

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659922

研究課題名(和文) 歯周炎病因論に基づくサイトカイン標的療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the cytokine targeted therapy based on the pathogenesis of periodontitis

研究代表者

吉江 弘正 (Yoshie, Hiromasa)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：20143787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、全身で高い腫瘍壊死因子(TNF)およびインターロイキン6(IL-6)レベルの関節リウマチ(RA)を伴う歯周炎患者を対象にTNF阻害薬およびIL-6受容体(IL-6R)阻害薬の投与前後で歯周状態を評価することである。解析の結果、いずれのサイトカイン標的療法でも歯周組織の炎症・破壊レベルの低下ならびに血清中のTNF- α ・IL-6濃度および急性期蛋白の発現低下をもたらした。以上の結果から、TNF・IL-6R標的療法は歯周状態の臨床的改善をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to evaluate periodontal condition before and after medication with inhibitors of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 receptor (IL-6R) in patients with rheumatoid arthritis (RA) and periodontitis who exhibits increased serum levels of TNF and IL-6. The results indicated that patients with RA and periodontitis showed a decreased level of periodontal inflammation and destruction as well as a decrease in serum expressions of TNF, IL-6, and acute-phase proteins following TNF and IL-6R targeted therapies. These results suggest that TNF and IL-6R targeted therapies may lead to a clinical improvement of periodontal condition in patients with RA and periodontitis.

研究分野：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎 サイトカイン 標的療法 リウマチ

1. 研究開始当初の背景

歯周炎と関節リウマチ(RA)は炎症性疾患であり、病態が類似していることが知られている。これらの2疾患の関連性についてや、共通病因としてのサイトカインについては国内外で数多くの報告が成されている。これまで本研究代表者らのグループは、RA患者および歯周炎患者において代表的な炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子- α (TNF- α)やインターロイキン-6(IL-6)の血清中の濃度が健常者と比べて増加していることを報告した(Kobayashi et al. J Periodontol 2010)。近年、特異抗体を用いてTNF- α やIL-6受容体を標的することによりサイトカインを阻害するサイトカイン標的治療がRA治療向けに開発・導入されて、その有効性について国内外で数多く報告が成されている。しかしながら、サイトカイン標的治療がRA患者の歯周病や歯周状態に及ぼす影響については未だ国外の3報告のみで、その効果については論争的な状態であり、機能的な検証も成されていない。これに関連して本研究グループは、RA患者のTNF- α やIL-6の血清濃度は歯周組織の炎症状態と正の相関を示すことを明らかにした(Kobayashi et al. J Periodontol 2010)。したがって、全身(血清)および局所(歯周組織)においてTNF- α ・IL-6の高い発現を示すRA患者では、サイトカイン標的治療を行うことで歯周状態が改善する可能性が考えられ、歯周炎とRAの共通発症機序を解明するには、サイトカイン標的治療効果の検証が必要不可欠であることが強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、全身・歯周局所において高いTNF- α ・IL-6の発現レベルを示すRAを伴う歯周炎患者を対象に、TNF- α 標的療法ならびにIL-6受容体標的療法を行い、その前後における歯周組織の炎症・破壊レベルの変動を臨床的に評価すること、さらに、全身・歯周局所のTNF・IL-6コンポーネントと臨床評価結果との関連性を解明することである。

3. 研究の方法

(1)インフォームドコンセントが得られTNF- α 標的療法を予定していたRA患者20名を対象に、RA・歯周状態に係る臨床検査を実施して、末梢静脈血を採取した。すべての血液検体、臨床検査結果、および血液検査結果は個人情報保護の観点から匿名・記号化した。

まず、サイトカイン標的治療としてTNF- α を特異的に阻害するヒト化特異抗体アダリムマブ(ADA)を投与前後の歯周組織の炎症・破壊状態ならびにリウマチ活動度(DAS28)を比較・検討した。次いで、末梢静脈血より血清を遠心抽出後、

抗環状シトルリン化ペプチド抗体、リウマトイド因子、C反応性蛋白(CRP)、TNF- α 、IL-6の血清濃度を各々ELISA法にて定量した。さらに、血清タンパクを溶解処理、タンパク濃度を測定後、二次元電気泳動ゲル上でタンパクスポット発現を画像解析ソフトにて定量・比較した。サイトカイン標的治療前後で統計学的に有意な発現差が認められるタンパクスポットを選定後に、切り抜き、回収、トリプシン処理を行い、MS/MSイオンサーチ分析法による質量分析を実施後、NCBIデータベースを参照してコードタンパクを同定した。

