

平成 30 年 6 月 10 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：15K20647

研究課題名(和文) 歯周病原細菌による膵臓への網羅的エピジェネティクス解析 基礎疾患の予防に向けて

研究課題名(英文) Comprehensive epigenetic analysis on pancreas by periodontal pathogenic bacteria

研究代表者

植原 治 (UEHARA, Osamu)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：00709248

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)：歯周病は動脈硬化、糖尿病および関節リウマチなどの全身疾患に関連する危険因子となることが報告されている。膵臓疾患との関連を示唆する報告もあるが、そのメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、種々の器官に急性炎症を引き起こさないマウスにおいてP.gingivalis-LPSが膵臓の遺伝子発現に与える影響について網羅的に検索した。膵臓のH.E染色による組織標本の観察では、明らかな急性炎症所見は確認されなかった。マイクロアレイによる解析では、Ighg3遺伝子やIgk遺伝子が発現上昇していることが確認された。これらの結果から、P.g-LPSが膵臓の免疫学的疾患に影響し得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease has been reported to increase a risk factor for various systemic diseases, including arteriosclerosis, diabetes and rheumatoid arthritis. There are also reports suggesting an association with pancreatic disease, but the mechanism is not clear. In this study, we examined the effect of periodontal pathogens, P. gingivalis LPS on the pancreas in a mouse model system that does not cause acute inflammation in various organs. The gene expression of the pancreas was exhaustively analyzed in this model. By qPCR the expression level of Ighg3 and Igk mRNAs in the experimental group were significantly higher than in the control. These results indicate that LPS from P. gingivalis may affect immunological diseases in the pancreas.

研究分野：予防歯科学

キーワード：膵臓 歯周病 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

多くの疾病の発症には素因や遺伝的要因を始めとした内因と、環境因子のような外因が関わっている。環境因子により影響を受ける遺伝子の表現系に、エピジェネティクスがある。エピジェネティクスは、DNA の塩基配列の変化を伴わず遺伝子発現が変化する現象であり、その代表的なものに DNA メチル化やヒストンの化学修飾がある。これらのエピジェネティックな遺伝子の修飾は、これまで発がんに関わる研究について行われてきたが、最近になり、感染、肥満、ストレスなどの環境因子によって発症する糖尿病(2型)などの生活習慣病発症への関与も指摘されてきている。糖尿病は、種々の臓器の機能に影響を及ぼす多因子疾患で、重症化すると網膜症、腎症、神経障害、高脂血症および動脈硬化などの合併症を起こし、さらにはがんリスクも上昇するため、糖尿病の発症や進行のコントロールは重要である。

歯周病原性細菌である *P. gingivalis* などのグラム陰性菌は、歯周ポケットや根尖病巣から多く検出され、その内毒素(LPS)は、歯周疾患の進行に大きな影響を与えることも報告されている。このように歯周病原細菌による歯周組織に対する生理作用の発現は広く認識され、多くの研究報告がある。また、歯周病原細菌は、糖尿病、肺炎、心疾患、高血圧などの生活習慣病の発症や進行に関与することも多数報告されている。歯周病原細菌が糖尿病に影響を与えるメカニズムとしては、細菌の産生物質が種々のサイトカイン(IL-1、IL-6、TNF- など)を血中に増加させ、それらが膵島のインスリン受容体の活性を抑制させるため糖尿病が進行すると考えられている。

これまでに歯周病原細菌による膵島(ランゲルハンス島)への影響にエピジェネティクス修飾が関与しているかについての報告はみられない。近年、エピジェネティクス修飾は種々の疾病治療のターゲットとなっていることから、歯周病原細菌による膵島へのエピジェネティクス修飾の網羅的探索を行い、それらの影響を明らかにすることは、糖尿病をはじめとする生活習慣病の新たな治療のターゲットとして期待できる。

平成 23 年歯科疾患実態調査において、20 本以上の歯を有する者の割合は増加傾向にある。しかし、4 mm 以上の歯周ポケットを持つ者の割合について前回調査(平成 17 年)と比較すると、30~60 歳代では概ね低値を示した。一方、75 歳以上の高齢者層では今回調査のほうが高値を示した。今後、超高齢社会がさらに進展することで、歯周疾患に罹患した現在歯数はさらに増加することが予想される。長期にわたり歯周疾患に罹患している者は、歯周病原細菌の影響により膵臓などの臓器がエピジェネティクス修飾を受けている可能性も考えられる。

2. 研究の目的

糖尿病でかつ歯周疾患を有する患者は、長期にわたり歯周病原細菌に曝されている環境下にあるためエピジェネティクス修飾の関与が推察される。そこで、本研究では、歯周病原細菌の LPS が膵島へどのようなエピジェネティクス修飾(DNA メチル化)を起こしているか、DNA メチル化解析する。マイクロアレイの結果から、特異的にエピジェネティックな発現変化を示した因子について、詳細なメチル化解析を行った。また、腎臓における遺伝子発現の網羅的解析を行い、歯周病および慢性腎臓病と密接に関連する遺伝子の同定およびエピジェネティクス修飾の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 歯周病原細菌 *P. gingivalis* 由来 LPS の全身投与が膵臓に与える影響

PG-LPS をマウスに腹腔内投与(3 日毎、1 ヶ月間(10 回)、5 mg/kg)し、最終投与より 3 日後にマウスを屠殺、膵臓を摘出、摘出した膵臓より RNA を抽出、cDNA を合成して SurePrint G3 Rat GE 8x60K Ver. 2.0 (Agilent) による mRNA 発現の変化の網羅的解析を行った。発現が上位であった遺伝子発現の再現性を real-time RT-PCR にて観察し、薄切標本を作製し組織像の観察、発現が上位であった遺伝子産物の免疫染色を行った。

また、糖尿病関連遺伝子でプロモーター領域に CpG アイランドが存在する CDKN2A、CDKN2B、IGF2BP2、CAPN10、HHEX、KCNQ1、NOTCH2、ENPP1、PPARG、TCF7L2、WSF7L2、WFS1、FTO に関して定量 MSP を行った。

(2) 歯周病原細菌 *P. gingivalis* 由来 LPS の全身投与が腎臓に与える影響に関する研究

歯周病原細菌 *P. gingivalis* 由来 LPS (PG-LPS) をマウスに腹腔内投与(3 日毎、1 ヶ月間(10 回)、5 mg/kg)し、最終投与より 3 日後に屠殺、腎臓を摘出。薄切標本を作製し組織像の観察と炎症性変化を評価。また摘出臓器より RNA を抽出し cDNA を合成後に SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Ver. 2.0 (Agilent) による mRNA 発現の変化の網羅的解析を行った。発現増加が大きな遺伝子発現の再現性を real-time RT-PCR にて確認した。

マイクロアレイの再現性の確認および遺伝子発現変化の要因となる細胞を確認する為にマウス腎内皮細胞(KEC)を培養し(4.0 × 10⁴ cells/ml)、PG-LPS (0、0.1、1.0、10、100、1,000 ng/ml) で 4 日及び 1 ヶ月間培養した。PG-LPS の添加はそれぞれ 3 日(48h) 毎に行い培養 4 日間および 33 日間培養を行った。培養後は Total RNA を抽出し、cDNA を合成し real-time RT-PCR による mRNA 発現の変化の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯周病原細菌 *P. gingivalis* 由来 LPS の全身投与が膵臓に与える影響

・ P.g-LPS 投与マウスは 1 ヶ月間の P.g-LPS 投与により死亡するものはみられなかった。脾臓の H.E 染色による組織標本の観察では、明らかな急性炎症所見は確認されなかった。マイクロアレイによる解析では、発現上昇した遺伝子は 1,029 プローブ、0.5 倍以下に発現減少した遺伝子は 326 プローブであった。パスウェイ解析の結果、上位は抗原提示、自然免疫と獲得免疫間の関係、樹上細胞の成熟、関節リウマチにおける T 細胞 B 細胞のシグナル変化、顆粒球の接着および癒着に関与している。これらのパスウェイの結果から LPS の刺激による遺伝子発現の変化が、免疫担当細胞と関わりの深い疾患の発症リスクに関わっている事が示された。遺伝子発現の変化した遺伝子が影響を及ぼす疾患は自己免疫系の疾患に関わる疾患に最も影響を与えていることが分かった。この他にも内分泌系の疾患や胃腸系の疾患に関わる遺伝子の発現が大きく変化している事が示された。

(2) 歯周病原細菌 *P.gingivalis* 由来 LPS の全身投与が腎臓に与える影響に関する研究

・ LPS 投与から 15 分後において、マウス血中の LPS 濃度は PG-LPS 投与群で 22.2 ± 8.94 ng/mL、対照群で 8.21 ± 2.65 ng/mL であり、有意差をもって PG-LPS 投与群マウス血中の LPS 濃度の上昇が認められた。

・ 腎臓の組織標本での観察では、PG-LPS 投与群で糸球体の破壊やメサンギウム細胞の増加などの明らかな急性炎症所見は確認されなかった。

・ 免疫染色の結果から腎臓の糸球体細胞に PG-LPS 投与群で TNF- α に弱陽性、eNOS に強陽性を示し、対照群ではいずれも弱い染色を認めただけであった。

・ マイクロアレイによる解析で発現上昇の見られた上位 10 遺伝子のうち、既知の遺伝子は serum amyloid A3 (Saa3)、toll-like receptor adaptor molecule 2 (Ticam2)、regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b)、3-oxoacid CoA transferase 2A (Oxct2a)、chemokine (C motif) receptor 1 (Xcr1) の 5 遺伝子で、マイクロアレイでの発現増加群の上位 5 遺伝子の mRNA は腎臓組織においていずれも PG-LPS 投与群で有意に発現が増加していた。

・ PG-LPS を添加したマウス腎内皮細胞の培養 4 日目では 1,000ng/ml 添加群を除くすべての群で 5 遺伝子の有意な発現変化は認めなかったが、1,000ng/ml 添加群ではすべての遺伝子の mRNA 発現の増加と有意差が認められた。さらに培養 33 日目では Saa3、Oxct2a および Xcr1 で Saa3 の 100ng/ml 群を除くすべての濃度の PG-LPS 投与群で各遺伝子の発現が増加し有意差を認めた。また Ticam2 および Reg3b の 10、100、1,000ng/ml の PG-LPS 投与群で各遺伝子の発現が増加し有意差を認めた。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

1) Harada F, Uehara O, Morikawa T, Hiraki D, Onishi A, Toraya S, Adhikari BR, Takai R, Yoshida K, Sato J, Nishimura M, Chiba I, Wu CZ, Abiko Y. Effect of systemic administration of lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* on gene expression in mice kidney. Med Mol Morphol, 2018.

2) Uehara O, Takimoto K, Morikawa T, Harada F, Takai R, Adhikari BR, Itatsu R, Nakamura T, Yoshida K, Matsuoka H, Nagayasu H, Saito I, Muthumala M, Chiba I, Abiko Y. Upregulated expression of MMP-9 in gingival epithelial cells induced by prolonged stimulation with arecoline. Oncol Lett, 14:1186-1192, 2017.

3) Takai R, Uehara O, Harada F, Utsunomiya M, Chujo T, Yoshida K, Sato J, Nishimura M, Chiba I, Abiko Y. DNA hypermethylation of extracellular matrix-related genes in human periodontal fibroblasts induced by stimulation for a prolonged period with lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res, 51:508-517, 2016.

[学会発表](計 3 件)

1) 平木大地, 植原 治, 原田文也, 森川哲郎, 虎谷斉子, 安彦善裕: マウスにおける歯周病原菌 *P.gingivalis* 由来 LPS の投与が脾臓の遺伝子発現に与える影響, 第 60 回日本歯周病学会春季学術大会, 2017

2) M. Nishimura, F. Harada, O. Uehara, T. Morikawa, R. Takai, K. Yoshida, J. Sato, I. Chiba, Y. Abiko, Effects of Administration of LPS Derived from *P.gingivalis* on Kidney Gene-expression in Mice: IADR 95th General Session and Exhibition, 2017.

3) 原田文也, 植原 治, 森川哲郎, 虎谷斉子, 高井理衣, 吉田光希, 佐藤 惇, 西村学子, 千葉逸朗, 安彦善裕: *P.gingivalis* 由来 LPS による腎臓の網羅的遺伝子発現解析, 第 9 回日本口腔検査学会総会・学術大会 2016.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

植原 治 (UEHARA, Osamu)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：00709248

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()