

分泌型白血球プロテアーゼインヒビターによる 歯肉上皮細胞の *Porphyromonas gingivalis* 感染制御

石河 太知

岩手医科大学歯学部口腔病因病態制御学講座口腔微生物学免疫学分野

(主任：木村 重信 教授)

(受付：2009年12月28日)

(受理：2010年1月7日)

Abstract : Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) has been recognized as not only a protease inhibitor but also an important defense component in mucosal secretory fluids. To elucidate the functional role in innate immunity in gingival crevices, the SLPI production from a gingival epithelial cell line, GE1, with or without the stimulation of *Porphyromonas gingivalis* lyophilized whole cells (Pg-WC) and the lipopolysaccharides (Pg-LPS), and the inhibitory effect on *P. gingivalis* proteases were investigated. The unstimulated GE1 cells showed low levels of SLPI mRNA expression, which was augmented by the stimulation with Pg-LPS as well as Pg-WC. The augmentation of SLPI mRNA expression in GE1 cells was accompanied by the inductions of IL-6, TNF- α and IL-1 β mRNA expressions. Although IL-6 could induce macrophages to produce SLPI, the kinetics analyses suggested that the augmentation of SLPI production in GE1 cells could not be a second response to the IL-6 induced by the stimulant, but a direct response by the *P. gingivalis* antigens. Further experiments using rSLPI indicated that SLPI showed a direct inhibitory effect on the *P. gingivalis* protease of Lys-gingipain. Thus, it was suggested that gingival epithelial cells could be a substantial producer of SLPI that functions inhibitory to the pathogenic *P. gingivalis* protease in gingival crevices. It was also suggested that the SLPI production could increase in response to *P. gingivalis* through the stimulation with its pathogenic constituents.

Key Words : secretory leukocyte protease inhibitor, gingival epithelial cells, inhibitory effect, *Porphyromonas gingivalis* infection

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) production from gingival epithelial cells and its inhibitory effect against *Porphyromonas gingivalis* infection

Taichi ISHIKAWA

Department of Pathogenesis and Control of Oral Diseases, Division of Oral Microbiology and Immunology, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief : Prof. Shigenobu KIMURA)

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

緒 言

分泌型白血球プロテアーゼインヒビター (SLPI: secretory leukocyte protease inhibitor) は 107 アミノ酸残基よりなる 11.7 kDa のセリンプロテアーゼのインヒビターで、好中球、マクロファージや、呼吸器、消化器、膣の粘膜上皮細胞、耳下腺および顎下腺腺房細胞、膝β細胞などから産生される¹⁻⁷⁾。SLPIの機能としては、プロテアーゼに対する阻害活性のほか、抗菌・抗真菌活性^{8,9)}、抗ウイルス活性^{10,11)}、ならびに呼吸器粘膜上皮組織の損傷治癒や上皮細胞の更新にも働く¹²⁾ことが明らかにされている。そのため、SLPIは、呼吸器、消化器、膣といった粘膜系での病原微生物感染に対する宿主の自然免疫として機能する因子、特に感染初期に lipopolysaccharide (LPS) などの微生物の病原因子に反応して感染制御的かつ抗炎症的に働く宿主因子として捉えられている^{13,14)}。

口腔においても、唾液中¹⁵⁾および歯肉溝滲出液中¹⁶⁾に SLPI が含まれることは示されており、HIV 感染者では唾液中の SLPI 濃度が上昇していることが明らかにされている¹⁷⁾ことから、SLPI が口腔自然免疫の機能因子としての役割を果たしていることが推測されている。口腔での SLPI 産生細胞としては唾液腺の腺房細胞と上皮細胞⁵⁾および歯肉上皮細胞^{18,19)}があるが、歯肉溝の感染制御という面からは、歯肉上皮細胞の産生する SLPI が重要となる。株化歯肉上皮細胞を用いた研究からは、HIV 感染により歯肉上皮細胞からの SLPI 産生が増強されること¹⁸⁾、しかし、慢性歯周炎の原因細菌である *Porphyromonas gingivalis* のアルギニン特異的プロテアーゼ (Arg-gingipain) による刺激では逆に歯肉上皮細胞からの SLPI 産生が抑制される¹⁶⁾ことが報告されている。歯肉溝/歯周ポケットは *P. gingivalis* をはじめとする歯周病原性細菌の感染/定着の場で、種々の細菌性病原因子が存在する。*P. gingivalis* の病原因子としては、gingipain (Arg-gingipain および基質特異性を異にする Lys-gingipain) のほか、線毛抗原、

LPS などが挙げられている^{20,21)}。特に LPS は、他の粘膜上皮細胞の SLPI 産生増強に働くことが示されていることからすれば、*P. gingivalis* の LPS も歯肉上皮細胞の SLPI 産生に影響する可能性が強く示唆される。しかしこれまでのところ、*P. gingivalis* の LPS あるいは菌体と歯肉上皮細胞との相互作用について検討した報告はない。そこで本研究では、歯肉溝/歯周ポケットにおける口腔宿主自然免疫における SLPI の役割、特に *P. gingivalis* の歯肉溝/歯周ポケットへの感染制御に果たす役割を明らかにする目的で、歯肉溝上皮細胞の分化形質を保持した不死化歯肉上皮細胞株である GE1 を用いて、歯肉上皮細胞の SLPI 産生能および *P. gingivalis* 抗原物質との相互作用について検討を行った。さらに本研究では、*P. gingivalis* の産生する主要プロテアーゼである 2 種類の gingipains (Arg-gingipain および Lys-gingipain) に対する SLPI の抑制効果についても検討を行った。

材料および方法

1. GE1 細胞とその培養

歯肉上皮細胞としては、マウス歯肉上皮細胞由来の GE1 細胞 (岩手医科大学口腔病態制御学講座口腔病理学分野 畠山節子博士より分与) を用いた。GE1 細胞の培養は Hatakeyama ら²²⁾の方法に従って行った。すなわち、1%牛胎仔血清とマウス上皮成長因子 (EGF, SIGMA-ALDRICH Co., Irvine, UK, 10 ng/ml) を添加した無血清合成培地 SFM101 (ニッスイ, 東京) を用いて、33°C で 4 日間培養した。

2. *P. gingivalis* 抗原および菌体外プロテアーゼ画分の調製

P. gingivalis 抗原としては凍結乾燥全菌体 (Pg-WC) および LPS を用いた。*P. gingivalis* ATCC 33277 株を、Brain Heart Infusion 培地 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) に hemin (SIGMA-ALDRICH, 5.0 μg/ml) と menadione (SIGMA-ALDRICH, 1.0 μg/ml) を添加した ABCM ブイヨン培地 (栄研化学, 東京)

で嫌気条件下 (90% N₂, 5% H₂, 5% CO₂) で培養し, 培養終了後, 凍結乾燥全菌体を調製した (Pg-WC). *P. gingivalis* LPS (Pg-LPS) は既報²³⁾ に従い Pg-WC より調製した. また, *Escherichia coli* LPS は, 市販の *E. coli* K235 株由来精製 LPS (SIGMA-ALDRICH) を再度 hot phenol-water 抽出して調製した (Ec-LPS).

P. gingivalis 菌体外プロテアーゼ画分は既報²⁴⁾ に従って行った. すなわち, 培地成分の混入を排除して *P. gingivalis* が産生するプロテアーゼを回収する目的で, 前培養した *P. gingivalis* ATCC 33277 株を 72 時間, 嫌気的条件下で透析膜上培養した. 得られた透析膜 (cut-off 値 = 12,000-14,000 Da, 三光純薬, 東京) 上の菌体を Na リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) を用いて回収した後, さらに PBS を添加して PBS 菌懸濁液 (A₆₀₀ = 1.0) を調製した. PBS 菌懸濁液を 4°C, 6,300 x g, 15 分間遠心し, 得られた上清を 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に透析し, *P. gingivalis* の菌体外プロテアーゼ画分を得た. 菌体外プロテアーゼ画分は -80°C で保存した.

3. *P. gingivalis* 抗原刺激による GE1 細胞の増殖反応

GE1 細胞 (2 x 10⁵ / 400 μl / 穴) を Pg-LPS, Pg-WC および Ec-LPS で刺激, 培養した. 培養は 48 穴平底マイクロプレート (Nalge Nunc International Co., Rochester, NY, USA) を用いて, 5% CO₂-95% 大気, 湿度 95% の条件下で, 33°C, 48 時間行った. 増殖反応は, 培養終了 12 時間前に添加した [6-³H] チミジン (GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, England) (37 kBq / 穴) の取り込み量から測定した.

4. SLPI および炎症性サイトカイン (IL-6, TNF-α および IL-1 β) mRNA 発現の測定

無刺激あるいは *P. gingivalis* 抗原で刺激, 培養した GE1 細胞より, RNA 抽出キット (QIAGEN Co., Hilden, Germany) を用いて total RNA を回収した. 精製 RNA (1 μg) より Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) を用いて cDNA を調

製し, 既報²⁵⁾ に従い, SLPI (F; 5'-CAA AAA TGA TGC TAT CAA AAT CGG A-3', R; 5'-TGC AGG GAT CAG GCT CAC AT-3'), IL-6 (F; 5'-GTT CTC TGG GAA ATC GTG GA-3', R; 5'-TGT ACT CCA GGT AGC TAT GG-3'), IL-1 β (F; 5'-TTG ACG GAC CCC AAA AGA TG-3', R; 5'-AGA AGG TGC TCA TGT CCT CA-3') および TNF α 特異的プライマー (F; 5'-TCT CAT CAG TTC TAT TGG CCC-3', R; 5'-GGG AGT AGA CAA GGT ACA AC-3') を用いて PCR を行った. Reverse-transcriptional PCR (RT-PCR) は 95°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒の 35 サイクルで行った. 反応後, エチジウムブロマイド (0.1 μg/ml) を含む 3% アガロースゲルを用いて電気泳動し, トランスイルミネーターで PCR 産物を検出, NIH image により数値化した. また, Real-time RT-PCR では, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (タカラバイオ, 東京) を使用し, 95°C 5 秒, 60°C 30 秒の 45 サイクルで行った.

5. *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼに対する SLPI の阻害活性

SLPI は市販のヒトリコンビナント SLPI (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を用いた. トリプシン (Promega Co., Madison, WI, USA), MCA ペプチド合成基質 (Bz-Arg-MCA および Z-His-Glu-Lys-MCA) (ペプチド研究所, 大阪) は市販のものを購入し使用した. SLPI の阻害活性は, 既報²⁴⁾ に従い, SLPI による前処理後の *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼの MCA ペプチド合成基質に対するプロテアーゼ活性の変動から検討した. すなわち, *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼあるいは対照として用いたトリプシンに SLPI を含む 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) を加え, 0°C で 30 分間静置, 反応させた. 前処理後, 30°C, 5 分間加温した後, MCA ペプチド合成基質 (20 μM) を添加して, 30°C で 90 分間反応後, 蛍光分光光度計 (F-2000, HITACHI, 東京) を用いて, 励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm で 7-amino-4-methylcoumarin の蛍光強度を測定した.

結 果

1. 無刺激状態での GE1 細胞の SLPI mRNA 発現

無刺激状態での GE1 細胞の SLPI 産生能について検討した。その結果、培養 0 日目から 5 日目のいずれの GE1 細胞においても、無刺激状態で弱いながらも SLPI mRNA の発現が観察され、培養時間の差は認められなかった（いずれも $p > 0.05$ ）（図 1）。

2. *P. gingivalis* 抗原刺激による GE1 細胞の増殖反応と SLPI mRNA 発現増強

GE1 細胞は、LPS のレセプターと考えられている CD14 および TLR4 を表面に発現し、Ec-LPS により増殖反応が誘導されることが報告

されている²⁵⁾。そこで、*P. gingivalis* 抗原 (Pg-LPS および Pg-WC) 刺激後の GE1 細胞の増殖反応を Ec-LPS のそれと比較検討した。その結果、Pg-WC (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の場合を除き、Pg-LPS および Pg-WC のいずれの刺激によっても、Ec-LPS 同様、GE1 細胞の増殖反応が誘導されることが明らかとなった (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Pg-WC では有意の抑制がみられたが、その他ではいずれも有意の増殖反応が誘導された) (図 2)。

GE1 細胞を Pg-LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、Pg-WC (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) あるいは Ec-LPS (1 および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で刺激すると、GE1 細胞の SLPI mRNA 発現が増強した (Pg-LPS では $p < 0.05$, Pg-WC および Ec-LPS では $p < 0.01$) (図 2)。この結果は Real-time RT-PCR によっても確認された (図

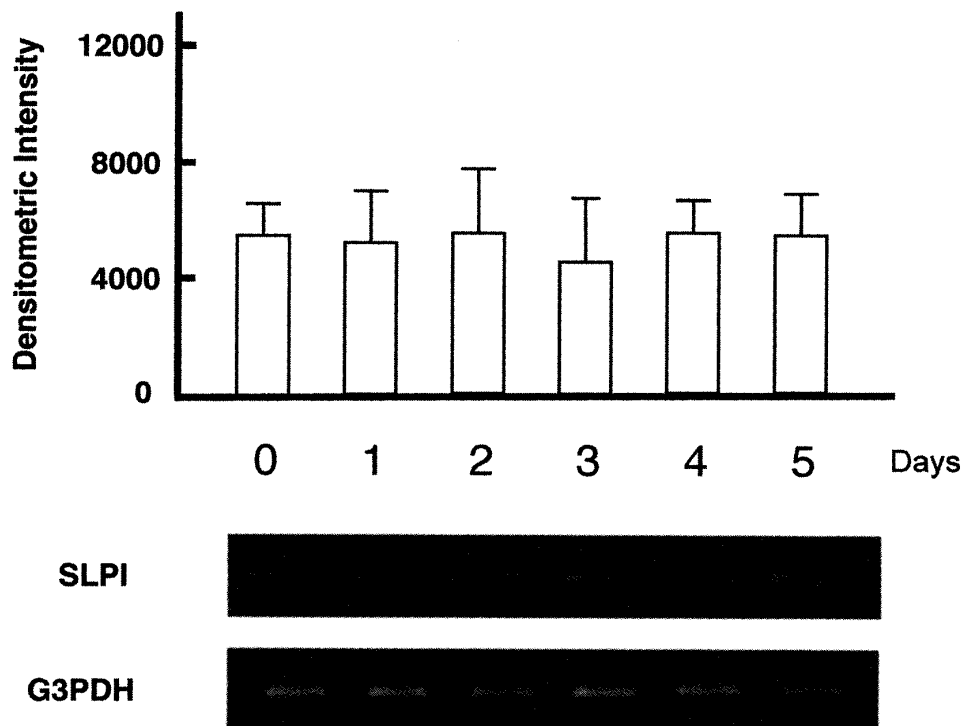


図 1 無刺激時の GE1 細胞からの SLPI mRNA 発現

GE1 細胞を 33°C, 5% CO₂ 存在下でそれぞれの日数培養した。Total RNA を抽出し SLPI 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った ($n \geq 6$)。Densitometric intensity: 平均値 \pm SE (数値化には NIH image Ver. 1.63 を使用し、SLPI mRNA 発現量を G3PDH の発現量から標準化した)。

3-B). 増殖反応の場合と同様, Pg-LPS では 10 μ g/ml, Pg-WC では 50 μ g/ml, Ec-LPS では 1 μ g/ml で最も高い SLPI mRNA 発現の増強が観察された (図 2) が, 3 群間で有意の差は観察されなかった (図 2, 図 3-B とも, いずれも $p >$

0.05).

つぎに, Pg-LPS (10 μ g/ml), Pg-WC (50 μ g/ml) および Ec-LPS (1 μ g/ml) による刺激時間をかえ, GE1 細胞の SLPI mRNA 発現増強に与える影響を検討した. その結果, Pg-LPS

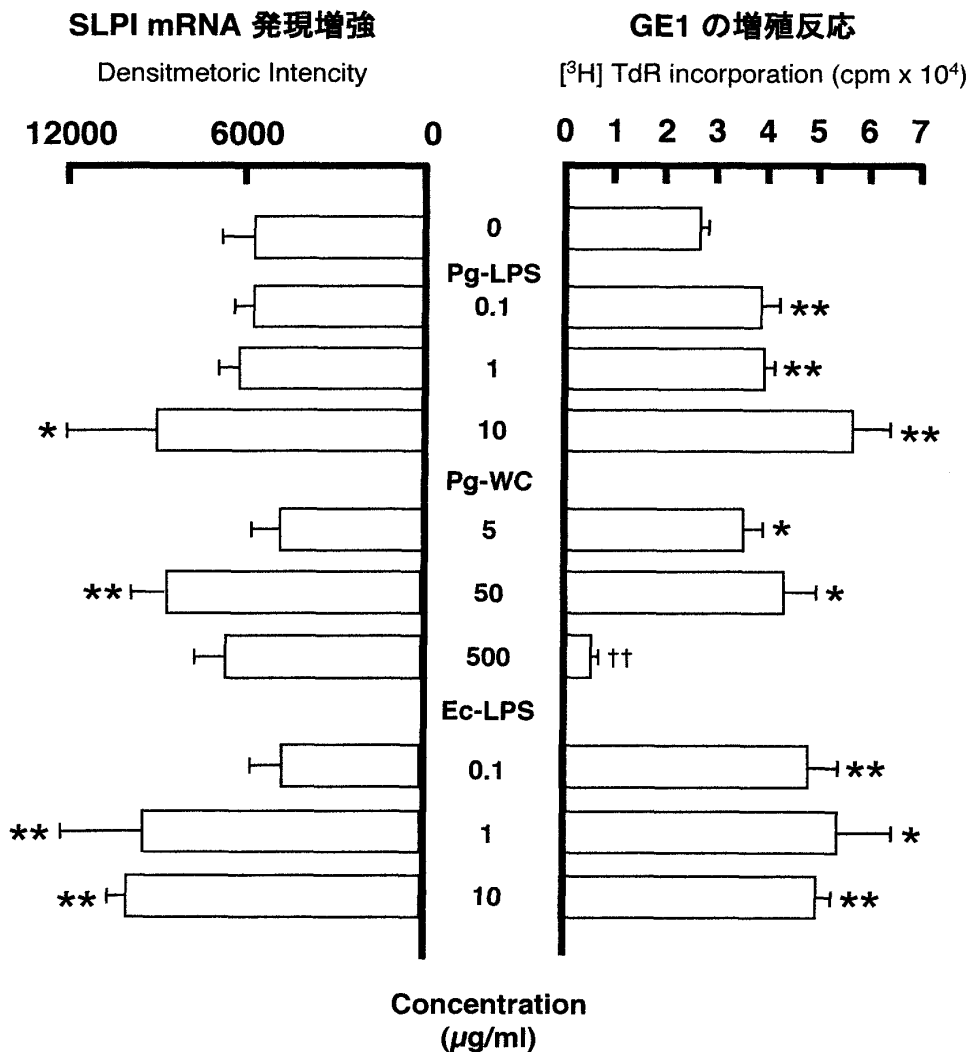


図 2 *P. gingivalis* 抗原刺激による GE1 細胞の SLPI mRNA 発現および増殖反応

SLPI mRNA 発現は GE1 細胞を Pg-LPS, Ec-LPS 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, Pg-WC 5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml でそれぞれ 6 時間刺激後, GE1 細胞を回収し total RNA を抽出した. SLPI 特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った ($n \geq 3$).

増殖反応は SLPI mRNA 発現と同様の抗原および用量でそれぞれ 12 時間刺激した GE1 細胞の [³H]チミジン取り込み量から測定した ($n \geq 3$). * ($p < 0.05$) および ** ($p < 0.01$) はそれぞれ無刺激対照と比較して有意に高いことを示し, †† ($p < 0.01$) は低いことを示す.

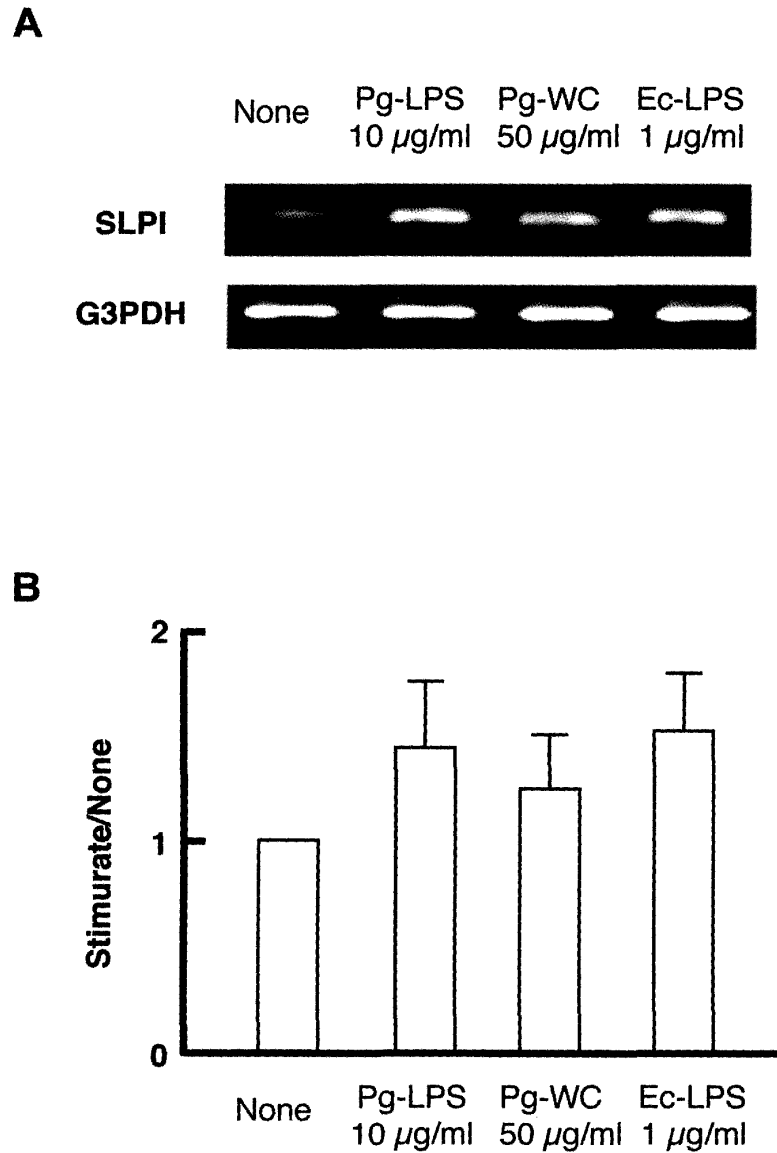


図3 *P. gingivalis* 抗原刺激による GE1 細胞からの SLPI mRNA 発現

GE1 細胞を Pg-LPS 10 μ g/ml, Pg-WC 50 μ g/ml, Ec-LPS 1 μ g/ml でそれぞれ 6 時間刺激した。Total RNA を抽出し SLPI 特異的プライマーを用いて RT-PCR (A) および Real-time RT-PCR(B)を行った。Stimurante/None: それぞれを G3PDH で標準化した後、無刺激時のそれと比較した(n \geq 3)。

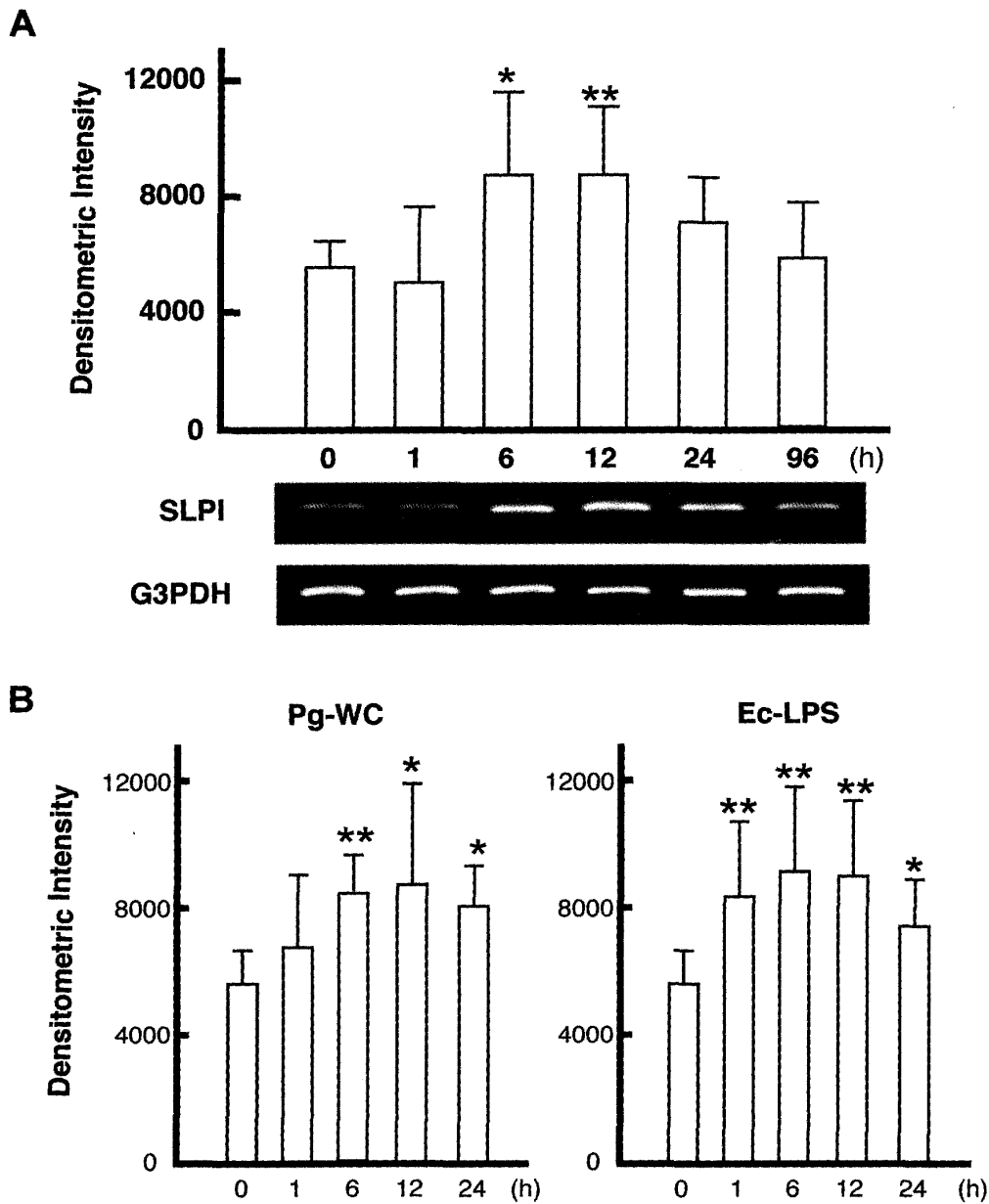


図4 *P. gingivalis* 抗原刺激による SLPI mRNA 発現の経時変化

GE1 細胞を Pg-LPS 10 µg/ml (A), Pg-WC 50 µg/ml および Ec-LPS 1 µg/ml (B) でそれぞれの時間刺激後, 細胞を回収し total RNA を抽出し RT-PCR を行った. Densitometric intensity: 平均値 ± SE (数値化には NIH image Ver.1.63 を使用した) (n ≥ 3). * ($p < 0.05$) および ** ($p < 0.01$) はそれぞれ無刺激対照と比較して有意に高いことを示す.

では、培養終了6-12時間前にPg-LPSを添加した実験系、すなわち、Pg-LPS 6-12時間刺激でGE1細胞のSLPI mRNA発現が最も強く増強されることが明らかとなった(図4-A)。また、Pg-WCでは12時間刺激で、Ec-LPSでは6-12時間刺激で、最大のSLPI mRNA発現増強が認められた(図4-B)。

3. *P. gingivalis* 抗原によるGE1細胞からの炎症性サイトカイン産生誘導

Pg-LPS, Pg-WCおよびEc-LPSによるGE1細胞からの炎症性サイトカイン産生誘導について検討した。その結果、Pg-WCによるIL-6の産生誘導の場合を除き、いずれの抗原刺激によってもGE1細胞でIL-6, IL-1 β およびTNF-

α mRNAの発現が増強した(図5)。また、その発現のピークはPg-WCによるIL-6の産生誘導の場合を除き、いずれも刺激後12時間で認められた(図6)。

4. *P. gingivalis* プロテアーゼ (gingipain) に対するSLPIの阻害活性

P. gingivalis が産生するgingipainには、基質特異性の異なるArg-gingipainとLys-gingipainの2種類があり、いずれも本菌の主要病原因子であることが示されている²⁶⁾。そこで、両gingipainを含む*P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分を用いて、SLPIの阻害活性について検討した。その結果、Bz-Arg-MCAを基質とした場合の活性(Arg-gingipain活性)は

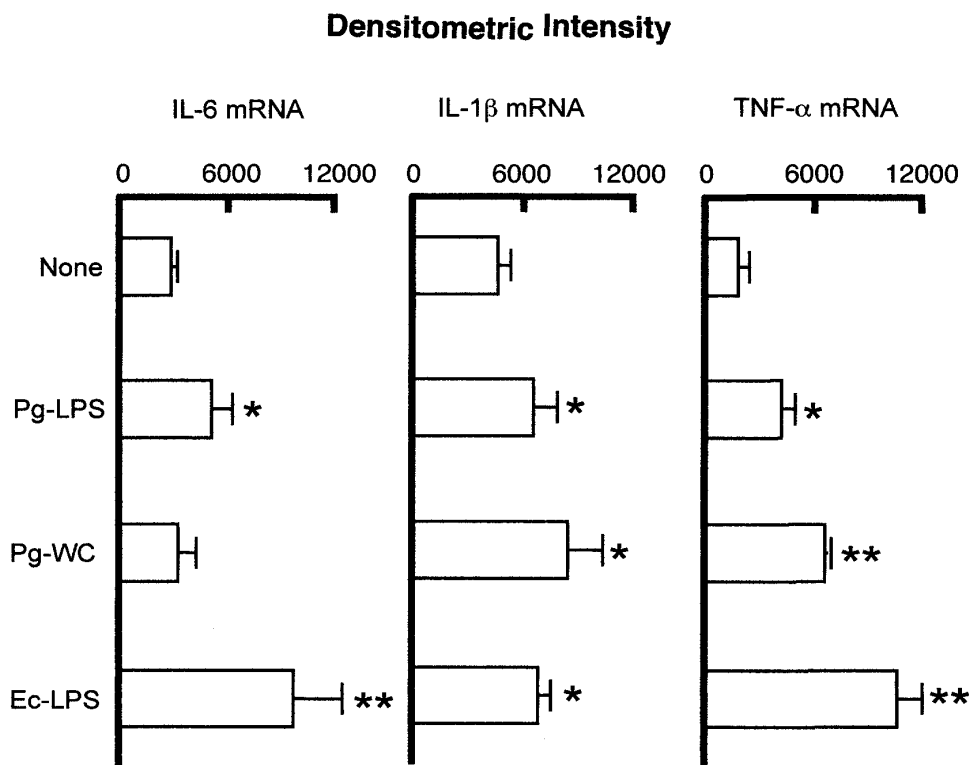


図5 *P. gingivalis* 抗原刺激によるGE1細胞のIL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA発現

GE1細胞をPg-LPS 10 μ g/ml, Ec-LPS 1 μ g/ml, Pg-WC 50 μ g/mlでそれぞれ6時間刺激後、GE1細胞を回収しtotal RNAを抽出しIL-6, IL-1 β , TNF- α 特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。Densitometric intensity: 平均値 \pm SE(数値化にはNIH image Ver. 1.63を使用した)($n \geq 3$)。* ($p < 0.05$) および** ($p < 0.01$) はそれぞれ無刺激対照と比較して有意に高いことを示す。

100 $\mu\text{g/ml}$ の rSLPI 添加によっても阻害は認められなかったが, Z-His-Glu-Lys-MCA を基質とした場合の活性 (Lys-gingipain 活性) は 50 $\mu\text{g/ml}$ 以上の rSLPI 添加によってほぼ完全に阻害されることが明らかとなった ($p < 0.01$) (図

7). 一方, 対照として用いたトリプシンに対する阻害活性は, Bz-Arg-MCA を基質とした場合に認められ ($p < 0.01$), Z-His-Glu-Lys-MCA を基質とした場合には認められなかった ($p > 0.05$).

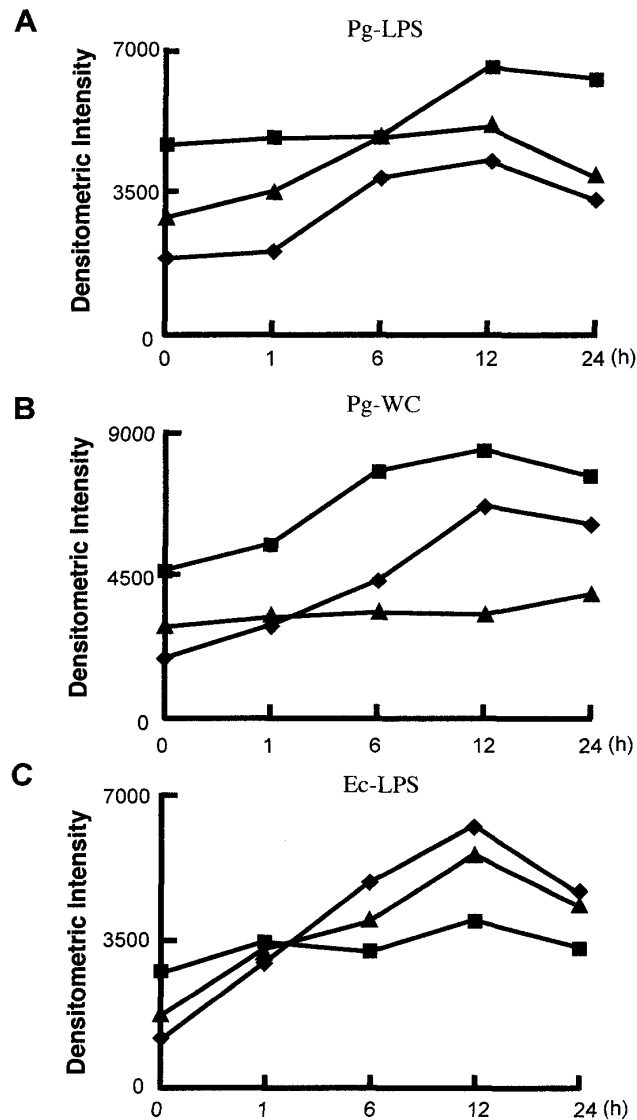


図6 *P. gingivalis* 抗原刺激による GE1 細胞の IL-6, IL-1 β , TNF- α mRNA 発現の経時変化

GE1 細胞を Pg-LPS 10 $\mu\text{g/ml}$, Pg-WC 50 $\mu\text{g/ml}$, Ec-LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ でそれぞれの時間刺激後, 細胞を回収し total RNA を抽出した. Pg-LPS (A), Pg-WC (B) および Ec-LPS (C) 刺激時の TNF- α (◆), IL-1 β (■) および IL-6 (▲) の mRNA 発現を RT-PCR により検討した ($n \geq 3$). Densitometric intensity: 平均値 \pm SE (数値化には NIH image Ver. 1.63 を使用した).

考 察

歯肉溝／歯周ポケットは歯周病原性細菌の感染／定着の場であることから、歯周病原性細菌に対する第一の感染防御機構として口腔自然免疫が重要な役割を演じていることは容易に想像される。歯肉溝滲出液中の細胞成分の95%以上を占める好中球については貪食能や抗菌性プロテアーゼ産生という面から検討されてい

る^{27, 28)}が、歯肉溝上皮細胞についてはほとんど研究が行われていない。それは、適当な歯肉上皮細胞株が入手困難であったこともあるが、自然免疫系での上皮細胞の役割が明確にされていなかったことによる。しかし最近、歯肉上皮細胞を含む上皮細胞が産生するSLPIが粘膜での自然免疫に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた^{14, 18, 19)}。しかし、SLPIによる歯周病原性細菌に対する感染制御およびSLPI産

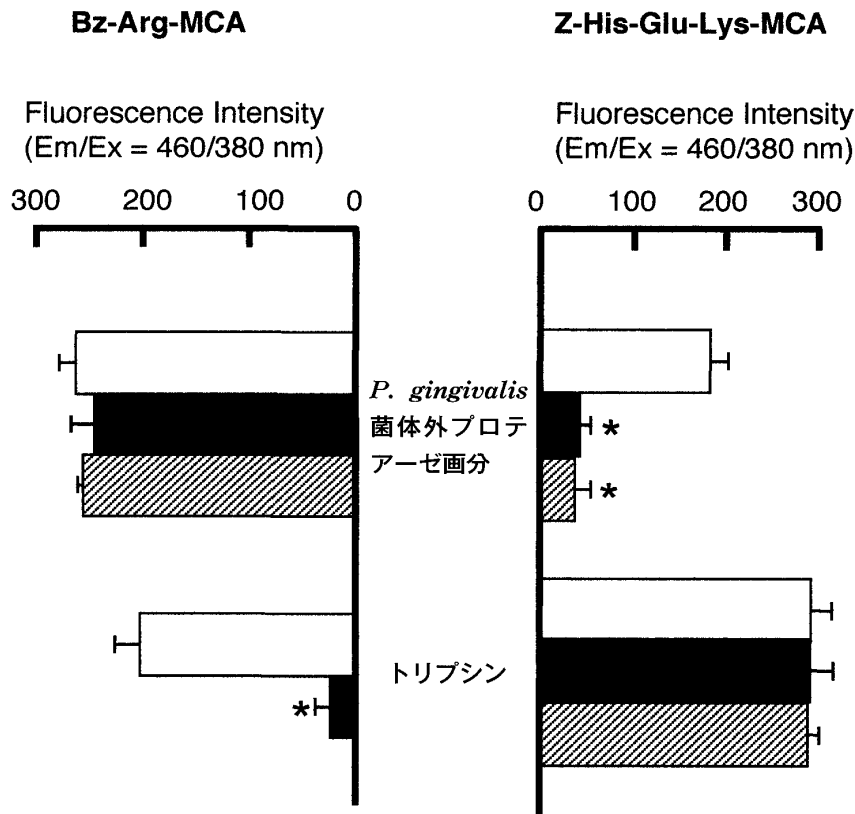


図7 *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分に対するSLPIの阻害作用

SLPI 0 μg/ml(□), 50 μg/ml(■), 100 μg/ml(▨)を *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分およびトリプシンに加え0℃で30分間反応させた。30℃, 5分間加温した後, MCA ペプチド合成基質 (Bz-Arg-MCA あるいは Z-His-Glu-Lys-MCA 各 20 μM) をそれぞれ添加して, 30℃で90分間反応後, 蛍光強度を測定した(n = 3). * : p < 0.01

生細胞としての歯肉上皮細胞の役割について検討した報告はない。そこで本研究では、歯肉溝上皮細胞の分化形質を保持する GE1 細胞を用いて、歯肉上皮細胞の SLPI 産生能および *P. gingivalis* 抗原との相互作用について検討し、さらに、SLPI の Arg-gingipain および Lys-gingipain に対する抑制効果についても検討を行った。

その結果、無刺激状態で GE1 細胞は SLPI を発現していることが強く示唆された (図 1)。この成績はヒト由来株化歯肉上皮細胞を用いた Jana ら¹⁸⁾、Into らの報告¹⁶⁾ を支持する。後者の報告では、歯肉上皮細胞の SLPI 産生量が歯肉溝滲出液中の SLPI 量に関連すると主張しているが、歯肉溝滲出液中の好中球もまた SLPI 産生細胞であることを勘案すると、歯肉上皮細胞の SLPI 産生量のみで歯肉溝滲出液中の SLPI 量を推し量ることはできないものと思われる。

P. gingivalis 抗原刺激により GE1 細胞の増殖反応と SLPI mRNA 発現が増強した (図 2 および 3)。GE1 細胞が LPS のレセプターと考えられている CD14, TLR4 を表面に発現し、Ec-LPS により増殖反応が誘導されることは報告されている²⁵⁾ が、Pg-LPS および Pg-WC によっても増殖反応が誘導されることが本実験より明らかとなった。但し、高濃度 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) の Pg-WC は GE1 細胞に対して細胞毒性を示した。Pg-LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および Pg-WC (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 刺激により GE1 細胞の SLPI mRNA 発現増強が認められたことは、歯肉上皮細胞への HIV 感染により SLPI mRNA 発現が増強するという Jana ら¹⁸⁾ の観察結果とともに、歯肉溝への病原微生物の感染初期に SLPI が産生され、感染制御に作用することを示唆するものかもしれない。

P. gingivalis 抗原刺激では GE1 細胞からの炎症性サイトカインの産生も誘導された (図 5)。マクロファージでは、Ec-LPS により誘導された内因性の IL-6 がオートクラインに働いて SLPI 産生に繋がることを示唆されてい

る¹³⁾。しかし GE1 細胞を用いた本実験では、SLPI mRNA の発現増強のピークが 6-12 時間で認められた (図 4) のに対し、IL-6 の産生誘導のピークは Pg-WC 刺激の場合を除きいずれも刺激後 12 時間で認められた (図 6) こと、また、Pg-WC 刺激では IL-6 の産生誘導がみられないにも関わらず SLPI mRNA の発現増強が観察された (図 2) ことから、歯肉上皮細胞の SLPI mRNA の発現増強は、誘導された IL-6 による二次的な作用ではなく、*P. gingivalis* 抗原による直接的な反応であることが示唆された。歯肉上皮細胞とマクロファージでの SLPI 産生機序の差は、両細胞の機能的役割の差に関連するのかもしれない。マクロファージでは LPS 刺激で SLPI が産生されるが、産生された SLPI によって LPS との反応性を下げ、エンドトキシンショック等の生体の過剰反応が抑制されることが示唆されている^{8,13)}。病原微生物の最初の攻撃を受ける (歯肉) 上皮細胞では、恒常的に SLPI を産生して感染防御機能を発揮する一方、強い侵襲を受けた場合には SLPI 産生が増強され、alarm reactant としてマクロファージの過剰反応の抑制に働くのかもしれない^{14,29)}。

本研究では、*P. gingivalis* の主要病原因子の一つであるプロテアーゼに対する SLPI の阻害活性を知る目的で、*P. gingivalis* が産生する基質特異性の異なる 2 種類の gingipain (Arg-gingipain および Lys-gingipain) を含む *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分を用いて SLPI の阻害活性を検討した。その結果、*P. gingivalis* の Arg-gingipain 活性に対する SLPI の阻害活性は認められなかったが、Lys-gingipain 活性に対しては強い阻害活性を示すことが明らかとなった (図 7)。Arg-gingipain と SLPI の相互作用について、Into らは Arg-gingipain が SLPI を分解するとの報告を行っている¹⁶⁾。しかし本研究では、Arg-gingipain および Lys-gingipain を含む *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分を用いて、Z-His-Glu-Lys-MCA を基質とした場合の活性 (Lys-gingipain 活性) が SLPI 添加によってほぼ完全に阻害さ

れることを明らかにした。この結果は、Arg-gingipain が存在する状態で SLPI の Lys-gingipain 抑制活性が認められることを示しており、Intoらの主張と一致しない。その理由は明らかではないが、本実験で用いた *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分中の Arg-gingipain 量が少ないためか、あるいは *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分に Arg-gingipain の SLPI 分解活性を阻害する物質が存在するのかもしれない。本研究で用いた *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分は、透析膜上培養から調製した、より native な状態に近いと考えられる *P. gingivalis* 菌体外プロテアーゼ画分であることから、歯肉溝／歯周ポケットでは SLPI による Lys-gingipain 抑制効果は保持されているものと予想される。

SLPI の直接的な抗菌作用としては、高濃度で *E. coli* および *Staphylococcus aureus* の増殖が抑制されることが明らかにされている⁹⁾。結果には示さなかったが、高濃度の SLPI 添加によっても *P. gingivalis* の増殖抑制はみられていない。さらに、*P. gingivalis* の Arg-gingipain が本菌の線毛を介する生体細胞への付着を亢進するという Kontani らの報告³⁰⁾ を勘案すると、歯肉溝／歯周ポケットへの *P. gingivalis* 感染／定着に対しては歯肉上皮細胞の SLPI は効果的な抑制作用を示さないのかもしれない。あるいは逆に、歯肉上皮細胞の SLPI による感染制御機能をすり抜ける細菌のみが歯周病原性を発揮するのかもしれない。今後、他の歯周病原性細菌に対する SLPI の作用についても検討し、SLPI による歯肉溝／歯周ポケットへの歯周病原性細菌の感染制御と歯周炎成立機序の関連性についても検討を行う予定である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会をあたえていただき、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました口腔病因病態制御学講座口腔微生物学免疫学分野 木村重信 教授に深く感謝いたします。また、本研究に際し、終始ひとかたな

らぬ御指導、御助言をいただき、御懇篤な校閲を賜りました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 根本優子 博士に深甚なる謝意を表します。最後に、絶えず暖かい御支援ならびに御協力を頂きました口腔病因病態制御学講座口腔微生物学免疫学分野の皆様へ深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Tompson, R. C., and Ohlsson, K.: Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 6692-6696, 1986.
- 2) Zitnik, R. J., Zhang, J., Kashem, M. A., Kohno, T., Lyons, D. E., Wright, C. D., Rosen, E., Goldberg, I., and Hayday, A. C.: The cloning and characterization of a murine secretory leukocyte protease inhibitor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232: 687-697, 1997.
- 3) Brown, T. I., Mistry, R., Gray, R., Imrie, M., Collie, D. D., and Sallenave, J. M.: Characterization of the ovine ortholog of secretory leukoprotease inhibitor. *Mamm. Genome.* 16: 621-630, 2005.
- 4) Franken, C., Meijer, C. J., and Dijkman, J. H.: Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 493-498, 1989.
- 5) Abe, T., Kobayashi, N., Yoshimura, K., Trapnell, B. C., Kim, H., Hubbard, R. C., Brewer, M. T., Thompson, R. C., and Crystal, R. G.: Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 87: 2207-2215, 1991.
- 6) Jin, F. Y., Nathan, C., Radzioch, D., and Ding, A.: Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 88: 417-426, 1997.
- 7) Li, J., Peet, G. W., Balzarano, D., Li, X., Massa, P., Barton, R. W., and Marcu, K. B.: Novel NEMO/IkappaB kinase and NF-kappa B target genes at the pre-B to immature B cell transition. *J. Biol. Chem.* 276: 18579-18590, 2001.
- 8) Sallenave, J. M.: Antimicrobial activity of anti-proteinases. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 111-115, 2002.
- 9) Hiemstra, P. S., Maassen, R. J., Stolk, J., Heinzl-Wiel, R., Steffens, G. J. and Dijkman, J. H.: Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect. Immun.* 64: 4520-4524, 1996.
- 10) McNeely, T. B., Dealy, M., Dripps, D. J., Orenstein, J. M., Eisenberg, S. P., and Wahl, S. M.: Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: A human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J. Clin. Invest.* 96: 456-464,

- 1995.
- 11) McNeely, T. B., Shugars, D. C., Rosendahl, M., Tucker, C., Eisenberg, P., and Wahl, M.: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood* 90: 1141-1149, 1997.
 - 12) Zhu, J., Nathan, C., Jin, W., Sim, D., Ashcroft, G. S., Wahl, S. M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wright, C. D., and Ding, A.: Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 111: 867-878, 2002.
 - 13) Nakamura, A., Mori, Y., Hagiwara, K., Suzuki, T., Sakakibara, T., Kikuchi, T., Igarashi, T., Ebina, M., Abe, T., Miyazaki, J., Takai, T., and Nukiwa, T.: Increased susceptibility to LPS-induced endotoxin shock in secretory leukoprotease inhibitor (SLPI)-deficient mice. *J. Exp. Med.* 197: 669-674, 2003.
 - 14) Williams, S. E., Brown, T. I., Roghanian, A., and Sallenave, J. M.: SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin. Sci(Lond)*. 110: 21-35, 2006.
 - 15) Tjabringa, G. S., Vos, J. B., Olthuis, D., Ninaber, D. K., Rabe, K. F., Schalkwijk, J., Hiemstra, P. S., and Zeeuwen P. L.: Host defense effector molecules in mucosal secretion. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 45: 151-158, 2005.
 - 16) Into, T., Inomata, T., Kanno, Y., Matsuyama, T., Machigashira, M., Izumi, Y., Imamura, T., Nakashima, M., Noguchi, T., and Matsushita, K.: Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leukocyte protease inhibitor in periodontal tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 145: 545-554, 2006.
 - 17) Chattopadhyay, A., Gray, L. R., Patton, L. L., Caplan, D. J., Slade, G. D., Tien, H. C., and Shugars, D. C.: Salivary secretory leukocyte protease inhibitor and oral candidiasis in human immunodeficiency virus type 1-infected persons. *Infect. Immun.* 72: 1956-1963, 2004.
 - 18) Jane, N.K., Gray, L. R., and Shugars, D. C.: Human immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: Role for SLPI in innate mucosal immunity. *J. Virol.* 79: 6432-6440, 2005.
 - 19) Westin, U., Nystrom, M., Ljungcrantz, I., Eriksson, B., and Ohlsson, K.: The presence of elafin, SLPI, IL1-RA and STNFalpha RI in head and neck squamous cell carcinomas and their relation to the degree of tumour differentiation. *Med. Inflamm.* 11: 7-12, 2002.
 - 20) Hamada, S., Fujiwara, T., Morishima, S., Takahashi, I., Nakagawa, I., Kimura, S., and Ogawa, T.: Molecular and immunological characterization of the fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Immunol.* 38: 921-930, 1994.
 - 21) Takemura, A., Matsuda, N., Kimura, S., Fujiwara, T., Nakagawa, I., and Hamada, S.: *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide modulates the responsiveness of human periodontal ligament fibroblasts to platelet-derived growth factor. *J. Periodontol. Res.* 33: 400-407, 1998.
 - 22) Hatakeyama, S., Ohara-Nemoto, Y., Yanai, N., Obinata, M., Hayashi, S., and Satoh, M.: Establishment of gingival epithelial cell lines from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. *J. Oral Pathol. Med.* 30: 296-304, 2001.
 - 23) Kimura, S., Tamamura, T., Nakagawa, I., Koga, T., Fujiwara, T., and Hamada, S.: CD14-dependent and independent pathways in lipopolysaccharide-induced activation of a murine B-cell line, CH12. LX. *Scand. J. Immunol.* 51: 392-399, 2000.
 - 24) Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S., and Nemoto, T. K.: Homologous and heterologous expression and maturation processing of extracellular glutamyl endopeptidase of *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.* 389: 1209-1217, 2008.
 - 25) 根本 優子.: 平成 12 年度～平成 13 年度文部科学省科学研究費 基盤研究 (C) (2) 研究成果報告書.
 - 26) Pike, R., McGraw, W., Potempa, J., and Travis, J.: Lysine- and arginine-specific proteases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J. Biol. Chem.* 269: 406-411, 1994.
 - 27) Kimura, S., Yonemura, T., Hiraga, H., and Okada, H.: Flow cytometric evaluation of phagocytosis by peripheral blood polymorphonuclear leukocyte in human periodontal diseases. *Arch. Oral Biol.* 37: 495-501, 1992.
 - 28) Cimasoni, G.: Crevicular Fluid Updated. In Monographs in Oral Science (Myers, H.M. ed.), Karger, Basel, pp.1-145, 1983.
 - 29) Sallenave, J. M.: The role of secretory leukocyte proteinase inhibitor and elafin (elastase-specific inhibitor/skin-derived antileukoprotease) as alarm antiproteases in inflammatory lung disease. *Respir. Res.* 1: 87-92, 2000.
 - 30) Kontani, M., Kimura, S., Nakagawa, I., and Hamada, S.: Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to matrix proteins via a fimbrial cryptic receptor exposed by its own arginine-specific protease. *Mol. Microbiol.* 24: 1179-1187, 1997.