(2)インフォームドコンセントが得られIL-6受容体標的療法を予定していたRA患者28名(実験群)ならびにサイトカイン標的治療を予定していない通常のRA治療患者27名(対照群)を対象に、RA・歯周状態に係る臨床検査を実施後、末梢静脈血を採取した。まず、IL-6受容体標的療法として、IL-6受容体に対するヒト化特異抗体トシリズマブ(TCZ)投与2ヶ月間での歯周組織の炎症・破壊状態ならびにDAS28を比較・検討した。次いで、末梢静脈血より血清を遠心抽出後、抗環状シトルリン化ペプチド抗体、リウマトイド因子、CRP、TNF- α 、IL-6、マトリックスメタロプロテアーゼ-3(MMP-3)、免疫グロブリンG(IgG)、4種の歯周病原菌(*A. actinomyces comitans*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*)に対するIgGの血清濃度も各々ELISA法にて定量した。

4. 研究成果

(1)歯周炎が認められるRA患者20名を対象に、TNF- α 標的療法としてADA投与前および投与3ヶ月後にRA・歯周状態を臨床的に評価・比較した。その結果、ADA投与後、DAS28や血清中のTNF- α ・IL-6の濃度は有意に低下し、RA活動度の改善および全身的炎症状態の軽減が示された。さらに、歯肉炎指数(Gingival Index)、プロービング時の出血(Bleeding on Probing)、歯周ポケット深さ(Probing Depth)においてもADA投与後に各々有意な低下が認められた。ADA投与前後において口腔衛生状態やRAに係る投薬状態が一定であったことから、これらの歯周組織の炎症状態の改善はADA投与が影響する可能性が示唆された(Kobayashi et al. J Periodontol 2014)。さらに、ADA投与前および投与3ヶ月後における血清蛋白の発現を二次元電気泳動ゲル上で解析・比較した結果、合計495スポットの蛋白が認められた。そのうち、5種の蛋白(serum amyloid A, complement component 4, complement factor H, phospholipase D, alpha-1-acid glycoprotein)の発現がADA投与後に有意に低下することが認められた。以上から、ADAはこれら5種の血清蛋白の発現を抑制することで、結果的に歯周組織の炎症状態を改善

させる可能性が示唆された。特に、serum amyloid A の発現増加は RA 合併症の1つであるアミロイドーシスと密接な関連があることから、ADA 投与によりアミロイドーシス予防効果が期待される (Kobayashi et al. J Periodontol 2014)。

(2) TCZ 投与を予定していた RA 患者 28 名(実験群) ならびに TCZ 投与を予定していない通常の RA 治療患者 27 名(対照群) を対象に、TCZ 投与 2 ヶ月間の歯周組織の炎症・破壊状態ならびに DAS28 を比較・検討した。その結果、実験群では対照群と比べて、2 ヶ月間の歯肉炎指数 (Gingival Index)、プローピング時の出血 (Bleeding on Probing)、歯周ポケット深さ (Probing Depth)、臨床的付着レベル (Clinical Attachment Level) の減少量が各々有意に大きいことが認められた。評価期間において口腔衛生状態や RA に係る投薬状態が一定であったことから、これらの歯周組織の炎症・破壊レベルの改善は TCZ 投与そのものが影響している可能性が示唆された (Kobayashi et al. J Periodontol 2014)。さらに、2 ヶ月間の血清 IL-6 および MMP-3 濃度の減少量においても、実験群では対照群と比べて有意に大きかった。以上の研究成果から、TCZ 投与により IL-6 産生経路の活性が抑制され、それに伴い、血清中の炎症性サイトカイン産生も抑制され、その結果、歯周組織の炎症・破壊レベルが改善した可能性が示唆された (Kobayashi et al. J Periodontol 2014)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Kobayashi T, Yoshie H. Host Responses in the Link between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis. *Current Oral Health Reports.* 2(1):1-8, 2015. DOI 10.1007/s40496-014-0039-2. 査読有り

Kobayashi T, Yokoyama T, Ito S, Kobayashi D, Yamagata A, Okada M, Oofusa K, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Periodontal and Serum Protein Profiles in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Tumor Necrosis Factor Inhibitor Adalimumab *J Periodontol.* 85(11):1480-1488, 2014. 査読有り

Kobayashi T, Okada M, Ito S, Kobayashi D, Shinhara A, Muramatsu T, Kobayashi T, Narita I, Nakazono K, Murasawa A, Yoshie H. Amino acid profiles in relation to chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. *Open Journal of Stomatology.* 4(2): 49-55, 2014. 査読有り

Yokoyama T, Kobayashi T, Ito S, Yamagata A, Ishida K, Okada M, Oofusa K, Murasawa A, Yoshie H. Comparative Analysis of Serum Proteins in Relation to Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis *J Periodontol.* 85(1):103-112, 2014. 査読有り

Kobayashi T, Okada M, Ito S, Kobayashi D, Ishida K, Kojima A, Narita I, Murasawa A, Yoshie H. Assessment of Interleukin-6 Receptor Inhibition Therapy on Periodontal Condition in Patients with Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis. *J Periodontol.* 85(1):57-67, 2014. 査読有り

Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Periodontal Treatment Decreases Levels of Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and Citrulline in Patients with Rheumatoid Arthritis and Periodontitis *J Periodontol.* 84(12):e74-e84, 2013. 査読有り

Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J Periodontol.* 83(7):917-925, 2012. 査読有り

[学会発表](計 18 件)

小林哲夫他. 腫瘍壊死因子抑制薬治療前後における歯周・血清蛋白プロファイル. 日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会 (第 141 回), 2014 年 10 月 31 日, 山形テルサ (山形県).

小島杏里, 小林哲夫, 吉江弘正他. 慢性歯周炎患者および関節リウマチ患者における TNF-alpha 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析. 第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2014 年 10 月 19 日, 神戸国際展示場 (兵庫県).

岡田 萌, 小林哲夫, 吉江弘正他. 関節リウマチ患者における生物学的製剤治療反応への *Porphyromonas gingivalis* 感染の影響. 第 57 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2014 年 10 月 19 日, 神戸国際展示場 (兵庫県).

小林哲夫他. TNF 抑制療法中の関節リウマチ患者における血漿アミノ酸と歯周状態. 第 57 回春季日本歯周病学会学術大会, 2014 年 5 月 23 日, 長良川国際会議場 (岐阜県).

小林哲夫他. TNF 阻害療法中の関節リウマチ患者のアミノ酸・歯周プロファイル. 第 58 回日本リウマチ学会学術集会, 2014

年4月25日、グランドプリンスホテル新高輪（東京都）
岡田 萌、小林哲夫、吉江弘正他。歯周治療による関節リウマチ活動度と血清シトルリン濃度の低下。第58回日本リウマチ学会学術集会，2014年4月25日，グランドプリンスホテル新高輪（東京都）
石田光平、小林哲夫、吉江弘正他。歯周炎罹患組織におけるIL-6遺伝子プロモーター領域のメチル化解析。日本歯科保存学会2013年度秋季学術大会（第139回），2013年10月18日，秋田県総合生活文化会館（秋田県）。
小島杏里、小林哲夫、吉江弘正他。慢性歯周炎患者におけるTNF-alpha遺伝子プロモーター領域のメチル化解析。第56回秋季日本歯周病学会学術大会，2013年9月22日，前橋市民文化会館（群馬県）。
Kobayashi T. et al. Effect of Interleukin-6 Receptor Inhibition Therapy on Periodontal Condition in Patients with Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. The 10th. Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, September 3, 2013. Nara.
Ishida K., Kobayashi T., Yoshie H. et al. Interleukin-6 Gene Promoter Methylation in Periodontal Tissues. The 10th. Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, September 3, 2013. Nara.
Okada M., Kobayashi T., Yoshie H. et al. Periodontal Treatment on Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and Citrulline levels and Rheumatoid Arthritis Condition. The 10th. Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, September 4, 2013. Nara.
Kojima A., Kobayashi T., Yoshie H. et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Promoter Methylation in Chronic Periodontitis The 10th. Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, September 4, 2013. Nara.
小林哲夫他。関節リウマチ患者におけるトシリズマブ治療の歯周状態への影響。日本歯科保存学会2013年度春季学術大会（第138回），2013年6月28日，福岡国際会議場（福岡県）。
小林哲夫他。IL-6受容体抑制治療中の関節リウマチ患者の歯周状態。第56回春季日本歯周病学会学術大会，2013年5月31日，タワーホール船堀（東京都）。
小林哲夫他。トシリズマブ（TCZ）療法中の関節リウマチ患者の歯周状態。第57回日本リウマチ学会総会・学術集会，2013年4月19日，京都国際会館（京都府）。
石田光平、小林哲夫、吉江弘正他。IL-6遺伝子プロモーター領域メチル化と慢性

歯周炎および関節リウマチ感受性との関連。日本歯科保存学会2012年度秋季学術大会（第137回），2012年11月22日，広島国際会議場（広島県広島市）。
Kobayashi T. et al Improvement of periodontal condition by anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis patients. EuroPerio 7. June 7, 2012. Vienna, Austria.
Okada M., Kobayashi T., Yoshie H. et al. Effects of periodontal therapy on the condition of rheumatoid arthritis. EuroPerio 7. June 7, 2012. Vienna, Austria.

〔図書〕（計1件）

小林哲夫、伊藤 聡、中園 清、村澤 章、吉江弘正、医薬ジャーナル社、関節リウマチ治療中における感染症のマネジメント - 関節リウマチ治療・ステップアップのために -、2014、111-117.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）
取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等
新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野
http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/obs/per/index_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉江 弘正 (YOSHIE HIROMASA)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：20143787

(2) 研究分担者

小林 哲夫 (KOBAYASHI TETSUO)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授
研究者番号：00215344