

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22706

研究課題名(和文)炎症の進展と寛解に関する好中球サブセット同定への挑戦

研究課題名(英文)Challenges to the identification of neutrophil subsets involved in the development and remission of inflammation

研究代表者

前川 知樹(Maekawa, Tomoki)

新潟大学・医歯学系・研究教授

研究者番号：50625168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：実験的歯周炎マウスモデルの経時的な解析において、歯周病原細菌の感染初期は、好中球優位であり、主な防御機構を司っていた。7日目になると炎症性サイトカイン減少とともに、T細胞とB細胞の組織浸潤が認められ、抗炎症作用が確認された。しかしながら、7日後の好中球浸潤を抑制すると、重度な骨吸収とIL-10濃度が減少していた。そこで炎症寛解期に浸潤する好中球を単離し、機能解析したところ、歯周炎期の好中球と異なり、オプソニン化した細菌に対する反応性が減弱し、抗炎症性サイトカインを産生することが示された。これまで好中球とされていた分画に、貪食好中球と、抗炎症好中球の2つのサブセットが存在する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、T細胞やB細胞に当てはまらない自然免疫細胞である自然リンパ球が同定された。さらに、マクロファージにおいても組織修復作用をもつM1およびM2マクロファージサブセットが同定された。貪食および抗炎症好中球が存在することが明らかになれば、これまでの古典的な好中球の学問体系を再興することになり、生体の初期防御から後期の修復期まで関与する好中球を中心とした生体防御・修復システムの構築が可能になる。抗炎症好中球の分化を制御し、自在に誘導することが可能になれば、好中球による過度な炎症性疾患に対し、抗炎症好中球の分化誘導または貪食好中球から抗炎症好中球への自在な転換による治療法が可能になる。

研究成果の概要(英文)：In a longitudinal analysis of a mouse model of experimental periodontitis, neutrophils were predominant in the early stage of infection with periodontopathogenic bacteria and were responsible for the main defense mechanism. 7 days later, tissue infiltration of T and B cells was observed along with a decrease in inflammatory cytokines, confirming the anti-inflammatory effect. However, when neutrophil infiltration was suppressed after 7 days, severe bone resorption and IL-10 levels were decreased. We isolated and functionally analyzed neutrophils infiltrating during the remission phase of inflammation, and found that, unlike neutrophils during periodontitis, these neutrophils were less responsive to opsonized bacteria and produced anti-inflammatory cytokines. It is possible that there are two subsets of neutrophils, phagocytic neutrophils and anti-inflammatory neutrophils, in the fraction previously considered to be neutrophils.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：好中球サブセット 抗炎症性サイトカイン 炎症性サイトカイン 好中球 歯周炎マウスモデル 実験的歯周炎 骨吸収 骨免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は、歯周病原細菌の感染に伴う正常な歯周組織からの病的な発展である。歯周病原細菌の感染初期には、好中球が主な防御機構を司っており、感染細菌を貪食するとともに、炎症性サイトカインを産生し、感染組織への炎症性細胞誘導を引き起こす。その後は、T細胞とB細胞の組織浸潤が認められ、歯周炎は慢性化へと展開していく。研究代表者は、米国留学時代から、好中球の歯周炎における機能に着目し、好中球の研究を一貫して行ってきた。帰国後、科研費若手研究（A）において、血管内皮細胞より産生される DEL-1 分子が好中球の走化性を制御し、炎症抑制作用を示すことを見出した（Maekawa, et al., *Sci Transl Med*, 2015）。DEL-1 の効果を解析する手段の一つとして用いたマウスチャンバーモデルにおいて、背部の創を形成した段階では、DEL-1 接種による背部組織への好中球誘導を抑制する効果が認められた。しかしながら、炎症後期である創部の修復段階においては、予想に反し、DEL-1 で抑制できない好中球の再誘導が観察された。そこで、炎症後期の好中球を単離して解析したところ、DEL-1 の機能対象である好中球表面の LFA-1 受容体の発現が低下しており、DEL-1 の抑制が効かないこと、さらに抗炎症性サイトカイン産生およびオプソニン化した細菌への貪食力の減弱が認められた。つまり、DEL-1 は、炎症初期に誘導される貪食力が強い好中球を抑制するが、炎症後期に誘導される抗炎症作用の強い好中球は抑制しないことを見出した。これらの結果から、研究代表者は、DEL-1 が抑制しない炎症後期で誘導される好中球は、抗炎症性サイトカインを産生する炎症寛解機能をもった新しい好中球サブセット—抗炎症好中球である可能性を考えた。好中球とされていた分画に、炎症の進展に関与する“貪食”好中球と、炎症の寛解に関与する“抗炎症”好中球の 2 つのサブセットが存在する可能性がある。

2. 研究の目的

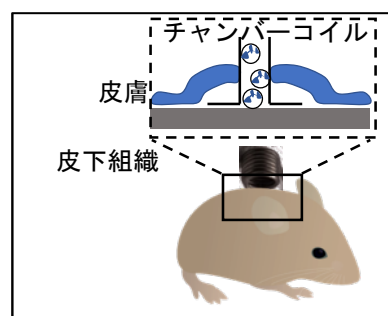
本申請研究では、貪食好中球と抗炎症好中球の存在を立証し、定義した上で、

- ①桿状核球から貪食好中球および抗炎症好中球の分化に必要な因子を解明すること、
- ②貪食好中球から抗炎症好中球への転換が可塑性に起きている場合に、転換の鍵となる因子を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 貪食好中球と抗炎症好中球の機能解析

本申請研究では、マウスの背部に滅菌チタンコイルチャンバーを留置するマウスチャンバーモデルを用いて解析を行う。マウスチャンバーモデルでは、背部へのチャンバー部に、組織から浸潤した好中球を採取することができる（右図）。チャンバーの留置から 1~3 日後の炎症初期に浸潤する好中球およびチャンバー内の浸出液を採取する。続いて、創が閉鎖する留置 14 日後のチャンバーからも同様に好中球と浸出液を採取する。採取した好中球は、細菌に対する貪食能、サイトカイン産生能および好中球エラスターゼ活性を比較解析する。さらにサイトカインを少量のサンプルで網羅的に解析できる Luminex を使用し、炎症初期と後期で産生されるチャンバー内浸出液中の炎症性サイトカイン量を測定する。



(2) 貪食好中球と抗炎症好中球の遺伝子およびタンパク質発現解析

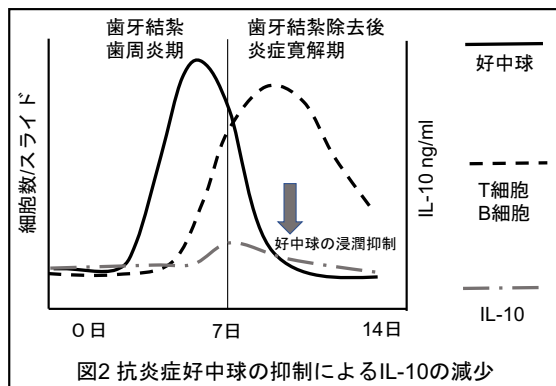
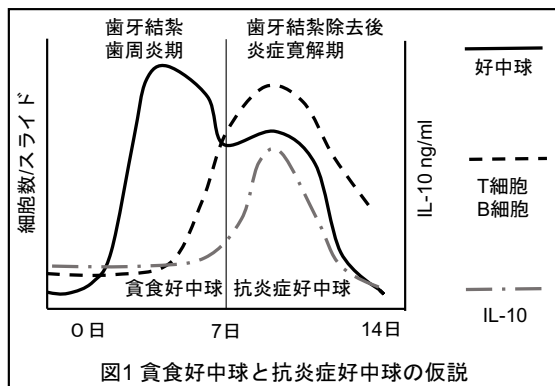
バイオインフォマティクスに精通する研究分担者である奥田と、機能的に差異が認められた炎症初期と後期の好中球に対し、ゲノムワイド関連解析とプロテオーム解析を行い、遺伝的およびタンパク質レベルでの違いを見出し、貪食好中球と抗炎症好中球を定義する。さらにその違いから、抗炎症性好中球への転換もしくは誘導因子を見出す。

(3) 好中球の細胞系譜における抗炎症好中球の存在位置の確定

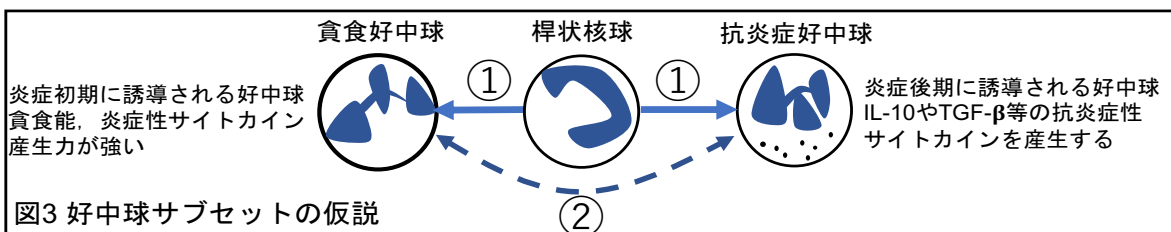
両者が桿状核球から分化しているのか、または貪食好中球から抗炎症好中球へと可塑性に転換しているのかを同定する。具体論として、好中球の細胞系譜上の未分化好中球を1細胞ずつ形態学的に単離し、細胞の中で時間変化にしたがって高頻度で変化させる DNA バーコード法を用い、細胞の系譜を次世代シーケンサーと高度計算機による再構成によって一斉に追跡できる方法を用いる。

