

〔原 著〕

Actinobacillus actinomycetemcomitans 感染による
ヒト単球細胞のアポトーシス発現について

杉村 典彦, 加藤 幸紀, 中島 啓介, 古市 保志

北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座

Actinobacillus actinomycetemcomitans induces
apoptosis in human monocytic cells

Norihiro SUGIMURA, Satsuki KATO, Keisuke NAKASHIMA and Yasushi FURUICHI

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

Abstract

We have reported that *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection induced apoptosis in a murine macrophage cell line, J774.1 cells. It is known that the human and murine immune cell response is different because of cell surface structure differences. In addition, mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity is directly involved in apoptosis of infected THP-1 cells. Previous studies have implicated protein kinase C (PKC) as an upstream regulator of MAPK. The aim of this study was to clarify whether human immune cells undergo apoptosis following *A. actinomycetemcomitans* infection.

A. actinomycetemcomitans and human monocytic THP-1 cells (1000 : 1) were suspended in microtubes. The tubes were centrifuged at 1000 x g for 10 min and incubated at 37°C for 30 min. Non-adherent bacterium were washed out by a series of centrifugations. Infected cells were transferred to a 24-well culture plate, and incubated for 24 h. Culture supernatant and nuclei were prepared from the infected cells to measure for LDH activity, DNA fragmentation, MAPK activity, and tumour necrosis factor α (TNF- α) levels.

A. actinomycetemcomitans-infected THP-1 cells were shown by an increase in the proportion of LDH release, fragmented DNA, p38 MAPK activity and TNF- α levels. The LDH release and DNA fragmentation were inhibited by the addition of p38 MAPK inhibitor (SB203580) or anti-TNF- α antibody or PKC inhibitor (H-7). The TNF- α levels in the infected cells decreased on addition of SB203580 or anti-TNF- α antibody. However, exogenous TNF- α did not induce apoptosis in uninfected THP-1 cells. Further, H-7 suppressed the p38 MAPK activity of the infected cells in a dose-dependent manner, while PKC activator (PMA) enhanced LDH release, DNA fragmentation, and p38 MAPK activity.

These results suggested that the p38 MAPK activity was the most important signal for apoptosis. The p38 MAPK activity was regulated by PKC and TNF- α in *A. actinomycetemcomitans*-infected THP-1 cells.

Key words : human monocytic cells, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, apoptosis

緒 言

歯周病は、歯を支持する歯周組織の破壊により、口腔機能に著しい障害をもたらす疾患である。この歯周病の

発症には、歯周病原性細菌と呼ばれる一部のグラム陰性細菌が深く関与していることが報告されている (Bragd et al., 1987) (Slots and Listgarten, 1988)。歯周病原性細菌の感染と、感染に伴う生体側の持続的な免疫応答の結果

受付：平成17年3月31日

として、歯周組織に炎症が生じると考えられる (Vandestein et al., 1984) (Sandholm, 1985). 歯周病原性細菌のひとつに *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) があり、様々な型の歯周病の発症と進行に関与する (Slots et al., 1980) (Haraszthy et al., 2000) (Muller et al., 2001) (Haubek et al., 2002). *A. actinomycetemcomitans* は、1) 歯肉上皮への侵入、2) ロイコトキシンなどの外毒素による細胞破壊、3) 細胞増殖抑制因子の産生、4) リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) による細胞活性化、などの能力を有していることが明らかにされている (Henderson et al., 2002). これまで我々は、マウスマクロファージ細胞株である J774.1 細胞に *A. actinomycetemcomitans* を感染させる *in vitro* の実験系を確立したところ、*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージ細胞に細胞死が惹起されることを明らかにした (Kato et al., 1995). この細胞死は、DNA 断片化の増加、TUNEL 陽性細胞の検出およびカスパーゼ 3 活性の上昇からアポトーシスによるものであることを報告した (Nonaka et al., 2001). また、ヒト口腔上皮細胞株である KB 細胞においても *A. actinomycetemcomitans* の感染によりアポトーシスが誘導されることを明らかにした (Kato et al., 2000). これらの結果から、われわれは *A. actinomycetemcomitans* が歯周組織を構成する細胞に感染すると、まず歯周組織の防御の最前線を担う上皮細胞がアポトーシスによる細胞死に至ることにより、結合組織層に *A. actinomycetemcomitans* が侵入しやすい環境を作る。さらに結合組織層に *A. actinomycetemcomitans* が侵入し、単球/マクロファージ細胞に感染し、その後感染細胞がアポトーシスによる細胞死に至ることで、免疫応答に何らかの影響を及ぼして歯周病の発症と進行に関与している可能性を推測した。しかし、一般にマウス由来免疫細胞とヒト由来免疫細胞とは、細胞表面の抗原認識レセプターの違いにより、抗原認識における免疫応答が異なることが報告されている (Ferrero et al., 1990). このためヒト免疫細胞における感染後の細胞内情報伝達機構が、マウスマクロファージ細胞とは異なる可能性が考えられる。

近年、リン酸化によって活性化されるセリン/スレオニンキナーゼである mitogen-activated protein kinase (MAPK) がアポトーシス発現における細胞内情報伝達機構に関与するという報告がされた (Xia et al., 1995). MAPK は、放射線、紫外線、浸透圧などの物理的ストレスと腫瘍壊死因子- α (TNF- α), インターロイキン 1 (IL-1) などの炎症性サイトカインや活性酸素といった化学的ストレスなど様々なストレス刺激により活性化され、細胞にアポトーシスを誘導すると考えられている

(Kyriakis and Avruch, 2001).

アポトーシスをはじめとした細胞の動態変化がサイトカインによって制御されていることが報告されている (Nagata, 1997). その中でも TNF- α は、骨吸収を惹起する過程における破骨細胞活性因子のひとつであり、歯周組織破壊において重要な役割を果たす (Kamaguchi et al., 1989) (MacEwan, 2002) (Stashenko et al., 1991). さらに、*A. actinomycetemcomitans* 感染マウスマクロファージ細胞において、感染前にすでに細胞内には TNF- α mRNA が存在し、感染による刺激によりすみやかに mRNA から翻訳が開始されて細胞外へ産生される (伊藤ら, 2004). また、*A. actinomycetemcomitans* Y4 株由来の LPS 刺激により活性化された末梢血中のヒト単球細胞から TNF- α が産生されることが報告されている (Lindemann et al., 1988).

Nonaka らは、マウスマクロファージ細胞のアポトーシス誘導に protein kinase の中で protein kinase C (PKC) が関与していることを明らかにした (Nonaka et al., 1998). 最近、白血病細胞株である U937 細胞をカルシウムチャンネルブロッカーである tetrandrine で処理するとアポトーシスが発現し、その細胞内情報伝達系において PKC が p38 活性を制御するという報告がされた (Jang et al., 2004).

そこで本研究では、1) *A. actinomycetemcomitans* をヒト単球系細胞である THP-1 細胞に感染させる実験系を確立し、感染細胞のアポトーシス発現について検討する、2) *A. actinomycetemcomitans* 感染ヒト単球細胞のアポトーシス誘導における細胞内情報伝達系について検討を加える、ことを目的とした。

材料および方法

1. 実験材料

1) 供試細胞株

本研究ではヒト骨髄単球性白血病細胞株である THP-1 細胞 (JCRB 0112.1) を用いた。THP-1 細胞は 10% 非働化牛胎仔血清 (FBS; Sigma) とペニシリン (10000 Units/ml, Sigma), ストレプトマイシン (10 mg/ml, Sigma) を含む RPMI 1640 培地 (Sigma) を使用して 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

2) 供試細菌株

歯周病原性細菌として *A. actinomycetemcomitans* Y4 株を使用した。*A. actinomycetemcomitans* Y4 株は Todd-Hewitt (Difco) に 1% Yeast Extract (Difco) を加えた培地で 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

2. 実験方法

1) 感染実験方法

抗生剤不含RPMI1640培地で調整した*A. actinomycetemcomitans* Y4株を、細菌：細胞比率が500：1, 1000：1, 2500：1となるようにそれぞれマイクロチューブ内のTHP-1細胞に添加し、1000×gで10分間遠心した。遠心後、37°C、5%CO₂存在下で30分間培養した。培養後、細胞に取り込まれなかった菌を取り除くために、遠心操作を用いてペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン(200 µg/ml, Sigma)を添加したRPMI1640培地で3回洗浄した。洗浄終了後、細胞を同じ抗生剤を含んだ5%FBS-RPMI1640培地に懸濁し、6穴培養プレート(Becton Dickinson)に播種して培養した。

2) 細胞死の検出方法

(1) LDH活性の測定

細胞死の指標として、Cytotoxicity Detection Kit (Roche)を用いて培養上清中の乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定した。まず感染操作後、24時間培養した後に培養上清を採取した。この上清をサンプルとして用い、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のち、490 nmにおける吸光度を測定しLDH活性の指標とした。

(2) DNA断片化の測定

アポトーシスをおこした細胞では、細胞内にヒストン/DNA断片化複合体が出現する。このヒストン/DNA断片化複合体をCell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche)を用いて検出し、感染細胞内のDNA断片化の定量を行った。

(3) アガロースゲル電気泳動法

感染細胞から抽出したDNAを用いて2%アガロースゲル電気泳動法を行い、アポトーシスの指標となる断片化DNA(ラダーパターン)を検出した。培養終了後、あらかじめ4°Cに冷やしておいた10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA・2Na, 1% TritonX-100からなる細胞溶解液に懸濁した。10,000×gで20分間遠心操作を行い、上清に0.5 mg/mlのRNase (Roche)を20 µl加え、37°Cで1時間処理した。さらに10 mg/mlのProteinase K (Invitrogen Corp)を加え、50°Cにて1時間処理した。さらにフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1, v/v)(Gibco)を用いてDNAを抽出し、その後エタノール沈殿を行った。これをDNA緩衝液(10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0)で溶解し、DNA量を2.0 µg/µlに調整した。このDNAサンプルを2%アガロースゲル上に添加し、Mupid-2(コスモ・バイオ)を用いて100Vの低電圧にて電気泳動を行った。

泳動後、エチジウムプロマイド(1 µg/ml; 和光純薬)で染色を行い、DNAを検出した。DNAマーカーとしては、100bp DNA Ladder(タカラバイオ)を用いた。

3) MAPK活性の測定

A. actinomycetemcomitans Y4株を感染させたTHP-1細胞を0, 1, 2, 3, 4, 5, 6および24時間培養した。培養後、10 mM Tris-HCl (pH7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na₂P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (Sigma)からなる細胞溶解液に懸濁した。この溶解液中のリン酸化したextracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, c-jun^N-terminal kinase (JNK)の各MAPKを各ELISA kit (ERK 1/2 ELISA kit, p38 MAPK ELISA kit, JNK 1/2 ELISA kit; BioSource)を用いて測定した。

4) *A. actinomycetemcomitans*感染細胞からのTNF-αの産生

*A. actinomycetemcomitans*感染細胞から産生されるTNF-αについて検討するために、感染12時間後に培養上清中に放出されたTNF-α量をHuman TNF-α ELISA Kit (BioSource)を用いて測定した。また感染実験時に抗TNF-α抗体(anti-human tumor necrosis factor-α antibody, 20 µg/ml; Sigma)を添加して、LDH活性とDNA断片化を測定した。

5) *A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス誘導におけるPKCの影響について

PKC活性阻害剤であるH-7(生化学工業)と活性化剤であるphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma)を用いて検討を加えた。THP-1細胞にH-7(20 µM)あるいはPMA(10 nM)を添加して30分間培養した。培養後*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させ24時間培養し、LDH活性およびDNA断片化を測定した。

3. 統計処理

各測定値の比較は、unpaired *t*-検定あるいはTukey-KramerのHSD検定により検定を行い、*p*<0.05を有意差ありと判定した。

結 果

1. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞の細胞死発現について

A. actinomycetemcomitans Y4株に感染したTHP-1細胞のLDH活性は、非感染細胞で0.06±0.01であったのに対して、細菌/細胞比率が500：1のときに0.18±0.05, 1000：1のときに0.29±0.05, 2500：1のときに

0.68±0.04となり、非感染細胞に比べて感染比率の増加に伴って、LDH活性の上昇を認めた。また、感染細胞のDNA断片化を調べたところ、非感染細胞で0.43±0.05であったのに対して、細菌/細胞比率が500:1のときに0.66±0.11, 1000:1のときに0.89±0.08, 2500:1のときに1.34±0.07となり、感染比率の増加に伴いDNA断片化の上昇を認めた(図1)。さらにアガロースゲル電気泳動像において、アポトーシス細胞に特徴的な

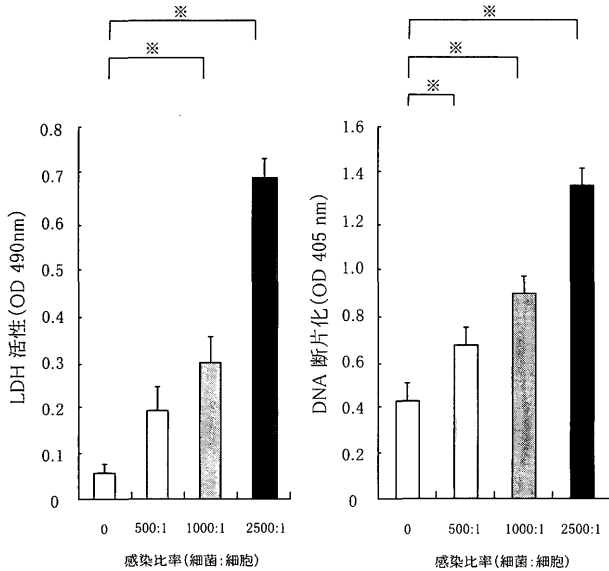
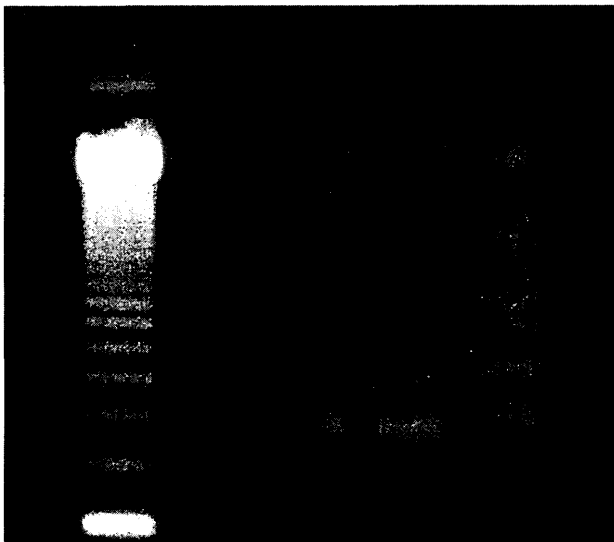


図1 *A. a*感染細胞のLDH活性およびDNA断片化

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率(細菌:細胞)が0(□), 500:1(□), 1000:1(■), 2500:1(■)となるように感染させて24時間培養した後、培養上清中のLDH活性および細胞内のDNA断片化を測定した。* $p < 0.05$ で有意差ありとした。



マーカー 0 500:1 1000:1 2500:1
感染比率 (細菌:細胞)

図2 *A. a*感染細胞の断片化DNA所見(2%アガロースゲル電気泳動)

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率(細菌:細胞)が0, 500:1, 1000:1, 2500:1となるように感染させて36時間培養した。培養後、細胞内からDNAを抽出し、2%アガロースゲル電気泳動により断片化DNAを検出した。

断片化DNA所見(ラダーパターン)が、感染細胞にのみ認められ、その所見は感染比率の増加により鮮明化した(図2)。

2. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるMAPKの影響について

*A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるMAPK活性について検討したところ、感染1時間において、非感染細胞におけるp38活性は、110 units/mlであるのに対して、感染細胞では607 units/mlと有意な活性の上昇を認

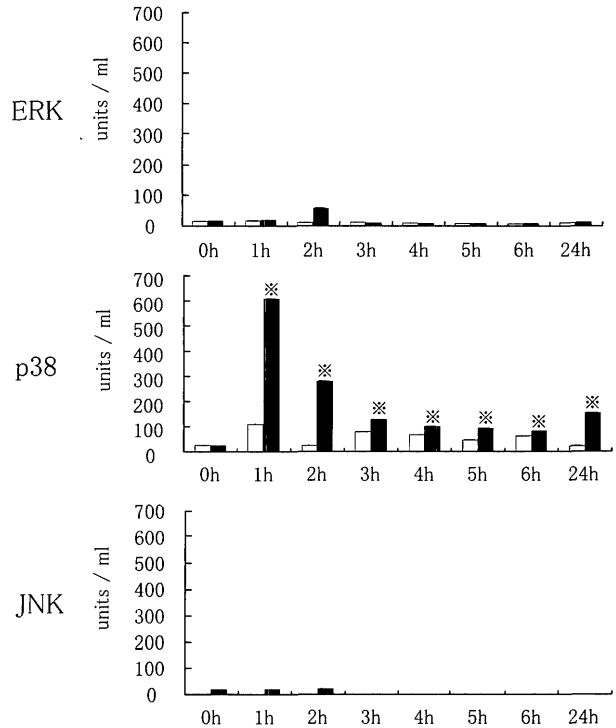


図3 *A. a*感染細胞のMAPKの活性

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率(細菌:細胞)が1000:1となるように感染し、感染直後を0時間として6時間まで1時間毎に24時間までサンプルを回収した。回収したサンプルの細胞内からDNAを抽出し、ELISA法によりMAPK活性を測定した。非感染群を(□), 感染群(細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。*各時間に採取したサンプルにおいて、非感染群と感染群を比較し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

