

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K17264

研究課題名(和文) 歯科を受診する自閉症におけるメラトニンの機能解明：自然免疫との接点について

研究課題名(英文) Explication of the function of melatonin in patients with autism who visit the dentist: about contact with innate immunity

研究代表者

嘉手納 未季 (KADENA, MIKI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20529367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症は睡眠障害が深刻な問題で、メラトニン量が少ないとの報告があるが、免疫系への影響については不明である。先行研究で、メラトニン処理マクロファージのLPS刺激時にIL-6、IFN- γ 産生量低下を認め、シグナル特異性があることが予想された。マイクロアレイのクラスター解析の結果、メラトニンは細菌・ウイルス感染の抑制に関与することが示唆されたことから、自然免疫系細胞であるマクロファージへの影響に着目した。メラトニン処理マクロファージに、脳心筋炎ウイルスを感染させ抗ウイルス応答の解析、EMCVの細胞内侵入量の評価、ウイルス感染時の細胞内状態(ストレス顆粒の形成、ミトコンドリアの形態)の観察を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2020年からメラトニンが「小児期の神経発達症に伴う入眠困難」へ「メラトニン受容体作動性入眠改善剤」として保険適用された。今後はメラトニンの免疫系への影響、歯科においては歯周病への影響について検討していく必要があると考える。

研究成果の概要(英文)：Sleep disturbances are a serious problem in autism spectrum disorders, and it has been reported that the brain pineal hormone melatonin levels, which controls circadian rhythms, are low, but the effect on the immune system is unknown. In our previous study, IL-6 and IFN- γ production was decreased during LPS stimulation of melatonin-treated macrophages, which was expected to be signal specific. Since the results of microarray cluster analysis suggested that melatonin is involved in the suppression of bacterial and viral infections, we focused on its effect on macrophages, which are cells of the innate immune system. After melatonin treatment, macrophages were infected with encephalomyocarditis virus (EMCV) to analyze the antiviral response, evaluate the amount of EMCV engulfment, and observe the intracellular conditions (formation of stress granules and mitochondrial morphology) during virus infection.

研究分野：障害者歯科学

キーワード：メラトニン 自閉スペクトラム症 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum disorder :ASD) は睡眠障害が深刻な問題である。サーカディアンリズムを司る松果体ホルモンであるメラトニン量が少ないため、睡眠導入薬としてメラトニンを服用している患者がいる。しかしながら、メラトニンは免疫系に対する抑制作用が報告されており、実際に、ASD の口腔内において、口腔清掃状態が良好であるにも関わらず、歯周病が難治化する症例がみられることから、メラトニン服用と歯周病悪化との関連性が懸念されている。これまでにメラトニン処理したマクロファージでは炎症性サイトカインの遺伝子発現がシグナル特異的に抑制されることが確認され、これにより感染に対する抵抗性が低下することが示唆された。しかしながら、このメラトニンおよびメラトニン受容体の下流シグナル伝達経路がどのような分子メカニズムによって、これら遺伝子群および転写因子群が抑制されるのかは不明である。メラトニンによる自然免疫抑制の分子メカニズムを解明することで、メラトニンの服用薬としての適性使用が可能となれば ASD や睡眠障害のある患者にとって有用な結果に繋がると考えた。

2. 研究の目的

サーカディアンリズムを司るメラトニンの催眠作用は、ASD などの睡眠障害を抱えている患者の QOL 改善に有用である。一方、メラトニン服用により免疫応答惹起が不十分になり、歯周病や誤嚥性肺炎、炎症性腸疾患などの感染性疾患の重症化を誘発する恐れがあるが、メラトニンの生体におけるメカニズムは解明されていない。これまでに、メラトニンは自然免疫細胞であるマクロファージが活性化された時に誘導される炎症性サイトカインや貪食能などの感染防御に重要な機能に対して抑制的に機能することを明らかにしてきた。本研究では、マクロファージを用いて、メラトニンに特異的に抑制される標的遺伝子が、どのように調節されているかを細胞生物学的・分子生物学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

我々の以前の研究(BBRC 485(2):414-420)から、メラトニン処理マクロファージの LPS 刺激時には IL-6、IFN- γ 産生量が低下することから、シグナル特異性があることが予想された。また、マイクロアレイのクラスター解析の結果、メラトニンは細菌・ウイルス感染の抑制に関わることが示唆されたことから、メラトニン処理したマクロファージを用いて脳心筋炎ウイルス (EMCV) を感染させ以下の実験を行った。

(1) メラトニン処理マクロファージにおける抗ウイルス応答

マクロファージはマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用い、1 mM メラトニンで 1 時間処理を行ったのち、EMCV を MOI10、100 で 16 時間感染させた。感染後の RNA を逆転写後、定量的 PCR により iNos、ifn- γ の発現量を解析した。内在性コントロールには GAPDH を使用した。

(2) メラトニン処理マクロファージにおける EMCV の細胞内侵入

マクロファージは(1)と同様の方法で調整した。感染後の RNA を逆転写後、定量的 PCR によりウイルスゲノム RNA の細胞内の存在量の変化を解析した。内在性コントロールには GAPDH を使用した。

(3) メラトニン処理マクロファージ EMCV 感染時のストレス顆粒の形成

マクロファージは(1)と同様の方法で調整した。0.1% TritonX-100 で透過処理した後、細胞をウサギモノクローナル抗 G3BP 抗体 (Abcam) で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

(4) メラトニン処理マクロファージ EMCV 感染時の TEM 解析

マクロファージは(1)と同様の方法で調整した。2.5% グルタルアルデヒドで細胞を固定後、2% 四酸化オスミウム処理した。その後 40-100% EtOH で脱水し、最後にサンプルを 100% 樹脂に包埋した。ウルトラミクロトームを使用してサンプルを 70 nm で薄切し、超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した後、TEM 観察を行った。

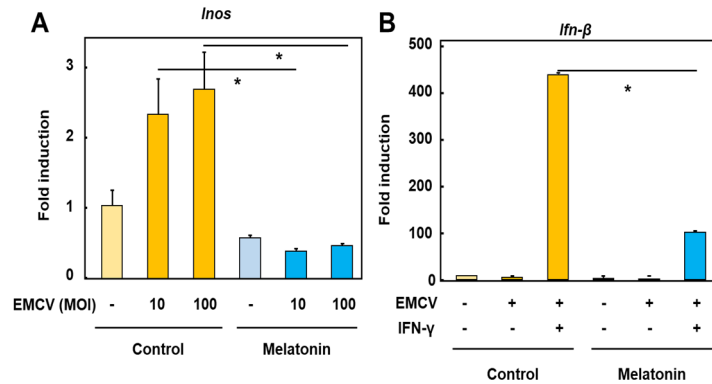
(5) メラトニンによる Th17 応答への影響

マウス脾臓細胞から CD3 陽性リンパ球を単離し、メラトニンで前処置後、腹腔マクロファージと TGF- β の共培養下で Th17 細胞を誘導し、IL-17 産生誘導能をフローサイトメトリーにより解析した。

4. 研究成果

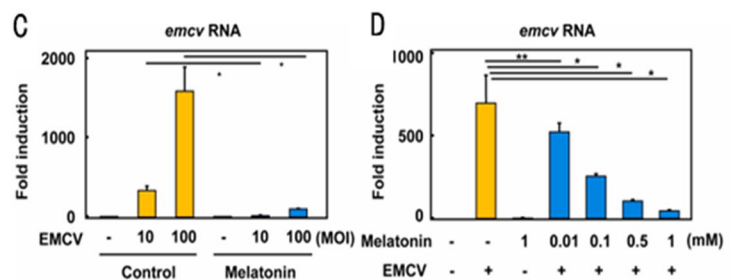
(1) メラトニン処理マクロファージにおける抗ウイルス応答

EMCV 感染に対するマクロファージの応答は、主に iNOS と I 型インターフェロンの発現による。感染後 16 時間後において、EMCV 感染は、コントロールマクロファージにおいて MOI に応じたウイルス量依存的に iNOS 発現を誘導したが、メラトニン処理では、iNOS 発現は認められなかった (図 A)。次に、MOI100 で IFN- γ をプライミングしたマクロファージにおいて、メラトニンが I 型 IFN (IFN- β) の発現を抑制するかどうかを調べたところ、メラトニンが IFN- β 遺伝子の発現を有意に抑制することを明らかにした (図 B)。これらのことから、メラトニンが EMCV 感染時の自然免疫応答を抑制する役割を持つことが明らかとなった。



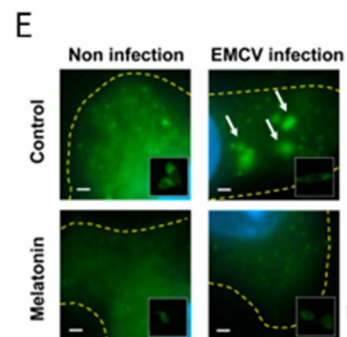
(2) メラトニン処理マクロファージにおける EMCV の細胞内侵入

コントロールのマクロファージでは、感染 16 時間後に EMCV RNA が MOI 10 および 100 で大量に存在することが示された。一方、1 mM メラトニンで 1 時間処理したマクロファージでは、EMCV RNA 量が大幅に減少した (図 C)。また、メラトニンが用量依存的にウイルス RNA 量を有意に抑制することを明らかにした (図 D)。



