

〔原著〕

## *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関連遺伝子のDNAメチル化解析

高井 理衣<sup>1)</sup>, 原田 文也<sup>1)</sup>, 森川 哲郎<sup>1)</sup>, Bhoj Raj Adhikari<sup>1)</sup>, 伊藤 - 小原 純<sup>1)</sup>, 中條 貴俊<sup>1)</sup>,  
宇津宮 雅史<sup>1)</sup>, 植原 治<sup>2)</sup>, 吉田 光希<sup>1)</sup>, 佐藤 惇<sup>1)</sup>, 西村 学子<sup>1)</sup>, 千葉 逸朗<sup>2)</sup>, 安彦 善裕<sup>1)</sup>

1) 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  
2) 北海道医療大学 歯学部 口腔構造・機能発育学系 保健衛生学分野

### DNA methylation analysis of Anti-aging related genes in Human Periodontal Ligament Fibroblasts by long-term stimulus of Lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis*

Rie TAKAI<sup>1)</sup>, Fumiya HARADA<sup>1)</sup>, Tetsuro MORIKAWA<sup>1)</sup>, Bhoj Raj ADHIKARI<sup>1)</sup>, Jun ITOH-OBARA<sup>1)</sup>,  
Masafumi UTSUNOMIYA<sup>1)</sup>, Osamu UEHARA<sup>2)</sup>, Koki YOSHIDA<sup>1)</sup>, Jun SATO<sup>1)</sup>, Michiko NISHIMURA<sup>1)</sup>,  
Itsuo CHIBA<sup>2)</sup>, Yoshihiro ABIKO<sup>1)</sup>

1) Division of Oral Medicine and Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido  
2) Division of Disease Control and Molecular Epidemiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

**Key words** : DNA methylation, *Porphyromonas gingivalis*, Lipopolysaccharide, Human periodontal ligament fibroblasts, Periodontal disease

#### Abstract

**Objectives** : Details of how DNA methylation is involved in periodontal disease are not fully understood. Lipopolysaccharide (LPS) derived from *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) is involved in the progress of periodontal diseases, and we have recently developed an in vitro model of LPS infection in human periodontal fibroblast cells (HPdLFs) for 1 month. In this study, we examined DNA methylation in HPdLFs stimulated with LPS derived from *P. gingivalis* for 1 month. We investigated the hypermethylation of Aging-related genes and examined whether hypermethylation affect their transcription levels.

**Methods** : The HPdLFs were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum. The culture was repeated, alternating 3 days with LPS derived from *P. gingivalis* and 3 days without LPS for 1 month. Untreated samples were used as

controls. The DNA was analyzed using human CpG island microarrays. A quantitative methylation-specific polymerase chain reaction was carried out to confirm the reproducibility of the microarray data. The expression levels of mRNA of the selected Aging-related genes from the data were analyzed by quantitative RT-PCR.

**Results** : We identified 4 Aging-related genes with hypermethylation at the CpG islands of the promoter region that exhibited 4-fold hypermethylation over the controls. Among these genes, the hypermethylation of the Klotho gene induced a significantly downregulated expression of the mRNA.

**Conclusions** : These results indicate that LPS derived from *P. gingivalis* may cause DNA hypermethylation of the Klotho gene followed by a downregulated expression of the transcriptional level.

#### 緒 論

歯周炎の発症, 進行には, 細菌感染を始めとする外的要因以外に, 老化や全身疾患, ホルモン, 遺伝的な素因

などの内的な要因も大きく関わっていると言われている(吉江ら, 2013). 最近になり, 外的要因が遺伝子の表現様式を変化させるエピジェネティクスが, 歯周炎の発症, 進行に関与していることが報告されてきている

(Larsson L et al., 2014 ; Barros SP & Offenbacher S, 2014).

