

〔学位論文〕

*Porphyromonas gingivalis*のLPSによるヒト歯根膜細胞への エピジェネティックな修飾について

植原 治

北海道医療大学大学院歯学研究科口腔生物学系 微生物学分野

Lipopolysaccharide extracted from *Porphyromonas gingivalis* induces epigenetic modifications in human periodontal fibroblasts

Osamu UEHARA

Division of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

緒 言

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メチル化やヒストン修飾（アセチル化、脱アセチル化）がある。これらのエピジェネティックな遺伝子の修飾は、これまで悪性腫瘍発生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、自己免疫疾患などでの関与も指摘されてきている。歯周組織をとりまく因子として、炎症性サイトカインやコラーゲンなどのエピジェネティックな修飾が報告されはじめているが、未だ歯周炎発症におけるエピジェネティックな修飾の関与は明らかにされていない。

一方、*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作用を引き起こす。その一つに歯根膜細胞の骨芽細胞への分化能抑制作用があるが、このメカニズムの詳細については未だ不明である。

本研究では、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) を用い、LPSによるHPDLの骨分化に関係する遺伝子へのエピジェネティックな修飾の関与について検討した。

材料および方法

1. LPS, DNAメチル化阻害剤および脱アセチル化阻害剤の影響

細胞は、HPDLを用い10% FBSおよび1% Penicillin-Streptomycin含有DMEMを用いて37℃、5% CO₂の条件

下で培養した。HPDLの増殖活性は、細胞増殖試薬WST-1を用い測定した。HPDLを96ウェルプレートに播種、0.1, 1, 10μg/mlのLPSおよび1, 10, 100μMの濃度で24時間培養した。その後、DMEMにLPSおよび5 Azaを共添加し12, 24時間培養した。培養後、細胞増殖をWST-1試薬で測定した。

2. LPSおよびDNAメチル化阻害剤による骨分化マーカーmRNAの発現

実験1で得られた至適濃度の条件下で各LPS, 5Aza, LPS + 5Azaを24時間培養後、Total RNAを抽出した。定量PCRは、骨分化マーカーであるRunx-related transcription factor (RUNX2), エピジェネティックな修飾に関与しているDNA methyltransferase 1 (DNMT1), ターゲット遺伝子の発現レベルは、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をコントロール遺伝子として、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて比較した。

3. DNAメチル化の解析

DNAの精製は、LPS, 5Azaを24時間作用させたHPDLからゲノムDNAを抽出した。精製したゲノムDNAを調整し、bisulfite処理した。プライマーの設計は、RUNX2遺伝子の塩基配列から潜在的なCpGアイランドの領域を決定した後、bisulfiteによるDNAの変換パターンをシミュレーションを行い、DNAメチレーション検出プライマーの設計を行った。Real-time Methylation Specific PCR (MSP) は、SYBR GreenによるReal-time PCR法を用いた。Real-time PCRにより得られたデータからメチル化レベルと非メチル化レベルの割合 (%) を求めた。

4. ヒストン修飾解析

LPSを4時間作用させたHPDLは、1% FormaldehydeによりDNAとヒストンをクロスリンク後、ゲノムDNAの断片化を行い、Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kitを用いてクロマチン免疫沈降 (Anti H3-Acetyl) を行った。Anti H3-Acetyl抗体により免疫沈降を行った試料 (ChIP) は、5M NaClによる脱クロスリンク処理後、DNAを抽出した。得られたDNAは、ChIP-DNAとしPCRに用いた。また、抗体による免疫沈降を行っていない試料についても同様に脱クロスリンク、DNA精製を行いコントロールDNAとしてPCRに用いた (input-DNA)。RUNX2遺伝子の塩基配列 (P2 promoter 領域) から、プライマーの設計を行った。DNAメチル化解析と同様にSYBR GreenによるReal-time PCR法を用いた。結果からCt値を算出し、Input画分をコントロールとし解析した。

結果および考察

P. gingivalis のLPS刺激により、HPDLのDNAメチル化転移酵素のmRNAの発現が上昇すること、およびヒストンアセチル化抑制酵素 (HAT) のmRNAの発現が減少することから、LPSによるエピジェネティックな修飾で、HPDLの遺伝子発現に関与していることが示唆された。P300などのHAT活性の低下により、ヒストンのアセチル化が抑制され、その後にDNMTによるDNAのメチル化により、RUNX2遺伝子発現の減少につながると考えられる。また、骨芽細胞転写因子であるRUNX2遺伝子のmRNAの発現低下に伴いメチル化が増加すること、ヒストンH3のアセチル化修飾をうけたDNAでは、LPS刺激によりRUNX2遺伝子の発現が低下したことから、*P. gingivalis* のLPSがHPDLの骨分化関連遺伝子にエピジェネティックな修飾を引き起こしていることも推察された。

近年、歯周炎の糖尿病や心臓血管疾患などの全身疾患

への影響についてエビデンスが報告され始めている。歯周病原菌は環境因子であり、歯周炎の発症をはじめとする全身疾患への影響にエピジェネティクスが関わっているものと考えられる。

結 論

P. gingivalis のLPSがHPDLのRUNX2遺伝子にDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな修飾を引き起こしていることが明らかとなった。



植原 治

平成12年3月 茨城県立土浦第一高等学校 卒業
 平成14年4月 北海道医療大学歯学部 入学
 平成20年3月 北海道医療大学歯学部 卒業
 平成20年4月 北海道医療大学病院 臨床研修医
 平成25年3月 北海道医療大学大学院歯学研究課博士課程 修了
 平成25年4月 北海道医療大学歯学部口腔機能・発育学系保健衛生学分野 助教