

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11662

研究課題名(和文) インフラマソームを介した唾液腺炎の発現機序ならびにその制御方法の検討

研究課題名(英文) Analysis of the pathogenic roles and control mechanisms of inflammasome in sialadenitis

研究代表者

室井 梓(酒井梓)(MUROI, AZUSA)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90463778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：シェーグレン症候群で起こる唾液腺炎はインターロイキン(IL)18が病態発生に関与している。インフラマソームはIL-18を活性化するタンパク質複合体であり、プリンヌクレオチド刺激などにより活性化される。本研究では、唾液腺組織でのIL-18ならびにインフラマソーム構成因子の発現を解析した。さらに、プリンヌクレオチド刺激による口腔上皮細胞の炎症反応も解析した。唾液腺マクロファージにIL-18およびインフラマソーム構成因子の恒常的なmRNA発現が認められた。また、プリンヌクレオチド刺激は口腔上皮細胞からの炎症性サイトカインIL-6の産生を増強し、IL-1との共刺激により相乗的に増強した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺炎による唾液分泌障害はドライマウスを引き起こし、QOLの低下をもたらす。さらに、ドライマウスによる口腔環境の悪化は、口腔粘膜疾患の発症リスクを増加させる。本研究結果から、唾液腺マクロファージから産生されるIL-18が、シェーグレン症候群などによる唾液腺炎の新たな治療ターゲットとなり得ることが示唆された。さらに、プリンヌクレオチドによる口腔上皮細胞からの炎症性サイトカイン産生誘導は、プリンヌクレオチドの様な内因性危険物質をターゲットとした、口腔粘膜疾患の新たな予防・治療法の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Proinflammatory cytokine interleukin (IL)-18 involves in pathology of Sjogren's syndrome. Caspase-1 is a proteolytic enzyme which cleaves pro-IL-18 to bioactive mature IL-18, and activated by inflammasome, a large protein complex including caspase-1. Purine nucleotides are endogenous danger signal and activate inflammasome. In this study, We analyzed the expression of IL-18 and inflammasome components in salivary glands, inflammatory roles of purine nucleotides in oral epithelial cells. Salivary gland macrophages constitutively expressed mRNA of IL-18, caspase-1 and inflammasome components, suggesting that IL-18 from salivary gland macrophages involve in sialadenitis. Purine nucleotides induced the significantly greater production of IL-6 by oral epithelial cells. Moreover, proinflammatory cytokine IL-1 significantly augmented the production of IL-6 induced by purine nucleotides. These results suggest that purine nucleotides play the pathological roles in inflammation of oral mucosa.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：インフラマソーム IL-18 唾液腺炎 細胞外プリンヌクレオチド 危険シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

唾液は良好な口腔環境の維持に必須の分泌液であり、抗菌作用や創傷治癒作用、消化作用、味覚発現作用、潤滑作用などの多彩な機能を担っている。この唾液の分泌が障害されるドライマウスは QOL の大幅な低下を引き起こす要因として問題視され、原因解明と治療法に対する需要が高まっている。なかでもシェーグレン症候群によるドライマウスは重症かつ原因不明であるため、しばしば治療に難渋する。シェーグレン症候群は唾液腺や涙腺といった外分泌腺に炎症を生じる自己免疫疾患であるが、その発症メカニズムはいまだ解明されておらず、有効な予防法や治療法は確立されていない。

研究代表者らはこれまで、シェーグレン症候群患者から採取した唾液、唾液腺組織、さらには唾液腺細胞株を用いて、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -18 が唾液腺炎の発症に重要であることを明らかにした。IL-18 は細胞内では生物活性を持たない前駆体として蓄積され、システインプロテアーゼの 1 種であるカスパーゼ 1 によって活性化型に分解された後、細胞外に分泌される。カスパーゼ 1 の活性化には、パターン認識受容体である NOD 受容体 (NLR) 、アダプター分子 ACS、そしてカスパーゼ 1 から構成されるインフラマソームとよばれる巨大タンパク質複合体が必須となる。微生物由来成分や内因性化学物質などの危険物質は、インフラマソームを活性化する危険シグナルである。この内、アデノシン三リン酸 (ATP) は P2X7 受容体を介して細胞を刺激し、インフラマソームを活性化することが報告されている。また、ATP やアデノシン二リン酸 (ADP) などのプリンヌクレオチドは内因性危険物質として機能し、P2 受容体を介して種々の細胞を刺激することにより、アポトーシスや炎症性サイトカイン産生を誘導する。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、唾液腺組織におけるインフラマソームの活性化と活性化型 IL-18 産生機構を解析し、唾液腺炎発症における IL-18 ならびにインフラマソームの関与を解明することを目的とした。さらに、内因性危険物質であるプリンヌクレオチドについて、口腔粘膜に対する炎症誘導能を解析し、口腔粘膜疾患における危険シグナルの役割の解明も目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液腺マクロファージにおける IL-18 ならびにインフラマソーム関連遺伝子発現

コラゲナーゼ処理によりマウス顎下腺から細胞懸濁液を調整した。その後、フローサイトメーターを用いて、マウス顎下腺由来マクロファージを精製した。顎下腺マクロファージの遺伝子発現はマイクロアレイ法により網羅的に解析した。

### (2) 口腔上皮細胞の危険シグナル刺激応答

ヒト口腔上皮細胞株である HSC-2 細胞における mRNA 発現は RT-PCR 法により解析した。培養上清中の各種サイトカイン濃度は ELISA 法により測定した。細胞質内タンパク質の発現はウェスタンブロットング法により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 唾液腺組織における IL-18 ならびにインフラマソーム構成因子の発現

当初はヒト下唇小唾液腺における IL-18 ならびにインフラマソーム構成因子の発現の解析を

計画していた。しかしながら、十分な研究材料を採取することが出来ず、解析を継続することが困難であったため、マウス顎下腺における IL-18 およびインフラマソーム構成因子の発現を解析した。特に、IL-18 の主要な産生細胞であるマクロファージに着目した。マクロファージは、貪食能と抗原提示能を持つ自然免疫担当細胞であり、生体防御と組織恒常性の維持を担っている。さらに、唾液腺マクロファージとシェーグレン症候群の関連も報告されている。

その結果、唾液腺マクロファージでは IL-18 に加え、P2X7 受容体、NOD 受容体、ASC、カスパーゼ 1 などのインフラマソーム構成因子の mRNA が恒常的に発現しており、細胞外 ATP 刺激により活性化型 IL-18 を分泌する可能性が考えられた。この唾液腺マクロファージによる IL-18 産生と唾液腺炎との関連は今後の検討課題である。

## (2) 口腔上皮細胞の危険シグナル刺激応答

これまでの研究から、口腔上皮細胞も IL-18 を恒常的に発現していることが明らかとなっている。このため、口腔上皮細胞においても、細胞外 ATP 刺激によるインフラマソームの活性化と、活性化型 IL-18 の産生誘導が推察された。そこで、ヒト口腔上皮細胞株である HSC-2 細胞におけるプリンヌクレオチド刺激応答性を検討した。まず、P2 受容体 mRNA 発現を解析したところ、HSC-2 細胞は P2X4-6 およびすべての P2Y 受容体 mRNA を恒常的に発現していた。しかしながら、ATP 刺激 HSC-2 細胞におけるカスパーゼ 1 の活性化や活性化型 IL-18 の分泌は認められなかった。その一方、ATP および ADP 刺激により、主要な炎症性サイトカインである IL-6 の産生増強が認められた (図 1)。

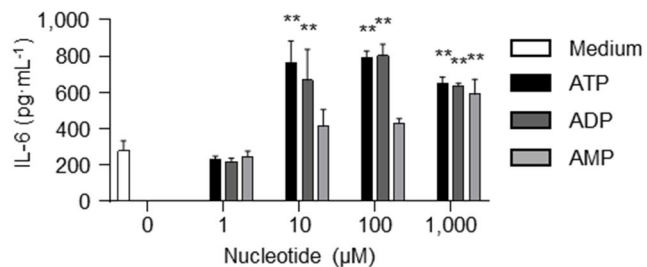


図 1. プリンヌクレオチド刺激 HSC-2 細胞による IL-6 産生

この ATP/ADP 刺激による IL-6 産生の誘導は P2 受容体アンタゴニストである suramin および PPADS で阻害されたことから、いずれかの P2 受容体を介することが示唆された (図 2A)。さらに、p38 MAPK 阻害剤により ATP/ADP 刺激による IL-6 産生誘導が阻害されたことから、p38 MAPK が P2 受容体の下流で機能していることが示唆された (図 2B)。

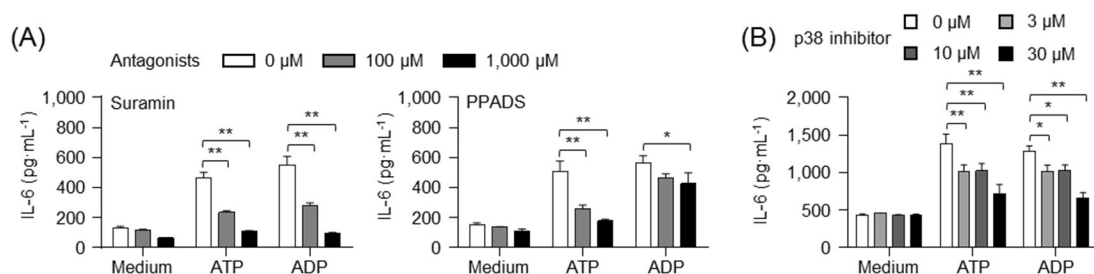


図 2. P2 受容体アンタゴニスト (A) および p38 MAPK 阻害剤による ATP/ADP 刺激 HSC-2 細胞による IL-6 産生

また、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 $\alpha$  もしくは IL-1 $\beta$  の共刺激により、ATP/ADP 刺激による IL-6 産生が相乗的に増強された(図3)。IL-1 は上皮細胞などが恒常的に発現しており、細胞内に蓄積された IL-1 が危険シグナルとして機能することが報告されている。HSC-2 細胞においても、IL-1 mRNA およびタンパク質の恒常的な発現が認められた。これらの結果から、口腔上皮細胞に由来する 2 種類の危険シグナル、ATP/ADP と IL-1 による相乗的な炎症誘導機構が示唆された。

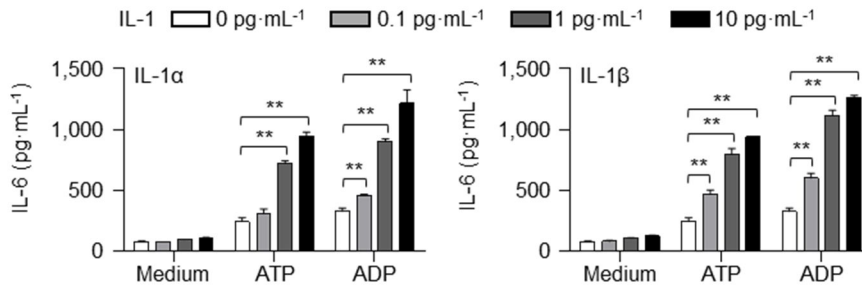


図3 . IL-1 と ATP/ADP の共刺激による HSC-2 細胞からの IL-6 産生

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 穴戸 香, 黒石智誠, 菅原俊二
2. 発表標題 P2受容体アゴニストとIL-1の共刺激はヒト口腔上皮細胞におけるIL-6産生を相乗的に増強する.
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 陸 路, 黒石智誠, 菅原俊二
2. 発表標題 マウス唾液腺における組織マクロファージの解析.
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 穴戸 香, 黒石智誠, 菅原俊二
2. 発表標題 細胞外purine nucleotide刺激はヒト口腔上皮細胞における炎症性サイトカイン産生を増強する
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	笹野 高嗣  (SASANO TAKASHI)  (10125560)	東北大学・歯学研究科・名誉教授    (11301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	菅原 俊二 (SUGAWARA SHUNJI)  (10241639)	東北大学・歯学研究科・教授  (11301)	
研究分担者	黒石 智誠 (KUROISHI TOSHINOBU)  (30400261)	東北大学・歯学研究科・講師  (11301)	