

学位研究紹介

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* はロイコトキシンにより好中球を傷害し、エラスターゼを漏出させることで、歯周組織破壊を誘導する**
***Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces periodontal tissue destruction via elastase release following leukotoxin-dependent neutrophil injury**

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野
 日吉 巧
 Division of Periodontology, Niigata University Graduate School
 of Medical and Dental Science
 Takumi Hiyoshi

【背景および目的】

人体に病原細菌の感染が生じると、炎症性サイトカイン等の作用で感染局所に好中球が多量に動員される。好中球は細菌の貪食作用を介して感染防御に働く一方、内在型のタンパク質分解酵素であるエラスターゼが細胞外へ漏出すると、組織傷害を起こす可能性が示唆されている。実際に、歯肉溝浸出液中のエラスターゼ活性と歯周炎の重症度には、正の相関関係があることが報告されている。しかしながら、本酵素が歯周炎組織中に誘導されるメカニズムおよびその病態に及ぼす作用は不明である。そこで本研究では、重度歯周炎との関連が報告されてい

る *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* とエラスターゼの関係に着目した。歯周病細菌の一つである *A. actinomycetemcomitans* は、ヒト白血球に対し傷害作用を示すロイコトキシン（白血球傷害毒素）を産生することが知られている。本研究では、*A. actinomycetemcomitans* のロイコトキシンが歯周組織内の好中球を傷害し、それによって漏出したエラスターゼが歯周組織破壊を誘導するとの仮説を立て、解析を行った。

【材料および方法】

A. actinomycetemcomitans HK1651 株の培養上清から抽出したロイコトキシンを、ヒト歯肉上皮細胞、ヒト歯肉線維芽細胞、およびヒト好中球それぞれに添加し、組織学的観察およびLDH細胞傷害試験を実施した。次に、免疫蛍光染色法により、ロイコトキシンを添加した好中球からエラスターゼが漏出するかどうかを試験した。また、同好中球の培養上清を採取し、エラスターゼ活性を定量した。続いて、エラスターゼが有する細胞傷害作用を試験するため、ヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線維芽細胞にエラスターゼを添加し、組織学的観察およびMTT細胞生存試験を実施した。また、ロイコトキシンを添加した好中球培養上清の細胞傷害作用を、組織学的観察および死細胞・生細胞染色にて解析した。さらに、エラスターゼ阻害剤を同培養上清に添加し、細胞傷害作用が抑制されるかどうかを試験した。

【結 果】

ロイコトキシンはヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線

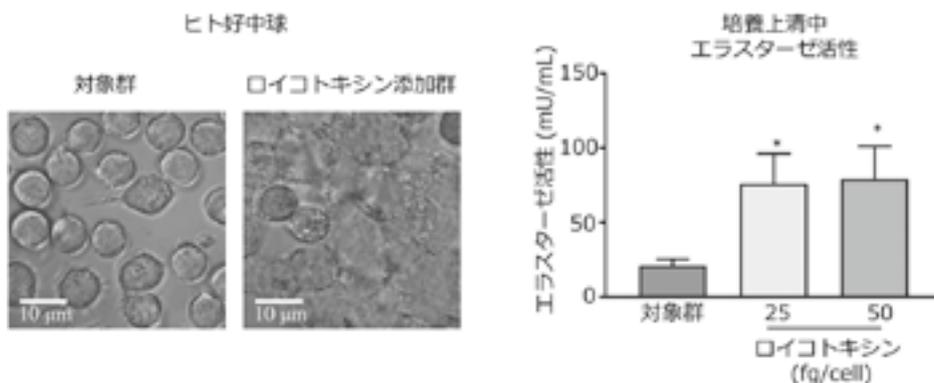


図1 ロイコトキシンによる好中球エラスターゼの細胞外漏出
 ヒト好中球にロイコトキシンを添加し、3時間後に形態学的観察および上清中のエラスターゼ活性測定を実施した。

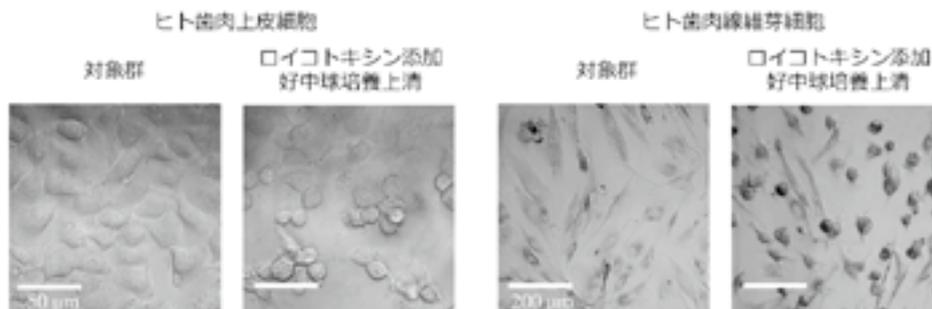


図2 ロイコトキシンを添加した好中球培養上清の細胞傷害作用
ヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線維芽細胞を、ロイコトキシンを添加した好中球培養上清にて3時間培養し、形態学的観察を実施した。

維芽細胞に対して細胞傷害性を示さなかった。一方で、ロイコトキシンはヒト好中球の細胞膜を融解し、有意な細胞傷害作用を示した。さらに、ロイコトキシンを添加した好中球は、細胞外にエラスターゼの漏出像を認め、培養上清中のエラスターゼ活性が有意に上昇した(図1)。また、エラスターゼは、歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞に対して、細胞剥離作用および細胞致死作用を示した。同様に、ロイコトキシンを添加した好中球培養上清は、歯肉上皮細胞と歯肉線維芽細胞に対して細胞剥離作用および細胞致死作用を示し(図2)、エラスターゼ阻害剤の添加によりこれらの作用は有意に抑制された。

【考察と結論】

A. actinomycetemcomitans が産生するロイコトキシンの好中球に細胞死を誘導し、それにより細胞外に漏出したエラスターゼが歯周組織細胞を傷害することで、歯周病が重症化する可能性が示唆された(図3)。また、エラスターゼ阻害剤の添加により細胞傷害作用が抑制されたことから、エラスターゼ阻害剤が新規歯周炎治療薬となる可能性が示唆された。



図3 ロイコトキシンによる歯周炎重症化メカニズム

【参考文献】

Hiyoshi T, Domon H, Maekawa T, Nagai K, Tamura H, Takahashi N, Yonezawa D, Miyoshi T, Yoshida A, Tabeta K, Terao Y: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces detachment and death of human gingival epithelial cells and fibroblasts via elastase release following leukotoxin-dependent neutrophil lysis. *Microbiol. Immunol.* 63(3-4): 100-110, 2019.
(図は全て参考文献より改変して引用)