

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 9 日現在

機関番号：13101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011～2012
課題番号：23792473
研究課題名（和文） 歯周炎および喫煙が IL-6 遺伝子プロモーター領域のゲノムメチル化に及ぼす影響
研究課題名（英文） Effect of periodontitis and smoking for genome methylation on IL-6 gene promoter region
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）：従来の遺伝子多型解析では疾患感受性遺伝子の機能や活性が不明確であった。また、一部の遺伝子では多型とタンパク産生における不一致が認められていた。この原因として、DNA のメチル化修飾により遺伝子情報発現が影響されている可能性が考えられる。それゆえ、疾患感受性遺伝子の研究を行うには、遺伝子活性を制御するゲノムメチル化の解析が必須である。本研究において、4 種類の被験者（健常者、歯周炎患者、喫煙者、喫煙関連歯周炎患者）における血液、歯肉溝滲出液、歯周組織片由来の DNA を用いて、歯周炎や喫煙が IL-6 プロモーター領域のゲノムメチル化に及ぼす影響が調べられた。

研究成果の概要（英文）：Conventional gene polymorphism analysis cannot elucidate the function and activity of the disease sensitivity gene. Also, it is known that discordant exist between polymorphism and protein production in some genes. The possible cause is that the expression of gene information is influenced by DNA methylation modification. Thus, analysis of genome methylation which regulates the gene activity is necessary for research of the disease sensitivity gene. In the study, DNA extracted from blood, gingival crevicular fluid and periodontal tissues samples in the four type subjects (Healthy individuals, periodontitis patients, smoker with/without periodontitis) were used to investigate the effect of periodontitis and smoking for genome methylation on the IL-6 gene promoter region.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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：IL-6、DNA メチル化、喫煙、歯周炎

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周炎の遺伝子多型研究は、1997 年に IL-1 遺伝子多型が慢性歯周炎の重症化と関係することが発表されて以来、既に 200 以上の国際論文が報告されている。申請者の講座でも一連の慢性・侵襲性歯周炎におけるケースコントロール研究解析に全面的に取り組み、Fc 受容体や IL-1 受容体アンタゴニスト、TNF 受容体、IL-6、CD14 などの候補リスク遺伝子を絞り込んできた。申請者自身もこれま

で、MMP-1 や MMP-3、フィブリノゲンなどの遺伝子多型と歯周炎の関連性について報告してきている (Itagaki et al, *J Clin Periodontol* 2004; Morozumi et al, *Immunol Invest* 2009)。

(2) しかしながら、従来の多型解析では疾患感受性遺伝子の機能や活性が不明確であった。また、一部の遺伝子では多型とタンパク産生における不一致が認められていた。この

原因として、近年、医科領域で明らかになりつつあるエピジェネティクス、とりわけ DNA のメチル化修飾により遺伝子情報発現が影響されている可能性が考えられる。それゆえ、疾患感受性遺伝子の研究を行うには、遺伝子活性を制御するゲノムメチル化の解析が必須である。これまでの歯周病領域での報告は極めて少なく、白人歯周炎患者の IL-8 で DNA メチル化を検証した 2 編のみである (Oliveira et al, *J Clin Periodontol* 2009; Andia et al, *J Periodontol* 2010)。

(3) IL-6 は免疫反応や急性期反応など、広範な生物活性を有する多機能なサイトカインである。歯周炎患者の血清や GCF 中における IL-6 濃度は高値であり (Buhlin et al, *Eur Heart J* 2003; Lee et al, *J Clin Periodontol* 1995)、さらには、-373 多型が歯周炎と関連することが報告されている (Komatsu et al, *Tissue Antigens* 2005)。しかしながら、強い寄与率とは言い難く、やはり遺伝子多型だけでは説明できない。また、IL-6 は喫煙により発現が亢進することが知られている (Yanvaeva et al, *Chest* 2007; Arnson et al, *J Autoimmun* 2010)。

(4) DNA のメチル化は、CpG アイランドとして表される CpG 領域で見られ、多くの遺伝子プロモーターに現れる。また、後天的修飾であるため、加齢やウイルス感染、炎症など様々な要因に影響を受ける。とりわけ、ニコチンは直接的にメチル化を引き起こすことが知られている (Marsit et al, *Int J Cancer* 2006; Soma et al, *Int J Cancer* 2006)。最近、喫煙者におけるメチル化異常 (高/低メチル化) が口腔上皮細胞由来の IL-8 において存在することが報告され (Oliveira et al, *J Clin Periodontol* 2009)、その蓄積は口腔ガンをはじめとする様々なガン発生に関与することも示唆されている (Oka et al, *Cancer* 2009; Supic et al, *J Dent Res* 2010)。

(5) 申請者はこれまでに、喫煙者における好中球遺伝子発現 (Morozumi et al, *J Clin Periodontol* 2004) やフィブリノゲン遺伝子多型の機能解析 (Morozumi et al, *Immunol Invest* 2009) 等の報告を行っており、本研究遂行後は、同様の手法をこれらへ応用し、さらに発展させたいと考えている。

2. 研究の目的

本研究では次の 2 点について明らかにする。

(1) ①健常者 ② (喫煙歴がない) 歯周炎患者 ③ (歯周炎が無い) 喫煙者、④喫煙関連歯周炎患者における IL-6 プロモーター全領域の DNA メチル化解析を行い、その修飾部位および頻度に関し、4 群間の比較解析を行う。

全身 (末梢血) と局所 (GCF 細胞、歯周組織片) においても比較解析する。

(2) GCF ならびに血清中の IL-6 濃度を測定し、各メチル化頻度やファクター (歯周炎、喫煙) との相関を解析する。

3. 研究の方法

【平成 23 年度】

(1) 被検者：以下の 4 群を対象者とする。

① 健常者 60 名、② (喫煙歴がない) 歯周炎患者 60 名、③ (歯周炎に罹患していない) 喫煙者 60 名、④ 喫煙関連歯周炎患者 60 名

・健常者：歯周疾患、喫煙歴がない者 (新潟大学職員、学生)

・歯周炎：新潟大学医歯学総合病院歯周病診療室を受診し、初診時に広汎型中等度慢性歯周炎と診断された者。診断基準は米国歯周病学会の分類に基づく (Armitage, *Ann Periodontol* 1999)。

・喫煙：質問票調査 (ファーガストローム・テスト) およびバックイヤー、血清中コチニン濃度によりミドルもしくはヘビー・スモーカーと診断された者 (受診患者および新潟大学職員、学生)。

いずれも全身疾患が無い者を対象とし、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場合にのみ被験者として登録する。

(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 DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出・精製する (Itagaki et al, *J Clin Periodontol* 2004)。

②GCF 細胞は低速定流ポンプ (ペリスタバイオミニポンプ) を用いた Crevicular washing 法 (Skapski & Lehner, *J Periodon Res* 1976, Kobayashi et al. 日歯周誌 1994) により採取し、QIAamp DNA micro kit (QIAGEN) により DNA を抽出・精製する。

③歯周炎患者においてのみ、歯周外科処置時に廃棄する歯周組織片を採取し、ホモジナイズ後、①と同様の方法で DNA を抽出・精製する。

④歯周炎罹患部位の歯肉溝に Perio-paper® (Harco Electronics) を静置して得られた GCF を Periotron 8000® (Harco Electronics) にて定量する (Morozumi et al, *J Clin Periodontol* 2004)。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) DNA メチル化解析

DNA の一本鎖化後、バイサルファイト処理 (バイサルファイト溶液中での非メチル化シント

シンへのスルホン酸付加、脱アミノ化)、脱スルホン酸処理を行う (MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit, TaKaRa)。つづけて IL-6 プロモーター領域のプライマーを用いた PCR を論文 (Nile et al. *Arthritis Rheum* 2008) を参照に行い、クローニング後、プラスミド DNA 断片配列を DNA シークエンサー (ABI PRISM 377 DNA Sequencer, Applied Biosystems) にて解析する。

(4) 統計解析

各群におけるメチル化頻度を χ^2 検定およびフィッシャーの直接確率計算法を用いて解析する。

【平成 24 年度】

(1) 前年度と同様に検体採取を継続し (予定: 110 名)、同様にメチル化解析を行う。

(2) IL-6 濃度測定

血清および GCF 中の IL-6 濃度を Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) を用いてデュプリケートで測定する (Komatsu et al, *Tissue Antigens* 2005)。

