

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591630

研究課題名（和文） B u e r g e r 病発症メカニズムにおける T L R ・ C D 4 0 L 遺伝的多型に関する研究

研究課題名（英文） Genetic polymorphism of TLR CD40L in the mechanism of pathogenesis of Buerger's disease

研究代表者

工藤 敏文 (KUDO TOSHIFUMI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50431911

研究成果の概要（和文）：GG genotype はその頻度がコントロール群に比して Buerger 病群で有意に低く Buerger 病の抵抗性を示すことが示唆された。また Formyl peptide receptors (FPR)1 TCCCT haplotype は Buerger 病の感受性を示すことが示唆された。以上より、TLR-MyD88 pathway は歯周病と Buerger 病の病態に同時に関わっていること、および歯周病と Buerger 病との病態形成において細菌感染免疫が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88) is a key signaling adaptor for all Toll-like receptors. The frequency of GG genotype was significantly lower in the Buerger's disease patients than in the controls. The frequency of Formyl peptide receptors (FPR)1 TCCCT haplotype was significantly higher in the Buerger's Disease patients than in the controls. The results of the current study suggest that TLR-MyD88 pathway and bacterial infection immunity play a role in the mechanism of pathogenesis of Buerger's disease as well as periodontal disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1200000	360000	1560000
2010年度	700000	210000	910000
2011年度	600000	180000	780000
年度			
年度			
総計	2500000	750000	3250000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：血管外科学, Buerger 病, TLR, 歯周病, 遺伝的多型

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省指定の難病である Buerger 病 (BD) は上下肢末梢動脈の閉塞を来す疾患であり、その結果四肢の虚血症状を来す。原

因不明であるが、喫煙が危険因子であることが知られている。最近、我々は BD 患者より採取した血管病理標本から口腔内細菌が高

率に検出され、BD 患者は歯周病菌に対する IgG 抗体価も有意に高いことを見出した。これらの結果は BD 病態形成におけるグラム陰性細菌（特に歯周病菌）感染の関与を示唆するものである。グラム陰性細菌はリポ多糖 (LPS) を産生するが、LPS receptor であり、自然免疫の重要分子である CD14 には多型があり、多型に依存して炎症反応の程度に個体差があることが知られている。また、Human leukocytic antigen (HLA) は分子自己あるいは非自己抗原を T リンパ細胞に提示し、適応免疫の中心的な役割を果たしている。我々は BD 患者と健常人で CD14 及び HLA の遺伝子多型をタイピングし、Case-control 解析を行った。CD14 TT genotype、DRB1*1501 および DPB1*0501 を有する頻度は BD 症例において、有意に高かった。この研究から、CD14 と HLA 遺伝子多型はともに BD と関連し、かつ相乗効果があることが判明した。上述の一連の結果は BD の発症において、細菌感染とこれに関与する自然免疫と適応免疫の双方が重要であることが示唆されるが、BD 発症メカニズムはいまだ解明されていない。一方、動脈硬化症においては、その発症に関し炎症の関与が指摘され、内皮障害にともなう自然免疫応答、自然免疫・適応免疫双方の不適切な活性化が動脈硬化促進に重要な役割を果たしていることが報告されている。*Chlamydia pneumoniae* による感染の関与も報告された。さらに、白血球、血管内皮細胞、血小板の多彩な相互作用が重要である。

2. 研究の目的

近年になり、パターン認識受容体である Toll 様受容体 (Toll-like receptor: TLR) および CD40 の重要性が報告されるようになった。活性化された血小板表面に出現した CD40L は数分から数時間で可溶性 (soluble) sCD40L へと変化し、血中に放出される。sCD40L は

血小板血栓より放出され、①炎症、②血栓形成、③ (血管形成術後) 再狭窄の 3 つの機能を有する特異的なタンパクである。循環血中 CD40L の 95% 以上は血小板由来であり、このことから、CD40L は血小板活性化と深いつながりがあると考えられる。BD においても、細菌感染により引き起こされる炎症および血小板活性化がその発症メカニズムにおいて重要である可能性がある。最近我々のグループは TLR (2 and 4) の signaling adaptor 分子である MyD88 の遺伝子多型と BD の関連を見出した (未発表データ)。さらに、我々は BD 患者の血中 sCD40L 濃度は健常人より有意に高いことをも観察した (未発表データ)。本研究において、歯周病菌感染→炎症の惹起→血小板活性化→BD 発症へといった経路のなかで、TLR および CD40L を中心に解析を深め、BD 発症メカニズムを分子レベルでの解明を進めることを目的とする。

3. 研究の方法

感染免疫に関する分子の遺伝子多型の検索をし、Case-control 解析を行う。PCR 及び関連技術を用いる。

【被験者】(1) BD と診断された症例 60 人および健常人 60 人、(2) BD の診断には、以下に挙げる塩谷の分類を用いる。①喫煙歴、②50 歳以前の発症、③下腿動脈あるいは足部動脈の閉塞性病変、④上肢動脈病変あるいは遊走性静脈炎、⑤喫煙以外の動脈硬化症危険因子がないこと、(3) 歯周病以外の炎症部位からの影響を除外するため、足部の壊死・潰瘍症例は除く、(4) 禁煙の指導を行い、尿中コチニン濃度を測定し、確認する、(5) 採血前にインフォームド・コンセントを得る。

【方法】

(1) TLR およびその下流分子：細菌感染免疫は多数の分子が関わっており、特に TLR を中心とした関連分子が注目されている。最近

我々のグループは TLR (2 and 4) の signaling adaptor 分子である MyD88 の遺伝子多型と BD の関連を見出した (未発表データ)。さらに、CD14-TLR signal の下流分子 IFN-regulatory factor 5 (IRF5)、IRF3、IRF7 などの遺伝子多型を解析し、BD との関連を検討する。

(2) CD40 および CD40Ligand : CD40 及び CD40 Ligand 分子は動脈の血栓形成に関与するとされる。我々は BD 患者の血中 sCD40L 濃度は健全人より有意に高いことを観察した (未発表データ)。血中 sCD40L の濃度は遺伝子多型に依存する可能性があり、これらの遺伝子多型も含めて検討する。(1) 血中 sCD40L 濃度測定は、①抗血小板剤内服前、②抗血小板剤内服後 1 ヶ月、③半年後、④1 年後に行う。(抗血小板剤による sCD40L 濃度の変化を観察する。sCD40L が BD の重症度マーカーとなりうる可能性があるかどうかを検討する。)(2) BD の臨床的重症度の判定は、①自覚症状、②tcPO₂、③SPP にて行う。(3) 抗血小板剤に対する反応 (治療効果が高いかどうか) および症状の経過に関し、遺伝的多型が関与していないかどうかを検討する。(4) 歯周病の程度、IgG 抗体価も測定し、sCD40L とともに比較検討する。(5) monocyte での TLR2、4 の発現に関し、RT-PCR により定量化を行う。(6) 動物モデルの in vivo 実験、細胞培養系の in vitro 実験をし、これらの分子の発現及び血栓形成との関連も検討する。

4. 研究成果

【研究 1】TLR 及びその下流分子の遺伝子多型と Buerger 病の関連性について研究を行った。(1) MyD88 rs7744 A>G 多型 : コントロールにおいて GG genotype の頻度は 15.9% に対し Buerger 病は 6.9% と有意に低かった ($P = 0.011$, odds ratio = 0.39, 95% confidence interval; 1.13, 1.79)。したがって

GG genotype は Buerger 病の抵抗性を示すことが示唆された。(2) 追加解析 : MyD88 rs7744 A>G 多型と Takayasu 病の関連性について研究を行った。Takayasu 病でも GG genotype の頻度が低下する傾向を示しているが、有意差がなかった (11.1% vs 15.9%, $P > 0.05$)。この結果より Buerger 病と Takayasu 病との発症メカニズムの違いが示唆された。これらの研究結果を報告した。

【研究 2】Formyl peptide receptors (FPRs) の遺伝子多型と Buerger 病の関連性について研究を行った。(1) FPR1-FPR2 領域の SNP rs4801893、rs11666254、rs207045、rs2070746 および rs5030880 と Buerger 病の関連性について解析した。コントロールにおいて rs11666254 CC genotype の頻度は 31.8% に対し、Buerger 病は 44.8% と有意に高かった ($P = 0.016$, odds ratio = 1.74)。さらに、この 5 つの SNP が構成する Haplotype の頻度を解析した。コントロールに比べ、Buerger 病 FPR1 TCCCT haplotype の頻度は有意に高かった ($P = 0.0048$, odds ratio = 2.77)。したがって、FPR1 TCCCT haplotype は Buerger 病の感受性を示すことが示唆された。(2) FPR1 TCCCT haplotype が構成される SNP は FPR1 の promoter と coding 領域に位置している。我々は TLR2 の遺伝子多型と侵襲性歯周病との関連性について解析した。侵襲性歯周病 38 例と正常人コントロール 190 名において、TLR2 の Exon 1 に位置する Ins/Del 多型、Intron 1 に位置する rs7696323 と Exon 3 に位置する rs3804100 をタイピングした。その結果、コントロールにおいて Ins allele の頻度が 67.6% であったのに対し Buerger 病では 54% と有意に低かった ($OR = 0.56$, 95% confidence interval (CI); 0.34-0.92, $p = 0.022$)。さらにコントロールにおいて rs3804100 の T allele の頻度は 71.6% に対し Buerger 病は

57.9% と有意に低かった

(OR=0.55、95% CI; 0.33-0.91、p=0.018)。

したがって、これら2つの allele は Buerger 病に対し抵抗性を示すことが示唆され

た。Haplotype 解析では Ins/Del-rs7696323-rs3804100 haplotype は Ins-C-T haplotype より Buerger 病に対する抵抗性を示した (0.252 vs 0.479、p=0.0003)。

上記研究結果より、TLR-MyD88 pathway は歯周病と Buerger 病の病態に同時に関わっていること、および歯周病と Buerger 病との病態形成において細菌感染免疫が関与していることが示唆された。

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 Chen Z, Nakajima T, Inoue Y, Kudo T, Jibiki M, Iwai T, Kimura A. A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of MyD88 gene is associated with Buerger disease but not with Takayasu arteritis in Japanese. *J Hum Genet.* 2011; 56: 545-547.
- ② Notani H, Inoue Y, Sugano N, Jibiki M, Umeda M, Izumi Y. Whole-blood platelet aggregation by porphyromonas gingivalis in patients with peripheral arterial disease. *J Med Dent Sci.* 2011; 58: 7-14
- ③ Kangmin Y, Inoue Y, Umeda M, Terasaki H, Chen Z, Iwai T. The periodontal anaerobe porphyromonas gingivalis induced platelet activation and increased aggregation in whole blood by rat model. *Thromb Res.* 2011; 127: 418-425
- ④ Toyofuku T, Inoue Y, Kurihara N, Kudo T, Jibiki M, Sugano N, Umeda M, Izumi Y. Differential detection rate of periodontopathic bacteria in

atherosclerosis. *Surg Today*, 2011; 41:

1395-1400

- ⑤ 岩井武尚, 佐藤彰治, 久米博子, 井上芳徳, 梅田誠, 加賀山知子, 広川雅之. パーリャー病患者の逍遥性静脈炎、表在静脈弁不全についての考察と新知見. *静脈学* 2011 ; 22 : 25-31
- ⑥ 井上芳徳. 血管疾患と歯周病. *Angiology Frontier.* 2010; 9: 160-165
- ⑦ Iwai T, Inoue Y, Li X, Umeda M. Buerger disease: new evidence. Davies AH, Mitchell AWM Edited. *Vasc Endovasc Surg Highlights* 2008-09. London 2009 Health Press pp93-98
- ⑧ Chen YW, Nagasawa T, Wara-aswapati N, Ushida Y, Wang D, Takeuchi Y, Kobayashi H, Umeda M, Inoue Y, Iwai I, Ishikawa I, Izumi Y. Association between periodontitis and anti-cardiolipin antibodies in Buerger disease. *J Clin Periodontol.* 2009; 10: 830-835
- ⑨ 地引政利、野谷啓之、井上芳徳. 閉塞性動脈硬化症での *Porphyromonas gingivalis* による全血凝集反応の意義について. *脈管学* 2009; 49; S162
- ⑩ 井上芳徳. 歯周病と動脈硬化. 成人病と生活習慣病. 2009; 39: 514-518

[学会発表] (計 10 件)

- ① Iwai T, Inoue Y, Umeda M, Li X, Chen Z, Nakamura H, Kurihara N, Nuttawud S, Chen Y-W. The evolution of the research on Buerger Disease. Buerger Disease Forum in Chiang Mai 2011. Oral presentation. Chiang Mai, 2011.6.17-19
- ② Koizumi S, Chen Z, Takahashi M, Naruse T, Nakajima T, Chen Y-W,

- Inoue Y, Ishikawa I, Iwai T, Kume H. Synergistic contribution of CD14 and HLA Loci in the susceptibility to Buerger Disease. Buerger Disease Forum in Chiang Mai 2011. Oral presentation. Chiang Mai, 2011.6.17-19
- ③ Igari K, Yonekura K, Uchiyama H, Koizumi S, Toyofuku T, Kudo T, Jibiki M, Sugano N, Inoue Y, Iwai T. Differential diagnosis of Buerger disease. Buerger Disease Forum in Chiang Mai 2011. Oral presentation. Chiang Mai. 2011.6.17-19
- ④ Iwai T, Sato S, Kume H, Inoue Y, Umeda M, Kagayama T. Clinical study of phlebitis migrans and incompetence of the leg superficial vein in Buerger Disease. Buerger Disease Forum in Chiang Mai 2011. Oral presentation. Chiang Mai, 2011.6.17-19
- ⑤ Nuttawut S, Ishii H, Igarashi K, Miura M, Yoshida M, Inoue Y, Iwai T. Enhanced adhesion of early endothelial progenitor cells to radiation-induced senescence-like vascular endothelial cells in vitro. Buerger Disease Forum in Chiang Mai 2011. Oral presentation. Chiang Mai, 2011.6.17-19
- ⑥ Umeda M, G.Amodini R, Iwai T, Inoue Y, Izumi Y. Periodontitis and Vascular diseases, the concern of periodontal pathogens. Buerger Disease Forum in Chiang Mai 2011. Oral presentation. Chiang Mai, 2011.6.17-19.
- ⑦ Iwai T, Sato S, Kume H, Inoue Y, Umeda M, Kagayama T. Free paper session:Basic research/Varia TK4.4-2 Clinical study of Phlebitis Migrans and incompetence of the leg superficial vein in Buerger Disease. International Congress of the Union Internationale de Phlebologie European Chapter Meeting. Prague. 2011.9.15-17
- ⑧ Koizumi S, Kudo T, Jibiki M, Sugano N, Inoue Y. Porphyromonas gingivalis make platelet aggregate in whole blood. The 11th Annual Congress of Asian Society for Vascular Surgery. Oral presentation. Kyoto. 2010.6.29-7.2
- ⑨ 豊福崇浩, 井上芳徳, 寺崎宏明, 工藤敏文, 地引政利, 菅野範英, 梅田誠, 和泉雄三, 須田智也, 岩井武尚. 閉塞性動脈硬化症に対する、歯周病原細菌の関連. 第 109 回日本外科学会. 福岡. 2009. 4. 2. -4. 4
- ⑩ 地引政利, 野谷啓之, 工藤敏文, 菅野範英, 井上芳徳. 閉塞性動脈硬化症での Porphyromonas gingivalis による全血凝集反応の意義について. 第 50 回日本脈管学会. 東京. 2009. 10. 29-31.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 敏文 (TOSHIFUMI KUDO)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50431911

(2) 研究分担者

井上 芳徳 (YOSHINORI INOUE)
東京医科歯科大学・
医歯（薬）学総合研究科・講師
研究者番号：70280964

地引 政利 (MASATOSHI JIBIKI)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50422481

(3) 連携研究者

()

研究者番号：