HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Aggregatibacter actinomycetemcomitansによるインフラマソームの活性化
Author(s)	阿部, 亜美; 佐伯, 渉; 長谷部, 晃 他
Citation	北海道歯学雑誌, 35(2), 123-132
Issue Date	2015-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58242
Type	journal article
File Information	35-02-4abe.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　35：123-132，2015.

原　著

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

阿部　亜美[1,2)]　佐伯　　歩[1)]　長谷部　晃[1)]
原　　博志[1)]　八若　保孝[2)]　柴田健一郎[1)]

抄　録：インフラマソームは多様な生理活性をもつ炎症性サイトカインのひとつであるIL-1βの産生を制御する細胞内センサーである．近年，IL-1βが関与する炎症性疾患の多くがこの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．歯周炎はその病態形成にIL-1βが重要な役割を果たすが，歯周炎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．そこで，本研究では，侵襲性歯周炎の主な病原菌であり，感染性心内膜炎や敗血症などの全身疾患との関連も多く報告されている*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*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，本菌によるインフラマソームの活性化について検証した．*A. actinomycetemcomitans*の生菌および死菌でA/Jマウス由来樹状細胞（XS106細胞）を刺激したところ，生菌，死菌ともにIL-1βの産生を誘導したが，*A. actinomycetemcomitans*培養上清では産生誘導はみられなかった．生菌および死菌でのIL-1β産生誘導活性はZ-VAD-FMKとZ-YVAD-FMKで有意に阻害された．さらに，これらのIL-1β産生誘導活性はcaspase-1ならびにNLRP3のノックダウンにより有意に減弱した.また，*A. actinomycetemcomitans*菌体はXS106細胞にネクローシス様細胞死を誘導し，その細胞死はIL-1βの産生を伴うことからピロトーシスであると考えられる．

以上の結果から，*A. actinomycetemcomitans*菌体はXS106細胞においてNLRP3インフラマソームを活性化し，IL-1β産生ならびにピロトーシス誘導活性を有していることがわかった．

キーワード：*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*，IL-1β，caspase-1，NLRP3インフラマソーム

緒　　言

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[1-3)]．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[4)]．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[5)]．

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[6)]．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[7,8)]．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（PRR）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[7,8)]．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

[1)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科　口腔病態学講座　口腔分子微生物学教室（主任：柴田健一郎 教授）
[2)] 〒060-8586 札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科　口腔機能学講座　小児・障害者歯科学教室（主任：八若保孝 教授）

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に変換される．次に，活性化されたcaspase-1がPRR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[9]．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[10]．現在までに，インフラマソームを形成するNLRとしてNLRP1，NLRP2，NLRP3，NLRP6，NLRC4が報告されている[7, 8]．

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．

材料と方法

１．試　薬

Pan-caspase阻害剤Z-VAD-FMKならびにcaspase-1阻害剤Z-YVAD-FMKは，それぞれPROMEGA社ならびにabcam社から購入した．ROS（reactive oxygen species）阻害剤N-Acetyl-L-cysteine（NAC）およびROS検出用蛍光試薬Dihydrorhodamine123はSigma-Aldrich社から購入した．caspase-1特異的siRNA（Silencer®Select Pre-designed siRNA）およびコントロールとして非特異的siRNA（Silencer® SelectNegative Control）はAmbion社から，また，Lipofectamine®RNAiMAXはInvitrogen社から購入した．GFP遺伝子を含むReady-made psiRNA-mNALP3 Kit（psiRNA-mNLRP3とpsiRNA-LucGL3）はInvivoGen社から購入した．

その他の試薬はすべて市販の特級品を使用した．

２．細胞培養

XS106細胞（A/Jマウス表皮由来樹状細胞株，米国トレド大学　高島　明教授より分与）は，10％（v/v）の非働化した牛胎児血清（FBS, Invitrogen社），2 mM L-glutamine，1 mM sodium pyruvate，10 mM HEPES，50 mM 2-mercaptoethanol，1％（w/v）non-essential amino acids，100 units/ml penicillinGおよび100 μg/ml streptomycinを含むRPMI-1640培地（Sigma-Aldrich社）に0.5 ng/ml murine recombinant GM-CSF（Pepro Tech社），５％（v/v）NS47繊維芽細胞培養上清を添加した培地（XS106コンプリート培地）を用い，10 cm dishにて37℃，５％ CO_2 下で培養した．

３．細菌培養

Aggregatibacter actinomycetemcomitans（Aa）JP２株（北海道医療大学歯学部 歯周歯内治療学 古市 保志教授より分与）は，１％（w/v）yeast extract（BD社）を含むBrain Heart Infusion（BD社）培地で37℃，５％ CO_2 下で培養し，対数増殖期後期に10,000gで15分間遠心して菌体を回収した．回収した菌体はPBS（Phosphate-Buffered Saline）で３回洗浄した後，その沈査をPBSに再懸濁し，菌懸濁液とした．また，遠心上清は220 nmのメンブレンフィルターで濾過し，濾液をAa培養上清とした．菌懸濁液ならびにAa培養上清は共に使用直前まで－80℃で保存した．

