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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏 名　　阿部　亜美

審査担当者	主査	教授	八若　保孝
	副査	教授	柴田　健一郎
	副査	教授	田村　正人

学　位　論　文　題　名

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

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。まず申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下の通りである。

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。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、 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。歯周炎はその病態形成に IL-1β が重要な役割を果たすが、歯周疾患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、フローサイトメーターで解析した。

Aa の生菌、死菌（100℃で 5 分間処理）および培養上清で 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。そこで、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。

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された。これは歯周炎における病因論の新たな一面を示唆しているものと推測される。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

１．　インフラマソームの活性化機構について

２．　DAMPs、PAMPs について

３．　Aa JP2 株について（特徴、使用した理由など）

４．　Caspase の種類について（アポトーシス、炎症などとの関連）

５．　Caspase inhibitor の構造について
６．　MFI について
７．　AnnexinⅤ、PI について
８．　ピロトーシスについて（定義、由来など）
９．　歯肉上皮細胞におけるインフラマソームの関与について
１０．今後の展望について

などであった。以上の質問に対して、申請者は適切に回答した。試問を通して、申請者が本研究ならびに関連分野を十分に理解し、幅広い知識を有していることが明らかになった。また、本研究は今後さらなる発展が期待されるものであった。

以上から、審査担当者全員が、本研究は学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格があると認めた。