

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462852

研究課題名(和文) シェーグレン症候群の唾液腺炎におけるエピジェネティック修飾の網羅的探索

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of epigenetics in the sialadenitis from Sjogren's syndrome

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シェーグレン症候群を研究対象とし、遺伝子の網羅的解析を行い、唾液腺炎関連遺伝子について探索を行い、シェーグレン症候群におけるエピジェネティクス機構を明らかにすることを目的とした。

網羅的解析で高メチル化のみられた遺伝子のうち、上皮接着関連分子であるE-cadherin、 β -cateninおよびDNA修復遺伝子であるMGMTに絞って検討した結果、これらの遺伝子における高メチル化がシェーグレン症候群の発症に関与していることが示唆された。また、これらの高メチル化がシェーグレン症候群における治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed Genome-wide analysis of epigenetics in the sialadenitis from Sjogren's syndrome. The hypermethylations of E-cadherin and β -catenin; epithelium adhesion connection genes and MGMT; DNA repair enzyme gene were analyzed. The hypermethylation of E-cadherin, β -catenin and MGMT may be involved in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. The hypermethylations of these genes may be therapeutic target for Sjogren's syndrome.

研究分野：口腔病理学

キーワード：シェーグレン症候群 エピジェネティクス DNAメチル化

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始めとした内因と、環境因子のような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に、エピジェネティクスがある。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、これまで発がんに関わる研究について行われてきたが、最近になり、糖尿病、アレルギー疾患、自己免疫疾患、精神疾患などの発症への関与も指摘されてきている。

口腔領域では、これまで口腔がんのエピジェネティックな修飾について報告はあるものの、他の口腔疾患についての報告はほとんどみられない。シェーグレン症候群の以外の基盤にある自己免疫疾患ではエピジェネティック修飾を探索することの臨床的意義について議論されてきており、シェーグレン症候群の唾液腺炎の発症・進行にもエピジェネティックな修飾が関与しているものと考えられるが、その詳細については全く明らかとなっていない。近年、エピジェネティック修飾は治療のターゲットともなっていることから、難治性疾患の新たな治療ターゲットとしての期待が大きい。

そこで、本研究では、口腔の難治性疾患であるシェーグレン症候群での唾液腺炎に関わるエピジェネティック修飾を解明することを目的とする。特に、エピジェネティックをターゲットとした治療への応用も考慮し、DNAメチル化修飾を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、シェーグレン症候群の唾液腺炎を研究対象とし、同疾患の生検標本のパラフィンブロックから、DNAを抽出して、網羅的DNAメチル化プロファイル解析を行う。

解析したデータの再現性を確認し、シェーグレン症候群症例について、ターゲットとなったエピジェネティクスについてゲノム網羅的に探索を行い、シェーグレン症候群の唾液腺炎で高頻度にみられるエピジェネティック修飾(DNAメチル化)を明らかにする。

3. 研究の方法

DNAメチル化プロファイル解析

(1) DNA抽出

シェーグレン症候群の材料 10 サンプルとコントロール材料 10 サンプルそれぞれからDNAを抽出する。シェーグレン症候群 10 サンプルを混合して1つのサンプルとし、同様に、コントロール 10 サンプルも混合して1サンプルとした。パラフィン切片はEpiTect Plus FFPE Lysis kit® (Qiagen) を用い、PCR Thermal Cycler (TaKaRa Bio) にて切片を溶解しクロスリンクされたDNAを抽出した。

(2) DNAメチレーションアレイ

網羅的DNAメチル化プロファイル解析は、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をハイブリダイズ、DNA Microarray Scanner (Agilent technology) にて検出、解析ソフトを用いて解析を行った。

(3) マイクロアレイの結果の信頼性・再現性の確認

Bisulfite 処理

マイクロアレイによって絞られたターゲット遺伝子の信頼性を確認するために、シェーグレン症候群とコントロール群からのそれぞれのDNAサンプルを用いて行った。抽出したDNAを500 ng/μlの濃度になるように調整し、EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit® (Qiagen) を用いて、Bisulfite 処理を施した。

Methylation Specific PCR (MSP) プライマーの設計

DNAメチル化レベルを検討するため、E-cadherin、 β -catenin およびMGMTのプロモーター領域における高メチル化領域のCpG配列部位に焦点を絞り Bisulfite 処理後のDNAに対応したMethylation Specific PCR (MSP) プライマーを用いた。すなわち、GenBank からプロモーター領域の塩基配列を検索し、その領域をPeking Union Medical College Hospital Chinese Academy of Medical Sciences のMethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) を用いて Bisulfite 変換後の配列を検索し、MSP プライマーを設計した。

定量的MSP法

Bisulfite 処理したDNA、MSP プライマー、反応検出試薬であるSYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, California, USA) を用いて、SYBR Green 法による定量的MSP法でメチル化発現解析を行った。MSP法には7500 Real-time System (Applied Biosystems) を用い、反応溶液総量を25 μl/tube とし Bisulfite 処理DNAを1.0 μl、プライマー溶液を各々1.0 μl、PCR Master Mix 12.5 μl とした。PCR条件は50℃ 2分、95℃ 10分で反応後、95℃ 15秒 プライマー毎にアニーリング温度を56℃ から60℃ で1分に設定し45サイクル施行した。

得られた結果からCT値を算出し、その値を定量値に変換しメチル化のレベルの算出を次の計算式で求めた(Lu L et al., 2007)。

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

統計分析処理

得られた結果は、統計ソフト IBM SPSS Statistics 20.0J および Microsoft excel 2013 を用いて分析を行った。算出されたメチル化レベル(%)はカイ二乗検定及び残差分析にて比較検討を行った。有意水準 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

DNA メチル化プロフィール解析

DNA メチル化の網羅的解析では、全遺伝子中、コントロールサンプルに比べシェーグレン症候群サンプルにおいて4倍以上の高メチル化がみられたのは12,918 プロンプであった。その中で、上皮接着関連分子である E-cadherin、 β -catenin および DNA 修復遺伝子である MGMT をターゲットとし、これらの遺伝子上のプロモーター領域における DNA のメチル化の程度を検討した。

カイ二乗検定に残差分析を行った結果、E-cadherin ではシェーグレン症候群において1%以上のメチル化が有意に多く認められた(図1)。 β -catenin ではシェーグレン症候群において10%以上のメチル化が有意に多く認められた。MGMT ではシェーグレン症候群において10%以上のメチル化が有意に多く認められた。

以上の結果より、E-cadherin、 β -catenin および MGMT の高メチル化がシェーグレン症候群の発症に関与していることが示唆された。また、これらの遺伝子の高メチル化がシェーグレン症候群における予後診断への応用や、治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

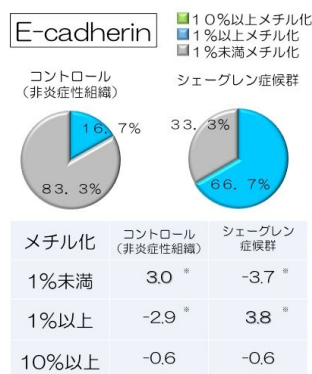


図1. E-cadherinにおけるメチル化程度の解析(* $p < 0.01$)

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)

[学会発表](計6件)

吉田光希、宇津宮雅史、原田文也、中條貴俊、高井理衣、佐藤 惇、松岡紘史、西村学子、千葉逸朗、安彦善裕、舌痛症を伴ったシェーグレン症候群患者の一治療経験例、第29回日本歯科心身医学会総会・学術大会、

2014年7月26~27日、神奈川歯科大学付属横浜クリニック(神奈川県横浜市)

中條貴俊、原田文也、宇津宮雅史、高井理衣、吉田光希、佐藤 惇、西村学子、橋本和彦、井上孝、安彦善裕、口腔扁平苔癬における上皮性接着関連遺伝子のDNAメチル化、第24回日本口腔内科学会・総会、2014年9月20日、九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)

松岡紘史、安彦善裕、坂野雄二、齋藤正人、齋藤一郎、千葉逸朗、ドライマウス患者のQOLにストレス対処が及ぼす影響、第24回日本口腔内科学会・総会、2014年9月20日、九州大学医学部百年講堂(福岡県福岡市)

中條貴俊、Bhoj Raj Adhikari、原田文也、宇津宮雅史、高井理衣、吉田光希、西村学子、橋本和彦、井上 孝、安彦善裕、口腔扁平苔癬におけるDNAメチル化解析、第26回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2015年7月29~31日、北海道大学学術交流会館(北海道札幌市)

中條貴俊、Bhoj Raj Adhikari、原田文也、宇津宮雅史、高井理衣、吉田光希、佐藤 惇、西村学子、橋本和彦、松坂賢一、井上 孝、安彦善裕、口腔扁平苔癬における上皮接着関連遺伝子、p16 および MGMT の DNA メチル化解析、第25回日本口腔内科学会学術大会、2015年9月18~19日、大阪大学(吹田キャンパス)コンベンションセンター(大阪府吹田市)

Takatoshi Chujo, Bhoj Raj Adhikari, Tetsuro Morikawa, Fumiya Harada, Koki Yoshida, Jun Sato, Michiko Nishimura, Kenichi Matsuzaka, Takashi Inoue, Yoshihiro Abiko, High frequency of DNA hypermethylation in lichen planus. The 93st General Session & Exhibition of the IADR, 2016年6月22~25日、ソウル(韓国)

[その他]
ホームページ等

北海道医療大学歯学部生態機能・病態学系臨床口腔病理学分野ホームページ

<http://www3.hoku-iryo-u.ac.jp/courses/2/013/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(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

田隈 泰信 (TAKUMA, Taishin)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：40095336

齊藤 正人 (SAITOH, Masato)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：50337036

齋藤 一郎 (SAITO, Ichiro)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：60147634