

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10226

研究課題名(和文) ポリリン酸を用いた炎症サイトカインシグナル制御法 インプラント周囲炎治療のために

研究課題名(英文) Regulation of inflammation-associated cytokines by inorganic polyphosphate for the treatment of peri-implantitis

研究代表者

原田 佳奈 (Harada, Kana)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：90609744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ポリリン酸を用いたインプラント周囲炎治療法の開発に向けて、炎症や骨代謝に関わるサイトカインに対してポリリン酸がどのような影響を与えるのか調べた。細菌構成成分リポポリサッカライド(LPS)で活性化したマクロファージにおいて、ポリリン酸が転写因子STAT1とSTAT3の活性化を抑制する一方、STAT5の活性化は促進したことから、これらのSTATを活性化するサイトカインに焦点を当てて検討した。本研究により、ポリリン酸がインターロイキンIL-27の作用を阻害することが明らかになった。また、ポリリン酸がLPS活性化マクロファージによるIL-27の産生・放出も抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IL-27は、炎症や骨代謝に関わる様々な細胞に作用する。本研究により、ポリリン酸がIL-27の阻害を介して炎症や骨代謝に影響を与える可能性が示された。研究代表者はポリリン酸がインターフェロンIFN- $\gamma$ の作用を阻害することも明らかにしており、ポリリン酸が様々なサイトカインの作用に影響を及ぼすことが明らかになりつつある。本研究は、生体分子でもあるポリリン酸の役割の理解や臨床応用につながる意義深い研究と考える。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to examine the effects of inorganic polyphosphate [poly (P)] on cytokines associated with inflammation and bone metabolism for the future treatment of peri-implantitis using poly(P). Since poly(P) suppressed the activation of transcription factors STAT1 and STAT3, and enhanced the activation of STAT5 in bacterial lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages, we focused on cytokines that activate these STATs. The results show that poly(P) inhibits interleukin (IL)-27-induced phosphorylation of STAT1 and STAT3 in macrophages. Moreover, we found that poly(P) suppresses LPS-induced production of IL-27 in macrophages.

研究分野：薬理学

キーワード：ポリリン酸 IL-27

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

補綴歯科治療においてインプラント治療を希望する患者が増加しているなか、インプラント周囲炎が治療の成功を阻害する問題となっている。インプラント周囲炎では、インプラント周囲粘膜の炎症に続いて周囲骨が吸収される。一方、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り(図1)、生体内にも存在する。ポリリン酸は、*Porphyromonas gingivalis* に対して抗菌作用を示すこと、骨形成を促進することが報告されている。さらに研究代表者は、ポリリン酸が炎症調節作用を有する可能性を見出した。このような背景のもと、研究代表者は、ポリリン酸の抗菌作用、骨形成促進作用、炎症調節作用をインプラント周囲炎の治療に活用することに注目している。しかしながら、炎症に対するポリリン酸の作用には不明な点が多く、さらなる検討を必要とする。

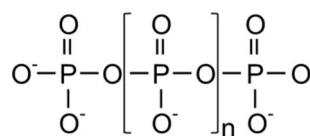


図1 ポリリン酸の構造

これまで研究代表者は、細菌由来物質リポポリサッカライド(LPS)により活性化されたマクロファージにおいて、ポリリン酸が転写因子 STAT1 のリン酸化を抑制し、誘導型一酸化窒素合成酵素 iNOS などの炎症関連遺伝子の発現を低下させることを見出した。しかしながら、ポリリン酸が STAT1 以外の STAT に与える影響については報告がない。そこで本研究では、LPS 活性化マクロファージにおいてポリリン酸が STAT1 以外の STAT に与える影響を検討する。また、炎症や骨代謝に関わるサイトカインのなかにも、STAT を活性化するものがある。研究代表者は、ポリリン酸がこのようなサイトカインによる STAT の活性化も制御し、炎症や骨代謝に影響を及ぼす可能性があるのではないかと考えた。

これまでの研究代表者は、細菌由来物質リポポリサッカライド(LPS)により活性化されたマクロファージにおいて、ポリリン酸が転写因子 STAT1 のリン酸化を抑制し、誘導型一酸化窒素合成酵素 iNOS などの炎症関連遺伝子の発現を低下させることを見出した。しかしながら、ポリリン酸が STAT1 以外の STAT に与える影響については報告がない。そこで本研究では、LPS 活性化マクロファージにおいてポリリン酸が STAT1 以外の STAT に与える影響を検討する。また、炎症や骨代謝に関わるサイトカインのなかにも、STAT を活性化するものがある。研究代表者は、ポリリン酸がこのようなサイトカインによる STAT の活性化も制御し、炎症や骨代謝に影響を及ぼす可能性があるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

以下の項目について検討し、ポリリン酸を活用した新しいインプラント周囲炎治療法の確立に向けて知見を収集することを目的とした。

- (1)LPS 活性化マクロファージにおいてポリリン酸が STAT リン酸化に与える影響とその機序
- (2)サイトカインにより活性化されたマクロファージ、骨芽細胞、破骨細胞の STAT と細胞機能に及ぼすポリリン酸の影響
- (3)炎症による STAT 活性化と骨吸収に及ぼすポリリン酸の影響

### 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週齢以降)の腹腔に3mLのチオグリコール酸培地を投与し、4日後に腹腔渗出細胞を採取した。細胞をディッシュに播種し、1%ウシ胎児血清含有 RPMI 1640 培地にて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試薬の処置

(1)で調製したマクロファージにポリリン酸を処置し、5分-2時間後にLPS、インターロイキン IL-6、IL-27 または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 GM-CSF を処置した。

#### (3)STAT のリン酸化の検出

マクロファージに(2)の試薬処置を行った後、細胞を溶解し、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングによりリン酸化 STAT を検出した。

#### (4)サイトカイン放出量の測定

マクロファージに(2)の試薬処置を行った後、培養上清を採取し、サイトカインの濃度を ELISA 法により測定した。

### 4. 研究成果

#### (1)LPS 活性化マクロファージにおいてポリリン酸が STAT リン酸化に与える影響

マクロファージにポリリン酸を処置すると、LPS 処置による STAT3 リン酸化が抑制されることが明らかになった。一方、LPS による STAT5 のリン酸化は、ポリリン酸により促進されることが明らかになった。

LPS 活性化マクロファージからは様々なサイトカインが放出される。これらのサイトカインのなかには、オートクライン/パラクラインでマクロファージに作用して STAT を活性化するものがある。ポリリン酸は、マクロファージから放出されるサイトカインに作用することにより、STAT のリン酸化に影響を及ぼす可能性が考えられた。以降の研究では、マクロファージから放出され STAT1/3/5 を活性化するサイトカインに焦点を当ててポリリン酸の効果を検討することにより、ポリリン酸が STAT リン酸化に影響を及ぼす機序、およびポリリン酸がサイトカインによる STAT リン酸化に及ぼす影響を明らかにしようと試みた。

## (2)ポリリン酸がIFN- $\gamma$ の産生と作用に及ぼす影響

LPS 活性化マクロファージから放出された IFN- $\gamma$  は、IFN- $\gamma$  R1/2 を介して STAT1 や STAT2 をリン酸化する。これまでに研究代表者は、ポリリン酸が LPS 活性化マクロファージによる IFN- $\gamma$  の産生・放出を抑制すること、さらにポリリン酸が IFN- $\gamma$  による STAT1 リン酸化を抑制することを見出した。しかしながら、ポリリン酸は LPS による STAT1 リン酸化を持続的に抑制するのに対し、IFN- $\gamma$  放出や IFN- $\gamma$  誘発性 STAT1 リン酸化は一過性かつ部分的にしか抑制しなかった。さらに本研究において、IFN- $\gamma$  中和抗体は LPS による STAT1 リン酸化を完全には抑制しなかった。以上のことから、LPS 活性化マクロファージにおいてポリリン酸が STAT1 リン酸化を抑制する機序として、IFN- $\gamma$  非依存的な経路の存在も考えられた。

## (3)ポリリン酸がIL-27の産生と作用に及ぼす影響

IL-27 は、炎症や骨代謝に関わる様々な細胞に作用する。また、マウス腹腔マクロファージにおいて、IL-27 は LPS による iNOS の発現誘導を促進することが報告されている (Shimizu *et al.* 2013)。本研究では、ポリリン酸が LPS 活性化マクロファージによる IL-27 の産生・放出を抑制することが明らかになった。さらに、ポリリン酸は、IL-27 による STAT1 と STAT3 のリン酸化を抑制した。これらの IL-27 に対するポリリン酸の作用は、IFN- $\gamma$  に対する作用と比べて持続的であった。また、IL-27 処置の 5 分前にポリリン酸を処置することにより STAT1 リン酸化が抑制されたことから、ポリリン酸の IL-27 阻害作用は速やかに発現することが示唆された。以上のように、マクロファージにおいて、ポリリン酸は LPS による IL-27 産生・放出と IL-27 の作用の両方を阻害することが示された。LPS 活性化マクロファージにおいて、ポリリン酸は IFN- $\gamma$  だけでなく IL-27 も阻害することにより、STAT1 リン酸化を抑制することが示唆された。

## (4)ポリリン酸がIL-6の作用に及ぼす影響

炎症による骨吸収を促進する IL-6 は、IL-6 受容体を介して STAT3 を活性化する。ポリリン酸が IL-27 による STAT1/3 リン酸化を抑制する実験条件でマクロファージにポリリン酸を処置したが、IL-6 (1 ng/mL) による STAT3 リン酸化への影響は認められなかった。

## (5)ポリリン酸がGM-CSFの作用に及ぼす影響

GM-CSF は、GM-CSF 受容体を介して STAT5 を活性化する。ポリリン酸が IL-27 による STAT1/3 リン酸化を抑制する実験条件でマクロファージにポリリン酸を処置したが、GM-CSF (20 pg/mL) による STAT5 リン酸化への影響は認められなかった。

## (6)まとめ

本研究により、ポリリン酸は IFN- $\gamma$  だけでなく IL-27 も阻害することにより、炎症や骨代謝に影響を及ぼす可能性が示された。ポリリン酸がサイトカインに与える影響については、ポリリン酸が増殖因子 FGF-2 を安定化するとの報告がある (Shiba *et al.* 2003; Kawazoe *et al.* 2008)。さらに、最近、ポリリン酸が炎症性サイトカインである TNF の作用を阻害することも報告され (Terashima-Hasegawa *et al.* 2019)、ポリリン酸が様々なサイトカインの作用に影響を及ぼすことが明らかになりつつある。今後、ポリリン酸がどのようにしてこれらのサイトカインに影響を及ぼすのか明らかにすることが、ポリリン酸の作用を理解する上で重要と考える。

### <引用文献>

Shimizu M, Ogura K, Mizoguchi I, Chiba Y, Higuchi K, Ohtsuka H, Mizuguchi J, Yoshimoto T. 2013. IL-27 promotes nitric oxide production induced by LPS through STAT1, NF- $\kappa$ B and MAPKs. *Immunobiology* 218, 628-634.

Shiba T, Nishimura D, Kawazoe Y, Onodera Y, Tsutsumi K, Nakamura R, Ohshiro M. 2003. Modulation of mitogenic activity of fibroblast growth factors by inorganic polyphosphate. *J. Biol. Chem.* 278, 26788-26792.

Kawazoe Y, Katoh S, Onodera Y, Kohgo T, Shindoh M, Shiba T. 2008. Activation of the FGF signaling pathway and subsequent induction of mesenchymal stem cell differentiation by inorganic polyphosphate. *Int. J. Biol. Sci.* 4, 37-47.

Terashima-Hasegawa M, Ashino T, Kawazoe Y, Shiba T, Manabe A, Numazawa S. 2019. Inorganic polyphosphate protects against lipopolysaccharide-induced lethality and tissue injury through regulation of macrophage recruitment. *Biochem. Pharmacol.* 159, 96-105.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	酒井 規雄  (Sakai Norio)  (70263407)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授    (15401)	

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