

Actinobacillus actinomycetemcomitans感染マクロ
ファージのアポトーシス誘導における一酸化窒素の
関与(北海道大学博士論文の内容および審査の結果
要旨(平成13年度))

著者名(日)	富岡 純
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	1
ページ	156-158
発行年	2002-06-30
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00008696/

学位論文審査の要旨

歯科治療において、抜歯は遭遇する機会の多い術式である。その抜歯窩の治癒過程を理解する上で、重要な因子の一つが、破骨細胞と骨芽細胞が関与する骨性治癒である。しかし、抜歯窩における骨吸収・骨形成の作用機序の詳細は、不明な点が多い。そこで、本論文は、ラット抜歯窩における骨吸収および骨形成の経時的な変化を放射線学的・組織学的・酵素組織化学的・形態計測学的に検討した。研究法として、生後3週齢のウィスター系雄性ラットの上顎右側第一大臼歯を抜歯し、X線学的観察と組織学的観察を行った。その結果、抜歯後の抜歯窩の変化は、CMR所見より窩底部方向から骨吸収および骨形成が進行することが観察された。同様に、CaおよびPの沈着も窩底部から観察され、幼若な骨の新生にもなって石灰化が進行していた。組織学的所見では、はじめに窩底部より肉芽組織の形成が見られ、窩底部においてTRAP陽性の多核破骨細胞が多数出現し、吸収が進行した後、窩底部より骨形成が進行していた。これらの所見から、抜歯窩の創傷治癒は、抜歯窩への血液供給が最も大きい根尖相当部から開始されると思われる。また、早期における肉芽組織の形成、破骨細胞と骨芽細胞の出現がほぼ同時期に窩底部から生じることから、肉芽組織存在下における硬組織の変化に破骨細胞と骨芽細胞が出現する時期および増減量を併せて報告したものであり、歯科治療での抜歯後の創傷治癒過程を把握する上で、歯科医学の発展に寄与するものである。

以上より歯学博士の学位を授与するに値するものと判定する。

以上より歯学博士の学位を授与するに値するものと判定する。

氏名・(本籍)	富岡 純 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第97号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	Actinobacillus actinomycetemcomitans感染マクロファージのアポトーシス誘導における一酸化窒素の関与
論文審査委員	主査 教授 小 鷲 悠 典 副査 教授 矢 嶋 俊 彦 副査 教授 賀 来 亨

論文内容の要旨

[緒 言]

細菌学的、臨床的研究の結果から、歯周炎は一部の細菌 (歯周病原性細菌) による感染症である可能性が示唆されている。歯周病原性細菌の一つである *Actinobacillus actinomycetemcomitans* はグラム陰性通性嫌気性の短桿菌で、若年性歯周炎および急速進行性歯周炎の原因菌と考えられている。本菌は歯周炎患者の歯周組織に侵入し、局所で多数の病原因子 (莢膜多糖, リポ多糖, ロイコト

キシン等) を産生することで宿主の防御機構に傷害を与え歯周組織の破壊が起こると考えられている。一般に、生体内に侵入した細菌は透過性の亢進した毛細血管から組織内に移行した好中球やマクロファージにより貪食、殺菌される。近年、フリーラジカルの一つである一酸化窒素 (NO) がマクロファージの細胞内殺菌に関与するとして注目されている。マクロファージでは、炎症や細菌感染などの刺激により誘導型NO合成酵素 (iNOS) が細胞内に誘導される。誘導されたiNOSにより細胞内に産

生されたNOは細胞内殺菌に関与し、微量ではあるが細胞外にも放出されている。我々は、これまでマウスマクロファージに*A. actinomycetemcomitans*を感染させる*in vitro*の実験系を確立し、感染により引き起こされるアポトーシスの詳細について検討してきた。その結果、感染マクロファージのアポトーシス発現には本菌の細胞内への取り込みが必須であり、その取り込みには細胞表層のCD14が関与していることを明らかにした。

近年、アポトーシス発現機構のなかではアポトーシスシグナルが複雑に交錯し最終的に共通経路に集約されることが明らかになった。このようなアポトーシスシグナル伝達系の機能分子のなかで、システインプロテアーゼであるカスパーゼファミリーは特に注目を集めている。我々はこれまでに、*A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージのアポトーシス誘導にはカスパーゼ3が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

本研究では、感染マクロファージにおいて産生される可能性のあるNOがアポトーシスの発現に何らかの影響を及ぼしているかどうかを検討することを目的とした。

[材料および方法]

1. 細胞の感染操作

マウスマクロファージ細胞株であるJ774.1細胞を6穴プレートに1×10⁶個となるように播種し、18時間培養した。その後、抗生物質を含まない5% FCS-RPMI 1640培地に浮遊*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細菌と細胞の感染比率が500:1となるように添加し、1,000×gで10分間遠心操作を行った。5% CO₂存在下で1時間培養し、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン含有RPMI1640培地で3回洗浄した。その後、抗生物質を含む5% FCS-RPMI 1640培地に最終濃度400μMとなるようNOS阻害剤であるS-Methyl-ITU (SMT)を添加し培養した。一部の実験では、NOS阻害剤としてL-NMMAも同濃度で使用した。

2. iNOS mRNAの発現

感染後、0, 3, 6, 9, 12および21時間培養した細胞からRNAを調製し、マウスiNOSに対する特異的プライマーを使ったRT-PCR法によってcDNAを増幅し、アガロース電気泳動によりiNOS mRNAの発現を確認した。また同時に、LightCyclerを使ったreal-time RT-PCR法によりiNOS mRNA発現量を求めた。

3. NO量の定量とLDH量の測定

感染後、3時間および21時間に培養上清を回収した。

この培養上清について、Griess法によりNO量を定量した。また、同時に細胞死検出(LDH)キットを用いて細胞死に伴い細胞より遊離されるLDH(乳酸脱水素酵素)量を測定した。

4. 断片化DNA量の検出と細胞内のカスパーゼ活性の測定

感染後、3時間および21時間培養した細胞を回収した。回収した細胞を細胞溶解バッファーにて溶解し遠心操作後、上清を採取した。この上清について細胞死検出ELISAキットにより断片化DNA量を測定した。また同時に上清に反応バッファーと7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)を結合させた合成ペプチド(カスパーゼ1:Ac-YVAD-MCA, カスパーゼ3:Ac-DEVD-MCA, カスパーゼ5:Ac-WEHD-MCA, カスパーゼ6:Ac-VEID-MCA, カスパーゼ8:Ac-IETD-MCA, カスパーゼ9:Ac-LEHD-MCA)を添加し、37°Cで1時間反応させた後、蛍光光度計を用いて遊離したAMC量を測定した。

[結果および考察]

アガロース電気泳動分析の結果、感染後3時間からiNOS mRNAの発現が認められた。また、real-time RT-PCR法によっても同様の所見が認められた。培養上清中のNO量は、感染によりわずかではあるが増加し、SMTの添加により減少した。また、培養上清中に遊離されるLDH量は感染により増加し、SMTの添加によりさらに増加した。次いで、アポトーシスの一つの指標である断片化DNA量を測定した結果、感染により断片化DNA量増加し、SMTの添加によりさらに増加した。以上の結果により、感染後に産生されたNOはDNAの断片化を抑制して細胞死に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、感染後に産生されたNOがカスパーゼ活性におよぼす影響を検討した結果、感染によりいずれのカスパーゼ活性も上昇し、SMTの添加によりさらに活性は上昇した。このことから感染により産生されたNOが、カスパーゼ活性を抑制している可能性が示唆された。

本研究の結果から、マクロファージに*A. actinomycetemcomitans*を感染させると細胞内にiNOSが誘導されてNOが産生されることが明らかとなった。さらにカスパーゼ、特にカスパーゼ3の活性がNO阻害剤の添加により上昇することから、アポトーシスの誘導抑制はカスパーゼの活性を一部阻害することにより起こっている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

これまでわれわれは、*in vitro*の培養系で*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4株がマウスマクロファージ細胞株であるJ774.1細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにしてきた。近年、活性化マクロファージによって産生される一酸化窒素(NO)は、抗菌活性を示すとともに炎症反応のモジュレータ分子として認識されてきている。本研究では、*A. actinomycetemcomitans*感染によりマクロファージがNOを産生する可能性、および産生されたNOがアポトーシスにおよぼす影響について検討した。まずNO産生について検討した結果、感染マクロファージでは誘導型NO合成酵素(iNOS) mRNAの発現が認められ、培養上清中のNO量は増加した。また、NO合成酵素(NOS)阻害剤の添加によりNO量は非感染細胞と同程度にまで減少した。次いで、産生されたNOが感染マクロファージの細胞死におよぼす影響について検討した。その結果、感染により細胞致死率および培養上清中の乳酸脱水素酵素量は増加し、NOS阻害剤の添加によりさらに増加した。また、アポトーシスの一つの指標であるDNA断片化を測定した結果、感染によりDNA断

片化は増加し、NOS阻害剤の添加によりさらに増加した。以上の結果から、産生されたNOはアポトーシスの誘導を一部抑制して細胞死を抑制している可能性が示唆された。これまで、感染マクロファージのアポトーシス誘導にはカスパーゼが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。そこで、感染マクロファージが産生するNOがカスパーゼ活性にどのような影響を及ぼしているかを検討するため、カスパーゼ1, 3, 5, 6, 8, 9活性を測定した。その結果、感染によりいずれのカスパーゼ活性も増加し、NOS阻害剤の添加によりさらに増加した。本研究の結果から、感染マクロファージでは、細胞内にiNOSが誘導されNOを産生することが明らかになった。また、NOS阻害剤の添加によりカスパーゼ活性とDNA断片化が増加することから、感染により産生されたNOはカスパーゼ活性を一部不活化することでアポトーシス誘導を調節している可能性が示唆された。

以上の結果から、本論文は歯周疾患の発症および進行の解明に寄与するところが大きく、審査の結果、学位論文に値すると判定した。

氏名・(本籍)	松田 哲朗 (北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第98号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	金属表面上における接着機能性モノマーの吸着構造と接着性との関係
論文審査委員	主査 教授 松田 浩一 副査 教授 大野 弘機 副査 教授 平井 敏博

論文内容の要旨

【緒言】

歯科用貴金属合金にレジンを強固に接着させるために、金属接着機能性モノマーが開発されている。これらの接着機能性モノマーの効果は、被着金属を接着機能性

モノマーで処理した後、接着強さを求めることによって評価されている。また、接着機能性モノマーの吸着構造は、希薄溶液中から純金属上に形成した単分子膜を分光学的な手法を用いて調べられてきた。しかし、様々な被着金属を接着機能性モノマーで処理した場合の表面構