エピジェネティクスとは、DNA塩基配列の変異を伴わず、遺伝子の化学的修飾によって発現を変化させ、遺伝子機能を後天的に制御する現象であり、DNAメチル化やヒストン修飾、クロマチン構造の形成、リモデリングなどが知られている (Eggar G et al., 2004). 中でもDNAのメチル化は、一旦、変化が及ぼされると遺伝子機能に長期的な影響を与える可能性があり、疾患の発症、進行に深く関わるとされている (Eggar G et al., 2004). 特に、プロモーター領域の高メチル化は、転写因子の結合を阻害し、遺伝子発現を強く抑制されることから、がん抑制遺伝子のプロモーター領域の高メチル化と発がんとの関係について広く研究が行われてきた (Baylin SB & Jones PA, 2011 ; Dawson MA & Kouzarides T, 2012). 近年、この領域の研究が糖尿病、肥満、アレルギー、自己免疫疾患、精神神経疾患などのがん以外の疾患へと広がりを見せている (Abiko Y et al., 2014). 口腔領域でも、口腔がんや前癌病変の発症、進行への関与について、報告がなされてきており、最近になり歯周病にもエピジェネティクスが関与するという報告がみられるが、その詳細は未だ不明な点が多い (Larsson L et al., 2014 ; Barros SP & Offenbacher S, 2014). 歯周炎の際に形成される歯周ポケットには、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を代表とする多くのグラム陰性菌が存在している。それらの細胞壁外膜には、Lipopolysaccharide (LPS) が存在し、生体に対して多様な生物活性を発現させ、歯周炎の病態を形成、進行させる一因になっていると言われている (Ding PH & Jin LJ, 2014). LPSを用いた研究の多くは、数時間や2, 3日程度の刺激によるものであり、DNAのメチル化に変化を及ぼすものとは考えにくい。そこで、最近我々は、*P. gingivalis*由来LPS長期刺激によりDNAのメチル化に変化を及ぼす新たな実験モデルを確立した (Takai et al., 2015).

本研究では、同実験モデルを用いて、*P. gingivalis*由来のLPSで長期間刺激した際のヒト歯根膜線維芽細胞における老化関連遺伝子のDNA高メチル化の解析を行った。

## 方 法

### 1. 細胞培養

ヒト歯根膜線維芽細胞HPdLFs (LONZA) を10% Fetal bovine serum (FBS, Sigma) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) にて24時間培養後、

DMEMに *P. gingivalis* (ATCC33277) 由来LPS (WAKO, 1 µg/ml) を添加したものと非添加したもので3日間ずつ交互に交換し、1ヶ月間培養したものをを用いた。また、コントロールにはLPSの代わりに滅菌水を添加し、同期間培養したものをを用いた。

### 2. メチレーションアレイ解析

培養した細胞からQiagen<sup>®</sup> DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いてDNAを抽出した。その後DNAを超音波処理により断片化、精製した後、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。得られたアレイ解析結果から、老化に関連する遺伝子のプロモーター領域に位置し、なおかつメチル化レベルが4倍以上を示すものを選出した。

### 3. mRNA発現解析

培養細胞よりTRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) にてtotal RNAを抽出した後、濃度を2 µg/µlになるよう調整し、逆転写を行った (SuperScript reverse transcriptase, Invitrogen)。得られたcDNAを用いて、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法を用いた定量的real-time PCR (SYBR<sup>®</sup> Green, Applied Biosystems) およびRT-PCR (KAPA) により、mRNA発現解析を行った。

### 4. MSP解析

DNAメチル化の変化の再現性を確認するため、培養した細胞からQiagen<sup>®</sup> DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出し、Qiagen<sup>®</sup> Epiect Bisulfite Kit (Qiagen) を用いてBisulfite処理を行った。その後、Methylation-Specific PCR (SYBR<sup>®</sup> Green) にてメチル化レベル解析を行った。

