

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16970

研究課題名（和文）HuRとRANKL陽性Th17細胞に着目した歯周病と多発性硬化症の関連機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the multiple sclerosis mechanism via periodontal tissue-induced HuR and RANKL-expressing Th17 cells

研究代表者

宗永 修一（Munenaga, Syuichi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・専門研究員

研究者番号：20825327

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、歯周炎と全身疾患のかかわりが数多く報告されている。本研究では、歯周炎と多発性硬化症（MS）の関係を明らかにすることを目的とした。MSモデルマウスに歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*（Pg）を口腔投与することで、MSの症状の増悪および炎症性マーカーの上昇を認めた。Pg感染がMS増悪に関与する機序を免疫細胞などに焦点をあてて検討したが、分子メカニズムの解明には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は40歳以上の約8割が罹患している疾患である。MSの推定患者数は全世界で約250万人におよぶ難病であり、本邦でのMS患者数は近年増加している。また、根治療法は存在しない。歯周炎とMSの関係を分子レベルで解明することは、歯科医療が口腔のみならず全身の健康に寄与していることを示す上で重要である。本研究で歯周炎がMSの症状増悪に関与する可能性が示唆されたが、分子メカニズムの解明には至らなかった。2つの疾患を結びつける因子が解明されれば、両疾患における新しい治療方法や創薬開発につながる可能性も見込まれるため、今後の研究が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Periodontal disease (PD) is a chronic inflammation caused by the interaction of host immune response and periodontopathogenic bacteria, such as *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Recently, this interaction has been reported to be associated with various systemic diseases. This study aimed to clarify the relationship between periodontitis and multiple sclerosis (MS). Oral administration of the periodontal pathogen Pg to MS model mice resulted in exacerbation of MS symptoms and an increase in inflammatory markers. We focused on immune cells to elucidate the mechanism by which Pg infection is involved in MS exacerbation. However, the molecular mechanism could not be elucidated.

研究分野：歯周炎

キーワード：歯周炎 *Porphyromonas gingivalis* 多発性硬化症 抗MOG抗体関連疾患

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、歯周病原細菌の侵襲によって宿主免疫応答が起こることで宿主-細菌相互作用が成立し、歯周組織が破壊される感染症である。多発性硬化症（MS）は中枢神経系にリンパ球浸潤、抗体沈着、補体活性化などを伴う脱髄巣が多発し、多様な神経症状を呈する自己免疫性の中枢性炎症性脱髄疾患である。MSの根本的な原因は未だ不明であるが、様々な環境因子と遺伝因子が関与する多因子疾患である。疫学研究から、MS患者は歯周病リスクが高いことが報告されている。MSおよび歯周炎はともに中年以降に発症する慢性炎症疾患である。共通の炎症性サイトカインやケモカイン、免疫系細胞が関与していることが知られている。そのため、両疾患は双方向性に関与している可能性が高い。しかし、その詳細な機序は明らかではない。そこで申請者は、その分子機序解明のために mRNA 結合タンパク質である HuR、および RANKL 陽性 Th17 細胞に着目した。

1) HuR による IL-6 mRNA 制御が MS に影響しているのか

MSの病態形成においてT細胞を中心とする自己免疫機序が強く関与している。T細胞の中でも、IL-17産生性ヘルパーT細胞サブセットであるTh17細胞の関与が大きく、そのTh17細胞への分化にはIL-6が必須である。IL-6は歯周組織構成細胞や中枢神経に存在するアストロサイトから産生され、MSおよび歯周病に炎症に関与する重要なサイトカインである。*in vitro*の実験系で、mRNAとタンパク量には相関が認められないことが多く、その原因の一つにmRNAの安定化の関与が示唆されている。HuRはmRNAの安定化に関与し、標的タンパク質の発現増加に関与することが報告されている。しかし、HuRを介したmRNAの安定化が*in vivo*で実際に引き起こされているのか、またその影響については不明な点が多い。mRNAの安定化、分解に関与するタンパク質ターゲットにした治療薬は今後新規治療として有効な手段となりうる。そこで第一の目的として、Pg感染により歯周組織に増加したHuRがIL-6 mRNAを長期間安定化させることでIL-6産生量が増加し、Th17細胞への分化を促すことでMS増悪に関与するかを検討する。

2) MS でみられる RANKL 陽性 Th17 細胞が歯周炎に影響しているのか

RANKL は骨芽細胞、活性化 T 細胞で発現する TNF ファミリーに属するサイトカインであり、破骨細胞の分化および活性化を行う。T 細胞の中でも Th17 細胞が特に RANKL を発現することが報告されている。また、MS のモデルマウスにおいて、RANKL は中枢神経組織のアストロサイトに作用することでケモカイン CCL20 の発現を誘導させ、炎症性細胞の浸潤を促す。さらに、中枢神経系に浸潤する RANKL 陽性 Th17 細胞自身も TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカインを産生し炎症を惹起する。これらのことから、MS の病態において RANKL 陽性 Th17 細胞が重要な役割を果たすと考えられている。実際、MS 患者において末梢血や髄液において IL-17 産生細胞の増加が報告されている。歯周炎において、歯槽骨破壊を引き起こす破骨細胞の分化および活性化には RANKL が必須である。破骨細胞は TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインにより分化が促進されることも報告されている。つまり、MS の病態に強く関与している

RANKL 陽性 Th17 細胞が歯周組織に浸潤すると、Th17 細胞自身が産生する炎症性サイトカインだけでなく、RANKL を介したケモカインの産生並びに破骨細胞の活性化により歯周炎の進行に関与している可能性がある。そこで、第二の目的として MS の病態に関与している RANKL 陽性 Th17 細胞が歯周炎増悪に関与しているかを検討する。

2.研究の目的

本研究の目的は、

Pg感染により歯周組織に増加したHuRがMSモデルマウスの病態増悪に関与するか

MSにより誘導されるRANKL陽性Th17細胞が歯周炎の増悪に関与するか

を明らかにすることである。

本研究課題で得られる知見から、HuRを含めたmRNA結合タンパク質群およびRANKL陽性Th17細胞が治療の新たな分子標的となり、今後の新規分子標的薬の開発に寄与できる。さらに歯周炎およびMSが互いに及ぼす影響が明らかになることで医歯連携も促進できる。

3.研究の方法

すでに確立しているPg口腔投与MSモデルマウスを使用する。具体的にはC57BL/6マウス(日本クレア)の9~11週齢の雌に、MOG35-55/CFA Emulsion (Hook Kit) を皮下投与する。それに加えて、実験開始日とその翌日に百日咳毒素 (PTX) を腹腔内投与することでMS症状を誘導する。Pg口腔投与群として2%carboxymethyl cellulose (CMC)含有PBS 50 μ l中にPg W83 を 10^8 CFUを懸濁後、綿球に含ませ3日おきに口腔内に留置する。28日後に屠殺し解析を行う。このPg口腔投与MSモデルマウスを用いて以下の実験を行う。

実験 Pg感染により生じたHuRがMSに及ぼす影響の解析

Pg口腔投与MSモデルマウスの歯周組織でのHuR増加をタンパク質レベルで確認する。その後、炎症性サイトカインであるIL-6産生量をELISAで評価する。また、MS症状をclinical scoreで評価する。

実験 Pg感染がMSモデルマウスにおけるT細胞分画および性質に与える影響の解析

Pg非投与MSモデルマウスおよびPg口腔投与MSモデルマウスの脳、脊髄、リンパ節ならびに脾臓から各々CD4陽性T細胞を分離する。各群におけるRANKL陽性Th17細胞の割合をFACSにて解析する。

4.研究成果

本研究から以下の結果を得た。

- 1) 実験開始28日後に屠殺し解析を行うと、Pg投与群はPg非投与群と比較し、MS症状を示すClinical scoreが有意に高値を示した。また、Pg投与群では歯周組織でのHuRの産生量、お

よび血清中のIL-6産生量がPg非投与群と比較し有意に増加していた。

2) リンパ節や脾臓におけるT細胞分画、特にRANKL陽性Th17細胞について検討するために、Pg投与群と非投与群の2群から採取し比較検討したが、解析した範囲では有意な差は認められなかった。

5 臨床例および追加実験

臨床例として、MS類似疾患である抗MOG抗体関連疾患患者において複数歯に歯根吸収を認める症例を経験したため、ケースレポートとして報告した。抗MOG抗体関連疾患とMSの臨床像は少し異なるが、ともに自己免疫性の中枢性炎症性脱髄疾患であり、病態や免疫異常の背景に多くの共通点がある。MSや抗MOG抗体関連疾患などの中枢性炎症性脱髄疾患は歯や歯槽骨などの硬組織代謝に影響を及ぼす可能性がある仮説を立てて以下の実験を追加で行った。

- 1) 作成したPg口腔投与MSモデルマウスや絹糸結紮MSモデルマウスを使用して、屠殺後の上顎骨を採取し、異常歯根吸収などが生じるか検討を行った。しかし、MSモデルマウスに明らかな根吸収を起こす結果は得られなかった。
- 2) Pg投与によりMS症状が増悪したマウスの血清は、MS症状が増悪しなかったマウスやPg非投与群の血清よりも破骨細胞分化を促進させる結果を得た。Pg投与によりMS症状が増悪したマウスの血清はその他の群の血清より補体因子C5a産生量が増加していた。

以上のことからPg感染はMSの病状増悪に関与すること、その増悪にIL-6産生量の増加が関与していることが示唆された。またMSの病態が増悪することで増加した補体因子C5aが歯周炎の病態である骨吸収に関与する破骨細胞分化を促進し、病態を悪化させる可能性も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tamura Tetsuya, Zhai Ruoqi, Takemura Tasuku, Ouhara Kazuhisa, Taniguchi Yuri, Hamamoto Yuta, Fujimori Ryouyuke, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Munenaga Syuichi, Fujita Tsuyoshi, Mizuno Noriyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Anti-Inflammatory Effects of Geniposidic Acid on Porphyromonas gingivalis-Induced Periodontitis in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 3096 ~ 3096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10123096	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 該当する

1. 著者名 Nishi Hiromi, Ohta Kouji, Kuramoto Yuri, Shigeishi Hideo, Obayashi Taiji, Yoshioka Yukio, Konishi Masaru, Munenaga Shuichi, Nagoshi Hisao, Yoshida Tetsumi, Fukushima Noriyasu, Kakimoto Naoya, Ohge Hiroki, Kurihara Hidemi, Ichinohe Tatsuo, Kawaguchi Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Periodontal inflamed surface area in oral cavity associated with febrile neutropenia in patients with hematologic malignancy undergoing chemotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2483 ~ 2483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06485-0	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 該当する

1. 著者名 Munenaga Syuichi, Usuda Momoko, Ouhara Kazuhisa, Maetani Yuta, Kajiya Mikihiro, Matsuda Shinji, Furusho Hisako, Miyauchi Mutsumi, Nakamori Masahiro, Maruyama Hirofumi, Nishi Hiromi, Kawaguchi Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 External cervical resorption detected via cone beam computed tomography in a patient with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.4415	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------