

機関番号：13101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792118
 研究課題名(和文) 歯周炎重症化に対するフィブリノゲンとIL-6の関連 -in vivo 解析-
 研究課題名(英文) Correlation between fibrinogen and IL-6 in progression of periodontitis -in vivo analyses-
 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(和文)：フィブリノゲンは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る。申請者はこれまでにBβフィブリノゲン・プロモーター領域において、-1420G/A、-854G/A、-148C/TはIL-6刺激による活性が有意に高く、機能的多型である可能性を報告している。一方で、同領域の4つの多型(-1420G/A、-953C/T、-455G/A、-148C/T)には連鎖不均衡が人種により存在することが知られている。そこで本研究において、日本人におけるBβフィブリノゲン・プロモーター領域遺伝子多型の分布・出現頻度を解析した。その結果、日本人においても4多型間に連鎖不均衡が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fibrinogen is an acute-phase protein synthesized both by hepatic and nonhepatic cells in response to proinflammatory cytokines such as IL-6. We have demonstrated that the -1420G/A, -854G/A and -148C/T polymorphisms in the β-fibrinogen promoter region are determinants of IL6-induced activity, and could be functional polymorphisms. While, it is reported that there is a strong linkage disequilibrium in some races among the 4 common polymorphisms (-1420G/A, -993C/T, -455G/A and -148C/T).

In the study, we performed the gene polymorphism analysis in the β-fibrinogen promoter region. The results indicated that the presence of the linkage disequilibrium among the 4 common polymorphisms in Japanese population.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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、IL-6、歯周炎

1. 研究開始当初の背景

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ーターにより起こされ、調整されている(Jumning & Vilcek, Lab

Invest 1989)。また、感染と炎症が起きている状態においては急性期蛋白レベルが全身のおよび局所的に上昇することが知られている(Hidaka et al, *J Periodontol* 1982)。

(1) 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(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。

(2) B β フィブリノゲン・プロモーター領域においては6種類の遺伝子多型が存在し、人種により内4つが連鎖不均衡にあることが知られている。すなわち、白色人種においては強力な連鎖不均衡が存在しているが(Thomas et al, *Hum Mutat* 1994; Behague, *Circulation* 1996)、アフリカ系アメリカ人においては存在しないと言われている(Cook et al, *Am J Epidemiol* 2001)。一方で、日本人を始めとする東アジア人種においては国内外ともに未だ報告がない。

(3) 心疾患との関連では、過去には-455G/A

が重要視されていたが、近年の *in vitro*、*in vivo* 研究では-148C/T や-854G/A が注目されている(van't Hooft et al, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; Verschuur et al, *J Biol Chem* 2005)。申請者は先に、6種類全ての遺伝子多型において IL-6 刺激による機能解析を同時に行った。その結果、-854G/A はエンハンサーとして、-1420G/A と-148C/T はサプレッサーとして機能的な役割を有し、-455G/A は機能を有さないことが示唆された(Morozumi et al, *Immunol Investigat* 2009)。

(4) 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(Tatakis, *Semin Thromb Hemost* 1992)。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(Nagata et al, *Oral Microbial Immunol* 1994; 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(Sharma et al, *Infect Immun* 1998)。しかしながら、未だこれらの相互関係は殆ど解明されておらず、遺伝子多型に関しても1カ所の遺伝子多型(-455G/A)と歯周炎の関連を調べた報告1編のみであり(Sahingur et al, *J Periodontol* 2003)、関連の有無を決定づけるまでには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では次の3点について明らかにする。

(1) 日本人健常者における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・出現頻度を解析し、連鎖不均衡の有無を明らかにする。

(2) 侵襲性歯周炎、慢性歯周炎患者において、(1)と同様の多型解析を行い、相関性を明らかにする。

(3) 歯肉溝滲出液ならびに血清中のフィブリノーゲン、IL-6 濃度を測定し、個々の遺伝子型や歯周炎重症度との相関を解析し、フィブリノー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 21 年度】

