

〔原 著〕

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*感染マクロファージの
アポトーシス発現におけるカスパーゼの関与

野中 浩嗣

北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座

(主任：小鷲 悠典教授)

Involvement of caspases in apoptotic cell death of
macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Koji NONAKA

Department of Periodontology and Endodontology
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

(Chief : Prof. Yusuke KOWASHI)

Abstract

This study investigated the involvement of caspase in apoptotic cell death of *A. actinomycetemcomitans*-infected macrophages. Two peptide inhibitors of caspases, Z-VAD-FMK and Z-DEVD-FMK, inhibited apoptotic cell death of J774.1 infected with *A. actinomycetemcomitans*. During the process of apoptosis, IL-1 β was detected in the culture supernatants of J774.1 cells. The IL-1 β secretion was blocked by the caspase-1 inhibitor, Z-VAD-FMK. Immunoblot analysis showed that the infection of *A. actinomycetemcomitans* to J774.1 cells induced the cleavage of Rb, suggesting that caspase-3 was activated by *A. actinomycetemcomitans*-infection. The cytosol from *A. actinomycetemcomitans*-infected J774.1 cells induced Rb proteolysis *in vitro*, which was inhibited by the caspase-3 inhibitor, Z-DEVD-FMK. Furthermore, caspase-3-like activity was markedly increased in J774.1 cells infected with *A. actinomycetemcomitans* between 12h and 24h, which was subsequently inhibited by the addition of Z-VAD-FMK and Z-DEVD-FMK. These findings indicate that caspase-3 induces apoptosis in J774.1 cells infected with *A. actinomycetemcomitans*. Taken together, these results suggest that caspase-1 and caspase-3 are involved in the induction of apoptosis in *A.*

日本歯周病学会
受付：平成13年3月31日

actinomycetemcomitans-infected macrophages.

Key words : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Macrophages, Apoptosis, Caspases.

I. 緒 言

歯周病細菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* は、様々なタイプの歯周炎の発症に深く関与していることが報告されている¹⁻³⁾。Zambonら⁴⁾は、口腔内から分離される *A. actinomycetemcomitans* を a, b, c の3つの血清型に分類し、ヒトの口腔内からは、血清型 a と血清型 b が多く分離されると報告している。近年、3つの型に加え血清型 d と血清型 e の存在が報告されている⁵⁾が、Asikainenら⁶⁾は、限局型若年性歯周炎 (Localized juvenile periodontitis : LJP) や重篤な成人性歯周炎患者の歯周ポケットからは血清型 b の菌株が多数分離されると報告している。これまでの一連の報告で、血清型 b の *A. actinomycetemcomitans* が LJP における病原菌として、最も注目されている⁷⁾。

これまで細胞死に関しては、障害性因子による偶発的な死の過程をとるネクローシスがほとんどであるとされてきたが、1972年にKerrら⁸⁾によりネクローシスとは異なる形態をとるアポトーシスという細胞死の概念が提唱された。近年、アポトーシスは免疫系における自己認識細胞の排除、神経系の発達過程における細胞の排除および細胞分化・増殖に深く関与していることが明らかにされてきた⁹⁾。また、HIVウイルスに感染したTリンパ球の細胞死、*Shigella* や *Bordetella* に感染したマクロファージにおける細胞死が、アポトーシスによる細胞死であると報告されている^{10,11)}。

Horvitzら¹²⁾は、線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) の発生過程における細胞死の解析により、アポトーシスが遺伝子により支配さ

れていたことを明らかにした。*ced-3* および *ced-4* 遺伝子がアポトーシス誘導に関与し¹³⁾、*ced-9* 遺伝子がアポトーシスを抑制する遺伝子として同定された¹⁴⁾。その後、線虫における細胞死プログラムの実行分子と考えられていた *ced-3* 遺伝子が、動物細胞でのシステインプロテアーゼファミリーであるカスパーゼと高い相同性を有していることが明らかにされた¹⁵⁾。

これまでの一連の研究で、われわれの研究グループは *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージに見られた細胞死がアポトーシスによるものであることを明らかにしてきた¹⁶⁻¹⁸⁾。また、感染マクロファージにおけるアポトーシス誘導には、*A. actinomycetemcomitans* Y4株がマクロファージ表層のCD14分子と結合して細胞内に取り込まれることが必須であることを明らかにした¹⁷⁾。さらに、このアポトーシス発現に細胞内のプロテインキナーゼCが関与していることを明らかにした¹⁸⁾。そこで、本研究では、細胞内に局在する一連のカスパーゼファミリープロテアーゼが細胞死のシグナル伝達にどのように関わっているかについて検討し、*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージのアポトーシス発現における細胞内情報伝達系の一端を明らかにした。

II. 材料および方法

1. 供試細胞株および供試細菌株

供試細胞株として、マウスマクロファージ細胞株J774.1細胞 (国立感染症研究所口腔科学部からの供与) を用いた。細胞はRPMI1640培地 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.) に非働化牛胎児血清 (FCS : Gibco) を10%添加し、ペニシリンGカリウム (100U/

ml, 明治製菓, 東京) および硫酸ストレプトマイシン (100 μ g/ml, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.) を含む培地 (以下, 10%FCS-RPMI1640培地) を使用し, 37°C, 5%CO₂存在下で培養した. 供試細菌株として, 国立感染症研究所口腔科学部保存株である *A. actinomycetemcomitans* Y4株 (血清型 b) を用いた. *A. actinomycetemcomitans* Y4株は, Todd-Hewitt Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) に酵母エキス (Difco) を1%加えた培地に接種し, 37°C, 5% CO₂存在下で2日間培養した.

