

原 著

***Porphyromonas gingivalis* システインプロテアーゼ (ジンジパイン) によるヒト歯肉線維芽細胞の CD14 分解と LPS 低応答性**

多 田 浩 之

東北大学大学院歯学研究科 口腔機能再建材料学講座 歯内・歯周療法学分野
(主任: 島内英俊教授)

Cleavage of CD14 on Human Gingival Fibroblasts by Cysteine Proteinases (Gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* Leads to Lipopolysaccharide Hyporesponsiveness

Hiroyuki Tada

*Division of Periodontics and Endodontics, Department of Oral Rehabilitation and Materials Science,
Tohoku University Graduate School of Dentistry
(Director: Prof. Hidetoshi Shimauchi)*

Abstract: *Porphyromonas gingivalis* is a major cause of adult periodontitis. To determine the effect of this pathogen on innate immunity in periodontal tissue, we examined the effect of cell-free culture supernatants of *P. gingivalis* W83 and ATCC 33277 on the expression of CD14, a pattern recognition receptor for many bacterial components, on human gingival fibroblasts (HGF). CD14 expression was assessed by flow cytometry. We found that the supernatants markedly reduced the CD14 expression in a dose-dependent manner. Studies using various proteinase inhibitors showed that decreased expression was caused mainly by arginine-specific cysteine proteinases, gingipains-R (Rgps). Analysis with purified gingipains revealed that a high molecular weight form of Rgp (HRgpA) efficiently reduced CD14 on HGF in time- and dose-dependent manners, with nearly complete elimination at 0.3 μ M HRgpA for 30 min. Other molecules, including Toll-like receptor 4, were only slightly affected. Immunoblot analysis showed that this reduction in CD14 resulted from direct proteolysis. Furthermore, interleukin-8 production by HGF after HRgpA treatment was suppressed when triggered by 10 ng/ml of lipopolysaccharide but not by phorbol myristate acetate, indicating that Rgps inhibited CD14-dependent cell activation. These findings suggest that Rgps preferentially cleave CD14 on HGF and are involved in immune evasion by bacteria in periodontal tissue.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, gingipains, CD14, human gingival fibroblast, LPS

内容要旨: *Porphyromonas gingivalis* は、成人性歯周炎の発症に係わる主要な病原菌と目されている。本研究では、歯周組織における自然免疫機構と同菌の産生するシステインプロテアーゼ (ジンジパイン) の関わりについて、種々の菌体成分のパターン認識レセプターである CD14 に着目して検討した。まず、*P. gingivalis* W83 と ATCC 33277 の培養上清でヒト歯肉線維芽細胞を処理し、同細胞の CD14 分子発現をフローサイトメトリーで測定したところ、濃度依存的に CD14 分子発現は減少した。各種プロテアーゼインヒビターで阻害実験を行ったところ、主としてジンジパイン-R (Rgps) が同作用を担っていることが明らかとなった。さらに、3 種の精製ジンジパインをヒト歯肉線維芽細胞に作用させると、高分子量型の Rgp (HRgpA) が最も強力に CD14 分子発現を減少させた。すなわち、0.3 μ M HRgpA で 30 分間処理することにより CD14 分子はほぼ完全に消失した。一方、Toll-like receptor 4 を含む他の抗原の発現には変化はみられなかった。細胞膜画分を供試した成績から、ジンジパインは CD14 をタンパク分解していることが示唆された。さらに HRgpA で処理したヒト歯肉線維芽細胞は、CD14 依存的な細胞応答を喪失し、内毒素性リポ多糖刺激に応じた IL-8 産生が著しく抑制された。これらの成績は、*P. gingivalis* のジンジパインがヒト歯肉線維芽細胞の CD14 を特異的に分解して、CD14 依存的免疫応答を喪失させることによって、同菌が宿主の自然免疫機構をエスケープする可能性を提示している。

緒 言

Porphyromonas gingivalis は成人性歯周炎の主要な原因菌の一つであり^{1,2)}, LPS, 菌体線毛, プロテアーゼ等, 多くのビルレンスファクターを有し, 直接的または間接的に宿主細胞を活性化させることにより, 炎症病巣の形成に関与している³⁾。

