

氏名	板垣 真奈美
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第 66 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis (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)
論文審査委員	主査 教授 吉江弘正 副査 教授 里方一郎 教授 朔 敬

博士論文の要旨

【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、すなわち結合組織繊維の付着の喪失・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)、及び健常者 (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。

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。

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とどかなかった ($p=0.076$)。

【考察】

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 法やシーケ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、同時に治癒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。

【結論】

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。

審査結果の要旨

本論文では、歯肉炎から歯周炎への病態の進行に重要なマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMPs)のプロモーター領域遺伝子多型と侵襲性歯周炎・慢性歯周炎との関連性について、ケース・コントロール研究で検討している。

侵襲性歯周炎患者(AgP)37名、慢性歯周炎患者(CP)205名、及び健常者(HC)142名のDNAから、MMP-1, MMP-3多型領域に特異的なプライマーと、アレル特異的TaqMan MGBプローブから、遺伝子型を決定した。その結果、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。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。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。

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法やシーケ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、SNPs解析に有用であると思われる。また、MMPsは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り、今後の課題である。

いずれにしても、ケースコントロール実験系が十分確立しており、遺伝子解析系の信憑性もあり、結果からの結論も妥当性、新規性があり、本研究を学位論文として価値を認める。