

## 研 究

*Streptococcus anginosus* 由来抗原による  
マウス腹腔滲出細胞からの NO 産生誘導機構

山浦 千春

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(指導: 木村 重信 教授)

(受付: 2003年12月1日)

(受理: 2003年12月18日)

**Abstract** : Nitric oxide (NO) has been implicated in macrophage-mediated cytotoxicity against various pathogens and may play a role in persistent or latent infections. However, its overproduction induced by some bacterial antigens could cause damage to host tissues and cellular DNA. We have previously reported a novel bioactive antigen (SAA) from a culture supernatant of *Streptococcus anginosus* that induces NO synthesis by murine peritoneal exudate cells (PEC). In this study, I performed a further assessment of SAA-induced NO synthesis by PEC. The results indicated that SAA stimulated the macrophages in PEC as well as a murine macrophage cell line, J774.1, to produce NO with the accumulation of inducible NO synthase (iNOS) mRNA. SAA also stimulated the non-macrophage cells in PEC to produce IFN- $\gamma$ , however, the endogenous IFN- $\gamma$  was not involved in the SAA-induced NO synthesis and iNOS mRNA accumulation by the macrophages. Further, phosphorylation of both p38 and ERK1/2 mitogen-activated protein (MAP) kinase was observed in macrophages by the stimulation with SAA but p38 MAP kinase pathway could solely correlate with SAA-induced NO synthesis. Thus, the present results suggest that *S. anginosus*, by a bioactive antigen, SAA, could stimulate macrophages through p38 MAP kinase pathway to induce NO synthesis without help of the endogenous IFN- $\gamma$ .

**Key words** : *Streptococcus anginosus*, nitric oxide synthesis, peritoneal exudate cells, macrophages, MAP kinase

## 緒 言

*Streptococcus anginosus* は、ヒトのデンタルプラーク中に存在し口腔常在細菌叢の一員として位置付けられているが、条件さえ整えば化膿性疾患や感染性心内膜炎の原因菌ともなることが報告されている<sup>1-5)</sup>。さらに、本菌のゲノムDNAがヒト食道癌や胃癌組織から高頻度で検

出されるとの報告<sup>6,7)</sup>以来、*S. anginosus* 感染がこれらの発癌機序に關与する可能性が示唆されている<sup>8,9)</sup>。しかし、*S. anginosus* の病原因子の解析は、我々の研究グループの報告を除き、ほとんど進んでいないというのが現状である。我々の研究グループではこれまでに、*S. anginosus* が、マウス腹腔滲出細胞(peritoneal exudate cells : PEC)を刺激して

Nitric oxide synthesis in murine peritoneal exudate cells stimulated with a *Streptococcus anginosus* antigen

Chiharu YAMAURA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 29 : 3-14, 2004

一酸化窒素 (nitric oxide : NO) 産生を誘導する抗原 (SAA) を培養上清中に産生すること、また、同抗原は同時に炎症性サイトカイン [tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1  $\beta$  および IL-6] の産生ならびにシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase) 2 mRNA 発現も誘導することを明らかにしてきた<sup>10, 11)</sup>。

NOをはじめとするフリーラジカルは抗菌作用を有し本来生体防衛的に働くが、過剰量の産生が誘導されると、生体タンパク質への直接的な為害作用や核酸の化学修飾による突然変異につながる事が報告されている<sup>12, 13)</sup>。実際、ヒト胃癌組織などで誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible NO synthase : iNOS) の局在が認められており<sup>14, 15)</sup>、また、NOS 阻害剤がマウス癌転移あるいはヒト大腸癌の発癌リスクを低下させるという実験的、疫学的データも示されている<sup>16-18)</sup>。これらの報告からすると、*S. anginosus* 感染の発癌機序への関与には、SAAをはじめとする *S. anginosus* の病原因子による宿主細胞に対する NO 産生誘導作用が関わっている可能性が強く示唆される。

細菌由来の病原因子による NO 産生誘導機構については、グラム陰性菌の外膜の構成成分である内毒素 (lipopolysaccharide : LPS) について研究が行われている<sup>19)</sup>が、グラム陽性菌の病原因子についてはほとんど報告がない。わずかに、*S. mutans* 菌体成分のラムノースグルコースポリマーがヒト単球に対し<sup>20)</sup>、*S. sanguis* および *S. mutans* のリポタイコ酸が、マウスマクロファージに対して<sup>21)</sup> NO 産生を誘導することが報告されているが、これらの報告においても、NO 産生誘導機構の詳細については検討されていない。そこで本研究では、*S. anginosus* 由来抗原である SAA による PEC からの NO 産生誘導機構の詳細を明らかにする目的で、PEC から分画した各細胞画分および株化マクロファージ細胞を用いて、NO 産生細胞の同定、内因性サイトカインの関与について検討を行った。さらに、NO 産生誘導過程でのマクロファージ細胞内シグナル伝達系につい

ても検討を加えた。

## 材料および方法

### 1. *S. anginosus* 由来抗原の調製

#### 1) SAA の調製

SAA の調製は既報<sup>11)</sup>に従って行った。すなわち、*S. anginosus* NCTC 10713株を Todd Hewitt Broth (Becton Dickinson Co., Cockeysville, USA) の透析培地で24時間培養後、遠心操作により上清を採取し、0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過した。上清を 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した DEAE Sephacel カラム (Amersham Pharmacia Biotech Co., Uppsala, Sweden) に添加し、0 - 0.5M NaCl のリニアグラジエントで結合画分を溶出した。次に、YM-10 メンブレン (Amicon Co., Beverly, USA) を用いて限外濾過を行った。濃縮後、TSK-GEL G4000SW カラム (TOSOH Co., 東京) を用いてゲルろ過を行い、NO 産生誘導活性を示す画分を合体後、水に対して透析し、凍結乾燥したものを SAA とした。

#### 2) Rantz-Randall 抗原 (RRA) の調製

RRA は *S. anginosus* NCTC 10713株より Hamada ら<sup>22)</sup>の方法に準じて調製した。すなわち、*S. anginosus* 菌体を生理食塩水に懸濁 (50 mg/ml) し、オートクレーブ (121°C, 20分間) 処理後、遠心操作により上清を採取し、水に対して透析し、凍結乾燥したものを RRA とした。

### 2. マウス腹腔滲出細胞 (PEC), プラスチックシャーレ付着細胞 (AD) およびプラスチックシャーレ非付着細胞 (NAD) の調製

マウス腹腔滲出細胞は、チオグリコレート培地腹腔内投与法<sup>23)</sup>により回収した。すなわち、C57BL/6 N マウス (8週令; CLEA Japan Co., 大阪) 腹腔内にチオグリコレート培地 (EIKEN CHEMICAL Co., 東京) を注射 (1.5 ml/匹) し、4日後に氷冷 PBS を用いて PEC を回収した。AD および NAD の調製は、ペニシリン-

Table 1. PCR primer sets used in this study

Target gene	Primer sets (5'-3')	Size (bp)
iNOS	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGC GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG	494
TNF- $\alpha$	TCTCATCAGTTCTATTGGCCC GGGAGTAGACAAGGTACAAC	212
IL-1 $\beta$	TTGACGGACCCCAAAAGATG AGAAGGTGCTCATGTCCTCA	204
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA TGTACTIONCAGGTAGCTATGG	208
IFN- $\gamma$	GCTCTGAGACAATGAACGCT AAAGAGATAATCTGGCTCTGC	227
IL-12	CGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG GAACACATGCCCACTTGCTG	575
$\beta$ -actin	TGCTGGGCGCTCTAGGCAC TGCCTTAGGGTTTCAGGGGG	243

ストレプトマイシン溶液(ペニシリン, 100 U/ml; ストレプトマイシン, 100  $\mu$ g/ml) および非働化したウシ胎児血清 (FCS; ICN Biomedicals, Inc., 大阪) (最終濃度10%) を添加した RPMI 1640 培地 (SIGMA-ALDRICH Co., Irvine, UK) (C-RPMI) に懸濁した PEC を, プラスチックシャーレで 37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95% 大気, 湿度95% の条件下で 2 時間培養し, 浮遊性のプラスチックシャーレ非付着細胞 (NAD) を回収した。さらに, プラスチックシャーレを 37°C に加温した 1% FCS 添加 PBS で 2 回洗浄し, C-RPMI を添加し氷上に 20 分間静置した後, セルスクレーパー (SUMITOMO BAKELITE Co., 東京) を用いてプラスチック付着細胞 (AD) を回収した。

### 3. マクロファージ株化細胞

マウスマクロファージ株化細胞 J774.1 細胞を用いた。培養は, RPMI1640 培地にペニシリン-ストレプトマイシン溶液および非働化した FCS (最終濃度5%) を添加した培地を用いて, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95% 大気, 湿度95% の条件下で行った。

### 4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) による iNOS およびサイ

### トカイン mRNA 発現の解析

C-RPMI に懸濁した PEC, AD, NAD および J774.1 の各細胞 (1 x 10<sup>6</sup>/1 ml) に SAA (10  $\mu$ g/ml) または RRA (10  $\mu$ g/ml) を添加後, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95% 大気, 湿度95% の条件下で, 12 時間培養した。培養終了後, RNeasy (QIAGEN Co., Hilden, Germany) を用いて RNA を精製した。精製 RNA (1  $\mu$ g) より既報<sup>24)</sup>に従い cDNA を調製した。調製した cDNA をテンプレートとし, iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 および IFN- $\gamma$  の特異的プライマー (Table 1) を用いて既報<sup>11)</sup>の反応条件で, PCR 反応を行った。PCR 産物は, アガロースゲル (1.8%アガロース, 0.1  $\mu$ g/ml エチジウムブロマイド, 44.5 mM Tris-borate, 5 mM EDTA, pH 8.3) で電気泳動を行った。

### 5. Mitogen-activated protein (MAP) キナーゼのリン酸化を指標としたマクロファージ細胞内シグナル伝達系の解析

NO 産生誘導過程でのマクロファージ細胞内シグナル伝達系の解析は, SAA 刺激後の MAP キナーゼ (ERK1/2 および p38) のリン酸化を指標に検討した。すなわち, PEC および J774.1 細胞を C-RPMI に浮遊し (2.5 x 10<sup>6</sup>/ml), 10  $\mu$ g/ml の SAA あるいは RRA を添加後, 37°C,

5%CO<sub>2</sub>-95%大気、湿度95%の条件下で培養を行った。培養終了後、遠心操作により細胞を回収し、サンプルバッファーで可溶化後、Laemmli<sup>25)</sup>の方法に従ってSDS-PAGEを行った。泳動終了後、PVDF膜 (Millipore Co., Bedford, USA) に転写し、抗リン酸化ERK1/2抗体および抗リン酸化p38抗体 (Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, USA) を用いてウエスタンブロットを行った。検出は、ECLウエスタンブロット検出試薬 (Amersham Biosciences Co., Piscataway, USA) を用いた。マーカーは、レインボーマーカー (Amersham Biosciences) を用いた。また、ERK1/2の特異的な阻害剤としてPD98059 (CALBIOCHEM, Inc., La Jolla, USA), p38の特異的な阻害剤としてSB 203580 (CALBIOCHEM) を用いた。

## 6. NO産生の測定

C-RPMIに懸濁したPEC, AD, NADおよびJ774.1細胞に、10 μg/mlのSAAあるいはRRAを添加し、培養した。培養は96穴プレート (Nalge Nunc International Co., Rochester, USA) を用い (2 x 10<sup>5</sup>/well), 37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95%大気、湿度95%の条件下で40時間行った。培養終了後、Griess試薬法<sup>26)</sup>を用いて550 nmの吸光度からNO産生量を測定した。また、MAPキナーゼ阻害剤のNO産生におよぼす影響については、各MAPキナーゼ阻害剤 (1-20 μM) をSAA刺激時に同時添加し、24時間後のNO産生量から検討した。SAAによるNO産生誘導におよぼすIFN-γの影響については、recombinant murine IFN-γ (rIFN-γ; PEPROTECH EC Ltd., London, UK) を用いて検討した。

## 結 果

### 1. SAA刺激後のPEC中のNO産生細胞の同定

PEC中のマクロファージに富む細胞画分であるAD、非マクロファージ細胞に富む画分

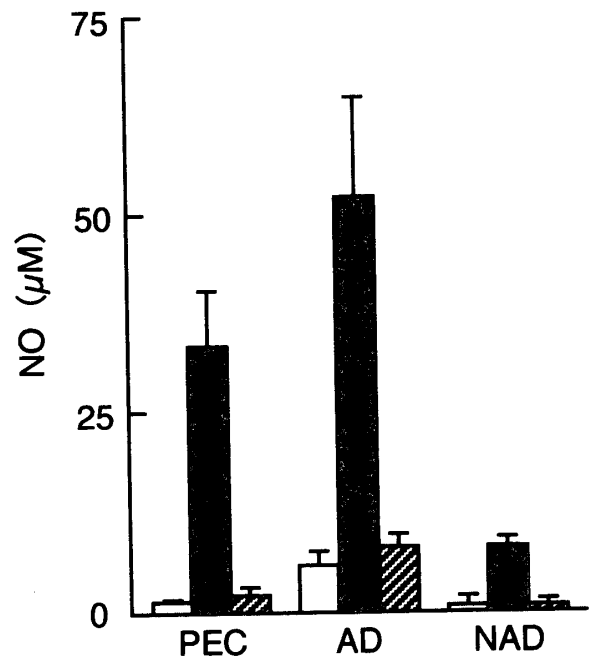


Fig. 1. NO production in PEC, AD and NAD stimulated with SAA and RRA. Ten μg/ml of SAA (closed bars), RRA (hatched bars) and/or PBS (open bars) were added to the culture (2 x 10<sup>5</sup>). After 40 h incubation, the nitrite in the culture supernatants was measured by Griess reagent. Data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments with triplicate cultures.

あるNAD、およびPECを用いて、SAA刺激後のNO産生細胞の同定を行った (Fig. 1)。その結果、ADでは、PECと同様、SAA刺激によりNO産生が誘導された。ADに対するSAAのNO産生誘導は、PECに対するNO産生誘導より強かった。一方、NADでは有意のNO産生誘導は認められなかった。また、*S. anginosus* 菌体表層多糖抗原であるRRAではいずれの細胞画分においてもNO産生は認められなかった。

### 2. SAAによるiNOSおよびサイトカインmRNA発現誘導

SAAおよびRRAを用いて、PEC, AD, NADに対するiNOSならびにサイトカインmRNA発現誘導を検討した (Fig. 2)。iNOS mRNA発現誘導は、NO産生同様、SAA刺激後のPECおよびADにおいて認められ、NAD

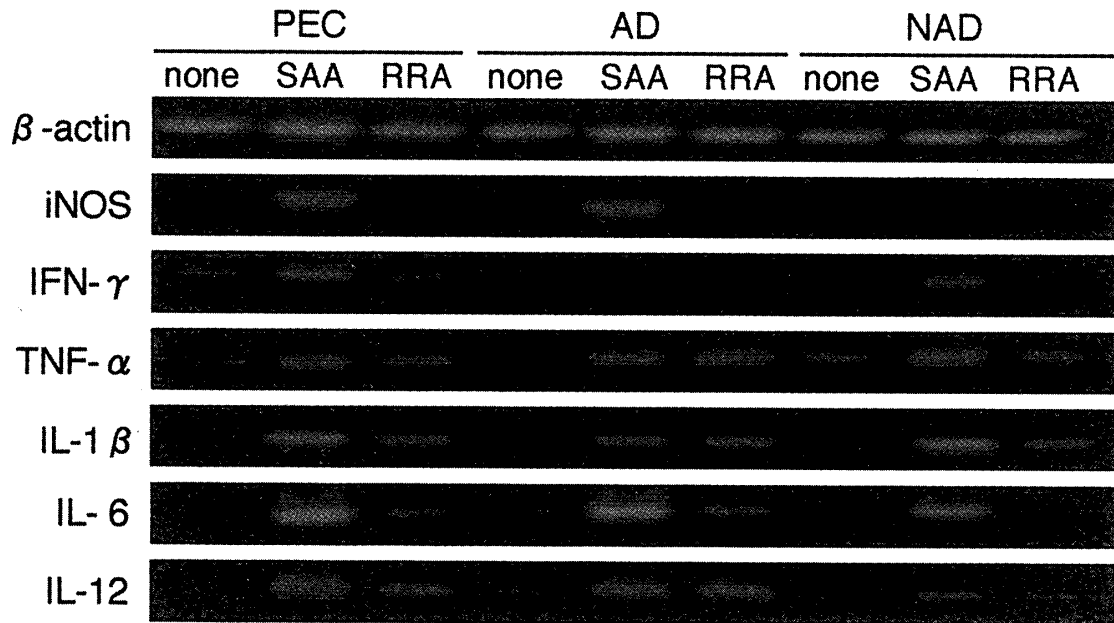


Fig. 2. Induction of iNOS and cytokine mRNAs in SAA-stimulated PEC, AD and NAD. Each cell population ( $1 \times 10^6$ ) was incubated with 10  $\mu$ g/ml of SAA and/or RRA. After 12 h incubation, total RNA was prepared, and iNOS and cytokine mRNAs were amplified by RT-PCR with sets of primers listed in Table 1. The PCR products were subjected to electrophoresis using 1.8% agarose gels. Similar results were obtained in other two independent experiments.

では認められなかった。また、RRA 刺激ではいずれの細胞画分に対しても iNOS mRNA 発現誘導は認められなかった。一方、サイトカイン mRNA 発現誘導については、SAA は AD および NAD の両細胞画分に対し、IFN- $\gamma$  を除き、今回調べたすべてのサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 および IL-12) の mRNA の発現を誘導した。SAA による IFN- $\gamma$  発現誘導は PEC, NAD に対して認められた。RRA 刺激では、マクロファージに富む AD に対して IFN- $\gamma$  を除くすべてのサイトカインの mRNA の発現を誘導したが、非マクロファージ細胞に富む画分である NAD に対しては、IL-1 $\beta$  を除き、著明な mRNA 発現の誘導は観察されなかった。

### 3. SAA 刺激による J774.1細胞からの NO 産生誘導ならびに iNOS mRNA 発現

SAA 刺激による iNOS mRNA 発現および NO 産生誘導がマクロファージに富む AD に対してのみ認められたことから、次に、マクロファージ株化細胞である J774.1細胞を用いて検

討した。その結果、SAA 刺激後、J774.1細胞では明確な iNOS mRNA 発現と NO 産生が観察された (Fig. 3)。また、RRA 刺激ではいずれも認められなかった。

### 4. SAA による NO 産生誘導機構における IFN- $\gamma$ の関与

マクロファージからの NO 産生機構には IFN- $\gamma$  が直接的あるいは間接的に関与することが示唆されている<sup>19,27)</sup>。そこで、SAA による NO 産生誘導機構における IFN- $\gamma$  の関与について検討した。

#### 1) IFN- $\gamma$ による NO 産生誘導

IFN- $\gamma$  は単独でもマクロファージに対し NO 産生を誘導することが示されている<sup>27)</sup>ことから、rIFN- $\gamma$  を用いて PEC に対する直接的な NO 産生誘導能について検討した。その結果、100 U/ml 以下の濃度の rIFN- $\gamma$  の添加では NO 産生は観察されなかった (Fig. 4)。PEC を SAA で刺激後 40 時間時点での培養上清中に産生された IFN- $\gamma$  の量を測定した結果、 $3.5 \pm 2.4$  U/ml (平均  $\pm$  標準誤差) であった。

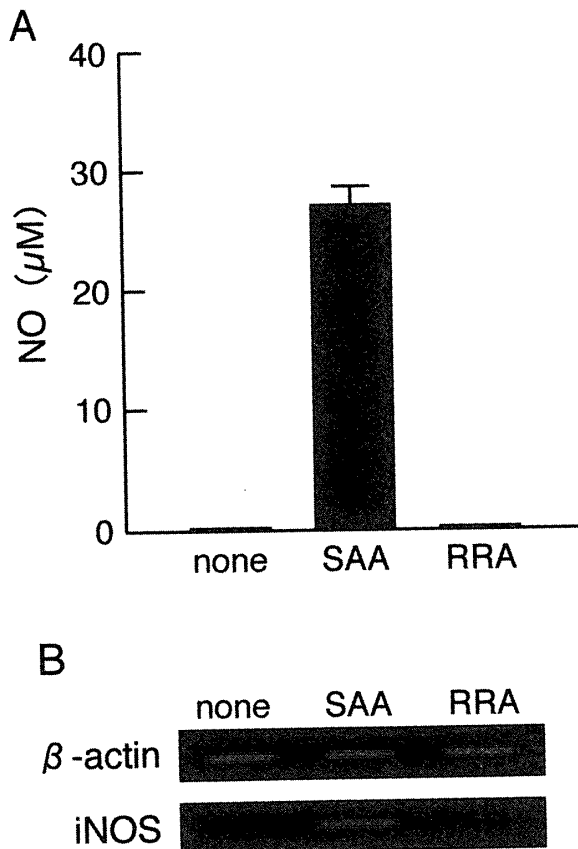


Fig. 3. NO production and iNOS mRNA accumulation in J774.1 cells stimulated with SAA and RRA. Ten  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SAA, RRA and/or PBS (none) were added to the culture. (A) After 40 h incubation, nitrite was measured by Griess reagent. (B) After 3 h incubation, iNOS mRNA was amplified by RT-PCR.

## 2) IFN- $\gamma$ による間接的 NO 産生誘導

LPSを抗原とするマクロファージからのNO産生誘導では、低濃度のIFN- $\gamma$ の共刺激が必要とする報告<sup>27)</sup>と、LPSが非マクロファージ細胞画分からのIFN- $\gamma$ 産生を惹起しその結果としてマクロファージからのNO産生が誘導されるとする報告<sup>19)</sup>がある。そこで、(Fig. 4の成績から)単独でNO産生を誘導しない50 U/mlのrIFN- $\gamma$ を用いてSAAとの共刺激によるNO産生誘導を検討した(Fig. 5)。その結果、PEC, ADのいずれに対しても、SAAによるNO産生誘導にrIFN- $\gamma$ 添加の影響は観察されなかった。さらに、J774.1細胞の場合にも、50 U/mlのrIFN- $\gamma$ 添加による増強作用は認められなかった。

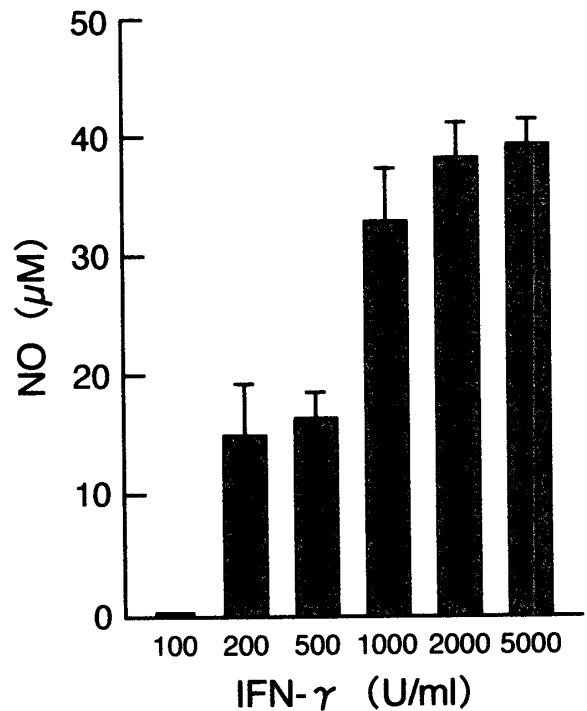


Fig. 4. Effect of IFN- $\gamma$  on the NO production from PEC. Recombinant IFN- $\gamma$  was added to PEC ( $2 \times 10^6$ ). After 40 h incubation, nitrite was measured by Griess reagent.

## 5. SAA刺激によるPECのMAPキナーゼ活性化

SAA刺激後15-60分でリン酸化ERK1/2のバンドが認められたことから、PEC細胞内のERK1/2が活性化されていることが明らかとなった(Fig. 6)。最も強いERK1/2の活性化はSAA刺激後30分で観察された。さらに、SAA刺激では30-60分後にp38の活性化も認められた。一方、RRA刺激の場合は、15-60分で弱いERK1/2の活性化が観察されたが、p38の活性化は認められなかった。

## 6. SAAによるNO産生誘導におよぼすMAPキナーゼ阻害剤の影響

ERK1/2の阻害剤であるPD98059とp38の阻害剤であるSB203580を用いて、SAAによるPECに対するNO産生誘導への影響について検討を行った(Fig. 7)。その結果、1-20  $\mu\text{M}$ のPD98059を添加した反応系でのNO産生量は、無添加系のそれとの間に有意の差は認めら

れなかった。一方, SB203580添加系では濃度依存的に NO 産生量の有意の低下が観察され, SAA による PEC に対する NO 産生誘導に p38 の活性化が関与することが強く示唆された。また, 結果には示さなかったが, J774.1細胞を用

いた検討からも PEC と同様の成績が得られ, p38 の活性化が SAA によるマクロファージの NO 産生誘導に関与することが示唆された。

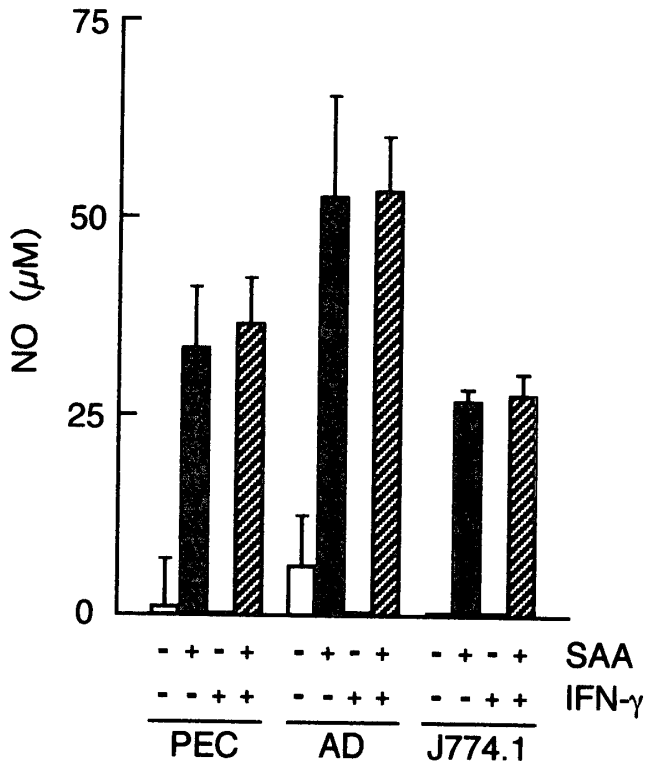


Fig. 5. Effect of IFN- $\gamma$  on the NO production from PEC, AD and J774.1 cells stimulated with SAA. PEC, AD and J774.1 cells ( $2 \times 10^6$ ) were stimulated without (open and dotted bars) or with (closed and hatched bars) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SAA in the absence (open and closed bars) or presence (dotted and hatched bars) of rIFN- $\gamma$  (50 U/ml). After 40 h incubation, nitrite was measured by Griess reagent.

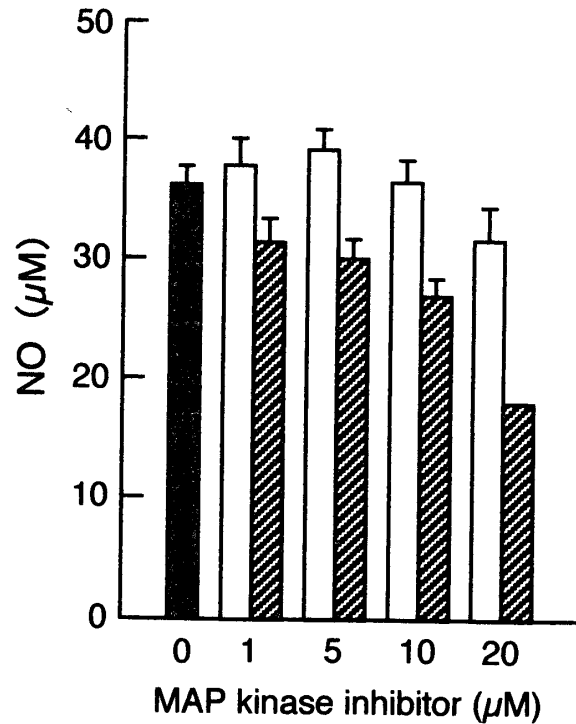


Fig. 7. Inhibitory effects of MAP kinase inhibitors on the NO production from PEC. NO production was measured in PEC stimulated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SAA in the presence of PD98059 (open bars) and/or SB203580 (hatched bars) of MAP kinase inhibitors against ERK1/2 and p38, respectively.

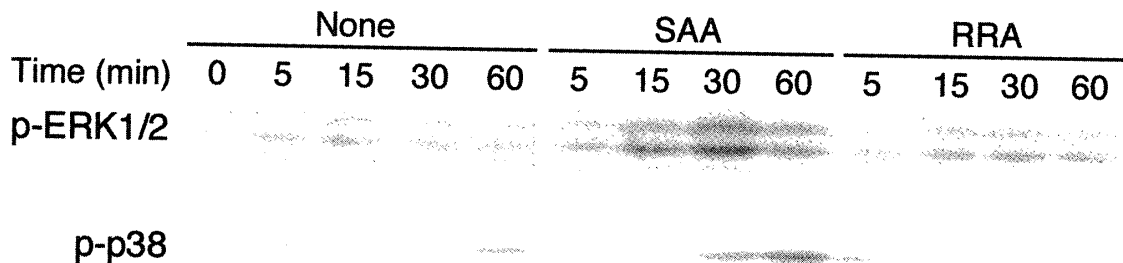


Fig. 6. Phosphorylation of ERK1/2 and p38 in PEC stimulated with SAA and RRA. Ten  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SAA, RRA and/or PBS (none) were added to PEC ( $1.5 \times 10^6$ ). After indicated periods, whole cell lysate was prepared and separated by SDS-PAGE. Proteins were transferred to PVDF membrane, probed with an anti-phospho-ERK and anti-phospho-p38 antibodies, and detected by ECL detection system.

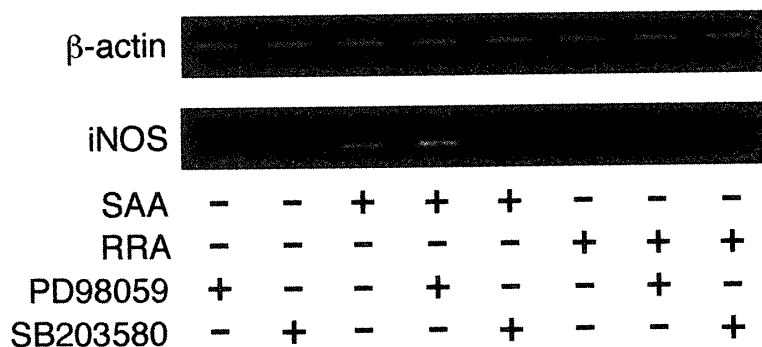


Fig. 8. Inhibitory effects of MAP kinase inhibitors on the iNOS mRNA accumulation in J774.1 cells stimulated with SAA and RRA. The iNOS mRNA was amplified by RT-PCR in J774.1 cells stimulated with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SAA and/or RRA in the presence of 10  $\mu\text{M}$  of PD98059 and/or SB 203580 of MAP kinase inhibitors against ERK1/2 and p 38, respectively.

#### 7. SAAによるiNOS mRNA発現誘導におよぼすMAPキナーゼ阻害剤の影響

J774.1細胞を用いて、SAAによるiNOS mRNA発現誘導におよぼすPD98059およびSB203580の影響について検討した (Fig. 8)。結果はNO産生と一致して、SB203580添加系ではSAAによるiNOS mRNA発現誘導の抑制が観察され、一方、PD98059添加系ではSAAによるiNOS mRNA発現誘導に対する著明な影響は観察されなかった。また、RRA刺激の反応系、ならびにPD98059およびSB203580単独添加の反応系では、いずれもiNOS mRNA発現誘導は観察されなかった。

#### 考 察

我々の研究グループではこれまでに、*S. anginosus*が、PECに対して強いNO産生誘導能を有する抗原(SAA)を培養上清中に産生すること、また、SAAは同時にTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ の産生も誘導することを明らかにしてきた<sup>10,11)</sup>。しかし、これまで機能的にはマクロファージ画分と同等<sup>28,29)</sup>と考えられていたPEC中に、NK細胞やT細胞といった非マクロファージ細胞が存在しており、LPSによるNO産生誘導機構においてはそれらの細胞群が重要な役割を演じていることを示唆する報告がなされている<sup>19,30,31)</sup>。そこで本研究では、SAAによ

るNO産生誘導機構におけるPEC中のNO産生細胞の同定、ならびに内因性サイトカイン、特にマクロファージのNO産生に關与する<sup>27,32)</sup>とされるIFN- $\gamma$ の作用について解析した。

プラスチックシャーレ付着法を用いることによってPECからマクロファージに富む(87-92%)細胞画分が(プラスチックシャーレ付着細胞として)得られることが明らかにされている<sup>31)</sup>。本研究においても、マクロファージが産生するサイトカインであるTNF- $\alpha$ およびIL-12 mRNAの発現がADで認められ、逆にT細胞の産生するIFN- $\gamma$  mRNAの発現は認められなかった (Fig. 2) ことから、ADがマクロファージリッチな細胞画分であることが強く示唆された。

SAA刺激によるNO産生誘導は、ADで認められ、NO産生量はPECのそれを上回った (Fig. 1) こと、iNOS mRNA発現誘導は、NO産生同様、SAA刺激後のPECおよびADにおいて認められ、NADでは認められなかったこと (Fig. 2) から、SAAによるNO産生誘導機構におけるPEC中のNO産生細胞はマクロファージであることが強く示唆された。さらに、この結果は、マクロファージ株化細胞であるJ774.1細胞を用いた検討 (Fig. 3) からも確認され、SAA刺激によりマクロファージがNO産生を行うことが明らかとなった。一方、



ネガティブセレクションで得られた NAD では、サイトカイン mRNA 発現 (Fig. 2) の成績から若干のマクロファージの混入が予想されるものの、有意の NO 産生は認められなかった (Fig. 1)。これらの結果を総合すると、SAA は PEC 中のマクロファージを直接刺激し、NO 産生を誘導することが強く示唆された。

マクロファージからの NO 産生機構には IFN- $\gamma$  が直接的あるいは間接的に関与することが示唆されている<sup>19,27)</sup>。そこで本研究では、rIFN- $\gamma$  による直接的な NO 産生誘導能を検討した。その結果、100 U/ml 以下の濃度の rIFN- $\gamma$  の添加では NO 産生は観察されなかった (Fig. 4)。SAA 刺激後 40 時間の PEC 培養上清中の IFN- $\gamma$  量 (3.5  $\pm$  2.4 U/ml) を勘案すると、本研究で用いた実験系では内因性の IFN- $\gamma$  の直接的な NO 産生誘導は認められないことが明らかとなった。さらに、IFN- $\gamma$  による間接的 NO 産生誘導についても検討を行ったが、AD および J774.1 細胞のいずれの場合にも IFN- $\gamma$  による間接的 NO 産生誘導は観察されず (Fig. 5)、SAA による PEC 中のマクロファージの NO 産生誘導機構には内因性の IFN- $\gamma$  は関与しないことが明らかとなった。この成績は、これまで報告されている LPS を抗原とした場合のマクロファージからの NO 産生誘導機構<sup>19,27)</sup>とは異なる。その理由は明らかではないが、SAA と LPS の NO 産生誘導にかかわる活性本体の違いによるのかもしれない。すなわち、SAA はタンパク質-多糖複合体で PEC からの NO 産生誘導にはタンパク質部分のみが関与する<sup>11)</sup>が、脂質-多糖複合体である LPS の活性本体はリピド A である<sup>33)</sup>ことによるのかもしれない。

MAP キナーゼは様々な細胞外刺激により活性化される細胞内のセリン/スレオニンキナーゼで、その活性化は細胞外の情報を核内へ伝える細胞内シグナル伝達系の主要な経路の 1 つとなっている<sup>34)</sup>。ほ乳類においては古典的 MAP キナーゼ (ERK1/2), JNK, p38 および ERK 5 の 4 種類の MAP キナーゼファミリー

分子が存在することが知られており、細胞増殖、分化、アポトーシスなどに重要な役割を演じることが報告されている<sup>35,36)</sup>。LPS 刺激によるマクロファージからの NO 産生誘導機構においても、ERK1/2 と p38 の関与が示唆されている<sup>37,38)</sup>が、ERK1/2 は NO 産生に抑制的に働くとの報告<sup>39)</sup>もあり、その見解は必ずしも一致していない。さらに、グラム陽性菌の病原因子による NO 産生誘導機構における MAP キナーゼの関与についてはこれまでほとんど報告がない。そこで本研究では、SAA 刺激による NO 産生誘導への MAP キナーゼの関与について抗リン酸化 ERK1/2 抗体および抗リン酸化 p38 抗体を用いたウエスタンブロット法により検討を行った。その結果、PEC においては、SAA 刺激により ERK1/2 および p38 の両 MAP キナーゼが活性化されることが明らかとなった (Fig. 6)。しかし、ERK1/2 の阻害剤である PD98059 と p38 の阻害剤である SB203580 を用いた検討からは、SAA 刺激によるマクロファージからの NO 産生誘導機構には p38 のみが関与することが強く示唆された (Figs. 7 and 8)。さらに、SAA の多糖部分と構造および作用が類似する<sup>11)</sup> RRA が ERK1/2 のみを活性化するという結果 (Fig. 6) を勘案すると、SAA 刺激後のマクロファージ内では MAP キナーゼのうち p38 の活性化が NO 産生に、ERK1/2 の活性化がサイトカイン産生に関与することが強く示唆される。NO 産生誘導機構には p38 活性化のみが関与するとの本研究成績は、S. *pneumoniae* の細胞壁抗原と IFN- $\gamma$  との共刺激による NO 産生を調べた Monier らの報告<sup>40)</sup>を支持する。しかし、彼らの成績では TNF- $\alpha$  産生には ERK1/2 と p38 の両活性化が関与することが示唆されている。さらに、LPS によるマクロファージからのサイトカイン産生には ERK1/2 のみとする報告<sup>41)</sup>と、p38, JNK および ERK 5 も関与するとの報告<sup>42)</sup>がある。JNK, ERK 5 を含め、SAA による MAP キナーゼ活性化についても今後さらに詳細な検討が必要となる。

以上の成績より、S. *anginosus* 由来抗原であ

る SAA は、PEC 中のマクロファージを直接刺激し、内因性の IFN- $\gamma$  の関与なしに NO 産生を誘導することが明らかとなった。また、SAA はマクロファージの ERK1/2 および p38 の両 MAP キナーゼの活性化を誘導するが、NO 産生誘導機構には p38 活性化を介したシグナル伝達系が主要な役割を演じていることが強く示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えていただき、終始熱心なご指導とご校閲を賜った口腔微生物学講座木村重信教授に深く感謝致します。

本研究に際し、終始ひとかたならぬご指導ならびにご助言をいただき、懇篤なるご校閲を賜った口腔微生物学講座佐々木実博士および根本優子博士に心から感謝の意を表します。また、様々なご援助、ご協力をいただいた口腔微生物学講座の皆様方に深謝致します。

## 文 献

- 1) Ruoff, K. L. : *Streptococcus anginosus* ("Streptococcus milleri") : the unrecognized pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 1 : 102-108, 1988.
- 2) Gossling, J. : Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. *Rev. Infect. Dis.* 10 : 257-285, 1988.
- 3) Whitworth, J. M. : Lancefield group F and related streptococci. *J. Med. Microbiol.* 33 : 135-151, 1990.
- 4) Willcox, M. D. P. : Potential pathogenic properties of members of the "*Streptococcus milleri*" group in relation to the production of endocarditis and abscesses. *J. Med. Microbiol.* 43 : 405-410, 1995.
- 5) Kitada, K., and Inoue, M. : Immunochemical characterization of the carbohydrate antigens of serotype k and Lancefield group G "*Streptococcus milleri*". *Oral Microbiol. Immunol.* 11 : 22-28, 1996.
- 6) Sasaki, H., Igaki, H., Ishizuka, T., Kogoma, Y., Sugimura, T., and Terada, M. : Presence of *Streptococcus* DNA sequence in surgical specimens of gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 86 : 791-794, 1995.
- 7) Sasaki, H., Ishizuka, T., Muto, M., Nezu, M., Nakanishi, Y., Inagaki, Y., Watanabe, H., Watanabe, H., and Terada, M. : Presence of *Streptococcus anginosus* DNA in esophageal cancer, dysplasia of esophagus, and gastric cancer. *Cancer Res.* 58 : 2991-2995, 1998.
- 8) Tateda, M., Shiga, K., Saijo, S., Sone, M., Hori, T., Yokoyama, J., Matsuura, K., Takasaka, T., and Miyagi, T. : *Streptococcus anginosus* in head and neck squamous cell carcinoma : implication in carcinogenesis. *Int. J. Mol. Med.* 6 : 699-703, 2000.
- 9) Shiga, K., Tateda, M., Saijo, S., Hori, T., Sato, I., Tateno, H., Matsuura, K., Takasaka, T., and Miyagi, T. : Presence of *Streptococcus* infection in extra-oropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma and its implication in carcinogenesis. *Oncol. Rep.* 8 : 245-248, 2001.
- 10) Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., and Kaneko, M. : Induction of inflammatory cytokine and cyclooxygenase-2 mRNA expression by secreted substances from oral streptococci. *Dent. J. Iwate Med. Univ.* 20 : 284-290, 1995.
- 11) Sasaki, M., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Kobayashi, M., Yamaura, C., and Kimura, S. : Antigenic characterisation of a novel *Streptococcus anginosus* antigen that induces nitric oxide synthesis by murine peritoneal exudate cells. *J. Med. Microbiol.* 50 : 952-958, 2001.
- 12) Hahm, K. B., Lee, K. J., Kim, J. H., Cho, S. W., and Chung, M. H. : *Helicobacter pylori* infection, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. *Digest. Dis. Sci.* 43 : 72S-77S, 1998.
- 13) Stoclet, J.-C., Fleming, I., Gray, G., Julou-Schaeffer, G., Schneider, F., Schott, C., Schott, C., and Parratt, J. R. : Nitric oxide and endotoxemia. *Circulation* 87 (suppl. V) : V-77-V-80, 1993.
- 14) Zhang, X.-J., Thompson, J. H., Mannick, E. E., Correa, P., and Miller, M. J. S. : Localization of inducible nitric oxide synthase mRNA in inflamed gastrointestinal mucosa by *in situ* reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Nitric Oxide* 2 : 187-192, 1998.
- 15) Koh, E., Noh, S. H., Lee, Y. D., Lee, H. Y., Han, J.-W., Lee, H. W., and Hong, S. : Differential expression of nitric oxide synthase in human stomach cancer. *Cancer Lett.* 146 : 173-80, 1999.
- 16) Iwasaki, T., Higashiyama, M., Kuriyama, K., Sasaki, A., Mukai, M., Shinkai, K., Horai, T., Matsuda, H., and Akedo, H. : N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester inhibits bone metastasis after modified intracardiac injection of human breast cancer cells in a nude mouse model. *Jpn. J. Cancer Res.* 88 : 861-866, 1997.
- 17) Jadeski, L. C., and Lala, P. K. : Nitric oxide synthase inhibition by N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors. *Am. J. Pathol.* 155 :

- 1381-1390, 1999.
- 18) Giardiello, F. M., Offerhaus, G. J. A., Lee, D. H., Krush, A. J., Tersmette, A. C., Booker, S.V., Kelley, N. C., and Hamilton, S. R. : Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut* 34 : 1394-1396, 1993.
  - 19) Matsuura, M., Saito, S., Hirai, Y., and Okamura, H. : A pathway through interferon- $\gamma$  is the main pathway for induction of nitric oxide upon stimulation with bacterial lipopolysaccharide in mouse peritoneal cells. *Eur. J. Biochem.* 270 : 4016-4025, 2003.
  - 20) Benabdelmoumene, S., Dumont, S., Petit, C., Poindron, P., Wachsmann, D., and Klein, J. P. : Activation of human monocytes by *Streptococcus mutans* serotype f polysaccharide : immunoglobulin G Fc receptor expression and tumor necrosis factor and interleukin-1 production. *Infect. Immun.* 59 : 3261-3266, 1991.
  - 21) English, B. K., Patrick, C.C., Orlicek, S. L., McCordic, R., and Shenep, J. L. : Lipoteichoic acid from viridans streptococci induces the production of tumor necrosis factor and nitric oxide by murine macrophages. *J. Infect. Dis.* 174 : 1348-1351, 1996.
  - 22) Hamada, S., Okahashi, N., Kimura, S., Imanishi, H., Koga, T., Kawata, S., Michalek, S. M., and McGhee, J. R. : Novel antigens of oral *Actinomyces* species prepared from a cell wall enzyme lysate. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 35 : 171-181, 1982.
  - 23) Takada, H., Kimura, S., and Hamada, S. : Induction of inflammatory cytokines by a soluble moiety prepared from an enzyme lysate of *Actinomyces viscosus* cell walls. *J. Med. Microbiol.* 38 : 395-400, 1993.
  - 24) Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S., and Kimura, S. : Characterization and molecular cloning of a glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus epidermidis*. *Microb. Pathogenesis* 33 : 33-41, 2002.
  - 25) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
  - 26) Stuehr, D. J., and Nathan, C. F. : Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169 : 1543-1555, 1989.
  - 27) Drapier, J.-C., Wietzerbin, J., and Hibbs, J. B., Jr. : Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 18 : 1587-1592, 1988.
  - 28) Stuart, A. E., Habeshaw, J. A., and Davidson, A. E. : Phagocytes *in vitro*. In : Weir, D. M., ed. Handbook of Experimental Immunology, 3rd ed. London : Blackwell Scientific Publications, 31.1-31.30, 1979.
  - 29) Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., and Miyake, K. : Cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 164 : 3471-3475, 2000.
  - 30) Zhang, T., Kawakami, K., Qureshi, M. H., Okamura, H., Kurimoto, M., and Saito, A. : Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells. *Infect. Immun.* 65 : 3594-3599, 1997.
  - 31) Tominaga, K., Saito, S., Matsuura, M., Funatogawa, K., Matsumura, H., and Nakano, M. : Role of IFN- $\gamma$  on dissociation between nitric oxide and TNF/IL-6 production by murine peritoneal cells after restimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J. Leukoc. Biol.* 66 : 974-980, 1999.
  - 32) Lorschach, R. B., and Russell, S. W. : A specific sequence of stimulation is required to induce synthesis of the antimicrobial molecule nitric oxide by mouse macrophages. *Infect. Immun.* 60 : 2133-2135, 1992.
  - 33) Jiang, H., Rummage, J. A., Zhou, A., Chen, Z., Herriott, M. J., Stewart, C. A., Kolosov, M., and Leu, R. W. : IFN- $\alpha\beta$  reconstitutes the deficiency in lipid A-activated AKR macrophages for nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 157 : 305-312, 1996.
  - 34) Nishida, E., and Gotoh, Y. : The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.* 18 : 128-131, 1993.
  - 35) Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. : Mitogen-activated protein kinase : conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79 : 143-180, 1999.
  - 36) Jia, J., Alaoui-El-Azher, M., Chow, M., Chambers, T. C., Baker, H., and Jin, S. : c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Pseudomonas aeruginosa* ExoS-induced apoptosis. *Infect. Immun.* 71 : 3361-3370, 2003.
  - 37) Ajizian, S. J., English, B. K., and Meals, E. A. : Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . *J. Infect. Dis.* 179 : 939-944, 1999.
  - 38) Chan, E. D., and Riches, D.W. H. : IFN- $\gamma$  + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38<sup>mapk</sup> in a mouse macrophage cell

- line. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280 : C441-C450, 2001.
- 39) Watters, J. J., Sommer, J. A., Pfeiffer, Z. A., Prabhu, U., Guerra, A. N., and Bertics, P. J. : A differential role for the mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide signaling. *J. Biol. Chem.* 277 : 9077-9087, 2002.
- 40) Monier, R. M., Orman, K. L., Meals, E. A., and English, B. K. : Differential effects of p38- and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase inhibitors on inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor production in murine macrophages stimulated with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 185 : 921-926, 2002 .
- 41) Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J-H., Patriotis, C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kollias, G., and Tschlis, P. N. : TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103 : 1071-1083, 2000.
- 42) Zhu, W., Downey, J. S., Gu, J., Padova, F. D., Gram, H., and Han, J. : Regulation of TNF expression by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Immunol.* 164 : 6349-6358, 2000.