

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	金子 千尋
学位	博士 (歯学)
学位記番号	新大院博 (歯) 第477号
学位授与の日付	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: A pilot case-control study (関節リウマチ患者における歯周炎重症度とカルバミル化タンパクおよび好中球細胞外トラップの血清レベルの関連：パイロットケースコントロール研究)
論文審査委員	主査 教授 多部田 康一 副査 教授 葭原 明弘 副査 教授 寺尾 豊

博士論文の要旨

学位申請者金子 千尋氏より提出のあった主論文 (英語) の要旨 (和訳) は以下の通りである。

【背景と目的】 関節リウマチ (RA) と歯周炎は、病態の類似性や双方向性の因果関係が示唆されている。RA の病態において、主に2つの翻訳後修飾 (シトルリン化・カルバミル化) タンパクに対する自己抗体が重要な役割を果たす。抗環状シトルリン化タンパク (CCP) 抗体は、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来のシトルリン化変換酵素によっても産生されることが示唆されている。また、抗カルバミル化タンパク (CarP) 抗体が抗 CCP 抗体とは独立したメカニズムにより産生されることが報告されている。さらに近年、好中球の新たな宿主防御機構として注目されている好中球細胞外トラップ (NETs) は、RA を含む自己免疫疾患に関与することが示唆されている。しかし、CarP および NETs と歯周炎との関連は未だ明らかになっていない。したがって、本研究では CarP および NETs の血清レベルが、歯周炎の重症度に関連するかおよび歯周治療の影響を受けるかについて評価した。

【対象と方法】 本研究では、ケースコントロール研究として、新潟県立リウマチセンターおよび新潟大学医歯学総合病院にてインフォームドコンセントが得られた歯周炎併発 RA 患者 40 名 (RA+歯周炎群)、歯周炎患者 30 名 (歯周炎群)、健常対照者 43 名 (対照群) を対象とし、歯周検査、RA 検査、ならびに血清検査を実施し、群間比較を行った。また、RA+歯周炎群における、CarP および NETs の血清レベルと歯周炎重症度、RA 活動度ならびに抗 CCP IgG 抗体血清レベルとの相関関係を解析した。さらに、介入試験として、RA+歯周炎群より 22 名を無作為に抽出し、口腔衛生指導と歯肉縁上スクレーピングを含めた非外科的歯周治療を行い、その2ヶ月後に、同様な3種の検査を実施し、歯周治療の前後比較を行った。血清検査では、CarP および NETs の血清レベルを ELISA 法にて測定した。対照群間ならびに歯周治療前後の検査値の比較について、統計学的な有意差の検定を行った。

【結果】 ケースコントロール研究において、単変量解析の結果、CarP 血清レベルは、対照群と比較して、RA+歯周炎群および歯周炎群で有意に高く (それぞれ $P=0.04$ および $P=0.004$)、NETs 血清レベルは対照群と比較して RA+歯周炎群で有意に高い値を示した ($P<0.001$)。RA+歯周炎群では、CarP および NETs の血清レベルは、平均プロービングデプス ($P=0.01$ および $P=0.007$) ならびに平均アタッチメントレベル ($P=0.007$ および $P=0.001$) と有意な正の相関を示した。また、NETs 血清レベルは、RA 疾患活動性スコア (DAS28-CRP) および抗 CCP IgG 抗体血清レベルと有意な正の相関を認めたが ($P=0.04$ および $P=0.007$)、CarP 血清レベルは DAS28-CRP および抗 CCP IgG 抗体血清レベルとの間に相関を認めなかった。多変量解析の結果、CarP およ

び NETs の血清レベルと中等度～重度の歯周炎との間に有意な関連が認められた ($P = 0.03$ および $P = 0.001$)。さらに、介入研究において、単変量解析の結果、RA+歯周炎群を対象とした非外科的歯周治療によって、歯周状態および RA 活動度の改善のみならず、CarP および NETs の血清レベルも有意な低下が認められた ($P = 0.03$ および $P = 0.02$)。

【考察】群間比較および相関関係の解析の結果、CarP および NETs の血清レベルと歯周炎重症度との関連が示唆された。CarP および NETs の血清レベルの上昇は、歯周炎患者の血清、唾液、歯肉溝滲出液および歯周組織におけるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 濃度の増加を反映している可能性が考えられる。加えて、NETs 血清レベルが RA 活動度および抗 CCP IgG 抗体血清レベルと有意な正の相関を示したことから、NETs がシトルリン化タンパクの供給源であり、NETs 血清レベルの上昇がタンパクのシトルリン化を介して RA の発症・進行に重要な役割を果たしていることが考えられる。さらに、介入研究の結果、非外科的歯周治療が CarP および NETs の血清レベルを有意に低下させることを示した。CarP 血清レベルの歯周治療後の減少は、タンパクのカルバミル化が MPO によって触媒されることから、好中球からの MPO の放出の減少が一部起因している可能性が推測される。同様に、NETs 血清レベルの歯周治療後の減少は、血液好中球の刺激に対する反応性の低下を反映していることが考えられる。本研究の結果を確認するため、今後は、大規模なコホートにおける、さらなる研究が必要である。

【結論】RA 患者の CarP および NETs の血清レベルは歯周炎の重症度に関連し、歯周治療の影響を受けることが示唆された。

審査結果の要旨

本研究の研究テーマの妥当性についての試問を行った。

本研究着想の経緯、先行研究との関連について下記の回答を得た。関節リウマチ (RA) は自己免疫疾患であり疾患の発症には抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体) が重要な役割を担うことが明らかになっている。また、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* はシトルリン化変換酵素を産生する唯一の細菌として注目され、歯周炎を介した RA の発症においては *P. gingivalis* 産生 Peptidyl arginine deiminase (PPAD) により、ヒトおよび *P. gingivalis* のタンパクがシトルリン化することで自己抗体の産生が誘導される可能性が示唆されている。しかし、全ての RA 患者から抗 CCP 抗体や *P. gingivalis* が検出されるわけではないことから、歯周炎を介した RA 発症機序を説明するためには他のメカニズムの検索も必要であると考えられてきた。近年、シトルリン化とは異なるタンパクの翻訳後修飾であるカルバミル化が RA に関連することが示唆され、RA 患者血清から抗カルバミル化タンパク抗体 (抗 CarP 抗体) が検出された (Shi et al. PNAS 2011)。さらに、CarP は炎症性歯周組織においても検出され、好中球細胞外トラップ (NETs) 由来の myeloperoxidase (MPO) がカルバミル化の潜在的な供給源となり得ることが示唆された (Bright et al. Med Hypothesis 2015)。以上の先行研究の報告をもとに、歯周炎による NETs 形成の促進がカルバミル化を誘導し、RA の発症に影響を及ぼすという仮説をたて、本研究を行うに至った。

研究方法と論旨の展開について試問をおこなった。

本研究デザインの妥当性について下記の回答を得た。本研究では、歯周炎併発 RA 患者において CarP および NETs 血清レベルに対する歯周治療の効果を評価するためにケースコントロールスタディーを採用した。臨床研究において信頼性の高い研究デザインを決定するためには、可能な限りバイアスを排除し、適切なサンプルサイズの設定を行い、適格性基準を正しく設定する必要がある。本研究では RA 検査および歯周検査の際に盲検化を行い、情報バイアスを制御した。また、RA 患者の平均年齢および女性の割合に関するデータは、別の大規模なコホート研究と類似し、選択バイアスは少ないと考えている。さらに、サンプルサイズは Cohen (1988, 1992) が推奨した有意水準、検出力、効果量をもとに SPSS Sample Power を用いて各群 20 名以上が必要と算出された。本研究における被験者数は歯周炎併発 RA 患者 40 名、歯周炎患者 30 名、対照者 43 名であり、算出された値を上回っている。適格性基準についても、先行研究を参考とし決定している。また、本研究での研究デザインにおけるリミテーションは、RA および歯周炎が多因子性疾患であるため、交絡因子の管理が制限されていること、歯周炎を併発しない RA 患者につ

いてリクルートすることが出来なかったことがあげられる。そのリミテーションを十分に理解して結果を解釈することが重要であると考えられる。

各解析の統計手法を選択した理由と妥当性については以下の通りである。本研究における集団が正規分布しないことを Kolmogorov-Smirnov 検定により評価した。歯周炎併発 RA 群、歯周炎群、対照群の 3 群間比較においては Kruskal-Wallis 検定を用いたが、この検定で有意差を認めた場合には、全体として群間のどこかに有意差があることを証明しただけであるため、Scheffe の多重比較法にて各群間の比較を行った。相関関係の検証については、Spearman の順位相関係数を用いて、CarP および NETs 血清レベルと RA 活動度または歯周炎重症度、抗 CCP IgG 抗体血清レベルの関係を決定した。さらに、CarP および NETs 血清レベルと歯周炎重症度との関連性を、多重ロジスティック回帰分析にて検証した。非外科的歯周治療前後の定量的データの差は、Wilcoxon 符号順位検定にて解析を行っている。全ての統計法の選択は文献に基づき、本研究の統計解析は妥当であると考えられる。

ELISA 法にて血清 NETs を定量する適切性について及び選択した抗体と NETs 特異性についての説明は以下の通りである。ELISA 法にて直接 NETs を測定する方法は確立されていない。代わりに cell-free DNA や可溶性 NETs 断片を測定した報告がある。cell-free DNA は NETs のみに由来せず、好中球以外の死細胞にも由来する。対して、可溶性 NETs 断片である MPO-DNA complex は NETs 由来物質であり、特異性および客観性が高いとされる (Masuda et al. Clinica Chimica Acta 2016)。以上から、本研究において NETs 発現を MPO-DNA complex にて評価したことは、適切であると考えている。

