

# *Fusobacterium nucleatum* によるマスト細胞の 細胞外トラップ放出と炎症誘導

多田 浩之<sup>1)</sup>, 西岡 貴志<sup>2)</sup>, 松下 健二<sup>3)</sup>, 尾之上さくら<sup>4)</sup>, 川原 一芳<sup>4)</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分子制御学分野

<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

<sup>4)</sup>関東学院大学理工学部理工学科生命学系

## *Fusobacterium nucleatum* induces the production of extracellular traps by human mast cells, resulting in inflammatory responses

Hiroyuki Tada<sup>1)</sup>, Takashi Nishioka<sup>2)</sup>, Kenji Matsushita<sup>3)</sup>, Sakura Onoue<sup>4)</sup>, Kazuyoshi Kawahara<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Oral Immunology, Tohoku University Graduate School of Dentistry

<sup>2)</sup>Division of Oral Diagnosis, Tohoku University Graduate School of Dentistry

<sup>3)</sup>Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology

<sup>4)</sup>Department of Biosciences, College of Science and Engineering, Kanto Gakuin University

### Abstract

Mast cells play an important role in the innate immune responses to bacterial infections as the first line of defense such as in the skin and mucosa. Mast cells can produce extracellular traps to kill bacteria by trapping pathogens. Mast cell extracellular traps (MCETs) are composed of web-like DNA fibers that contain bactericidal substances such as DNA, histones, trypsinase, and antimicrobial peptides. At present, it is unknown whether the induction of inflammation in periodontal diseases is due to MCETs induced by periodontal bacteria. We investigated the role of mast cells in the induction of MCET production following infection with *Fusobacterium nucleatum*, a Gram-negative anaerobic bacterium associated with periodontal disease. We found that mast cells produced MCETs in response to *F. nucleatum* infection. Furthermore, the MCETs highly expressed macrophage migration inhibitory factor (MIF). Of note, the level of MIF expressed in the MCETs was inhibited by tauroldine, an LPS antagonist. We next investigated whether MCETs can induce inflammatory responses in monocytes. The MCETs induced the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 by monocytes. The production of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IL-8 was inhibited by an MIF inhibitor. These findings suggest that MCETs produced by mast cells in response to *F. nucleatum* infection induce proinflammatory cytokine production by monocytes, which may lead to the chronic inflammation observed in periodontal diseases.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 63~66, 2019

**Key words** : 慢性歯周炎, マスト細胞, Mast cell extracellular traps, *Fusobacterium nucleatum*, リボ多糖

### はじめに

30歳以上の成人の約8割が罹患する慢性歯周炎は、歯周病関連細菌による感染症であるが、歯の喪失をもたらす歯周組織の破壊は、歯周ポケットに慢性的に感染する歯周病関連細菌に対する免疫応答の遷延化による慢性炎症が引き起こす。歯周ポケットには、デンタルプラーク

と呼ばれる1 mgで1億を超える口腔細菌がバイオフィルムを形成しており、慢性歯周炎罹患者のデンタルプラーク細菌叢は主に歯周病関連細菌で構成されている。歯周病関連細菌の感染に対して歯周ポケットに集積する免疫細胞の大多数は好中球であるが、重度の慢性歯周炎患者における炎症歯周組織にはマスト細胞が多く局在することが示されており、慢性歯周炎の病態形成において

マスト細胞による免疫応答は炎症の増悪にかかわる可能性が推測される。

細菌感染に際して、好中球は NETosis という細胞死に陥ることで neutrophil extracellular traps (NETs) と呼ばれる細胞内容物を放出し感染防御作用を発揮する。しかしながら、好中球からの持続的あるいは過剰な NETs 放出は、慢性炎症性疾患を増悪させることが示唆されている。一方、マスト細胞も Group A *Streptococcus* 感染に際して、好中球と類似するマスト細胞細胞外トラップ (mast cell extracellular traps : MCETs) を放出することで感染防御機構を担う。

本稿では、歯周病関連細菌である *Fusobacterium nucleatum* 感染によるマスト細胞からの MCETs 放出と MCETs による炎症誘導について、われわれの知見を中心に概説したい。

## 1. マスト細胞による細胞外トラップ放出

病原体の感染に際して、マスト細胞は TLR, Dectin-1 や補体受容体など自然免疫受容体で病原体を認識し、食食、脱顆粒や活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) などを放出することで直接的に防御機構を発揮する一方、マスト細胞はヒスタミンやロイコトリエン C4 による上皮細胞からのムチン産生や血管透過性の亢進ならびに IL-8, TNF- $\alpha$  や eotaxin による好酸球、好中球や NK 細胞の遊走などにより間接的に防御機構を発揮する<sup>1)</sup>。近年、マスト細胞は Group A *Streptococcus* や *Leishmania* 感染に対して、好中球が放出する NETs と類似した DNA やヒストンから構成される MCETs を放出することが明らかにされ<sup>2-4)</sup>、MCETs は細菌感染におけるマスト細胞による防御機構であることが示された。

## 2. 慢性歯周炎における歯周病関連細菌とマスト細胞の役割

歯周病関連細菌は、慢性歯周炎の病態増悪に最も強く関与するレッドコンプレックスと呼ばれる 3 菌種 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* を頂点とする細菌種で構成される。*Fusobacterium nucleatum* は、慢性歯周炎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嫌気性菌であり、レッドコンプレックスに次ぐオレンジコンプレックスに属し<sup>5)</sup>、ヒト口腔の他に腸管にも常在し大腸がんの増殖を促進させる<sup>6)</sup>。デンタルプラークの形成は、まず始めに初期付着菌 (early colonizer) である、う蝕原因菌 *Streptococcus mutans* を含むグラム陽性通性菌が菌面に定着する。次に、時間の経過に伴うデンタルプラークの成熟により、後期付着菌 (late colonizer) である歯周病関連細菌を中心とするグラム陰性嫌気性菌 (後期付着菌) 主体に遷移するが、この細菌叢の遷移 (dysbiosis) において *F. nucleatum* は強力な共凝集能を有することで、初

期付着菌と後期付着菌の双方を結合させる役割を担う<sup>7)</sup>。

重度慢性歯周炎患者の炎症歯肉にはマスト細胞が集積することが示唆されているが<sup>8-12)</sup>、慢性歯周炎の病態形成におけるマスト細胞の機能的役割は十分に明らかにされていない。最近われわれは、マウス口腔に *P. gingivalis* を感染させると、マスト細胞依存的に炎症性サイトカイン IL-31 が産生され、IL-31 は歯肉上皮細胞に作用するとタイトジャンクション分子 claudin-1 発現をダウンレギュレーションさせることで慢性炎症の誘導にかかわることを示した<sup>13)</sup>。

## 3. *F. nucleatum* によるマスト細胞からの細胞外トラップ放出

*F. nucleatum* による好中球からの ROS 産生は、*P. gingivalis* よりも高いことが示されており<sup>14)</sup>、ROS は細胞質における NETs ならびに MCETs 誘導に必須の分子であることから、*F. nucleatum* は *P. gingivalis* よりマスト細胞からの MCETs 放出を強く誘導することが予測される。そこでわれわれは、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞が MCETs を放出する可能性について、ヒトマスト細胞株 HMC-1 に *F. nucleatum* を感染させた結果、マスト細胞は感染 4 時間後から細胞外に DNA を放出することを見出した。また、マウス骨髄細胞由来マスト細胞 (BMMCs) に *F. nucleatum* を感染させても同様に細胞外 DNA 放出が観察された。この細胞外 DNA 放出は、*F. nucleatum* 死菌ならびに cytochalasin D および nocardazole を前処理したマスト細胞でも観察されたことから、細菌の細胞内侵入やマスト細胞による細菌の食食に依存しないことが示された。*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞から放出された細胞外 DNA は、著明にヒストン H3 のシトルリン化が検出されたことから、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞が放出した細胞外 DNA は MCETs であることが証明された。また、同 MCETs にはカテリシジンファミリーの属する抗菌ペプチドである cationic antimicrobial peptide of 18-kDa (CAP-18) が発現しており、感染防御能を有することが示唆された。そこで *F. nucleatum* 感染によりマスト細胞から放出された MCETs に発現する分子群について、105 種類のサイトカインを中心とした分子の抗体が固相化されたメンブレンを用いたサイトカインアレイ法で解析した結果、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞から放出された MCETs には IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) や plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) に加え、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibitory factor : MIF) が高レベルで発現することを HMC-1 ならびに BMMCs で明らかにした。他方、われわれは *F. nucleatum* 感染によりヒト好中球は NETs を放出し、この NETs も MIF を高発現しており血管内皮細胞に炎症を誘導することを明らかにした。

#### 4. MCETs 発現 MIF による炎症誘導

MIF は当初、キャピラリーからマクロファージの無秩序な遊走を阻止する因子として発見された。その後、LPS によるエンドトキシンショック誘導は抗 MIF 抗体で阻害され<sup>15)</sup>、MIF はエンドトキシンショック誘導にかかわる IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 や TNF- $\alpha$  など炎症性サイトカイン産生を誘導することが明らかにされ<sup>16)</sup>、MIF は炎症性サイトカインとしての機能を有することが明らかにされた。MIF は構成的に多様な細胞種の細胞質に発現しており、MIF はアミノ末端を欠如することから小胞体を介する通常のタンパク質分泌系では細胞外に産生されず、damage-associated molecular patterns (DAMPs) のようにネクロシスに伴う細胞傷害の結果、MIF は細胞外に放出される<sup>17)</sup>。興味深いことに、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞が放出した MCETs には著明な MIF 発現がみられたのに対して、培養上清中には MIF はほぼ検出されなかった。そこで、*F. nucleatum* 感染による MCETs の MIF 発現を誘導する菌体成分について、*F. nucleatum* の LPS により担われる可能性について検討した。*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞が放出する MCETs の MIF 発現は、MCETs を LPS 阻害剤である taurolidine で前処理することで著明に抑制された。そこで、マスト細胞を *F. nucleatum* 由来 LPS で刺激したところ、MIF は培養上清には産生されず、細胞質に著明な MIF 発現が誘導されることを見出した。これらの知見は、マスト細胞が *F. nucleatum* 感染を受けると、細胞質に MCETs が形成されると同時に LPS 刺激により細胞質に MIF が蓄積し、MIF-MCET 複合体が形成され細胞死に伴い細胞外に放出されたと捉えられる (図 1)。最後に、*F. nucleatum* 感染により放出された MCETs による炎症誘導について、ヒト THP-1 細胞を活性型ビタミン D3 で分化誘導させた単球様細胞を供試し、MCETs による THP-1 細胞からの炎症性サイトカイン産生について検討した。THP-1 細胞を MCETs で刺激すると著明に IL-1 $\beta$ 、IL-6 および IL-8 が産生され、THP-1 細胞を MIF アンタゴニスト ISO-1 で前処理すると同作用は完全に阻害された。以上の知見から、*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞は MCETs を放出し、MCETs に発現する MIF は単球から炎症性サイトカイン産生を誘導することが示された (図 1)。

#### おわりに

われわれは歯周病関連細菌 *F. nucleatum* の感染によりマスト細胞は MCETs を放出し、同菌 LPS は MIF 発現を誘導することを示した。また、MCETs に結合する MIF は単球から炎症性サイトカインを誘導することが明らかとなった。慢性歯周炎において、歯周病関連細菌の感染により放出されるマスト細胞の MCETs ならびに

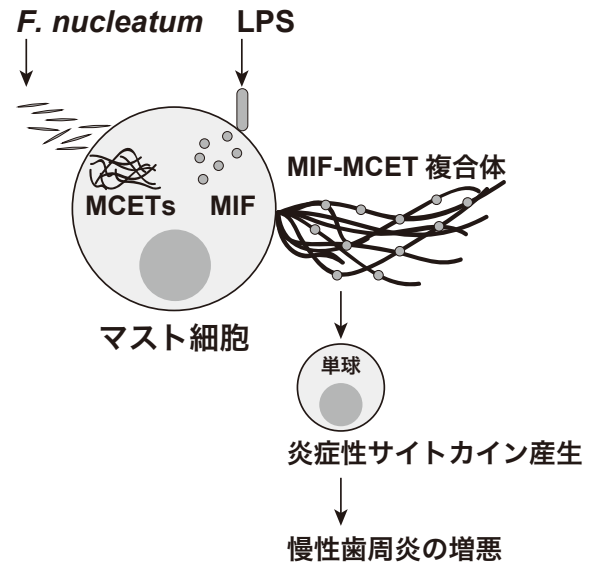


図 1 *F. nucleatum* 感染によるマスト細胞の MIF-MCET 複合体の放出は、単球からの炎症性サイトカイン産生を誘導する

*F. nucleatum* 感染によりマスト細胞は MCETs を放出する一方、*F. nucleatum* 由来 LPS の刺激はマスト細胞に MIF 発現を誘導する。MIF が結合した MCETs は細胞死に伴い細胞外に放出されると、単球からの炎症性サイトカイン産生を誘導する。

好中球の NETs に発現する MIF は、慢性歯周炎における炎症の遷延化にかかわる可能性が想定され、今後の検討課題といえる。

#### 文 献

- 1) Urb M, Sheppard DC : The role of mast cells in the defense against pathogens. PLoS Pathog 8 : e1002619, 2012
- 2) Clark M, Kim J, Etesami N, et al. : Group A *Streptococcus* prevents mast cell degranulation to promote extracellular trap formation. Front Immunol 9 : 327, 2018
- 3) von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, et al. : Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. Blood 111 : 3070-3080, 2008
- 4) Naqvi N, Ahuja K, Selvapandiyan A, et al. : Role of mast cells in clearance of *Leishmania* through extracellular trap formation. Sci Rep 7 : 13240, 2017
- 5) Socransky SS, Haffajee AD : Dental biofilms : difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 28 : 12-55, 2002
- 6) Kostic AD, Chun E, Robertson L, et al. : *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. Cell Host Microbe 14 : 207-215, 2013
- 7) Jiao Y, Hasegawa M, Inohara N : The role of oral pathogens in dysbiosis during periodontitis development. J

- Dent Res 93 : 539-546, 2014
- 8) Gupta K, Idahosa C, Roy S, et al. : Differential regulation of mas-related G protein-coupled receptor X2-mediated mast cell degranulation by antimicrobial host defense peptides and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. Infect Immun 85 : e00246-17, 2017
  - 9) Huang S, Lu F, Chen Y, et al. : Mast cell degranulation in human periodontitis. J Periodontol 84 : 248-255, 2013
  - 10) Huang S, Lu F, Li J, et al. : Quantification of tryptase-TIM-3 double-positive mast cells in human chronic periodontitis. Arch Oral Biol 59 : 654-661, 2014
  - 11) Myint M, Steinsvoll S, Yuan ZN, et al. : Highly increased numbers of leukocytes in inflamed gingiva from patients with HIV infection. AIDS 16 : 235-243, 2002
  - 12) Steinvoll S, Halstensen TS, Schenck K : Extensive expression of TGF- $\beta$ 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. J Clin Periodontol 26 : 366-373, 1999
  - 13) Tada H, Nishioka T, Takase A, et al. : *Porphyromonas gingivalis* induces the production of interleukin-31 by human mast cells, resulting in dysfunction of the gingival epithelial barrier. Cell Microbiol 21 : e12972, 2019
  - 14) Wright HJ, Chapple IL, Matthews JB, et al. : *Fusobacterium nucleatum* regulation of neutrophil transcription. J Periodontol Res 46 : 1-12, 2011
  - 15) Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, et al. : MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia. Nature 365 : 756-759, 1993
  - 16) Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, et al. : The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J Exp Med 179 : 1895-1902, 1994
  - 17) Roth S, Agthe M, Eickhoff S, et al. : Secondary necrotic neutrophils release interleukin-16C and macrophage migration inhibitory factor from stores in the cytosol. Cell Death Discov 1 : 15056, 2015