

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09556

研究課題名(和文) マクロファージ泡沫化とインフラマソームの因果関係の解明と心筋梗塞発症機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms involved in pathogenesis of myocardial infarction by foam cell formation and inflammasome activation

研究代表者

西原 達次(Tatsuji, Nishihara)

九州歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：80192251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージにおける歯周病原性細菌が誘導するピロトーシスや炎症性サイトカインの産生において、インフラマソーム複合体の形成を介した複雑な分子機構が関与していることを明らかにした。また、多価不飽和脂肪酸が歯周病原性細菌の侵入により誘導されるピロトーシスや炎症性サイトカインの産生に対して抑制的に作用することを見出した。加えて、炎症性サイトカインであるIL-17Aが血管内皮細胞やマクロファージ系の細胞に作用して、接着分子の発現やスカベンジャー受容体であるLOX-1を介する泡沫化細胞形成を亢進することにより、アテローム性動脈硬化の病態形成へ関与していることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究事業では、歯周病細菌感染による炎症反応について、自然免疫の概念を見据えた研究を展開した。このような発想に立った感染症・炎症学研究は見られない。その結果、歯周病原性細菌の侵入によるインフラマソームを軸とした単球・マクロファージ系の炎症応答や炎症性サイトカインのアテローム性動脈硬化症発症の関与を示唆する成果を見出すことができた。ここで得られた成果により、歯周炎に関する特異的な炎症性タンパクや病態形成に関わる分子メカニズムの一部が解明され、今後、歯周炎および歯周炎が関連する種々の全身疾患のリスクの低下に繋がる新たな予防・治療戦略の提案に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)： Periodontopathic bacterium invasion induced secretion of interleukin (IL)-1 and expression of inflammasome-associated factors. Docosahexaenoic acid (DHA), an omega-3 fatty acid suppressed inflammasome-associated factors expression as well as IL-1 secretion by THP-1 cells in response to *A. actinomycetemcomitans* invasion.

Moreover, we revealed that expression of adhesion molecules in endothelial cells and macrophages was upregulated by IL-17A. Furthermore, IL-17A stimulation resulted in expression of scavenger receptor in phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-activated macrophages. Oil Red O also demonstrated that IL-17A enhanced foam cell formation by PMA-activated macrophages induced by oxidized low-density lipoprotein. These results indicated that IL-17A may be responsible for the pathogenesis of atherosclerosis by inducing the adhesion of leukocytes to vascular endothelium and foam cell formation.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 心筋梗塞 インフラマソーム ピロトーシス マクロファージ 泡沫化

1. 研究開始当初の背景

インフラマソームは細胞質に存在するタンパク質複合体で、感染等の外部刺激で活性化され、**caspase** を介して炎症性サイトカインの分泌を誘導する。近年、このような炎症性サイトカイン産生に伴う細胞死ピロトーシスが注目され、**Gsdmerin D** による細胞膜への孔形成が報告され、炎症応答におけるピロトーシスと炎症性サイトカイン産生メカニズム解明への切り口として報告されている (**Liu et al. 2016. Nature, Shi et al. 2015. Nature**)。

我々は歯周病細菌感染による炎症反応において、インフラマソーム複合体が深く関わることを明らかにし、国際誌に報告してきた(**Okinaga et al. 2015. J. Interf. Cytok. Res.**)。歯周炎は歯周病細菌による感染症であり、歯周組織の炎症・破壊を誘導するが、現在では糖尿病や心筋梗塞など生活習慣病との関連が示唆されている。我々は、これにインフラマソームが関連していると仮定し研究を展開する。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病において炎症細胞であるマクロファージに誘導されるインフラマソーム分子群に焦点をあて、これら分子の会合メカニズムおよび情報伝達機構を解析した。マクロファージに対して、歯周病原性細菌である **Aggregatibacter actinomycetemcomitans** が誘導するピロトーシスについては、細胞死の解析、炎症性サイトカインの発現など多面的な視点で検証を行った。加えて、多価不飽和脂肪酸が **A. actinomycetemcomitans** の侵入により誘導されるマクロファージ系細胞のピロトーシスや炎症性サイトカイン産生に対する作用とその分子メカニズムを解析した。

加えて、付随研究として炎症性サイトカインである **IL-17A** が血管内皮細胞やマクロファージ系細胞に及ぼす接着分子の発現やスカベンジャー受容体を介する泡沫化細胞形成とアテローム性動脈硬化の病態形成への関与について検討した。

さらに、新たに企業と開発している **MEMS** を使用した血球分離装置を併用した生体に近い微小血管流路実験系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) **A. actinomycetemcomitans** の侵入により誘導されるマクロファージ細胞死の分子機構 細胞培養

ヒト単球様細胞株 (**THP-1** 細胞) に対して、**phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)** で処理を行い、マクロファージへの分化誘導を行った。分化誘導後の細胞を **6-well plate** に播種し、**A. actinomycetemcomitans Y4** 株を侵入させた。一部の研究では、オメガ3脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (**DHA**) 存在下で同侵入実験を行った。培養後の細胞に対して、下記の生化学的分析を行った。

生化学的分析

a. **ELISA**

培養後の **THP-1** 細胞の培養上清を回収後、市販のキットを用いて、**IL-18** の濃度を定量した。

b. **Western blotting** 解析

培養後の **THP-1** 細胞よりタンパク質を抽出し、**Western blotting** 法によりインフラマソーム関連タンパクの発現を検出した。

c. 細胞生存率解析

培養後の **THP-1** 細胞に対し、**CCK-8** アッセイを行い、細胞生存率を計測した。

(2) **IL-17A** のアテローム性動脈硬化の病態形成への関与

細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞株 (**HUVEC** 細胞) およびヒト単球様細胞株 (**U937** 細胞) を播種し、**IL-17A** 存在下/非存在下で培養した。一部の研究では、**U937** 細胞に対して、**PMA** 処理によるマクロファージへの分化誘導を行った。培養後の細胞に対して、下記の生化学的分析を行った。

生化学的分析

a. **real-time RT-qPCR** 解析

培養後の **HUVEC** 細胞および **U937** 細胞より **RNA** を抽出、逆転写処理により **cDNA** を合成後、各実験群の細胞接着因子およびスカベンジャー受容体の遺伝子発現量について評価を行った。

b. オイルレッド染色

PMA 処理を行いマクロファージへと分化誘導した **U937** に対して、**IL-17A** または低密度リポタンパク質 (**oxLDL**) の存在下または非存在下で **24** 時間培養を行った。培養後の細胞を固定後、**0.5%** オイルレッド染色溶液を用いた染色を行い、顕微鏡視下に泡沫細胞形成を観察し、全マクロファージ数に対するオイルレッド陽性細胞数の割合を算出した。

(3) 微小血管流路系の構築

我々は、企業との共同研究にて、**MEMS** を応用した微小流路チップを開発している。この

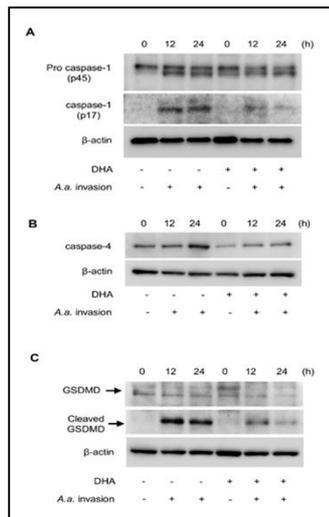
チップに HUVEC 細胞をコーティングし、流路実験系を構築する。

4. 研究成果

(1) *A. actinomycetemcomitans* の侵入により誘導されるマクロファージ細胞死の分子機構

THP-1 細胞に対する *A. actinomycetemcomitans* の侵入実験の結果、炎症性サイトカインである IL-18 の分泌と、**nucleotide-binding oligomerization domain like receptor protein 3 (NLRP3)**、**adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)**、**caspase-1**、**caspase-4**、**cleaved-gasdermin D (GSDMD)**といったインフラソーム関連因子の発現が誘導された。これに対して、DHA は、同菌の侵入による NLRP3、ASC、caspase-1 の発現、および IL-18 の分泌を抑制した。さらに DHA は、ASC の会合、caspase-4 および GSDMD の発現を抑制し、*A. actinomycetemcomitans* の侵入による THP-1 細胞の細胞死を抑制した (図 1)。これらの結果から、DHA がインフラソーム関連因子の抑制を介してマクロファージへの *A. actinomycetemcomitans* の侵入によって誘導される IL-18 の分泌と細胞死を減弱させることが示唆された。

図 1 歯周病原性細菌の侵入によるインフラソーム関連タンパクの発現と DHA による阻害作用



(2) IL-17A のアテローム性動脈硬化の病態形成への関与

IL-17A は、アテローム性動脈硬化症局所において、高発現することが報告されている。そこで、IL-17A が血管内皮細胞や単球に及ぼす作用について検討を行った。その結果、IL-17A 刺激により、HUVEC 細胞では **intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)** と **vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)** に加えて、U937 細胞では **lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)**、**macrophage antigen 1 (MAC-1)**、**very late antigen 4 (VLA-4)** など、種々の細胞接着因子の遺伝子発現が亢進した (図 2)。

さらに、IL-17A で刺激した HUVEC 細胞および U937 細胞の共培養系において細胞間接着の誘導が確認された。一方、PMA 処理下の U937 細胞では IL-17A によって、スカベンジャー受容体である **lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1)** の発現と oxLDL 存在下における泡沫化細胞形成が亢進した (図 3, 4)。

以上から、IL-17A は血管内皮細胞と単球の細胞接着因子の発現を増強するとともに、LOX-1 を介した泡沫化亢進により、アテローム性動脈硬化症の病態形成に関与することが示唆された。

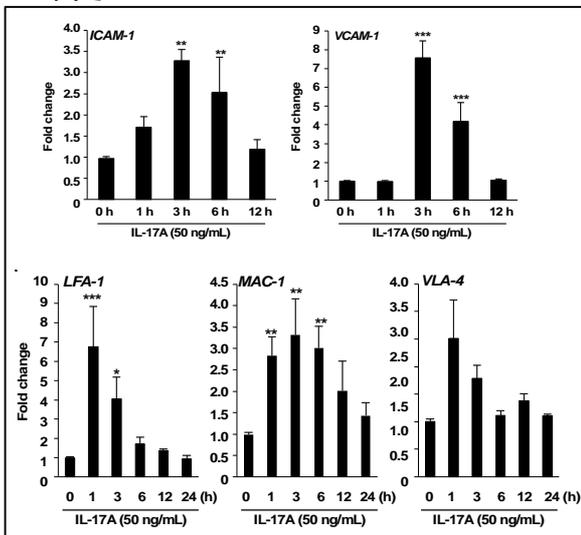


図 2 IL-17A による細胞接着因子の発現亢進

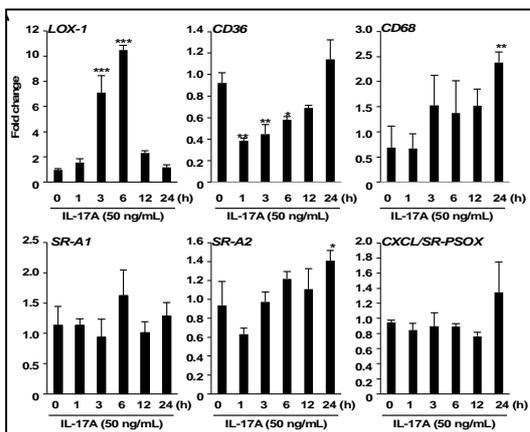


図 3 IL-17A による LOX-1 発現亢進

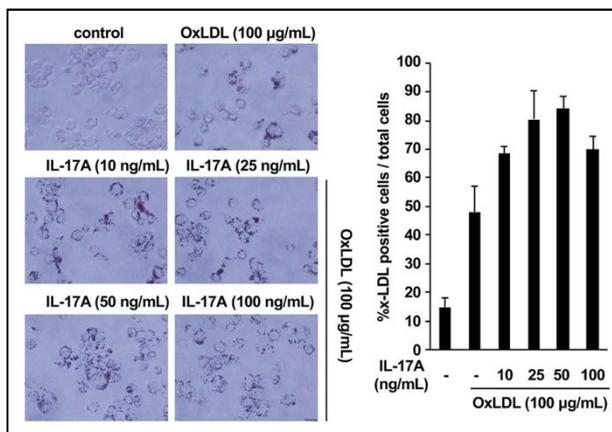


図 4 IL-17A による泡沫細胞形成亢進

(3) 微小血管流路系の構築

図5に開発した微小流路チップを示す。このチップ内面をフィブロネクチンで被覆したところ、HUVEC細胞の接着が確認された。また、このチップをペリスタポンプに接続し、培養液を還流しても、顕著な細胞の脱落は観察されなかった。現在、スクラッチ法を用いて損傷部位を作製し、単球やマクロファージの集積を促す条件設定を行っている。このモデルを血栓形成モデルとして使用し、IL-17A存在下に培養を行い、集積したプラーク塊や血管内皮細胞を回収し、マイクロアレイを用いて、IL-17Aにより誘導されるアテローム性動脈硬化形成への関与が疑われる候補因子を決定する予定である。



図5 微小流路チップ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoue Maki, Okinaga Toshinori, Usui Michihiko, Kawano Aki, Thongsiri Chuencheewit, Nakashima Keisuke, Ariyoshi Wataru, Nishihara Tatsuji	4. 巻 366
2. 論文標題 -glucan suppresses cell death of ASC deficient macrophages invaded by periodontopathic bacteria through the caspase-11 pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 pii: fnz093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnz093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akifusa Sumio, Isobe Ayaka, Kibata Kanako, Oyama Akinori, Oyama Hiroko, Ariyoshi Wataru, Nishihara Tatsuji	4. 巻 20
2. 論文標題 Comparison of dental plaque reduction after use of electric toothbrushes with and without QLF-D-applied plaque visualization: a 1-week randomized controlled trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-019-0982-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiotsugu Shohei, Okinaga Toshinori, Habu Manabu, Yoshiga Daigo, Yoshioka Izumi, Nishihara Tatsuji, Ariyoshi Wataru	4. 巻 39
2. 論文標題 The Biological Effects of Interleukin-17A on Adhesion Molecules Expression and Foam Cell Formation in Atherosclerotic Lesions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Interferon & Cytokine Research	6. 最初と最後の頁 694 - 702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/jir.2019.0034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko Junya, Okinaga Toshinori, Hikiji Hisako, Ariyoshi Wataru, Yoshiga Daigo, Habu Manabu, Tominaga Kazuhiro, Nishihara Tatsuji	4. 巻 38
2. 論文標題 Zoledronic acid exacerbates inflammation through M1 macrophage polarization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-018-0074-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Junya, Okinaga Toshinori, Ariyoshi Wataru, Hikiji Hisako, Fujii Seiko, Iwanaga Kenjiro, Tominaga Kazuhiro, Nishihara Tatsuji	4. 巻 42
2. 論文標題 Ky-2, a hybrid compound histone deacetylase inhibitor, regulated inflammatory response in LPS-driven human macrophages	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 1622 ~ 1631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.11058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawano Aki, Ariyoshi Wataru, Yoshioka Yoshie, Hikiji Hisako, Nishihara Tatsuji, Okinaga Toshinori	4. 巻 120
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid enhances M2 macrophage polarization via the p38 signaling pathway and autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 12604 ~ 12617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.28527	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawano Aki, Ariyoshi Wataru, Yamasaki Ryota, Yoshioka Yoshie, Kashiwagi Kosuke, Namikawa Daisuke, Nishihara Tatsuji, Okinaga Toshinori	4. 巻 31
2. 論文標題 Docosahexaenoic acid attenuates cell death and interleukin-1beta secretion in THP-1 cells responded to Aggregatibacter actinomycetemcomitans invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 93 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 川野亜希、有吉 渉、沖永敏則
2. 発表標題 細菌誘導のマクロファージ細胞応答におけるオメガ3系脂肪酸の影響
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aki Kawano, Wataru Ariyoshi, Toshinori Okinaga
2. 発表標題 Role of omega-3 fatty acid on inflammasome activity in Aggregatibacter actinomycetemcomitans-invaded macrophages
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2019- International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川野亜希、有吉 渉、吉岡香絵、山崎亮太、沖永敏則
2. 発表標題 インフラマソーム活性に対するオメガ3 系脂肪酸の影響
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aki Kawano, Toshinori Okinaga, Wataru Ariyoshi, Hisako Hikiji, Tatsuji Nishihara
2. 発表標題 Effect of polyunsaturated fatty acids on macrophage polarization
3. 学会等名 Effect of polyunsaturated fatty acids on macrophage polarization Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2018- International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maki Inoue, Toshinori Okinaga, Wataru Ariyoshi, Masaki Morishita, Michihiko Usui, Keisuke Nakashima, Tatsuji Nishihara
2. 発表標題 Effect of α -glucan and dectin-1 binding on periodontopathic bacteria-invaded macrophages
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2018- International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩次將平、有吉 渉、沖永敏則、吉岡 泉、西原達次
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるInterleukin-17A (IL-17A) の生物学的機能の解明について
3. 学会等名 第78回九州歯科学会総会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩次將平、有吉 渉、沖永敏則、西原達次
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるInterleukin-17A(IL-17A)の生物学的機能の解明について
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川野亜希、沖永敏則、有吉 渉、引地尚子、西原達次
2. 発表標題 単球マクロファージ系細胞の分化に対する多価不飽和脂肪酸の影響
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 沖永敏則、有吉 渉、Chuencheewit Thongsiri、西原達次
2. 発表標題 歯周病細菌誘導のインフラマソーム活性におけるオメガ3脂肪酸の役割
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川野亜希、沖永敏則、有吉 渉、引地尚子、西原達次
2. 発表標題 マクロファージ分化に及ぼすドコサヘキサエン酸の影響
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩次將平、有吉 渉、沖永敏則、吉岡 泉、西原達次
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるIL-17Aの生物学的機能の解明について
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上真紀、沖永敏則、有吉 渉、守下昌輝、白井通彦、西原達次
2. 発表標題 グルカン添加による歯周病細菌侵入マクロファージに見られる細胞死抑制効果について
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	有吉 渉 (Ariyoshi Wataru) (40405551)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	冲永 敏則 (Okinaga Toshinori) (60582773)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関