

論 文 要 旨

*Porphyromonas gingivalis*由来LPS長期刺激による
ヒト歯根膜線維芽細胞におけるDNA高メチル化の網羅的解析
-細胞外マトリックス関連および老化抑制関連の遺伝子について-

平成27年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

高井 理衣

【緒言】

DNAメチル化は、エピジェネティクスの代表的な化学的修飾の一つである。エピジェネティクスとは、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、様々な生命現象や疾患に関わるとされている。最近では、歯周病の発症・進行への関与を示唆する報告もあるが、具体的な詳細は明らかにされていない。また、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) などの歯周病原性細菌に含まれるLipopolysaccharide (LPS) は歯周組織の細胞にさまざまな変化を引き起こし、歯周炎の病態を形成するといわれており、その中にエピジェネティクスの関与を示唆する報告もある。

本研究では、歯周疾患とDNAメチル化との関係を解明するため、ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDLFs) を用い、*P. gingivalis* 由来LPS長期刺激による新たな実験モデルを確立して、DNA高メチル化の網羅的解析を行った。解析結果から特に、歯周組織の維持に影響を与える細胞外マトリクスと、老化に関連する遺伝子を抽出し、DNA高メチル化と遺伝子発現の変化および脱メチル化処理による影響について検討を行った。

【方法】

1. 細胞培養

HPDLFsを *P. gingivalis* 由来LPSによって長期刺激を行う実験モデルを確立するために、LPSによるHPDLFs細胞の毒性試験を行った。HPDLFsを10%FBS含有DMEMに *P. gingivalis* 由来LPSを濃度0, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{l/ml}$ に調整し添加して、72, 144時間後にトリパンブルー染色の後、血球計算盤を用いて(生)細胞数を計測した。

2. LPS刺激下での長期細胞培養

毒性試験の結果をもとにLPSの濃度を決定し、HPDLFsをLPS添加培地で3日間、非添加培地で3日間培養することを交互に1ヶ月間培養を行った。コントロールとしてLPSの代わりに滅菌水を添加した培地を用いた。

3. メチレーションアレイ解析

細胞サンプルより、Dneasy® Blood & Tissue Kit を用いてDNAを抽出した後、超音波処理によりDNAを断片化・精製を行った。その後cytidine 5-dUTPおよびcytidine 3-dUTPにて蛍光ラベリングを行い、Human CpG islands 224k array によってハイブリダイゼーションして、DNA Microarray Scannerにて検出・解析を行った。

4. mRNA発現解析

mRNAの発現を解析する遺伝子は、マイクロアレイの解析結果から細胞外マトリクス関連遺伝子、および老化関連遺伝子のプロモーター領域に位置し、メチル化レベルが4倍以上を示

すものとした。細胞サンプルよりTRIzol®法を用いてTotal RNAを抽出し、濃度調整を行い、逆転写の後、SYBR® Greenを用いたreal-time PCR法によってmRNA発現量を定量的に解析し、 $\Delta\Delta$ CT法により算出した。

5. DNAメチル化解析

マイクロアレイによる解析結果の再現性を確認するために、mRNA発現で有意差のみられた細胞外マトリックスおよび老化に関連する遺伝子について、細胞サンプルから抽出されたDNAの濃度調整を行い、Bisulfite処理後、Methylation-Specific PCR (MSP) 法(SYBR® Green)にてメチル化解析を行った。

6. タンパク質発現解析

タンパク質の発現量は、Cellular Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(CELISA)法により解析した。細胞サンプルを0.05%トリプシン溶液にて処理し回収後、 3×10^4 個/mlの濃度に調整し96 well plate内で再度培養を行った。24時間培養の後、In Cell ELISA Kitを用いてCELISA法を行った。一次抗体としてMouse anti-GAPDH Antibody (In Cell ELISA Kit), Fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1 (FANK1) Antibody, Collagen type XII alpha 1 (COL12A1) Antibody, Human Klotho (KL) Antibodyを用い、二次抗体にはHRP-Conjugated Anti-Mouse IgG Antibodyを用いて反応を行い、Bio-Rad® Model 680 Microplate Readerにて450nmの吸光度を測定した。

7. 脱メチル化解析

LPS刺激を加えた細胞群に、100 μ M濃度の5-Aza-deoxycytidine (5-Aza)を加え24時間処理を行った。その後、TRIzol®法にてtotal RNAを抽出し、方法4に準じて脱メチル化処理前後の細胞外マトリックスおよび老化に関連する遺伝子のmRNA発現を比較した。

8. 統計

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

【結果および考察】

細胞毒性試験では、LPS濃度10, 100 μ l/mlで72, 144時間ともに細胞数の有意な減少がみられたものの、1 μ l/mlでは細胞数の減少がみられなかった。そこで、LPS濃度1 μ l/mlで3日間、非添加培地で3日間培養することを交互に1ヶ月間培養を行った。この培養条件で明らかな細胞死や形態的变化は認められず、メチル化の網羅的解析を行うための細胞サンプルとして有効な結果が得られた。

メチレーションアレイによる解析で、全遺伝子中、4倍以上の高メチル化がみられたのは12,918 プローブ (2,910遺伝子)、1/4倍以下の低メチル化がみられたのは10,330 プローブ (3,375遺伝子)であった。この解析結果から特に、歯周組織の維持に影響を与える細胞外マトリックスと、老化に関連する遺伝子で、メチル化の変化がプロモーター領域に位置するものを検索したところ、細胞外マトリックスに関連する遺伝子は25 遺伝子、老化に関連する遺伝子は4 遺伝子であった。

これらの遺伝子のmRNA発現解析を行ったところ、細胞外マトリックス関連遺伝子25遺伝子中9遺伝子Fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1 (FANK1), Collagen type IV alpha 1, 2 (COL4A1-A2), COL12A1, Collagen type XV alpha 1 (COL15A1), Laminin alpha 5 (LAMA5), Laminin beta 1 (LAMB1), Matrix metalloproteinase 25 (MMP25), Protein-O-mannosyltransferase 1 (POMT1), Elastin microfibril interfacier 3 (EMILIN3)で発現の有意な低下がみられ、これらの遺伝子はMSP解析においてもDNAメチル化レベルの有意な上昇が確認された。老化関連遺伝子では、4遺伝子中1遺伝子Klotho (KL)でmRNA発現の有意な低下がみられ、MSP法においてDNAメチル化レベルの有意な上昇が確認された。さらに、FANK1, COL12A1およびKLについて、CELISA法によりタンパク質発現量を検討したところ、いずれも有意な発現量の低下が認められた。

これら発現低下のみられた細胞外マトリックスや老化に関連する遺伝子は、歯周組織における生体恒常性の維持する機能をもつとされる。LPS長期刺激によるDNAメチル化を介した遺伝子発現の低下で、歯周組織の恒常性が崩れ、歯周疾患の発症・進行の一因につながると考えられる。

【結論】

本研究で、歯周病原性細菌 *P. gingivalis*由来のLPSを用いた細胞に対し長期にわたり継続的に刺激を加える、新たな歯周組織のDNAメチル化解析のための実験モデルを確立した。この実験モデルにより細胞外マトリックスと老化抑制関連遺伝子の中で、mRNAやタンパク質の転写活性に影響を及ぼす高メチル化DNAを同定した。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。また、これらのDNAメチル化の改善をターゲットとした新たな歯周治療に対する応用できる可能性が見出された。