

## 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25日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592626

研究課題名（和文） 日本人歯周病患者を対象とした抗菌ペプチド遺伝子の多型解析と疾患感受性の検討

研究課題名（英文） Analysis of association between gene polymorphisms of antimicrobial peptides and periodontitis among Japanese patients

研究代表者

稲垣 裕司（INAGAKI YUJI）

徳島大学・病院・助教

研究者番号：50380019

研究成果の概要（和文）：

歯周病患者および健常者 103 名の DNA を用いて、カルプロテクチン、 $\beta$ -ディフェンシン-1 およびラクトフェリンの既知の 7 SNPs について遺伝子多型解析を行った。その結果、 $\beta$ -ディフェンシン-1 の rs1800972 C/C 保有者において、中等度～重度慢性歯周炎のリスクが有意に高かった（オッズ比=3.692）。また被験者の一部から歯肉溝滲出液を採取して  $\beta$ -ディフェンシン-1 を定量した結果、rs1800972 C/C 保有者の  $\beta$ -ディフェンシン-1 濃度が有意に低かった。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the relationship between single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of antimicrobial peptides and periodontitis, we performed to genotype at known 7 SNPs (three SNPs of calprotectin, three SNPs of  $\beta$ -defensin-1 and a SNP of lactoferrin) in 103 Japanese individuals with or without periodontitis. The -44CC genotype of DEFB1 (rs1800972) is associated with moderate and severe chronic periodontitis (odds ratio 3.692). Furthermore  $\beta$ -defensin-1 in gingival crevicular fluids were quantified by ELISA, the peptide concentrations were significantly lower in the individuals with -44 CC genotype of DEFB1 than in those without -44CC genotype of it.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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： 歯周病、抗菌ペプチド、遺伝子多型、カルプロテクチン、ディフェンシン、ラクトフェリン、SNPs、インペーダー法

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原菌の感染に始まり歯周組織内での過剰な免疫反応が進行した結果、最終的に歯槽骨が溶け、歯が脱落する疾患である。その発症と進行には細菌以外に、年齢、性別、人種、生活習慣、遺伝的素因、全身疾患などの様々な要因が複雑に関与する。近年の研究結果から、歯周病は生活習慣病であるとともに、遺伝的因子と環境因子が関与する多因子性疾患であり、遺伝的因子の本体は遺伝子多型、特に一塩基多型 (SNP; Single Nucleotide Polymorphism) の違いによって生じることが明らかにされている。SNP はヒトゲノム 500~1000 塩基に 1 個の割合で個人間に配列の違いが見られ、ヒトゲノム 30 億塩基の約 0.1%にあたる 300 万個存在すると推定されている。医科領域では種々の病気と遺伝子多型との関連について多くの研究成果が上がっており、患者の体質に応じたオーダーメイド治療の道が開かれつつある。一方、歯周病と遺伝子多型との関連についても複数の報告があり、現在までに、炎症に関与するインターロイキンなどのサイトカインの SNP、免疫細胞に発現する Fc 受容体などの SNP、MMP などの代謝酵素の SNP が歯周病の発症や進行に関連していることが明らかにされている。

ヒトの口腔内は常に病原微生物にさらされているが、感染に対して自然免疫と獲得免疫の 2 つの免疫システムによって防御されている。これらの免疫システムのうち自然免疫は微生物の接触の初期段階から作用する。そして自然免疫において重要な役割を果たすのが抗菌ペプチドであり、真核生物では 800 種類以上の存在が知られている。しかし抗菌ペプチドの SNP と歯周疾患との関連性についての報告は少ない。また一般的に SNP と疾患との関連性には人種や地域間での差が存在すると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病患者における抗菌ペプチドの SNP を網羅的に調べ、自然免疫システムの異常が歯周病の発症や進行にどのような影響を与えているかを検討する。具体的には、日本人の歯周病患者を対象に、カルプロテクチン、 $\beta$ -ディフェンシン、ラクトフェリンの 3 種類の抗菌ペプチドの SNP を網羅的に調べ、歯周病との関連性について明らかにする。また被験者の歯肉溝滲出液 (GCF) 中に発現している抗菌ペプチドを定量し、抗菌ペプチドの SNP、その発現量、歯周病の病態という 3 者の相関関係を統計学的に処理して、抗菌ペプチドの SNP が自然免疫システムに影響を与えてその疾患感受性を引き起こしていることを明らかにする。

