

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861775

研究課題名(和文)インフラマソームが繋ぐ宿主・寄生体相互関係における炎症シグナル機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the inflammatory mechanism in host-parasite relationship through inflammasome activity

研究代表者

沖永 敏則 (OKINAGA, TOSHINORI)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60582773

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)：今回、歯周病細菌感染マクロファージにおける炎症反応誘導時に、インフラマソームが活性化することを見出した。ヒトおよびマウスマクロファージへのファゴサイトーシスによる歯周病細菌の取り込みを確認した後、インフラマソーム関連因子であるNLRP3受容体の発現とIL-1 β の発現、アダプタータンパク質のASCやcaspase-1の発現を確認した。カテプシンBや活性酸素の発現が認められ、IL-1 β 発現への関与が明らかとなった。歯周病細菌感染マクロファージにおいて、NLRP3の発現を伴うインフラマソーム活性化誘導には、カテプシンBや活性酸素が関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the periodontopathic bacterial pathogen, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, induced cell death and cytokine release in macrophages. Pattern recognition receptor, NLRP3 was upregulated in *A. actinomycetemcomitans*-invaded macrophages. However, NLRP3 knockdown had no effect on the secretion of IL-1 β in *A. actinomycetemcomitans*-invaded RAW 264 cells. *A. actinomycetemcomitans* invasion induced the generation of reactive oxygen species (ROS) and the release of cathepsin B in RAW 264 cells. CA074-Me, a cathepsin B inhibitor, and N-Acetyl-L-cysteine (NAC), a ROS inhibitor, prevented the production of IL-1 β induced by *A. actinomycetemcomitans*. Taken together, these results suggest *A. actinomycetemcomitans* induce IL-1 β production in RAW 264 cells through the production of ROS and cathepsin B, but not through the NLRP3/caspase-1 pathway.

研究分野：感染症学

キーワード：インフラマソーム 歯周病細菌 炎症性サイトカイン 宿主寄生体相互関係

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、病原体成分などの外来性因子、コレステロール結晶といった内因性因子が引き起こす炎症において、細胞質内タンパク複合体であるインフラマソームの活性化が相次いで報告されるようになり、さらに治療標的として注目を浴びてきていた。我々は歯周病細菌侵入マクロファージにおいて、炎症性サイトカイン IL-6 の産生および JAK/STAT 経路の活性化の一連のシグナル経路を明らかにしてきた。その過程で、IL-6 以外にも IL-1 や IL-18 の産生が、歯周病細菌感染により促進されることを見出していた。

(2) サイトカイン IL-1 や IL-18 の産生に関与しているのは、インフラマソームと呼ばれる細胞質内タンパク複合体である。インフラマソームは、Nod (Nucleotide-binding oligomerization) 受容体 (Nod-like receptor: NLR)、アダプタータンパク質(ASC)、カスパーゼ-1 から構成される複合体である。受容体が外来性および内在性因子を認識し活性化すると、ASC およびカスパーゼ-1 前駆体が呼び寄せられ、インフラマソーム複合体を形成する。ASC は細胞質病原体センサーと考えられる NLR とカスパーゼ-1 をつなぐアダプターとして働き、カスパーゼ-1 依存性の炎症性サイトカインの活性化、NF- κ B の活性化、アポトーシスやネクローシスの誘導など様々な応答のシグナル伝達に関与すると言われている。

(3) インフラマソーム誘導の細胞死は、カスパーゼ-1 の活性化とサイトカインの産生を伴い、ピロトーシスと呼ばれている。このピロトーシスの生理的な役割として、病原細菌感染の観点から考えると、細菌増殖抑制に働く生理的な細胞応答であると推測される。ピロトーシスが誘導されたマクロファージは、サイトカイン誘導とともに細胞内容物を周囲に放出する。これらの細胞内容物により、以降の炎症・免疫応答がより活性化されることも考えられる。

2. 研究の目的

最近の研究では、炎症においてインフラマソームと呼ばれる細胞質内タンパク複合体がさまざまな生命現象において重要な役割を果たしていることが報告されているが、この複合体が関与する炎症誘導性の細胞死(ピロトーシス)のメカニズムに関しては全く不明である。今回の研究では、歯周病細菌が細胞内に侵入した後のインフラマソームの役割について、宿主微生物相互関係の観点から解明を行う。その過程で、細菌を認識する細胞質内受容体の情報伝達系およびインフラマソーム形成に関わる分子のピロトーシスにおける役割を分子レベルで明らかにする。あわせて、インフラマソームが、感染症の他にも糖尿病、動脈硬化などの発症と増悪に関与していることが報告されていることから、歯周病細菌感染と全身疾患の関与について