(1) 対象者：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同意書に署名して頂いた、初診時に広汎型侵襲性歯周炎と診断された 20 名、広汎型慢性歯周炎と診断された 120 名(軽度、中等度、重度:各 40 名)、および健常人 100 名を被験者とする。診断基準は米国歯周病学会の分類に基づき (Armitage, *Ann Periodontol* 1999)、初診時に歯周組織検査、全顎デンタル・レントゲン撮影を行う。

(2) 検体採取:

① 上腕より末梢血 15 ml を採取する。その内の 10 ml は遠心分離をして血清を採取する。残り 5 ml からは DNA Extractor WB kit (WAKO) を用いてゲノム DNA を抽出、精製し、70 ng/ul に調整する (Itagaki et al, *J Clin Periodontol* 2004)。

② 歯周炎罹患部位の歯肉溝に Perio-paper® (Harco Electronics) を静置 (10 秒、2 本/部位) して得られた歯肉溝滲出液 (GCF) を Periotron 8000® (Harco Electronics) にて定量する (Morozumi et al, *J Clin Periodontol* 2004)。200 ul の PBS バッファーに浸漬、溶解させ、遠心分離により上清を回収する。

(3) 遺伝子多型解析: フィブリノーゲン・プロモーター領域の 6 部位に存在する遺伝子多

型 (-1420G/A, -993C/T, -854G/A, -455G/A, -249C/T, -148C/T) をカバーするプライマーを 3カ所に分けて設計・合成し、PCR により増幅する (Pfx50™ DNA Polymerase, Invitrogen)。得られた PCR 産物を、PCR 法と同様のプライマーで、BigDye Terminator Cycle Sequencing kit と ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシーケンシングを行う (Yasuda et al, *Genes Immun* 2003)。得られたシーケンシング・データは DNASIS software (Hitachi) にて編集する。

(4) 統計解析: 健常者と歯周炎患者における各遺伝子多型の出現頻度をカイ 2 乗検定および Fisher の直接確率計算法を用いて解析する。

【平成 22 年度】

(1) 前年と同様に検体採取を継続し、遺伝子多型のタイピングを行う。

(2) フィブリノーゲンおよび IL-6 濃度の測定: 血清および GCF 中のフィブリノーゲン濃度は、RID kits® (The Binding Site) による放射状免疫拡散法 (RID 法) によりデュプリケートで測定する (Sahingur et al, *J Periodontol* 2003)。IL-6 濃度は Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) を用いてデュプリケートで測定される (Komatsu et al, *Tissue Antigens* 2005)。

(3) 統計解析: 歯周炎重症度、各遺伝子多型の出現頻度、フィブリノーゲン及び IL-6 濃度の相関関係をクラスカル・ワリス検定およびシェフェ法により解析する。

(4) 研究成果の発表: 多型解析結果、歯周炎重症度・各濃度・多型の相関関係の結果を

国内および国際学会にて発表し、同時に各々の研究成果を論文にまとめて国際専門誌に投稿する。

4. 研究成果

(1) 日本人健常者 100 名において、B β フィブリノゲン・プロモーター領域全てをカバーする遺伝子多型解析を行った。その結果、コーカシアンと同様、6 部位に遺伝子多型 (-1420G/A, -993C/T, -854G/A, -455G/A, -249C/T, -148C/T) が存在し、内 4 つの多型 (-1420G/A, -953C/T, -455G/A, -148C/T) には連鎖不均衡が有意に存在することが確認された。この結果は、人種における個人間の差異の洞察という観点において非常に重要である。

(2) 広汎型侵襲歯周炎患者 20 名、広汎型慢性歯周炎患者 120 名における多型解析の結果、2 群間に有意差は見られなかった。

(3) 歯肉溝滲出液ならびに血清中のフィブリノゲン、IL-6 濃度、個々の遺伝子型や歯周炎重症度との相関関係の解析は現在進行中である。

(4) フィブリノゲンとそのメディエーターである IL-6 は血液凝固システムの起始部に位置し、それらの濃度と遺伝子多型との相関関係を解析することは、申請者が *in vitro* で明らかにした遺伝子多型の機能解析の結果を *in vivo* で実証することになる。すなわち、高濃度の IL-6 を有する場合でもサプレッサーの遺伝子多型が発現している被験者では、フィブリノゲン濃度が低いというケースも想定される。さらに、血清のみならず GCF サンプルでも評価することは、局所の炎症である歯周炎の実態をより正確に反映することになる。

