

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17075

研究課題名（和文）DNAメチル化を介したプロポリスの歯周病予防効果

研究課題名（英文）Effect to prevent periodontal disease of propolis focusing on DNA methylation

研究代表者

高井 理衣（TAKAI, Rie）

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：50781085

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、プロポリスに含まれるアルテピリンCの生理活性、特に歯周病予防に関する作用機序についてDNAメチル化という観点から検討することを目的とした。

ヒト歯根膜線維芽細胞にアルテピリンCを1ヶ月間添加培養した後発現解析を行なったところ、370の遺伝子で発現上昇がみられ、378の遺伝子で発現低下がみられた。これらの中では細胞外マトリックスに関連する遺伝子が多く、プロモーター領域でDNAメチル化レベルを解析すると、COL5A3とHSPG2でDNAメチル化レベルに変化がみられた。

結果より、プロポリスは歯周組織の細胞外マトリックスに対しDNAメチル化を介した生理活性作用を示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、プロポリスの歯周病改善効果のメカニズムについて歯周病原菌に対する抗菌作用機序の詳細は報告されているが、歯周組織や細胞に対するプロポリスの生理活性作用機序に関するものは少なく、詳細は不明であった。

本研究で得られた研究成果は、生体に対するプロポリスの生理活性作用を解明する一助になるとともに、新しいDNAメチル化を治療ターゲットとした歯周病治療の創薬開発の基礎研究になると期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the effect of artepillin C on periodontal tissue, we analyzed the expression level and DNA methylation status in human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs) upon artepillin C treatment. The culture of HPDLFs was repeated alternating 3 days with artepillin C and 3 days without artepillin C in DMEM for 1 month, and we extracted DNA and total RNA samples from these cells. Overall, we found 370 upregulated genes and 377 downregulated genes caused by artepillin C treatment in microarray analysis. Among these, 18 genes belonging to the extracellular matrix (ECM) were significantly correlated in the keyword analysis on DAVID. Within the ECM genes, HSPG2 and COL5A3 exhibited significantly altered gene expression patterns and DNA methylation levels. These results indicate that artepillin C is responsible for the altered methylation status in the promoter region, resulting in differences in the expression patterns of the ECM genes.

研究分野：歯周病学

キーワード：プロポリス アルテピリンC 細胞外マトリックス マイクロアレイ DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

ローヤルゼリーに多く含まれるプロポリスには、歯周病の予防・改善、抗菌、抗酸化、抗炎症などの様々な効果を持つといわれており、サプリメントや歯磨剤としてよく使用されている。これらプロポリスのもたらす効果について、歯周病原菌に対する抗菌作用のメカニズムに関する報告はなされてきているが、歯周組織や細胞に対する作用の具体的な機序は未だ明らかになっていない。

DNAメチル化は、遺伝子配列の変異を伴わずに化学的修飾により遺伝子発現が変化する現象で、様々な生命現象や疾患に関わるとされている[4, 5]。歯周病の発症・進行への関与も多数報告されており、我々も歯周病原菌 *P. gingivalis* 由来の LPS 長期刺激による DNA 異常メチル化で細胞外マトリックス関連遺伝子の発現が低下することを報告した。また、最近では LPS が誘発する肝臓での DNA メチル化をプロポリスが改善したという報告がなされた。

2. 研究の目的

本研究では、プロポリスに含まれるアルテピリン C の生理活性、特に歯周病予防に関する作用機序について DNA メチル化という観点から検討することを目的とする(図1)。

これまでに、プロポリスの歯周病改善効果のメカニズムについて歯周病原菌に対する抗菌作用機序の詳細は報告されているが、歯周組織や細胞に対するプロポリスの生理活性作用機序に関するものは少ない。特に、DNA メチル化に着目した研究は全く行われていない。

また、プロポリスを用いた生理活性を検討する添加培養実験は2~3日程度の短期間のもので多いが、歯周病などの慢性疾患を対象とした場合は適切とは言い難かった。それに対し、本実験での1か月間という長期間添加しての効果を検討している点は好ましい実験系といえる。

さらに、本研究でプロポリスの生理活性作用機序が解明されれば、DNA メチル化を治療ターゲットとした歯周病治療の創薬開発の基礎研究になると期待される。

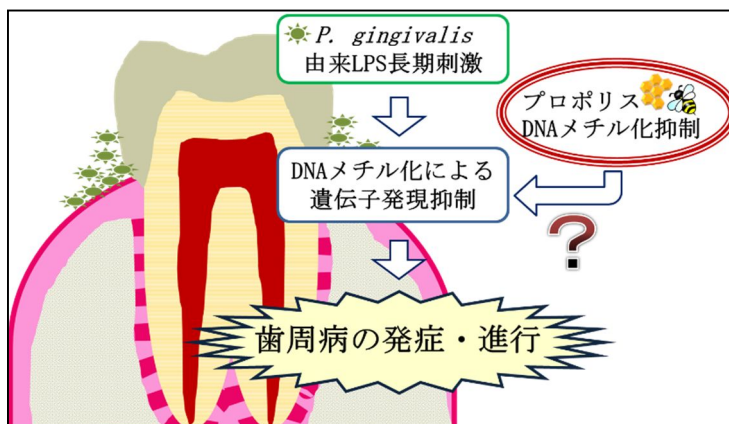


図1. 研究の目的

3. 研究の方法

本研究では、歯周病原菌 *P. gingivalis* 由来の LPS とプロポリスを添加しながら細胞を長期間(1か月間)培養し、遺伝子の発現変化と DNA メチル化の変化についてプロファイリング解析を行い、歯周病改善効果の機序に DNA メチル化が関与しているかを考察する予定である。

【試験方法(図2)】

(1)細胞毒性試験および細胞培養

ヒト歯根膜線維芽細胞を FBS 含有 DMEM にて前培養後、培地に 0~1 mg/ml で濃度を振り分けたプロポリスを添加して一週間培養した後、細胞数を計測する。その後、細胞の死滅がみられない濃度のプロポリスと *P. gingivalis* 由来 LPS を 1 µg/ml 添加した培地と非添加の培地で3日毎交互に交換しながら一か月間培養する。その後、細胞サンプルより DNA を抽出し(Dneasy® Blood & Tissue Kit, QIAGEN 社)細胞を回収し DNA と Total RNA を抽出する。

(2)遺伝子発現プロファイリング解析

抽出した Total RNA は、Microarray (Whole Human Genome 4x44K ver.2.0, Agilent Technology) にて遺伝子発現を解析後、発現変化の認められた遺伝子をアノテーションデータベース DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用いて KEYWORDS 抽出解析を行い、機能ごとに分類する。

(3)定量的 Real-Time PCR

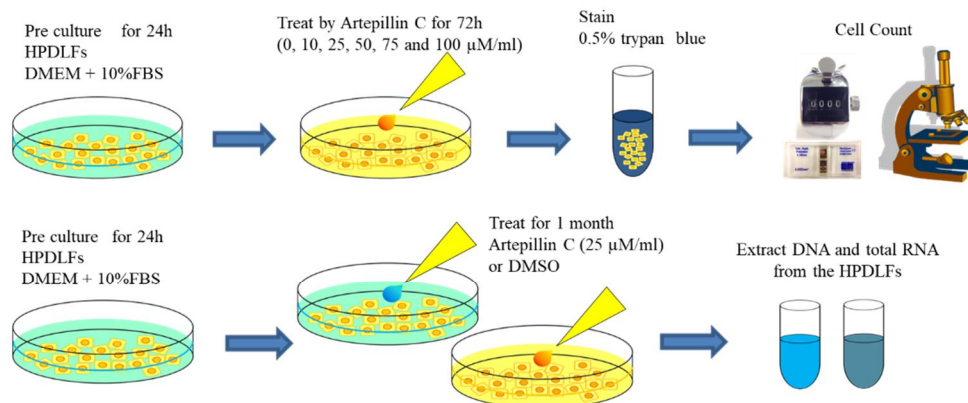
抽出した Total RNA は逆転写後、Light Cycler nano®(Roche)を用いた定量的 Real-Time PCR 法(SYBR® Green)にて mRNA 発現解析を行う。ターゲットとする遺伝子は、(2)遺伝子発現プロファイリング解析を照合し、遺伝子発現変化のみられた遺伝子の中でも歯周病に関連の強い遺伝

子をターゲットとして遺伝子発現変化の再現性確認を行う。

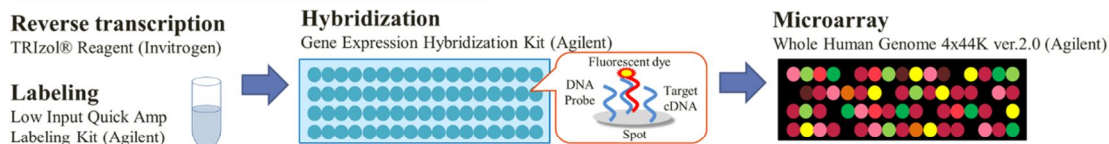
(4)Methylation Specific PCR

DNA メチレーションアレイ解析の再現性を確認するため、抽出した DNA を Bisulfite 処理後、Light Cycler nano®(Roche) を用いた Methylation Specific PCR 法(SYBR® Green)にてプロモーター領域の CpG islands の DNA メチル化解析を行う。ターゲットとなる遺伝子は(3)にて発現変化の再現性が確認された遺伝子をターゲットとする。

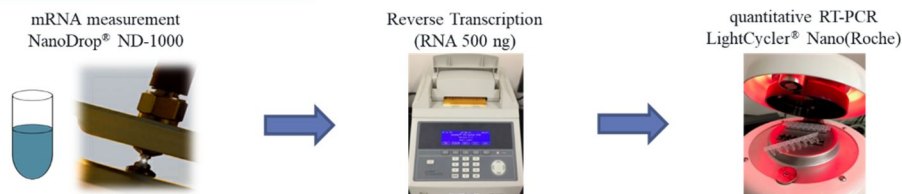
(1) 細胞毒性試験および細胞培養



(2) 遺伝子発現プロファイリング解析



(3) 定量的Real-Time PCR



(4) Methylation Specific PCR

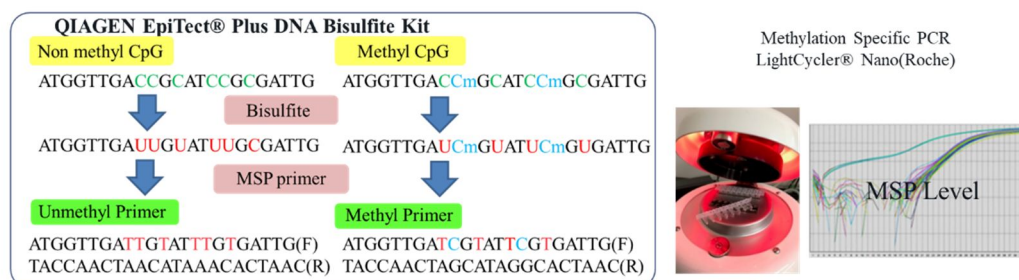


図 2 . 試験方法の流れ

4 . 研究成果

細胞毒性試験では、アルテピリン C の濃度を 0 ~ 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ の 6 段階に分けて添加したところ、50, 75, 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ で細胞の増殖抑制がみられた (図 3)。そこで、アルテピリン C の添加濃度を 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$ として 1 ヶ月培養を行なったところ、添加群と対照群との間で細胞の形態変化などは認められなかった (図 4)。

マイクロアレイ解析では、Z score > 2.0 かつ 1.5 倍以上の発現上昇がみられたのは 370 遺伝子、Z score > 2.0 かつ 0.66 倍以下の発現低下がみられたものは 378 遺伝子であった。これらの遺伝子をキーワード解析にて機能分類してみると 41 群に分けられ、最も有意な発現変化が認められたのは細胞外マトリックスの遺伝子群であった (表 1)。この細胞外マトリックス関連遺伝子に着目し 18 遺伝子の発現変化の再現性を確認したところ、COL9A2、MMP3、ACAN、DPT で発現の上

