

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11526

研究課題名(和文) 歯周病発症におけるEBV関与の解明及び新規治療法開発のための分子レベルでの検討

研究課題名(英文) Strategic approach towards etiological elucidation and novel therapy development of periodontitis attributed to EBV

研究代表者

今井 健一 (IMAI, Kenichi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：60381810

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)：歯周疾患は骨破壊を伴う難治性の炎症性疾患であり成人の多くが罹患している国民病である。しかし、その病因はまだよく解っていない。近年、EBウイルス(EBV)が歯周病や根尖性歯周炎の発症に関与していることが報告されているが、そのメカニズムは不明である。今回、EBVのlatent membrane protein 1(LMP1)が歯肉上皮細胞から炎症性サイトカインを誘導すること、根尖性歯周炎関連細菌がEBVを再活性化すること、さらにヒト化マウスを用いたEBV感染動物モデルの解析も進行した。歯周疾患の予防と治療における、EBVの重要性を提示することが出来たと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えるわが国では、歯周疾患の罹患率の上昇と重症度のより高い患者の増加が見込まれる。病気の進行は歯の喪失に繋がるため、食生活の著しい低下を招く。長年にわたり、ある種の細菌と歯周疾患に関する研究が行われてきたが、未だに病因ははっきりしていない。最近、患部には細菌のみならず多くのEBウイルス(EBV)が存在することがわかってきた。EBVによる歯周疾患発症のメカニズムに関する研究は、新たな診断基準の基となる病因論の解明と新規治療法の開発に繋がることが期待される。また、EBVが関与するがんや潰瘍性大腸炎など他の重要な疾患の研究に新たな情報を提示できる可能性もある。

研究成果の概要(英文)：Human chronic periodontitis is a major public health problem, the major etiology of which has recently been revealed to be neutrophil infiltration into the periodontium. It affects over half of the adult population worldwide. Although traditional microbiological research on the etiology of periodontitis has focused on some oral endogenous bacteria, emerging evidence suggests an association between EBV and periodontitis progression. However, EBV's role in the etiology of periodontitis is unknown. We found that extremely high concentrations of IL-8 were produced due to LMP1 in time- and dose-dependent manners in human gingival cells. In addition, *P. endodontalis* induces the EBV's lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. Thus, EBV, as well as periodontopathic bacteria, should be considered as a causative agent of the progression of human chronic periodontitis.

研究分野：微生物学、感染・免疫学、歯周病学、ウイルス学

キーワード：歯周病 歯周疾患 EBウイルス 炎症 根尖性歯周炎

1. 研究開始当初の背景

歯周疾患（歯周病と根尖性歯周炎）による歯の喪失は、食生活に支障をきたすのみならず日常生活などの社会生活にも悪影響を及ぼす。「歯周病と全身疾患」を関連付ける疫学的研究や基礎研究も多数報告され、現在歯周病は歯科のみならず医科をはじめとする他分野から注目を集めている。一生涯自分の歯で食事を楽しむためのみならず、全身の健康維持のためにも歯周病対策はますます重要となる。

これまで歯周疾患は細菌感染症とされ、細菌に関する多くの研究が行われてきたが、未だ病因論の解明には至っていない。複数の細菌が関与すると言われているものの、最新の次世代シーケンサーを使用した研究等により、実際の歯周病患者から関連細菌が検出されなかったとするケースが多く報告されている。原因が明らかとなっていないため、治療や予防に対する考え方も未だ定まっていないのが現状である。近年、我々のグループも含む国内外の研究から、Epstein-Barr ウイルス（EBV）と歯周疾患とを関連付けるエビデンスが積み重なり、新たな視点に立った病因論の解明が期待されている。

歯周疾患の誘因として宿主因子が注目されているが、宿主に寄生して免疫機能低下を誘導する EBV に関する研究は、これまで細菌感染だけでは説明が困難であった歯周疾患の病因論確立に繋がる可能性がある。我々は、患部に EBV が存在すること、歯周病原菌が EBV 再活性化することを報告してきた。歯周病患者に抗ヘルペスウイルス薬を服用した結果、口腔内の EBV コピー数が劇的に減少するとともに、歯周病も改善した（Sunde PT et al, J Clin Virol., 2008）ことから、病原因子として EBV に注目が集まっている。

しかし、EBV がどのように歯周疾患の発症に関与しているかについては、報告が見当たらない。EBV はヘルペスウイルスのなかでも扱いが困難であるばかりでなく、ヒトのみにしか感染しないため通常の動物実験が行えないことも、研究が遅れている要因である。ウイルスの関与という新しい視点に立った概念の構築が、歯周疾患の理解と新しい予防・治療法開発のブレークスルーとなる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者らは、本邦で初めて歯周病及び根尖性歯周炎患者の患部から EBV が検出されること、歯肉と滑膜組織に EBV の RNA (EBER) が認められることを発見し、EBV と両疾患との因果関係を示してきた。さらに、EBV 研究の最重要課題である潜伏感染について研究を進め、その成立と再活性化機構を転写レベルで示した。しかし、EBV と両疾患との関連性をより明確にするために、EBV がどのように炎症性疾患の発症に関与をしているのかを基礎・動物・臨床研究により明らかにする必要がある。

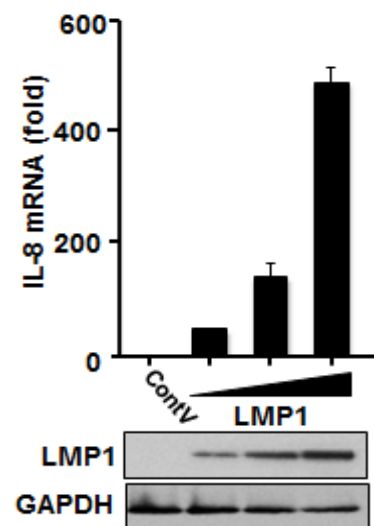
そこで本研究では、EBV 感染、及び EBV の Latent membrane protein 1 (LMP1; 細胞増殖、及びがん化促進に関与する蛋白) に着目し歯周疾患発症と進行における EBV の重要性を明確にするための研究を進めた。また、EBV は人のみにしか感染しないため、動物研究が遅れている。この点を克服するため、これまで開発を続けてきたヒト化マウスを用いた動物モデルマウスの解析に加え、細菌によるウイルス再活性化機構に関する研究を行った。さらに、治療前後での患部における EBV のコピー数やウイルス遺伝子の変化に関する研究も立ち上げた。

3. 研究の方法

- (1) EBV による炎症性サイトカイン誘導の解析は、歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) に、LMP1及びその変異型の発現ベクターを導入後、各種サイトカインのmRNAは RT-PCR、培養上清中のIL-8量はELISAにて定量した。NF- κ Bの活性化はウェスタンブロット法とLuciferase assayを行い検討した。
- (2) EBV転写と複製に関する実験は主に分子生物学的手法を用いて解析した。また細菌を培養後、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。
- (3) 患部から EBV の DNA を通法に従い抽出し、EBV 特異的プライマーと TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR を行うことで、実際に EBV 量を定量した。得られたウイルス量と病気の程度との関連性を検討した。
- (4) 実験モデルマウスは、NOG マウス (実験動物中央研究所) に CD34 陽性ヒト臍帯血を静脈内注射しヒト化させた後、EBV を投与することにより作製した。マウスの有用性を調べるために、サイトカインや細胞表面マーカーに対する抗体を用い免疫染色を行った。

4. 研究成果

- (1) EBV が歯肉上皮細胞にも感染していること、EBV の LMP1 の発現と歯周ポケット深さとが関連していることが示された。そこで今回、LMP1 は炎症性サイトカインを誘導することで、歯周病の発症に関与しているのではないかと推察し実験を行った。その結果、LMP1 の導入により、IL-1、IL-8 及び TNF の mRNA 発現上昇が認められた。特に、IL-8 の mRNA の発現は顕著で、LMP1 の導入量及び時間依存的に大量の IL-8 産生が誘導された(右図参照)。また、LMP1 は NF- κ B を活性化すること、DN 型 I κ B が LMP1 誘導性 IL-8 産生を抑制することが解った。さらに、LMP1 を用いた実験から、LMP1 の TRAF と TRADD 結合領域が LMP1 による IL-8 産生に必須であることが明らかとなった。今回の結果から、我々は、EBV が歯肉線維芽細胞から IL-6 と IL-8 を誘導することを報告しているが、LMP1 誘導性の炎症性サイトカインが破骨細胞形成を促進する等により歯周病の発症に深く関与していることが示唆された。EBV 関与機構の解明は、これまで細菌感染のみでは説明が困難であった歯周病発症機序の解明に繋がる可能性がある。



- (2) ヒト化マウスを用いた解析の結果、EBV の投与により歯槽骨及び歯髄に破骨用細胞の誘導が認められた。また、骨吸収の進行も認められた。免疫染色及びクローナリティ解析の結果、ヒトの EBV 関連疾患と微小環境が非常に類似していた。また、ヒトと同様のサイトカイン (IL-10 や TNF 等) 及び CD163 陽性のマクロファージの誘導も認められ、本モデルマウスは EBV が関連する疾患の解析のみならず、新規治療薬の開発のために有用であると考えられた。

- (3) 根尖性歯周炎を引き起こす原因菌である *Porphyromonas endodontalis* の代謝産物により

EBV が再活性化されることを明らかにするため EBV 感染細胞を用いて EBV 再活性化の指標となる BZLF1 活性と ZEBRA の発現を実際の患者サンプルを用い検索した。その結果、*P. endodontalis* の培養上清中から酪酸を検出し、その培養上清を添加した EBV 感染細胞から BZLF1 活性と ZEBRA の発現を認めた。従って、根尖性歯周炎の *P. endodontalis* が EBV を再活性化させる可能性が示唆された。

現在、治療前後でのウイルス動態の解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Cueno ME, Imai K (2018) Various cellular components change as the rat ages: An insight into the putative overall age-related cellular stress network. *Experimental Gerontology* 102, 36-42. doi: 10.1016/j.exger.2017.11.021. (査読有)
2. Makino K, Takeichi O, Imai K, Inoue H, Hatori K, Himi K, Saito I, Ochiai K, Ogiso B (2018) *Porphyromonas endodontalis* reactivates latent Epstein-Barr virus. *Int Endod J.* 51(12), 1410-1419. doi: 10.1111/iej.12959. (査読有)
3. Cueno ME, Imai K (2018) Network analytics approach towards identifying potential antivirulence drug targets within the *Staphylococcus aureus* staphyloxanthin biosynthetic network. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 645, 81-86. doi: 10.1016/j.abb.2018.03.010. (査読有)
4. Kato A, Imai K, Sato H, Ogata Y (2017) Prevalence of Epstein-Barr virus DNA and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese peri-implantitis patients. *BMC Oral Health* 17(1), 148. doi: 10.1186/s12903-017-0438-6. (査読有)
5. Ibi H, Hayashi M, Yoshino F, Tamura M, Yoshida A, Kobayashi Y, Shimizu K, Lee MC, Imai K, Ogiso B (2017) Bactericidal effect of hydroxyl radicals generated by the sonolysis and photolysis of hydrogen peroxide for endodontic applications. *Microb Pathog* 103, 65-70. doi: 10.1016/j.micpath.2016.12.010. (査読有)

〔学会発表〕(計 68 件)

1. 今井健一. 口腔細菌と全身疾患との関わり - 補綴臨床がもたらす影響について - . 平成 30 年度日本補綴歯科学会東京支部学術大会, 2018 年
2. Kenichi Imai. EBV-LMP1 induces IL-8 production via regulation of the NF- κ B pathway in the human gingival epithelial cells. The 43rd FEBS Congress, 2018 年
3. 今井健一. EBV-LMP1 promotes production of inflammatory cytokines through NF- κ B signaling in gingival epithelial cells: its potential implication in periodontitis progression. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年
4. 加藤彩子, 今井健一, 神尾宜昌, 岡林堅, 小方頼昌. 慢性歯周炎の発症と進行へのエプスタインバーウイルス(EBV)と *P. gingivalis* の関与, 第 23 回日本歯科医学会総会 2016 年

〔図書〕(計 1 件)

1. 今井健一ら (2018) 口腔微生物学 - 感染と免疫 - 第 6 版. 石原和幸, 今井健一ら編集.
学建書院. 433 ページ (総ページ)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/microbiology/>

6 . 研究組織