(5) 歯周炎の病因や発症・進行におけるフィブリノゲンの役割は未だ殆ど知られていない。本研究の結果は歯周組織破壊のメカニズムや歯周炎の免疫学的な発症メカニズム解明の一助となり、さらには診断や治療法の確立に大きく貢献をすと思われる。

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 6 件)

- ① Abe D, Kubota T, Morozumi T, Shimizu T, Nakasone N, Itagaki M, Yoshie H. Altered gene expression in leukocyte transendothelial migration and cell communication pathways in periodontitis-affected gingival tissues. *Journal of Periodontal Research*, 査読有り. in press.
- ② 大森みさき、両角俊哉、稲垣幸司、横田誠、沼部幸博、佐藤聡、伊藤弘、王宝禮、上田雅俊、山田了、伊藤公一： ポジションペーパー(学会見解論文) 喫煙の歯周組織に対する影響. *日本歯周病学会会誌*. 査読あり. 第 53 巻 1 号 40-49, 2011.
- ③ Shimizu T, Kubota T, Nakasone N, Abe D, Morozumi T, Yoshie H. Microarray and quantitative RT-PCR analyses in calcium-channel blockers induced gingival overgrowth tissues of periodontitis patients. *Archives of Oral Biology* 査読あり. 56: 277-284, 2011.
- ④ Morozumi T, Kubota T, Abe D, Shimizu T, Komatsu Y, Yoshie H. Effects of irrigation with an antiseptic and oral administration of azithromycin on bacteremia caused by scaling and root planning. *Journal of*

Periodontology 査読あり. 81: 1555-1563, 2010.

⑤ 大森みさき、稲垣幸司、両角俊哉、横田誠、沼部幸博、佐藤聡、上田雅俊、山田了、伊藤公一：歯周病専門医の喫煙状況と喫煙に対する意識. 日本歯周病学会会誌 査読あり. 第 51 巻 4 号 334-345, 2009.

⑥ 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 査読あり. 38: 311-323, 2009.

[学会発表] (計 16 件)

① Morozumi T, Kubota T, Abe D, Shimizu T, Komatsu Y, Yoshie H: Effects of irrigation with an antiseptic and oral administration of azithromycin on bacteremia due to scaling and root planning. The 50th Anniversary, General Session and International Congress of the KAP (Poster presentation), Seoul, Korea, November 27-28, 2010 (*J Periodontal Implant Sci* 40, Suppl 2: s251, 2010).

② 小松康高、両角俊哉、小林哲夫、奥田一博、阿部大輔、吉江弘正：Er:YAG レーザによる SRP 治療効果および菌血症予防効果の検討. 第 53 回秋季日本歯周病学会学術大会(日本歯周病学会会誌 第 52 巻 秋季特別号 p38)、高松市、2010.9.19.

③ 久保田健彦、阿部大輔、清水太郎、中曽根直弘、両角俊哉、吉江弘正：アルツハイマー病関連遺伝子は歯周炎罹患歯肉において転写発現亢進している. 第 53 回秋季日本歯周病学会学術大会(日本歯周病学会会誌 第 52 巻 秋季特別号 p33)、高

松市、2010.9.19.

④ Kubota T, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T, Yoshie H: Alzheimer's disease pathway was accelerated in periodontitis-affected gingival tissues. IADR General Session (Poster presentation), Barcelona, Spain, June 14-17, 2010.

⑤ 山口人巳、久保田健彦、川崎健司、両角俊哉、板垣真奈美、吉江弘正：乳酸菌配合シュガーレスガムの歯周病抑制効果. 日本歯科保存学会 2010 年度春季学術大会(第 132 回)、プログラムおよび講演抄録集、熊本市、2010.6.4-5.

