

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	日吉 巧
学位	博士（歯学）
学位記番号	新大院博（歯）第481号
学位授与の日付	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> induces detachment and death of human gingival epithelial cells and fibroblasts via elastase release following leukotoxin-dependent neutrophil lysis (<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> はロイコトキシンにより好中球を溶解し、エラスターゼを漏出させることで、ヒト歯肉上皮細胞とヒト歯肉線維芽細胞に細胞剥離および細胞死を誘導する)
論文審査委員	主査 教授 多部田 康一 副査 教授 寺尾 豊 副査 教授 大島 勇人

博士論文の要旨

学位申請者日吉 巧氏より提出のあった主論文（英語）の要旨（和訳）は以下の通りである。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好中球が感染局所に動員される。好中球は細菌を貪食して感染防御に働く一方、内在型のタンパク質分解酵素エラスターゼが細胞外へ漏出した場合は、組織傷害を起こす可能性が示唆されている。歯周炎において、病態の重症度と歯肉溝浸出液中のエラスターゼ活性には相関があると報告されている。しかしながら、本酵素が歯周炎組織中に誘導される機序およびその病態に及ぼす作用は不明である。そこで申請者は、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、ヒト免疫細胞に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。本論文では、*A. actinomycetemcomitans* のロイコトキシンが歯周組織内の好中球を傷害し、それにより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。

初めに、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 *A. actinomycetemcomitans* HK1651 株の培養上清から抽出したロイコトキシンを添加し、LDH 法で細胞傷害性を調べた。その結果、ロイコトキシンはヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線維芽細胞に対しては細胞傷害性を示さず、ヒト好中球に対してのみ有意に細胞傷害性を示した。同時に、ロイコトキシンにより細胞死した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。その結果、同培養上清のエラスターゼ活性は、ロイコトキシン未添加群と比較して有意に高かった。そこで続いて、ヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線維芽細胞に、細胞死した好中球の培養上清もしくはエラスターゼを添加すると、両細胞ともに剥離し細胞死が誘導された。さらに、同培養上清にエラスターゼ阻害剤を加えると、細胞剥離作用および細胞致死作用が有意に抑制された。以上の結果から、*A. actinomycetemcomitans* はロイコトキシンを放出して好中球を傷害し、それによって漏出したエラスターゼにより歯周組織が破壊される可能性を明らかにした。(Hiyoshi T, *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 主論文)。現在申請者は、エラスターゼが有する細胞間接着分子分解作用および歯肉上皮バリア傷害作用が歯周炎に与える影響に着目し、解析を行っている。今後は、エラスターゼによる歯周炎重症化メカニズムをより詳細に解析し、エラスターゼ阻害剤を用いた新規歯周炎治療法の開発を目的に研究を実施する。

上記の基礎的研究に続けて申請者は、新規歯周炎治療法の応用開発にも着手した。まず、ヒノキ科の植物に含まれるヒノキチオールが、歯周病原細菌に対して抗菌活性を示すことを報告した (Domon H., Hiyoshi T. (10人中2番目), *et al.*, *Microbiol. Immunol.*)。さらに、*in vitro* において、

マウスマクロファージにヒノキチオールを添加すると、リポポリサッカライド誘導性の炎症性サイトカイン転写量が未添加群と比較し有意に減少することを明らかにした。*In vivo* においては、マウス歯牙結紮歯周炎誘導モデルの歯肉にヒノキチオールを局所投与すると、歯肉中の炎症性サイトカイン転写量および結紮糸中の総細菌数が減少するとともに、歯槽骨吸収量が有意に低下することを示した。以上の結果から、ヒノキチオールは抗炎症作用および抗菌活性を有し、歯周炎における歯槽骨吸収を抑制することを報告した (Hiyoshi T., *et al.*, *Arch Oral Biol.*, 参考論文 1)。

以上一連の研究成果は、細菌性因子の排除に加え、過剰な炎症反応に対する治療が歯周炎の重症化を抑制することを示唆しており、新規歯周炎治療法の開発に繋がる可能性をもつ。

審査結果の要旨

本研究の研究テーマの妥当性についての試問を行った。

本研究着想の経緯、先行研究との関連については以下の通りである。人体に細菌感染が生じると、炎症性サイトカインの産生を通じて大量の好中球が感染局所に動員される。好中球は細菌を貪食し、感染の防衛線として働く一方、先行研究により、好中球に内在するエラスターゼが過剰に組織中に漏出することで、急性障害が引き起こされる可能性が示唆されてきた。歯周炎においては、歯周炎患者の歯肉溝浸出液中でエラスターゼ活性は有意に上昇し (Smith QT., *et al.*, *J Clin Periodontol.* 1995), エラスターゼが歯周炎の重症度に相関関係があることが報告されてきた (Aberg CH., *et al.*, *PLoS One*, 2014)。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ため、重度歯周炎との関連が報告される *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* とエラスターゼの関係に着目した。*A. actinomycetemcomitans* は、ヒト免疫細胞に傷害作用を示すロイコトキシンを産生することが知られている。本研究では、*A. actinomycetemcomitans* が産生したロイコトキシンが歯周組織内の好中球を傷害し、それにより漏出したエラスターゼが二次的な歯周組織破壊を誘導するとの仮説を立て、解析を行った。

研究方法と論旨の展開についての試問をおこなった。主論文研究において *A. actinomycetemcomitans* HK1651 株を使用した理由についての回答は以下である。*A. actinomycetemcomitans* HK1651 株は、他の菌種と比べて有意に高いロイコトキシン活性をもつ JP2 クローンに属し (Rylev M., *et al.*, *J Periodontol*, 2000), 重度歯周炎との関連が報告されるため使用した (Haubek D., *et al.*, *Int J Paediatr Dent.*, 2006)。

HGEC, HGF の細胞致死性評価において、致死性を有しない濃度の LPS (0.4ng/ml) を加えた理由の回答は以下の通りである。本研究で用いたロイコトキシンは、*A. actinomycetemcomitans* HK1651 株の培養上清よりゲルろ過クロマトグラフィー法にて抽出した。抽出したロイコトキシン 1 µg 中に 4 ng (4/1000 倍) の LPS のコンタミネーションを認めた。そのため、最高濃度のロイコトキシンに混入している量と同量の LPS を添加した群を試験することで、混入した LPS による影響を評価した。

進行した歯周ポケットから検出されることは稀な *A. actinomycetemcomitans* と歯周病の病態との関連についての考察については以下の通りである。日本国内において、歯周組織中の *A. actinomycetemcomitans* の罹患率を大規模に調査した論文はなく、一般に検出頻度は高くはないことが知られている。しかし、ガーナでランダムに選ばれた青年期男女においては、歯周病罹患の有無に関わらず、*A. actinomycetemcomitans* の罹患率は 54.4%であった (Aberg CH., *et al.*, *J. Periodontol.*, 2012)。また、中国では、中等度もしくは重度歯周炎患者の 63%が *A. actinomycetemcomitans* に感染しているとの報告がある (A. Mombelli, *et al.*, *J Clin Periodontol.* 1999)。さらに、強い白血球毒性を持つ *A. actinomycetemcomitans* JP2 クローンは、北アフリカでの重度侵襲性歯周炎と関連が報告されている (Haubek D., *et al.*, *J Oral Microbiol.* 2014)。以上のことから、*A. actinomycetemcomitans* の感染率には地域差が認められるが、その感染は歯周炎の重症化に寄与することが推察される。

本研究で明らかになった Ltx の作用は、歯周病原細菌としての *A. actinomycetemcomitans* の病原性においてどのように位置づけられるかの考察は以下の通りである。これまで、*A.*

actinomycetemcomitans が産生するロイコトキシンの主な働きは、免疫細胞を傷害することにより、貪食等による免疫防御機構を回避することであると考えられてきた。しかし、本研究により、ロイコトキシンは単に免疫回避に働くだけでなく、好中球を傷害することによりエラスターゼを漏出させ、次いで歯肉上皮バリアを傷害するという、宿主に対する直接的な歯周炎重症化機序を示すことが明らかになった。これにより、*A. actinomycetemcomitans* はロイコトキシンを用いて宿主の免疫機能を悪用し、歯周病原細菌の深部組織への感染拡大を誘導することにより、歯周炎を重症化する能力を有していることが考察される。

各実験において添加したロイコトキシン濃度および好中球エラスターゼ濃度の妥当性については以下の通りである。歯肉溝浸出液中のロイコトキシン濃度は未だ不明だが、*A. actinomycetemcomitans* は生体内を模した環境下で、ロイコトキシンを十分に産生し（およそ $100 \sim 1000 \text{ ng}/10^9 \text{ cell}$ ）、同培養上清が好中球傷害作用を示すことが報告されている（Johansson A., et al., Eur J Oral Sci, 2003）。また、本研究で用いたエラスターゼは、ロイコトキシンを添加した好中球培養上清から得られた活性を基準にしており、歯周炎患者における歯肉溝浸出液中のエラスターゼ活性以下の活性であり、細胞傷害作用を試験する濃度として適切であると考えられる。

ロイコトキシンが好中球を特異的に傷害する理由についての説明は以下の通りである。ロイコトキシンは、血管内皮への細胞の接着および血管外遊走に関するリンパ球機能関連抗原 1 に特異的に結合し、傷害作用を示すことが明らかにされている。そのため、リンパ球機能関連抗原 1 を発現する好中球を含めた顆粒球、リンパ球および単球に特異的な傷害作用を示す。

ロイコトキシンにより傷害を受けた好中球から漏出したエラスターゼが歯周組織を破壊したと結論づけた理由は以下の通りである。好中球は、エラスターゼに加え、複数の傷害作用を示す因子を有している。しかし、本研究において、ロイコトキシンにより傷害された好中球培養上清にエラスターゼ阻害剤を添加した群は、ロイコトキシン未添加群比較して、歯肉上皮細胞に対する傷害作用に有意差を認めなかった。このことから、好中球から漏出したエラスターゼこそが歯周組織破壊における重要な役割を担っていると結論づけた。

歯牙結紮とロイコトキシン添加による歯周組織破壊の共通点と相違点の考察は以下の通りである。歯牙結紮による歯周組織破壊は、結紮絹糸中に過剰に付着した細菌に対する急性炎症が原因で生じる。一方、ロイコトキシンは歯周組織に対する直接の傷害作用はなく、傷害した好中球から漏出したエラスターゼが二次的な歯周組織破壊を引き起こす。申請者は、歯肉上皮細胞層にエラスターゼを添加すると、細胞層を通過する歯周病原細菌の数が増加することを明らかにした。このことから、エラスターゼは歯肉上皮細胞のバリア機能を傷害し、感染の拡大を介して歯周炎における組織破壊を引き起こしていると考えられる。

Human gingival epithelial cells (HGECs) と human gingival fibroblasts (HGFs) の脱離は *in vivo* ではどのような現象かについての考察は以下の通りである。申請者の *in vitro* 研究により、エラスターゼは歯肉上皮細胞に発現する細胞接着分子を分解し、歯肉上皮バリア機能を傷害することが明らかになった。さらに、歯牙結紮により急性の歯周炎を誘導するモデルマウスを用いた *in vivo* 研究では、歯周炎罹患歯肉中のエラスターゼ活性が有意に上昇した。加えて、同マウスにエラスターゼ阻害剤を局所投与することで、歯肉中の炎症性サイトカイン転写が抑制され、歯槽骨吸収量が減少した。以上の知見から、エラスターゼは歯肉上皮バリア機能を傷害し、細菌感染の拡大を通じて歯周炎重症化を引き起こす可能性が示唆された。また、HGFs は歯周組織の主な構成細胞である。加えて、線維芽細胞成長因子は歯周組織の再生に重要な役割を果たしており、歯周炎由来の歯槽骨欠損に対する再生材料として用いられている。これらのことから、エラスターゼの HGFs に対する剥離および細胞致死作用は、歯周組織破壊につながると考えられる。

歯周病で Neutrophil elastase が影響を及ぼす組織についての説明は以下の通りである。エラスターゼは、C 末端側の小さな疎水的アミノ酸（グリシン、アラニン、バリン等）を切断するため、非常に標的範囲が広いことで知られている。申請者は、エラスターゼがオクルーディン、E-カドヘリンおよびデスモグレイン 1 といった細胞接着分子を分解し、歯肉上皮細胞バリアを傷害することを解明した。加えて、オステオプロテゲリン（破骨細胞形成抑制因子）や Toll 様受容体といった分子もエラスターゼが分解することを明らかにしている。各組織に対してエラスターゼが及ぼす影響は今後の研究で明らかにする必要があるが、その広い標的範囲から、エラスターゼは多

くの組織に傷害作用を示すと考えられる。

LDH 試験とエラスターゼ活性試験についての説明は以下の通りである。LDH 試験は、細胞死を引き起こした細胞を定量化するために古くから一般的に用いられている方法であり、ロイコキシンが有する細胞傷害作用を試験するために適切である (Korzeniewski, *et al.*, *J Immunol Methods*, 1983)。エラスターゼ活性試験は (Z-Ala-Ala-Ala) 2Rh110 が基質として、エラスターゼによって特異的に切断され、高蛍光化合物 R110 を生成する性質を有しており、エラスターゼ活性を定量することが可能である。

Neutrophil elastase inhibitor である Sivelestat の作用機序については以下の通りである。Sivelestat は、好中球エラスターゼに選択的な阻害剤であり、その阻害様式は拮抗阻害である。具体的には、エラスターゼの結合部位へ阻害剤が結合することにより、エラスターゼの作用を妨げる。Sivelestat は実際の臨床で急性肺障害の治療薬として使用されている。

学術的意義に関わる試問を行った。

新規性・創造性については以下の通りである。複数の臨床研究により、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関連があることが報告されてきたが、そのメカニズムは不明であった。本研究は、*A. actinomycetemcomitans* のロイコキシンにより好中球から漏出したエラスターゼが、歯周組織の細胞を傷害し、歯周炎重症化に関与することを初めて明らかにした。さらに、好中球から漏出したエラスターゼによる細胞傷害作用は、エラスターゼ阻害剤を添加することで有意に抑制された。また、近年、不適切な抗菌薬の使用による薬剤耐性菌の増加が、国際社会で大きな課題となっている。新しい抗菌薬の開発は進んでおらず、このまま薬剤耐性菌に抜本的対策が採られなければ、2050年には世界で毎年1,000万人以上の死者が生じるとの試算が出されている (Review on Antimicrobial Resistance, Jim o'neill, 2014)。このような背景から、歯科治療における抗菌薬経口投与量の減少が社会的に求められる。そのような状況下で、エラスターゼに着目した歯周炎の治療法は、自己の過剰な免疫反応を標的とした、抗菌薬に頼らない新しい歯周炎治療法に繋がる可能性をもつ。

本研究結果の学術的発展性や応用価値については以下の通りである。本研究によって明らかになった、*A. actinomycetemcomitans* のロイコキシンによるエラスターゼを介した歯周炎の重症化メカニズムは、実際の臨床で急性肺傷害の治療薬として用いられているエラスターゼ阻害剤により有意に抑制されることが示された。一方、*A. actinomycetemcomitans* の感染に関わらず、歯周炎の重症度と歯肉溝浸出液中のエラスターゼ活性が関与することが報告されている。申請者が学位論文発表後に行った *in vitro* 研究により、エラスターゼは細胞接着分子を分解し、歯肉上皮バリア機能を傷害することが明らかになった。さらに、歯牙結紮により急性の歯周炎を誘導したモデルマウスを用いた *in vivo* 研究により、歯周炎を生じた歯肉中のエラスターゼ活性が有意に上昇していることが判明した。加えて、同マウスにエラスターゼ阻害剤を局所投与することで、歯肉中の炎症性サイトカイン転写は抑制され、歯槽骨吸収が抑制された。このことから、本研究によって得られたエラスターゼによる歯周炎重症化メカニズムは、急性期における歯周炎で等しく生じている可能性があり、*A. actinomycetemcomitans* のロイコキシンはその作用を増強するものであると考えられる。以上の知見から、急性期歯周炎においてエラスターゼを阻害することは、歯肉上皮バリア機能の傷害を抑制し、細菌感染の拡大予防によって歯周炎の重症化を抑制する、全く新しい歯周炎治療法となる可能性が示された。

論文構成・文法・語法については適切に執筆されている。

以上