

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09980

研究課題名（和文）難治性根尖性歯周炎におけるEpstein-Barrウイルスのサイトカイン誘導能

研究課題名（英文）Cytokine induction by Epstein-Barr virus in persistent apical periodontitis

研究代表者

武市 収（TAKEICHI, Osamu）

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：10277460

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）：歯根肉芽腫31例と健常歯肉組織10例を検索した結果、歯根肉芽腫からBZLF-1遺伝子とZEBRAタンパクの発現を確認した。また、Fusobacterium nucreatumおよびEpstein-Barrウイルス（EBV）も検出されたが、健常歯肉からは検出されなかった。F. nucreatumによりBZLF-1ルシフェラーゼ活性が上昇した。Daudi細胞にF. nucreatumを用いて培養したところ、BZLF-1遺伝子およびZEBRAタンパクの発現が認められた。以上の結果から、根尖病変に感染したF. nucreatumは潜伏感染したEBVを再活性化し、炎症を誘導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

根尖性歯周炎は口腔内常在菌の感染によって惹起されると考えられおり、これまでウイルスとの関連性に関する研究はほとんど行われていない。本研究では、ヒトヘルペスウイルスであるEpstein-Barrウイルスが難治性根尖性歯周炎に潜伏感染しており、Fusobacterium nucreatumの関与により再活性化することで、根尖病変を惹起する可能性を示唆した。ウイルスが根尖性歯周炎に果たす役割を明らかにしたことによって、今後難治性根尖性歯周炎に対する治療法を見出すことが可能となり、学術的意義がある。これによって、抜歯が適応とされる難治性根尖性歯周炎であっても、歯の保存治療を可能とし、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Periapical granulomas and healthy gingival tissues were analyzed in this study. By polymerase chain reaction and immunohistochemical analyses, BZLF-1 mRNA and ZEBRA protein were detected from periapical granulomas, respectively, but not from healthy tissues. Fusobacterium nucreatum and Epstein-Barr virus (EBV) were also detected from periapical granulomas, but not from healthy tissues. F. nucreatum produced butyric acid, and increased Luciferase activity for BZLF-1. Daudi cells incubated with the culture medium of F. nucreatum induced BZLF-1 mRNA and ZEBRA protein expressions. These results demonstrated that EBV in periapical granulomas stays in latency after infection. F. nucreatum reactivates latent infections of EBV and could induce periapical inflammation.

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 Epstein-Barrウイルス Fusobacterium nucreatum ルシフェラーゼ アッセイ BZLF-1 ZEBRA 再活性化

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。

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 (HHV) は 9 型までタイプがあり、その中でも HHV-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の根管から優位に検出される 4 菌種 (*Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*) 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：得られた試料を分割し、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。他方は凍結包埋し、DNA および RNA の抽出を行った。
- (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 4 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 66 名から根尖病巣組織を、また埋伏智歯抜去患者 10 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 66 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。なお、残りの 16 例には重層扁平上皮と肉芽組織中にコレステリン空隙を認め、歯根嚢胞を診断し、本研究からは除外した。また、健常歯肉組織 10 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/ μ g 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)。

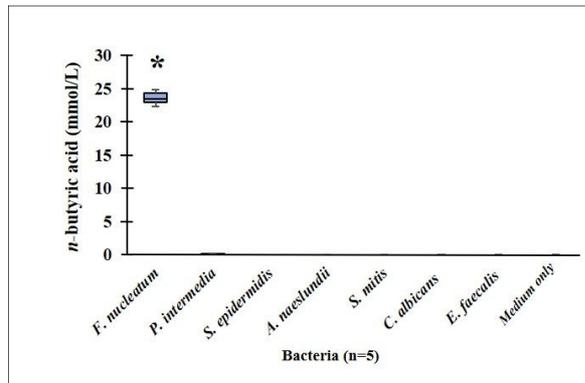


図1：難治性根尖性歯周炎関連細菌による酪酸産生量 (* : $P < 0.05$)

(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)。

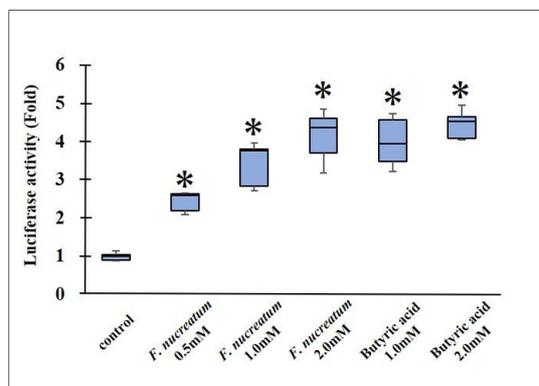


図2：*F. nucleatum* による BZLF-1 ルシフェラーゼ活性の推移 (* : $P < 0.05$)

(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)。

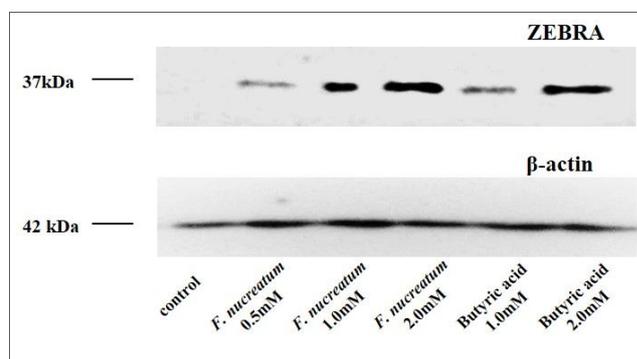


図3：*F. nucleatum* による Daudi 細胞の ZEBRA タンパク発現誘導能

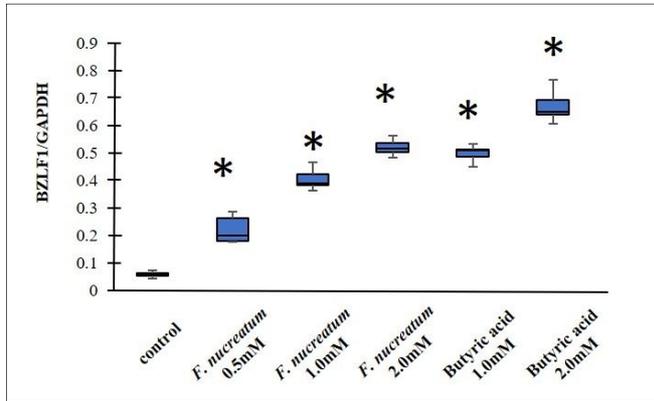


図4 : *F. nucleatum* による Daudi 細胞の BZLF-1 遺伝子発現誘導能 (* : $P < 0.05$)

< 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.

Makino K, Takeichi O, Imai K, Inoue H, Hatori K, Himi K, Saito I, Ochiai K, Ogiso, *Porphyromonas endodontalis* reactivates latent Epstein-Barr virus. *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 1件）

1. 著者名 武市 収, 牧野公亮, 氷見一馬, 宮田泰伎	4. 巻 44
2. 論文標題 根尖性歯周炎におけるヒトヘルペスウイルス感染の関与	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
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 Yokoe Sho, Hasuie Akira, Watanabe Norihisa, Tanaka Hideki, Karahashi Hiroyuki, Wakuda Shin, Takeichi Osamu, Kawato Takayuki, Takai Hideki, Ogata Yorimasa, Sato Shuichi, Imai Kenichi	4. 巻 23
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 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 809 ~ 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 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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武市 収
2. 発表標題 ヘルペスウイルスによる根尖性歯周炎発症とマイクロエンド
3. 学会等名 第18回日本顕微鏡歯科学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田泰伎, 田村隆仁, 羽鳥啓介, 清水康平, 林 誠, 武市 収
2. 発表標題 難治性根尖性歯周炎における再活性化Epstein-Barrウイルスの影響
3. 学会等名 第156回日本歯科保存学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水見一馬, 武市 収, 羽鳥啓介, 岡田將司, 田村隆仁, 今井健一
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatumにより再活性化されたEpstein-Barr virusはinterferon- の発現を誘導する
3. 学会等名 第152回春季日本歯科保存学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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