

## 8. 歯周病関連細菌による好中球からの neutrophil extracellular traps 産生を介した炎症反応の誘導

多田 浩之<sup>1)</sup>, 沼崎 研人<sup>1)</sup>, 西岡 貴志<sup>2)</sup>, 松下 健二<sup>3)</sup>, 高田春比古<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔微生物学分野

<sup>2)</sup>同 口腔病態外科学講座口腔診断学分野

<sup>3)</sup>国立研究開発法人国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部

### はじめに

歯周病は歯周病関連細菌による感染症であるが、歯周病における歯の喪失を引き起こす歯周組織の破壊は歯周病関連細菌の感染による慢性炎症によりもたらされ、歯周組織における炎症の遷延化は糖尿病や動脈硬化性疾患など、他臓器における炎症性疾患の病態形成に影響を及ぼすことが注目されている。好中球の新たな機能である Neutrophil extracellular traps (NETs) は、自然免疫における感染防御機構である一方、炎症性疾患や自己免疫疾患などさまざまな病態を増悪させることが示唆されている。しかしながら、歯周病の病態形成における NETs の機能的役割については十分に明らかにされていない。本稿では、歯周病関連細菌である *Fusobacterium nucleatum* 感染による好中球からの NETs 産生の意義について、われわれの知見を概説したい。

### 1. NETs による炎症反応の誘導

自然免疫系において、好中球は粘膜組織における感染防御の最前線を担う免疫担当細胞であり、病原体の刺激に応じて貪食、脱顆粒やサイトカイン産生を行うことで感染防御を担う。2004年、好中球の新たな感染防御機構として NETs が発見された<sup>1)</sup>。好中球は、細菌、真菌やウイルスなど病原微生物の刺激に応じ、網目状の構造物である NETs を放出し、NETs で病原体を捕獲して破壊する。真菌感染において、好中球は小型の酵母形真菌に対しては貪食を行うのに対して、貪食が不可能な大型の菌糸形真菌に対しては NETs を産生することから、好中球による NETs 産生は、貪食で対処できない感染に対応する免疫応答と捉えられる<sup>2)</sup>。NETs を放出した好中球は、細胞の生存に必要な DNA を放出することで apoptosis や necrosis とは異なる細胞死形態である NETosis に至る。好中球の NETosis 誘導は、細胞死を伴う suicidal NETosis と細胞が生存し機能を保持した状態で NETs 放出を行う vital NETosis の2つのメカニズムが明らかにされている<sup>3)</sup>。Suici-

dal NETosis は、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、コレステロール結晶や自己抗体などの刺激により、数時間で誘導される。刺激後、NADPH オキシダーゼ活性化により産生された活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) は、peptidylarginine deiminase 4 (PAD4) 活性化を誘導する。PAD4 はヒストンをシトルリン化することでクロマチンが脱凝縮し、好中球エラスターゼやミエロペルオキシダーゼによる核膜や細胞膜の崩壊に伴いクロマチンが細胞質に移行することでクロマチンに顆粒および細胞質タンパク質が結合し、NETs として細胞外に放出される。一方、vital NETosis は、黄色ブドウ球菌や大腸菌の感染もしくは菌体成分の刺激により、補体受容体、Toll-like receptor (TLR) 2 や TLR4 を介して、数十分と短時間で誘導される。Vital NETosis 誘導は ROS 非依存的で核膜や細胞膜構造は保持され、NETs 放出後も細胞は生存する。NETs はクロマチン線維から成る網状構造物に、ヒストン、好中球プロテアーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、抗菌ペプチドや炎症性サイトカインなどが結合しており、これらの分子により NETs に捕捉された病原体は破壊される。NETs は感染防御に重要な役割を担う一方、過剰な NETs 産生や慢性的な NETs の刺激は、動脈硬化性疾患、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなど炎症性疾患の病態増悪や、糖尿病における創傷治癒の遅延にかかわることが明らかにされている<sup>2,4~7)</sup>。

### 2. 歯周病と NETs

歯周病の病態形成において、歯と歯肉の境界部である歯周ポケットの歯肉上皮バリアは、歯周病関連細菌に対する感染防御の最前線を担う。歯周ポケット内はグラム陰性偏性嫌気性菌を中心とする歯周病関連細菌が常在し温床となっており、それに応じて免疫担当細胞が集積することで炎症が遷延化し、歯肉上皮バリアは破綻する。歯周病患者の歯周ポケットでは、集積する免疫担当細胞の80~95%が好中球であり、老齢マウスを用いた解析から歯周ポケット内への好中球の浸潤