P. gingivalis はトリプシン様活性を示す 2 種類のシステインプロテアーゼであるジンジパインを産生する⁴⁾。すなわち, Arg-X を切断するジンジパイン-R (Rgp) と Lys-X を切断するジンジパイン-K (Kgp) である^{5,6)}。Rgp には 95 kDa の HRgpA と 50 kDa の RgpB が存在し, HRgpA と Kgp (105 kDa) は, 触媒ドメインと赤血球凝集/接着活性ドメインが非共有結合した複合体である。ジンジパインは, カリクレイン・キニン系の活性化による血管透過性の亢進^{7,8)}, 血液凝固系の制御因子酵素の活性化による線維素溶解系の亢進⁹⁻¹⁴⁾, 宿主細胞表面抗原の分解・修飾¹⁵⁻¹⁹⁾ など多彩な生物活性を示す。ジンジパインは, また *P. gingivalis* の線毛発現に際して構成タンパク fimbriin のプロセッシングに必須である²⁰⁾。

CD14 は 55-kDa の glycosylphosphatidylinositol (GPI)-アンカー型膜タンパクであり, LPS を始めとする様々な菌体表層成分を認識するパターン認識レセプターとして機能する^{21,22)}。CD14 はシグナル伝達を担う細胞質内ドメインを欠いている²³⁾ので, それ自身ではシグナル伝達はできない²⁴⁾。近年, Toll-like receptor (TLR) が菌体成分のシグナル伝達を担うことが次々と明らかにされている^{25,26)}。LPS によるシグナル伝達には, TLR4²⁷⁻²⁹⁾ に加えて, MD-2 が必要である^{30,31)}。CD14 は単球・マクロファージに強く^{32,33)}, 好中球にも弱く発現する³⁴⁾。近年, ヒト歯肉線維芽細胞にも CD14 を発現する細胞が存在することが報告された³⁵⁻³⁷⁾。

Sugawara ら¹⁸⁾ は, 精製ジンジパインが, ヒト単球に発現する CD14 を特異的に分解して, LPS 応答を抑制することを報告した。歯周炎は歯周組織の炎症を主徴とし, 歯周組織を構成する主要な細胞である線維芽細胞は, 支持細胞として機能するばかりでなく, 種々のサイトカインを産生することにより積極的に生体防御に関与することが示唆されている³⁸⁾。実際, 歯肉線維芽細胞は, CD14 依存的に LPS に応答して, interleukin-8 (IL-8)³⁵⁾ や monocyte chemoattractant protein-1³⁶⁾ を産生することが報告されている。しかしながら, ヒト歯肉線維芽細胞 CD14 に及ぼすジンジパインの影響については明らかにされていない。

そこで本研究では, まず *P. gingivalis* 培養上清中にヒト歯肉線維芽細胞 CD14 のタンパク分解活性が存在すること, さらにこの現象にはジンジパインが関与することを明らかにし, 次いで精製ジンジパインが LPS 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞からの IL-8 産生に及ぼす影響を解明しようとした。

材料と方法

1) 試薬

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), エチレンジアミン四酢酸 (EDTA), 1, 10-phenanthroline, pepstatin A, *Escherichia coli* O55: B5 LPS, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ならびに *N*- α -benzyloxycarbonyl-L-Arg-p-nitroanilide (BAPNA) は, Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) より, 低毒性セリンプロテアーゼインヒビターの Pefabloc SC は, Roche Diagnostics 社 (Mannheim, Germany) より, alpha modified Eagle's medium (α -MEM) 培養液と 0.25%トリプシン/1 mM EDTA は, Life Technologies 社 (Rockville, MD, USA) より, Phe-Pro-Arg-chloromethyl ketone (FPR-cmk), benzyloxycarbonyl-Phe-Lys-cholomethyl ketone (Z-FK-cmk) と *N*- α -benzyloxycarbonyl-L-Lys-p-nitroanilide (Z-Lys-pNA) は, Bachem 社 (Bubendorf, Switzerland) より, Phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) は, Molecular Probes 社 (Eugene, OR, USA) より, それぞれ購入した。抗 CD14 モノクローナル抗体 (MAb) MEM-18 (mouse immunoglobulin G1 [IgG1]) は, Monosan 社 (Uden, The Netherlands) より, 抗 CD14 MAb MY4 (mouse IgG2b), 抗 CD157 MAb RF3 (mouse IgG1) とアイソタイプコントロール抗体は, Immunotech 社 (Marseille, France) より, 抗 CD40 MAb EA-5 (mouse IgG1) は, BioSource International 社 (Camarillo, CA, USA) より, 蛍光イソチオシアネート (FITC) を標識した抗主要組織適合複合体 (MHC) クラス I G46-2.6 (mouse IgG1) と抗 CD59 FITC p282 (mouse IgG2a) は, PharMingen 社 (San Diego, CA, USA) よりそれぞれ購入した。抗ヒト TLR4 MAb HTA1216 (mouse IgG1) は, 三宅健介教授 (東京大学医科学研究所)³¹⁾ より分与を受けた。その他の試薬は Sigma 社より入手した。

