

*P. gingivalis fimA* II 型の気管上皮細胞への感染に対する  
Bestatin の有用性

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

菱 沼 光 恵

(指導 : 野 本 た か と 教授)

# **The effectiveness of Bestatin on bronchial epithelial cells infected with *P. gingivalis fimA* type II**

**Mitsue Hishinuma**

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo, Special Needs Dentistry, 870-1,  
sakaecho-Nishi 2, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan.

(Director : Takato Nomoto)

*Key words* : *fimA* type II, Bestatin, Bronchial epithelial cell, invasion, PepD

## **Abstract**

Respiratory diseases are the first leading cause of death among the elderly with long-term care and individuals with severe physical and mental disability. *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), a periodontal pathogen, cause various systemic disease such as respiratory infection and bacterial pneumonia by invading to cell and tissue. It is therefore important to control *P. gingivalis* for the prevention of respiratory disorder. Fimbriae of *P. gingivalis*, which play important role in its adhesion to and invasion of host cells, are classified type I-V based on the *fimA* genes. *P. gingivalis* with *fimA* type II (*P. gingivalis fimA* type II) was detected at highest frequency in patients with severe periodontitis. *P. gingivalis* produce various proteases to rely on the fermentation of amino acid for energy production, a property required for its survival, as it is an asaccharolytic bacterium.

Aminoacyl-histidine dipeptidase (PepD) was one of those proteases and strongly expressed in *P. gingivalis fimA* type II. It is considered that inhibition of PepD enzymatic activity lead to control of *P. gingivalis fimA* type II. PepD is known as carnosinase and Bestatin, inhibitor of carnosinase, specifically reduce growth of *P. gingivalis*. It is supposed that Bestatin was to be strong candidate to control *P. gingivalis fimA* type II as antibacterial therapy. We studied the influence of PepD to BEAS-2B cell, bronchial epithelium, and the effect of Bestatin to enzymatic activity of PepD. The chronic respiratory disease caused by repeated bacterial invasion. We also studied the effectiveness of Bestatin to inhibit of intracellular *P. gingivalis fimA* type II in BEAS-2B cell. In addition, we evaluated mRNA expression levels of IL-6, IL-8, STAT3 and SOCS3 in BEAS-2B with invasion of *P. gingivalis fimA* type II and addition of Bestatin. PepD enhanced IL-6 and IL-8 production in BEAS-2B cell and its enzymatic activity was significantly inhibited by Bestatin. Although Bestatin inhibited growth of extracellular *P. gingivalis fimA* type II through proteolysis of PepD, it could not inhibit intracellular *P. gingivalis fimA* type II. However Bestatin regulated IL-8 mRNA expression in BEAS-2B cell invaded with *P. gingivalis fimA* type II. Therefore, it is considered that Bestatin could play important role in controlling of *P. gingivalis fimA* type II and in inhibition of inflammatory response in BEAS-2B cell infected with *P. gingivalis fimA* type II.

## 要 旨

要介護高齢者や重症心身障害児者における死亡原因の第1位は呼吸器疾患であり，歯周病に代表される口腔疾患も深く関与することが知られている．歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) は線毛の遺伝子 (*fimA*) で分類した場合，重症歯周病患者に多く検出されるのはII型 (*P. g. fimA* II型) であるとされている．糖非分解性である *P. g.* がエネルギー産生のために分泌するプロテアーゼの中で，特に Aminoacyl-histidine dipeptidase (PepD) は，*P. g. fimA* II型に多く発現するとの報告がある．従って，歯周病病原細菌が原因となる呼吸器疾患の発症や進行を抑えるためには，PepDの活性を阻害することで *P. g. fimA* II型の増殖や炎症応答の抑制が鍵となると思われる．また，既に臨床応用されており，抗がん作用や抗炎症作用を有するアミノペプチダーゼ阻害剤の一種である Bestatin は，*P. g.* の増殖を特異的に抑制することが報告されていることから，呼吸器疾患の発症や進行抑制に対して有力な候補となると考えられる．従って，本研究では気管上皮細胞である BEAS-2B 細胞に対する PepD の影響ならびに PepD に対する Bestatin の有用性について検討した．その結果，PepD は *P. g.* の代表的な病原因子である LPS よりも BEAS-2B 細胞の IL-8 産生量を増大させ，Bestatin によって著しく活性阻害をうけることが判明した．慢性炎症は細菌の宿主細胞や組織への繰り返しの侵入によって生じる．本研究にて *P. g. fimA* II型は時間経過とともに侵入菌数は減少するものの BEAS-2B 細胞内への侵入は可能であることが示され，慢性炎症に関与する可能性が十分にあると考えられた．次に BEAS-2B 細胞に侵入した *P. g. fimA* II型への Bestatin の有用性について検討を加えたところ，細菌の生存には影響を及ぼさないが，*P. g. fimA* II型の BEAS-2B 細胞内への感染，侵入によって惹起される炎症応答を調整する可能性があると考えられた．*P. g. fimA* II型が侵入した BEAS-2B 細胞では，IL-6 および IL-8 の遺伝子発現は増加するが IL-6 シグナル伝達経路にある STAT3 ならびに SOCS3 は変化を認められないことから，複雑なサイトカインネットワークが形成されていることが推察された．

また Bestatin 添加によって, *P. g. fimA* II 型侵入で増加した IL-8 遺伝子発現が有意に減少したことから, IL-8 の発現をコントロールすることが炎症制御の鍵となることが考えられた. Bestatin は菌体と宿主細胞表層に存在するアミノペプチダーゼに働くことで, 細菌と炎症応答の両方を制御するのに有用であると推測されることから, 臨床応用に向けて更なる検討を重ねる意義があると思われる.

## 緒 言

呼吸器官は生命活動を行うために必要な酸素を提供する重要な臓器であり、口腔と直結しているために口腔環境から受ける影響は大きい。要介護高齢者や重症心身障害児者における死亡原因の第1位は呼吸器疾患であり、呼吸器及び関連器官の先天的・後天的な形態・機能異常、加齢による機能低下のみならず、歯周病に代表される口腔疾患も深く関与することが知られている<sup>1-4)</sup>。歯周病原菌である *P. g.* は様々な全身疾患を誘発することで知られており<sup>5-7)</sup>、高齢の肺炎患者の唾液、喀痰、肺膿瘍、および膿胸患者の病巣で本菌体が polymerase chain reaction (PCR) 法にて検出されている<sup>3,8,9)</sup>。従って、*P. g.* の制御が呼吸器疾患の予防ないし進行抑制の鍵となると推察される。*P. g.* による感染は生体細胞への①接着、②侵入/内部移行、③移送、④持続生存、⑤脱出の5段階に分かれている。特に接着において重要な役割を果たす線毛<sup>10)</sup> の遺伝子 (*fimA*) で分類した場合、I~V型に分けられる<sup>11,12)</sup>。*P. g. fimA* 型によって細胞への接着、侵入率が異なる上、歯周病の病態に深く関与すると言われており、II型は歯肉上皮細胞や咽頭上皮細胞への接着および侵入率が高く、重症歯周病患者から多く検出されるとの報告がある<sup>13-17)</sup>。これらのことから *P. g.* の増殖ならびに炎症応答の抑制を考えるうえで、*P. g. fimA* II型を研究のターゲットとすることが有用である。

糖非分解性である *P. g.* は、自身が産生したプロテアーゼによって周囲のタンパク質を分解し取り込むことで自身の生存のためのエネルギーとしている<sup>18-21)</sup>。産生されるプロテアーゼには、ジンジパイン、ジペプチジルアミノペプチダーゼ IV (DPP IV)、ジアミノメタロペプチダーゼ Aminoacyl-histidine dipeptidase (PepD)などが同定されており、なかでもジンジパインや DPP IV は生体細胞に対し病原因子として深く関与することが数多く報告されている<sup>22-27)</sup>。一方 PepD は *P. g.* の中でも *P. g. fimA* II型に最も発現が多いと言われているが<sup>28)</sup>、生体細胞に対する病原因子としての役割についての報告は未だない。また、これらの酵素は基

質と結合することで必要な生成物を産生し、生体機能を調整しているため、酵素産生を調整することが生体機能維持に関与することになる。そのため、酵素活性阻害剤は医薬品、農薬など様々な分野で利用されている<sup>29)</sup>。以上のことから、気管上皮細胞への PepD の影響を明らかにするとともに、呼吸器疾患治療薬の開発の一助として、PepD を標的とした酵素活性阻害剤の有用性を検討することは意義深い。さらに PepD はカルノシナーゼに相同性が高い<sup>28)</sup>ことから、*P. g.* 特異的に増殖抑制を示すと報告があるカルノシナーゼ阻害剤の Bestatin<sup>30, 31)</sup> が PepD 活性阻害剤として有力な候補になると想定される。

一般的に細菌は生存や増殖のために生体細胞を必要としないが、生体細胞側の様々な防御機能<sup>32-34)</sup>を回避して生存するためのエネルギーを享受できるように、栄養豊富な生体細胞内への侵入を試みようとする<sup>35, 36)</sup>。これは本来、生体細胞が持つ栄養摂取や生体防御のために細胞外の物質を取り込むための機能であるエンドサイトーシスを細菌が利用することによって行われる。生体細胞はこれに対抗してエンドソーム、リソソームという分解系機能を有するが、細菌の中にはこれらの機能から逃れて感染を拡大していくものが数多く存在する<sup>37-40)</sup>。*P. g.* もエンドサイトーシスを利用する菌のひとつであり、*P. g.* の多くはエンドソームからリソソームもしくはオートファゴソームへ移送され分解されるが、一部の *P. g.* は初期エンドソームからリサイクリング経路を利用して細胞外に脱出し周囲の宿主細胞に再侵入する<sup>41-44)</sup>。これらを繰り返すことで免疫応答から逃れ、より深い組織へ侵入し組織破壊を誘発するとされている<sup>45, 46)</sup>。*P. g.* 特異的に増殖抑制を示す Bestatin の生体細胞への作用として、抗がん作用、抗炎症作用など様々な報告がされ<sup>47-51)</sup>、特に癌治療の分野では既に臨床で応用されている<sup>51-53)</sup>。従って、Bestatin は細菌の宿主細胞への侵入の繰り返しによる呼吸器疾患の進行を制御する目的としても有用性が高いと思われる。有病高齢者や重症心身障害児者における呼吸器疾患への安全かつ適切な薬剤開発は急務であるが、新規薬剤開発には、膨大な費用と時間が必要であり、可及的に既存薬剤が応用できれば極めて効率的であると言える。以上のことから、本研究は *P. g. fimA* II 型の侵入を受けた気管上

皮細胞における Bestatin の有用性について検討を行った.



## 材料および方法

### 1. ヒト気管上皮細胞における *P. g.* 産生酵素 PepD の影響

#### 1.1 供試菌株および培養

*Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 $\alpha$  および BL21 を LB 培地 (BD, NJ, U.S.A.) にて好気下 37°C で培養し、リコンビナントタンパク作成時のコンピテントセルとして用いた。

*P. g.* ATCC 33277 株 (*fimA* I 型; ATCC<sup>®</sup> 33277<sup>TM</sup>) および TDC60 株 (*fimA* II 型; 東京歯科大学より譲渡) を、phytone peptone (5 mg/ml), NaCl (5 mg/ml), システイン (0.1%), ヘミン (5 mg/ml) およびビタミン K1 (0.01% 含有) trypticase soy 培地 (BD) にて、嫌気条件下 (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>) 37°C で培養し、各々の実験に用いた。

#### 1.2 細胞培養

ヒト気管上皮細胞である BEAS-2B 細胞 (BEAS-2B : ATCC<sup>®</sup>CRL-9609<sup>TM</sup>) を 10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum ; FBS, GE Healthcare, WI, U.S.A.) および抗菌薬 (50 units/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin ; GIBCO, NY, U.S.A.) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM ; Sigma, MO, U.S.A.) にて 37°C, air 95%, CO<sub>2</sub> 5% の条件下で継代培養し、実験に供した。

#### 1.3 *P. g.* 由来 Lipopolysaccharide (LPS) の抽出

Hot phenol-water 法<sup>54)</sup>にて LPS を分離、精製した。

#### 1.4 リコンビナント PepD の作成および精製

PepD のリコンビナントタンパク質 (rPepD) は, Aoki ら<sup>28)</sup>の方法に従い Profinity eXact cloning kit (Bio-Rad, CA, U.S.A.) を用いて行った. *P. g. fimA* II 型より調整した染色体 DNA を鋳型として, プライマー (Table 1) を用いて *pepD* 遺伝子の増幅を PCR 法にて行った. 増幅した *pepD* 遺伝子は profinity eXact Tag を付与させる pPAL7ベクターに挿入後, *E. coli* BL21 に形質転換し, PepD 融合タンパク質の発現を IPTG にて誘導した. 集菌後の培養上清を Affinity カラムに通し, 結合した融合タンパク質に NaF を酵素反応させ, rPepD の精製を行った. この精製には Profina Protein Purification System (Bio-Rad) を使用した.

### 1.5 BEAS-2B 細胞における Interleukin-8 (IL-8) 産生量の測定

BEAS-2B 細胞を24 well 培養プレート (Corning, NY, U.S.A.) に $5 \times 10^4$ 細胞/well になるよう播種し, 18時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない D-MEM にて *P. g. fimA* I 型および *fimA* II 型由来 LPS を, それぞれ0.01, 0.1, 0.5および1  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で作用させた. また同様に培養した BEAS-2B 細胞に *P. g. fimA* II 型由来 LPS および rPepD を100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加した. ともに24時間後の培養上清を試料とし ELISA 法 (ELISA kit ; Affymetrix, CA, U.S.A.) にて IL-8産生量を測定した.

### 1.6 rPepD 添加による BEAS-2B 細胞における経時的な Interleukin-6 (IL-6) および IL-8 産生量の測定

方法1.5と同様に培養した BEAS-2B 細胞に1  $\mu\text{g/ml}$  の rPepD を添加し, 4, 8および24時間後の培養上清を試料とし, ELISA 法 (ELISA kit ; Affymetrix) にて IL-6および IL-8産生量を測定した.

### 1.7 アミノペプチダーゼ阻害剤添加による rPepD 活性の測定

アミノペプチダーゼ阻害剤として Phebestin, Amastatin, Leuhistin, Arphamenine B および

Bestatin (MSD, Darmstadt, Germany) を使用し, Aoki ら<sup>28)</sup>および Wang ら<sup>55)</sup>の方法に従い rPepD の活性を測定した. まず, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に, rPepD (0.5 mg/ml) , 各 アミノペプチダーゼ阻害剤 (1  $\mu$ M) を添加し, 2 mM カルノシン ( $\beta$ -alanyl-histidine ;  $\beta$ -Ala-His)を基質として加え, 反応を開始させた. 37°Cで1時間経過した後, 1% trichloroacetic acid を加えて室温で30分間静置し反応を停止させた. 次に, 1 mg/ml の O-phthaldialdehyde (OPA) を反応溶液に加え, 暗所にて37°Cで15分間誘導体化反応を行った. OPA により誘導体化された L-histidine は Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific, MA, U.S.A.) にて励起波長 355 nm および蛍光波長450 nm により検出した.

### 1.8 *P. g. fimA* II 型の増殖に対する Bestatin の影響

*P. g. fimA* II 型を方法1.1に示した条件下にて48時間嫌気培養した後, Grenier ら<sup>31)</sup>の報告に従い, 2 v/v%になるように新鮮な培地に播種した. Bestatin を0.1, 0.5, 2.5および12.5  $\mu$ g/ml の濃度で添加し, 56時間連続培養を行い, 分光光度計を用いて経時的に濁度 (OD<sub>600</sub>) を測定した.

### 1.9 Bestatin 添加による BEAS-2B 細胞の生存率の測定

BEAS-2B 細胞を6 well 培養プレート (Corning) に $2 \times 10^5$  細胞/well になるように播種し, 18時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない D-MEM に交換し, Bestatin を0.1, 1, 10および100  $\mu$ g/ml の濃度で添加した. 培養24時間後に細胞を回収し, Trypan blue にて染色を行い Countess<sup>TM</sup> 自動セルカウンター (Invitrogen, CA, U.S.A.) を用いて細胞生存率の測定を行った.

## 2. *P. g.*のヒト気管上皮細胞への侵入と Bestatin の有用性

## 2.1 供試菌株および培養

*P. g. fimA* II 型 (*P. g.* TDC60株 JCM 19600 ; RIKEN RBC, Japan) を, 方法1.1に示した条件下にて嫌気培養した. 菌数は, 分光光度計を用いて菌懸濁液の濁度 (OD<sub>600</sub>) を測定し, 同菌液を血液寒天培地 (変法 CDC 嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地 ; BD) に塗布・培養して得られた形成コロニー数から, OD<sub>600</sub>が0.7の時の菌濃度が $6 \times 10^8$  CFU/mlであることを確認した. 上記濃度まで培養した菌を6,000 rpm で4°C, 5分間遠心分離した後, 沈渣を Phosphate Buffered Saline (PBS) にて2回洗浄し, 必要な菌濃度に調整して各々の実験に供した.

## 2.2 細胞培養

BEAS-2B 細胞を方法1.2に示した条件下にて継代培養し, 実験に供した.

## 2.3 *P. g. fimA* II 型の BEAS-2B 細胞への侵入実験と Bestatin 添加による影響

*P. g. fimA* II 型の BEAS-2B 細胞への侵入は, Duncan ら<sup>56)</sup>および Sandros ら<sup>57)</sup>の方法に従い, antibiotic protection assay を用いて行った. まず, BEAS-2B 細胞を6 well 培養プレートに $2 \times 10^5$  細胞/well になるように播種し, 18時間培養後, FBS および抗菌薬を含まない D-MEM に交換し, *P. g. fimA* II 型を Multiplicity of infection (MOI) 1, 10および100で2時間感染させた. 次いで, PBS にて3回洗浄後, 抗菌薬 (200 μg/ml metronidazole, 300 μg/ml gentamycin ; Sigma) を添加した D-MEM にて1時間培養し, 細胞表面および細胞外に存在する菌を除去した. 洗浄後, BEAS-2B 細胞を滅菌蒸留水で30分処理し, 回収したライセートを段階希釈し血液寒天培地に播種した. 14日間嫌気培養後, CFU をカウントし, 細胞侵入数を算出した. Bestatin 添加による影響については *P. g. fimA* II 型の侵入を MOI 100で行い, antibiotic protection assay 後に10 μg/ml の Bestatin を添加し, 1.5, 4, 8および24時間培養し細胞侵入数を上述と同様に算出した. 実験群は BEAS-2B 細胞に対し, *P. g. fimA* II 型非感染 Bestatin 非添加の群 (対照群), *P. g. fimA* II 型非感染 Bestatin 添加の群 (Bestatin 添加群), *P. g. fimA* II 型侵入後の Bestatin

非添加の群 (*P. g. fimA* II 型侵入群), *P. g. fimA* II 型侵入後の Bestatin 添加の群 (*P. g. fimA* II 型侵入 Bestatin 添加群) の4群とした.

#### 2.4 *P. g. fimA* II 型侵入後 Bestatin 添加による BEAS-2B 細胞における IL-6, IL-8, Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) ならびに Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) の遺伝子発現解析

*P. g. fimA* II 型を MOI 100 で感染させ方法 2.3 に示した antibiotic protection assay を行った後, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の Bestatin を添加した. Bestatin 添加 4, 8 時間後に RNeasy Mini Kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) で total RNA を抽出し, QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて cDNA を合成した. この cDNA を鋳型とし, KAPA<sup>®</sup> SYBR FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems, MA, U.S.A.) と IL-6, IL-8, STAT3 ならびに SOCS3 のプライマー (Table 2) を用い, Eco<sup>™</sup> Real-Time PCR system (Illumina, CA, U.S.A.) にて 95°C 30 秒で熱変性させた後, 95°C 5 秒, 60°C 20 秒の 2 段階で設定し, 45 サイクルで real-time PCR による遺伝子発現解析を行った. なお, 内在性コントロールとして GAPDH を使用した.

#### 2.5 統計分析

方法 1 および 2 の実験結果は, 平均値  $\pm$  標準偏差 (mean  $\pm$  SD) で示した. 2 群間の比較には Student's *t*-test を用い, その他の比較は一元配置分散分析に従い, Tukey-Kramer test を用いた.

## 結 果

### 1. ヒト気管上皮細胞における *P. g.* 産生酵素 PepD の影響

#### 1.1 *P. g. fimA* I 型および *fimA* II 型由来 LPS 刺激による BEAS-2B 細胞における IL-8 産生量

*P. g. fimA* I 型および II 型由来の LPS はともに濃度依存的に BEAS-2B 細胞における IL-8 産生量を有意に増大させた。また、LPS 濃度が 0.1, 0.5, および 1  $\mu\text{g/ml}$  における IL-8 産生量は、*P. g. fimA* II 型由来 LPS による方が *fimA* I 型由来 LPS よりも有意に低かった (Fig. 1)。

#### 1.2 *P. g. fimA* II 型由来 LPS および rPepD による BEAS-2B 細胞における IL-8 産生量

100  $\mu\text{g/ml}$  の *P. g. fimA* II 型由来 LPS および rPepD はともに BEAS-2B 細胞において IL-8 産生量を有意に増加させ、LPS 添加群と比較して rPepD 添加群の方が有意に高かった (Fig. 2)。

#### 1.3 rPepD による BEAS-2B 細胞における IL-6 および IL-8 産生量の経時的変化

IL-6 および IL-8 産生量はともに、実験で行った全ての経過時間において 1  $\mu\text{g/ml}$  の rPepD 添加群で対照群に比べて有意に増加した。さらに、rPepD 添加群における IL-6 および IL-8 産生量はともに、8 時間においてピークを認めた (Fig. 3A, B)。

#### 1.4 アミノペプチダーゼ阻害剤による rPepD 活性への影響

カルノシン( $\beta\text{-Ala-His}$ ) を基質とした rPepD の酵素活性は、Bestatin によって顕著に阻害された (Fig. 4)。

## 1.5 Bestatin による *P. g. fimA* II 型の増殖能への影響

Bestatin 添加濃度が 0.1  $\mu\text{g/ml}$  および 0.5  $\mu\text{g/ml}$  では, *P. g. fimA* II 型は対数増殖期において増殖が抑制され, 添加濃度 2.5  $\mu\text{g/ml}$  および 12.5  $\mu\text{g/ml}$  では対数増殖期を認めなかった (Fig. 5) .

## 1.6 *P. g.* Bestatin による BEAS-2B 細胞の生存率の影響

すべての Bestatin 添加濃度 (0.1~100  $\mu\text{g/ml}$ ) においても BEAS-2B 細胞の生存率は, 対照群と比較して有意差は認められなかった (Fig. 6) .

## 2. *P. g. fimA* II 型のヒト気管上皮細胞への侵入と Bestatin の有用性

### 2.1 *P. g. fimA* II 型による BEAS-2B 細胞への侵入

*P. g. fimA* II 型の BEAS-2B 細胞内侵入菌数 (侵入菌数) は感染時の MOI 依存的に増加した (Fig. 7A) . MOI 100 での感染実験における細胞内生存細菌数は時間依存的に減少し, 24時間後には検出されなかった. 4時間における *P. g. fimA* II 型侵入 Bestatin 添加群の侵入菌数が *P. g. fimA* II 型侵入群と比較して有意に上昇していた. それ以外の作用時間においては両者間に有意な差は認められなかった (Fig. 7B) .

### 2.2 *P. g. fimA* II 型侵入 Bestatin 添加 BEAS-2B 細胞における IL-6, IL-8, STAT3 ならびに SOCS3 遺伝子発現

Bestatin 添加群の IL-6, IL-8, STAT3 ならびに SOCS3 遺伝子発現は対照群と比べて有意な差を認めなかった (Fig. 8, 9) . *P. g. fimA* II 型侵入群の IL-6 および IL-8 の遺伝子発現は対照群と比較して全ての作用時間で有意に高かったが, IL-6 は時間依存的にその量は減少したが, IL-8 は時間的な増減が認められなかった. また *P. g. fimA* II 型侵入群と比べて *P. g. fimA* II 型

侵入 Bestatin 添加群の IL-8遺伝子発現は全ての作用時間で有意に減少したが、IL-6遺伝子発現量は8時間では有意に減少するものの4時間では有意な差を認めなかった (Fig. 8A, B) .  
また、STAT3および SOCS3遺伝子発現は全ての作用時間での実験群間において有意差がなかった (Fig. 9A, B) .



## 考 察

LPS は *P. g.* の代表的な病原因子であるにも関わらず<sup>58-60)</sup>, *P. g. fimA* II 型由来の LPS による BEAS-2B 細胞の IL-8 産生量が *P. g. fimA* I 型由来 LPS に比べて低いことから, 他の病原因子が歯周病の炎症応答に重要な働きをしている可能性があると考えられた. *P. g. fimA* II 型由来の LPS と rPepD で刺激した BEAS-2B 細胞における IL-8 産生量の比較では, rPepD 刺激によるものの方が有意に上昇しことから, *P. g. fimA* II 型の PepD は BEAS-2B 細胞の炎症応答惹起においてより強力な病原因子として担っている可能性があると考えられた. これは BEAS-2B 細胞に対する rPepD 刺激のすべての経時的な時点において IL-6 および IL-8 の産生量が対照群に比較し高いことから裏付けられた.

PepD を標的酵素とするアミノペプチダーゼ阻害剤の検索を行ったところ, 生体の様々な臓器に広く分布しているカルノシン ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) を基質とした際の Bestatin によって著しい rPepD 活性抑制が認められたことから, PepD は Bestatin の標的酵素であることが示唆された. Bestatin は *P. g. fimA* I 型の増殖抑制を示すことが知られている<sup>30, 31)</sup>が, その作用機序についてはジンジパインの関与が報告されている<sup>61)</sup>ものの明らかにはされていない. 本研究の結果から, Bestatin は *P. g. fimA* II 型への増殖抑制も示し, PepD 活性の抑制がその作用の一旦を担っている可能性が考えられた. そこで, 細菌の繰り返し侵入によって引き起こされる慢性呼吸器疾患の発症ないし進行抑制にむけた *P. g. fimA* II 型の増殖抑制ならびに炎症応答抑制として Bestatin の有用性について検討を加えた. Bestatin は放線菌の二次代謝産物から生成されたアミノペプチダーゼ N, B 阻害剤である<sup>62, 63)</sup>が, BEAS-2B 細胞への添加実験において細胞生存に影響を示さなかったことから宿主細胞に対して為害性はないものと思われ, 臨床応用への可能性は高いと考えられる.

現在までに様々な臓器由来の上皮細胞への *P. g.* 侵入が報告されているが<sup>64-67)</sup>, 気管上皮細

胞への報告はほとんどない。本研究で BEAS-2B 細胞へ *P. g. fimA* II 型を 2 時間感染させたところ、侵入菌数は MOI 依存的に上昇した。また、*P. g. fimA* II 型の BEAS-2B 細胞内侵入 24 時間後の血液寒天培地ではコロニーが検出されなかった。*P. g.* は侵入後 4 時間で大部分が分解され<sup>67)</sup> 24 時間以降は検出されないとの報告<sup>38, 42)</sup>があることから、BEAS-2B 細胞に侵入した *P. g. fimA* II 型の多くは、8 時間から 24 時間までにリソソームないしはオートファゴソームによって宿主細胞により分解されてしまうか、初期エンドソームからリサイクリング経路によって細胞外へ脱出した可能性があると思われる。そして *P. g. fimA* II 型侵入 Bestatin 添加群におけるコロニー数は *P. g. fimA* II 型侵入群と比べて減少しておらず、4 時間後においては *P. g. fimA* II 型侵入群と比較して、*P. g. fimA* II 型侵入 Bestatin 添加群のコロニー数は有意に上昇していたことから、Bestatin は BEAS-2B 細胞内に侵入した *P. g. fimA* II 型の PepD に直接的に作用して増殖能を抑制することは出来ないと考えられた。しかしながら Bestatin には免疫調整作用があり、上皮細胞が示す細菌に対する防御修復反応としての炎症反応<sup>68, 69)</sup> に対し、急性炎症では終息させ<sup>70)</sup>、慢性炎症では増悪させる<sup>71, 72)</sup>などの働きが報告されていることから、BEAS-2B 細胞の炎症応答への影響を検討することは意義のあることであると思われる。

一般的に生体細胞は病原菌に存在する病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular pattern molecules; PAMPs) や生体細胞の破壊・損傷によって産生される傷害関連分子パターン (Damage-associated molecular pattern molecule; DAMPs) が、構造に合わせた結合様式<sup>68, 69, 73-75)</sup> (Table3) でパターン認識受容体 (PRRs) に認識された後、それぞれの下流にある異なったシグナル伝達系が発動し、早期に IL-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) , IL-6 など、次いで IL-8, C-C motif chemokine 2 (CCL2) , 抑制系サイトカインである IL-10 などの多種多様な物質が次々に産生されネットワークが形成される<sup>45, 76-80)</sup> (Fig. 10) 。本研究結果では *fimA* II 型侵入群における IL-6 遺伝子発現の上昇は弱く時間経過とともに減少し、IL-8 の遺伝子発現上昇は比較的強く時間依存的ではなかった。これらは、歯肉上皮細胞におけ

る IL-6 遺伝子発現は感染させた *P. g.* の菌株によって弱いものが存在するが、IL-8 遺伝子は全ての菌株で強く発現するとの報告<sup>64)</sup>や、気管上皮細胞は免疫担当細胞との相関性が高いために IL-8 を多く産生するとの報告<sup>81)</sup> と一致している。また *P. g. fimA* II 型侵入群と *P. g. fimA* II 型侵入 Bestatin 添加群の遺伝子発現量を比較すると、Bestatin 添加によって IL-6 は 8 時間で、IL-8 は 4 時間、8 時間ともに有意に減少した。これは、*P. g. fimA* II 型が BEAS-2B 細胞内から脱出後に産生された PepD が培養上清中の Bestatin によって活性阻害を受けたことにより *P. g. fimA* II 型の生存が抑制され、本菌は再度細胞へ再侵入することが不可能になり、炎症応答の抑制が認められたためであると考えられる。また Bestatin は LPS 刺激をうけた免疫細胞に対し IL-6 や IL-8 遺伝子発現を減少させ、IL-10 遺伝子発現を上昇させるとの報告がある<sup>82)</sup>。これは Bestatin が BEAS-2B 細胞表層のアミノペプチダーゼに結合し酵素活性を阻害することにより生じると考えられている。このアミノペプチダーゼは、炎症や損傷などを受けた場合において細胞表層に強く発現し、炎症関連メディエーターの発現抑制や TLR4 機能抑制などの急性炎症を終息させる働きをする<sup>70)</sup>。免疫細胞との相関性が高い BEAS-2B 細胞に対しても同様の働きをした可能性が示唆された。しかしながら作用 4 時間では IL-6 遺伝子発現には両実験群間に有意差を認めず、IL-6 と IL-8 の発現応答の時間差や *P. g. fimA* II 型の細胞外脱出の時間などへの Bestatin の関与をより深く追及する必要があると思われた。近年 IL-6 は炎症促進と抑制の両方に関与することから<sup>83, 84)</sup>、炎症性疾患治療薬のターゲットとして着目されている。産生された IL-6 が受容体で認識されると JAK/gp130 の結合により STAT3 の活性や核移行が誘発される<sup>85-87)</sup>。STAT3 は NF- $\kappa$ B 活性の調節、SOCS3 や IL-8 の発現の促進に関与するが、SOCS3 は JAK/gp130 の活性を抑制するため、負のフィードバック機構に関与すると言われている<sup>88, 89)</sup>。この一連のカスケードは JAK/STAT 経路と言われているが、本研究では STAT3 および SOCS3 ともに遺伝子発現を認められなかったため、JAK/STAT 経路への関連性は低いものと思われる。以上のことから、より詳細にサイトカインネットワークを確認していく必要は残るが、*P. g. fimA* II 型の感染、侵入を受けた気管上皮細胞に

においては IL-8 のコントロールが今後の研究の鍵となることが推察された。

有病高齢者や重症心身障害児者における呼吸器疾患は症状が不顕性化しやすく、原因の特定が困難であることが多いため生命の維持に影響を及ぼすが、*P. g.* などの口腔常在菌が有力な原因菌の一つであることは周知の事実である。*P. g.* のなかでも特に病原性が高いとされる *P. g. fimA* II 型の増殖および炎症応答制御が重要な鍵となると考えられ、その *P. g. fimA* II 型と生体細胞とに存在するアミノペプチダーゼ B ないし N の両方に働く Bestatin は、菌の増殖や炎症抑制に対してのみならず、細胞表層に存在するアミノペプチダーゼに結合することで生じる生体応答調節に対しても有用であると思われるため、臨床応用に向けて更なる検討を重ねる意義があると考えられる。

## 結 論

*P. g. fimA* II型に代表的に発現するジアミノメタロペプチダーゼである PepD は、気管上皮細胞である BEAS-2B 細胞において炎症反応を惹起させる。また PepD はアミノペプチダーゼ阻害剤である Bestatin の標的酵素であることが判明した。従って *P. g. fimA* II型の増殖抑制が Bestatin 添加によって確認されたことは、*P. g. fimA* II型のアミノ酸代謝に大きく関与する PepD の活性を Bestatin が阻害したためであると推測された。一方、BEAS-2B 細胞内に侵入した *P. g. fimA* II型の増殖に対して Bestatin は抑制効果を示さないことが示唆された。しかしながら Bestatin は、BEAS-2B 細胞表層に存在するアミノペプチダーゼ N を阻害することにより炎症抑制効果を有することが推測される。このアミノペプチダーゼ N は炎症発症時に細胞表層に強く発現し、炎症性サイトカインの発現抑制に関与すると言われている。本研究では炎症性サイトカインのなかでも IL-8の発現が顕著に確認されたため、今後は IL-8 遺伝子発現調節への影響を検索することが慢性呼吸器疾患に対する Bestatin の有用性の解明へと繋がると考えられた。

本論文は、主となる参考論文「気管上皮細胞内に侵入した *P. gingivalis fimA* II 型に対する Bestatin の影響」日本障害者歯科学会雑誌，掲載予定および副となる参考論文「気管上皮細胞における *Porphyromonas gingivalis* 産生酵素 PepD の影響」日本障害者歯科学会雑誌：Vol. 36, No. 2, 605-615, 2015.をまとめたものである。

## 参考文献

- 1) Terpenning M. S. , Taylor G.W. *et al.* : Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 49 : 557-563, 2001.
- 2) 寺本信嗣 : 誤嚥性肺炎の診断法の開発と新治療戦略. *日呼ケアリハ学誌*, 24 : 7-12, 2014.
- 3) Madalli R., Kheur S., *et al.* : Assessment of role of *Porphyromonas gingivalis* as an aggravating factor for chronic obstructive pulmonary disease patients with periodontitis. *Dental Hypotheses*, 7 : 100-106, 2016.
- 4) 米山武義 : 誤嚥性肺炎予防における口腔ケアの効果. *老年歯学*, 38 : 476-477, 2001.
- 5) Cavrini, F., Sambri, V., *et al.*: Molecular detection of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in carotid and aortic atheromatous plaques by FISH: report of two cases. *J. Med. Microbiol.*, 54 : 93-96, 2005.
- 6) Li X., Kristin M., *et al.* : Systemic Diseases Caused by Oral Infection. *Clin. Microbiol.*, 13 : 547-558, 2000.
- 7) Kimizuka, R., Kato, T., *et al.*: Mixed infections with *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* cause excessive inflammatory responses in a mouse pneumonia model compared with monoinfections. *Microbes. Infect.*, 5 : 1357-1362, 2003.
- 8) Pinto E.H., Longo P.L., *et al.* : Assessment of the quantity of microorganisms associated with bronchiectasis in saliva, sputum and nasal lavage after periodontal treatment : a study protocol of a randomised controlled trial. *BMJ Open*, 6 : 1-8, 2016.
- 9) 門屋講太郎, 吉岡泰子, 他 : 肺膿瘍・膿胸 7 例における歯周病細菌 PCR 検査の臨床的意義の検討. *日呼吸誌*, 2 : 79-84, 2013.
- 10) Nagano, K., Abiko, Y., *et al.*: *Porphyromonas gingivalis* FimA fimbriae: Roles of the *fim* gene cluster in the fimbrial assembly and antigenic heterogeneity among *fimA* genotypes *J. Oral Biosciences.*, 54 : 160-163, 2012.
- 11) Morten, E., Nakano, K., *et al.*: *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J. Oral Microbiology*, 5 : 20265-20275, 2013.
- 12) Hua, X., Whasun O.C., *et al.*: Regulation of the *Porphyromonas gingivalis fimA* (Fimbrillin) Gene. *Infect. Immun.*, 68 : 6574-6579, 2000.
- 13) Amano A., Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with *fimA* genotypes in periodontitis patients. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 1426-1430, 1999.
- 14) 天野敦雄 : *Porphyromonas gingivalis* 線毛の付着能と遺伝子多型の歯周病原生との関連. *日歯周誌*, 45 : 357-363, 2003.

- 15) Nakagawa I., Amano A., *et al.* : Functional Differences among FimA Variants of *Porphyromonas gingivalis* and Their Effects on Adhesion to and Invasion of Human Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 70 : 277-85, 2002.
- 16) Wang M., Liang S., *et al.* : Differential virulence and innate immune interactions of Type I and II fimbrial genotypes of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 24 : 478-84, 2009.
- 17) Amano A., Nakagawa I., *et al.* : Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J. Periodontal Res.*, 39 : 136-42, 2004.
- 18) Yamasaki, T., Nagata, A., *et al.*: Black-pigmented, asaccharolytic *Bacteroides* species resembling *Porphyromonas gingivalis* (*Bacteroides gingivalis*) from beagle dogs. *Oral Microbiol. Immunol.*, 5 : 332-335, 1990.
- 19) 庄子幹郎:ポルフィロモナス・ジンジバリスの表面蛋白質の輸送と局在化に関する研究. *日細菌誌*, 67 : 245-255, 2012.
- 20) 中山浩次 : 口腔偏性嫌気性菌 *Porphyromonas gingivalis* の病原性に関する分子遺伝学的研究. *日細菌誌*, 56 : 573-585, 2001.
- 21) Yoshimura, F., Murakami, Y., *et al.*: Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodont. Res.*, 44: 1-12, 2009.
- 22) Bao, K., Belibasakis, G., *et al.*: Role of *Porphyromonas gingivalis* gingipains in multi-species biofilm formation. *BMC. Microbiology.*, 14:258, 2014.
- 23) Uehara, A., Naito, M., *et al.* : Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Med. Microbiology.*, 57: 500-507, 2008.
- 24) Clais, S., Boulet, G., *et al.*: Importance of biofilm formation and dipeptidyl peptidase IV for the pathogenicity of clinical *Porphyromonas gingivalis* isolates. *Pathog. Dis.*, 70:408-413, 2014.
- 25) Kumagai, Y., Konishi, K., *et al.*: Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. *Infect. Immun.*, 68: 716-724, 2000.
- 26) 伊藤潔, 中嶋義隆, 他 : ペプチド最終分解系に関するエキソペプチダーゼの構造と機能. *生化学*, 81:5-16, 2009.
- 27) Benedyk M., Mydel P.M., *et al.* : Gingipains: Critical Factors in the Development of Aspiration Pneumonia Caused by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Innate. Immun.*, ; 8 : 185-98, 2016.
- 28) Aoki, A., Shibata, Y., *et al.*: Transition metal ions induce carnosinase activity in PepD-homologous protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Microb. Pathog.*, 52:17-24, 2012.
- 29) Copeland, R. A., *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists.* Wiley-Interscience, 2005.



