

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名 小島 杏里
学 位 博 士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第346号
学位授与の日付 平成28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 Tumor necrosis factor- α gene promoter methylation in Japanese adults with chronic periodontitis and rheumatoid arthritis
(日本人慢性歯周炎および関節リウマチ罹患成人における TNF- α 遺伝子プロモーター領域メチル化の解析)

論文審査委員 主査 教授 吉江 弘正
副査 教授 山崎 和久
副査 教授 佐伯 万騎男

博士論文の要旨

今回提出された博士論文の要旨については下記のとおりである。

【背景と目的】

腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 遺伝子は慢性歯周炎 (CP) および関節リウマチ (RA) などの炎症性疾患の感受性に関与するが、それらのエピジェネティックな役割は殆ど解明されていない。本研究の目的は、CP および RA での TNF- α 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を解析することである。

【材料と方法】

インフォームドコンセントが得られた RA 患者 30 名 (RA 群)、CP 患者 30 名 (CP 群)、ならびに健常者 30 名 (H 群) の血液よりゲノム DNA を抽出後、バイサルファイト処理を行った。TNF- α 遺伝子プロモーター領域のプライマーを用いて PCR 増幅後、ダイレクトシーケンシングにて CpG 部位のメチル化状態を解析した。メチル化頻度に有意な群間差を認めた CpG 部位では、健常者血液単核細胞を対象に *Porphyromonas gingivalis* LPS 刺激時の TNF- α 産生を ELISA にて測定し、メチル化有無での機能差を検証した。

【結果と考察】

DNA メチル化に影響する年齢・性別・喫煙状態に有意な群間差は認められなかった。TNF- α 遺伝子プロモーター (-343 ~ +57bp) 領域に 12 CpG 部位を認めた。同領域における CP 群のメチル化率とメチル化頻度は -72bp において H 群と比較し有意に高かった ($P < 0.01$)。RA 群は H 群と比べてメチル化率が 7 部位 (-302, -163, -119, -72, -49, -38, +10bp) で有意に高く ($P < 0.01$)、メチル化頻度が 6 部位 (-163, -119, -72, -49, -38, +10bp) で有意に高い ($P < 0.01$) という結果が得られた。TNF- α 機能検証では -163 bp 非メチル化群はメチル化群と比べ TNF- α 産生は有意に高く ($P = 0.03$)、-161 bp、-119 bp でも高い傾向にあった。他の報告と同様にメチル化による TNF- α 産生の抑制が示唆された。このように RA・CP 群の TNF- α 遺伝子高メチル化状態による TNF- α 発現抑制は、血清 TNF- α レベルと全身・局所炎症との正の相関を示した報告と異なる。この相違は、CpG 高メチル化状態が炎症性疾患との関連よりも、持続的な慢性炎症による DNA メチルトランスフェラーゼの活性化による結果と考えられる。また、TNF- α 遺伝子プロモーター領域では NF κ B、AP1、AP2、SP1、EGR1、cAMP 等の転写因子を含み、これらの結合部位は DNA メチル化で制御されるため、結果的に TNF- α 転写の制御につながる可能性が考えられる。

【結論】

以上の結果をまとめると、日本人の CP や RA 患者における TNF- α 遺伝子プロモーター領域の高メチル化状態は特有であることが示唆された。

審査結果の要旨

各種慢性炎症や自己免疫疾患において、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 遺伝子が深く関与しており、過去約 20 年にわたり多くの研究が精力的に行われてきた。その中で、TNF- α のエピジェネティックの解析は近年とくに注目され研究報告が発表されつつある。TNF- α 遺伝子プロモーター領域のメチル化と neuronal vulnerability, central adiposity, Alzheimer disease, 極度の体重減少、年齢とは関連性が報告されている一方、その直接的な作用機序については明確になっていないものが多い。TNF- α 遺伝子プロモーター領域 CpG 部位のメチル化解析については、リウマチ疾患で数編の論文報告があるのみで、歯周疾患に関しては皆無である。遺伝子多型やメチル化解析の臨床研究においては、民族差が大きく影響しており、グローバルにみて、日本人では比較的単一性があり、遺伝子研究モデルとしても、適切である。このような現状の中で、関節リウマチと歯周病の両疾患について、TNF- α 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を解析する本研究の目的は、極めて新規性が高く、かつ独創的であると思われる。

本研究では、関節リウマチ患者、歯周炎患者と健常者 90 人の末梢血液を対象とし、TNF- α 遺伝子プロモーター領域のプライマーを用いて PCR 増幅後、ダイレクトシーケンスにて CpG 部位のメチル化状態を解析した。その結果、同領域における CP 群のメチル化率とメチル化頻度は -72bp において H 群と比較し有意に高かった。RA 群は H 群と比べてメチル化率が 7 部位で有意に高く、メチル化頻度が 6 部位で有意に高いという結果が得られた。このうち一部の部位については、数編の関節リウマチ患者を対象とした論文と一致した所見であり、学理的にみて妥当性がある。次にこれらのメチル化と TNF- α 産生量との機能検証実験については、健常者血液単核細胞を対象に *Porphyromonas gingivalis* LPS 刺激時の TNF- α 産生を ELISA にて測定した。その結果、-163 bp 非メチル化群はメチル化群と比べ TNF- α 産生は有意に高く、-161 bp、-119 bp でも高い傾向にあった。このメチル化による TNF- α 産生の抑制は、極めて新規性が高く、評価に値する。RA・CP 群の TNF- α 遺伝子高メチル化状態による TNF- α 発現抑制は新規性が高い一方、血清や局所の TNF- α 濃度の上昇との作用機序、因果関係については解釈が難しい。この相違は、CpG 高メチル化状態が炎症性疾患との関連よりも、持続的な慢性炎症による DNA メチルトランスフェラーゼの活性化による結果との考察は、学理的にみて妥当性が認められる。また、このメチル化による TNF- α 産生の抑制を引き起こす遺伝子レベルでの解釈は、TNF- α 遺伝子プロモーター領域では NF- κ B、AP1、AP2、SP1、EGR1、cAMP 等の転写因子を含み、これらの結合部位は DNA メチル化で制御されるため、結果的に TNF- α 転写の制御につながるという考察は、他の疾患でも数多く報告されており、論理的にも支持できる見解である。

以上の結果を導いた実験プロトコルをみると、インフォームドコンセントが得られた RA 患者 30 名 (RA 群)、CP 患者 30 名 (CP 群)、ならびに健常者 30 名 (H 群) の血液よりゲノム DNA を抽出後、バイサルファイト処理を行った。TNF- α 遺伝子プロモーター領域のプライマーを用いて PCR 増幅後、ダイレクトシーケンスにて CpG 部位のメチル化状態を解析した。メチル化解析法は、現在多くの手法が使用されているが、ダイレクトシーケンスでの解析は間違いの極めて少ない、正統的な方法であり、時間的効率からいうと労力のかかる方法であるがそれを着実に実行して点は、高く評価したい。結果の表現法として、メチル化率とメチル化頻度の両面を使用したことについても、確実性・信頼性の面からも評価できる。90 人を対象としてことは、パワー解析で示された適切な例数であり、関節リウマチと歯周炎の臨床指標は、汎用的、標準的、正統的な方法であり、他の論文比較において、有用性のある項目であり、高く評価したい。

最終結論として、日本人の関節リウマチ・歯周炎患者における TNF- α 遺伝子プロモーター領域の高メチル化状態は特有であるという明確な結論となっている。今後の研究の方向性として、対象とした末梢血液だけでなく歯肉局所組織におけるメチル化解析と機能的な研究の必要性を強調しており、重要な点である。

本研究は、目的の明確性、臨床研究デザインの妥当性、正当性があり、測定方法の堅実性、結果からの結論への展開の妥当性も認められた。これらの点において、極めて新規性、話題性が高く、学位論文としての価値を十分に認めるものである。

