

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17116

研究課題名(和文)インフラマソームを標的とした低出力超音波パルスを用いた新規歯内治療の基盤構築

研究課題名(英文)Study of new Endodontic treatment using LIPUS target for Inflammasome

研究代表者

須藤 瑞樹 (Suto, Mizuki)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：40708046

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)：低出力超音波(LIPUS)は、骨関連細胞に対してin vitroにおいて骨形成を促進することが報告されているが、LIPUS照射の炎症作用に対する効果はあまり知られていない。本研究は、LPS刺激マウスマクロファージ様株化細胞(J774.1)を用いてLIPUSの炎症反応に対する影響について検討を行った。LIPUS照射のLPS刺激したJ774.1に与える影響について検討した結果、LIPUS照射はLPS刺激によって誘導されたIL-1 β の発現を遺伝子およびタンパクレベルで抑制した。この抑制機序については、LIPUS照射によるNF- κ Bのp65シグナルの抑制であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LIPUS照射のLPS刺激したマウスマクロファージ様株化細胞に与える影響について検討した結果、LIPUS照射はLPSが誘導したIL-1 β の発現を遺伝子およびタンパクレベルで抑制した。これはインフラマソーム情報伝達経路に影響を及ぼすものではなくNF- κ Bのp65シグナルを抑制することによってIL-1 β の発現を抑制するものと示唆された。これらの知見はLIPUS照射がNF- κ Bに關与する疾患の治療法に対して有効に作用する可能性を示唆するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS), which acts on cells as a mechanical stress, has been reported that LIPUS treatment has a potential to activate osteogenesis. However, little is known regarding an effect of LIPUS treatment on inflammation. In this study, we examined the effect of LIPUS on J774.1, a murine macrophage cell line, stimulated with E. coli lipopolysaccharide (LPS). We found that LIPUS exerts anti-inflammatory effects on LPS-stimulated J774.1 by inhibiting NF- κ B signaling, resulting in an inhibition of IL-1 β expression. LIPUS may be a powerful therapeutic tool for the NF- κ B-associated diseases such as periodontal diseases.

研究分野：歯内療法

キーワード：インフラマソーム LIPUS マクロファージ 抗炎症作用

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

根尖性歯周炎は、う蝕病巣から歯髄炎を経て根尖部の歯周組織に炎症性疾患として広がった病変である。根尖性歯周炎は根管および根尖歯周組織においてグラム陰性嫌気性菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* など) が Lipopolysaccharide (LPS) を産生し、根尖部周囲のマクロファージを中心とする炎症性細胞から種々の炎症性サイトカインや炎症性メディエーターを誘導し炎症が憎悪する。

この根尖性歯周炎の炎症を憎悪させ、病態形成に重要な因子のひとつに IL-1 β がある。IL-1 β は、他の炎症性サイトカインを誘導することによって炎症反応を増大させ、破骨細胞の活性化やマトリックスメタロプロテアーゼを誘導することにより、歯槽骨吸収や結合組織破壊を進行させるなど病態形成に大きく関与している。近年、この IL-1 β が関与する炎症性疾患はインフラマソームとよばれる細胞内センサーの活性化が関与していることが明らかとなっている。

インフラマソームは生体に加わる様々な刺激を認識し、NOD-like receptor family, pyrin domain containing3 (NLRP3), Pro-Caspase-1, Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) から構成される細胞内タンパク複合体であり、IL-1 β の産生を制御する。グラム陰性嫌気性菌由来 LPS により IL-1 β はマクロファージの Toll-like receptors (TLRs) のシグナルにより Pro-IL-1 β (前駆体) として細胞内に蓄積される。前駆体 IL-1 β はそのままでは生理活性を持たず、細胞外へ放出されることはない。しかしインフラマソームの活性化というもう一つのシグナルにより誘導された Caspase-1 により前駆体 IL-1 β は切断され成熟型 IL-1 β に変換され、細胞外に分泌され炎症反応を憎悪させる (図 1)。

低出力超音波パルス (Low intensity pulsed ultrasound: 以下 LIPUS) は 1980 年代に米国で開発され、低出力の超音波パルスを照射することで骨折部位に非侵襲性に機械的なメカニカル・ストレス刺激を与え、骨折治癒を促進する医療機械である。骨折治癒促進効果が証明されて以来、日本では 1995 年に整形外科領域で臨床治療が導入され、安全性の実績を有する。歯科領域においては、Inubishi ら (2008) は LIPUS を歯根膜細胞に照射することで歯根膜細胞の分化が促進されることを報告した。

本研究は既に整形外科分野で臨床的に使用されていて安全性の実績を有し、倫理的なハードルも極めて低いという利点を有する LIPUS を使用し、根尖性歯周炎におけるインフラマソーム情報伝達系を標的とする抗炎症作用の分子機構を明らかにすることである。

2. 研究の目的

マクロファージにより分泌される IL-1 β は、根尖性歯周炎の炎症を憎悪させ、病態形成に重要な因子である。本研究の目的は IL-1 β の分泌を制御している細胞内タンパク複合体であるインフラマソームに対する LIPUS の抗炎症効果について分子生物学的および組織学的に明らかにすることである。LIPUS は整形外科領域をはじめとして硬組織形成促進作用があることが知られているが、インフラマソームへの効果は知られていない。本研究により、LIPUS によるインフラマソーム情報伝達系の制御が可能となれば難治性根尖性歯周炎等に対する新たな治療法の開発につながり、生活の質の向上や治療期間の短縮等につながると考えられる。

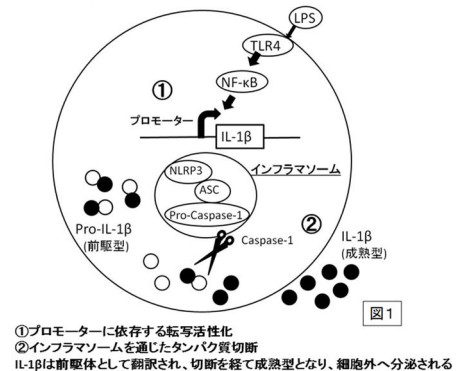
3. 研究の方法

マウスマクロファージ様株化細胞 (J774.) は 10% fetal bovine serum (FBS) 添加 RPMI1640 培地で継代培養して供試した。LPS は *Escherichia coli* 由来のものを使用し、100 ng/ml の濃度で 6 時間培養を行った。ウルトラサウンド ST-SONIC (伊藤超短波株式会社) を用いて有効強度 60 mW/cm²、音響作用周波数 1.5MHz で LPS 刺激開始とともに 1 時間照射を行い、引き続き 5 時間培養を行い、最後の 1 時間はアデノシン三リン酸 (ATP) を添加することにより NLRP3 (NLR family, pyrin domain-containing 3) インフラマソームを活性化させた。遺伝子およびタンパクの発現はそれぞれ Real-time PCR, および Western blot, ELISA にて解析を行った。

4. 研究成果

LPS 刺激した J774.1 は LIPUS 照射を行った結果、LIPUS 照射群の IL-1 β 発現を遺伝子およびタンパクレベルで有意に抑制した。LIPUS 照射は、NF- κ B を構成している p65 のリン酸化を抑制していることが Western blot 法により明らかとなった。また、LPS 刺激開始と同時に LIPUS 照

<IL-1 β の産生・分泌を調整する仕組み>



射を行った場合では IL-1 β のタンパク発現は有意に抑制されるものの、LIPUS 照射を ATP 刺激開始時、すなわち最後の 1 時間で行うと IL-1 β のタンパク産生は抑制されなかった。

LIPUS 照射の LPS 刺激した J774.1 に与える影響について検討した結果、LIPUS 照射は LPS が誘導した IL-1 β の発現を遺伝子およびタンパクレベルで抑制した。これは NF κ -B の p65 シグナルを抑制することによって IL-1 β の発現を抑制するものと示唆された (図 2)。

これらの知見は LIPUS 照射が歯周炎をはじめとする NF κ -B が関与する疾患の治療法に対して有効に作用する可能性を示唆するものと考えられる。

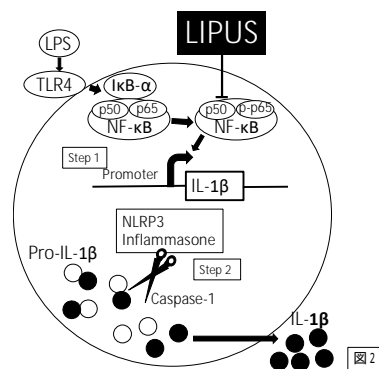


図 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maruyama Kentaro, Sakisaka Yukihiro, Suto Mizuki, Tada Hiroyuki, Nakamura Takashi, Yamada Satoru, Nemoto Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Cyclic Stretch Negatively Regulates IL-1 Secretion Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation by Attenuating the AMP Kinase Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 802 ~ 814
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2018.00802	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanaya Sousuke, Xiao Binlu, Sakisaka Yukihiro, Suto Mizuki, Maruyama Kentaro, Saito Masahiro, Nemoto Eiji	4. 巻 26
2. 論文標題 Extracellular calcium increases fibroblast growth factor 2 gene expression via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and protein kinase A signaling in mouse dental papilla cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Applied Oral Science	6. 最初と最後の頁 231 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1590/1678-7757-2017-0231	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 丸山顕太郎、池野修好、小松秀裕、向阪幸彦、大方広志、須藤瑞樹、根本英二、庄司茂	4. 巻 第60巻 第3号
2. 論文標題 偏心モーター内蔵型振動スケーラーの歯石除去における臨床的有効性の評価	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本歯科保存学会誌	6. 最初と最後の頁 111 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11471/shikahozon.60.111	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王祝愉、根本英二、丸山顕太郎、鈴木茂樹、多田浩之、向阪幸彦、須藤瑞樹、山田聡
2. 発表標題 ヒト歯根膜細胞は周期的伸展刺激により抗炎症性エクソソームを分泌する
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石幡浩志、須藤瑞樹、向阪幸彦、小松秀裕、丸山顕太郎、山田聡、長谷川博
2. 発表標題 骨補填材を用いたGBRにおける純チタン製メンブレンの有効性について
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤瑞樹、石幡浩志、向阪幸彦、山田聡、長谷川博
2. 発表標題 新規GBR用純チタン製メンブレンの有用性について： TCPを用いたin vivoでの評価
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向阪幸彦、石幡浩志、須藤瑞樹、小松秀裕、丸山顕太郎、山田聡、長谷川博
2. 発表標題 in vivoでの新規GBR用純チタン製メンブレンの有効性について
3. 学会等名 第61回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuki Suto, Eiji Nemoto, Kentaro Maruyama, Yukihiko Sakisaka, Satoru Yamada
2. 発表標題 LIPUS inhibits IL-1 secretion through NF- B signaling pathway in macrophages
3. 学会等名 第104回アメリカ歯周病学会共催 カナダ歯周病学会・日本臨床歯周病学会・日本歯周病学会 2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiji Nemoto , Kentaro Maruyama , Yukihiko Sakisaka , Mizuki Suto , Hiroyuki Tada , Takashi Nakamura , Satoru Yamada
2. 発表標題 Cyclic stretch inhibits IL-1 secretion by attenuating NLRP3 inflammasome activation
3. 学会等名 第104回アメリカ歯周病学会共催 カナダ歯周病学会・日本臨床歯周病学会・日本歯周病学会 2018年大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mizuki Suto, Kentaro Maruyama, Sousuke Kanaya, Eiji Nemoto
2. 発表標題 Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits proinflammatory cytokine secretion from murine macrophages triggered by E.coli Lipopolysaccharide.
3. 学会等名 The 2017 Japan-NIH Joint Symposium.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須藤瑞樹、丸山顕太郎、金谷聡介、根本英二
2. 発表標題 LIPUS刺激はNF- Bシグナル抑制を介してIL-1 分泌を抑制する
3. 学会等名 第146回秋季日本歯科保存学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山顕太郎、須藤瑞樹、向阪幸彦、金谷聡介、根本英二
2. 発表標題 マクロファージ周期的伸展刺激はNLRP3インフラマソームを介したIL-1 分泌を抑制する
3. 学会等名 第146回秋季日本歯科保存学会学術大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----