

〔原 著〕

*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

富岡 純

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)

Nitric oxide-mediated protection of *Actinobacillus*
actinomycetemcomitans-infected macrophages against apoptosis

Jun TOMIOKA

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

(Chief : Prof. Yusuke KOWASHI)

Abstract

Nitric oxide (NO) produced by activated macrophages is known to have antibacterial effects and to act as an inflammatory modulator. The aim of this study was to determine whether infected macrophages produce NO after *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection, and whether the produced NO is involved in regulating subsequent apoptosis. The expression of inducible NO synthetase (iNOS) was examined. In addition, culture supernatant was obtained to measure NO levels and LDH activity in the presence and absence of S-methylisourea (SMT), a specific inhibitor of iNOS. Cellular protein was extracted from infected macrophages to measure DNA fragmentation and caspase activity. The NO levels were increased by the infection. The LDH activity, DNA fragmentation, and caspase activity were also increased by the infection, and increased further with addition of SMT. These findings indicate that infected macrophages produce NO to protect themselves against apoptotic cell death by decreasing caspase activity.

Key words : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Macrophages, Apoptosis, Nitric oxide.

I. 緒 言

グラム陰性桿菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* は様々なタイプの歯周炎の発症に深く関わっていると報告されている¹⁻³⁾。歯周ポケット内から分離される *A. actinomycetemcomitans* は a, b, c の3つの血清型に分類され、ヒトの口腔内からは血清型 a と b が多く分離されると報告されている⁴⁾。最近では、これら3つの血清型に加えて d および e の血清型が報告されている⁵⁾。このような血清型の中でも、血清型 b の菌株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多数分離されるため、これら歯周炎の原因菌として注目されている^{6,7)}。本菌を含め歯周病の発症に深く関連している一連の細菌 (歯周病原性細菌) は、宿主の口腔内に定着・侵入し局所で多くの病原因子 (莢膜多糖・リポ多糖, ロイコトキシンなど) を産生することで宿主に傷害を及ぼし歯周組織破壊を引き起こすと考えられている。

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って貪食、殺菌される。*A. actinomycetemcomitans* などの歯周病原性細菌やその代謝産物などが生体内に侵入すると、マクロファージはこれを非特異的に貪食し細胞内で分解後、その一部を抗原として提示することで免疫応答を開始させる役割を果たしている⁸⁾。

これまで、われわれは *in vitro* の実験系で *A. actinomycetemcomitans* Y 4 株を感染させるとマクロファージはアポトーシスにより細胞死に到ることを報告した⁹⁾。また、このアポトーシスの誘導には、本菌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¹⁰⁾。近年、アポト

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が注目を集めているが、感染マクロファージにおけるアポトーシスの誘導ではこの中でもカスパーゼ 3 が重要な役割を果たしていることが示唆されている¹¹⁻¹⁴⁾。

一般に、サイトカインによって活性化したマクロファージでは、誘導型一酸化窒素 (NO) 合成酵素 (iNOS) が誘導され NO が産生されることが知られている¹⁵⁾。NO は生物のエネルギー代謝に必要なヘム化合物などの鉄金属を有する酵素やタンパクに強い親和性を有し、核酸合成に関与する重要な酵素を不活化することが報告されている。マクロファージから産生される NO は、貪食した細菌のエネルギー代謝や DNA 合成を阻害することにより抗菌活性を示すと考えられている¹⁷⁾。また、炎症反応のモジュレーター分子としても機能していることが明らかになっている¹⁸⁾。

そこで本研究では、*A. actinomycetemcomitans* の感染によりマクロファージから NO が産生されているかどうか、さらに産生された NO が誘導されるアポトーシスに与える影響を明らかにすることを研究の目的とした。

II. 材料および方法

1. 供試細胞と供試細菌

国立感染症研究所口腔科学部から供与を受けたマウスマクロファージ細胞株 J 774.1 を用いた。細胞は、RPMI 1640 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 (100 U/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.) を添加した培地 (以下 10% FCS 添加 RPMI 1640 培地) にて、37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

供試細菌としては、同じく国立感染症研究所口腔科学部から供与を受けた *A. actinomycetemcomitans* Y 4 株を用いた。 *A. actinomycetemcomitans* Y 4 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存在下で培養した。

2. *A. actinomycetemcomitans*による感染操作

10%FCS添加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 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U. S. A.) に 1×10^6 個/穴となるように播種し、18時間培養した。培養した *A. actinomycetemcomitans* Y 4 株を遠心分離して集菌した後、RPMI1640培地に懸濁し、吸光度550nmで菌数を調整した。この菌液を細胞数と細菌数の比率が 1 : 500 となるように細胞に添加し、取り込みを促進するために $1,000 \times g$ で 10 分間遠心操作を行った。その後、37°C、5 %CO₂存在下で 1 時間 30 分培養した。細胞に取り込まれなかった菌を取り除くため、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) を添加した RPMI 1640 培地で 3 回洗浄した。その後、洗浄に使用した培地に 5 % の FCS を添加し、NO 合成酵素 (NOS) 阻害剤である S-Methyl-ITU (Sigma) を 400 μ M の濃度となるように添加し実験を行った。一部の実験では、NOS 阻害剤として、L-NMMA (同仁化学研究所、熊本) も同濃度で使用した。

3. iNOS mRNA発現量の検討

感染操作終了後、L-NMMA あるいは S-Methyl-ITU を培地に添加し、48 時間培養を行った。また、感染操作前に 10 μ g/ml のリポ多糖を添加して 18 時間前培養しておいた細胞を、

iNOS mRNA 発現のポジティブコントロールとして用いた。

培養終了後、細胞から High Pure RNA Isolation Kit (Boehringer Mannheim, Germany) により全 RNA を抽出した。その後、逆転写酵素 (スーパースクリプト II Rnase H-逆転写酵素, Gibco) を加えて 42°C で 50 分間反応させ、1st Strand cDNA を合成した。まず、得られた cDNA に LightCycler DNA Master SYBR Green I (Boehringer Mannheim)、各種プライマー、TaqStart Antibody (CLONTECH, 東京) を加え、室温で 5 分間インキュベートした。プライマーとしては、ヒト/マウス iNOS プライマーセット (Maxim Biotech Inc., San Francisco, CA, U. S. A.) あるいはヒト/マウス/ラット G3PDH RT-PCR プライマーセット (TOYOBO, 大阪) を用いた。95°C で 2 秒インキュベート後、熱変性 (95°C, 0 秒)、アニーリング (65°C, 5 秒)、伸長反応 (72°C, 10 秒)、蛍光測定 (85°C, 5 秒) から構成されるサイクルを 50 サイクル行った。横軸にサイクル数、縦軸に蛍光光度をプロットしたグラフから mRNA 量を算定した。各サンプル中の iNOS mRNA 量については、各々の GAPDH mRNA 量で割ることによりサンプル調製時の RNA 収量の補正を行った。測定が終了したサンプルは分子量マーカー (ϕ X174-Hae III digest; 宝酒造、滋賀) と共に 2 % アガロースゲルに添加し電気泳動を行った。泳動終了後、エチレンブロマイド溶液にて染色し観察した。

4. 一酸化窒素 (NO) 量の測定

感染操作終了後、S-Methyl-ITU を培地に添加し 3 時間あるいは 21 時間培養した。培養上清を採取し、得られた上清に Griess Reagent (Sigma) を添加し、室温に 15 分静置した。SPECTRAMax 340PC (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, U. S. A.) により

540nmにおける吸光度を測定し、亜硝酸ナトリウム(和光純薬, 大阪)を用いた標準直線より、培養上清中NO量を算出した。

5. MTTアッセイによる細胞致死率の算定

細胞を96穴マイクロプレート (Becton Dickinson) に 2×10^4 個/穴となるように播種し、37°C, 5% CO₂存在下で18時間培養後、2. の項に示す方法と同様に感染操作を行った。感染操作終了後、L-NMMAあるいはS-Methyl-ITUを培地に添加して48時間培養し、培養終了4時間前に3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT試薬; 2.5 mg/ml; Sigma) を各穴に20μl添加した。培養終了後、0.04N HCl添加イソプロパノール100 μlを加え十分混和して発色させた後、吸光度(測定波長570nm, 対照波長620nm)を測定した。測定後、細胞致死率を以下の計算式により算定した。

$$\text{細胞致死率(\%)} = 100 \times (1 - \frac{\text{感染細胞の吸光度}}{\text{非感染細胞の吸光度}})$$

6. 乳酸脱水素酵素活性による細胞死の測定

細胞死の検出の指標として、細胞死や細胞溶解に伴い細胞外に放出される乳酸脱水素酵素(LDH)をCytotoxicity Detection Kit (LDH) (Boehringer Mannheim) により測定した。感染操作終了後、培地にS-Methyl-ITUを添加し3時間あるいは21時間培養した。培養終了後、培養上清を採取し、この上清にキット中の反応溶液を添加し室温で10分間反応させた。その後1N塩酸を添加し反応を停止させた後、490nmにおける吸光度を測定しLDH活性の指標とした。

7. DNA断片化の測定

アポトーシスに陥った細胞では、細胞質にヒ

ストン/DNA断片複合体が出現する。このヒストン/DNA断片化複合体をアポトーシス誘導の指標として、細胞死検出ELISAキット^{PLUS} (Boehringer Mannheim) により測定した。感染操作終了後、培地にS-Methyl-ITUを添加し3時間あるいは21時間培養した。培養上清を除きキット中の細胞溶解バッファーを細胞に加え溶解した。細胞溶解液を遠心した上清にキット中のビオチン標識抗ヒストン抗体とペルオキシダーゼ標識抗DNA抗体を添加し、2時間反応させた。その後、キット中のペルオキシダーゼ基質を添加して発色させ405nmにおける吸光度を測定し、DNA断片化の指標とした。

