

学位研究紹介

関節リウマチおよび歯周炎罹患者における IL-6 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析

Interleukin-6 Gene Promoter Methylation in Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野
石田光平

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

【目 的】

エピジェネティクスとは DNA メチル化やヒストン修飾などからなる後天的修飾である。その中の一つである DNA メチル化は DNA 塩基配列の変化を伴わずに遺伝子機能の発現を制御・伝達し、遺伝子発現制御のメカニズムとしての役割を担っている。この現象は医学領域とくに悪性腫瘍などの疾患発症要因として広く知られているが、近年、悪性腫瘍以外の疾患におけるエピジェネティクス異常の可能性があることが明らかになってきており、これらの分野におけるエピジェネティクス研究の重要性がますます高まっている。炎症性サイトカインの一つとして知られるインターロイキン6 (IL-6) は慢性歯周炎および関節リウマチの共通病因の1つであり、炎症性疾患で発現が上昇する。最近では、炎症性疾患発症と各種サイトカイン遺伝子の DNA メチル化との関連性が指摘されている。しかし、炎症性疾患と IL-6 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化との関連性についての知見は未だ乏しい。そこで本研究では、慢性歯周炎および関節リウマチ患者、健常者由来の末梢血単核細胞 DNA を対象に、各被験者の IL-6 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化解析を行い、疾患感受性との関連性について検証した。

【材料および方法】

インフォームドコンセントが得られた関節リウマチ患者群 (RA 群) 30 名および慢性歯周炎患者群 (CP 群) 30 名、ならびに健常者群 (H 群) 30 名を対象に全被験

者より末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出後、バイサルファイト処理を行い、PCR 法によりプライマーを用いて IL-6 遺伝子プロモーター領域を増幅後、ダイレクトシーケンス法にて DNA 塩基配列を解析し、5'-CG-3' (CpG) 部位の特定とそれぞれの部位におけるメチル化頻度を測定した。また、各被験者の血清 IL-6 濃度と健常者群の末梢血由来単核細胞に対する *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) LPS 刺激後の IL-6 産生量については ELISA 法を用いて測定を行った。統計学的検定は、Kruskal-Wallis test ならびに Mann-Whitney U test を用いた。

【結 果】

3 群間のメチル化頻度を比較した結果、IL-6 遺伝子プロモーター全領域中 (-1200 ~ +27bp) で、-74bp 部位では H 群が RA 群と CP 群と比較しメチル化頻度が有意に高く、+19bp 部位では CP 群が H 群と RA 群と比較し有意に高い結果が得られた (♣, †; $P < 0.05$, 図 1)。その後、有意差のあった -74bp と +19bp 部位について ELISA 法を用いてメチル化状態による血清 IL-6 濃度を比較した結果、血清 IL-6 濃度は -74bp 部位において非メチル化群がメチル化群と比較し有意に高い結果となった ($P = 0.043$, 図 2 A)。一方、+19bp 部位では有意な差は認められなかった ($P = 0.96$, 図 2 B)。そして、交絡因子である年齢・性別・喫煙状態の影響を考慮させた比較においても同様に -74 部位では非メチル化群がメチル化群と比較し有意に高い結果となった ($P = 0.03$, 図 2 C)。一方、+19 部位では有意な差は認められなかった ($P = 0.75$, 図 2 D)。健常者の末梢血由来単核細胞の *P. gingivalis* LPS 刺激後の IL-6 産生量の比較を行った結果、-74bp 部位において非メチル化状態ではメチル化状態と比較して有意に高い結果となった ($P = 0.03$, 図 3)。

【考察・結論】

エピジェネティクスとして知られている後天的修飾の一つである DNA メチル化は遺伝子プロモーター領域中のシトシン塩基とグアニン塩基が隣接し合った CpG 部位におけるシトシン塩基に対してメチル基転移酵素が作用することによってメチル化が起こるとされている。また、これらの酵素は年齢や性別、喫煙などといった環境因子によって付加の影響を受けると報告されている。本

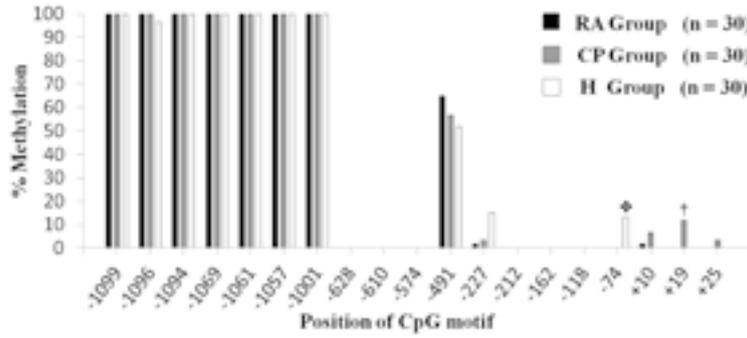


図1 3群間におけるIL-6遺伝子プロモーター領域メチル化頻度比較

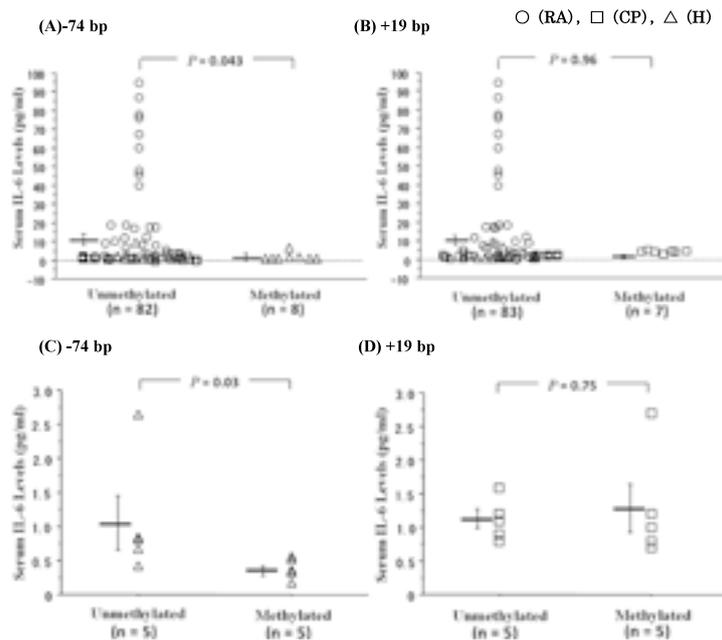


図2 -74bp, +19bp 部位のメチル化状態における血清IL-6濃度比較

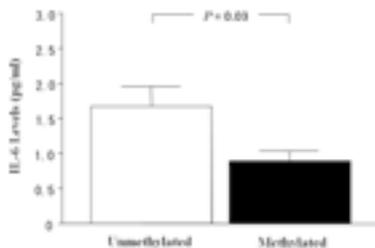


図3 健常者群由来末梢血単核細胞のP. gingivalis LPS刺激後のIL-6産生量比較

研究の結果として、IL-6 遺伝子プロモーター上 -74bp 部位は免疫反応において中心的役割を担う転写因子 Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB) (-75 ~ -63bp) の結合部位であり、この部位におけるメチル化頻度は RA 群や CP 群といった疾患群と比較し、健常者群で有意に高かった。また、全被験者の血清 IL-6 濃度は -74bp 部位における非メチル化状態でメチル化状態と比較し有意に高かった。in vitro の実験においても同様に末梢血単核細胞に対する P. gingivalis LPS 刺激後の

IL-6 産生量は -74bp 部位における非メチル化状態で有意に高い結果となった。すなわち、-74bp 部位のシトシン塩基に対しメチル化が起こることによりメチル基に特異的なタンパクが結合し、転写因子 NF-κB の結合が阻害され、その結果、炎症性サイトカインである IL-6 タンパクの発現が抑制される可能性があることが推察された。以上の結果より、IL-6 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態が慢性歯周炎および関節リウマチの発症に関与する可能性が示唆された。

【文 献】

Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H Interleukin-6 Gene Promoter Methylation in Rheumatoid Arthritis and Chronic Periodontitis. Journal of Periodontology.2012; 83(7):917-925. (図は全て文献より改変して引用)