- 30) Labbé, S., Grenier, D., *et al.*: Effects of dipeptide bestatin on *Porphyromonas gingivalis* and epithelial cells. *J Periodontol.* 72 : 714-721, 2001.
- 31) Grenier D. and Michaud, J. : Selective growth inhibition of *Porphyromonas gingivalis* by bestatin. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 123 : 193-199, 1994.
- 32) Whitsett J.A., Alenghat T. : Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nature Immunol.*, 16 : 27-35. 2015.
- 33) Eckmann L., Kagnoff M.F., *et al.* : Epithelial cells secrete the Chemokine Interleukin-8 in Response to Bacterial Entry. *Infect. Immun.*, 61 : 4569-4574, 1993.
- 34) Guillot L., Medjane S., *et al.* : Response of Human Pulmonary Epithelial Cells to Lipopolysaccharide Involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent Signaling Pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J. Biol. Chem.*, 279 : 2712-2718, 2004.
- 35) 矢野環 細胞内侵入性細菌と宿主のオートファジーを介した攻防. *生化学* 85 : 92-97, 2013.
- 36) Falkow S., : Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell*, 65 : 1099-1102, 1991.
- 37) 中川一路 : オートファジーによる防御システム. 細胞内の細菌排除機構. *日細菌誌*, 60 : 485-489, 2005.
- 38) 天野敦雄 : 細菌感染とオートファジー. *モダンメディア* 57 : 159-165, 2011.
- 39) 桜井敦朗, 新谷誠康, : 口腔内細菌に対する宿主免疫応答と疾患への関与. *小児歯誌*, 50 : 22-30, 2012.
- 40) Ribet D., Cossart P., : How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 17 : 173-183, 2015.
- 41) Lamont R.J., Chan A., *et al.* : *Porphyromonas gingivalis* Invasion of Gingival Epithelial Cells. *Infect. Immun.*, 63 : 3878-3885, 1995.
- 42) Olsen I., Progulske-Fox A., : Invasion of *Porphyromonas gingivalis* strains into vascular cells and tissue. *J. Oral Microbiol.*, 7 : 1-9, 2015.
- 43) Irshad M., van der Reijden WA., *et al.* : In Vitro invasion and Survival of *Porphyromonas gingivalis* in Gingival Fibroblasts ; Role of the Capsule. *AITE*, 60 : 469-476, 2012.
- 44) Takeuchi H., Furuta N., *et al.* Cell entry and exit by periodontal pathogen via recycling pathway. *Commun. Integr Biol.*, 4 : 587-589, 2011.
- 45) Tribble G.D., Lamont R.J., : Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontology* 2000, 52 : 68-83, 2010.
- 46) Li L., Michel R., : Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiology*, 8 : 1-11, 2008.
- 47) 梅沢浜夫, 滝田智久, : ベスタチン類の合成と生理活性. *有機合成化学協会誌*, 38 : 1077-1083, 1980.

- 48) 日本緩和医療学会 緩和医療ガイドライン作成委員会 補完代替医療ガイドライン作業部会：がん補完代替医療ガイドライン，第1版，24-27，日本緩和医療学会，東京，2008.
- 49) Ota K., Kurita S., *et al.*: Immunotherapy with bestatin for acute nonlymphocytic leukemia in adults. *Cancer. Immunol. Immunother.*, 23:5-10, 1986.
- 50) Ichimura E., Yamada M., *et al.*: Immunohistochemical expression of aminopeptidase N (CD13) in human lung squamous cell carcinomas, with special reference to Bestatin adjuvant therapy. *Pathol. Int.*, 56 : 296-300, 2006.
- 51) Cowburn A. S., Sobolewski A., *et al.* : Aminopeptidase N (CD13) Regulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Apoptosis in Human Neutrophils. *J. of Biological Chemistry*, 281 : 12458-12467, 2006.
- 52) Dunlap B. E., Dunlap S.A., *et al.* : Effect of Bestatin on in Vitro Responses of Murine Lymphocytes to T-Cell Stimuli. *Scand. J. Immunol.*, 20 : 237-45, 1984.
- 53) Tian W., Jiang X., *et al.* : Macrophage Leukotriene B4 Prevents Endothelial Injury and Reverses Pulmonary Hypertension. *Sci Transl Med.* 5 : 1-32, 2013.
- 54) Koga T., Nishihara T., *et al.*: Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, 47:638-647, 1985.
- 55) Wang T. Y., Chen Y. C., *et al.*: Expression and characterization of the biofilm-related and carnosine-hydrolyzing aminoacylhistidine dipeptidase from *Vibrio alginolyticus*. *FEBS. J.*, 275 : 5007-5020. 2008.
- 56) Duncan M. J., Nakao S., *et al.* : Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect. Immun.*, 61 : 2260-2265, 1993.
- 57) Sandros J., Papapanou P., *et al.* : *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells in vitro. *J Periodontal Res.*, 28 : 219-26, 1993.
- 58) Mysak J., Podzimek S., *et al.*: *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen. *J. immune. Res.*, 2014 : 1-8, 2014.
- 59) Ara, Z., Kurata, K., *et al.*: Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J. Periodontal. Res.*, 44 : 21-27, 2009.
- 60) Mayer A.K., Muehmer M., *et al.* : Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J. Immunol.*, 178 : 3134-3142, 2007.
- 61) Veillard F., Potempa B., *et al.*: Gingipain aminopeptidase activities in *Porphyromonas gingivalis*. *Biol. Chem.*, 393 : 1471-1476, 2012.
- 62) Umezawa H, Aoyagi T, *et al.* Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes., *J. Antibiotics* 29 : 97-99, 1976.
- 63) Inoue T., Kanzaki H., *et al.* : Bestatin, a potent aminopeptidase-N inhibitor, inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 79 : 171-175,

- 1994.
- 64) Eick S., Reissmann A., *et al.* : *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol. Immunol.*, 21 : 231-7, 2016.
  - 65) Dorn B. R., Burks J. N., *et al.* : Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 187 : 139-144, 2000.
  - 66) Dorn B. R., Dunn W. A., *et al.* : Invasion of Human Coronary Artery Cells by Periodontal Pathogens. *Infect. Immun.*, 67 : 5792–5798, 1999.
  - 67) Rodrigues P. H., Progulsk-Fox A., : Gene expression profile analysis of *Porphyromonas gingivalis* during invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun.* 73 : 6169-6173, 2005.
  - 68) 吉川恵次 : PAMPs, DAMPs と PRRs. *外科と代謝・栄養*, 48 : 247-249, 2014.
  - 69) Krachler A. M., Woolery A. R., *et al.* : Manipulation of kinase signaling by bacterial pathogens. *J. Cell Biol.*, 195 : 1083-1092, 2011.
  - 70) Ghosh M., Subramani J., *et al.* : CD13 Restricts TLR4 Endocytic Signal Transduction in Inflammation. *J. immun.*, 194 : 4466-4476, 2015.
  - 71) Mendes M. T., Nascimento S. M., *et al.* : Basic aminopeptidase activity is an emerging biomarker in collagen-induced rheumatoid arthritis. *Regul. Pept.*, 167 : 215-221, 2011.
  - 72) Morgan R., Endres J., *et al.* : Expression and function of aminopeptidase N/CD13 produced by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: role of CD13 in chemotaxis of cytokine-activated T cells independent of enzymatic activity. *Arthritis Rheumatol.*, 67 : 74-85, 2015.
  - 73) 金倫基 : 宿主細菌感染防御における Nod1/Nod2 の役割. *腸内細菌学雑誌*, 25 : 7-10, 2011.
  - 74) 猪原直弘 : 細胞質内パターン認識受容体 NLR の構造と機能. *生化学* 82 : 12-20, 2010.
  - 75) Qiu H. N., Wong C. K., *et al.* : Muramyl dipeptide mediated activation of human bronchial epithelial cells interacting basophils : a novel mechanism of airway inflammation. *Clin Exp Immunol.*, 172 : 81-94, 2013.
  - 76) Boniotto M., Jordan W. J., *et al.* : Human  $\alpha$ -Defensin 2 Induces a Vigorous Cytokine Response in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50 : 1433-1441, 2006.
  - 77) Trine H. Mogensen, : Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev.*, 22 : 240–273, 2009.
  - 78) Turner M. D., Nedjaib B., *et al.* : Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *BBA-Molecular Cell Research*, 1843 : 2563-2582, 2014.
  - 79) Hedges S., Svensson M., *et al.* : Interleukin-6 Response of Epithelial Cell Lines to Bacterial Stimulation In Vitro. *Infect Immun.*, 60 : 1295-1301, 1992.
  - 80) Schulz C., Farkas L., *et al.* : Differences in LPS-Induced Activation of Bronchial Epithelial Cells (BEAS-2B) and Type II-Like Pneumocytes (A-549). *Scand. J. Immunol.* 56 : 294-302, 2002.

- 81) Eckmann L., Kagnoff M. F., et al. : Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.*, 61 : 4569-4574, 1993.
- 82) Lkhagvaa B., Tani K., et al. : Bestatin, an inhibitor for aminopeptidases, modulates the production of cytokines and chemokines by activated monocytes and macrophages. *Cytokine*, 44 : 386-391, 2008.
- 83) Scheller J., Chalaris A., et al. : The pro-and anti- inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1813 : 878-888, 2011.
- 84) Stefan R. J. : IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Important for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci.*, 8 : 1237–1247, 2012.
- 85) Chen Y. Y., Ma Z. B., et al. : IL-6/STAT3/SOCS3 signaling pathway playing a regulatory role in ulcerative colitis carcinogenesis. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 8 : 12009-12017, 2015.
- 86) Tadokoro T., Wang Y., et al. : IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* : 111 : 3641-3649, 2014.
- 87) Wang Y., van Boxel-Dezaire A. H., et al. : STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, : 110 : 16975-16980, 2013.
- 88) Yasukawa H., Ohishi M., et al. : IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat. Immunol.*, 4 : 551-556, 2003.
- 89) Vij N., Sharma A., et al. : PDGF-driven proliferation, migration, and IL-8 chemokine secretion in human corneal fibroblasts involve JAK2-STAT3 signaling pathway. *Mol. Vis.*, 14 : 1020–1027, 2008.

**Table 1** Primers for PCR cloning

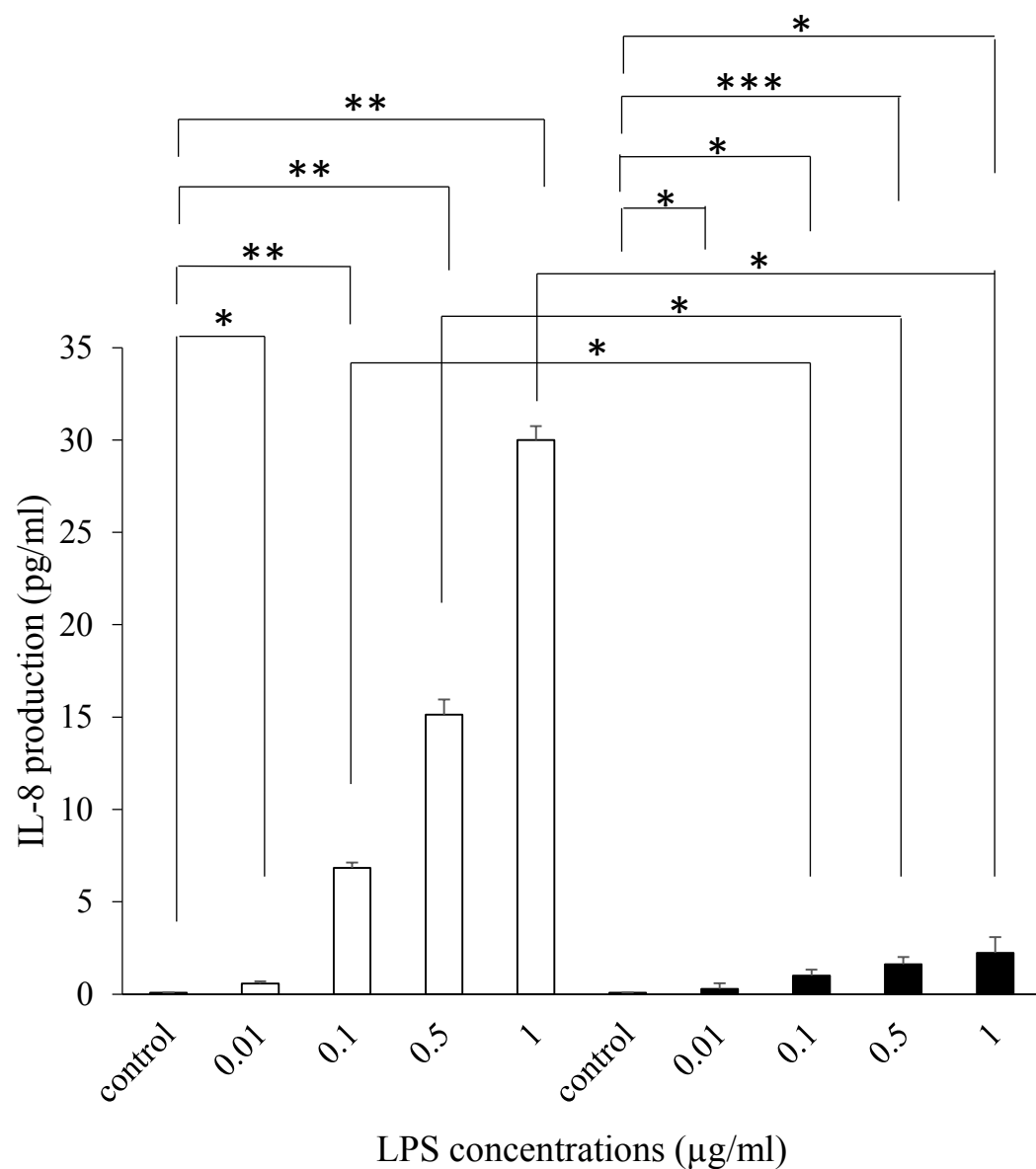
Gene name		Sequence (5'-3')
<i>pepD</i>	Forward	AAGCTTTGATGAACATTACAGATCTCAA
	Reverse	AATTCTTATTTGGCTGCGGGGATATG

**Table 2** Primers for real-time PCR

Gene name		Sequence (5'-3')
IL-6	Forward	AAGCCAGAGCTGTGCAGATGAGTA
	Reverse	TGTCCTGCAGCCACTGGTTC
IL-8	Forward	ATTGCATCTGGCAACCCTAG
	Reverse	CTGCGCCAACACAGAAATTA
STAT3	Forward	TGGCACTTGTAATGGCGTCTTC
	Reverse	CAGCAGGGAGGAGTCAGGAG
SOCS3	Forward	TGAGCGCGGCTACAGCTT
	Reverse	TCCTTAATGTCACGCACGATTT
GAPDH	Forward	GTAGAGGCAGGGATGATGT
	Reverse	TCCAAAATCAAGTGGGGCGA

**Table 3**

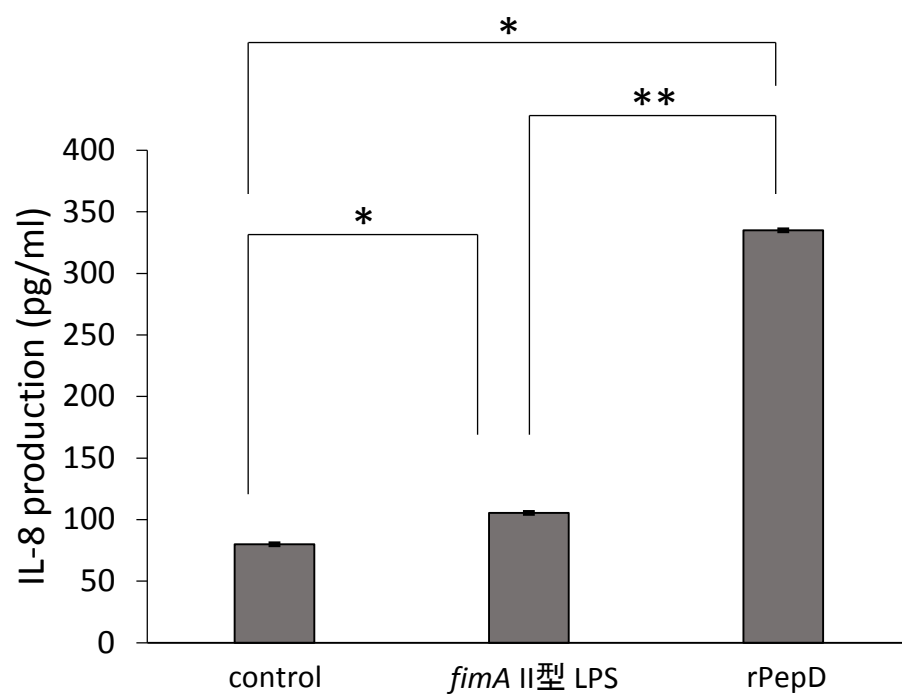
<i>P. gingivalis</i> PAMPs	生体細胞 PRRs	DAMPs	
LPS	Toll-like receptor (TLR) 4	high-mobility group box 1 (HMGB1) heat shock proteins (HSPs)	
リポタンパク質	細胞膜	high-mobility group box 1 (HMGB1) heat shock proteins (HSPs)	
二本鎖RNA			TLR2
一本鎖DNA			TLR3
線毛			TLR7, 8, 9
ペプチドグリカン (gamma-D-glutamyl-meso-DAP)	細胞内		
Muramyl dipeptide			Nod-like receptor (NLR)
		Nod1	
		Nod2	



**Figure 1** *P. g. fimA* I型およびII型 LPS刺激によるBEAS-2B細胞におけるIL-8産生量

BEAS-2B細胞に*fimA* I型およびII型由来LPSを24時間添加した後、回収した培養上清中におけるIL-8産生量をELISA法にて測定した。IL-8産生量は*P. g. fimA* I型、II型由来LPSにより濃度依存的に増大した。添加濃度0.1-1µg/mlの*P. g. fimA* II型由来LPSによる産生量は*P. g. fimA* I型由来LPSと比較して有意に低かった (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.005$ )。

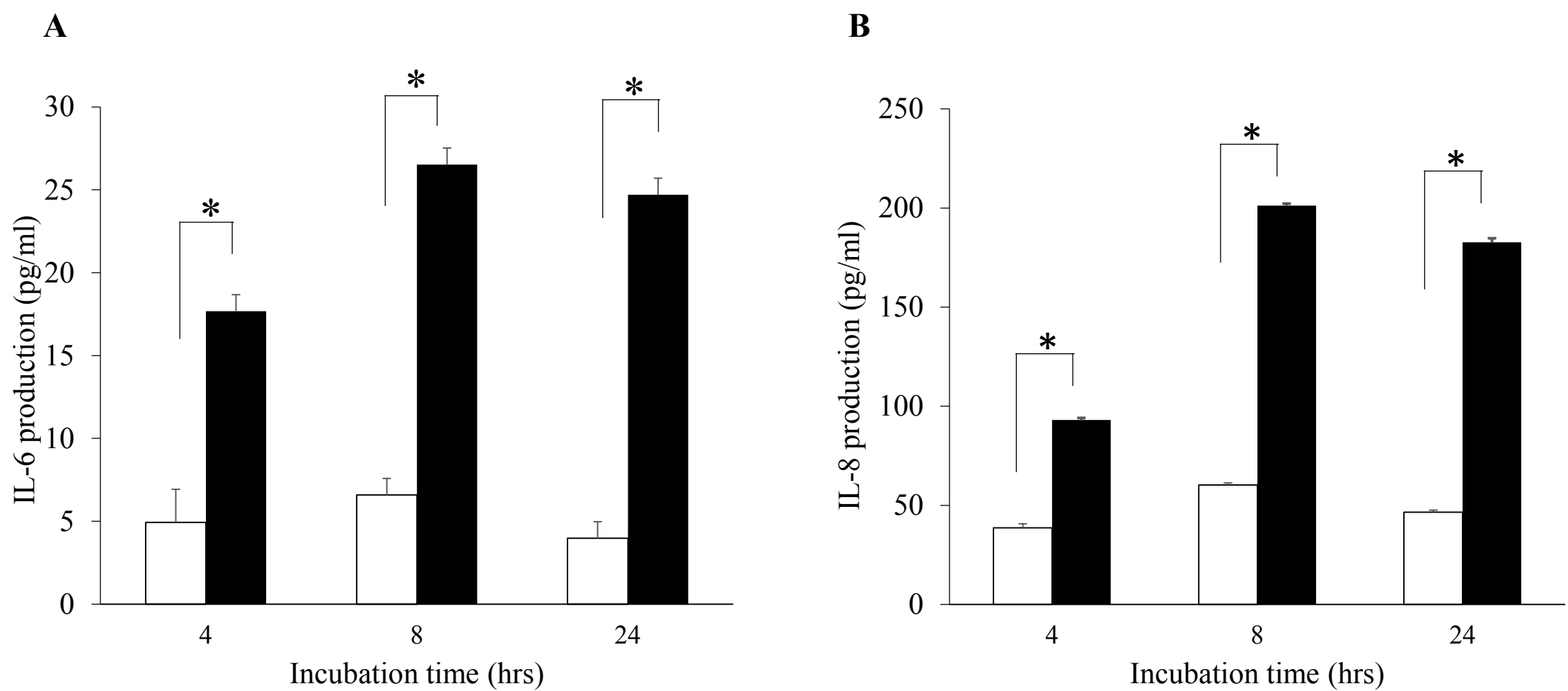
□: *P. g. fimA* I型LPS添加群, ■: *P. g. fimA* II型LPS添加群



**Figure 2** *P. g. fimA* II型由来LPSおよびrPepDによるBEAS-2B細胞におけるIL-8産生量

BEAS-2B細胞に100 µg/mlの*P. g. fimA* II型由来LPSおよびrPepDを24時間添加した後、回収した培養上清中におけるIL-8産生量をELISA法にて測定した。

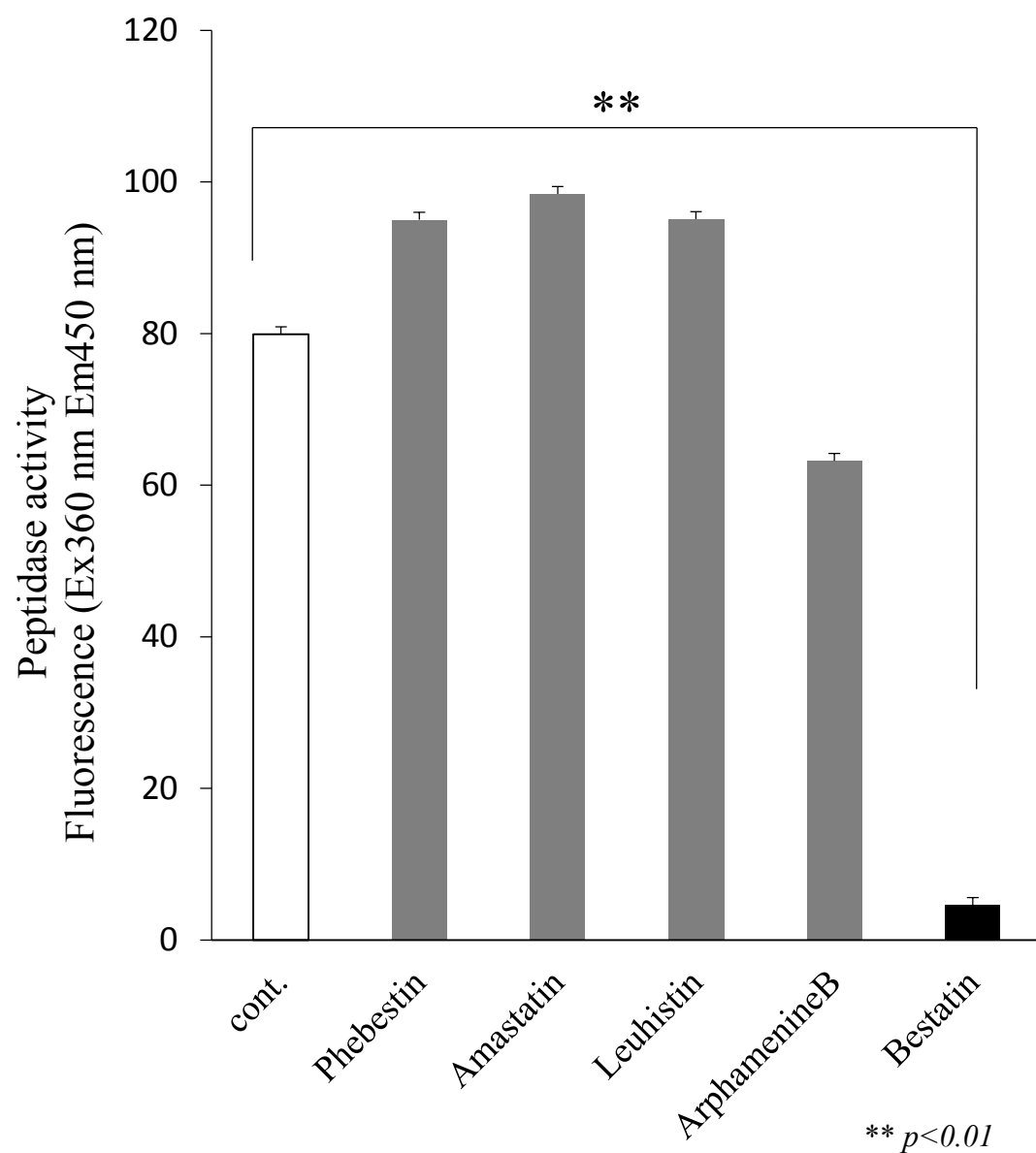
LPSおよびrPepD添加群はともにコントロールと比較して有意に増大していた。またLPS添加群と比較してrPepD添加群の方が有意に高かった (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )。



**Figure 3** rPepDによるBEAS-2B細胞におけるIL-6, IL-8産生量の経時的変化

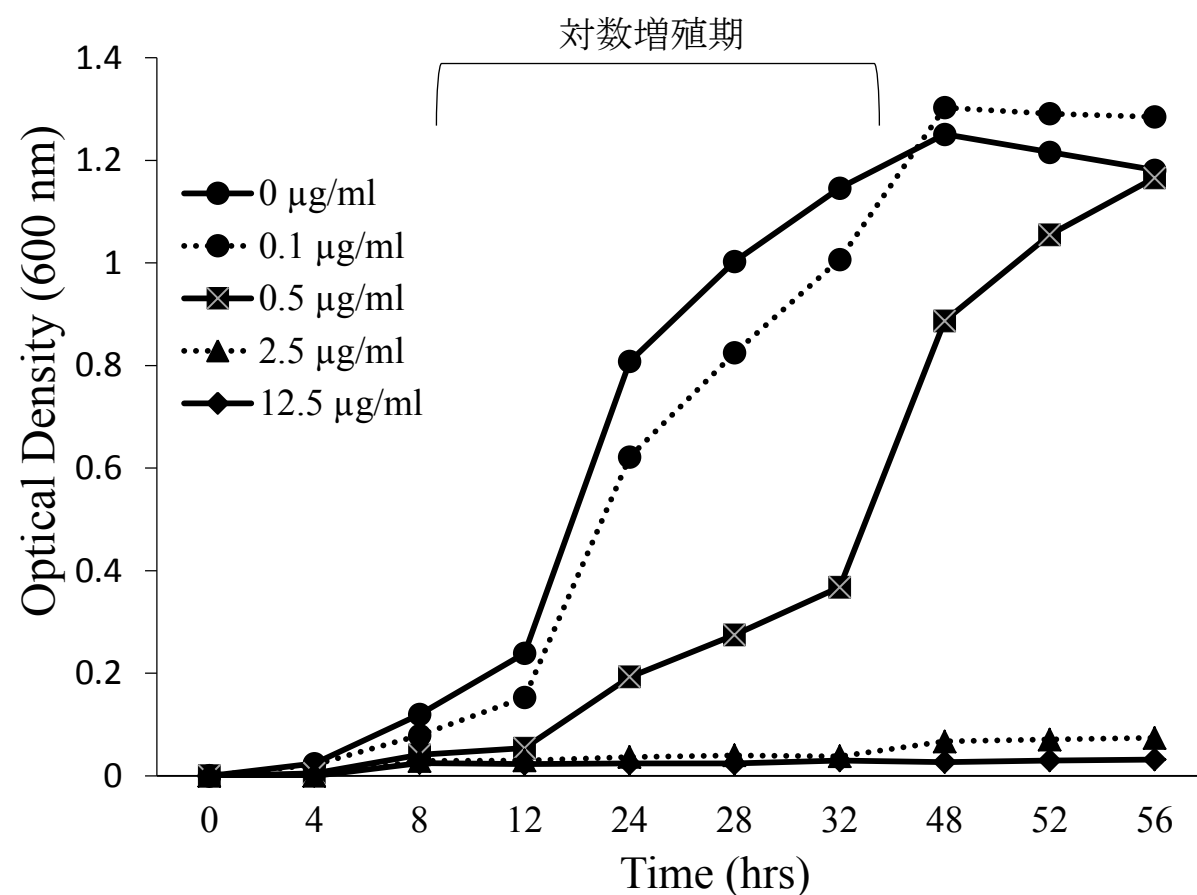
BEAS-2B細胞に1 $\mu$ g/mlのrPepDを4, 8, 24時間添加した後, 培養上清中のIL-6産生量 (A) およびIL-8産生量 (B) をELISA法にて測定した. IL-6およびIL-8産生量ともに, rPepD添加により全ての添加時間でコントロールと比較し有意に増大した(\* $p < 0.05$ ). また, IL-6およびIL-8産生量ともに8時間まで時間依存的に増大し, 24時間添加で減少した.

□: 対照群, ■: rPepD添加群



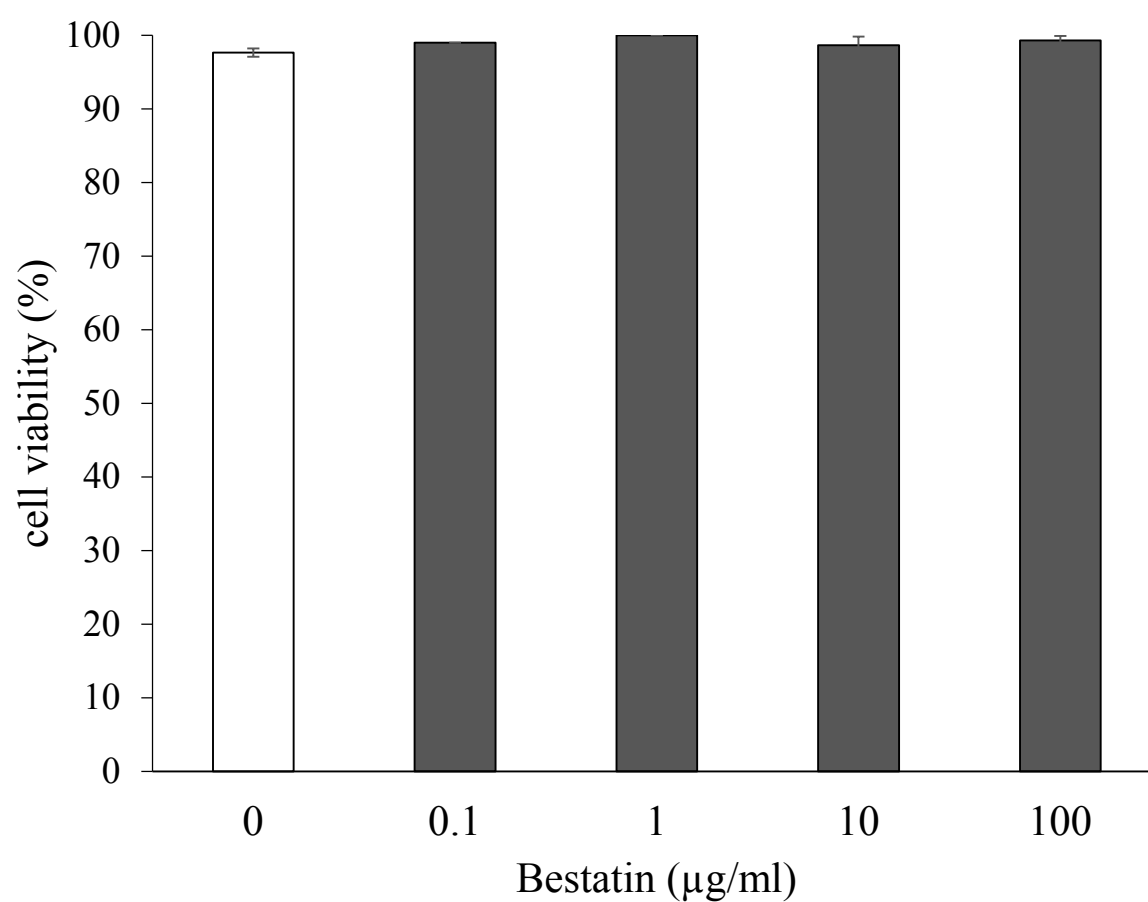
**Figure 4** アミノペプチダーゼ阻害剤によるrPepD活性への影響

対照群と比較してPhebestin, Amastatin, Leuhistin,ならびにArphamenineB添加群では顕著なrPepD酵素活性阻害は認められなかったが, Bestatin添加群では著しい活性阻害が認められた (\*\* $p < 0.01$ ) .



**Figure 5 Bestatinによる*P. g. fimA* II型の増殖能への影響**

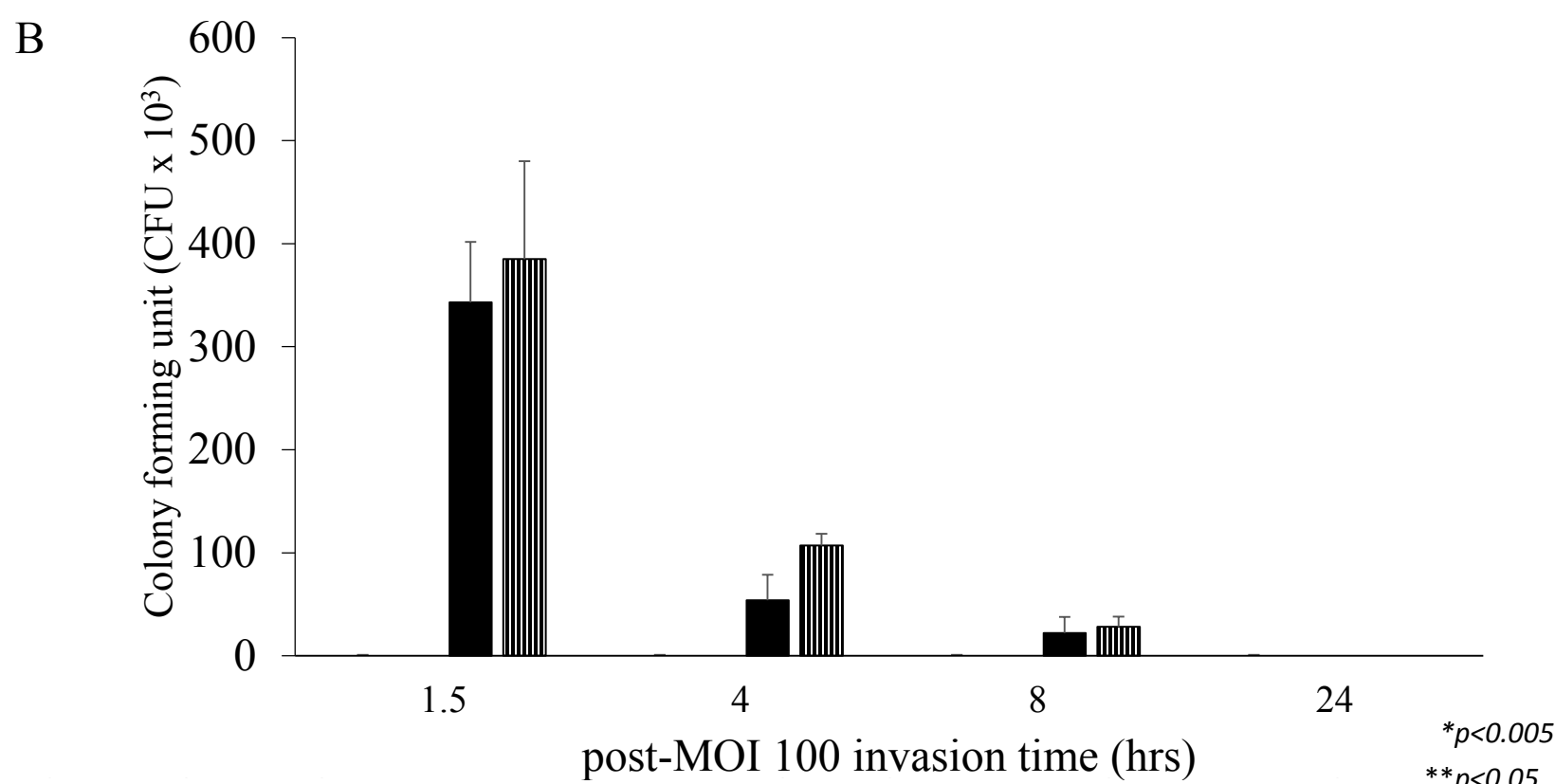
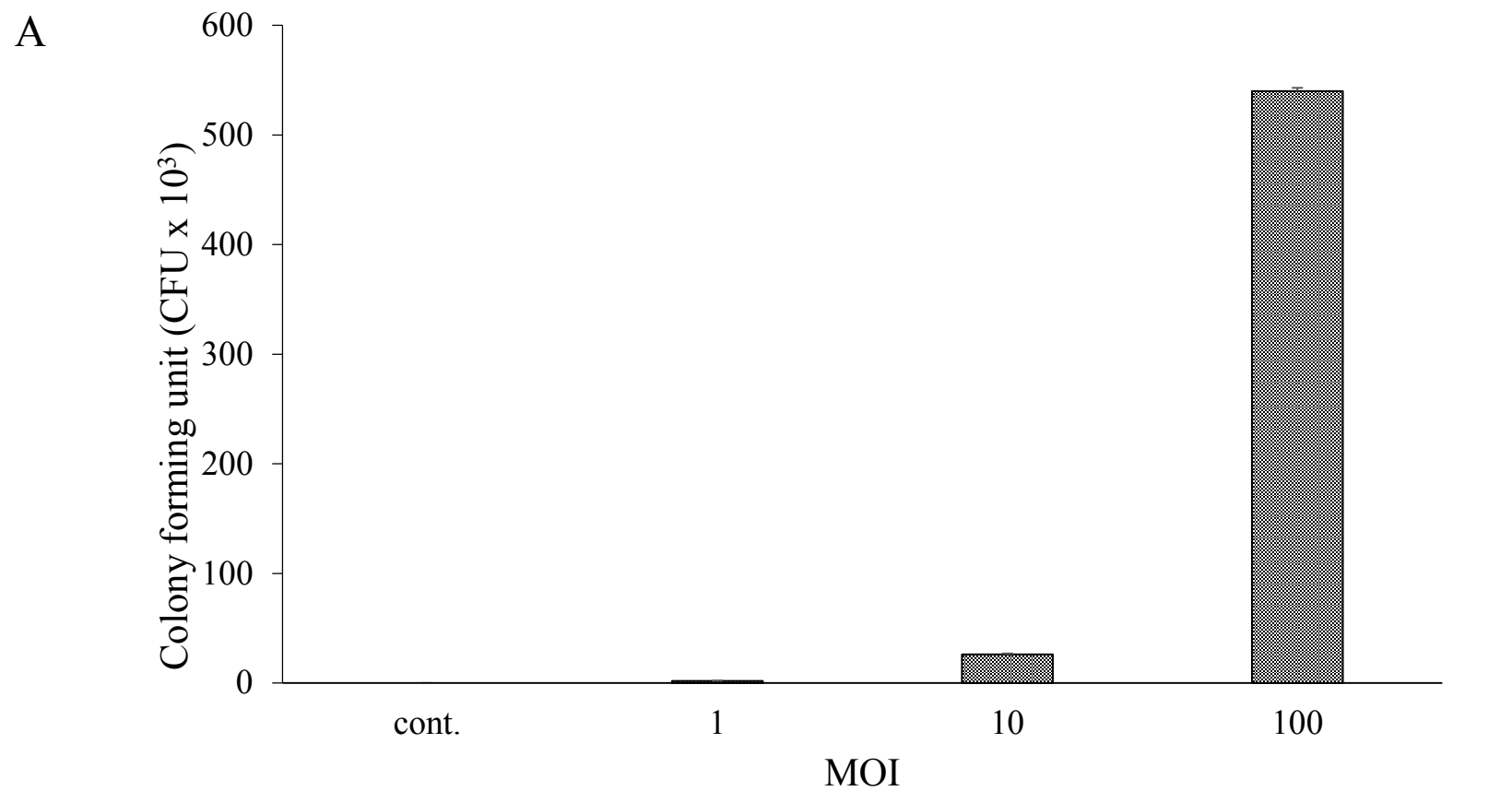
Bestatin添加濃度が0.1 μg/ml, 0.5 μg/mlでは, *P. g. fimA* II型は対数増殖期において増殖が抑制されたが, 2.5 μg/ml, 12.5 μg/mlでは対数増殖期が認められなかった.



**Figure 6 BestatinによるBEAS-2B細胞の生存率の影響**

濃度0.1, 1, 10, 100 μg/ml のBestatin添加における細胞生存率は対照群と比較して有意な低下を認めなかった.

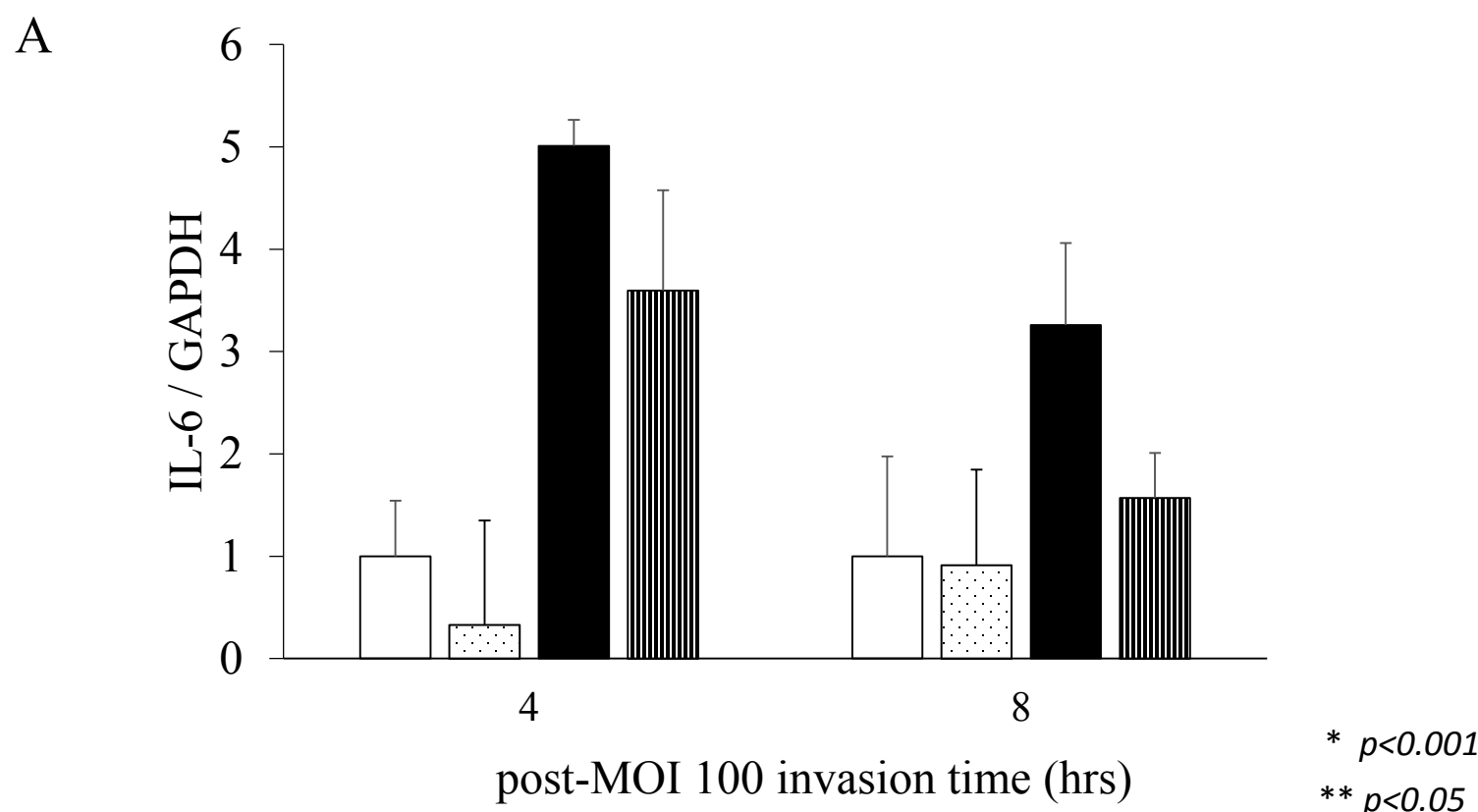




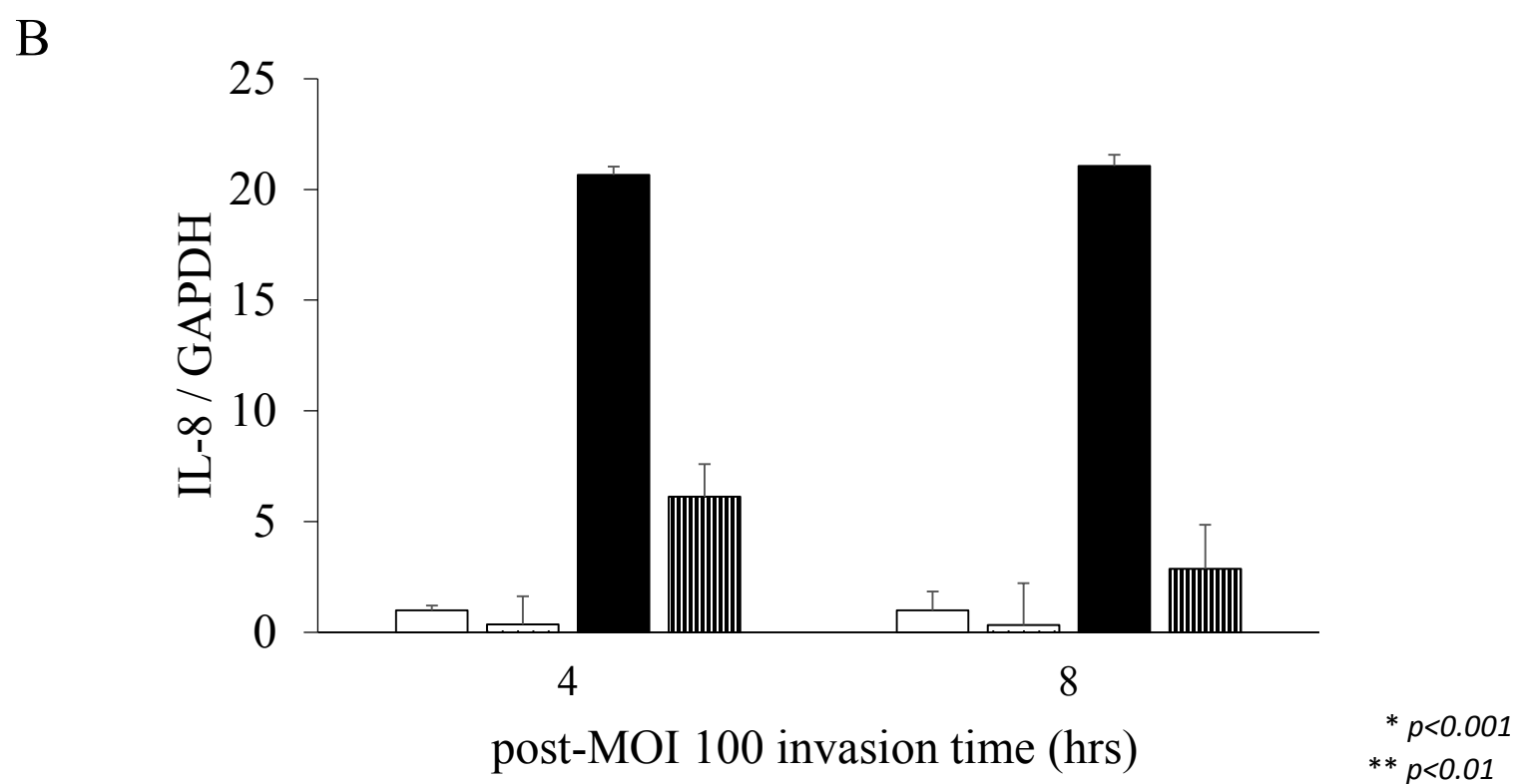
	対照群	Bestatin添加群	<i>fimA</i> II型侵入群	<i>fimA</i> II型侵入Bestatin添加群
1.5 hrs	-	-	0.0002*	0.0022*
4 hrs	-	-	0.016**	0.001*
8 hrs	-	-	0.071	0.0083*
24 hrs	-	-	-	-

Figure 7 *P. g. fimA* II型によるBEAS-2B細胞への侵入

*P. g. fimA* II型のBEAS-2B細胞内侵入菌数は、MOI依存的に上昇し、MOI 100にて著しい上昇を認めた (A) . MOI 100における細胞内菌数の経時的変化は実験群を*P. g. fimA* II型非感染Bestatin非添加 (対照群), *P. g. fimA* II型非感染Bestatin添加 (Bestatin添加群), *P. g. fimA* II型侵入Bestatin非添加 (*P. g. fimA* II型侵入群) ならびに*P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群の4群とした. 対照群, Bestatin群では検出されず, *fimA* II型侵入群および*fimA* II型侵入Bestatin添加群において検出され時間依存的に減少し, 24時間後には検出されなかった. *P. g. fimA* II型侵入群と*P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群間において4時間で有意差を認め, 1.5, 8時間では有意差を認めなかった (B) . □: 対照群, □(ドット): Bestatin添加群, ■: *P. g. fimA* II型侵入群, □(縦線): *P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群



	対照群	Bestatin添加群	<i>fimA</i> II型侵入群	<i>fimA</i> II型侵入Bestatin添加群
4 hrs	-	0.36	0.0003*	0.013**
Bestatin添加群	-	-	0.0013*	0.015**
<i>P. g. fimA</i> II型侵入群	-	-	-	0.058
<i>P. g. fimA</i> II型侵入Bestatin添加群	-	-	-	-
8 hrs	-	0.9	0.039**	0.46
Bestatin添加群	-	-	0.03**	0.35
<i>P. g. fimA</i> II型侵入群	-	-	-	0.03**
<i>P. g. fimA</i> II型侵入Bestatin添加群	-	-	-	-



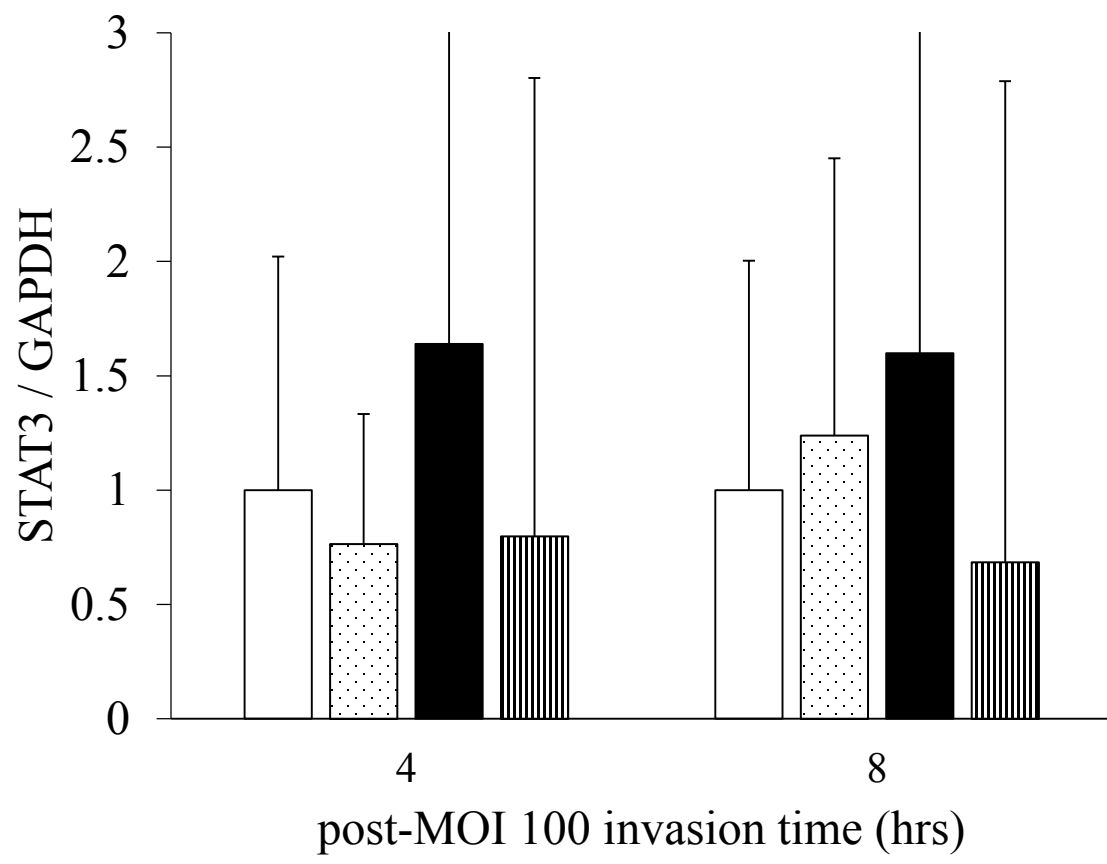
	対照群	Bestatin添加群	<i>fimA</i> II型侵入群	<i>fimA</i> II型侵入Bestatin添加群
4 hrs	-	0.44	0.001*	0.004**
Bestatin添加群	-	-	0.001*	0.006**
<i>P. g. fimA</i> II型侵入群	-	-	-	0.001*
<i>P. g. fimA</i> II型侵入Bestatin添加群	-	-	-	-
8 hrs	-	0.58	0.001*	0.21
Bestatin添加群	-	-	0.001*	0.17
<i>P. g. fimA</i> II型侵入群	-	-	-	0.001*
<i>P. g. fimA</i> II型侵入Bestatin添加群	-	-	-	-

**Figure 8** *P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加BEAS-2B細胞におけるIL-6およびIL-8遺伝子発現

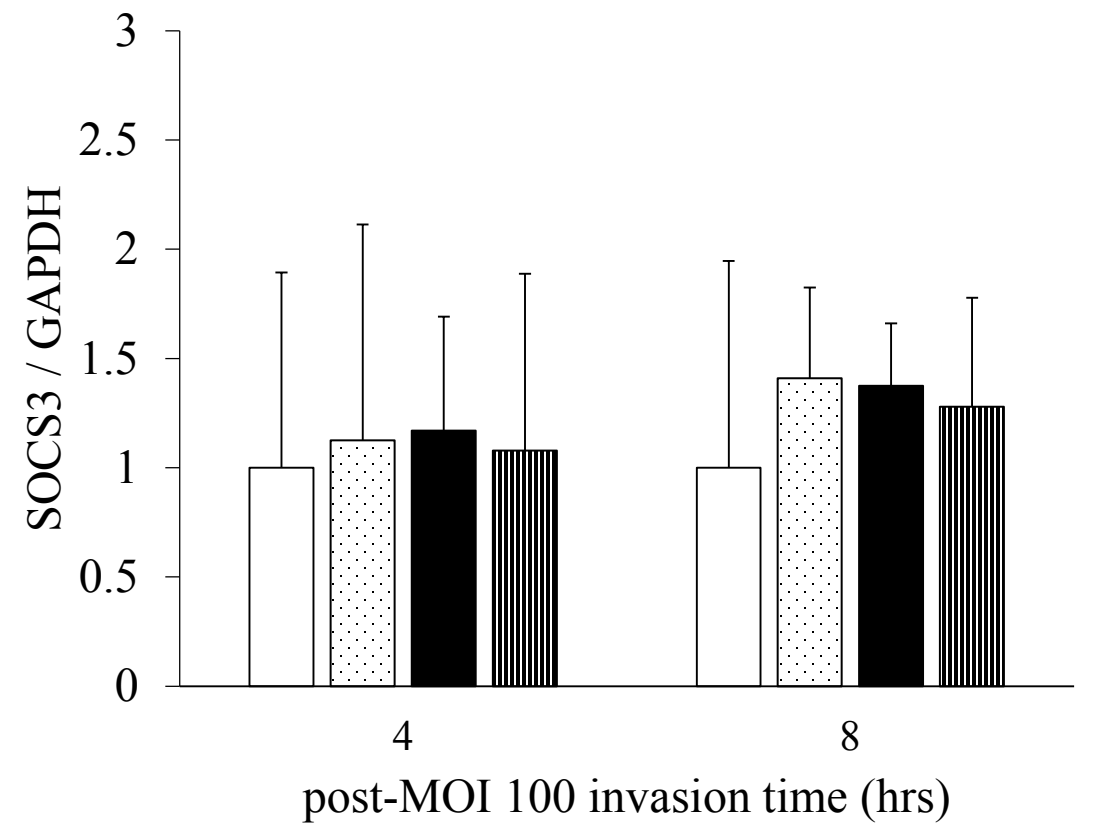
(A) IL-6遺伝子発現は、Bestatin添加群においてはいずれの作用時間においても対照群と比べて有意差を認めなかった。対照群ならびにBestatin添加群と比較すると、*P. g. fimA* II型侵入群ではいずれの作用時間においても有意に上昇し、*P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群では4時間では有意に上昇し、8時間では有意差は認められなかった。*P. g. fimA* II型侵入群と比較して*P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群では4時間では有意差は認められなかったが、8時間では有意に減少していた。

(B) IL-8遺伝子発現は、IL-6遺伝子発現同様にBestatin添加群においてはいずれの作用時間で対照群と比べて有意差を認めなかった。対照群ならびにBestatin添加群と比較すると、*P. g. fimA* II型侵入群ではいずれの作用時間においても有意に上昇し、*P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群では4時間では有意に上昇し、8時間では有意差は認められなかった。*P. g. fimA* II型侵入群と比較して*P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群はいずれの作用時間においても有意に減少していた。  
□: 対照群, □(ドット): Bestatin添加群, ■: *P. g. fimA* II型侵入群, □(縦線): *P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群

A



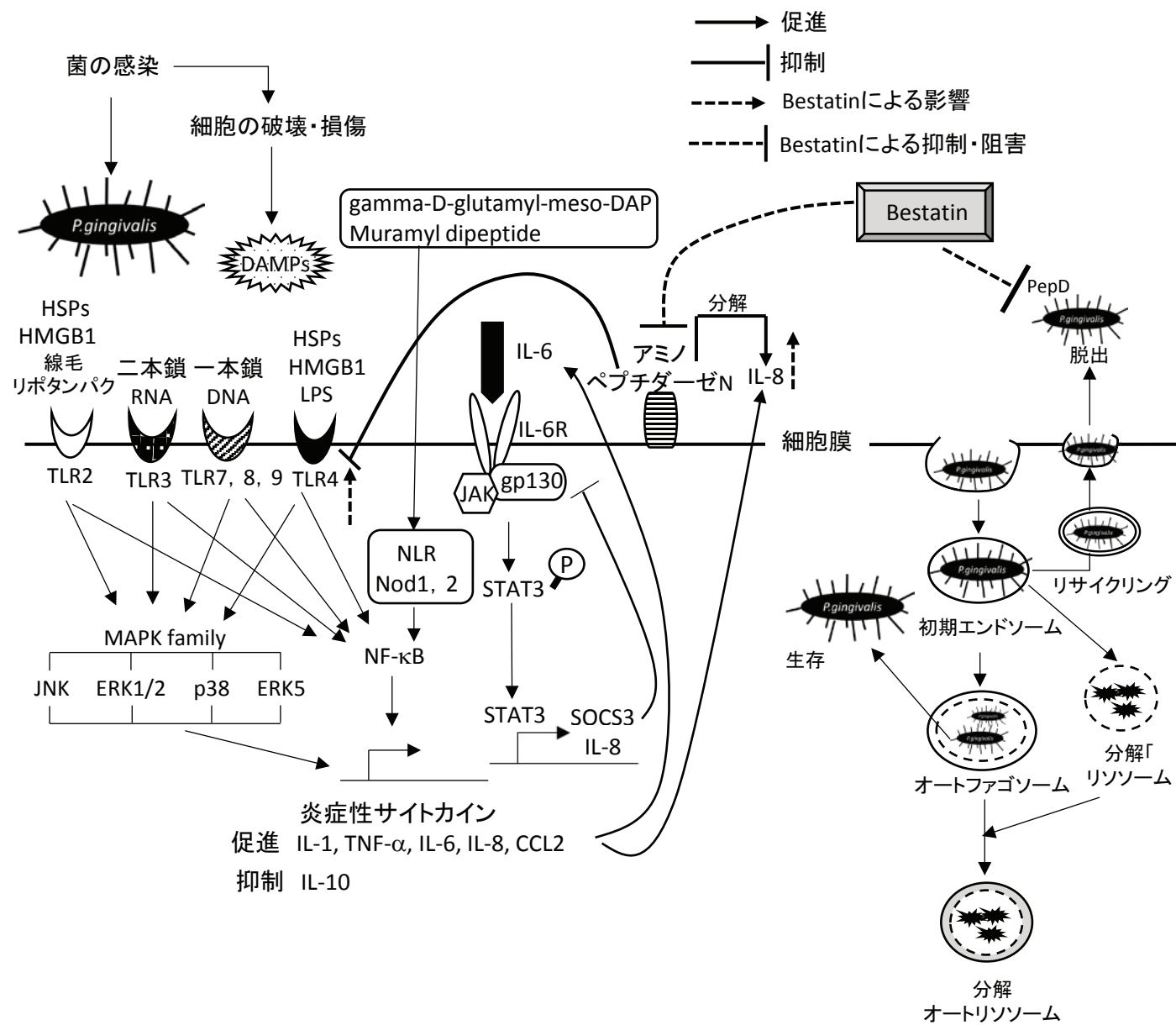
B



**Figure 9** *P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加BEAS-2B細胞におけるSTAT3およびSOCS3遺伝子発現

STAT3およびSOCS3遺伝子発現は、すべての作用時間ならびにすべての群間において有意差は認められなかった (Fig. 9A, B) .

□: 対照群, □(ドット): Bestatin添加群, ■: *P. g. fimA* II型侵入群, □(縦線): *P. g. fimA* II型侵入Bestatin添加群



**Figure 10** BEAS-2B細胞にエンドサイトーシスを利用し侵入した*P. g. fimA* II型の多くは分解されるが、一部は生体細胞内で生存もしくはリサイクリング経路にて脱出する。アミノペプチダーゼ阻害剤であるBestatinは*P. g. fimA* II型の生存に対して、生体細胞内に存在する場合は影響を及ぼさず、脱出した場合はPepD活性阻害を介して影響を及ぼす。BEAS-2B細胞は、*P. g. fimA* II型のPAMPsや菌感染による自身の破壊・損傷によって放出されるDAMPsをそれぞれの構造に合わせたPRRsで認識し、下流のサイトカインネットワークや表層に存在するアミノペプチダーゼNを活性化させる。BestatinはアミノペプチダーゼNの有するTLR4活性阻害機能ならびにIL-8などタンパク分解機能を抑制することで細胞の恒常性を保つ。

TLR : Toll-like receptor, IL-6R : IL-6受容体, NF-κB : nuclear factor kappa B, MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase, JNK : c-jun N-terminal Kinase, ERK : Extracellular Signal-regulated Kinase.