ミニレビュー

歯周組織におけるインフラマソームの役割

吉村 篤利, Jorge Luis Montenegro Raudales, Ziauddin SM,
樋口賀奈子, 原 宜興

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病学分野

キーワード：歯周炎，インフラマソーム，歯石，結晶

1. はじめに

炎症性サイトカインの1つであるインターロイキン (IL)-1 β は IL-1 ファミリーの1つで，多様な生理活性を持ち，細胞の分化・増殖など様々な生物学的作用を引き起こす¹⁾。主に，マクロファージなどによって産生され，歯周炎患者の歯周組織および歯肉溝滲出液中にも検出される^{2,3)}。歯周炎患者の歯肉溝滲出液中の IL-1 β 濃度は，健常者の歯肉溝滲出液中の濃度よりも高く，歯周組織における炎症の程度と相関する⁴⁾。IL-1 β は骨吸収にも促進的に作用することから，歯周炎の進行にも深く関与すると考えられている⁵⁾。

ところで IL-1 β は，歯周組織に恒常的には発現しておらず，その発現は転写レベルおよび蛋白レベルの2段階で制御されている (図1)⁶⁾。IL-1 β の転写は，炎症性転写因子 NF- κ B の核内移行を誘導する刺激等により開始される。細菌性の刺激であれば，Toll 様受容体 (TLR) や NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) 様受容体 (NLR) を介して刺激が伝達される。これらの刺激が核内に伝達されると，IL-1 β の転写が開始され，IL-1 β 前駆体が合成される。IL-1 β 前駆体は，それ自体は非活性型であり，また細胞外へ分泌されない。IL-1 β 前駆体は，カスパーゼ 1，別名 IL-1 β 変換酵素 (ICE) により切断されて初めて成熟型 IL-1 β となり，細胞外へ分泌される。このカスパーゼ 1 の活性化に必須なのが，インフラマソームと呼ばれる蛋白複合体の細胞質内での形成である⁷⁾。

インフラマソームが活性化されるとカスパーゼ 1 前

駆体が切断されて活性型カスパーゼ 1 となり，IL-1 β 前駆体以外にも 24 kDa の IL-18 前駆体が切断される⁸⁾。切断され 18 kDa となった成熟型 IL-18 は，T 細胞の分化に重要な役割を果たし，Th1 細胞のインターフェロン γ 産生を誘導する⁹⁾。また，活性型カスパーゼ 1 はガスダミン D と呼ばれる 53 kDa の蛋白も切断する。切断されたガスダミン D の N 末端側の断片は，細胞膜の内側で重合し，直径 10~33 nm の細胞膜を貫通する小孔を形成する¹⁰⁾。この小孔により細胞は溶解・膨張するが，このような細胞死をピロトーシスと呼ぶ。

インフラマソームの活性化により誘導される IL-1 β ，IL-18 前駆体のプロセシングおよびピロトーシスは，いずれも免疫系の活性化や感染防御に深く関与しており，歯周組織の恒常性の維持に重要な役割を果たすとともに，過剰な活性化は歯周組織の破壊にも関与していると考えられる。

2. インフラマソームの構成成分とその活性化機構

インフラマソームは細胞質受容体として NLR または absent in melanoma 2 (AIM2)，アダプターとして apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruit domain (ASC)，さらにカスパーゼ 1 前駆体により構成される (図2)⁸⁾。NLR は，N 末端にパイリンドメイン (PYD) またはカスパーゼリクルートドメイン (CARD) を持ち，中央に NOD ドメイン，C 末端にロイシン繰り返し配列 (LRR) を持つ。AIM2 は，N 末端に PYD を持つ。カスパーゼ 1 前駆体は，N 末端に CARD を持つ。ASC は，N 末端に PYD，C 末端に CARD を持ち，PYD を持つ蛋白と CARD を持つ蛋白を結合させるアダプターとして機能する。未刺激状態ではこれらの構成成分は細胞質内に独立して存在するが，後述の刺激が NLR または AIM2 によって感知されると，NLR または AIM2，ASC，カスパーゼ

