

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09939

研究課題名（和文）エピジェネティクスをターゲットとした歯科用金属の細胞親和性の検証

研究課題名（英文）Evaluation of the cellular affinity of dental metals targeting epigenetics

研究代表者

大友 麻衣子（OTOMO, Maiko）

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：20453277

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯科金属材料の安全性をエピジェネティクス変化から検証した。ヒト歯肉線維芽細胞（HGnF）でのニッケル（Ni）及びチタン（Ti）による細胞生存率測定を行なった後、HGnFをNi（50 μ M）及びTi（10 μ M）で培養した結果、Ni及びTi刺激ではControl（無刺激）に比べ炎症性サイトカインのIL-6 mRNA発現の有意な上昇を認め、Ti刺激においてControlに比べIL-6での有意なDNAメチル化率低下を認めた。HGnFへのNi及びTi刺激はDNAメチル化変化を介してIL-6のmRNA発現変化を引き起こした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、ヒト歯肉線維芽細胞（HGnF）へのNi及びTi刺激がDNAメチル化変化を介して、炎症性サイトカインであるIL-6のmRNA発現変化を引き起こすことを明らかにしたものである。

歯科用金属材料はイオン化などによってヒト歯肉線維芽細胞へ浸透し影響する可能性のあることから、本研究成果の学術的意義は大きいものと考えられた。

また将来的に、DNAメチル化レベルを検討する手法は、歯科の生体適合性材料における新しい細胞毒性評価ツールとして役立つ可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, the safety of dental metal materials was evaluated from the perspective of epigenetic changes. After measuring the cell viability of human gingival fibroblasts (HGnF) exposed to nickel (Ni) and titanium (Ti), HGnF were cultured with Ni (50 μ M) and Ti (10 μ M). The results showed a significant increase in the expression of the inflammatory cytokine IL-6 mRNA upon stimulation with Ni and Ti compared to the control (no stimulation). Additionally, Ti stimulation resulted in a significant decrease in DNA methylation of IL-6 compared to the control. These findings indicate that Ni and Ti stimulation in HGnF induces changes in IL-6 mRNA expression through alterations in DNA methylation.

研究分野：小児歯科学

キーワード：エピジェネティクス 歯科用金属

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科用金属材料の安全性については古くから検討が行われ、安全性の高い材料が広く用いられている。安全性の検証には材料の組織適合性を、培養細胞や動物を用いた急性の細胞毒性やアレルギー反応の有無などについて検証されている。

外的な慢性刺激によって引き起こされる遺伝子修飾にエピジェネティクスがある。エピジェネティクスは、環境因子により、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、代表的なものにDNAメチル化がある。エピジェネティクス変化は長期的に発がんをはじめ、生活習慣病や自己免疫疾患などへ、口腔領域では、口腔粘膜疾患や歯周炎の増悪などにも関わっていることが示唆されている。更に、生体に刷り込まれたエピジェネティック修飾は世代を超えて遺伝子内に存在し、現時点では疾病として発症していないものの、次世代で疾患として発症しうることも知られている。このことから、エピジェネティクス変化を検討することは疾病発症の予防の上でも極めて重要である。

以上の様に、生体への安全性が確認されている歯科用金属材料も環境因子の一つであることから、生体へ何らかのエピジェネティック修飾を引き起こ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。生体金属材料によるエピジェネティック修飾を観察することは、長期にわたる安全性を担保するために極めて重要と考えられる。また、この変化は可逆的であることから、疾患予防への介入に関する情報としても重要である。

歯科材料の安全性を検証した報告は多いが、歯科用金属材料による生体のエピジェネティクス変化は検証されていない。一般に生体への毒性が強いと考えられている金属、すなわち、カドミウム、鉛、水銀やニッケルなどによるエピジェネティクス修飾を観察した報告は僅かにみられる(Ruiz-Hernandez, et al. Clin Epigenetics, 2015)。しかしながら、歯科材料として用いられているもののエピジェネティクス変化を観察した報告は見られない。

2. 研究の目的

本研究では、歯科用金属材料によるエピジェネティック修飾を観察し、これらの材料が長期的に生体に与える影響について検索することを目的とする。また、エピジェネティクス変化は可逆性であることから、歯科金属材料による長期的な疾患の発症や進行に対する予防的治療のターゲットとなりうる。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞(human gingival fibroblast cells, HGnF; ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, USA)を、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS; Biowest, Nuaille, France)および2% ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液 (富士フイルム和光純薬、大阪) 含有の alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium (-MEM; ナカライテスク、京都) で、5%CO₂、37 条件下で培養した。

