

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11122

研究課題名(和文) 根尖病変のメタゲノム解析と抗ApoH抗体の解析による脳梗塞リスク診断

研究課題名(英文) Risk diagnosis of cerebral infarction by metagenomic and anti-ApoH antibody analysis in apical periodontitis

研究代表者

加藤 幸紀 (Kato, Satsuki)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：50281283

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)：本研究は血液・根管内容物における抗リン脂質抗体とTLRVYK抗体価を測定し、感染に伴う全身の免疫応答について検討した。血清中のTLRVYK抗体価は有病者で有意に高い値を示した。しかし抗リン脂質抗体に有意差は認めなかった。根尖性歯周炎罹患歯においてTLRVYK抗体価は抜髄根管に比べ上昇した。また、メタゲノム解析の結果、根尖性歯周炎には多数の細菌種が認められ、中には日和見感染や薬剤耐性株を含む細菌種も検出されたことから、根尖性歯周炎の治療だけでなく、全身に影響する可能性が示唆された。以上のことから、TLRVYK抗体価は、細菌感染による全身的な免疫応答を知るための有益な指標となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine of ant-phospholipid antibody and TLRVYK antibody in apical periodontitis for systemic immune response by bacterial infection. Antibody titer of TLRVYK in systemic disease person were significant increase in comparison with healthy person. On the other hand, no differences of ant-phospholipid antibody between systemic disease person and healthy person. Next, we examined antibody titer of TLRVYK in apical periodontitis. Antibody titer of TLRVYK in apical periodontitis were higher than pulpitis. Furthermore, large number of bacteria detected in apical periodontitis by metagenomic analysis. Our results suggest that antibody titer of TLRVYK may be related with systemic immune response.

研究分野：歯周治療学

キーワード：根尖性歯周炎 動脈硬化症 ApoH TLRVYK メタゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、脳梗塞は寝たきりや要介護の主な原因となっており、その抑制は医療費の軽減と患者のQOL向上のための喫緊の課題である。自覚症状のない微細な炎症 (Sub-clinical inflammation) が心臓血管疾患を引き起こすことが報告されてから、辺縁性歯周炎と血管疾患はペリオドンタルメディシンという新たな研究領域を生み出し、アテローム形成に *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原性細菌が関与する可能性などが報告されている。根尖性歯周炎と心内膜炎との関わりについての研究は歯性病巣感染として20世紀初頭から研究されているが、新たな知見に基づく全身疾患と根尖性歯周炎の関係についてはほとんど報告されていない。一般に根尖性歯周炎は歯内治療を適切に行う事で治癒するが、再根管治療では成功率は大きく低下することから、根尖のバイオフィルムによる炎症が成立してしまうと辺縁性歯周炎と同様に sub-clinical inflammation となると考えられる。 *Streptococcus mutans* 菌がコラーゲン結合蛋白を介して脳梗塞に関与することが報告され、脳血管疾患との関与は歯周病原細菌に限らないことが示唆されている。メタゲノム解析によって歯周病のバイオフィルムは未知の細菌を含め、700以上の細菌から構成されることが報告されている。根尖性歯周炎の病巣ではう蝕の細菌のほか *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原性細菌も検出されている。しかし、脳梗塞を有する患者の難治性根尖性歯周炎における細菌のメタゲノム解析は行われておらず、根尖バイオフィルムに脳梗塞に関与しうる未知の細菌が存在する可能性がある。

アポリポタンパク H (ApoH、別名 2 glycoprotein I) は血栓の形成抑制機能を持つタンパクで、特に ApoH 分子上のペプチド配列 TLRVYK は血栓抑制機能上、重要であることが知られている。我々は歯周病原細菌が TLRVYK と相同性をもつペプチドを有するために、歯周病原細菌感染によって自己の ApoH に結合する自己抗体が産生されることを明らかにしてきた。

この自己抗体は抗リン脂質抗体症候群で見られる自己抗体と同じ特徴を持ち、ApoH による血栓の抑制機能を阻害して血栓を作り、脳卒中を引き起こす可能性が懸念される。これらの内外の研究から、根尖歯周組織に成立した細菌感染も ApoH に対する自己抗体を引き起こす可能性が示唆される。そこで根尖性歯周炎に関連する細菌の TLRVYK と相同性をもつペプチドを検討したところ、難治性根尖

性歯周炎に関与する *Staphylococcus aureus* の CoA-disulfide reductase に TLRVYF という相同ペプチドが存在することが明らかとなった。辺縁性歯周炎と共通に存在する *Porphyromonas gingivalis* にも ApoH 相同ペプチドが存在する。

これらの知見を基に、根尖性歯周炎が脳梗塞に与える影響について、メタゲノム解析を用いて未知の病原性細菌を網羅的に調べること、さらに分子相同性から関連が疑われる既知の細菌について ApoH に対する自己抗体を調査・検討する必要があるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は脳梗塞患者の難治性根尖性歯周炎の細菌の詳細をメタゲノム解析により調べるとともに、ApoH と細菌の分子相同性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験者

北海道医療大学病院・歯科クリニックを受診した患者を対象とした。被験者から唾液・血液および根管内容物を採取した。また全身状態について調査した。

(2) 検体採取と解析方法

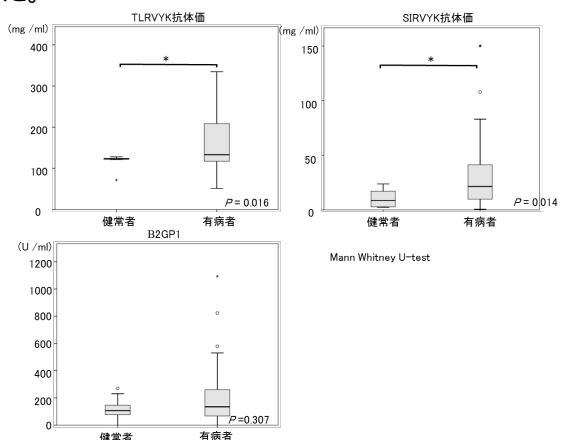
患者血清あるいは根管内容物を検体として抗リン脂質抗体 (カルジオリピン / ApoH)、細菌に対する抗体と ApoH 上のペプチド TLRVYK に対する抗体価を ELISA 法で測定した。

根管内容物から抽出した細菌 DNA を検体としてメタゲノム解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 血清中の TLRVYK 抗体価・抗リン脂質抗体価 (2GPI) について

有病者の血清を検体として TLRVYK 抗体価、SIRVYK 抗体価、および抗リン脂質抗体価を測定したところ、TLRVYK 抗体価・SIRVYK 抗体価は有病者において有意な増加を認めた。一方、抗リン脂質抗体価に有意差は認めなかった。

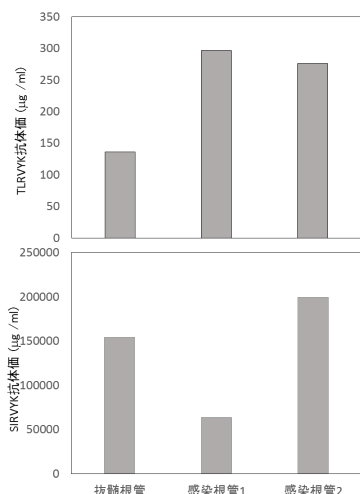


さらにSpearman順位相関を行ったところ、TLRVYK抗体価は唾液中のA. actinomycetemcomitansとP. gingivalisとの間で相関を認めた。

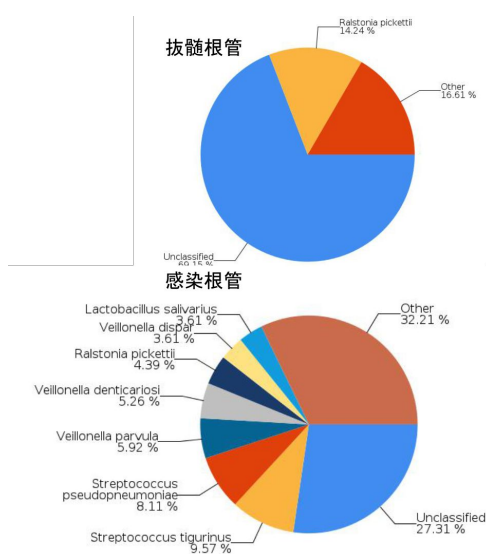
Spearman順位相関

	A. actinomycetemcomitans (Saliva)	P. gingivalis (Saliva)	抗A. actinomycetemcomitans IgG	抗P. gingivalis IgG
TLRVYK抗体価	0.280 (0.017)	-0.227 (0.055)	0.053 (0.654)	-0.089 (0.455)
SIRVYK抗体価	0.333 (0.002)	0.019(0.865)	0.005 (0.965)	0.184 (0.119)
B2GPI (-)	-0.135 (0.254)	0.072 (0.545)	0.041 (0.73)	0.022 (0.853)

次に、根管内容物を検体としてTLRVYK抗体価とSIRVYK抗体価を測定したところ、抜髄根管に比べ、感染根管（根尖性歯周炎）においてTLRVYK抗体価の上昇を認めた。



さらにメタゲノム解析を実施したところ、感染根管（根尖性歯周炎）において複数の細菌が認められた。



抜髄根管に比して根尖性歯周炎ではAcinetobacter属、Enterococcus属、Mycoplasma属といった日和見感染や薬剤耐性

に影響する菌種が有意に多かったことから、根尖先生歯周炎は菌血症等で全身に影響する可能性も推測された。

Species	抜髄根管			感染根管			p値
	1	2	3	1	2	3	
Acinetobacter bouvetii	0	0	1	158	11	5	0.046
Acinetobacter indicus	0	1	7	345	242	23	0.05
Acinetobacter johnsonii	0	0	18	5829	807	204	0.046
Acinetobacter tjernbergiae	1	11	6	2553	639	84	0.05
Enterococcus camelliae	0	0	1	13	5	3	0.046
Enterococcus hawaiiensis	0	0	0	34	1	3	0.037
Micrococcus yunnanensis	1	0	5	100	265	6	0.05
Mycoplasma edwardii	2	2	6	1	1	0	0.043
Sphingomonas mali	0	0	0	1	1	1	0.025

本研究では細菌感染に伴う全身的な炎症、自己抗体の産生を検討するために、血清中の抗リン脂質抗体とApoH上のペプチドTLRVYKに対する抗体価を測定し、感染に伴う全身の免疫応答について検討を加えた。この結果、有病者では抗リン脂質抗体とTLRVYKに対する抗体価が健常者に比して有意に増加していたことから、これら抗体価の上昇により全身的な炎症の既往を推測できると考えられた。さらに、根管治療中の根管内容物について検討したところ、細菌感染の多い根尖性歯周炎検体においてTLRVYK抗体価の上昇が認められたことから、この病変が全身に影響する可能性が考えられた。メタゲノム解析により根尖性歯周炎の根管からは種々の細菌が検出されたことから、複数の細菌感染が認められる根尖性歯周炎では難治性となる可能性が高いと推測される。また、日和見感染や薬剤耐性を有した細菌種を含んでいることから、菌血症といった全身に影響する可能性も考えられる。

血清あるいは根管内容物を検体としたTLRVYKに対する抗体価の測定は、細菌感染による全身的な免疫応答を知るために有益であることが示唆された。

< 参考文献 >

1. Nagasawa T *et.al.*, Relationship between Periodontitis and Diabetes. 2010.
2. Sakurai K *et.al.*, High incidence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection in acute coronary syndrome. Int Heart J. 2007 Nov; 48(6): 663-75.
3. Chen YW *et.al.*, Periodontitis May Increase the Risk of Peripheral Arterial Disease. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2008 35(2): 153-8

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1件)

1. 長澤敏行、白井 要、河野 舞、加藤幸紀、森 真理、古市保志。リン脂質に対する免疫応答を介した歯周炎と心臓血管疾患の関係。日本歯周病学会会誌、58巻 (3) : 98-106、2016。doi.10.2329/periodo.58.98

〔学会発表〕(計8件)

1. Kousei Matsumoto, Yuko Nakatsuka, Kaname Shirai, Shintaro Shimizu, Satsuki Kato, Yasusi Furuichi: Ligature induced periodontitis exacerbates reumatoid arthritis in SKG mice. 95th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. 2017.Mar 24, San Francisco, USA.
2. 渡邊裕之、長澤敏行、清水伸太郎、寺田裕、加藤幸紀、森 真理、川上智史、辻 昌宏、古市保志：高脂血症患者における抗酸化物質と *Porphyromonas gingivalis* の関係について。第23回日本歯科医学会総会、2016年10月23日、福岡
3. 渡邊裕之、長澤敏行、清水伸太郎、寺田裕、加藤幸紀、森 真理、川上智史、辻 昌宏、古市保志。高脂血症患者における抗酸化物質と *Porphyromonas gingivalis* の関係について。第23回日本歯科医学会総会、2016年10月23日、福岡
4. 加藤幸紀、清水伸太郎、長澤敏行、中村梢、野口和行、古市保志。妊婦の口腔微生物叢の解析 - ビフィズス菌の口腔・腸管・腔への細菌分布について -。第23回日本歯科医学会総会、2016年10月23日、福岡
5. 清水伸太郎、長澤敏行、渡邊裕之、寺田裕、小西ゆみ子、森 真理、舞田健夫、川上智史、井出 肇、辻 昌宏、古市保志：歯周組織の状態と高脂血症及び糖尿病との関連。第59回秋季日本歯周病学会学術大会、2016年10月7日、新潟
6. Watanabe H, Nagasawa T, Shimizu S, Terada Y, Kato S, Konishi Y, Mori M, Maida T, Kawakami T, Ide H, Tsuji M, Furuichi Y. Association of salivary *P. gingivalis* with serum antioxidants in hyperlipidemia patients. The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of

Periodontology and Japanese Academy of Clinical Periodontology, September 10-13, 2016, San Diego, CA

7. 渡邊裕之、長澤敏行、清水伸太郎、寺田裕、加藤幸紀、小西ゆみ子、森真理、舞田健夫、川上智史、井出肇、辻昌宏、古市保志：糖尿病を有する高脂血症患者における尿酸と *P.gingivalis* の関係。第59回春季日本歯周病学会学術大会、2016年5月20日、鹿児島
8. 渡邊裕之、長澤敏行、加藤幸紀、清水伸太郎、寺田 裕、辻昌宏、古市保志：唾液中の歯周病原細菌と血清抗酸化物質の関係、第58回秋季日本歯周病学会学術大会、2015年9月12日、浜松

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
加藤 幸紀 (KATO, Satsuki)
北海道医療大学・歯学部・講師
研究者番号：50281283
(2) 長澤 敏行 (NAGASAWA, Toshiyuki)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：90262203