

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791607
 研究課題名 (和文) フィブリノゲン遺伝子多型は歯周炎発症の有力なリスクファクターになり得るか？
 研究課題名 (英文) Exploring the possibility of the fibrinogen gene polymorphism as a prepotent risk factor of pathogenesis of periodontitis.
 研究代表者
 両角 俊哉 (MOROZUMI TOSHIYA)
 新潟大学・医歯学総合病院・助教
 研究者番号：20444151

研究成果の概要：

フィブリノゲンは急性炎症時の血液凝固・止血反応において重要な機能を果たす蛋白質として知られる。高濃度フィブリノゲンは過度の血栓形成や出血傾向をもたらし、冠状動脈性心疾患や脳梗塞に対する有意な独立した危険因子となる。B β フィブリノゲン・プロモーター領域には 6 つの遺伝子多型が存在するが、実際にどの多型が機能を有しているのかはわかっていない。そこで全ての組み合わせを作製し、同時に機能解析を行った。その結果、-1420G/A と-148C/T がサプレッサーとして、-854G/A がエンハンサーとしての機能を有することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

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：フィブリノゲン、遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周炎は、歯周病原細菌による感染とそれに伴う炎症メディエーターの産生が原因となり、歯周組織破壊をもたらす感染症である (Baker, *Microb Infect* 2000)。個人により歯周炎の程度には差があり、歯周炎に

対する生体の感受性の相違には遺伝要素が大きく関わっている (Michalowicz et al, *J Dent Res* 1991; Kornman et al, *J Clin Periodontol* 1997)。また、炎症の急性期反応はサイトカインなど様々な炎症性メディ

エイターにより起こされ、調整されている (Jumning & Vilcek *Lab Invest* 1989)。さらには、感染と炎症が起きている状態において、急性期蛋白レベルは全身的にも局所的にも上昇することが知られている (Hidaka et al, *J Periodontol* 1982)。

(2) フィブリノゲン (血液凝固 I 因子) は IL-6 の誘導により肝細胞において産生される急性期蛋白質であり、血液凝固・止血反応の最終段階において重要な機能を果たしている。フィブリノゲンは炎症状態では平常時の 2~10 倍にも増加し (Downton & Colten, *Sem Hematol* 1988)、高/低濃度のフィブリノゲン分泌は過度の血栓形成や出血傾向をもたらす (Wu et al, *Am J Epidemiol* 2000)。特に高濃度フィブリノゲンは炎症性サイトカインを増加させ、炎症部位に多くの白血球を引き寄せるため、冠状動脈性心疾患や脳梗塞に対する有意な独立した危険因子として知られている (Perez & Roman, *J Immunol* 1995)。それら疾患の易罹病性や病型、発症の機序にはフィブリノゲンの遺伝子多型、とりわけ B β 鎖における遺伝子多型が大きく関わっていると言われているが (Roy et al, *J Biol Chem* 1990)、そのメカニズムについては未だよくわかっていない。

(3) 病変した歯周組織では、血液凝固カスケードの連続的な局所的活性が示されている (Sahingur et al, *J Periodontol* 2003)。また、フィブリノゲンはバイオフィルムの形成や付着をプロモートする細菌と相互に影響することも知られている (Sharma et al, *Infect Immun* 1998)。これらの特性より、近年、フィブリノゲンが歯周炎の病因に大きく関与している可能性が指摘されている (Sahingur et al, *J Periodontol* 2003)。しかしながら、それらを分子生物学的に解明した報告は未だない。

(4) 本研究代表者はこれまでに遺伝学的手法を用いて、好中球における歯周炎易感受性に関する特異的遺伝子の特定や (Morozumi et al, *J Periodont Res* 2001; Kubota et al, *J Periodont Res* 2001)、歯周炎患者におけるマトリックス・メタロプロテアーゼ-1, -3 の遺伝子多型解析 (Itagaki et al, *J Clin Periodontol* 2004) を行い、歯周炎の遺伝子診断の一助となるべくそれらの解明に取り組んできた。

2. 研究の目的

B β フィブリノゲン・プロモーター領域においては、現在までに 6 種類の遺伝子多型 (-1420G/A, -993C/T, -854G/A, -455G/A, -249C/T, -148C/T) の存在が報告されているが、機能的役割を有する遺伝子多型の特定までには未だ至っていない。そこで、本研究では次の 2 点について明らかにしたい。

(1) B β フィブリノゲン・プロモーター領域において生理学的な役割を有する遺伝子多型を、細胞レベルでの遺伝子機能解析により特定する。

(2) 歯周炎患者における B β フィブリノゲン・プロモーター領域遺伝子多型の分布を調べ、それら遺伝子型と歯周炎との相関、遺伝子型とフィブリノゲン・IL-6 産生量の相関、歯周炎とフィブリノゲン・IL-6 産生量の相関について調べ、フィブリノゲンの歯周炎のリスクマーカーとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

【平成 19 年度】

- (1) 被験者：インフォームド・コンセントが得られ、全身疾患及び歯周疾患のない健常人 1 名。
- (2) レポータープラスミドの作製：被験者より末梢血 5 ml を採取し、DNA Extractor SP kit (WAKO) を用いてゲノム DNA を抽出、精製する。

B β フィブリノゲンのプロモーター領域（約1600bp）をPCR増幅し、増幅部を制限酵素にて切断後、レポーターベクター（pGL3-Basic Vector, Promega）に挿入する。

(3) Site-Directed Mutagenesis：得られたレポータープラスミドをテンプレートとして、Site-Directed Mutagenesis（QuickChange II kit, Stratagene）により4種類のナチュラル・ハプロタイプ及び4種類の人工的ハプロタイプ、計8種類のレポータープラスミドを作製する。シークエンシングにより、得られた全種類のレポータープラスミドにおいて意図どおりに塩基変異がなされていること、他の余分な変異が入っていないことを確認する。

(4) 細胞への遺伝子導入：各々のレポータープラスミド及びpRL-TKVector（内部コントロール, Promega）において、FuGENE 6[®]（Roche）によるTransfection法により、DNA-脂質複合体を形成する。それら複合体はトリプレケートでプレATINGされ、最適条件下においてヒト肝癌細胞（ATCC）へ遺伝子導入される。24時間培養後、recombinant IL-6（Promega）にて細胞を16時間刺激する。

(5) 遺伝子発現解析：受動的な細胞溶解によりサンプルを調整する。ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ・アッセイ（Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System Kit, Promega）を行い、各レポーター遺伝子の発現量を測定する。

(6) 統計解析：ルシフェラーゼ・アッセイは各種3サンプルずつを計10回独立して行われ、その平均値を各回の代表値とする。ナチュラル・ハプロタイプの発現に対する各遺伝子多型発現量の割合を統計学的（Student's t-test）に解析し、比較検討する。

【平成20年度】

(1) 対象者：①実験群：新潟大学医歯学総合病院歯周病診療室を受診し、インフォーム

ド・コンセントが得られた初診時に中等度～重度の広範性歯周炎患者と診断された50名。

②対照群：全身疾患及び歯周炎がない健常人50名。

(2) 検体採取：上腕より末梢血10ml×2tubesを採取する。

①血清：末梢血10mlを遠心分離して血清を採取する。これらのフィブリノゲン、IL-6濃度をELISA法にて測定する。

②DNA：末梢血10mlからDNA Extractor SP kit（WAKO）を用いてゲノムDNAを抽出、精製する。

(3) シークエンシング：Automated Sequencer（ALF express, Pharmacia Biotech）にてB β フィブリノゲン・プロモーター領域遺伝子のダイレクト・シークエンシングを行い、ALF Win analyzing software（Pharmacia Biotech）にて解析する。シークエンシングのデータをDNASIS software（Hitachi）にて編集する。

(4) 多型解析：下記項目に関して各々の相関を調べ、比較検討する。

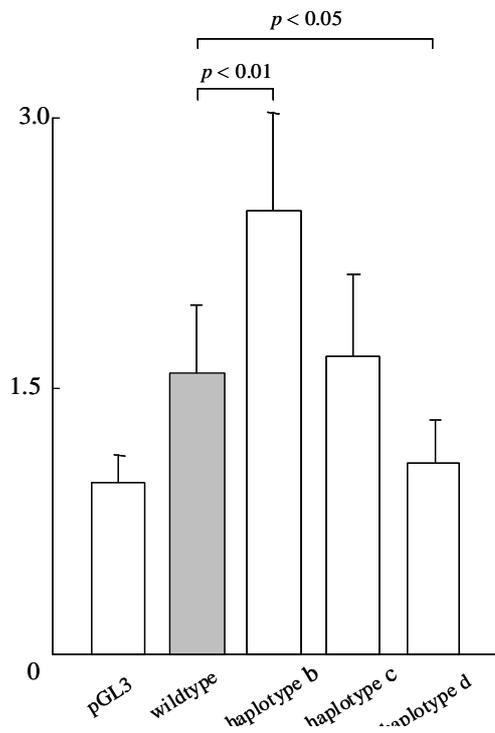
- ① 歯周炎と遺伝子多型出現頻度の相関
- ② 歯周炎とフィブリノゲン及びIL-6産生量の相関
- ③ 遺伝子多型出現頻度とフィブリノゲン及びIL-6産生量の相関

(5) 統計解析：歯周炎と遺伝子型の出現頻度の検定は χ^2 検定およびFisherの直接確率計算法を用いて、歯周炎とフィブリノゲン産生量ならびに遺伝子型とフィブリノゲン産生量の検定にはMann-Whitney検定を用いて解析する。

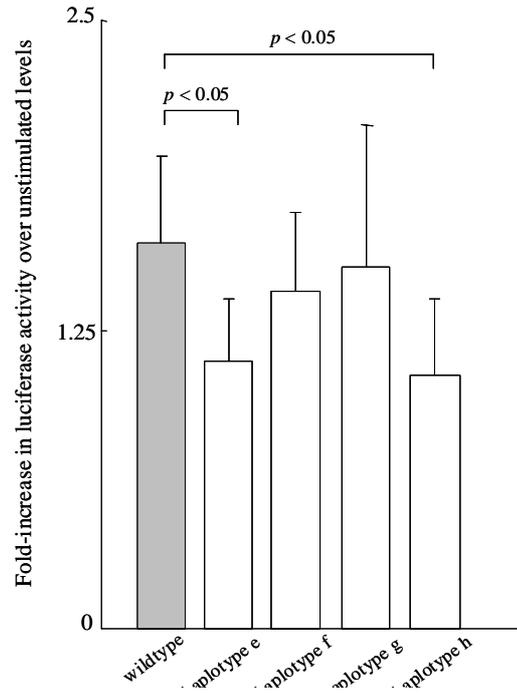
4. 研究成果

(1) B β フィブリノゲン・プロモーター領域における6種類の遺伝子多型の内、4つ（-1420G/A, -993C/T, -455G/A, -148C/T）が連鎖不均衡の関係にあることが知られている。そこで本研究において、統計学的に存在するナチュラル・ハプロタイプ4種類と、

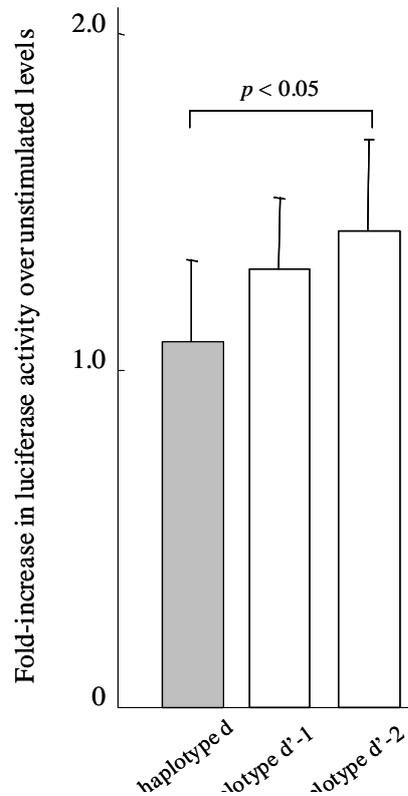
人工的ハプロタイプ 4 種類、計 8 種類のレポータープラスミドを作製した。そして、それらを肝癌細胞にトランスフェクションし、IL-6 にて刺激後、ルシフェラーゼ・アッセイにより細胞内のレポーターの発現量を同時に測定することで、どのタイプ（どの遺伝子多型）がプロモーターとしての機能を有しているのか解析し、タイプ間における比較検討を行った。その結果、wildtype に比べ、-854G/A タイプは発現量が有意に高く、連鎖不均衡タイプは有意に低かった。



(2) 次に、4つの多型から成る連鎖不均衡タイプにおいて、どの多型が実際に機能的なのかを調べた。その結果、-1420G/A と-148C/T が各々単独の場合は wildtype に比べ有意に低くなることが明らかにされた。



(3) 更に、連鎖不均衡タイプにおける-148Tを-148Cに置き換えたところ、有意に増加した。



(4) これらの結果より、-1420G/A と-148C/T はサプレッサーとして、-854G/A はエンハンサーとしての機能を有することが示唆された。

(5) 本研究は、 β フィブリノゲン・プロモーター領域において統計学的に存在する全ての遺伝子多型と、それらを構成する一塩基多型全ての機能解析を同時に測定、比較検討した国内外で初めての報告である。生理学的機能を有する遺伝子多型を特定し、それらのメカニズムを知ることは炎症反応における個人の差異の洞察という観点において非常に重要である。得られた知見は、歯周炎のみならず様々な全身疾患の遺伝子診断の指標になると同時に、それらの発症機序を解明する一助になると思われる。

(6) 歯周炎罹患者の遺伝子多型および IL-6 濃度産生量の解析は現在進行中である。

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 3 件)

1) Morozumi T, Sharma A, De Nardin E: The functional effects of the -455G/A polymorphism on the IL-6-induced expression of the β -fibrinogen gene may be due to linkage disequilibrium with other functional polymorphisms. Immunological Investigations, 査読有り. in press.

2) Kubota T, Itagaki M, Morozumi T, Maruyama S, Nakasone N, Shimizu T, Saku T, Yoshie H: A case report of multiple-drug-induced gingival overgrowth with TIMP-3 over-expression.

Oral Medicine & Pathology. 査読有り. 12: 141-148, 2008.

3) Kubota T, Itagaki M, Hoshino 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. Journal of Periodontology. 査読有り. 79: 166-173, 2008.

[学会発表] (計 5 件)

1) Morozumi T, Abe D, Shimizu T, Kubota T, Yoshie H: Effects of subgingival irrigation and rinsing with an essential oil-containing antimicrobial mouthrinse and administration of azithromycin on bacteremia due to scaling and root planning. The 94th Annual Meeting of the AAP (Poster presentations), September 6-9, 2008, Seattle, U.S.A.

2) Kubota T, Shimizu T, Abe D, Morozumi T, Yoshie H: The gene expression profile in sites with drug-induced gingival overgrowth or periodontitis-affected tissues. The 94th Annual Meeting of the AAP (Poster presentations), September 6-9, 2008, Seattle, U.S.A.

3) Kubota T, Hoshino C, Itagaki M, Morozumi T, Nohno K, Yoshie H: Altered MMP/TIMP gene expression in drug-induced gingival overgrowth patients' gingivae. The 37th SSP annual meeting in conjunction with the 11th IAP Biennial Congress (Poster presentations), September 13-15, 2007, Berne, Switzerland.

4) Morozumi T, Sharma A, Kubota T, Yoshie H, De Nardin E: Functional effects of gene polymorphisms in the β -fibrinogen promoter region. The 37th SSP annual meeting in conjunction with the 11th IAP Biennial Congress (Poster presentations), September 13-15, 2007, Berne, Switzerland.

5) 両角俊哉、吉江弘正： IL-6 誘導による B β フィブリノゲン・プロモーター領域遺伝子多型における転写活性の変化. 第 49 回歯科基礎医学会総会 (Journal of Oral Biosciences vol.49 Suppl., 2007)、2007. 8. 29-31, 札幌.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

両角 俊哉 (モロズミ トシヤ)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：20444151

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：