

平成22年 5 月 6 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390535
 研究課題名（和文）歯周炎・膠原病のリスク遺伝子多型分類に基づく RNA 発現とタンパク同定
 研究課題名（英文）RNA and protein expression based on risk gene polymorphisms in periodontitis and collagen diseases
 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

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯周病と膠原病の感受性に関わる共通遺伝子を解明し、感受性に関連した歯肉組織中の RNA 発現と好中球におけるタンパクを同定することを目的とした。解析の結果、歯周炎・膠原病患者の Fc 受容体、インターロイキン 1, 6 の関連が明確となり、また好中球産生タンパクとしてシトルリン化変換酵素タンパクの発現亢進、さらに歯周炎歯肉組織での共通変動遺伝子発現が同定された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the role of genes in regulation of signal expression in relation to susceptibility to periodontitis and collagen diseases. Our results indicated Fc receptor, IL-1, IL-6 genotypes were related with susceptibility of two diseases. And also, protein arginine deiminase type 4 of leukocytes was determined, and common differential RNA expression from gingival tissues was observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周炎、膠原病、リスク遺伝子、RNA 発現、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周炎の遺伝的背景の解明は 1990 年代後半から国内外で精力的に行われ、約 100 編以上の国際学術論文が報告されている。その約半数はインターロイキン 1 等のサイトカイン関連遺伝子であり、次いで Fc レセプター遺伝子が多い。報告者らは歯周炎感受性を規定する一連の遺伝子多型の関連解析を行い、Fc レセプター遺伝子多型と歯周炎感受

性が関連することを報告した（国際学術論文計 15 編）。しかしながら、従来の候補遺伝子アプローチ法で統計的に特定したリスク遺伝子は、歯周炎の病態形成のメカニズムにおいて不明点が多い。歯周炎病因論に基づいた遺伝子診断を確立するためには、これまで特定してきた Fc レセプターリスク遺伝子多型の情報に対応したコードタンパクのプロファイル解析（プロテオーム解析）を同時

に実施することが必要不可欠である。

(2) 膠原病の一つである関節リウマチは歯周炎と極めて類似した病態を示し、関節リウマチ患者で歯周炎罹患率が高いこと、ならびにFcレセプター遺伝子多型が両疾患患者に関与することが示されている。したがって、歯周炎と関節リウマチには共通した病因因子があると考えられ、その発症メカニズムを解明することが必要である。

2. 研究の目的

本研究では歯周炎の感受性に関わるFcレセプター遺伝子の特定と遺伝子情報の発現制御メカニズムの解明を目的としている。そのため、以下の3種の解析を主に実施する。

- (1) 遺伝子多型のタイピングと遺伝子型分布解析によるリスク遺伝子型の特定
- (2) Fcレセプターリスク遺伝子型と炎症性サイトカインならびに特異的抗体産生能との関連を解析
- (3) Fcレセプター遺伝子型コードタンパクのプロテオーム解析
- (4) 歯周炎歯肉組織特異的遺伝子発現プロファイルを同定する。

3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントが得られた歯周炎患者、関節リウマチ患者および健常者を対象に歯周診査を実施後に末梢血を採取した。すべての血液検体、診査結果は個人情報保護の観点から匿名・記号化した。末梢血よりゲノムDNAを抽出し、各種Fcレセプターの遺伝子型をPCR法ならびにインベーター法にて決定した。Fcレセプター遺伝子ごとに遺伝子型の分布(頻度)が群間で異なるか否かを統計学的に検証した。

(2) 前述した(1)の対象者の末梢血の一部から血清を分離し、血清中の各種の炎症性サイトカイン(IL-1b, IL-6, IL-12, IL-18, TNF-a)濃度をELISA法にて測定した。また、免疫グロブリンG抗体ならびに歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 外膜タンパク抗原に対する特異的抗体の産生量もELISA法にて測定した。これらの測定値が、Fcレセプター遺伝子型間で異なるか否かを統計学的に検証した。

(3) 前述(1)対象者の末梢血の一部より二重密度勾配遠心法を用いて好中球分画を分離した。更に、遠心にて細胞分画を濃縮した後、タンパク溶解処理、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。Fc

レセプター遺伝子型間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び、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 Inr データベースを参照してコードタンパクを同定した。

(4) 限局型重度慢性歯周炎と診断され、患者3名をマイクロアレイ解析の対象とした。歯周外科手術が必要と診断された部位より歯周炎罹患歯肉組織及び同術野の臨床的健常歯肉組織を採取後、RNA stabilization 溶液中で安定化させ、AGPC法にてtotal RNAを抽出・DNase処理を行った。RNAの品質はアジレント 2100 バイオアナライザーを用いて確認した。Affimetrix社製のGeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (>47000 transcripts / >54000 probe sets)を用いてマイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) インフォームドコンセントが得られた歯周炎患者100名、歯周炎を有する関節リウマチ患者86名および健常者100名を対象に、歯周診査後に末梢血ゲノムDNAを対象にFcレセプター、インターロイキン1遺伝子型をインベーター法で決定した。その結果、3種のFcレセプター(IIA, IIIA, IIIB)の遺伝子型の分布に統計学的な有意差は認められなかった。一方、インターロイキン1(IL-1B +3954)遺伝子型の分布において群間での有意な偏りが見られ、IL-1B +3954 Tアレルの頻度は、歯周炎を有する関節リウマチ患者群で有意に高かった(Kobayashi et al. J Periodontol 2007)。更に、規模を大きくした対象(歯周炎患者117名、関節リウマチ患者153名、健常者108名)で、他の16種のサイトカインの遺伝子型を解析したところ、同じ結果が得られた(Kobayashi et al. J Periodontol 2009)。以上の研究成果から、Fcレセプター(IIA, IIIA, IIIB)の遺伝子は対象集団によっては必ずしもリスク因子になりえないことが示唆された。このような結果が認められた説明として、遺伝子情報の発現がゲノムメチル化によって影響を受けている可能性が考えられる。今後は、遺伝子多型と疾患感受性との関連を明らかにするためにはエピジェネティクス解析が必要と考えられる。また、IL-1B +3954 遺伝子多型が歯周炎と関節リウマチの共通したリスク因子である可能性を世界で初めて報告し、国内外の歯周病専門医、歯周病研究者に大きなインパクトを与え、最近の歯周病とリウマチ疾患の関連に関するレビュー(de Pablo et al. Nat Rev Rheumatol 2009)にも引用された。IL-1B +3954 遺伝子がどのようなメカニズム

で2つの疾患に関わっているか、今後明らかにしていく必要がある。

(2) インフォームドコンセントが得られた健康者 12 名を対象に、採取した末梢血よりゲノム DNA を抽出し Fc レセプター-IIa 遺伝子型を PCR 法で決定した。残りの末梢血から単核細胞を分離し、Fc レセプター-IIa 遺伝子型ごとに免疫グロブリン G 2 刺激時のインターロイキン 1 産生能を測定した。その結果、Fc レセプター-IIa- H131 保有者は非保有者と比べてインターロイキン 1 産生能が有意に高かった (表 1 : Yamamoto et al. Int J Immunogenet 2007)。また、インフォームドコンセントが得られた慢性歯周炎患者 47 名を対象に、採取した末梢血よりゲノム DNA を抽出し Fc レセプター-IIb 遺伝子型をダイレクトシーケンス法で決定した。残りの末梢血から血清を分離し、*Porphyromonas gingivalis* 外膜タンパク抗原に対する特異的抗体価を測定した。その結果、Fc レセプター-IIb-232T 保有者は、非保有者と比べて *P. gingivalis* 外膜タンパク抗原に対する抗体産生能が有意に低下した (図 1 : Honma et al. J Periodont Res 2008)。以上の研究成果から、Fc レセプター-IIa および IIb のリスク遺伝子型は、炎症性サイトカインならびに特異的抗体産生能を制御することにより歯周炎の感受性を規定している可能性が示唆された。このように、リスク遺伝子が、どのようなメカニズムで歯周炎に関わっているかを機能的に明らかにした報告は世界でも極めて少なく、国内外の歯周病専門医、歯周病研究者に与えたインパクトは非常に大きい。

FcγRIIIa genotype	n	% of IL-1β-producing cells
H/H131	5	70.4 ± 6.8 ^{ab}
R/H131	4	40.7 ± 9.3
R/R131	3	29.0 ± 6.7

表 1 Fc レセプター-IIa 遺伝子型と免疫グロブリン G 2 刺激時の単核細胞インターロイキン 1 産生能

(3) インフォームドコンセントが得られた健康者 10 名を対象に末梢血より二重密度勾配遠心法を用いて好中球分画を分離して、*P. gingivalis* 外膜タンパク抗原に対する IgG1 抗体刺激で誘導されるタンパク発現を Fc レセプター-IIb 遺伝子型ごとに解析した。その結果、統計学的に有意に容積の異なるタンパクが計 6 スポット検出された。同定した結果、NA1 タイプでは好中球機能に関わるタンパクが強く発現しており、一方、NA2 タイプでは関節リウマチの病原因子で自己免疫応答に

関与すると考えられているシトルリン化変換酵素タンパクの発現亢進が見られた。以上から、Fc レセプター-IIb-NA2 遺伝子保有者は、そのコードタンパクにより自己免疫応答が誘発されて、その結果、歯周炎に対する感受性が高まった可能性が示唆された。更に、Fc レセプター-IIb-NA2 遺伝子は、歯周炎と関節リウマチの共通リスク因子となる可能性も示唆された (論文投稿中)。

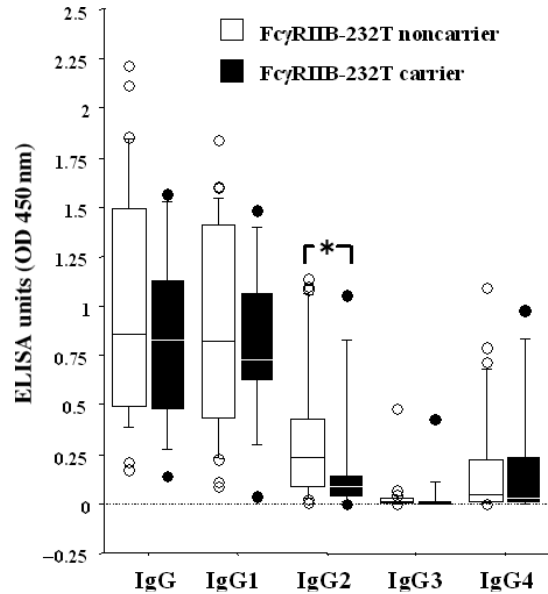


図 1 Fc レセプター-IIb 遺伝子型と *Porphyromonas gingivalis* 外膜タンパク抗原に対する特異的抗体価

(4) 関節リウマチを伴う歯周炎患者と歯周炎患者とでは、各 Fc レセプター-遺伝子 (IIA, IIB, IIIA) の遺伝子型分布において有意差はなく、インターロイキン 1-B (IL-1B) +3954 のみに有意差が認められた。また、関節リウマチの活動度と血清中のインターロイキン 6、腫瘍壊死因子、ならびに歯周ポケット内炎症レベルとの間に有意な相関が認められた。以上から、これら 2 種のサイトカインは歯周炎と関節リウマチの共通リスク因子で、早期発見の生物学的指標になりうる可能性が示唆された。

(5) GeneChip® expression array 解析の結果、歯周炎罹患歯肉組織中で統計学的に有意に 2 倍差以上の発現変動を認めた遺伝子数は、それぞれ上昇 : 94, 41, 955、減少 : 64, 32, 40 であった。全例に共通して発現上昇したのものには、Interleukin 1 beta など cytokines や chemokine ligands/receptors など炎症・免疫応答に関する遺伝子が、低下したものでは、keratin, dermokine など上皮や細胞骨格に関わる遺伝子が多い傾向が見られた。

一方、Gene Ontology 頻度解析より歯周炎罹患組織に共通して発現が2倍以上有意に変動した生物学的 Pathways は、Leukocyte transendothelial migration, Hemotopoietic, Cytokines-receptors, ECM-receptors, Wnt-signaling, Toll-like receptor signaling などが上昇し、Cell communication, Arachidonic acid metabolism などが減少した。

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 10 件)

- ① Kobayashi T, Murasawa A, Komatsu Y, Yokoyama T, Yamamoto K, Ishida K, Abe A, Yamamoto K, Yoshie H. Serum cytokine and periodontal profiles in relation to disease activity of rheumatoid arthritis in Japanese adults. J. Periodontol. 2010 in press. 査読有り
- ② Kobayashi T, Nagata T, Murakami S, Takashiba S, Kurihara H, Izumi Y, Numabe Y, Watanabe H, Kataoka M, Nagai A, Hayashi J, Ohyama H, Okamatsu Y, Inagaki Y, Tai H, Yoshie H. Genetic risk factors for periodontitis in a Japanese population. J Dent Res. 88(12): 1137-1141, 2009. 査読有り
- ③ Kobayashi T, Murasawa A, Ito S, Yamamoto K, Komatsu Y, Abe A, Sumida T, Yoshie H. Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. J. Periodontol. 80(5):792-799, 2009. 査読有り
- ④ Tsutsumi A, Kobayashi T, Ito S, Goto D, Matsumoto I, Yoshie H, Sumida T. Mannose binding lectin gene polymorphism and the severity of chronic periodontitis. Jpn. J. Clin. Immunol. 32(1):48-52, 2009. 査読有り
- ⑤ Tabeta K, Shimada Y, Tai H, Ishihara Y, Noguchi T, Soga Y, Takashiba S, Suzuki G, Kobayashi T, Oka A, Kobayashi T, Yamazaki K, Inoko H, Yoshie H. Assessment of chromosome 19 for genetic association in severe chronic periodontitis. J. Periodontol. 80(4):663-671, 2009. 査読有り
- ⑥ Honma Y, Sugita N, Kobayashi T, Abiko Y, Yoshie H. Lower antibody response to *Porphyromonas gingivalis* associated with immunoglobulin G Fcγ receptor IIB polymorphism. J Periodont Res. 43 (6):706-711, 2008. 査読有り
- ⑦ Komatsu Y, Galicia JC, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Association of interleukin-1 receptor antagonist +2018 gene polymorphism with Japanese chronic periodontitis patients using a novel genotyping method. Int. J. Immunogenet. 2008. 35(2):165-170, 2008. 査読有り
- ⑧ Kubota T, Itagaki M, Oshino C, Nagata M, Morozumi T, Kobayashi T, Takagi R, Yoshie H. Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. J. Periodontol. 79(1):166-173, 2008. 査読有り
- ⑨ Kobayashi T, Ito S, Kuroda T, Yamamoto K, Sugita N, Narita I, Sumida T, Gejyo F, Yoshie H. The interleukin-1 and Fcγ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with rheumatoid arthritis and periodontitis. J. Periodontol. 78(12):2311-2318, 2007. 査読有り
- ⑩ Yamamoto K, Kobayashi T, Sugita N, Tai H, Yoshie H. The FcγRIIa polymorphism influences production of interleukin-1 by mononuclear cells. Int. J. Immunogenet. 34 (5):369-372, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小林哲夫. 関節リウマチ活動度と歯周疾患重症度との関連性. 日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会 (第 131 回)、2009 年 10 月 30 日、仙台.
- ② 横山智子. 歯周炎感受性に関わる好中球 FcγRIIIb 遺伝子多型のプロテオーム解析. 第 52 回秋季日本歯周病学会学術大会、2009 年 10 月 11 日、宮崎.
- ③ 小林哲夫. 関節リウマチおよび歯周炎感受性に関わるサイトカイン遺伝子多型. 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会、2009 年 5 月 15 日、岡山.
- ④ Kobayashi T. Gene Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis and Periodontitis in Japanese. The 4th Pan European Federation of International Association for Dental Research. September 11, 2008. London.
- ⑤ Kobayashi T. Functional gene polymorphisms in rheumatoid arthritis and periodontitis. The 93rd. Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, October 29, 2007.

Washington DC.

[図書] (計1件)

- ① 小林哲夫、吉江弘正、医歯薬出版、
Preventive Periodontology 臨床を支えるサイエンスを知る、唾液検査を活用する、生活習慣病を予防する、2007、161-164.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉江 弘正 (YOASHIE 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

成田 一衛 (NARITA ICHIEI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：20272817

久保田 健彦 (KUBOTA TAKEHIKO)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：50303136