

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：27102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659841

研究課題名(和文) グルカンの自然免疫における機能発現のメカニズム解明のための生体高分子化合物の開発

研究課題名(英文) Development of biopolymer compound to elucidate the effect of glucan on innate immune system

研究代表者

西原 達次 (NISHIHARA, Tatsuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80192251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)： 1-3グルカンであるcurdlanを単球・マクロファージ系細胞であるRAW264.7細胞のdectin-1過剰発現株に添加し、破骨細胞分化因子(RANKL)存在下に培養を行った。RANKLにより誘導される破骨細胞形成および骨吸収活性はcurdlanにより、著しく抑制された。この抑制効果は野生株のRAW264.7細胞では軽微であった。また、破骨細胞分化に関わる分子であるNFATc1についても、RANKLによる発現亢進がcurdlanの添加により有意に抑制された。以上から、curdlanはdectin-1を介して単球・マクロファージ系細胞の破骨細胞への分化を負に制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Several immune system cell-surface receptors are reported to be associated with osteoclastogenesis. Dectin-1, a lectin receptor for beta-glucan, is found predominantly on cells of the myeloid lineage. In the present study, we examined the effect of dectin-1 agonist, curdlan, on osteoclastogenesis. In dectin-1 over-expressing RAW 264.7 cells (d-RAW), curdlan suppressed receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) ligand (RANKL)-induced osteoclast differentiation, bone resorption and actin-ring formation. Furthermore, curdlan inhibited RANKL-induced nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1) expression.

In conclusion, our results demonstrate that curdlan potentially inhibits osteoclast differentiation, especially NFATc1 expression. This suggests activation of curdlan-dectin-1 interaction critically regulates the genes required for osteoclastogenesis.

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：医歯薬学/歯学/病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：マクロファージ 1-3グルカン dectin-1 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は核酸やタンパク質に次ぐ第3の“生体高分子”であり、生体内での分子認識の機能に注目が集まっている。また、糖鎖は炎症部位へのリンパ球のホーミングや細胞の増殖・分化・接着の際の細胞の認識信号物質として重要な役割を果たしている。Gordonらは、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞上のdectin-1とよばれる-1,3グルカン受容体が発現していることを報告した。-1,3グルカンは真菌の細胞壁に多く存在しており、自然免疫の活性化に関する報告がなされているが、その詳細な生物学的機能は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、-1,3グルカンを自然免疫に及ぼす影響について、マクロファージを対象に解析を行った。-1,3グルカンは真菌の細胞壁に存在し、マクロファージによる貪食や活性酸素産生、サイトカイン産生などの生体防御機構に関与することが示唆されているが、dectin-1を介するこのパターン認識機構は-1,3グルカンの構造多様性等の理由から不明な点が多い。このため、種々の-1,3グルカンのマクロファージ細胞との親和性、そしてマクロファージのphenotypeや機能におよぼす影響について分子生物学的手法を用いて解析した。

3. 研究の方法

平成24年度から25年度にかけて、マクロファージを用いてdectin-1と自然免疫における役割を解析していくなかで、破骨細胞分化という観点で興味深い知見が得られた。そこで、最終年度において、マクロファージ系細胞で、破骨細胞分化因子(RANKL)存在下で破骨細胞に分化するRAW264.7細胞を用いた分子レベルで検証を加えた。

4. 研究成果

RAW264.7細胞のdectin-1過剰発現株(d-RAW)に、RANKLおよび1-3グルカンの1つcurdlanを添加して培養を行った。培養後の細胞に対して、酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)染色を行い、形成された破骨細胞数を計測した。図1に示すように、curdlanの添加により、d-RAWの破骨細胞への分化は有意に抑制された。しかしながら、dectin-1を過剰発現していないcontrol細胞(c-RAW)ではその抑制効果がほとんど観察されなかった。

以上のことからcurdlanによる破骨細胞分化抑制作用は特異的な受容体であるdectin-1との相互作用を介して誘導されることが示唆された。

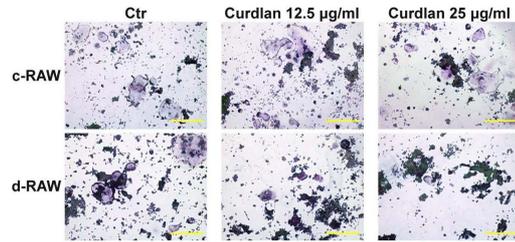


図1. RAW264.7細胞の破骨細胞分化に対するcurdlanの影響

RANKL刺激により、c-RAW、d-RAWともにTRAP陽性多核細胞である破骨細胞への分化が誘導された。curdlanの添加により、dectin-1過剰発現株において、破骨細胞の形成の著明な減少が観察された。