は加齢に伴い増加することが明らかにされている<sup>8)</sup>。免疫組織染色の研究結果から、慢性歯周炎患者の歯肉上皮組織には NETs が局在すること<sup>9)</sup>、好中球を歯周病関連細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* や *F. nucleatum* で刺激すると NETs 産生が誘導されることが示されている<sup>10)</sup>。NETs を産生することができない好中球プロテアーゼのカテプシン C 遺伝子異常を伴う Papillon-Lefèvre 症候群では重度歯周炎の罹患リスクが高いことから<sup>11)</sup>、好中球は歯周病関連細菌に対する感染防御に重要な役割を担うことが示唆される。しかしながら、好中球の過剰な活性化は慢性炎症を引き起こし、NETs が歯周病の病態増悪にかかわる可能性が考えられる。そこでわれわれは、歯周病関連細菌による NETs 産生および NETs が歯周病の病態形成に及ぼす影響について検討した。

### 3. *F. nucleatum* による NETs 依存性 MIF 産生誘導ならびに NETs による炎症の誘導

歯周病関連細菌の一種であるグラム陰性偏性嫌気性桿菌 *F. nucleatum* は、う蝕の原因菌であるミュータンスレンサ球菌群や歯周病関連細菌と強い共凝集能を有しており、歯周組織のバイオフィームであるデンタルプラークの形成にかかわる。そこで、*F. nucleatum* 感染によるヒト好中球からの NETs 産生と同 NETs による炎症反応の誘導について、ヒト前骨髄球細胞株 HL-60 を all-trans retinoic acid 処理で分化誘導した好中球様細胞を供試し検討した。同好中球を *F. nucleatum* で感染 4 時間後に透過型電子顕微鏡で観察すると、細胞から網状構造物が放出され、*F. nucleatum* が捕捉されていることが観察された。この構造物は細胞膜非透過性 DNA 染色試薬の SYTOX Green で染色され、DNase I 処理で分解されたことから、同構造物は NETs であることが明らかとなった。次に *F. nucleatum* 感染後の好中球を DNase I で処理して抽出した NET 分画におけるシトルリン化ヒストン H3 発現をウェスタンブロット法で解析した結果、*F. nucleatum* 感染により産生された NET 分画には、著明なシトルリン化ヒストン H3 発現が認められた。また、Transwell フィルターを用いた実験結果から、好中球からの NETs 産生には細胞と細菌の直接的な接触が必要であり、NETs 産生の誘導には多量の細菌が必要であったことから、NETs は重度歯周炎の病態形成にかかわる可能性が示唆された。そこで、*F. nucleatum* 感染により好中球から産生された NETs に含まれる各種サイトカインなどの発現について、メンブレンレイ法で網羅的に解析した結果、*F. nucleatum* 誘導性 NETs には、好中球エラスターゼ、ミエロペルオキシダーゼ、抗菌ペプチド LL-37、IL-8 や MCP-1 などのケモカインに加え、マクロファージ遊走

阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) が著明に発現することが明らかとなった。また、歯周病は複数の歯周病関連細菌による混合感染であることから、他種の歯周病関連細菌の感染による NET 分画の MIF 産生について検討したところ、他の歯周病関連細菌感染も同様に NETs 産生を誘導するが、同 NET 分画における MIF 産生量は *F. nucleatum* が最も高いレベルであった。MIF は、好中球を始め T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージや mast 細胞など多様な免疫担当細胞から産生され、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  や IL-1 $\beta$  を始めとする多様な炎症性サイトカイン産生を惹起し、炎症のマスターレギュレーターとして機能する<sup>12)</sup>。また、MIF はアテローム性動脈硬化症、関節リウマチや炎症性腸疾患など炎症性疾患の病態を増悪させることが注目されており、MIF が新たな治療薬のターゲットと捉えられている<sup>13)</sup>。*F. nucleatum* 感染細胞の NET 分画および培養上清における MIF 産生を測定したところ、興味深いことに *F. nucleatum* による MIF 産生は NET 分画にのみ認められ、培養上清に MIF 産生は検出されなかった。それに対して、*F. nucleatum* 感染による IL-8 産生は、NET 分画ならびに培養上清の双方で検出され、免疫蛍光染色の結果から MIF は NETs と共局在することが確認された。以上の結果から、歯周病関連細菌の感染により産生された NETs には MIF が著明に結合することが明らかとなった。