8. マクロファージ細胞内カスパーゼ活性の測定

感染操作後、S-Methyl-ITUを添加し21時間培養した。培養終了後、細胞を回収し細胞溶解バッファー(10mM HEPES; pH 7.5, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 2mM PMSF, 0.5% NP-40)を加え、氷上に15分静置した。10,000×gで5分間遠心操作を行い、上清を採取した。この上清に反応バッファー(10mM HEPES; pH7.5, 50mM NaCl, 2.5mM DTT)とカルボキシル末端に蛍光試薬である7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)を結合させた各々の合成ペプチド(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; Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan)を50μl添加し、37°Cで1時間反応させた。反応後、蛍光光度計(SPECTRAFLUOR^{PLUS}, TECAN Austria GmbH, Austria)を用いて励起波長360nm, 蛍光波長460nmにて遊離したAMCの蛍光光度を測定した。AMC標準溶液の蛍光光度により作成した標準直線から、遊離したAMC量を算出し

た。さらに測定した細胞溶解液のタンパク量から、タンパク 1 mgあたりの遊離AMC量を算出し細胞内カスパーゼ活性とした。

9. 統計処理

各測定値の比較は、student-t testにより検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

III. 結 果

1. マクロファージにおけるiNOS mRNAの発現

まず、感染操作終了後48時間におけるiNOS mRNA発現状態をアガロースゲル電気泳動により検討した(図1)。ポジティブコントロールでは231bp付近にiNOS mRNAに特有なバンドが認められた(レーン1)。非感染細胞では、いずれも同じ位置にわずかにバンドが認められた(レーン2～4)。感染細胞ではiNOS mRNAの強い発現が認められたが、L-NMMAあるいはS-Methyl-ITU添加によってその発現に変化

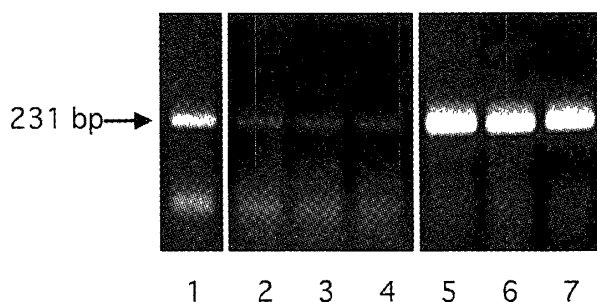


図1 *A. actinomycetemcomitans* Y 4 株感染マクロファージにみられたiNOS mRNAの発現(感染操作終了後48時間)

A. actinomycetemcomitans Y 4 株を細胞:細菌比 1:500となるように調整し感染させた。

レーン1:非感染J 774.1細胞(LPS前培養)

レーン2:非感染J 774.1細胞

レーン3:非感染J 774.1細胞(L-NMMA添加)

レーン4:非感染J 774.1細胞(S-Methyl-ITU添加)

レーン5:感染J 774.1細胞

レーン6:感染J 774.1細胞(L-NMMA添加)

レーン7:感染J 774.1細胞(S-Methyl-ITU添加)

A. actinomycetemcomitans Y 4 株の感染により非感染細胞では認められないiNOS mRNA特有のバンド発現が認められる。また、NO阻害剤添加による影響は認めなかった。

は認められなかった(レーン5～7)。

次に、感染操作終了直後から21時間後までのiNOS mRNA発現の変化をアガロースゲル電気泳動により検討した(図2)。G3PDH mRNAについては、非感染細胞(レーンC)、感染細胞のすべてにおいて452bp付近にG3PDH mRNA特有なバンドが同程度認められた。iNOS mRNAについては、非感染細胞、感染直後(レーン0)の感染細胞では、バンドが認められなかったが、感染後3時間より231bp付近にバンドが認められ、9時間、12時間において発現程度が低下したが、21時間では3時間と同程度あるいはそれ以上の発現が認められた。

アガロースゲルによる発現量の定量は半定量的であるため、感染操作終了後から21時間後までのiNOS mRNA発現量をLightCyclerにより定量した(図3)。電気泳動の結果と同様に、

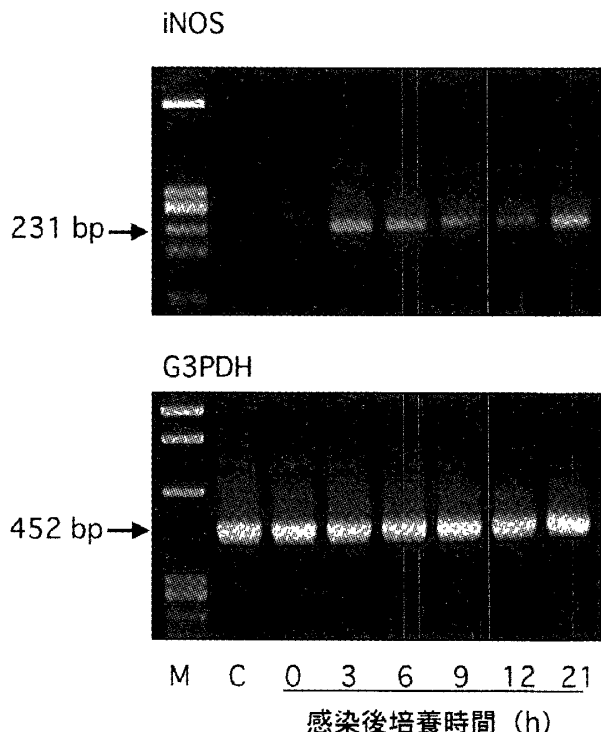


図2 *A. actinomycetemcomitans* Y 4 株感染マクロファージにおけるiNOS mRNAの発現

M:分子量マーカー

C:非感染J 774.1細胞

非感染細胞および感染操作終了直後(C)ではiNOS mRNA発現を認めないが、感染後3時間より21時間までiNOS mRNA発現を認めた。

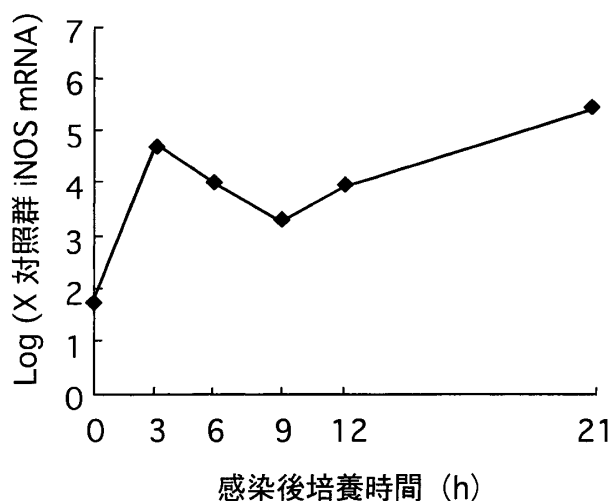


図3 *A. actinomycetemcomitans* Y4株感染後, 0, 3, 6, 9, 12, 21時間後のマクロファージにおけるiNOS mRNA発現量 (LightCycler™) 感染操作終了直後(C)ではiNOS mRNA発現を認めないが, 感染後3時間より急激に増加しその後減少したが21時間までiNOS mRNA発現を認めた。

iNOS mRNA発現量は感染後3時間に急激に増加し6時間以降に若干減少した後, 21時間では3時間の発現量と同程度以上に増加した。

2. マクロファージ培養上清中のNO量

感染操作終了後3時間では, S-Methyl-ITU

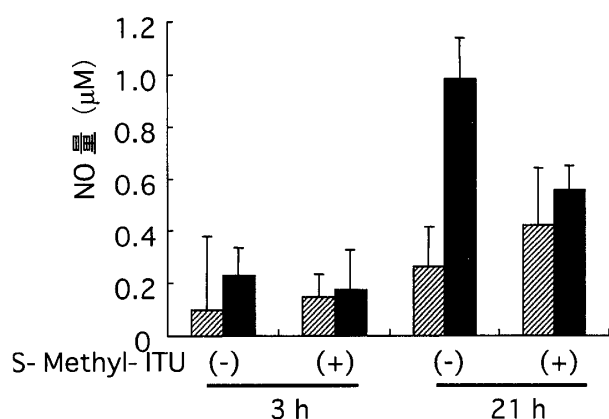


図4 感染操作終了後21時間におけるマクロファージ培養上清中のNO量
 非感染 J 774.1 細胞 (斜線)
 感染 J 774.1 細胞 (黒)
 * $p < 0.05$ N.S.: 有意差無し
 感染後21時間で*A. actinomycetemcomitans* Y4株の感染によりNOの産生量が非感染細胞の約3倍まで増加した。また, S-Methyl-ITUの添加により感染細胞のNO産生量は抑制された。

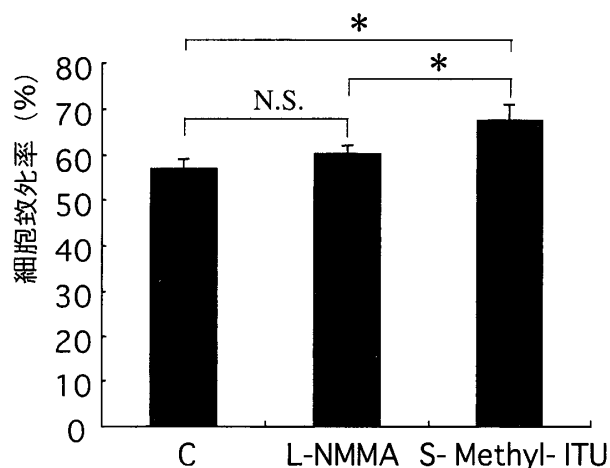


図5 感染操作終了後48時間における*A. actinomycetemcomitans* Y4株感染マクロファージの細胞致死率の測定
 C: 感染 J 774.1 細胞
 * $p < 0.05$ N.S.: 有意差無し
A. actinomycetemcomitans Y4株感染細胞の細胞致死率はS-Methyl-ITUの添加により有意に増加した。