昇が確認でき、ADAMTS10、OMD、COL5A3、ASPN、FBLN2、COL16A1、HSPG2 で発現低下が確認された。さらに、発現変化が認められた細胞外マトリックスの遺伝子群のプロモーター領域で DNA メチル化レベルを解析したところ、DNA メチル化レベルに変化がみられたのは、COL5A3 と HSPG2 であった。

得られた結果より、アルテピリン C 長期添加によってヒト歯根膜線維芽細胞において細胞外マトリックス遺伝子発現と DNA メチル化変化がみられたことから、プロポリスは歯周組織の細胞外マトリックスに対し DNA メチル化を介した著明な生理活性作用を示す可能性が示唆された。

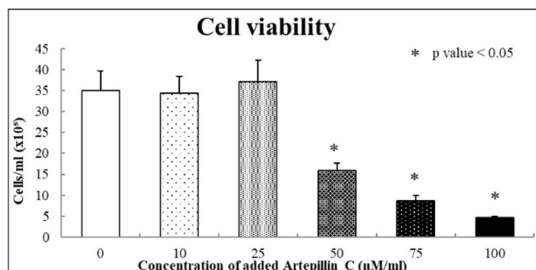


図 3 . 細胞毒性試験

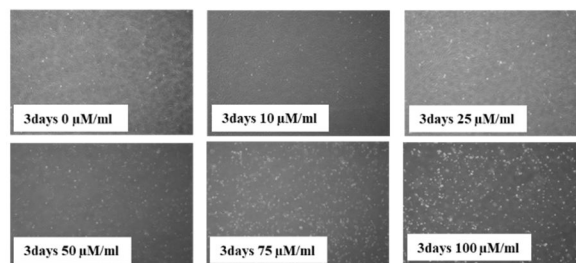


図 4 . 培養細胞

Term Name	Changed Genes	%	P-value
Extracellular matrix	18	3.2	6.3E-6
Cholesterol metabolism	7	1.3	6.1E-4
Sterol metabolism	7	1.3	1.4E-3
Disulfide bond	84	15.1	4.4E-3
Steroid metabolism	7	1.3	5.1E-3
Metalloprotease	9	1.6	7.1E-3
Endoplasmic reticulum	32	5.7	8.3E-3
Hypotrichosis	4	0.7	8.3E-3
Integrin	5	0.9	9.2E-3
Prostaglandin biosynthesis	3	0.5	1.4E-2

表 1 . キーワード解析による機能分類 上位 10 遺伝子群

Fold change	Regulation	Gene Name
49.9190831933228	up	Tenascin XB (TNXB)
22.1214220404988	up	Wnt family member 7B (WNT7B)
20.5137791400612	up	Collagen Type IX Alpha 2 Chain (COL9A2)
2.74399828670858	up	Matrix metalloproteinase 3 (MMP3)
2.02186394747378	up	Aggrecan (ACAN)
1.82574696382657	up	Dermatopontin (DPT)
1.74727666248456	up	Matrix metalloproteinase 16 (MMP16)
1.56406845899407	up	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif-1 (ADAMTS1)
0.655479308448815	down	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif-10 (ADAMTS10)
0.633133655062959	down	Osteomodulin (OMD)
0.6244844294899	down	Collagen Type V Alpha 3 Chain (COL5A3)
0.61110378693612	down	Collagen Type III Alpha 1 Chain (COL3A1)
0.535076815904009	down	Asporin (ASPN)
0.507590520059697	down	Fibulin 2 (FBLN2)
0.507065014832833	down	annexin A2 (ANXA2)
0.45326277973904	down	Collagen Type XVI Alpha 1 Chain (COL16A1)
0.189669969157902	down	Heparan sulfate proteoglycan 2 (HSPG2)
0.00929612415642549	down	Laminin subunit beta 4 (LAMB4)

表 2 . 細胞外マトリックス関連遺伝子リスト

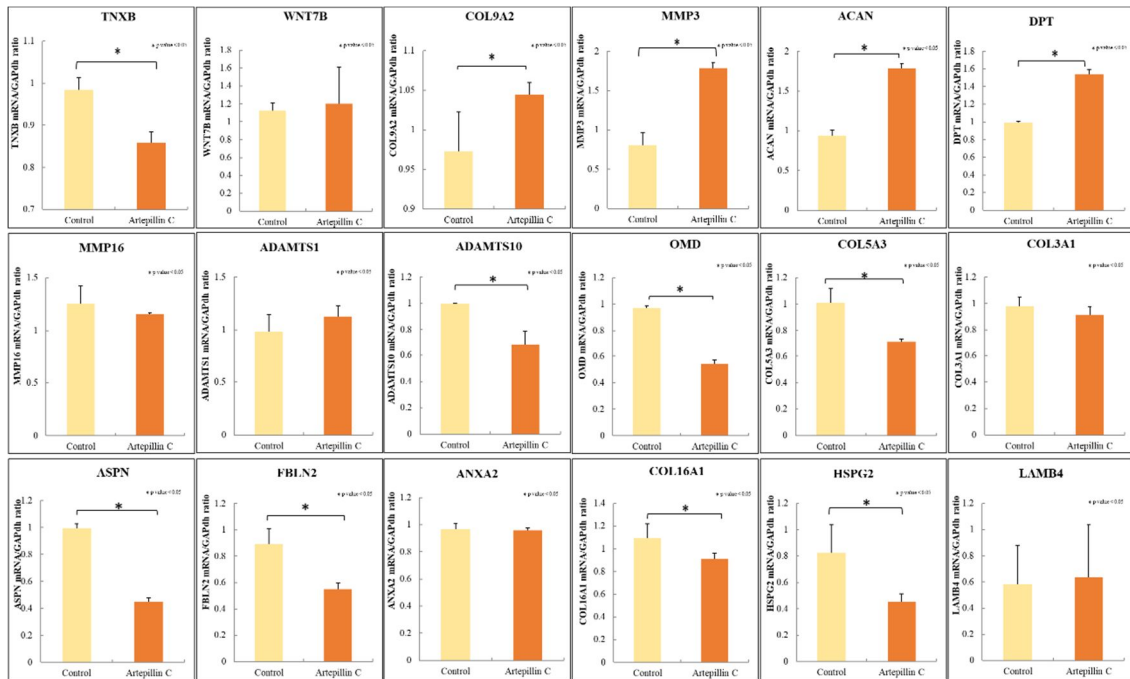


図5 . 定量的 Real-Time PCR の結果

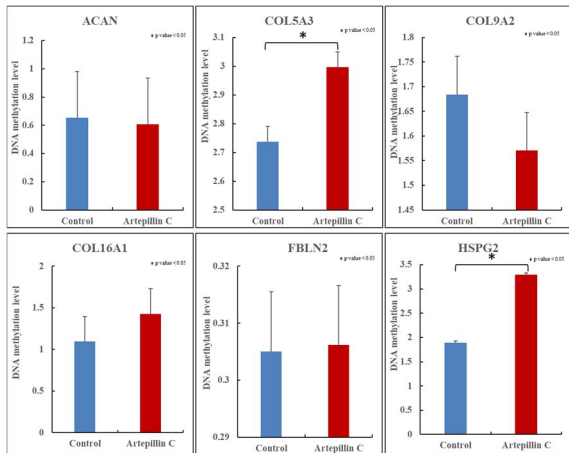


図6 . Methylation Specific PCR の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 R. TAKAI, O. UEHARA, T. MORIKAWA, K. YOSHIDA, J. SATO, Y. ABIKO, T. OHTA
2. 発表標題 Artepillin C regulates extracellular matrix gene expressions in human periodontal fibroblasts by DNA methylation
3. 学会等名 68th Meeting of the Japan Association for Dental Research 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rie Takai, Osamu Uehara, Daichi Hiraki, Tetsuro Morikawa, Fumiya Harada, Koki Yoshida, Jun Sato, Yoshihiro Abiko, Tohru Ohta
2. 発表標題 Gene expression profiles in HPDLFs by Artepillin C treatment
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------