

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20675

研究課題名(和文) TLR2遺伝子を標的としたエピジェネティクス制御による新規歯周治療薬の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapeutic drug for periodontitis targeting epigenetic regulation of TLR2

研究代表者

田中 麗 (Tanaka, Urara)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50734993

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、エピジェネティクスを標的とする新規歯周治療薬を開発すること目的とした。その結果、歯周炎モデルマウスにおいて、DNAメチル化阻害剤であるDecitabineは歯槽骨吸収を抑制し、破骨細胞の活性化も抑制した。また、細胞実験において、Decitabineは抗炎症性サイトカインの mRNA発現を亢進させた。その一つの要因として、転写因子KLF2 に着目したところ、DecitabineはKLF2発現を亢進させ、KLF2が抗炎症性サイトカインを亢進させた。以上より、Decitabine は転写因子KLF2を介して炎症を制御することで、歯周炎モデルマウスの骨吸収を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a novel therapeutic drug for periodontitis targeting epigenetics. We observed severe bone loss in the ligature induced periodontitis model in mice and Decitabine significantly inhibited the bone loss. We found that the treatment with Decitabine significantly reduced osteoclasts both in vivo and in vitro and up-regulated the anti-inflammatory cytokines (IL-10 and TGF- β) in vitro. Next, we focused on Kruppel-like Factor 2 (KLF2) which is a transcription factor regulating inflammation. As the results, Decitabine increased KLF2 and KLF2 up-regulated the transcriptional activity of CCAAT/enhancer binding protein beta (CEBPB) and the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β . We concluded that Decitabine inhibits alveolar bone loss by limiting osteoclastogenesis in mice and shows KLF2 can regulate that. Taken together, Decitabine may have utility in treating chronic inflammatory periodontal disease in humans.

研究分野：歯周病学

キーワード：Decitabine 歯周炎モデルマウス DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列変化によらない遺伝情報の発現制御のことであり、その主なメカニズムに DNA メチル化とヒストン修飾がある。DNA のメチル化は細胞特異的な変化により遺伝子発現を厳密に制御されており (Issa *et al.* 2011 *Nat Genet.*)、癌では組織特異的にメチル化部位が異なっていると報告されている。また、ニワトリを用いた実験では、TLR プロモータのメチル化により TLR の転写活性が減少することで、サルモネラ菌への感受性に影響を与えることが報告されている。(Gou *et al.* 2012 *PLoS One.*) 申請者の研究グループでは、既にヒト歯肉上皮細胞を用いて TLR2 プロモータの異常メチル化が炎症応答を制御し、また、*P. gingivalis* によりそれが誘導されることを示している。これらのことから、歯周病に対する感受性が、DNA メチル化と関連することが示唆されている。

2. 研究の目的

細菌感染により惹起される歯周炎症の病態は非常に複雑であり、重度の骨欠損を再生させることは未だ困難である。そのため、早期に炎症を消退させ、組織を治癒ことは必須でありそのメカニズムの解明と新規治療薬の確立が期待されている。そこで、本研究では実験的歯周炎モデルマウスに DNA メチル化転移酵素阻害剤である Decitabine を投与することで歯周炎による組織破壊に及ぼす影響を検討し、エピジェネティクスを標的とする最も効果的かつ安全性の高い新規歯周炎治療薬を開発することを目的とした。

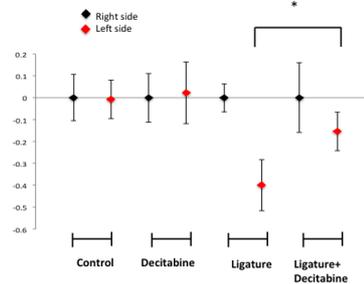
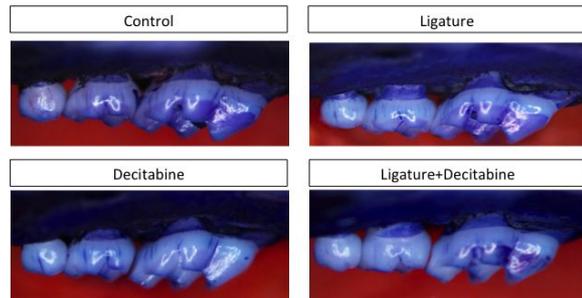
3. 研究の方法

本研究においては、マウス上顎第二大臼歯に 5-0 絹糸を結紮し細菌感染による炎症を誘導するマウス歯周炎モデルを作成した。その後 Decitabine を投与し、歯周組織に及ぼす影響を解析した。また CD14 陽性細胞に Decitabine 刺激を行い、破骨細胞分化およびサイトカイン発現に及ぼす影響を検証した。

4. 研究成果

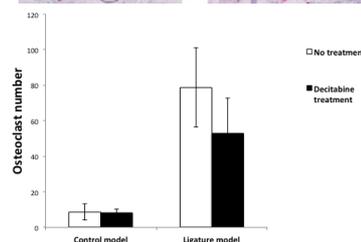
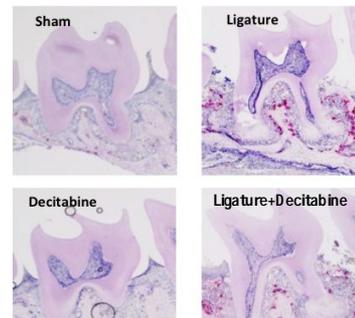
Decitabine によるマウス歯周炎モデルの歯槽骨吸収への影響

マウス歯周炎モデルを作成し、Decitabine を Oral gavage 法で 5 日間投与後の歯槽骨吸収量の変化について検討した。Decitabine 投与群では、有意に歯槽骨吸収を抑制した。



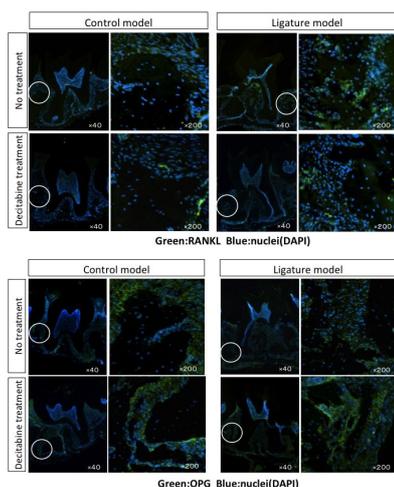
Decitabine による破骨細胞への影響

続いて、歯周炎モデルマウスの組織切片を作成し、TRAP 染色により破骨細胞活性の検討を行った。Decitabine 投与群では破骨細胞活性が抑制された。



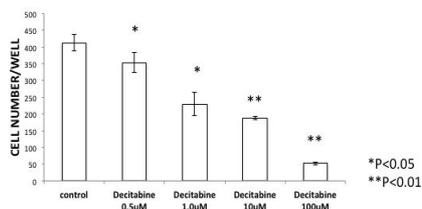
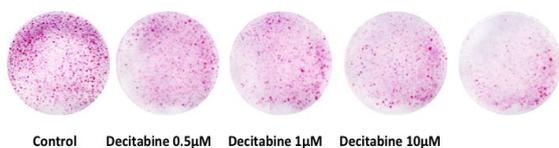
Decitabine による RANKL, OPG 発現への影響

続いて、Decitabine が破骨細胞活性を制御する RANKL, OPG 発現へ及ぼす影響について検討した。Decitabine 投与群では RANKL 発現の減少及び OPG 発現が亢進した。



Decitabine の破骨細胞分化に及ぼす影響

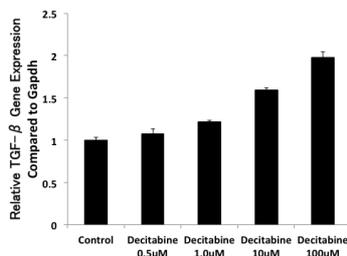
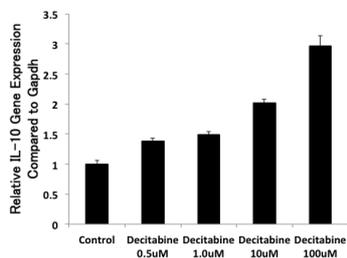
続いて、CD14 陽性単球を使用した破骨細胞分化実験における、Decitabine の影響について検討した。Decitabine 投与群では濃度依存性に TRAP 陽性細胞数が減少した。



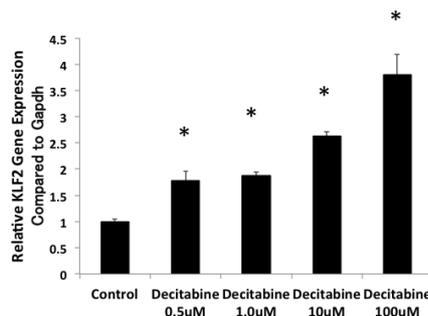
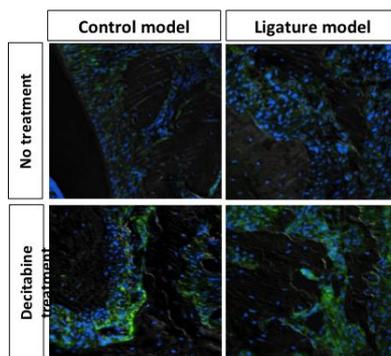
Decitabine が炎症性サイトカインに及ぼす影響

続いて、CD14 陽性単球において Decitabine 刺激におけるサイトカイン発現の検討を行った。Decitabine 刺激群で抗炎症性サイトカイン IL-10, TGF-β の mRNA 発現が亢進した。

Decitabine が転写因子 KLF2 に及ぼす影響



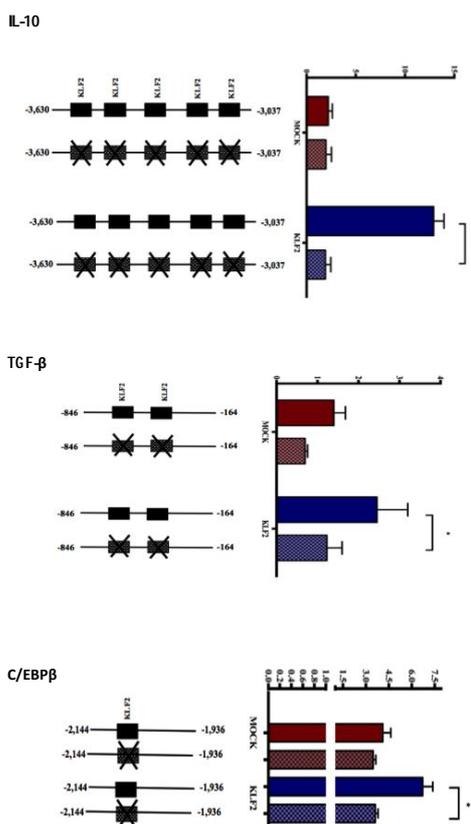
転写因子 KLF2 は炎症制御に働くことが報告されている。歯周炎モデルマウスにおいて Decitabine 投与群では、免疫組織染色で KLF2 の発現が亢進し、CD14 陽性単球においても Decitabine 刺激で KLF2 の mRNA 発現が亢進した。



KLF2 が抗炎症性サイトカインの転写活性に及ぼす影響

さらに、KLF2 が IL-10, TGF-β, C/EBPβ の転写活性に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセ

イにて検討した。その結果、KLF2 は、IL-10, TGF- β , C/EBP β の転写活性を亢進させた。



結論として、Decitabine は転写因子 KLF 2 を介して炎症を制御することで、歯周炎モデルマウスの歯槽骨吸収を抑制する可能性が示唆された。これによりエピジェネティクを標的とする歯周炎に対する新規治療薬の開発が期待される。

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 6 件)

1. Yamamichi K, Fukuda T, Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Nakao Y, Yotsumoto K, Yamato H, Taketomi T, Uchiyama T, Nishimura F. Amelogenin induces M2 macrophage polarisation via PGE2/cAMP signalling pathway. *Arch Oral Biol* 2017

Nov;83:241-251. 査読有

2. Sanui T, Takeshita M, Fukuda T, Tanaka U, Alshargabi R, Aida Y, Nishimura F. Roles of serum in innate immune responses of human leukocytes to synthetic lipopeptide. *Int Immunopharmacol* 2017 Sep;50:61-68. 査読有
3. Sanui T, Takeshita M, Fukuda T, Tanaka U, Alshargabi R, Aida Y, Nishimura F. Adhesion attenuates respiratory burst induced by different modes of triggering in resting or LPS-primed neutrophils. *Immunobiology*. 2017 Aug;222(8-9):865-871. 査読有
4. Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kensuke Yamamichi, Kyosuke Toyoda, Urara Tanaka, Karen Yotsumoto, Takaharu Taketomi, Fusanori Nishimura. Microarray Analysis of the Effects of Amelogenin on U937 Monocytic Cells. *Am J Mol Biol*. 2017 107-122. 査読有
5. Manjunatha R. Benakanakere, Livia S. Finoti, Urara Tanaka, Gregory R. Grant, Raquel M, Denis F. Kinane. Investigation of the functional role of human Interleukin-8 gene haplotypes by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *Sci Rep*. 2016 Aug 8;6:31180 査読有
6. Ryo Atomura, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kensuke Yamamichi, Urara Tanaka, Kyosuke Toyoda, Takaharu Taketomi, Kensuke Yamamichi, Fusanori Nishimura. Inhibition of Sprouty2 polarizes macrophages toward an M2 phenotype by stimulation with interferon γ and Porphyromonas gingivitis lipopolysaccharide. *Immunity, Inflammation and Disease*. 26;4(1):98-110 2016 査読有

[学会発表](計 6 件)

1. Urara Tanaka, Karen Yotsumoto, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Fusanori Nishimura : Microarray Analysis of U937 Monocytic Cells Stimulated with Amelogenin. Penn Periodontal Conference, Philadelphia, USA, 2017.6.29
2. 田中 麗, 讚井 彰一, 福田 隆男, 西村 英紀 : 歯周炎モデルマウスにおける歯槽骨吸収及び破骨細胞分化への Decitabine の効果, 日本歯科保存学会 2017 年度春季学術大会, 青森市, 2017.6.9
3. Urara Tanaka, Livia Finoti, 西村 英紀, Denis F. Kinane, Manju Benakanakere : Decitabine inhibits osteoclastogenesis and ameliorates periodontal bone loss in mice, 95th General Session & Exhibition of IADR, San Francisco, USA, 2017.03

4. Urara Tanaka, Manju Benakanakere, Denis Kinane, 西村 英紀 : Effect of Decitabine on Osteoclastgenesis and Periodontal Bone Loss in Mice, 3rd Symposium program for Advancing Strategic International Networks to Accelerate the Circulation of Talented Researchers, 福岡市, 2017.02.12
5. 田中 麗, 讚井 彰一, 福田 隆男, 西村 英紀 : Decitabine の歯周炎モデルマウスにおける歯槽骨吸収抑制効果の検討, 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟市, 2016.6.8
6. Urara Tanaka, Manju Benakanakere, Denis F. Kinane: Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) Ameliorates Periodontal Bone loss, 94th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Seoul,Korea, 2016.06

〔その他〕

ホームページ等

九州大学研究者情報

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html>

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 麗 (TANAKA,Urara)

九州大学・病院歯周病科・助教

研究者番号 : 50734993