

氏名・(本籍)	室 三 之 (岐阜県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第56号
学位授与の日付	平成10年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第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に認められるアポトーシス発現機序に関する研究
論文審査委員	主 査 教 授 小 鷲 悠 典 副 査 教 授 馬 場 久 衛 副 査 教 授 賀 来 亨

論文内容の要旨

I. 緒 言

近年, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* は, 若年性歯周炎のみならず様々な病型の歯周炎に深く関わっていると考えられている。本菌にはこれまで5つの血清型が報告されているが, 血清型bの菌株は若年性歯周炎患者から最も高頻度に分離されることなどから, 特に病原性が高いのではないかと重要視されている。本菌はロイコトキシン, リポ多糖などを保有しており, これらの病原因子が歯周ポケット内での定着と増殖, 宿主組織への侵入, それに続く組織破壊過程において極めて重要な役割を果たしていると考えられる。我々はこれまで *in vitro* の培養系で血清型bである *A. actinomycetemcomitans* Y 4株が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し, その誘導にはY 4株がマクロファージに貪食されることが重要であると明らかにした。今回の研究では, Y 4株が細胞内に貪食される際に関与する分子の一つとして, リポ多糖のレセプターの一つであるCD14分子を想定し, アポトーシス発現においてどのような役割を果たしているかについて検討した。

II. 材料と方法

1. 供試細胞株および細菌株

マウスマクロファージ細胞株として, J774.1細胞およびそのCD14分子欠損変異株であるLR-9細胞を使用した。また, 5つの異なる血清型から1株ずつの *A. actinomycetemcomitans* を1%酵母エキスを含むBrain

Heart Infusion培地で培養し, 実験に用いた。また, *A. actinomycetemcomitans* Y 4株全菌体からWestphalらの方法に従い, リポ多糖を抽出・精製し使用した。

2. 感染細胞の調製

10%FCS-RPMI1640培地で調製した細胞を播種し, 18時間培養した。培養終了後, 抗生物質を含まないRPMI1640培地に *A. actinomycetemcomitans* を懸濁し, 細胞数と細菌数の比が1:50, 1:500, 1:5000となるように細胞に添加し, 1,000×gで10分間遠心操作を行った。1時間培養後, 抗生物質を含むRPMI1640培地で洗浄し, 上記の培地に5%FCSを添加した培地でさらに培養し, 各種測定を行った。また, J774.1細胞を播種6時間後にリポ多糖で18時間前処理した後に感染操作を上記の方法と同様に行った。

3. 各種測定および分析法

致死活性率は, MTTアッセイを指標とした方法で算定した。また, 細胞内DNA量はPropidium iodide (PI) 染色もしくは, Fluorescein Isothiocyanate (FITC) 結合dUTP標識後にフローサイトメーターで解析し, 同時に感染操作後の細胞からゲノムDNAを抽出し, 2%アガロースゲルを用いて電気泳動後に分析した。また, 共焦点レーザー顕微鏡下にて細胞内に取り込まれたFITC標識Y 4株の菌数を測定した。次に, リポ多糖で前処理した細胞にY 4株を感染させた後, MTTアッセイおよびPI染色後にフローサイトメーターで解析した。さらに, 細胞内に取り込まれたY 4株を血液寒天培地にて培養した後にコロニーを測定した。

III. 結 果

異なる血清型の *A. actinomycetemcomitans* 5 菌株を J774.1細胞に感染させ、致死活性率を調べたところ、血清型の違いによる致死活性率の差はほとんど認められなかった。よって、以降の実験には血清型 b の Y 4 株のみを用いた。感染させた J774.1細胞の致死細胞率は、LR-9細胞と比較すると有意に高かった。次に、感染させた細胞を PI 染色および FITC 結合 dUPT 標識後にフローサイトメーターで解析したところ、感染させていない細胞と比較して J774.1細胞はハイポディプロイド DNA を有する核の量がおおよそ 3 倍増加したが、LR-9細胞ではほとんど変化は認められなかった。また、J774.1細胞では自己蛍光と比較して、出現ピークが右方に移動したが、LR-9細胞では出現ピークの移動は認められなかった。また、感染させた細胞から DNA 抽出して電気泳動したところ、J774.1細胞では DNA 断片化像が観察されたが、LR-9細胞ではいずれの比率で感染させても DNA 断片化像は観察されなかった。そこで、J774.1細胞に Y 4 株を感染させる際に抗 CD14 抗体を添加したところ、わずかながら致死活性率が抑制された。さらに、共焦点レーザー顕微鏡下で細胞内に取り込まれた菌数を測定したところ、

J774.1細胞は LR-9細胞と比較して、おおよそ 4 倍の菌数の取り込みが認められた。一方、リポ多糖で前処理した J774.1細胞に Y 4 株を感染させて致死活性率を調べたところ、リポ多糖濃度の増加にともない致死活性抑制率が上昇した。また、ハイポディプロイド DNA を有する核の量は前処理しなかった細胞のおおよそ 46% 減であった。次に細胞内に取り込まれた菌数を血液寒天培地上で比較したところ、感染させてから 8~10 時間後では、リポ多糖で前処理した細胞は前処理しなかった細胞に比べて、菌数が有意に低かった。

IV. 考察および結論

これまでの研究では、マクロファージの貧食を抑制する薬剤であるサイトカラシン D の添加により、Y 4 株を感染させた細胞のアポトーシス発現が有意に抑制されたことから、アポトーシスが発現されるためには細胞が Y 4 株を貧食することが必須であると考えられていた。今回の結果から、Y 4 株が細胞内に貧食される際には細胞膜上の CD14 分子が深く関与していることが明らかになった。また、アポトーシス発現は、細胞内に取り込まれた後の菌数の増加に関連している可能性が示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

これまで室三之らは *in vitro* の培養系で *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y 4 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し、その誘導には本菌が細胞に貧食されることが重要であることを明らかにした。本研究では、Y 4 株が細胞内に貧食される際に関与する因子として CD14 分子に着目し、本分子のアポトーシス発現における役割について検討した。まず、J774.1細胞およびその CD14 分子欠損株である LR-9細胞に Y 4 株を感染させてアポトーシス発現について検討したところ、LR-9細胞ではアポトーシスの発現は認められなかった。次に、J774.1細胞に Y 4 株を感染させる際に抗 CD14 抗体を添加し、致死活性の発現に及ぼす影響を調べたところ、抗 CD14 抗体で処理した J774.1細胞で、感染後の致死活性の発現が抑制された。一方、共焦点レーザー顕微鏡の観察結果から、LR-9細胞内に取り込まれた Y 4 株の菌数は J774.1細胞内に取り込まれた菌数に比べて有意に少なかった。以上の結果から、J774.1細胞が Y 4 株を貧食してアポトーシスを引き起こす際に CD14 分子が重要な役割を果たしていることが示唆された。この CD14 分子はリポ多糖に対するレセプターであり、リポ多

糖と結合して細胞内への情報伝達に関与していると考えられている。そこで、J774.1細胞をリポ多糖で前処理すると、前処理しなかった J774.1細胞に比べ Y 4 株感染後のアポトーシス発現が有意に減少した。さらに、リポ多糖で前処理した後に感染させ、J774.1細胞を一定時間培養し、細胞内に取り込まれた Y 4 株の生菌数を測定したところ、感染直後の J774.1細胞ではリポ多糖での前処理の有無にかかわらず、取り込まれていた Y 4 株に差は認められなかった。しかし、リポ多糖で前処理せずに感染させた J774.1細胞を 10 時間培養した後に回収された Y 4 株の生菌数は、感染直後に比べ 2.6 倍に増加していた。対して、リポ多糖で前処理した感染 J774.1細胞内では、Y 4 株の増加は認められなかった。

本研究の結果、Y 4 株感染 J774.1細胞におけるアポトーシス発現には、CD14 分子を介して Y 4 株が細胞内に取り込まれ、その後の細胞内での Y 4 株の増加が深く関与していることが示唆された。

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。