

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792335

研究課題名(和文) 歯石中のリン酸カルシウム結晶によるインフラマソームの活性化が歯周組織に及ぼす影響

研究課題名(英文) Dental calculus induces IL-1 beta production through NLRP3 inflammasome

研究代表者

中村 弘隆 (NAKAMURA, Hirotaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科歯学系・助教

研究者番号：70346914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では歯石中のリン酸カルシウム結晶がマクロファージや好中球においてNLRP3インフラマソームを介したIL-1 β 産生に関与するかどうかを検討した。野生型マクロファージをLPSで感作後に乾熱処理した歯石で刺激すると培地上清にIL-1 β の産生がみられたが、NLRP3欠損マクロファージにおいてはIL-1 β はほとんど産生されなかった。LPS感作後の野生型マクロファージにおけるIL-1 β の産生は、カスパーゼ1阻害剤の添加により有意に抑制された。同様にヒトPMNをLPS感作後に乾熱処理した歯石で刺激するとIL-1 β を産生した。また、このIL-1 β 産生は、カスパーゼ1阻害剤の添加により抑制された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate whether the crystals in dental calculus could induce activation of NLRP3 inflammasome to produce IL-1 β in macrophages and PMNs. WT macrophage incubated with untreated dental calculus produced a robust amount of IL-1 β , whereas the cells incubated with heat-treated calculus produced much less IL-1 β . After LPS priming, WT macrophage incubated with heat-treated calculus produced considerable level of IL-1 β . However, Nlrp3 $^{-/-}$ macrophage produced marginal level of IL-1 β . Addition of Z-VAD-FMK significantly suppressed the IL-1 β production. Similarly, human PMN incubated with heat-treated calculus produced IL-1 β . The IL-1 β production by PMN was also inhibited by Z-VAD-FMK, indicating involvement of caspase 1. These results indicate that the crystals in dental calculus could accelerate production of IL-1 β through NLRP3 inflammasome activation in mouse macrophage and human PMNs.

研究分野：歯周病学

キーワード：インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

炎症性サイトカイン IL-1 β は、歯周炎患者の歯肉や歯肉溝滲出液で高レベルで検出され、治療によってその濃度が減少すること、IL-1 β の遺伝子多型が歯周病の罹患率や重症度に関連していることなどから、歯周炎の病因において大きな役割を持つとされている。

IL-1 β 産生には2つのシグナルが必要である。ひとつはToll-like receptor (TLR)などからの刺激で、IL-1 β 前駆体が産生される。もうひとつはカスパーゼ1の活性化で、NOD-like receptor (NLR)が活性化して形成されるインフラマソームというタンパク複合体に制御されている。NLRが活性化されると、アダプタータンパクのASCを介してカスパーゼ1前駆体が集合し、インフラマソームが形成される。インフラマソームにより活性化したカスパーゼ1は、IL-1 β 前駆体を切断し、成熟型IL-1 β が分泌される。

近年、結晶などの刺激によりインフラマソームが活性化されることが明らかになってきた。痛風で関節包内に蓄積する尿酸ナトリウムの結晶は、NLRP3インフラマソームを介してカスパーゼ1を活性化する。シリカ結晶の吸引によって生じる慢性炎症性肺疾患の珪肺症でも、肺胞マクロファージのIL-1 β 産生にNLRP3インフラマソームが関与していることが明らかとなっている。

慢性炎症性疾患である歯周炎においても、IL-1 β の産生にはインフラマソームの活性化が必須であり、インフラマソーム活性化との関連が最も疑われる結晶は、歯石中のハイドロキシアパタイトやオクタリン酸カルシウムなどのリン酸カルシウム結晶である。歯石は歯周ポケット中に高頻度で検出され、歯石沈着の程度と歯周炎の進行は相関することから、歯石中のリン酸カルシウム結晶がNLRP3インフラマソームを活性化し、カスパーゼ1を介したIL-1 β 産生に關与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では歯石中のリン酸カルシウム結晶がマクロファージや好中球においてNLRP3インフラマソームを介したIL-1 β 産生に關与するかどうか検討した。

3. 研究の方法

・細胞

C57BL/6野性型(WT)、NLRP3欠損(NLRP3-KO)、ASC欠損(ASC-KO)マウスよりマクロファージ細胞株を樹立した。ヒトPMNは健康者の末梢血を比重遠心分離後、好中球分画から採取した。

・結晶

シリカ結晶(Silica)、ハイドロキシアパ

タイト(HAp)、歯周病患者から採取した歯石を使用した。歯石は粉碎して乾熱処理(250、1時間)によって菌体成分を不活性化させ、48mmのフィルターで濾過した(H-Cal)。

・細胞の刺激と上清中IL-1 β 濃度の測定

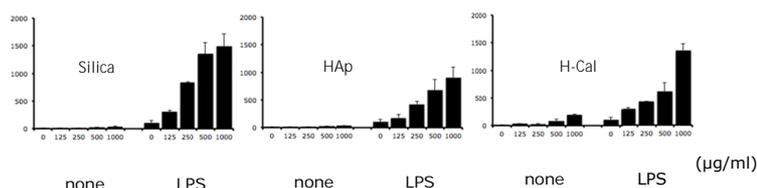
細胞は 1×10^5 /wellの密度で96穴プレートに播種し、LPS(100ng/ml)で2時間感作後、カスパーゼ1阻害剤(Z-YVAD-FMK)またはCytochalasin Dの存在下/非存在下にて、各種結晶で刺激した。

刺激8時間後に培地上清を回収し、上清中IL-1 β 濃度をELISAで測定した。

4. 研究成果

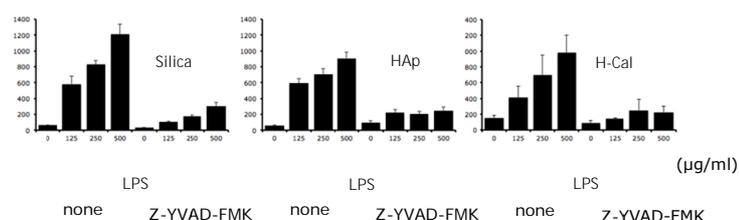
WTマクロファージを結晶で刺激した。結晶のみの刺激では培地上清中にIL-1 β の産生はみられなかった。マクロファージをLPSで感作すると結晶の刺激により、IL-1 β が濃度依存的に産生された。

HAp、H-CalのIL-1 β 誘導能はSilicaと同程度であった。



結晶の刺激で産生されたIL-1 β は、カスパーゼ1阻害剤Z-YVAD-FMK

(20mM)の添加により抑制された。

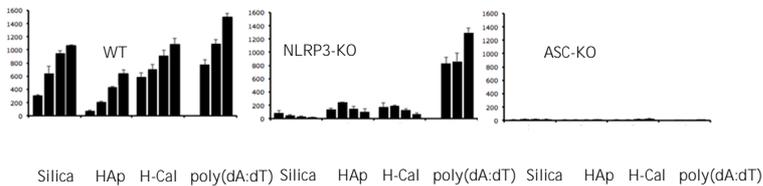


NLRP3-KOまたはASC-KOマクロファージをLPSで感作し、結晶で刺激した。

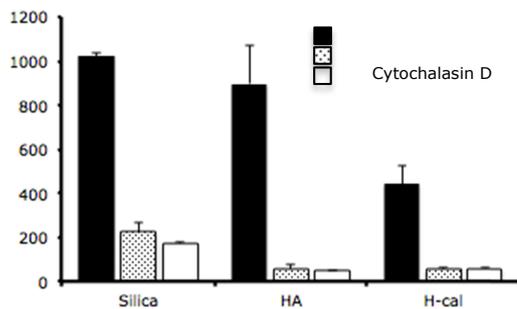
NLRP3-KO、ASC-KOマクロファージでは結晶刺激によるIL-1 β 産生はみられな

かった。AIM2インフラマソームのリグランドであるpoly(dA:dT)(25-100ng)で刺激

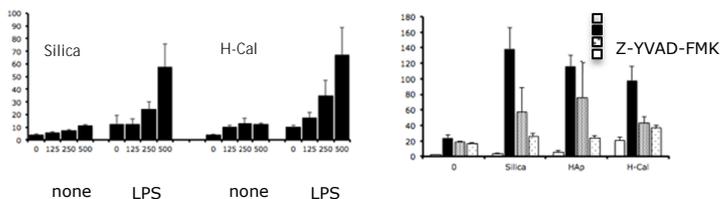
すると、WT、NLRP3-KOマクロファージはASC依存的にIL-1 β 産生を誘導した。



LPS 感作した WT マクロファージの培地に、食細胞の貪食に重要なアクチンの重合阻害剤 Cytochalasin D を添加すると、結晶刺激による IL-1 β 産生は抑制された。



