

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890006

研究課題名(和文)細胞外寄生細菌の細胞内センサーによる認識機構の解明

研究課題名(英文)Recognition mechanisms of extracellular bacteria by intracellular sensors.

研究代表者

佐伯 歩 (SAEKI, Ayumi)

北海道大学・歯学研究科(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) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外寄生細菌である口腔連鎖球菌*S. mutans*、*S. gordonii*ならびに*S. sanguinis*は、A/Jマウス由来樹状細胞XS-106に菌量依存的にIL-1bの産生を誘導する活性を有していた。*S. sanguinis*のIL-1b産生誘導活性はcaspase-1ならびにNLRP3依存的であった。本研究により、口腔連鎖球菌はマウス樹状細胞にNLRP3インフラマソームを活性化し、IL-1bの産生を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：*S. mutans*, *S. gordonii* and *S. sanguinis*, as extracellular pathogens, which are normal inhabitants of the human oral cavity, induced IL-1b production by the dendritic cell line XS-106 cells derived from A/J mice in dose-dependent manners. The activity of *S. sanguinis* to induce IL-1b production was dependent on caspases-1 and NLRP3. Thus, this study suggests that oral streptococci activate NLRP3 inflammasome to produce IL-1b in murine dendritic cells.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：インフラマソーム 口腔連鎖球菌

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで human embryonic kidney 293 細胞を用いた NF- κ B ルシフェラーゼ法により、細胞外寄生細菌である口腔レンサ球菌 (*S. mutans* ならびに *S. gordonii*) の野生株とリポタンパク質欠損株の生菌が細胞内のセンサーである nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) で認識され (Pathog Dis, 68:3, 2013)、また、熱処理した死菌は認識されないこと、さらに、これらの菌株はヒト単球系細胞株 THP-1 細胞に IL-1 β 産生を誘導することを見いだした。

近年、細胞内に存在する自然免疫系の病原体パターン認識機構の一つとして NOD-like receptors (NLRs) が注目されており、細胞内寄生細菌だけではなく、細胞外寄生細菌の認識にも関与していることが報告されている (Immunological Reviews 243:9, 2011)。NLRs の中で NOD2 はグラム陽性菌あるいはグラム陰性菌のペプチドグリカンの生合成あるいは分解産物であるムラミルジペプチドを認識し、転写因子 NF- κ B や mitogen-activated protein kinases (MAPKs) の活性化を誘導することが知られている

(Immunity 27:549, 2007)。また、THP-1 細胞からの IL-1 β の産生には細胞内にあるシグナルの複合体インフラマソームの活性化が関与しているものと推測される。そこで、細胞外寄生細菌がどのようなメカニズムで細胞質にある NOD2 と出会うのか、また、どのようなメカニズムでインフラマソームの活性化を誘導するのかに興味を覚え、そのメカニズムを明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞外寄生細菌である *S. mutans*, *S. gordonii* ならびに *S. sanguinis* がどのようなメカニズムで細胞内センサーに認識され、また、どのようなメカニズムでインフラマソームを活性化し、IL-1 β の産生を誘導するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

菌株は *S. mutans* 109c (Sm), *S. gordonii* Challis (Sg) ならびに *S. sanguinis* ATCC 10556 (Ss) を用い、標的細胞としては A/J マウス由来樹状細胞 (XS-106 細胞) を用いた。IL-1 β の産生は ELISA 法と Western blot 法で評価した。ROS の産生と細胞死の形態はフローサイトメトリーで分析した。

4. 研究成果

Sm, Sg ならびに Ss の生菌ならびに熱処理した菌体 (100°C で 5 分間) は、XS-106 細胞に菌量依存的に IL-1 β の産生を誘導する活性を有していた (図 1)。Ss の IL-1 β 産生誘導活性は pan-caspase ならびに caspase-1 阻害剤である z-VAD-fmk ならびに z-YVAD-fmk で阻害され (図 2)、さらに caspase-1 の mRNA の

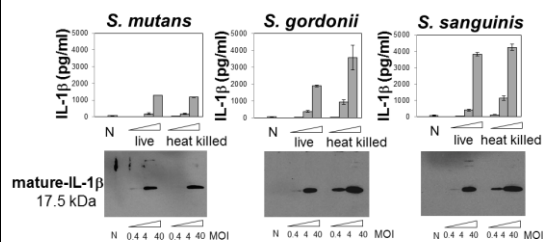


図1. *S. mutans*, *S. gordonii* ならびに *S. sanguinis* はマウス樹状細胞 XS-106 に IL-1 β の産生を誘導する

ノックダウンにより抑制された (図 3)。Ss の IL-1 β 産生誘導活性は NLRP3 特異的 siRNA を安定発現する XS-106 細胞において有意に低下した (図 4)。さらに、Ss による刺激で reactive oxygen species (ROS) が産生され (図 5)、また、ROS の阻害剤 (N-acetylcysteine) で IL-1 β の産生が抑制された (図 6)。さらに、Ss による刺激は XS-106 細胞にネクロシス様の細胞死を誘導した (図 7)。

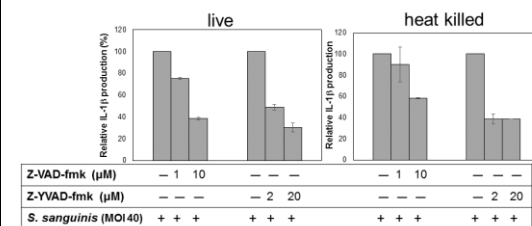


図2. *S. sanguinis* の IL-1 β の産生誘導活性は caspase-1 依存的である

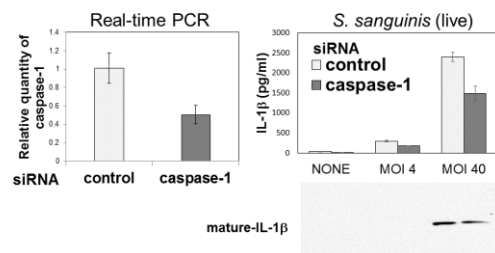


図3. *S. sanguinis* の IL-1 β の産生誘導活性は caspase-1 の RNA 干渉により阻害される

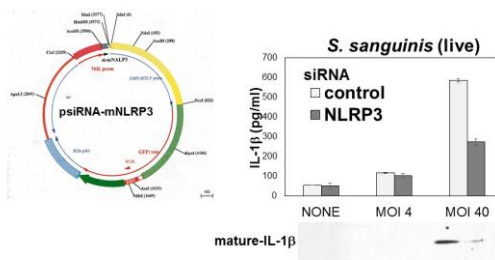


図4. *S. sanguinis* の IL-1 β の産生誘導活性には NLRP3 が関与する

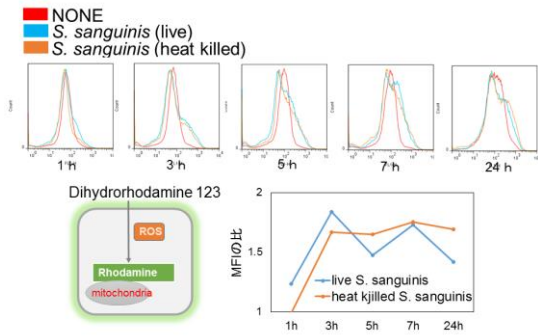


図5. *S. sanguinis*はXS-106細胞にROSの産生を誘導する

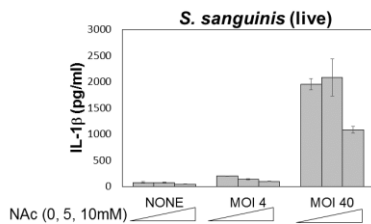


図6. *S. sanguinis*のIL-1βの産生誘導活性はROSの阻害剤(N-acetylcysteine)により阻害される

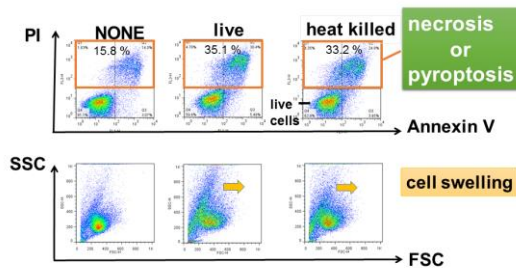


図7. *S. sanguinis*はXS-106細胞に細胞死(pyroptosis)を誘導する

以上の結果から、Ss菌体はマウス由来樹状細胞にNLRP3インフラマゾームを活性化し、IL-1βの産生ならびに細胞死を誘導することが示唆された。また、その活性化にはROSの産生が関与している可能性が示唆された。

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4件)

① Segawa T, Saeki A, Hasebe A, Kataoka H, Arimoto T, Yokoyama A, Kawanami M, Shibata K, Differences in recognition of wild-type and lipoprotein-deficient strains of oral Streptococci in vitro and in vivo, Pathog Dis, 68(3), 65-77, 2013, 査読有
DOI: 10.1111/2049-632X.12049

② Saeki A, Segawa T, Abe T, Sugiyama M, Arimoto T, Hara H, Hasebe A, Ohtani M, Tanizume N, Ohuchi M, Kataoka H, Kawanami M, Yokoyama A, Shibata K, Toll-like

receptor 2-mediated modulation of growth and functions of regulatory T cells by oral streptococci, Mol Oral Microbiol, 28(4), 267-80, 2013, 査読有
DOI: 10.1111/omi.12023

③ Hasebe A, Ishikawa I, Shamsul HM, Ohtani M, Segawa T, Saeki A, Tanizume N, Oouchi M, Okagami Y, Okano T, Shibata K, Mycoplasma removal from cell culture using antimicrobial photodynamic therapy, Photomed Laser Surg, 31, 1-7, 2013, 査読有
DOI: 10.1089/pho.2012.3372

④ Ishida K, Kubo T, Saeki A, Yamane C, Matsuo J, Yimin, Nakamura S, Hayashi Y, Kunichika M, Yoshida M, Takahashi K, Hirai I, Yamamoto Y, Shibata K, Yamaguchi H, Chlamydomonas pneumoniae in human immortal Jurkat cells and primary lymphocytes uncontrolled by interferon-γ, Microbes Infect, 15, 192-200, 2013, 査読有
DOI: 10.1016/j.micinf.2012.11.006

[学会発表] (計11件)

① 佐伯 歩、長谷部 晃、中澤 太、柴田 健一郎 *Streptococcus sanguinis*によるマウス樹状細胞のNLRP3インフラマゾームの活性化、第87回日本細菌学会総会、2014年3月26~28日、タワーホール船堀(東京)

② 長谷部 晃、佐伯 歩、柴田 健一郎、*Candida albicans*によるマクロファージ/樹状細胞へのIL-1β産生誘導について、第87回日本細菌学会総会、2014年3月26~28日、タワーホール船堀(東京)

③ Saeki A, Hasebe A, Shibata K, Activation of inflammasome in murine dendritic cells by *Streptococcus sanguinis*, 第42回日本免疫学会学術集会、2013年12月11~13日、幕張メッセ(千葉)

④ 佐伯 歩、杉山 正博、長谷部 晃、中澤 太、柴田 健一郎、*Streptococcus sanguinis*によるインフラマゾームの活性化、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月20~22日、岡山コンベンションセンター(岡山)

⑤ 長谷部 晃、佐伯 歩、杉山 正博、柴田 健一郎、*Candida albicans*によるIL-1β産生誘導のメカニズム、第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、2013年9月20~22日、岡山コンベンションセンター(岡山)

⑥ 佐伯 歩、長谷部 晃、中澤 太、柴田 健

一郎、口腔レンサ球菌 *Streptococcus sanguinis* によるインフラマゾームの活性化、第 80 回日本細菌学会北海道支部会学術総会、2013 年 8 月 30～31 日、東京農業大学（網走）

⑦ 杉山 正博、佐伯 歩、長谷部 晃、柴田 健一郎、マイコプラズマによるインフラマゾームの活性化、日本マイコプラズマ学会第 40 回学術集会、2013 年 5 月 23～24 日、秋葉原 UDX GALLERY（東京）

⑧ 佐伯 歩、大谷 誠、長谷部 晃、中澤 太、柴田健一郎、Recognition of oral streptococci by intracellular sensors, NODs, and inflammasome、第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18～20 日、幕張メッセ（千葉）

⑨ 大内 学、佐伯 歩、柴田 健一郎、Expression and function of Toll-like receptors and NK activity in oral candidiasis and aging、第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18～20 日、幕張メッセ（千葉）

⑩ 佐伯 歩、柴田 健一郎、口腔レンサ球菌によるインフラマゾームの活性化、第 5 回口腔環境制御研究カテゴリー集会、2013 年 2 月 1 日、長崎大学（長崎）

⑪ 原 博志、佐伯 歩、長谷部 晃、柴田 健一郎、口腔連鎖球菌の抗腫瘍活性、第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 14～16 日、奥羽大学（郡山）

〔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
北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講

座口腔分子微生物学教室ホームページ
<http://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・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：70638345

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし