

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10078

研究課題名(和文) EBウイルス感染制御を基盤とした新規歯周病予防・治療戦略の確立

研究課題名(英文) A strategic approach to elucidate the etiology of EBV-induced periodontitis and to develop novel therapies

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の吸収を特徴とする慢性の炎症性疾患で、30歳以上の約8割が罹患している。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が炎症性サイトカイン産生と破骨細胞分化の両方を強く誘導することを示した。また、歯周病患者の唾液中の酪酸は、エピジェネティック制御を介してBZLF1の発現を誘導することにより、EBVを再活性化することを明らかにした。歯周病発症機序の解明に繋がる可能性が示唆され、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

わが国では今後ますます高齢化が進むため、重症度のより高い患者の増加が見込まれる。また、歯周病がその発症に関与する糖尿病や肺炎等への影響も懸念される。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が関与するリンパ腫や胃がん、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)：Periodontitis is an inflammatory condition that causes the destruction of the supporting tissues of teeth and is a major public health problem. 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 levels of IL-6 and IL-8 were induced by inactivated EBV in a copy-dependent manner in HGFs. EBV induced I B degradation, NF- B transcription, and RAW264.7 cell differentiation into osteoclast-like cells. Furthermore, BZLF1 mRNA expression and transcriptional activity in Daudi cells were induced only when treated with the chronic periodontitis patients' saliva. 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：口腔微生物学、感染症学、ウイルス学、免疫学

キーワード：EBウイルス 歯周病 炎症性サイトカイン 破骨細胞 唾液

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯肉の炎症と歯槽骨の吸収を特徴とする慢性の炎症性疾患で、30歳以上の約8割が罹患している。歯を喪失する最も大きな要因となるだけでなく、誤嚥性肺炎などの呼吸器疾患、糖尿病および低体重児出産など様々な全身疾患の誘因となることも解ってきた。したがって、歯周病予防は口腔の健康のみならず、全身の健康維持にも重要との考え方が広まっている。しかし、歯周病の病因論は未だ確立されていない。これまでの研究から、*Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* などの嫌気性菌が歯周病の主な原因菌であることが知られている。しかし、これらの細菌がどのように歯周病の発症に関与しているのかは、現在でも明確に説明することは難しい。最近の研究では、歯周ポケットから検出される *P. gingivalis* や *F. nucleatum* の数が、患者と健常者において差がなかったとする報告に加え、*P. gingivalis* 等が患部から検出されなかったとする症例も報告されている。したがって近年では、歯周病の発症に細菌の関与は必須であるものの、主な原因は宿主側にあり、特に免疫機能の低下が重要な因子であるとの考えが広く認識されるようになった。

そこで、宿主細胞内に寄生し感染局所や全身の免疫能低下を誘導するウイルス、特に Epstein-Barr virus (EBV) と歯周病発症に関する興味深い臨床研究データが世界各国から蓄積されている。これまでに、*P. gingivalis* や *F. nucleatum* が、エピジェネティック制御を通じて EBV の再活性化を誘導すること、歯周病患者の歯周ポケットや唾液中の EBV 検出率と歯周病の重症度とに相関があることが多数報告されている。さらに、EBV が歯肉上皮細胞にも感染していること、感染歯肉上皮細胞には EBV による癌化や炎症反応において重要な役割を担う Latent membrane protein 1 が発現していることが最近報告された。

しかし、EBV がどのように歯周病の発症と進行に関与しているかは不明である。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

本研究では、EBV の歯周病への直接的な関与を解明するために、歯周病患者由来のヒト歯肉線維芽細胞とマウス単球由来 RAW264.7 細胞を用い、EBV が歯周病の進行において重要な役割を担う炎症性サイトカインの産生と破骨細胞分化に対する作用を検討した。さらに、*P. gingivalis* や *F. nucleatum* の培養液中に含まれる短鎖脂肪酸の一つである酪酸が、エピジェネティック制御を介して EBV の再活性化を誘導することを以前に報告したが、酪酸は強力な HDAC 阻害作用を有することが知られているため、BZLF1 プロモーター上の HDAC に直接作用してヒストンの脱アセチル化を解除した結果、EBV の再活性化を誘導したと考えられた。歯周病患者の唾液中には歯周病原菌が多く存在するため、歯周病原菌が産生した唾液中の酪酸が EBV を再活性化する可能性がある。しかしこれまでに、唾液中の短鎖脂肪酸と EBV 再活性化に関する報告は見当たらない。そこで、実際の歯周病患者の唾液を採取し、唾液中の短鎖脂肪酸の濃度を測定すると共に、唾液が EBV を再活性化するか否かを検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 歯肉線維芽細胞に薬剤処理により不活化した EBV、もしくは CMV を添加したのち、培養上清と細胞抽出液を回収し、IL-6 と IL-8 の遺伝子発現を real-time PCR 法にて、蛋白質量は ELISA 法にて定量した。炎症性サイトカイン産生における、転写因子 NF- $\kappa$ B の関与を調べるために、転写活性化はルシフェラーゼアッセイにより、I $\kappa$ B $\alpha$  の分解および NF- $\kappa$ B p65 のリン酸化は、各々の抗体を用いた Western blotting 法により調べた。また、NF- $\kappa$ B 選択的阻害剤: BAY11-70582 の効果も ELISA 法にて検討した。破骨細胞分化に対する作用は、RAW264.7 細胞を RANKL で 4 日間処理し破骨細胞分化を誘導する系を用い、TRAP 染色を行うことにより、破骨細胞様の TRAP 陽性多核巨細胞数を計測することにより調べた。

(2) 歯周病患者 7 名、及び健常者 5 名から採取した唾液を用いた。無味ガムを噛んでもらい 5~10 ml 程度の唾液を回収し遠心後、0.22  $\mu$ m のフィルターに通したものを使用した。唾液の採取は歯学部倫理委員会の承諾を得て実施した。唾液中の短鎖脂肪酸(酪酸、プロピオン酸、酢酸、イソ吉草酸、及びイソ酪酸)の濃度は、高速液体クロマトグラフィーを用いて定量した。EBV 再活性化は EBV 潜伏感染 B 細胞である Daudi 細胞に唾液刺激を行った後、BZLF1 の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて検出することで解析した。BZLF1 がコードする蛋白質である ZEBRA の発現とヒストンのアセチル化は各々の特異的抗体を用いた Western blotting 法にて調べた。また、転写レベルで検討するために、BZLF1 のプロモータープラスミドが安定的に組み込まれた B95-8-221 細胞を用いて Luciferase assay を行った。

### 4. 研究成果

(1) 歯肉線維芽細胞において、EBV が IL-6 および IL-8 の発現を誘導するか否かを検討した。その結果、EBV は IL-6 で約 35 倍、IL-8 においては約 400 倍と非常に強く両遺伝子発現を誘導した。蛋白質産生においても、EBV は実際の歯周病の患者において検出されるウイルス量よりも少ない量で、IL-6 と IL-8 の産生を強く誘導することがわかった。また、EBV は I $\kappa$ B $\alpha$  の分解と p65 のリン酸化を誘導し、転写レベルで NF- $\kappa$ B を活性化することがルシフェラーゼアッセイの結果から明らかとなった。さらに、NF- $\kappa$ B 阻害剤: BAY11-70582 は、その濃度依存的に EBV 誘導性の IL-6 および IL-8 の産生を抑制したことから、EBV による両炎症性サイトカイン

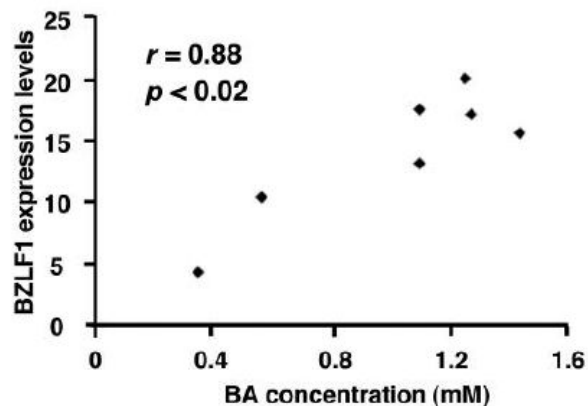


ン産生には NF- $\kappa$ B が深く関与していることが示唆された。次に、破骨細胞分化に対する EBV の効果を RAW264.7 細胞を用いて検討した。破骨細胞は、破骨細胞前駆細胞上の RANK に、そのリガンドである RANKL が結合することにより形成される。RAW264.7 細胞を RANKL 処理した結果、多数の TRAP 陽性の破骨細胞が形成されたが、興味深いことに EBV の添加により、その数は EBV の量依存的に増加した。一方、CMV においてはそのような作用は認められなかった(上図)。

以上の結果より、EBV は歯肉線維芽細胞において NF- $\kappa$ B の活性化を介して IL-6 および IL-8 の産生を誘導すること、その作用が既存の病原因子や CMV よりも強いことが明らかとなった。また、EBV が破骨細胞分化を誘導することが初めて明らかとなり、骨吸収促進作用を有することも示唆された。歯周病の進行に伴い患者の歯周ポケット内には IL-6 や IL-8 等の炎症性サイトカインが上昇することが報告されている。これらの炎症性サイトカインは LPS などの病原因子同様、RANKL を誘導することにより骨吸収にも深く関与する。本研究から EBV が炎症性サイトカイン産生と破骨細胞分化の両方を強く誘導することが明らかとなり、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示唆された。

(2) 唾液中の短鎖脂肪酸濃度を測定した結果、歯周病患者唾液中には酪酸、プロピオン酸、及び酢酸が、それぞれ  $0.95 \pm 0.39$  mM、 $0.67 \pm 0.31$  mM、 $3.41 \pm 1.20$  mM と高濃度で存在していることが解った。その値は健常者の唾液中の濃度と比較してそれぞれ、33.3 倍、3.3 倍、及び 2.4 倍と優位に高かった。イソ吉草酸とイソ酪酸の濃度は健常者と歯周病患者ともに  $0.01 \sim 0.03$  mM と低い値を示し、両者の間に有意差は認められなかった。次に、Daudi 細胞と B95-8-221 細胞に唾液を添加し BZLF1 の mRNA 発現と転写活性を検討した。その結果、歯周病患者の唾液により BZLF1 の発現が転写レベルで誘導されると共に、BZLF1 発現量は唾液中の酪酸濃度との間みに有意な相関関係があることが認められた(下図)。そこで、5 つの短鎖脂肪酸をそれぞれ実際の歯周病患者の唾液中に含まれる濃度で Daudi 細胞を刺激した結果、酪酸のみに BZLF1 の誘導能があることが解った。さらに、歯周病患者の唾液と酪酸は Daudi 細胞において ZEBRA の発現を誘導すると共に、ヒストン H3 のアセチル化を促進することが確認できた。

以上の結果から、歯周病患者の唾液中の酪酸は、エピジェネティック制御を介して BZLF1 の発現を誘導することにより、EBV を再活性化することが明らかとなった。今後、唾液のサンプル数を増やして実験を行っていく必要があるが、本研究から歯周病が EBV 再活性化のリスク因子となり得ることが推察され、歯周病のみならず上咽頭癌やパーキットリンパ腫等の発症機序の解明とその予防法の開発に繋がる可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Koike R, Nodomi K, Watanabe N, Ogata Y, Takeichi O, Takei M, Kaneko T, Morio T, Kotani A, Imai K	4. 巻 34(2)
2. 論文標題 Butyric acid in saliva of chronic periodontitis patients induces transcription of the EBV lytic switch activator BZLF1: A Pilot study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 587-594.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11811.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Himi K, Takeichi O, Imai K, Hatori K, Tamura T, Ogiso B	4. 巻 53
2. 論文標題 Epstein-Barr virus reactivation by persistent apical periodontal pathogens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Endod J	6. 最初と最後の頁 492-505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayata M, Watanabe N, Kamio N, Tamura M, Nodomi K, Tanaka K, Iddamalgoda A, Tsuda H, Ogata Y, Sato S, Ueda K, Imai K	4. 巻 73
2. 論文標題 Cynaropicrin from Cynara scolymus L. suppresses Porphyromonas gingivalis LPS-induced production of inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts and RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nat Med	6. 最初と最後の頁 114-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Imai K, Ogata Y	4. 巻 21(6)
2. 論文標題 How dose Epstein-Barr virus contribute to chronic periodontitis?.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.,	6. 最初と最後の頁 E1940.
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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yokoe S, Hasuike A, Watanabe N, Tanaka H, Karahashi H, Wakuda S, Takeichi O, Kawato T, Takai H, Ogata Y, Sato S, Imai K.	4. 巻 23(2)
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus Promotes the Production of Inflammatory Cytokines in Gingival Fibroblasts and RANKL-Induced Osteoclast Differentiation in RAW264.7 Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.,	6. 最初と最後の頁 809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23020809.	査読の有無 無
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9件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今井健一
2. 発表標題 口腔フローラと健康寿命 - 「細菌-ウイルス-宿主相互作用」の観点から - .
3. 学会等名 第40回日本歯内療法学会学術大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池亮, 今井健一
2. 発表標題 EBV関連悪性リンパ腫モデルマウスの作製とヒトリンパ腫との組織レベルでの比較検討
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺典久, 横江将, 佐藤秀一, 今井健一
2. 発表標題 P. gingivalis LPS誘導性炎症性サイトカイン産生とRANKL誘導性破骨細胞分化に対するアーティチョーク由来シナロピクリンの抑制効果
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石原和幸、今井健一、大島朋子、落合智子、葛城啓彰、清浦有祐、高橋幸裕、田中芳彦、浜田信城、	4. 発行年 2021年
2. 出版社 学建書院	5. 総ページ数 423
3. 書名 口腔微生物学 感染と免疫	

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学歯学部細菌学 <a href="http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/microbiology/">http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/microbiology/</a>
---

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------