(3) 統計解析

IL-6 濃度と各メチル化頻度、ファクター (歯周炎、喫煙)、部位 (全身・局所) と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

各群におけるメチル化解析の結果、各ファクターおよび IL-6 濃度とメチル化解析と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) 登録された被験者数は各群 (健常者、歯周炎患者、喫煙者、喫煙関連歯周炎患者) 30 名、計 120 名であった。被験者選定にあたり、様々な全身疾患を有する者が多く、サンプリングは予定数よりも少ない結果となった。予定数に達しなかったため、講座にストックしてあるサンプルを使用し、それらを合わせ統計解析可能な N 数とする。

(2) 現在、それら検体を用い、IL-6 プロモーター領域のメチル化解析を行い、4 群間の比較解析を行っている。

(3) 喫煙レベルをパッキイヤーと血清中コチニン濃度で比較するとバラツキが見られた。これは、喫煙本数が多くても浅く吸い込

むなどの喫煙方などに差異があるためと考えられる。

(4) これまでの報告の多くは、部分的な、いくつかの CpG アイランドに限って解析したものが殆どである。最近、白人の関節リウマチ患者の IL-6 プロモーター全領域におけるメチル化解析が報告された (Nile et al, *Arthritis Rheum* 2008)。本研究においても、IL-6 プロモーター領域全てをカバーするメチル化解析を行う。これは、①コーカシアン以外の人種において、②歯周炎患者において、③喫煙者において、いずれも国内外で初めての報告となる。この総括的な解析は、人種や炎症反応、喫煙刺激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り、得られる知見は歯周炎や喫煙が関係する様々な全身疾患の遺伝子診断の指標になると同時に、それらの発症機序を解明する一助になると思われる。

(5) 遺伝子情報の発現は環境因子に影響されることから、全身 (血液) と局所 (GCF、歯肉) では IL-6 遺伝子のメチル化頻度は異なる可能性が考えられる。本研究では、歯周炎に関しては事前の歯周検査により歯周病罹患部位をあらかじめ特定し、喫煙者においては最も刺激を受けやすい上顎前歯口蓋側を対象部位とする。それら部位よりサンプリングを行うことで比較検証が可能となる。また、GCF サンプルの評価は、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もなり、その点からも、極めて貴重な研究といえる。

(6) 歯周炎の病因や発症・進行における DNA メチル化の影響は未だほとんど解明されていない。本研究の結果は、歯周組織破壊のメカニズムや歯周炎の遺伝・免疫・環境因子による発症メカニズムの解明の一助となり、さらには診断や治療法の確立に大きく貢献すると思われる。

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 9 件)

(1) Tomita T, Kubota T, Nakasone N, Morozumi T, Abe D, Maruyama S, Shimizu T, Horimizu M, Saku T, Yoshie H. Gene and protein localisation of Tumor Necrosis Factor (TNF) - α converting enzyme in gingival tissues from periodontitis patients with drug-induced gingival overgrowth. *Archives of Oral Biology*, in

press. 査読有

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2013.02.011.

(2) 両角俊哉、吉江弘正： Over 20 特集 危険！その SRP が菌血症を招いている。歯科衛生士 2013 年 3 月号 (37 巻 3 号)、p16-26, クインテッセンス出版、東京、2013 年。査読無

(3) 森田学、稲垣幸司、王宝禮、埴岡隆、藤井健男、両角俊哉、伊藤弘、山本龍生、吉江弘正： ポジションペーパー (学会見解論文) 生涯を通じての歯周病対策ーセルフケア、プロフェッショナルケア、コミュニティーケア。日本歯周病学会会誌 第 54 巻 4 号 352-374, 2012. 査読有

DOI: 10.2329/periodo.54.352

(4) Komatsu Y, Morozumi T, Abe D, Okada M, Nakasone N, Okuda K, Yoshie H. Effects of Erbium-Doped: Yttrium Aluminum Garnet (Er: YAG) laser on bacteremia due to scaling and root planing. Journal of Lasers in Medical Sciences 2012; 3(4):175-84. 査読有

<http://www.journals.sbm.ac.ir/jlms/article/view/3353>

(5) 両角俊哉、吉江弘正： ヘルスケアプロバイダーとしての歯周病感染リスクマネジメント。抗菌療法、菌血症対策と歯周病感染リスクマネジメント。DHstyle 5 巻 7 号、P36-39, デンタルダイヤモンド社、東京、2011. 査読無

(6) 山口人巳、久保田健彦、濃野 要、両角俊哉、飯山真奈美、川崎健司、吉江弘正： 乳酸菌配合シュガーレスガムが歯周病患者唾液中の歯周病原細菌叢へ与える影響。日本歯科保存学雑誌 第 54 巻第 6 号 466-474, 2011. 査読有

http://www.hozon.or.jp/member/kaisi_vol54_no6.html

(7) 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 46:

345-353, 2011. 査読有

DOI: 10.1111/j.1600-0765.2011.01349.x.

(8) 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 第 53 巻 1 号 40-49, 2011. 査読有

DOI: 10.2329/periodo.53.40

(9) 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 56: 277-284, 2011. 査読有

DOI: 10.1016/j.archoralbio.2010.10.002.

[学会発表] (計 20 件)

① 堀水 慎、川瀬知之、久保田健彦、永田昌毅、奥田一博、富田尊志、両角俊哉、吉江弘正： Platelet-rich fibrin (PRF) によるヒト培養骨膜シートの機能向上。第 12 回日本再生医療学会総会、横浜市、2013.03.22, 日本再生医療学会雑誌 第 12 巻増刊号:284 頁, 2013.

② 富田尊志、久保田健彦、中曾根直弘、両角俊哉、堀水慎、吉江弘正： TNF- α converting enzyme (TACE, ADAM-17), TIMP-3 の歯周組織発現解析および歯肉増殖症への関与。平成 24 年度新潟歯学会第 2 回例会、新潟市、2012.11.10. suppl. P8, 2012.

③ 両角俊哉、中川種昭、川浪雅光、高橋慶壮、佐藤 聡、齋藤 淳、小方頼昌、三辺正人、和泉雄一、沼部幸博、伊藤公一、吉成伸夫、野口俊英、梅田 誠、前田勝正、原 宜興、野口和行、高柴正悟、野村義明、吉江弘正： SPT 期における細菌および抗体価検査値の変動。第 22 回日本歯科医学会総会、プログラム・事前抄録集 p107、大阪市、2012.11.9-11.

④ Fujioka Y, Morozumi T, Kubota T, Yoshie H: Effect of BFR for periodontopathic bacteria in oral cavity and halitosis. The 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Research Forum Poster Session), Los Angeles, U. S. A., September 29 - October 2, 2012 (Abstracts of JSP/JACP Poster Session p30).

⑤ Morozumi T, Nakagawa T, Kawanami M, Takahashi K, Sato S, Saito A, Ogata Y, Minabe M, Izumi Y, Numabe Y, Ito K, Yoshinari N, Noguchi T, Umeda M, Maeda K, Hara Y, Noguchi K, Takashiba S, Kakuta E, Nomura Y, Hanada N, Yoshie H: Bacterial counts and serum antibody levels against periodontal bacteria during SPT phase. The 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Research Forum Poster Session), Los Angeles, U. S. A., September 29 - October 2, 2012 (Abstracts of JSP/JACP Poster Session p29).

⑥ Kubota T, Mauyama S, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T, Saku T, Yoshie H: Amyloid beta (A β) precursor protein expression in periodontitis-affected gingival tissues. The 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in

collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Research Forum Poster Session), Los Angeles, U. S. A., September 29 - October 2, 2012 (Abstracts of JSP/JACP Poster Session p21).

⑦ Inagaki K, Ohmori M, Morozumi T, Numabe Y, Sato S, Noguchi T: Attitude to tobacco control policy and social nicotine dependence among Japanese periodontitis. The 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Research Forum Poster Session), Los Angeles, U. S. A., September 29 - October 2, 2012 (Abstracts of JSP/JACP Poster Session p21).

⑧ Shimizu T, Kubota T, Iwasaki M, Morozumi T, Nakasone N, Yoshie H: Molecular biological factors in drug-induced gingival overgrowth. The 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Research Forum Poster Session), Los Angeles, U. S. A., September 29 - October 2, 2012 (Abstracts of JSP/JACP Poster Session p16).

⑨ Horimizu M, Kawase T, Kubota T, Nagata M, Okuda K, Timita T, Morozumi T, Yoshie H: The combinational use of periosteal sheet and platelet-rich fibrin. The 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Research Forum Poster Session), Los Angeles, U. S. A., September 29 - October 2, 2012 (Abstracts of JSP/JACP Poster Session p10).

⑩ 両角俊哉: 細菌検査・抗体価検査による SPT 期再発の予知判定. 第 55 回秋季日本歯周病学会学術大会シンポジウム 1 歯周炎の再発リスクは予測できるか、つくば国際会議場、つくば市、2012. 9. 23

⑪ 藤岡陽介、両角俊哉、久保田健彦、吉江弘正: 口腔内歯周病原細菌および口臭に対する BFR (ブラッシング+フロッシング+リンシング) の効果. 平成 24 年度新潟歯学会第 1 回例会、新潟市、2012. 7. 14. suppl. P11, 2012.

⑫ 阿部大輔、久保田健彦、両角俊哉、中曽根直弘、清水太郎、吉江弘正: 歯周炎罹患部位歯肉組織における Toll-like receptor signaling pathway 関連遺伝子の上昇. 日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 (第 136 回)、プログラム、宜野湾市、2012. 6. 28-29.

⑬ 堀水 慎、久保田健彦、奥田一博、富田尊志、両角俊哉、吉江弘正、川瀬知之:

Platelet-rich fibrin との複合化によるヒト培養骨膜シートの機能向上. 日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 (第 136 回)、プログラム、宜野湾市、2012. 6. 28-29.

⑭ 藤岡陽介、両角俊哉、久保田健彦、吉江弘正: 口腔内歯周病原細菌および病的口臭に対する BFR (ブラッシング+フロッシング+リンシング) の効果. 日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会 (第 136 回)、プログラム、宜野湾市、2012. 6. 28-29.

⑮ Tomita T, Kubota T, Nakasone N, Iiyama M, Morozumi T, Horimizu M, Abe D, Nagata K, Nohno H, Yoshie H: Gene and protein expression of TNF- α converting enzyme (TACE/ADAM17) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 in gingival tissues from periodontitis patients with drug-induced gingival overgrowth. EUROPERIO7 (Poster presentations), Vienna, Austria, June 6-9, 2012.

⑯ Kubota T, Maruyama D, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T, Saku T, Yoshie H: Amyloid beta (A β) precursor protein expression in periodontitis-affected gingival tissues. EUROPERIO7 (Poster presentations), Vienna, Austria, June 6-9, 2012.

⑰ Abe D, Kubota T, Morozumi T, Nakasone N, Shimizu T, Yoshie H: Toll-like receptor (TLR) signaling pathway is upregulated in periodontitis-affected gingival tissues. EUROPERIO7 (Poster presentations), Vienna, Austria, June 6-9, 2012.

⑱ 両角俊哉: 歯科における禁煙支援の実際. 平成 23 年度社団法人新潟県歯科衛生士会第 4 回研修会、新潟県歯科医師会館、新潟市、2012. 3. 25

⑲ 小松康高、両角俊哉、阿部大輔、岡田萌、奥田一博、中曽根直弘、吉江弘正、小林哲夫: Er:YAG レーザーによる SRP 治療効果および歯血症予防効果の検討. 日本歯科保存学会 2011 年度秋季学術大会 (第 135 回)、プログラム、大阪市、2011. 10. 20-21.

⑳ 富田尊志、久保田健彦、中曽根直弘、飯山真奈美、両角俊哉、永田昌毅、堀水慎、濃野要、吉江弘正: TACE 及び TIMP-3 の薬物性歯肉増殖症と歯周炎の歯肉組織における遺伝子発現とタンパク質局在. 第 54 回秋季日本歯周病学会学術大会 (日本歯周病学会会誌 第 53 巻 秋季特別号 p106)、下関市、2011. 9. 24.

〔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〕

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：