

氏名	ガリシア ジョナ コルテス Galicia Johnah Cortez
学位	博士 (歯学)
学位記番号	新大院博 (歯) 第 8 2 号
学位授与の日付	平成 18 年 9 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
博士論文名	IL-6 receptor(IL-6R) gene polymorphisms and their association with serum levels of soluble IL-6 receptor and periodontitis in a Japanese population (日本人歯周炎患者におけるインターロイキン 6 受容体 (IL-6R) 遺伝子多型と血清中の可溶性 IL-6R 濃度との関連)
論文審査委員	主査 教授 吉江 弘正 副査 教授 網塚 憲生 教授 山崎 和久

#### 博士論文の要旨

##### [目的]

IL-6の生理作用は過去、長期に渡り解明されてきた。歯周組織においては、IL-6遺伝子は様々な細胞において発現しており、歯周炎患者の炎症性組織、歯肉溝浸出液、血漿中ではIL-6濃度の上昇をみる。一方、歯周炎の治療により血清IL-6濃度は有意に減少することも報告されている。

IL-6は標的細胞上に発現している特異的受容体を介して、その生理作用を発現する。まず、IL-6は80KDaの糖タンパクである、膜結合型IL-6受容体 (IL-6R) に結合し、IL-6/IL-6R複合体を形成する。この複合体が更に、シグナル伝達鎖であるgp130と呼ばれる130KDa糖タンパクとの結合に関与し、その結果、IL-6は高親和性に受容体と複合体を形成し、主要シグナル伝達経路JAK/STATを介して、細胞活性化を引き起こす。IL-6R遺伝子は染色体1q21、9に位置している (後者は偽遺伝子である)。IL-6受容体には膜結合型IL-6Rと可溶型sIL-6Rが存在する。また、血清sIL-6Rレベルの上昇は、炎症性腸疾患、悪性リンパ腫、慢性関節リウマチ、歯周病などの疾患で報告されている。

最近、Kimらによって韓国人ボランティア300人を対象とした研究で、IL-6R遺伝子において、着目すべき7つの一塩基多型 (SNP) について報告された。この報告を受けて、筆者らはこれらの遺伝子多型の血清sIL-6Rへの影響を調べるため、とりわけ重要な2箇所の遺伝子多型：プロモーター領域 -183G/A、エクソン9 +48892A/Cについて今回検討した。

## [材料と方法]

健常者ボランティア115名（男性42名、女性73名、平均43.3才、22-77才）の末梢血よりDNA extraction kit (Wako Pure Chemical Industries, Inc., Osaka, Japan) を使用し、ゲノムDNAを抽出した。全ての対象者は日本人で、問診により非喫煙者である事を確認した。本研究はヘルシンキプロトコールを満たしており、また新潟大学倫理委員会の承認の下、行われた。IL-6R遺伝子型はPCR-RFLP（制限酵素切断断片長多型）法およびダイレクトシーケンス法により同定した。（GenBank Sequence Accession ID: X58298）PCRプライマーはヒト染色体1qの配列を参考に設計した（Genbank ID: NT-079484）。

## [結果]

統計解析の結果、血清 sIL-6R 濃度と IL-6R 遺伝子型に強い相関性がみられた（Kruskal-Wallis test、 $P<0.0001$ ：エクソン9、 $P<0.018$ ：プロモーター）。

エクソン9においては、遺伝子型の違いが血清 sIL-6R に強く影響し（Wilcoxon test, Bonnferroni 補正）、C/C 遺伝子型では血清 sIL-6R 濃度は A/A に比較し、約 1.7 倍上昇した。血清 sIL-6R 濃度は、A/A :  $23.8 \pm 1.0$ , A/C:  $29.7 \pm 1.4$ , C/C:  $39.7 \pm 2.8$  ng/ml だった（平均 $\pm$ SE）。また、年齢、性ごとに対象者をまとめ同様に解析しても、有意差は認められた（young group [n=36]、20-31 才、older group [n=34]、40 才以上、男性：n=30、女性：n=40、data not shown）。また、C アリル保有者は A/A 遺伝子型に比較し有意に血清 sIL-6R 濃度が高かった（Mann-Whitney U test、 $P<0.0001$ ）。

一方、プロモーター領域遺伝子多型においては、A/A と G/G 間、A/A と A/G 間において血清 sIL-6R 濃度に有為差が認められた（Wilcoxon test）。しかし、Bonferroni の補正後、有為差が認められたのは、A/A、G/G 間においてのみであった。更に、年齢、性によりグループ分け解析を行ったが、女性においてのみ、遺伝子型による血清 sIL-6R 濃度に有意差が認められた（Kruskal-Wallis test、 $P<0.046$ ）。G アリル保有者は A アリル保有者に比較し、有意に低い血清 sIL-6R 濃度を示した（Mann-Whitney U test、 $P<0.0082$ ）。

今回の報告における日本人の遺伝子多型の頻度は、韓国の研究グループの報告と比較し、有意差はなかった。強調されるべき事は、以下である。すなわち、エクソン9、+48892 A/C SNP はアスパラギン酸/アラニン（D358A）とアミノ酸の置換を引き起こし、更に、この位置が膜結合型 IL-6 受容体の酵素的切断部位にあたる事を Müllberg らが既に立証しているということである。

#### [考察]

筆者らは更に IL-6R SNP の歯周炎における役割を報告し、論文として、2006/06/14 に受理された。インフォームドコンセントを得た日本人歯周炎患者 212 名、健常者 210 名が対象で、PCR-RFLP 法、ダイレクトシーケンス法により遺伝子型を同定した。その結果、侵襲性歯周炎 (AgP)、慢性歯周炎 (CP) 各々において、エクソン 9 +48892A/C 遺伝子多型との関連性を示唆する結果を得た (順に、 $P=0.04$ 、 $P=0.04$ )。加えて、A アリル保有率は健常者に比較し、CP 群で有意に高かった ( $P=0.02$ 、 $OR=2.25$ )。一方、プロモーター -183 G/A SNP において関連性は認められなかった。以上より、IL-6R +48892 A/C 遺伝子多型は歯周炎のリスクとして作用することが示唆された。

#### [結論]

上記事項と今回の結果を踏まえると、以下仮説が成立する。すなわち、エクソン 9 +48892 A/C 遺伝子多型は膜結合型 IL-6 受容体の酵素的切断に著明な影響を及ぼし、その結果、C アリル保有者は C アリル非保有者に比較し、より多く切断を惹起することになる。

## 審査結果の要旨

本論文では、IL-6R遺伝子において、とりわけ重要な2箇所の遺伝子多型：プロモーター領域 -183G/A、エクソン9 +48892A/Cについて、日本人歯周炎患者における遺伝子多型分布と血清sIL-6Rへの影響を検討した。

健常者ボランティア115名ならびに日本人歯周炎患者212名、健常者210名の末梢血よりゲノムDNAを抽出した。IL-6R遺伝子型はPCR-RFLP法およびダイレクトシーケンス法により同定した。その結果、エクソン9においては、遺伝子型の違いが血清sIL-6Rに強く影響しC/C遺伝子型では血清sIL-6R濃度はA/Aに比較し、約1.7倍上昇した。また、Cアレル保有者はA/A遺伝子型に比較し有意に血清sIL-6R濃度が高かった。さらに、侵襲性歯周炎、慢性歯周炎各々において、エクソン9 +48892A/C遺伝子多型との関連性を示唆する結果を得た。加えて、Aアレル保有率は健常者に比較し、慢性歯周炎群で有意に高かった。

IL-6は標的細胞上に発現している特異的受容体を介して、その生理作用を発現する。まず、IL-6は80KDaの糖タンパクである、膜結合型IL-6受容体（IL-6R）に結合し、IL-6/IL-6R複合体を形成する。この複合体が更に、シグナル伝達鎖である130KDa糖タンパクとの結合に関与し、その結果、IL-6は高親和性に受容体と複合体を形成し、主要シグナル伝達経路JAK/STATを介して、細胞活性化を引き起こす。IL-6受容体には膜結合型IL-6Rと可溶型sIL-6Rが存在する。また、血清sIL-6Rレベルの上昇は、炎症性腸疾患、悪性リンパ腫、慢性関節リウマチ、歯周病などの疾患で報告されている。

これらのことを総合してみると、結論としてエクソン9 +48892 A/C遺伝子多型は膜結合型IL-6受容体の酵素的切断に著明な影響を及ぼし、Cアレル保有者はCアレル非保有者に比較し、より多く切断を促し、結果として歯周炎のリスクとして作用することが示唆された。

いずれにしても、臨床実験系、遺伝子解析系が十分確立しており、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。