2. 細胞の感染操作

10%FCS-RPMI1640培地で 5×10^5 個/mlに調製した細胞を, 6穴マイクロプレート (Corning Glass Works, Corning, NY, U.S.A.) に 5×10^4 個/穴となるように播種し, 18時間培養した. 上記のように培養した *A. actinomycetemcomitans* Y4株を遠心分離して集菌した後に抗生物質を含まないRPMI1640培地に懸濁し, 吸光度550nmで菌数を調製した. 細胞数と細菌数の比率が, 1:50, 1:500, 1:5000となるように細胞に添加し, 食菌を促進するために, 1,000 \times gで10分間遠心操作を行った. その後, 37°C, CO₂存在下で1時間培養した. 細胞に取り込まれなかった *A. actinomycetemcomitans* を取り除くため1. で述べたように, ペニシリンGカリウム, 硫酸ストレプトマイシンおよび硫酸ゲンタマイシン (200 μ g/ml, Sigma Chemical Company) を含むRPMI1640培地で細胞を3回洗浄し, その後, 上記の培地に5% FCSを添加した培地を加え, 以下の実験を行った.

3. アポトーシスの検出法

1) ヘキスト染色による観察

ここでは, 8穴チャンバースライド (Nalge

Nunc International Naperville, IL, U.S.A.) に細胞を 1×10^5 個/穴となるように播種し, 37°C, 5% CO₂存在下で18時間培養した. その後, 2. に示す方法により感染操作を行った. 感染後に48時間培養した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; PBS, pH 7.2) で洗浄し, 1%グルタルアルデヒドを50 μ l添加し, 1時間室温で固定した. PBSで3回洗浄後, ヘキスト33342溶液 (Bisbenzimidazole H 33342 Fluorochrome, Trhydrochloride; Hoechst dye 33342; 56 μ g/ml, Calbiochem-Novabiochem Co. La Jolla, CA, U.S.A.) を50 μ l添加し, 蛍光顕微鏡にて励起波長355nm, 蛍光波長465nmで核を観察した.

2) DNA断片化検出法

感染操作後, カスパーゼ1阻害剤 (Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, U.S.A.) およびカスパーゼ3阻害剤 (Kamiya Biomedical Company) をそれぞれ最終濃度25 μ M, 50 μ Mおよび100 μ Mになるように添加し, 細胞を24時間培養した. その後, 細胞溶解バッファー (5mMEDTA \cdot 2Na, 1% Triton X-100を含む10mMトリス塩酸緩衝液, pH 7.5) 500 μ lに溶解した. 氷上に30分静置後, 10,000 \times gで20分間遠心操作を行った. 次に上清を採取し, リボヌクレアーゼ (500 μ g/ml; Boehringer Mannheim, Germany) を20ml添加し37°Cで1時間反応させた. これにproteinase K (10mg/ml;和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を5 μ l加え37°Cで1時間反応させた. さらにフェノール・クロロホルムを等量加えてDNAを抽出した. 抽出したDNAは, エタノール沈澱後, TE バッファー (1mMEDTA \cdot 2Naを含む10mMトリス塩酸緩衝液, pH8.0) に溶解し, 2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った. 泳動は, Mupid-2 (コスモ・バイオ株式会社, 東京, 日本) を用いて100Vの定電圧で泳動した. エチジウムブロマイド (1 μ g/ml; 和光純薬工業株

式会社)で染色した後、紫外線イルミネーター上で断片化DNA像を観察し、ポラロイド写真を撮影した。DNAマーカーとしては、Super Ladder-low 100 bp ladder (Gen Sura Laboratories, Inc., Del Mar, CA, U.S.A.)を用いた。

4. 感染マクロファージ培養上清中に遊離したIL-1 β 量の測定

感染操作後、カスパーゼ1阻害剤を最終濃度25 μ M, 50 μ Mおよび100 μ M添加し24時間培養し、10,000 $\times g$ にて15分間遠心操作を行い得られた上清を回収した。培養上清中に遊離したIL-1 β 量の測定はInterTest-1 β X™ ELISA Kit (Genzyme Co. Cambridge, MA, U.S.A.)を用いて行った。

5. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロット解析

1) サイトゾール抽出法

感染操作後、細胞を1,000 $\times g$ にて5分間遠心操作を行い回収し、バッファー(5 MNaCl, 1 MKCl, 1 MMgCl₂, 1M トリス塩酸緩衝液, pH7.5を含む)にて2回洗浄した。その後、サイトゾール調製用バッファー(50mMPIPES, 5 mM EGTA, 50mM KCl, 2 mM MgCl₂)にCytochalasin B:10 μ M (10 μ M; BIOMOL Research Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA, U.S.A.), DTT: 1 mM (1 M; 和光純薬株式会社)とプロテアーゼ阻害剤: 1 mM (50mM; Complete™, Boehringer Mannheim)を添加した溶液を細胞に添加し、氷上にて15分間放置した。ダウンス型ホモジナイザー(1 ml Dounce Tissue Grainder, Wheaton Millville, NJ, U.S.A.)でホモジナイズし、10,000 $\times g$ にて15分間遠心操作を行い得られた上清をサイトゾール抽出物とした。

