

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463223

研究課題名(和文) 歯周病原菌による歯肉上皮でのエピジェネティクス機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic mechanism in gingival epithelium by periodontal pathogen

研究代表者

西村 学子 (Michiko, Nishimura)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：10337040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、P.gingivalis由来LPSをヒト歯周組織由来細胞に長期間作用させた際のエピジェネティクス変化について研究した。ヒト歯周組織由来線維芽細胞へのLPS長期刺激により、fibronectin type III (FN)、I(XII)collagen(XII-collagen)及び細胞外基質タンパク関連遺伝子のDNA高メチル化とmRNA発現減少を認めた。タンパク質解析でもXII-collagenとFNの発現が減少し、脱メチル化剤により発現回復した。この結果、歯周病原菌由来LPSは、エピジェネティクス修飾を介した遺伝子発現低下により歯周疾患の発症や進行に参与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated epigenetics change when P. gingivalis-derived LPS was allowed to act on human gingival fibroblasts for a long time. LPS chronic stimulation was given to human gingival fibroblasts, DNA hypermethylation and mRNA expression decrease of fibronectin type III (FN), I (XII) collagen (XII-collagen) and extracellular matrix protein related genes were observed. Protein analysis also reduced the expression of XII-collagen and FN and its expression was restored by demethylating agent. These result suggest that periodontal pathogen-derived LPS is involved in the pathogenesis and progression of periodontal disease due to gene expression reduction through epigenetic modification.

研究分野：臨床口腔病理

キーワード：エピジェネティクス 歯周疾患 線維芽細胞 DNAメチル化 LPS 歯周病原菌 歯周組織

1. 研究開始当初の背景

多くの疾病の発症には素因や遺伝的要因を初めとした内因と、環境因子である外因が関わっている。環境因子により影響を受ける遺伝子の表現系のエピジェネティクスは、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、その代表的なものにDNAメチル化修飾やヒストンの化学修飾がある。これらのエピジェネティックな遺伝子の修飾は、これまでのところ悪性腫瘍発生に関わる研究が大半を占め、これ以外にも、糖尿病、アレルギー、自己免疫疾患、精神疾患などでの関与も指摘されてきており、Common disease を含めた多くの疾患の病態にエピジェネティック修飾の関与していることが推測されている。

最近、歯周病原菌のひとつである *Porphyromonas gingivalis* 由来の LPS が歯根膜由来線維芽細胞の骨芽細胞転写因子である RUNX2 遺伝子の高メチル化と脱アセチル化を引き起こすことを明らかにし (J Microbiol Immunol Infect, 2012)、歯周炎発症進行へのエピジェネティックな関与が示された。

歯周炎に関わる環境因子としての多くは、歯周病原菌の感染によるのは周知のところであるが、口腔内で長時間にわたり歯周病原菌に曝されている環境下にあることもエピジェネティクス修飾に関与すると予測される。また、歯周病原菌 (*Porphyromonas gingivalis* 等) から産生されている物質 (酪酸) には、ヒストンアセチル化により遺伝子発現制御作用を示すものがあり、歯周病原菌産生物によるヒストンアセチル化修飾が歯肉炎発症や免疫能とも関与しているものと推測される。

このことから、口腔内環境では歯周病原菌が直接的あるいは間接的にエピジェネティクスを誘発し、歯周病の発症・進行に関連している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、歯周組織由来細胞における歯周病原菌のエピジェネティック修飾について網羅的に解析し、治療や進行予防に意義のあるエピジェネティクスを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト歯根膜線維芽細胞 (LONZA) を 10%FBS 含有 DMEM にて前培養後、DMEM に *P. gingivalis* (ATCC 33277) 由来 LPS (WAKO, 1 µg/ml) を添加したものと非添加したものを 3 日間ずつ交互に交換し、1~4 ヶ月間培養した。

(2) DNA メチレーションアレイ解析

DNA は精製後、cytidine 5-dUTP (Cy5) および cytidine 3-dUTP (Cy3) にて蛍光ラベリング、Human CpG islands 224k array に DNA を Hybridize, DNA Microarray Scanner (Agilent technology) にて解析した。

(3) MSP 法による XII-collagen および FN のプロモーター領域の DNA メチル化解析は、fibronectin type III (FN) および I(XII)collagen (XII-collagen) DNA のメチレーションアレイ結果の再現性の確認目的で行った。LPS 添加細胞より DNA を抽出後、QIAGEN EpiTect® Plus DNA Bisulfite Kit により Bisulfite 処理を行い、Methylation-Specific PCR (SYBR® Green) にて解析した。

(4) 定量的 real-time PCR 法による mRNA 発現解析

LPS 添加長期培養後の細胞から、Trizol Regent® を用いて total RNA を抽出後 cDNA を作成した。得られた cDNA は、FN および XII-collagen の特異的 PCR を用いて定量的

real-time PCR法 (SYBR® Green、CT法)を行った。

(5) XII-collagenおよびFNの蛋白発現解析
CELISA法 (Bioo Scientific®) による蛋白発現解析を行った。長期LPS添加細胞を、96well plateに再播種24時間後、In Cell ELISA Kitのprotocolに従い、GAPDH、FANK1 COL12A1に対する抗体を用いて行った。反応後のplateは、Micro plate readerにて450nmの吸光度を測定した。

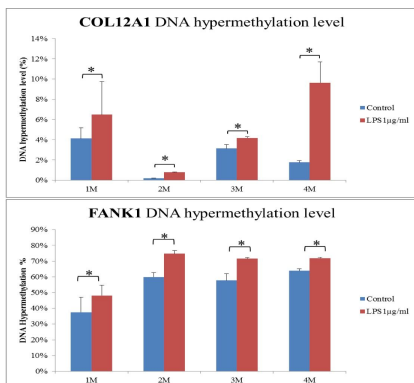
4. 研究成果

(1) DNAメチレーションアレイ解析

P.gingivalis由来LPSを、ヒト歯肉由来線維芽細胞に1ヶ月作用させDNAを解析したところ、I(XII)collagen(XII-collagen)のプロモーター領域の9箇所、FANK1(FN)では7箇所のCpG DNA高メチル化領域が確認された。

(2) MSP法によるXII-collagenおよびFNのプロモーター領域のDNAメチル化解析

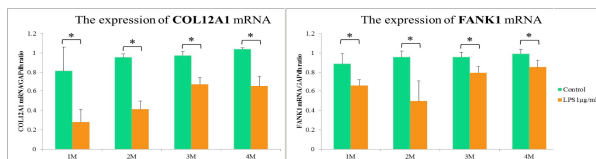
ヒト歯肉由来線維芽細胞にLPS長期刺激(1~4ヶ月間)を与え、メチル化特異的PCRである定量的MSP法でもDNA高メチル化が確認され、メチレーションアレイデータと再現性のある結果が得られた。



(3) 定量的 real-time PCR法によるXII-collagenおよびFNの長期培養によるmRNA発現解析

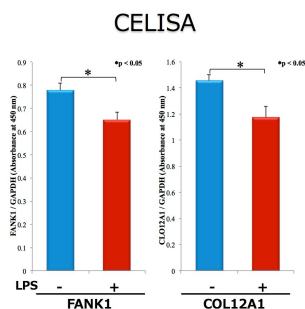
高メチル化のみられた両遺伝子XII-collagenとFANK1は、RT-PCRにより有意なmRNA発現減少を認め、この現象にはDNAメチル化が関与していることが考えられた。

さらに、XII-collagenやFN以外の細胞外基質タンパク (ECM) 関連の7遺伝子のmRNA発現においてもDNA高メチル化が起こっており、ECM関連遺伝子が歯肉線維芽細胞のエピジェネティクスに強く影響していることが考えられた。



(4) XII-collagenおよびFNの長期培養1ヶ月の蛋白発現変化

ECM関連遺伝子とDNAメチル化の関連性についてCELISA法によるタンパク質解析で、XII-collagenとFANK1の有意な発現減少が認められた。さらに、これらのmRNA及び蛋白発現の減少は、脱メチル化剤5-Azaにより発現回復を認めた。



これらのことから、P.gingivalis由来LPSの長期刺激はDNAメチル化と強く関連しており、歯周疾患の発症や増悪にエピジェネティクス修飾が影響していることが示唆された。

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3件)

Bhoj Raj Adhikari, Osamu Uehara, Hirofumi Matsuoka, Rie Takai, Fumiya

Harada, Masafumi Utsunomiya, Takatoshi Chujo, Tetsuro Morikawa, Mamata Shakya, Koki Yoshida, Jun Sato, Toshiya Arakawa, Michiko Nishimura, Hiroki Nagayasu, Itsuo Chiba, Yoshihiro Abiko. Immunohistochemical evaluation of Klotho and DNA methyltransferase 3a in oral squamous cell carcinomas. Med Mol Morphol. 査読有, 2017, doi:10.1007/s00795-017-0156-9.

[Epub ahead of print]

Takai R, Uehara O, Harada F, Utsunomiya M, Chujo T, Yoshida K, Sato J, Nishimura M, Chiba I, Abiko Y. **DNA hypermethylation of extracellular matrix-related genes in human periodontal fibroblasts induced by stimulation for a prolonged period with lipopolysaccharide derived from Porphyromonas gingivalis.** J Periodontol Res. 査読有, 2016, Aug;51(4):

508-17. doi:10.1111/jre.12330

高井理衣, 原田文也, 森川哲郎, Bhoj Raj Adhikari, 伊藤-小原純, 中條貴俊, 宇津宮雅史, 植原 治, 吉田光希, 佐藤 惇, 西村学子, 千葉逸朗, 安彦善裕. Porphyromonas gingivalis 由来 Lipopolysaccharide 長期刺激によるヒト歯根膜線維芽細胞における老化抑制伝子の DNA メチル化解析. 北海道医療大学雑誌, 査読有, 34(2), 2015, 17-22

[学会発表](計5件)

M. Nishimura, F. Harada, O. Uehara, T. Morikawa, R. Takai, K. Yoshida, J. Sato, I. Chiba, Y. Abiko. Effects of

Administration of LPS Derived From P. gingivalis on Kidney Gene-expression in Mice. 95th IADR, March 22-25, 2017, San Francisco, USA.

R. Takai, O. Uehara, T. Morikawa, F. Harada, K. Yoshida, J. Sato, M. Nishimura, I. Chiba, Y. Abiko, T. Ohta. Polyamines Remove DNA Methylation of COL15A1 Caused by LPS. 95th IADR, March 22-25, 2017, San Francisco, USA.

Bhoj Raj Adhikari, Hirofumi Matsuoka, Fumiya Harada, Takatoshi Chujo, Tetsuro Morikawa, Puja Neopane, Osamu Uehara, Koki Yoshida, Michiko Nishimura, Itsuo Chiba, Yoshihiro Abiko. Epigenetic silencing of anti-aging gene Klotho may lead to hypermethylation of DNMT3a in oral cancer: Immunohistochemical analysis. 第35回北海道医療大学歯学会・学術大会, 2017年3月4日, 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス, 北海道, 札幌市.

高井理衣, 原田文也, 宇津宮雅史, 中條貴俊, 植原 治, 吉田光希, 佐藤 惇, 西村学子, 千葉逸朗, 安彦善裕. P. gingivalis 由来 LPS 長期刺激による歯根膜線維芽細胞における細胞外基質タンパク関連遺伝子の高メチル化. 第26回日本臨床口腔病理学会学総会, 2015年7月29-31日, 北海道大学学術交流会館, 北海道, 札幌市.

西村学子, 高井理衣, 植原 治, 原田文也, 宇津宮雅史, 中條貴俊, 吉田光希, 佐藤 惇, 安彦善裕. LPS 長期刺激によるヒト歯肉線維芽細胞での fibronectin と XII-collagen の DNA メチル化について. 第104回日本病理学会学総会, 2015年4月30日-5月2日, 名

古屋国際会議場，愛知県，名古屋市．

6．研究組織

(1)研究代表者

西村 学子 (NISHIMURA, Michiko)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：10337040

(2)研究分担者

太田 亨 (OHTA, Tohru)

北海道医療大学・個体差健康科学研究所・

教授

研究者番号：10223835

荒川 俊哉 (ARAKAWA, Toshiya)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：40306254

古市 保志 (FURUICH, Yasushi)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：80305143

安彦 善裕 (ABIKO, Yoshihiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：90260819