表1 mRNA発現解析に用いたプライマー配列

Name	Sequences	Size
TBX2-F	5'-CATCCGAAGGTGTCTCTGGT-3'	159bp
TBX2-R	5'-CCAGTTTTATCACGCGGTCT-3'	
KL-F	5'-AGGGTCCTAGGCTGGAATGT-3'	158bp
KL-R	5'-CCTCAGGGACACAGGGTTTA-3'	
TBX3-F	5'-AAGACCTAGGGGCTGGAGAG-3'	196bp
TBX3-R	5'-GGCGAAAAATCAGCAAACAT-3'	
NPM1-F	5'-TTGTTGAAGCAGAGGCAATG-3'	158bp
NPM3-R	5'-AATATGCACTGGCCCTGAAC-3'	

表2 MSP解析に用いたプライマー配列

Name	Sequences	Size
KL-Methyl-F	5'-ACAAAACATTTTCATAAACTCA-3'	169bp
KL-Methyl-R	5'-AAAACGTTTCGTAAACGCTC-3'	
KL-Unmethyl-F	5'-GAGAGTAGGTGTTTTTTAGTGGT-3'	169bp
KL-Unmethyl-R	5'-AGTAGGTGTTTTTTAGCGGC-3'	

5. タンパク質発現解析

タンパク質の発現は、CELISA法にて解析した。コントロール群、LPS刺激群の培養細胞を0.05%トリプシン溶液 (gibco) 処理にて回収後、96 well plateに  $3 \times 10^4$  個/ml再度播種し、24時間培養した。その後、In Cell ELISA Kit (Cosmo Bio), Klotho抗体 (PEPROTECH) にて処理を行い、Bio-Rad® Model 680 Microplate Reader (Bio Rad) を用いて450nmの吸光度を測定、タンパク質発現量を解析した。

6. 5-AzaによるDNA脱メチル化解析

LPS刺激を加えた細胞群に、脱メチル化させるため100µM濃度の5-Aza-deoxycytidineを加え24時間処理を行った (Uehara et al., 2014)。その後、方法3と同様にtotal RNAを抽出し、逆転写後、脱メチル化処理前後のmRNA発現を比較した。また、方法5と同様にCELISA法を用いてタンパク質発現解析を行った。

7. 統計

得られた結果はすべて、IBM SPSS Statistics 20 (IBM) を用いたMann-Whitney U検定にて比較・検討した ( $P < 0.05$ )。

結果

1. メチレーションアレイ解析

メチレーションアレイの結果から、プロモーター領域で4倍以上の高メチル化がみられたものの中で老化抑制に関連する遺伝子を検索すると、T-box 2 (TBX 2), Klotho (KL), T-box 3 (TBX 3), Nucleophosmin 1

表3 アレイ解析結果より選出された老化抑制関連遺伝子

Normalized ratio	Gene Symbol	Description	Position
29.0	TBX2	T-box2	-3874
21.29	KL	Klotho	-460
10.02	TBX3	T-box3	-3079
8.15	NPM1	Nucleophosmin 1	-132

(NPM 1) の4遺伝子が見出された (表3)。

2. mRNA発現解析

アレイ解析により高メチル化のみられた老化抑制関連遺伝子について、mRNA発現解析を行ったところ、KLのみLPS長期刺激により有意な発現低下が認められた ( $P < 0.05$ , 図1)。

