

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10187

研究課題名(和文) 口腔内病原菌内毒素により誘発される膵臓のエピジェネティクス変化

研究課題名(英文) Epigenetic alterations of pancreas induced by oral bacterial endotoxin

研究代表者

安彦 善裕 (ABIKO, Yoshihiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：90260819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (P.g) 由来内毒素 (Lipopolysaccharide; LPS) による膵臓疾患関連遺伝子の同定を目的とし、P.g-LPSをマウスへ30日間投与した。膵臓の網羅的解析で、膵臓がん関連遺伝子 Regenerating islet-derived protein 3 gamma (Reg3G) が上位となった。Reg3Gおよび同源性のあるReg3Aとの免疫染色の結果、膵臓ランゲルハンス島にReg3A/G陽性反応を認めた。P.g-LPSはReg3A/G遺伝子発現を増加させ、膵臓がんの発症や進行に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓関連疾患の発症や進行に歯周病原菌の関与することを示唆する報告は年々増えてきているものの、膵臓関連疾患に歯周病原菌がどの様に働いているか、そのメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* 由来内毒素 Lipopolysaccharide によって膵臓がん関連遺伝子 Reg3A/G の発現が増加し、膵臓がんの発症や進行に関与する可能性を明らかとした。本研究成果は、膵臓疾患の発症や進行に対し、歯周病を予防・治療することが重要な手段のひとつとなることを示した学術的価値の高いものであり、国民の健康に寄与する社会的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify pancreatic disease-related genes induced by endotoxin (Lipopolysaccharide; LPS) derived from periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* (P.g). P.g-LPS was administered to mice for 30 days. A comprehensive DNA microarray analysis of gene expression showed that the pancreatic cancer-related gene Regenerating islet-derived protein 3G (Reg3G) ranked high. As a result of immunostaining with Reg3G and Reg3A, which is homologous to Reg3G, Reg3A/G positive reaction was observed in pancreatic islets of Langerhans. These results indicate that the gene expression of Reg3A/G was increased by the stimulation of P.g-LPS, suggesting that it might be involved in the development and progression of pancreatic cancer.

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 歯周病原菌 膵臓

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病を始めとした口腔内の感染性疾患は糖尿病や心疾患、呼吸器疾患、自己免疫疾患、慢性腎臓病、認知症など全身の様々な疾患の発症や進行への関与が明らかになってきている。悪性腫瘍の発症との関連も指摘されてきており、口腔がん、食道がん、肺がん、膵臓がんなどへの関連が示唆されてきている。このメカニズムとして、細菌産生物質に由来するサイトカインが主なものとして挙げられているが、未だ不明な点が多い。

歯周病の発症には、病原菌をはじめとした外因(環境因子)による慢性的な刺激が大きく関わっていることから、近年では歯周炎の発症や進行へのエピジェネティクス修飾の関与が注目されてきている(Larsson L et al., 2015; Najeeb S et al., 2016; Barros SP et al., 2018)。エピジェネティクスは、環境因子により影響を受ける遺伝子表現系で、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る。エピジェネティクス変化に関する研究は、主に悪性腫瘍をターゲットとしたものが多かったが、最近になり、肥満や糖尿病などの生活習慣病の発症や自己免疫疾患などへの関与も指摘されてきている(Arighbede AO et al., 2012; Noble JM et al., 2014; Wu & Nakanishi, 2014)。このことから、口腔内病原菌が関与する全身疾患の発症・進行に、諸臓器におけるエピジェネティクス変化も関与しているものと考えられるが、未だ明らかとなっていない。

近年、歯周病の膵臓への影響について関心が高まっている。これは歯周病原菌の存在が原因となっており、糖尿病との関連性はそれを裏付ける多くの報告がある。そのほか、慢性膵臓炎との関連性、自己免疫性疾患として発症する1型糖尿病や、膵臓がんの発症との関連性も注目されてきている。このように、膵臓関連疾患の発症や進行に歯周病原菌の関与することを示唆する報告は年々増えてきているものの、膵臓関連疾患に歯周病原菌がどのように働いているか、そのメカニズムは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、口腔内病原菌である歯周原菌 *Porphyromonas gingivalis* (P.g) とその由来内毒素(Lipopolysaccharide; LPS) による、膵臓でのエピジェネティクス修飾を網羅的に観察し、口腔内病原菌のエピジェネティクス修飾によって影響を受ける膵臓関連疾患遺伝子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) P.g の培養と LPS の抽出

Porphyromonas gingivalis (P.g) ATCC33277 株を、血液寒天培地を用いて 37℃、嫌気条件にて培養した後、選択したコロニーを液体培地にて 37℃ で 3 日間嫌気培養した。培養後、菌体を遠心処理により回収した。PBS で洗浄後、ホルマリンにて死菌処理を行い、凍結乾燥させた。凍結乾燥させた菌体から、ホットフェノール法にて LPS を抽出した。

(2) 実験動物

実験動物には、C57BL/6J 雄性マウスを用い、北海道医療大学動物実験委員会の承認の後実施した(承認番号;平成 30 年 089 号)。

(3) P.g の LPS と P.g の投与

P.g 由来 LPS を生理食塩水に溶解し、5.0 mg/kg の濃度で腹腔内注射した(以下、LPS 投与群, Harada et al., 2018)。対照群には実験群と同期間で同量の生理食塩水を腹腔内注射した。膵臓への影響を検証するため、8-10 週齢の C57BL/6J 雄性マウスに P.g 由来 LPS を 3 日毎に 30 日間投与し、最終投与より 3 日後にマウスを屠殺後、膵臓を摘出した。

P.g の投与は P.g+CMC (1×10^9 CFU) を週に 3 回、5 週間経口投与し、コントロールには CMC のみを投与した。

(4) マイクロアレイ網羅的解析

膵臓より抽出された total RNA を、SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Ver. 2.0 (Agilent Technologies Japan) にて遺伝子のマイクロアレイ網羅的解析を行った。得られた解析結果から、発現上昇が強く認められた上位 10 遺伝子を選出した。

(5) 膵臓疾患関連遺伝子の検索

マイクロアレイ網羅的解析より発現上昇が認められた上位 10 遺伝子について、web サイト「The Human Protein Atlas」(<https://www.proteinatlas.org>) が提供している、遺伝子の発現情報データベースより、膵臓疾患に関連する遺伝子かどうか検索を行った。

(6) 定量的 RT-PCR 法によるマイクロアレイ網羅的解析の再現性の確認

マイクロアレイ網羅的解析より発現上昇が認められた上位 10 遺伝子の中で膵臓疾患関連遺伝子であった Regenerating islet-derived protein 3 gamma (Reg3G) と、相同性のある Reg3A について再現性を確認するため、各遺伝子に対応するプライマーを設計した後、定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現の検討を行なった。

(7)免疫組織化学染色

Reg3A/G の膵臓におけるタンパクの発現を観察するために、免疫組織化学染色を行った。摘出した膵臓組織を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 24 時間浸漬固定の後、脱パラフィンおよび親水処理を行い、内因性ペルオキシダーゼの不活性化を行った。非特異的免疫反応をブロックするために、切片を Phosphate Buffered Saline with Tween で処理した。1%BSA/0.1 M PBS で希釈した抗 Reg3A/G 抗体 (1:100 希釈, Abcam, MA, USA) を一次抗体として 37 °C で 1 時間反応させた。その後、切片を洗浄し、EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-rabbit (Agilent Technologies Japan) を二次抗体として室温で 30 分反応させた。その後、切片を洗浄し、発色は DAB peroxidase substrate (Dako, Tokyo, Japan) を用いて行った。核染色には Hematoxylin を使用し、封入後、FLOVEL Filing System カメラ (Flovel, Tokyo, Japan) と OLYMPUS BX50 (Olympus, Tokyo, Japan) で観察・撮影した。画像処理ソフト Image J (U. S. National Institutes of Health, Maryland, USA) を用いて、撮影画像の二値化による領域抽出を行い、膵臓のランゲルハンス島に占める Reg3A/G 発現細胞の面積比率を測定し、定量化を行った。

(8)蛍光免疫染色

Reg3A/G の局在を調べるために、蛍光免疫染色を行った。摘出した膵臓組織を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 24 時間浸漬固定の後、脱パラフィンおよび親水処理を行い、0.1% TritonX/0.1 M PBS で透過処理した。PBS で洗浄し、非特異的免疫反応をブロックするために、切片を 3% Goat serum (Sigma-Aldrich) で処理した。1%BSA/0.1 M PBS で希釈した抗 Reg3A/G 抗体 (1:100 希釈, Abcam plc, Cambridge, UK) と抗 Glucagon 抗体 (1:100 希釈, Abcam plc) を一次抗体として室温で 1 時間反応させた。切片を洗浄し、Goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (1:100 希釈, AF488, Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) と Donkey Anti-Sheep IgG (H+L) antibody (1:100 希釈, CF543, Biotium, CA, USA) を二次抗体として室温・遮光下で 1 時間反応させた。切片を洗浄し、DAPI Fluoromount-G (SouthernBiotech, AL, USA) で核染色を行った。封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (Eclipse TE 2000-E, Nikon, Tokyo, Japan) を用いて観察・撮影を行った。

(9)RNA-seq

サンプルは BioAnalyzer で実行し、Total RNA integrity を評価した。配列ライブラリーの構築には、高品質の RNA サンプル (RNA インテグリティナンバー 9.0) だけを使用した。鎖特異的ライブラリ調製法 (dUTP 法) で調製したテンプレートとインデックス配列を含むプライマーを用いて PCR による増幅を行い、シーケンスライブラリを調製した (NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module; NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina)。RNA-seq データは、NovaSeq 6000 システム (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて得た。配列リードは Trimmomatic (ver.0.38) を用いてトリミングした。トリミングされたシーケンスリードは、HISAT2 (ver.2.1.0) を用いて参照ゲノムにマッピングした。featureCounts (ver.1.6.3) を用いて、各遺伝子の raw read count を算出した。生リードカウントは iDEP.95 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep95/>) にアップロードし、階層的クラスタリング、主成分分析 (PCA)、相関評価、ヒートマップ作成、機能分析を行った。

(10)統計分析

統計分析は、統計ソフト IBM SPSS Statistics 25 (IBM, Armonk, NY, USA) を用いた Mann-Whitney U 検定にて比較・検討し、有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1)研究の主な成果

マイクロアレイ網羅的解析

P.g 由来 LPS 投与による膵臓の遺伝子のマイクロアレイ網羅的解析を行った結果、LPS 投与群において、対照群と比較して全遺伝子中、2 倍以上の発現増加がみられたのは 1,591 プローブ、0.5 倍以下の発現減少がみられたのは 527 プローブであった。発現上昇および発現低下した遺伝子それぞれを IPA*ソフトウェアに Agilent Probe ID および Fold change のデータをインポートしたところ、遺伝子情報が合致したデータは発現上昇で 1,029 プローブ、発現低下で 326 プローブであった。それらの遺伝子の中で発現比の大きかった上位 10 遺伝子は発現上昇群で Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (Ighg3), S100 calcium-binding protein A8 (S100A8), S100b calcium-binding protein A9 (S100A9), LOC102642252, Immunoglobulin kappa locus (Igl), Immunoglobulin lambda variable 1 (Iglv1), Regenerating islet-derived protein 3 gamma (Reg3G), Immunoglobulin kappa variable 4-53 (Igv4-53), Immunoglobulin heavy variable V10-3 (Ighv10-3), Chitinase-like protein 3/4 (Chil3/Chil4) であった (表 1)。

そのうち、Reg3G が膵臓疾患関連遺伝子に該当した。またマイクロアレイ網羅的解析で 22.756 倍の発現上昇を示した Reg3A は Reg3G と 60~70% の相同性を有し (Narushima et al., 1997) Reg3A も膵臓癌において発現する遺伝子であった。

表1. 発現比の大きかった発現上昇群の上位10遺伝子

Gene Symbol	Description	Fold change
Ighg3	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	4123.958
S100A8	S100 calcium-binding protein A8	523.053
S100A9	S100 calcium-binding protein A9	336.474
LOC102642252	Uncharacterized	263.940
Igk	Immunoglobulin kappa locus	241.758
Iglv1	Immunoglobulin lambda variable 1	112.254
Reg3G	Regenerating islet-derived protein 3 gamma	73.305
Igkv4-53	Immunoglobulin kappa variable 4-53	66.337
Ighv10-3	Immunoglobulin heavy variable V10-3	51.897
Chil3/Chil4	Chitinase-like protein 3 / 4	48.847

定量的 RT-PCR 法によるマイクロアレイ網羅的解析の再現性の確認

定量的 RT-PCR 法の結果、マイクロアレイ網羅的解析により発現上昇のみられた上位 10 遺伝子の Reg3G および相同性のある Reg3A について mRNA 発現レベルで qRT-PCR 法による解析を行った結果、Reg3A および Reg3G の発現レベルは、LPS 投与群で対照群と比較して有意な発現上昇が認められた ($p < 0.05$) (図 1)。

