

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462842

研究課題名(和文) 口腔扁平苔癬発症におけるインフラマソームの関わり

研究課題名(英文) Involvement of NLRP3 inflammasome in oral lichen planus

研究代表者

北村 直也 (KITAMURA, Naoya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：70351921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平苔癬(OLP)の病因は未だ明らかにされていないが、局所におけるサイトカインの亢進に基づく粘膜上皮細胞に対する過剰な免疫応答の可能性が示唆されている。そこで、本研究では外来性および内在性の危険分子を認識してCaspase-1を活性化し、IL-1、IL-18の分泌、さらには、細胞死を促す細胞質内タンパク質複合体であるNLRP3インフラマソームの活性化がOLPの病態形成に参与しているのかを検討した。その結果、口腔粘膜上皮細胞およびマクロファージにおいて金属ナノ粒子がインフラマソームを活性化し、IL-1の分泌を誘導することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although the pathogenesis of oral lichen planus (OLP) has not been elucidated, the possibility of an immune response based on localized excessive cytokine toward mucosal epithelial cells has been suggested. In this study, we investigated whether the activation of NLRP3 inflammasome is involved in the pathogenesis of OLP. As a result, it was revealed that the activation of NLRP3 inflammasome by metal nanoparticles in the oral mucosal epithelial cells and macrophages was involved with the pathogenesis of OLP.

研究分野：口腔外科

キーワード：インフラマソーム 口腔扁平苔癬

1. 研究開始当初の背景

近年、自己免疫疾患、癌、糖尿病、動脈硬化、アルツハイマーなどの神経変性疾患などの発症および重症化に慢性炎症が関与することが明らかとなってきたが、炎症反応遷延化の分子機序としてウイルス、細菌などの感染が関与せず、内因性の細胞由来成分による自然免疫の活性化が炎症誘導に関わる可能性が示唆されている。自然免疫系の細胞（主に抗原提示細胞）はパターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptors; PRR) を発現しており、Danger Signal を迅速に認識することで免疫系の活性化が開始される。PRR には抗原関連分子パターン (pathogen associated molecular patterns; PAMPs) (LPS、ペプチドグリカン、ウイルス由来 ssRNA など) を認識する TLRs 以外に、細胞質で働く NLR (NOD-like receptors)ファミリーや RLHs (RIG-like helicase) ファミリーがあり、その中で NLR ファミリーは微生物由来成分に加え、傷害を受けた細胞から放出されるダメージ関連分子パターン (Danger Associated Molecular Patterns; DAMPs) といわれる内因性の細胞由来成分 (壊死によって放出された熱ショックプロテイン (heat shock protein ; hsp)、HMGB1 (High Mobility Group Box-1)、dsDNA、ATP、尿酸結晶など) を認識し、アダプタータンパク質の ASC、Pro-Caspase-1 と会合してインフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体を形成して Caspase-1 を活性化し、炎症性サイトカインである IL-1 や IL-18 の産生・分泌を促進して、炎症反応やアレルギーを誘導することが報告されている (図 1)。

これまで我々は、口腔扁平苔癬 (Oral lichen planus; OLP) に関して臨床的に検討するとともに、その病理・病態についても種々の検討を行ない、以下の点を明らかにした。 OLP 病変部より分離した粘膜上皮細胞のサイトカイン産生は亢進しており、その促

進因子として Lipopolysaccharide (LPS) や温熱刺激などが考えられる (*J Oral Pathol Med* 23;309:1994, *J Invest Dermatol* 104;784:1995)

上皮下の炎症性細胞浸潤はケラチノサイトから分泌されたサイトカインによって遊走・浸潤する (*J Clin Immunol* 20;294:2000)

上皮下および上皮内の浸潤細胞はそれぞれ主として CD4 陽性、CD8 陽性細胞からなり、浸潤細胞の程度と基底膜の破壊・消失の程度とは相関している (*Path Res Pract* 185;218:1989, 186;625:1990)、病変部の浸潤リンパ球はランゲルハンス細胞やマクロファージよりシグナルを受け、ケラチノサイトを傷害する (*Path Res Pract* 188:1033:1992)

OLP 患者の末梢血単球および病変部ケラチノサイトでは Toll-like receptor (TLR)2/4 の発現が亢進しており、TLR2/4 リガンドによる単球からのサイトカイン産生も亢進している (*The Journal of Dermatology* 37:1:2010)。これらの結果から OLP の発症機序として、何らかの外的刺激を受けた上皮細胞が TLR2/4 のシグナルを介してサイトカインを産生、リンパ球浸潤を促し、ランゲルハンス細胞やマクロファージにより抗原提示を受けた浸潤リンパ球がケラチノサイトを傷害するという病因が示唆されるが、それだけでは説明しきれず、別のシグナルの関与も考えられる。そこで、本研究では OLP の発症および病態形成における NLRP3 インフラマソームの関与について検討した。

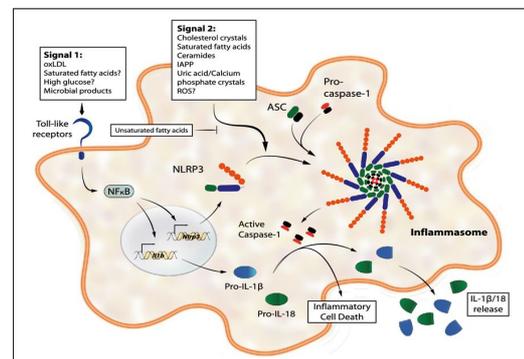


図 1 : NLRP3 インフラマソームの活性化 1)

2. 研究の目的

口腔扁平苔癬(OLP)は中高年の女性に好発する難治性の慢性炎症性疾患で、時に悪性化を来すことはよく知られている。その病因についてはこれまで多くの研究者によって色々な観点より研究されてきたが、未だ明らかにされていない。したがって、現在のところ副腎皮質ホルモン剤を中心とした薬剤による対症療法が中心に行われているのが現状であるが、これらの治療に抵抗性を示す症例も多数認められ、その根本的な治療法は確立されていない。そこで、本研究では OL P の根本的治療の確立を目指して、OLP の発症および病態におけるインフラマソームの関わりを明らかにする。

3. 研究の方法

58 症例の OL P 罹患口腔粘膜および健常口腔粘膜の生検組織を用いてパラフィン切片を作成し、インフラマソーム関連分子 (NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1) の発現を免疫組織化学的に比較検討する。

OLP10 例および 4 例の健常口腔粘膜組織より抽出した RNA を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行う。

不死化正常口腔粘膜上皮細胞 RT-7 を金および銀のナノ粒子で処理し、Caspase-1 の活性化を Western blot 法、IL-1 の産生レベルを ELISA 法にて検討するとともに、増殖能およびアポトーシス誘導能への影響をそれぞれ WST-1 assay、AnnexinV-PI によるフローサイトメトリー法にて検討する。

PMA で処理してマクロファージに分化させたヒト単球様細胞株 THP-1 を金および銀ナノ粒子で処理し、Caspase-1 の活性化を Western blot 法、IL-1 の産生レベルを ELISA 法にて検討するとともに、増殖能およ

びアポトーシス誘導能への影響をそれぞれ WST-1 assay、AnnexinV-PI によるフローサイトメトリー法にて検討する。

4. 研究成果

免疫組織化学染色による OL P58 例および健常口腔粘膜の臨床材料におけるインフラマソーム関連分子の発現の比較検討

表 1: 対象症例の内訳

| | | 例数 | (%) |
|------|---------|----|------|
| 性別 | 男性 | 13 | 22.4 |
| | 女性 | 45 | 77.6 |
| 年齢 | < 50 歳 | 12 | 20.7 |
| | 50 歳 | 46 | 79.3 |
| 部位 | 頬粘膜 | 40 | 69 |
| | 歯肉 | 9 | 15.5 |
| | 口唇 | 6 | 10.3 |
| | 舌 | 2 | 3.4 |
| | 口蓋 | 1 | 1.7 |
| 部位数 | 1 | 34 | 58.6 |
| | 2 | 24 | 41.4 |
| 臨床型 | 網状型 | 29 | 50 |
| | びらん・潰瘍型 | 16 | 27.6 |
| | 紅斑型 | 7 | 12.1 |
| | 白板型 | 6 | 10.3 |
| 病悩期間 | < 1 年 | 49 | 84.5 |
| | 1 年 | 9 | 15.5 |
| 治療効果 | 有効 | 43 | 74.1 |
| | 無効 | 15 | 25.9 |

対象症例の内訳を表 1 に示す。インフラマソーム関連分子の免疫組織学的検討を行った結果、OLP 罹患上皮ではインフラマソーム関連分子の発現は亢進しており、中でも Caspase-1 および IL-1 の発現が OL P 罹患組織で有意に増強していた。また、病悩期間が短く、頬粘膜を含んだ多発性の網状・白板型の OL P で、インフラマソーム関連分子が

強く発現していた。

cDNA マイクロアレイの結果、OLP 病変部上皮における症例において NLRP3、Caspase-1、IL-1 の mRNA レベルは、いずれも健常粘膜と比較して高値を示したが、なかでも NLRP3 の発現に有意差が認められた。

金および銀ナノ粒子処理により RT-7 の Caspase-1 の活性化が生じるとともに、IL-1

の産生レベルは濃度依存性に亢進したが、銀ナノ粒子よりも金ナノ粒子処理により、顕著な誘導効果が認められた。さらに、RT-7 の細胞増殖能は金ナノ粒子処理により若干低下し、銀ナノ粒子処理では、50 μ g/mL で強力に抑制された。RT-7 のアポトーシスへの影響に関しては、50 μ g/mL の銀、金ナノ粒子はともに、アネキシンおよび PI 陽性細胞率を増加させた。

金および銀ナノ粒子処理により THP-1 の Caspase-1 の活性化が生じるとともに、濃度依存性に IL-1 の産生レベルが亢進した。その効果は RT-7 よりも顕著に認められた。金属ナノ粒子処理により誘導される IL-1 β の産生亢進は Caspase-1 阻害剤である Ac-YVAD-cmk 処理により抑制された。さらに、両金属ナノ粒子は THP-1 の増殖能には影響しなかった。50 μ g/mL の銀ナノ粒子は、アネキシンおよび PI 陽性細胞率を増加させたが、金ナノ粒子による影響は認められなかった。

<参考文献>

1) Haneklaus M, O'Neill LA. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. Immunol Rev. 2015 May;265(1):53-62. doi: 10.1111/imr.12285.

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)

[学会発表] (計 4 件)

1. 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也 口腔粘膜上皮由来細胞およびマクロファージのインフラマソームに及ぼす金属ナノ粒子の影響 第71回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2017.4.26-28 ひめぎんホール(愛媛県松山市)
2. 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也 口腔粘膜上皮細胞のインフラマソームに及ぼす金属ナノ粒子の影響 第53回日本口腔組織培養学会学術大会 2016.11.18 石川県立美術館(石川県金沢市)
3. 笹部衣里、仙頭慎哉、北村直也、山本哲也 口腔粘膜ケラチノサイトのインフラマソームに及ぼす歯科用金属の影響 第70回NPO法人日本口腔科学会学術集会 2016.4.16-17 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
4. 笹部衣里、浜田真友子、CHONG LI、富田理生、仙頭慎哉、山本哲也 口腔扁平苔癬の病態形成におけるインフラマソームの関わり 第25回日本口腔内科学会学術大会 2015.9.18-19 大阪大学コンベンションセンター(大阪府吹田市)

[その他]

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_dntst/index.htm

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北村 直也 (KITAMURA, Naoya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号 : 70351921

(2)研究分担者

笹部 衣里 (SASABE, Eri)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・講師

研究者番号：40363288

山本 哲也 (YAMAMOTO, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・教授

研究者番号：00200824