結晶の刺激のみではヒト PMN に IL-1 β 産生はみられなかった。LPS 感作した PMN は、結晶で刺激により濃度依存的に IL-1 β が産生された。上清中の IL-1 β 濃度は、Z-YVAD-FMK により減少した。



歯石中のリン酸カルシウム結晶は、LPS 感作したマウスマクロファージにおいて、NLRP3 インフラマソームを活性化し、カスパーゼ 1 活性化による成熟型 IL-1 β 産生を誘導する。また同様に、LPS に感作したヒト PMN においてもカスパーゼ 1 を介した IL-1 β 産生を促進する。結論として、歯石中のリン酸カルシウム結晶は、歯肉溝中の好中球の IL-1β 産生を促進することにより、歯周組織の炎症に関与して

いる可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA.

Sirois CM, Jin T, Miller AL, Bertheloot D, Nakamura H, Horvath GL, Mian A, Jiang J, Schrum J, Bossaller L, Pelka K, Garbi N, Brewah Y, Tian J, Chang C, Chowdhury PS, Sims GP, Kolbeck R, Coyle AJ, Humbles AA, Xiao TS, Latz E.

The Journal of Experimental Medicine 2013 Oct 21;210(11):2447-63 (査読あり)

A Single Nucleotide Polymorphism in 3'-Untranslated Region Contributes to the Regulation of Toll-Like Receptor 4 Translation.

Sato K, Yoshimura A, Kaneko T, Ukai T, Ozaki Y, Nakamura H, Li X, Matsumura H, Hara Y, Ogata Y

The Journal of Biological Chemistry 2012, 282 (30): 25163–25172 (査読あり)

Green tea catechin inhibits

lipopolysaccharide-induced bone resorption *in vivo*.

Nakamura H, Ukai T, Yoshimura A, Kozuka Y, Yoshioka H, Yoshinaga Y, Abe Y, Hara Y
Journal of Periodontal Research, 45(1): 23-30, 2010. (査読あり)

Locally administered T cells from mice immunized with lipopolysaccharide(LPS) accelerate LPS-induced bone resorption.

Ozaki Y, Ukai T, Yamaguchi M, Yokoyama M, Ayon Haro ER, Yoshimoto M, Kaneko T, Yoshinaga M, Nakamura H, Shiraishi C, Hara Y
Bone, 44: 1169-1176, 2009. (査読あり)

グリチルレチン酸はLPS誘導性骨吸収を抑制する

中村弘隆、鵜飼孝、吉永泰周、尾崎幸生、金子高士、白石千秋、岸本真実、小野山美穂、阿部嘉裕、安部達也、吉村篤利、原宜興
日歯保存誌, 51, (3), 323-330, 2008. (査読あり)

Lack of TLR4 decreases LPS-induced bone resorption in C3H/HeJ mice in vivo
Nakamura H, Fukusaki Y, Yoshimura A, Yoshinaga Y, Kaneko T, Hara Y
Oral Microbiol Immunol., 23 (3), 190-195, 2008 (査読あり)

Interferon-gamma production changes in parallel with bacterial lipopolysaccharide induced bone resorption in mice: an immunohistometrical study.

Moriyama H, Ukai T, Hara Y.
Calcif Tissue Int. 2002 Jul; 71(1): 53-8. 2002 (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

The crystals in dental calculus accelerate IL-1 production through activation of NLRP3 inflammasome in mouse macrophage and human peripheral polymorphonuclear leukocyte.

Nakamura H, Yoshimura A, Kaneko T, Latz E, Hara Y

12th Biennial International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012, p.160
2012年10月23-26日
学術総合センター (東京都・神保町)

歯石中のリン酸カルシウム結晶はNLRP3インフラマソームを活性化する

中村弘隆, 吉村篤利, 金子高士, Eicke Latz, 原 宜興

日本臨床歯周病学会九州支部・日本歯周病学会九州5大学合同研修会 2012, p.13
2012年10月28日
アクロス福岡(福岡県・天神)

歯周炎発症メカニズム研究 - 実験的歯周

炎モデルの確立 -

吉永泰周, 藏本明子, 鵜飼孝, 金子高士, 中村弘隆, 白石千秋, 小野山美穂, 市村育久, 押野一志, 原宜興

日本歯科保存学会誌, 第52巻 春季特別号: 54, 2009

2009年6月11-12日

札幌コンベンションセンター(北海道・東札幌)

[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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 弘隆 (NAKAMURA, Hirotaka)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
研究者番号: 70346914

(2) 研究分担者

(なし)

研究者番号:

(3) 連携研究者

(なし)

研究者番号: