

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11390

研究課題名(和文)慢性関節リウマチ関連新規因子LRG1の歯周炎における役割

研究課題名(英文)The bidirectional effect of Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (LRG1) in rheumatoid arthritis and periodontitis

研究代表者

應原 一久(Ouhara, Kazuhisa)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教

研究者番号：80550425

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)：本研究の目的はLRG1の歯周組織における発現、および機能解析を行うことである。LRG1は炎症組織で血管新生を誘導するなど炎症の惹起に強く関与することが知られている。本研究では、IL-6に依存しないRAのマーカーとして報告されているLRG1に着目した。歯周炎は炎症性サイトカインネットワークで調節されている点でRAと類似している。また、RAをはじめとする全身疾患と歯周炎の関連が多数報告され、これらの有病者の歯周病治療の機会が増加している。したがって、LRG1は生物学的製剤使用下にも有効な歯周炎検査マーカーであると仮定し、さらにLRG1が歯周炎とRAに共通する炎症マーカーとなることを明らかにする。

研究成果の概要(英文)：The correlation between periodontitis and RA is the acceptable fact via the elevated level of CP produced by Porphyromonas gingivalis (Pg). Recently, biologics (neutralization antibodies for IL-6 and TNF-alpha) was approved to treat RA. However, the evaluation of inflammatory response by CRP, which is regulated by inflammatory cytokine, is sometimes difficult for patient in the circumstance of using biologics. Therefore, 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：歯周病学

キーワード：歯周炎 LRG1

1. 研究開始当初の背景

LRG1 は炎症組織で血管新生を誘導するなど炎症の惹起に強く関与することが知られている (Nature. 2013 Jul 18;499(7458):306-11.). 近年、TNF-alpha や IL-6 などの炎症性サイトカインに対する阻害抗体が RA、クローン病、潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患に臨床応用され劇的な治療効果を示している。しかし、これら生物学的製剤、特に IL-6 レセプター阻害抗体使用時においては、IL-6 の機能が抑制されるため、IL-6 で誘導される CRP といった炎症マーカーが変化しにくい。そのため、IL-6 レセプター阻害抗体使用時の炎症の評価や感染症罹患の早期の検出が困難となる。そこで IL-6 に依存しない RA のマーカーとして報告されている LRG1 に着目した。歯周炎は歯周病原細菌の感染による慢性炎症で、炎症性サイトカインネットワークで調節されている点で RA と類似している。また、RA をはじめとする全身疾患と歯周炎の関連が多数報告され、これらの有病者の歯周病治療の機会が増加している。したがって、LRG1 は生物学的製剤使用下にも有効な歯周炎検査マーカーであると仮定した。さらに LRG1 が歯周炎と RA に共通する炎症の程度を表すマーカーとなることを明らかにする。

2. 研究の目的

本研究の目的は慢性リウマチ (RA) 患者で血中産生量が増加するタンパク質 Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (LRG1) の歯周組織における発現、および機能解析を行うことである。申請者はこれまでに歯周炎の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 感染と RA の関連について明らかにしてきたが、本研究では以下のことについて検討した。

- 1) LRG1 の歯周炎発症における意義
- 2) LRG1 の歯周炎検査マーカーとしての有用性
- 3) 抗 LRG1 療法の歯周炎治療に対する有効性

3. 研究の方法

本研究では LRG1 の歯周組織、RA 組織での産生、その機能解析を行うために、

- 1) 培養細胞 (歯肉上皮細胞、歯肉線維芽細胞、滑膜由来細胞、免疫系細胞) を用いて LRG1 の歯周組織での機能を明らかにする実験
- 2) 患者由来組織、血清を用いた LRG1 の発現、臨床症状との比較を明らかにする実験
- 3) モデルマウスを用いた LRG1 の体内での機能、治療ターゲットとしての有効性を明らかにする実験

