

令和元年5月28日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07143

研究課題名(和文) NETosis誘導歯周炎および自己免疫疾患コントロール法の開発

研究課題名(英文) Development of control methods for NETosis-induced periodontitis and autoimmune diseases

研究代表者

室伏 貴久 (MUROFUSHI, Takahisa)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：60800787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：好中球の活性化により網状のクロマチン構造物(neutrophil extracellular traps, NETs)が細胞外へ放出され、細菌を抑制する。また、歯周病原細菌は酪酸等の短鎖脂肪酸を高濃度に産生し、そのうち、酪酸は歯肉上皮の強い細胞死活性をもつ。本研究では、この酪酸誘導の細胞死がNETosisかどうかについて、好中球を含む歯周組織に存在する細胞で確認することを目的とした。その結果、誘導された細胞死はNETs様構造物を伴う細胞死であり、それがオートファジー、活性酸素種に依存することが解った。また、歯周病原細菌が産生する因子がLPS誘導のマクロファージの活性化を抑制することが解った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酪酸はNETosis様の細胞死を引き起こすことが解った。この結果は、歯周疾患発症時における歯周組織の自然免疫メカニズムの一端を解明できたということとなる。また、細胞死発生に関わる因子が分かったということでも、それらの調節により歯周疾患の発症をコントロールできる可能性がでてきた。さらに、細菌の内毒素であるLPSによって引き起こされるマクロファージによる炎症を抑制する可能性が示唆された。歯周病原細菌は短鎖脂肪酸を産生することにより自然免疫機構を抑制し、歯周組織における細菌優位な状況を作っているかもしれない。これらのことから、歯周疾患の発症およびそれらに対する対応法を考えることが可能になる。

研究成果の概要(英文)：Activated neutrophil leukocytes release net-like chromatin structures (NETs) that inhibit bacteria. Periodontopathic bacteria induce high concentration of short chain fatty acids. Among them, butyrate exhibits strong cytotoxic activity. In the present study, we examined whether butyrate-induced death of periodontal cells and leukocytes accompany NET-release. Butyrate induces release of NET-like structures and the release is autophagy and ROS-dependent. In addition, we demonstrated that culture supernatants of periodontopathic bacteria inhibits LPS-induced macrophage activation.

研究分野：生化学、口腔生化学

キーワード：NETosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

好中球は細菌菌体をはじめとする様々な因子により活性化され、網状のクロマチン構造物 (neutrophil extracellular traps, NETs) を細胞外へ放出する。放出される NETs は細菌を補足し、抑制するため、自然免疫の一端を担うと考えられている反面、同時に HMGB1 等の炎症に關与する因子も放出されるので、過剰な NETs の放出は歯周疾患発症機序の一端となりうる。NETosis とは NETs を伴う細胞死で、その発生にはオートファジーの誘導、peptidyl-arginine deiminase 4 (PAD4) による細胞内タンパク質のシトルリン化が必要である。成熟プラークの蓄積した歯肉溝には高濃度の酪酸等の短鎖脂肪酸が産生される。我々の研究グループは、酪酸を歯肉上皮細胞に作用させたところ、濃度依存的なオートファジー依存性の細胞死が引き起こされることを確認した。成熟プラークの蓄積した歯肉溝では、好中球やマクロファージにも高濃度の酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸が作用しているはずである。このことから、短鎖脂肪酸が好中球の NETosis を引き起こしている可能性を考えた。これらのことより、短鎖脂肪酸に誘導される NETosis が歯周疾患および RA や SLE などの自己免疫疾患発症に關わっている可能性を着想した。

2. 研究の目的

(1) 酪酸をはじめとする短鎖脂肪酸が NETosis を引き起こすかどうかを明らかにする。

酪酸のみならず、プロピオン酸や酢酸などの作用により、NETosis が誘導されるかどうかを調べる。

(2) 歯周病病原細菌が産生する短鎖脂肪酸がマクロファージの細胞死、および活性化に及ぼす影響について明らかにする。

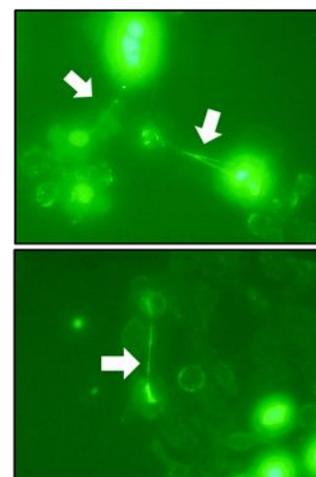
(3) これらの結果から、自然免疫系における歯周病原細菌由来の短鎖脂肪酸の役割についての知見を得ることができ、それによりコントロール法を考察する。

3. 研究の方法

(1) ヒト前骨髄性白血病 HL-60 細胞に all-trans retinoic acid を作用させることで、好中球様細胞に分化させ、それを実験に使うこととする。このように分化させた好中球様細胞に酪酸などの短鎖脂肪酸を作用させ、細胞死を SYTOX-green で測定する。細胞死が強く認められた条件下で、その細胞死が NETosis かどうかについて検討する。つまり、siRNA を用いてオートファジーの阻害、Cl-amide による PAD 活性の阻害により細胞死が減少するかどうかを調べる。また、double-stranded DNA を蛍光染色する SYTOX-green を用いて、細胞から NETs 様構造物が放出されるかどうかを確認する。細胞外への DNA の放出は SYTOX-green を用い、回収した培養上清中の double-stranded DNA を蛍光強度として測定した。

(2) 上記について、他の細胞、つまり歯肉上皮細胞およびマクロファージ様細胞についても行う。

図1. 酪酸誘導NETs



1% FBS, 5 mM Butyrate

4. 研究成果

(1) HL-60 細胞を 1 ~ 4 μM の all-trans retinoic acid で 3 ~ 4 日刺激すると、細胞は凝集し、好中球様細胞が誘導された。

(2) 上記細胞を使用して実験を行うこととしたが、結果が安定しなかった。また、理由は不明だが、細胞の増殖が悪くなるなどのトラブルが続いたので、他の歯肉上皮細胞およびマクロファージ細胞株を用いた実験を行うこととした。

(3) 歯肉上皮 Ca9-22 細胞に 5 mM 酪酸を作用させたところ、過去のデータ通り細胞死が引き起こされた。SYTOX-green 色素を用いて、生体膜でおおわれていないむき出しの 2 本鎖 DNA を染色してみたところ、NETs 様構造物が確認できた (図 1、矢印)。また、DNA の細胞外放出量を SYTOX-green 色素を使用したところ、図 2 の様に、24 時間以降にコントロールと比較して大量の DNA が細胞外に放出されていることが確認できた (図 2)。酪酸の作用による歯肉上皮細胞の細胞死が誘導されることはすでに報告されているので、これらのことから、歯肉上皮 Ca9-22 細胞株への酪酸の作用では、NETosis が起こっている可能性が高まった。そこで、NETosis 誘導に重要であるといわれている、オートファジー、活性酸素種を阻害して、これらがこの DNA 放出に関与しているかどうかを調べることにした。その結果、ATG5 のノックダウンでオートファジーを抑制すると、DNA の細胞外放出は抑制された (図 3)。次に、アスコルビン酸 (ASC) で活性酸素種 (ROS) を消去してみたところ、酪酸誘導の細胞外 DNA の放出は濃度依存的に抑制された (図 4)。これらのことから、酪酸によって誘導された細胞死は NETosis 様の細胞死である可能性が示唆された。

(4) 酪酸誘導の DNA の放出はオートファジー依存的であり、活性酸素依存的であることが上記

図2. 酪酸誘導DNA放出

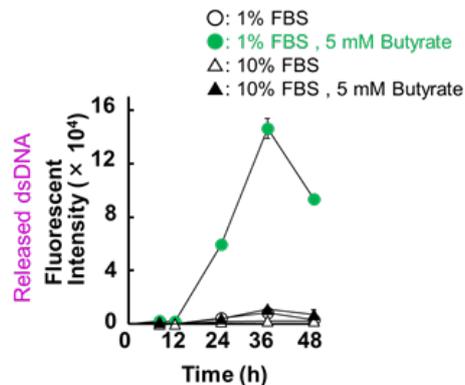


図3. DNAの細胞外放出は siRNAによるオートファジーの阻害で抑制される。

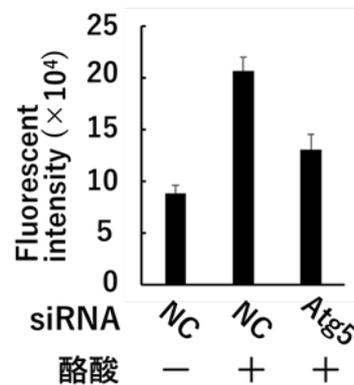
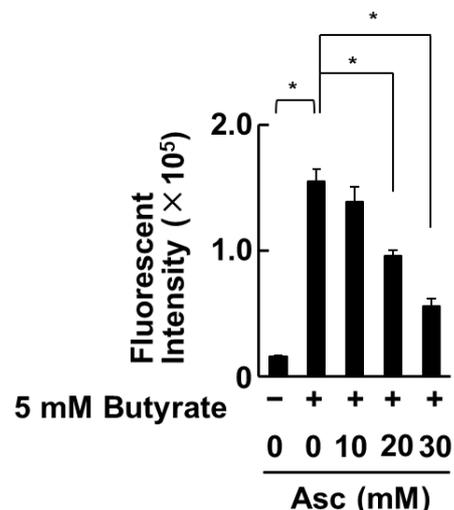


図4. ROSの消去はDNAの細胞外放出を抑制する。



結果から分かった。次に、PAD の抑制が酪酸誘導の DNA 放出に影響を及ぼすかどうかについて調べた。その結果、PAD 阻害剤である Cl-amide の作用によって酪酸誘導の DNA 放出は抑制されなかった (図 5)。これらの事から、酪酸によって誘導された DNA 放出には PAD は関係していない可能性が示唆された。このことから、酪酸誘導 NETosis 様細胞死は PAD 活性を必要としない可能性が示唆された。今のところ、作用させた Cl-amide の濃度は文献的に報告のある濃度で作用させたが、PAD の活性が本当に抑制されたのかどうかについては調べていない。

今後、Cl-amide の PAD 活性抑制濃度を調べて実験を行ったり、siRNA 等で PAD の総量を抑制したりするなどして、本当に細胞死に PAD が関係していないかどうかを調べることが必要である。

(5) 次に、酪酸のマクロファージ様細胞へ及ぼす影響について調べてみたところ、酪酸の作用によりマウスマクロファージ Raw264.7 細胞の細胞死が誘導された (図 6)。次いで、酪酸を高濃度に含んでいると報告されている、歯周病原細菌の *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) および *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) の細菌培養上清を作用させたところ、細胞死が起こるずっと前の時間帯において LPS で誘導された iNOS の発現が抑制された (図 7)。この LPS 誘導 iNOS の産生抑制は様々な短鎖脂肪酸によって起こる事が分かった。これらの事より、*P. gingivalis* および *F. nucleatum* の細菌培養上清中に含まれる短鎖脂肪酸が LPS 誘導のマクロファージの活性化を抑制することが解った。

(6) 以上のことから、酪酸は歯肉上皮細胞の NET 様構造物を放出することが解った。また、その放出にはオートファジー及び活性酸素種が必要であることが解った。さらに酪酸を含む細菌培養上清は LPS によるマクロファージの活性化を抑制することが解った。細菌の産生する短鎖脂肪酸は、NET 様構造物を出すことで、自然免疫に貢献していると言える反面、マクロファージの活性化を抑制することにより自然免疫を抑制していることが示唆された。

図5. PADの阻害剤は酪酸誘導のDNA放出を抑制しなかった。

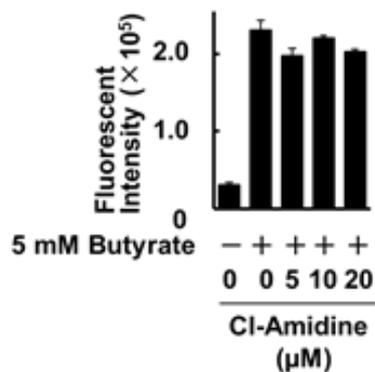


図6. 酪酸はRaw264.7細胞の細胞死を引き起こした。

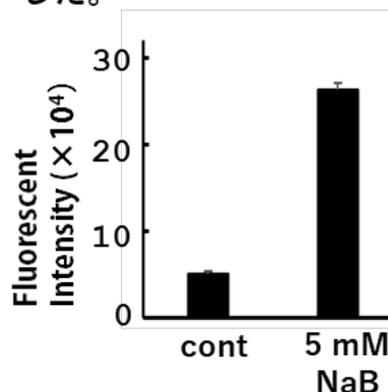
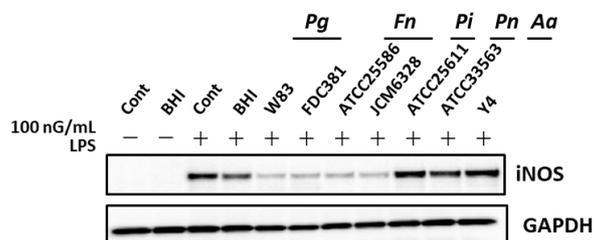


図7. 歯周病原細菌の培養上清はLPS誘導のiNOSの発現を抑制した。



以上より、酪酸は歯肉上皮細胞の NET 様構造物を放出することが解った。また、その放出にはオートファジー及び活性酸素種が必要であることが解った。さらに酪酸を含む細菌培養上清は LPS によるマクロファージの活性化を抑制することが解った。細菌の産生する短鎖脂肪酸は、NET 様構造物を出すことで、自然免疫に貢献していると言える反面、マクロファージの活性化を抑制することにより自然免疫を抑制していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

山口洋子、福村基徳、室伏貴久、津田啓方、鈴木直人、三次元培養歯周炎関連線維芽細胞によるコラーゲン分解に及ぼすメカブの影響 第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会合同年次大会、2017年

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：津田 啓方

ローマ字氏名： TSUDA, Hiromasa

研究協力者氏名：山口 洋子

ローマ字氏名： YAMAGUCHI, Yoko

研究協力者氏名：山口 裕史

ローマ字氏名： YAMAGUCHI, Hirofumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。