HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Aggregatibacter actinomycetemcomitans によるインフラマソームの活性化［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	阿部, 亜美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11241号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55390
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tsugumi_Abe_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏名　阿部　亜美

学　位　論　文　題　名

Aggregatibacter actinomycetemcomitans によるインフラマソームの活性化

Aggregatibacter actinomycetemcomitans（Aa）は通性嫌気性グラム陰性桿菌であり，急速な歯周組織破壊をもたらす侵襲性歯周炎の主な病原菌として知られている．さらには感染性心内膜炎，敗血症，動脈硬化，肺炎などの全身疾患との関連も多く報告されている．歯周炎の病態形成に重要な因子のひとつに，病原体刺激に対する生体防御機構の一環として宿主側から放出される炎症性サイトカイン IL-1β がある．歯周炎において IL-1β は，他の炎症性メディエーターを誘導することで炎症反応を拡大し，破骨細胞を活性化することにより歯槽骨吸収を進行させ，マトリックスメタロプロテアーゼを誘導することにより結合組織破壊を進行させるなど病態形成に大きく関わっている．このように IL-1β の歯周炎への関与は以前より多くの報告がなされているが，IL-1β がどのような経路で産生されるのかについては不明なままである．

近年，この多様な生理活性をもつIL-1βが関与する炎症性疾患の多くがインフラマソームと呼ばれる細胞内センサーの活性化と関連している可能性が示唆され，病態解明の手がかりとしてインフラマソームが注目されている．インフラマソームは，生体に加わる様々な刺激を認識し，IL-1βの産生を制御する細胞内タンパク質複合体である．IL-1βが細胞外へ放出され機能するためには少なくとも２つのステップが必要である．その一つは，Toll-like receptors (TLRs) 等のパ

ターン認識レセプター (PRRs) からのシグナルによる転写因子NF-κBの活性化で誘導される前駆体IL-1βの細胞内蓄積である．もう一つはインフラマソームの活性化で誘導されたcaspase-1による前駆体IL-1βから成熟型IL-1βへのプロセシングである．インフラマソームの活性化によるIL-1βの産生は以下のようなメカニズムで誘導される．何らかのシグナルでNod-like-receptor（NLR），アダプタータンパクであるASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain) ならびに前駆体caspase-1の3分子複合体（インフラマソーム）が形成され, それにより前駆体caspase-1が活性化型caspase-1へ変換される. 次に, 活性化されたcaspase-1がPRRs シグナルにより産生された前駆体IL-1β (31kD) をプロセシングし，活性化型IL-1β (17kD)を産生・放出する．多くの場合，IL-1βはピロトーシス (pyroptosis) という細胞死により細胞外へ放出される. 刺激の種類に応じて様々なNLRがインフラマソームを形成しIL-1βを産生している．

歯周炎はその病態形成にIL-1βが重要な役割を果たすが，歯周病原菌とインフラマソームとの関連を示した報告はほとんどない．本研究では，未だ不明な点が多いAaの歯周疾患における病因論の一部を明らかにすることを目的とし，Aaによるインフラマソームの活性化について検証した．

標的細胞は A/J マウス由来樹状細胞（XS106 細胞）を，Aa の菌株は JP2 株を使用した. IL-1β の産生は ELISA 法と Western Blotting 法で評価した. ROS (reactive oxygen species)の産生は蛍光試薬 Dihydrorhodamine123 を用いて，フローサイトメトリーで解析した．

Aa の生菌，死菌（100℃で 5 分間処理），培養上清で XS106 細胞を刺激したところ，生菌，死菌ともに IL-1β の産生誘導を認めたが，Aa 培養上清では産生誘導はみられなかった．菌体刺激による IL-1β 産生誘導活性は Pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK および caspase-1 阻害剤である Z-YVAD-FMK で有意に阻害

され, さらにcaspase-1ノックダウンにより有意に減弱したことから, AaのXS106細胞における IL-1β 産生誘導活性には caspase-1 の関与が強く示唆された．この caspase-1 の活性化に関わるインフラマソームを同定するために，NLRP3 特異的 siRNA 安定発現株（XS106nlrp3）を樹立し，菌体で刺激したところ，生菌の IL-1β 産生誘導活性は有意に減弱したが，死菌の活性は減弱しなかった．さらに，NLRP3インフラマソームを活性化することがすでに明らかにされているROSの影響を調べた．ROS 阻害剤である N-Acetyl-L-cysteine により生菌の IL-1β 産生誘導活性は有意に阻害され，生菌刺激により ROS が産生されていることが確認された．以上のことから，Aa 生菌の IL-1β 産生誘導活性には NLRP3 インフラマソームが関与していることが示唆された．

また，これまで細胞死は，形態学的特徴によりプログラムされた細胞死であるアポトーシスと病理的細胞死であるネクローシスに分類されてきた．近年，プログラムされた細胞死の中にもネクローシス様形態をとり，IL-1β の放出を特徴とする，ピロトーシスとよばれる細胞死の存在が明らかになり，IL-1β は，多くの場合，このピロトーシスによって細胞外へ放出されることがわかってきたことから，Aa が誘導する細胞死の形態を確認した．Aa で刺激後の細胞を Annexin-V と PI で染色し，その形態をフローサイトメーターで解析した．Aa が誘導する細胞死は形態学的にネクローシス様細胞死であり, Aa は caspase-1 依存的に IL-1β を産生誘導しているというこれまでの結果からピロトーシスである可能性が示唆され, 生菌, 死菌ともに XS106 細胞に対しピロトーシスを誘導し, IL-1β が細胞外へ放出されたと考えられる．

以上の結果から，以下のようなことが推測される．XS106 細胞は樹状細胞であるためにTLR2やTLR4を発現しており, また, グラム陰性菌であるAaはTLR2や TLR4 で認識されるリポタンパク質や LPS を有しているために，これらの

TLRs のシグナルにより XS106 細胞内に前駆体 IL-1β が産生・蓄積されている．現時点では，どのような物質がどのような機構で NLRP3 インフラマソームを活性化しているかということは不明である．しかしながら，Aa 菌体あるいは菌体結合性の耐熱性物質が XS106 細胞に取り込まれ，何らかの経路で細胞質に入り，生菌の場合は NLRP3 インフラマソームを，また，死菌の場合はそれ以外のインフラマソームを活性化し IL-1β の産生を誘導したものと推測される．

結論として，本研究において*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2株は，樹状細胞系XS106細胞に対しNLRP3インフラマソームを活性化し，IL-1βの産生ならびにピロトーシスを誘導することが示唆された．