

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23593066

研究課題名(和文) 歯周病原細菌によるインフラマソーム活性化機構に着目した歯周炎症反応の制御

研究課題名(英文) The regulation of periodontal inflammation based on the inflammasomes activated by periodontal pathogens.

研究代表者

金子 高士 (Kaneko, Takashi)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：10284697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン(IL)-1 は炎症性サイトカインで歯周病の組織破壊や歯槽骨吸収に密接に関連し、IL-1 の産生をコントロールすることは歯周病の発症進展を抑制に重要である。歯周病原細菌 (Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum) 刺激によるIL-1 の産生は、Ac-YVAD-CMKによる抑制からカスパーゼ1依存性であること、またグリブライドによる抑制からNLRP3依存性であった。これらの結果からカスパーゼ1、NLRP3を標的にした歯周治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Interleukin (IL)-1 is an inflammatory cytokine associated with periodontal break down and alveolar bone resorption, therefore the regulation of IL-1 is important to inhibit onset/progression of periodontal disease. IL-1 secretion induced with periodontal pathogens (Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum) is inhibited by the pretreatment with both Ac-YVAD-CMK and glyburide, indicating that IL-1 activation is dependent on both caspase-1 and NLRP3. These results indicate that the possibility of novel periodontal treatment that is targeted for caspase-1 and NLRP3.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病原細菌 インフラマソーム NLRP3 カスパーゼ1

1. 研究開始当初の背景

IL-1 は免疫系細胞、血管内皮細胞に作用し、炎症性サイトカインや接着分子の発現や破骨細胞の分化を誘導する作用を持ち、炎症病変の形成に深く関与している。歯周炎においてもその炎症組織や歯肉溝滲出液(GCF)で発現が上昇し、臨床パラメーターと相関していること、さらにIL-1の多型(IL-1B +3953)は歯周病の罹患率、重篤度が高いことが報告されており、IL-1と歯周病との関連が示唆されている。さらにIL-1の多型をもつ歯周病患者は歯周病原細菌に対する反応性が亢進しており、歯周治療に対する反応性も悪いことも明らかになってきている。これらの知見はIL-1発現のコントロールは歯周治療を成功に導く重要な因子となる可能性を示唆している。

成熟型IL-1の産生は複雑に制御されており、一般に自然免疫受容体のToll-like receptor (TLR) やNucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)からの刺激はpro-IL-1の産生を誘導するが、それらがプロセッシングをうけて成熟型のIL-1になるにはカスペーゼ-1を活性化する別のシグナル経路の刺激が必要とされる。近年、細胞内に存在するNOD-like receptor (NLR)のファミリーのNLRP1, NLRP3, IPAFとHIN-200ファミリーのAIM2がカスペーゼ1とインフラマソームを形成することにより、その活性化に関与していることが発見された。現在、病原体の菌体成分やDanger signalとこれらのインフラマソームの関連について研究がすすめられ、細菌の種類や構成成分によって活性化されるインフラマソームの種類が異なること明らかにされつつある。

2. 研究の目的

我々は歯周病原細菌菌種によりIL-1などの炎症性サイトカインの産生が異なること、pro-IL-1の発現に重要なTLRやNODを介するNF-kBの活性化

能が異なることを報告してきた。しかしながら前述したように、IL-1の産生のメカニズムを考える場合、NF-kBの活性化とカスペーゼの活性化はそれぞれ別に研究する必要があるが、歯周病原細菌のカスペーゼ1活性化に関する研究は少ない。そこで本研究では歯周病原細菌のインフラマソームを介したカスペーゼ1活性化メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 歯周病原細菌によるIL-1誘導

歯周病原細菌として *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, 非歯周病原細菌として *Echerichia coli* を用いて実験を行う。ヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞をこれらの熱処理超音波破碎細菌により 24 時間刺激し、細胞培養液中の IL-1 濃度を ELISA にて測定した。また同時に IL-8 濃度も測定した。

(2) 歯周病原細菌によるIL-1誘導におけるカスペーゼ1の役割

カスペーゼ1インヒビターのAc-YVAD-CMK存在下において歯周病原細菌でTHP-1細胞を刺激し、IL-1の濃度を測定することにより、カスペーゼ1の役割について検討する。

(3) 歯周病原細菌刺激によるIL-1産生におけるNLRP3の役割

NLRP3インヒビターのグリプリドの存在下において歯周病原細菌でTHP-1細胞刺激後のIL-1の濃度を測定することにより、NLRP3の役割について検討する

4. 研究成果

THP-1細胞を各歯周病原細菌で刺激したところいずれの菌体においても刺激量依存的にIL-1の産生が認められた。IL-1の産生量は *E.coli*,

A.actinomycetemcomitans の順で、*F.nucleatum*、*P.gingivalis* は低い結果となった (図 1)。

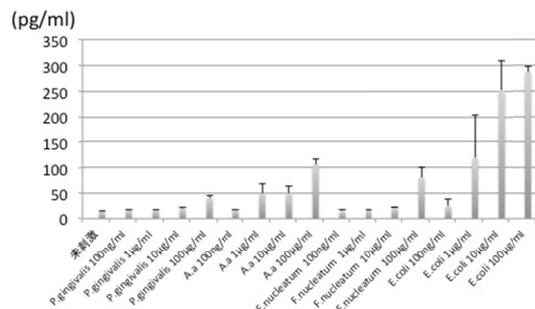


図1 歯周病原細菌刺激によるIL-1β産生

また IL-8 の産生量も IL-1 と同様で *E.coli*、*A.actinomycetemcomitans* の順で、*F.nucleatum*、*P.gingivalis* は低い結果となった (図 2)。

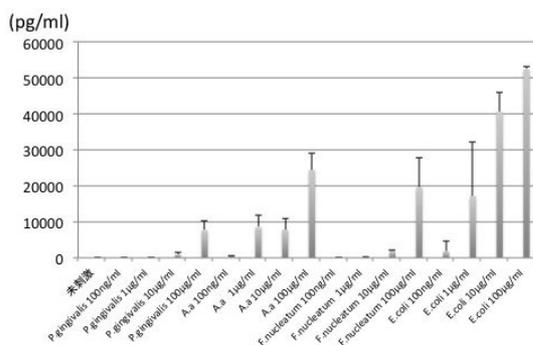


図2 歯周病原細菌刺激によるIL-8産生

IL-1 のプロセッシングにはカスパーゼ1に依存する経路と依存しない経路が存在することが報告されている。我々は歯周病原細菌による IL-1 の産生におけるカスパーゼ1の関与を調べるために、カスパーゼ1抑制剤 z-YVAD-fmk の存在下で *F.nucleatum* 刺激時 IL-1、IL-8 産生量を測定した (図 3、4)。z-YVAD-fmk は IL-1 の産生量を濃度依存的に抑制したが、IL-8 の産生には影響しなかった。このことからカスパーゼ1の *F.nucleatum* による IL-1 誘導への関与が示唆された。

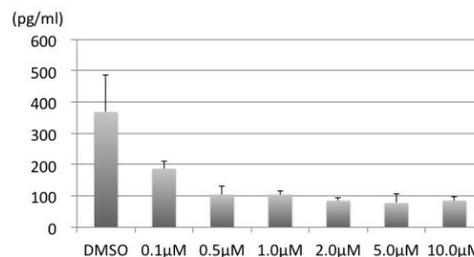


図3 z-YVAD-fmkのF.nucleatum刺激によるIL-1β産生に対する影響

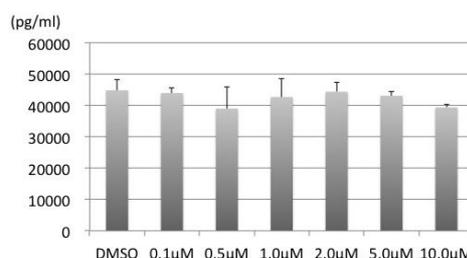


図4 z-YVAD-fmkのF.nucleatum刺激によるIL-8産生に対する影響

次に糖尿病治療薬の一種であるグリブライドは NLRP3 の抑制作用を有することが報告されている。歯周病原細菌による IL-1 の産生における NLRP3 の関与について調べるために、グリブライドの存在下において *P.gingivalis* で THP-1 細胞を刺激し、IL-1 と IL-8 の産生を調べた。グリブライドは IL-1 の産生量を濃度依存的に抑制したが、IL-8 の産生には影響しなかった (図 5)。このことから *P.gingivalis* による IL-1 の産生への NLRP3 の関与が示唆された。

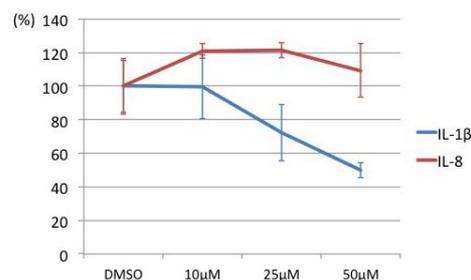


図5 グリブライドのP.gingivalis刺激によるサイトカイン産生に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Kishimoto T, Kaneko T, Ukai T, Yokoyama M, Ayon Haro R, Yoshinaga Y, Yoshimura A, Hara Y. Peptidoglycan and lipopolysaccharide synergistically enhance bone resorption and osteoclastogenesis. J Periodontal Res 47(4): 446-54, 2012.

Kuramoto A, Yoshinaga Y, Kaneko T, Ukai T, Shiraishi C, Oshino K, Ichimura I, Hara Y. The formation of immune complexes is involved in the acute phase of periodontal destruction in rats. J Periodontal Res, 47(4): 455-62, 2012.

Li X, Zhou L, Takai H, Sasaki Y, Mezawa M, Li Z, Wang Z, Yang L, Wang S, Matsumura H, Kaneko T, Yoshimura A, Ogata Y. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates bone sialoprotein gene transcription. J Cell Biochem 113(9): 2822-34, 2012.

Yoshinaga Y, Ukai T, Kaneko T, Nakatsu S, Shiraishi C, Kuramoto A, Oshino K, Ichimura I, Hara Y. Topical application of lipopolysaccharide into gingival sulcus promotes periodontal destruction in rats immunized with lipopolysaccharide. J Periodontal Res, 47(5): 674-80, 2012.

Sato K, Yoshimura A, Kaneko T, Ukai T, Ozaki Y, Nakamura H, Li X, Matsumura H, Hara Y, Ogata Y. A single nucleotide polymorphism in 3'-untranslated region contributes to the regulation of Toll-like receptor 4 translation. J Biol Chem 287(30): 25163-72, 2012.

吉永美穂、鶴飼孝、吉永泰周、白石千秋、金子高士、岸本隆明、佐藤佳昌、吉村篤利、原宜興
テーパード毛歯ブラシの臨床効果に関する研究 日本歯科保存学雑誌 55(2): 158-164, 2012.

Nagno F, Kaneko T, Yoshinaga Y, Ukai T, Kuramoto A, Nakatsu S, Oshino K, Ichimura I, Hara Y. Gram-positive bacteria as an antigen topically applied into gingival sulcus of immunized rat accelerates periodontal destruction. J Periodontal Res, 48(4):420-427, 2013.

Nakamura K, Yoshimura A, Kaneko T, Sato K, Hara Y. ROCK inhibitor Y-27632 maintains the proliferation of confluent human mesenchymal stem cells. J Periodontal Res, 49(3): 363-370, 2014.

吉永泰周, 長野史子, 金子高士, 鶴飼孝, 吉村篤利, 尾崎幸生, 吉永美穂, 白石千秋, 中村弘隆, 藏本明子, 高森雄三, 野口恵司, 山下恭徳, 泉聡史, 原宜興: グラム陰性菌またはグラム陽性菌の菌体破砕物が感作ラットの歯周組織に及ぼす影響、日本歯科保存学雑誌、57 巻 2 号、2014.

[学会発表] (計 6 件)

Yokoyama M, Ukai T, Kaneko T, Kishimoto T, Sato K, Shiraishi C, Ozaki Y, Yoshimura A, Hara Y: T cells from mice immunized with peptidoglycan accelerates lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis, 7thConference of the European Federation of Periodontology, Wien, Austria, 2012

Nagano F, Yoshinaga Y, Kaneko T, Kuramoto A, Nakatsu S, Kishimoto T, Takamori Y, Noguchi S, Hara Y: Topical application of sonicated and heat-treated *Staphylococcus aureus* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* into rat gingival sulcus induces periodontal tissue destruction after immunization, 7th Conference of the European Federation of Periodontology, Wien, Austria, 2012

Sato K, Yoshioka H, Yoshimura A, Kaneko T, Hara Y: Analysis of the pro-inflammatory property of subgingival plaque, First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species, Nagasaki, Japan 2012

Yoshimura A, Sato K, Kaneko T, Li X, Matsumura H, Ogata Y, Hara Y: A single nucleotide polymorphism rs11536889 in 3'-untranslated region of TLR4 contributes to the regulation of Toll-like receptor 4 expression, The 12th Biennial International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting, Tokyo, Japan, 2012

Nakamura H, Yoshimura A, Kaneko T, Latz E, Hara Y: The crystals in dental calculus accelerate IL-1 β production through activation of NLRP3 inflammasome in mouse macrophage and human peripheral polymorphonuclear leukocyte, 12th Biennial International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting, Tokyo, Japan, 2012

Kaneko T, Kishimoto T, Ukai T, Yokoyama M, Yoshimaga Y, Sato K, Yoshimura A, Hara T: Peptidoglycan and lipopolysaccharide synergistically enhance bone resorption and osteoclastogenesis, The 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, Los Angeles, CA, 2012

Sato K, Yoshimura A, Kaneko T, Kishimoto T, Matsumura H, Li X, Ogata Y, Hara Y: Effects of rs11536889 G/C polymorphism on Toll-like receptor 4 expression, The 98th Annual Meeting of American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, Los Angeles, CA, 2012

[図書] (計 1 件)

吉村篤利、佐藤佳昌、金子高士、原宜興
TLR4 遺伝子多型 rs11536889 の Toll-like
receptor 4 発現調整への関与。P.21-25. エ
ンドトキシン・自然免疫研究 16, 自然免
疫から自然炎症へ、編集日本エンドトキ
シン・自然免疫研究会、三宅健介、谷徹、
横地高志、医学図書出版株式会社、2012

[その他]

ホームページ等

<http://www.fdcnet.ac.jp/cod/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子高士 (KANEKO Takashi)

福岡歯科大学・口腔医療センター・教授

研究者番号：10284697

(2)研究分担者

原宜興 (HARA Yoshitaka)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60159100

吉村篤利 (YOSHIMURA Atsutoshi)

長崎大学・大学院石薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70253680