

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792114

研究課題名(和文) 歯周炎病態、リスク診断のこれから：インターロイキン6受容体の可能性を探る

研究課題名(英文) The diagnosis of the risk of periodontitis: searching for the interleukin-6 receptor

研究代表者

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

研究成果の概要(和文): 歯周炎における IL-6 の生理作用を制御する可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R, sgp130) に注目した。ロジスティック回帰分析の結果、IL-6R +48892 (A/C) 遺伝子多型と有意な関係が認められた。また *in vitro* 解析により、A アリル保有群で単核細胞、リンパ球上の膜結合型 IL-6R 発現が有意に高かった。以上より、IL-6R 遺伝子多型が免疫細胞上の IL-6R 発現レベル、ひいては局所 sIL-6R レベルを制御し、慢性歯周炎の病態形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文): Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) and soluble gp130 (sgp130) are key molecules in regulation of IL-6 response. Multiple logistic regression analysis revealed significant association between genetic polymorphisms of IL-6R +48892 (A/C) and susceptibility to periodontitis. Moreover, cell surface expression of membrane-bound IL-6R in PBMC and lymphocyte was significantly higher in subjects who carry IL-6R +48892 A allele than that who did not carry. These results suggest that IL-6R gene polymorphisms could act as a risk factor for chronic periodontitis by regulating immunological cell surface expression of IL-6R and sIL-6R levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、IL-6、IL-6 レセプター

1. 研究開始当初の背景

歯周炎の病態形成に IL-6 は非常に重要であり、膜結合型 IL-6 レセプター (IL-6R , CD126) の発現が低い歯周組織においては

IL-6 の生理活性作用は可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R, sgp130) の局所動態に大きく制御されるが、報告は十分ではなかった。そこで、申請者らはこれまで、IL-6、IL-6R 遺伝子多

型と歯周炎との関連性、及び血清 IL-6 component (IL-6, sIL-6R, sgp130) レベルへの影響について研究してきた。その結果、歯周炎患者では IL-6R +48892(A/C) A アリル保有者が有意に多く、血清 sIL-6R レベルにも強く影響していることがわかった。

2. 研究の目的

- (1) 健常者、歯周炎患者における血清、歯肉溝滲出液中の IL-6 component (IL-6, sIL-6R, sgp130) レベルを把握すること。
- (2) 歯周炎患者の治療前後での IL-6 component レベルの変化を把握すること。
- (3) 免疫細胞上での膜結合型 IL-6R 発現における IL-6R 遺伝子多型の影響を検討すること。

3. 研究の方法

(1) 対象 :

本研究について説明後、インフォームドコンセントの得られた、新潟大学医歯学総合病院・歯周病診療室を受診し、診断された慢性歯周炎患者 44 名、および健常者 95 名
* 歯周炎診断基準は Kornman KS, et al. *J Clin Periodontol* 1997, Greenstein G, Heart TC. *J Periorontol* 2002 による。

また、当講座研究室において、本研究について説明後、インフォームドコンセントの得られた健常者ボランティア 10 名を対象に単核・多核細胞およびリンパ球上の IL-6R 発現の差異を検索した。

(2) 検体採取 :

検体は対象者の DNA、血清とし、以下方法にて採取、保存した。

DNA : 上腕より静脈血を採取、通法に従いゲノム DNA を抽出した。

血清 : 上腕より静脈血 10ml を採取し、遠心分離後 -80 °C にて凍結保存した。

(3) IL-6 (-572, -373), IL-6R (-183, +48892) 遺伝子型の決定

IL-6 (-572), IL-6R (-183, +48892) : PCR-RFLP、ダイレクトシーケンス法
IL-6 (-373) : PCR-SSCP、ダイレクトシーケンス法

Komatsu Y, et al. *Tissue Antigens* 2005.
Galicia JC, et al. *Genes Immun* 2004.

(4) IL-6 component レベルの測定

IL-6 : CLEIA 法 (検出下限値=0.2pg/ml)

sIL-6R, sgp130 : ELISA 法

(検出下限値 = 順に 1.3ng/ml, 25ng/ml)

CRP ラテックス凝集免疫比濁法

(検出下限値=50ng/ml)

(4) IL-6 遺伝子多型ごとの単核・多核細胞およびリンパ球上の IL-6R 発現解析

細胞分離

上腕よりヘパリン (+) 10ml x 3 本を採血。PBS(-), Ficoll を混和し、遠心分離後に細胞を分離した。Decanation 後、PBS(-) を加え、 1×10^7 cells/ml になるように濃度調整した。

細胞 counting

IL-6R 染色

Blocking step (抗体の Fc レセプターへの非特異的反応の阻害)

BSA buffer を細胞に加え、遠沈し、上清を除去した。 2×10^7 cells/ml に濃度調整し、Human IgG を加えた。

CD126 (IL-6R) 抗体染色、FACS 解析

CD126 抗体を細胞に加え、incubation, 遠沈後、Stain buffer (BSA+) を加え、細胞を浮遊させた。FACS tube に細胞を移し、フローサイトメーターにて解析した。以上を IL-6R (-183G/A, +48892 A/C) : G/G; A/A, A/G; A/C; A/A; C/C の 3 pattern について解析した。

(5) 統計解析

・ IL-6, IL-6R 遺伝子多型頻度 : χ^2 検定

・ IL-6 component レベルの比較 :

Mann-Whitney U test

・ 免疫細胞上の IL-6R 発現レベルの比較

2 群間比較 : Mann-Whitney U test

3 群間比較 : Kruskal-Wallis test

・ 歯周炎への寄与因子の解析 : ロジスティック回帰分析

* 統計処理は、STAT VIEW J-4.5 application program, SAS Institute Inc., NC を使用し、 $P < 0.05$ で有意差ありとした。

4. 研究成果

- (1) 歯周炎患者群 (N=44, 58.8 ± 1.4 歳 (mean \pm SE)) で健常者 (N=95, 42.2 ± 1.7 歳) に比較して血清 IL-6, sIL-6R, 高感度 CRP が有意に高かった (順に、 1.4 ± 0.1 (pg/ml) vs. 1.1 ± 0.1 , $P=0.001$; 26.7 ± 1.1 (ng/ml) vs. 23.2 ± 0.7 , $P=0.006$; 644.3 ± 108.0 (ng/ml) vs. 403.9 ± 56.7 , $P=0.002$)。一方、sgp130 は有意差が認められなかった。但し、歯周炎患者群で健常者群に比較して年齢が有意に高く、マッチしていなかった ($P < 0.0001$)。

- (2) 血清 sIL-6R レベルは 2 群とも IL-6R -183 G アリル保有群で有意に低かった (歯周炎患者群 : G アリル保有群 : 23.2 ± 1.0 (ng/ml) vs. G アリル非保有群 : 34.0 ± 2.2 、 $P=0.0005$; 健常者群 : G アリル保有群 : 21.4 ± 0.7 (ng/ml) vs. G アリル非保有群 : 27.7 ± 1.7 , $P=0.002$)。加えて、健常者群において IL-6R -183 G アリル保有群で非保有群に比較し、血清 IL-6 レベルが有

意に低かった (G保有群: 1.0 ± 0.1 (pg/ml) vs. 1.8 ± 0.4 , $P=0.02$)。

- (3) また、血清sIL-6Rレベルは2群ともIL-6R +48892 Cアレル保有群で有意に高かった (歯周炎患者群: Cアレル保有群: 31.9 ± 1.5 (ng/ml) vs. Cアレル非保有群: 20.7 ± 0.8 , $P<0.0001$; 健常者群: Cアレル保有群: 26.4 ± 0.8 (ng/ml) vs. Cアレル非保有群: 17.9 ± 0.5 , $P<0.0001$)。
- (4) ロジスティック回帰分析の結果、歯周炎罹患と血清IL-6 componentレベルに有意性はなく、年齢 ($P=0.045$)、IL-6 -572, -373 ($P=0.015$, 0.017)、IL-6R +48892 ($P=0.041$)で有意性を認めた。
- (5) IL-6遺伝子多型ごとの単核・多核細胞およびリンパ球上のIL-6 発現解析結果は以下の通りとなった。

抹消血単核細胞 (PBMC) 上のIL-6R遺伝子多型別のIL-6R 発現レベルは下記表のようになり、IL-6R (-183, +48892): (A/A) (C/C)群で最も有意に低かった。

(-183, +48892)	CD126+ cells Mean in present	MFI* \pm SD	Analysis	P value
All genotype	58.1	10.74 ± 1.92	-	0.01
(G/G) (A/A) N=4	56.6	12.44 ± 0.68	vs. (A/G) (A/C)	0.04
(A/G) (A/C) N=4	56.3	10.99 ± 1.05	vs. (A/A) (C/C)	0.03
(A/A) (C/C) N=3	62.5	8.14 ± 0.38	vs. (G/G) (A/A)	0.03

MFI=Mean Fluorescence Intensity
(平均蛍光強度)

リンパ球上のIL-6R遺伝子多型別のIL-6R 発現レベルは、下記表のようになり、同様にIL-6R (-183, +48892): (A/A) (C/C)群で最も有意に低かった。

(-183, +48892)	CD126+ cells Mean in present	MFI* \pm SD	Analysis	P value
All genotype	52.9	8.76 ± 2.87	-	0.01
(G/G) (A/A) N=4	51.7	10.48 ± 0.59	vs. (A/G) (A/C)	0.02
(A/G) (A/C) N=4	49.9	8.72 ± 0.99	vs. (A/A) (C/C)	0.03
(A/A) (C/C) N=3	58.3	6.53 ± 0.38	vs. (G/G) (A/A)	0.03

