

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2018年度 博士論文

関節リウマチモデルマウスにおける
唾液抗シトルリン化ペプチド抗体の検出についての研究

2019年 3月 1日

坂口 和歌子

Wakako Sakaguchi

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座

環境病理学分野

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2018年度 博士論文

関節リウマチモデルマウスにおける

唾液抗シトルリン化ペプチド抗体の検出についての研究

2019年 3月 1日

坂口 和歌子

Wakako Sakaguchi

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座

環境病理学分野

槻木恵一教授 指導

論文内容要旨

関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA)は関節滑膜を病巣の首座とし、骨関節破壊や炎症性細胞浸潤を伴う自己免疫疾患で、自己抗体である抗シトルリン化抗体 (anti-citrullinated protein antibodies : anti-ccp antibody、ACPA) は、RA の診断において特異性が高いとされており、RA の早期例や発症数年前から検出されることがあり、臨床では抗 CCP 抗体として測定されている。また、歯周病と RA には双方向性の関連が報告されている。これまで著者の教室では、前立腺癌の腫瘍マーカーProstate-specific antigen (PSA)が唾液中に含まれ、唾液検査が一部の腫瘍において有用であることを報告してきた。また、唾液腺の腺房細胞で産生されず、自己抗体など疾患特異性が高い物質は唾液検査に応用しやすいと考えられている。そこで本研究では、RA の診断特異性の高い ACPA に注目し、歯周病との関連も含めて唾液中に検出されるか検討した。

RA のモデルマウスである DBA/1JmsSlc マウスを使用した。II 型コラーゲンを投与し RA を発症させた状態で、マウスの口腔内へ *Porphyromonas gingivalis* (Pg) あるいは *Escherichia coli* (Ec)を塗布した。Control 群、Control 群と同条件のマウスに Pg を投与した Pg 群、Ec/RA 群、RA 群、Pg/RA 群の 5 つのグループにわけ、足の関節炎指数を測定、ピロカルピンを投与し唾液を採取、心臓穿刺により血清を採取、左右の足骨を摘出した。足骨は HE 染色で病理組織学的に炎症の程度を確認した。ELISA 法を用いて血清および唾液中の抗 CCP 抗体量を測定、Western Blotting 法で血清、唾液、足骨のシトルリン化タンパクを検出し分析した。データの統計解析は多群の比較は one-way ANOVA の後、Bonferroni の補正、相関解析は Pearson の相関係数で解析した。

足骨の病理組織標本では、RA 群でも好中球浸潤が中心の炎症反応を認めたが、Pg/RA 群はマクロファージや形質細胞などの炎症細胞浸潤が混在し、炎症反応がより進行していた。また、足骨骨膜の周囲に破骨細胞が認められ骨吸収が著明に生じていた。関節炎指数は Pg/RA 群は RA 群、Ec/RA 群と比較して有意差を認めた ($P < 0.05$)。ELISA の結果、Control 群、Pg 群は血清中、唾液中から検出されず、血清中での抗 CCP 抗体の検出量は、Ec/RA 群、RA 群と比較して Pg/RA 群が有意に高かった ($P < 0.05$)。唾液中の ACPA は、Pg/RA 群は、Ec/RA 群、RA 群より増加傾向を示し、さらに Pg/RA 群の血清および唾液中の抗 CCP 抗体量には相関を認めた ($P < 0.05$, $r = 0.972$)。また、Western Blotting の結果、RA 群、Pg/RA 群の血清、唾液から 55kDa のシトルリン化タンパクが検出された。Pg 感染により RA の自己抗体 ACPA は血清中で増加し、唾液中にも反映された可能性が考えられる。

また、唾液成分は血液成分由来であることから、Pg/RA 群の血清、唾液中の抗 CCP 抗体量に相関が認められたと考えられる。今後、ヒト関節リウマチ患者における臨床的な意義について検討する予定である。

学位論文審査要旨

学位論文である「関節リウマチモデルマウスにおける唾液抗シトルリン化ペプチド抗体の検出についての研究」は、関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA) の診断特異性の高い抗シトルリン化抗体 (anti-citrullinated protein antibodies: anti-ccp antibody: ACPA) に注目し、*Porphyromonas gingivalis* (Pg) を感染させた関節リウマチモデルマウスの唾液中に ACPA およびシトルリン化蛋白が検出されることを示した論文である。

これまで、著者の教室では、前立腺癌のマーカーの Prostate-specific antigen (PSA) やうつ病の診断マーカーとして有用視されている Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) などの非侵襲的で簡便な医科歯科連携医療に応用可能な唾液検査の有用性を報告してきた。これまで、歯周病と RA の関連について多くの報告があるが、唾液中の ACPA の検出は、明らかにされておらず、本論文において、それを実証しようとする研究目的は、今後の歯科医療への貢献の点からも高く評価できる。

研究方法は、RA のモデルマウスを使用して II 型コラーゲンを投与し RA を発症させた状態で Pg および *Escherichia coli* (Ec) を口腔内に塗布した。コントロール群 (非 RA : Control 群)、Control 群に Pg を塗布した Pg 群、Ec/RA 群、RA 群、Pg/RA 群の 5 群を設定し、足の関節炎指数の測定と足骨の HE 染色による病理組織学的評価を行うとともに、ELISA 法により血清と唾液中の ACPA の測定とウエスタンブロッティング法で血清、唾液、足骨のシトルリン化蛋白の分析を行った。実験は、本学動物倫理委員会の承認を得て実施されており、データ分析手法とデータの統計解析手法は、文献や既存の方法に基づいており妥当なものである。

結果として、関節炎指数や足骨の病理組織学評価により、RA の発症と Pg 感染による RA の重症化が確認された。ELISA の結果、ACPA は Cont 群、Pg 群は、血清、唾液中より検出されず、Pg/RA 群では、Ec/RA 群および RA 群と比較して高い検出量を示し、血清と唾液中の ACPA 検出量には相関性を認めた。また、ウエスタンブロッティングの分析により、RA 群、Pg/RA 群の血清、唾液中からシトルリン化蛋白が検出された。本研究で、RA 群および Pg/RA 群の唾液中に ACPA の検出が確認されたことは、今までに報告例がなく、新しい知見が得られたことは高く評価できる。一方、ACPA の検出量は、血清に比較して唾液中で非常に少なかったことや、RA 群において血清と唾液中には相関性が認められなかったことから、

今後、唾液検査の実用化に向けてより高感度の検出系の開発とともに長期間のPg感染を伴うRAモデルによる検討が必要であるが、発展性が期待できる。

主査および副査より論文内容および関連事項に関して質問があったが、過去の報告やこれまでの研究成果を踏まえた的確な回答が得られた。さらに今後の方向性も明確に示されており、臨床への貢献が期待できる。

最終試験は、論文内容ならびに関連事項につき口頭試問を持って行われた。さらに結果の解釈について質問がなされ、それらに対する十分な回答が得られた。その結果、合格と認めた。

本審査委員会は、全ての教育課程を修了し、教育理念に相応しい成果が認められ、高度専門職としての豊かな学識を有すると判定されたことから、申請者が博士(歯学)の学位に十分値するものと認めた。

2019年3月1日

主査： 三辺 正人 教授

副査： 合田 征司 教授

副査： 星 憲幸 准教授

目次

緒言	1
実験材料および方法	6
結果	12
考察	15
結論	18
謝辞	19
文献	20
表および図	
図 1.	27
図 2.	28
図 3.	29
図 4.	30
図 5.	31
図 6.	32

本文

緒言

唾液腺は、耳下腺、顎下腺および舌下腺の三大唾液腺と口唇腺、口蓋腺などの小唾液腺を含む器官であり、唾液は主にこれらの腺から分泌される¹⁾。唾液は、口腔の健康だけでなく、全身的な健康状態の維持においても重要な役割を果たしており、さまざまな成長因子、IgA などの抗菌物質、リゾチームなどの消化酵素が含まれている²⁻⁴⁾。

著者の教室では、これまで唾液中の成分に注目し、全身への影響について機能的役割が存在するのではないかという仮説に基づく研究や唾液がホルモンや薬物など、体内のさまざまな物質の血漿中濃度の良好な指標となる点にも注目し、唾液検査が血液の代替えとなるのではないかと考え研究を進めてきた。本教室の Shiiki らは、前立腺癌の腫瘍マーカーである Prostate-specific antigen (PSA)濃度が血清と唾液において相関を認め、唾液検査による PSA の検出が再発のマーカーとなる可能性を報告した⁵⁾。他の研究においても、唾液が癌などの疾患の早期発見、および個体の健康状態のモニタリングに有用であることが実証されている。このように唾液検査は、非侵襲的で簡便な検査であり、繰り返し採取でき

るなどの利点があることから、唾液検査は様々な分野から注目されている^{5,6)}。

唾液検査は、歯科分野において、う蝕罹患のリスク検査や歯周病原細菌の検出などに用いられてきた。さらに近年歯科医療には、医科歯科連携に基づく医療が必要となっており、採血のしにくい歯科医院では、全身との関連で唾液検査を用いることができるようになることは、歯科医療の拡大を念頭に置いたとき非常に重要と考えられる。

血液検査の代替えとして唾液検査を応用する場合、マーカーとなる物質は、唾液腺の腺房細胞で産生されていないということが重要な前提条件となる。その特徴を考慮すると薬物、外来微生物などのウイルスやウイルスに対する抗体、特異性の高い自己抗体などが、唾液検査に応用が有望であり、疾患特異性の高いマーカーとなりうる。

Äyräväinen⁷⁾らは、関節リウマチ (Rheumatoid arthritis: RA) 群は、対照群と比較した場合、bleeding on probing (BOP)、probing pocket depth (PD) および periodontal inflammatory burden index (PIBI) によって評価された歯周組織の健康状態がより不良であり、BOP と PIBI の有意な上昇は、すでに早期 RA の未治療段階において、唾液中の唾液マトリックスメタロプロテイナーゼ-8 (MMP-8)濃度の上昇を反映しており、RA と歯周病との関連を唾液検査でモニターできる可能性を報告している^{7,8)}。

RA は、中年女性によく見られるリウマトイド因子 (Rheumatoid factor : RF) および抗シトルリン化ペプチド抗体 (Anti citrullinated peptide antibody; anti-CCP antibody、ACPA) を含む様々な自己抗体の産生によって特徴付けられる全身性自己免疫疾患である⁹⁾。臨床の現場で測定している ACPA は、ほとんどの場合が抗 CCP 抗体であることから、ほぼ同一の意味として使われることも多いが、正確には ACPA のほうが抗 CCP 抗体より広い概念として使われている¹⁰⁾。

RA の重要な症状である関節破壊は、滑膜組織における慢性炎症および増殖に起因し、関節などの炎症部位でタンパク質がシトルリン化し自己抗体である ACPA を形成する。RF は RA 以外のリウマチ性疾患でも陽性率が高く、肝疾患や高齢者でも陽性になることがあると指摘されているが¹¹⁾、ACPA は RA において高い特異性を特徴とするので、優れた診断能力を有している¹²⁾。さらに RA における関節破壊の進行は、この ACPA が陽性の患者で早いことが報告されており、この自己抗体は、疾患の早期例や発症前でも陽性になることから、早期診断に特に有用であり¹³⁻¹⁵⁾、RA 発症後に陽性になることは比較的まれである。

ACPA は RA の特異的自己抗体であるが、その対応抗原は一つでなく、シトルリン化されたビメンチン、 α -エノラーゼ、II型コラーゲン、フィブリノーゲンなど多くのタンパクを対応抗原とする¹⁰⁾。興味深いことに歯周病細菌の一つで