2) SDSポリアクリルアミド電気泳動 (SDS

-PAGE)

1) で調製した試料溶液に同量の試料用緩衝液(10%SDS, メルカプトエタノール, グリセロール, 0.001%プロロフェノールブルーを含む0.5M トリス塩酸緩衝液, pH6.8)を加え、100°Cで5分間熱処理を行った。12.5%分離ゲルと4%濃縮ゲルを用い、20mAの定電流で1時間泳動した。

3) ウェスタンブロット解析

泳動終了後、3時間、200mAの定電流で、PVDF膜(Immobilon™-P, Millipore Co. Bedford, MA, U.S.A.)に転写した。転写後、膜を5%スキムミルク含有PBS-1%Tweenにて1時間ブロッキングし次いで1次抗体(Purified anti-human Rb monoclonal antibody: Pharmingen, San Diego, CA., U.S.A.) 2 μ g/mlの入った5%スキムミルク含有PBS-1%Tweenに浸し室温にて1時間反応させた。PBS-1%Tweenで3回洗浄後、5%スキムミルク含PBS-1%Tweenにて3000倍に希釈した2次抗体(Anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked whole antibody: Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, U.S.A.)で室温にて1時間反応させた。PBS-1%Tweenで3回洗浄後、ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて検出した。

6. 感染マクロファージ細胞内のカスパーゼ3活性の測定

感染操作後、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を各々50 μ Mの濃度で添加し、12時間および24時間培養した。細胞を1,000 $\times g$ にて5分間遠心操作を行い回収した後、細胞溶解バッファー(10mMHEPES; pH7.5, 150 mMNaCl, 0.5mMEDTA, 2 mMPMSF, 0.5%NP-40)を加え、氷上に15分静置後、10,000 $\times g$ で5分間遠心操作を行い、上清を採取した。上清に反応バッファー(10mM

HEPES; pH7.5, 50mMNaCl, 2.5 mMDTT) とカルボキシル末端に蛍光試薬である7-アミノ-4-メチルクマリリン (AMC) を結合させた合成ペプチド (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-MCA; Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan) を50 μ M添加し, 37°Cで1時間反応させた後, 蛍光光度計 (F-4010, 日立, 東京) を用いて励起波長380 nm, 蛍光波長460nmにて遊離したAMCの蛍光光度を測定した。

III. 結 果

1. *A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージのアポトーシス像

A. actinomycetemcomitans Y4株をJ774.1細胞に感染させ, 48時間培養後にヘキスト染色を行った。その結果, 感染させなかったJ774.1細胞と比較して細胞:細菌比が1:500で感染処理を行ったものでは, 核が分葉化したアポトーシス細胞が数多く認められた (図1)。

2. アガロース電気泳動によるDNA断片化の検出

J774.1細胞に *A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させた後, カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を添加し24時間培養した後

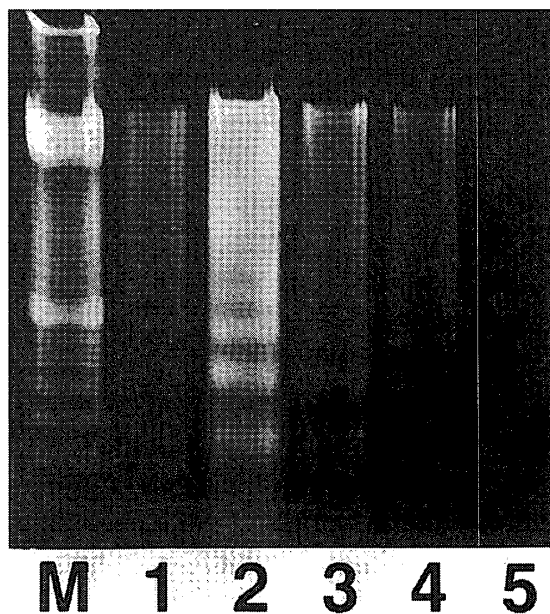


図2 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージにみられたDNA断片化像

A. actinomycetemcomitans Y4株を細胞:細菌比1:500となるように調製し感染させた。培養24時間後, 感染マクロファージからDNAを抽出して2%アガロースを用いて電気泳動を行った。
 M ; DNAマーカー (Supper Ladder-low)
 レーン 1; Y4株非感染J774.1細胞
 レーン 2; J774.1細胞:Y4株=1:500の比率で感染
 レーン 3; 感染操作後カスパーゼ1阻害剤を25 μ M添加
 レーン 4; 感染操作後カスパーゼ1阻害剤を50 μ M添加
 レーン 5; 感染操作後カスパーゼ1阻害剤を100 μ M添加

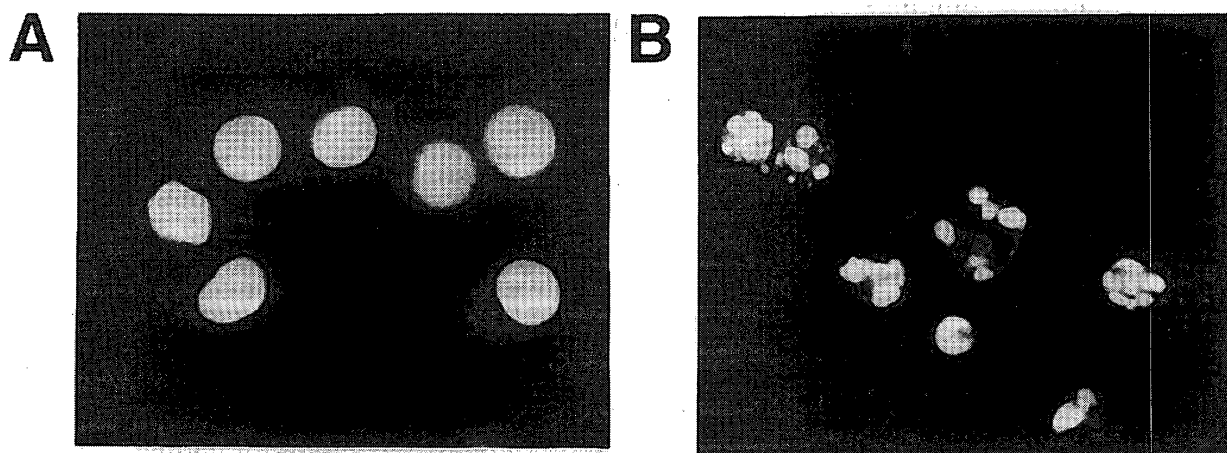


図1 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージのヘキスト染色像

A. actinomycetemcomitans Y4株を細胞:細菌の比率が1:500となるように感染させ48時間培養した。その後, 蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(A) 非感染群 (B) 感染群 ($\times 250$)

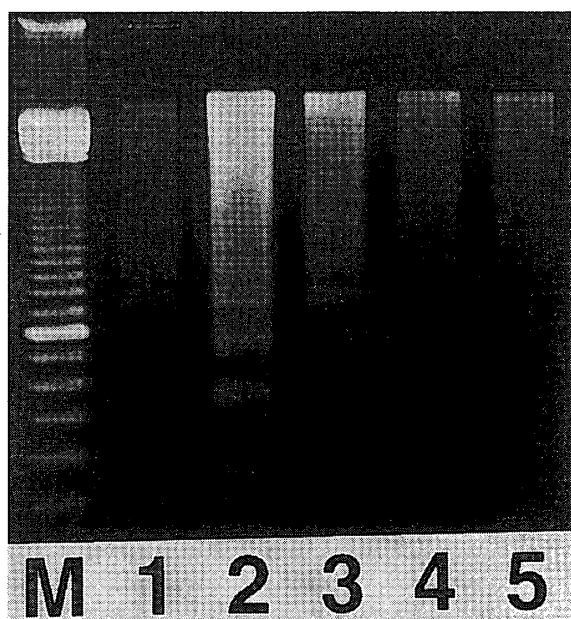


図3 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージにみられたDNA断片化像

A. actinomycetemcomitans Y4株を細胞：細菌比1：500となるように調製し感染させた。培養24時間後、感染マクロファージからDNAを抽出して2%アガロースを用いて電気泳動を行った。

M ; DNAマーカー (Supper Ladder-low)

レーン 1 ; Y4株非感染J774.1細胞

レーン 2 ; J774.1細胞：Y4株=1：500の比率で感染

レーン 3 ; 感染操作後カスパーゼ3阻害剤を25 μ M添加

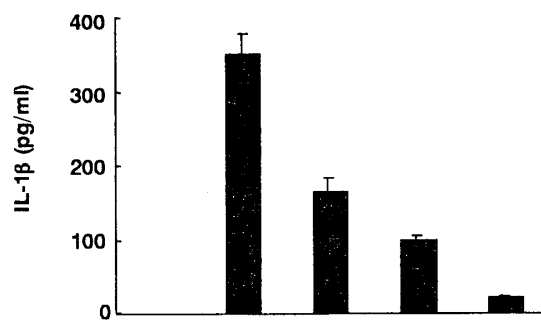
レーン 4 ; 感染操作後カスパーゼ3阻害剤を50 μ M添加

レーン 5 ; 感染操作後カスパーゼ3阻害剤を100 μ M添加

にDNAを抽出し2%アガロースゲルで泳動を行った。その結果、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージから抽出したDNAでは、アポトーシス特有のラダー形成が認められた。一方、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージにカスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を25 μ M, 50 μ M, 100 μ Mの濃度で添加したところ濃度依存的にアポトーシス特有のラダー形成は消失した(図2, 図3)。

3. *A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージ培養上清中のIL-1 β 量

J774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させる際に、カスパーゼ1阻害剤を添



Y4 infection (500:1)	-	+	+	+	+
caspase-1 inhibitor (μ M)	-	-	25	50	100

図4 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージ培養上清中のIL-1 β 量の測定

A. actinomycetemcomitans Y4株をJ774.1細胞に感染させた後、カスパーゼ1阻害剤を添加し24時間培養後、ELISA kitを用いて培養上清中のIL-1 β 量を測定した。

加し、その培養上清中のIL-1 β 量をELISA法を用いて測定した。*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージの培養上清中には、350pg/mlのIL-1 β が検出されたが、カスパーゼ1阻害剤を25 μ M, 50 μ M, 100 μ Mの濃度で添加するとIL-1 β 量が165pg/ml, 98pg/ml, 21pg/mlと濃度依存的減少した(図4)。

