

歯周病における neutrophil extracellular traps 産生と血管内皮細胞の炎症誘導

多田 浩之¹⁾, 西岡 貴志²⁾, 松下 健二³⁾, 尾之上さくら⁴⁾, 川原 一芳⁴⁾

¹⁾東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔分子制御学分野, ²⁾同 口腔病態外科学講座口腔診断学分野

³⁾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, ⁴⁾関東学院大学理工学部理工学科生命学系

Periodontal bacteria-induced neutrophil extracellular traps enhances proinflammatory responses in human endothelial cells

Hiroyuki Tada¹⁾, Takashi Nishioka²⁾, Kenji Matsushita³⁾, Sakura Onoue⁴⁾, Kazuyoshi Kawahara⁴⁾

¹⁾Division of Oral Immunology, Tohoku University Graduate School of Dentistry

²⁾Division of Oral Diagnosis, Tohoku University Graduate School of Dentistry

³⁾Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology

⁴⁾Department of Biosciences, College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University

Abstract

In the inflammatory disease chronic periodontitis, the periodontium is exposed to a high density and diversity of periodontal bacteria. Neutrophils are the first line of defense in the periodontium. Circulating neutrophils adhere to endothelial cells by adhesion molecules, such as $\beta 2$ -integrin, following their migration across endothelial cells into the inflamed periodontium. Endothelial cell-derived developmental endothelial locus-1 (Del-1) acts as a negative regulator of neutrophil extravasation that inhibits $\beta 2$ -integrin-dependent adhesion to vascular endothelial cells. Neutrophil extracellular traps (NETs) are extracellular web-like DNA structures that contain bactericidal substances such as histones, human neutrophil elastase, and cathelicidin antimicrobial peptides. NETs are produced by many bacterial species, but it remains unknown whether the development of periodontal disease is due to periodontal bacteria-induced NET production. *Fusobacterium nucleatum* is a Gram-negative anaerobic bacterium associated with periodontal disease. We examined the effects of *F. nucleatum*-induced NET stimulation on the induction of Del-1 in human endothelial cells. A transendothelial migration assay was performed to evaluate the number of transmigrated neutrophils. Stimulation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with *F. nucleatum*-infected NET fragments enhanced the transendothelial migration of neutrophils. Furthermore, the Del-1 production induced by HUVECs was attenuated in NET fragments-primed cells. Thus, *F. nucleatum*-induced NETs may enhance neutrophil extravasation in a manner dependent on the attenuation of Del-1 production in endothelial cells. This study suggests that NETs are associated with the pathogenesis of periodontal disease.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 66~69, 2018

Key words : 歯周病, Neutrophil extracellular traps, *Fusobacterium nucleatum*, Developmental endothelial locus-1, 血管内皮細胞

はじめに

歯周病は 30 歳以上の成人の約 8 割が罹患する歯周病関連細菌による感染症である。歯周病罹患者の歯周ポケットでは、歯周病関連細菌がバイオフィルムを形成することに伴って好中球を主とする免疫担当細胞が集

積し、慢性炎症が引き起こされることで歯周組織が破壊され、最終的に歯の喪失に至る。自然免疫における好中球の新たな感染防御機構である neutrophil extracellular traps (NETs) が慢性炎症性疾患の病態形成にかかわることが示唆されている。デンタルプラーク中や炎症歯肉でも NETs の産生が確認されているが、歯周

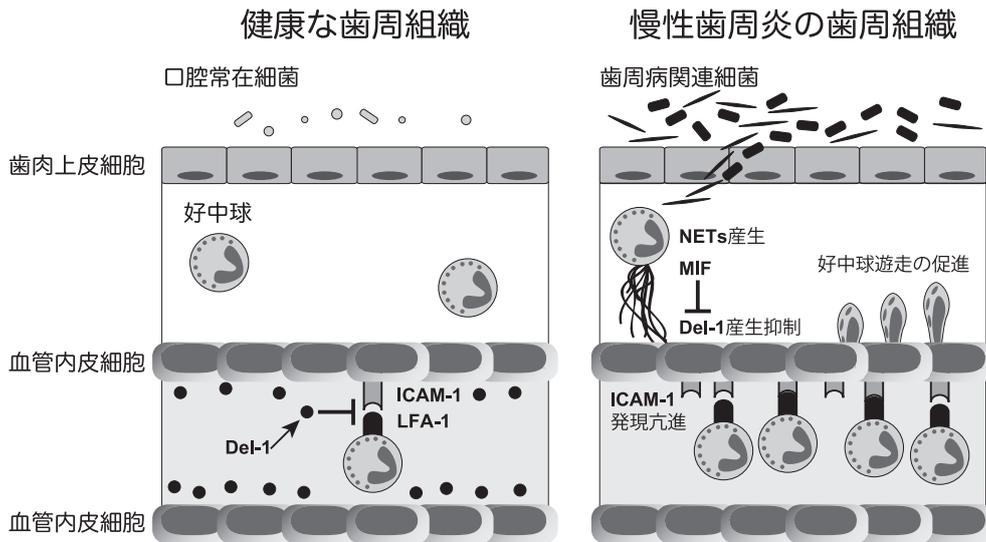


図 1 慢性歯周炎の歯周組織では NETs により血管内皮細胞に炎症反応が誘導される

病の病態形成において NETs は感染防御に働くのか歯周炎を増悪させるかについては十分に明らかにされていない。歯周炎が重度になると歯肉溝を形成する粘膜上皮に潰瘍が生じ、歯肉から出血することで歯周ポケット内の歯周病関連細菌や炎症性メディエーターが糖尿病や心臓・循環器疾患といった他臓器の疾患に影響を及ぼすことに関心が寄せられている。本稿では歯周病関連細菌の感染による好中球の NETs 産生と血管内皮細胞への影響について、われわれの知見を中心に概説したい。

1. NETs による炎症反応の誘導

粘膜組織の自然免疫では、好中球が病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を Toll-like receptor などで認識することにより、抗菌ペプチド、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) や炎症性サイトカインの産生が誘導される。ところが、好中球を PMA で刺激するとネクロシスやアポトーシスと異なる形態の細胞死が誘導される研究成果¹⁾を機に、好中球は NETosis という新規の細胞死に陥ることで NETs を放出することが明らかにされた²⁾。NETs はクロマチン線維から成る網状構造物で構成され、捕捉した病原微生物を NETs に結合するヒストン、好中球エラスターゼ、ミエロペルオキシダーゼ、抗菌ペプチドや炎症性サイトカインにより破壊する感染防御機構である。

2. NETs による血管の組織障害

NETs による病原体の破壊は重度の感染症において重要な役割を担う一方、NETs の慢性的な産生は臓器障害や細胞死を誘導し、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の炎症性疾患を増悪さ

せ、糖尿病における創傷治癒を遅延させることが明らかにされている。その原因として、NETs に含まれる多様な殺菌性分子が組織障害を引き起こすことが示唆されている。NETs に結合する dsDNA、ミエロペルオキシダーゼや MMP-9 は、血管内皮細胞を障害するほか³⁻⁵⁾、ヒストンによる血管内皮細胞の障害は敗血症における DIC の病態形成にかかわる⁶⁾。また、炎症組織に集積した NETs からヒストンが血液性に遊離することで遠隔臓器に障害を引き起こすことも指摘されている^{7,8)}。歯周病の歯肉組織に集積した好中球は NETs を産生することが示唆されていることから、歯周ポケット内に蓄積された NETs が血行性に全身の他臓器を障害する可能性が危惧される。

3. 歯周病原細菌感染による NETs 産生と血管内皮細胞の炎症誘導

われわれは、慢性歯周炎の病態形成に深くかかわる歯周病関連細菌を選択し、ヒト好中球からの NETs 産生能について比較検討したところ、*Fusobacterium nucleatum* に対して好中球は高い NETs 産生誘導を示した。*F. nucleatum* は慢性歯周炎罹患者の歯周ポケットから高頻度で検出されるグラム陰性偏性嫌気性桿菌で、ヒトでは口腔および腸管に常在する。*F. nucleatum* は宿主細胞ならびに他の細菌種と強い共凝集能を持つことから、バイオフィーム形成において中心的な役割を担う。また、*F. nucleatum* による好中球からの ROS 産生は、慢性歯周炎の代表的な病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* よりも高いことが示されており⁹⁾、ROS は細胞質における NETs 形成のプロセスに必須の分子であることから、*F. nucleatum* は好中球からの NETs 産生を強く誘導することが示唆される。そこで、*F. nucleatum* 刺激によりヒト好中球から産生された

NETsが血管内皮細胞に炎症反応を誘導する可能性について、好中球による血管内皮細胞間隙遊走 (trans-endothelial migration) を指標として検討した。*F. nucleatum* 刺激により好中球から産生されたNETsをDNase I処理で分離し、Transwellフィルター上に単層培養したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を同NET分画で刺激後、HUVECの細胞間隙を通過した好中球数を測定した。その結果、HUVECをNET分画で刺激すると遊走した好中球数が著明に亢進した。

次に、NETsによる血管内皮細胞を介する好中球遊走の亢進作用にかかわる分子機序について、血管内皮細胞に発現する developmental endothelial locus-1 (Del-1) に着目した。Del-1は血管内皮細胞から構成的に分泌される分子であり、LFA-1を介する好中球と血管内皮細胞の接着を拮抗阻害することで好中球の血管外遊走を調節する¹⁰⁾。Eskanらによると、若年マウスの歯肉組織では血管内皮細胞からDel-1が産生されるため歯肉組織への好中球遊走は調節されているが、高齢マウスの歯肉組織ではIL-17A産生が亢進することで血管内皮細胞からのDel-1産生が抑制され、歯肉組織への好中球遊走が亢進し慢性炎症に至ることが示唆されている¹¹⁾。そこで、HUVECからのDel-1産生におけるNETsの影響について検討した結果、HUVECをNETsで刺激するとDel-1産生が減少することが示された。NETsによるHUVECのDel-1産生抑制にかかわる分子について、NETsに結合する各種サイトカインを網羅的に解析した結果、*F. nucleatum* 感染により産生されたNETsには macrophage migration inhibitory factor (MIF) が著明に結合し、好中球を*F. nucleatum*由来LPSで刺激するとMIF mRNA発現が亢進することが明らかとなった。MIFは、TNF- α 、IFN- γ やIL-1 β などの炎症性サイトカイン産生を誘導し¹²⁾、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチや炎症性腸疾患といった慢性炎症性疾患を増悪させる¹³⁾。そこで、NETsによる transendothelial migration の亢進作用にMIFがかかわる可能性について、HUVECをMIFアンタゴニストISO-1で処理したNETsで刺激した結果、transendothelial migration の亢進が著明に抑制された。また、HUVECからのDel-1産生もISO-1処理NETsでは抑制された。他方、NETsにはHUVECのICAM-1発現を著明に亢進させる作用があることも明らかとなった。以上の結果から、歯周病関連細菌により好中球から産生されたNETsは血管内皮細胞を活性化し、Del-1産生抑制やICAM-1発現亢進を誘導することで好中球の細胞接着を促進させ、血管における炎症反応が増悪することが示唆された。今後、NETsによる血管内皮細胞の障害作用について、NETsに結合するミエロペルオキシダーゼ、好中球エラスターゼ、ヒストンやヌクレオソームなどの分子に着目して検討する必要

がある。

おわりに

歯周病は2型糖尿病や動脈硬化症など全身疾患の病態形成にかかわることが指摘され、そのメカニズムとして歯周病関連細菌による菌血症や歯周炎による炎症性メディエーターの関与が示唆されているが、十分に解明されていない点も多い。慢性歯周炎の歯周ポケットには好中球が多量に集積し、歯周病関連細菌の感染に常時暴露されていることから、NETsの恒常的な供給源であることが推察される。NETsによる血管内皮細胞の炎症誘導は、歯周ポケットに蓄積したNETsが血行性に全身へ拡散する可能性が想定され、歯周病を予防することの重要性は今後高まることが考えられる。

文 献

- 1) Takei H, Araki A, Watanabe H, et al. : Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol* 59 : 229-240, 1996
- 2) Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. : Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303 : 1532-1535, 2004
- 3) Gloude NJ, Khandelwal P, Luebbering N, et al. : Circulating dsDNA, endothelial injury, and complement activation in thrombotic microangiopathy and GVHD. *Blood* 130 : 1259-1266, 2017
- 4) Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. : Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 7 : e32366, 2012
- 5) Carmona-Rivera C, Zhao W, Yalavarthi S, et al. : Neutrophil extracellular traps induce endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus through the activation of matrix metalloproteinase-2. *Ann Rheum Dis* 74 : 1417-1424, 2015
- 6) Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. : Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 11 : 1318-1321, 2009
- 7) Chaput C, Zychlinsky A : Sepsis : the dark side of histones. *Nat Med* 15 : 1245-1246, 2009
- 8) Abrams ST, Zhang N, Manson J, et al. : Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 187 : 160-169, 2013
- 9) Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB, et al. : *Fusobacterium nucleatum* regulation of neutrophil transcription. *J Periodontol Res* 46 : 1-12, 2011
- 10) Choi EY, Chavakis E, Czabanka MA, et al. : Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor,

- limits inflammatory cell recruitment. *Science* 322 : 1101-1104, 2008
- 11) 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
- 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 : 399-410, 2006