ある *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は、タンパク質のシトルリン化を引き起こす酵素である *P.gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) を産生する唯一の既知の細菌であり、生体由来の peptidylarginine deiminase (PAD) と同様な生理活性を示す^{16,17)}。PAD や PPAD はビメンチンなどのタンパク質を基質としてシトルリン化し、自己抗体である ACPA 産生を刺激する。現在、PAD の活性化は、関節内で炎症が起こり、その結果遊走してきた好中球由来の PAD によってシトルリン化が起こる、もしくは口腔内で歯周病菌由来の PAD によりシトルリン化が起こり、口腔内で ACPA が産生されるという二つの仮説が立てられている¹⁸⁾。滋賀県長浜市と京都大学の共同研究長浜コホート研究では、RA を発症していない健常な長浜市民約 10,000 人に対し、健康、生活の情報、血清、DNA の解析を行い、5 年間追跡調査を行った。健常人でも ACPA は 1.7% に陽性になり、歯周病の重症度を community periodontal index (CPI) を用いて 4 段階に階層化すると、歯周病の重症度と ACPA 陽性率が相関することがわかり、歯周病が RA の発症と関連する可能性が示された¹⁹⁾。また、新潟大学の小林らは、歯周病合併 RA 患者 44 名と歯周病非合併 RA 患者 13 名を対象とし、歯周検査 (plaque control record、gingival index、bleeding on probing、probing depth、clinical attachment level) および RA 検査 (RA 活動度 the disease activity score including 28 joints using CRP [DAS28-CRP]、RA 罹患期間、投薬状態)

について評価した結果、歯周病合併 RA 群は歯周病非合併 RA 群と比較して 5 つの歯周検査指標全てにおいて有意に高い値を示したが、RA 検査指標においては有意な群間差は認められないことから、今後大規模集団での検証が必要であると報告している²⁰⁾。これまで、歯周病と関節リウマチの関連については、多数の報告が認められ、シトルリン化タンパクが歯周組織内で認められ、口腔内で生成されたタンパクと関節組織内で観察されたものとの関連を示すと報告もある²¹⁾。しかし、関節リウマチにおける唾液中の成分として ACPA が含まれるかどうかの研究は行われていない。

シェーグレン症候群の患者の唾液では、抗 SS-A 抗体や抗 SS-B 抗体などの自己抗体が検出されることが報告されており²²⁾、我々は ACPA が唾液中から検出される可能性があるのではないかという仮説を立てた。さらに、歯周病と関節リウマチの関連において MMP-8 の唾液検査が報告されているが^{7,8)}、ACPA に関しての報告は無い。

そこで本研究では、II 型コラーゲンを投与し RA を発症させた DBA マウスに Pg を感染させ、唾液および血清中の ACPA の検出および歯周病による炎症の進展の影響について調べた。

実験材料および方法

実験動物

今回の実験では、12 週齢のオスの DBA/1JJmsSlc マウス (SLC Japan, Inc、静岡、日本) を用いた。マウスは、特定の無菌室 (SPF) に保管された。実験計画は、神奈川歯科大学動物実験倫理委員会 (登録番号 17-053) の認可を受け、神奈川歯科大学動物実験のガイダンスに従って実験を行った。マウスには食物および水道水を自由に摂取させた。マウスを 5 つのグループに分類した：グループ 1、control 群；グループ 2、Pg に感染した非 RA DBA マウス；グループ 3、RA 群；グループ 4、Pg に感染した RA 群 (Pg / RA 群)、グループ 5、*Escherichia coli* (Ec) に感染した RA 群 (Ec / RA 群) に分類した (図 1)。

RA 誘導と関節炎指数

RA のモデルである DBA マウスは、ウシ由来 II 型コラーゲンを 0.2mg ずつ耳介基部および尾根部 (50 μ l/マウス) に 7 週目および 10 週目に投与し RA を発症させた (図 1)。同量の生理食塩水を同じ方法で Control 群に投与した。足関節の腫脹は、5 点スケールで採点した：0；変化なし、1；足指の腫脹、2；足

指および足裏の腫脹、3；足全体の腫脹、4；重度の腫脹足全体とし、四肢の総数（最大得点、16点）を関節炎スコアとした。

細菌の調製と感染

American Type Culture Collection (ATCC 33277; Manassas, VA@, USA) からの Pg を嫌気性チャンバー Anaerobox (Hirasawa, 東京, 日本) において 37°C で 18 時間培養した。12 週齢の DBA マウスおよびコントロールマウスの口腔に、5%カルボキシメチルセルロース溶液 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) で調製した Pg (10⁹ CFU/ml) を直接口腔内へ塗布した。Ec は、好气的条件 Anaerobox において、37°C で 18 時間培養し、同様に 12 週齢のマウスの口腔内へ塗布した²¹⁾。

病理組織学的分析と細胞数のカウント法

関節（近位部分）の足の骨を 10%ホルマリン (pH7.4) (富士フィルム和光純薬、東京、日本) で 17 時間固定し、Kalkitox (富士フィルム和光純薬、東京、

日本) で脱塩し、パラフィンに包埋した。パラフィンブロックを $5\mu\text{m}$ 切片に切断し、ヘマトキシリンエオシン (HE) で染色した。Olympus BX 41 (オリンパス、東京、日本) を用いて倍率 400 において、足首部の炎症細胞 1000 個中の好中球の個数を計測し、4 匹の平均値を示した。

試料調製

細菌感染の 5 日後、12 週のマウスの腹腔内に $1\text{mg} / \text{kg}$ の非選択性ムスカリン性受容体刺激薬ピロカルピンであるサンピロ 1% (参天製薬、大阪、日本) を投与し、口腔に流出した唾液をマイクロピペットで採取した。その後、心臓穿刺により血液を採取した。血清成分は、真空採血管 Benoject II (テルモ、東京、日本) で分離し、遠心分離 ($10,000\times\text{g}$ 、15 分、 4°C) をした。マウスの足骨は Cryopress (Microtec Company Limited、千葉、日本) を用いて粉碎し、フェニルメチルスルホニルフルオリド (ジメチルスルホキシド・HCl 溶液) を添加した 1% Triton X-100 (MP Biomedicals、CA、USA) に入れ、分析まで -80°C で保存した。

ELISA

Mouse anti-cyclic citrullinated peptide antibody ELISA kit (CUSABIO BIOTECH, Wuhun, China) を用いた酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) により、5 群のマウスの血清および唾液中の抗 CCP 抗体の濃度を定量した。Standard および各サンプルをウェルへ $100\ \mu\text{l}$ ずつ添加し、 37°C で 2 時間保温した。次に、 $100\ \mu\text{l}$ の Biotin Diluent を添加し、 37°C で 1 時間保温した。3 回洗浄した後、HRP-avidin を各 well に加え ($100\ \mu\text{l}$)、 37°C で 1 時間保温した。各 well を吸引、洗浄を 5 回行い、 $90\ \mu\text{l}$ の TMB Substrate を添加し、遮光下で 37°C 、20 分間保温した。Stop Solution ($50\ \mu\text{l}$) の添加により反応を停止させ、 450nm での吸光度を microplate reader BioRad (Hercules, CA, USA) を用いて測定した。この ELISA キットを用いたマウスの抗 CCP 抗体の検出可能限界値は、 1.56U/ml 未満である。尚、本文中の記載において、本キットを用いて検出された抗体については ACPA ではなく、使用マニュアルに従い抗 CCP 抗体とした。

シトルリン化タンパク質の分析

各サンプルを 15%ポリアクリルアミドゲル Super SepTMAce (富士フイルム

和光純薬、東京、日本) 上に置いた。タンパク質を電気泳動的に分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 Immobilon (Merck Millipore Ltd、Frankfurt、Germany) へ電氣的に移した。膜を 5% スキムミルクでブロックし、1 次抗体として ACPA (0.5mg/ml) (Biorbyt、Cambridge、England) および HRP 二次抗体 (1mg/ml) (Dako、Glostrup、Danmark) を 1 時間室温で反応させた。画像解析は、CCD カメラ LAS3000 (富士フイルム、東京、日本) を用いて行った。

統計分析

データは、平均および標準誤差として提示した。Kolmogorov-Smirnov 検定で、データが正規分布していたため、Welch の補正による一元配置分散分析に続いて Bonferroni 検定で多重比較検定を用いて Ec / RA 群、RA 群および Pg / RA 群間の比較を行った。血清および唾液中の相関は、Pearson の相関係数を用いて分析した。P < 0.05 は統計的に有意であるとした。全ての統計解析は、SPSS Statistics Version 23.0 (IBM、Armonk、NY、USA) を用いて行った。

結果

関節炎指数

図 2 は、5 つのグループのそれぞれにおける代表的なマウスの足骨を示した。12 週目、RA モデルマウスの足首は対照群と比較して明確な腫脹を示し、Pg の投与により、さらに腫脹を示した (図 2)。Pg 群と control 群との間に明らかな差はなかった。関節炎指数は、control 群、0; Pg 群、0; RA 群、 4.09 ± 0.24 ; Ec / RA 群、 5.16 ± 0.16 ; Pg / RA 群、 7.33 ± 0.15 であった。Ec/RA 群、RA 群、Pg/RA 群の関節炎指数においてに統計的に有意差があった ($n=4$, $P < 0.05$)。 (図 3)

足関節の病理組織学的解析

5 群のマウスの足骨を HE 染色によって病理組織学的に分析した。control 群 (図 4 a、b)、Pg 群 (図 4 c、d) において、骨の周囲に炎症細胞は検出されなかった。一方、RA 群では、好中球を中心とした炎症性細胞の浸潤を認め、マクロファージ、リンパ球および形質細胞も認めた (図 4 e、f)。RA 群では、 $311 \pm$

3.02 個の好中球数が認められた。Ec / RA 群でも同様の所見が得られた。Pg / RA 群の足骨においては、好中球浸潤は RA 群に比べて減少し、リンパ球および形質細胞が増加し、骨破壊は Pg / RA 群においてのみ認められた (図 4g、h)。Pg / RA 群では、好中球数は 162.5 ± 1.65 個を示し、形態的には、マクロファージ、リンパ球、形質細胞が増加した。炎症細胞浸潤の形態的観察では、RA 群は急性期の像を示し、Pg / RA 群ではより炎症が進展していた。

血清および唾液中抗 CCP 抗体の濃度の比較と相関

唾液および血清中の抗 CCP 抗体は、control 群、Pg 群では、検出されなかった。Pg / RA 群のマウスの血清中の抗 CCP 抗体レベルは、Ec / RA 群および RA 群 の血清中レベルよりも有意に高かった ($n=4$, $P<0.05$) (図 5-a)。さらに、唾液中の抗 CCP 抗体レベルは、Pg / RA 群で Ec / RA 群および RA 群よりも増加傾向を示した (図 5-b)。Pg / RA 群における抗 CCP 抗体の唾液レベルと血清レベルとの間には有意な相関があった ($r=0.972$, $P=0.028$) (図 5-c)。

シトルリン化タンパク質の検出

血清中では、Pg / RA 群および RA 群において約 55kDa にシトルリン化タンパク質が検出されたが、control 群および Pg 群の血清では、シトルリン化タンパク質は検出されなかった (図 6-a)。唾液でも血清と同様に Pg / RA 群および RA 群において約 55kDa に検出された (図 6-b)。RA 群の足関節でも 55kDa 付近にタンパクが検出された (図 6-c)。

考察

本研究は、血液検査の代替えとしての、唾液検査を行うことによって、簡便および非侵襲的に RA を発症前に早期診断をし、早期治療へ導くこと、併せて歯周病と RA の関連性を検討することを目的としている。シェーグレン症候群の患者の唾液中から SS の自己抗体である抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体が検出されたという報告が示すように²²⁾、唾液中に自己抗体が検出できることが示されており、本研究においても ACPA が唾液中に検出できることが明らかになった。唾液成分は唾液腺由来もしくは血漿成分が唾液を介して輸送されたもので構成されており、腺房細胞で作られた原唾液は、導管を通る過程で一部の成分が血液へ再吸収されたり、血中成分が直接導管部へ分泌されたりして、唾液成分の修飾がなされ口腔内へ分泌されるが、抗体を産生することはない^{23,24)}。従って、血漿成分中に認められた ACPA が、唾液中へ浸出し検出されたと考えられ、今回の結果からも、RA 群および Pg/RA 群の血液および唾液から抗 CCP 抗体の検出が認められ、唾液中から検出された抗体は血液由来であることが示唆された。

ELISA 法では、唾液中から検出された抗 CCP 抗体のレベルは血液中のレベルと比較して非常に少なかった。Shiiki らは、前立腺がん腫瘍マーカーである PSA の血中濃度と唾液中濃度の関係を調べたところ、唾液中の濃度は血液中の濃度より約 1/1000 程度であったことを報告している⁵⁾。ACPA が唾液中にも含まれていることは驚くべきこ

とではないが、血漿成分から唾液に移行する過程で、様々な物質の濃度が薄くなることから、今後、唾液検査の実用化において、高感度の検出系の開発が望まれる。また、我々の研究では、Pg/RA 群において、唾液および血液中の ACPA の量が相関していた (図 5-c)。唾液は、血漿成分に基づいて生成されることから、血液中の物質と唾液中の物質については、相関するという報告が多い²⁵⁾。しかし、8020 調査・研究事業において全国4県で実施された高齢者に対する疫学調査の結果報告によると、LDH や ASTなどは、血液と唾液中において相関がなく、物質により相関の関係は異なるようである²⁶⁾。一方、今回の研究では、RA 群における抗 CCP 抗体のレベルでは血液と唾液との間に相関が認められなかった。本研究では、II 型コラーゲンによる 2 回目の感作の 14 日後にサンプリングを行ったが、この時点でシトルリン化タンパク質は増加していたが、ACPA の産生が不十分であった可能性がある。安田らは、DBA マウスにII 型コラーゲン投与後 1 日置きに Pg を口腔内に投与し、42 日後にサンプリングをした結果、血清中の MMP-3 値の有意な上昇と、関節の破壊、パンスの形成を認め炎症が進行していることを報告している²⁷⁾。今後、コラーゲン感作後、より時間の経過を追い観察することで抗体量の増加が見込まれれば、RA 群の血液、唾液中の抗 CCP 抗体にも相関関係が得られると考えられる。しかし、本研究から、RA 発症初期の状態でも Pg 感染により、血清、唾液中の抗 CCP 抗体の上昇、足骨部の炎症の進展を認め、RA を重症化がすることが示唆された。血清中の抗 CCP 抗体は Control 群および Pg

群では検出されなかったが、RA 群では検出された。Pg/RA 群と RA 群、Ec/RA 群との間の血清中の抗 CCP 抗体レベルにおいて有意差が観察され (図 5)、Pg 感染は抗 CCP 抗体価を増加した。DBA マウスは、抗 CCP 抗体を有する RA モデルとして広く使用されている^{28,29)}。ACPA は、炎症病巣におけるシトルリン化タンパク質を抗原として形質細胞から産生される³⁰⁾。このシトルリン化反応は PAD を介して起こり、歯周炎で増加することが報告されている³¹⁾。さらに、Pg は細菌で唯一 PAD に類似した PPAD を含み、ACPA 産生の増加に関連する³²⁻³⁶⁾。これらの要因により、Pg/RA 群が RA 群、Ec/RA 群よりも有意に高い抗 CCP 抗体レベルを示した理由と考えられた。

Western Blotting による分析では、RA 群および Pg/RA 群の血液、唾液および足骨においてシトルリン化タンパク質が検出された(図 6)。Control 群および Pg 群では、シトルリン化されたタンパク質は検出されていないことから、RA の誘導とともにシトルリン化タンパク質が産生されたことが示唆された。このことは、RA 群および Pg/RA 群で血液、唾液および足骨中に ACPA が検出されたことを支持する現象である。本研究では、血液、唾液および足骨に 55kDa のシグナルが検出され、血液から唾液中へ移行したことが示唆された。今後、この 55kDa のタンパク質の詳細な分析が必要と考えられる。

結論

本実験で用いた RA モデルは、コラーゲンを投与し関節リウマチを発症させる実験系であり、血中の抗 CCP 抗体も増加する。本検討では、RA 群の唾液中に抗 CCP 抗体およびそれを誘導したシトルリン化蛋白が検出された。これは、これまでに報告例のない新たな知見である。さらに、RA モデルに Pg を感染することにより、炎症が進展すると同時に、ACPA の量が増加し、RA において ACPA の唾液検査が有望である可能性が示唆された。

唾液 ACPA 検査は、RA 患者の歯周治療において、歯科医院におけるモニタリングに応用することへの期待を望める意義が認められ、今後は、ステロイド療法などで病態が安定している患者ではなく、診断直後の初期の RA 患者に焦点を絞り、唾液検査における歯周治療の効果と ACPA の関連についての臨床研究を検討する予定である。

謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導ご鞭撻を頂きました神奈川歯科大学大学院口腔科学講座環境病理学分野 槻木恵一教授に心より感謝いたします。ならびに本研究を進めるにあたり、終始ご協力頂きました神奈川歯科大学大学院口腔科学講座環境病理学分野 猿田樹理准教授、神奈川歯科大学大学院口腔科学講座歯科形態学分野 東雅啓助教に深く感謝いたします。さらに、統計解析は、社会歯科学分野 湊田慎也助教のご指導を受けました厚く御礼申し上げます。最後に、多くの示唆を頂いた神奈川歯科大学大学院口腔科学講座の皆様にも深く感謝いたします。

文献

1. Saruta J, Sato S, Tsukinoki K. The role of neurotrophins related to stress in saliva and salivary glands. *Histol Histopathol* 125:1317-1330, 2010.
2. Tsukinoki K, Saruta J. Role of stress-related brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the rat submandibular gland. *Acta Histochem* 45: 261-267, 2012.
3. Human LH. Saliva as a Diagnostic Specimen, *Am Soc Nutri Sci* : 1621S-1625S, 2001.
4. Qin R, Steel A, Fazel N. Oral mucosa biology and salivary biomarkers, *Clin Der* 35: 477-483, 2017.
5. Shiiki N, Tokuyama S, Sato C, Kondo Y, Saruta J, Mori Y, Shiiki K, Miyoshi Y, Tsukinoki K. Association between saliva PSA and serum PSA in conditions with prostate adenocarcinoma. *Biomarkers* 16: 498–503, 2011.
6. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 6: 78–95, 2010.
7. Äyräväinen L, Heikknen AM, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Moilanen E, Hamalainen M, Tervahartiala T, Meurman JH, Leirisalo-Repo M, Sorsa T. Anti-rheumatic medication and salivary MMP-8, a biomarker for periodontal disease. *Oral*

Dis 10: 1–10. 2018.

8. Äyräväinen L, Heikknen AM, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Laasonen L, Moilanen E, Hamalainen M, Tervahartiala T, Meurman JH, Leirisalo-Repo M, Sorsa T. Inflammatory biomarkers in saliva and serum of patients with rheumatoid arthritis with respect to periodontal status. *Ann Med* 50: 333–344, 2018.

9. van de Stadt LA, de Koning MH, van de Stadt RJ, Wolbink G, Dijkmans BA, Hamann D, van Schaardenburg D. Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 63: 3226–3233, 2011.

10. 大村浩一郎. 抗シトルリン化蛋白抗体の産生機序. *医学のあゆみ* 256: 1187-1191, 2016.

11. 荒木智奈美, 林伸英, 森山雅子, 森信早穂子, 向井正彦, 小柴賢洋, 河野誠司, 熊谷俊一. 関節リウマチ検査である抗環状シトルリン化ペプチド抗体 (抗CCP 抗体) の有用性, *臨床病理* 52: 966-972, 2004.

12. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheumatol* 43: 155–163, 2000.

13. Verheul MK, Bohringer S, van Delft MAM, Jones JD, Rigby WFC, Gan RW,

Holers VM, Deane K, Edison JD, Deane KD, Janssen KMJ, Brink M, Rantapää-Dahlqvist S, Huizinga TWJ, van der Helm-van Mil AHM, van der Woude D, Toes REM, Trouw LA. The combination of three autoantibodies, ACPA, RF and anti-CarP antibodies is highly specific for rheumatoid arthritis: implications for very early identification of individuals at risk to develop rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 10: 1002, 2018.

14. Kurowska W, Kuca-Warnawin EH, Radzikowska A, Maslinski W. The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Central Eur J Immunol* 42: 390–398, 2017.

15. Hashimoto M, Yamazaki T, Hamaguchi M, Morimoto T, Yamori M, Asai K, Isobe Y, Furu M, Ito H, Fujii T, Terao C, Mori M, Matsuio T, Yoshitomi H, Yamamoto K, Yamamoto W, Bessho K, Mimori T. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in preclinical stage of arthritis patients. *PLoS One* 10: e0122121, 2015.

16. Li R, Tian C, Postlethwaite A, Jiao Y, Garcia-Godoy F, Pattanaik D, Wei D, Gu W, Li J. Rheumatoid arthritis and periodontal disease: What are the similarities and differences? *Inter J Rheuma Dis* 20: 1887–1901, 2017.

17. Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther* 12: 218, 2010.

18. 大村浩一郎. ACPA (anti-citrullinated peptide/protein antibody)の出現機序. 日本臨床 72: 49-52,2014.
19. Terao C, Asai K, Hashimoto M, Yamazaki T, Ohmura K, Yamaguchi A, Takahashi K, Takei N, Ishii T, Kawaguchi T, Tabara Y, Takahashi M, Nakayama T, Kosugi S, Sekine A, Fujii T, Yamada R, Mimori T, Matsuda F, Bessho K. Nagahama Study Group, Significant association of periodontal disease with anti-citrullinated peptide antibody in a Japanese healthy population—The Nagahama study. *J Autoimmun* 59: 85–90, 2015.
20. 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, 第 59 巻: 266-272, 2016.
21. Araújo VM, Melo IM, Lima V. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. *Mediators Inflamm*, ID 259074: 2015.
22. Wei P, Li C, Qiang L, He J, Li Z, Hua H. Role of salivary anti-SSA/B antibodies for diagnosing primary Sjögren's syndrome. *Medicina Oral Patologia Oral Cir Bucal* 20: e156–160, 2015.
23. 美島健二. 唾液腺の基礎知識と唾液産生の仕組み, 非侵襲的検体検査の最前線: 38-45, 2015

24. 杉谷博士. 唾液腺と唾液の基礎知識. *BIO INDUSTRY* 29: 9–16, 2012.
25. Matsuki C, To M, Kondo Y, Sugiyama H, Yamamoto Y, Shimizu T, Kamata Y, Saruta J, Tsukinoki K. Associations between brain-derived neurotrophic factor and estradiol in women's saliva. *Neuro Endocrinol Lett* 35: 236–241, 2014
26. 8020 調査研究事業 全国4県で実施された高齢者に対する疫学調査の結果から <https://www.8020zaidan.or.jp/reseach/result.html>
27. 安田 忠司, 佐藤 匠, 松下 至宏, 澁谷 俊昭. *Porphyromonas gingivalis* を口腔感染させたコラーゲン誘発関節炎モデルマウスの解析. *日本歯科保存学雑誌* 61: 214-224, 2018
28. Cordova KN, Willis VC, Haskins K, Holers VM. A citrullinated fibrinogen-specific T cell line enhances autoimmune arthritis in a mouse model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 190: 1457–1465, 2013.
29. de Molon RS, Hsu C, Bezouglaia O, Dry SM, Pirih FQ, Soundia A, Cunha FQ, Cirelli JA, Aghaloo TL, Tetradis S. Rheumatoid arthritis exacerbates the severity of osteonecrosis of the jaws (ONJ) in mice. A randomized, prospective, controlled animal study. *J Bone Min Res* 31: 1596–1607, 2016.
30. Ceccarelli F, Perricone C, Colasanti T, Massaro L, Cipriano E, Pendolino M,

Natalucci F, Mancini R, Spinelli FR, Valesini G, Conti F, Alessandri C, Anti-carbamylated protein antibodies as a new biomarker of erosive joint damage in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 20: 1186, 2018.

31. 大村浩一郎. ACPA(anti-citrullinated peptide/protein antibody)の出現機序. 日本臨床 72: 49-52, 2014

32. Stobernack T, Glasner C, Junker S, Gabarrini G, Smit M, Jong A, Otto A, Becher D, Winkelhoff A.J, Diji J.M. Extracellular proteome and citrullinome of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J Proteome Res* 15: 4532–4543, 2016.

33. Laugisch, O, Wong A, Sroka A, Kantyka T, Koziel J, Neuhaus K, Sculean A, Vanables PJ, Potempa J, Moller B, Eick S. Citrullination In the periodontium--a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. *Clin Oral Invest* 20: 675–683, 2016.

34. Konig, MF, Paracha AS, Moni M, Bingham CO 3rd, Andrade F. Defining the role of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid arthritis through the study of PPAD biology. *Ann Rheumatic Dis* 74: 2054–2061, 2015.

35. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Mechin MC, Vincent C, Nachat R, Yamada M, Takahara H, Simon M, Guerrin M, Serre G. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are

expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue

inflammation. *Arthritis Rheumatol* 56: 3541–3553, 2001.

36. Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, Friday S, Li S, Patel RM, Subramanian V, Thompson P, Chen P, Fox DA, Pennathur S, Kaplan MJ. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Translational Med* 5: 178ra40, 2013.

group	Bacterial infection
control	-
P.g	+ (<i>P.gingivalis</i>)
RA	-
P.g/RA	+ (<i>P.gingivalis</i>)
E.coli/RA	+ (<i>E.coli</i>)

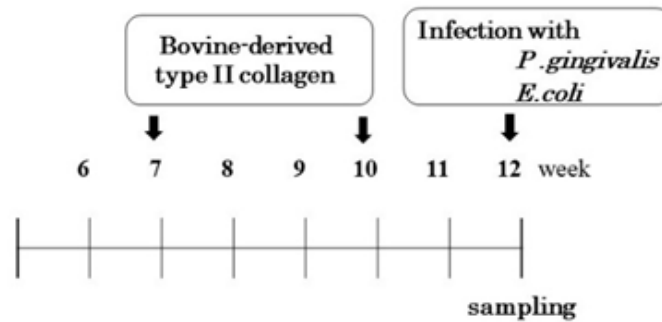


図1. グループおよび細菌投与

マウスを5つのグループに分類した DBA マウスに7週齢および10週齢でII型コラーゲンを投与した。12週齢で *P.gingivalis* または *E.coli* を感染させ、その5日後にサンプリングを行った。各群4匹ずつサンプリングを行った。



図 2. 足首の状態

(a) Control 群、(b) Pg 群、(c) Ec/RA 群、(d) RA 群、(e) Pg/RA 群

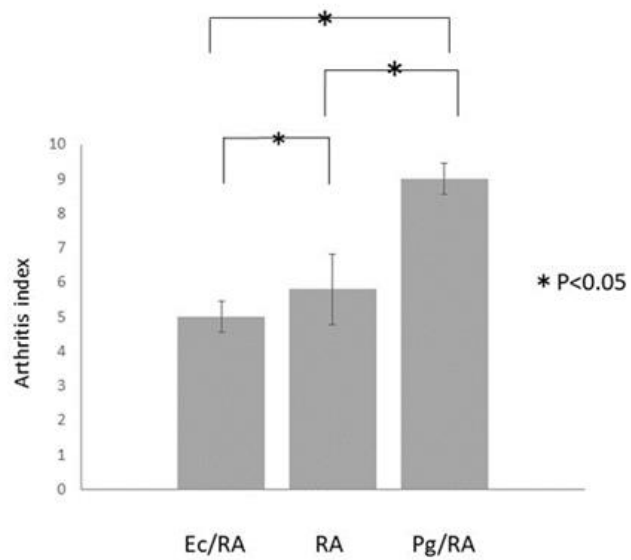


図 3. 関節炎指数

Welch の補正による一元配置分散分析の後、Bonferroni 検定で多重比較検定を用いて Ec / RA 群、RA 群および Pg / RA 群間の比較を行った。Ec/RA 群、RA 群、および Pg/RA 群の間に有意差があった。対照群と Pg 群のスコアは 0 だったため、比較に含めなかった。

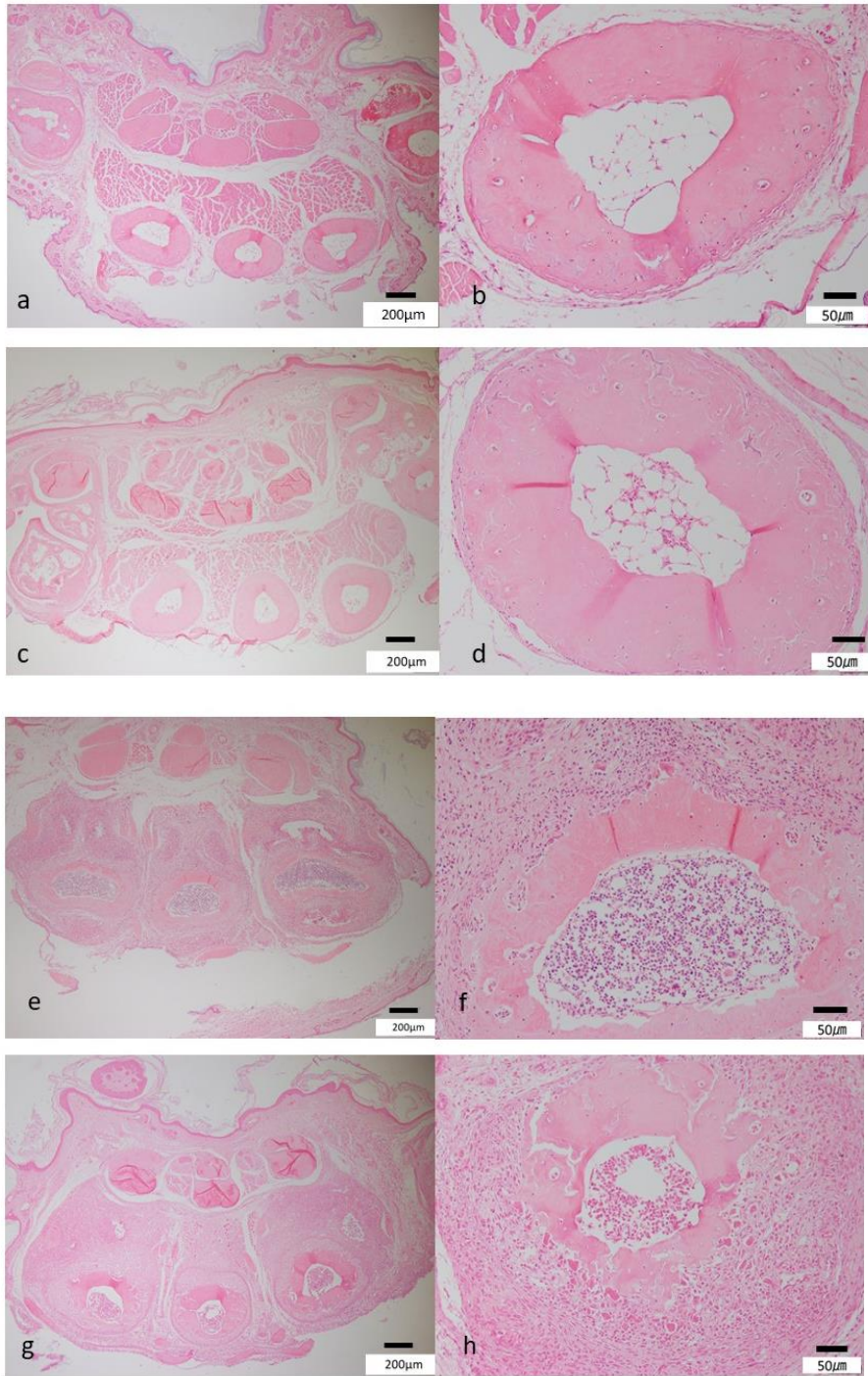
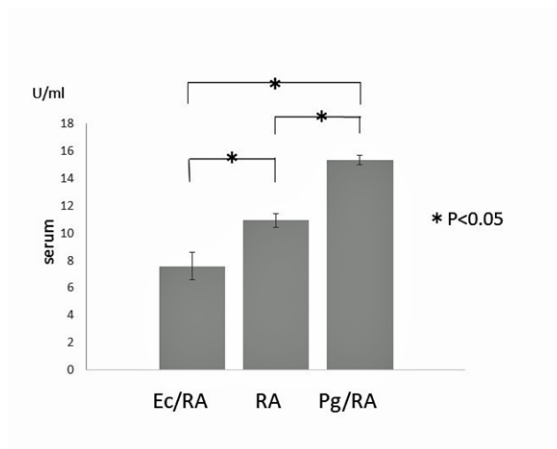


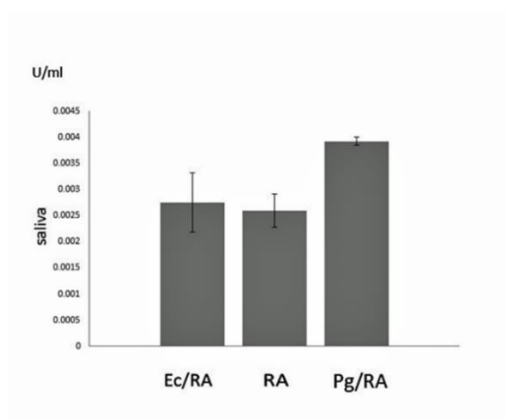
図 4. 足骨の HE 染色

Scar Bar は 50µm または 200µm を表す (図 4 a-h)。(a, b) Control 群の足骨 (c, d) Pg 群の足骨 (e, f) RA 群の足骨、好中球が多く認められる。(g, h) Pg/RA 群の足骨、骨の破壊を認める。

a



b



c

	n	P	r
RA group	4	0.120	0.880
Pg/RA group	4	0.028	0.972

図 5. 血清中、唾液中の抗 CCP 抗体量の比較

Welch の補正による一元配置分散分析を行った後、Bonferroni 検定で多重比較検定を用いて Ec/RA 群、RA 群および Pg/RA 群間の比較を行った。Control 群と Pg 群のスコアは 0 だったため、比較に含めなかった。血清中の抗 CCP 抗体価は、Ec/RA 群および RA 群よりも Pg/RA 群の方が有意に高かった(a)。唾液中の抗 CCP 抗体の量は、Pg/RA 群が他の群よりも高い傾向にあった (b)。血清および唾液中の相関は、Pearson の相関係数を用いて分析した。Pg/RA 群の血液と唾液中の抗 CCP 抗体量に相関を認めた (c)。

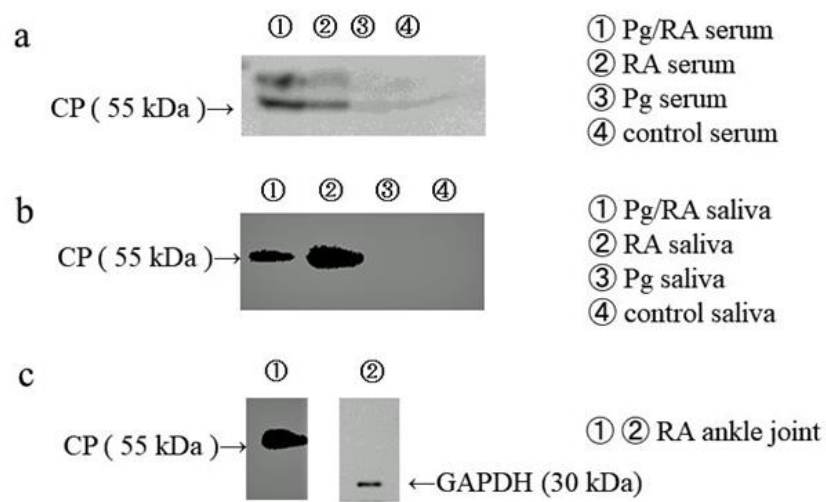


図 6. Western Blotting 結果

全群の血清 (a) および唾液 (b) を用いてシトルリン化タンパクの検出を行った。(c) 関節リウマチにおける足首関節と GAPDH。RA 群および Pg/RA 群の血清および唾液から 55kDa 付近にシトルリン化タンパク質が検出された。