連絡先：吉村篤利

〒852-8588 長崎市坂本 1-7-1

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病学分野

E-mail: ayoshi@nagasaki-u.ac.jp

doi: 10.2329/periodo.59.57

図1 インフラマソームの活性化を介した IL-1 β , IL-18 の産生とピロトーシスの誘導

図2 インフラマソームの構成成分

1 前駆体が会合して多量体化する。多量体化して形成されたインフラマソームによりカスパーゼ1前駆体が切断され、カスパーゼ1が活性型として機能する。

インフラマソームを活性化するNLRとして、NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRC4が知られている。NLRはTLRなどと同様に、病原体成分特有の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) や傷害細胞内に発生した特有の分子パターン (damage-associated molecular patterns, DAMPs) を認識する。NLRやAIM2は、それぞれ表1に示すPAMPs/DAMPsによって活性化される¹¹⁾。

NLRP1は、細菌細胞壁を構成するペプチドグリカンの構成要素ムラミルジペプチドや炭疽菌のリーサルトキシンなどによって活性化される。NLRP3は、これまでもっともよく研究されているインフラマソームを構成するNLRで、傷害を受けた細胞から放出されるアデノシン三リン酸 (ATP)、痛風の原因となる尿酸結晶、偽痛風の原因となるピロリン酸カルシウム結晶、動脈硬化の原因となるコレステリン結晶、アルツハイマー病の原因となる β アミロイドなどによって活性化される。珪肺の原因となるシリカや、抗体作成のための免疫時にアジュバントとして用いられる水酸化アルミニウムによっても活性化される。これらの結晶の組織への沈着は、それぞれが関連する疾患における局所での炎症の原因となる (表2)。また、クライオパイリン関連周期熱症候群と呼ばれる自己炎症性疾患では、NLRP3遺伝子の変異によりIL-1 β の産生が亢進していることも知られている。他方、NLRC4 (別名 Ipaf) は、細菌の鞭毛を構成するフラジェリンによって活性化される。AIM2は、ウイルスなどの二重鎖DNAによって活性化される。

インフラマソームの活性化は、当初これらのNLRまたはAIM2がPAMPs/DAMPsを直接または間接的に感知することにより誘導されたと考えられていたが、細胞内に取り込まれたりリポ多糖 (LPS) は、マウスのカスパーゼ11、ヒトのカスパーゼ4, 5を直接活性化し、IL-1 β , IL-18前駆体のプロセッシングやピロトーシスを誘導することが明らかとなった。そこで、通常のNLRまたはAIM2を介したインフラマソーム活性化をカノニカル経路と呼ぶのに対し、マウスのカスパーゼ11やヒトのカスパーゼ4, 5を介したインフラマソームの活性化をノンカノニカル経路と呼ぶ⁸⁾。また、

表1 インフラマソームの活性化因子 (文献 11 より改変)

インフラマソーム	活性化因子
NLRP1	ムラムルジペプチド (MDP) 炭疽菌リーサルトキシン など
NLRP3	アデノシン三リン酸 (ATP) 尿酸結晶 ピロリン酸カルシウム結晶 コレステリン結晶 β アミロイド シリカ 水酸化アルミニウム など
NLRP4	フラジェリン など
AIM2	二重鎖 DNA など

表2 インフラマソーム関連疾患とその原因因子 (文献 11 より改変)

疾患名	原因因子
痛風	尿酸結晶
偽痛風	ピロリン酸カルシウム結晶
粥状動脈硬化	コレステリン結晶
アルツハイマー病	β アミロイド
珪肺	シリカ

ヒト単球においては LPS の刺激によりピロトーシスを誘導することなくインフラマソームが活性化され、IL-1 β が産生されることが明らかにされた。カノニカルおよびノンカノニカルなインフラマソームの活性化を古典的インフラマソーム活性化と呼ぶのに対して、このような活性化を代替的インフラマソーム活性化と呼ぶ¹²⁾。代替的インフラマソーム活性化は、マウスの細胞では確認されていない。

3. 歯周組織におけるインフラマソームの発現とその活性化

Bostanci らは、歯周組織におけるインフラマソームの発現と制御について解析を行った¹³⁾。歯肉炎患者 10 名、慢性歯周炎患者 18 名、広範型侵襲性歯周炎患者 20 名、健常者 20 名の歯周組織における NLRP3, NLRP2, ASC, IL-1 β , IL-18 の発現について定量的 RT-PCR 法を用いて解析したところ、歯周病患者の歯周組織における NLRP3 と NLRP2 の発現量は、健常者の歯周組織における発現量よりも多かった。また、歯周組織における NLRP3 の発現量と IL-1 β , IL-18 の発現量は相関しており、NLRP3 インフラマソームの発現が歯周炎の進行と関連していることが示唆された。Park らも、

健常者と歯周炎患者の歯周組織における ASC, NLRP3, AIM2, カスパーゼ 1 の発現をウェスタンブロット法で比較し、歯周炎患者により多くの NLRP3, AIM2, カスパーゼ 1 の発現がみられることを報告した¹⁴⁾。

Porphyromonas gingivalis や *Treponema denticola* などの歯周病原細菌は、NLRP3 インフラマソームや AIM2 インフラマソームを活性化することが示されている^{14, 15)}。Park らは、ホルボール 12-ミリストート 13-アセタート (PMA) で分化させた THP-1 細胞に *P. gingivalis* を感染させると、培養上清中に IL-1 β および乳酸脱水素酵素 (LDH) が検出され、IL-1 β の産生とピロトーシス様の細胞死が誘導されることを報告した¹⁴⁾。さらに、PMA で分化させた THP-1 細胞の NLRP3 または AIM2 を siRNA でノックダウンすると、*P. gingivalis* を感染させても IL-1 β の産生およびピロトーシス様の細胞死は誘導されず、これらの反応は、NLRP3 インフラマソームおよび AIM2 インフラマソームを介していることが明らかとなった¹⁴⁾。また、Jun らは、PMA により分化させた THP-1 細胞を *T. denticola* の菌体表面蛋白 Td52 で刺激した。刺激後の培養上清中に IL-1 β および LDH が検出され、Td52 が IL-1 β の産生とピロトーシス様の細胞死を誘導するこ

とが明らかとなった¹⁵⁾。この反応は NLRP3 インフラマソーム阻害剤および抗 $\alpha 5\beta 1$ インテグリン抗体により抑制され、また、Td52 は $\alpha 5\beta 1$ インテグリンと直接結合したことから、Td52 が THP-1 の細胞表面に発現する $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介して NLRP3 インフラマソームを活性化することが示された¹⁵⁾。これらの結果は、*P. gingivalis* および *T. denticola* を含む多くのプラーク中の細菌がインフラマソームを活性化し、歯周組織における IL-1 β 、IL-18 の産生やピロトーシスの誘導に関与していることを示唆している。

また、Huang らは、健常者から採取した歯肉上皮と慢性歯周炎患者および糖尿病患者から採取した歯肉上皮における NLRP3 および IL-1 β の発現量を免疫組織学的に比較した¹⁶⁾。慢性歯周炎患者および糖尿病患者の歯肉上皮は、いずれも健常者の歯肉上皮より多くの NLRP3 および IL-1 β を発現していた。さらに、*in vitro* で歯肉上皮細胞を高濃度のグルコースおよび LPS で同時刺激すると、LPS 単独で刺激した場合よりも NLRP3 の mRNA 発現量が増加していた。また、高濃度のグルコースおよび LPS で同時刺激した場合の方が、いずれの単独刺激よりも NLRP3 蛋白発現量が増加していることが、免疫染色により確認された¹⁶⁾。これらの結果から、高血糖状態によるインフラマソーム活性化の亢進が糖尿病患者で歯周病が進行しやすいことと関連しているのではないかと述べている。

4. 歯石によるインフラマソームの活性化

我々は、歯石に含まれる菌体成分は TLR を介して IL-1 β 前駆体を誘導し、歯石中のリン酸カルシウム結晶は、尿酸結晶やコレステリン結晶などと同様に、貪食細胞の NLRP3 インフラマソームを活性化することができるのではないかと仮説を立て、歯周病患者から採取した歯石の IL-1 β 産生誘導能について解析した¹⁷⁾。歯石は、10% 次亜塩素酸ナトリウムと蒸留水で洗浄した後、細かく粉碎して 48 μm のメッシュを通過した粒子をオートクレーブで滅菌して使用した。この歯石を用いてヒト末梢血から採取した好中球および単球を刺激し、培養上清中の IL-1 β 濃度を ELISA 法で測定した。その結果、歯石は、濃度依存的にヒト好中球および単球における IL-1 β の産生を誘導することが明らかとなった。野生型マウスから樹立した不死化マクロファージを歯石で刺激した場合にも培養上清中に IL-1 β が検出されたが、ASC 欠損マウスおよび NLRP3 欠損マウスから樹立した不死化マクロファージの培養上清中には IL-1 β が検出されず、この反応は NLRP3 インフラマソームを介していることが明らかとなった。歯石を 250 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間熱処理して有機質を変性させた後、野生型マウスマクロファージをこの歯石で刺激すると、IL-1 β 前駆体の mRNA の発現上昇はみられ

なくなった。この結果から、歯石中に含まれる菌体成分が IL-1 β 前駆体の合成に必須であることが示された。また、歯石を構成する結晶には、ハイドロキシアパタイト(HA)、ブルシャイト、リン酸三カルシウム、リン酸オクタカルシウムなどが含まれるが、合成 HA 粒子(直径 5 μm 以下)を用いて lipid A でプライミングした野生型マウスマクロファージを刺激すると、IL-1 β が産生された。一方、lipid A でプライミングしていない野生型マウスマクロファージからは、IL-1 β は産生されなかった。これらの結果から、歯石に含まれる HA 粒子はインフラマソームの活性化を介して IL-1 β をプロセシングすることが示された。また、ASC 欠損マウスおよび NLRP3 欠損マウス由来のマクロファージを lipid A でプライミングして HA 粒子で刺激しても IL-1 β は誘導されず、歯石中の結晶構造は、NLRP3 を介してインフラマソームを活性化し、IL-1 β の産生に寄与していることが確認された。

歯石は、通常プラークで覆われており、プラークの有害性に歯石が付加的に作用しているかどうかを判定することは難しい。しかしながら、疫学的には歯石付着と歯周病の進行には関連がみられることが示されており、歯石の取り残しが臨床成績に悪影響を及ぼすこともよく知られている¹⁸⁾。今回我々が明らかとした歯石による NLRP3 インフラマソームの活性化と IL-1 β の産生は、歯石が付加的に有害性を示し得ることを示しており、特にプラークコントロールの行き届いた口腔内やフラップ手術後の根面では、歯肉縁下歯石の取り残しが歯周組織の炎症の直接的原因となる可能性もあるものと思われる。

5. おわりに

歯周組織にはインフラマソーム構成成分が恒常的に発現しており、歯周病病変部ではその発現が増強するとともに各成分が会合して多量体化し、インフラマソームが活性化される。インフラマソームが活性化すると活性型カスパーゼ 1 により IL-1 β 、IL-18 前駆体がプロセシングされるとともにピロトーシスが誘導される。歯周病原細菌および歯石によるインフラマソームの活性化は、これらの作用を介して歯周組織の感染からの防御に重要な役割を果たすとともに、歯周組織の組織破壊にも関与していると考えられるが、その役割については不明な点も多い。これまでに、歯周組織における NLRP3 インフラマソームの活性化と IL-1 β の産生については数多くの研究成果が報告されているが、NLRP3 以外のインフラマソームの活性化やインフラマソーム活性化による IL-18 の産生やピロトーシスの誘導が歯周組織に及ぼす影響については、十分な知見が得られていない。今後、これらの点を含めて研究が進展していくことが期待される。また、動脈硬化や

糖尿病などの他の全身疾患と同様に、歯周炎についてもインフラマソームを標的とした分子標的薬の開発が進むことが期待される。

今回の論文に関連して、開示すべき利益相反状態はありません。

文 献

- 1) Dinarello CA: Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*, 16: 457-499, doi: 10.3109/08830189809043005, 1998.
- 2) Zhu H, Lin X, Zheng P, Chen H: Inflammatory cytokine levels in patients with periodontitis and/or coronary heart disease. *Int J Clin Exp Pathol*, 8: 2214-2220, 2015.
- 3) Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A: Levels of interleukin-1 β , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*, 71: 1535-1545, doi: 10.1902/jop.2000.71.10.1535, 2000.
- 4) Oh H, Hirano J, Takai H, Ogata Y: Effects of initial periodontal therapy on interleukin-1 β level in gingival crevicular fluid and clinical periodontal parameters. *J Oral Sci*, 57: 67-71, doi: 10.2334/josnusd.57.67, 2015.
- 5) Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MK, Russell RG: An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature*, 306: 378-380, 1983.
- 6) Pope RM, Tschopp J: The role of interleukin-1 and the inflammasome in gout: implications for therapy. *Arthritis Rheum*, 56: 3183-3188, doi: 10.1002/art.22938, 2007.
- 7) Latz E, Xiao TS, Stutz A: Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, 13: 397-411, doi: 10.1038/nri3452, 2013.
- 8) Guo H, Callaway JB, Ting JP: Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*, 21: 677-687, doi: 10.1038/nm.3893, 2015.
- 9) Wawrocki S, Druszczyńska M, Kowalewicz-Kulbat M, Rudnicka W: Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. *Acta Biochim Pol*, 63: 59-63, doi: 10.18388/abp.2015_1153, 2016.
- 10) Man SM, Karki R, Kanneganti TD: Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev*, 277: 61-75, 2017.
- 11) Horvath GL, Schrum JE, De Nardo CM, Latz E: Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes. *Immunol Rev*, 243: 119-135, doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01050.x, 2011.
- 12) Gaidt MM, Hornung V: Alternative inflammasome activation enables IL-1 β release from living cells. *Curr Opin Immunol*, 44: 7-13, doi: 10.1016/j.coi.2016.10.007, 2016.
- 13) Bostanci N, Emingil G, Saygan B, Turkoglu O, Atilla G, Curtis MA, Belibasakis GN: Expression and regulation of the NALP3 inflammasome complex in periodontal diseases. *Clin Exp Immunol*, 157: 415-422, doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03972.x, 2009.
- 14) Park E, Na HS, Song YR, Shin SY, Kim YM, Chung J: Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* infection. *Infect Immun*, 82: 112-123, doi: 10.1128/IAI.00862-13, 2014.
- 15) Jun HK, Lee SH, Lee HR, Choi BK: Integrin $\alpha 5 \beta 1$ activates the NLRP3 inflammasome by direct interaction with a bacterial surface protein. *Immunity*, 36: 755-768, doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.002, 2012.
- 16) Huang X, Yang X, Ni J, Xie B, Liu Y, Xuan D, Zhang J: Hyperglucose contributes to periodontitis: involvement of the NLRP3 pathway by engaging the innate immunity of oral gingival epithelium. *J Periodontol*, 86: 327-335, doi: 10.1902/jop.2014.140403, 2015.
- 17) Montenegro Raudales JL, Yoshimura A, SM Z, Kaneko T, Ozaki Y, Ukai T, Miyazaki T, Latz E, Hara Y: Dental calculus stimulates interleukin-1 β secretion by activating NLRP3 inflammasome in human and mouse phagocytes. *PLoS One*, 11: e0162865, doi: 10.1371/journal.pone.0162865, 2016.
- 18) Jepsen S, Deschner J, Braun A, Schwarz F, Eberhard J: Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontol 2000*, 55: 167-188, doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00382.x, 2011.

Role of inflammasome in periodontal tissue

Atsutoshi Yoshimura, Jorge Luis Montenegro Raudales, Ziauddin SM,
Kanao Higuchi and Yoshitaka Hara

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

Key words: periodontitis, inflammasome, dental calculus, crystal

Corresponding author: Atsutoshi Yoshimura

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8588, Japan

E-mail: ayoshi@nagasaki-u.ac.jp