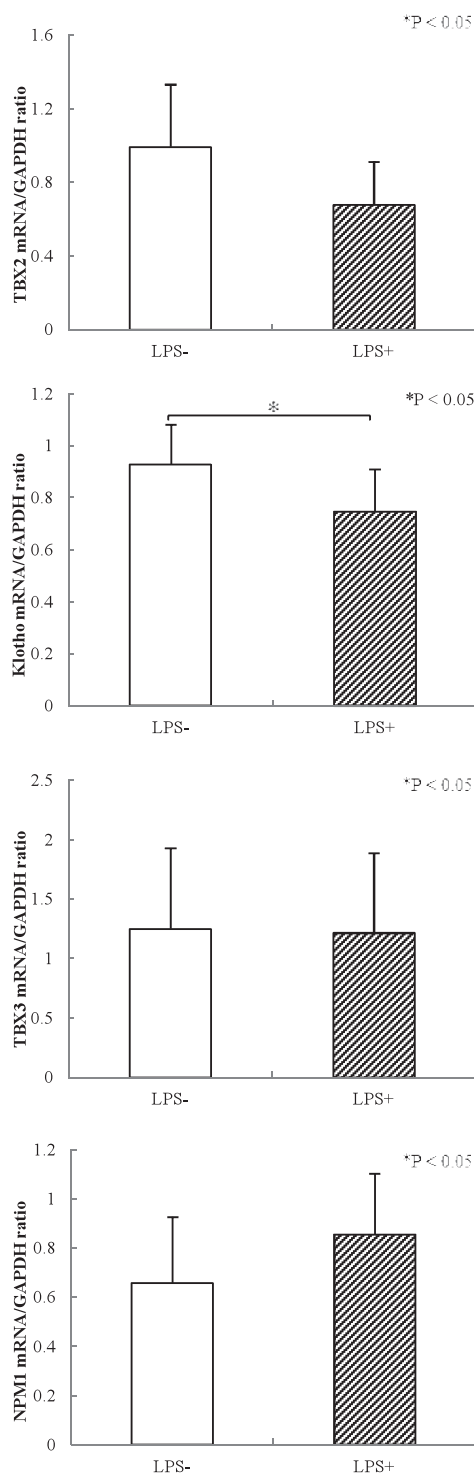


図1 定量的Real-Time RT PCR法による老化抑制関連遺伝子のmRNA発現解析

### 3. メチル化レベル解析

MSP法において、mRNA発現低下のみられたKLにおけるDNA高メチル化の再現性を確認したところ、コントロール群と比較してLPS長期刺激群ではメチル化レベルの有意な上昇が確認された ( $P < 0.05$ , 図2)。

### 4. タンパク質発現解析

mRNA発現に差があってもタンパク質発現と一致しない場合も考えられるため、CELISA法によるタンパク質発現解析を行ったところ、KLはLPS長期刺激により有意な発現低下が認められた ( $P < 0.05$ , 図3)。

### 5. 脱メチル化解析

5-Aza-deoxycytidineにより脱メチル化処理を加えたところ、LPS長期刺激群と比較してmRNA発現に有意な回復が認められた ( $P < 0.05$ , 図4)。また、LPS刺激後に5-Aza-deoxycytidineにより脱メチル化処理を加えた群ではコントロール群と同等のタンパク質発現がみられた (図3)。

## 考 察

本研究では、歯根膜由来線維芽細胞を *P. gingivalis* 由来のLPSで長期刺激をすることによって、老化抑制関連遺伝子であるKlothoが高メチル化し、そのmRNAとタンパクレベルの発現が低下することを明らかにした。歯

周病原菌がKlotho遺伝子を介した歯周組織の老化促進に関与していることが示唆された。

Klothoは、生体内で老化を抑制する働きを持つとされるタンパク質をコードする遺伝子である。主として腎尿管、パラトルモンを発現している副甲状腺の主細胞、脳脈絡膜などに発現し、欠損マウスでは短命であることから老化抑制遺伝子の一つとされてきた (Bian A et al., 2015; Sopjani M et al., 2015)。KlothoはFGF19ファミリーの一つであるFGF23とFGFR 4の結合を触媒し、生体内もしくは組織でのカルシウム (Ca) 代謝を調整する働きを持つとされており、発現が低下すると、カルシウム沈着による動脈硬化を引き起こすことが示唆されている。歯周病が動脈硬化のリスクとなることが知られており、本研究から歯周病原菌によるKlotho遺伝子の高メチル化とそれに伴う発現低下がその一因と推測されるが、このことを実証するためには、更なる研究が必要である。

