

前 めぐみ 論文内容の要旨

主 論 文

The Role of Cytokines Produced via the NLRP3 Inflammasome in Mouse Macrophages Stimulated with Dental Calculus in Osteoclastogenesis

(歯石で刺激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介して産生されるサイトカインの破骨細胞形成における役割)

(前 めぐみ、Mohammad Ibtehad Alam、山下 恭徳、尾崎 幸生、樋口 賀奈子、Ziauddin SM、Jorge Luis Montenegro Raudales、坂井 詠子、筑波 隆幸、吉村 篤利)

(International Journal of Molecular Sciences • 22 巻 原稿 1 2 4 3 4 ページ)

doi:10.3390/ijms222212434 2021 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：吉村 篤利 教授)

緒 言

歯周炎は、歯槽骨吸収を伴う炎症性疾患であり、歯垢や歯石などの外的刺激に反応して歯周組織に浸潤した白血球が産生するサイトカインが骨吸収に関与する。インターロイキン (IL) -1 β は、歯周炎患者の歯肉溝滲出液から検出され、強い骨吸収作用を示す炎症性サイトカインであり、その産生には nucleotide oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain containing (NLRP) 3 インフラマソームが関与している。IL-1 β と同様に IL-1 ファミリーの IL-18 も NLRP3 インフラマソームを介して産生される炎症性サイトカインであるが、破骨細胞形成には促進的にも抑制的にも作用することが報告されている。これまでに歯石刺激後のマウスマクロファージは NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 β を産生することが明らかにされているが、歯石刺激後に NLRP3 インフラマソーム依存性に誘導される IL-18 や NLRP3 インフラマソーム非依存性に誘導される抗炎症性サイトカイン IL-10 等が破骨細胞形成へ与える影響については未解明である。本研究では、歯石刺激後のマウスマクロファージが産生するこれらサイトカインの破骨細胞形成への影響を解析した。

対象と方法

ヒト歯周炎患者から採取した歯石を粉砕、洗浄後にオートクレーブで滅菌処理した。この歯石で野生型 (WT) および NLRP3 欠損型マウスマクロファージを刺激し、培養上清を回収した。マウス骨髄由来マクロファージ (BMMs) 由来破骨細胞前駆細胞および RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞にこれらの培養上清を添加して培養後、3 核以上の酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 陽性細胞を破骨細胞として計測した。培養上清中の IL-1 β 、IL-18、IL-10 の濃度は酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) 法で計測した。WT マウスマクロファージ培養上清中の IL-1 β の破骨細胞形成への影響を解析するため、BMMs 由来破骨細胞前駆細胞 に WT マウスマクロファージ培養上清と組換え (r) IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1ra) を同時に添加し、破骨細胞数を計測した。次に、個々のサイトカインの破骨細胞形成への影響を調べ

るため、BMMs 由来破骨細胞前駆細胞および RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞に rIL-1 β 、rIL-18、rIL-10 を添加し、破骨細胞数を計測した。RANKL プライミング前後の BMMs と RAW-D 細胞における IL-10 受容体の発現量を定量的 reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法で解析した。

結 果

BMMs 由来破骨細胞前駆細胞に歯石刺激後の WT または NLRP3 欠損型マウスマクロファージ培養上清を添加すると破骨細胞形成が促進され、WT マウスマクロファージ培養上清の方がより強い破骨細胞形成作用を示した。一方、RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞に歯石刺激後の WT または NLRP3 欠損型マウスマクロファージ培養上清を添加すると破骨細胞形成は著しく抑制された。WT マウスマクロファージ培養上清中の IL-1 β 、IL-18 は歯石の濃度依存的に増加したが、NLRP3 欠損型マウスマクロファージ培養上清においては IL-1 β は検出されず、IL-18 の増加もみられなかった。WT、NLRP3 欠損型マウスマクロファージ培養上清において IL-10 は歯石の濃度依存的に増加した。WT マウスマクロファージ培養上清による BMMs 由来破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成促進作用は、rIL-1ra により抑制された。rIL-1 β は BMMs および RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成を促進した。rIL-18、rIL-10 は BMMs および RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞において破骨細胞形成を抑制した。BMMs においては RANKL プライミング後に IL-10 受容体の発現が有意に減少したが、RAW-D 細胞においては発現量の変化がみられなかった。

考 察

歯石刺激後の WT マウスマクロファージ培養上清は、BMMs 由来破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成を促進し、RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成を抑制したことから、破骨細胞形成促進作用と抑制作用の両方を有することが示された。歯石刺激後の WT マウスマクロファージ培養上清中に IL-1 β が検出され、NLRP3 欠損型マウスマクロファージ培養上清中には検出されなかったことから、IL-1 β の産生は NLRP3 インフラマソームを介していると考えられる。WT マウスマクロファージ培養上清の破骨細胞形成促進作用は IL-1ra の添加により抑制されたことから、IL-1 β が BMMs 由来破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成を強く促進したと考えられる。これは、臨床的に歯周ポケットに滲出した白血球が微細な歯石粒子を取り込み、NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 β を産生することで骨吸収を促進することを示唆していると考えられる。一方、RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞においては歯石刺激後のマウスマクロファージ培養上清が破骨細胞形成を抑制した。また、rIL-10、rIL-18 は破骨細胞形成抑制作用を示したことから、マウスマクロファージ培養上清中のこれらのサイトカインが RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成の抑制に関与したと思われる。IL-10 受容体の発現は RANKL プライミング後の BMMs のみで有意に減少したことから、BMMs 由来破骨細胞前駆細胞と RAW-D 細胞由来破骨細胞前駆細胞におけるマウスマクロファージ培養上清への反応性の違いには IL-10 への感受性が関与していると思われる。BMMs はより生理的な細胞と考えられるため、歯石刺激後のマクロファージが産生するサイトカインは破骨細胞形成促進的に作用する可能性が高いと考えられるが、今後、歯石により誘導されるサイトカインの歯槽骨吸収における役割については動物モデル等を用いてより詳細に明らかにする必要がある。