

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09954

研究課題名(和文) 歯周病原細菌の感染とタンパク質シトルリン化を介する関節リウマチの病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis mediated by infection of periodontal pathogenic bacteria and citrullinated protein

研究代表者

畑中 加珠 (Hatanaka, Kazu)

岡山大学・大学院・医員

研究者番号：50362992

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)：歯周炎と関節リウマチの関連を解明するために、リウマチとその類似疾患患者を対象に、シトルリン化に関与する歯周病原細菌の感染を調べた。

歯周病原細菌 *P. gingivalis* に対する血清IgG抗体価の上昇と抗シトルリン化ペプチド抗体との間に有意な関連を認めた。リウマチの治療前の疾患活動性と抗体価との間に関連はなかったが、*P. gingivalis* および *A. actinomycetemcomitans* に対する抗体価が高い患者は、3ヶ月後の治療反応性が不良であった。両疾患のリスク因子である喫煙については関連が見出せなかった。歯周病原細菌の感染がリウマチの治療効果を阻害する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、関節リウマチ患者の治療反応性に歯周病原細菌の感染が影響している可能性を明らかにした。このことから、両疾患分野に新たな医科歯科連携を提案することができ、将来の医療の進歩に貢献できると考えられる。さらに、歯周病の治療介入による関節リウマチへの影響を調べることによって、両疾患の関連および病態を解明する一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the association between periodontitis and rheumatoid arthritis, we investigated infection of periodontal pathogenic bacteria involved in citrullination in patients with rheumatoid arthritis and similar diseases.

We found a significant association between elevated serum IgG antibody titers against periodontal bacteria *P. gingivalis* and anti-citrullinated peptide antibodies. Although there was no difference in disease activity before rheumatoid arthritis treatment and antibody titers against *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, patients with higher antibody titers had a poorer response to treatment after 3 months. No association was found for smoking, a risk factor for both diseases. It was suggested that infection with periodontal pathogenic bacteria may interfere with the therapeutic efficacy of rheumatoid arthritis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周病原細菌 シトルリン化蛋白 関節リウマチ 血清抗体価

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は、関節の滑膜を病変の主座として関節組織の破壊を来す炎症性疾患である。一方、歯周病は歯周病原細菌と宿主応答との相互作用によって歯周組織が破壊される慢性炎症である。両者は、骨破壊を伴う慢性炎症性疾患で、炎症性サイトカインや破骨細胞の関与など共通の病態を持っている。RA 患者では歯周病罹患率が高いという報告 (Mikuls TR et al. *Arthritis Rheumatol.* 66(5); 2014)、また歯周病患者は RA 罹患率が高いという報告 (Demmer RT et al. *J Clin Periodontol.* 38(11); 2011) があるが、大規模なランダム化試験による関連の報告はなく、十分なエビデンスは認められていない。

歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は、アルギニンをシトルリンに変換する酵素を有する唯一の細菌といわれている (McGraw WT et al. *Infect Immun.* 67(7); 1999)。Pg が口腔内感染すると、このシトルリン化変換酵素によって歯周組織中のタンパクがシトルリン化され、産生された抗シトルリン化タンパク抗体と関節内のシトルリン化タンパクと免疫複合体を形成して関節炎を惹起することが提唱されている (Lundberg K et al. *Nat Rev Rheumatol.* 6(12); 2010)。シトルリン化タンパクに対する自己抗体である抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (anti-cyclic citrullinated peptide antibody: ACPA) は、70%の感度、90%の特異度をもつ RA の主要な診断マーカーである。

本邦での研究において、RA 患者を対象に歯周病原細菌とシトルリン化ペプチドに対する血清 IgG 抗体価を調べた結果、非 RA 患者と比較して Pg に対する血清抗体価が有意に高かったという結果がある (Okada M et al. *J Periodontol.* 82(10); 2011)。彼らのグループは、歯周炎と関節リウマチの発症機序に関する継続した研究を重ね、Pg のシトルリン化変換酵素に対する血清抗体反応が、リウマチ薬物治療に対する反応性も制御する可能性を示唆している (Kobayashi T et al. *PLoS One.* 11(4); 2016)。

近年新たに、歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) が、ロイコトキシンという外毒素の産生によって好中球のシトルリン化酵素の活性化に影響を与えることが報告された (Konig MF et al. *Sci Transl Med.* 8(369); 2016)。

そこで、ACPA が陽性と陰性の患者でその差異に、Pg および Aa を含む歯周病原細菌の感染が関連するか、また、歯周病原細菌の感染が、ACPA の産生増加、RA の疾患活動性や治療反応性に関連するかを明らかにすることを考えた。さらに、喫煙は両疾患のリスク因子であり、その影響にも関心がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病原細菌の感染と RA の病態への関与を明らかにすることである。その戦略として、1) ACPA 陽性群と陰性群で Pg および Aa を含む歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価の違いを比較検討する。2) 歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価と ACPA の産生、RA の疾患活動性および治療反応性の関連を検討する。さらに、3) 両疾患のリスク因子である喫煙の関連も検討する。

これまでの報告では、RA 患者と非 RA 患者、その多くは健常者を比較対照として調べられている。しかしながら、ACPA 陽性 RA と陰性 RA では、対照的な遺伝的背景があることが示唆され、異なるリスク因子が関与することが示されている (Daha NA & Toes RE. *Nat Rev Rheumatology.* 7(4); 2011)。そこで、本研究では、RA の比較対照疾患として、リウマチ性多発筋痛症 (polymyalgia rheumatic: PMR) を設定する。PMR は、高齢者に多く、時に RA との鑑別が困難な原因不明の炎症性疾患であり、赤血球沈降速度の亢進や C 反応性蛋白の上昇のような炎症反応を伴うが、リウマチ因子 (RF) や ACPA はほとんどの場合陰性となるという特徴を持っている。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究対象者

2012年3月から2018年2月までに岡山赤十字病院を受診した RA または PMR の日本人患者で、治療歴のない患者をすべて本研究に登録した。血清は、同病院において「膠原病を対象とした、臨床データベースと検体バイオバンクの構築と解析」の研究に被験者から同意を得て「検体バンク」に保存されているもので、個人を識別できない状態にした上で、岡山大学に提供された。RA は 2010 年の米国および欧州リウマチ学会 (ACR/EULAR) 分類基準に、PMR は 2012 年の EULAR/ACR 予備分類基準の結果に基づいて診断された。研究プロトコルは、岡山大学研究倫理審査専門委員会の承認を得た (受理番号 1709-040)。

### (2) 研究デザイン

本研究は、RA および PMR の患者を対象とした観察的症例対照横断的研究である。ACPA 値の測定は、Architect Anti-CCP (Abbott Japan LLC) により、4.5 U/mL が陰性および陽性の基準で

ある。被験者は、疾患 RA あるいは PMR の 2 群、そして ACPA 値によって 3 群に分類された。

RA 患者は、DAS-score のウェブサイト (<http://www.das-score.nl/>) を用いて疾患活動性スコア 28 (DAS28-CRP、DAS28-ESR) を算出して、それぞれ 3 群に分類された。3 ヶ月後の DAS28 の改善量に基づき、EULAR 基準に従って RA 治療反応性を良好、中程度、無反応の 3 群に分類された。また、DAS 比に基づいて 2 群に分類された (DAS 比 = 3 ヶ月後の DAS28-ESR または CRP / 初診時の DAS28-ESR または CRP : 良好反応者 < 0.75、不良反応者 0.75)。

さらに、喫煙状況を質問し「喫煙者」「元喫煙者」「非喫煙者」の 3 つのカテゴリーに分類した。それぞれについて欠損値のあるサンプルは除外した。

### (3) 歯周病原細菌抗原に対する血清 IgG 抗体価の測定

超音波処理した歯周病原細菌の粗抗原に対する血清中の IgG 抗体価は、当該研究分野で確立されている方法 (Murayama Y et al. *Adv Dent Res.* 2(2); 1988) を用いて酵素結合免疫吸着法 (ELISA) で測定した。全患者の血清は、治療直前のタイミングのものを用いた。本研究では、Aa 菌 3 株 Aa Y4, Aa ATCC29523, Aa SUNY67 と Pg 菌 2 株 Pg FDC381, Pg SU63 のそれぞれ平均抗体価を使用した。抗体価は、以下の式で定義した : 抗体価 = (患者の ELISA 単位 - 健常対照の平均値) / 健常対照の 2 標準偏差 [SD]。健常対照者は歯周炎のない成人 10 名で、検量線の作成にはそれらの血清のプールを使用した。

