

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670818

研究課題名(和文)細胞種特異的炎症応答の探索

研究課題名(英文)Search of the cell type-specific inflammatory response

研究代表者

村上 智彦 (Murakami, Tomohiko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：50510723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞種特異的なインフラマソームの探索を行うために、マウスの骨・軟骨関連細胞の初代培養を行い、インフラマソーム関連遺伝子の発現変化を培養細胞レベルで検討を行った。その結果、破骨細胞において、インフラマソーム関連因子が発現することを見出した。さらに、破骨細胞にインフラマソームを活性化させる刺激を負荷すると、下流シグナルが活性化されることが判明した。これらの結果から、歯周疾患、骨関節疾患などの慢性炎症においても破骨細胞のインフラマソームの発現および活性化が生じ、IL-1 の成熟および分泌を促進し、IL-1 によって破骨細胞の骨吸収能が増強され、病態の重篤化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to carry out the search of the cell-type specific inflammasome, we performed primary cultures of bone and cartilage related cells from mice and measured the expression levels of inflammasome-related genes in cultured cells. We found that inflammasome-related genes were strongly expressed in osteoclasts compared with osteoblasts and chondrocytes. Further, when osteoclasts were stimulated with inflammasome activators, downstream signalings of inflammasome were activated in osteoclasts. These results indicated that the activation of the inflammasome in osteoclasts would be associated with the pathogenesis such as periodontal disease and bone/joint diseases since IL-1 promote the maturation and activation of osteoclasts.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：炎症 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は歯周疾患、骨疾患、関節疾患、代謝性疾患など多くの疾患の発症に深く関与する。炎症組織ではマクロファージの浸潤と共に炎症性サイトカインTNF やIL-1が産生され、炎症性疾患の発症につながる。近年、歯周疾患、骨・関節疾患、肥満、糖尿病、動脈硬化、神経変性疾患、がんなどの慢性炎症を伴う疾患の発症に、NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体が密接に関与することが明らかにされた。

NLRP3 インフラマソームは、センサータンパク質である NLRP3, アダプタータンパク質である apoptosis-associated speck-like protein containing caspase recruitment domain (ASC), Interleukin (IL)-1 転換酵素である Caspase-1(Interleukin-1-converting enzyme, ICE) から構成される。通常時、NLRP3, ASC, Caspase-1 は複合体を形成していないが、細胞が感染や様々な生体内外のストレスに曝されると、NLRP3, ASC, Caspase-1 は速やかに複合体を形成し、NLRP3 インフラマソームを構築するに至る。NLRP3 インフラマソームが構築されることを引き金として、Caspase-1 が活性化される。活性化した Caspase-1 は炎症性サイトカインである IL-1 および IL-18 の成熟および分泌を誘導すると共に、最終的には Caspase-1 依存的細胞死である pyroptosis を引き起こす。

インフラマソームを構築するセンサータンパク質は NLRP3 以外にも存在し、(NLR family CARD domain-containing protein 4) NLRC4 や absent in melanoma 2 (AIM2) などのパターン認識受容体 Pattern recognition receptors (PRRs) が知られている。これらセンサータンパク質はそれぞれが異なる特異的な刺激やストレスを感知し、活性化すると考えられている。インフラマソームの構築が Caspase-1 の活性化に必須であることから、インフラマソームの構築機構の解析が進められている。その中で、いくつかのインフラマソームの活性化機構が解明されてきた。例えば、NLRC4 は細菌の鞭毛を構成するタンパク質の一つであるフラジエリンを認識し活性化する。また、AIM2 は細胞内の二本鎖 DNA を認識し活性化する。一方、NLRP3 の活性化機構は未だに不明な点が多い。

NLRP3 インフラマソームを活性化させる刺激としては、感染、細胞外 ATP、結晶、小胞体ストレスなど多種多様な刺激が報告され

ており、これらの刺激が細胞外へのカリウムの流出、活性酸素、ミトコンドリアダメージ、カルシウムシグナルなどを誘導し、その後未知のメカニズムで活性化すると考えられている。

このように炎症応答におけるインフラマソームの活性化機構が注目されているため、マクロファージなどの免疫関連細胞を中心とした解析が進んでいる。一方、インフラマソームはマクロファージなどの免疫関連細胞以外の細胞においても発現していることが一部報告されているが、その解析はほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

近年、慢性炎症関連疾患の発症にインフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体の関与が発見され、その重要性が明らかにされつつある。その解析の中で、NLRP3 が中心となって構築される NLRP3 インフラマソームは特に様々な疾患に関連することが報告されてきた。興味深いことに、NLRP3 が構成するインフラマソームは、歯周組織、骨芽細胞、破骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞においても発現し、各々の細胞における疾患への関与が示唆されているが、その実態の解明は全く不明である。そこで本研究では、骨代謝、関節疾患ならびに骨破壊性歯周疾患に関連する細胞に着目し、インフラマソームのコンポーネントの発現の検討を行うことで、細胞種特異的なインフラマソームを探索し、発見した細胞種特異的なインフラマソームの役割とその分子制御機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞の分化誘導および培養

骨・軟骨組織関連の細胞に着目し、細胞種特異的なインフラマソームの探索と細胞の同定、細胞種特異的なインフラマソームの分子制御機構の解析を行う。骨・軟骨組織関連の細胞として、骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞に着目した。骨芽細胞は、生後4日目のマウス頭蓋骨を採取し、コラゲナーゼにて細胞を単離し、骨芽細胞初代培養として用いた。軟骨細胞は、生後0-2日目のマウス肋骨を採取し、コラゲナーゼにて細胞を単離し、軟骨細胞初代培養とした。破骨細胞はマウス脾臓あるいは骨髄から細胞を単離し、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を含む培地にて6

日間分化誘導を行い、破骨細胞初代培養とした。またインフラマソーム発現細胞のポジティブコントロールとしてマクロファージを用いた。マクロファージは、マウス脾臓あるいは骨髄から細胞を単離し、M-CSFを含む培地にて6-7日間分化誘導を行い、マクロファージ初代培養とした。

(2) 細胞種特異的なインフラマソームの探索と機能解析

骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞の各種初代培養細胞を用いて、細胞種特異的なインフラマソームの探索を行った。方法としては、検出感度が良い taqman qPCR あるいは SYBR qPCR 法によりインフラマソーム関連遺伝子の発現を検出し、発現レベルの比較および発現細胞の同定を行った。また必要に応じて網羅的解析のためのマイクロアレイを行った。さらにターゲット遺伝子のタンパク質に対する抗体が利用できる場合は、遺伝子発現に加え、ウエスタンブロット法によるタンパク質の発現確認も行った。インフラマソームの発現を確認した細胞は初代培養を用いて、細胞種特異的なインフラマソームの機能解析を行った。刺激としては、炎症あるいはインフラマソーム構築のプライミングを行う刺激として Lipopolysaccharide (LPS)、インフラマソームを活性化させるトリガーの刺激として ATP、カリウムイオノフォアである Nigericin、ウシ胸腺由来 DNA、尿酸塩 (MSU) などをを用いた。

(3) インフラマソームの活性化測定

インフラマソーム活性化の判定には、細胞培養上清中に分泌される IL-1 の量を高感度で定量測定できる ELISA 法を用いた。ELISA の測定と共に、IL-1 には前駆体タイプと成熟タイプがあるので、成熟タイプが産生されていることをウエスタンブロット法にて確認を行った。また細胞種によっては IL-1 の発現がない可能性も考えられるため、IL-1 の ELISA に加え、活性型 Caspase-1 をウエスタンブロット法にて検出し、インフラマソームの活性化の指標とした。

4. 研究成果

細胞種特異的なインフラマソームの探索を行うために、マウスの骨・軟骨関連細胞の初代培養を行い、インフラマソーム関連遺伝子の発現変化を培養レベルで検討をおこなった。その結果、骨芽細胞および軟骨細胞では、微弱な発現を確認することができた。一

方、破骨細胞ではインフラマソーム関連遺伝子の発現が骨芽細胞や軟骨細胞に比べ、強く発現していることを見出した。破骨細胞におけるインフラマソームの発現をマクロファージと比較したところ、マクロファージに比べ発現は弱かった。この発現が破骨細胞由来であることを確認するために、破骨細胞培養を用いて破骨細胞マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを染色する Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色を行ったところ、ほぼ全ての細胞が TRAP ポジティブ細胞であったことから、この破骨細胞培養におけるインフラマソームの発現は TRAP ポジティブ細胞つまり破骨細胞であることが判明した。

続いて、マクロファージでは LPS 刺激などによりマクロファージがプライミングされないと NLRP3 インフラマソームの活性化や IL-1 の分泌が起きないことが知られている。この現象に着目し、破骨細胞におけるインフラマソームがマクロファージなどと同様に機能しうるかを検討するため、LPS 刺激を行い、その機能解析を行った。その結果、破骨細胞において、インフラマソーム関連因子である NLRP3 や IL-1 などが LPS 刺激にตอบสนองして発現することを見出した。さらに、破骨細胞にインフラマソームを活性化させるトリガーとなる刺激を負荷すると、インフラマソームの下流シグナルである IL-1 の分泌が誘導され、それは Caspase-1 の活性化を伴っていることが判明した。これらの結果から、マクロファージなどの免疫担当細胞に加え、破骨細胞においてもインフラマソームが構築され、Caspase-1 が活性化されることがわかった。

インフラマソームの活性化で産生される IL-1 は破骨細胞の骨吸収活性を上昇させることがよく知られている。本研究結果により、歯周疾患、骨関節疾患などの慢性炎症においても、患部あるいはその周囲に存在する破骨細胞のインフラマソームの発現および活性化が生じ、IL-1 の成熟および分泌を促進し、自己分泌した IL-1 によって破骨細胞の骨吸収能が増強され、病態の重篤化に関与す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2件)

村上智彦

慢性炎症を基盤にした歯周疾患の病態の
理解と治療戦略 CLINICAL CALCIUM Vol.26
No.5 P114(766)-120(772) (2016)
DOI: CliCa1605766772

Yu J, Nagasu H, Murakami T, Hoang H,
Broderick L, Hoffman HM, Horng T.
Inflammasome activation leads to
Caspase-1-dependent mitochondrial
damage and block of mitophagy. Proc Natl
Acad Sci USA, 111, 15514-15519. (2014)
DOI: 10.1073/pnas.1414859111

〔学会発表〕(計2件)

村上智彦、高畑佳史、波多賢二、西村理行
慢性炎症に関連するNLRP3インフラマソームの活性化機構の解析
第57回歯科基礎医学会学術大会
新潟コンベンションセンター 新潟県新潟市 (2015/9/11-13)

村上智彦、高畑佳史、波多賢二、西村理行
神経変性疾患発症に関与する炎症の慢性化機構
第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会
奈良県文化会館・奈良県新公会堂 奈良県奈良市 (2014/9/29-10/1)

〔図書〕(計0件)

〔産業財権〕

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

http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission_000294.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 智彦 (Tomohiko Murakami)
大阪大学・歯学研究科・講師
研究者番号：50510723

(2)研究分担者

該当なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者

西村 理行 (Riko Nishimura)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：60294112

波多 賢二 (Kenji Hata)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：80444496