

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18537

研究課題名（和文）歯周病原細菌特異的CAR導入Treg細胞を用いた関節リウマチ抑制効果の検討

研究課題名（英文）Suppression of rheumatoid arthritis using specific CAR-transfected Treg cells for periodontopathogenic bacteria.

研究代表者

濱本 結太（HAMAMOTO, Yuta）

広島大学・病院（歯）・助教

研究者番号：00848476

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯周炎は口腔内の細菌による感染症である。これまでの研究から歯周病原細菌*P. gingivalis*がその原因菌の一つとして同定された。また、*P. gingivalis*感染が、糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病、関節リウマチ、慢性腎疾患、早産・低体重児出産と関連があることが報告されている。本研究では特異的な免疫抑制システムの確立を目指し、抗原認識部位を用いたCAR-T細胞作製のための準備として、*P. gingivalis*の主要な病原因子ジンジパインとこれに対する抗体を作製し、免疫複合体の歯周炎と関節リウマチ病態への影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節リウマチはシトルリン化タンパク（Cp）に対する自己抗体（ACPA）に関連した自己免疫疾患である。近年では関節リウマチ発症の数年前からACPAが上昇していることが報告され、ACPA産生の足場となる環境因子の存在が示唆されている。またこの環境因子としてこれまで、喫煙や歯周炎が報告されている。本研究により歯周炎、特に*P. gingivalis*が有する病原因子が、局所炎症だけでなく全身に影響していることが明らかになり、そのメカニズムとして抗体の重要性が明らかになった。その抗体を利用した特異的な免疫抑制システムの確立へ今後つながる重要な研究である。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis is an infectious disease caused by periodontopathogenic-bacteria in the oral cavity. *P. gingivalis* was identified as one of the causative bacteria of periodontitis. It has been reported that *P. gingivalis* infection is associated with diabetes, arteriosclerosis, Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, chronic kidney disease, pre-birth and low birth weight babies. In this study, we aimed to establish a specific immunosuppressive system, and in preparation for creating CAR-T cells using antigen recognition sites. We also established gingipain-induced periodontitis model and showed the effects of immunocomplex on periodontitis and rheumatoid arthritis pathology.

研究分野：歯周治療学

キーワード：ジンジパイン *Porphyromonas gingivalis* 免疫複合体 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は口腔内の細菌による感染症である。また、歯周組織において細菌により微小構造が破壊され、炎症を伴うことで局所の血管が拡張し、細菌が血液に侵入する状態『バクテレミア (菌血症)』を呈する (Support Care Cancer. 2013)。これまでの研究から歯周病原細菌 *P. gingivalis* がその原因菌の 1 つとして同定された。また、*P. gingivalis* 感染が、糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病、関節リウマチ、慢性腎疾患、早産・低体重児出産と関連があることが報告されている (Exp Mol Pathol. 2016, J Int Oral Health. 2015, Curr Oral Health Rep. 2015)。*P. gingivalis* が歯周炎だけではなく様々な疾患との関連に着目されたのは、*P. gingivalis* が有する様々な病原因子 (線毛 Fim、タンパク質分解酵素 gingipain) を有する結果、過剰な免疫応答を惹起し、バクテレミアを引き起こすことで全身へ様々な影響をきたすためである。その影響として、*P. gingivalis* 感染を伴う歯周炎患者の血清中抗 Pg 抗体価は強く上昇が認められる (J Dent Res. 2012 Dec;91(12):1190-5.)。したがって *P. gingivalis* 感染を伴う全身疾患は *P. gingivalis* 血清抗体価の上昇と強く相関を示す。これまでに申請者のグループは関節リウマチ (RA) が *P. gingivalis* 感染と強く相関するという疫学研究の結果をもとに、その分子メカニズムを明らかにしてきた。しかし、実際の歯周炎治療、RA 治療は、原因である細菌の除去、炎症性物質の抑制を主眼においており、免疫応答の細胞レベルでの抑制に着目した治療法の確立はなされていない。本研究課題では、これまでの申請者グループの知見をもとに、*P. gingivalis* 感染で活性化した免疫応答を抑制することで歯周炎だけでなく、*P. gingivalis* 感染に起因する全身疾患の治療を目的として、キメラ抗原受容体 (CAR) を導入した Treg (CAR-Treg) の作製、動物実験での抑制効果の検討を行う。この技術は近年がん免疫療法薬 (キムリア) によるオーダーメイド治療として有効性が広がると考えられる。

P. gingivalis 感染が免疫応答を異常に活性化した結果、RA の病態を悪化させるが、RA の治療 (対策) としては Pg 感染が病態に影響することから、歯周炎治療と、関節炎の悪化に対する抗炎症薬、免疫調整薬、生物学的製剤 (抗体製剤) のような対症療法が主である。しかし、これまでの結果から、RA 患者の炎症程度と *P. gingivalis* 血清抗体価の上昇の相関認められたことから、*P. gingivalis* に対する免疫応答、特に T cell 応答が RA 増悪に影響していると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*P. gingivalis* 観戦における免疫応答を直接抑制できるシステムの構築するための抗体の役割を明らかにすることである。これを学術的「問い」とし、in vitro および in vivo 実験でそのメカニズム解明を行う。具体的には、ジンジパインとそれに対する抗体に着目する。これは、*P. gingivalis* の産生する主要なプロテアーゼであり、ペプチド切断部位特異性の異なる Arg-gingipain (Rgp) と Lys-gingipain (Kgp) が存在する。両酵素はタンパク質の分解を引き起こすことで、宿主細胞に傷害を与え、歯周炎に関連する種々の病態を生み出す (Front Oral Health. 2022 Feb 8;3:845002.)。例えば、ジンジパインは歯肉線維芽細胞や血管内皮細胞の接着性を消失させる細胞死誘導に関与し、特異的阻害薬や遺伝子欠損によって抑制できる (Biol Chem. 2018 Nov 27;399(12):1353-1361.)。また、ジンジパインは単量体として菌体細胞外に分泌されるだけでなく、血球凝集素やヘモグロビン結合タンパク質、LPS、リン脂質と結合した高分子複合体としても存在する。この膜結合型ジンジパイン複合体は単量体より強力な細胞傷害活性を示す。更に、骨破壊に関しては TRAF6 を活性化することで破骨細胞分化に影響する (J Mol Histol. 2020 Apr;51(2):147-159.)。以上からジンジパインは直接的に歯周組織の炎症、破壊に関与している。このような病原性の高い細菌因子に対して、宿主は特異的 IgG 産生を含めた獲得免疫で防御にあたっている。しかし、防御的に働く IgG と抗原が免疫複合体を形成することで、病原因子として働くこともわかっている (Nat Commun. 2015 Mar 31;6:6637.)。本研究では、病原性に高いジンジパインに対する抗体を作製し、ジンジパインとの免疫複合体の歯周組織破壊への影響を、in vitro および in vivo で検討する。病原性の高い抗体の抗原認識部位を用いてキメラ抗原受容体発現制御性 T 細胞 (CAR-Treg 細胞) を作製し、病気の発症初期相を標的とした従来にない全く新しいタイプの革新的治療法を開発する。

また、免疫複合体の病原性についても解析予定だが、破骨前駆細胞の Fc R に免疫複合体が結合することで、破骨細胞形成が促進されることが報告されている (Nat Commun. 2015 Mar 31;6:6637.)。私どもの予備実験で、歯周炎に罹患している患者血清を用いたジンジパインに対する抗体価測定により、歯周ポケット炎症面積 PISA とジンジパインに対する IgG 抗体価には相関関係があるという可能性がある。このことから、ジンジパインは歯周組織内で免疫複合体を形成していることが考えられ、破骨細胞形成に影響しており、歯槽骨破壊を含めた歯周炎のさらなる病態解明に有用ではないかという学術的な問いを設定した。

3. 研究の方法

1) 歯周炎患者、関節リウマチ患者血清中における *P. gingivalis*、ジンジパインに対する抗体価の測定

広島大学病院歯周診療科受診した歯周炎患者、またはリウマチ・膠原病科受診した関節リウマチ患者の血清を採取する(広島大学倫理委員会で承認)。血清中の *P. gingivalis* 全菌体またはリコンビナントジンジパインに対する血清抗体価を ELISA 法で評価する。

2) ジンジパインに対する抗体の作製

C57BL/6 マウスの腹腔内にリコンビナントジンジパイン(RGP)または *P. gingivalis* を1週間毎、3回接種後のマウス血清を採取する。血清中のポリクローナル IgG をプロテイン A カラムを用いて精製する。またマウス脾臓から B 細胞を単離し、抗体産生細胞から ISAAC 法で mRNA 単離、ベクター組み込み、昆虫細胞でのモノクローナル抗体作成を行う。

3) ジンジパイン抗体存在下のマウス歯周炎モデルマウスでの歯周組織破壊の程度の検討

C57BL/6 マウスの腹腔内に RGP を投与し、2週間後から3日毎に *P. gingivalis*(108 CFU/50 μ l 1%カルボキシセルロース溶液に懸濁)を塗布する。6週間後に上顎臼歯部歯槽骨と血清を採取し、歯槽骨吸収レベルの評価と各種炎症性サイトカインの測定を LEGENDplex(BioLegend)で行う。

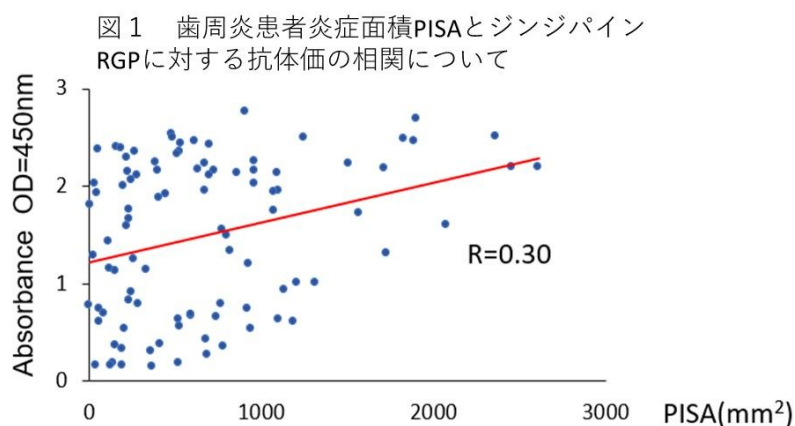
4) ジンジパイン欠失株でマウス歯周炎モデルマウスでの歯周組織破壊の程度の検討

ジンジパイン欠失株を用いて3)と同様の実験を行い、6週間後に評価を行う。また、C57BL/6 マウスの腹腔内に RGP 投与の代わりに、2)で作製した抗体を、実験開始日、3週間後に腹腔内投与し、同様に評価する。

5) RGP と抗体による免疫複合体の単球系細胞における炎症性サイトカイン酸性と破骨細胞分化への影響

4. 研究成果

1) 歯周炎患者血清中の *P. gingivalis* に対する血清抗体価とリコンビナント RGP に対する血清抗体価を ELISA 法で測定し、歯周炎の炎症面積総和 PISA との相関を検討した。PISA と *P. gingivalis* に対する血清抗体価とリコンビナント RGP に対する血清抗体価はそれぞれ相関を認めしたが、RGP に対する血清抗体価の方がより相関係数が高かった(図1)。



2) これまでに報告されている *P. gingivalis* 口腔内感染によるマウス歯周炎モデルと比較し、あらかじめ RGP に対する抗体が作られる RGP リコンビナント腹腔投与後の *P. gingivalis* 口腔内感染マウスモデルの方が、歯槽骨欠損が重度であった。また、血清中、歯周組織中 IL-6 量を ELISA 法測定したところ後者のほうが上昇していた。

3) ジンジパイン欠損 *P. gingivalis* 株で同様の実験を行ったところ、欠失株感染株ではあらかじめ RGP 免疫・抗 RGP 抗体を有している場合も歯槽骨吸収は更新しなかった。また、抗 RGP 抗体の腹腔内投与でも RGP 欠損 *P. gingivalis* 感染では歯槽骨吸収が亢進しなかった。

4) 抗 RGP 抗体と RGP で形成される免疫複合体を作製し、マウス単球系細胞に添加したところ、炎症性サイトカイン IL-6 の産生が上昇した。この上昇は RGP 単独による刺激よりも高かった。また、免疫複合体存在下で骨髓由来単球系細胞えお SRANKL と M-CSF で培養した場合は、免疫複合体非存在下よりも破骨細胞への分化が亢進した。

5) これまでの研究はマウスポリクローナル抗体で行っており、モノクローナル抗体の作成を試みたが、感度の良い抗体が得られていない。また、モノクローナル抗体では抗原結合部位が1箇所のため、免疫複合体の分子量が大きくなり、細胞に対する刺激が弱く、解析が進んでいない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 0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 Hamamoto Yuta, Ouhara Kazuhisa, Munenaga Syuichi, Shoji Mikio, Ozawa Tatsuhiko, Hisatsune Jyunzo, Kado Isamu, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Kawai Toshihisa, Mizuno Noriyoshi, Fujita Tsuyoshi, Hirata Shintaro, Tanimoto Kotaro, Nakayama Koji, Kishi Hiroyuki, Sugiyama Eiji, Kurihara Hidemi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Porphyromonas gingivalis infection on gut dysbiosis and resultant arthritis exacerbation in mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	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) 10.1186/s13075-020-02348-z	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 -

1. 著者名 Miyuchi Shunsuke, Tokuyama Takehito, Shintani Tomoaki, Nishi Hiromi, Hamamoto Yuta, Ouhara Kazuhisa, Furusho Hisako, Miyuchi Mutsumi, Komatsuzawa Hitoshi, Nakano Yukiko	4. 巻 32
2. 論文標題 Periodontitis and the outcome of atrial fibrillation ablation: <i>Porphyromonas gingivalis</i> is related to atrial fibrillation recurrence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Electrophysiology	6. 最初と最後の頁 1240 ~ 1250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jce.14952	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 -

1. 著者名 Hamamoto Yuta, Ouhara Kazuhisa, Miyagawa Tsuyoshi, Shintani Tomoaki, Komatsu Nao, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Fujita Tsuyoshi, Sasaki Shinya, Iwata Tomoyuki, Ohno Haruya, Yoneda Masayasu, Mizuno Noriyoshi, Kurihara Hidemi	4. 巻 17
2. 論文標題 Masticatory dysfunction in patients with diabetic neuropathy: A cross-sectional study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0269594	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 -

1. 著者名 Taniguchi Yuri, Ouhara Kazuhisa, Kitagawa Masae, Akutagawa Keiichi, Kawada-Matsuo Miki, Tamura Tetsuya, Zhai Ruoqi, Hamamoto Yuta, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Maruyama Hirofumi, Komatsuzawa Hitoshi, Shiba Hideki, Mizuno Noriyoshi	4. 巻 210
2. 論文標題 Periapical lesion following Cnm-positive<i>Streptococcus mutans</i>pulp infection worsens cerebral hemorrhage onset in an SHRSP rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Immunology	6. 最初と最後の頁 321 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cei/uxac094	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀨本結太
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis感染による腸内細菌叢の変化が関節リウマチ増悪に与える影響
3. 学会等名 第63回秋季日本歯周病学会学術大会 Sunstar Young Investigator Award口演
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		
米国	Nova Southeastern University		