

口腔フローラと病巣感染：歯周疾患における短鎖脂肪酸の為害作用と全身疾患

落合 邦康¹⁾、栗田(落合)智子²⁾

日本大学歯学部細菌学教室¹⁾、日本大学松戸歯学部細菌学教室²⁾

口腔の代表的感染症“う蝕と歯周病”は、デンタルプラークに棲息する細菌によって引き起こされる。口腔レンサ球菌が細菌性心内膜炎の主な原因菌であることは古くから知られているが、培養や検索技術の進歩に伴い、歯周病原細菌が呼吸器系および循環器系感染症から多く分離されている。また、近年米国における大規模疫学調査から、歯周病原細菌に起因する炎症や炎症物質が心臓病や動脈硬化などの循環器障害、糖尿病、呼吸器疾患や早産など多くの全身性疾患に関わっていることが判明した。“慢性疾患・歯周病”の病原因子として多様な生物活性を持つ内毒素、外毒素、莢膜、付着線毛、そして多種類の組織破壊酵素が知られている。これらの刺激により誘導され炎症性サイトカインや破骨作用の複雑さが歯周病の発症機所解明をより困難なものとしている。我々は、歯周病の発症と病態の進展に、歯周局所における免疫応答の変調、特にサイトカイン産生のアンバランスが深く関わっているとの考えから、歯周病原性グラム陰性嫌気性桿菌が産生する“単純物質・短鎖脂肪酸(SCFA)”の影響について検討を行ってきた。

代表的歯周病原細菌 *P. gingivalis*、*P. loescheii*、*P. intermedia*、*F. nucleatum* は大量の酪酸、プロピオン酸、イソ吉草酸を産生する。これらの菌が生息する歯肉溝内では、正常時でも約 8 mM、歯周病炎症部位においては約 14 ~ 20 mM と高濃度の酪酸が検出される。SCFA を種々の濃度で各種細胞に作用させると、1 mM 程度から濃度依存的にアポトーシスが誘導される。マウス脾臓 T 細胞を用いサイトカイン産生に及ぼす SCFA 影響を検討した結果、1.25 mM の酪酸添加で IL-4、IL-5、IL-6 の産生がほぼ完全に阻害された。IL-2 の産生も 2.5 mM 添加でその産生量が 80% 阻害されたことから SCFA がサイトカイン産生に影響を及ぼすことが判明した。そこで、アポトーシス誘導性の強い酪酸の為害作用を検討したところ、マウス胸腺細胞、脾臓 T 細胞、B 細胞およびヒト T 細胞株 Jurkat 細胞、PBMC においてもほぼ同程度の DNA 断片化が認められた。また、ヒト B 細胞株、マクロファージ細胞株においても同様の結果が見られた。更に、低濃度の LPS を共存させると酪酸誘導アポトーシスが顕著に促進された。しかし、ヒト口腔各所から分離した粘膜上皮や線維芽細胞(HGF)は、酪酸により増殖促進作用がみられアポトーシスは誘導されなかった。これらの結果から細胞種により酪酸感受性に大きな差があることが判明した。

酪酸誘導 T 細胞アポトーシスの機序を解明するため、p53 ノックアウトマウスを用い種々の検討を行ったところ、正常マウスとは有意の差が認められなかった。また、Jurkat 細胞株、ヒト PBMC の T 細胞を用いた実験では、Fas/Fas-L 系の関連性も認められなかった。しかし、細胞内においてアポトーシスがどのように決定、実行されているかを検討するため Jurkat T 細胞を用い DNA マイクロアレイによる分析を行い、その結果をもとに細胞内情報伝達について種々の検討を行った。その結果、酪酸処理直後から経時的に Ros および ceramide の産生が上昇し、ASK-1

のリン酸化が認められた。さらに、分化増殖に関与する ERK の磷酸化が低下する一方、アポトーシスや細胞周期停止と関与する JNK の持続的リン酸化が認められた。また、cytochrome c、caspase-9、-8、-6、-3 の活性も上昇し、特に早期の caspase-8 の上昇が顕著であった。また、Bax や Bcl-2 の作用も認められることから、caspase 依存系の他にミトコンドリアを介する caspase 非依存系も機能していることが示唆された。

酪酸存在下における HGF と T 細胞間の相互作用を検討する目的で種々の解析を行った。HGF が産生するサイトニンの中で酪酸刺激により IL-6、IL-8、IL-11 産生性が顕著に促進された。インターカップを用いた共存培養では、アポトーシス誘導濃度 5 mM の酪酸存在下においても T 細胞アポトーシスは誘導されず、モノクローナル抗体を用いた解析から特に IL-6、IL-11 に T 細胞アポトーシス誘導阻害効果が強いことが判明した。また、HGF シートを用いた共存培養では、5 mM 酪酸存在下で非存在時の約 3 倍の T 細胞が HGF に接着し、かつ活発に増殖する像が観察された。種々の解析によりこの細胞間接着には、T 細胞が発現する CD44、VLA-2 (CD49b)、VLA-5 (CD49e) が深く関与していることが判明した。これらの結果から、HGF が T 細胞アポトーシスを direct および indirect に阻害する機構が歯周組織に存在していることが示唆された。

歯肉溝内には、腸管のように大量の粘液や夾雑物が存在しないことから、SCFA は直接組織へ作用すると考えられる。これら一連の研究から、歯周病原性嫌気性細菌の産生する酪酸は、歯周組織の多くの細胞に様々な作用を及ぼしている可能性がある。しかし、健康歯周組織には、粘膜上皮や HGF が酪酸の侵入、およびその為害作用から T 細胞を保護し、局所免疫応答維持に寄与している可能性が強く示唆された。多くの病原細菌が増殖した場合、さらに何らかの原因により粘膜上皮や HGF の酪酸感受性に変化が生じた場合、このシステム維持が困難となり局所免疫応答に破綻を来し“慢性疾患・歯周病”が発症する可能性も考えられる。慢性感染症の複雑な発症機所解明の糸口に“単純物質 SCFA”を検討することは意義あることと考えている。現在、これらの視点から酪酸の為害作用についてより詳細な検討を行っている。

- 1) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. et al. (1999) *Infect. Immun.*, 67, 22-29.
- 2) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. et al. (2000) *J. Dent. Res.*, 79, 1948-1954.
- 3) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. (2001) *Clin. Diagos. Labo. Immunol.*, 8, 325-332.
- 4) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. et al. (2002) *Infect. Immun.*, 70, 2361-2367.
- 5) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. et al. (2003) *J. Immunol.*, 171, 3576-3584.
- 6) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. et al. (2004) *Infect. Immun.*, 72, 5947-5954.

Short chain fatty acid-induced apoptosis modulates immunoresponse ; Role of cell-cell communication in inhibiting butyric acid-induced T-cell apoptosis.

Kuniyasu Ochiai¹⁾ and Tomoko Kurita-Ochiai²⁾

¹⁾Department of Microbiology, Nihon University School of Dentistry, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310 and ²⁾Department of Microbiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo-shi, Chiba-ken, 271-8587, Japan,

Recently, it was reported that periodontal disease patients became sick with arteriosclerosis, cardiac infarction and pneumonia at high rates on the basis of extensive examination in the United States. Furthermore, it was proved that periodontal disease was related to premature birth, birth of a low weight of newborn and diabetes. These phenomena suggest that periodontopathic bacteria that cause periodontal disease, local chronic disease, could be not only a source of focus infection, but also holding resources of inflamed materials. The mechanism of periodontal disease was very complicated and falling illness and its progress is related to the immunological imbalance.

It is recognized that periodontal diseases are infectious and that periodontal tissue breakdown results from the interaction of specific anaerobic bacteria, namely, *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Fusobacterium* spp., and host immune mechanisms. These bacteria produce and elaborate variety of virulence factors such as proteases, LPS, and fimbriae. The respective metabolisms of the bacteria are also characterized by the production of an identifiable fingerprint of short-chain fatty acids (SCFA), which are major by-products of anaerobic metabolism. Our study demonstrated that SCFA, especially butyric acid (BA), present in the culture filtrates of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella loescheii*, and *Fusobacterium nucleatum*, greatly inhibit T- and B-cell proliferation and cytokine production. On the basis of our results showing that from 13.3 to 26.8 mM of BA was detected in culture filtrates from these bacteria, along with a previous study showing that BA concentrations in subgingival plaque from periodontitis sites could reach 14.4 mM. Other reports revealed that SCFA is a causative agent in gingival inflammation. BA is also known released by colonic bacteria and administrated therapeutically in inflammatory bowel diseases, and exerts immunomodulatory properties.

We reported that butyric acid induce apoptosis in murine thymocytes, splenic T cells, human Jurkat T cells and human peripheral blood T cells. To determine the apoptotic signaling pathway induced by BA, we investigated the contribution of reactive oxygen species (ROS), mitochondria, ceramide and mitogen-activated protein kinases in BA-induced human Jurkat cell apoptosis. Our results indicate that BA-induced T cell apoptosis is mediated by ceramide production, ROS synthesis in mitochondria, and JNK activation in the mitogen-activated protein kinase cascade.

We previously demonstrated that human gingival fibroblasts (Gin 1 cells, HGF) rescue BA-induced T-cell apoptosis via the proinflammatory cytokines such as IL-6 and IL-11, which were produced in

fibroblasts stimulated with BA. In this study, we assessed whether the T cell adhesion to HGF regulates the susceptibility of T cells to BA-induced apoptosis. The number of Jurkat cells adhered to HGF was significantly increased by addition of BA. All Jurkat cells adhered to Gin-1 cells were live cells in contrast to non-adhered cells drop into apoptosis. The increase in T cell adhesion to fibroblasts was also observed when Jurkat cells but not Gin 1 cells were pretreated with butyric acid. CD44, very late antigen (VLA-2, CD49b) and VLA-5 (CD49e) but not leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and VLA-4 expressions on Jurkat cells were increased by BA-treatment. Furthermore, pretreatment of BA-sensitized Jurkat cells with monoclonal antibodies against CD44, VLA-2 and VLA-5 but not LFA-1 and VLA-4 followed by co-culture with Gin-1 cells attenuated T-cell adhesion to fibroblasts. These results suggest that the T-cell adherence to fibroblasts is facilitated by BA, and that BA-induced T-cell apoptosis is down-regulated by the adhesion to HGF through the interaction with the adhesion molecule such as CD44, VLA-2 and VLA-5, expressed on T cells stimulated with BA.

BA is a causative agent in gingival inflammation and may exert immunomodulation through T- and B-cell apoptosis in gingival tissue. However, T-cell adherence to fibroblasts is enhanced by BA and that BA-induced T-cell apoptosis is down-regulated by T-cell adhesion to HGFs through an interaction with the adhesion molecules CD44, VAL-2, and VAL-5 expressed on T cells stimulated with BA. Fibroblasts rescue BA-induced T-cell apoptosis at the inflammatory sites of anaerobic-bacterial infection in mucous membrane.

- 1) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. (2001) Clin. Diagos. Labo. Immunol., 8, 325-332.
- 2) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. et al (2002) Infect. Immun., 70, 2361-2367.
- 3) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. et al (2003) J. Immunol., 171, 3576-3584.
- 4) Ochiai K., Kurita-Ochiai T. (2003) Dentistry in Japan. 39, 29-33.
- 5) Kurita-Ochiai T, Ochiai K et al (2004) Infect. Immun., 72, 5947-5954.

