

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11717

研究課題名（和文）難治性根尖性歯周炎原因細菌によるEpstein-Barrウイルスの再活性化

研究課題名（英文）Reactivation of Epstein-Barr virus by persistent apical periodontitis-related bacteria

研究代表者

武市 収 (TAKEICHI, Osamu)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10277460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：歯根肉芽腫からEBVを検出したが、健常歯肉組織からは一切検出できなかった。歯根肉芽腫中のEBV感染細胞はB細胞であった。難治性根尖性歯周炎関連細菌7菌種の検出を行ったところ、*Fusobacterium nucleatum*が最も優位である、最も高い酪酸産生能を示す、最も高いBZLF-1のルシフェラーゼ活性を示すことが明らかとなった。Daudi細胞を用いてEBVの再活性化能を検索したところ、*F. nucleatum*が最も高いBZLF-1遺伝子およびZEBRAタンパクの発現を誘導した。本研究により歯根肉芽腫に潜伏感染したEBVは*F. nucleatum*の関与により再活性化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根尖性歯周炎は口腔内常在菌による細菌感染症であると認識されていたが、難治性根尖性歯周炎にはEpstein-Barrウイルス（EBV）が感染していること、EBVが根尖性歯周炎の発症と遷延に関わっていることが明らかとなった。また、EBVは潜伏感染し炎症を誘発することはないが、難治性根尖性歯周炎関連細菌である*Fusobacterium nucleatum*が潜伏感染EBVを再活性化することから、炎症メディエーターの発現を誘導する可能性を示唆した。これらの結果から、EBVならびにウイルス研究が新たな治療法のターゲットとなりうることを示唆され、根尖性歯周炎の病因論という名の地図を塗り替える一助となった。

研究成果の概要（英文）：Epstein-Barr virus (EBV) was detected from apical granulomas, but not from healthy gingival tissues using polymerase chain reaction analysis. Type of EBV-infected cells in apical granulomas were B lymphocytes. Seven persistent periapical periodontitis-related bacteria were detected, and *Fusobacterium nucleatum* was the most detected bacteria, showing the highest butyric acid induction, and the highest BZLF-1-luciferase activity. Daudi cells showed that *F. nucleatum* induced the most BZLF-1 mRNA expression and ZEBRA protein. The results demonstrated that *F. nucleatum* could reactivate latent EBV in apical granulomas.

研究分野：歯内療法

キーワード：難治性根尖性歯周炎 歯根肉芽腫 ヘルペスウイルス Epstein-Barrウイルス 再活性化 *Fusobacterium nucleatum* ZEBRA BZLF-1

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 慢性根尖性歯周炎は口腔内常在菌による感染症であると考えられていたが、近年根管からヒトヘルペスウイルスが検出されたとする報告がある (Oral Microbiol Immunol, 18, 104, 2003)。そのため、根管に感染したウイルスが根尖歯周組織にまで波及し、根尖性歯周炎を惹起している可能性が示唆される。
- (2) ヒトヘルペスウイルスは8型までタイプがあり、その中でも4型である Epstein-Barr ウイルス (EBV) に着目した。EBV は B 細胞に特異的に感染するが、感染しても直ちに炎症を誘発することなく潜伏性を示す。しかし、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の関与により再活性化する。HDAC 阻害剤には細菌が産生する酪酸があり、酪酸産生菌の有無は EBV の再活性化に大きく関与する。
- (3) 申請者は、EBV が根尖性歯周炎局所の B 細胞や形質細胞に感染することを分子生物学的に証明した (PLOS One, 10, e0121548, 2015)。また、*Porphyromonas endodontalis* の培養液中の8種類の短鎖脂肪酸量を測定したところ、酪酸が有意に産生されていることを明らかにし、潜伏感染した EBV を再活性化する可能性を証明した (Int Endod J, 51, 1410, 2018)。再活性化した EBV は、B 細胞による炎症性サイトカインの発現を誘導する可能性がある。すなわち、根尖歯周組織に感染した EBV は酪酸産生菌により再活性化し、根尖歯周組織の炎症を誘導している可能性があるが、その詳細は未だに不明である。
- (4) ウイルスには抗菌薬の効果が期待できず、一度感染すると体内から排除することが難しい。従ってウイルスと根尖性歯周炎の関連性を明らかにすることは、根尖性歯周炎の新たな治療法を見出すための一助となる可能性がある。

2. 研究の目的

根尖性歯周炎の中には、根管治療を行ってもなかなか治癒せず難治化するものが少なくない。そのため、難治性根尖性歯周炎の病態を解明することはウイルスをターゲットにした新たな治療法の開発に大きく寄与する。潜伏感染した EBV が難治性根尖性歯周炎にどのように関与するかは解析されておらず、未だに不明である。本研究の目的は、難治性根尖性歯周炎関連細菌によって潜伏性 EBV が再活性化されるかを明らかにし、根尖性歯周炎の新たな治療法開発の一助とすることである。

3. 研究の方法

- (1) 供試試料：難治性根尖性歯周炎と診断された患者の外科処置の際に摘出された根尖病巣組織を試料とした。また、完全埋伏智歯の抜去の際に摘出された歯肉組織を健常組織として比較検討した。
- (2) 病理組織学的検索：得られた飼料を分割し、一つはホルマリン固定したのちパラフィン切片を作製した。その後、ヘマトキシリン-エオジン重染色を行い、光学顕微鏡観察を行った。
- (3) EBV と難治性根尖性歯周炎関連細菌の検出：real-time PCR 法を用いて、試料中の EBV および難治性根尖性歯周炎関連細菌7菌種の定量的検出を行った。
- (4) 酪酸の定量：高速液体クロマトグラフィーを用いて、難治性根尖性歯周炎関連細菌の培養液中の酪酸量を定量した。
- (5) BZLF-1 ルシフェラーゼアッセイ：BZLF-1 のプロモーター領域を制限酵素で消化したのち、ルシフェラーゼプラスミドに挿入し、B 細胞内に導入した。この細胞に難治性根尖性歯周炎関連細菌の培養上清を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。
- (6) Daudi 細胞を用いた EBV 再活性化の検討：Daudi 細胞に難治性根尖性歯周炎関連細菌の培養上清を添加し培養した。培養上清中の ZEBRA タンパク発現量並びに Daudi 細胞の BZLF-1 遺伝子発現量を、それぞれ Western blot 法および real-time PCR 法で定量的に解析を行った。
- (7) 統計分析：得られたデータを、Steel test と Mann-Whitney U-test を用いて統計学的に解析した。

4. 研究成果

- (1) 供試試料：難治性根尖性歯周炎患者 60 名から根尖病巣組織を、また埋伏智歯抜去患者 15 名から健常歯肉組織を採取した。
- (2) 病理組織学的検索：試料のパラフィン切片をヘマトキシリン-エオジン染色したところ、根尖病巣組織 60 症例中 50 例に幼弱な毛細血管に富む肉芽組織を認め、歯根肉芽腫と病理診断し、本研究に供試した。また、健常歯肉組織 15 例はヘマトキシリン陽性の細胞浸潤が軽度で、炎症はほとんど観察されなかった。
- (3) EBV と難治性根尖性歯周炎関連細菌の検出：EBV は 50 例中 47 例で検出され、検出量は中央値で 923.73 コピー/ μg であった。一方健常歯肉組織からは全例検出されなかった。7 菌種については検出頻度と検出量は様々であったが、最も高頻度に検出されたのは *Fusobacterium nucleatum* であった。

(4) 酪酸の定量：難治性根尖性歯周炎関連細菌7菌種の培養上清中における酪酸量の定量的検出を行ったところ、*Fusobacterium nucleatum*が最も産生量が高く、 $23.5 \pm 0.8 \text{ mmol/L}$ であった。一方、難治性根尖性歯周炎から高頻度に検出される *Enterococcus faecalis* や *Candida albicans* などは酪酸を産生しなかった(図1)。

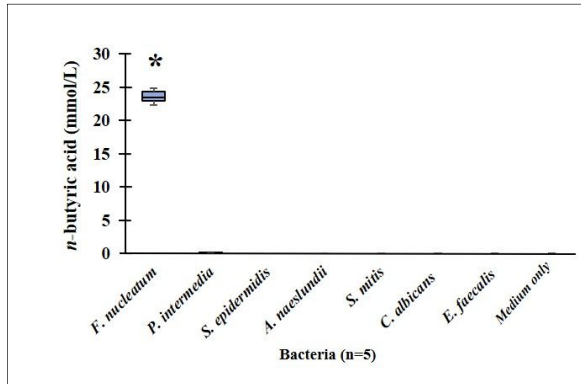


図1：難治性根尖性歯周炎関連細菌による酪酸産生量 (* : $P < 0.05$)

(5) BZLF-1 ルシフェラーゼアッセイ：難治性根尖性歯周炎関連細菌7菌種の培養上清を用いてBZLF-1 ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、*F. nucleatum*が最も高いルシフェラーゼ活性を示し、尚且つ *F. nucleatum* の培養液内酪酸量の濃度依存的に活性は上昇した(図2)。

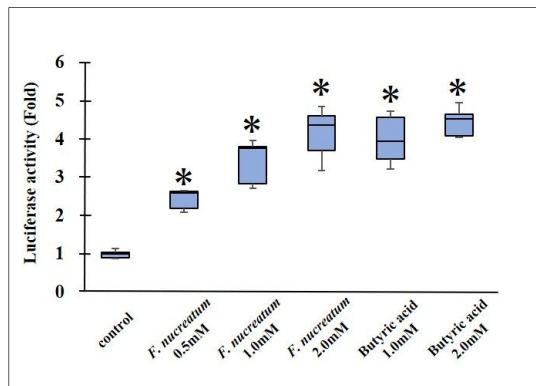


図2：*F. nucleatum*によるBZLF-1 ルシフェラーゼ活性の推移 (* : $P < 0.05$)

(6) Daudi 細胞を用いたEBV再活性化の検討：Daudi細胞に *F. nucleatum* の培養上清を添加し培養したところ、培養上清中のZEBRAタンパク発現量は酪酸産生量依存的に上昇した(図3)。同様に培養細胞からRNAを抽出しBZLF-1 mRNA発現を検索したところ、酪酸産生量依存的に上昇した(図4)。

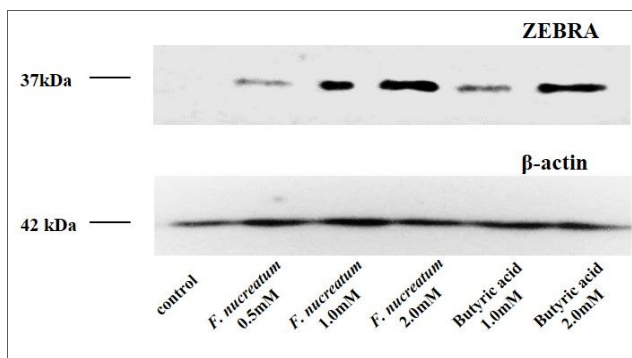


図3：*F. nucleatum*によるDaudi細胞のZEBRAタンパク発現誘導能

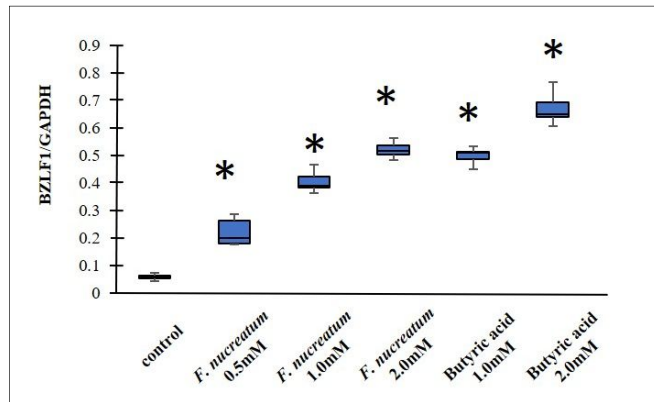


図4 : *F. nucleatum* による Daudi 細胞の BZLF-1 遺伝子発現誘導能 (* : $P < 0.05$)

<引用文献>

Sabeti M, Valles Y, Nowzari H, Simon JH, Kermani-Arab V, Slots, Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA transcription in endodontic symptomatic lesions. *Oral Microbiol Immunol*, 18(2):104-8, 2003.

Makino K, Takeichi O, Hatori K, Imai K, Ochiai K, Ogiso B, Epstein-Barr virus infection in chronically inflamed periapical granulomas. *PLoS One*, 10(4):e0121548, 2015.

Porphyromonas endodontalis reactivates latent Epstein-Barr virus. Makino K, Takeichi O, Imai K, Inoue H, Hatori K, Himi K, Saito I, Ochiai K, Ogiso, *Int Endod J*, 51(12):1410-1419, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe N, Nodomi K, Koike R, Kato A, Takeichi O, Kotani A, Kaneko T, Sakagami H, Takei M, Ogata Y, Sato S, Imai K	4. 巻 33
2. 論文標題 EBV LMP1 in Gingival Epithelium Potentially Contributes to Human Chronic Periodontitis via Inducible IL8 Production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 1793-1800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.11670	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makino K, Takeichi O, Imai K, Inoue H, Hatori K, Himi K, Saito I, Ochiai K, Ogiso B	4. 巻 51
2. 論文標題 Porphyromonas endodontalis reactivates latent Epstein-Barr virus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Endodontic Journal	6. 最初と最後の頁 1410-1419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iej.12959.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 水見一馬、武市 収、羽鳥啓介、工藤 洋、田中 一、今井健一、小木曾文内
2. 発表標題 難治性根尖性歯周炎関連細菌とEpstein-Barr virusの関連性
3. 学会等名 第70回日本大学歯学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuma Himi, Osamu Takeichi, Keisuke Hatori, Hiroshi Kudo, Hajime Tanaka, Kenichi Imai, Bunnai Ogiso
2. 発表標題 EBV reactivation by refractory apical periodontitis-related bacteria
3. 学会等名 96th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 氷見一馬、武市 収、羽鳥啓介、牧野公亮、工藤 洋、田村隆仁、田中 一、今井健一、小木曾文内
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatumは歯根肉芽腫に潜伏感染したEpstein-Barr virusを再活性化する
3. 学会等名 第149回秋季日本歯科保存学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 氷見一馬、武市 収、羽鳥啓介、牧野公亮、工藤 洋、田中 一、今井健一、小木曾文内
2. 発表標題 難治性根尖性歯周炎関連細菌とEpstein-Barr virusの関連性
3. 学会等名 第147回秋季日本歯科保存学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	氷見 一馬 (HIMI Kazuma)		
研究協力者	牧野 公祐 (MAKINO Kosuke)		
研究協力者	工藤 洋 (KUDO Hiroshi)		