4. 研究成果

歯牙を絹糸にて結紮し、実験的に歯周炎を誘導したマウスモデルの経時的な解析において、歯周病原細菌の感染初期には、好中球が優位であり、主な防御機構を司っていた。その後、7日目になると炎症性サイトカインの減少とともに、T細胞とB細胞の組織浸潤が認められ、歯周炎は慢性化へと展開していく(左図)。7日後には抗炎症作用をもつ好中球の浸潤が確認された。



しかしながら、7日後好中球浸潤を DEL-1 (代表者が見出した好中球遊走阻止) を接種すると、好中球の浸潤が認められず、炎症の寛解が起きないと同時に、さらなる歯を支える骨である歯槽骨の吸収が認められた。さらに抗炎症性サイトカインである IL-10 の歯肉溝滲出液中濃度が減少していた。そこで炎症寛解期に浸潤する好中球を単離し、機能解析したところ、歯周炎期の好中球と異なり、オプソニン化した細菌に対する反応性が減弱し、IL-10 や TGF- β 等の抗炎症性サイトカインを産生することが示された。加えて、歯牙結紮除去後に誘導される好中球を抑制すると、抗炎症性サイトカインの IL-10 産生が減少し、歯周炎によって破壊された組織の修復が遅延することを見出した。



すなわちこれまで好中球とされていた分画に、炎症の進展に関与する“貪食”好中球と、炎症の寛解に関与する“抗炎症”好中球の2つのサブセットが存在する可能性がある。今後は、2つの好中球サブセットについて詳細な解析を基盤研究にて展開していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tamura Hikaru, Maekawa Tomoki, Domon Hisanori, Hiyoshi Takumi, Hirayama Satoru, Isono Toshihito, Sasagawa Karin, Yonezawa Daisuke, Takahashi Naoki, Oda Masataka, Maeda Takeyasu, Tabeta Koichi, Terao Yutaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Effects of Erythromycin on Osteoclasts and Bone Resorption via DEL-1 Induction in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 312～312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antibiotics10030312	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 Domon Hisanori, Maekawa Tomoki, Isono Toshihito, Furuta Kazuyuki, Kaito Chikara, Terao Yutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Proteolytic cleavage of HLA class II by human neutrophil elastase in pneumococcal pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 Online Journal
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82212-5	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 Isono Toshihito, Domon Hisanori, Nagai Kosuke, Maekawa Tomoki, Tamura Hikaru, Hiyoshi Takumi, Yanagihara Katsunori, Kunitomo Eiji, Takenaka Shoji, Noiri Yuichiro, Terao Yutaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Treatment of severe pneumonia by hinokitiol in a murine antimicrobial-resistant pneumococcal pneumonia model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0240329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0240329	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 Tamura Hikaru, Maekawa Tomoki, Hiyoshi Takumi, Terao Yutaka	4. 巻 1
2. 論文標題 Analysis of Experimental Ligature-Induced Periodontitis Model in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 237～250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0939-2_23	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 -

1. 著者名 Maekawa Tomoki, Tamura Hikaru, Domon Hisanori, Hiyoshi Takumi, Isono Toshihito, Yonezawa Daisuke, Hayashi Naoki, Takahashi Naoki, Tabeta Koichi, Maeda Takeyasu, Oda Masataka, Ziogas Athanasios, Alexaki Vasileia Ismeni, Chavakis Triantafyllos, Terao Yutaka, Hajishengallis George	4. 巻 5
2. 論文標題 Erythromycin inhibits neutrophilic inflammation and mucosal disease by upregulating DEL-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 Online Journal
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.136706	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 該当する

1. 著者名 Oda Masataka, Kurosawa Mie, Yamamoto Hirofumi, Domon Hisanori, Takenaka Shoji, Ohsumi Tatsuya, Maekawa Tomoki, Yamasaki Naoto, Furue Yui, Terao Yutaka	4. 巻 64
2. 論文標題 Sulfated vizantin inhibits biofilm maturation by Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 493 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12797	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 -

1. 著者名 Hiyoshi Takumi, Domon Hisanori, Maekawa Tomoki, Yonezawa Daisuke, Kunitomo Eiji, Tabeta Koichi, Terao Yutaka	4. 巻 112
2. 論文標題 Protective effect of hinokitiol against periodontal bone loss in ligature-induced experimental periodontitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104679 ~ 104679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2020.104679	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 -

1. 著者名 Yuh DY, Maekawa T, Li X, Kajikawa T, Bdeir K, Chavakis T, Hajishengallis G.	4. 巻 In press
2. 論文標題 The secreted protein DEL-1 activates a α 3 integrin-FAK-ERK1/2-RUNX2 pathway and promotes osteogenic differentiation and bone regeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013024	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 該当する

1. 著者名 Ziogas Athanasios, Maekawa Tomoki, Wiessner Johannes R., Le Thi Trang, Sprott David, Troullinaki Maria, Neuwirth Ales, Anastasopoulou Vasiliki, Grossklau Sylvia, Chung Kyoung-Jin, Sperandio Markus, Chavakis Triantafyllos, Hajishengallis George, Alexaki Vasileia Ismini	4. 巻 204
2. 論文標題 DHEA Inhibits Leukocyte Recruitment through Regulation of the Integrin Antagonist DEL-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1214 ~ 1224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1900746	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 該当する

1. 著者名 Domon Hisanori, Hiyoshi Takumi, Maekawa Tomoki, Yonezawa Daisuke, Tamura Hikaru, Kawabata Shigetada, Yanagihara Katsunori, Kimura Osamu, Kunitomo Eiji, Terao Yutaka	4. 巻 63
2. 論文標題 Antibacterial activity of hinokitiol against both antibiotic resistant and susceptible pathogenic bacteria that predominate in the oral cavity and upper airways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 213 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12688	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 前川 知樹
2. 発表標題 歯学研究の今昔と次世代研究 DEL-1分子誘導による抗炎症および骨形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会, 鹿児島 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日吉 巧, 土門久哲, 前川知樹, 田村 光, 米澤大輔, 國友栄治, 寺尾 豊, 多部田康一
2. 発表標題 マウス歯牙結紮歯周炎モデルにおけるヒノキチオールの骨吸収抑制作用の解析
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会, 郡山 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土門久哲, 前川知樹, 寺尾 豊
2. 発表標題 宿主由来エラスターゼはHLAクラスII発現を抑制する
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会, 鹿児島 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日吉 巧, 土門久哲, 前川知樹, 田村 光, 國友栄治, 寺尾 豊
2. 発表標題 ヒノキチオールの抗菌活性および抗炎症作用によるマウス歯牙結紮歯周炎モデル骨吸収抑制作用の解析
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会, 鹿児島 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 光, 前川知樹, 土門久哲, 日吉 巧, 前田健康, 寺尾 豊
2. 発表標題 エリスロマイシンによるDel-1誘導を介した骨代謝の制御
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会, 鹿児島 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 光, 前川知樹, 土門久哲, 日吉 巧, 磯野俊仁, 米澤大輔, 前田健康, 寺尾 豊, 多部田康一
2. 発表標題 エリスロマイシンによるDEL-1誘導を介した破骨細胞の制御
3. 学会等名 第63回秋季歯周病学会学術大会, 石川 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日吉 巧, 土門久哲, 前川知樹, 田村 光, 磯野俊仁, 寺尾 豊, 多部田康一
2. 発表標題 好中球エラストラーゼによる歯周炎重症化メカニズム解析
3. 学会等名 第63回秋季歯周病学会学術大会, 石川 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土門 久哲, 前川 知樹, 寺尾 豊
2. 発表標題 宿主由来エラストラーゼは HLA クラス II 発現を抑制する
3. 学会等名 第63回秋季歯周病学会学術大会, 石川 (Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前川 知樹
2. 発表標題 シンポジウム「オーラルエイジングを科学し全身の健康を目指す」歯周組織のアンチエイジングから歯周病を制御する
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会, 横浜
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井康介, 土門久哲, 前川知樹, 日吉 巧, 田村 光, 寺尾 豊
2. 発表標題 Immunization with pneumococcal EF-Tu enhances serotype-independent protection against <i>S. pneumoniae</i> .
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会, 札幌
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 4) 日吉 巧, 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 田村 光, 寺尾 豊
2. 発表標題 Analysis of periodontal tissue destruction induced by A. actinomycetemcomitans leukotoxin.
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会, 札幌
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 8) 田村 光, 前川知樹, 土門久哲, 日吉 巧, 米澤大輔, 永井康介, 前田健康, 寺尾 豊, 多部田康一
2. 発表標題 エリスロマイシンのDel-1再誘導による炎症性骨吸収抑制効果の検証
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会, 横浜
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 前川 知樹	4. 発行年 2020年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 5
3. 書名 BIO Clinica DEL-1分子誘導による炎症性骨破壊の新規治療戦略	

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学医歯学総合研究科 高度口腔機能教育研究センター http://www.caos-niigata-univ.net/

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	奥田 修二郎 (Okuda Shujiro) (00512310)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	土門 久哲 (Domon Hisanori) (00594350)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	寺尾 豊 (Terao Yutaka) (50397717)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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			
ドイツ	ドレスデン工科大学			
米国	ペンシルベニア大学			
英国	エジンバラ大学			