また、d-RAWに対して、同様の培養をリン酸カルシウム被覆プレート上で行い、骨吸収活性について、観察を行ったところ、RANKLにより誘導される骨吸収窩の形成は、curdlanの併用添加により、抑制されることが示された(図2)。



図2. RAW264.7細胞由来の破骨細胞の骨吸収活性に対するcurdlanの影響

d-RAWに対するRANKL刺激により、分化した破骨細胞の骨吸収活性は、curdlanの添加により、有意に抑制された。

成熟した破骨細胞はアクチンリングと呼ばれる特異な構造を形成し、骨吸収能を増強することが知られている。curdlanの添加により、RANKLにより誘導されるアクチンリングの形成の抑制も観察された(図3)。



図3. RAW264.7細胞由来の破骨細胞のアクチンリング形成に対するcurdlanの影響

蛍光免疫染色法にて細胞を観察したところ、RANKLにより誘導されるアクチンリングの形成は、curdlanの添加により限弱した。

このcurdlanによる破骨細胞の負の制御のメカニズムの解明のため、破骨細胞分化のマスター分子であるNFATc1の発現についてWestern blot法を用いて検討した。RANKLにより、c-RAW、d-RAWともにNFATc1のタンパク質発現は著しく亢進した。この亢進はd-RAWにおいて、curdlanの添加により抑制される一方で、c-RAWでは抑制されなかった(図4)。

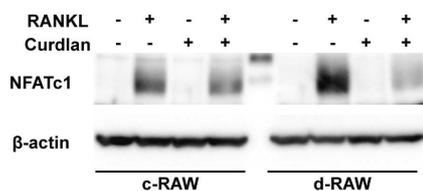


図 4. RAW264.7 細胞の NFATc1 発現に対する curdlan の影響

RANKL 刺激により、c-RAW、d-RAW ともに破骨細胞分化のマスター分子である NFATc1 の発現が誘導された。curdlan の添加により、dectin-1 過剰発現株において、NFATc1 の発現誘導が抑制された。

以上の結果から、curdlan が破骨細胞前駆細胞上の dectin-1 との相互作用により、破骨細胞の分化および、骨吸収活性を負に制御することが明らかとなった。またその抑制メカニズムとして、NFATc1 の発現抑制が関与していることが明らかとなった。現在その詳細な分子メカニズムについて、検討中であるが、これらのことが、明らかになることにより、歯科医学における生体分子の知見が集積され、炎症学のさらなる発展につながると考えられている。

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 14 件)

有吉 渉, 西原 達次 歯周炎におけるマクロファージの機能の多様性 第 3 回炎症性骨吸収に対するマクロファージの関与 日本歯科評論, 査読無, 2012, 第 842 号 149-152.

沖永 敏則, 西原 達次 歯周炎におけるマクロファージの機能の多様性 第 2 回 マクロファージにおける炎症応答でのインフラマソームの役割 日本歯科評論, 査読無, 2012, 第 841 号, 153-155.

秋房 住郎, 西原 達次, 歯周炎におけるマクロファージの機能の多様性 第 1 回 マクロファージの機能に対するアディポネクチンの役割と歯周疾患との関連, 日本歯科評論, 査読無, 2012, 第 840 号 155-157.

Ariyoshi W, Okinaga T, Knudson CB, Knudson W, Nishihara T, High Molecular Weights Hyaluronic Acid Regulates Osteoclast Formation by Inhibiting Receptor Activator of NF-kappaB Ligand through Rho Kinase, Osteoarthritis cartilage, 査読有, 2014, 22 (1): 111-20.

DOI: 10.1016/j.joca.2013.10.013.

Kakudate N, Muramatsu T, Endoh M, Satomura K, Koseki T, Sato Y, Ito K, Ogasawara T, Nakamura S,

Kishimoto E, Kashiwazaki H Yamashita Y, Uchiyama K, Nishihara T, Kiyohara Y, Kakinoki Y, Factors associated with dry mouth in dependent Japanese elderly, Gerodontology, 査読有, 2014, 31 (1): 11-18.

