

令和元年5月17日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20527

研究課題名（和文）新しいマクロファージ機能転換方法とインプラント周囲炎治療への応用

研究課題名（英文）Functional switch of inflammatory macrophages and novel treatment strategies for peri-implantitis

研究代表者

原田 佳奈（Harada, Kana）

広島大学・医歯薬保健学研究科（医）・助教

研究者番号：90609744

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000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として着目したポリリン酸が、細菌構成成分リポポリサッカライド（LPS）により活性化された炎症性のマクロファージの性質をどのように変化させるのか検討した。ポリリン酸は、LPSによる転写因子STAT1のリン酸化を抑制する。この機序には、インターフェロンIFN- γ の作用の抑制や、脱リン酸化酵素SHP2の活性化など、複数の機構が関与することが示された。ケモカインCXCL10など、STAT1により促進される遺伝子発現は、ポリリン酸処置により低下することが明らかになった。また、ポリリン酸はLPSによる破骨細胞の分化抑制を強める可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージにおけるポリリン酸の新たな作用として、IFN- γ の作用の抑制やSHP2の活性化を介したSTAT1リン酸化抑制が明らかとなり、ポリリン酸を臨床で用いる上で重要な知見を得ることができた。また、ポリリン酸は生体内にも存在するが、その生理的役割には不明な点が多い。本研究成果は、生体におけるポリリン酸の機能を理解する上でも一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed to examine the effects of polyphosphate [poly(P)], a drug candidate for the treatment of peri-implantitis, on the inflammatory nature of macrophages activated by bacterial lipopolysaccharide (LPS). The results suggest that, in macrophages, poly(P) suppresses LPS-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1, a transcriptional factor, through multiple mechanisms including inhibition of the effects of interferon- γ and activation of Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase. Poly (P) down-regulated STAT1-mediated gene expression such as the gene encoding chemokine (CXC) motif ligand 10. In addition, poly(P) may augment LPS-mediated inhibition of osteoclast differentiation.

研究分野：薬理学

キーワード：ポリリン酸 リポポリサッカライド マクロファージ CXCL10 STAT1 IFN- γ SHP2 破骨細胞

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

1. 研究開始当初の背景

近年、補綴歯科治療において、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。インプラント周囲炎はインプラント周囲組織の炎症と骨吸収を引き起こすことから、インプラントの長期的維持において大きな問題となる。現在の治療法はブラークの機械的除去やクロルヘキシジンによる洗浄であるが、インプラント表面は粗造でブラークの完全除去が難しく、破壊されたインプラント周囲組織の再生も困難である。このような背景から、確実な治療効果の得られるインプラント周囲炎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の新しい治療法の確立を目指し、骨代謝に関わる生体物質「ポリリン酸」の機能に焦点をあて、研究を行ってきた。ポリリン酸は、数十個から数百個のリン酸が直鎖状に結合した分子である(図1)。インプラント周囲炎ではインプラント周囲骨の吸収が引き起こされるが、ポリリン酸は fibroblast growth factor-2 の分解を抑制することで骨芽細胞の分化・石灰化を促進し、骨形成を促進することが知られている。また、ポリリン酸は原因菌 *Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌作用を示す。一方、インプラント周囲炎において骨吸収を促進する炎症に対して、ポリリン酸がどのような影響を及ぼすのかわからない点が多い。

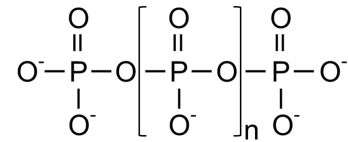


図1 ポリリン酸の構造

細菌由来物質のリポポリサッカライド(LPS)はマクロファージを活性化し、炎症を誘導する。このような炎症性のマクロファージにおいて高発現している誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)は、ポリリン酸処置により著しく発現低下することを研究代表者は見出した。そこで、ポリリン酸を用いてマクロファージの機能を変化させることができるか、その現象をインプラント周囲炎の治療に利用できるか可能性を探ることにした。

2. 研究の目的

LPSにより活性化された炎症性のマクロファージの性質に対してポリリン酸がどのような影響を与えるのか、炎症関連分子の発現変化とそのメカニズムを明らかにする。また、ポリリン酸を作用させたマクロファージが骨代謝に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス腹腔マクロファージの採取

C57BL/6J マウス(雄、8-16週齢)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採取した。この腹腔滲出細胞を1%ウシ胎児血清(FBS)含有RPMI 1640培地に分散させてディッシュに播種し、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て使用した。

(2) マクロファージへのポリリン酸、LPS、IFN- γ の処置

マクロファージに平均リン酸数130個のポリリン酸(リン酸換算濃度100 μM)を処置し、5分後にLPS(100 ng/mL)を処置した。あるいは、ポリリン酸処置の2時間後に interferon- γ (IFN- γ 、100 U/mL)を処置した。

(3) mRNA発現の解析

マクロファージからRNAを抽出、逆転写反応によりcDNAを合成し、リアルタイムPCRにより解析した。

(4) TNF、IL-1、IL-6、IL-10およびCXCL10の放出量の測定

マクロファージの培養上清中の tumor necrosis factor(TNF)、interleukin(IL)-1、IL-6、IL-10および chemokine (CXC) motif ligand 10 (CXCL10)の濃度をELISAにより測定した。

(5) JAK1、TYK2、STAT1およびSHP2の検出

マクロファージの細胞溶解物中の Janus kinase 1 (JAK1)、tyrosine kinase 2 (TYK2)、signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)、Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP2) およびそれらのリン酸化型を、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。

(6) 破骨細胞の培養

C57BL/6J マウス(雄、5-6週齢)の大腿骨と脛骨から骨髄細胞を採取した。骨髄細胞を10% FBS含有MEM培地に分散させてディッシュに播種し、5 ng/mL macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)を16時間処置した後、非接着細胞を回収した。この非接着細胞に60 ng/mL M-CSFを3日間処置し、破骨前駆細胞に分化させた。次に、破骨前駆細胞に5 ng/mL M-CSFおよび100 ng/mL receptor activator of nuclear factor κ B ligand(RANKL)を処置し、破骨細胞に分

化させた。

4. 研究成果

(1) LPS により活性化されたマクロファージの性質に及ぼすポリリン酸の影響

Toll-like receptor 4 (TLR4) を介して LPS により活性化されたマクロファージは、様々な炎症関連分子を産生し、炎症を誘導する。このような炎症関連分子の一つである iNOS の発現は、ポリリン酸処置により抑制されることをこれまでに明らかにした。しかしながら、ポリリン酸が他の炎症関連分子の産生にも影響を与えるかどうか不明である。そこで本研究では、LPS 処置マクロファージにおける炎症関連分子の産生に及ぼすポリリン酸の影響を、マウス腹腔マクロファージを用いて検討した。以前の結果と一致して、ポリリン酸は、LPS で刺激したマクロファージからの TNF 放出には影響を与えなかった。また、IL-1、IL-6、IL-10 の放出に対してもポリリン酸は影響を与えなかった。一方、LPS によるケモカイン CXCL10 の放出は、ポリリン酸処置により抑制されることが明らかになった。ポリリン酸による CXCL10 放出の抑制が転写段階での抑制かどうかリアルタイム PCR により検討したところ、ポリリン酸は LPS による CXCL10 mRNA 発現を抑制することが明らかになった。したがって、LPS 処置マクロファージにおいて、ポリリン酸は CXCL10 mRNA 発現を抑制することで、CXCL10 放出量を減少させることが明らかになった。これまでの研究成果も併せると、ポリリン酸は LPS で活性化されたマクロファージで産生されるすべての炎症関連分子の発現を抑制するのではなく、CXCL10 や iNOS といった特定の遺伝子発現を抑制することが示された。

(2) LPS により活性化されるマクロファージ細胞内情報伝達に及ぼすポリリン酸の影響

LPS により活性化された TLR4 は、nuclear factor B (NF- κ B)、mitogen-activated protein kinase (MAPK)、interferon regulatory factor 3 (IRF3) などの活性化を引き起こす。IRF3 は IFN- β の発現を誘導し、細胞外へ放出された IFN- β は、IFN R1/2 を介して JAK1/TYK2 とその下流の STAT1 を活性化する (図 2)。LPS の刺激を受けたマクロファージにおける STAT1 の活性化は、CXCL10 や iNOS の発現誘導に関与することが報告されている。これまでの検討により、マクロファージへのポリリン酸処置は NF- κ B や MAPK の活性化には影響を与えないが、LPS による IRF3 リン酸化と IFN- β 放出を一過性 (LPS 処置 1-3 時間後) に、部分的に抑制することを見出した。

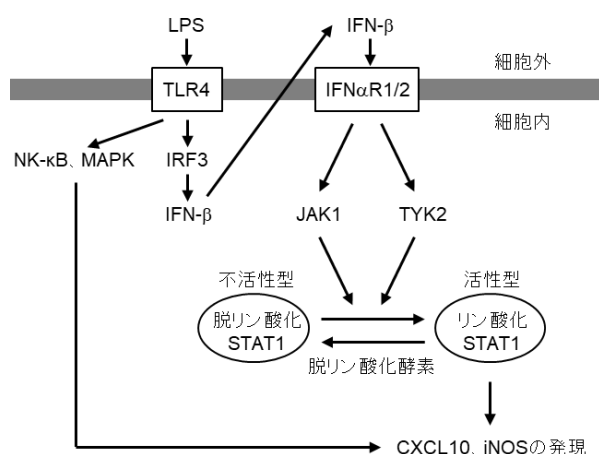


図 2 LPS により活性化される細胞内情報伝達系

一方、ポリリン酸は、LPS による STAT1 リン酸化に対しては持続的 (LPS 処置 2-24 時間後) な抑制作用を示す。そこで、マクロファージにおけるポリリン酸の作用機構をさらに明らかにするため、JAK1/TYK2-STAT1 の活性化に及ぼすポリリン酸の影響の経時変化を調べた。

LPS による JAK1/TYK2-STAT1 活性化と脱リン酸化酵素に及ぼすポリリン酸の影響

マクロファージに LPS を処置すると、LPS 処置 2-4.5 時間後の早期 STAT1 リン酸化と LPS 処置 6-24 時間後の遅延 STAT1 リン酸化から成る、二相性の STAT1 リン酸化上昇が引き起こされる。この時間経過と一致して、STAT1 上流の JAK1 と TYK2 においても早期リン酸化と遅延リン酸化が認められた。そこで、LPS 処置時間の設定を、早期リン酸化については 2 時間、遅延リン酸化については 12 時間とし、以降の検討を行った。

ポリリン酸は LPS による STAT1 の早期リン酸化と遅延リン酸化を共に抑制した。また、ポリリン酸は JAK1 と TYK2 の早期リン酸化も抑制した。この結果は、LPS 処置 1-2 時間後の早期においてはポリリン酸は IRF3 の上流を抑制し、下流の IRF3 リン酸化、IFN- β 放出、早期 STAT1 リン酸化を低下させるという以前の考察を支持する。一方、JAK1/TYK2 の遅延リン酸化に対するポリリン酸の作用は、早期リン酸化に対する作用とは異なっていた。ポリリン酸は、LPS による TYK2 の遅延リン酸化を抑制せず、増強する傾向を示した。また、ポリリン酸は遅延 JAK1 リン酸化を抑制する傾向を示す一方で JAK1 発現量を増加させ、リン酸化 JAK1 の全体量は増加させることが明らかになった。

リン酸化された STAT1 は、脱リン酸化酵素の働きにより脱リン酸化される。STAT1 を脱リン酸化する酵素として、SHP2 が報告されている。そこで、ポリリン酸が SHP2 の活性化に影響を与えるかどうか検討した。SHP2 の活性化をリン酸化を指標として評価したところ、ポリリン酸は LPS 処置 12 時間後における SHP2 リン酸化を促進することが明らかとなった。この LPS 処置時間は、ポリリン酸が遅延 STAT1 リン酸化を抑制する時間経過と一致している。一方、STAT1 の早期リン酸化が起こる LPS 処置 2 時間後の SHP2 リン酸化に対しては、ポリリン酸は影響を与えなかった。

以上より、LPS 処置後早期においては、ポリリン酸は IRF3 の上流でシグナル伝達を阻害し、STAT1 リン酸化を低下させると考えられる。一方、LPS 処置 12 時間後では、ポリリン酸は SHP2 の活性化を増強することにより、STAT1 の脱リン酸化を促進することが示唆された。

IFN- による STAT1 活性化に及ぼすポリリン酸の影響

ポリリン酸が IFN- の作用に影響を与えるかどうか明らかにするため、IFN- による STAT1 リン酸化に及ぼすポリリン酸の影響を検討した。マクロファージへ IFN- を処置すると、処置 1 時間後を最大とする STAT1 リン酸化を引き起こされた。ポリリン酸は、IFN- 処置 1-3 時間後の STAT1 リン酸化を一過性に、部分的に抑制した。したがって、ポリリン酸は、IFN- の作用も部分的に抑制することが示された。

(3) 破骨細胞の分化に及ぼすポリリン酸の影響

破骨前駆細胞に RANKL を処置すると破骨細胞に分化する。RANKL 処置の前に LPS を処置しておく、破骨細胞への分化が抑制されることが知られている。本研究では、細菌由来物質 LPS 存在下でポリリン酸が破骨細胞の分化にどのような影響を与えるのか検討した。破骨前駆細胞にポリリン酸および LPS を処置した後に RANKL を処置したところ、ポリリン酸は LPS による破骨細胞分化抑制を阻害せず、むしろ増強した。

本研究結果とポリリン酸に関するこれまでの報告を併せて考えると、リン酸の繰り返しという単純な構造を持つポリリン酸(図 1)は、様々な生体分子と相互作用し、その総和として炎症や骨代謝を調節する作用が現れるようである。生体におけるポリリン酸の作用については未解明の部分が多い。本研究では、LPS で活性化された炎症性のマクロファージにおいて、ポリリン酸は IRF3 の上流のほか、SHP2 リン酸化、IFN- の作用にも影響を与え、STAT1 リン酸化を抑制することが明らかになった。このような複数の機序で STAT1 リン酸化を抑制するポリリン酸は、STAT1 により促進される CXCL10 や iNOS といった遺伝子発現を低下させることが示された。また、ポリリン酸は、LPS による破骨細胞分化抑制をさらに増強できる可能性が示された。これらの成果は、インプラント周囲炎治療にポリリン酸を用いるにあたって、ポリリン酸の作用を理解する上で重要な知見である。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

原田佳奈、ポリリン酸は LPS によるマクロファージ細胞内情報伝達の活性化と炎症関連分子の産生を調節する、日本薬学会第 139 年会、2019 年

原田佳奈、ポリリン酸によるマクロファージ STAT1 制御機構と CXCL10、iNOS 産生抑制、第 92 回日本薬理学会年会、2019 年

原田佳奈、マウス腹腔マクロファージにおけるサイトカイン産生に及ぼすポリリン酸の影響、第 134 回日本薬理学会近畿部会、2018 年

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。