

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15764

研究課題名(和文) リウマチ併発歯周炎患者のJAK分子標的・抗菌療法と機能検証

研究課題名(英文) An analysis of therapeutic and functional efficiency of targeting Janus kinase and periodontal bacteria in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis

研究代表者

吉江 弘正 (YOSHIE, HIROMASA)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20143787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、関節リウマチ(RA)併発の歯周炎患者に対するチロシンキナーゼ(JAK)分子標的治療と歯周抗菌療法の効果の評価とその機能検証を行うことである。これらの治療はともにRAおよび歯周炎の病状を改善させた。JAK標的治療後ではインターロイキン6および腫瘍壊死因子の血清レベルは低下し、歯周抗菌療法後では血液・脂質代謝に関連する血清蛋白apolipoprotein A1, angiotensinogen, hemopexinの発現が減少した。以上の結果から、JAK標的治療と歯周抗菌療法はRAと歯周炎の病状を改善させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to assess the therapeutic and functional efficiency of targeting Janus kinase (JAK) and periodontal bacteria in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis (RA). The results indicated that both the JAK- and the periodontal bacteria-targeting therapies exhibited an improvement of rheumatologic and periodontal inflammatory condition. The former therapies reduced serum levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor, while the latter decreased serum protein spots in abundance which corresponds to blood and lipid metabolism-related components including apolipoprotein A1, angiotensinogen, and hemopexin. These results suggest the beneficial therapeutic effects of the JAK- and the periodontal bacteria-targeting therapies on rheumatologic and periodontal condition in patients with periodontitis and RA.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 関節リウマチ JAK分子標的 抗菌療法

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎と関節リウマチ(RA)はともに炎症性疾患で、病因・病態に類似点が多く、双方向性の因果関係が示唆されている。共通病因であるサイトカインやシトルリン化変換酵素(PAD)の発現について多くの報告が成されており、本研究代表者らのグループでもRA・歯周炎の患者において炎症性サイトカインの腫瘍壊死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、インターロイキン-6(IL-6)、ならびに*Porphyromonas gingivalis* PAD(PPAD)の血清濃度が健常者と比較して増加していることを報告した(Kobayashi et al. J Periodontol 2010, Shimada et al. J Periodontal Res 2016)。

TNFやIL-6受容体の特異的抗体によって阻害するサイトカイン標的治療がRA患者向けに開発・導入され、その有効性が国内外で報告されている。本研究代表者らのグループも、TNF・IL-6受容体阻害がRAのみでなく歯周炎の病状も改善すること(Kobayashi et al. J Periodontol 2014)、歯周治療がRA病状を改善すること(Okada et al. J Periodontol 2013)を報告した。しかしながら、サイトカイン標的治療はRAを改善するものの寛解に至るのは30%~50%であり、歯周抗菌療法についても同様であった。さらに、サイトカイン標的治療は被験者全てを必ずしも改善することはなく、その改善効果の作用機序についても不明確であった。

近年、TNF- $\alpha$ ・IL-6シグナル因子の1つであるチロシンキナーゼ(JAK)分子を標的する阻害薬が本邦で認可され、RA患者における有効性が報告されてきている。また、歯周抗菌療法によってPADやシトルリン化タンパクの発現も低下するためRAが改善することが考えられる。したがって、JAK分子標的治療と歯周抗菌療法の併用はRAのみでなく歯周炎の病状も改善させる可能性が考えられ、歯周炎・RAの共通発症機序の解明には、これらの標的治療併用効果の検証が必要不可欠であることが示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、TNF・IL-6標的治療に対して低応答性のRA併発歯周炎患者を対象に、TNF・IL-6シグナル伝達因子JAK分子標的治療と歯周抗菌療法を併用し、歯周炎とRAの改善効果を評価することである。さらに、その効果についての機能検証も併せて行う。

### 3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントが得られJAK標的治療を予定していたRA・歯周炎併発患者2名を対象に、RA・歯周状態に係る臨床検査を実施後、血液および歯周ポケットプラークを採取した。治療3ヶ月後に同様な検査を実施して比較・検討した。血液より血清を遠心抽出して、すべての血清検体、臨床検査結果、血清検査結果は個人情報保護の観

点から匿名・記号化した。

次いで、抗環状シトルリン化ペプチド抗体(抗CCP抗体)、リウマトイド因子(RF)、C反応性タンパク(CRP)、血清アミロイドA、TNF- $\alpha$ 、IL-6、マトリックスメタロプロテアーゼ-3(MMP-3)の血清濃度を各々ELISA法にて定量し、歯周ポケットプラークを対象にDNAアレイを用いて細菌同定を行った。

(2) インフォームドコンセントが得られ歯周抗菌療法を予定していたRA・歯周炎併発患者26名を対象にRA・歯周状態に係る臨床検査を実施後、血液を採取した。治療2ヶ月後に同様な検査を実施して比較・検討した。血液より血清を遠心抽出して、すべての血清検体、臨床検査結果、血清検査結果は個人情報保護の観点から匿名・記号化した。

次いで、抗CCP抗体、抗PPAD抗体、RF、CRP、血清アミロイドA、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMP-3、シトルリンの血清濃度を各々ELISA法にて定量した。

さらに、血清タンパクを溶解処理、タンパク濃度を測定後、二次元電気泳動ゲル上でタンパクスポット発現を画像解析ソフトにて定量・比較した。サイトカイン標的治療前後で統計学的に有意な発現差が認められるタンパクスポットを選定後に、切り抜き、回収、トリプシン処理を行い、MS/MSイオンサーチ分析法による質量分析を実施後、NCBI Inr データベースを参照してコードタンパクを同定した。

### 4. 研究成果

(1) RA・歯周炎併発患者2名を対象に、JAK標的治療前および治療3ヶ月後にRA・歯周状態を臨床的に評価・比較した。その結果、治療後のRA活動度(DAS28-CRP)、疼痛・腫脹関節数、Visual Analogue Scaleはともに減少した。また、歯肉縁上プラークの付着状態に有意な変動は認められなかったものの、歯肉炎指数(Gingival Index)、プロービング時出血(Bleeding on Probing)、歯周ポケット深さ(Probing Depth)、臨床的付着レベル(Clinical Attachment Level)は、いずれも有意な低下が認められた。

血清検査結果では、標的治療後のRF、CRP、MMP-3、TNF- $\alpha$ 、IL-6の各濃度は低下した。しかしながら、抗CCP抗体および血清アミロイドA濃度について変動は認められなかった。歯周ポケットプラーク細菌検査の結果、総菌数は約1/3に低下し、歯周病関連細菌*Campylobacter rectus*の総菌数に対する比率も0.02%から未検出レベルに低下した。

以上の結果から、JAK標的治療はRA病状を改善させるだけでなく、血清サイトカイン・炎症メディエーター濃度の低下、歯周ポケット内細菌叢の変動によって、歯周状態も改善させる可能性が示唆された。

(2) RA・歯周炎併発患者26名を対象に、歯

周抗菌療法前および2ヶ月後にRA・歯周状態を臨床的に評価・比較した。その結果、歯周抗菌療法後、歯肉炎指数(Gingival Index) プロービング時出血(Bleeding on Probing) 歯周ポケット深さ(Probing Depth) 臨床的付着レベル(Clinical Attachment Level)に有意な低下が認められた。

また、DAS28-CRPおよびシトルリン血清濃度は有意に低下したものの、抗CCP抗体、抗PPAD抗体、RF、CRP、血清アミロイドA、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMP-3の血清濃度に有意な変動は認められなかった。

さらに、歯周抗菌療法前および2ヶ月後における血清蛋白の発現を二次元電気泳動ゲル上で解析・比較した結果、合計535スポットの蛋白が認められた。そのうち、歯周抗菌療法後に有意に発現強度が増加したのは10スポットであり、すべてhaptoglobinであった。一方、歯周抗菌療法後に有意に発現強度が減少したのは6スポットで、血液・脂質代謝に関連する3種の血清蛋白(apolipoprotein A1, angiotensinogen, hemopexin)であった。

以上の結果から、歯周抗菌療法は歯周状態を改善するだけでなく、血清シトルリン濃度の低下、血液・脂質代謝の改善によってRAの病状も改善させ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7件)

Kobayashi T, Kido J, Ishihara Y, Omori K, Ito S, Matsuura T, Bando T, Wada J, Murasawa A, Nakazono K, Mitani A, Takashiba S, Nagata T, Yoshie H. The KCNQ1 Gene Polymorphism as a Shared Genetic Risk for Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis in Japanese Adults: A Pilot Case-Control Study. *Journal of Periodontology*, 査読有, 2018, in press. DOI: 10.1002/JPER.17-0412

Kaneko C, Kobayashi T, Ito S, Sugita N, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: A pilot case-control study. *PLoS ONE*, 査読有, 2018, 13(2):e0192365. DOI:10.1371/journal.pone.0192365.

Kobayashi T, Ishida K, Yoshie H. Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *Archives of Oral*

*Biology*, 査読有, 2016, 69:89-94. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2016.05.018.

Kojima A, Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. *Journal of Periodontal Research*, 査読有, 2016, 51(3):350-358. DOI:10.1111/jre.12314. Kobayashi T, Ito S, Kobayashi D, Shimada A, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Serum Immunoglobulin G Levels to *Porphyromonas gingivalis* Peptidyl-arginine Deiminase Affect Clinical Response to Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drug in Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE*, 査読有, 2016, 11(4):e0154182. DOI:10.1371/journal.pone.0154182.

Kobayashi T, Ito S, Kobayashi D, Kojima A, Shimada A, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab ameliorates periodontal inflammation in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis as well as tumor necrosis factor inhibitors. *Clinical and Experimental Dental Research*. 査読有, 2016, 1(2): 63-73. DOI: 10.1002/cre2.11.

Shimada A, Kobayashi T, Ito S, Okada M, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Expression of anti-*Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase immunoglobulin G and peptidyl-arginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 査読有, 2016, 51(2): 103-111. DOI:10.1111/jre.12288.

[学会発表](計13件)

小林哲夫・歯周炎と全身疾患(糖尿病・関節リウマチ)に共通するリスク遺伝子の解析. 第60回春季日本歯周病学会学術大会, 2017年5月13日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

小林哲夫・関節リウマチ患者におけるbiologic DMARDs(bDMARDs)治療反応性予測因子の解析. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2017年4月20日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

小林哲夫・*Porphyromonas gingivalis* PAD IgG抗体価と関節リウマチ治療応答性との関連. 日本歯科保存学会2016年度秋季学術大会(第145回), 2016年10月28日, キッセイ文化ホール(長野県・松本市).

小林哲夫 . 慢性歯周炎罹患歯肉組織における IL-6 プロモーター低メチル化と遺伝子転写発現亢進 . 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2016 年 10 月 7 日, 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市).

小林哲夫 . 歯周炎併発と関節リウマチ活動度との関連性の解析 . 日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会 (第 144 回), 2016 年 6 月 10 日, 栃木県総合文化センター (栃木県・宇都宮市).

小林哲夫 . *Porphyromonas gingivalis* PAD 血清抗体価のサイトカイン標的療法反応性への影響 . 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 2016 年 5 月 20 日, かごしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市).

小林哲夫 . 関節リウマチ患者における *Porphyromonas gingivalis* PAD 血清抗体価と biologic DMARDs 反応性との関連性 . 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016 年 4 月 21 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

小林哲夫 . IL-6 レセプター阻害による関節リウマチ患者の歯周炎症の改善 . 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 (第 143 回), 2015 年 11 月 13 日, 文京シビックホール (東京都・文京区).

島田惇史 . 歯周炎併発関節リウマチ患者における *Porphyromonas gingivalis* PAD に対する血清抗体価 . 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 9 月 12 日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市).

Kojima A. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter methylation in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis. EuroPerio 8, June 3-6, 2015, London (UK) .

Shimada A. Effects of periodontal treatment on serum peptidylarginine deiminase levels in patients with rheumatoid arthritis. EuroPerio 8, June 3-6, 2015, London (UK).

小林哲夫 . IL-6 受容体阻害薬トシリズマブ投与前後での歯周・血清サイトカインプロファイル . 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 5 月 15 日, 幕張メッセ (千葉県・幕張市).

小林哲夫 . アダリムマブ投与前後での歯周・血清蛋白プロファイル . 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2015 年 4 月 24 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野

[http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/obs/per/index\\_j.html](http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/obs/per/index_j.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉江 弘正 (YOSHIE, Hiromasa)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 : 2 0 1 4 3 7 8 7

(2)研究分担者

小林 哲夫 (KOBAYASHI, Tetsuo)

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号 : 0 0 2 1 5 3 4 4