⑥ 両角俊哉、久保田健彦、阿部大輔、清水太郎、吉江弘正：全顎的慢性歯周炎患者の歯肉縁下細菌叢におけるエッセンシャルオイル含有殺菌剤の効果. 第 53 回春季日本歯周病学会学術大会(日本歯周病学会会誌 第 52 巻 春季特別号 p124)、盛岡市、2010.5.14-15.

⑦ 大森みさき、稲垣幸司、両角俊哉、沼部幸博、横田誠、佐藤聡：歯周病専門医に対する喫煙に関する質問票調査. 第 19 回日本禁煙推進医師歯科医師連盟総会・学術総会、新潟市、2010.2.27-28.

⑧ 久保田健彦、阿部大輔、清水太郎、両角俊哉、中曽根直弘、吉江弘正：歯周炎罹患歯肉組織局における特異的遺伝子発現の解析. 日本歯科保存学会 2009 年度秋季学術大会(プログラおよび講演抄録集 p52)、仙台市、2009.10.29-30.

⑨ Morozumi T, Kubota T, Abe D, Shimizu T, Yoshie H: Microbiological effect of essential oil-containing antibiotic in patients with generalized chronic periodontitis. The 95th Annual Meeting of the AAP (Poster presentations), Boston, U.S.A., September 12-15, 2009.

- ⑩ Shimizu T, Kubota T, Abe D, Morozumi T, Yoshie H: Transcriptomes in sites with drug-induced gingival-overgrowth. Microarray and qRT-PCR analyses. EUROPERIO6 (Poster presentations), Stockholm, Sweden, Jun 4-6, 2009.
- ⑪ Abe D, Kubota T, Shimizu T, Morozumi T, Yoshie H: Comprehensive gene expression analysis of gingival tissues affected by localized chronic periodontitis. EUROPERIO6 (Poster presentations), Stockholm, Sweden, Jun 4-6, 2009.
- ⑫ 両角俊哉, 阿部大輔、清水太郎、久保田健彦、吉江弘正: SRP 後の菌血症における、エッセンシャルオイル含有殺菌洗口液を用いたイリゲーションおよびアジスロマイシン投与による予防効果の検討. 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会(日本歯周病学会会誌 第 51 巻 春季特別号 p116)、岡山市、2009.5.15-16.
- ⑬ 大森みさき、稲垣幸司、両角俊哉、三辺正人、横田誠、沼部幸博、佐藤聡: 歯周病専門医に対する糖尿病に関する質問票調査. 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会(日本歯周病学会会誌 第 51 巻 春季特別号 p128)、岡山市、2009.5.15-16.
- ⑭ 稲垣幸司、大森みさき、両角俊哉、沼部幸博、横田誠、佐藤聡、上田雅俊、谷口威夫、野口俊英: 歯周病専門医の喫煙状況と社会的ニコチン依存度. 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会(日本歯周病学会会誌 第 51 巻 春季特別号 p112)、岡山市、2009.5.15-16.
- ⑮ 清水太郎、久保田健彦、阿部大輔、両角俊哉、吉江弘正: 薬剤性歯肉増殖症の感受性と特異的遺伝子発現の網羅的解析. 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会(日本歯周病学会会誌 第 51 巻 春季特別号

p108)、岡山市、2009.5.15-16.

- ⑯ 阿部大輔、久保田健彦、清水太郎、両角俊哉、吉江弘正: 限局型慢性歯周炎罹患部位歯肉における網羅的遺伝子発現解析. 第 52 回春季日本歯周病学会学術大会(日本歯周病学会会誌 第 51 巻 春季特別号 p108)、岡山市、2009.5.15-16.

[図書] (計 1 件)

- ① 吉江弘正、両角俊哉: 歯周組織と歯周病 (石橋寛二、川添堯杉、川和忠治、福島俊士、三浦宏之、矢谷博文 編). 第 4 版 クラウンブリッジ補綴学. 12-17 頁, 医歯薬出版, 東京, 2009.

[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 0 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
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：