2) *P. gingivalis* 培養上清の採取

P. gingivalis ATCC 33277 株および W83 株は, 1% トリプトン (Difco, Detroit, MI, USA), 1% プロテオースペプトン (Difco), 0.5% 酵母エキス (Difco), 0.5% NaCl, ヘミン (5 μ g/ml), メナジオン (0.5 μ g/ml) および 38 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を添加した BM 培養液³⁹⁾ で, 嫌気性培養器 (N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%, NHC-type, ヒラサワ, 東京) にて 37°C で培養した。培養 96 時間後に培養液を遠心分離 (6,000 \times g, 30 分間, 4°C) し, 上清を回収して 0.45 μ m のフィルターにて濾過滅菌後, 実験に供試した。培養上清の酵素活性の抑制には, 各種プロテアーゼインヒビターを添加して室温にて 10 分間前処理することにより行った。

3) 酵素活性の測定

P. gingivalis 培養上清の酵素活性は, Rgp の基質である BAPNA 0.5 mM あるいは Kgp の基質である Z-Lys-pNA 0.5

mM を 0.2 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 5 mM CaCl₂, および 10 mM cysteine を含むバッファー (pH 7.6) 1.0 ml 中に上清を加えて 37°C で 1 時間反応させて測定した⁴⁰⁾。基質から放出された pNA 量を吸光度 405 nm で測定し, 37°C にて 1 時間に放出された pNA が 1 μmol となる活性を 1 ユニットとした。

4) 精製ジンジパインおよび活性化

3 種類の精製ジンジパイン, HRgpA, RgpB および Kgp は, *P. gingivalis* HG66 の培養上清から Pike らの記載⁶⁾に従って調製したものを, 今村隆寿博士 (熊本大学大学院医学研究科) より分与を受けた。精製ジンジパインは, 各々 10 μM を 0.2 M HEPES-5 mM CaCl₂-10 mM システイン (pH 8.0) に溶解し, 37°C, 10 分間インキュベートすることにより活性化させた後に実験に供試した。ジンジパインの酵素活性を抑制する実験では, FPR-cmk, Z-FK-cmk あるいはヒト血清を加えて室温で 10 分間前処理した。

5) ヒト歯肉線維芽細胞の培養

ヒト歯肉線維芽細胞は, 東北大学歯学研究科研究倫理委員会の承認を得て, インフォームドコンセントにより同意を得た成人患者の健全歯肉より Sugawara ら³⁵⁾の記載に準じて分離, 培養した。組織片は, 10% FCS 添加 α-MEM 培養液を入れた 100 mm の組織培養ディッシュ (Falcon; Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA) 中に静置し, 3 日おきに培養液を交換して, 10~15 日経過後にコンフルエント単層培養を得た。継代にあたり, 細胞は 0.25% トリプシン/1 mM EDTA 処理を行って回収後, リン酸緩衝食水 (PBS) にて洗浄した。フローサイトメトリーによる解析には, 10% FCS 添加 α-MEM 培養液で直径 100 mm の培養液 (Falcon) にて培養し, 6~9 代の継代を行いコンフルエントになった後 4 日経過した細胞を供試した。なお, 細胞の *P. gingivalis* 培養上清ないし精製ジンジパインによる処理は, トリプシンにて細胞を剥離した後, 加温した培養液で 3 回洗浄し, 10⁵ cells/25 μl, 37°C の条件で行った。

6) フローサイトメトリー

細胞膜表面上に発現する MHC クラス I と CD59 の染色は, FITC を標識したマウス IgG 抗体を 4°C, 20 分間反応させることにより行った。CD14, TLR4, CD40 および CD157 の染色には, それぞれの抗体で 4°C, 20 分間処理した後, さらに FITC 標識抗マウス IgG 抗体 (BioSource International) を 4°C, 20 分間反応させた。染色後, 細胞を PBS にて洗浄し, フローサイトメーター (FACScan; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) にて解析した。成績は, 平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity; MFI) または発現率 (%) (*P. gingivalis* 培養上清またはジンジパイン処理細胞の各種膜抗原の MFI - *P. gingivalis* 培養上清またはジンジパイン処理細胞のコントロール抗体による MFI) / (*P. gingivalis* またはジンジパイン未

処理細胞の各種膜抗原の MFI - *P. gingivalis* 培養上清またはジンジパイン未処理細胞のコントロール抗体による MFI) × 100 (%) にて表記した。

7) 細胞膜の分離

細胞膜画分の分離には, ヒト歯肉線維芽細胞を hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 と 1 mM MgCl₂ の混液) に浮遊し, 水中にて 30 分間静置後, Dounce ホモゲナイザーで 15 回ホモゲナイズし, 0.25 M スクロースを加えた。懸濁液を遠心 (15,000 × g, 30 分間, 4°C) することにより, 細胞膜画分を分離した後に, PBS で希釈して実験に供した。

8) ウェスタンブロッティングによる CD14 タンパクの発現の検討

ヒト歯肉線維芽細胞より分離した細胞膜をそれぞれ 0.3 μM HRgpA, 20% *P. gingivalis* (W83 または ATCC 33277) 培養上清, または 5 U/ml PI-PLC を含む PBS 100 μl にて 37°C, 1 時間処理した。処理後, 遠心 (15,000 × g, 30 分間, 4°C) により細胞膜と上清に分画し, 上清はさらに真空乾燥した。その後, それぞれを Laemmli サンプルバッファー 20 μl に溶解, 10% ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行い, 分離したタンパクを polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (ATTO, 東京) に転写した。PVDF 膜は 3% ウシ血清アルブミン (BSA)/PBS 中で室温, 2 時間ブロッキングした後, ヒツジ抗ヒト CD14 ポリクローナル抗体 (Genzyme/Techne, Minneapolis, MN, USA) を加え 4°C で一夜処理した。その後, PBS にて 4 回洗浄し, 1:2,000 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ロバ抗ヒツジ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) を室温で 2 時間反応させた。CD14 タンパクの発現はジアミノベンチジンにて可視化した。得られたタンパクのバンドの分子量は, タンパクマーカー (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) と比較して評価した。

9) ジンジパイン処理後の CD14 分子の再発現

ヒト歯肉線維芽細胞 (10⁵ cells) を血清非存在下に 0.3 μM HRgpA (25 μl) で 37°C, 30 分間処理した。細胞は加温した培養液にて 3 回洗浄し, 10% FCS 添加 α-MEM 培養液にて浮遊した後に, 24 穴培養プレート (Falcon) 中で 37°C にて培養した。培養終了後, CD14 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

10) IL-8 の測定

ヒト歯肉線維芽細胞 (2 × 10⁴ cells) を, MATRIGEL Matrix (ラムニン, タイプ IV コラーゲン, ヘパラン硫酸, プロテオグリカンならびにエンタクチンを含む) コーティング 96 穴平底培養プレート (Falcon) に入れた 10% FCS 添加 α-MEM 培養液中で, コンフルエント後さらに 4 日間培養した。細胞を加温

した培養液で3回洗浄後、血清非存在下にて0.3 μ M HRgpAで37°C, 30分間処理した。その後、加温した培養液で3回洗浄し、刺激物質と共に1% FCS添加 α -MEM 培養液中で細胞を4時間培養した。中和抗体による抑制実験を行う場合には、ヒト歯肉線維芽細胞を10 μ g/mlの抗CD14 MAb (MY4) または10 μ g/mlのコントロールIgG2b抗体で37°C, 30分間前処理した後、同様に刺激を行った。刺激後4時間目に、それぞれの上清を回収し、IL-8産生量を酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)キット(Opt EIA; PharMingen)を用いて測定した。IL-8量はSoftmaxデータ解析プログラム(Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA)にて、標準IL-8タンパクと比較定量することにより濃度を求めた。

11) 統計処理

全ての実験は3回以上繰り返して実施した。それぞれの試料における測定値の平均と標準偏差(SD)を算出し、Bonferroni/Dunn法により多重比較検定(ANOVA)を行い、 p 値が0.05未満を有意と判定した。

結 果

1) *P. gingivalis* 培養上清によるヒト歯肉線維芽細胞のCD14喪失

はじめに*P. gingivalis* ATCC 33277株およびW83株の培養上清がヒト歯肉線維芽細胞のCD14分子発現におよぼす影響について、フローサイトメトリーにより検討した。ヒト歯肉線維芽細胞を*P. gingivalis* 培養上清で30分間血清非存在下で処理することにより、培養上清濃度1%以上で、ヒト歯肉線維芽細胞のCD14分子発現は統計学的に有意に減少し($p < 0.01$)、上清20%ではほぼ完全に消失した(図1A)。CD14分子の減少の程度は*P. gingivalis* W83上清の方が、*P. gingivalis* ATCC 33277上清に比べて高かった。図1Bは*P. gingivalis* W83の20%培養上清を30分間処理した時のフローサイトメトリー分析の成績である。