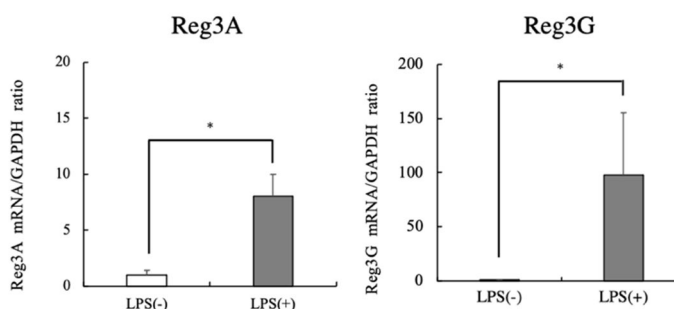


図1. Reg3A/GのmRNA発現解析

P. g由来LPSを投与したマウスの膵臓において定量的RT-PCR法による遺伝子のmRNAの発現解析を行ったところ、対照群と比較してLPS投与群ではReg3AおよびReg3GのmRNA発現が有意に低下した ($*p < 0.05$)。

免疫組織化学染色

Reg3A/G の膵臓におけるタンパクの発現を観察するために免疫組織化学染色を行った結果、LPS 投与群の膵臓ランゲルハンス島の外縁付近に茶褐色濃染の陽性反応が認められた (図 2)。

また Reg3A/G 発現の画像解析を行った結果、膵臓ランゲルハンス島に占める Reg3A/G 発現細胞の面積比率は、LPS 投与群で対照群と比較して有意に大きい値となった ($p < 0.05$) (図 3)。

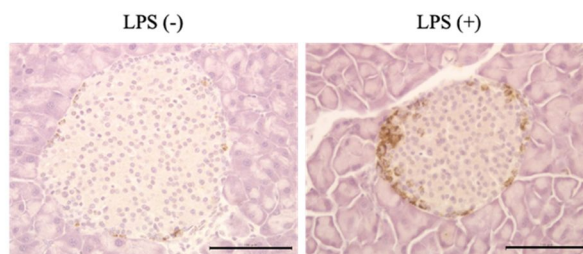


図2. 抗Reg3A/G抗体を用いた免疫組織化学染色 (bar=100 μm)

LPS投与群 (右) 及び対照群 (左) のマウス膵臓において、タンパクの発現を観察するために、抗Reg3A/G抗体を用いて免疫組織化学染色を行った結果、LPS投与群の膵臓ランゲルハンス島の外縁付近に茶褐色濃染の陽性反応を認めた。

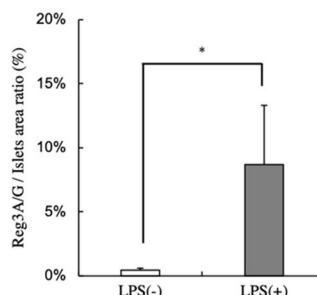


図3. 画像解析で算出した膵臓ランゲルハンス島に占めるReg3A/G発現細胞の面積比率
画像処理ソフトImage Jを用いて、撮影画像の二値化による領域抽出を行い、Reg3A/G発現細胞の定量化を行ったところ、膵臓ランゲルハンス島に占めるReg3A/G発現細胞の面積比率は、LPS投与群で対照群と比較して有意に大きい値となった ($*p < 0.05$)。

蛍光免疫染色

Reg3A/G の局在を調べるために蛍光免疫染色を行った結果、抗 Reg3A/G 抗体および抗 Glucagon 抗体の二重染色により、LPS 投与群の膵臓ランゲルハンス島の細胞相当領域に Reg3A/G 陽性細胞が認められた (図 4)。

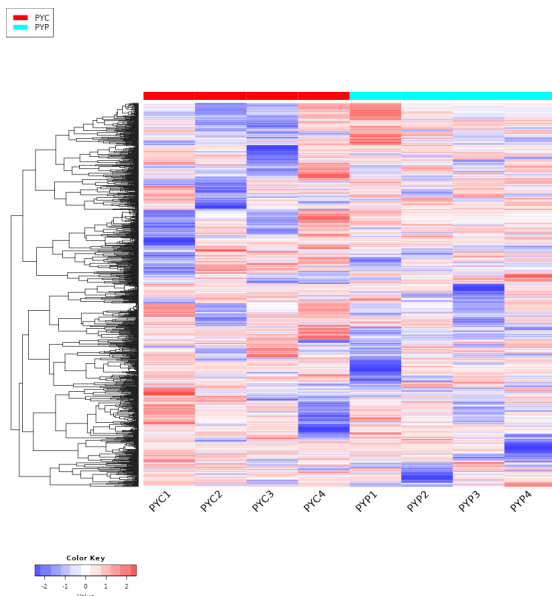


図 5 . RNA-seq の結果

RNA-seq 解析

Ahsg, Schip1, Gm10143 など 33 遺伝子が発現上昇、Eva1c, Igkv3-2, Dtl など 43 遺伝子が発現低下した。これらの変化に関わるパスウェイ解析を行なったが、パスウェイは検出されなかった (図 5)。

(2)得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

近年、国際誌に口腔内病原菌と膵臓疾患と関連を示すデータが報告されてきている。すなわち、歯周炎が慢性膵炎の発症に関わっていることを示す臨床データに関する報告があり (Miskiewicz et al., 2018)。大規模なコホート研究では、P.g 由来 LPS に対する高い抗体価を有する患者では膵臓がん発症のリスクが約 2 倍高いことが報告されている (Michaud D S et al., 2013)。また、メタゲノム解析で、口腔内細菌叢の変化と膵臓がん発症の関連が検討されており、P. gingivalis と Aggregatibacter. Actinomycetemcomitans の存在が膵臓がんのリスクが増加することが示唆されている (Fan X et al., 2016)。これらの多くは病原菌感染に伴うサイトカインの産生と関連付けられているが、メカニズムの詳細は未だ不明である。

本研究で、P.g 由来 LPS による病的なエピジェネティクス修飾による膵臓疾患関連遺伝子 Reg3A/G の発現変化を同定したことは、歯周病を膵臓疾患発症のリスクと捉え、膵臓疾患の発症や進行に対する、Reg3A/G をターゲットとした歯周病の新たな予防法・治療法に寄与する可能性が考えられた。本研究により得られた成果は国内外を問わず、大きなインパクトを与えるものと思われる。

(3)今後の展望

今後は、本研究成果をもとに、P.g 由来 LPS によるエピジェネティクス修飾が膵臓疾患関連遺伝子 Reg3A/G にどのような影響を及ぼすかについて、エピジェネティクス修飾機構である DNA メチル化修飾やヒストン修飾についての研究を進めていくことで、歯周病による膵臓疾患発症リスクについて詳細な機序を解明していく予定である。

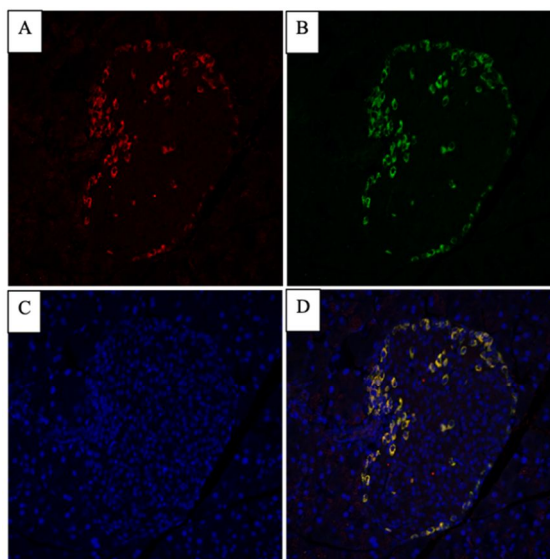


図4. 抗Reg3A/G抗体及び抗Glucagon抗体を用いた蛍光免疫染色 (bar=100 μm)

P.g由来LPS投与群のマウス膵臓において、Reg3A/Gの局在を調べるために、抗Reg3A/G抗体及び抗Glucagon抗体を用いた蛍光免疫染色を行った結果、LPS投与群の膵臓のランゲルハンス島のα細胞相当領域にReg3A/G陽性細胞を認めた。

A : Glucagon, B : Reg3A/G, C : DAPI, D : Merge

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Daichi Hiraki, Osamu Uehara, Yasuhiro Kuramitsu, Tetsuro Morikawa, Fumiya Harada, Koki Yoshida, Kozo Akino, Itsuo Chiba, Masahiro Asaka and Yoshihiro Abiko	4. 巻 21
2. 論文標題 P. gingivalis Lipopolysaccharide Stimulates the Upregulated Expression of the Pancreatic Cancer-Related Genes Regenerating Islet-Derived 3 A/G in Mouse Pancreas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21197351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野ホームページ研究概要 https://www.hoku-iryo-u.ac.jp/course-guide/course/dent/rinsho-koku-byori/kenkyugaiyo/

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
研究分担者	植原 治 (UEHARA Osamu) (00709248)	北海道医療大学・歯学部・講師 (30110)	
研究分担者	太田 亨 (OHTA Tohru) (10223835)	北海道医療大学・健康科学研究所・教授 (30110)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	藏満 保宏 (KURAMITSU Yasuhiro) (50281811)	北海道医療大学・医療技術学部・教授 (30110)	

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