

## - 総説 -

## 歯周炎の遺伝子診断と歯周組織再生

吉 江 弘 正, 奥 田 一 博

新潟大学大学院 医歯学総合研究科  
歯周診断・再建学Genetic Diagnosis for periodontitis and  
Regenerative Therapy of Periodontal Tissue

YOSHIE HIROMASA, OKUDA KAZUHIRO

Division of Periodontology,  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

平成 17 年 4 月 15 日受付 4 月 15 日受理

キーワード：遺伝子多型，遺伝子診断，歯周再生療法，組織工学

## はじめに

1999 年以来，歯周診断・再建学分野では，1) 歯周病変の免疫病理学的研究，2) 歯周病の遺伝子診断，3) 歯周再生治療を 3 つの柱にして，研究を進めてきた。本総説では，遺伝子多型を基盤とした歯周炎の遺伝子研究と組織工学的手法による歯周再生治療研究に焦点をあてて，研究結果を紹介する。詳細の所見は論文を参照していただくとして，研究の必要性，方向性，将来展望を含めて解説したい。

## 歯周炎の遺伝子診断

## 1 遺伝子診断の重要性

従来そして現在おこなわれている歯周炎の検査・診断は，口腔清掃状態，歯肉の炎症状態，歯周組織の破壊状態（歯周ポケット，付着レベルや歯槽骨吸収）を数値化して，現在の病態を診断している。これらは歯科医学，歯科医療的にもほぼ確立したものであり，歯周治療を行ううえで基本かつ重要なものである。しかしながら，これらは 現状の病態診断であり，いわば過去の結果をみている。われわれが目指すものは，感受性診断・発症前診断である。すなわち 遺伝子手法を利用して，歯周炎，さらには炎症・感染に対する感受性診断を確立することである。この診断法が確立すると以下のことが可能となる。

1) 歯周炎患者の個体（オーダーメイド）医療が可能

## となる

- 2) 本人ならびに家族に対する炎症・感染症になりやすさの情報を提供できる
- 3) 歯周炎ハイリスク集団を特定し，予防戦略に利用できる

歯周炎の遺伝子診断は，歯科医院へ来院する患者さんのためだけのものではない。地域住民の口腔保健や予防戦略に重要となる。すなわち，日本国内に現存する歯周炎患者は，3400 万人と推定されており，このような疾患の予防戦略としては，ハイリスク集団を特定することが常道であり，遺伝子診断は欠かせないツールとなる。

## 2 歯周炎発症と遺伝子多型

歯周炎は，図 1 に示すように歯肉溝，歯周ポケットに存在する細菌・歯周病原細菌により生体を刺激すると免疫・炎症応答が生じる。この際に産生される炎症性サイトカインにより，コラーゲン破壊による付着の喪失と歯槽骨吸収がおこり，歯周炎としての臨床症状が認められる。この一連の流れに対して，遺伝的要因が大きく影響している。

歯周炎は全国民の約 3 割を占める慢性（成人性）歯周炎と 0.1% 前後の罹患率の侵襲性（早期発症型・若年性）歯周炎に大別できる。現在までの家族疫学，双生児疫学研究により，慢性歯周炎は約 50% が遺伝的要因であり，侵襲性歯周炎は 50% 以上が遺伝的要因であることが報告されている（図 2）。次に歯周炎の遺伝子診断の基本となっている遺伝子多型について述べると，遺伝子多型

とは、「1%以上の頻度で生じる塩基配列の変異」であり、この変異が一塩基のものを SNPs (スニップス、一塩基多型)と呼んでいる。このありふれた塩基の変異、スニップスは人類では 300 万から 1000 万存在するといわれ、いわゆる個体の多様性を生み出している。ありふれた病気 (common disease) である糖尿病、肥満、心筋梗塞、高脂血症、自己免疫疾患、再発性感染症、そして歯周病においても、これらと関連する遺伝子多型が多数報告されている。

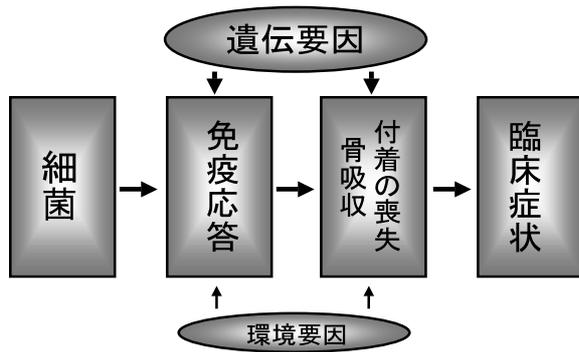


図1 歯周炎の病因論

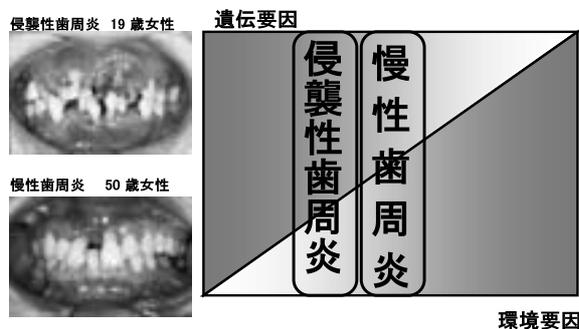


図2 歯周炎における遺伝的要因と環境的要因の割合

### 3 歯周炎感受性に関連する候補遺伝子多型

歯周炎感受性に関連する遺伝子多型研究は、1997 年に K. Kornman により報告された論文<sup>1)</sup>「IL-1 遺伝子は成人性(慢性)歯周炎の重症化因子である」が契機となった。すなわち、歯周組織破壊の主要物質である炎症性サイトカイン IL-1 $\alpha$  の産生量を調節する IL-1 プロモーター領域遺伝子 (IL-1A+4845 と IL-1B+3954) が変異している人 (allele 2) は、歯周炎がより重篤化しやすく、白人におけるオッズ比は 6.8 であると報告した。この変異を持つ人の割合は、白人では約 3 割であるが、日本人では 1 割以下である。その後、侵襲性歯周炎や慢性歯周炎

患者を中心に、多くのケース・コントロール研究が報告された。

われわれも、1997 年に小林らが免疫グロブリン G (IgG) Fc 受容体 IIIb (Fc RIIIb) の遺伝子多型と歯周炎の再発との関連を報告した<sup>2)</sup>。この Fc RIIIb の遺伝子多型 (NA2/NA2) は、エクソン領域の変異でアミノ酸の違いがあり、細胞表面に発現しているこの受容体の構造が異なるものである。そのため、IgG との結合力が低下して、細菌抗原・抗体の貪食能が低下したり、自己免疫の免疫複合体のクリアランス能が低下することが解明されている(図3)。結果として、再発性の炎症(髄膜炎、腎炎)や自己免疫疾患 (SLE, RA) になりやすいことが報告されている。この変異を持つ人の割合は、日本人で

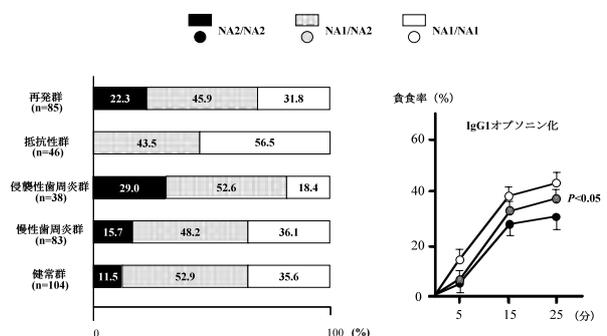


図3 Fc receptor IIIb 遺伝子多型の分布と機能差

は約 1 割、白人では約 4 割である。

われわれは、この Fc 受容体の遺伝子多型とサイトカイン多型 (IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) を二つの柱として、さらに CD14 分子, Vitamin D 受容体, TNF 受容体, IL-6 受容体, MMP-1, 3, を加えて、侵襲性歯周炎・慢性歯周炎患者によるケース・コントロール研究を進めている<sup>2-24)</sup>。現在までに日本人における我々の結果から、侵襲性歯周炎に関連する候補遺伝子としては、Fc RIIIb, Fc RIIb, Fc RI, CD14 分子, IL-1RA (インターロイキン 1 受容体アンタゴニスト) があげられる<sup>4, 13, 14, 16, 19, 20</sup>。また、慢性歯周炎の重症化に関連する候補遺伝子としては、Fc RIIa, Fc RIIIa, TNF-R2, IL-6 が絞り込まれている<sup>10, 17, 20, 24)</sup>。参考までに 2004.12 までに侵襲性歯周炎・慢性歯周炎に関して報告された国際論文を我々の報告を含め、図4、図5にまとめてみた。遺伝子名と遺伝子座を示しており、分母は報告された国際論文数、分子はその中で有意の関連性があったと報告された論文数である。

	関連陽性の論文数 / 国際論文数	本分野の論文 ;
IL-1	A-889, A+4845, B+3954, RN	7 / 11 II-1 Diehl JP 1999 Parkhill JCP 2000 Katho JJSP 2000 Thomson JDR 2001 Tai JCP 2002 Quappe JP 2004 Scapoli GI 2004 FcR
Fc R	IIIB, IIB, I	6 / 6 Kobayashi JP 2000 Yoshihara JDR 2001 Fu JP 2002 Yasuda GI 2003 Chung JCP 2003 Kaneko TA 2004
TNF	:-1031, -863,-857,-308, :+252	0 / 3 FMLP R Gwinn JP 1999 Zhang GI 2003 HLA
IL-4,10	10:-1087, -819, -152	0 / 6 Shapira JP 1994 Takashiba JP 1994 Ohyama JP 1996 Machulla JCP 2002 Stein JPR 2003 VD R
FMLP R	306, 329, 348, 379, 568, 576	2 / 2 Hennig TA 1999 Sun JPR 2002 CD 14
HLA	A9, B15, DRB1, DQB1- 0503, -0602	5 / 6 Yamazaki JDR 2003 Lactoferrin Vellyagounder IAI 2003
VD R	Tt, Bb	2 / 3
CD14	-159	1 / 1
Lactoferrin	+29	1 / 1
Estrogn R, MMP-1,3, -Defensin		0 / 1

図4 侵襲性歯周炎に関連する遺伝子多型論文レビュー

	関連陽性の論文数 / 国際論文数	本分野の論文 ;
IL-1	A-889, A+4845, B+3954, RN	8 / 12 MMP Kornman JCP 1997 Gore JCP 1998 Garbrauth JCP 1999 McDevitt JP 2000 Papapanou JCP 2001 Laine JDR 2001 Cullinan JCP 2001 Meisel JDR 2003 Fc R
Fc R	IIIA, IIIB, IIA, IIB	6 / 8 De Souza JCP 2003 Holla JCP 2004 HLA
TNF	:-1031, -863,-857,-308, :+252	4 / 8 Machulla JCP 2002 Stein JPR 2003 CD 14
IL-2,-4,-6,10	2:-330, 6:-572, 10:-1087, -819, -592	5 / 6 Holla JMG 2002 Folwaczny JCP 2004 TGF-
VD R	Aa, Tt	3 / 3 De Souza JCP 2003 Fibrinogen
MMP-1	-1607	2 / 3 Sugita CEI 1999 Kobayashi JP 2001 Sahingur JP 2003 MPO
HLA	A, B, Cw	2 / 2 Meisel GI 2001 Loos JCP 2003 Meisel GI 2002 TNF R
CD14	-159	2 / 2 Yamamoto JP 2004 Shimada JCP 2003 Estrogen R
TGF-	-509	1 / 2 Galbraith JCP 1999 Holla JP 2001 Zhang JPR 2004 CYP, GST
Fibrinogen	-455	1 / 1 Fassmann JPR 2003 Soga JCP 2003 Kim JCP 2004 RAGE
MPO	-463	1 / 1 IL-2, -4, -6, -10 Scarel JCP 2002 Holla JP 2001 RAGE
TNF R	+587	1 / 1 Berglundh JCP 2003 S-Caminaga JCP 2004 Holla JP 2004 Kocher JCP 2002 VD R
Estrogen R		1 / 1 Komatsu TA 2005
CYP450, GST		1 / 1 Inagaki JP 2003 Tachi LS 2003 Brito Jr JP 2004
TLR-2,4, CCR5, RAGE, CARD15, ALDH <sub>2</sub>		0 / 1
RAGE		1 / 2
NAT2		1 / 1

図5 慢性歯周炎に関連する遺伝子多型論文レビュー

#### 4 多 SNP 解析とゲノムワイド解析

歯周炎のような common disease では、単一遺伝子により決定されるものではなく、多くの遺伝子（リスク遺伝子、関連遺伝子と表現する）の重なりにより生ずる疾患（polygenic disease）として提唱されている。図6は、8項目の多リスク遺伝子モデルであり、今後の研究により、歯周炎のリスク遺伝子は10-20前後特定されるのではないかと推定されている。そのためにも、一回

の検査で多数のSNPsを同時にかつ迅速に特定できる検査法が必須となる。現在われわれは、日本の代表的検査会社であるBMLとの共同開発で歯周炎に適したナノインベーター法を進めている。この方法は、PCRによる遺伝子増幅を行うことなく、単一ハイブリダイゼーション・発色法であり、通常のスライドガラスの大きさに最大5040サンプルを測定することが可能であり、比較的安価な方法である。現在20SNPsのセットを確立し、日

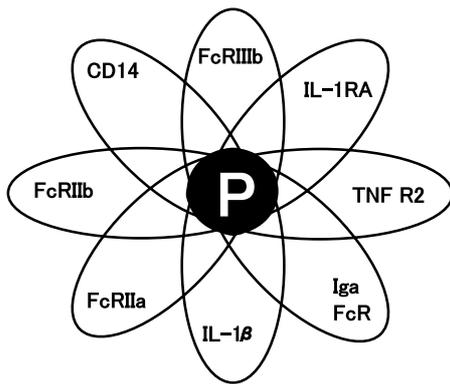


図6 歯周炎における多リスク遺伝子モデル

本歯周病学会母体の総合研究で徳島大学の永田俊彦教授を主任研究者として国内14施設で解析中である。

一方、今まで述べてきた遺伝子解析法は、候補遺伝子アプローチといわれるものであり、ある疾患の原因論に基づいて関連するタンパクを仮説上で定め、実証して、積み上げていく方法である。これに対して、ゲノムワイド(ゲノムスキャン)アプローチあるいはゲノムポジショニング法といわれる方法がある。すなわち、染色体に一定の間隔でマーカーを設定して、疾患と関連のある(連鎖不平衡)の位置から、遺伝子を特定する方法で、新規遺伝子を見つけだすのに適している。現在われわれも、東海大学医学部の猪子英俊教授との共同研究でマイクロサテライト多型を使用した解析が進行中である。

#### 5 今後の研究方向 - 遺伝子多型と歯周医学 -

近年、ペリオドンタル・メデシン(歯周医学)といわれる研究分野が台頭し、歯周病研究における第3のターニングポイントであるといわれている(第1のターニングポイント; 歯周病原細菌と生体応答, 第2のターニングポイント; 歯周再生治療)。歯周医学とは、歯周炎と全身疾患すなわち冠動脈心疾患、糖尿病、早産、骨粗鬆症、自己免疫疾患、誤嚥性肺炎との関連を研究する分野である。当初、疫学的研究からの関連性が報告され、その後、因果関係や関連性の機序に関する説明がなされている。歯周炎とこれらの疾患との接点は、1) 歯周病原細菌が血流を介して他の臓器にいく、2) 歯周炎により血清中の炎症性サイトカインが上昇して作用する、3) 細菌成分・歯周組織と他の臓器とに共通抗原がある、4) 共通の生活習慣に関連するリスク因子がある、5) 二つの疾患に共通した遺伝子多型がある が推定されている。

とくに共通遺伝子多型の存在は診断、歯科医療の面でも重要である。現在までわれわれは医学部内部環境医学講座(第二内科)と、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチ(RA)患者に

おける歯周炎の状態ならびに遺伝子解析をおこなっており、Fc受容体遺伝子多型が共通遺伝子の一つではないかと考えている。また、米国の研究グループでは、IL-1遺伝子多型が歯周炎と冠動脈心疾患とを結びつける重要な項目であることを報告している。遺伝子診断学からみると、このような共通遺伝子多型解析法が確立すれば、歯周炎ばかりでなく炎症・感染症を含めた多くの病気に関する情報を本人ならびに家族に提供できることになり、このことが病める患者さんへの貢献となることを期待し、また確信している。

#### 歯周組織再生

##### 1 臨床研究の流れ

本分野における歯周組織再生についての臨床研究の流れを図7に示した。1980年代には、骨移植材である人工合成骨移植材(ハイドロキシアパタイト、第三リン酸カルシウム)を中心に再生治療が行われた。1990年代に入り、歯周組織再生誘導法としてGTR膜(非吸収性; ePTFE膜)が利用され、その臨床実績から1996年に歯学部病院における高度先進治療として認定され、その後吸収性のcollagen膜が臨床の場で多用されるようになった。1997年ころから、幼若ブタの歯胚から抽出したエナメル基質タンパク(EMD)の基礎研究と並行して臨床研究が進行した。それから、自家の多血小板血漿(PRP)が臨床応用されている。細胞治療に関しては、2000年代に入り、口腔粘膜の上皮細胞および線維芽細胞の培養シートによる歯肉増大手術をてがけ、現在臨床試験研究の段階である。ここでは、エナメル基質由来タンパク、自家の多血小板血漿および口腔粘膜培養シートによる歯肉増大手術について本分野の研究成果を説明する。

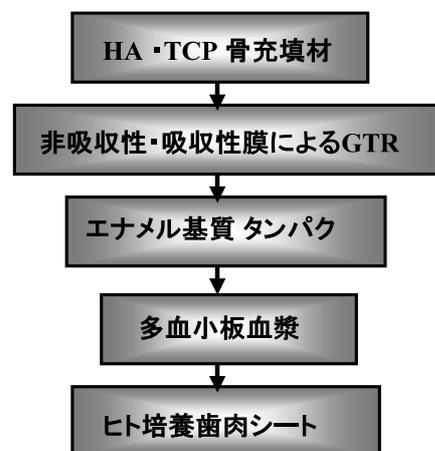


図7 患者応用できた我々の歯周再生治療

## 2 エナメル基質タンパクによる歯周組織再生効果

エナメル基質タンパク (EMD) として、幼若ブタの歯胚から抽出したものが現在臨床で使用されており (商品名; エムドゲイン), 主成分はアメロジェニンであり, その他のエナメル基質タンパクおよび各種成長因子が含まれている。

### 1) エナメル基質タンパクの細胞への作用<sup>25-27)</sup>

腫瘍由来の上皮細胞への作用としては, 細胞分裂抑制があり, 増殖抑制タンパクである p21<sup>WAF1/cip1</sup> の誘導とそれによる細胞周期の G1 期での停止が深く関与していることが明らかとなった。細胞内においては, MAP カイネースのリン酸化が認められ, smad 2 の核内移動があることから, TGF- $\beta$  様作用が推定される。株化および継代歯肉歯根膜細胞についてみると, 付着・遊走能の増加が, さらに石灰化の指標としてのアルカリフォスファターゼの増加が著明に認められた。腫瘍由来骨芽細胞株についてみると, 遊走能の増加, 細胞分裂の増加, アルカリフォスファターゼの増加が認められる。特に, 前骨芽細胞における細胞分裂能の増加が著しく, TGF- $\beta$  産生の増加が示されている。

### 2) 臨床的效果 (図 8)<sup>28, 29)</sup>

筆者らは, 16 名の患者の口腔内を無作為に 2 分割し, 術者, 検査者いずれもどちらの部位になにを投与するか知らせないようにした上で, 片方の部位に EMD を, もう片方は EMD の溶媒である PGA (偽薬) を対照 (Cont) として投与して 12 カ月後の臨床評価を行った。歯周ポケットの減少量 (EMD: 3.00 mm, Cont: 2.22 mm,  $p < 0.05$ ), 付着の獲得量 (EMD: 1.72 mm, Cont: 0.83 mm,  $p < 0.05$ ), レントゲンの骨密度増加量 (EMD: 20.2 %, Cont: -3.9 %,  $p < 0.01$ ) において有意にエナメル基質タンパク投与群が優れていた<sup>28)</sup>。

また, 上記の患者群で GCF 中に含まれる組織破壊および治癒促進のマーカーとして有用な, 間質コラーゲナーゼである MMP-1(matrix metalloproteinases-1) と MMP-8 およびその特異的 inhibitor である TIMPs

(Tissue inhibitors of metalloproteinases) の変動を測定した。

術後, 2, 4, 12 週において, 各項目とも EMD 群では対象群に比較して低い値を示した。これより, 手術後早期 (1 ~ 3 カ月) の創傷治癒過程で EMD はコラーゲナーゼ活性を抑制し, 結合組織破壊に対する防御機構を高めていることが示された<sup>29)</sup>。

## 3 多血小板血漿の歯周組織再生効果

多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma: PRP) は, 濃縮された血小板を含む血漿であり, 成長因子である TGF- $\beta$  や PDGF, 血漿中の接着因子であるフィブロンectin, ビトロネクトin, および糖蛋白であるフィブリンが含まれており, 歯周手術時に使うことで, 創傷治癒促進効果および歯周組織再生の促進効果が期待されている。

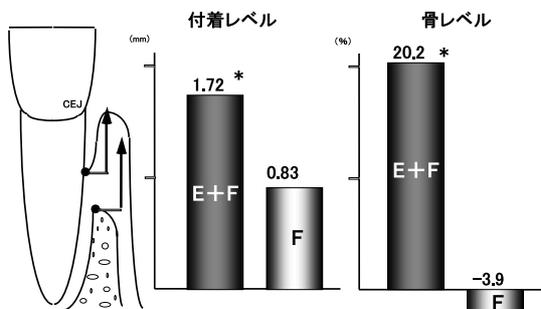
PRP の調整方法としては, 患者自身の自己血を 8.5ml 採取したあと, 遠心分離器で 2400 回転, 10 分間回転し, 下層の血液細胞分画の最上部から上 1mm の上層分画を採取し, 再び 3600 回転, 15 分間回転して得られた下層分画 約 0.6cc を PRP として使用している。この方法で, PRP は通常血漿と比べて血小板は約 2.8 倍, TGF- $\beta$  は約 3.5 倍, PDGF は約 4.4 倍に濃縮されていることが明らかとなった<sup>30)</sup>。

### 1) PRP の各種細胞への作用<sup>30-32)</sup>

骨芽細胞および歯肉線維芽細胞に対して 5% PRP を 24 時間作用すると, 細胞数の増殖促進が認められ, 上皮細胞では増殖抑制が示された。また, 歯根膜細胞に 5% PRP を添加すると, 30 分以内にフィブリン塊が形成される。その後, 0.5% PRP で歯根膜細胞を 24 時間処理すると, I 型コラーゲンの産生が促進され, トロンピンは, 骨芽細胞および歯根膜細胞から供給されていることが明らかとなった。

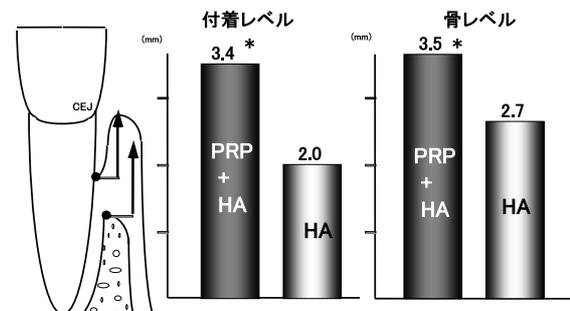
### 2) 臨床効果 (図 9)<sup>33)</sup>

歯周手術の際に, PRP + アルギン酸ナトリウム + 八



16名歯周炎患者, split-mouth design, double blind, 1-3症性 n = 36, エムドゲイン処置群(E+F), エムドゲイン非処置群(F), 12ヶ月後, \*有意差あり(p<0.05) Okuda et al. JP 2000

図 8 エムドゲイン治療の臨床効果



70名歯周炎患者, 1-3症性骨欠損70部位, 多血小板血漿+ハイドロキシアパタイト(PR+HA) n=35, ハイドロキシアパタイト(HA) n=35, 12ヶ月後, \*有意差あり(p<0.05) Okuda et al. JP 2005 in press

図 9 多血小板血漿治療の臨床効果

イドロキシアパタイト複合体を骨欠損部へ移植して使用している。実験群を上記複合体の投与群，対照側を生食 + ハイドロキシアパタイト投与群として観察期間1年にわたる無作為比較臨床研究を行った。PRP + アパタイト複合体を局所応用した35症例の1年予後は，平均3.4mmの付着獲得量であった。対照群としての生食 + アパタイトのみ投与した群では，平均2.0mmであり，明らかに再生能力が認められた。また，臨床的印象としては，創傷治癒の促進が認められる。さらに，歯槽骨の添加量については，生食 + アパタイト群では，平均2.7mmの骨添加に対して，PRP + アパタイト複合体群では3.5mmの骨添加が認められた。

4 口腔粘膜培養シートによる歯肉増大手術

歯肉軟組織の上皮細胞および線維芽細胞を培養し臨床応用可能なシートを作成することに成功した。そこでこの自家培養歯肉上皮シートならびに自家培養線維芽細胞シートを歯肉増大術に臨床応用した。

1) 自家培養歯肉上皮細胞シート<sup>34,36)</sup>

このシートについては，日本ティッシュエンジニアリングとの共同研究である。患者さんの下顎臼後結節部位から，健全な付着歯肉組織，2 x 2mmを外科的に採取して，畠およびGreenらの方法を改良した方法<sup>29,31)</sup>で培養上皮シートを作製した。培養歯肉上皮シートの生物学的性状として，シート形成過程で細胞から培養液中にVEGF, TGF- 1, TGF- , EGFが放出され，高い濃度で検出された(図10)<sup>34)</sup>。また，シートの組織切片について，増殖細胞核抗原・PCNA陽性細胞が基底細胞層で多数認められ，上皮細胞の分化マーカーであるサイトケラチン19，インボルクリンの陽性細胞も基底細胞上層に存在した。これより歯肉培養上皮シートは細胞増殖活性および角化能を有していることから，創傷治癒および組織再生を促進することが示唆された<sup>35)</sup>。さらに，慢性剥離性歯肉炎患者にこの細胞シートを応用した。患者は60歳女性，上顎左側の歯肉の発赤，潰瘍，疼痛を主訴に来院した。患者の臼後結節部の付着歯肉小片を採取して培養上皮シートを作製した。これをコラーゲン

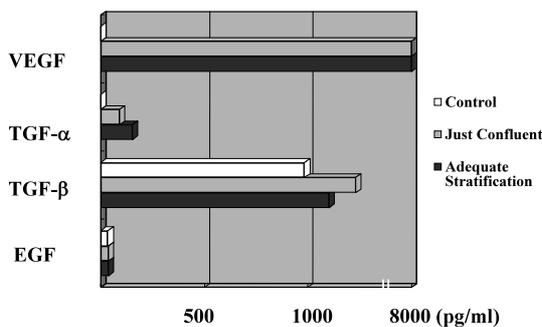


図10 歯肉上皮細胞シートからの各種成長因子の産生

/シリコン2層膜を担体として上皮シートを巻き付け，病変部を切除した受容床に適合させ縫合した。6か月後，当該部位は術前と比較して炎症所見は全く認められず新しく角化歯肉が獲得された。術前の組織所見では上皮組織は萎縮して，上皮と結合組織の間に亀裂が認められ，結合組織層には，毛細血管とリンパ球浸潤を伴う炎症性肉芽組織が広範に認められた。培養上皮シート移植6か月後の組織所見では，上皮と結合組織の亀裂は消失し炎症性細胞浸潤は著明に減少した(図11)<sup>36)</sup>。

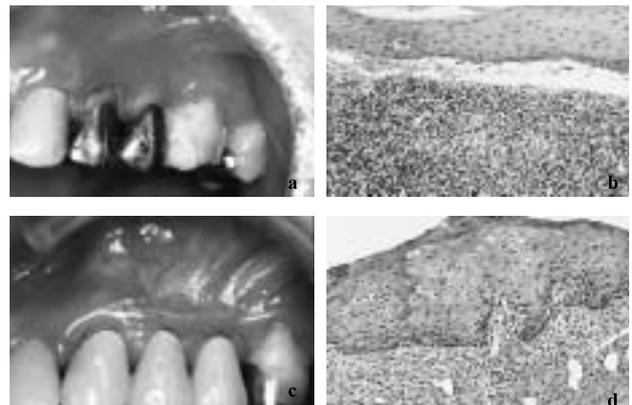


図11 自家培養歯肉上皮細胞シートを慢性剥離性歯肉炎に応用した症例  
 a; 治療前の歯肉                      b; 治療前の歯肉組織像 (H-E染色)  
 c; 手術6ヶ月後の歯肉                  d; 手術6ヶ月後の歯肉組織像 (H-E染色)

2) 自家培養歯肉線維芽細胞シート<sup>37)</sup>

このシートについては，北里大学大学院医療系研究科再生組織工学，黒柳能光教授との共同研究である。細胞のスキャフォールドにはヒアルロン酸スポンジにアテロコラーゲンのゲルを組み合わせたマトリックスを使用した。ヒアルロン酸分子は細胞遊走，血管新生を促進させ，アテロコラーゲン分子は線維芽細胞の走化性を有している。培養歯肉線維芽細胞シートの生物学的性状としては，線維芽細胞培養1週間で培養液中へ放出される成長因子については，interluekin-6, hepatocyte growth factor (HGF), interluekin-8, VEGF, TGF- のレベルが上昇していた(図12)。IL-6はケラチノサイトの遊走と増殖に密接に関連しており，IL-8は血管内皮細胞の遊走と増殖を刺激することが知られている。HGFは血管新生を含む多くの作用を有していることが報告されている。

さらに，この細胞シートを，歯肉退縮部位の根面被覆術として症例応用した。24歳女性，下顎前歯部唇側の歯肉退縮と審美性改善のための治療を希望して来院された。同一患者の下顎臼後結節部から健全な歯肉小片を採取して培養歯肉線維芽細胞シートを作製した。受容床を



- 9) Endo M, Tai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H: Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. *J Periodontol*, 72:1554-1559, 2001.
- 10) Kobayashi T, Yamamoto K, Sugita N, van der Pol W-L, Yasuda K, Kaneko S, Van De Winkel JGJ, Yoshie H: The Fc receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in Japanese patients. *J Periodontol*, 72: 1324-1331, 2001.
- 11) Sugita N, Kobayashi T, Ando Y, Yoshihara A, Yamamoto K, Van De Winkel JGJ, Miyazaki H, Yoshie H: Increased frequency of Fc RIIb-NA1 allele in periodontitis-resistant subjects in an elderly Japanese population. *J Dent Res*, 80:914-918, 2001.
- 12) Yamamoto K, Sugita N, Kobayashi T, Okuda K, Van De Winkel JGJ, Yoshie H: Evidence for a novel polymorphism affecting both N-linked glycosylation and ligand binding of the IgG receptor IIIB(CD16). *Tissue Antigens*, 57:363-366, 2001.
- 13) Tai H, Endo M, Shimada Y, Go E, Orima K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H: Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with early onset periodontitis in Japanese. *J Clin Periodontol*, 29:882-888, 2002.
- 14) Yasuda K, Sugita N, Kobayashi T, Yamamoto K, Yoshie H: Fc RIIb gene polymorphisms in Japanese periodontitis patients. *Genes Immun*, 4:541-546, 2003.
- 15) Kobayashi T, Ito S, Yamamoto K, Hasegawa H, Sugita N, Kuroda T, Kaneko S, Narita I, Yasuda K, Nakano M, Gejyo F, Yoshie H: Risk of periodontitis in systemic lupus erythematosus is associated with Fc receptor polymorphisms. *J Periodontol*, 74:378-384, 2003.
- 16) Yamazaki K, Ueki-Maruyama K, Oda T, Tabeta K, Shimada Y, Tai H, Nakajima T, Yoshie H, Herawati D, Seymour GJ: Single-nucleotide polymorphism in the CD 14 promoter and periodontal disease expression in a Japanese population. *J Dent Res*, 82:612-616, 2003.
- 17) Yamamoto K, Kobayashi T, Grossi S, Ho AW, Genco RJ, Yoshie H, De Nardin E: Association of Fc receptor IIa genotype with chronic periodontitis in Caucasians. *J Periodontol*, 75:517-522, 2004.
- 18) Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H, Meyle J: Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31:384-389, 2004.
- 19) Kaneko S, Kobayashi T, Yamamoto K, Jansen MD, van de Winkel JGJ, Yoshie H: A novel polymorphism of Fc R1(CD89) associated with aggressive periodontitis. *Tissue Antigens*, 63:572-577, 2004.
- 20) Shimada Y, Tai H, Endo M, Kobayashi T, Akazawa K, Yamazaki K: Association of tumor necrosis factor receptor type 2 +587 gene polymorphism with severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31:463-469, 2004. (corresponding author Yoshie H)
- 21) Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, Shimada Y, Akawaza K, Yoshie H: Polymorphisms in the IL-6 receptor(IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced. *Genes Immun*, 5:513-516, 2004.
- 22) Itagaki M, Kubota T, Tai H, Shimada Y, Morozumi T, Yamazaki K: Matrix metalloproteinase-1 and -3 gene promoter polymorphisms in Japanese patients with periodontitis. *J Clin Periodontol*, 31:764-769, 2004. (corresponding author Yoshie H)
- 23) Yoshihara A, Sugita N, Yamamoto K, Kobayashi T, Hirotsu T, Ogawa H, Miyazaki H, Yoshie H: Fc RIIb genotypes and smoking in periodontal disease progression among community-dwelling older adults in Japan. *J Periodontol*, 76:250-255, 2005.
- 24) Komatsu Y, Tai H, Galicia JC, Shimada Y, Endo M, Akazawa K, Yamazaki K, Yoshie H: Interleukin-6(IL-6) - 373 A9TII allele is associated with reduced susceptibility to chronic periodontitis in Japanese subjects and decreased serum IL-6 level. *Tissue Antigens*, 65:110-114, 2005.
- 25) Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM: Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC25 epithelial cells. *J Periodont Res*, 35: 291-300, 2000.

- 26) Kawase T, Okuda K, Momose M, Kato Y, Yoshie H, Burns DM: Enamel matrix derivative (EMDOGAIN ) rapidly stimulates phosphorylation of the MAP kinase family and nuclear accumulation of smad2 in both oral epithelial and fibroblastic human cells. *J Periodont Res*, 36: 367-376, 2001.
- 27) Kawase T, Okuda K, Yoshie H, Burns DM: Anti-TGF- $\beta$  antibody blocks enamel matrix derivative-induced upregulation of p21<sup>WAF1/cip1</sup> and prevents its inhibition of human oral epithelial cell proliferation. *J Periodont Res*, 37: 255-262, 2002.
- 28) Okuda K, Momose M, Miyazaki A, Murata M, Yokoyama S, Yonezawa Y, Wolff LF, Yoshie H: Enamel matrix derivative in the treatment of human intrabony osseous defects. *J Periodontol*, 71: 1821-1828, 2000.
- 29) Okuda K, Miyazaki A, Momose M, Murata M, Nomura T, Kubota T, Wolff LF, Yoshie H: Levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and matrix metalloproteinases-1 and -8 in gingival crevicular fluid following treatment with enamel matrix derivative (EMDOGAIN ). *J Periodont Res*, 36: 309-316, 2001.
- 30) Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*, 74: 849-857, 2003.
- 31) Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma (PRP)-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*, 74: 858-864, 2003.
- 32) Kawase T, Okuda K, Saito Y, Yoshie H: In vitro evidence that the biological effects of platelet-rich plasma on periodontal ligament cells is not mediated solely by constituent transforming-growth factor- $\beta$  or platelet-derived growth factor. *J Periodontol*, 76: 98-105, 2005.
- 33) Okuda K, Tai H, Tanabe K, Suzuki H, Sato T, Saito Y, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: A comparative controlled clinical study. *J Periodontol*, 76: 881-889, 2005.
- 34) Momose M, Murata M, Kato Y, Okuda K, Yamazaki K, Shinohara C, Yoshie H: Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and - $\gamma$  are released from human cultured gingival epithelial sheets. *J Periodontol*, 73: 748-753, 2002.
- 35) Murata M, Momose M, Okuda K, Ninagawa Y, Ueda M, Yoshie H: Immunohistochemical localization of cytokeratin19, involucrin and PCNA in human cultured gingival epithelial sheets. *J Int Acad Periodontol*, 2005 in press.
- 36) Okuda K, Momose M, Murata M, Saito Y, Inoie M, Shinohara C, Wolff LF, Yoshie H: Treatment of chronic desquamative gingivitis using tissue-engineered human cultured gingival epithelial sheets: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 24: 119-125, 2004.
- 37) Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsui H, Kim HJ, Numari S, Mabuchi Y, Kagawa S: Establishment of banking system for allogenic cultured dermal substitute. *Artif Organs*, 28:13-21, 2004.