次に、*F. nucleatum* 誘導 NETs による炎症反応の誘導について、血管内皮細胞を介する細胞遊走作用 (transmigration) について検討した。Transwell フィルター上に培養したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を *F. nucleatum* 感染好中球から抽出した NET 分画で刺激後、フィルター下部に IL-8 含有培地を添加し、フィルター上部に好中球を添加することで HUVEC を介してフィルター下部へ transmigration した好中球数を測定した。その結果、HUVEC を *F. nucleatum* 感染 NET 分画で刺激すると、好中球の transmigration が著明に亢進した。一方、動脈硬化症においてコレステロール結晶の刺激で好中球から放出された NETs は、マクロファージを刺激しマクロファージの泡沫細胞への形成を促進させることで病態増悪にかかわる<sup>6)</sup>。そこで、低密度リポタンパク質 (low density lipoprotein : LDL) によるマクロファージの泡沫細胞への形成における *F. nucleatum* 感染 NETs に影響について検討した。マクロファージを *F. nucleatum* 感染 NETs で刺激すると、LDL による泡沫細胞への形成が促進されマクロファージからの IL-6 産生が著明に亢進した。以上の結果から、歯周病関連細菌の感染により好中球から産生された NETs は炎症反応を亢進させ、好中球の遊走促進や泡沫細胞の形成促進の誘導にかかわることが示唆された (図 1)。

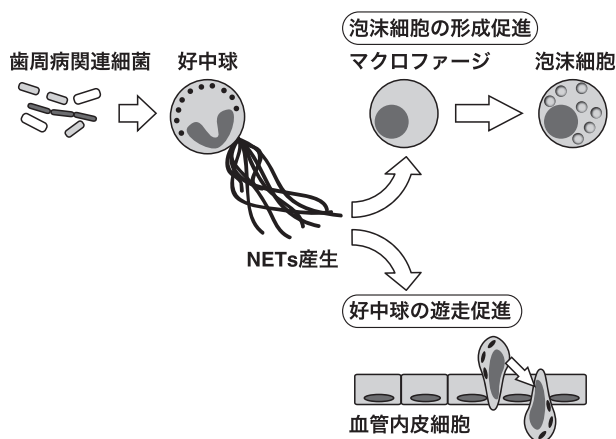


図1 歯周病関連細菌により好中球から産生された NETs による炎症反応の誘導

## おわりに

歯周病関連細菌である *F. nucleatum* 感染により好中球から産生される NETs には MIF が高発現し、NETs は泡沫細胞の形成促進や好中球の遊走促進を誘導することで炎症反応を亢進させることを示した。歯周病における NETs 産生は、歯周組織における炎症の遷延化や他臓器の炎症性疾患の病態形成にかかわる可能性があり、今後さらなる検討が必要と考えられる。

## 文 献

- 1) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. : Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 : 1532-1535, 2004
- 2) Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. : Neutrophil sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol* 15 : 1017-1025, 2014
- 3) Jorch SK, Kuberski P : An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med* 23 : 279-287, 2017
- 4) Macanovic M, Sinicropi D, Shak S, et al. : The treatment of systemic lupus erythematosus (SLE) in NZB/W F1 hybrid mice : studies with recombinant murine DNase and with dexamethasone. *Clin Exp Immunol* 106 : 243-252, 1996
- 5) Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. : NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 5 : 178ra40, 2013
- 6) Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al. : Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349 : 316-320, 2015
- 7) Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. : Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med* 21 : 815-819, 2015
- 8) Eskandari MA, Jotwani R, Abe T, et al. : The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol* 13 : 465-473, 2012
- 9) Cooper PR, Palmer LJ, Chapple ILC : Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity : friend or foe? *Periodontol* 2000 63 : 165-197, 2013
- 10) White PC, Chicca IJ, Cooper PR, et al. : Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis : A Web of Intrigue. *J Dent Res* 95 : 26-34, 2016
- 11) Hart TC, Hart PS, Michalec MD, et al. : Haim-Munk syndrome and Papillon-Léfevre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *J Med Genet* 37 : 88-94, 2000
- 12) Calandra T, Roger T : Macrophage migration inhibitory factor : a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3 : 791-800, 2003
- 13) Morand EF, Leech M, Bernhagen J : MIF : a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 5 : 399-411, 2006