

令和元年6月18日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17611

研究課題名(和文) NETosisを介した歯周炎症の病態解明と治療戦略の開発

研究課題名(英文) Clarification of disease state and development of therapeutic strategy on periodontitis mediating NETosis

研究代表者

今野 泰典 (KONNO, YASUNORI)

秋田大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50581162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯性感染症における好中球NETosisの関連について検討を試みた。臨床サンプルについては、確認方法は確立とNETsの存在を確認できた。各種サイトカインの定量は有意な結果は得られなかった。In vitroの検討では、条件設定等に時間を要し、有意な結果は得られなかった。これらの結果より、歯性感染症においてNETosisが関与している可能性が示唆された。今後、詳細なメカニズムについてさらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科口腔疾患におけるneutrophil extracellular traps (NETs)の関連については、NETsの構成成分のヒストンによる上皮細胞障害や歯周病原菌による動脈硬化への関与が明らかとなっている。本研究で、歯性感染の局所でのNETsの存在を確認した。さらに、NETosisにおいて、細胞外に放出された顆粒蛋白、ヒストンやDNAによる組織障害性により、病態形成に何らかの影響を与えていると予想される。単なる炎症として片付けられていた病態を、新たな視点で解明することで、NETsの適切な制御という新たな治療戦略へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to evaluate relevance of NETosis on odontogenic infection. In assay using clinical specimen, we could establish processing methods of sample and confirm localization of NETs. However, in quantification of cytokines, we could not achieve significant results. In vitro, we could not performed enough experiment because of much time required for condition setting. Our results indicated the possibility of relevance of NETosis on odontogenic infection. It is necessary to evaluate mechanisms in more detail.

研究分野：外科系歯学

キーワード：歯性感染症 NETosis 好中球

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、活性化に伴いネット状の DNA を放出する。これは細胞死の結果であるが、核の凝集や DNA の断片化がおこらず、核膜と細胞膜の崩壊を伴うという特徴を有することから、アポトーシスやネクローシスと区別して Extracellular trap cell death (ETosis)と呼ばれる。この細胞死は重要な自然免疫機構である一方、適切に ETosis をコントロールすることは炎症疾患の治療戦略になっていくと考えられる。

2. 研究の目的

歯周炎は中高年層の 70%以上が罹患している口腔常在菌による慢性炎症疾患であり、脳血管障害や糖尿病をはじめ様々な疾患との関連から、その制御が重要視される。本研究では、歯周炎をはじめとした歯性感染症の病態形成における好中球の ETosis (Neutrophil ETosis; NETosis) の関与を明らかにし、新しい治療戦略の提唱を目指す。

3. 研究の方法

臨床サンプルを用いて、歯周炎組織における NETs の局在、細菌やバイオフィームとの関連を組織学的な観点から検討する。さらに、口腔内での NETosis のメカニズムと機能について、ヒト末梢血分離好中球を用いた in vitro の検討を行う。口腔内常在菌による NETosis 誘導と NETs による組織傷害の可能性、炎症発展への修飾メカニズムを明らかにし、必要となるシグナルと分子機構を探索する。最終的には、病態に及ぼす影響や治療戦略の確立を目指す。

4. 研究成果

(1) 歯周炎、顎骨骨髓炎等の歯性感染症を有する患者から同意を得て採取した手術検体、膿などを用いて、NETs が評価可能か検討した。サンプルの採取・固定・保存方法、パラフィン切片の厚みなど基礎的な検討についてはすでに確立した。組織や分泌液中の好中球の形態やバイオフィームは免疫蛍光染色(抗 Histon 抗体)、共焦点顕微鏡、透過型電子顕微鏡を用いて検討し、歯性感染症における NETosis および NETs の関連を示唆する結果となった。

2) In vitro の検討としては、実際の健常人から同意を得て採取した末梢血を用い、好中球を分離、得られたヒト分離好中球を用いて、口腔内常在菌による NETosis -NETs の誘導が可能かを検討した。細胞死については LDH 放出、好中球の形態変化については共焦点顕微鏡や透過型電子顕微鏡により経時的に検討した。これらの研究に関しては、分離好中球において手技、方法はすでに確立しており、同様のプロトコールで検討できることを確認した。

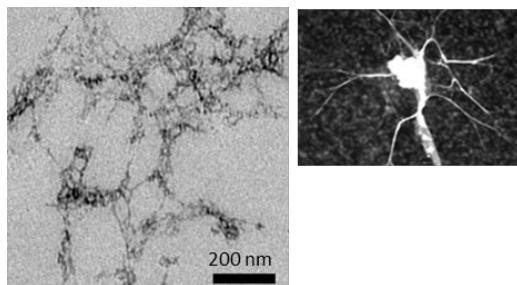


図 分離好中球から誘導した NETs

PMA で刺激し、NETosis を誘導

左: 透過型電子顕微鏡

右: 倒立顕微鏡

(SYTOX 染色、40 倍)

グラム陰性菌の構成成分 LPS や IL-1、IL-8、TNF- α などの炎症性サイトカインと NETosis との関係を検討した。これらは、培養条件、各種試薬濃度等の調整に困難を要し、実験方法の検討にとどまった。

ETosis を誘導させた好中球を用いて破骨細胞や骨芽細胞、線維芽細胞などの培養細胞との共培養を行い、ETosis によって産生される液性因子、遊離顆粒や DNA などによる影響を検討予定であったが、培養細胞の準備や共培養の条件設定に時間を要し、培養上清中のサイトカインについては、ELISA 法により測定は十分な検討は行っていない。また、培養細胞に対する細胞障害性については、MTT assay を行ったが、有意な結果は出ていない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Fukuchi M, Ueki S, Saito H, Miyabe Y, Konno Y, Omokawa A, Saga T, Moritoki Y, Takeda M, Yamada T, Hirokawa M. Comparison of CD16-negative selection vs. MACSxpress system for isolation of blood eosinophils. *Allergol Int.* 2019 May 6. pii: S1323-8930(19)30054-1. (査読あり)

Kobayashi Y, Konno Y, Kanda A, Yamada Y, Yasuba H, Sakata Y, Fukuchi M, Tomoda K, Iwai H, Ueki S. Critical role of CCL4 in eosinophil recruitment into the airway. *Clin Exp Allergy.* 2019 Jun;49(6):853-860. (査読あり)

Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, Saito H, Honda K, Fukuchi M, Konno Y, Takeda M, Yamamoto Y, Hirokawa M, Fujieda S, Spencer LA, Weller PF. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. *Blood.* pii: blood-2018-04-842260. 2018. (査読あり)

Ueki S, Nishikawa J, Fukuchi M, Konno Y, Takeda M, Moritoki Y, Chihara J, Omokawa A, Saga T, Hirokawa M. ICAM-1 upregulation is not required for retinoic acid-induced human eosinophil survival. *Immunol Lett.* 196:68-73. 2018. (査読あり)

Ohta N, Ueki S, Konno Y, Hirokawa M, Kubota T, Tomioka-Matsutani S, Suzuki T, Ishida Y, Kawano T, Miyasaka T, Takahashi T, Suzuki T, Ohno I, Kakehata S, Fujieda S. ETosis-derived DNA trap production in middle ear effusion is a common feature of eosinophilic otitis media. *Allergol Int.* 67(3):414-416. 2018. (査読あり)

Ueki S, Ohta N, Takeda M, Konno Y, Hirokawa M. Eosinophilic Otitis Media: the Aftermath of Eosinophil Extracellular Trap Cell Death. *Current Allergy and Asthma Reports.* 17(5):33. 2017. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：

ローマ字氏名：

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。