### (4) 統計解析

年齢と喫煙が RA パラメータと歯周病菌の感染程度に影響するかどうか、まずそれらの相関係数を調べた。各群の血清 IgG 抗体価は、Student の t 検定または一元配置分散分析およびポストホック分析 (Bonferroni の調整) を用いて比較した。各比較において、喫煙状況は Fisher の正確検定または Pearson のカイ二乗検定を用いて検討した。治療反応性と歯周病原細菌の感染および喫煙の関係は、マリメッコチャート (モザイク図) で示して、Pearson のカイ二乗検定を用いて分析した。これらの分析において、統計的有意性は  $P < 0.05$  とした。

データ解析には、統計ソフト JMP version 9.0.2 および NCSS version 2021 を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 対象サンプル

本研究では、142 検体 (男性 47 名、女性 95 名、平均年齢  $64.9 \pm 15.1$  歳) を用いた。全患者の特徴として、ACPA, ESR, CRP, RF の中央値は正常値を大きく上回っていた (表 1)。

まず、RA と PMR 患者における歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価を測定した。PMR 群の 38 検体は ACPA 陰性、RA 群の 82 検体は ACPA 陽性であった。次に、ACPA 値に基づいて抗体価を解析した。ACPA 値は  $< 4.5$  U/mL が 53 検体、 $4.5$  U/mL  $< 100$  U/mL が 29 検体、 $100$  U/mL が 58 検体であった。さらに、RA 患者の抗体価を疾患活動性に基づいて解析した。DAS28-CRP 値は 81 検体で 2.3 以上であり、2.3-2.7, 2.7-4.1, 4.1 以上の 3 群間で比較した。DAS28-ESR 値は 86 検体で 2.6 以上であり、2.6-3.2; 3.2-5.1; 5.1 以上の 3 群間で比較した。EULAR 反応基準で群分けされた RA 患者の治療反応性は、良好 (DAS28-ESR で 23 検体、DAS28-CRP で 30 検体)、中程度 (DAS28-ESR で 25 検体、DAS28-CRP で 19 検体)、無反応 (DAS28-ESR で 36 検体、DAS28-CRP で 35 検体) であった。また、DAS 比により、良好 ( $< 0.75$  : DAS28-ESR で 37 検体、DAS28-CRP で 43 検体)、不良 ( $0.75$  : DAS28-ESR で 47 検体、DAS28-CRP で 41 検体) に分類された。

表 1. 被験者の特性と臨床検査値

Factor	Value
Sex	Female 95 (67%), Male 47 (33%)
Mean Age (SD)	64.9 years (15.1)
Smoking	Current 16 (11%), Former 36 (25%), Never 90 (63%)
Median ACPA ( $P_{25}$ ; $P_{75}$ ; Ref.)	91.7 U/mL (2.2; 401; 4.5)
Median ESR ( $P_{25}$ ; $P_{75}$ ; Ref.)	51 mm/h (27; 80; 20)
Median CRP ( $P_{25}$ ; $P_{75}$ ; Ref.)	1.48 mg/dL (0.46; 4.56; 0.3)
Median RF titers ( $P_{25}$ ; $P_{75}$ ; Ref.)	80 IU/mL (28; 176; 15)

### (2) 年齢や喫煙などの因子が RA の病態に及ぼす影響の可能性

患者の年齢は、ACPA 値と負の相関、DAS28 と正の相関を示したが、歯周病原細菌の感染とは相関しなかった。喫煙の有無は、RA および歯周病パラメータのいずれとも相関がなかった (表

2) また、疾患 (RA または PMR)、ACPA 値、疾患活動性で分けた群間でも喫煙歴に差はなかった (表 3 - 5)。また、喫煙歴と治療反応性にも有意な差はなかったが、喫煙歴のない患者は RA 治療に対する反応が良好な傾向にあった (図 1)。

表 2. 臨床検査値と年齢および喫煙の関連

	age		smoking	
	<i>r</i>	P-value	<i>r</i>	P-value
ACPA	-0.3315	0.0001*	0.0282	0.7407
DAS28-ESR	0.2394	0.0201*	0.1012	0.3316
DAS28-CRP	0.2147	0.0377*	0.1517	0.1445
<i>Aa</i> titer	-0.0770	0.3626	0.0259	0.7597
<i>Pg</i> titer	-0.0292	0.7305	-0.0343	0.6855

### (3) 歯周病原細菌抗原に対する血清 IgG 抗体価

PMR および RA 患者における血清 IgG 抗体価の平均値および標準誤差を表 3 に示す。PMR 群と RA 群の間で抗体価に有意差はなかった。*Aa* に対する血清 IgG 抗体価は、ACPA 値による有意差はなかったが、*Pg* に対する血清 IgG 抗体価は、ACPA 値が高い群で有意に高かった (表 4、 $p=0.0491$ )。また、ACPA 陰性群と ACPA 高値陽性群の間でも、*Pg* に対する抗体価に有意差があった (表 4、 $p=0.0368$ )。RA の疾患活動性は、DAS28-ESR、DAS28-CRP とともに群間に血清 IgG 抗体価の有意な差はなかった (表 5) が、DAS28-ESR 活性が低い患者 10 名全員 (表 5A) と DAS28-CRP 活性が低い患者 6 名中 5 名 (表 5B) は、*Pg* に対する血清 IgG 抗体価が 1 未満と低かった。

歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価と治療反応性との関係を図 2 に示す。IgG 抗体価と EULAR 基準の治療反応性との間に有意な差はなかった (図 2AB)。しかし、IgG 抗体価と DAS 比 0.75 で定義した治療反応性との間には、DAS28-ESR (図 2C、 $p=0.0301$ ) および DAS28-CRP (図 2D、 $p=0.0049$ ) で有意差があった。

表 3. PMR および RA 患者の血清 IgG 抗体価

		PMR ( <i>n</i> = 38)	RA ( <i>n</i> = 82)	P-value
Smoking	Current	3 (7.9 %)	12 (14.6%)	0.4811
	Former	7 (18.4%)	18 (22.0%)	
	Never	28 (73.7 %)	52 (63.4 %)	
<i>Aa</i> titer		0.98 ± 0.27	1.11 ± 0.19	0.6930
<i>Pg</i> titer		0.62 ± 0.60	1.63 ± 0.40	0.1635

表 4. ACPA 値に基づいた血清 IgG 抗体価

		Negative ACPA < 4.5 ( <i>n</i> = 53)	Positive 4.5 ≤ ACPA < 100 ( <i>n</i> = 29)	High-value positive ACPA ≥ 100 ( <i>n</i> = 58)	P-value
Smoking	Current	3 (5.7 %)	3 (10.3 %)	9 (15.5 %)	0.5935
	Former	15 (28.3 %)	7 (24.1 %)	14 (24.1 %)	
	Never	35 (66.0 %)	19 (65.5 %)	35 (60.3 %)	
<i>Aa</i> titer		0.86 ± 0.22	1.08 ± 0.30	1.11 ± 0.21	0.7113
<i>Pg</i> titer		0.54 ± 0.48	0.87 ± 0.65	2.12 ± 0.46	0.0491*
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 10px;"> <span style="border-top: 1px solid black; width: 200px; margin-left: auto; margin-right: auto;"></span> <span>0.0368*</span> </div> (Bonferroni test)					

表 5. 疾患活動性による血清 IgG 抗体価

(A) DAS28-ESR		Low activity $2.6 \leq \text{DAS28} < 3.2$ (n = 10)	Moderate activity $3.2 \leq \text{DAS28} < 5.1$ (n = 45)	High activity $\text{DAS28} \geq 5.1$ (n = 31)	P-value
Smoking	Current	1 (10.0 %)	5 (11.1 %)	6 (19.4 %)	0.3372
	Former	3 (30.0 %)	8 (17.8 %)	10 (32.3 %)	
	Never	6 (60.0 %)	32 (71.1 %)	15 (48.4 %)	
Aa titer		$0.58 \pm 0.58$	$0.96 \pm 0.27$	$1.15 \pm 0.33$	0.6892
Pg titer		$-0.23 \pm 1.37$	$1.63 \pm 0.64$	$1.63 \pm 0.78$	0.4422

(B) DAS28-CRP		Low activity $2.3 \leq \text{DAS28} < 2.7$ (n = 6)	Moderate activity $2.7 \leq \text{DAS28} < 4.1$ (n = 41)	High activity $\text{DAS28} \geq 4.1$ (n = 34)	P-value
Smoking	Current	0 (0.0 %)	11 (26.8 %)	10 (29.4 %)	0.3316
	Former	1 (16.7 %)	4 (9.8 %)	7 (20.6 %)	
	Never	5 (83.3 %)	26 (63.4 %)	17 (50.0 %)	
Aa titer		$0.45 \pm 0.78$	$0.84 \pm 0.30$	$1.44 \pm 0.33$	0.2875
Pg titer		$0.58 \pm 1.83$	$1.66 \pm 0.70$	$1.47 \pm 0.77$	0.8576

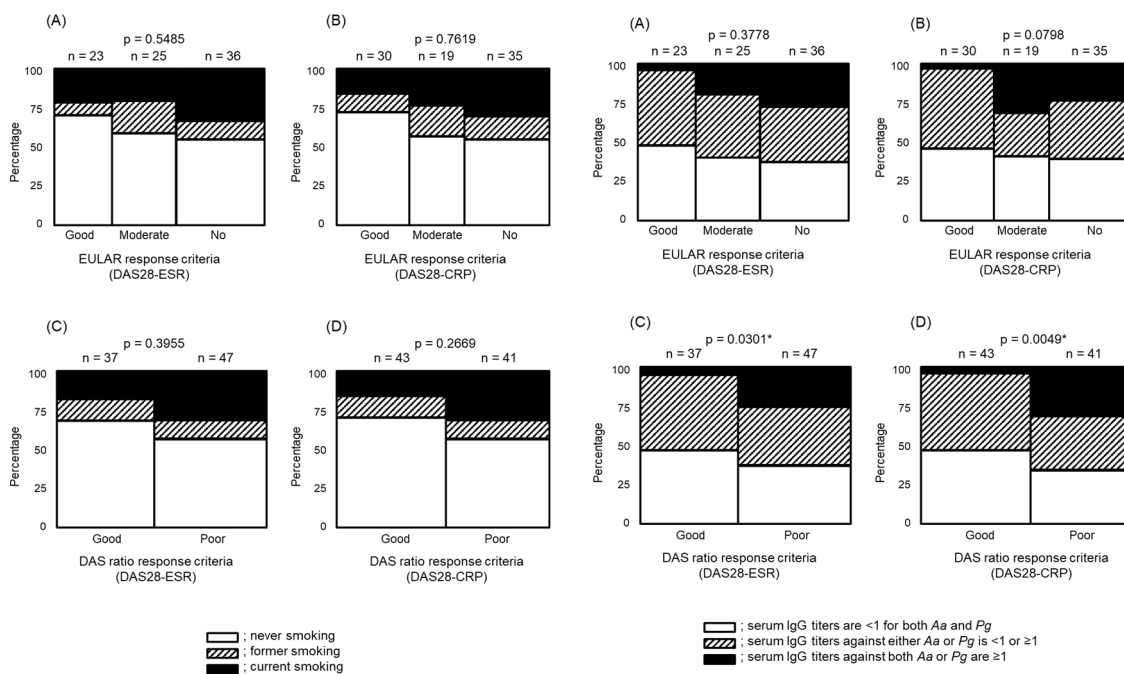


図1. 治療反応性と喫煙の関連

図2. 治療反応性と血清抗体価の関連

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi-Hatanaka K, Koyama Y, Okamoto K, Sakaida K, Yamamoto T, Takashiba S.	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Treatment resistance of rheumatoid arthritis relates to infection of periodontal pathogenic bacteria: a case-control cross-sectional study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 12353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16279-z.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 釜田 英幸, 畑中 加珠, 小山 芳伸, 山本 直史, 高柴 正悟
2. 発表標題 関節リウマチ患者の治療反応性に対する歯周病感染の影響と新たな医科歯科連携の提案
3. 学会等名 第29回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	大森 一弘 (Omori Kazuhiro) (20549860)	岡山大学・医歯薬学域・准教授  (15301)	
研究分担者	高柴 正悟 (Takashiba Shogo) (50226768)	岡山大学・医歯薬学域・教授  (15301)	

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
---------	---------