

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25年 6月 3日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390396

研究課題名（和文）歯周炎・リウマチにおける IL-6 エピジェネティクス病因論の確立

研究課題名（英文）The role of interleukin-6 epigenetics in the pathogenesis of periodontitis and rheumatoid arthritis

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）：本研究の目的は、炎症性サイトカインであるインターロイキン-6（IL-6）遺伝子のメチル化解析を行い、歯周炎および関節リウマチにおける役割を解明することである。解析の結果、同遺伝子には19カ所のメチル化部位が見られ、その1つの低メチル化が2疾患に関与する可能性を示した。また、血液と比べて歯肉のメチル化程度が低下していることから、歯肉での環境的修飾を受けた結果、同遺伝子活性が高まり炎症が促進された可能性も示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the role of interleukin-6 gene methylation in the pathogenesis of periodontitis and rheumatoid arthritis. The results indicated that the gene contained 19 methylation motifs, and hypomethylated status of a single motif was associated with two diseases. Additionally, methylation level was decreased in the gingival than those in blood, suggesting an increased level of IL-6 gene activity and inflammatory condition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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、リウマチ、IL-6、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周炎の遺伝子多型研究は1997年以降国内外で精力的に行われ、200編以上の国際論文が報告されている。しかしながら、一部の遺伝子では遺伝子多型とコードタンパク産生の不一致が見られた。その原因の1つとして、医学領域でDNAメチル化などのエピジ

エネティクスによる疾患関連遺伝子修飾の研究報告があるが、歯周病分野で未だ検証されていない。歯周炎患者血清ではIL-6レベルが高く、遺伝子多型と一致しなかったため、IL-6遺伝子のエピジェネティクス解析を行うことは歯周炎病因論の解明に必要不可欠である。

(2) 関節リウマチは全身と病変局所で IL-6 過剰産生が見られる点で歯周炎と極めて類似した病態を示す。また、リスク遺伝子多型も共有することから、関節リウマチ患者でも同様に IL-6 遺伝子のエピジェネティクス解析を行うことは、歯周炎と関節リウマチの共通した発症メカニズムを解明するうえで重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、全身と局所に IL-6 高値を示す歯周炎患者においてエピジェネティクス解析を行い、新たな歯周病の原因論を確立することである。具体的には、以下の3つの解析を実施する。

(1) 歯周炎患者、関節リウマチ患者、健常者の末梢血液単核細胞 IL-6 遺伝子のメチル化状態の比較・解析

(2) 歯周炎患者由来の末梢血液単核細胞を歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来リポ多糖で刺激し、IL-6 産生量と IL-6 遺伝子メチル化状態との相関性を解析

(3) 歯周炎患者の末梢血液単核細胞と炎症歯肉細胞 IL-6 遺伝子のメチル化状態の比較・解析

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検査、リウマチ検査を実施後に末梢血液を採取した。すべての血液検体、検査結果は個人情報保護の観点から匿名・記号化した。末梢血液より単核細胞を分離し、ゲノム DNA 抽出後にバイサルファイト処理を行い、IL-6 遺伝子プロモーター領域のプライマーを用いて PCR 増幅後、ダイレクトシーケンス法にてメチル化状態を解析した。更に、血液より血清を調整後に IL-6 濃度を ELISA 法にて定量した。各臨床検査結果、メチル化頻度、IL-6 濃度について統計解析を行った。

(2) 前述した(1)の対象者の末梢血液から分離した単核細胞を対象に *P. gingivalis* リポ多糖刺激後の IL-6 産生量を ELISA 法にて測定した。これらの測定値が、メチル化状態と統計学的に関連するかを検証した。

(3) インフォームドコンセントが得られた歯周炎患者および健常者を対象に歯周処置時あるいは抜歯時に廃棄する歯肉組織片を採取して、ゲノム DNA 抽出後に(1)と同様にしてメチル化状態を解析した。メチル化レベルについて血液と歯肉組織とで有意差検定を行った。

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 30 名、歯周炎を有する関節リウマチ患者 30 名および健常者 300 名を対象に、末梢血液単核細胞由来 DNA 抽出後に IL-6 メチル化状態を解析した。その結果、IL-6 遺伝子プロモーター領域 (-1200 bp~+27 bp) では計 19 の CpG 部位にメチル化を検出した。メチル化レベルは-74 bp と+19 bp 部位で3群に統計学的な有意差を認めた。-74 bp 部位では健常者群と比べて関節リウマチ群および歯周炎患者群のメチル化レベルが有意に低下していた。-74 bp 部位のメチル化血清は非メチル化血清と比べて IL-6 濃度が有意に低下していた。一方、+19 bp 部位では健常者群と比べて歯周炎患者群のメチル化頻度が有意に高かったものの、+19 bp メチル化と非メチル化の血清間で IL-6 濃度の有意差は認められなかった。非メチル化状態により IL-6 遺伝子活性は高まり IL-6 産生が促進されることから、-74 bp 部位のメチル化状態は歯周炎ならびに関節リウマチの感受性に影響している可能性が示唆された。

(2) インフォームドコンセントが得られた健常者 10 名を対象に、末梢血液から分離した単核細胞を対象に *P. gingivalis* リポ多糖刺激後の IL-6 産生量を ELISA 法にて測定した。その結果、-74 bp 部位のメチル化細胞は非メチル化細胞と比べて IL-6 濃度が有意に低下していた。この *in vitro* 解析結果は、(1)の血清 IL-6 濃度の結果と一致して、非メチル化状態により IL-6 遺伝子活性は高まり IL-6 産生が促進されること支持した。

(3) インフォームドコンセントが得られた歯周炎患者 15 名および健常者 10 名の末梢血液および歯肉組織由来のゲノム DNA を対象に IL-6 遺伝子メチル化状態を解析した。その結果、IL-6 遺伝子プロモーター領域の計 19 の CpG 部位のうち、両群の血液・歯肉組織とも 9 CpG 部位 (-1099 bp, -1096 bp, -1094 bp, -1069 bp, -1061 bp, -1057 bp -1001 bp, -491 bp, -227 bp) においてメチル化を検出した。-491 bp における健常者群の歯肉組織のメチル化レベルは血液と比べて有意に低下していた。同様に、歯周炎患者群の歯肉組織のメチル化レベルも血液と比べて低下傾向にあった。IL-6 遺伝子プロモーター領域メチル化レベルの低下によって IL-6 遺伝子発現活性は高まり IL-6 産生が促進されることから、今回の結果より、歯肉組織では血液と比べて IL-6 遺伝子活性が高まり、IL-6 産生促進による炎症惹起の可能性が示唆された。したがって、IL-6 遺伝子のエピジェネティクス解析は、歯周炎の新たな病因論に寄与する可能性が考えられる。

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 8 件)

- ① Kobayashi T, Okada M, Ito S, Kobayashi D, Ishida K, Kojima A, Narita I, Murasawa A, Yoshie H. Assessment of Interleukin-6 Receptor Inhibition Therapy on Periodontal Condition in Patients with Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis. J. Periodontol. 2013 in press. 査読有り. DOI: 10.1902/jop.2013.120696
 - ② Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. J Periodontol. 83(7):917-925, 2012. 査読有り, doi: 10.1902/jop.2011.110356
 - ③ Sugita N, Iwanaga R, Kobayashi T, Yoshie H. Association of the FcγRIIB-nt645+25A/G polymorphism with the expression level of the FcγRIIb receptor, the antibody response to *Porphyromonas gingivalis* and the severity of periodontitis J Periodont Res. 47(1):105-113, 2012. 査読有り doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01411.x
 - ④ 小林哲夫, 吉江弘正. 歯周炎と関節リウマチ-関連性と臨床対応-日本歯周病学会会誌, 54 巻 1 号, 11-17 ページ 2012 年. 査読有り
 - ⑤ Shibata Y, Okano S, Shiroza T, Tahara T, Nakazawa K, Kataoka S, Ishida I, Kobayashi T, Yoshie H, Abiko Y. Characterization of human-type monoclonal antibodies against reduced form of hemin binding protein 35 from *Porphyromonas gingivalis*. J Periodont Res. 46(5):673-681, 2011. 査読有り. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01389.x
 - ⑥ Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Komatsu Y, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Antibody responses to periodontopathic bacteria in relation to rheumatoid arthritis in Japanese adults. J. Periodontol. 82(10):1433-1441, 2011. 査読有り. doi: 10.1902/jop.2011.110020
 - ⑦ Yokoyama T, Kobayashi T, Yamamoto K, Yamagata A, Oofusa K, Yoshie H. Proteomic profiling of human neutrophils in relation to immunoglobulin G Fc receptor IIIB polymorphism. J Periodont Res. 45(6):780-787, 2010. 査読有り. doi:10.1111/j.1600-0765.2010.01300.x
- ⑧ 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. 81(5):650-657, 2010. 査読有り. doi: 10.1902/jop.2010.090688
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Kobayashi T. Effects of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy on Periodontal Condition in Patients with Rheumatoid Arthritis. The 52nd. Annual Scientific Meeting of the Korean Academy of Periodontology, November 24, 2012. Seoul, Korea.
 - ② Okada M. Improvement of the Activity of Rheumatoid Arthritis by Periodontal Therapy. The 52nd. Annual Scientific Meeting of the Korean Academy of Periodontology, November 24, 2012. Seoul, Korea.
 - ③ 石田光平. 歯周炎罹患歯肉における IL-6 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析. 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (第 137 回)、2012 年 11 月 22 日、広島.
 - ④ Yokoyama T. Proteomic profiling of human serum in relation to rheumatoid arthritis and periodontitis. The 98th. Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology. September 30-October 1, 2012. Los Angeles, USA.
 - ⑤ 横山智子. 関節リウマチおよび歯周炎の関連血清タンパク質のプロテオーム解析. 第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会、2012 年 9 月 23 日、筑波.
 - ⑥ 岡田 萌. 関節リウマチおよび慢性歯周炎患者における血漿アミノ酸解析. 第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会、2012 年 9 月 23 日、筑波.
 - ⑦ Kobayashi T. Improvement of periodontal condition by anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis patients. EuroPerio 7, June 7, 2012. Vienna, Austria.
 - ⑧ Okada M. Effects of periodontal therapy on the condition of rheumatoid arthritis. EuroPerio 7, June 7, 2012. Vienna, Austria.
 - ⑨ 小林哲夫. 抗 TNF 療法による関節リウマチ患者の歯周組織状態の改善. 第 55

- 回春季日本歯周病学会学術大会、2012年5月18日、札幌。
- ⑩ 岡田 萌. 歯周治療による関節リウマチへの影響. 第55回春季日本歯周病学会学術大会、2012年5月18日、札幌。
 - ⑪ 小林哲夫. 抗TNF療法による関節リウマチ患者の歯周組織状態への影響. 第56回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012年4月26日、東京。
 - ⑫ Ishida K. Interleukin-6 gene promoter methylation in relation to rheumatoid arthritis and periodontitis. The 97th. Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, November 13-14, 2011. Miami, USA.
 - ⑬ 石田光平. 関節リウマチおよび歯周炎患者における IL-6 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析. 第54回秋季日本歯周病学会学術大会、2011年9月24日、下関。
 - ⑭ 小林哲夫. 関節リウマチにおける歯周炎関連タンパク質の網羅的解析. 日本歯科保存学会2011年度春季学術大会(第134回)、2011年6月9日、浦安。
 - ⑮ 横山智子. 歯周炎関連血清タンパク質のプロテオーム解析. 日本歯科保存学会2011年度春季学術大会(第134回)、2011年6月9日、浦安。
 - ⑯ 岡田 萌. 歯周病原細菌に対する血清抗体価と関節リウマチとの関連. 日本歯科保存学会2011年度春季学術大会(第134回)、2011年6月9日、浦安。
 - ⑰ Kobayashi T. Serum cytokine and periodontal profiles related to rheumatoid arthritis activity. The 96th. Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, November 1, 2010. Honolulu, USA.
 - ⑱ Komatsu Y. Genetic influence of serum interleukin-6 and its soluble receptor levels. The 96th. Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, November 1, 2010. Honolulu, USA.
 - ⑲ Ishida K. DNA methylation status of the interleukin-6 gene promoter in periodontitis. The 96th. Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, November 1, 2010. Honolulu, USA.
 - ⑳ 石田光平. 歯周炎および関節リウマチ患者における IL-6 遺伝子プロモーター領

域のメチル化解析. 第53回秋季日本歯周病学会学術大会、2010年9月19日、高松。

〔図書〕(計2件)

- ① 小林哲夫、吉江弘正、クインテッセンス出版、イラストで語る歯科医学最前線、2013、3-6.
- ② Tetsuo Kobayashi、Hiromasa Yoshie、Quintessence Publishing Co, Inc, AT THE FOREFRONT. Illustrated Topics in Dental Research and Clinical Practice、2012、3-6.

〔その他〕

ホームページ

http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/obs/per/index_j.html

6. 研究組織

(1) 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

(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

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

小松 康高 (KOMATSU YASUTAKA)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：40422597