

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21674

研究課題名(和文)「DNAのねじれ」を標的としたネオエピジェネティック歯周治療の創成

研究課題名(英文)Creation of neo-epigenetic periodontal therapy targeting DNA twist

研究代表者

山下 元三(Yamashita, Motozo)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：90524984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、歯周組織構成細胞のDNA超らせん高次構造とスーパーエンハンサーの役割を検討し、炎症性サイトカイン遺伝子の包括的な転写制御機構の解明に挑んだ。その結果、老化ヒト歯根膜細胞(HPDL)において、Pol IIを標的とするmicroRNA-34aの発現増加を認めた。そして、炎症性サイトカインの産生にとり、DNAのねじれとスーパーエンハンサーの形成が重要であることがDNAトポイソメラーゼI、BRD4、PTEFbの特異的阻害から明らかとなった。また、ATACシーケンシング法により、老化HPDLの炎症性サイトカイン遺伝子の近上流領域のユークロマチン活性の増加を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAのメチル化、ヒストン修飾のエピゲノムの概念では、基礎疾患を有する高齢者にみられるサイトカインストームのような急性炎症につながる病態のゲノムレベルの理解は困難である。本研究では、老化歯周組織細胞の炎症性サイトカインの調節、制御において、DNA超らせん高次構造とスーパーエンハンサーが重要であることを示した。これは、クロマチン構造と転写因子のゲノム領域への結合を制御することにより、炎症性サイトカインストームを抑制することが可能であることを示唆する。これらの結果は、免疫の低下した高齢者の重篤な歯周病を対象とした新規の歯周病予防・治療法開発にとり有用な分子基盤となるものである。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of higher-order structure of DNA superhelices and the super-enhancers to elucidate the comprehensive transcriptional regulation mechanism of inflammatory cytokine genes in periodontal ligament cells. We found that increased expression of microRNA-34a, which targets Pol II, in senescent human periodontal ligament cells (HPDL). Moreover, we found that DNA twisting and super-enhancer formation are important for the production of pro-inflammatory cytokines in senescent HPDL by specific inhibition of DNA topoisomerase I, BRD4 and PTEFb. ATAC sequencing also confirmed the increased euchromatin activity in the upstream region of inflammatory cytokine genes in senescent HPDL.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病治療 エピゲノム DNA超らせん スーパーエンハンサー サイトカインストーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人病のような加齢性疾患の発症・病態形成には環境要因の寄与が大きく、DNA のメチル化、ヒストン修飾という、エピジェネティックなゲノム DNA の修飾制御が明らかとされている。しかしながら、エピゲノムに基づいた概念では、基礎疾患のある高齢者において発症する重篤な歯周病や全身性の急性炎症をゲノムレベルで理解することは困難である。近年、遺伝子転写に重要な分子機構として、クロマチンの高次構造が注目されている。その好例として、DNA 超らせんのねじれや、遺伝子転写開始点から離れて位置する複数のエンハンサー領域の局所的なクラスターであるスーパーエンハンサーの形成が挙げられる。DNA トポイソメラーゼ I (TopI) が、転写開始領域上流の DNA 超らせんのねじれを解消することにより、巨大なタンパク質複合体である mRNA 転写を担う酵素、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) や転写因子のプロモーター領域への結合のみならず、離れて位置するエンハンサー領域へのアクセスを促進することが明らかとなりつつある。我々は、次世代型シーケンサーを用いた RNA シークエンス (RNA-seq.) と統合バイオインフォマティクス解析による探索を行い、炎症サイトカインを高産生するヒト老化歯根膜細胞に特有な microRNA である hsa-miR-34a がその標的遺伝子 Pol II mRNA の発現を制御するという、興味深い結果を得た。最近、新しい概念として、「相分離 スーパーエンハンサー制御モデル」が提唱されている。これは、転写調節因子の巨大なタンパク質複合体と DNA の形成により生じたタンパクの濃縮が、油滴のような液液相分離を誘導し、物理や化学現象の一つである相分離がスーパーエンハンサー領域の複数の遺伝子転写を調節する、との分子生物学と物理化学の融合となる理論である。これらより、申請者は、「DNA のねじれの制御」による遺伝子転写の調節は、エピゲノムより強力であると推察した。また、生物学的老化が炎症サイトカイン遺伝子の転写開始点近傍の DNA 超らせんのねじれの高次構造とスーパーエンハンサー/転写因子複合体のナノ空間における相互関係に歪みを及ぼしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、これらの仮説を確固たるものとするとともに、歯周組織構成細胞や免疫担当細胞の DNA 超らせんの高次構造とスーパーエンハンサーの役割を明らかにすることで、炎症性サイトカイン遺伝子の包括的な転写制御機構を解明する。そして、クロマチン構造や相分離の制御に基づいた超エピゲノムの新規歯周治療を創成し、従来の医学では制御困難である炎症性サイトカインストームを克服することで、免疫の低下した高齢者の重篤な歯周病の治療法開発の分子基盤を構築する。

3. 研究の方法

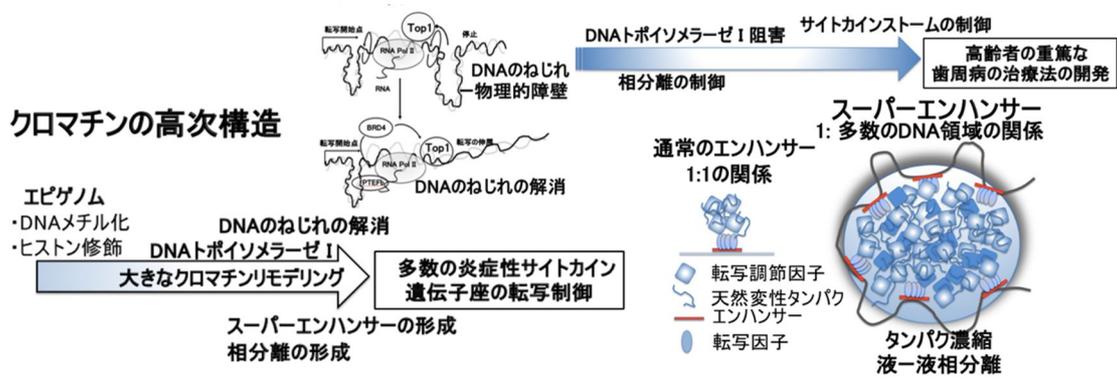
本研究では、DNA のねじれやスーパーエンハンサーへの影響が大きい炎症関連遺伝子の包括制御を明らかにし、歯周組織の急性炎症の病態をゲノムレベルで解析した。

1) 細胞老化を誘導した歯周組織構成細胞や免疫細胞の DNA トポイソメラーゼ I を特異的阻害剤 (カンプトテシン; CPT) 処理し、感染微生物、*Porphyromonas.gingivalis* LPS、Poly(I:C) 刺激に対する炎症性サイトカインの産生応答を解析し、DNA のねじれが炎症性サイトカイン遺伝子の転写調節に及ぼす影響を検討する。同機構におけるクロマチンの転写調節因子 (アセチル化ヒス

トンに結合する転写調節因子;プロモドメインタンパク;BRD4、転写伸展因子 PTEFb)の役割をそれぞれの特異阻害剤(+JQ1、I-BET151)処理により、炎症性サイトカインの産生応答を比較し、検討する。2)そして、1)実験条件下の細胞を用いて、Pol II、Top I、アセチル化ヒストン、BRD4 抗体を用いたクロマチン IP-RNA-seq.を実施し、得られたデータを ChIP-Atlas ソフトにて解析することで炎症性サイトカイン遺伝子座への結合を評価する。3)次に、高週齢マウスの *in vivo* 歯周病評価モデルに、Top1 特異阻害剤;CPT を前投与後に *Porphyromonas. gingivalis* もしくは LPS 腹腔投与で菌血症を誘導し、歯周病の病態形成ならびに全身状態を評価する。4)また、スーパーエンハンサー領域における、クロマチンタンパクと核酸の混みあった濃縮物、液相分離の形成を化学的に阻害し、(pH、イオン、温度調節もしくはポリマー阻害剤 1,6-Hexanediol 処理)を行い、共焦点イメージングによる GFP-BRD4 標識化クラスターの観察と炎症性サイトカイン産生を検討する。

4. 研究成果

研究開始にあたり、炎症性サイトカイン IL-6/8 を高産生する、細胞老化の亢進した歯周組織構成細胞株のスクリーニングを実施し、産生能の異なる細胞株を樹立した。そして、IL-1beta、LPS の共刺激に対す老化歯根膜細胞は、炎症性サイトカインの高産生を示したが、DNA 超らせん構造の維持に重要な DNA トポイソメラーゼ I、BRD4、転写伸展因子 PTEFb 転写調節因子の特異的阻害剤処理により抑制された。ゲノム解析の手法として、クロマチン IP を必要としない、転写が活性化されたユークロマチン領域に対する ATAC シークエンス法を用いた解析を行った。老化歯根膜細胞株と正常歯根膜細胞株のライブラリーを作成し、次世代シークエンス (Novaseq6000)を用いて、リード長 150bp、ペアエンド、53.3M リードペアで解析した結果、K-means Heatmap 解析において差があることが明らかとなった。今後、IL-6、IL-8 のプロモーター上流領域を ISV ゲノムブラウザを用いて、より詳細なオープンクロマチン領域の可視化、評価を行う予定である。高週齢マウスならびに *P.g* を投与した高血糖 *ob/ob* マウスで *in vivo* 歯周病評価モデルを構築し、菌血症を誘導することで歯周病の病態形成と血液マーカーならびに肝機能状態の計測系を樹立した。ヒストン脱アセチル化作用のある NMN の腹腔投与により、マウス歯周組織の活性酸素種の変化がみられたことから、カンプトテンシンが歯周組織と全身に及ぼす効果を評価した。スーパーエンハンサー領域における、液相分離の形成をポリマー阻害剤にて化学的に阻害し、共焦点イメージングによる GFP-BRD4 標識化クラスター (スーパーエンハンサー) の観察を行ったが、GFP-BRD4 の遺伝子導入率が低く検出が困難であったため、高感度細胞免疫染色による検出を試みる予定である。COVID-19 感染拡大防止の観点から、研究施設のある大阪大学において活動制限がなされたため、当初の研究計画を修正して対応したが、一部の研究計画、とりわけ動物実験については遅れが生じたが、採取した試料の解析を継続する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Mari Tatsumi, Manabu Yanagita, Motozo Yamashita, Shiori Hasegawa, Kuniko Ikegami, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami	4. 巻 56(5)
2. 論文標題 Long-term exposure to cigarette smoke influences characteristics in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Periodontal Res	6. 最初と最後の頁 951-963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山下元三、村上伸也	4. 巻 Vol.10 No.2
2. 論文標題 老化と慢性炎症 - 歯周組織の慢性炎症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患	6. 最初と最後の頁 41-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Tomomi, Yamashita Motozo, Ikegami Kuniko, Suzuki Mio, Yanagita Manabu, Kitagaki Jirouta, Kitamura Masahiro, Murakami Shinya	4. 巻 11
2. 論文標題 Autophagy facilitates type I collagen synthesis in periodontal ligament cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80275-4	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 -

1. 著者名 Shiori Hasegawa Manabu Yanagita Mari Tatsumi Motozo Yamashita Masahiro Kitamura, Shinya Murakami	4. 巻 56(4)
2. 論文標題 Aromatase inhibitor anastrozole modifies cellular functions in gingival fibroblasts and endothelial cells: possible periodontal complications of aromatase inhibitor treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 828-836
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12881	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本 康樹, 山下 元三, 池上 久仁子, 中村 友美, 西川 有彩, 森川 竜也, 北村 正博, 村上 伸也
2. 発表標題 NAD+依存性のミトコンドリアの異常が老化歯根膜における酸化ストレスに及ぼす影響
3. 学会等名 第64回秋季日本歯周病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Arisa Nishikawa, Motozo Yamashita and Shinya Murakami
2. 発表標題 HSP47 causes the denatured collagen in aged periodontal ligament.
3. 学会等名 第69回 国際歯科研究学会 日本部会学術大会(JADR)(国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	竹立 匡秀 (Takedachi Masahide) (60452447)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	柏木 陽一郎 (Kashiwagi Yoichiro) (20598396)	大阪大学・歯学研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------