そして、その SNP 解析を利用して歯周病の予知や診断に役立てることを目的とする。

## 3. 研究の方法

徳島大学病院を受診した日本人の患者で、インフォームドコンセントを行い本研究の参加に同意の得られた者を被験者とした。なお本研究は、徳島大学病院ゲノム倫理委員会の承認のもとに実験を行った。被験者のクライテリアを下表に示す。

侵襲性歯周炎 ・ 残存歯数は問わない ・ 初診時に35歳以上 (40歳前半) でも病歴や主訴から侵襲性と推察できる場合は、侵襲性に診断してもよい		
限局型	初診時年齢 15~29歳	第一大臼歯・切歯に限局したCAL5mm以上が少なくとも2歯以上 (そのうち1歯は第一大臼歯) 病巣は第一大臼歯・切歯以外では2歯以内
広汎型	初診時年齢 20~35歳	CAL5mm以上が8歯以上 (そのうち第一大臼歯と切歯以外の永久歯を少なくとも3歯以上含む)  * 今回家族性は問わない (Diehl 1999, AAP: Armitage 1999)
健常者	PPD3mm超が存在しない + 平均 BLが15%以下	X線撮影が不可能の場合、8番を除く全ての部位がPPD3mm以下ならば健常者とみなす

慢性歯周炎 ・ 初診時年齢 ; 40~65歳 ・ 15歯以上残存 (機能している8番は含んでもよい)		
軽度 (健常者)	PPD3mm超が存在しない + 平均BLが15%以下 (Kornman 1997)	平均BL15%以下が絶対条件
中等度	BL 50%以上が4部位以上 + 17% ≤ 平均BL ≤ 28% (Kornman 1997)	17% ≤ 平均BL ≤ 28%が絶対条件 重度との境界域の場合、平均BLが20%台ならば中等度に含め被験対象から除外
重度	BL 50%以上が7部位以上 + 平均BLが34%以上 (Kornman 1997)	平均BL34%以上が絶対条件 中等度との境界域の場合、平均BLが30%台ならば重度に含める

侵襲性歯周炎の患者 22 名、重度慢性歯周炎の患者 25 名、中等度慢性歯周炎の患者 13 名、軽度慢性歯周炎の患者 22 名、および健常者 21 名 (侵襲性歯周炎患者に対する対照群)、合計 103 名の血液試料から DNA を抽出して、抗菌ペプチドの SNPs (カルプロテクチン ; rs3795391, rs3806232, rs3885688 の 3 SNPs,  $\beta$ -ディフェンシン-1 ; rs1799946, rs1800972, rs11362 の 3 SNPs, およびラクトフェリン ; rs1126478 の 1 SNP) を解析した。これら SNPs の配列は既知であるが、日本人歯周病患者を対象とした疾患との関連性についての報告は存在しない。SNPs の解析はインバーダー法を用い、株式会社 BML に委託した。そして sas 社の統計解析ソフトウェア JMP を用いて、各 SNPs について下記群間での

統計処理を行い、オッズ比 (OR)、95%信頼区間および有意差を求めた。

対象遺伝子(1)	部位	SNP	allele	reference
calprotectin (S100A8)	upstream from ATG start codon	rs3795391	A/G	• Annals of Human Genetics (2006) 71: 312-324
	upstream from ATG start codon	rs3806232	A/G	• J Periodont Res (2009) 44: 184-192
	upstream from ATG start codon	rs3885688	G/A	
対象遺伝子(2)	部位	SNP	allele	reference
β-defensin (DEFB1)	5'-UTR	rs1799946	G-52A	Genes and Immunity (2008) 9: 57-60
	5'-UTR	rs1800972	C-44G(668 C>G)	J Periodontol (2006) 77: 426-436
	5'-UTR	rs11362	G-20A(692 G>A)	J Clin Microbiol (2003) 41: 90-96
対象遺伝子(3)	部位	SNP	allele	reference
lactoferrin	N-terminal alpha-helical region	rs1126478	AGA(Arg) codon at position29	• Infection and Immunity (2003) 71: 6141-6147
			AAA(Lys) codon at position29	• J Periodont Res (2009) 44: 418-424

