

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463130

研究課題名(和文) シトルリン化プロファイルによる歯周炎とリウマチの共通発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) A profiling of citrullination in relation to shared mechanisms in periodontitis and rheumatoid arthritis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、シトルリン化プロファイリングによって歯周炎と関節リウマチ(RA)の共通発症機序を検証することである。歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* のシトルリン化変換酵素(PPAD)に対する血清抗体反応は非RA患者と比べてRA患者群で亢進し、抗環状シトルリンペプチド(CCP)抗体発現と相関した。また、抗PPAD血清抗体反応が低いRA患者は、高いRA患者と比べて生物学的リウマチ薬(bDMARD)投与後のRA活動度や抗CCP抗体発現が改善した。以上から、抗PPAD血清抗体反応はシトルリン化やRAと関連し、RA患者のbDMARD反応性も制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to assess if the profiling of citrullination could play a role in the shared mechanisms involved in the pathogenesis of periodontitis and rheumatoid arthritis (RA). The results indicated that the serum antibody responses to peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* (PPAD) were increased in patients with RA as compared to those without RA, which was associated with the expressions of anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibodies. Additionally, the patients with low anti-PPAD titers showed a greater improvement in RA activities and anti-CCP titers after biological disease-modifying antirheumatic drug (bDMARD) therapy than the patients with high anti-PPAD titers. These results suggest the possibility that the anti-PPAD titers may be related to citrullination and RA, and also affect response to bDMARD in patients with RA.

研究分野：歯周病学、歯周治療学

キーワード：歯周炎 関節リウマチ シトルリン化 発症メカニズム

1. 研究開始当初の背景

全身的な自己免疫疾患の1つである関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) は、関節組織の炎症性破壊を呈するが、その発症機序は未だ不明確である。環状シトルリン化ペプチド (Cyclic Citrullinated Peptide: CCP) に対する自己抗体は RA 発症前に産生され、その血清濃度は RA 重症度と相関するため、現在では、抗 CCP 抗体は RA 特異的な診断指標とされている (Schellekens et al. 1998, van de Stadt et al. 2011)。翻訳後蛋白修飾の1つであるシトルリン化は、内在性のシトルリン化変換酵素 (Peptidylarginine Deiminase: PAD) により触媒され、5つの PAD isotype (PAD-1, -2, -3, -4, -6) のうち、PAD-4 が RA 発症と最も強い関連をもつことが報告されている (Suzuki et al. 2003, Chang et al. 2005)。

局所的な慢性炎症性疾患の1つである歯周炎は口腔細菌感染によって発症し、歯周組織の炎症性破壊を伴い、その病態は RA と類似する (Bartold et al. 2005)。歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* は PAD 活性 (*P. gingivalis* PAD: PPAD) を保有するため生体組織の蛋白をシトルリン化する (McGraw et al. 1999)。これまでに本研究代表者らは、RA 患者血清の *P. gingivalis* に対する免疫グロブリン G (Immunoglobulin G: IgG) 抗体価が対照者と比べて有意に高く、歯周病治療後に RA 活動度 (Disease Activity Score including 28 joints: DAS28) と抗 *P. gingivalis* 血清 IgG 抗体価が有意に低下することを報告した (Okada et al. 2011, 2013)。

以上の背景から、*P. gingivalis* 口腔感染は PPAD による生体組織蛋白のシトルリン化を通して RA 発症・進行に関与するという仮説が考えられる。さらに、この仮説の検証には、蛋白シトルリン化に関与する細菌性 PPAD と内在性 PAD の発現を同時に評価することが必要不可欠であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、シトルリン化プロファイル (抗 CCP 血清 IgG 抗体価、抗 PPAD 血清 IgG 抗体価、および PAD-4 血清濃度) について以下の2つの比較を行い、歯周炎と RA の共通発症機序を検討することである。

(1) RA 患者と対照者、ならびに RA 患者の歯周治療前後で比較する。

(2) RA 患者の生物学的疾患修飾性抗リウマチ薬 (Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drug: bDMARD) の投与前後で比較する。

3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントが得られた RA 患者 52 名および対照者 26 名を対象に、リウマチ専門医によるリウマチ検査、歯周病

専門医による歯周検査を実施後、末梢静脈血を採取した。また、RA 患者 52 名から歯周炎併発を認めた 26 名について非外科的歯周病治療としてプラークコントロールと歯肉縁上スケーリングを実施し、治療前後で同様な検査と採血を行った。臨床検体と検査結果を個人情報保護の観点から匿名・記号化した。血液より血清を抽出後、抗 CCP 血清 IgG 抗体価、PAD-4・C 反応性蛋白 (CRP)・腫瘍壊死因子 (TNF)-alpha・インターロイキン 6 (IL-6) の各血清濃度を ELISA 法にて定量した。また、抗 PPAD 血清 IgG 抗体価は Quirke らの方法 (2014) に準じて ELISA 法にて測定し、ELISA units (EU) で表示した。

(2) インフォームドコンセントが得られた RA 患者 60 名を対象に、bDMARD 投与前と投与後 3, 6 ヶ月目にリウマチ検査、歯周検査を実施後、末梢静脈血を採取した。臨床検体と検査結果を個人情報保護の観点から匿名化・記号化した。血液より血清を抽出後、抗 CCP 血清 IgG 抗体価、PAD-4・CRP・TNF-alpha・IL-6 の各血清濃度を ELISA 法にて定量した。また、抗 PPAD 血清 IgG 抗体価は Quirke らの方法 (2014) に準じて ELISA 法にて測定し、EU で表示した。

4. 研究成果

(1) 年齢・性別・喫煙・歯周状態は RA 群と対照群で同等であったが、抗 PPAD 血清 IgG 抗体価と抗 CCP 血清 IgG 抗体価は対照群と比べて RA 群で有意に高い値を示した。また、抗 PPAD 血清 IgG 抗体価と抗 CCP 血清 IgG 抗体価との間には有意な正の相関を認めた。さらに、年齢・性別・喫煙を調整した多重ロジスティック回帰分析から、抗 PPAD 血清 IgG 抗体価と RA の発症との間に有意な関連を認めた。以上の結果から、PPAD と CCP に対する血清中の抗体反応は互いに関連し、RA 患者では蛋白シトルリン化への PPAD の関与が示唆された。

一方、PAD-4 血清レベルは RA 群と対照群で同等であった。本研究の RA 群の PAD-4 レベルは他の報告 (Ishigami et al. 2013) と同等であったことから、対照群での PAD-4 レベルの増加が示された。この原因としては、本研究の対照群では歯周炎が認められ、歯周局所で亢進した PAD-4 発現が全身に波及した可能性が考えられる。

(2) bDMARD 投与前に、抗 PPAD 血清 IgG 抗体価の中央値を基準にして、高抗体価群 (30 名) と低抗体価群 (30 名) に分類した。bDMARD 投与前のリウマチ検査結果および歯周検査結果は高抗体価群と低抗体価群とで同等であった。しかしながら、投与後 3, 6 ヶ月目の低抗体価群の RA 活動度は高抗体価群と比べて有意に改善した。同様に、投与後 3, 6 ヶ月目の低抗体価群の RA 活動度・抗 CCP 抗体価の各改善量も高抗体価群と比べ

て有意に大きい値を示した。また、bDMARD 投与前の抗 PPAD 血清 IgG 抗体価は RA 活動度・抗 CCP 抗体価の各変化量と各々有意な正の相関を示した。さらに、年齢、性別、喫煙、歯周状態を調整した重回帰解析の結果から、投与前の抗 PPAD 血清 IgG 抗体価は投与後 6 ヶ月目の RA 活動度の変化量と有意な正の相関を示した。

研究期間全体の研究成果として、PPAD に対する血清抗体反応は血清シトルリン化蛋白レベルと RA の発症と関連しており、リウマチ薬物治療に対する反応性にも関与する可能性が示唆された。これは、歯周病原菌の口腔内感染がリウマチの発症・進行に関与する作用機序の一端を示唆するものであり、歯周炎と RA の共通発症機序の解明のための基盤資料になりうる点で学術的・社会的意義があると考えられる。

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 8 件)

小林哲夫、伊藤 聡、島田惇史、村澤 章、中園 清、吉江弘正. 関節リウマチ患者の活動度に及ぼす歯周炎併発の影響. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 2016, 59(3),266-272.DOI:10.11471/shikahozon.59.266.

Kobayashi T, Ishida K, Yoshie H. Increased expression of interleukin-6 (IL-6) gene transcript in relation to IL-6 promoter hypomethylation in gingival tissue from patients with chronic periodontitis. Archives of Oral Biology, 査読有, 2016, 69:89-94. DOI:10.1016/j.archoralbio.2016.05.018

Kobayashi T, Ito S, Kobayashi D, Shimada A, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Serum Immunoglobulin G Levels to *Porphyromonas gingivalis* Peptidylarginine Deiminase Affect Clinical Response to Biological Disease-Modifying Anti-rheumatic Drug in Rheumatoid Arthritis. PLoS ONE, 査読有, 2016, 11(4):e0154182. DOI:10.1371/journal.pone.0154182.

Kojima A, Kobayashi T, Ito S, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. Journal of Periodontal Research, 査読有, 2016, 51(3):350-358. DOI:10.1111/jre.12314.

Kobayashi T, Ito S, Kobayashi D,

Kojima A, Shimada A, Narita I, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Interleukin-6 receptor inhibitor tocilizumab ameliorates periodontal inflammation in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis as well as tumor necrosis factor inhibitors. Clinical and Experimental Dental Research. 査読有, 2016, 1(2): 63-73. DOI: 10.1002/cre2.11.

Shimada A, Kobayashi T, Ito S, Okada M, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Expression of anti-*Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase immunoglobulin G and peptidylarginine deiminase-4 in patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. Journal of Periodontal Research, 査読有, 2016, 51(2):103-111. DOI:10.1111/jre.12288.

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

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. Journal of Periodontology. 査読有, 2014, 85(11): 1480-1488.DOI:10.1902/jop.2014.140194.

[学会発表](計 17 件)

小林哲夫. *Porphyromonas gingivalis* PAD IgG 抗体価と関節リウマチ治療応答性との関連. 日本歯科保存学会 2016 年度秋季学術大会(第 145 回), 2016 年 10 月 28 日, キッセイ文化ホール(長野県・松本市).

小林哲夫. 慢性歯周炎罹患歯肉組織における IL-6 プロモーター低メチル化と遺伝子転写発現亢進. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2016 年 10 月 7 日, 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市).

小林哲夫. 歯周炎併発と関節リウマチ活動度との関連性の解析. 日本歯科保存学会 2016 年度春季学術大会(第 144 回), 2016 年 6 月 10 日, 栃木県総合文化センター(栃木県・宇都宮市).

小林哲夫. *Porphyromonas gingivalis* PAD 血清抗体価のサイトカイン標的療法反応性への影響. 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 2016 年 5 月 20 日, かごしま県民交流センター(鹿児島県・

鹿児島市).

小林哲夫. 関節リウマチ患者における *Porphyromonas gingivalis* PAD 血清抗体価と biologic DMARDs 反応性との関連性. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016 年 4 月 21 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

小林哲夫. IL-6 レセプター阻害による関節リウマチ患者の歯周炎症の改善. 日本歯科保存学会 2015 年度秋季学術大会 (第 143 回), 2015 年 11 月 13 日, 文京シビックホール (東京都・文京区).

島田 惇史. 歯周炎併発関節リウマチ患者における *Porphyromonas gingivalis* PAD に対する血清抗体価. 第 58 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 9 月 12 日, アクトシティ浜松 (静岡県・浜松市).

Kojima A. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter methylation in patients with periodontitis and rheumatoid arthritis. *EuroPerio* 8, June 3-6, 2015, London (UK).

Shimada A. Effects of periodontal treatment on serum peptidylarginine deiminase levels in patients with rheumatoid arthritis. *EuroPerio* 8, June 3-6, 2015, London (UK).

小林哲夫. IL-6 受容体阻害薬トシリズマブ投与前後での歯周・血清サイトカインプロファイル. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 5 月 15 日, 幕張メッセ (千葉県・幕張市).

小林哲夫. アダリムマブ投与前後での歯周・血清蛋白プロファイル. 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2015 年 4 月 24 日, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市).

小林哲夫. 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・山形市).

岡田 萌. 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・神戸市).

小島杏里. 慢性歯周炎患者および関節リウマチ患者における TNF- α 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・神戸市).

小林哲夫. *Porphyromonas gingivalis* によるタンパクシトルリン化と関節リウマチとの関連. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014 年 9 月 25 日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市).

小林哲夫. 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・岐阜市).

小林哲夫. 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総会・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・港区).

〔図書〕(計 0 件)

〔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

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: 0 0 2 1 5 3 4 4