最近我々は、歯根膜由来線維芽細胞の細胞外マトリックス関連遺伝子のいくつかにDNA高メチル化が起これ、遺伝子発現が低下することを報告した (Takai et al., 2015)。その一つのType XIIコラーゲンはメカニカルストレスにより発現が上昇し (Uno et al., 2001)、Type Iコラーゲンを保護する働きのあることが示されており (Nemoto et al., 2010)、この発現の低下は歯周組織の脆弱化につながるものと考えられている。Type XIIコラーゲンは、老化により発現の低下することが報告されている (山羽, 2010)。本研究でのLPSによるKlotho遺伝子の発現低下と、先に報告したType XIIコラーゲンの発現低下は、いずれも歯周病原菌が歯周組織局所の老化を促進するという考えに一致している。老化が歯周炎のリスク因子となることは広く知られているが、歯周病原菌が歯周組織の老化を促進するという新たな概念を提唱するものと考えられた。

5-Aza-deoxycytidineによる脱メチル化処理にて

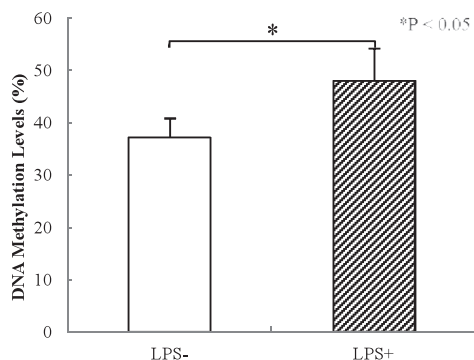


図2 MSP法によるKlotho遺伝子のDNAメチル化レベル解析

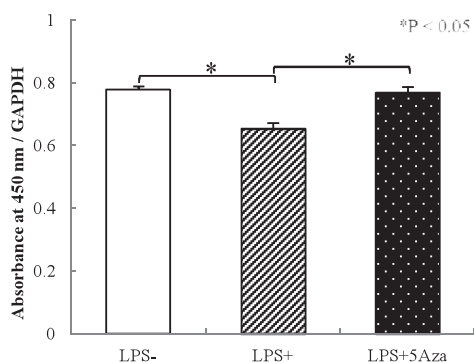


図3 CELISA法によるKlothoタンパク発現解析

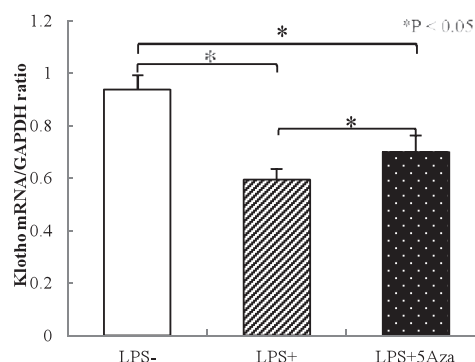


図4 脱メチル化処理によるKlotho遺伝子のmRNA発現解析

mRNAおよびタンパク質発現に回復が認められた。5-Aza-deoxycytidineは、DNAメチル基転移酵素 (DNMT) を阻害することにより脱メチル化を起こす薬剤であり、日本では骨髄異形成症候群に対するエピゲノム薬として2011年に承認されている (Ishikawa, 2014)。さらに、正常肺細胞のCpG islandではメチル化はみられないのに対し、肺癌では異常な高メチル化が起こることでKlothoの発現が低下するという報告がある (Rubinek et al., 2011)。正常な肺細胞と肺癌細胞に対し5-Aza-deoxycytidine処理を行うと、肺癌細胞は脱メチル化されKlotho mRNA発現が回復し、正常な肺細胞にはほとんど影響はみられなかったと報告されている (Rubinek et al., 2011)。5-Aza-deoxycytidineは、日本では腫瘍に対する治療薬として承認されて間もないが、今後歯周治療に対しての局所応用にも期待できる。

## 結 論

ヒト歯根膜線維芽細胞において歯周病原性細菌である *P. gingivalis* 由来のLPSで長期間刺激を加えたところ、老化に関連するKlotho遺伝子のプロモーター領域CpG islandsにDNA高メチル化を引き起こし、遺伝子発現およびタンパク質の発現を低下させた。これらの発現低下が歯周組織の老化を促進し、歯周疾患の発症、進行に影響を及ぼすことが示唆された。

## 謝 辞

本研究は、平成26年度北海道医療大学歯学会奨励研究金 (研究テーマ: LPS長期刺激による歯根膜線維芽細胞での老化関連遺伝子のDNAメチル化解析) の助成を受けて実施した。

## 文 献

- Abiko Y, Uehara O, Fukumoto S, Ohta T. Epigenetics of oral infection and inflammatory diseases – DNA methylation changes in infections and inflammation diseases. *J Oral Biosci* 56 : 105–109, 2014.
- Barros SP, Offenbacher S. Modifiable risk factors in periodontal disease : epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response. *Periodontol* 2000 64 : 95–110, 2014.
- Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11 : 726–734, 2011.
- Bian A, Neyra JA, Zhan M, Hu MC. Klotho, stem cells, and aging. *Clin Interv Aging* 10 : 1233–1243, 2015.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics : from mechanism to therapy. *Cell* 150 : 12–27, 2012.
- Ding PH, Jin LJ. The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity : a revisit and its relevance to oral/periodontal health. *J Periodontol Res* 49 : 1–9, 2014.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429 : 457–463, 2004.
- Ishikawa T. Novel therapeutic strategies using hypomethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndrome. *Int J Clin Oncol* 19(1) : 10–15, 2014.
- Larsson L, Castilho RM, Giannobile WV. Epigenetics and its Role in Periodontal Diseases – A State-of-the-Art Review. *J Periodontol* 86(4) : 556–568, 2015 Apr.
- Nemoto T, Kajiya H, Tsuzuki T, Takahashi Y, Okabe K. Differential induction of collagens by mechanical stress in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Bio* 55 : 981–987, 2010.
- Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundeleovich A, Evron E, Gal-Yam EN, Kaufman B, Wolf I. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 133(2) : 649–657, 2012
- Sopjani M, Rinnerthaler M, Kruja J, Dermaku-Sopjani M. Intracellular signaling of the aging suppressor protein Klotho. *Curr Mol Med* 15(1) : 27–37, 2015.
- Takai R, Uehara O, Harada F, Utsunomiya M, Chujo T, Yoshida K, Sato J, Nishimura M, Chiba I, Abiko Y. *J Periodontol Res*, in press.
- Uehara O, Abiko Y, Saitoh M, Miyakawa H, Nakazawa F. Lipopolysaccharide extracted from *Porphyromonas gingivalis* induces DNA hypermethylation of runt-related transcription factor 2 in human periodontal fibroblasts. *J Microbiol Immunol Infect* 47(3) : 176–181, 2014.
- Uno K, Abiko Y, Takita H, Ukegawa T, Satoh N, Ueda Y, Ohata N, Kaku T, Kuboki Y. Effects of mechanical stress on the expression of type XII collagen mRNA in human periodontal ligament cells. *J Hard Tissue Biol* 10 : 116–122, 2001.
- 山羽宏行. コラーゲン線維束構築におけるXII型コラーゲン機能と加齢変化. *FRAGRANCE JOURNAL* 1 : 41–46, 2010.
- 吉江弘正・伊藤公一・村上伸也・申基喆 編. 臨床歯周病学 第2版. 医歯薬出版 : 2013, 18–22



高井 理衣

北海道医療大学大学院歯学研究科臨床口腔病理学専攻博士課程第4学年  
平成17年3月 帯広柏葉高等学校 卒業  
平成17年4月 北海道医療大学歯学部歯学科 入学  
平成23年3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業  
平成23年4月～平成24年3月 つがやす歯科医院 臨床研修歯科医  
平成24年4月 北海道医療大学大学院歯学研究科 入学  
現在に至る