

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592309

研究課題名(和文)ゲノムメチル化プロファイルによる歯周炎とリウマチの共通発症機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of Genome Methylation Profile in Relation to Common Mechanisms of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis Onset

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周炎とリウマチ(RA)の病態が類似するエビデンスとして、遺伝子情報発現調節(ゲノムメチル化)に着目して、歯周炎とRAの共通発症メカニズムの解明を目的とした。解析の結果、2つの疾患に罹患された方は健康者と比べて炎症調節物質(サイトカイン)の1つであるインターロイキン-6(IL-6)遺伝子のゲノムメチル化の程度は抑制され、IL-6産生は促進していた。以上の結果から、IL-6遺伝子のゲノムメチル化状態は歯周炎やRAの病因に関与している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to elucidate the role of methylation status of interleukin-6 (IL-6) gene in regulation of signal expression in relation to susceptibility to periodontitis and rheumatoid arthritis (RA), because of the similarities in the pathologic features of these diseases. The results indicated that patients with periodontitis and RA showed the hypomethylated status of IL-6 gene and increased IL-6 levels than healthy control individuals. These results suggest that IL-6 gene methylation may play a role in the pathogenesis of periodontitis and RA.

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 インターロイキン6 ゲノム メチル化

#### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎と関節リウマチ(RA)は病態が類似しており、共通した病因としてサイトカイン遺伝子が示唆されていた。本研究代表者は、歯周炎患者での免疫グロブリン G Fc レセプター遺伝子多型の関与 (Kobayashi et al. 1997, 他 15 編)、歯周炎併発した RA 患者でのインターロイキン - 1B(IL-1B)遺伝子多型の関与 (Kobayashi et al. 2007, 2009) を各々報告した。これらの遺伝子多型は IL-1b, IL-6 などのサイトカイン産生を制御することが示唆され、本研究代表者らも、Fc レセプター IIA 遺伝子多型が単核細胞由来の IL-1b 産生能を制御することを報告した (Yamamoto et al. 2007)。しかしながら、これらの遺伝子多型とその遺伝子コード蛋白産生との不一致も数多く認められた。この不一致の原因として、遺伝子情報発現がゲノムメチル化に影響されている可能性が考えられ、歯周炎と RA の共通発症機序の解明には、エピジェネティクス解析が必要不可欠であることが強く示唆された。

#### 2. 研究の目的

本研究では、歯周炎患者と RA 患者由来の全身ならびに局所の単核細胞ゲノムを対象に、IL-6 および腫瘍壊死因子-alpha (TNF-alpha) のサイトカイン遺伝子プロモーター領域のゲノムメチル化状態とコード蛋白の発現を解析して、2つの炎症性疾患の共通発症機序を解明することである。

#### 3. 研究の方法

(1)インフォームドコンセントが得られた RA 患者群 30 名、歯周炎患者群 30 名ならびに健常者群 30 名を対象に、臨床検査を実施後に末梢静脈血を採取した。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。末梢静脈血よりゲノム DNA を抽出後にバイサルファイト処理を行い、IL-6 および TNF-alpha 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、ダイレクトシークエンスにて塩基配列を解析した。各 CpG 部位ごとにメチル化頻度を算出して、疾患群間で異なるか否かを統計学的に評価した。さらに、メチル化頻度の疾患群間で統計学的に有意差が認められた CpG 部位について機能検証を行った。同 CpG 部位でのメチル化有無の対象者から末梢静脈血を採取して単核細胞を分離後、*Porphyromonas gingivalis* リポ多糖による刺激後にサイトカイン蛋白産生を ELISA 法にて定量した。

(2)インフォームドコンセントが得られた歯周炎患者群 25 名と健常者群 20 名を対象に、臨床検査後に末梢静脈血および歯肉組織を採取して、ゲノム DNA を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塩基配列を(1)と同様に解析した。各 CpG 部位ごとにメチル化頻度を算出して、疾

患群間および血液・歯肉間で異なるか否かを統計学的に評価した。さらに機能検証として、RT-PCR 法により IL-6 mRNA 発現量を定量した。

(3) 前述(1)対象者末梢血の一部より血清を分離後、タンパク溶解処理、タンパク濃度を測定後、二次元電気泳動ゲル上でタンパクスポット発現を画像解析ソフトにて定量・比較した。疾患群間で統計学的に有意な発現差が認められるタンパクスポットを選定後に、切り抜き、回収、トリプシン処理を行い、MS/MS イオンサーチ分析法による質量分析を実施後、NCBI nr データベースを参照してコードタンパクを同定した。

#### 4. 研究成果

(1) RA 患者群 30 名、歯周炎患者群 30 名ならびに健常者群 30 名の血液 DNA を対象に、IL-6 および TNF-alpha 遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度を評価した。その結果、IL-6 遺伝子プロモーター領域では合計 19 CpG 部位においてメチル化を検出した。メチル化頻度を算出後に統計解析した結果、-74 bp および+19 bp 部位のメチル化頻度において 3 群間で有意差が認められた。-74 bp 部位では健常者群と比べて RA 患者群および歯周炎患者群のメチル化頻度が有意に低く、同部位でのメチル化細胞は非メチル化細胞と比べて IL-6 産生が有意に低下していた。また、+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、同部位でのメチル化細胞と非メチル化細胞とでは同等の IL-6 産生が認められた。非メチル化によって IL-6 遺伝子の発現活性は高まり 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 RA・歯周炎の感受性に影響している可能性が示唆された。(Ishida, Kobayashi et al. J Periodontol 2012)。一方、TNF-alpha 遺伝子プロモーター領域では合計 10 CpG 部位においてメチル化を検出した。メチル化頻度を算出後に統計解析した結果、計 6 部位 (-163 bp, -161 bp, -119 bp, -72 bp, -49 bp, -38 bp) において 3 群間で有意差が認められた。そのうち、4 部位 (-163 bp, -119 bp, -49 bp, -38 bp) では歯周炎患者群、健常者群と比べて RA 歯周炎併発群のメチル化頻度が有意に高かった。

(2) 歯周炎患者群 25 名と健常者群 20 名の血液単核細胞と歯肉組織由来 DNA の IL-6 遺伝子プロモーター領域のゲノムメチル化頻度を統計学的に比較した。IL-6 および TNF-alpha 遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度を評価した。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、血液および歯肉組織でのメチル化程度に有意な群間差は認められなかった。しかしながら、歯肉組織での 7 CpG 部位 (-1099 bp, -1096 bp, -1094 bp, -1069 bp, -1061 bp,

-1057 bp, -1001 bp) のメチル化頻度は血液の場合と比べて有意に低下していた。血液と歯肉組織での IL-6 mRNA 発現量に有意な群間差は認められなかったものの、歯肉組織での IL-6 mRNA 発現量は血液の場合と比べて上昇傾向にあった。以上の研究成果から、歯肉組織では血液と比べ 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 遺伝子プロモーター領域のゲノムメチル化解析が、将来的に歯周炎や RA の感受性診断の一助になることが考えられる。

(3) 歯周炎併発 RA 患者群、RA 患者群、歯周炎患者群ならびに健常者群の各 10 名を対象に、二次元電気泳動ゲル上で血清蛋白スポット発現を解析した結果、合計 1,694 スポットが認められ、そのうち、7 蛋白 (complement component 3 and 4, complement factor H, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain, ceruloplasmin, apolipoprotein H, kringle domain) が疾患群間で発現量に有意差を認めた。特に、3 蛋白 (complement component 3, complement factor H, ceruloplasmin) は歯周炎併発 RA 患者群に特異的に発現した (Yokoyama, Kobayashi et al. J Periodontol 2014)。以上の研究成果から、歯周炎と RA の共通発症機序において 3 つの血清蛋白が関与する可能性が示唆された。

#### 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 7 件)

Kobayashi T, Okada M, Ito S, Kobayashi D, Shinhara A, Muramatsu T, Kobayashi T, Narita I, Nakazono K, Murasawa A, Yoshie H. Amino acid profiles in relation to chronic periodontitis and rheumatoid arthritis. Open Journal of Stomatology. 4(2): 49-55, 2014. 査読有り

Yokoyama T, Kobayashi T, Ito S, Yamagata A, Ishida K, Okada M, Oofusa K, Murasawa A, Yoshie H. Comparative Analysis of Serum Proteins in Relation to Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis J Periodontol. 85(1):103-112, 2014. 査読有り

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. 85(1):57-67, 2014. 査読有り

Okada M, Kobayashi T, Ito S, Yokoyama T, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Periodontal Treatment Decreases Levels of Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and Citrulline in Patients with Rheumatoid Arthritis and Periodontitis J Periodontol. 84(12):e74-e84, 2013. 査読有り

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

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

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

〔学会発表〕(計 17 件)

石田光平. 歯周炎罹患組織における 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 2013 年度秋季学術大会 (第 139 回), 2013 年 10 月 18 日, 秋田県総合生活文化会館 (秋田県).

小島杏里. 慢性歯周炎患者における TNF- $\alpha$  遺伝子プロモーター領域のメチル化解析. 第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2013 年 9 月 22 日, 前橋市民文化会館 (群馬県).

Kobayashi T. Effect of Interleukin-6 Receptor Inhibition Therapy on Periodontal Condition in Patients with Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. The 10th. Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. September 3, 2013. Nara.

Ishida K. Interleukin-6 Gene Promoter Methylation in Periodontal Tissues. The 10th. Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. September 3, 2013. Nara.

Okada M. Periodontal Treatment on Antibodies to *Porphyromonas gingivalis* and Citrulline levels and Rheumatoid Arthritis Condition. The 10th. Asian Pacific Society of

Periodontology Meeting. September 4, 2013. Nara.

Kojima A. Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene Promoter Methylation in Chronic Periodontitis The 10th. Asian Pacific Society of Periodontology Meeting. September 4, 2013. Nara.

小林哲夫. 関節リウマチ患者におけるトシリズムブ治療の歯周状態への影響. 日本歯科保存学会 2013 年度春季学術大会 (第 138 回), 2013 年 6 月 28 日, 福岡国際会議場 (福岡県).

小林哲夫. IL-6 受容体抑制治療中の関節リウマチ患者の歯周状態. 第 56 回春季日本歯周病学会学術大会, 2013 年 5 月 31 日, タワーホール船堀 (東京都).

小林哲夫. トシリズムブ (TCZ) 療法中の関節リウマチ患者の歯周状態. 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2013 年 4 月 19 日, 京都国際会館 (京都府).  
石田光平. IL-6 遺伝子プロモーター領域メチル化と慢性歯周炎および関節リウマチ感受性との関連. 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, 広島国際会議場 (広島県広島市).

Kobayashi T. Improvement of periodontal condition by anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis patients. EuroPerio 7. June 7, 2012. Vienna, Austria.

Okada M. Effects of periodontal therapy on the condition of rheumatoid arthritis. EuroPerio 7. June 7, 2012. Vienna, Austria.

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, 2011. Miami, Florida, United States of America.

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, 海峡メッセ (山口県下関市).

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, Hawaii, United States of America.

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, Hawaii, United States of America.

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, サポートホール高松 (香川県高松市).

〔図書〕(計 1 件)

小林哲夫, 永井書店, リウマチ病セミナー-XXIV, 2013, 1-7.

〔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

新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野

[http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/obs/per/index\\_j.html](http://mds.niigata-u.ac.jp/organization/ols/obs/per/index_j.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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