採取した血清に含まれる NETs が、口腔における *P. gingivalis* 感染や歯周疾患と関連すると考察した妥当性については以下の通りである。肘正中皮静脈 (困難な場合は、手背静脈) から採血を行った。本研究では歯周治療後に NETs 血清レベルの減少を認めた。この結果は、歯周治療後において末梢好中球の NETs 形成に有意な減少を認めた報告と矛盾しない (White et al. J Clin Periodontol 2016)。以上の結果は、歯周組織の炎症の改善が全身循環における NETs の減少につながることを示唆しており、歯周局所の炎症が循環 NETs に影響を与えるとの考察は妥当であると考えられる。

本研究結論の「NETs がシトルリン化タンパクの供給源」および「NETs 血清レベルの上昇がタンパクのシトルリン化を介して RA の発症進行に重要な役割を果たす」は、共著者らの先行結果である「RA の発症進行は、*P. gingivalis* のシトルリン化変換酵素によってもたらされる」とどのように関連するかについて問いに以下の回答を得た。NETs 形成のためには、ペプチジルアルギニンデアミナーゼ 4 (PAD4) の好中球核内移行が必要不可欠であるとの報告がある (Koen et al. J Clin Periodontol 2017)。*P. gingivalis* のシトルリン化変換酵素は核内移行をしないため、NETs の形成を起こさないと考えられる。先行結果は、歯周炎を介した RA 発症の細菌特異的な機序をサポートする結果であり、本研究の結果は、細菌非特異的な機序について新たな知見を提供したものである。

歯周病原性細菌群の病原因子群により、好中球が傷害され、その細胞内容物が NETs を形成することなく漏出している可能性が勘案されていない。その理由について以下の回答を得た。アポトーシスやネクローシスによる細胞内容物の漏出に関して、アポトーシスの場合は核内や細胞質内の様々なタンパクを細胞外に漏出させない。ネクローシスについては、クロマチン網を形成せず、MPO-DNA complex 等の形成は起こらない。以上から、細胞傷害により漏出した物質を誤検出している可能性は低いと考えたため、NETs 以外の細胞傷害の可能性を勘案していない。

歯周治療後に NETs 血清レベルが減少したメカニズムの考察は以下の通りである。歯周炎罹患部位において、活性酸素種 (ROS) 放出され、PAD4 の核内移行後、ヒストンのシトルリン化および核クロマチンの脱凝集による NETs 形成がおこる (Fuchs et al. J Cell Biol 2007)。歯周治療の結果、ROS 産生の減少が生じ (Matthews et al. Journal of Dental Research 2007)、NETs 形成が抑制されて NETs 血清レベルの減少につながったと考察している。

リウマチと歯周炎の関連においては様々なメカニズムが検討される中で、CarP, Nets の疾患関連における寄与度についての考察は以下の通りである。RA に関連する自己抗体のなかで、抗 CCP 抗体は RA 患者の 50~70%において陽性である (Smolen et al. Lancet 2016)。また、カルバミル化

も RA のリスクとなる自己抗体を誘導する (Wang et al. Nat Med 2007) が、抗 CarP 抗体は抗 CCP 抗体とは独立した自己抗体系であることが報告される (Shi et al. PNAS 2011)。抗 CCP 抗体陰性 RA 患者において、抗 CarP 抗体が検出される割合は 8~37%と報告され (Shi et al. PNAS 2011, Nakabo et al. J Rheumatol 2017)、抗 CCP 抗体により全ての RA 患者を検出できるわけではなく、抗 CCP 抗体陰性の場合に抗 CarP 抗体陽性となる RA 患者が一定割合存在することを勘案すると、歯周炎と RA の関連についてカルバミル化の影響を検証することは重要であると考えられる。また、NETs 由来成分がカルバミル化やシトルリン化の供給源である可能性を検証することは、歯周炎を介した RA 発症機序を説明するための重要な知見を提供することにつながると考える。

リウマチと歯周病の双方向性の関連性のメカニズムについての説明は以下の通りである。歯周炎から関節リウマチ (RA) への影響については、*P. gingivalis* 感染 (Wegner et al. Arthritis Rheum. 2010) およびペプチジルアルギニン Deputy 4 (PAD4) によるシトルリン化促進と、歯周炎罹患によるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 上昇によるカルバミル化の促進 (Bright et al. Med Hypothesis 2015) が考えられる。RA から歯周炎への影響については、RA 患者は健常者と比較して歯周炎罹患率が高く (Kobayashi et al. J Periodontol 2007, Miyazaki et al. Community Dent Oral Epidemiol 1989)、これは、手指の機能障害による口腔衛生不良および、RA 治療薬である免疫抑制薬や生物学的製剤の使用による易感染性が考えられる。

抗カルバミル化蛋白抗体 (抗 CarP 抗体) の形成についての説明は以下の通りである。カルバミル化は尿素依存的・非尿素依存的におこる反応であり、シアネートにより媒介され、タンパクの構造を変化することで免疫寛容を破綻させ、自己抗体である抗 CarP 抗体の産生へと至る。カルバミル化により翻訳後修飾されるタンパクは未だ不明な部分が多いが、抗 CarP 抗体の対応抗原の一つがカルバミル化アルブミンであるとの報告がある (Nakabo et al. Rheumatology 2017)。

抗シトルリン化蛋白抗体 (抗 CCP 抗体) の形成と歯周病との関連の説明は以下の通りである。歯周炎における、抗 CCP 抗体の形成については大きく 2 つの経路に分けられる。1 つ目は、歯周病原菌である *P. gingivalis* が産生する PPAD (Smolen et al. Lancet 2016) や PAD4 により、ヒトおよび *P. gingivalis* のタンパクがシトルリン化され、自己抗体の産生につながる。2 つ目は、歯周炎罹患部位で活性酸素 (ROS) 放出を認め (White et al. J Clin Periodontol 2016)、ROS 存在下で PAD4 の核内移行が促進される。その結果、ヒストンのシトルリン化を生じ、核クロマチンの脱凝集による好中球細胞外トラップ (NETs) が形成され、NETs 構成成分の一種であるシトルリン化ヒストンが自己抗体の供給源になる (Janssen et al. J Clin Periodontol 2017)。

NETs と好中球との関連についての説明は以下の通りである。活性化好中球は、核内のクロマチンを細胞外へ放出することが発見され (Brinkmann et al. Science 2004)、このクロマチン網は NETs と呼ばれた。クロマチン網に捕らえられた細菌は、好中球やマクロファージに貪食されやすくなり、NETs そのものにも抗菌作用が確認されている (Parker et al. J Leukoc Biol 2012)。すなわち、NETs は好中球の新たな宿主防御機構であると考えられている。

Non-RA applicants の選定方法の説明は以下の通りである。本研究は後ろ向きコホート研究であり、本研究班の先行研究のデータを再抽出している。Non-RA applicants の選定に関して、歯周炎群の適格性の条件は歯周炎を伴う全身的に健康な個体とし、対照者の適格性の条件は歯周炎を伴わない全身的に健康な個体としている。

歯周治療によって RA が改善するメカニズムの考察は以下の通りである。非外科的歯周治療により血清シトルリンレベル、CarP・NETs 血清レベルの改善が確認されている。歯周治療による歯周組織の炎症の改善により、MPO や ROS の減少が生じ、カルバミル化やシトルリン化が抑制される。したがって、抗 CarP 抗体や抗 CCP 抗体といった RA 関連自己抗体とその標的抗原との抗原抗体複合体が減少することで RA 改善が得られると考察している。

エピジェネティックな変化による歯周病とリウマチとの関連については以下の通りである。IL-6 遺伝子プロモーター領域の-74bp 部位のシトシン塩基のメチル化により、炎症性サイトカインである IL-6 タンパクの発現が抑制される可能性がある (Ishida et al. J Periodontol 2012)。

学術的意義に関わる試問を行った。

学術的意義、新規性・創造性は以下の通りである。CarP が RA のみならず歯周炎とも関連があるという仮説や、NETs 構成成分の MPO が CarP の潜在的な供給源との仮説が提唱されるが、

CarP および NETs 血清レベルの歯周炎またはその重症度への関連性を評価した研究はない。したがって、CarP および NETs 血清レベルが歯周炎およびその重症度に関連するか否かを評価することは、臨床的に意義があると考えられる。

本研究結果の学術的発展性や応用価値または位置づけは以下である。RA と歯周炎の病因や病態の多くは共通し、双方向性の関連があるとされる。RA と歯周炎の関連性については細菌特異的な機序についての報告が多いが、歯周炎が RA の発症に影響を及ぼすメカニズムが抗 CCP 抗体の誘導や *P. gingivalis* のみに関連しているのかは議論が多く、細菌非特異的な機序の検索が必要である。本研究の結果、歯周炎が RA の発症に影響を及ぼすメカニズムにおいて、カルバミル化の関与が示唆されたことは、細菌非特異的な機序解明の足がかりとなるのではないかと考えている。また、本研究において NETs および抗 CCP 抗体血清レベルの間に相関を認めたことは、NETs が抗 CCP 抗体の潜在的な供給源となる可能性を示唆した他の研究の結果 (Janssen et al. J Clin Periodontol 2017) を支持する。

論文構成・文法・語法について適切に執筆されている。

以上