単球上のIL-6R遺伝子多型別のIL-6R 発現レベルは、下記表のようになり、IL-6R (-183, +48892): (A/A) (C/C)群で(G/G) (A/A)群に比較し、有意に低かった ($P=0.03$)。

(-183, +48892)	CD126+ cells Mean in present	MFI* \pm SD	Analysis	P value
All genotype	93.6	17.64 ± 0.39	-	0.09
(G/G) (A/A) N=4	94.5	19.41 ± 0.91	vs. (A/G) (A/C)	0.2
(A/G) (A/C) N=4	93.2	17.19 ± 3.2	vs. (A/A) (C/C)	0.3
(A/A) (C/C) N=3	93.6	15.86 ± 0.39	vs. (G/G) (A/A)	0.03

歯周炎の病態形成に IL-6 は非常に重要であり、歯周組織においては IL-6 の生理活性作用を大きく制御する可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R, sgp130) の局所動態の解明が特に重要であるが、これまで十分な報告がなかった。そこで我々は sIL-6R, sgp130 の局所動態を遺伝子多型の影響も踏まえ、*in vivo*, *in vitro* の両側面から把握することを検討した。

以前、我々は歯周炎患者では IL-6R +48892 (A/C) A アレル保有者が多いことを報告した (Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, et al. *J Clin Periodontol* 2006)。IL-6R +48892 (A/C) 遺伝子多型部位は、膜結合型 IL-6R が歯周病原性細菌由来 endotoxin などにより酵素的に切断、sIL-6R が産生される cleavage site であり、機能的に非常に重要な部位である。

今回の *in vitro* の結果から、A アレル保有群では、免疫細胞 (単核細胞, リンパ球) 上の膜結合型 IL-6R 発現が有意に高いことが分かった。それにより、歯周炎局所においては sIL-6R 産生とそれに続いて IL-6/sIL-6R 複合体形成が亢進し、炎症が進行するものと考えられた。しかし、A アレル保有群では血清 sIL-6R レベルは逆に低下すると以前に報告したが (Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, et al. *Genes Immun* 2004) これは局所での消費が増加するために、血清レベルは低下するためではないかと思われた。

しかし、ここで一つ疑問点が生じる。それは、IL-6R +48892 (A/C) A アレル非保有者では、逆に免疫細胞上の膜結合型 IL-6R 発現が低いにもかかわらず、血清 sIL-6R が高くなるという事実である。このことから、IL-6R (+48892) C アレルから生じた sIL-6R は IL-6 と複合体形成しにくく、IL-6 生理作用発現せず、遊離型として血清中にクリアランスされてしまうのではないかという仮説が浮かび上がる。

一方で、*in vivo* の結果からは、血清 IL-6 component (IL-6, sIL-6R, sgp130) レベル自体は歯周炎発症に関係がないことが分かった (ロジスティック回帰分析より)。

In vitro, *in vivo* 双方の結果を考慮すると、IL-6R (-183, +48892) 遺伝子多型が、免疫細胞上の IL-6R 発現レベル、ひいては局所 sIL-6R レベルを制御し、歯周炎病態形成に関与することが示唆された。今後は、歯周局所 (歯肉組織中、歯肉溝滲出液中) の IL-6 component 動態を解析する予定である。また、産生された sIL-6R は IL-6R 遺伝子多型により、その機能的差異がある可能性も浮かび上がり、今後の更なる詳細な検討が必要である

と思われた。

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5件)

- 1) 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*, in press. 査読あり
- 2) 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. *J Periodontol*. 2010; 81: 1555-1563. 査読あり
- 3) 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*. 2010; 81: 650-657. 査読あり
- 4) Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Noriko S, Yoshie H: The effects of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *J Periodontol*. 2010; 81: 1118-1123. 査読あり
- 5) Kobayashi T, Murasawa A, Ito S, Yamamoto K, Komatsu Y, Abe A, Sumida T, Yoshie H: Cytokine gene polymorphisms associated with rheumatoid arthritis and periodontitis in Japanese adults. *J Periodontol*. 2009; 80: 792-799. 査読あり

[学会発表](計5件)

- 1) Komatsu Y, Kobayashi T, Shimada Y, Yoshie H: 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. Honolulu, Hawaii, November 1, 2010.
- 2) Kobayashi T, Murasawa A, Komatsu Y, Yokoyama T, Ishida K, Abe A, Yamamoto K, Yoshie H: 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. Honolulu, Hawaii, November 1, 2010.
- 3) Ishida K, Kobayashi T, Yokoyama T, Komatsu Y, Yoshie H: 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. Honolulu, Hawaii, November 1, 2010.
- 4) 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 レーザーによる SRP の治癒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、高松市、2010.9.19.
- 5) 石田光平、小林哲夫、小松康高、横山智子、岡田萌、吉江弘正: 歯周炎および関節リウマチ患者における IL-6 遺伝子ブ

口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、高松市、
2010.9.19.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小松 康高 (KOMATSU YASUTAKA)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：4 0 4 2 2 5 9 7

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：