	疾患群		対照群
1	慢性歯周炎 (重度) : 25例	↔	慢性歯周炎 (軽度) : 22例
2	侵襲性歯周炎 : 22例	↔	健常者 : 21例
3	慢性歯周炎 (重度+中等度) : 38例	↔	慢性歯周炎 (軽度) : 22例
4	慢性歯周炎 (重度) + 侵襲性歯周炎 : 47例	↔	慢性歯周炎 (軽度) + 健常者 (若年者) : 43例
5	慢性歯周炎 (重度+中等度) + 侵襲性歯周炎 : 60例	↔	慢性歯周炎 (軽度) + 健常者 (若年者) : 43例

次に通法に従い、被験者の一部から GCF を採取し、GCF 中に発現している上記抗菌ペプチドを ELISA 法により定量した。ELISA 法は市販のキットを用いて行った (Human BD-1 ELISA Kit, pink-ONE; KOMA BOTECH INC, K0331251P および HUMAN LACTOFERRIN ELISA KIT; Hycult biotech, HK329)。

そして抗菌ペプチドの SNPs、その発現量、歯周病の病態 (口腔内診査およびエックス線撮影から得られた被験者の臨床データ) という 3 者の相関関係を統計学的に処理した。

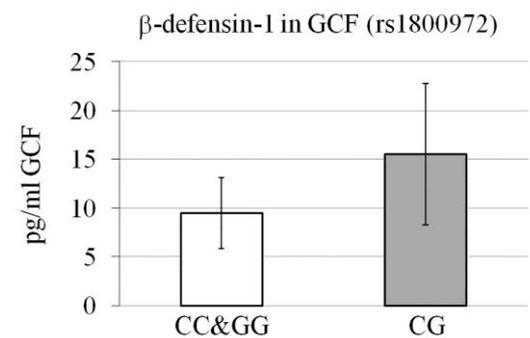
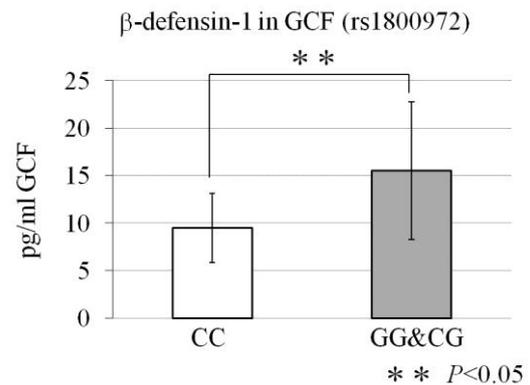
#### 4. 研究成果

(1) β-ディフェンシン-1 の SNP である rs1800972 について、「C/C vs other」で「慢性歯周炎 (重度+中等度)」VS「慢性歯周炎 (軽度)」における OR= 3.692、95%信頼区間: 1.114 ~ 13.114 が得られた。これは「rs1800972 の C/C 保有者は C/C 非保有者に比べて歯周病が 3.692 倍重症化する」ことを意味する。また rs1800972 では「C/G vs other」でも OR= 0.219、95%信頼区間: 0.057 ~ 0.753 が得られた。この「C/G vs other」は「C/G vs (C/C+G/G)」であり、ヘテロ型はホモ型に比べて歯周病のリスクが 0.219 倍であることを意味する。しかし本研究において G/G 保有者は 1 名であるのでヘテロ型とホモ型とを単純に比較することはできない。またヘテロ型と両ホモ型の比較で有意差が出る場合は生物学的な説明が難しい。上記 rs1800972 の結果を下表に示す。