４．AaのIL-1β産生誘導活性

XS106細胞を24-well plateの１ウェルあたり（500 μlの血清無添加RPMI-1640培地）に 6×10^5 個播種し，種々の菌数（3.6×10^6，3.6×10^7，3.6×10^8 cfu）のAa菌体あるいはAa培養上清５μl（原液，10倍希釈，100倍希釈）を加え，37℃，５％ CO_2 下で反応させた．24時間反応させた後，遠心し，その上清中のIL-1β量をBD OptEIA™Set Mouse IL-1β（BD Biosciences社）で測定した．阻害剤を使用した実験においては，種々の濃度の阻害剤を，XS106細胞（6×10^5 個）に予め１時間作用させた後，Aa菌体（3.6×10^8 cfu）を加えて24時間反応させた．なお，生菌刺激の際は菌の増殖を防ぐために培地に100 units/ml penicillin Gおよび100 μg/ml streptomycinを添加した．死菌は100℃で５分間処理した．

産生されたIL-1βが成熟型かどうかはWestern blotting法で確認した．刺激後の上清をAmicon®Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices（Millipore社）を用いて25倍濃縮し，SDSサンプルバッファーで100℃，５分間処理した．SDSサンプルバッファーで処理したサンプルをMini PROTEAN Tetra Cell（Bio-Rad社）を用いて電気泳動し，転写装置（Amersham Bioscience社）を用いて，ニトロセルロースメンブレン（Whatman社）に転写した．そのメンブレンを５％（w/v）スキムミルクおよび0.2％（v/v）Tween 20を含むPBSでブロッキングした後，一次抗体としてマウスIL-1β抗体（R&D SYSTEMS社）を室温で15時間反応させ，次に２次抗体としてPeroxidase-conjugated Affini Pure Rabbit Anti-Goat（Immuno Reserch社）と室温で１時間反応させた．そのメンブレンをLuminata™Forte Western HRP Substrate（Millipore社）と反応させ，X線フィルム（Kodak社）に感光させた．

５．RNA干渉

XS106細胞を24well-plateに１ウェルあたり 3×10^5 個播種し，caspase-1特異的siRNAおよび非特異的siRNAをLipofectamine®RNAiMAXを用いて導入した．24時間培養した後，細胞（6×10^5 個）を血清無添加のRPMI-1640培地で２回洗浄し，Aa菌体（3.6×10^8 cfu）を加え，24時間反応させた後の上清を回収した．なお，トランスフェクショ

ン条件は付属のプロトコールに従った.

6．NLRP3特異的siRNA発現XS106細胞株の樹立

付属のプロトコールに従って調整したpsiRNA-mNLRP3とpsiRNA-LucGL3のそれぞれ5 μlを90 μlのOpti-MEM（Invitrogen社）に懸濁し，1 × 10^6個のXS106細胞へ加え，175V，5 msecの条件でtwo-step electroporator（CUY21 Pro-Vitro, NEPA GENE）を使用して遺伝子導入した．10 cm dishにてXS106コンプリート培地で2日間培養後，100 μg/ml Zeocinを含むXS106コンプリート培地で継代培養し，安定発現細胞株（XS106nlrp3）を樹立した．なお，遺伝子の導入はGFPの蛍光をフローサイトメーターで確認し，もっとも強く発現しているクローンをXS106nlrp3細胞とした.

7．Real- time PCR

Caspase-1特異的siRNAを導入したXS106細胞あるいはXS106nlrp3細胞からReliaPrep™RNA Cell Miniprep System（Promega社）を用いてRNAを精製し，ReverTraAce® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（東洋紡社）を用いて逆転写反応を行い，cDNAを合成した．マニュアルは付属のプロトコールに従った.

Caspase-1特異的あるいはNLRP3特異的TaqMan®Gene Expression Master Mix（Applied Biosystems社）を用いて，上記のcDNAをStep One®（Applied Biosystems社）にて増幅させ，定量および解析を行った．内部標準にはGAPDHを用い，その相対比を比較検討した.

8．ピロトーシス

XS106細胞（6 × 10^5 個）をAaの生菌および死菌（3.6 × 10^8 cfu）で24時間刺激した後，PBSで2回洗浄した．洗浄した細胞をAnnexin-V-FLUOS Staining Kit（Roche社）で染色し，30000イベントをFACS Calibur flow cytometer（BD社）で分析した．なお，得られたデータは解析ソフトFlowJo（トミーデジタルバイオロジー社）を用いて解析した.

9．統計学的処理

得られたデータは統計ソフト（SSRI, 社会情報サービス，東京）Student's T testにて解析し，P＜0.05を統計学的に有意とした.

結　　果

1．AaのIL-1β産生誘導活性

XS106細胞をAaの生菌，死菌あるいは培養上清で刺激したところ，生菌（図1-A），死菌（図1-B）ともに菌体量依存的な成熟型IL-1βの産生を誘導したが，Aa培養上清（図1-C）にはそのような活性はみられなかった.

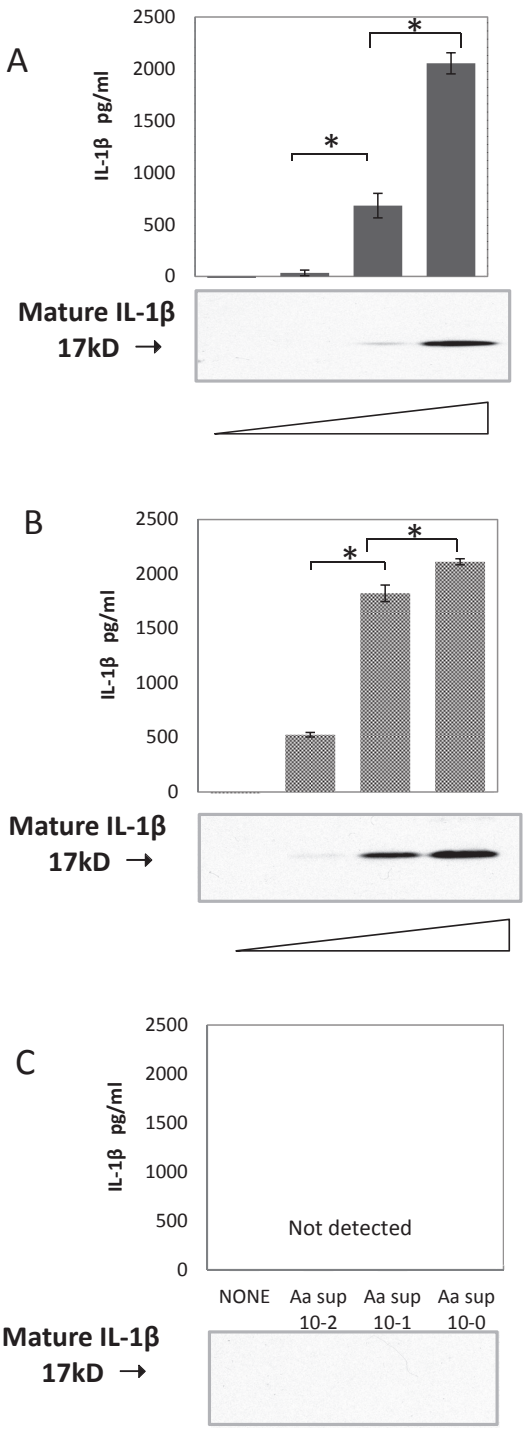


図1．XS106細胞に対するAaのIL-1β産生誘導活性

XS106細胞（6 × 10^5 個/well）に，種々の菌数（3.6 × 10^6, 3.6 × 10^7, 3.6 × 10^8 cfu）のAa菌体あるいはAa培養上清（原液，10倍希釈，100倍希釈）を加え，37℃，5 % CO_2下で反応させた．反応24時間後の上清中のIL-1β量をELISA法で測定した．なお，生菌刺激の際は100 units/ml penicillin Gおよび100 μg/ml streptomycinを添加した．グラフは，生菌（図1A），死菌（図1B），培養上清（図1C）を示す．成熟型IL-1βはWestern blotting法で確認した．データは triplicateで行なった実験結果の平均値と標準偏差を示す.

t-検定　*：P＜0.05

２．Caspase-1の関与

１）caspase阻害剤

IL-1βの産生は，TLR等のシグナルで産生された前駆体IL-1βがインフラマソームの活性化で生じたcaspase-1により処理され，ピロトーシス等の細胞死により細胞外へ放出される[11]．そこで，生菌および死菌のIL-1β産生誘導活性に及ぼすpan-caspase阻害剤であるZ-VAD-FMKならびにcaspase-1阻害剤であるZ-YVAD-FMKの影響を調べた．その結果，Z-VAD-FMKならびにZ-YVAD-FMKは濃度依存的に生菌（図２-A，C）および死菌（図２-B，D）によるIL-1β産生誘導活性を阻害した．

２）Caspase-1 mRNAのノックダウン

Caspase-1特異的ならびに非特異的siRNAをXS106細胞へ導入し，caspase-1 mRNAの発現を調べた．その結果，caspase-1特異的なsiRNAの導入により，caspase-1 mRNAの発現は有意に抑制された（図３-A）．この細胞を，Aaの生菌あるいは死菌で刺激したところ，ともにIL-1β産生誘導活性が有意に阻害された（図３-B，C）．

３．NLRP3の関与

インフラマソームはNLR，アダプター分子ASCならびに前駆体caspase-1からなるタンパク質複合体である[10]．次に，Aaによるインフラマソームの活性化にはどのようなNLRが関与しているかを検証するため，多くの細菌で活性化されるという報告があるNLRP3に着目した[12, 13]．NLRP3特異的なsiRNAを発現するプラスミドを恒常的に発現するXS106nlrp3細胞株（図４A）を樹立し，Aaの生菌あるいは死菌で刺激した．その結果，生菌のIL-1β産生誘導活性は抑制されたが，死菌の活性は抑制されなかった（図４B，C）．

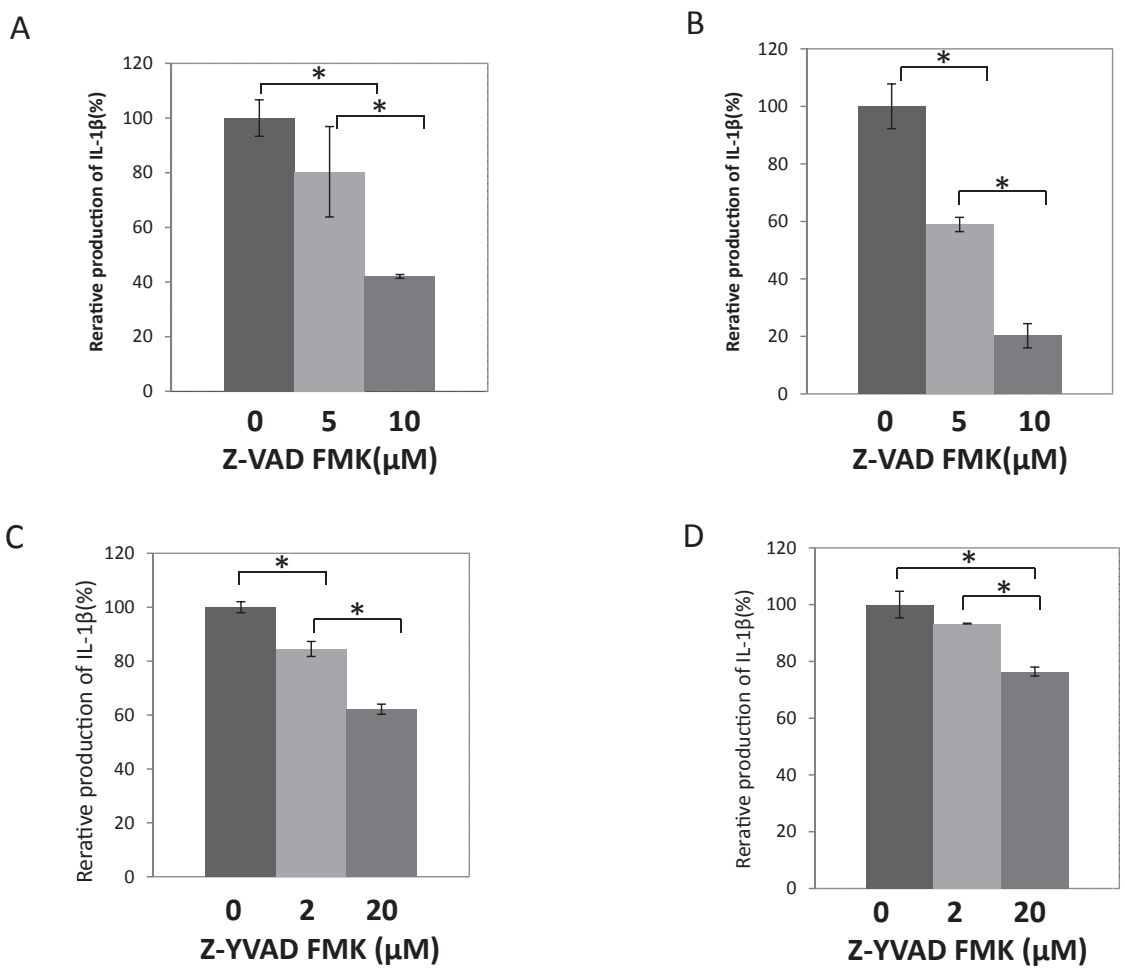
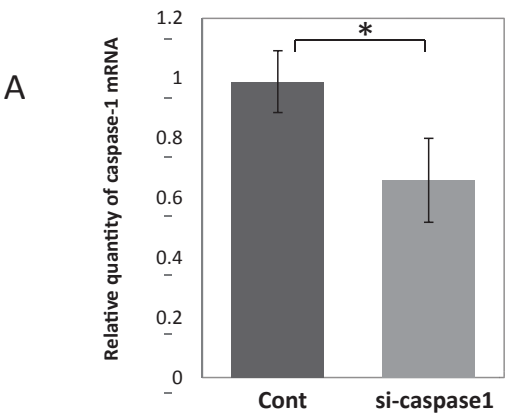
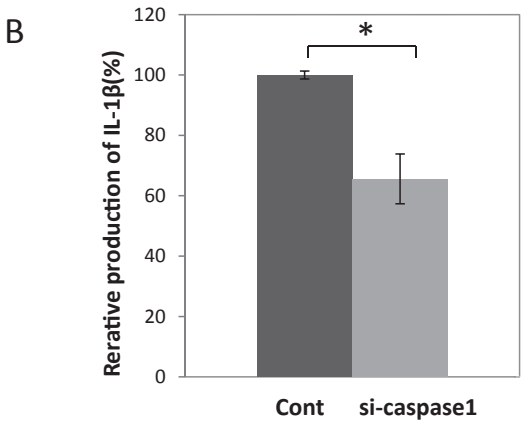


図２． AaのIL-1β産生誘導活性に及ぼすcaspase阻害剤の影響

XS106細胞（6×10^5 個/well）に予めPan-caspase阻害剤Z-VAD-FMK（５，10 μM）およびcaspase-1阻害剤Z-YVAD-FMK（２，20 μM）を１時間作用させた後，3.6×10^8 cfuのAaの生菌（図２A，２C）あるいは死菌（図２B，２D）を加え，37 ℃，５% CO_2 下で反応させた．反応24時間後の上清中のIL-1β量をELISA法で測定した．なお，生菌刺激の際は100 units/ml penicillin Gおよび100 μg/ml streptomycinを添加した．データはtriplicateで行なった実験結果の平均値をコントロールに対する割合（%）として示す．

t-検定　*：$P<0.05$





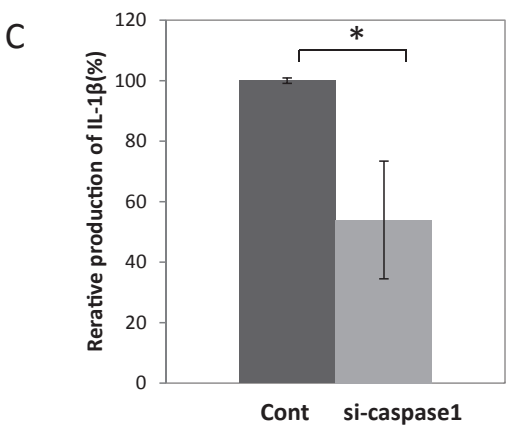
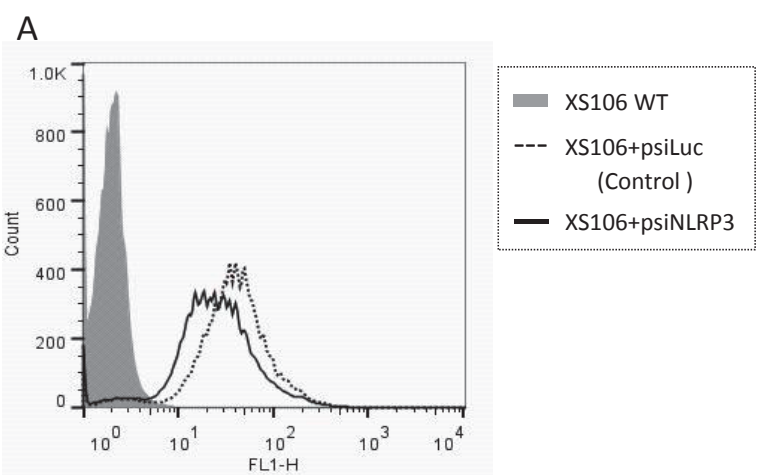
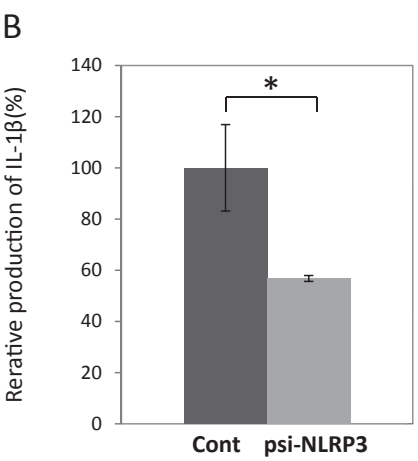


図３．AaのIL-1β産生誘導活性に及ぼすcaspase-1のRNA干渉の影響

Caspase-1特異的（si-caspase1）ならびに非特異的siRNA（control）をXS106細胞に導入し，caspase-1 mRNAの発現をRT-PCRで確認した（図３Ａ）．siRNAを導入したXS106細胞（6×10^5 個/well）に，3.6×10^8 cfuのAaの生菌（図３Ｂ）あるいは死菌（図３Ｃ）を加え，37 ℃，５％ CO_2 下で反応させた．反応24時間後の上清中のIL-1β量をELISA法で測定した．なお，生菌刺激の際は100 units/ml penicillin Gおよび100 μg/ml streptomycinを添加した．非特異的siRNAを導入したXS106細胞をコントロールとした．データはtriplicateで行なった実験結果の平均値をコントロールに対する割合（％）として示す．

t-検定　*：$P < 0.05$





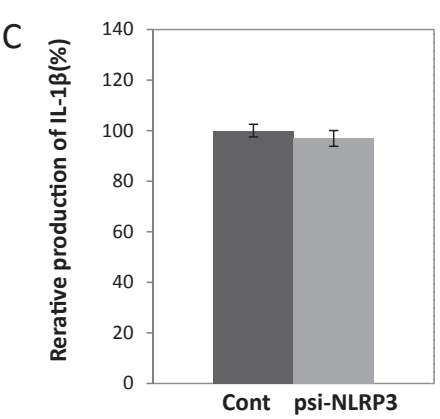


図４．AaのIL-1β産生誘導活性に及ぼすNLRP3のRNA干渉の影響

XS106nlrp3細胞の遺伝子発現状況を図４Ａに示す．XS106nlrp3細胞（6×10^5 個/well）に，3.6×10^8 cfuのAaの生菌（図４Ｂ）あるいは死菌（図４Ｃ）を加え，37 ℃，５％ CO_2 下で反応させた．反応24時間後の上清中のIL-1β量をELISA法で測定した．なお，生菌刺激の際は100 units/ml penicillin Gおよび100 μg/ml streptomycinを添加した．データはtriplicateで行なった実験結果の平均値をコントロールに対する割合（％）として示す．

t-検定　*：$P < 0.05$

ROSはNLRP3インフラマソームを活性化し，IL-1βの産生を誘導することが明らかにされている[14]．そこで，ROS阻害剤であるNACによるAa生菌のIL-1β産生誘導活性に及ぼす影響ならびにROSの産生を検証した．その結果，NACは濃度依存的にAa生菌のIL-1β産生誘導活性を阻害し（図５Ａ），また，Aa生菌刺激によりROSが産生されている（図５Ｂ，５Ｃ）ことから，Aa生菌によるインフラマソームの活性化に関与しているNLRはNLRP3であると考えられる．

４．ピロトーシス

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，IL-18，IL-33などの炎症性サイトカイン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った11)．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明らかになってきたことから，Aa生菌および死菌による刺激でXS106細胞に細胞死が誘導されているかを検証した．Aaで刺激後の細胞をAnnexin5とPIで染色し，その細胞死の形態をフローサイトメーターで分析した結果，ネクローシス様の細胞死が誘導されていることがわかった（図６）．なお，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，Aaが誘導する細胞死はIL-1βの放出を伴ったネクローシス様細胞死であるピロトーシスの可能性が示唆された．

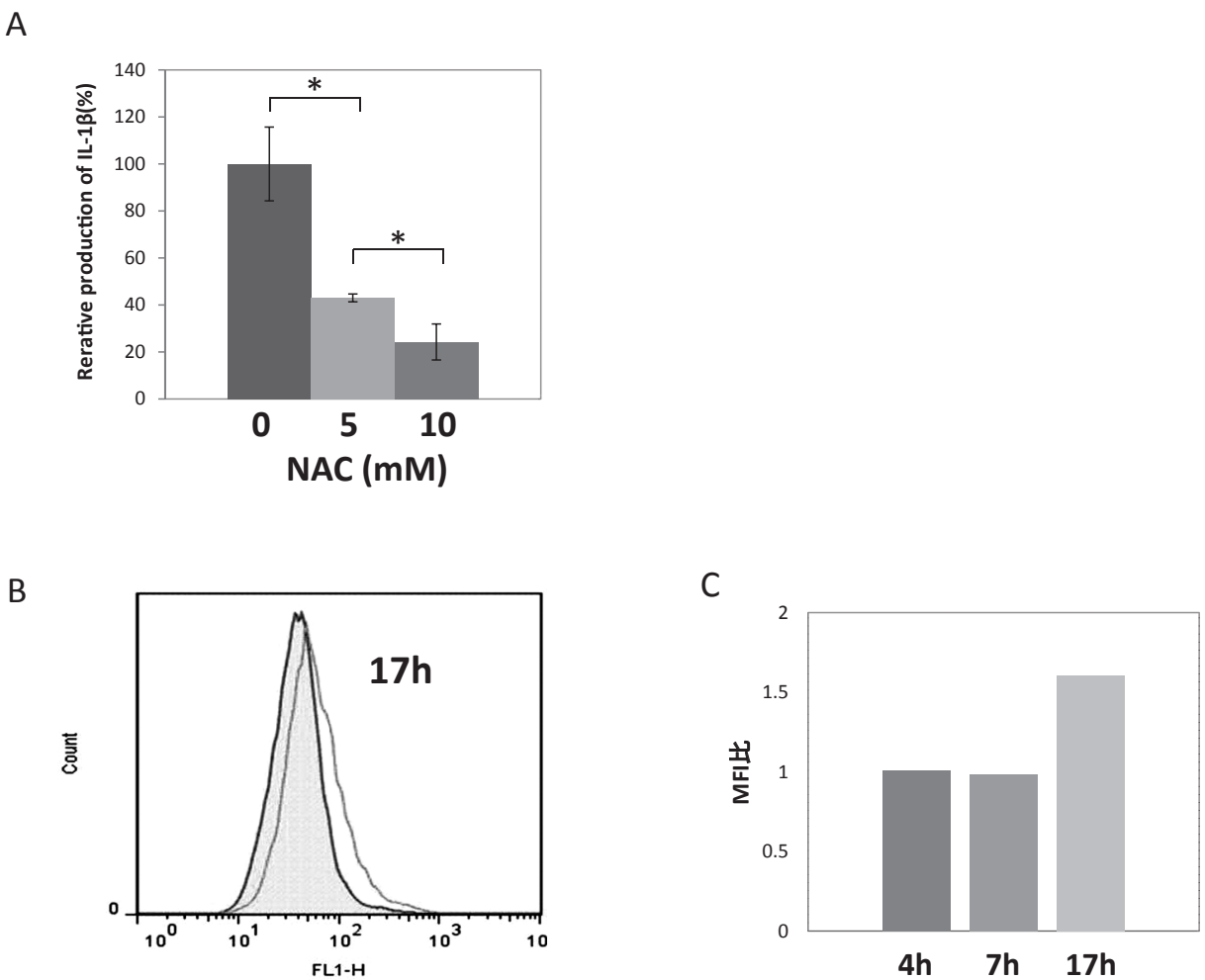


図５． AaのIL-1β産生誘導活性に及ぼすROSの影響

XS106細胞（6×10^5 個/well）に予めNAC（5，10 mM）を１時間作用させた後，3.6×10^8 cfuのAa生菌を加え，100 units/ml penicillin Gおよび100 μg/ml streptomycinの存在下で，37 ℃，５％ CO_2 下で反応させた（図５Ａ）．反応24時間後の上清中のIL-1β量をELISA法で測定した．データはtriplicateで行なった実験結果の平均値をコントロールに対する割合（％）として示した．ROSの産生はDihydrorhodamine123を用い，フローサイトメーターで分析した（図５Ｂ）．ROSの産生の経時変化はコントロールのMFI（平均蛍光強度）を１として相対比で表している（図５Ｃ）．

t-検定　*：$P<0.05$

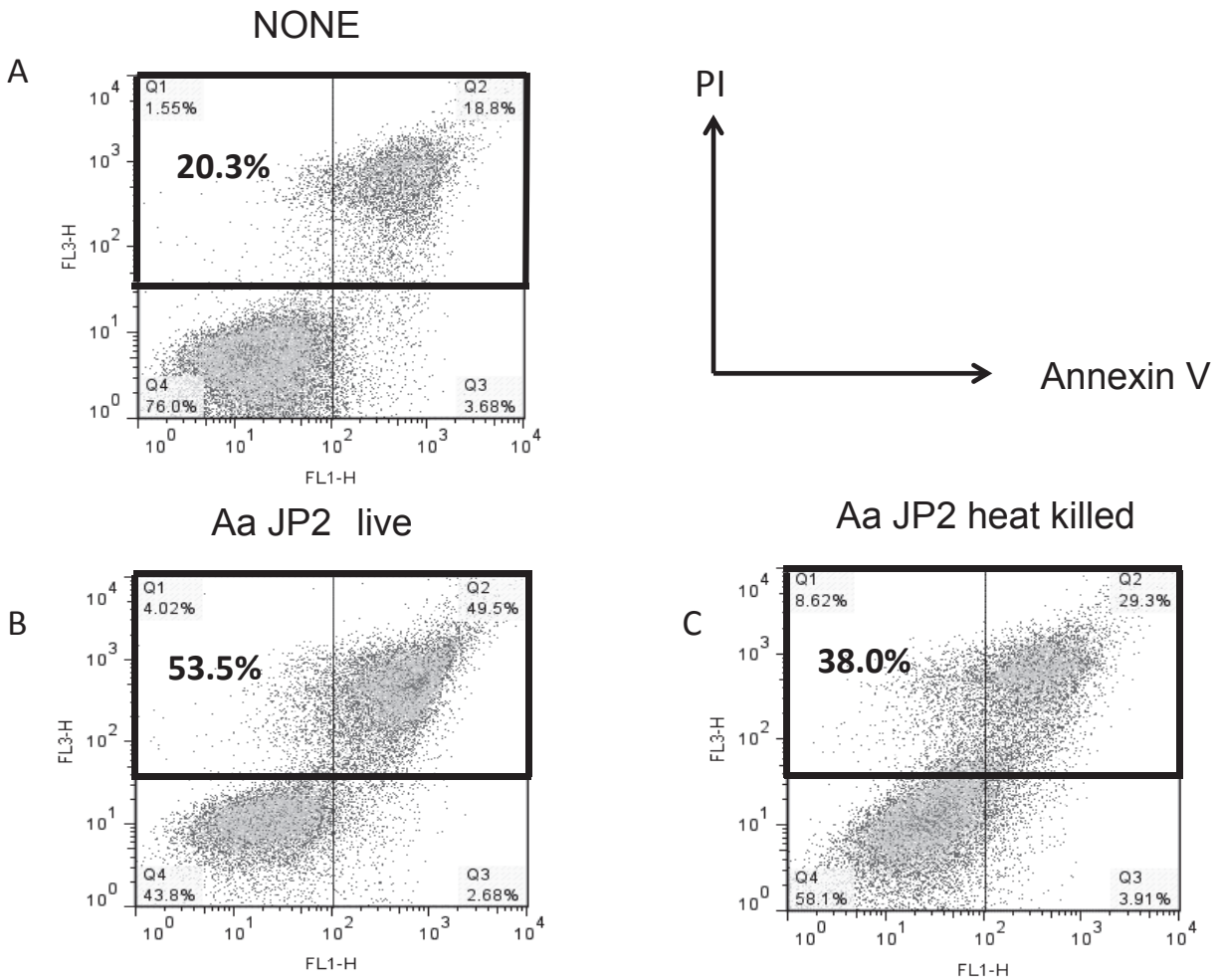


図6．Aaのピロトーシス誘導活性

XS106細胞（6×10^5 個/well）に3.6×10^8 cfuのAa菌体を加え，100 units/ml penicillin Gおよび100 μg/ml streptomycinの存在下で，37℃，５％ CO_2 下で反応させた．反応24時間後の細胞を回収し，PBSで洗浄後，Annexin VならびにPIで染色し，フローサイトメーターにて細胞死を確認した．データはFlowJoで解析した（図６A，６B，６C）．

以上の結果から，Aaは樹状細胞の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していることがわかった．

考　　察

歯周炎は口腔細菌が原因となり発症する細菌感染症であり，歯周病原細菌の持続的感染により直接的あるいは間接的に歯周組織が障害され発症・進行する．歯周病原細菌の産生する酵素，毒素および代謝産物が歯周組織に直接作用して障害を与え，一方では歯周病原細菌に対する宿主の感染防御機構としての免疫応答が結果として歯周組織を障害している．急速な歯周組織破壊をもたらす侵襲性歯周炎は，慢性歯周炎に比べると罹患率ははるかに低いが35歳以下の比較的早期に発症し，重症化しやすいという特徴があるため，その病状は深刻である[3]．通性嫌気性グラム陰性桿菌であるAaがその主な病原菌として知られており[1–3]，病原因子としては細胞膨化毒素とロイコトキシンの２種類の毒素が注目されている．さらに，Aa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[4]．

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．このIL-1βの歯周炎への関与は，以前より多くの報告[5]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った．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[6]．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[7, 8]．IL-1βはTLRs等のPRRsのシグナルにより前駆体として細胞内に蓄積される．前駆体IL-1βはそのままでは生理活性をもたず細胞外へ放出されることもないが，イン

フラマソームの活性化というもう一つのシグナルにより誘導されたcaspase-1により前駆体は切断され，活性型となる[8]．多くの場合，生物活性を有する活性型IL-1βはピロトーシスというネクローシス様の細胞死により細胞外へ放出されることが明らかになってきた[11]．

上述したように，歯周炎はその病態形成にIL-1βが重要な役割を果たし，また，AaがIL-1β産生誘導活性を有するという報告はある[15]．しかしながら，Aaによるインフラマソームの活性化機構を明らかにした報告はない．そこで，本研究ではAaの歯周疾患における病因論の一部を明らかにするために，上皮細胞層直下に存在し，微生物の侵入を監視する，そして，重要な抗原提示細胞である樹状細胞を用い，Aaによるインフラマソームの活性化機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした．

Aaの生菌，熱処理菌体および培養上清を樹状細胞であるXS106細胞に作用させると，菌体量依存的にIL-1βの産生を誘導したが，培養上清はIL-1βの産生を誘導しなかった（図１）．また，生菌および死菌のIL-1β産生誘導活性にはcaspase-1が関与していた（図２，３）．さらに，生菌のIL-1β産生誘導活性ではNLRP3インフラマソームが関与していたが，死菌ではNLRP3インフラマソームは関与していなかった（図４）．生菌，死菌ともにXS106細胞に対しピロトーシスという細胞死を誘導し，IL-1βが細胞外へ放出された（図６）．

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．

歯周炎において，IL-1βは炎症性メディエーターの誘導，破骨細胞の活性化による歯槽骨吸収ならびにマトッリクスメタロプロテアーゼの誘導による結合組織破壊といった病態形成に大きく関わっていることが報告されている[5]．近年，IL-1βが血小板凝集活性を有し，凝集した血小板に口腔レンサ細菌*Streptococcus sanguinis*が入り込み，その塊が血管の内皮に付着することが感染性心内膜炎の病態形成に重要であることが報告されている[16]．Aaも感染性心内膜炎の病巣から検出されていることから，*Streptococcus sanguinis*と同様にIL-1βによって凝集された血小板に入り込み菌塊を形成している可能性もある．さらに，歯周炎においては，歯周組織で産生されたIL-1βが血小板を凝集させ，それにAaが入り込むことで形成された菌塊が歯周組織の血管内皮に付着して炎症を惹起するという歯周炎における病態形成の新たな一面を示しているのではないかと推測される．

このように，本研究においてAaは樹状細胞内でNLRP3インフラマソームを活性化し，ピロトーシスという細胞死により細胞外へIL-1βを放出させる活性を有していることが明らかにされた．また，本研究成果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．

結　　論

Aggregatibacter actinomycetemcomitans JP2株は，樹状細胞系XS106細胞において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．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2株を分与して頂きました北海道医療大学歯学部歯周歯内治療学講座 古市 保志教授，長澤 敏行先生，加藤 幸紀先生，本研究に多大なるご支援とご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔分子微生物学教室ならびに口腔機能学講座小児・障害者歯科学教室の諸先生方に心より感謝いたします．

参 考 文 献

1）Slots J, Ting M: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. Periodontology 2000 20 : 82-121, 1999.
2）Armitage GC: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 4 : 1-6, 1999.
3）Tonetti MS, Mombelli A: Early-onset periodontitis. Ann Periodontol 4 : 39-53, 1999.
4）van Winkelhoff AJ, Slots J: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. Periodontology 2000 20 : 122-135, 1999.
5）Graves DT, Cochran D: The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol 74 : 391-401, 2003.
6）Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R: Inflammasomes in health and disease. Nature 481 : 278-286, 2012.
7）Davis BK, Wen H, Ting JP: The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases.

Annu Rev Immunol 29 : 707–735, 2011.
8）Schroder K, Tschopp J: The inflammasomes. Cell 140 : 821–832, 2010.
9）Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT: NLRs at the intersection of cell death and immunity. Nat Rev Immunol 8 : 372–379, 2008.
10）Lamkanfi M, Walle LV, Kanneganti TD: Deregulated inflammasome signaling in disease. Immunol Rev 243 : 163–173, 2011.
11）Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT: Pyroptosis: host cell death and inflammation. Nat Rev Microbiol 7 : 99–109, 2009.
12）Vladimer GI, Marty–Roix R, Ghosh S, Weng D, Lien E: Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. Curr Opin Microbiol 16 : 23–31, 2013.
13）Franchi L, Munoz–Planillo R, Nunez G: Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. Nat Immunol 13 : 325–332, 2012.
14）Martinon F: Signaling by ROS drives inflammasome activation. Eur J Immunol 40 : 616–619, 2010.
15）Kelk P, Claesson R, Chen C, Sjostedt A, Johansson A: IL–1beta secretion induced by *Aggregatibacter*（*Actinobacillus*）*actinomycetemcomitans* is mainly caused by the leukotoxin. Int J Med Microbiol 298 : 529–541, 2008.
16）Veltrop MH, Beekhuizen H, Thompson J: Bacterial species– and strain–dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells. Infect Immun 67 : 6130–6138, 1999.

ORIGINAL

Activation of inflammasome by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Tsugumi Abe[1,2], Ayumi Saeki[1], Akira Hasebe[1],
Hiroshi Hara[1], Yasutaka Yawaka[2] and Ken-ichiro Shibata[1]

ABSTRACT : Inflammasome is an intracellular sensor that regulates the production of IL-1β, which is one of the inflammatory cytokines with diverse biological activities. Recently, inflammasome is intensively investigated as a clue to clarify pathogenesis of many inflammatory diseases that are known to be associated with IL-1β. In periodontitis, IL-1β is known to play an important role in the pathogenesis. However, few reports on the association between periodontitis and inflammasome have been obtained, although some periodontopathogenic bacteria induced production of IL-1β exist. In this study we investigated whether Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a major pathogen of aggressive periodontitis, as well as systemic diseases such as infectious endocarditis, induce the activation of inflammasome in a murine dendritic cell line like XS106 cells. Futher investigation was carried out,to clarify its pathogenic roles in periodontitis. Stimulation of XS106 cells with live and heat killed cells of A. actinomycetemcomitans induced production of IL-1β, whereas the cultute supernatant did not. The IL-1β production-inducing activity of live and heat killed cells was significantly inhibited by Z-YVAD-FMK and Z-VAD-FMK, which are inhibitors for caspase 1 and all caspases, respectively. In addition, the activity was significantly attenuated by the decrease of mRNAs of caspase-1 and NLRP3. Furthermore, both heat-killed and live cells induced necrosis-like cell death in XS106 cells, which is considered to be pyroptosis because of its accompanying the production of IL-1β. Thus, these results suggest that A. actinomycetemcomitans activates NLRP3 inflammasome in murine dendritic cells producing IL-1β, which is released extracellularly by pyroptosis.

Key words : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, IL-1β, caspase-1, NLRP3 inflammasome

Division of Oral Molecular Microbiology (Chief : Prof. Ken-ichiro Shibata)[1], Department of Oral Pathobiological Science, and Department of Dentistry for Children and Disabled Person, Division of Oral Functional Science (Chief : Prof. Yasutaka Yawaka)[2], Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan.