

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20432

研究課題名(和文) S. sanguinisによるIL-1 産生誘導機構の解明

研究課題名(英文) IL-1alpha inducing activity of Streptococcus sanguinis

研究代表者

佐伯 歩 (Saeki, Ayumi)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70638345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：S. sanguinisはA/J マウス由来樹状細胞(XS-106細胞)ならびにC57BL/6マウス由来の骨髄由来マクロファージ(BMMs)にIL-1 $\alpha$ の産生を誘導し、caspase-1、NLRP3ならびにASCをノックアウトすることにより有意に減弱した。また、本活性はcalpain阻害剤であるMDL28170により阻害されたが、caspase-1阻害剤であるz-YVAD-fmkでは阻害されなかった。本活性は、貪食阻害剤、P2X/P2Yレセプター阻害剤で阻害された。さらに、Proximity ligation assayによりIL-1 $\alpha$ とcaspase-1が細胞質で共局在することが観察された。

研究成果の概要(英文)：S. sanguinis had the activity to induce secretion of IL-1 $\alpha$  by a murine dendritic cell (XS-106) and a murine bone marrow-derived macrophage (BMMs) from C57BL/6 in a dose-dependent manner, but the activity toward NLRP3-, ASC- and caspase-1-deficient BMMs were significantly attenuated. The calpain-1 inhibitor MDL28170 but not the caspase-1 inhibitor z-YVAD-fmk attenuated the IL-1 $\alpha$ -inducing activity. Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization reduced the IL-1 $\alpha$ -inducing activity. The receptor P2X/P2Y inhibitor oxidized ATP downregulated IL-1 $\alpha$  release. Colocalization of caspase-1 with IL-1 $\alpha$  was detected by Proximity ligation assay.

研究分野：歯学

キーワード：S. sanguinis IL-1 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

申請者は最近、感染性心内膜炎(IE)の主要な原因菌として知られている *Streptococcus sanguinis* が、マウス樹状細胞ならびにマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 の分泌を誘導することを明らかにした。一方、IL-1 の活性化ならびに分泌メカニズムはほとんど明らかにされていない。IE の病因論は不明な点が多いが、本菌菌体ならびに IL-1 が血小板を凝集させ、心内膜に付着することが一因であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、*S. sanguinis* が IL-1 の分泌を誘導する分子機構を明らかにし、本菌による IE の病因論解明ならびに新規予防・治療法開発の一助とすることを目的とした。

3. 研究の方法

菌株は *S. sanguinis* ATCC 10556 を用いた。標的細胞としては A/J マウス由来樹状細胞(XS-106 細胞)、さらに、C57BL/6(B6)マウスならびに B6 マウスから caspase-1、ASC あるいは NLRP3 をノックアウトしたマウスの骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ(BMMs)を用いた。上清中に放出された IL-1 は ELISA 法ならびに Western blot 法で測定した。

4. 研究成果

*S. sanguinis* は XS-106 細胞(図1)ならびに B6 由来の BMMs(図2)に IL-1 の産生を誘導したが、それらの活性は caspase-1、NLRP3 あるいは ASC ノックアウトマウス由来 BMMs で有意に減弱した(図2)。

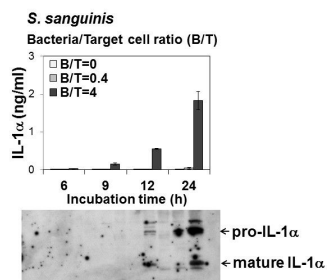


図1. *S. sanguinis*はXS-106細胞にIL-1αの産生を誘導

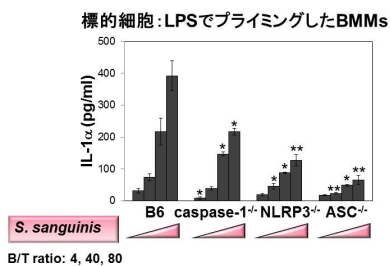


図2. caspase-1, NLRP3, ASCノックアウトの影響

また、本活性は calpain 阻害剤である MDL 28170 により阻害されたが(図3)、caspase-1 阻害剤である z-YVAD-fmk では阻害されなかった(図4)。

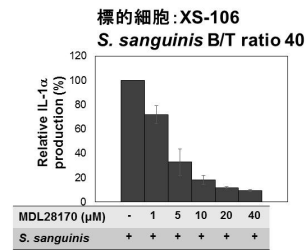


図3. calpain阻害剤の影響

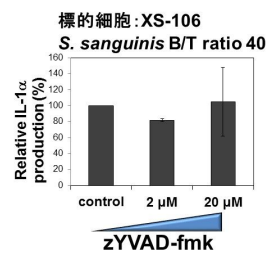


図4. caspase-1阻害剤の影響

また、XS-106 細胞に対する IL-1 産生誘導活性は、食食阻害剤であるサイトカラシン D(図5)、P2X ならびに P2Y(ATP ならびに ADP のレセプター)の阻害剤である oxidized ATP (oATP)(図6)により阻害された。

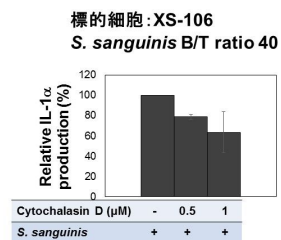


図5. 食食阻害剤の影響

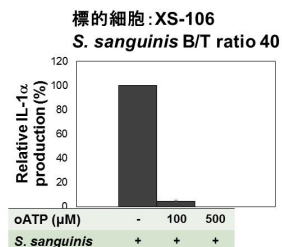


図6. P2X/P2Yレセプター阻害剤の影響

さらに菌体刺激時の細胞外 ATP 濃度を測定したところ、菌量ならびに時間依存的に増加し、

それに伴い IL-1 の産生も誘導された( 図 7 )。さらに、細胞外 ATP 濃度の増加は、サイトカリン D により阻害された( 図 7 )。

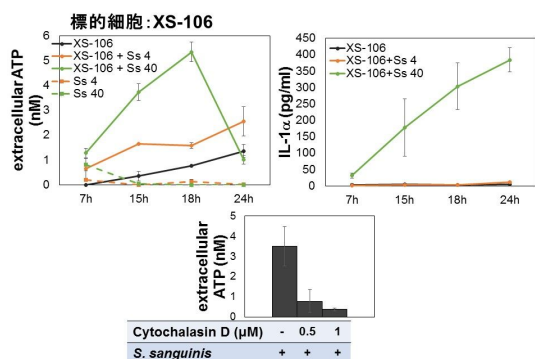


図7. 細胞外ATP

これらのことより、菌体の貪食に伴い細胞外へ ATP が放出され、ATP や ADP のレセプターである P2X あるいは P2Y レセプターのシグナルが IL-1 の産生誘導活性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

さらに、Proximity ligation assay により IL-1 と caspase-1 が細胞質で共局在することが観察された( 図 8 )。

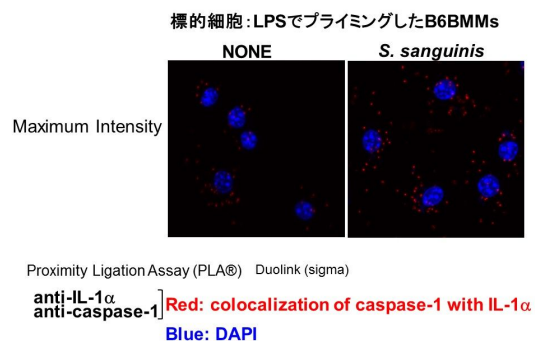


図8. IL-1αとcaspase-1の共局在

以上の結果から、*S. sanguinis* は XS-106 細胞ならびに BMMs に対して IL-1 産生を誘導する活性を有し、その活性発現には NLRP3 インフラマソームが関与していることが示唆された。しかしながら、NLRP3 インフラマソームの活性化で誘導される caspase-1 のタンパク質分解活性が重要ではなく、caspase-1 と IL-1 が細胞質で共局在していることが何か重要な役割を果たしているのではないかと推測された。

## 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3件)

亀崎 良助、阿部 亜美、佐伯 歩、長谷部 晃、鈴木 敏彦、北川 善政、柴田 健一、Aggregatibacter actinomycetemcomitans のゲノム DNA はマクロファージに対して nucleotide-binding domain-like receptor containing protein 3

インフラマソームを活性化して IL-1 を誘導する、北海道歯学雑誌、38 (2)、177-184、2018、査読有

佐伯 歩、柴田 健一郎、心内膜炎関連口腔連鎖球菌による IL-1 産生誘導活性、北海道歯学雑誌、38 (1)、56-58、2017、査読無

Saeki A, Suzuki T, Hasebe A, Kamezaki R, Fujita M, Nakazawa F, Shibata K, Activation of nucleotide-binding domain-like receptor containing protein 3 inflammasome in dendritic cells and macrophages by *Streptococcus sanguinis*, Cell Microbiol, 19(3), 2017, 査読有 DOI: 10.1111/cmi.12663

[学会発表](計14件)

佐伯 歩、長谷部 晃、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、Translocation of the mycoplasmal lipopeptide FSL-1 into cytosol for the NLRP3 inflammasome activation in murine macrophages、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年

長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎、IL-1 production by dendritic cells and macrophages stimulated with *Candida albicans*、第 91 回日本細菌学会総会、2018 年

佐伯 歩、長谷部 晃、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、インフラマソーム活性化物質としてのマイコプラズマ由来リポタンパク質、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年

長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎、樹状細胞とマクロファージへの *Candida albicans* の IL-1 産生誘導、第 59 回歯科基礎医学会学術大会、2017 年

佐伯 歩、長谷部 晃、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、マイコプラズマ由来リポタンパク質によるマウスマクロファージに対する IL-1 産生誘導活性、第 84 回日本細菌学会北海道支部学術総会 2017 年

佐伯 歩、長谷部 晃、柴田 健一郎、*M. salivarium* ならびに *M. pneumoniae* はインフラマソームを活性化して IL-1 ならびに IL-18 の産生を誘導する、日本マイコプラズマ学会第 44 回学術集会、2017 年

佐伯 歩、長谷部 晃、亀崎 良助、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、マイコプラズマ由来リポタンパク質による TLR2 を介した NLRP3 インフラマソームの活性化、第 2 回北大部局横断シンポジウム、2017 年

佐伯 歩、長谷部 晃、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、マイコプラズマの IL-1 産生誘導物質の一つはリポペプチド・リポタンパク質である、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年

長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎、IL-1 production-inducing activity of *Candida albicans* toward dendritic cells and macrophages、第 90 回日本細菌学会総会、2017 年

佐伯 歩、長谷部 晃、亀崎 良助、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、マイコプラズマ由来リポペプチド・リポタンパク質によるインフラマソームの活性化、第 83 回日本細菌学会北海道支部学術総会、2016 年

佐伯 歩、長谷部 晃、亀崎 良助、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、*Streptococcus sanguinis* の IL-1 産生誘導活性におけるインフラマソームの関与、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年

長谷部 晃、佐伯 歩、亀崎 良助、柴田 健一郎、樹状細胞とマクロファージ細胞に対する *Candida albicans* の IL-1 産生誘導の違い、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年

亀崎 良助、佐伯 歩、長谷部 晃、北川 善政、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DNA によるインフラマソームの活性化、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年

佐伯 歩、長谷部 晃、亀崎 良助、柴田 健一郎、マイコプラズマ由来リポペプチド・リポタンパク質による NLRP3 インフラマソームの活性化、日本マイコプラズマ学会第 43 回学術集会、2016 年

〔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  
<https://www.den.hokudai.ac.jp/saikin/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
佐伯 歩 (SAEKI, Ayumi)  
北海道大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号：70638345

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
柴田 健一郎 (SHIBATA, Ken-ichiro)