も検証する。

3. 研究の方法

(1) 我々が確立している歯周病細菌侵入実験系を用いて、歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 侵入による宿主応答について網羅的な解析を行った。

歯周病細菌感染が免疫細胞に誘導するインフラマソームの活性化の解析のため、分子生物学的ならびに遺伝工学的手法を用いて検証した。インフラマソームの構成因子について Nod 受容体ファミリー(NLR)、ASC、Caspase-1 の活性化については、リアルタイム PCR およびウエスタンブロットング法にて解析した。

歯周病細菌侵入を認識する細胞内受容体の検索を行った。歯周病原性細菌侵入により活性化した Nod 受容体ファミリーについてより詳細に解析を加えた。siRNA により NLR ノックアウト細胞を作成し、インフラマソーム活性化および炎症性サイトカイン産生の変化について解析した。

インフラマソーム活性化を誘導する病原因子の検証を行った。歯周病細菌が誘導することが示唆される活性酸素の産生、細菌のファゴサイトーシスによるカテプシン B の流入について検討を加えた。

4. 研究成果

(1) 我々は歯周病細菌 *A. actinomycetemcomitans* が、どのように免疫

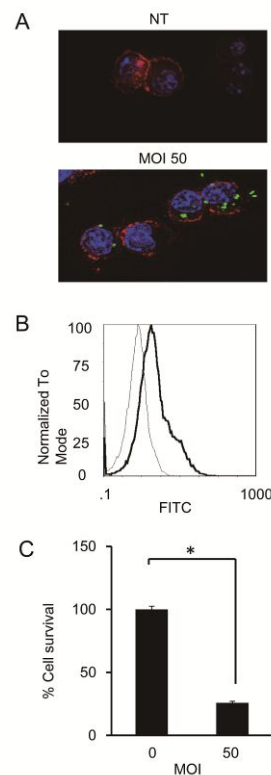


図1: *A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージ

細胞であるマクロファージへ侵入するのが検証した。まず、*A. actinomycetemcomitans* に GFP ラベルした菌株を使用し、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞への侵入実験を行った。図 1 A に示すように、MOI 50 (細胞/細菌 比率) にて侵入実験を行ったところ、緑色蛍光を示す歯周病細菌がマクロファージ内へ侵入していることを免疫蛍光染色にて確認した。

また、図 1 B に示すように、侵入割合についてフローサイトメータ解析を用いて行った。さらに、歯周病細菌侵入マクロファージでは、侵入実験後 3 6 時間で細胞死が誘導されていることを MTT アッセイにて確認した (図 1 C)。

(2) 次に、*A. actinomycetemcomitans* 侵入により、マクロファージにおいて炎症性サイトカイン IL-1 遺伝子およびタンパク発現が誘導されていることを確認した。

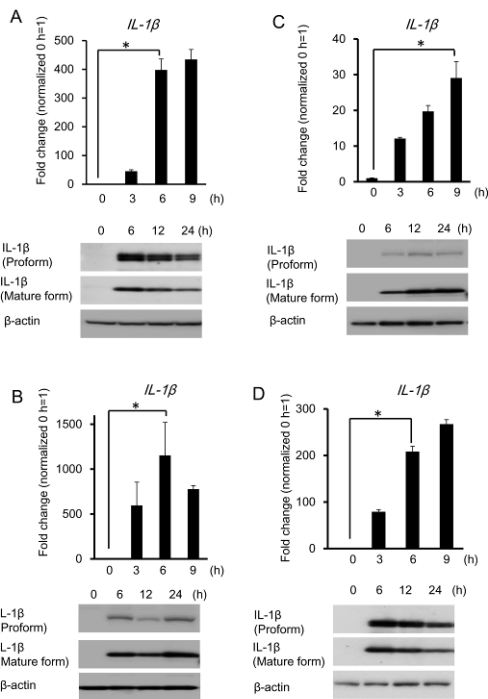


図 2 : マクロファージ細胞における IL-1 遺伝子およびタンパク発現

図 2 A ではマウスマクロファージ RAW264.7 細胞、B ではマウス骨髄由来マクロファージ、C ではヒト単球細胞 THP-1 細胞、D では、U937 細胞を使用した。骨髄由来マクロファージおよびヒト単球系細胞には、マクロファージ分化誘導を行っている。歯周病細菌 *A. actinomycetemcomitans* 侵入により、6 時間より、IL-1β の mature form の発現が上昇していることから、歯周病細菌がマクロファージに対して炎症性サイトカインタンパク発現を誘導することが明らかとなった。

(3) 次に、インフラマソーム複合体を形成

している因子のなかで caspase-1 に注目した。現在までに、炎症応答におけるマクロファージの IL-1β の産生に caspase-1 が関与していることが報告されている。図 3 A は、歯周病細菌侵入による IL-1β の細胞外産生を ELISA にて測定したものである。侵入後 1 2 時間から産生が上昇している。一方、図 3 B にて、caspase-1 阻害剤 Z-YVAD-FMK の前処理を行い、caspase-1 活性の阻害を行った。*A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージに誘導される IL-1β 産生は抑制されなかった。また、siRNA により caspase-1 ノックダウン細胞を作成し、歯周病細菌侵入実験系を行った。しかし、IL-1β mature form の発現に変化は認められなかった。以上から、*A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージに誘導される IL-1β 誘導は、caspase-1 に依存する経路ではないことが示唆された。また、*A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージに誘導される細胞死は、興味深いことに、caspase-1 ノックダウンでは抑制傾向が認められ、caspase-1 阻害剤では特に変化は認めなかった。このことについては、より詳細な解析が望まれる。

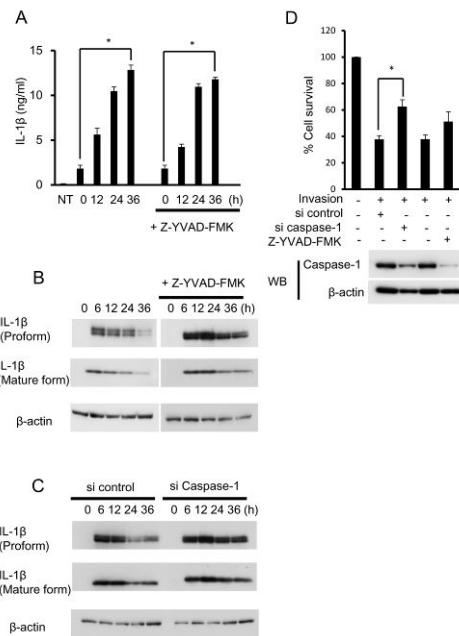


図 3 : Caspase-1 非依存的な IL-1β 産生

(4) *A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージにおける細胞内受容体について詳細な検証を加えた。マウスマクロファージ RAW264.7 細胞において、Nod ファミリーである NLRP3 の遺伝子発現は侵入実験 3 時間で著明に上昇した (図 4 A)。また、NLRP3 タンパク発現に関しては、侵入 6 時間で、発現を確認した。また、免疫蛍光染色にて、細胞質内の NLRP3 の発現を確認した。

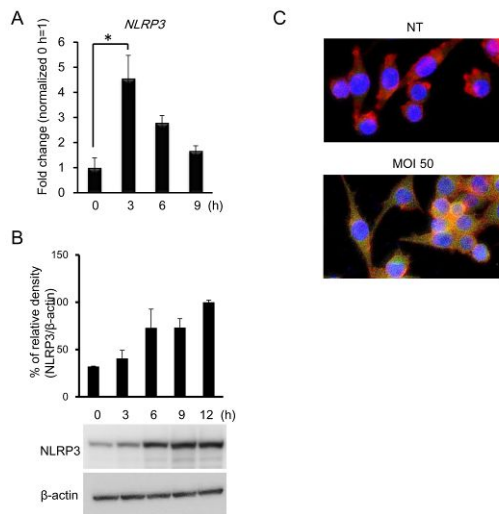


図4: *A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージにおける細胞質内受容体の発現

(5) *A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージに誘導される IL-1 に、細胞質受容体 NLRP3 がどのように関与しているか検証した(図5)。NLRP3 ノックダウン細胞にて、*A. actinomycetemcomitans* 侵入実験を行ったところ、IL-1 発現に影響は認めなかった。ELISA では、若干減少傾向は認められるものの、著明な抑制効果を示すものではなかった。

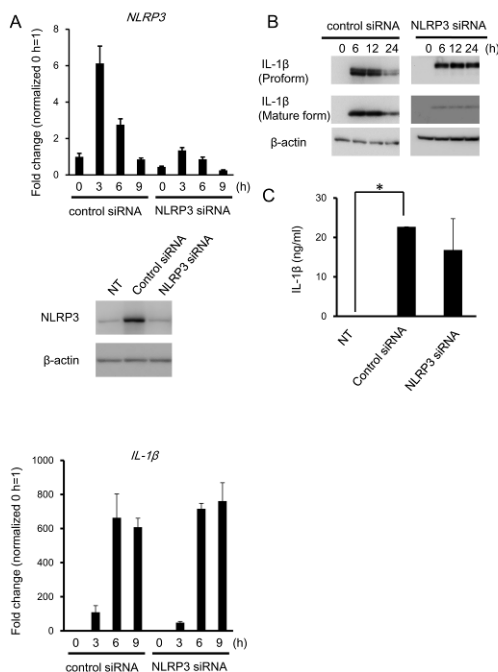


図5: *A. actinomycetemcomitans* 侵入が誘導する IL-1β における NLRP3 の役割

(6) *A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージに誘導される IL-1 産生におけるカテプシン B の役割について検証した。過去の報告にて、NLRP3 活性にライソゾームとカテプシン B の関与が認められている。そこで、*A. actinomycetemcomitans* 侵入におけるカテプシン B 産生について調べたところ、侵入後4時間で産生の上昇を認めた(図6A)。カテプシン B が IL-1 産生を制御しているか検証するために、カテプシン B 活性阻害薬 CA074-Me を使用した。阻害剤使用濃度決定(図6B)後、IL-1 への影響を解析した。ウエスタンブロットングおよび ELISA 解析により、部分的な抑制が確認できた。

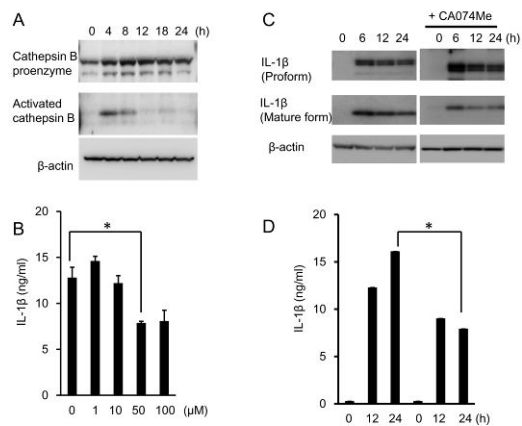


図6: *A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージが誘導する IL-1 産生におけるカテプシン B の役割

(7) ROS (活性酸素) の役割に関して、免疫応答に大きな役割は果たしている。まず、*A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージにおける ROS の産生について検証した。フローサイトメータ解析により、侵入6時間

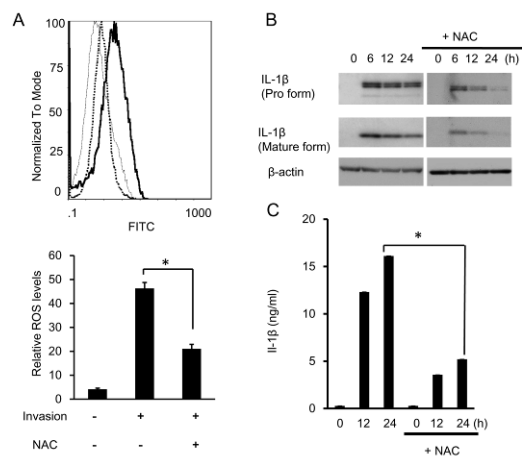


図7: *A. actinomycetemcomitans* 侵入マクロファージが誘導する IL-1 産生における ROS の役割

で ROS の発現を認めた (図 7 A)。そこで、ROS 阻害剤を使用し、IL-1 産生について調べた。ROS 阻害剤により、*A. actinomycetemcomitans* 侵入が誘導する IL-1 産生は抑制されていた (図 7 B C)。

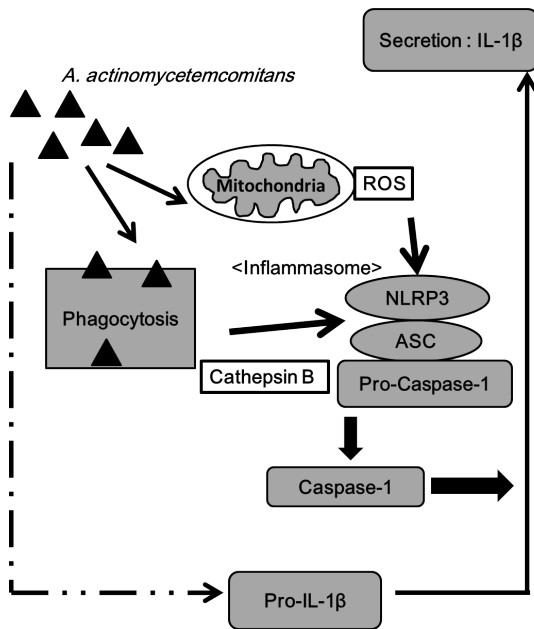


図 8 : 本研究の概要

以上より、歯周病細菌侵入マクロファージにおいて、細胞質内受容体 NLRP3 が活性化することが明らかになった。活性化に伴い、炎症性サイトカイン IL-1 発現が誘導された。一方で、誘導される IL-1 産生は、NLRP3 に関与していたが、カスパーゼ 1 依存経路によるものではなかった。また、歯周病侵入によりカテプシンや活性酸素が発現し、この発現により IL-1 産生が誘導されることが示唆された (図 8)。宿主細胞が外来性因子や内因性因子を認識することで形成されるインフラマソームは、多彩な炎症応答に重要な役割を果たしている。今回の研究では、歯周炎において、インフラマソームが、分子生物学的におよび病態学的にどのように関与するかの糸口を解明することができた。このことは、新たな戦略としての歯周炎の予防・治療方法を模索する切り口となる。また、インフラマソームを宿主寄生体相互関係の観点から解析したことで、歯周炎と、糖尿病や動脈硬化症といった全身疾患との関係に新たな視点を設け、今後の歯周医学研究に新しい知見を提供することができると確信している。

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 8 件)

- 1) Fujii S, Okinaga T, Ariyoshi W, Takahashi O, Iwanaga K, Nishino N, Tominaga K, Nishihara T. Mechanisms of G1 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells induced by hybrid-compound histone deacetylase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 May 10;434(3):413-20. doi: 10.1016/j.
- 2) Ariyoshi W, Okinaga T, Knudson CB, Knudson W, Nishihara T. High molecular weight hyaluronic acid regulates osteoclast formation by inhibiting receptor activator of NF- κ B ligand through Rho kinase. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013 Nov 1. pii: S1063-4584(13)00986-2. doi:10.1016/j.joca. 2013.10.013.1)
- 3) Saito N, Ariyoshi W, Okinaga T, Kamegawa M, Matsukizono M, Akebiyama Y, Kitamura C, Nishihara T. Inhibitory effects of ameloblastin on epithelial cell proliferation. *Archives of Oral Biology,* 2014 .
- 4) Morishita M, Saeki R, Okinaga T, Ariyoshi W, Okahashi N, Usui M, Nakashima K, Nishihara T. New system for detection of oral bacterial adhesion to macrophages in vitro. *WebPub Journal of Scientific Research Vol. 2(7),* 82-86, 2014
- 5) Morotomi T, Kitamura C, Okinaga T, Nishihara T, Sakagami R, Anan H. Continuous fever-range heat stress induces thermotolerance in odontoblast-lineage cells. *Arch Oral Biol.* 2014 Apr 18;59(7):741-748. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.03.014.
- 6) Obara S, Akifusa S, Ariyoshi W, Okinaga T, Usui M, Nakashima K, Nishihara T. Pyroglutamated apelin-13 inhibits lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines in murine macrophage J774.1 cells. *Modern Research in Inflammation Vol. 3(2)* p59-66. 2014.
- 7) Yamasaki T, Ariyoshi W, Okinaga T, Adachi Y, Hosokawa R, Mochizuki S, Sakurai K, Nishihara T. Dectin-1 Agonist, Curdlan, Regulates Osteoclastogenesis by Inhibiting Nuclear Factor of Activated T-cells Cytoplasmic 1 through Syk Kinase. *J Biol Chem.* 289 (27) 19191-19203. 2014
- 8) Okinaga T, Ariyoshi W, Nishihara T. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* invasion induces pyroptosis and NLRP3 inflammasome activation through IL-1 production mediated by reactive oxygen species and cathepsin B. *J Interferon Cytokine Res.* 2015 Mar 19

〔学会発表〕(計 20 件)

- 1) 山崎徹、有吉渉、沖永敏則、細川隆司、西原達次 Curdlan-dectin-1 を介した新たな破骨細胞分化の制御機構 第 55 回歯科基礎医学会 岡山 2013 年
- 2) 谷口広祐、引地尚子、沖永敏則、西原達次 Tumor associated macrophage におけるアシル基転移酵素群の役割 第 55 回歯科基礎医学会 岡山 2013 年
- 3) 沖永敏則、有吉渉、西原達次 歯周病細菌感染マクロファージにおけるインフラマソーム活性 第 55 回歯科基礎医学会 岡山 2013 年
- 4) 西藤法子、有吉渉、沖永敏則、鷲尾絢子、北村知昭、西原達次 アメロプラスチンは口腔上皮細胞の細胞増殖を抑制する 第 55 回歯科基礎医学会 岡山 2013 年
- 5) 小原成将、秋房住郎、臼井通彦、笠井宏記、沖永敏則、有吉渉、西原達次 新規アディポカイン apelin による炎症応答に対する影響 第 55 回歯科基礎医学会 岡山 2013 年
- 6) 沖永敏則、有吉渉、西原達次 Dectin-1 activation inhibits an inflammatory response to bacterial infection 第 87 回日本細菌学会総会 3 月 東京 2014 年
- 7) 重田啓彰、前田憲成、西原達次、沖永敏則 歯周病細菌の次亜塩素酸ナトリウム溶液に対する環境適応機能の追究 第 87 回日本細菌学会 3 月東京 2014 年
- 8) 沖永敏則、有吉渉、臼井通彦、西原達次 細菌誘導インフラマソーム活性に対する -1,3 glucan の制御 第 35 回 日本炎症再生医学会 7 月 沖縄 2014 年
- 9) 櫻井拓真、有吉渉、沖永敏則、吉賀大午、富永和宏、西原達次 関節炎における IL-17 の作用機序の解明 第 35 回 日本炎症再生医学会 7 月 沖縄 2014 年
- 10) 有吉渉、沖永敏則、櫻井拓真、西原達次 Interleukin-33 (IL-33) は単球・マクロファージにおける matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現を増強する第 35 回 日本炎症再生医学会 7 月 沖縄 2014 年
- 11) 沖永敏則、有吉渉、西原達次 歯周病細菌が誘導する炎症性サイトカイン産生に対する -1,3 glucan の制御 第 67 回 日本細菌学会九州支部総会 9 月 鹿児島 2014 年
- 12) 有吉渉、沖永敏則、西原達次 Syk の分解を介した 1-3 グルカンによる破骨細胞分化制御機構 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 福岡 2014 年
- 13) 清宮弘康、有吉渉、沖永敏則、西原達次 骨芽細胞に対する圧縮刺激により分泌される IL-33 を介した破骨細胞分化制御メカニズム 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 福岡 2014 年
- 14) 櫻井拓真、有吉渉、沖永敏則、西原達次 Interleukin-17 刺激により誘導された骨膜細胞の生物学的活性の解明 第 56 回 歯科

基礎医学会学術大会・総会 9 月 福岡 2014 年

- 15) 沖永敏則、有吉渉、西原達次 -1,3 glucan のインフラマソーム活性制御メカニズムについて 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 福岡 2014 年
- 16) 谷口広祐、引地尚子、沖永敏則、西原達次 脂質代謝異常におけるマクロファージのリゾリン脂質アシル転移酵素群の役割 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 福岡 2014 年
- 17) 中川愛加、沖永敏則、有吉渉、北村知昭、西原達次 炎症性サイトカインによる象牙芽細胞様細胞における分化マーカー発現誘導に関する研究 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 福岡 2014 年
- 18) 諸富孝彦、沖永敏則、西原達次、北村知昭 持続的な軽度熱刺激は象牙芽細胞様細胞の熱耐性を向上させる 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会 9 月 福岡 2014 年
- 19) 佐藤しのぶ・中原敏貴・島本準平・沖永敏則・有吉渉・西原達次・竹中繁織 定量的歯周病診断のためのフェロセン修飾ペプチドプローブ固定化電極の最適化とその電気化学的検出 日本分析化学会第 63 年会 9 月 広島 2014 年
- 20) 松尾佳祐、前田憲成、沖永敏則、西原達次 口腔内歯周病抑制菌による歯周病細菌に対する静菌作用の解明 第 88 回日本細菌学会 2015 年 3 月 岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖永敏則 (OKINAGA TOSHINORI)
九州歯科大学歯学科
感染生物学分野・講師

研究者番号：60582773

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし