

研究者：植原 治（所属：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）

研究題目：歯周病原菌による歯周組織のエピジェネティクス機構の解明

目的：

エピジェネティクスは、DNA塩基配列の変異を伴わず遺伝子発現が変化するもので、主にDNA高メチル化やヒストン修飾がある。近年、エピジェネティクスの歯周炎発症や進行への関与を示唆する報告はあるが、その詳細は不明である。本研究では、*P. gingivalis*由来LPSによる歯周組織のエピジェネティクスを明らかにするため、長期LPS刺激でのヒト歯根膜線維芽細胞（HPdLs）におけるDNAメチル化の網羅的解析を行った。

対象および方法：

- ・試料作成：HPdLs（LONZA）を10% FBS含有DMEMにて前培養後、DMEMに*P. g*菌由来LPS（WAKO, 1 μ g/ml）を3日おきに添加・非添加培地にて交互に、1ヶ月間培養を行った。コントロールとして、LPS非添加DMEMにて1ヶ月間培養したものを用いた。
- ・CpGメチレーションアレイ：細胞からDNAを抽出し、cytidine 5-dUTP（Cy5）およびcytidine 3-dUTP（Cy3）にてラベリング、Human CpG islands 224k arrayにDNAをハイブリダイズ、DNA Microarray Scanner（Agilent technology）にて解析した。
- ・mRNA発現解析：高メチル化のみられた上位遺伝子のうち、転写に影響を与えるものに焦点を当てさらに、細胞からRNA抽出を行い、逆転写後、リアルタイムPCR法にてmRNAの発現解析を行った。
- ・MSP解析：mRNAで発現性の差がみられたものにおいては、再現性を確認するためMSP法による定量的リアルタイムPCRを行った。

結果および考察：

CpGメチレーションアレイ結果、全遺伝子（254179116875 probe）中、2倍以上の高メチル化は30112 probe（5760 遺伝子）、1/2以下の低メチル化は25878 probe（6864 遺伝子）確認された。高メチル化がみられた遺伝子のうち、線維芽細胞および炎症に関連する重要な遺伝子20個を選出した（図1）。20遺伝子のうちCOL12A1, CRKRS, FANK1, FGF19, Klothoの5遺伝子に、mRNA発現の有意な低下がみられた（図2）。また、MSP法にてDNA高メチル化の再現性を確認した結果、いずれの遺伝子でもDNAメチル化レベルの上昇が認められた（図3）。これらのことより、HPdLsに*P. g*菌由来のLPSで長期刺激を加えると、DNAの高メチル化が起り、多くの遺伝子制御に関与していることが示唆された。

Gene bank	Gene Symbol	Ratio
NM_145235	FANK1(fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1)	63.491898
NM_020776	PCDH19(protocadherin 19)	54.824726
NM_021809	TGIF2(TGFB-induced factor homeobox 2)	34.12235
NM_199168	CXCL12(chemokine (C-X-C motif) ligand 12)	26.053122
NM_032532	FNDC1(fibronectin type III domain containing 1)	24.233826
NM_016507	CRKRS(Cdc2-related kinase, arginine/serine-rich)	22.442991
NM_004795	KL(klotho)	21.288427
NM_004969	IDE(insulin-degrading enzyme)	19.877449
NM_005226	EDG3(endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3)	19.150072
NM_007199	IRAK3(interleukin-1 receptor-associated kinase 3)	17.992823
NM_173852	KRTCAP2-TRIM46(keratinocyte associated protein 2)	17.928236
NM_004052	BNIP3(BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3)	13.653895
NM_152890	COL24A1(collagen, type XXIV, alpha 1)	13.42935
NM_005558	LAD1(ladinin 1)	13.19245
NM_014339	IL17R(interleukin 17 receptor A)	12.187029
NM_033150	COL2A1(collagen, type II, alpha 1)	11.571117
NM_005117	FGF19(fibroblast growth factor 19)	10.820207
NM_001033930	UBA52(ubiquitin A-52)	9.423913
NM_005381	NCL(nucleolin)	9.409264
NM_080645	COL12A1(collagen, type XII, alpha 1)	8.6972885

図1 高メチル化がみられた遺伝子

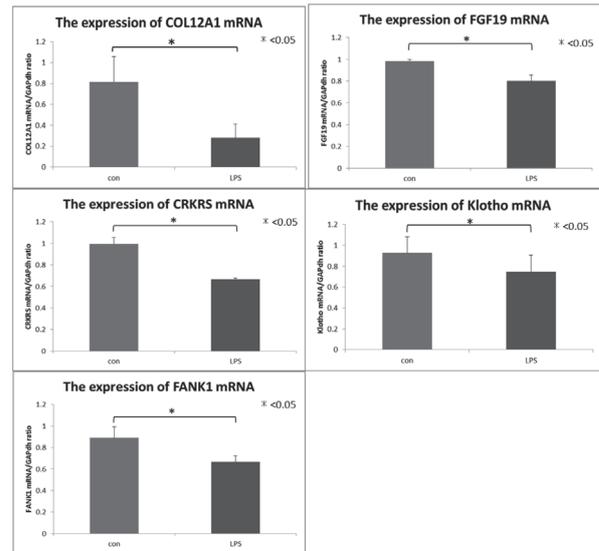


図2 mRNA 発現

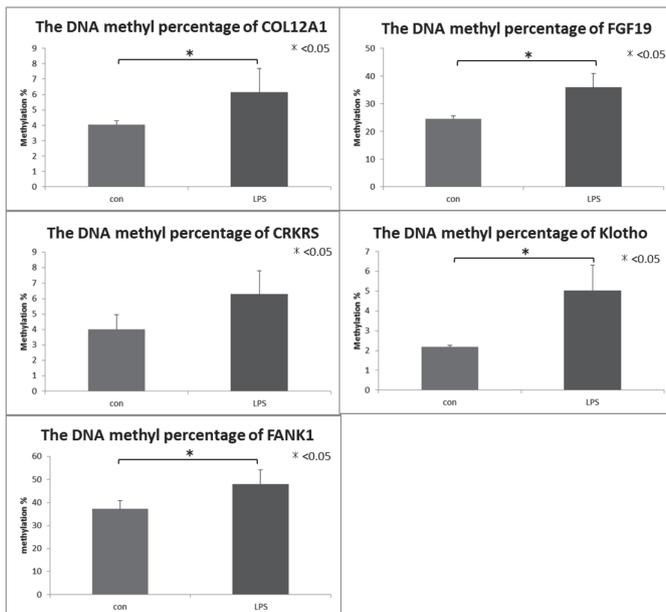


図3 DNA メチル化レベル (MSP)

成果発表：(予定を含めて口頭発表，学術雑誌など)

- ・長期 LPS 刺激されたヒト歯根膜線維芽細胞における DNA メチル化の網羅的解析，第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会，岡山，2013