



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Activation of NLRP3 inflammasome in dendritic cells and macrophages by Mycoplasma salivarium [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	杉山, 正博
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11729号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59249
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masahiro_Sugiyama_review.pdf, 審査の要旨



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 杉山 正博

主査 教授 北川 善政
審査担当者 副査 教授 柴田 健一郎
副査 教授 田村 正人

学 位 論 文 題 名

Activation of NLRP3 inflammasome in dendritic cells and macrophages
by *Mycoplasma salivarium*
(*Mycoplasma salivarium*による樹状細胞ならびにマクロファージにおける
NLRP3 インフラマソーム活性化)

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

IL-1 β はインフラマソームと呼ばれる細胞内センサーで制御されている炎症性サイトカインであり、また、歯周炎の病態形成において重要な役割を果たしている。*Mycoplasma salivarium*は口腔から分離される代表的なマイコプラズマであり、歯周炎や顎関節症との関連性が疑われている。そこで、本研究では *M. salivarium* の歯周炎における病因的役割を明らかにするために、樹状細胞ならびにマクロファージに IL-1 β の産生を誘導するかどうかを検証した。

M. salivarium ATCC 23064 (MS) ならびに *M. pneumoniae* ATCC 15492 (MP) は Hayflick の培地で培養した。標的細胞として A/J マウス由来樹状細胞株である XS-106 細胞、また、C57BL/6 マウスならびに C57BL/6 マウスから caspase-1、ASC あるいは NLRP3 を欠損させたマウス (caspase-1^{-/-}、ASC^{-/-}、NLRP3^{-/-}マウス) より採取した骨髓細胞から分化誘導したマクロファージ (BMM) を用いた。IL-1 β の産生は ELISA 法ならびに Western blot 法で評価した。MS ならびに MP の生菌および死菌 (100°C で 5 分処理) で XS-106 細胞を刺激したところ、両菌種の生菌、死菌共に IL-1 β 産生を誘導し、さらに XS106 細胞に対してピロプトーシスと呼ばれるネクローシス様の細胞死を誘導した。また、これらの活性は pan-caspase 阻害剤 z-VAD-fmk ならびに caspase-1 阻害剤 z-YVAD-fmk で有意に抑制され、caspase-1 に特異的な siRNA の導入により有意に抑制されたことから、MS ならびに MP の IL-1 β 産生誘導活性には caspase-1 の関与が示唆された。caspase-1 の活性化に関わる代表的なインフラマソームである NLRP3 に特異的な siRNA の導入により抑制傾向を認められたが、明らかな有意はみられなかった。そこで、両マイコプラズマの IL-1 β 産生誘導活性に及ぼす NLRP3 インフラマソーム

の活性化因子である ROS(reactive oxygen species)の関与を検証した。これらの IL-1 β 産生誘導活性は ROS 阻害剤である N-アセチルシステインにより有意に阻害された。また、XS-106 細胞を両マイコプラズマで刺激することにより、実際に ROS の産生が確認された。これらの結果は、両マイコプラズマが NLRP3 インフラマソームを活性化して IL-1 β の産生を誘導していることを示唆している。更に、NLRP3 インフラマソームの関与を検証するために、caspase-1 $^{-/-}$ 、ASC $^{-/-}$ ならびに NLRP3 $^{-/-}$ マウス由来の BMM を標的細胞として用いた。MS は caspase-1 $^{-/-}$ ならびに ASC $^{-/-}$ 由来 BMM に対してほぼ完全に IL-1 β の産生を誘導しなかった。しかしながら、NLRP3 $^{-/-}$ 由来 BMM に対する活性は有意に抑制されていたが、その程度は約 60%で完全な抑制ではなかった。このことは、MS は NLRP3 インフラマソームを含むいくつかのインフラマソームの活性化を通して IL-1 β の産生を誘導する活性を有していることを示唆している。

以上の結果から、MS は歯周組織に浸潤している樹状細胞やマクロファージに IL-1 β の産生を誘導することにより、歯周炎の発症ならびに増悪において重要な病因的な役割を果たしていることが推測される。

続いて、審査担当者から本研究およびその関連事項について質問がなされた。質問の内容は、以下の通りであった。

- 1) インフラマソームの構成因子およびIL-1 β 産生における役割について
- 2) 細胞培養上清中のmature IL-1 β の測定について
- 3) マイコプラズマ生菌、熱処理菌体におけるIL-1 β 産生誘導活性の比較について
- 4) MSの歯周炎ならびに顎関節症における病因的役割について
- 5) ピロプトーシスの生体防御における役割について
- 6) ROSの測定と評価方法について
- 7) ノックアウトマウスの維持管理について
- 8) インフラマソームに関連する阻害剤の臨床的応用の可能性について
- 9) 本研究の今後の展望について

以上の質問に対して申請者から適切かつ明確な回答が得られた。審査担当者との質疑応答を通じて、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有し、本研究のさらなる発展が期待された。

以上のことから、審査委員会は全員、本研究が学位論文に十分値し、申請者が歯学博士の学位を授与される資格を有するものと認めた。