添加の有無に関わらず, 非感染細胞と感染細胞との間で培養上清中のNO量に差は認められなかった。感染操作終了後21時間では, S-Methyl-ITUを添加しなかった細胞では, 感染細胞では非感染細胞に比べて有意ではないがNO量が約3倍に増加していた。しかし, S-Methyl-ITUを添加した細胞では, 感染細胞は非感染細胞に比べてわずかにNO量が増加していた (図4)。

3. 感染マクロファージの細胞致死率

NOS阻害剤を添加しない感染細胞(C)では, 細胞致死率が約60%であった。これにL-NMMAを添加した細胞では, 細胞致死率は有意ではなかったが, わずかに増加した。しかし, S-Methyl-ITUを添加した細胞では, 細胞致死率が有意に増加していた (図5)。

4. マクロファージ培養上清中のLDH活性

感染操作終了後3時間では, S-Methyl-ITU添加の有無に関わらず, 感染細胞は非感染細胞に比べて有意に培養上清中LDH活性が増加していた。しかし, 感染細胞においてS-Methyl-

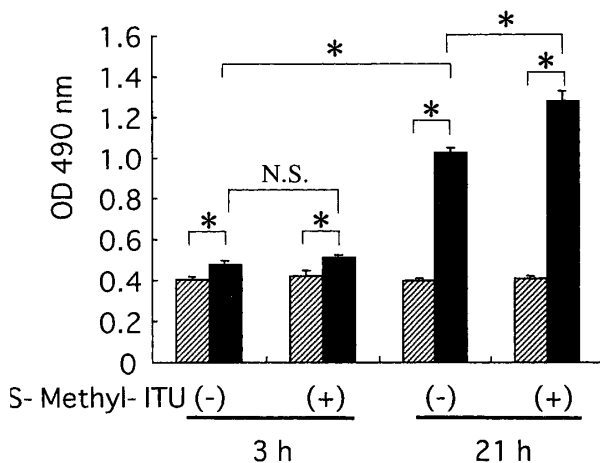


図6 感染操作終了後21時間におけるマクロファージ培養上清中のLDH量

■ 非感染 J 774.1細胞
■ 感染 J 774.1細胞

* $p < 0.05$ N.S.: 有意差無し

感染操作終了3時間で感染細胞のLDH活性は非感染細胞に比べ有意に増加した。感染操作終了21時間では感染細胞のLDH活性は非感染細胞に比べ有意に増加し、S-Methyl-ITUの添加によりさらに増加した。

ITU添加の有無によりそのLDH活性に有意差は認められなかった。感染操作終了後21時間でもS-Methyl-ITU添加の有無に関わらず、感染細胞は非感染細胞に比べて有意に培養上清中LDH活性が増加していた。さらに感染細胞にS-Methyl-ITUを添加した細胞では、非添加の細胞に比べLDH活性の有意な増加が認められた(図6)。

5. マクロファージ細胞内のDNA断片化

感染操作終了後3時間では、S-Methyl-ITU添加の有無に関わらず、感染細胞は非感染細胞に比べて有意にDNA断片化が増加していた。しかし、感染細胞においてS-Methyl-ITU添加の有無によりそのDNA断片化に有意差は認められなかった。感染操作終了後21時間でもS-Methyl-ITU添加の有無に関わらず、感染細胞は非感染細胞に比べて有意にDNA断片化が増加していた。さらに感染細胞にS-Methyl-ITUを添加した細胞では、非添加の細胞に比べDNA断片化の有意な増加が認められた(図7)。

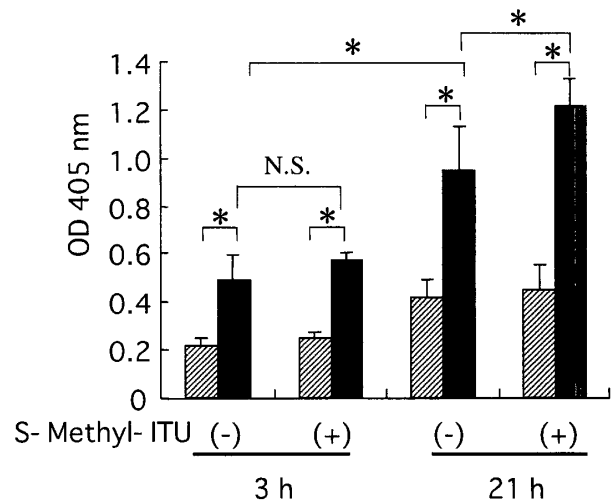


図7 感染操作終了後21時間におけるマクロファージ細胞内のDNA断片化

■ 非感染 J 774.1細胞
■ 感染 J 774.1細胞

* $p < 0.05$ N.S.: 有意差無し

感染操作終了3時間で感染細胞のDNA断片化は非感染細胞に比べ有意に増加した。感染操作終了21時間において感染細胞のDNA断片化は非感染細胞に比べ有意に増加し、S-Methyl-ITUの添加によりさらに増加した。

6. 感染マクロファージ細胞内カスパーゼ活性

感染操作後、S-Methyl-ITUを添加し21時間培養を行った。培養終了後の細胞を回収し、細胞内のカスパーゼ1, 3, 5, 6, 8, 9活性を測定した。カスパーゼ1活性は、図8に示すようS-Methyl-ITUを添加しなかった場合、感染細胞と非感染細胞の間には有意な差は認められなかった。しかし、S-Methyl-ITUを添加した場合は、感染細胞では非感染細胞に比べてカスパーゼ1活性が有意に増加していた。また、感染細胞にS-Methyl-ITUを添加した場合は活性が有意に増加した。カスパーゼ3活性は、S-Methyl-ITU添加の有無に関わらず、感染細胞は非感染細胞に比べて有意に活性が増加していた。また、カスパーゼ1と同様、感染細胞にS-Methyl-ITUを添加した場合は活性が有意に増加した。カスパーゼ5, 6, 8, 9活性については、各々、活性の大小に差は見られたが、カ

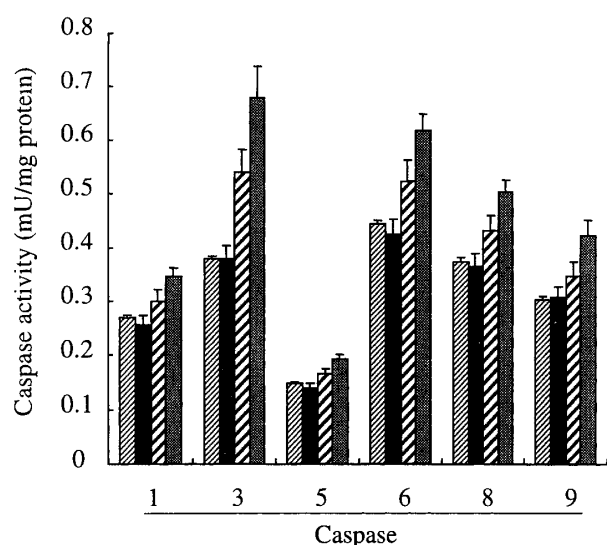


図8 感染操作終了後21時間におけるマクロファージ細胞内のカスパーゼ活性

- ▨ 非感染 J 774.1細胞
- 感染 J 774.1細胞
- ▤ 非感染細胞+SMT
- 感染細胞+SMT

* $p < 0.05$ N.S.: 有意差無し

A. actinomycetemcomitans Y 4 株感染細胞のカスパーゼ 1, 3, 5, 6, 8, 9 活性は S-Methyl-ITU (SMT) の添加により有意に増加した。

スパーゼ 1 と全く同じ傾向を示した (図 8)。

IV. 考 察

近年、血管内皮細胞から生成される内皮細胞由来血管弛緩因子 (EDRF) の本体が NO であることが明らかになり、NO の生理的役割について盛んに研究されるようになった¹⁹⁾。生体内において NO は L-アルギニンを基質として NO 合成酵素 (NOS) により産生される²⁰⁾。NOS には神経型 NOS (nNOS)、血管内皮型 NOS (eNOS) および炎症反応により誘導される誘導型 NOS (iNOS) の 3 種のアイソザイムが存在する。これらの酵素により産生される NO は、血管弛緩に限らず神経系での神経情報伝達や免疫系での広範囲な炎症反応のモジュレーター分子として機能している²⁰⁾。一方、過剰に産生された NO は細胞傷害のメディエーター分子として病理的作用に深く関わっている可能性が示唆されてい

る。近年、サイトカインなどにより活性化したマクロファージにおいて、通常発現していない iNOS が発現し NO を産生することが明らかになった¹⁵⁾。産生された NO は、病原性細菌に対し抗菌作用を示すことが報告されている¹⁶⁾。われわれは、マクロファージに *A. actinomycetemcomitans* を感染させる実験系を確立し、感染後にマクロファージに誘導されるアポトーシスについて研究を重ねてきた^{9,10)}。マクロファージ細胞に貪食された *A. actinomycetemcomitans* は、おそらく NO による抗菌作用で殺菌され则认为られる¹⁷⁾。そこで本研究では、*A. actinomycetemcomitans* 感染 J774.1 細胞内で NO が産生されている可能性について検討した。

これまでの研究の結果^{9,10)}から、感染後 48 時間では MTT アッセイによる増殖活性が有意に減少していたので、まず感染後 48 時間において iNOS mRNA の発現が認められるかどうか検討した。非感染細胞ではわずかにバンドが認められたが、感染細胞では著明なバンドの発現が認められた (図 1)。NOS 阻害剤の添加は iNOS mRNA の発現には影響を与えなかったことから、おそらく NOS 阻害剤は iNOS の誘導には影響を与えない可能性が示唆された。次に、感染初期における iNOS mRNA 発現量を経時的に検討した。感染後 3 時間より感染後 21 時間まで、感染マクロファージに iNOS mRNA 発現が認められたが、感染後 6, 9 時間において発現量は減少していた (図 2, 3)。一般に、iNOS の誘導はインターロイキン 1 β (IL-1 β)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターフェロン γ (IFN- γ) などの炎症性サイトカインを介すると報告されている^{22,23)}。これらのサイトカインの中でも TNF- α は、感染初期に迅速に放出され、マクロファージの活性化や IL-1 産生の促進など多彩な作用を持つことが知られている。実際、感染後の培養上清中サイトカイン量を調べた予

備実験では、感染後3時間でIL-1 β 量は2.39 pg/ml, TNF- α 量は1.73ng/mlで、IL-1 β 量の約700倍量のTNF- α が産生されていた (data not shown). さらに、TNF- α 量は21時間後には約10倍に増加していた。感染マクロファージにおいても、感染初期に産生されたTNF- α が細胞自身に複雑な影響を与えているのかもしれない。iNOS mRNAの発現状態に二相性の変化が認められたのは、このようなTNF- α の働きに起因するものかもしれない。

感染細胞においてiNOS mRNAが発現され、iNOSが誘導される可能性が示唆されたので、感染細胞が実際にNOを産生しているかどうかについて検討した。その結果、感染操作終了後21時間の感染細胞では非感染細胞に比べ培養上清中のNO量に増加が認められ、感染操作時にS-Methyl-ITUを添加した細胞では、非感染細胞と比べNO量の増加はわずかであった。(図4)。しかし、感染によるNO量の増加は有意ではなかった。これは、細胞外に漏出してくるNO量が極微量で、Griess試薬の感度の限界に近いためであると考えられる。今後は、高感度な蛍光色素を用いた定量法などを考慮する必要があると考えられた。

これまで、生体内で産生されるNOについてはアポトーシスを抑制する、あるいは促進する、という相反する報告が認められる^{24,25)}。そこで、本研究ではNOS阻害剤の添加によりどのような影響が認められるか検討した。感染操作後にL-NMMAあるいはS-Methyl-ITUを添加したところ、細胞致死率はわずかに増加した(図5)。また、培養上清中の乳酸脱水素酵素(LDH)は感染後にS-Methyl-ITUを添加すると増加した(図6)。これらの結果から、NOS阻害剤の添加によりNOの産生を抑制すると細胞死が促進されることが明らかとなった。さらに、アポトーシスの一つの指標であるDNA断片化についてもNOS阻害剤の添加により大幅に増加したこ

とにより、感染細胞内で産生されたNOはDNA断片化を抑制して細胞死を抑制している可能性が示唆された。

アポトーシスの実行過程には、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ることが知られている²⁶⁾。活性化されたカスパーゼは、アポトーシスの実行過程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^{11,28)}。例えば、ストレス誘導アポトーシスでは細胞のストレス負荷によりカスパーゼ9が活性化され、次いでカスパーゼ9がカスパーゼ3を活性化する。このようなカスパーゼ活性のカスケードが、ストレス誘導アポトーシスのメカニズムとして提唱されている²⁸⁾。また、デスファクターを介するアポトーシス誘導時のカスパーゼ活性化では、FasリガンドのFasへの結合により、カスパーゼ8が活性化する。その後、実行カスパーゼであるカスパーゼ3を活性化することにより、デオキシリボヌクレアーゼ(caspase-3-activated DNase; CAD)の活性化が生じ、DNAの断片化が引き起こされることが考えられている^{12,29)}。

本研究の結果から、感染細胞内で産生されたNOはDNA断片化を抑制して細胞死を抑制している可能性が示唆されたので、NOがどのようなメカニズムでDNA断片化を抑制しているかについて検討した。その結果、NOS阻害剤を添加しない場合、感染操作によってカスパーゼ活性が有意に増加したのはカスパーゼ3のみであった。しかし、NOS阻害剤を添加した場合は、感染操作によっていずれのカスパーゼ活性も有意に増加していた。このことから、感染細胞内で産生されるNOはカスパーゼ3以外のカスパーゼの活性化を抑制している可能性が示唆された。カスパーゼ3については、NOによる抑制が認められるものの、感染によりそれ以上に活性が増加していると考えられた。これまで、NOはタンパク質のシステイン残基のスルフヒドリ

ル基 (-SH) をニトロソ化し-SNO を生成することが知られており、大腸菌を用いた酵素学的検討により、カスパーゼ 1 またはカスパーゼ 3 を NO で処理することでカスパーゼ活性は不可逆的非競合阻害により完全に消失することが報告されている^{24,30,31)}。A. *actinomycetemcomitans* 感染細胞内での NO によるカスパーゼ抑制のメカニズムについては、完全ではないが少なくともカスパーゼの一部がニトロソ化することにより不活化されている可能性が考えられる。

以上のことから、A. *actinomycetemcomitans* Y 4 株を感染させたマクロファージでは、感染により細胞内に NO が産生され、産生された NO がカスパーゼ活性を一部不活化することにより、アポトーシスの誘導を抑制している可能性が示唆された。

V. 結 論

本研究では、A. *actinomycetemcomitans* Y 4 株感染マクロファージのアポトーシス発現における NO の影響について検討し、以下の結果が得られた。

1. 感染操作終了後 3 時間から感染マクロファージに iNOS mRNA の発現が認められた。iNOS mRNA の発現に NOS 阻害剤の添加は影響をおよぼさなかった。
2. 感染マクロファージでは、培養上清中の NO 量は増加し、NOS 阻害剤の添加により NO 量は減少した。
3. 感染マクロファージにおけるアポトーシス誘導は、NO 産生を抑制すると増加した。
4. 感染によりマクロファージのカスパーゼ活性 (特にカスパーゼ 3) は増加し、NO 産生を抑制するといずれの活性も増加した。

以上の結果から、A. *actinomycetemcomitans* Y 4 株感染マクロファージでは、感染による刺激でマクロファージ細胞内に iNOS が誘導され

て、NO が産生されることが明らかとなった。また、NO の産生を抑制することによりカスパーゼ (特にカスパーゼ 3) 活性が増加することから、A. *actinomycetemcomitans* Y 4 株感染により産生された NO は、細胞内での殺菌に関与するとともに、誘導されるアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御教示、御校閲を頂きました北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座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中島啓介助教授に心から感謝の意を表します。本研究の実施にあたり、御協力頂きました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., Dahlen, G., Wikstrom, 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. Gmur, R., Manabb, H., van Steenberg, T. M. J., Baehni, P., Mombelli, A., van Winkelhoff,

- A. J. and Guggeheim, B.: Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype. *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. Genco, R. J. and J. Slots: Host responses in periodontal disease. *J. Dent. Res.*, **63**: 441-451, 1984.
 9. 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.
 10. Muro, M., Koseki, T., Akifusa, S., Kato, S., Kowashi, Y., Ohsaki, Y., Yamamoto, 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.
 11. Enari, H., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamitsu, A. and Nagata, S.: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, **391**: 43-50, 1998.
 12. Sakahira, H., Enari, M. and nagata, S.: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, **391**: 96-99, 1998.
 13. 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.
 14. Nonaka, K., Ishisaki, A., Okahashi, N., Koseki, T., Kato, S., Muro, M., Nakashima, K., Nishihara, T., Kowashi, Y.: Involvement of caspases in apoptotic cell death of murine macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontal Res.*, **36**: 40-47, 2001.
 15. Blix, I. J. and K. Helgeland.: LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. *Eur. J. Oral Sci.*, **106**: 576-581, 1998.
 16. Weiss, G., Wenner-Felmayer, G., Werner, E. R., Grunewald, K., Wachter, H., and Henztle, M. W.: Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J. Exp. Med.*, **180**: 969-976, 1994.
 17. Nathan. C. and Xie. Q.: Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. A review. *Cell*, **78**: 915-918, 1994.
 18. 赤池考章, 前田 浩: NOの生理活性. *消化器内科*, **14**: 671-680, 1999.
 19. Beckerman, K. P., Rogers, H. W., Corbett, J. A., Schreiber, R. D., McDaniel, M. L., and Unanue, E. R.: Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. *J. Immunol.*, **150**: 888-895, 1993.
 20. Ignarro, L. J., Harbison, R. G., Wood, K. S. and Kadowits, P. J.: Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**: 893-900, 1986.
 21. Bredt, D. S. and Snyder, S. H.: Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Rev. Biochem.*, **63**: 175-195, 1994.
 22. Stuehr, D. J.: Mammalian nitric oxide synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**: 217-230, 1999.
 23. Marletta, M. A., Hurshman, A. R., Rusche, K. M.: Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**: 656-663, 1998.
 24. Kim, Y. M., Talanian, R. V., Biller, T. R.: Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **272**: 31138-31148, 1997.
 25. Tsuji, A. and Sakurai, H.: Generation of nitric oxide from streptozotocin (STZ) in the presence of copper (II) plus ascorbate: implication for the development of STZ-induced diabetes. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun., **245** : 11-16, 1998.
26. Cryns, V. & Yuan, J.: Proteases to die for. Genes Dev., **12** : 1551-1570, 1998.
27. Cohen, G. M.: Caspase: the executioners of apoptosis. Biochem. J., **326** : 1-16, 1997.
28. Ashkenazi, A. and Dixit, V. M.: Death receptors: signaling and modulation Science, **281** : 1305-1308, 1998.
29. Green, D. R. and Reed, J. C.: Mitochondria and apoptosis. Science, **281** : 1309-1312, 1998.
30. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. and Zeiher, A. M.: Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. J. Exp. Med., **185** : 601-607, 1997.
31. Ogura, T., Tatemichi, M. and Esumi, H.: Nitric oxide inhibits CPP32-like activity under redox regulation. Biochem. Biophys. Res. Commun., **236** : 365-369, 1997.