(2)細胞生存率アッセイ

HGnF に対する、歯科用金属材料であるヘキサフルオロニッケル(IV)酸カリウム(Ni; Strem Chemicals, Newburyport, USA)および、ヘキサフルオロチタン(IV)酸ナトリウム(Ti; Apollo Scientific, Stockport, UK)での刺激培養における細胞生存率を、細胞増殖試薬 WST-1(Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) を用いて測定した。HGnF 細胞を 96 well plate (AGC TECHNO GLASS、静岡) に -MEM で播種し、各濃度の Ni (5、10、20、30、40、50、100 μM)、Ti (10、20、30、40、50、100、200 μM) で刺激し、double-distilled water (DDW) を対照群として用いた。48 時間培養後、WST-1 を各 well に加え 1 時間培養した。吸光度は、Multiskan FC 吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を使用して 450 nm で測定した。細胞生存率アッセイの結果から、以降の実験では Ni(50 μM)、Ti(100 μM)を使用した。

(3)RNA および DNA 抽出

HGnF 細胞は 60 mm dish で、-MEM にそれぞれ、Ni(50 μM)、Ti(100 μM)、および DDW (対照群、Control) を添加し 3 日おきに培地交換し 2 週間培養した。Total RNA は、TRIzol (Invitrogen; Massachusetts, USA) および RNeasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany) を使用して抽出し、Genomic DNA は、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用して抽出した。

(4) 定量的 RT-PCR 法

HGnF での Ni および Ti 刺激による、炎症性サイトカインである Interleukin-6(IL-6)および Interferon gamma (IFN- γ) の mRNA 発現変化を検討するために定量的 RT-PCR 法を行った。抽出した Total RNA から、oligo(dT)primers(Invitrogen)および SuperScript reverse transcriptase(Invitrogen)による逆転写反応(reverse transcription, RT)で cDNA を作製後、KAPA SYBR Fast qPCR Kit(Kapa Biosystems; Roche, Basel, Switzerland)、IL-6 または IFN- γ のターゲットプライマー、内在性コントロールの GAPDH プライマー、cDNA を用いて、LightCycler Nano (Roche) による定量的リアルタイム polymerase chain reaction (qPCR) を行った。

(5) 定量的メチル化特異的 PCR 法

HGnF での Ni および Ti 刺激による、炎症性サイトカイン IL-6 および IFN- γ の mRNA 発現変化に、エピジェネティクスの DNA メチル化が影響しているかを調べるために、定量的メチル化特異的 PCR (qMSP) 法を行った。抽出した Genomic DNA を、EpiTect Bisulfite Kits (Qiagen) による Bisulfite 変換後、MethPrimer (Li LC & Dahiya R, 2002) で IL-6 および IFN- γ のプライマーを設計し、KAPA SYBR Fast qPCR Kit、Bisulfite 変換 DNA を用いて LightCycler Nano による qMSP 法を行った。DNA メチル化率は、次の式を使用して計算された(Lu L et al., Cancer Res, 2007)。

$$\text{Methylated DNA (\%)} = \frac{M}{M + U} \times 100(\%) = \frac{1}{1 + \frac{U}{M}} \times 100(\%) = \frac{1}{1 + 2^{(-\Delta Cq)}} \times 100(\%)$$

4. 研究成果

(1) IL-6 および IFN- γ の mRNA 発現変化

定量的 RT-PCR 法の結果、2 週間培養後の IL-6 の mRNA 発現レベルは、対照群 (DDW) と比較して、Ni 群 および Ti 群で有意に上昇した (図 2(a); $p < 0.05$; Mann-Whitney U 検定; $n=4$)。一方、IFN- γ の mRNA 発現レベルは、対照群 (DDW) と比較して、Ni 群 および Ti 群で有意差を認めなかった (図 1)。

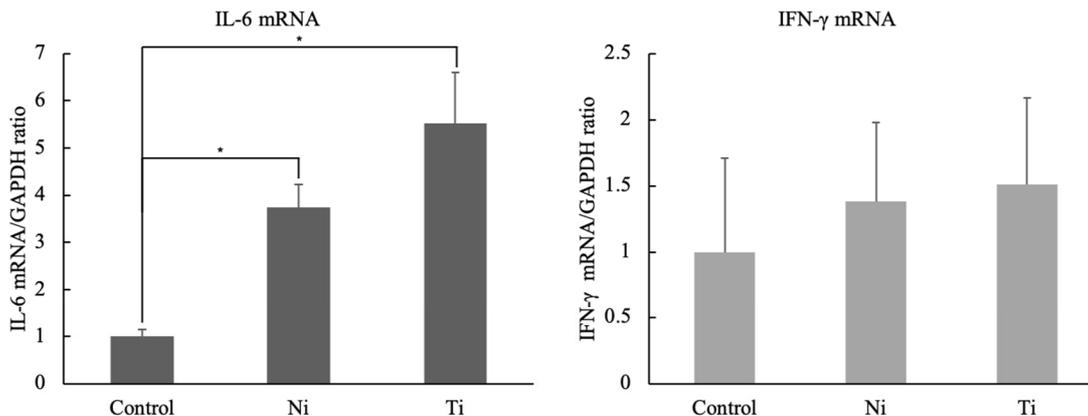


図1. IL-6 および IFN- γ の mRNA 発現変化

定量的 RT-PCR 法の結果、2 週間培養後の IL-6 の mRNA 発現レベルは、対照群である Control (DDW) と比較して、Ni 群 および Ti 群で有意に上昇した ($*p < 0.05$; Mann-Whitney U 検定; $n=4$)。

一方、IFN- γ の mRNA 発現レベルは、Control (DDW) と比較して、Ni 群 および Ti 群での有意な変化は見られなかった。

(2) IL-6 および IFN- γ の DNA メチル化変化

定量的メチル化特異的 PCR 法の結果、Ti 群では、IL-6 および IFN- γ の DNA メチル化率は対照群 (DDW) と比較して有意低下した (図 3(a); $p < 0.05$, カイ二乗検定; $n=4$)。一方、Ni 群では、IL-6 および IFN- γ の DNA メチル化率において対照群 (DDW) との有意な変化は見られなかった。

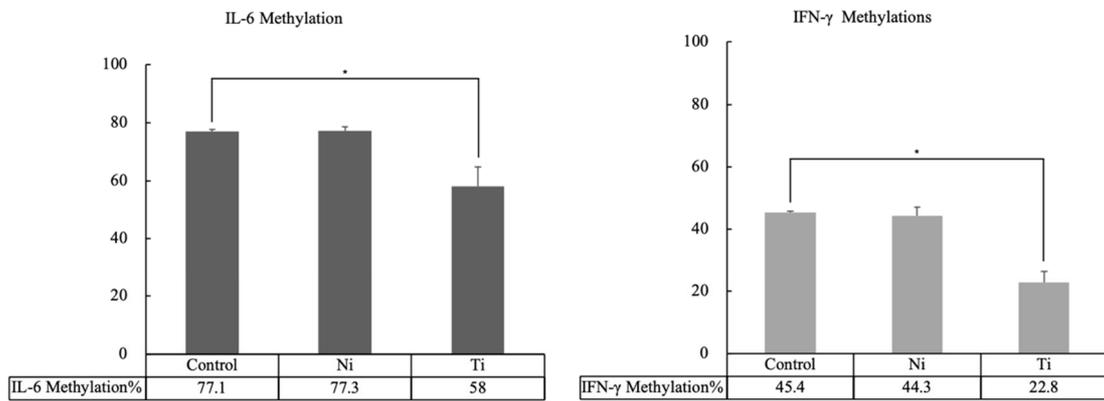


図2. IL-6 および IFN- γ のDNAメチル化変化
 定量的メチル化特異的PCR法の結果、Ti群では、IL-6およびIFN- γ の DNAメチル化率は対照群であるControl (DDW)と比較して有意に低下した(* $p < 0.05$ 、カイ二乗検定; $n=4$)。一方、Ni群では、IL-6およびIFN- γ のDNAメチル化率においてControl (DDW)との有意な変化は見られなかった。

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 0件）

1. 著者名 Dedy ARIWANSYA, Koki YOSHIDA, Tetsuro MORIKAWA, Jun SATO, Maiko OTOMO, Masato SAITOH, Takashi NEZU, and Yoshihiro ABIKO	4. 巻 43巻1号 (Accepted, in press)
2. 論文標題 Effect of Nickel and Titanium on Epigenetic Changes in Human Gingival fibroblast cells In Vitro	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 北海道医療大学歯学雑誌	6. 最初と最後の頁 -
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	安彦 善裕 (ABIKO Yoshihiro) (90260819)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	
研究分担者	齊藤 正人 (SAITOH Masato) (50337036)	北海道医療大学・歯学部・教授 (30110)	
研究分担者	根津 尚史 (NEZU Takashi) (40264056)	北海道医療大学・歯学部・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
---------	---------