め、その後ゆるやかに減少した。一方ERKおよびJNK活性では、非感染細胞、感染細胞ともに有意な活性の上昇は認められなかった(図3)。

3. p38活性阻害剤の感染細胞に与える影響について

これまでの結果から、感染細胞においてp38のみが活性の上昇を示した。そこでp38に着目し、p38活性を特異的に阻害するSB203580(Calbiochem-Novabiochem)を用いて、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるp38活性を阻害した。細胞数を 2×10^6 個/mlに調整したTHP-1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させる前にSB203580を添加し、30分間培養した。培養後*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細菌:細胞比率が1000:1となるように感染させた。24時間培養後に各種測定を

行った。SB203580を添加した*A. actinomycetemcomitans*感染細胞では、SB203580非添加細胞に比べ、LDH活性の低下が認められた。また、SB203580を添加した*A. actinomycetemcomitans*感染細胞では、SB203580非添加*A. actinomycetemcomitans*感染細胞に比べ、DNA断片化の減少が認められた(図4)。さらにアガロースゲル電気泳

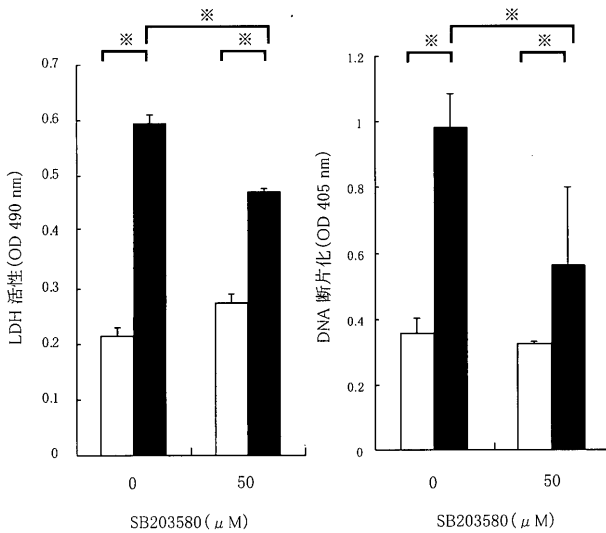
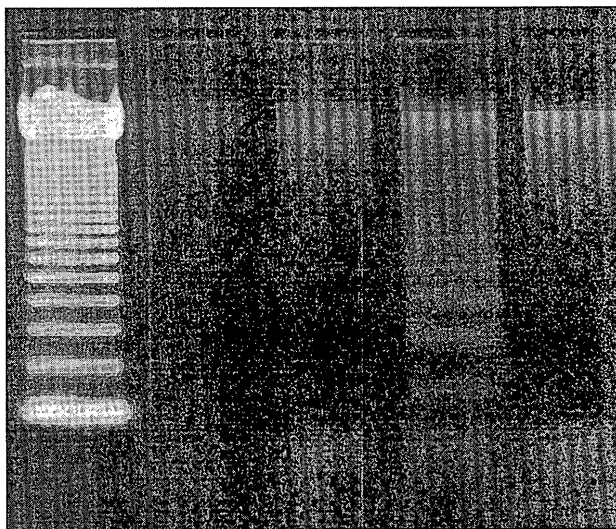


図4 *A. a*感染細胞のSB203580添加によるLDH活性およびDNA断片化への影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前にSB203580 (50 μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率(細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて24時間培養した後、培養上清中のLDH活性および細胞内のDNA断片化をELISA法により測定した。非感染群を(□)、感染群(細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。* $p < 0.05$ で有意差ありとした。



感染	-	-	+	+
SB203580 (μM)	0	50	0	50

図5 p38活性阻害による*A. a*感染細胞の断片化DNA所見

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前にSB203580 (50 μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率(細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて24時間培養した後、細胞内のDNAを採取し、2%アガロースゲル電気泳動法を行った。

動像から、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞に認められたDNA断片化所見は、SB203580の添加により消失した(図5)。

4. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞からのTNF-α産生について

*A. actinomycetemcomitans*感染細胞からのTNF-α産生について検討を行った。感染12時間後におけるTNF-α産生量を測定したところ、非感染細胞では95 pg/mlであるのに対し、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞では1220 pg/mlとTNF-α産生の有意な増加を認めた。またこの感染細胞におけるTNF-α産生は、SB203580の添加により有意に減少した(図6)。さらに、抗TNF-α抗体を用いて*A. actinomycetemcomitans*感染細胞に与える影響を検討したところ、抗TNF-α抗体添加により、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるTNF-α産生の減少が認められた(図7)。加えて、抗TNF-α抗体添加により、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のLDH活性およびDNA断片化は減少した(図8)。抗TNF-α抗体のp38活

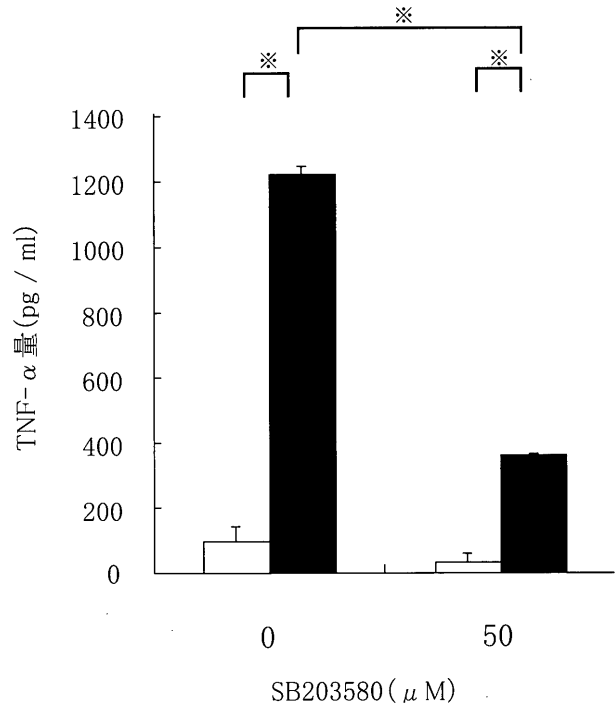


図6 p38活性阻害によるTNF-α産生に与える影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前にSB203580 (50 μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率(細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて12時間培養した後、培養上清中のTNF-α量をELISA法により測定した。非感染群を(□)、感染群(細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。* $p < 0.05$ で有意差ありとした。

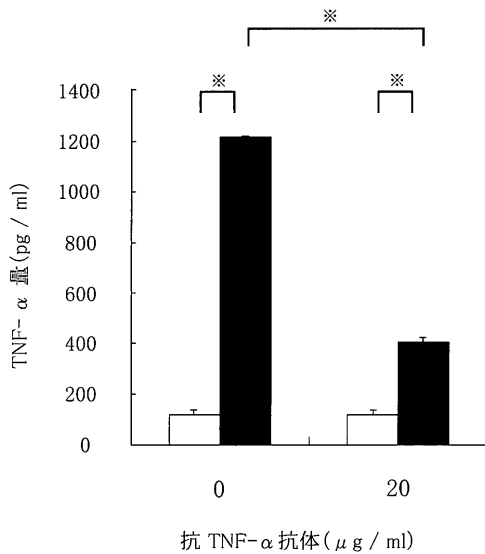


図7 抗TNF-α抗体のTNF-α産生に与える影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前に抗TNF-α抗体 (20μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率 (細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて12時間培養した後、培養上清中のTNF-α量をELISA法により測定した。非感染群を(□)、感染群(細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

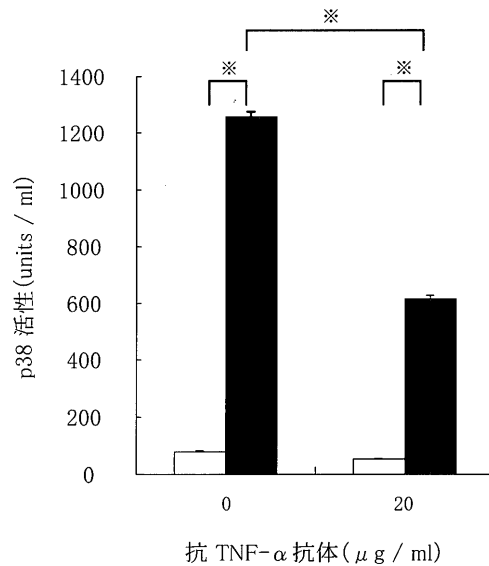


図9 抗TNF-α抗体のp38に与える影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前に抗TNF-α抗体 (20μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率 (細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて1時間培養した後、細胞内のp38活性をELISA法により測定した。非感染群を(□)、感染群(細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

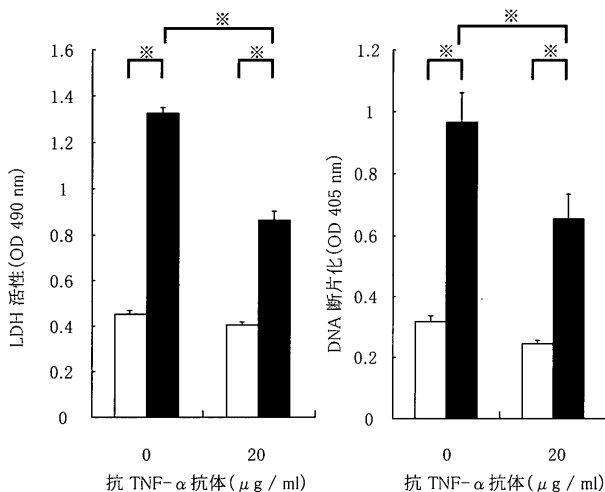


図8 抗TNF-α抗体の細胞死に与える影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前に抗TNF-α抗体 (20μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率 (細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて24時間培養した後、培養上清中のLDH活性およびDNA断片化をELISA法により測定した。非感染群を(□)、感染群(細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

性に与える影響を検討したところ、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるp38活性は、抗TNF-α抗体添加により活性の有意な低下を認めた(図9)。

5. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス誘導におけるPKCの影響について

まず*A. actinomycetemcomitans*感染細胞における細胞死の影響を調べるために、LDH活性およびDNA断片化を測定した。感染細胞におけるLDH活性は、H-7の添加に

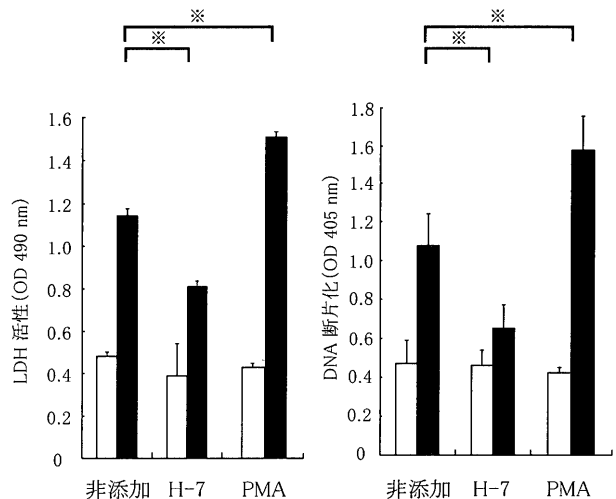


図10 PKC活性阻害および活性化による*A. a*感染細胞の細胞死への影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前にH-7 (20μM)あるいはPMA (10μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率 (細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて24時間培養した後、培養上清中のLDH活性およびDNA断片化をELISA法により測定した。非感染群を(□)、感染群(細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

よって低下し、PMAの添加によって上昇した。また感染細胞におけるDNA断片化もLDH活性同様に、感染細胞においてH-7の添加によって減少し、PMAの添加によって増加した(図10)。次にPKCのp38活性への影響について検討したところ、H-7の添加によって感染細胞のp38活性は非添加細胞に比べて有意に低下した。またPMAの添加によって感染細胞のp38活性は、非添加細胞

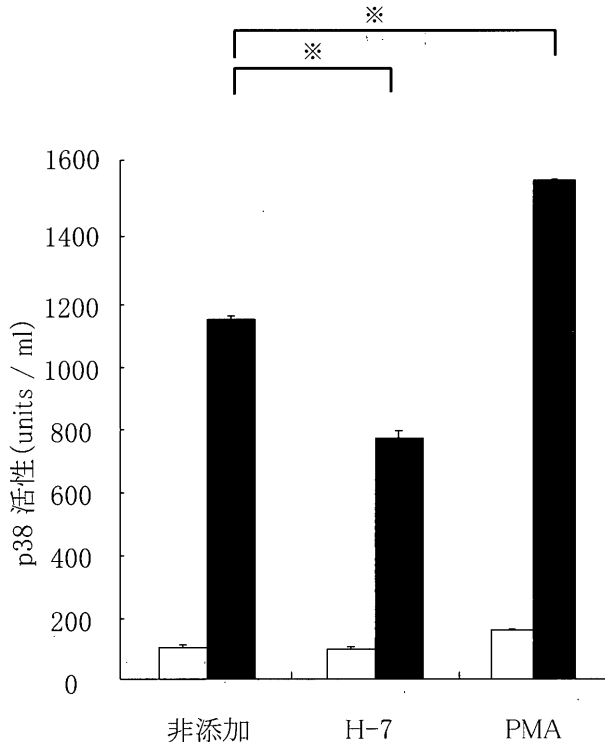


図11 PKC活性阻害およびPKC活性化によるp38活性の変化（感染後1時間）

THP-1細胞に*A.a* Y4株を感染させる30分前にH-7 (20 μ M) あるいはPMA (10 μ M) を加えた。その後THP-1細胞に*A.a* Y4株を感染比率（細菌：細胞=1000：1）となるように感染させて1時間培養した後、細胞内のp38活性をELISA法により測定した。非感染群を(□)、感染群（細菌：細胞=1000：1）を(■)で示す。
 $\ast p < 0.05$ で有意差ありとした。

に比べて有意に上昇した（図11）。

考 察

歯周病の発症メカニズムについては、これまで様々な研究がされてきたが未だ不明な点が多い。われわれは歯周病原性細菌のひとつである*A. actinomycetemcomitans*が感染した上皮細胞やマウスマクロファージ細胞が、アポトーシスによる細胞死に至ることを報告した（Muro et al., 1997）。この結果から、歯周組織破壊に*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現が関与していることが考えられた。単球/マクロファージ細胞は、免疫応答に関して重要な役割を担う細胞である。Manganらは、ヒト単球細胞におけるアポトーシス発現が慢性炎症において重要な役割を果たしていることを報告した（Mangan et al., 1993）。そこで本研究では、ヒト単球系白血病細胞株であるTHP-1細胞に*A. actinomycetemcomitans*を感染させる*in vitro*の実験系を確立し、感染細胞動態をアポトーシスの観点から検討した。

まずTHP-1細胞に*A. actinomycetemcomitans*をマイクロチューブ内で感染させる*in vitro*の実験系を確立したところ、本菌の感染により細胞死の指標であるLDH活性

が増加し、さらにELISA法によるDNA断片化が増加した（図1）。2%アガロースゲル電気泳動法においても感染細胞において断片化DNAが検出されたことから、アポトーシスによる細胞死が発現していることが明らかになった（図2）。これらのことからマウスマクロファージ細胞と同様に、*A. actinomycetemcomitans*の感染によりヒト単球細胞においてもアポトーシスにより細胞死に至ることが明らかになった。近年、アポトーシス発現における細胞内情報伝達機構の1つとしてMAPKファミリーが注目されている。MAPKはそれぞれ特定の部位がリン酸化することにより活性化し、多様な生命現象を制御する（Yamagishi et al., 2003）。MAPKのうちERK経路は、細胞の増殖や分化の情報を媒介する。一方で、JNKやp38 MAPK経路はストレス応答キナーゼ経路とも呼ばれる（Salh et al., 1999）（Place et al., 2003）。細胞は物理的・化学的ストレスに対して生存を維持しようとするが、決定的なダメージを受けた場合にはアポトーシスを引き起こす。そこで本研究においても*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス誘導へのMAPKの関与について検討した。各MAPKに対して特異的にリン酸化部位に結合する抗体を用いたELISA法により各MAPK活性を調べたところ、*A. actinomycetemcomitans*感染後1時間でp38活性の上昇を認めたが、ERKとJNK活性は著明な変化を認めなかった（図3）。このことから*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス誘導にp38が関与している可能性が考えられた。そこでp38に着目して検討を進めた。p38活性阻害剤であるSB203580を添加し、LDH活性とDNA断片化を測定したところ、感染細胞のLDH活性とDNA断片化が減少した（図4）。さらに2%アガロースゲル電気泳動においては、SB203580添加により濃度依存的にラダーパターンが消失した（図5）。これらの結果から*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現にp38が関与していることが考えられた。

TNF- α は、単球/マクロファージなどから産生される炎症性サイトカインであり、破骨細胞の活性化とそれに伴う骨吸収に大きく関与していると報告されている（MacEwan, 2002）。また、p38はTNF- α により活性化される（Park et al., 2002）。そこで*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現におけるTNF- α の役割について検討を加えた。まず感染後12時間後のTNF- α 量をELISA法にて測定したところ、非感染細胞に比べ感染細胞において約13倍のTNF- α 産生を認めた（図6）。またSB203580添加して同様の感染実験を行ったところ、非添加細胞に比べ添加細胞でTNF- α 産生量の有意な減少を認めた（図6）。感染細胞から産生されるTNF- α を

中和するために抗TNF- α 抗体を用いて検討を加えたところ、感染細胞からのTNF- α 産生は減少した(図7). Eissnerらは、ヒトマクロファージに20 $\mu\text{g/ml}$ の抗TNF- α 抗体を添加するとアポトーシスが抑制されたと報告している(Eissner et al., 2000). 本研究においても抗TNF- α 抗体の添加によりLDH活性とDNA断片化が減少した(図8). このことから、培養上清中に産生されたTNF- α が*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシスに関与している可能性が考えられた. Rivadeneiraらは、マウス腹腔マクロファージに10 ng/ml のTNF- α を添加したところ、細胞にアポトーシスが誘導されたと報告した(Rivadeneira et al., 2001). 我々は、感染細胞から産生されたTNF- α 量と同程度の濃度のTNF- α を非感染細胞に添加して培養しても、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞に見られたような細胞死が発現しないことを確認した(Kato et al., 2005). このことから、TNF- α が直接的に感染細胞にアポトーシスを引き起こすのではなく、感染細胞から産生されたTNF- α が何らかの細胞内情報伝達系を活性化することで、アポトーシスを発現させる可能性が考えられた. そこで、抗TNF- α 抗体のp38活性に与える影響について検討したところ、抗TNF- α 抗体の添加により感染細胞のp38活性は有意に低下した(図9). これよりp38活性は感染細胞から産生されるTNF- α と関連している可能性が示された. Parkらは、p38がTNF- α によって誘導されるアポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることを報告している(Park et al., 2002). Gretheらもp38がTNF- α によって活性化され、Bcl-X(L)の活性を抑制することによりアポトーシスを発現させると報告した(Grethe et al., 2004). これらの報告は、本研究結果を支持するものと考えられる.

近年、前立腺腫瘍細胞において活性化されたPKCがp38を活性化させてアポトーシスを促進するという報告がされている(Tanaka et al., 2003). またわれわれは、*A. actinomycetemcomitans*感染によるマウスマクロファージのアポトーシス発現にPKCが関与していることを報告した(Nonaka et al., 1998). そこでヒト単球細胞のアポトーシス発現におけるPKCの影響について検討を加えた. まず*A. actinomycetemcomitans*感染細胞における細胞死の影響を調べるために、LDH活性およびDNA断片化を測定した. 感染細胞におけるLDH活性は、H-7の添加によって低下し、PMAの添加により上昇した(図10). また感染細胞のDNA断片化においてもLDH活性同様に、H-7の添加によって減少し、PMAの添加によって増加した(図10). Zhuangらもまた、PKC活性を抑制するとカスパーゼ8活性を抑制しアポトーシスを抑制すると

報告している(Zhuang et al., 2001). さらにPKCのp38活性への影響について検討したところ、H-7の添加によって感染細胞のp38活性は有意に低下し、PMAの添加によって有意に上昇した(図11). これらの結果から、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のp38の活性化にPKCが影響している可能性が考えられた.

本研究により、ヒト単球細胞であるTHP-1細胞に*A. actinomycetemcomitans*を感染させると、マウスマクロファージ細胞と同様にアポトーシスによる細胞死が発現することが明らかになった. またこのアポトーシス発現には、細胞内のp38活性が重要な役割を果たしており、この活性化は感染細胞から産生されるTNF- α とPKCにより影響されている可能性が考えられた. 歯周組織内の免疫細胞に*A. actinomycetemcomitans*が感染することによりアポトーシスを誘導し、結果として炎症を持続させると考えられる. さらにこれによる慢性炎症の存在は歯周組織破壊へと結びつく. *A. actinomycetemcomitans*が感染した単球/マクロファージ細胞のアポトーシス誘導機序を明らかにすることにより、歯周病の発症メカニズムの解明ならびに歯周病治療に寄与すると考えられる.

結 語

本研究では、*A. actinomycetemcomitans*をヒト単球細胞に感染させる*in vitro*の実験系を確立し、感染細胞のアポトーシス発現について検討し、以下の結果が得られた.

1. ヒト単球細胞に*A. actinomycetemcomitans*を感染させるとアポトーシスによる細胞死が発現することが明らかになった.
2. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現において、MAPKのなかでp38活性の上昇を認められたが、ERKおよびJNK活性の上昇は認められなかった. さらに、感染細胞のp38活性を阻害したところ、感染細胞のアポトーシス発現が減少した.
3. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞において、TNF- α 産生量が非感染細胞に比べて有意に増加した. p38活性を阻害したところ、感染細胞からのTNF- α 産生量は有意に減少した. また抗TNF- α 抗体の添加により、感染細胞のアポトーシス発現とp38活性は有意に低下した.
4. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞において、PKC活性抑制剤の添加によりアポトーシス発現が有意に減少したが、PKC活性化剤の添加によりアポトーシス発現が有意に増加した. さらに、PKC活性抑制剤の添加によりp38活性は有意に減少したが、PKC活性化剤の添加によりp38活性は有意に増加した.

以上の結果より、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現における細胞内情報伝達系にMAPKのなかでp38が最も重要な役割を果たしている可能性が示唆された。このp38活性は、細胞内から産生されるTNF- α あるいはPKCにより影響されている可能性が考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました本学歯学部歯科保存学第一講座 故 小鷲 悠典教授、古市 保志教授、本学歯学部歯科理工学講座 大野 弘機教授に深甚なる感謝の意を表します。また、適切な御指導、御校閲を賜りました本学歯学部口腔解剖学第一講座 矢嶋 俊彦教授、本学歯学部口腔病理学講座 賀来 亨教授に深く感謝致します。さらに、本研究を行うにあたり、御助言、御協力を頂きました本学歯学部歯科保存学第一講座の諸先生に心よりお礼を申し上げます。

文 献

- 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.
- Eissner G, Kirchner S, Lindner H, Kolch W, Janosch P, Grell M, Scheurich P, Andreesen R and Holler E. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. J Immunol 164 : 6193-6198, 2000.
- Ferrero E, Hsieh CL, Francke U and Goyert SM. CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. J Immunol 145 : 331-336, 1990.
- Grethe S, Ares MP, Andersson T and Porn-Ares MI. p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). Exp Cell Res 298 : 632-642, 2004.
- Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E and Zambon JJ. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. J Periodontol 71 : 912-922, 2000.
- Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N and Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol 29 : 657-660, 2002.
- Henderson B, Wilson M, Sharp L and Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Med Microbiol 51 : 1013-1020, 2002.
- 伊藤泰城, 中島啓介, 富岡 純, 加藤幸紀, 小鷲悠典. *A. actinomycetemcomitans*感染マクロファージから産生される炎症性サイトカインのアポトーシス誘導への関与. 日歯保存誌 47 : 420-428, 2004.
- Jang BC, Lim KJ, Paik JH, Cho JW, Baek WK, Suh MH, Park JB, Kwon TK, Park JW, Kim SP, Shin DH, Song DK, Bae JH, Mun KC and Suh SI. Tetrandrine-induced apoptosis is mediated by activation of caspases and PKC-delta in U937 cells. Biochem Pharmacol 67 : 1819-1829, 2004.
- 鎌形有祐, 宮坂伸之, 井上祐子, 橋本純子, 飯田正人. ヒト歯周炎歯周組織から産生されるサイトカインの検討—特にインターロイキン-1 (IL-1 α , β) と腫瘍壊死因子 (TNF- α) について—. 日歯周誌 31 : 843-848, 1989.
- 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.
- Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihara T and Kowashi Y. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. J Med Microbiol 49 : 739-745, 2000.
- Kato S, Sugimura N, Nakashima K, Nishihara T, Kowashi Y. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptosis in human monocyte THP-1 cells. J Med Microbiol 54 : 293-298, 2005
- Kyriakis JM and Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev 81 : 807-869, 2001.
- Lindemann RA, Economou JS and Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. J Dent Res 87 : 1131-1135, 1988.
- MacEwan DJ. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. Br J Pharmacol 135 : 855-875, 2002.
- Muller HP, Heinecke A, Zoller L, Fuhrmann A and Eger T. Gingivitis in young adults with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Clin Oral Invest 5 : 83-88, 2001.
- Mangan DF, Mergenhagen SE and Wahl SM : Apoptosis in human monocytes. Possible role in chronic inflammatory diseases. J Periodontol 64 : 461-466, 1993.
- Muller HP, Heinecke A, Fuhrmann A, Eger T and Zoller L. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. J Periodontal Res 36 : 114-123, 2001.
- 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.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88 : 355–365, 1997.
- Nonaka K, Ishisaki A, Muro M, Kato S, Oido M, Nakashima K, Kowashi Y and 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.
- Nonaka K, Ishisaki A, Okahashi N, Koseki T, Kato S, Muro M, Nakashima K, Nishihara T and Kowashi Y. Involvement of caspases in apoptotic cell death of murine macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res* 36 : 40–47, 2001.
- Park JG, Yuk Y, Rhim H, Yi SY and Yoo YS. Role of p38 MAPK in the regulation of apoptosis signaling induced by TNF- α in differentiated PC12 cells. *J Biochem Mol Biol* 31 : 267–272, 2002.
- Place RF, Haspelslagh D and Giardina C. Induced stabilization of Ikappa B alpha can facilitate its re-synthesis and prevent sequential degradation. *J Cell Physiol* 195 : 470–478, 2003.
- Rivadeneira DE, Grobmyer SR, Naama HA, Mackrell PJ, Mestre JR, Stapleton PP and Daly JM. Malnutrition-induced macrophage apoptosis. *Surgery* 129 : 617–625, 2001.
- Salh B, Marotta A, Matthewson C, Ahluwalia M, Flint J, Owen D and Pelech S. Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. *Anticancer Res* 19 : 731–740, 1999.
- Sandholm L. The cellular host response in juvenile periodontitis. A review. *J Periodontol* 56 : 359–366, 1985.
- Slots J, Reynolds HS and Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun* 29 : 1013–1020, 1980.
- Slots J and Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 15 : 85–93, 1988.
- Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J and Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 62 : 504–509, 1991.
- Tanaka Y, Gavrielides MV, Mitsuuchi Y, Fujii T and Kazanietz MG. Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J Biol Chem* 278 : 33753–33762, 2003.
- Vandesteen GE, Williams BL, Ebersole JL, Altman LC and Page RC. Clinical, microbiological and immunological studies of a family with a high prevalence of early-onset periodontitis. *J Periodontol* 55 : 159–169, 1984.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ and Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270 : 1326–1331, 1995.
- Yamagishi S, Yamada M, Koshimizu H, Takai S, Hatanaka H, Takeda K, Ichijo H, Shimoke K and Ikeuchi T. Apoptosis-signal regulating kinase-1 is involved in the low potassium-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *J Biochem* 133 : 719–724, 2003.
- Zhuang S, Demirs JT and Kochevar IE. Protein kinase C inhibits singlet oxygen-induced apoptosis by decreasing caspase-8 activation. *Oncogene* 20 : 6764–6776, 2001.