

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：35413

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893313

研究課題名(和文)炎症性骨吸収に対するポリリン酸の作用 インプラント周囲炎治療法の開発に向けて

研究課題名(英文) Effects of polyphosphate on inflammatory bone resorption: Development of novel treatment strategies for peri-implantitis

研究代表者

原田 佳奈 (HARADA, Kana)

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号：90609744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲炎治療薬の候補であるポリリン酸が、炎症性骨吸収を促進するシグナル伝達機構に及ぼす影響を検討した。グラム陰性菌細胞壁構成成分リポポリサッカライドにより活性化されたマクロファージにおいて、ポリリン酸はIRF3リン酸化を抑制することにより、早いSTAT1リン酸化を抑制した。また、ポリリン酸はIRF3リン酸化抑制とは異なる機構を介して遅いSTAT1リン酸化を抑制する可能性も示された。本研究によりポリリン酸の新たな作用機構が明らかとなり、インプラント周囲炎治療へポリリン酸を応用するにあたって有用な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effects of polyphosphate [poly(P)], a drug candidate for the treatment of peri-implantitis, on inflammatory bone resorption-related signal transduction. Poly(P) decreased the initial phosphorylation of STAT1 via suppressing IRF3 phosphorylation in macrophages activated with lipopolysaccharide, a cell wall component of Gram-negative bacteria. In addition, poly(P) was suggested to suppress the delayed phosphorylation of STAT1 in an IRF3-independent manner. These findings provide useful information for the development of novel treatment strategies for peri-implantitis.

研究分野：薬理学

キーワード：ポリリン酸 マクロファージ リポポリサッカライド IRF3 STAT1

1. 研究開始当初の背景

近年、より高い機能性と審美性の回復を求めてインプラント治療を希望する患者が増加しており、オッセオインテグレーションが確立されたインプラントをいかに長期間機能させるかが重要な課題となっている。プラークの蓄積により引き起こされるインプラント周囲炎はインプラントの機能を損なう主な原因であり、インプラント周囲粘膜炎と周囲骨の吸収を主徴とする。インプラント周囲炎のエビデンスのある治療法は、現在のところプラークの機械的な除去とクロルヘキシジンによる洗浄である。しかしながら、インプラント表面は粗造でプラークの完全除去が難しいこと、ひとたび吸収された骨の再生に時間がかかることから骨吸収がさらに進行する例も多く、より確実な治療効果の得られる治療法が求められている。

研究代表者はインプラント周囲炎により吸収された骨の再生法の開発を目指して研究を行い、その過程で骨再生促進薬の候補としてポリリン酸に着目した。ポリリン酸は原因菌 *Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌作用を示すのみならず、basic fibroblast growth factor の安定化を介して骨芽細胞の分化・石灰化を促進し、骨形成を促進することが知られている。一方、インプラント周囲炎では骨芽細胞による骨形成よりも破骨細胞の骨吸収活性が優勢となっており、ポリリン酸がこのような炎症性骨吸収を抑制して骨形成促進作用を発揮できるか否かについては不明のままである。

2. 研究の目的

これまでに研究代表者は、グラム陰性菌細胞壁構成成分 lipopolysaccharide (LPS) により活性化されたマクロファージにおいて、炎症のメディエーターである一酸化窒素 (NO) の産生をポリリン酸が抑制することを見出した。しかしながら、ポリリン酸がどのようにしてマクロファージに作用するのか全く不明であり、有効性が高く副作用が少ない治療法を確立するためにはポリリン酸の作用機構の解明が必須である。そこで本研究では、マクロファージにおいて LPS により活性化されるシグナル伝達機構に及ぼすポリリン酸の影響を検討した。また、炎症性サイトカイン tumor necrosis factor (TNF) は破骨前駆細胞から破骨細胞への分化を促進する。本研究では、破骨前駆細胞における TNF のシグナル伝達機構に及ぼすポリリン酸の影響も検討した。

3. 研究の方法

マクロファージは雄性 C57BL/6J マウス (8-12 週齢) の腹腔から採取した。マウスの腹腔に 3 mL のチオグリコール酸培地を投与し、4 日後に腹腔滲出細胞を回収した。この細胞をディッシュに播種して 2 時間培養した後、非接着細胞を洗浄除去し、接着細胞をマクロ

ファージとした。マクロファージにリン酸数が約 130 個のポリリン酸を処置し、5 分後に LPS (100 ng/mL) を処置した。Interferon- (IFN-) 放出量の測定は、マクロファージ培養上清中の IFN- を ELISA により定量した。誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現と p65 Ser536, extracellular signal-regulated kinase (ERK) Thr202/204, p38 Thr180/Tyr182, c-Jun N-terminal kinase (JNK) Thr183/Tyr185, interferon regulatory factor 3 (IRF3) Ser396, signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) Tyr701 のリン酸化は、ウェスタンブロッティングにより解析した。細胞内カルシウム濃度の測定は、蛍光カルシウム指示薬 Fluo 4 を用いて画像解析した。

破骨前駆細胞は、雄性 C57BL/6J マウス (5-6 週齢) の大腿骨および頸骨から採取した骨髄細胞に 5 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) を 16 時間処置し、その後、非接着細胞に 60 ng/mL M-CSF を 3 日間処置して得た。この破骨前駆細胞にリン酸数が約 130 個のポリリン酸を処置し、5 分後に TNF (50 ng/mL) を処置した。p65 Ser536, p38 Thr180/Tyr182 および JNK Thr183/Tyr185 のリン酸化はウェスタンブロッティングにより解析した。

4. 研究成果

(1) マクロファージにおける LPS のシグナル伝達機構に及ぼすポリリン酸の影響

ポリリン酸による iNOS 発現抑制

LPS の刺激を受けたマクロファージでは iNOS の発現が誘導され、NO が産生される。LPS を処置したマクロファージにおける iNOS 発現は LPS 処置後 12 時間から認められ、24 時間まで増加した。ポリリン酸は LPS 処置後 12-24 時間の iNOS 発現を抑制した。

Nuclear factor B (NF- B), mitogen-activated protein kinase (MAPK) および IRF3 のリン酸化に及ぼすポリリン酸の影響

LPS は Toll-like receptor 4 (TLR4) に結合し、その下流のシグナル伝達機構を活性化する。TLR4 下流のシグナル伝達分子のうち、iNOS の発現誘導には NF- B, MAPK の ERK, p38 および JNK, そして IRF3 の活性化が関わっている。これらのシグナル伝達分子の活性化に及ぼすポリリン酸の影響を、タンパク質リン酸化を指標として検討した。その結果、ポリリン酸は NF- B p65, ERK, p38 および JNK のリン酸化には影響を与えないことが明らかになった。一方、IRF3 は LPS 処置後 0.5-6 時間においてリン酸化され、ポリリン酸は LPS 処置後 1 時間の IRF3 リン酸化のピークを一過性に、部分的に抑制した (図 1)。

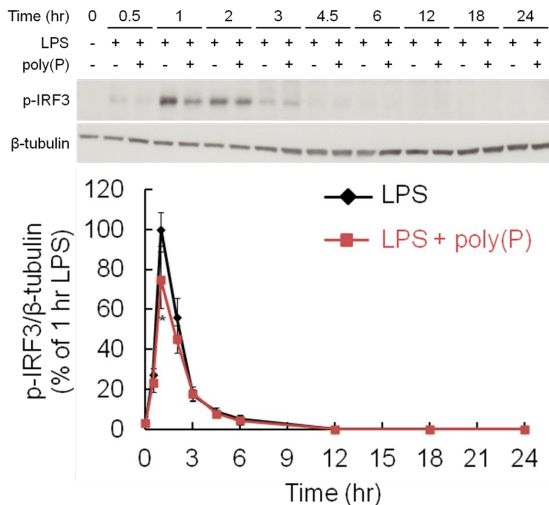


図1 LPS 処置マクロファージにおける IRF3 リン酸化に及ぼすポリリン酸の影響
Poly(P) : ポリリン酸, * $p < 0.01$ vs. LPS (two-way ANOVA with Bonferroni ' s post-test)

IFN- 放出と STAT1 リン酸化に及ぼすポリリン酸の影響

LPS により活性化された IRF3 は, IFN- の発現を誘導する. 産生された IFN- は細胞外に放出された後, IFN R1/2 に結合し, 下流の STAT1 を活性化する. ポリリン酸が LPS による IRF3 リン酸化を抑制したため, IFN- 放出と STAT1 活性化もポリリン酸により抑制されるか検討した. マクロファージに LPS を処置すると, 処置後 2 時間から IFN- の放出が認められ, 処置後 3 時間で最大となった. ポリリン酸は LPS 処置後 2-3 時間の IFN- 放出を部分的に抑制した (図 2). 一方, LPS 処置後 4.5-24 時間の IFN- 放出は, ポリリン酸の影響を受けなかった (図 2). ポリリン酸による一過性で部分的な IFN- 放出抑制は, IRF3 リン酸化抑制の時間経過および抑制率と相関していた. したがって, ポリリン酸が LPS 処置後 1 時間の IRF3 リン酸化を抑制することにより, LPS 処置後 2-3 時間の IFN- 放出が抑制されたと考えられる. 一方, リン酸化 STAT1 は LPS 処置後 2 時間から 24 時間にかけて 2 相性に増加した. まず, LPS 処置後 2-4.5 時間において, LPS 処置後 2 時間をピークとするリン酸化 STAT1 の増加が認められた. 次に LPS 処置後 4.5 時間から 24 時間にかけてリン酸化 STAT1 が徐々に増加した. ポリリン酸は LPS 処置後 2 時間の STAT1 リン酸化を部分的に抑制した. この一過性で部分的な STAT1 リン酸化抑制は, IRF3 リン酸化抑制および IFN- 放出抑制の時間経過・抑制率と相関していた. したがって, ポリリン酸は IRF3 リン酸化を抑制することで IFN- 放出を減少させ, LPS 処置後 2 時間の STAT1 リン酸化を低下させたと考えられる. また, ポリリン酸は LPS 処置後 6-24 時間のリン酸化 STAT1 の増加も抑制した (図 3). LPS 処置後 6-24 時間の IFN- 放出はポリリン酸の影響

を受けないことから, このような遅い STAT1 リン酸化の抑制は, IRF3 リン酸化抑制および IFN- 放出抑制とは異なる作用機構を介して制御されている可能性が考えられる.

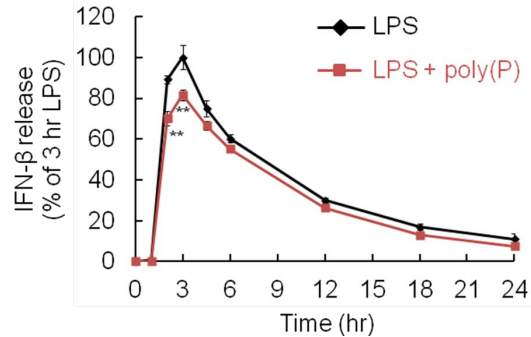


図2 LPS 処置マクロファージからの IFN- 放出に及ぼすポリリン酸の影響
Poly(P) : ポリリン酸, ** $p < 0.001$ vs. LPS (two-way ANOVA with Bonferroni ' s post-test)

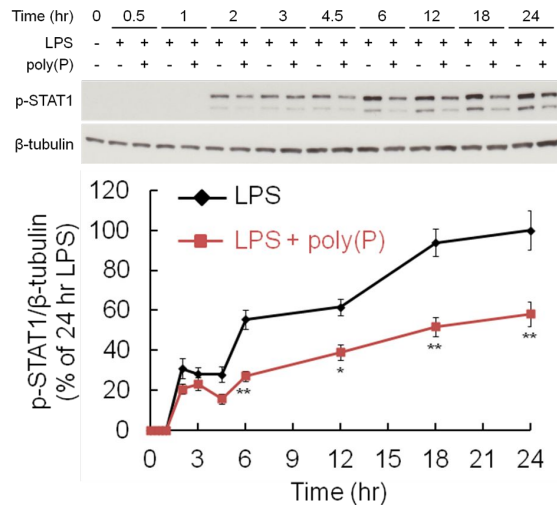


図3 LPS 処置マクロファージにおける STAT1 リン酸化に及ぼすポリリン酸の影響
Poly(P) : ポリリン酸, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. LPS (two-way ANOVA with Bonferroni ' s post-test)

細胞内カルシウム濃度に及ぼすポリリン酸の影響

まず, マクロファージの細胞内カルシウム濃度に及ぼすポリリン酸単独の影響を検討したが, 細胞内カルシウム濃度の変化は認められなかった. 次に, カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンによる細胞外カルシウム流入に及ぼすポリリン酸の影響を検討したが, カルシウム流入を抑制する作用は認められなかった.

(2) 破骨前駆細胞における TNF のシグナル伝達機構に及ぼすポリリン酸の影響

破骨細胞の分化に重要な nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1) の発現誘導は NF- B, p38, JNK により促進される. 炎症性サイトカイン TNF で刺激した破骨前駆

細胞における NF- B p65, p38, JNK のリン酸化に対して、ポリリン酸は影響を与えなかった。

以上のことから、LPS により活性化されたマクロファージにおいてポリリン酸が IRF3 リン酸化と STAT1 リン酸化を抑制することが示され、ポリリン酸の全く新しい作用機構が明らかとなった。この成果は、インプラント周囲炎治療にポリリン酸を応用するにあたっての一助となることが期待される。

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1件)

Kana Harada, Effects of polyphosphate on lipopolysaccharide-induced signal transduction in macrophages, 第89回日本薬理学会年会, 2016年3月10日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 佳奈 (HARADA, Kana)

広島国際大学・薬学部・助教

研究者番号: 90609744