

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20389

研究課題名(和文) 口腔上皮の感染によるエピジェネティクス修飾に関するターゲット遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of the target genes involved in epigenetics with the infection of the oral epithelium

研究代表者

吉田 光希 (Yoshida, Koki)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：30453260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病や口腔粘膜疾患に関わる遺伝子の同定を行うことを目的とした。歯周病原菌由来毒素刺激によって変化のみられた遺伝子について解析した結果、線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR3)及びアポトーシス関連因子(CASP2)、細胞周期調節因子(CDC25B)においてメチル化レベルの有意な変化が認められた。以上より、歯周病原菌由来毒素は、炎症反応を惹起することで、細胞周期にも影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the target genes involved in the periodontal disease and oral mucosal diseases. The present results indicate that DNA methylation levels of Fibroblast growth factor receptor3 (FGFR3), Caspase2 (CASP2) and Cell division cycle 25B (CDC25B) were significantly changed stimulated with periodontal pathogens toxin. From the above, periodontal pathogens toxin may affect cell cycle with inflammatory reaction.

研究分野：臨床口腔病理学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な疾病の発症に、環境因子などの外的要因が関わっていることが明らかとなっている。環境因子が引き起こす遺伝子変化の代表的なものにエピジェネティックな修飾がある。エピジェネティクスは、DNA塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現が変わる現象であり、主にDNAメチル化やヒストン修飾、クロマチン構造の形成、クロマチンリモデリングなどが知られている。エピジェネティクスの代表的なメカニズムの一つであるDNAのメチル化は、主に悪性腫瘍の発症に関与したものが報告されてきたが、最近になり、糖尿病やアレルギー、自己免疫疾患、神経性疾患などでもみられることが明らかとなってきている。

口腔領域においては、口腔癌や前癌病変の発症・進行への関与について報告がなされてきており、最近になり歯周病にもエピジェネティクスが関与するという報告もみられるが、その詳細は未だ不明な点が多い。

口腔内の環境因子の一つに口腔内細菌があり、歯周病の発症・進行に関わる *in vitro* のモデルとして歯周組織由来の様々な細胞が用いられ、歯周病原菌由来の Lipopolysaccharide (LPS) による反応が広く観察されてきた。エピジェネティクス変化で代表的なDNAメチル化は、直接的に転写に影響を与えることが多く、治療の際のターゲットにもなりやすいが、多くは環境因子の長期にわたる変化で修飾が起こりやすいため、LPS刺激による *in vitro* のモデルでは長期刺激が必要である。しかしながら、LPSの長期刺激は、細胞に変性・壊死をひき起こすことが多く、長期による刺激は困難であった。

そこで研究代表者の所属する研究室では、この問題を解決するためにLPS添加と非添加を交互に行うことによって、長期にわたって培養細胞にLPS刺激を行うことのできる培養系を確立した為、長期培養実験が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病や口腔粘膜疾患の発症や進展に関わる口腔内病原細菌による、口腔上皮細胞のエピジェネティクス修飾の解明を目指し、新たに開発した培養系を用いて、DNAメチル化の網羅的解析を行う。

この結果から、今後、歯周病や口腔粘膜疾患の発症や進展に関わるDNAメチル化のターゲットとなる遺伝子の同定を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LPS 刺激

ヒト歯肉上皮前駆細胞 (Human Gingival Epithelium Progenitors; HGEP) を前培養後、*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (1 µg/ml) を添加したものと非添加のものを3日間ずつ交互に交換し、1ヶ月間培養した。

また、コントロールにはLPSの代わりに滅菌水を添加し、同期間培養したものをそれぞれDNA、RNAを抽出した。

(2) マイクロアレイ解析

抽出したサンプルからマイクロアレイ解析を行い、mRNA発現レベルがコントロールに比べ2倍以上または1/2以下を示す遺伝子を確認した。

(3) CpG Islands の確認

マイクロアレイ解析結果より mRNA 発現レベルが2倍以上または1/2以下を示す遺伝子を選出後、UCSC Genome Browser を用い、メチル化によって遺伝子転写抑制に影響を与える CpG Islands の有無を確認した。

(4) mRNA 発現レベルの再現性の検討

CpG Islands が存在した遺伝子について mRNA 発現レベルの再現性を検討する為に、定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現レベルを確認した。再現性の得られた遺伝子について以下の実験を行った。

(5) Methylation Specific PCR (MSP) 解析

Bisulfite 処理

mRNA 発現を左右するメカニズムを調べるために、培養細胞から DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。Epitect Bisulfite Kit (Qiagen) を用いて Bisulfite 処理を行った。

MSP プライマーの設計

Bisulfite 処理後の DNA に対応した Methylation-Specific PCR (MSP) プライマーをプライマー設計ソフト Methyl Primer Express にて設計した。

定量的 MSP 法

Bisulfite 処理した DNA、MSP プライマー及び KAPA SYBR Fast qPCR Kit を用いて SYBR Green 法による定量的 MSP 法でメチル化発現解析を行った。得られた結果から CT 値を算出し、その値を定量値に変換し、メチル化のレベルの算出を次の計算式で求めた (Lu L et al., 2007)。

$$\text{Methylated (\%)} = \frac{M}{M+U} \times 100 = \frac{1}{1 + \frac{U}{M}} \times 100 = \frac{1}{1 + 2^{-(\Delta\Delta C_t)}} \times 100$$

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果、mRNA 発現レベルがコントロールに比べ2倍以上となったのは 865 遺伝子で、1/2 以下となったのは 777 遺伝子であった。

(2) 炎症反応関連遺伝子の解析

mRNA 発現に低下を認められた遺伝子のうち、炎症反応関連遺伝子にターゲットを絞り、UCSC

Genome Browser にて CpG Islands の存在したものを選出した。

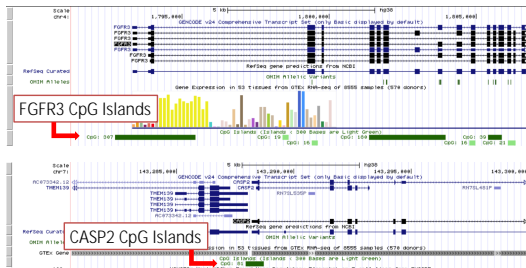


図. 炎症反応関連遺伝子におけるCpG Islands

その後、再現性確認の為、定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現解析を行った。

その結果、線維芽細胞増殖因子受容体 (Fibroblast growth factor receptor3, FGFR3) 及びアポトーシス関連因子 (Caspase2, CASP2) において mRNA 発現低下を認めた。

さらに、これらの遺伝子におけるメチル化レベルの解析を行う為に、DNA を bisulfite 処理後、Methylation-Specific PCR (MSP) 法を行った結果、Control (LPS 非添加群) に比べメチル化レベルの上昇を認めた。

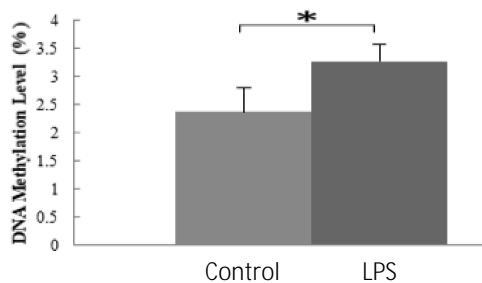


図. FGFR3におけるメチル化レベル解析

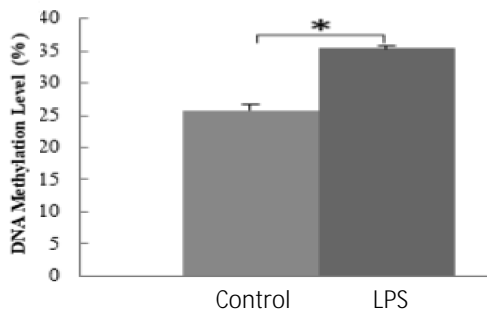


図. CASP2におけるメチル化レベル解析

以上より、*P. gingivalis* 由来 LPS での長期刺激による口腔上皮細胞の遺伝子発現変化には、CpG Islands 高メチル化が影響し、FGFR3 や CASP2 といった炎症反応関連遺伝子がターゲットとなることが示唆された。

(3) 細胞周期調節遺伝子の解析

mRNA 発現に上昇を認めた遺伝子のうち、細胞周期調節因子の Cell division cycle 25B (CDC25B) において CpG Islands の存在を認

めた。

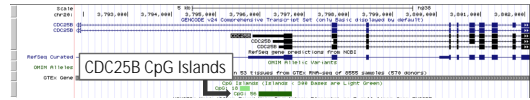


図. 細胞周期調節関連遺伝子におけるCpG Islands

そこで、CDC25B において定量的 RT-PCR 法にて mRNA 発現上昇の再現性を確認した。

さらに、これらの遺伝子におけるメチル化レベルの解析を行う為に、DNA を bisulfite 処理後、Methylation-Specific PCR (MSP) 法を行った。

その結果、Control (LPS 非添加群) に比べ LPS 添加群でのメチル化レベルの有意な減少が認められた。

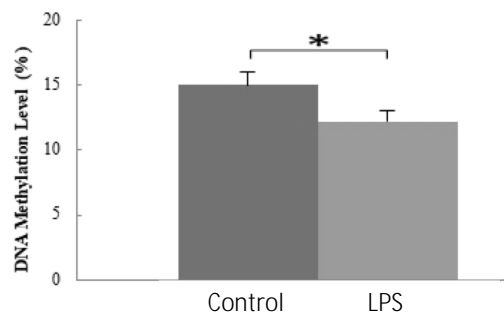


図. CDC25Bにおけるメチル化レベル解析

以上より、歯周病原菌由来 LPS は、炎症反応を惹起することで、細胞周期調節遺伝子にも影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

1. 高井理衣, 植原 治, 原田文也, 宇津宮雅史, 中條貴俊, 吉田光希, 佐藤 惇, 西村学子, 千葉逸朗, 安彦善裕. LPS 長期刺激による細胞外マトリックス関連遺伝子の DNA メチル化解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015 年 9 月 11-13 日, 北朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県, 新潟市)

2. Takai R, Harada F, Utsunomiya M, T. Chujo T, Uehara O, Yoshida K, Sato J, Nishimura M, Chiba I, & Abiko Y. DNA hypermethylation of Klotho gene by LPS derived from *P. gingivalis*. the 63th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research October 30-31, 2015, Fukuoka (Japan)

3. 高井理衣, 虎谷斉子, 植原 治, 大西 綾,

吉田光希、佐藤 惇、西村学子、安彦善裕、
太田 亨 LPS 長期刺激によるヒト歯肉上皮
細胞での老化およびオートファジー遺 伝 子
の発現解析 2017 年 9 月 16-18 日（長野県、
塩尻市）

〔その他〕
ホームページ等

北海道医療大学歯学部生態機能・病態学系臨
床口腔病理学分野ホームページ
<http://www3.hoku-iryu-u.ac.jp/courses/2/013/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 光希 (YOSHIDA, Koki)
北海道医療大学・歯学部・助教
研究者番号：30453260