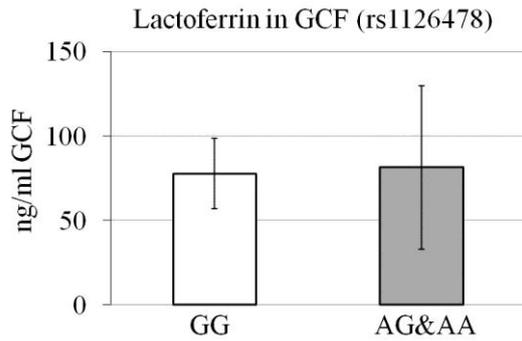
一方、それ以外のカルプロテクチン 3 SNPs、β-ディフェンシン-1 2SNPs およびラクトフェリン 1 SNPs については同じ解析手法を行ったが、「有意差あり」と出たものは無かった。

SNP	Genotype	群分け	P-value	オッズ比		
				OR	95%信頼区間	
					下限	上限
rs1800972	C/C vs other	慢性重度 vs 慢性軽度	0.057	3.635	0.973	15.744
		侵襲性 vs 健常者	0.650	1.406	0.319	6.562
		慢性重中等度 vs 慢性軽度	0.030	3.692	1.114	13.114
		慢性重度+侵襲性 vs 慢性軽度+健常者	0.087	2.353	0.888	6.599
		慢性重中等度+侵襲性 vs 慢性軽度+健常者	0.060	2.414	0.959	6.277
	C/G vs other	慢性重度 vs 慢性軽度	0.057	0.275	0.064	1.027
		侵襲性 vs 健常者	0.392	0.505	0.092	2.384
		慢性重中等度 vs 慢性軽度	0.014	0.219	0.057	0.753
		慢性重度+侵襲性 vs 慢性軽度+健常者	0.048	0.363	0.124	0.985
		慢性重中等度+侵襲性 vs 慢性軽度+健常者	0.019	0.319	0.115	0.833

次に、被験者の一部から GCF を採取し、被験者の GCF 中に発現している β-ディフェンシン-1 およびラクトフェリンを市販の ELISA キットを用いて定量した。その結果、下図に示すように上記 rs1800972 の「C/C vs other」で GCF 中の β-ディフェンシン-1 濃度に有意な差が得られた。一方、「C/G vs other」では有意な差は得られなかった。



しかしその他の β-ディフェンシン-1 の SNPs およびラクトフェリンの SNP では有意差のある結果は得られなかった (下図参照)。



以上の結果より、 $\beta$ -ディフェンシン-1 の rs1800972 において SNP (C/C vs other)、抗菌ペプチドの発現量、歯周病の病態という 3 者の相関関係が認められた。

(2) パラメーター解析 (年齢、Bone Loss: BL、BOP、PPD、CAL) では、有意差のある結果は得られなかった (rs1800972 「C/C vs other」と BL との解析で  $p=0.0816$ 、「C/G vs other」と BL との解析で  $p=0.0678$  であった)。

(3)  $\beta$ -ディフェンシン-1 の SNPs (rs11362、rs1800972、rs1799946) はハプロタイプを形成していたので、ハプロタイプでジェノタイプと同様の解析を行ったが、有意差のある結果は得られなかった。

(4) 本研究は 1 施設のみで被験者を集めたため症例数が 103 名と少なく、特に有意差の得られた  $\beta$ -ディフェンシン-1 の SNP の rs1800972 については、G/G 保有者を多数得ることが出来なかったので解析結果に限界があった。今後、本研究結果を踏まえて、多施設、大規模でスクリーニングを行えば、さらに信頼性の高い結果が得られると判断する。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

稲垣 裕司 (INAGAKI YUJI)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：50380019

### (2) 研究分担者

永田 俊彦 (NAGATA TOSHIHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号：10127847

板東 美香 (BANDO MIKA)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：10510000

(H21, H22 研究分担者)