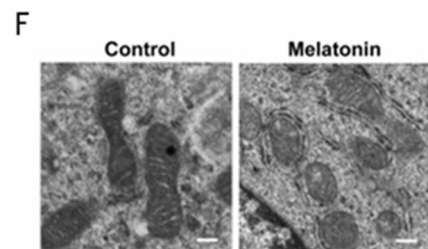
(3) メラトニン処理マクロファージ EMCV 感染時のストレス顆粒の形成

EMCV は、感染した宿主細胞の細胞質内で ribonucleoproteins の凝集体であるストレス顆粒の一時的な形成を誘導し、その後の抗ウイルス応答のプラットフォームとして機能することが知られている。Ras-Gap SH3 ドメイン結合タンパク質 1 (G3BP1) は、ストレス顆粒マーカー分子であり、ウイルス誘発性ストレス顆粒の細胞内分布を研究するために使用され、I 型インターフェロンの発現において重要な役割を果たす。そこで、メラトニンがマクロファージの細胞質におけるストレス顆粒の動態を観察した。メラトニンは EMCV 感染マクロファージにおける SG 形成の程度を減少させた (図 E)。



(4) メラトニン処理マクロファージ EMCV 感染時の TEM 解析

メラトニン処理細胞では、ミトコンドリア凝集の形態的特徴が観察された (図 F)。メラトニン処理マクロファージのミトコンドリアは、正常な細胞に見られる管状ではなく、網様構造であった。



(5) メラトニンによる Th17 応答への影響

メラトニンによる Th17 応答については、マウス脾臓細胞から CD3 陽性リンパ球を単離し、メラトニンで前処置後、腹腔マクロファージと TGF- β の共培養下で Th17 細胞を誘導し、IL-17 産生誘導能をフローサイトメトリーにより解析したところ、LPS 刺激されたマクロファージからの IL-6 産生を抑制し、Th17 細胞の分化誘導を抑制した。

以上の結果より、EMCV 感染による iNos, ifn- β の産生誘導はメラトニン処理により抑制された。メラトニンはマクロファージへのウイルス侵入を減少させ、抗ウイルス応答を抑制した。EMCV 感染時のミトコンドリア形態変化を観察したところ、ミトコンドリアは管状網様構造を形成し、メラトニン処理では断片化が起こり、ミトコンドリアの機能抑制が示唆された。

メラトニンは炎症制御に重要だが、過剰投与で感染憎悪等の有害事象が起こり得ることも示された。今後はメラトニンの免疫系への影響、歯科においては歯周病への影響について検討していく必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mariko Kikuchi, Miki Kadena, Haruka Fukamachi, Takashi Takaki, Shohei Matsui, Sumire Hoashi Takiguchi, Hirobumi Morisaki, Natasa Trtic, Mina Mori, Mie Kurosawa, Momoe Itsumi, Takahiro Funatsu, Atsuo Sakurai, Seikou Shintani, Hiroki Kato, Takashi Fujita, Yasubumi Maruoka, and Hiroataka Kuwata	4. 巻 8
2. 論文標題 Melatonin suppresses the antiviral immune response to EMCV infection through intracellular ATP deprivation caused by mitochondrial fragmentation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e11149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 嘉手納未季、栗谷未来、馬目瑠子、マイヤース三恵、丸岡靖史、五島衣子、飯島毅彦、船津敬弘	4. 巻 41
2. 論文標題 当院スペシャルニーズ歯科センター（障がい者歯科）における全身麻酔下治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本障害者歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 菊池真理子、嘉手納未季、桑田啓貴
2. 発表標題 松果体ホルモンメラトニンはミトコンドリア機能制御を通して自然免疫細胞の活性化制御を行う
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Kadena, Yoko Manome, Miku Kuritani, Takahiro Funatsu
2. 発表標題 A case report of an adult patient with Cornelia de Lange Syndrome.
3. 学会等名 Asia Association for Disability and Oral Health (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Kikuchi, Miki Kadena, Hiroataka Kuwata
2. 発表標題 The modulatory function of melatonin in encephalomyocarditis virus infection.
3. 学会等名 International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬目 瑤子、船津 敬弘、網野 重人、嘉手納 未季、栗谷 未来
2. 発表標題 自傷行為防止に苦慮したLesch-Nyhan症候群の1例
3. 学会等名 日本小児歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池真理子、桑田啓貴、嘉手納未季
2. 発表標題 松果体ホルモンメラトニンによる自然免疫系を介した炎症制御機構の解明
3. 学会等名 昭和大学学士会例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗谷 未来、嘉手納 未季、馬目 瑤子、姜 世野、佐藤 ゆり絵、船津 敬弘
2. 発表標題 歯周病悪化の主因が糖尿病のコントロール不良と考えられる自閉スペクトラム症の1例
3. 学会等名 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池真理子、桑田啓貴、嘉手納未季
2. 発表標題 松果体ホルモンメラトニンによる自然免疫系を介した炎症制御機構の解明
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Kikuchi, Miki Kadena, Hirotaka Kuwata
2. 発表標題 The modulatory function of pineal gland hormone melatonin in encephalomyelitis virus infection
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------