

# 歯周病原性細菌の感染によるヒト単球細胞のアポトーシスについて

加藤 幸紀 [北海道医療大学歯学部／講師]

## 背景・目的

我々は、歯周病原性細菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) 菌に感染したマウスマクロファージ細胞とヒト上皮細胞がアポトーシスにより細胞死に至ることを明らかにし、感染細胞のアポトーシスが歯周病の発症に関与する可能性を報告した。しかしマウス免疫細胞とヒト免疫細胞とは免疫応答の詳細が異なる。そこで本研究ではヒト単球系細胞株を用いた感染実験を行い、歯周病原性細菌に感染したヒト免疫細胞のアポトーシス発現と歯周病の発症について詳細な検討を加えることを目的とした。

## 内容・方法

### 1. *A. actinomycetemcomitans* 感染方法

*A. actinomycetemcomitans* をヒト単球系細胞株である THP-1 細胞に細菌：細胞比率が 1000：1 となるようにマイクロチューブ内で感染させた。1000×g で 10 分間遠心操作を行った後、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃ で 30 分間培養した。その後遠心操作により 3 回洗浄し、5% FBS 含有 RPMI 1640 培地を添加して 24 穴プレートに播種し、培養した。

### 2. 細胞死の検出方法

細胞死の指標として培養上清中の LDH 活性を Cell Cytotoxicity Detection Kit (Roche 社) を用いて測定した。アポトーシス発現の指標としては Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche 社) を用いて細胞内の断片化 DNA を測定した。さらに感染後の THP-1 細胞から DNA を抽出し、2% アガロースゲル電気泳動により断片化 DNA の検出を行った。

### 3. MAP キナーゼ活性の検出

感染細胞における p38 MAP キナーゼ (p38) 活性を ELISA キット (BioSource 社) および p38 MAP Kinase Assay Kit (Cell Signaling 社) を用いて測定した。また感染実験系に p38 阻害剤である SB203580 を添加して、同様の実験を行った。

### 4. TNF- $\alpha$ 量の測定

培養上清中の TNF- $\alpha$  量を Human TNF- $\alpha$  ELISA Kit (BioSource 社) を用いて測定した。

## 結果・成果

### 1. 感染細胞における細胞死発現について

*A. actinomycetemcomitans* Y4 株を感染させた THP-1

細胞は、非感染細胞に比べ LDH 活性は有意に上昇していた。またアポトーシス細胞の特徴のひとつである細胞内の DNA 断片化の増加が感染細胞において認められた。さらに感染 THP-1 細胞において断片化 DNA 所見 (ラダーパターン) が 2% アガロースゲル電気泳動により確認された。

### 2. 感染細胞における p38 活性について

*A. actinomycetemcomitans* 感染による THP-1 細胞の p38 活性について検討した。ELISA 法およびウェスタンブロット法のいずれにおいても、非感染細胞に比べて感染細胞における p38 活性の上昇が認められた。さらに SB203580 を添加したところ、非添加感染細胞に比べて p38 活性の減少が認められた。

### 3. 感染細胞からの TNF- $\alpha$ 産生について

*A. actinomycetemcomitans* 感染による THP-1 細胞からの TNF- $\alpha$  産生について検討したところ、感染により THP-1 細胞からの TNF- $\alpha$  産生は増加した。また感染による TNF- $\alpha$  の産生は、SB203580 の添加により減少することが示された。

以上の結果から、*A. actinomycetemcomitans* 感染ヒト単球細胞においても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。さらにこのアポトーシス誘導には p38 といった MAP キナーゼによる細胞シグナル伝達系が関与し、またこの p38 は感染細胞からの TNF- $\alpha$  産生に関与している可能性が示唆された。

## 今後の展望

今後は、単球細胞をマクロファージ化してアポトーシス誘導シグナルについて詳細な検討を加えるとともに、ヒトから採取した単球／マクロファージ細胞についても検討が必要と考える。また、*A. actinomycetemcomitans* はヒト単球／マクロファージ細胞や白血球に対して溶解作用を有するロイコトキシンといった病原因子を産生する。菌体のみならず、病原因子の影響についても検討しなければならないと考える。