

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861566

研究課題名(和文) S. sanguinisによるインフラマゾーム活性化機構の解明

研究課題名(英文) Activation of inflammasome by Streptococcus sanguinis

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：S. sanguinis (Ss)はA/J マウス由来樹状細胞(XS-106細胞)ならびにC57BL/6(B6)マウス由来の骨髄由来マクロファージ(BMM)にIL-1 β の産生を誘導したが、caspase-1、NLRP3ならびにASCノックアウトマウス由来BMMでは殆どみられなかった。本活性は、貪食阻害剤、P2X/P2Y レセプター阻害剤ならびにATP加水分解酵素で阻害された。

Ssは樹状細胞ならびにマクロファージにおいてNLRP3インフラマゾームを介してIL-1 β の産生を誘導し、菌体の貪食によるATPの細胞外への放出とそのレセプターとの相互作用が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：S. sanguinis induced release of IL-1 β by a murine dendritic cell (XS-106) and a murine bone marrow-derived macrophage (BMM) from C57BL/6, but not by BMMs from caspase-1-, ASC- and NLRP3-deficient mice. Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization, inhibited phagocytosis of S. sanguinis and reduced the IL-1 β -inducing activity in XS106. The receptor P2X (P2XR)/P2YR inhibitor oxidized ATP, the P2X7R selective inhibitor KN-62 and the ATP-degrading enzyme apyrase downregulated IL-1 β release in XS106.

Thus, this study suggests that S. sanguinis activates NLRP3 inflammasome to induce IL-1 β release by murine dendritic cells and macrophages, and phagocytosis of the organism, interaction of ATP and its derivatives with P2X7 and P2Y receptors are involved in the expression of the activity.

研究分野：歯学

キーワード：口腔連鎖球菌 インフラマゾーム

1. 研究開始当初の背景

申請者は最近、感染性心内膜炎(IE)の主要な原因菌として知られている *Streptococcus sanguinis* が、マウス由来樹状細胞の細胞内センサーであるインフラマゾームを活性化し、IL-1 の産生を誘導すること、また、本菌をマウスの血中に接種すると IL-1 が産生されることを見いだした。IE の病因論は不明な点が多いが、本菌ならびに IL-1 が血小板を凝集させ、菌と血小板の凝集塊が心内膜に付着することが一因であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究は、*S. sanguinis* がインフラマゾームを活性化し IL-1 の産生を誘導する分子機構ならびにその活性物質を明らかにし、本菌による IE の病因論解明ならびに新規予防・治療法開発の一助とすることを目的とした。

3. 研究の方法

菌株は *S. sanguinis* ATCC 10556 (Ss) を用いた。標的細胞としては A/J マウス由来樹状細胞 (XS-106 細胞)、さらに、C57BL/6(B6) マウスならびに B6 マウスから caspase-1、ASC あるいは NLRP3 をノックアウトしたマウスの骨髄細胞から分化誘導したマクロファージ (BMM) を用いた。IL-1 は ELISA 法ならびに Western blot 法で測定した。

4. 研究成果

Ss は XS-106 細胞 (図 1) ならびに B6 由来の BMM (図 2) に IL-1 の産生を誘導した。

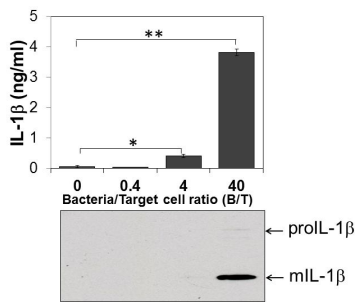


図1. *S. sanguinis* は XS-106 細胞に IL-1β の産生を誘導

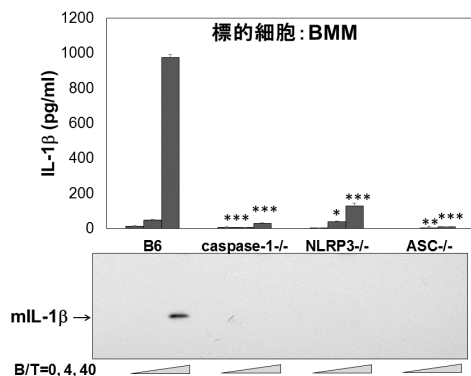


図2. caspase-1, NLRP3, ASC ノックアウトの影響

IL-1 産生誘導活性は、caspase-1、NLRP3 ならびに ASC ノックアウトマウス由来 BMM では殆どみられなかった (図 2)。Ss の IL-1 の産生誘導は食食阻害剤である Cytochalasin D (Cyt-D) で阻害された (図 3)。また、実際に XS-106 細胞による菌体の食食を FITC 標識した Ss を用いてフローサイトメトリー (図 4a) ならびに共焦点レーザー顕微鏡 (図 4b) にて調べたところ、菌体が食食され、Cyt-D により食食が阻害されることが確認された (図 4c)。

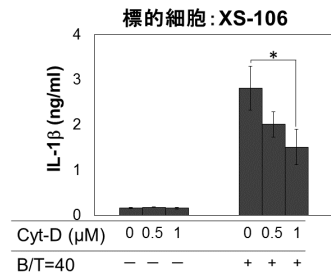


図3. 食食阻害剤の影響

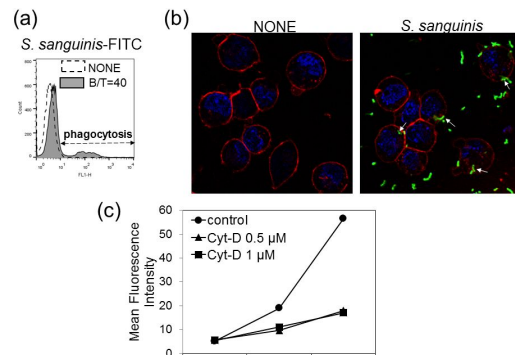


図4. XS-106 細胞による *S. sanguinis* の食食

本活性は P2X/P2Y レセプター阻害剤である oxidized ATP (oATP) (図 5a)、P2X₇ レセプター阻害剤である KN-62 (図 5b) ならびに ATP 加水分解酵素である apyrase (apy) (図 6b) により阻害された。また、実際に、菌体刺激により細胞外 ATP の濃度が増加していた (図 6a, 7)。さらに、細胞外 ATP 濃度の増加は、Cyt-D により阻害された (図 8)。

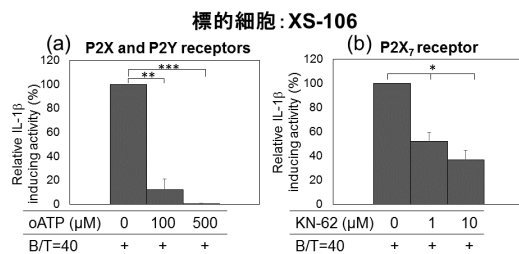


図5. P2X/P2Y レセプター阻害剤ならびに P2X₇ レセプター阻害剤の影響

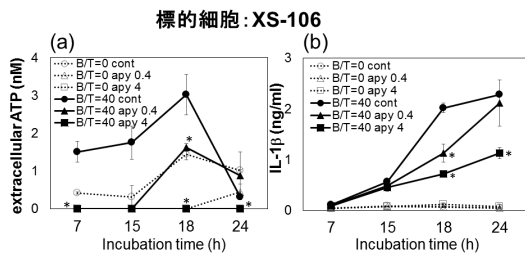


図6. ATP加水分解酵素の影響

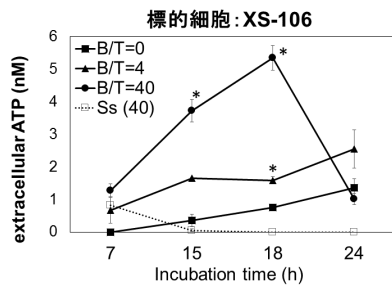


図7. 細胞外ATP

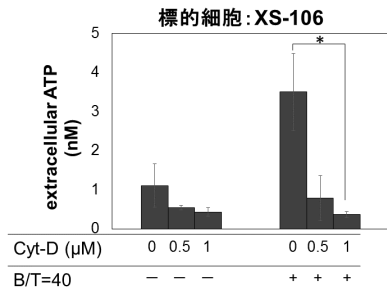


図8. 食食阻害剤の細胞外ATP濃度に及ぼす影響

以上の結果から、Ssは樹状細胞ならびにマクロファージにおいてNLRP3インフラマソームを介してIL-1の産生を誘導することが示唆された。SsによるNLRP3インフラマソーム活性化のメカニズムには、菌体の食食によるATPの細胞外への放出とそのレセプターとの相互作用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)

Sugiyama M, Saeki A, Hasebe A, Kamesaki R, Yoshida Y, Kitagawa Y, Suzuki T, Shibata K, Activation of inflammasomes in dendritic cells and macrophages by *Mycoplasma salivarium*, *Mol Oral Microbiol*, 31(3), 259-69, 2016, 査読有
DOI: 10.1111/omi.12117

阿部 亜美、佐伯 歩、長谷部 晃、八若 保孝、柴田 健一郎、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*によるインフラマソ

ームの活性化、北海道歯学雑誌、35、123-132、2015、査読有

原 博志、長谷部 晃、佐伯 歩、阿部 亜美、山崎 裕、柴田 健一郎、*In vivo*における口腔レンサ球菌の抗腫瘍活性、北海道歯学雑誌、35、16-24、2014、査読有

谷詰 直穂、大谷 誠、長谷部 晃、佐伯 歩、戸塚 靖則、鄭 漢忠、柴田 健一郎、Toll-like receptor 2シグナルにおけるSrcファミリーキナーゼLckの役割、北海道歯学雑誌、35、8-15、2014、査読有

[学会発表](計13件)

佐伯 歩、長谷部 晃、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、IL-1 α -inducing activity of *Streptococcus sanguinis* in murine dendritic cells and macrophages、第89回日本細菌学会総会、2016年3月23~25日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

佐伯 歩、長谷部 晃、亀崎 良助、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、心内膜炎関連細菌によるインフラマソームの活性化、第1回北大・部局横断シンポジウム、2016年3月7日、北海道大学医学部学友会館フラテホール(北海道札幌市)

佐伯 歩、長谷部 晃、中澤 太、柴田 健一郎、*Streptococcus sanguinis*によるIL-1産生誘導活性、第57回歯科基礎医学会学術大会2015年9月11~13日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

佐伯 歩、長谷部 晃、亀崎 良助、中澤 太、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、*Streptococcus sanguinis*によるマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおけるIL-1産生誘導活性、第82回日本細菌学会北海道支部学術総会、2015年9月5日、北海道医療大学(北海道札幌市)

亀崎 良助、佐伯 歩、阿部 亜美、長谷部 晃、北川 善政、鈴木 敏彦、柴田 健一郎、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*によるインフラマソームの活性化、第82回日本細菌学会北海道支部学術総会、2015年9月5日、北海道医療大学(北海道札幌市)

杉山 正博、佐伯 歩、長谷部 晃、亀崎 良助、北川 善政、柴田 健一郎、樹状細胞ならびにマクロファージにおける*Mycoplasma salivarium*によるNLRP3インフラマソームの活性化、日本マイコプラズマ学会第42回学術集会、2015年5月22~23日、慶應大学薬学部 芝共立キャンパス(東京都港区)

佐伯 歩、長谷部 晃、中澤 太、鈴木敏彦、柴田 健一郎、*Streptococcus sanguinis* による NLRP3 インフラマソームの活性化とその機構、第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26～28 日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

Saeki A, Hasebe A, Suzuki T, Shibata K. Involvement of NLRP3, ASC and caspase-1 in the IL-1 inducing activity of *Streptococcus sanguinis* to murine dendritic cells and macrophages、第 43 回日本免疫学会学術集会、2014 年 12 月 10～12 日、国立京都国際会館（京都府京都市）

佐伯 歩、杉山 正博、長谷部 晃、中澤 太、柴田 健一郎、*Streptococcus sanguinis* による NLRP3 インフラマソームの活性化、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 25～27 日、福岡国際会議所（福岡県福岡市）

長谷部 晃、佐伯 歩、杉山 正博、柴田 健一郎、*Candida albicans* によるマクロファージと樹状細胞への IL-1 産生誘導の違い、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 25～27 日、福岡国際会議所（福岡県福岡市）

佐伯 歩、長谷部 晃、中澤 太、鈴木敏彦、柴田 健一郎、*Streptococcus sanguinis* によるマウス樹状細胞ならびにマクロファージの NLRP3 インフラマソームの活性化、第 81 回日本細菌学会北海道支部学術総会、2014 年 8 月 29～30 日、札幌医科大学（北海道札幌市）

長谷部 晃、佐伯 歩、杉山 正博、亀崎 良助、柴田 健一郎、マクロファージと樹状細胞への *Candida albicans* による IL-1 産生誘導、第 81 回日本細菌学会北海道支部学術総会、2014 年 8 月 29～30 日、札幌医科大学（北海道札幌市）

杉山 正博、佐伯 歩、長谷部 晃、柴田 健一郎、マイコプラズマの IL-1 産生誘導活性における ATP とその分解産物ならびに K⁺ の関与、日本マイコプラズマ学会第 41 回学術集会、2014 年 5 月 22～23 日、東京大学（東京都文京区）

〔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
<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