を計画した。

4. 研究成果

- ・健常者、歯周炎患者の歯肉組織の免疫染色で LRG1 の産生量を検討したところ、炎症組織で強い染色像が認められた。
- ・患者血清中で同様に LRG1 を検討したところ、RA、歯周炎患者で産生量が増加していた。
- ・歯肉上皮細胞、RA 滑膜細胞における IL-8 mRNA 発現を検討したところ、LRG1、TGF-beta の共刺激や、Pg、TNF-alpha の刺激で発現量の誘導が認められた。
- ・RA のモデルマウスである、SKG マウスに Pg 感染させたところ、RA の臨床症状 (arthritis score) と血清中の LRG1 産生量は相関していた。
- ・LRG1 を RA のモデルマウスの足関節に注入したところ、arthritis score の上昇が認められた。

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 14 件)

- 1: Motoike S, Kajiya M, Komatsu N, Takewaki M, Horikoshi S, Matsuda S, Ouhara K, Iwata T, Takeda K, Fujita T, Kurihara H. Cryopreserved clumps of mesenchymal stem cell/extracellular matrix complexes retain osteogenic capacity and induce bone regeneration. Stem Cell Res Ther. 2018 Mar 21;9(1):73. 査読あり
- 2: Matsuda S, Memida T, Mizuno N, Ogawa I, Ouhara K, Kajiya M, Fujita T, Sugiyama E, Kurihara H. Reparative bone-like tissue formation in the tooth of a systemic sclerosis patient. Int Endod J. 2018 Feb 26. ページ未定 査読あり

- 3: Ouhara K, Munenaga S, Kajiya M, Takeda K, Matsuda S, Sato Y, Hamamoto Y, Iwata T, Yamasaki S, Akutagawa K, Mizuno N, Fujita T, Sugiyama E, Kurihara H. The induced RNA-binding protein, HuR, targets 3'-UTR region of IL-6 mRNA and enhances its

stabilization in periodontitis. Clin Exp Immunol. 2018 Feb 2. 査読あり

4: Takai Y, Ouhara K, Movila A, Kawai T. Retrospective Case Series Analysis to Evaluate Ridge Augmentation Procedure Applied to Immediate Implant Placement in the Esthetic Zone: Five-Year Longitudinal Evaluation Using Cone Beam Computed Tomography. Int J Periodontics Restorative Dent. 2017 Jul/Aug;37(4):521-530. 査読あり

5: Takewaki M, Kajiya M, Takeda K, Sasaki S, Motoike S, Komatsu N, Matsuda S, Ouhara K, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H. MSC/ECM Cellular Complexes Induce Periodontal Tissue Regeneration. J Dent Res. 2017 Aug;96(9):984-991. 査読あり

6: Takeshita K, Motoike S, Kajiya M, Komatsu N, Takewaki M, Ouhara K, Iwata T, Takeda K, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H. Xenotransplantation of interferon-gamma-pretreated clumps of a human mesenchymal stem cell/extracellular matrix complex induces mouse calvarial bone regeneration. Stem Cell Res Ther. 2017 Apr 26;8(1):101. 査読あり

7: Takeda K, Tokunaga N, Aida Y, Kajiya M, Ouhara K, Sasaki S, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H. Brain-Derived Neurotrophic Factor Inhibits Peptidoglycan-Induced Inflammatory Cytokine Expression in Human Dental Pulp Cells. Inflammation. 2017 Feb;40(1):240-247. 査読あり

8: Imai H, Fujita T, Kajiya M, Ouhara K, Yoshimoto T, Matsuda S, Takeda K, Kurihara H. Mobilization of TLR4 Into Lipid Rafts by

Aggregatibacter Actinomycetemcomitans in Gingival Epithelial Cells. Cell Physiol Biochem. 2016;39(5):1777-1786. 査読あり

9: Yamakawa M, Ouhara K, Kajiya M, Munenaga S, Kittaka M, Yamasaki S, Takeda K, Takeshita K, Mizuno N, Fujita T, Sugiyama E, Kurihara H. Porphyromonas gingivalis infection exacerbates the onset of rheumatoid arthritis in SKG mice. Clin Exp Immunol. 2016 Nov;186(2):177-189. 査読あり

10: Yoshimoto T, Fujita T, Kajiya M, Ouhara K, Matsuda S, Komatsuzawa H, Shiba H, Kurihara H. Aggregatibacter actinomycetemcomitans outer membrane protein 29 (Omp29) induces TGF- β -regulated apoptosis signal in human gingival epithelial cells via fibronectin/integrin β 1/FAK cascade. Cell Microbiol. 2016Dec;18(12):1723-1738. 査読あり

11: Miyagawa T, Fujita T, Yumoto H, Yoshimoto T, Kajiya M, Ouhara K, Matsuda S, Shiba H, Matsuo T, Kurihara H. Azithromycin recovers reductions in barrier function in human gingival epithelial cells stimulated with tumor necrosis factor- α . Arch Oral Biol. 2016 Feb;62:64-9. 査読あり

12: Kashiwai K, Kajiya M, Matsuda S, Ouhara K, Takeda K, Takata T, Kitagawa M, Fujita T, Shiba H, Kurihara H. Distinction Between Cell Proliferation and Apoptosis Signals Regulated by Brain-Derived Neurotrophic Factor in Human Periodontal Ligament Cells and Gingival Epithelial Cells. J Cell Biochem. 2016 Jul;117(7):1543-55. 査読あり

13: Yoshimoto T, Fujita T, Kajiya M, Matsuda S, Ouhara K, Shiba H, Kurihara H.

Involvement of smad2 and Erk/Akt cascade in TGF- β 1-induced apoptosis in human gingival epithelial cells. Cytokine. 2015 Sep;75(1):165-73. 査読あり

14: 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. Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration. Cytotherapy. 2015 Jul;17(7):860-73. 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

1 . 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 感染の関節リウマチへの影響についての検討

宗永修一 應原一久 山川真宏 山崎聡士 杉山英二 栗原英見
第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2016 年 4 月, 横浜)

2 . CBCT から作成した 3D 模型を歯周組織再生療法に利用した侵襲性歯周炎の一症例
應原一久, 内田雄士, 水野智仁, 藤田 剛, 栗原英見
第 59 回春季日本歯周病学会学術大会 (2016 年 5 月, 鹿児島)

3 . 凍結保存が間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex による骨再生に及ぼす影響
本池総太, 加治屋 幹人, 竹下 慶、竹脇学、岩田倫幸、武田克浩、應原一久、藤田 剛、栗原英見
第 59 回春季日本歯周病学会学術大会 (2016 年 5 月, 鹿児島)

4 . *Porphyromonas gingivalis* infection exacerbates rheumatoid arthritis in mice model.
Masahiro Yamakawa, Kazuhisa Ouhara,

Takata Takashi, Hidemi Kurihara
The 94th Annual Meeting of the International Association for Dental Research (2016 年 6 月, 大韓民国ソウル)

5 . 関節リウマチ患者由来血清の歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 表層抗原との反応性について
應原一久、宗永修一、山川真宏、濱本結太、水野智仁、藤田剛、栗原英見
日本歯周病学会 第 8 回中国地区臨床研修会 (2016 年 7 月, 松江)

6 . コウボクは *Porphyromonas gingivalis* の mgl を介したメチルメルカプタン産生を抑制する
佐藤陽子, 應原一久, 宗永修一, 加治屋幹人, 水野智仁, 藤田 剛, 栗原英見
第 145 回日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会 (2016 年 10 月, 松本)

7 . コウボクは *Porphyromonas gingivalis* の mgl を介したメチルメルカプタン産生を抑制する
佐藤陽子, 應原一久, 山川真宏, 宗永修一, 加治屋幹人, 水野智仁, 藤田 剛, 栗原英見
第 55 回広島県歯科医学会併催第 100 回広島大学歯学会 (2016 年 10 月, 広島)

8 . 歯周組織再生を目的とした骨髄間葉系幹細胞集塊の 3 次元培養によって生じる特異的遺伝子発現の解析
小松奈央, 加治屋幹人, 竹下 慶, 竹脇学, 本池総太, 應原一久, 武田克浩, 岩田倫幸, 藤田 剛, 栗原英見
第 55 回広島県歯科医学会併催第 100 回広島大学歯学会 (2016 年 10 月, 広島)

〔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

應原 一久 (Ouhara Kazuhisa)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・助教
研究者番号： 80550425

(2) 研究分担者

藤田 剛 (Fujita Tsuyoshi)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・准教授
研究者番号： 80379883

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし