supporting a role for EBV as a pathogenic agent of periodontal disease because bacterial activities alone do not explain several of its clinical characteristics. We established for the first time, more EBV DNA is found deeper in periodontal pockets of chronic periodontitis in Japanese patients. Interestingly, the odds of acquiring chronic periodontitis were higher in the presence of both EBV DNA and P. gingivalis compared with either EBV DNA or P. gingivalis only. In addition, we found that P. gingivalis induced EBV reactivation and EBV stimulated production of inflammatory cytokines. Although additional basic and clinical studies are needed, our findings would suggest a relationship between periodontal disease and EBV reactivation.

研究分野：微生物学

キーワード：EBV 歯周病 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

歯周病は成人の80%以上が罹患している感染症である。近年、歯周病が誤嚥性肺炎などの全身疾患の原因となることが明らかとなり、超高齢化社会を迎えるわが国において歯周病対策はより重要となる。

歯周病はグラム陰性の嫌気性菌感染症であるが、LPSや線毛、ジンジパインといった病原因子がIL-6やIL-8といった炎症性サイトカインを誘導することで、歯周組織の破壊や歯槽骨の吸収を引き起こす。従い、歯周病の予防や治療は歯周病原菌を除去する事に重点が置かれている。しかしながら実際の臨床の現場では、細菌のみでは病態が説明できない症例が多数認められる。例えば、歯周病原菌の量が少ないにも関わらず進行性や難治性の歯周病が発症することや、原因菌を除去しても歯周病が改善しないことなどが報告されている。このような事実から、歯周病の発症に細菌以外の微生物の関与が推察されていたが、最近、難治性や進行性の歯周病の病態形成にEpstein-Barrウイルス(EBV)が関与しているとの興味深い臨床研究が複数の施設からなされた。歯周ポケットや唾液中のEBV量と歯周病の進行度が相関しており、特に重症の歯周病ではその関連性はより高くなる。また、歯周病原菌の量とEBVのDNA量も相関関係にあることが報告されている。しかしながら、わが国における歯周病とEBVの関係を示す報告は無かった。またEBVが歯周病の発症にどのように関与しているのか？この問題に関しては具体的な報告は世界中を見渡しても見当たらなかった。

2. 研究の目的

近年、進行性や難治性の歯周病の発症にEBVが関与するとの興味深い臨床報告がなされているが、本邦における関連性、および病態の形成にEBVがどのように関与しているかについては不明である。本課題は、歯周病

発症因子としてのEBVの関与を明らかとするために本課題を企画した。新たな歯周病の病因論を提示する事で、新規の予防と治療に繋がる可能性があり国民の健康増進にも貢献すると考える。

EBVは成人の90%以上が感染しているが、ウイルスは咽頭上皮細胞に初感染した後、B細胞中で潜伏感染状態を保つため、ウイルスの再活性化が病態形成の律速段階となる。最近の研究から、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)によるクロマチンレベルでのEBV潜伏感染機構が明らかとなってきたが、一方で生体内においてどのような状態(病態)が潜伏感染の破綻を引き起こすかは不明である。

従い、本研究では、わが国の歯周病患者におけるEBVの検出を試みるとともに、歯周病原菌による潜伏感染EBVの再活性化とEBVによる歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカイン誘導機構を分子生物学、生化学的手法を用いて明らかにする。

3. 研究の方法

慢性歯周炎患者85名(57.4±13.1歳)の同一口腔内から、5mm以上のプロービングポケット深さ(PPD)部位1か所(平均PPD; 6.18±1.04)と3mm以下のPPD部位1か所(平均PPD; 2.91±0.36)、およびアタッチメントロスの無い健常者20名(45.9±17.0歳)の3mm以下のPPD部位(平均PPD; 2.73±0.45)2か所(計40部位)から、滅菌ペーパーポイントを使用して30秒間、3回歯肉溝滲出液を採取した。歯肉溝滲出液からDNAを抽出後、特異的プライマーを用いたnested PCRおよびmultiplex PCRでEBVの検出を行った。

EBV転写と複製に関する実験は主に分子生物学的手法(Luciferase assay、免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法等)を用いて解析した。また種々の歯周病原菌を培養後、その上清を回収したものを実験に使用した。酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸の濃度は、ガスクロマト

グラフィーにより定量した。

4. 研究成果

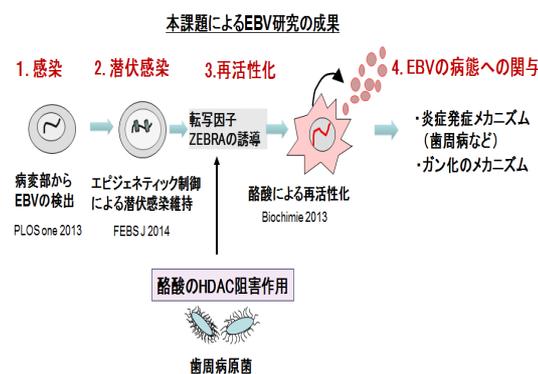
(1) 日本人慢性歯周炎患者における EBV の検出

EBV は慢性歯周炎患者の深い PPD 56 部位 (66%)、浅い PPD 41 部位 (48%)、健常者の浅い PPD 18 部位 (45%) で検出された。EBV の検出率に、男女差は認められなかった。*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) は慢性歯周炎患者の深い PPD 55 部位 (65%)、浅い PPD 34 部位 (40%)、健常者の浅い PPD 16 部位 (40%) で検出され、深い PPD 34 部位 (40%)、浅い PPD 12 部位 (14%)、健常者の浅い PPD 5 部位 (13%) では、EBV と *P.g.* の共感染が認められた。慢性歯周炎患者の 5 mm 以上の PPD 部位 (85 部位) の中で、EBV のみが 20 部位、*P.g.* のみが 19 部位、EBV と *P.g.* の両方が 36 部位と最も多く検出され、10 部位では両方とも検出されなかった。Bleeding on probing (BOP) は、EBV と *P.g.* の両方とも検出されなかった 10 部位の 50% で認められた。EBV のみが検出された 20 部位の 65%、*P.g.* のみを検出した 19 部位の 58%、EBV と *P.g.* の両方を検出した 36 部位の 61% で BOP が高率で検出されたが、BOP の発現率に有意差は認められなかった。EBV と *P.g.* の共感染が 5 mm 以上の PPD 部位に存在するオッズ比は 4.67 であった。

(2) 歯周病原菌による潜伏感染 EBV の再活性化と EBV による炎症性サイトカイン誘導機構の解明

EBV のゲノム DNA が宿主細胞に感染した後、環状となり、クロマチン構造をとることに着目し研究を行った。その結果、歯周病原菌の主要な代謝産物である酪酸が EBV の再活性化に必須である最早期遺伝子 ZEBRA の発現を転写レベルで誘導する事を見出した。転写因子 ZEBRA は他のウイルス蛋白や RNA

の発現を誘導し EBV 関連疾患を引き起こすことから、歯周病が EBV を再活性化し口腔毛様白板症やがんおよび重度の歯周病の進展に深く関与している可能性を示唆している。さらに、EBV が歯肉線維芽細胞から大量の IL-6 と IL-8 を誘導することを見出した。この作用は、LPS や LTA 刺激より強いものであった。詳細な解析の結果、EBV は TLR-NF- κ B シグナルを活性化することが明らかとなった(下図)。



歯周病の発症と進展において、炎症性サイトカインは骨吸収への関与など中心的な役割を演じる。一連の研究成果から、EBV は局所および全身の相乗的な作用により歯周病の発症と進展に深く関与していること、歯周病対策に EBV 感染を考慮する必要性が示唆された。

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 21 件)

Kato A, Imai K, Ochiai K, Ogata Y (2014) Prevalence and quantitative analysis of Epstein - Barr virus DNA and *Porphyromonas gingivalis* associated with Japanese chronic periodontitis patients. Clin. Oral Invest., 査読有. 印刷中. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25515271>

Imai K, Kamio N, Cueno ME, Saito Y, Inoue

H, Saito I, Ochiai K (2014) Role of the histone H3 lysine 9 methyltransferase Suv39h1 in maintaining Epstein-Barr virus latency in B95-8 cells. FEBS J. 281(9), 2148-2158, 査読有. doi: 10.1111/febs

Kato A, Imai K, Ochiai K, Ogata Y (2013) Higher prevalence of Epstein-Barr virus DNA in deeper periodontal pockets of chronic periodontitis in Japanese patients. PLoS One. 8(8):e71990, 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0071990.

Imai K, Inoue, H, Tamura M, Cueno ME, Inoue H, Takeichi O, Kusama K, Saito I, Ochiai K (2012) The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr Virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. Biochimie, 94(3), 839-846, 査読有. doi: 10.1016/j.biochi.2011.12.001.

[学会発表](計 56 件)

今井健一, Role of the histone H3 lysine 9 methyltransferase Suv39h1 in maintaining Epstein-Barr virus latency in B95-8 cells. 第 37 回日本分子生物学会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜(神奈川)・横浜

今井健一, H3K2 メチル化酵素 Suv39h1 による潜伏感染 EBV の維持と Suv39h1 阻害剤カエトシンによるその破綻機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日, パシフィコ横浜(神奈川)・横浜

今井健一, EBV による歯周疾患発症メカニズムの解明 -EBV は NF- κ B を活性化し歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカイン産生を誘導する-. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014 年 9 月 25 日, 福岡国際会議場(福岡)・博多

今井健一, EBV の歯周病発症と進展への関与. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 11 日, 神戸国際会議場(兵庫)・神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.nihon-u.ac.jp/bact/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今井 健一(IMAI, Kenichi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 60381810