

学位研究紹介

日本人歯周炎患者におけるマトリックス
メタロプロテイナーゼ -1, 及び -3 遺伝
子多型の解析

Matrix metalloproteinase-1 and -3
gene promoter polymorphisms in
Japanese patients with periodontitis.

新潟大学大学院医歯学総合研究科
摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野

板垣 真奈美

Division of Periodontology, Department of Oral Biological
Science, Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences

Manami Itagaki

【目 的】

マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs) は、歯肉炎から歯周炎への病態の進行、すなわち結合組織線維の付着の喪失・歯槽骨破壊を引き起こす重要な酵素群である。これまで、MMPs の mRNA 発現が歯周炎罹患歯肉中において上昇し、歯周炎において MMPs は重要な役割を担っていることが明らかになっている。

近年、MMPs の遺伝子多型として、MMP-1, -3 遺伝子の転写を促進するプロモーター領域の遺伝子多型が報告された。MMP-1 の遺伝子多型は -1607 に位置するグアニン (G) の挿入・欠失多型で (1G/2G), G の挿入により転写因子結合配列が形成され、転写活性が上昇する。MMP-3 の遺伝子多型は、-1171 に位置するアデニン (A) 挿入・欠失多型 (5A/6A) で、5A アレルのほうがより高いプロモーター活性を示すことが明らかになっている。これらの遺伝子多型は、子宮がん・急性心筋梗塞等において疾患との関与が報告されている。また、MMP-1 と MMP-3 遺伝子はともに染色体 11q22.3 に位置している。

歯周炎は多因子性疾患であると同時に、common diseases の一つとして位置づけられ、その発症・進行に遺伝子多型の関与が示唆されている。そこで、今回新しくリアルタイム PCR システムを用いて日本人における MMP-1, -3 遺伝子多型の頻度について検索し、歯周炎との関連性について検討した。

【材料および方法】

新潟大学歯学部附属病院歯周病診療室を受診し、本研究について十分なインフォームドコンセントが得られた侵襲性歯周炎患者 (AgP) 37 名、慢性歯周炎患者 (CP) 205 名 (重度 56 名, 中等度 84 名, 軽度 65 名), 及び健康者 (HC) 142 名を対象とし、採取した末梢血を用いてゲノム DNA を抽出した。

MMP-1, MMP-3 各々の多型領域に特異的なプライマーを設計し、MMP-1 1G アレル, MMP-3 5A アレルが FAM にて、MMP-1 2G アレル, MMP-3 6A アレルが VIC にて蛍光標識されるようアレル特異的 TaqMan MGB プローブを設計、委託合成した。そして、ABI PRISM 7900HT を用いて PCR 反応を行い、SDS2.0 にて反応後の蛍光強度を検出し、遺伝子型を決定した。

AgP 群, CP 群, HC 群での遺伝子型分布, アレル頻度, アレル保有率, 推定ハプロタイプを算出し、歯周炎との関連性について χ^2 検定にて統計学的に解析した。

【結 果】

リアルタイム PCR システムによる MMP-1, -3 遺伝子多型解析に成功した。MMP-1, MMP-3 どちらについても、すべての群間で統計学的に有意差は認められなかったが、MMP-3 では、HC 群と比較して AgP 群に 5A 遺伝子型が多く ($p=0.057$), アレル保有率が高い ($p=0.059$) 傾向にあった (表 1)。

表 1 AgP, CP, HC 各群の MMP-1, MMP-3 遺伝子多型頻度

		AgP		CP		HC	
		%	n	%	n	%	n
MMP-1 遺伝子型	2G/2G	35.1	13	47.3	97	41.5	59
	1G/2G	46.0	17	40.0	82	43.7	62
	1G/1G	18.9	7	12.7	26	14.8	21
アレル頻度*	2G	58.1	43	67.3	276	63.4	180
	1G	41.9	31	32.7	134	36.6	104
アレル保有率**	2G+	81.1	30	87.3	179	85.2	121
	2G-	18.9	7	12.7	26	14.8	21
MMP-3 遺伝子型	5A/5A	0.0	0	2.4	5	2.8	4
	5A/6A	45.9	17	28.3	58	26.8	38
	6A/6A	54.1	20	69.3	142	70.4	100
アレル頻度*	5A	23.0	17	16.6	68	16.2	46
	6A	77.0	57	83.4	342	83.8	238
アレル保有率**	5A+	45.9	17	30.7	63	29.6	42
	5A-	54.1	20	69.3	142	70.4	100

*アレル頻度: 総アレル数 (AgP=74, CP=410, HC=284) に対する各アレルの頻度

**アレル保有率: 各アレルをひとつでも保有するものの割合

表2 慢性歯周炎の重症度別にみた MMP-1, MMP-3 遺伝子多型の頻度

		重度		中等度		軽度		
		%	n	%	n	%	n	
MMP-1 遺伝子型	2G/2G	53.6	30	44.0	37	46.1	30	
	1G/2G	33.9	19	41.7	35	43.1	28	
	1G/1G	12.5	7	14.3	12	10.8	7	
	アレル頻度*	2G	70.5	79	64.9	109	67.7	88
		1G	29.5	33	35.1	59	32.3	42
	アレル保有率**	2G+	87.5	49	85.7	72	89.2	58
2G-		12.5	7	14.3	12	10.8	7	
MMP-3 遺伝子型	5A/5A	3.6	2	1.2	1	3.1	2	
	5A/6A	21.4	12	27.4	23	35.4	23	
	6A/6A	75.0	42	71.4	60	61.5	40	
	アレル頻度*	5A	14.3	16	14.9	25	20.8	27
		6A	85.7	96	85.1	143	79.2	103
	アレル保有率**	5A+	25.0	14	28.6	24	38.5	25
5A-		75.0	42	71.4	60	61.5	40	

CP 群をさらに重症度別に軽度, 中等度, 重度の3群に分類して同様の解析を行ったところ, MMP-1 2G アレル頻度とアレル保有率が重度群で高い傾向にあったが統計学的有意差は得られなかった。MMP-3 についても統計学的有意差は認められなかった (表2)。

推定ハプロタイプ解析では, 1G-5A ハプロタイプが他群と比較して AgP 群に多いものの, 統計学的な有意差までは届かなかった ($p=0.076$) (表3)。

表3 推定ハプロタイプ頻度

ハプロタイプ	AgP	CP	HC
1G-5A	23.0	14.9	14.4
1G-6A	18.9	17.8	22.2
2G-5A	0	1.7	1.8
2G-6A	58.1	65.6	61.6

値はすべて%

【考察および結論】

今回用いた TaqMan プローブを利用したリアルタイム PCR システムは, 従来の RFLP 法やダイレクトシー

クエンシング法より簡便・迅速でしかも正確であることが確認された。今後も他の SNPs 解析に有用であると思われる。

今回の HC 群における遺伝子型, アレル頻度, アレル保有率は, 以前に正常日本人で報告されたものとほぼ同様の結果であったが, 他の人種の報告とは異なるものであった。

日本人歯周炎患者において, MMP-1, -3 の遺伝子多型がその感受性や進行度に影響しなかった理由として, 以下のことが考えられる。まず, 日本人は正常者でも MMP-1 のリスクアレルである 2G 保有率が高いといった人種による違いがあげられる。次に, MMP-1, -3 は共に歯周炎における結合組織・骨組織破壊において重要な役割を果たしていると考えられるが, 同時に治療や組織リモデリングにも関与している。また, MMPs はサイトカイン, 成長因子などのさまざまな局所因子によって転写調節を受けていること, 他の MMPs が機能を代償していること, MMP-1 のノンリスクアレルと MMP-3 のリスクアレルが連鎖していること, TIMPs との量的バランス, についても考慮する必要がある。

以上より, MMPs の発現は遺伝子多型の影響だけでなく, サイトカインネットワークなどを含めて複雑にコントロールされており, 日本人歯周炎患者において, MMP-1, -3 遺伝子多型のみでの発症・重症度への影響は小さいと結論付けた。

【参考文献】

Manami Itagaki, Takehiko Kubota, Hideaki Tai, Yasuko Shimada, Toshiya Morozumi and Kazuhisa Yamazaki : Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis. Journal of Clinical Periodontology 2004;31 (9) : 764-9.