

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11083

研究課題名(和文) 感染マクロファージの脂肪代謝の解析を軸にした歯周病と肥満に関する分子生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular biological analysis on periodontal disease and obesity centered on fat metabolism analysis of bacterial invaded macrophages

研究代表者

沖永 敏則 (OKINAGA, TOSHINORI)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60582773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回、ドコサヘキサエン酸(DHA)が、歯周病細菌誘導マクロファージにおいて誘導されるインフラマソーム活性やピロトーシスに及ぼす影響について検証した。THP-1細胞において、歯周病細菌侵入は、インフラマソーム活性およびピロトーシスと共に、炎症性サイトカインの細胞外分泌に關与する gasdermin Dの発現を誘導した。DHA前刺激により、歯周病細菌侵入が誘導するインフラマソーム関連因子ASCおよびgasdermin Dの発現さらに炎症性サイトカインIL-1 β の細胞外産生も抑制された。ASCやgasdermin Dのノックダウン細胞では、IL-1 β の細胞外分泌は抑制された。

研究成果の概要(英文)：We clarified the role of ω -3 fatty acids in periodontopathic bacteria-invaded macrophages. Human macrophage cell line THP-1 was invaded with Periodontopathic bacterium. To make knock down cells, siRNA was induced to macrophages by electroporation. Periodontopathic bacteria invasion induced the expression of IL-1 β and gasdermin D in THP-1 cells, concurrently with cell death. DHA downregulated cell death and the secretion of IL-1 β from periodontopathic bacteria-invaded THP-1 cells. DHA also downregulated the expression of inflammasome-related protein induced by periodontopathic bacteria invasion in THP-1 cells. Depletion of caspase-4 downregulated the expression of IL-1 β and gasdermin D in periodontopathic bacteria-invaded THP-1 cells. These results indicate that ω -3 fatty acid, particularly DHA, downregulated the inflammasome activity in THP-1 cells induced by periodontopathic bacteria through the downregulation of ASC and caspase-4 expression.

研究分野：感染症学・免疫学

キーワード：インフラマソーム マクロファージ ピロトーシス オメガ3系脂肪酸 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

歯周病と全身に関する疫学調査で明らかとなった肥満に関して多くの疫学研究が展開されているが、その因果関係に関する分子メカニズムは明らかにされていない。そのようななかで、肥満に伴う慢性炎症の進行は、炎症性サイトカインの発現増加と関連し、インスリン標的臓器に脂肪毒性を生じ、インスリン抵抗性を引き起こすということが明らかになっている¹⁾。

我々は、歯周病細菌感染マクロファージにて、インフラマソーム複合体が形成され、IL-1 や IL-18 といった炎症性サイトカインが発現することを明らかにし、さらに caspase-1 依存性細胞死ピロプトーシスが誘導されることを報告している。一方、マクロファージは細菌感染やケモカイン刺激下で、M1 マクロファージや M2 マクロファージといった異なるサブクラスに分化して炎症性サイトカインの産生や免疫応答に相反する作用を示しながら関与することが報告されている²⁾。

脂質成分である脂肪酸のなかで飽和脂肪酸は、肥満の進行とともに肥満細胞から遊離される。遊離脂肪酸は、M1 マクロファージを誘導し、脂肪組織の慢性炎症を亢進する。LDL (低密度リポタンパク質) は、高コレステロール血症や動脈硬化などの原因となるが、慢性炎症の亢進に伴い脂肪組織から発現されるホスホリパーゼは、この LDL のリン脂質を分解して不飽和脂肪酸を遊離する。不飽和脂肪酸は、飽和脂肪酸に拮抗的に作用し、炎症応答を抑制していることが報告されている³⁾。

2. 研究の目的

今回の研究では、脂肪酸が、歯周病細菌感染マクロファージが誘導するインフラマソーム複合体形成、ならびにピロプトーシス (細胞死) の発現におよぼす影響を分子レベルで解析する。とくに、炎症応答に多様な性状を有する M1 および M2 マクロファージの分化に対する飽和および不飽和脂肪酸の影響について、網羅的なシグナル解析を行う。さらに、2 種類の脂肪酸が制御する歯周病細菌感染マクロファージ内シグナル分子を探査し、歯周病の脂肪酸に起因する全身疾患との関連について、自然免疫の主役を担うマクロファージを素材に分子レベルで詳細な検証を行う。

3. 研究の方法

我々の開発した歯周病細菌感染の実験系を用いて、歯周病細菌感染により誘導されるピロプトーシスおよびインフラマソーム構成分子と、脂肪酸との関連性について、分子レベルで検証する。

飽和脂肪酸 (パルミチン酸) ならびに不飽和脂肪酸 (オレイン酸・リノール酸・ドコサヘキサエン酸) によるインフラマソーム複合

体形成確認を行う。細胞は、ヒト単球系細胞を使用する。すでに既知である構成成分に関しては、リアルタイム PCR やウェスタンブロットティング法、複合体形成には免疫沈降法にて確認する。脂肪酸認識受容体として、Toll 様受容体 (TLRs) や核内受容体、パターン認識受容体 (NLRPs, AIM, NLRC) の発現検証を分子生物学的手法にて行う。

我々の歯周病細菌感染の前後にて、飽和脂肪酸・不飽和脂肪酸の作用が、細菌感染により誘導されるインフラマソームならびにピロプトーシスに与える影響について解析する。脂肪酸が誘導するシグナル分子発現の変化について、ならびに関連因子に関して、分子生物学的手法にて詳細な解析を行う。

歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 株を用い、ヒト単球細胞 THP-1 細胞、マウスマクロファージ細胞 J774.1 およびマウス骨髄由来単球に対し、侵入実験を行った。3 脂肪酸として DHA および EPA を用いた。遺伝子発現は Real-Time RT-PCR 解析、タンパク発現はウェスタンブロットティング解析および ELISA を行った。ノックダウン細胞は siRNA 導入により構築した。

4. 研究成果

THP-1 細胞において、歯周病細菌 *A. actinomycetemcomitans* 侵入は、炎症性サイトカインの分泌を誘した (図 1A)。この誘導

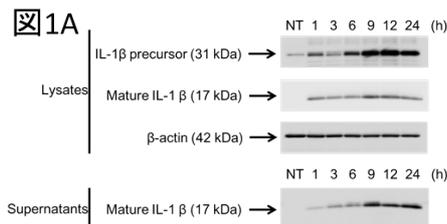


図1B

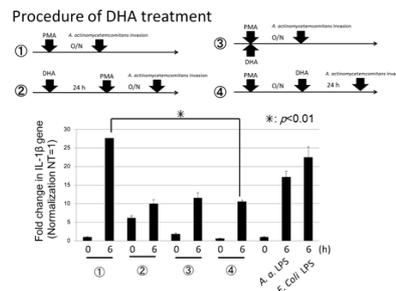


図1C

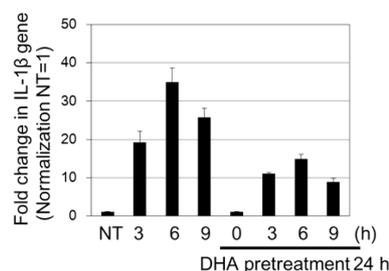


図1D

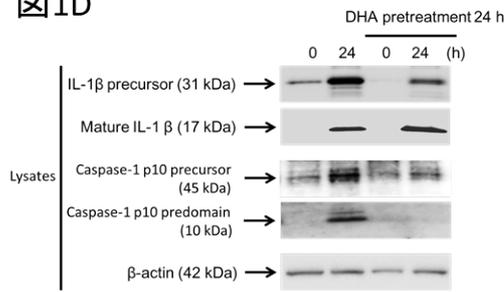


図1E

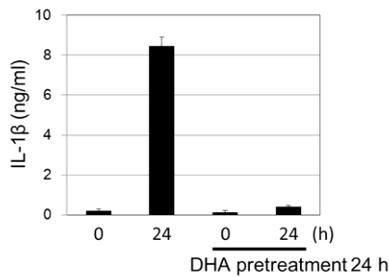


図1F

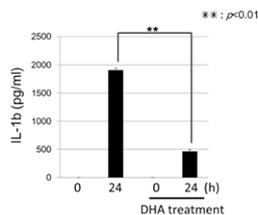
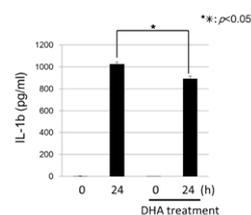


図1G



は、-3系脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) の前処理によって著明に抑制された。また同時に、インフラマソーム関連因子の活性も抑制した (図1B-E)。また、DHA 処理により、細胞内受容体 NLRP3 の発現も抑制され、ASC、インフラマソーム関連因子の degradation も確認された (図2)。

図2A

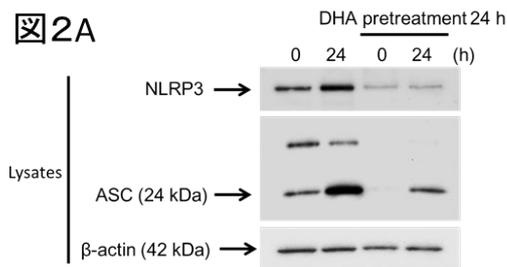
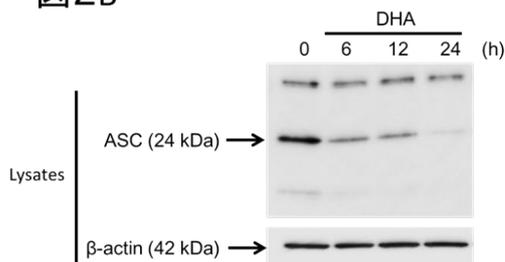


図2B



歯周病細菌 *A. actinomycetemcomitans* 侵

入マクロファージにて誘導される IL-1 産生は、図3に示すように ASC 依存性であった。そこで、他の -3系脂肪酸で、おなじような効果があるか確認したところ、EPA にて同様

図3A

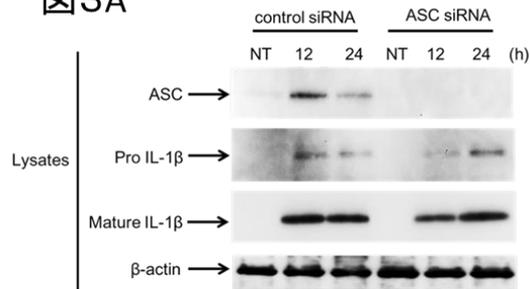
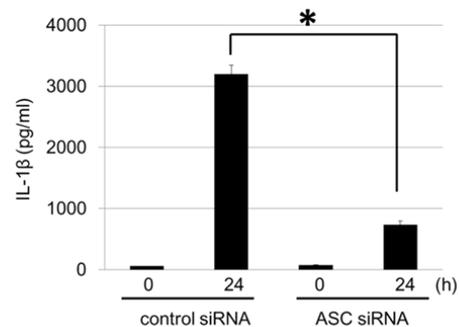


図3B



の効果が認められた (図4)。

インフラマソーム活性およびピロトーチンと共に、炎症性サイトカインの細胞外分泌に關与する gasdermin D の発現が誘導された (図5)。THP-1 細胞を DHA で前刺激したと

ころ、*A. actinomycetemcomitans* 侵入が誘導するインフラマソーム関連因子 ASC および gasdermin D の発現は抑制された。また、インフラマソーム関連因子 NLRP3 や caspase-1 p10、さらに炎症性サイトカイン IL-1 の細胞外産生も抑制された。siRNA による ASC や gasdermin D のノックダウン細胞では、*A. actinomycetemcomitans* 侵入において、IL-1 の細胞外分泌は抑制された。

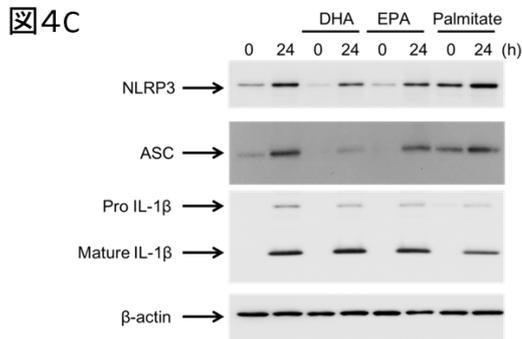
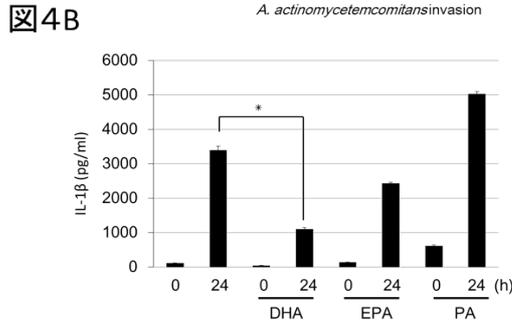
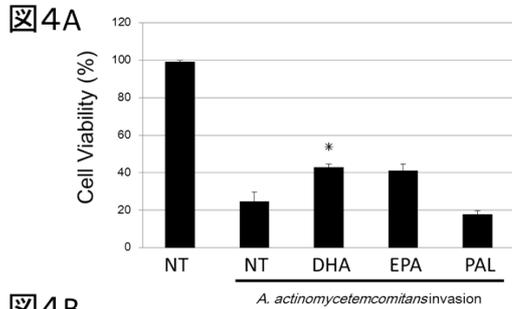
【考察】以上の結果から、DHA は、インフラマソーム関連因子の発現を抑制することで、歯周病細菌侵入マクロファージにおいて誘導されるインフラマソーム活性を抑制することが示唆された。

<引用文献>

- 1) Xu et al. J Clin Invest 2003
- 2) Mantovani et al TRENDS in Immunology 2004
- 3) Tios et al J Immunol 2011

5. 主な発表論文等

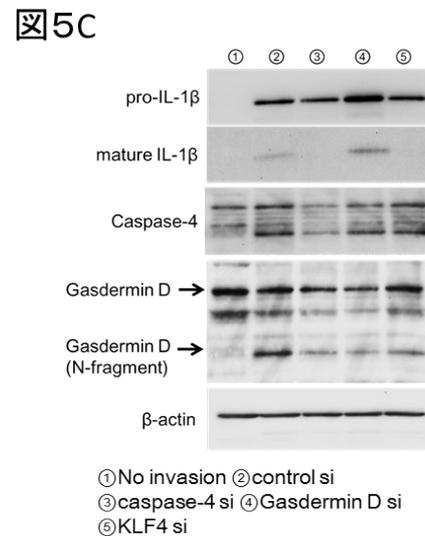
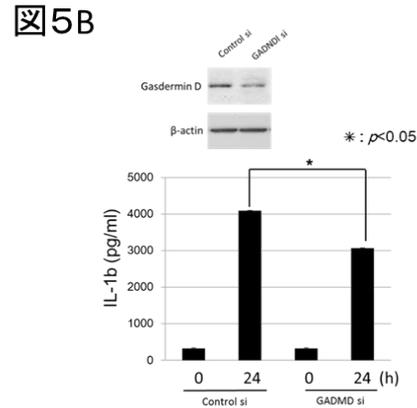
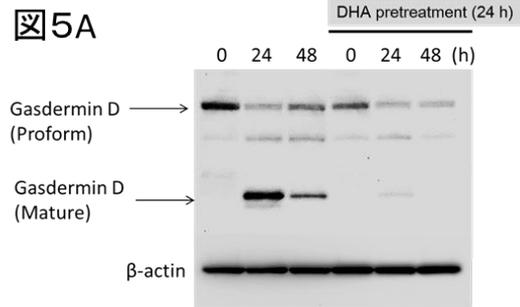
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)



〔雑誌論文〕(計2件)

Otsuka M, Okinaga T, Ariyoshi W, Kitamura C, Nishihara T. Ameloblastin upregulates inflammatory response through induction of IL-1β in human macrophages. *J Cell Biochem* **2017**;118(10):3308-3317. doi:10.1002/jcb.25983.

Jaffar N, Ishikawa Y, Mizuno K, Okinaga T, Maeda T. 2016. Mature Biofilm Degradation by Potential Probiotics: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* versus *Lactobacillus* spp. *PLoS One* **2016**;11(7):e0159466. doi:10.1371/journal.pone.0159466. eCollection



〔学会発表〕(計6件)

沖永敏則, 有吉渉, 西原達次. オメガ3脂肪酸は歯周病細菌が誘導するインフラマソーム活性を抑制する. 第59回歯科基礎医学会学術大会 2017.9.17 松本市.

沖永敏則, 有吉渉, 西原達次. ドコサヘキサエン酸は歯周病細菌誘導インフラマソーム活性を制御する. 第70回日本細菌学会九州支部総会 2017.9.8 那覇市.

Okinaga T, Ariyoshi W, Nishihara T. Omega-3 fatty acids regulate inflammasome activity and pyroptosis induced by *A. actinomycetemcomitans* invasion in macrophages. International union of microbiological societies, 15th International Congress of Bacteriology

and Applied Microbiology 2017.6.18
(Singapore, Singapore)

沖永敏則, 有吉渉, 西原達次. The role of Docosahexaenoic acid on inflammasome activity induced by *A. actinomycetemcomitans* invasion macrophages. 第 90 回日本細菌学会総会 2017.3.19 仙台市.

沖永敏則, 有吉渉, 西原達次. *A. actinomycetemcomitans* が誘導するサイトカイン産生に対するオメガ 3 脂肪酸の影響. 第 69 回日本細菌学会九州支部総会 2016.9.2 宮崎市.

沖永敏則, 有吉渉, 西原達次. オメガ 3 脂肪酸は歯周病細菌侵入マクロファージが誘導するインフラマソーム活性を抑制する. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016.8.26 札幌市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :
取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖永 敏則 (OKINAGA TOSHINORI)
九州歯科大学
感染分子生物学分野 講師
研究者番号 :

(2) 研究分担者

()
研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者 ()