DOI: 10.1111/j.1741-2358.2012.00685.x.

Diala I, Sato S, Usui M, Nakashima K, Nishihara T, Takenaka S, Development of a Membrane-based Micro-wave-mediated Electrochemical ELISA Method for TNF-α Detection in Patients with Periodontitis, Anal Sci, 査読有, 2013 29 (9): 927-930.

https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/29/9/29_927/_pdf.

Mori K, Sato S, Kodama M, Habu M, Takahashi O, Nishihara T, Tominaga K, Takenaka S, Oral cancer diagnosis via a ferrocenylnaphthalene diimide-based electrochemical telomerase assay. Clin Chem, 査読有, 2013, 59 (1): 289-295.

DOI: 10.1373/clinchem.2012.191569.

Mizutani H, Ishihara Y, Izawa A, Fujihara Y, Kobayashi S, Gotou H, Okabe E, Takeda H, Ozawa Y, Kamiya Y, Kamei H, Kikuchi T, Yamamoto G, Mitani A, Nishihara T, Noguchi T, Lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* upregulates inflammatory cytokines, PGE2 synthesis, and osteoclast formation in IL-1Ra deficient mice. J Periodont Res, 査読有, 2013, 48 (6): 748-756.

DOI: 10.1111/jre.12065.

Fujii S, Okinaga T, Ariyoshi W, Takahashi O, Iwanaga K, Nishino N, Tominaga K, Nishihara T, Mechanisms of G1 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells induced by hybrid-compound histone deacetylase inhibitor, Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 2013, 434 (3): 413-420.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.043.

Kataoka Y, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Takahashi T, Nishihara T, Mechanisms involved in suppression of ADAMTS4 expression in synoviocytes by high molecular weight hyaluronic acid. Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 2013, 432 (4): 580-585.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.043.

Morishita M, Ariyoshi W, Okinaga T,

Usui M, Nakashima K, Nishihara T, A. *actinomycetemcomitans* LPS enhances form cellformation induced by LDL, J Dent Res, 査読有, 2013, 92 (3): 241-246.

DOI: 10.1177/0022034512473309.

Okinaga T, Ariyoshi W, Akifusa S, Nishihara T. Essential role of JAK/STAT pathway in the induction of cell cycle arrest in macrophages infected with periodontopathic bacterium *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Medical Microbiol Immunol, 査読有, 2013, 202 (2): 167-174.

DOI: 10.1007/s00430-012-0282-x.

Yoshida A, Ennibi OK, Miyazaki H, Hoshino T, Hayashida H, Nishihara T, Awano S, Ansai T. Quantitative discrimination of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* highly leukotoxic JP2 clone from non-JP2 clones in diagnosis of aggressive periodontitis, BMC Infect Dis, 査読有, 2012, 12: 253.

DOI: 10.1186/1471-2334-12-253.

Mitsugi S, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Kataoka Y, Takahashi T, Nishihara T. Mechanisms involved in inhibition of chondrogenesis by activin-A, Biochem Biophys Res Commun, 査読有, 2013, 420 (2): 380-384.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.003.

〔学会発表〕(計 40 件)

【平成 25 年度】

沖永敏則, 有吉渉, 西原達次, Dectin-1 activation inhibits an inflammatory response to bacterial infection, 第 87 回 日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26 日-28 日、東京

小原成将, 秋房住郎, 臼井通彦, 笠井宏記, 有吉渉, 沖永敏則, 西原達次, 新規アディポカイン apelin による炎症反応に対する影響、第 55 回 歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20-22 日、岡山

山崎徹, 有吉渉, 沖永敏則, 細川隆司, 西原達次, Curdlan-dectin-1 を介した新たな破骨細胞分化の制御機構、第 55 回 歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20-22 日、岡山

廉晃勲, 鷺尾絢子, 有吉渉, 北村知昭, 西原達次, 象牙芽細胞様細胞に対する多血小板血漿の作用、第 55 回 歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20-22 日、岡山

西藤法子, 有吉渉, 沖永敏則, 鷺尾絢

子, 北村知昭, 西原達次, アメロブラスチンは口腔上皮細胞の細胞増殖を抑制する、第 55 回 歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20-22 日、岡山
沖永敏則, 有吉渉, 西原達次, 歯周病細菌感染マクロファージにおけるインフラマソーム活性、第 55 回 歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20-22 日、岡山

Nishihara T, Periodontal diseases in elderly patients, The Scientific Meeting of TADOH, September 16, 2013, Kaohsiung, Taiwan

Okinaga T, Ariyoshi W, Usui M, Nishihara T, Inflammasome activation via periodontopathic bacterial infection in macrophage, 2nd meeting of IADR-Asia Pathific Region, August 21-23, 2013, Bangkok, Thailand

Ariyoshi W, Okinaga T, Knudson CB, Knudson W, Nishihara T, High molecular weights hyaluronic acid regulates osteoclastogenesis. Hyaluronan 2013, June 2-7, 2013, Oklahoma, USA

Kataoka Y, Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T, High molecular weight hyaluronan down-regulates the expression of ADAMTS4 via p38 MAPK signaling pathway in human synoviocytes, 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 28-June 1, 2013, Kobe, Japan

Yamazaki T, Ariyoshi W, Okinaga T, Hosokawa R, Nishihara T, Curdlan regulates osteoclastic differentiation and function, 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 28-June 1, 2013, Kobe, Japan

Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T, Inhibitory effect of hyaluronic acid on osteoclastogenesis via Rho kinase 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research, May 28-June 1, 2013, Kobe, Japan

Saito N, Washio A, Nishihara T, Kitamura C, Inhibitory Effect of Ameloblastin on Epithelial Cells, IFEA, May 23-26, 2013, Tokyo, Japan

Nakagawa A, Washio A, Hirata-Tsuchia S, Terashita M, Nishihara T, Kitamura C, Effects of Newly Developed Bioglass Cement on Cell Morphology and Viability, IFEA, May 23-26, 2013,

Tokyo, Japan

小原成将, 秋房住郎, 臼井通彦, 笠井宏記, 中島啓介, 西原達次, 新規アディポカイン apelin は LPS の誘導する炎症反応を抑制する、第 56 回 春季日本歯周病学会学術大会、2013 年 5 月 31 日-6 月 1 日、船堀

山崎徹, 有吉涉, 正木千尋, 中本哲自, 西原達次, 細川隆司 Curdlan は Dectin-1 を介して破骨細胞形成を抑制する、第 122 回 日本補綴歯科学会学術大会 2013 年 5 月 18-19 日、福岡

中川愛加, 沖永敏則, 鷺尾絢子, 寺下正道, 北村知昭, 西原達次 PC 1 2 細胞の神経細胞分化に対する各種セメントの影響、第 74 回九州歯科学会総会、2013 年 5 月 18-19 日、北九州

西藤法子, 蔵満幸子, 有吉涉, 沖永敏則, 北村知昭, 山口和憲, 西原達次, アメロプラスチン発現による上皮細胞増殖への影響について、第 74 回九州歯科学会総会、2013 年 5 月 18-19 日、北九州

小原成将, 秋房住郎, 臼井通彦, 笠井宏記, 有吉涉, 沖永敏則, 西原達次, 中島啓介, 新規アディポカイン apelin の免疫機能に対する影響について、第 74 回九州歯科学会総会、2013 年 5 月 18-19 日、北九州

廉晃勲, 鷺尾 絢子, 有吉涉, 北村知昭, 西原達次、象牙芽細胞様細胞の抗炎症能と分化能に与える多血小板血漿の影響、第 74 回九州歯科学会総会、2013 年 5 月 18-19 日、北九州

【2012 年度】

Fujii S, Okinaga T, Ariyoshi W, Takahashi O, Iwanaga K, Habu M, Tominaga K, Nishihara T, The effect of HDAC inhibitor on mouse myeloma cells. IADR March 20-23, 2013, Seattle, USA
Kataoka Y, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Takahashi T, Nishihara T, High-molecular-weight hyaluronic acid down-regulates the expression of ADAMTS4 in synoviocytes, IADR March 20-23, 2013, Seattle, USA

Saito N, Kuramitsu S, Washio A, Ariyoshi W, Kitamura C, Nishihara T, Role of ameloblastin on epithelial cells proliferation IADR March 20-23, 2013, Seattle, USA

Yamasaki T, Ariyoshi W, Okinaga T, Hosokawa R, Nishihara T, Effect of Dectin-1 signaling on osteoclastogenesis, IADR March 20-23, 2013, Seattle, USA

岡橋暢夫, 沖永敏則, 桜井敦朗, 寺尾豊, 中田匡宣, 川端重忠, 西原達次, *Streptococcus sanguinis* はマクロファージの泡沫化と細胞死を誘導する、第

86 回 日本細菌学会総会 2013 年 3 月 18-20 日、幕張

常岡祐介, 前田憲成, 沖永敏則, 西原達次, 歯周病細菌の生育を抑制・阻害する緑膿菌分泌物の作用機構の追及、第 86 回 日本細菌学会総会 2013 年 3 月 18-20 日、幕張

沖永敏則, 有吉涉, 西原達次, 歯周病原性細菌マクロファージのピロトーム誘導におけるインフラマソームの役割、第 86 回 日本細菌学会総会 2013 年 3 月 18-20 日、幕張

Morishita M, Okinaga T, Ariyoshi W, Nakashima K, Nishihara T, New detection system for the adhesion of oral bacteria on macrophages in vitro. International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu, January 26, 2013, Kitakyushu, Japan

Okinaga T, Ariyoshi W, Nishihara T. The involvement of inflammasome in mouse macrophage infected with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu, January 26, 2013, Kitakyushu, Japan

Washio A, Nakagawa A, Nishihara T, Kitamura C, Physicochemical properties of newly developed bioactive glass cement and its effect on various cell responses, The fifth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, October 26, 2012, Kitakyushu, Japan

Fujii S, Fukuda K, Okinaga T, Ariyoshi W, Nakashima K, Nishihara T, Sarai A, Sato S, Takenaka S. A simple approach to test periodontal disease from saliva using fourier transform infrared spectroscopy, The fifth Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology, October 26, 2012, Kitakyushu, Japan

有吉涉, 沖永敏則, 西原達次, 破骨細胞支持能に対する高分子ヒアルロン酸の抑制効果について、第 54 回 歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 14-16 日、郡山

安永愛, 吉田明弘, 西原達次, 安細敏弘, 歯面初期定着菌群との共培養における *Streptococcus mutans* 抗酸化タンパク質の機能解析、第 54 回 歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 14-16 日、郡山

沖永敏則, 有吉涉, 西原達次, 歯周病原性細菌はマクロファージにおける pyroptosis を誘導する、第 54 回 歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 14-16 日、郡山

山崎徹, 有吉涉, 沖永敏則, 細川隆司,
西原達次、破骨細胞文化における
Dect in-1 の作用について、第 54 回 歯
科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月
14-16 日、郡山

片岡良浩, 有吉涉, 西原達次、マクロフ
ァージ及び滑膜細胞におけるプロテア
ーゼ産生に及ぼすヒアルロン酸の影響
第 33 回日本炎症・再生医学会、 2012
年 7 月 5 日・ 6 日、福岡

井上真紀, 藤井誠子, 片岡良浩, 守下昌
輝, 沖永敏則, 有吉涉, 西原達次、マク
ロファージ食食機能におけるデクチ
ンの役割について、第 72 回九州歯科学
会総会、2012 年 5 月 19・20 日、北九州
中島啓介, 北村知昭, 西原達次、歯・歯
周組織疾患と動脈硬化の関連について、
第 72 回九州歯科学会総会、2012 年 5 月
19・20 日、北九州

北村知昭, 吉居慎二, 寺下正道, 西原達
次、歯科医療産業への展開を目指した根
管および歯周組織の微細構造観察用高
解像度デバイスの開発、第 72 回九州歯
科学会総会、2012 年 5 月 19・20 日、北
九州

西原達次, 金子明寛、口腔内における
難治性感染症, 耐性菌感染症の治療、
第 60 回 日本化学療法学会学術集会
シンポジウム、2012 年 4 月 26 日・27
日、長崎

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kyu-dent.ac.jp/research/lecture/infection_molecule

6. 研究組織

(1)研究代表者

西原 達次 (NISHIHARA, Tatsuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80192251

(2)研究分担者

有吉 涉 (ARIYOSHI, Wataru)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40405551

(3)連携研究者

沖永 敏則 (OKINAGA, Toshinori)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60582773