

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463138

研究課題名(和文) 歯周病原細菌排除におけるカスパーゼの役割と炎症反応制御に関する研究

研究課題名(英文) The role of caspases in clearance of periodontal pathogens and regulation of inflammatory responses.

研究代表者

金子 高士 (Kaneko, Takashi)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：10284697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性カスパーゼのカスパーゼ1、4、5はインターロイキン1の産生やピロトーシスと呼ばれる細胞死を誘導することにより、炎症反応を惹起し、生体内に侵入した細菌の排除に関与していることが報告されている。そこで我々は歯周病炎症反応における炎症性カスパーゼの機能について実験を行った。ラットにおける実験的歯周炎モデルにおいて、カスパーゼ1の活性化に関与するNLRP3の抑制剤のグリブライドを投与したラットは、コントロールと比較して歯肉内の炎症性細胞数、破骨細胞数、歯槽骨吸収が抑制されていた。このことからカスパーゼ1は歯周炎症反応と歯槽骨吸収において重要な役割を演じていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory caspases 1,4,5 are involved in production of interleukin-1 and proptosis cell death in inflammatory diseases, and contribute to the clearance of invasive bacterial pathogens. Therefore, we investigated the role of caspases in periodontal inflammation in rat experimental periodontal models. We used anti-diabetic drug, gluburide, which is act as NLRP3 inhibitor, to inhibit the activation of caspase 1. The rats given glyburide exhibit significantly lower number of inflammatory cells and osteoclasts and bone resorption compared with control. This results indicate that caspase 1 play an important role in periodontal inflammatory responses and alveolar bone resorption.

研究分野：歯周病学

キーワード：カスパーゼ1 IL-1 NLRP3 グリブライド 歯周炎 歯周病原細菌 骨吸収 インフラマソーム

## 1. 研究開始当初の背景

細胞に侵入した細菌は自然免疫受容体のエンドソーム内の Toll-like receptor (TLR) や 細胞質内に存在する Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD) によって検知され、侵入細菌を除去する種々の細胞応答を引き起こす。細菌を貪食したファゴソームへのリソゾームの融合や自食作用 (オートファジー) は細胞内細菌を除菌する重要な反応であるが、近年、*Salmonella* や *Listeria* などの細胞内寄生菌のクリアランスにはカスパーゼ 1, 4, 5 が重要なことが報告された。カスパーゼ 1, 4, 5 は、その酵素活性によりピロトーシスと呼ばれる細胞死の一形態を誘導する。ピロトーシスは細胞膜の破壊を伴い、細胞外に放出された細菌のクリアランスには好中球の活性酸素 (ROS) 産生を介することが報告されている。一方、カスパーゼ 1, 4, 5 は炎症性サイトカインの IL-1 や IL-18 前駆体のプロセッシングにも関与し、これらのサイトカインの生物学的活性の発現をコントロールしている。ピロトーシスによって成熟型の IL-1 は細胞内内容物とともに細胞外に放出され、二次的に炎症を誘導し、組織破壊に増強すると考えられている。カスパーゼ 1, 4, 5 はそれぞれ相補的に作用するが、マウスにおける実験で、カスパーゼ 1 はより IL-1 のプロセッシングに、カスパーゼ 11 はピロトーシス誘導に関与すること、そして菌種によって活性化されるカスパーゼが異なることも報告されている。しかしながら、歯周病原細菌感染によるカスパーゼ 1 の活性化とピロトーシスの誘導と歯周病細菌のクリアランスに関する報告はなされていない。我々は歯周病原細菌の種類により活性化されるカスパーゼの種類が異なり、ピロトーシスや IL-1 の活性化機構が異なるのではないかと仮説をたてた。そこで本研究では細胞

内侵入歯周病細菌のクリアランスにおけるカスパーゼ 1, 4, 5 活性化とピロトーシスの役割について基礎研究を行うことを計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病細菌の種類によるカスパーゼ 1, 4, 5 活性化とピロトーシス誘導、IL-1 の遺伝子発現とそれぞれの前駆体を含めた細胞外放出メカニズムを解明することにより、カスパーゼ 1, 4, 5 活性化経路を標的とした IL-1 の産生抑制に着目した新規歯周治療法の可能性について追求することを目的とした。

## 3. 研究の方法

歯周病原細菌によるピロトーシスの誘導と IL-1 の産生

歯周病原細菌として *P. gingivalis* ATCC33277, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 を、非歯周病原細菌として *E. coli* MC4100 を実験に使用した。

これらの細菌の加熱超音波破碎物でヒトマクロファージ細胞株 THP-1 細胞を刺激し、ピロトーシスの誘導は培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を酵素基質法で測定した。また IL-1 と IL-8 の培養上清中への放出は ELISA 法で測定した。また Pro-IL-1 と活性化型 IL-1 の発現は Western blotting 法で確認した。Pro-IL-1 とカスパーゼ 1 の mRNA の発現は real-time PCR で確認した。

カスパーゼ 1 の IL-1 産生への関与

カスパーゼ 1 のインヒビターとして z-YVAD-fmk, またカスパーゼ 1 の活性化に関与する NLRP3 を抑制する作用を有する糖尿病治療薬、グリブリドで前処理し、前述した実験を行った。

ラット歯周炎モデルを用いた抑制剤の影響

グリブリドをルイス系ラットに経口投与し、歯肉に歯周病原細菌をマイクロシリンジによって経時的に複数回注射する。投与後屠殺し、組織切片を作製し、HE 染色と TRAP 染色を行い、歯肉の炎症や歯槽骨吸収を病理組織学的に解析する。

#### 4. 研究成果

歯周病原細菌による IL-1 の放出

THP-1 細胞を歯周病原細菌で 24 時間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 の培養上清への放出が認められた。IL-1 の量は他の細菌と比較して *P. gingivalis* は低い結果となった。

z-YVAD-fmk による IL-1 の放出の抑制

歯周病原細菌刺激の 30 分前に加えた z-YVAD-fmk は *P. gingivalis*, *E. coli* 刺激による 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。このことから歯周病原細菌による IL-1 放出はカスパーゼ 1 依存性であることが示唆された。

細胞内 pro-IL-1 , 活性化型 IL-1 、カスパーゼ 1 の発現

1  $\mu\text{g/ml}$  の歯周病原細菌で刺激し、24 時間後の細胞内のプロおよび活性化型 IL-1 タンパク発現はすべての細菌によって増加したが、カスパーゼ 1 タンパク発現は *P.g.* では誘導されなかった。また IL-1 mRNA の発現はいずれの細菌刺激でも増加したが、カスパーゼ 1 mRNA の発現は他の細菌とは対照的に *P.gingivalis* では誘導できなかった。

歯周病原細菌による LDH の放出

THP-1 細胞を歯周病原細菌で 4 時間刺激した。コントロールの LPS と Nigericin 刺激刺

激では約 60%の細胞死を示したが、歯周病原細菌は THP-1 細胞に細胞死を誘導することはできなかった。

グリブリドの IL-1 放出抑制

グリブリドの存在下において *P. gingivalis*, *E. coli* で THP-1 細胞を刺激し、IL-1 と IL-8 の産生を調べた。グリブリドは 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。

実験的歯周炎におけるグリブリドの炎症、骨吸収抑制効果

ラットにグリブリド (20mg/kg) もしくはその溶媒 (Mock; 20% エタノール) を 24 時間ごとに経食道投与した。その後 24 時間ごとに 0.6  $\mu\text{g}/3\mu\text{l}$  の *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. coli* を歯肉に 4 回投与した。最終投与後 24 時間後に屠殺、組織切片を作製した。実験期間中眼下窩静脈叢と心臓採血を行い血糖値を測定した。いずれの細菌投与において、Mock では好中球を主体とした強い炎症性細胞浸潤と破骨細胞の発現をみとめたが、それらはグリブリド投与群では有意に抑制されていた。また Mock 群で細菌を歯肉投与すると血糖値の継時的な増加が認められたが、グリブリド群では Mock と比較して有意に減少していた

#### 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7件)

1. Yamashita Y, Ukai T, Nakamura H, Yoshinaga Y, Kobayashi H, Takamori Y, Noguchi S, Yoshimura A, Hara Y. RANKL pretreatment play an important role in the differentiation of pit-forming osteoclasts induced by TNF- on murine

bone marrow macrophages. Arch Oral Biol, 60(9): 1273-82, 2015.

2. Takamori Y, Atsuta I, Nakamura H, Sawase T, Koyano K, Hara Y. Histopathological comparison of the onset of peri-implantitis and periodontitis in rats. Clin Oral Implants Res 28(2): 163-170. 2016.

3. Noguchi S, Ukai T, Kuramoto A, Yoshinaga Y, Nakamura H, Takamori Y, Yamashita Y, Hara Y. The histopathological comparison on the destruction of the periodontal tissue between normal junctional epithelium and long junctional epithelium. J Periodontal Res 52(1): 74-82, 2017.

4. Ziauddin SM, Montenegro Raudales JL, Sato K, Yoshioka H, Ozaki Y, Kaneko T, Yoshimura A, Hara Y. Analysis of subgingival plaque ability to stimulate toll-like receptor 2 and 4. J Periodontol 87(9): 1083-91, 2016.

5. Montenegro Raudales JL, Yoshimura A, Sm Z, Kaneko T, Ozaki Y, Ukai T, Miyazaki T, Latz E, Hara Y. Dental calculus stimulates interleukin-1 secretion by activating NLRP3 inflammasome in human and mouse phagocytes. PLoS One, 11(9): e0162865, 2016.

6. Ziauddin SM, Yoshimura A, Montenegro Raudales JL, Ozaki Y, Higuchi K, Ukai T, Kaneko T, Miyazaki T, Latz E, Hara Y. Crystalline structure of pulverized dental calculus induces cell death in oral epithelial cells. J Periodontal Res 53(3): 353-361, 2018.

7. Takamori A, Yoshinaga Y, Ukai T, Nakamura H, Takamori Y, Izumi S, Shiraishi C, Hara Y. Topical application of glycyrrhetic acid in the gingival sulcus inhibits attachment loss in lipopolysaccharide-induced experimental periodontitis in rats. J Periodontal Res 53(3): 422-429, 2018.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. モンテネグロホルヘ, 吉村篤利, エスエムジャウディン, 金子高士, 原宜興. Dental calculus induces IL-1 production in murine macrophages through the NLRP3 inflammasome. 第 56 回秋季歯周病学会学術大会, 神戸市, 2014.

2. 尾崎幸生, 吉村篤利, 金子高士, 鶴飼孝, 吉永泰周, Jorge Montenegro, Ziauddin SM, 白石千秋, 中村弘隆, 藏本明子, 原宜興. TLR2 および TLR4 リガンド投与マウス歯肉における炎症性および抗炎症性サイトカインの発現, 日本歯科保存学会 2014 年秋季学術大会, 山形市, 2014.

3. Montenegro Raudales JL, Yoshimura A, Ziauddin SM, Nakamura H, Kaneko T, Ozaki Y, Hara Y. Resveratrol inhibits NLRP3 inflammasome-derived IL-1beta secretion induced by dental calculus in murine macrophages. 第 58 回秋季歯周病学会学術大会, 浜松, 2015.

4. Yoshimura A, Montenegro JL, Ziauddin SM, Nakamura H, Kaneko T, Ozaki Y, Hara Y. Dental calculus induces IL-1 production through the NLRP3 inflammasome. Toll 2015, Marbella, Spain, 2015.

5. ホルヘルイスモンテネグロ, 吉村篤利, ジャウディンエスエム, 中村弘隆, 金子高土, 尾崎幸生, 原宜興. 歯石はNLRP3 インフラマソームを活性化してヒトおよびマウス貪食細胞による IL-1 産生を誘導する. 平成 27 年度日本歯周病学会九州5 大学, 日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会, 福岡市, 2015.
6. 金子高土, 吉永泰周, 岡田芙美子, 青木将虎, 井口育美, 大家知子, 吉村篤利, 古賀千尋, 坂上竜資. 歯周病原細菌による IL-1 産生に対するグリブライドの抑制効果に関する研究. 第 42 回福岡歯科大学学会総会, 福岡市, 2015.
7. 金子高土, 吉永泰周, 吉村篤利, 古賀千尋, 坂上竜資. 歯周病原細菌による IL-1 産生に対するグリブライドの抑制効果. 第 59 回春季歯周病学会学術大会, 鹿児島市, 2016.
8. 金子高土, 吉永泰周, 青木将虎, 吉村篤利, 松浦洋志, 津江文武, 古賀千尋, 坂上竜資. グリブライドは歯周病原細菌による IL-1 活性化を抑制する. 第 23 回日本歯科医学会総会, 福岡市, 2016.
9. Montenegro J, Yoshimura A, Ziauddin SM, Kaneko T, Ozaki Y, Miyazaki T, Ukai T, Latz E, Hara Y. Dental calculus stimulates IL-1beta release through the NLRP3 inflammasome in human and mouse phagocytes. 第 23 回日本歯科医学会総会, 福岡市, 2016.
10. Ziauddin SM, Montenegro Raudales JL, Ozaki Y, Kaneko T, Yoshimura A, Hara Y. Dental calculus activates inflammasome in human oral epithelial cells. 第 23 回日本歯科医学会総会, 福岡市, 2016.
11. Montenegro Raudales JL, Yoshimura A, Ziauddin SM, Kaneko T, Ozaki Y, Ukai T, Miyazaki T, Latz E, Hara Y. Dental calculus triggers NLRP3 inflammasome-dependent IL-1beta secretion in mouse macrophages. 14th Biennial Meeting International Endotoxin and Innate Immunity Society, Curio-Haus/Hamburg, 2016.
12. 尾崎幸生, 吉村篤利, 金子高土, 鶴飼孝, 山下恭徳, Montenegro J, Ziauddin SM, 原宜興. リポ多糖およびペプチドグリカン局所投与マウス歯槽骨面上の破骨細胞形成において TNF- $\alpha$  が果たす役割. 平成 28 年度秋季日本歯周病学会学術大会, 新潟市, 2016.
13. 吉永泰周, 金子高土, 有田陽一, 河原ゆり, 有田晴一, 笠孝成, 吉村篤利, 古賀千尋, 坂上竜資. 糖尿病治療薬グリブライドは菌体破砕物誘導性ラット実験的歯周炎を抑制する. 平成 28 年度日本歯周病学会九州5 大学日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会, 長崎市, 2016.
14. 金子高土, 吉永泰周, 吉村篤利, 古賀千尋, 坂上竜資, 歯周病原細菌による IL-1 発現に対するグリブライドの抑制効果, 第 59 回春季日本歯周病学会学術大会, 鹿児島市, 2016.
15. 吉永泰周, 金子高土, 有田陽一, 河原ゆり, 有田晴一, 笠孝成, 中村恵子, 吉村篤利, 古賀千尋, 坂上竜資. グリブライドは歯周病原細菌による実験的歯周炎を抑制する. 第 60 回春季日本歯周病学会学術大会, 福岡市, 2017.
16. 大城希美子, 吉永泰周, 金子高土, 有田陽一, 河原ゆり, 有田晴一, 笠孝成, 山

本南奈, 村上弘, 廣松亮, 岡部幸司, 坂上竜資. Toll-like receptor 刺激は酸化 LDL 受容体 Lox-1 を介して破骨細胞形成に影響する. 平成 29 年度日本歯周病学会九州五大学・日本臨床歯周病学会九州支部合同研修会, 福岡市, 2017.

17. 吉永泰周, 金子高士, 有田陽一, 河原ゆり, 有田晴一, 笠孝成, 中村恵子, 古賀千尋, 佐藤博信, 坂上竜資. グリプリドは歯周病原細菌によるラット実験的歯周炎を抑制する. 第 44 回福岡歯科大学学会総会, 福岡市, 2017.

18. Ziauddin SM, 吉村篤利, Montenegro Raudales JL, 尾崎幸生, 樋口賀奈子, 金子高士, 原宜興. 歯石により誘導される HSC-2 口腔上皮細胞の細胞死において結晶構造および菌体成分が果たす役割. 平成 29 年度日本歯周病学会 60 周年記念京都大会, 京都市, 2017.

〔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.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 : 1 0 2 8 4 6 9 7

### (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 : 6 0 1 5 9 1 0 0

吉村篤利 (YOSHIMURA Atsutoshi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 7 0 2 5 3 6 8 0

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし