

## 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 6 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年 ～ 2011 年

課題番号：21592464

研究課題名（和文）遺伝子多形解析によるインプラント周囲炎リスク診断システムの新開発

研究課題名（英文）Development of risk criteria for implantitis using gene polymorphism

研究代表者 小城辰郎

(KOJO TATSURO)

九州歯科大学 歯学部 講師

研究者番号：80153542

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、アジア系人種における  $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$  一塩基多型（SNP）とインプラント喪失の関連を調査した。1 本以上のインプラントを喪失した 13 名（テスト群）と、経過良好なインプラント患者 27 名（コントロール群）の計 40 名を被験者とした。遺伝子型の判定は PCR-RFLP 法にて行った。その結果、インプラント本数ベースにおいて、2 群間で  $TNF\alpha$  のアリル分布に有意差が認められた ( $p=0.02$ )。また、 $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$  双方のアリル T を保有する遺伝子型の分布に 2 群間で有意差が認められた ( $p=0.008$ )。以上の結果から、アジア系人種において  $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$  双方の SNP 保有はインプラント喪失のリスクファクターとなることが示された。

## 研究成果の概要（英文）：

This study examined the association between implant failure and  $TNF\alpha$  and  $IL-1\beta$  single nucleotide polymorphism (SNP) in Asian patients. Forty patients were divided into a test group with one or more implants that failed early ( $n = 13$ ) and a control group with healthy implants ( $n = 27$ ). Genotyping was performed by PCR-RFLP. In the implant analysis, the allele distribution of  $TNF\alpha$  differed significantly between the two groups ( $p = 0.02$ ), and among the patients possessing both genotypes, i.e., allele T at  $TNF\alpha$  and  $IL-1\beta$ , the difference between the control and test groups was significant ( $p = 0.008$ ). This study suggests that possessing both  $TNF\alpha$  and  $IL-1\beta$  SNP constitutes a risk factor for implant failure in Asian patients.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：遺伝子多型，SNP，遺伝子診断，インプラント周囲炎，粘膜細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在行われているインプラント周囲炎や

慢性歯周炎の検査・診断は、口腔清掃状態、歯肉の炎症状態、歯周組織の状態（歯周ポケット

ット、付着レベルや歯槽骨吸収)を数値化して病態を診断しており、その結果をもとに治療法を選択、それぞれの患者に医療を提供している。また、インプラント周囲炎、慢性歯周炎の発症頻度、重篤度には個人差があり、患者1人ひとりに画一的な医療を提供する従来型の医療では限界があると言わざるを得ない。しかし、近年のヒトゲノム解析計画の成果によって、ヒトDNA全領域が解析されつつある。

それに伴い、インプラント周囲炎や、慢性歯周炎等の炎症性サイトカイン関連遺伝子多型が同定され、患者個々の遺伝子多型によるインプラント周囲炎や慢性歯周炎における感受性診断、発症前診断が可能となってきており、患者個々に最も適した治療法、予防法を選択・提供するテーラーメイド医療の実現が現実的なものとなってきている。

歯周炎感受性に関連する遺伝子多型研究は、1997年にK.Kornmanらによる報告「IL-1 $\alpha$  (+4845)allele2,IL-1 $\beta$  (+3954)allele2, 双方を保有する遺伝子型の場合、重度慢性歯周炎に罹患するリスクが高く、白人におけるオッズ比は6.8である」(Kornman KS, et al.(1997) J Clin Periodontol,24:72-77)を契機に、日本をはじめ世界中で同様の研究が行われている。しかし、インプラント周囲炎と炎症性サイトカイン関連遺伝子多型についての調査は皆無であり、遺伝子多型解析によるインプラント周囲炎のリスク診断調査を行うことは非常に意義があると考えた。

また、遺伝子診断の研究では、通常遺伝子サンプルを静脈血の採取によって得ているが歯科領域において静脈血の採取は、一般的とはいえない。また、患者にとっても痛みを伴う侵襲的処置であり、遺伝子多型解析の調査を行う上での障害の一つになっていることは否めない。このことから、患者1人ひとりに対して遺伝子診断をもとにしたテーラーメイド医療を一般開業医でも提供する上で、より簡便に、かつ侵襲を最小限に抑えた遺伝子サンプルの採取法を確立することが必須であると考えた。術者・患者ともに負担が少なくDNAサンプルを採取する方法として我々は、従来から法医学分野においてDNA鑑定に用いられてきたphi29 DNA polymeraseに注目した。本酵素は、少量の血痕、唾液斑、爪、微量の毛髪等から短期間でDNA増幅が可能であるとされており、これを用いることにより、口腔粘膜より採取した少量の細胞を精製し、得られたゲノムDNAからでも、遺伝子多型解析を行うに十分量のDNAが増幅できるのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

(1)インプラント周囲炎と炎症性サイトカイン

関連遺伝子多型についての調査は皆無であり、遺伝子多型解析によるインプラント周囲炎のリスク診断調査を行うことは非常に意義があると考えた。しかし、遺伝子診断の研究では、通常遺伝子サンプルを静脈血の採取によって得ているが歯科領域において静脈血の採取は、一般的とはいえない。そこで本研究では、口腔内より粘膜上皮細胞を採取、Phi29 DNA polymeraseを用いてDNAを増幅することによって、血液サンプルの採取を行わずとも遺伝子診断を行える手技を確立し、遺伝子多型とインプラント周囲炎との関連を明らかにし、最終的には遺伝子多型解析によるインプラント周囲炎のリスク診断システムの開発を目的とした。

(2)近年、各種遺伝子多型とインプラント喪失の関連についての報告がなされているものの、コーカソイドにおける報告が多く、アジア系人種についてはほとんど報告がされていない。遺伝子多型の発現頻度は人種間の差が大きいため、コーカソイドの結果を直接日本人にあてはめることは難しいと考えられる。そこで本研究は、日本人におけるIL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 遺伝子多型とインプラント喪失の関連を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)被験者として研究の目的を理解し、同意の得られた5名のボランティアを選択した。口腔内よりスパーテルと呼ばれるプラスチック製の小さじ状の器具を用いて、頬粘膜から少量の口腔粘膜細胞を採取した。採取した細胞は500 $\mu$ lのPBS中にて毎分1000回転を5分間、遠心分離後、上澄み液を吸引し、アルカリ溶液で細胞を溶解し、中和溶液で中和後Phi29 DNAポリメラーゼを用いてDNAの増幅を行った。DNAの増幅後、0.6%アガロースゲルにて電気泳動を行い、DNA増幅を確認した。

(2)DNAの増幅後、PCR法を用いてIL-1 $\beta$ 領域の増幅を行い、その後、制限酵素TaqIを用いてRestriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)解析を行った。

(3)同一被験者においてPhi29 DNAポリメラーゼで増幅した頬粘膜細胞からのDNAサンプルと血液サンプルから精製したDNAサンプルをショートタンデムリピート解析(STP解析)を用いて代表的な9つのローカス(STRs: FL-D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, TMR-CSF1P0, TPOX, TH01, vWA, Amelogenin)について比較検討を行った。

(4)被験者として九州歯科大学附属病院インプラントセンターにてインプラント治療をおこない、本研究の目的を理解し同意の得られた患者の中から選択した。1本以上のインプラントを喪失した13名(男性5名、女性8名、平均年齢65.5歳)の被験者をテスト群

とした。また、コントロール群として、インプラントが良好に経過している 27 名（男性 9 名，女性 18 名，平均年齢 62.6 歳）の被験者をランダムに選択した。被験者の頬粘膜より口腔粘膜細胞を採取し，phi29 DNA polymerase を用いてゲノム DNA の増幅を行い，PCR 法にて IL-1 $\beta$ ，TNF- $\alpha$  のプロモーター領域を増幅後，制限酵素を利用した RFLP 解析を行った。IL-1 $\beta$  (+3954) 部および，TNF- $\alpha$  (-857) 部における遺伝子多型の有無を確認後，インプラント喪失と遺伝子多型との関連を統計的に検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ギムザ染色にて頬粘膜細胞が採取できていることを確認した。DNA の増幅を行っていない頬粘膜細胞からの DNA 量は平均 3.5 ng/ $\mu$ l であったのに対し，Phi29 DNA ポリメラーゼで増幅した DNA サンプルは平均 89.8 ng/ $\mu$ l と増加が認められた。また，DNA の純度に関しては増幅前が 0.59 であったのに対し，増幅後は 1.71 であった。

(2) DNA の増幅を行ったすべてのサンプルにおいて IL-1 $\beta$  の遺伝子増幅が確認できたが，増幅を行っていないコントロールサンプルに置いてはバンドの検出はできなかった。DNA 増幅を行ったサンプルにおいて RFLP 解析を行ったところ，すべてのサンプルにおいてアリの解析が可能であり，すべてのサンプルで IL-1 $\beta$  の遺伝子多型を保有していないことが示された。

(3) 次に，同一被験者において，血液サンプルと Phi29 DNA ポリメラーゼで DNA 増幅を行ったサンプルを STR 解析により比較検討したところ，それぞれ若干ピークの高さは異なるものの，両サンプルともこれら 4 つの遺伝子領域のピークが一致していることが示された。また，また残りの 5 つのローカスについても若干のピークの高さは異なるもののピークの値は一致していることが示された。

(1)，(2)，(3) より，頬粘膜細胞からの少量の DNA を用いても遺伝子多型診断が可能であり，約 6 時間で細胞採取から遺伝子多型診断まで行うことができ，効率的であることが示唆された。また，同一被験者において，DNA 増幅を行ったサンプルと血液サンプルを STR 解析により比較検討したところ，両サンプルとも 9 つのローカスのピークは一致しており，同じ allele を有していることが明らかになった。

(4) コントロール群では TNF- $\alpha$  の C アリルを有する被験者は 70.1%，T アリルを有する被験者は 29.9% であった。一方，テスト群では TNF- $\alpha$  の C アリルを有する被験者は 50.0%，T アリルを有する被験者も 50.0% であった。テスト群とコントロール群の間に，IL-1 $\beta$  (+3954) 部および TNF- $\alpha$  (-857) 部における

allele および，遺伝子型の分布に有意差は認められなかった。また，IL-1 $\beta$  (+3954)，TNF- $\alpha$  (-857) 両方の部位で allele T を持つ遺伝子型を認めた被験者数を比較したが，有意差は認められなかった ( $p=0.055$ )。一方，インプラントの本数ベースで比較をおこなうと，2 群間で IL-1 $\beta$  (+3954) 部の allele および，allele T を含む遺伝子型の分布に有意差は認められなかったが，TNF- $\alpha$  (-857) 部の allele 分布には有意差が認められた ( $p=0.02$ )。また，IL-1 $\beta$  (+3954)，TNF- $\alpha$  (-857) 両方の部位で allele T を持つ遺伝子型を認めた被験者へ埋入されたインプラント数を，2 群間で比較したところ，有意差が認められた ( $p=0.008$ )。以上の結果から，テスト群とコントロール群で，IL-1 $\beta$ ，TNF- $\alpha$  における遺伝子多型の発現頻度に有意な相関は認められなかったものの，TNF- $\alpha$  遺伝子多型とインプラントを喪失する本数との間に何らかの関連を示す傾向が認められた。

#### 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 1 件)

Y. Murashima, C. Masaki, M. Makino, T. Kojo, T. Nakamoto, R. Hosokawa. The Tumor Necrosis Factor-Alpha Gene-857 Single-Nucleotide Polymorphism Associated with Early Implant Failure in Asian Patients. International Journal of Oral Implantology and Clinical Research, 2, 1-6, 2011. 査読有, DOI:10.5005

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

小城辰郎 (KOJO TATSURO)  
九州歯科大学 歯学部 講師  
研究者番号：80153542

### (2) 研究分担者

細川隆司 (HOSOKAWA RYUJI)  
九州歯科大学 歯学部 教授  
研究者番号：60211546

中本哲自 (NAKAMOTO TETSUJI)  
九州歯科大学 歯学部 准教授  
研究者番号：30514989

正木千尋 (MASAKI CHIHIRO)  
九州歯科大学 歯学部 助教  
研究者番号：60397940

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：