4. *A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージ細胞内のRbタンパクの変化

J774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細胞1に対して細菌500, および5000となるように感染させた後、12時間および24時間培養した。培養後にタンパクを抽出し、ウェスタンブロットで解析したところ、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染処理12時間後に110kDaの高リン酸化型Rbタンパクから105kDaの低リン酸化型Rbタンパクへの移行が認められた(図5, レーン2および3)。さらに、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染処理24時間後には、105kDaの低リン酸化型Rbタンパクからさらに5kDa小さい100kDaのタンパクへ

の移行が認められた(図5, レーン4および5)。

次に, *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージ細胞からサイトゾールを調製し GST-Rbタンパク(図6)とともに培養し, その後, Rbに対する抗体を用いてウェスタンブ

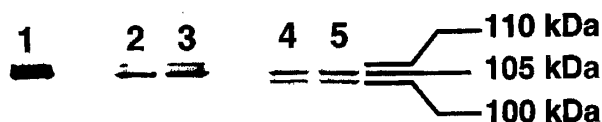


図5 *A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージ細胞内のRbタンパクの変化
 レーン 1: Y4株非感染J774.1細胞
 レーン 2: J774.1細胞: Y4株= 1:500の比率で感染させ12時間培養
 レーン 3: J774.1細胞: Y4株= 1:5000の比率で感染させ12時間培養
 レーン 4: J774.1細胞: Y4株= 1:500の比率で感染させ24時間培養
 レーン 5: J774.1細胞: Y4株= 1:5000の比率で感染させ24時間培養

GST-Rb protein (46 kDa)

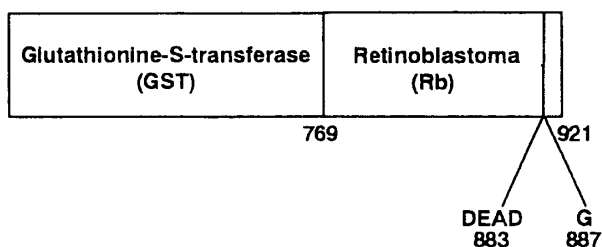


図6 GST-Rbタンパクの構成とカスパーゼ3の切断部位
 カスパーゼ3は, 細胞周期を制御するRbタンパクのD(886)とG(887)の-Asp-Gly-の間を特異的に分解する。

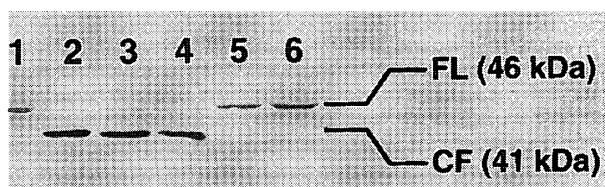


図7 カスパーゼ3によるGST-Rbタンパクの切断の観察
 レーン 1: Y4株非感染J774.1細胞のサイトゾール
 レーン 2: J774.1細胞: Y4株のサイトゾール
 レーン 3: J774.1細胞: Y4株のサイトゾール; カスパーゼ1阻害剤を0.1μM添加
 レーン 4: J774.1細胞: Y4株のサイトゾール; カスパーゼ1阻害剤を1μM添加
 レーン 5: J774.1細胞: Y4株のサイトゾール; カスパーゼ3阻害剤を0.1μM添加
 レーン 6: J774.1細胞: Y4株のサイトゾール; カスパーゼ3阻害剤を1μM添加

ロット法にて解析した。図7でも明らかのように, GST-Rbタンパクは46kDaから41kDaへ移行した。また, カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージ細胞より抽出したサイトゾールに0.1μM, 1μMの濃度で加えたところ, カスパーゼ3阻害剤の添加したときのみ41kDaへの移行が完全に抑制された(図7)。

5. *A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージ細胞内のカスパーゼ3の活性

A. actinomycetemcomitans Y4株を感染させた後, カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤(50μM)とともに感染細胞を, 12時間および24時間培養し, カスパーゼ3の活性を測定した。

A. actinomycetemcomitans Y4株に感染させたJ774.1細胞内のカスパーゼ3活性は, 12時間および24時間で著しく増加した。一方, カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤添加群では, いずれの時間においてもカスパーゼ3の活性が著しく減少した(図8)。

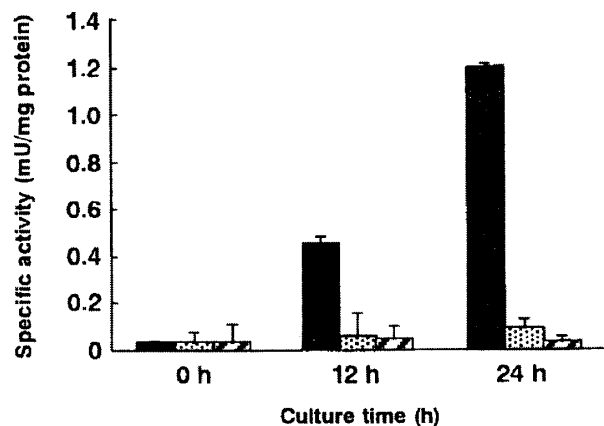


図8 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージ細胞内のカスパーゼ3の活性
 ■ J774.1細胞: Y4株= 1:500の比率で感染
 ▨ J774.1細胞: Y4株= 1:500の比率で感染後, カスパーゼ1阻害剤を50μM添加
 ▩ J774.1細胞: Y4株= 1:500の比率で感染後, カスパーゼ3阻害剤を50μM添加

IV. 考 察

カスパーゼファミリーはこれまでに10種類の存在が報告されている¹⁹⁾。アポトーシスの過程では、プロテアーゼカスケードが存在し、カスパーゼが順次活性化され、この活性化されたカスパーゼはアポトーシスにおいて、それぞれ異なる役割を果たしていると考えられている²⁰⁾。また、*Shigella*や*Salmonella*などの細菌に感染した細胞のアポトーシスにおいてこのカスパーゼ1が関与していることが明らかにされている^{21~23)}。また、近年アポトーシスが誘導される際、DNAの断片化はカスパーゼ3により活性化されたデオキシリボヌクレアーゼ (caspase-3-activated DNase; CAD) によって引き起こされると考えられている^{24~26)}。そこで本研究では、細胞内に局在する一連のカスパーゼファミリーのうちのカスパーゼ1とカスパーゼ3が*A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージにみられるアポトーシスシグナル伝達にどのように関わっているかを検討した。

まず、J774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させ、蛍光顕微鏡にてアポトーシス像を確認した。*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させることにより、核が分葉化したアポトーシス細胞が数多く認められた(図1)。さらに、アガロース電気泳動で解析したところ*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージにDNAの断片化が認められた(図2, 3)。一方、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染操作時にカスパーゼ1阻害剤を添加したところ濃度依存的にDNA断片化の減少が認められた(図2)。カスパーゼ1は、不活性型のIL-1 β (31kDa) をアミノ酸配列の-Asp-Ala-の間で切断して、活性型のIL-1 β (17.5 kDa) に変換する活性をもつ酵素として知られている²⁷⁾。今回、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージ培養上清中のIL-1 β 量を

ELISA法を用いて測定したところ、感染群において350pg/mlのIL-1 β が検出された。ここにカスパーゼ1阻害剤を添加したところIL-1 β 産生が著しく抑制された(図4)。以上の結果より、*A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージのアポトーシス発現にカスパーゼ1が関与していることが示唆された。

*A. actinomycetemcomitans*は、第一大臼歯と中切歯の歯槽骨の喪失に特徴づけられる若年性歯周炎の主たる原因菌といわれている^{6,28~33)}。また、*in vitro*の実験結果から*A. actinomycetemcomitans* Y4株に由来する莢膜多糖およびリポ多糖は、IL-1産生を介して破骨細胞様細胞形成を促進することが報告されている^{34~36)}。さらに、IL-1が炎症性骨吸収の潜在的誘導因子である³⁵⁾ことを考え合わせると、感染マクロファージから産生されるIL-1が*A. actinomycetemcomitans*に起因する急激な歯槽骨吸収に深く関与している可能性が高い。このことに関しては、今後詳細な検討が必要であろう。

現在、アポトーシスが誘導される際、DNAの断片化はカスパーゼ3により活性化されたデオキシリボヌクレアーゼ (caspase-3-activated DNase; CAD) によって引き起こされると考えられている^{24~26)}。今回、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染操作時にカスパーゼ3阻害剤を添加して培養を行い、その後、アガロース電気泳動で解析したところ、濃度依存的にDNA断片化の減少が認められた(図3)。また、カスパーゼ3はアポトーシス誘導に深く関わっていることに加えて、細胞内の様々なタンパクを分解することが広く知られている。一般にカスパーゼ3によって切断されるタンパクのアミノ酸配列の部位は、-Asp-X-X-Asp-を含んでいる。例えば、PARP³⁷⁾、プロテインキナーゼC δ ^{38,39)}、Rb^{40,41)}などの細胞内タンパクはそれぞれ-Asp-Glu-Val-Asp- (DEVD)、-Asp-Met

-Gln-Asp-(DMQD), -Asp-Glu-Ala-Asp-(DEAD) といったアミノ酸配列を持ち、この部位で切断される。

一般に正常な細胞では、RbタンパクはG1期では低リン酸化型、S期以降では高リン酸化型として存在し細胞周期のG1期からS期への移行において重要な役割を果たしている^{42~43)}。そこで、*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージの細胞内のRbタンパクの変化をウェスタンブロット法を用いて解析した。*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染操作12時間後に110kDaの高リン酸化型Rbタンパクから105kDaの低リン酸化型Rbタンパクへの移行が認められた(図5)。このことは、マクロファージに*A. actinomycetemcomitans* Y4株が感染することで細胞周期がG1期に停止していることを示している。*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージをさらに24時間培養すると105kDaの低リン酸化型Rbタンパクから、さらに5kDa小さい100kDaのタンパクへの移行が認められた(図5)。JänickeらはRbタンパクのC末端42アミノ酸(5kDa)の部位がアポトーシス細胞におけるカスパーゼ3によって特異的に切断されることを報告している⁴⁴⁾。このことから*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージのアポトーシス発現において、この5kDa小さいタンパクへの移行にカスパーゼ3の関与が考えられた。そこで、このことを明らかにするために46kDaのGST-Rbタンパクを用いて検討した(図6)。まず、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージ細胞からサイトゾールを調製しGST-Rbタンパクとともに培養した。その後、Rbに対する抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。図7でも明らかのように、GST-Rbタンパクは46kDaから41kDaへ移行し、また、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージ細胞より抽出したサイト

ゾールに0.1 μ M, 1 μ Mの濃度で加えたところ、カスパーゼ3阻害剤の添加したときにのみ41kDaへの移行が完全に抑制された(図7)。

以上のことより*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージのサイトゾール中にはカスパーゼ3が存在し、Rbタンパクの分解を引き起こしているということが明かとなった。

次に、*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージ中のカスパーゼ3の活性を測定した。*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染群においては、感染操作後12時間および24時間培養すると、細胞内のカスパーゼ3の活性が著しく増加した。一方、感染操作後の細胞にカスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を添加して培養すると、いずれにおいてもカスパーゼ3の活性が著しく減少した(図8)。このことから、*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージの細胞内のカスパーゼ1およびカスパーゼ3がアポトーシス発現に深く関与していることが明かとなった。さらに、今回の結果から感染マクロファージのアポトーシス誘導時の情報伝達系ではカスパーゼ1がカスパーゼ3の上流に位置することが示唆された。

V. 結 論

A. actinomycetemcomitans 感染マクロファージのアポトーシス発現機構について検討し、以下の結果が得られた。

1. *in vitro*の培養系でマウスマクロファージ細胞株J774.1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させヘキスト染色で観察したところ、アポトーシス特有の核の分葉化が確認された。
2. *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージのアポトーシス発現をアガロース電気泳動で観察したところ、アポトーシス特有のラダーが認められた。
3. *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染後に

カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を添加させアガロース電気泳動にて観察したところ、阻害剤の濃度依存的にラダーの消失が認められた。

4. *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染後にカスパーゼ1阻害剤を添加しその培養上清中のIL-1 β 量を測定したところ、著しく抑制された。
5. *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージの細胞内のRbタンパクの変化をウェスタンブロット法にて解析したところ、感染後12時間で高リン酸化型Rbタンパクから低リン酸化型Rbタンパクへの移行が認められた。さらに24時間培養すると低リン酸化型Rbタンパクから5kDa小さい100kDaのタンパクへ移行することが認められた。
6. *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージ細胞からサイトゾールを調製しGST-Rbタンパクとともに培養し、その後、Rbに対する抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析したところ、46kDaのGST-Rbタンパクが41kDaに変化した。さらに、サイトゾールとGST-Rbタンパクにカスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を添加したところ、カスパーゼ3阻害剤の添加群のみ41kDaへの移行が抑制された。
7. *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージの細胞内のカスパーゼ3の活性を測定したところ、感染後、12時間、24時間で活性が著しく増加した。一方、カスパーゼ1阻害剤およびカスパーゼ3阻害剤を添加したところ、カスパーゼ3の活性は著しく抑制された。

以上の結果から、*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージのアポトーシス発現にはカスパーゼ1およびカスパーゼ3が関与していることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御教示、御校閲を頂きました小鷲悠典教授に心から感謝の意を表します。また、研究に際し、御指導、御校閲を頂きました国立感染症研究所口腔科学部花田信弘部長に心から感謝の意を表します。さらに、実験に際し常に御助言、御指導を頂きました九州歯科大学口腔微生物学講座西原達次教授に心から御礼を申し上げます。本研究の実施にあたり、御協力頂きました口腔科学部諸先生方、ならびに歯科保存学第一講座教室員各位にお礼を申し上げます。

文 献

1. Slots, J., Reynolds, H. S. and Genco, R. J.: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect. Immun.*, **29**: 1013-1020, 1980.
2. Bragd, L., Dahlén, G., Wikström, M. and Slots, J.: The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J. Clin. Periodontol.*, **14**: 95-99, 1987.
3. Slots, J. and Listgarten, M. A.: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.*, **15**: 85-93, 1988.
4. Zambon, J. J., Slots, J. and Genco, R. J.: Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.*, **41**: 19-27, 1983.
5. Gmür, R., Manabb, H., van Steenberg, T. M. J., Baehni, P., Mombelli, A., van Winkelhoff, A. J. and Guggenheim, B.: Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol. Immunol.*, **8**: 116-120, 1993.

6. Asikainen, S. : Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and spirochetes in relation to age in localized juvenile periodontitis. J. Periodontol., **57** : 537-541, 1986.
7. Zambon, J. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol., **12** : 1-20, 1985.
8. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. : Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer, **26** : 239-257, 1972.
9. Raff, M. C. : Social controls on cell survival and cell death. Nature, **356** : 397-400, 1992.
10. Zychlinsky, A., Prevost, M. C. and Sansonetti, P. J. : *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. Nature, **358** : 167-169, 1992.
11. Khelef, N., Zychlinsky, A. and Guiso, N. : *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages : role of adenylate cyclase-hemolysin. Infect. Immun., **61** : 4064-4071, 1993.
12. Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. : Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. Cell, **44** : 817-829, 1986.
13. Yuan, J. and Horvitz, H. R. : The *caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. Dev. Biol., **138** : 33-41, 1990.
14. Hengartner, M. O., Ellis, R. E. and Horvitz, H. R. : *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. Nature, **356** : 494-499, 1992.
15. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. : The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. Cell, **75** : 641-652, 1993.
16. Kato, S., Muro, M., Akifusa, S., Hanada, N., Semba, I., Fujii, T., Kowashi, Y. and Nishihara, T. : Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. Infect. Immun., **63** : 3914-3919, 1995.
17. Muro, M., Koseki, T., Akifusa, S., Kato, S., Kowashi, Y., Ohsaki, Y., Yamato, K., Nishijima, M. and Nishihara, T. : Role of CD14 molecules in internalization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by macrophages and subsequent induction of apoptosis. Infect. Immun., **65** : 1147-1151, 1997.
18. Nonaka, K., Ishisaki, A., Muro, M., Kato, S., Oido, M., Nakashima, K., Kowashi, Y., Nishihara, T. : Possible involvement of protein kinase C in apoptotic cell death of macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. FEMS Microbiol. Lett., **159** : 247-254, 1998.
19. Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. and Yuan, J. : Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell, **87** : 171, 1996.
20. Cohen G. M. : Caspase : the executioners of apoptosis. Biochem. J. **326** : 1-16, 1997.
21. Chen, Y., Smith, M. R., Thirumalai, K. and Zychlinsky, A. : A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. EMBO J., **15** : 3853-3860, 1996.
22. Hilbi, H., Chen, Y., Thirumalai, K. and Zychlinsky, A. : The interleukin 1 β -converting enzyme, caspase 1, is activated during *Shigella flexneri*-induced apoptosis in human monocyte-derived macrophages. Infect. Immun., **65** : 5165-5170, 1997.
23. Hilbi, H., Moss, J. E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., Flavell, R. A., Yuan, J., Sansonetti, P. J. and Zychlinsky, A. : *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. J. Biol. Chem., **273** : 32895-32900, 1998.
24. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. : A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature, **391** : 43-50, 1998.
25. Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. : Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature, **391** : 96-99, 1998.
26. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T. and Wang, X. : The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **95** : 8461-8466, 1998.
27. Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R.,

- Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., Elliston, K. O., Ayala, J. M., Casano, F. J., Chin, J., Ding, G. J. —F., Egger, L. A., Gaffney, E. P., Limjuco, G., Palyha, O. C., Raju, S. M., Rolando, A. M., Salley, J. P., Yamin, T-T., Lee, T. D., Shively, J. E., MacCross, M., Mumford, R. A., Schmidt, J. A. and Tocci, M. J. : A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*, **356** : 768-774, 1992.
28. Slots, J. : The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.*, **84** : 1-10, 1976.
29. Liljenberg, B. and Lindhe, J. : Juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **7** : 48-61, 1980.
30. Slots, J. and Rosling, B. G. : Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J. Clin. Periodontol.*, **10** : 465-486, 1983.
31. Mandell, R. L. : A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. *Infect. Immun.*, **45** : 778-780, 1984.
32. Christersson, L. A., Slots, J., Rosling, B. G. and Genco, R. J. : Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, **12** : 465-476, 1985.
33. Zambon, J. J., Christersson, L. A., Genco, R. J. : Diagnosis and treatment of localized juvenile periodontitis. *JADA*, **113** : 295-299, 1986.
34. Christersson, L. A., Wikesjö, U. M. E., Albini, B., Zambon, J. J. and Genco, R. J. : Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. *J. Periodontol.*, **58** : 540-545, 1987.
35. Nishihara, T., Ueda, N., Amano, K., Ishihara, Y., Hayakawa, H., Kuroyanagi, T., Ohsaki, Y., Nagata, K. and Noguchi, T. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 capsular-polysaccharide-like polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 α production in mouse marrow cultures. *Infect. Immun.*, **63** : 1893-1898, 1995.
36. Ueda, N., Koide, M., Ohguchi, M., Ishihara, Y., Noguchi, T., Okahashi, N., Nishihara, T. : Involvement of prostaglandin E2 and interleukin-1 α in the differentiation and survival of osteoclasts induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *J. Periodont. Res.*, **33** : 509-516, 1998.
37. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. and Earnshaw, W. C. : Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371** : 346-347, 1994.
38. Emoto, Y., Manome, Y., Meinhardt, G., Kisaki, H., Kharbanda, S., Robertson, M., Ghayur, T., Wong, W. W., Kamen, R., Weichselbaum, R. and Kufe, D. : Proteolytic activation of protein kinase Cd by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J.*, **14** : 6148-6156, 1995.
39. Ghayur, B. T., Hugunin, M., Talanian, R. V., Ratnofsky, S., Quinlan, C., Emoto, Y., Pandey, P., Datta, R., Huang, Y., Kharbanda, S., Allen, H., Kamen, R., Wong, W. and Kufe, D. : Proteolytic activation of protein kinase Cd by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J. Exp. Med.*, **184** : 2399-2404, 1996.
40. Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. and Poirier, G. G. : Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase : an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **53** : 3976-3985, 1993.
41. Wang, Z-Q., Auer, B., Stingl, L., Berghammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M. and Wagner, E. F. : Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes & Dev.*, **9** : 509-520, 1995.
42. Weinberg, R. A. : The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81** : 323-330, 1995.
43. Yamato, K., Koseki, T., Ohguchi, M., Kizaki, M., Ikeda, Y. and Nishihara, T. : Activin A induction of cell-cycle arrest involves modulation of cyclin D2 and *p21^{CIP1/WAF1}* in plasmacytic cells. *Mol. Endocrinol.*, **11** : 1044-1052, 1997.
44. Jänicke, R. U., Walker, P. A., Lin, X. Y. and Porter, A. G. : Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis. *EMBO J.*, **15** : 6969-6978, 1996.