2) *P. gingivalis* 培養上清によるヒト歯肉線維芽細胞のCD14喪失に対する各種プロテアーゼインヒビターの影響

*P. gingivalis*は種々のプロテアーゼを産生する⁴¹⁾ので、*P. gingivalis* 培養上清によるヒト歯肉線維芽細胞CD14分子発現の減少がいかなるプロテアーゼにより惹起されているかについて、各種プロテアーゼインヒビターを用いて検討した。その結果、Rgp特異的インヒビターFPR-cmk (1 μ Mないし10 μ M)は、*P. gingivalis* W83培養上清(20%)によるCD14喪失作用はほぼ完全に抑制した(表1)。Kgp特異的インヒビターZ-FK-cmkも、弱いながら抑制効果を示した。しかしながら、セリンプロテアーゼインヒビター(PMSFおよび低毒性アナログPefabloc SC)、メタロプロテアーゼインヒビター

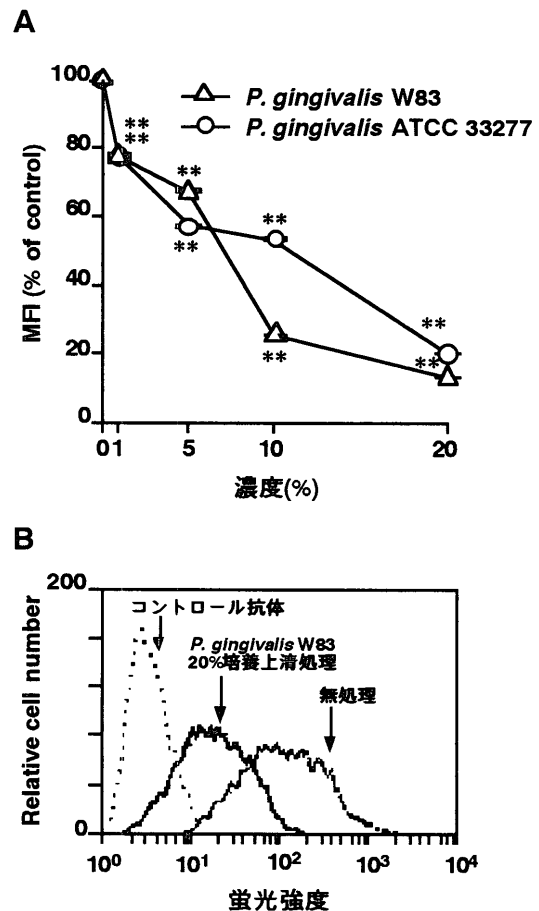


図1 *P. gingivalis* 培養上清で処理したヒト歯肉線維芽細胞のCD14分子発現減少

(A) ヒト歯肉線維芽細胞を*P. gingivalis* W83あるいはATCC 33277の培養上清(1~20%)で37°C, 30分間処理した。処理後、細胞をPBSで洗浄してMEM-18およびアイソタイプMAbで染色し、フローサイトメトリーにて解析した。同様の実験を3回(各3通り)繰り返して行い、MFI(% of control)の平均値で示した。**, $p < 0.01$ [対未処理(培地のみ)対照]。(B) *P. gingivalis* W83の培養上清(20%)を30分間処理したヒト歯肉線維芽細胞のCD14分子発現の変化。

(EDTAおよび1,10-phenanthroline),ならびにアスパラギン酸プロテアーゼインヒビター(pepstatin A)は、全く抑制効果を示さなかった。

次に、*P. gingivalis* 培養上清によるCD14喪失作用が*P. gingivalis*から産生されたジンジパインによるものであることを確認するために、Rgpの基質(BAPNA)およびKgpの基質(Z-Lys-pNA)を用いて、上清中のジンジパインの酵素活性を測定した。その結果、W83およびATCC 33277の培養上清100 ml中にそれぞれRgpが27.0 Uおよび23.9 U、Kgpがそれぞれ9.5 Uおよび6.8 U含まれていた。さらにRgpとKgpの酵素活性は、それぞれのインヒビターであるFPR-cmk(図2A)とZ-FK-cmk(図2B)によりほぼ完全に抑制された。これらの成績より*P. gingivalis* 培養上清中のジンジパイン、特にRgpsがヒト歯肉線維芽細胞のCD14を分解していることが示唆さ

表1 *P. gingivalis* 培養上清によるヒト歯肉線維芽細胞の CD14 喪失に対する各種プロテアーゼインヒビターの影響

インヒビター	濃度	Binding of MEM-18 (%)	% Inhibition
-	-	9.6±0.1	
FPR-cmk	1 μM	86.0±0.1	84.7
	10 μM	92.7±0.7	91.4
Z-FK-cmk	1 μM	12.3±1.5	11.2
	10 μM	24.9±2.9	24.0
PMSF	1 mM	5.5±0.1	0
Pefabloc SC	1 mM	10.5±0.6	0.5
EDTA	1 mM	7.8±0.1	0
1,10-Phenanthroline	1 mM	2.1±0.6	0
Pepstatin A	1 μM	10.6±0.1	1.1

P. gingivalis W83 培養上清 (20%) に各種プロテアーゼインヒビターを加えて室温にて10分間前処理した後、ヒト歯肉線維芽細胞に37°C、30分間作用させた。その後、細胞をフローサイトメトリーにより解析した。成績は未処理(培地のみ)のヒト歯肉線維芽細胞 CD14 の MFI に対する百分率により、% binding および% inhibition で表示した。

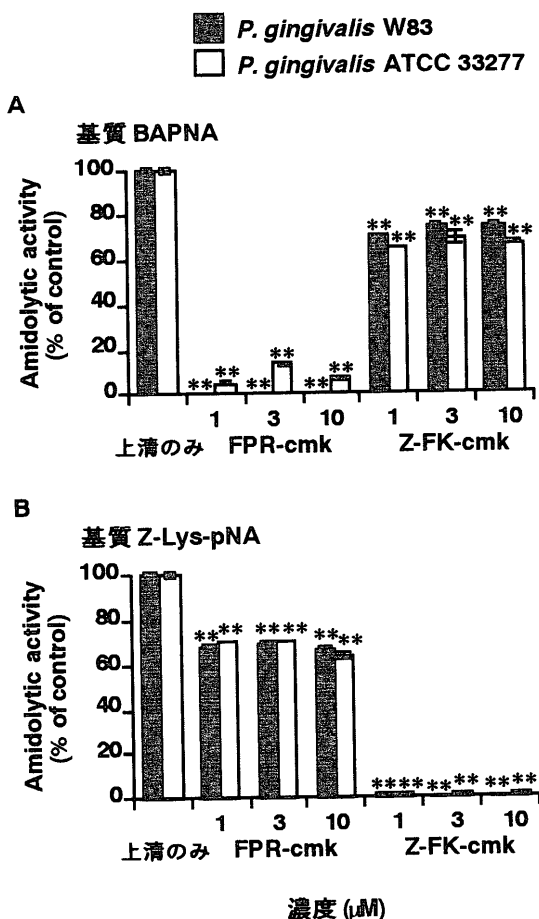


図2 *P. gingivalis* 培養上清の CD14 消失作用に対するジンジパイン特異的インヒビターの影響
P. gingivalis W83 および ATCC 33277 の培養上清を FPR-cmk あるいは Z-FK-cmk で室温にて10分間前処理した後、上清中の amidolytic activity を BAPNA (A) および Z-Lys-pNA (B) を基質として測定した。データは、培養上清のみの amidolytic activity に対する % of control で示した。**, $p < 0.01$ (対培養上清単独)。

れた。

3) 精製ジンジパインによるヒト歯肉線維芽細胞 CD14 の分解

次に、精製ジンジパイン (HRgpA, RgpB, および Kgp) を供試して、ヒト歯肉線維芽細胞の CD14 発現への影響について検討した。0.03~0.3 μM の HRgpA あるいは RgpB で120分まで処理すると、ヒト歯肉線維芽細胞の CD14 分子発現は経時的に、また濃度依存的に減少した ($p < 0.01$) (図3)。HRgpA, RgpB ともに 0.3 μM で60分、あるいは 0.1 μM で120分処理することにより CD14 発現はほぼ完全に消失した。一方、Kgp の CD14 喪失作用は弱かった。これらの成績から、Rgp が Kgp より高い CD14 分解活性を有していることが示唆された。さらに Rgp の酵素活性によって CD14 を減少させていることを確認するために、Rgp 特異的インヒビターである FPR-cmk を供試したところ、10倍濃度のインヒビターにより HRgpA の CD14 喪失作用は抑制された(表2)。それに対して Kgp 特異的インヒビターである Z-FK-cmk は同作用をわずかしか抑制しなかった。

4) Rgp および *P. gingivalis* 培養上清によるヒト歯肉線維芽細胞 CD14 の分解

ヒト歯肉線維芽細胞の CD14 分子発現抑制がジンジパインの酵素活性によるタンパク分解である可能性をさらに検討するため、細胞より細胞膜を分離して *P. gingivalis* 培養上清あるいは精製した HRgpA で処理し、その細胞膜あるいは上清中に存在する CD14 タンパクをウェスタンブロットにて検出した。細胞表面上の GPI アンカーを特異的に切断する酵素²³⁾を、陽性対照として供試した。未処理細胞膜には 55-kDa の CD14 のバンドが強く検出された(レーン1)(図4)。PI-PLC 処理細胞膜は CD14 のバンドが弱くなり(レーン5)、HRgpA あるいは

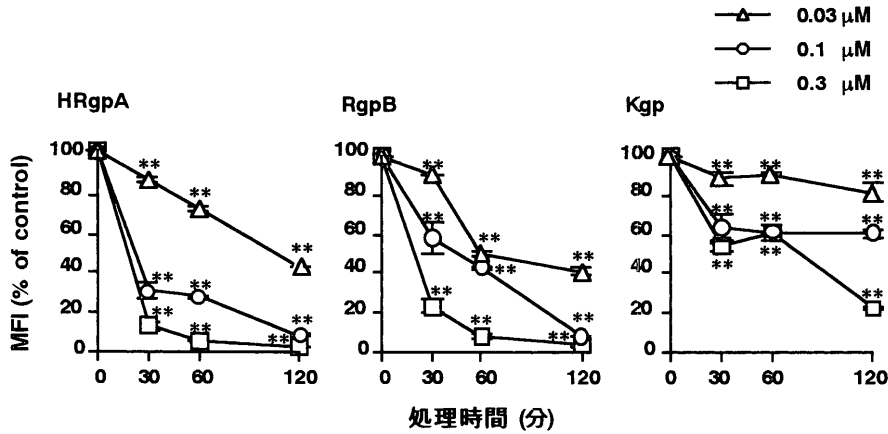


図3 精製ジンジパイン処理したヒト歯肉線維芽細胞 CD14 分子発現減少
ヒト歯肉線維芽細胞を HRgpA, RgpB あるいは Kgp で 37°C にて所定時間処理した。処理後、細胞を PBS で洗浄して MEM-18 あるいはアイソタイプ MAb で染色し、フローサイトメトリーにて解析した。同様の実験を 3 回 (各 3 通り) 繰り返して行い、典型的なデータを MFI (% of control) の平均値で示した。**, $p < 0.01$ [対未処理 (培地のみ) 対照]。

表2 HRgpA によるヒト歯肉線維芽細胞の CD14 喪失に対するジンジパインインヒビターの影響

インヒビター	濃度 (μM)	Binding of MEM-18 (%)	% Inhibition
-	-	25.7±0.2	
FPR-cmk	3	97.6±0.4	96.7
Z-FK-cmk	3	43.7±4.6	24.5

HRgpA (0.3 μM) にジンジパイン特異的インヒビターを加えて室温にて 10 分間前処理した後、ヒト歯肉線維芽細胞に 37°C, 30 分間作用させた。その後、細胞をフローサイトメトリーにより解析した。成績は未処理のヒト歯肉線維芽細胞 CD14 の MFI に対する百分率により、% binding および % inhibition で表示した。

P. gingivalis W83, ATCC 33277 の培養上清 (20%) で処理することにより、バンドは完全に消失した (レーン 2~4)。これらの上清サンプルでは PI-PLC 処理の場合のみ 55- kDa の CD14 のバンドが明確に検出された (レーン 10) が、HRgpA あるいは *P. gingivalis* 培養上清で処理した上清中にバンドは全く検出されなかった (レーン 7~9)。これらの成績から、CD14 喪失作用はジンジパインによる直接的なタンパク分解によるものであり、CD14 タンパクは抗 CD14 ポリクローナル抗体では検出できなくなる程度の低分子量の断片に分解されることが示唆された。

5) ヒト歯肉線維芽細胞に発現する各種抗原への Rgp の影響

次に HRgpA がヒト歯肉線維芽細胞に発現する他の抗原へどのような影響を及ぼすかについて検討した。HRgpA (0.3 μM) 処理によりヒト歯肉線維芽細胞上の CD14 は分解されるが、TLR4, CD40, CD59, CD157 および MHC class I の発現はほとんど変化しなかった (図 5)。また、HRgpA (0.3 μM) 処理により細胞膜上から消失した CD14 分子は徐々に回復し、48 時間後には無処理細胞の CD14 分子発現の 80% 以上にまで回復した (図 5B)。

6) HRgpA による LPS 刺激ヒト歯肉線維芽細胞からの IL-8 産生の抑制

Rgps によるヒト歯肉線維芽細胞の CD14 分子分解が、同細胞の LPS 応答に及ぼす影響を IL-8 産生を指標として検討した。ヒト歯肉線維芽細胞を 0.3 μM HRgpA で 30 分間処理すると、LPS (10 ng/ml) 刺激により産生される IL-8 量は有意に減少した (図 6)。しかし、HRgpA (0.3 μM) を 3 μM FPR-cmk で室温にて 10 分間前処理してから供試すると、IL-8 産生は無処理細胞と同レベルに回復した。また、抗 CD14 MAb (MY4) で同様に前処理すると、LPS によるヒト歯肉線維芽細胞からの IL-8 産生は完全に抑制されたが、アイソタイプコントロール抗体では、非特異的な抑制しかみられなかった。CD14 非依存的な刺激物質である PMA で刺激した実験では、いずれの処理においても IL-8 産生に全く変化はみられなかった (図 6)。以上の成績から Rgp はヒト歯肉線維芽細胞の LPS 刺激に対する CD14 依存的な応答を抑制することが明らかとなった。

考 察

本研究の成績より、*P. gingivalis* の培養上清中にはヒト歯肉線維芽細胞の CD14 分子発現を減少させる活性があり、同活性

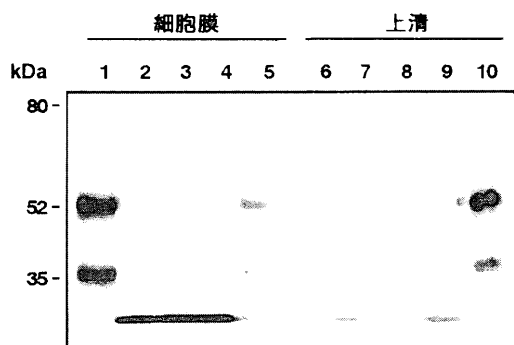


図4 HRgpA と *P. gingivalis* 培養上清によるヒト歯肉線維芽細胞 CD14 の分解

ヒト歯肉線維芽細胞から分離した細胞膜を未処理対照 (レーン 1, 6), HRgpA (0.3 μ M) (レーン 2, 7), *P. gingivalis* W83 培養上清 (20%) (レーン 3, 8), ATCC 33277 培養上清 (20%) (レーン 4, 9) あるいは PI-PLC (5 U/ml) (レーン 5, 10) でそれぞれ 37°C, 1 時間処理し, 遠心により細胞膜 (レーン 1~5) と上清 (レーン 6~10) に分画した。全ての試料は Laemli sample buffer にて可溶化し, 10% SDS-PAGE を実施した後, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。さらに, PVDF 膜を抗 CD14 ポリクローナル抗体にて染色した。分子量マーカーを図の左に示した。同様の実験を 3 回繰り返して行い, 典型的なデータを示した。

はジンジパイン特異的インヒビターとセリン, アスパラギン酸およびメタロプロテアーゼ特異的インヒビターを供試した成績より, 主として Rgps に起因することが明らかとなった。さらに, 精製ジンジパインを供試した実験によって, この CD14 分子発現の減少はジンジパインのタンパク分解作用によること, その結果として LPS 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞からの IL-8 産生応答が低下することが示された。

ジンジパインは遊離型, vesicle 型あるいは膜結合型として存在し, さらに細胞質中にも存在することが知られている⁴⁰⁾。Potempa らは, *P. gingivalis* ATCC 33277 および W83 株は培養上清中に遊離型と vesicle 型のジンジパインを産生すること, Rgp は Kgp の約 3 倍の酵素活性が認められたと報告している⁴⁰⁾。今回の成績でも, 培養上清中のジンジパインのうちで, Rgp が, Kgp よりも CD14 分解活性に大きく寄与していた (表 1)。さらに, 精製ジンジパインを供試した実験においても, Rgps が Kgp より高い CD14 分解活性を示した (図 3)。HRgpA は RgpB と異なり, 赤血球凝集/接着活性ドメインを有している。同ドメインはフィブリノーゲン, フィブロネクチンおよびラミニンに結合し⁴¹⁾, 細胞膜の磷脂質を Ca^{2+} 依存的に活性化する¹³⁾。従って, HRgpA は RgpB に比べて細胞表面に対する接着能が高いため, 効果的に酵素活性を発揮することにより, より強力な CD14 分解活性を示したと考えられる。

ヒト単球は LPS, インターフェロン- γ , PMA あるいはカルシウムイオンにより活性化されると, CD14 を細胞外に遊離するとの報告がある⁴²⁾。ジンジパインもまた, protease-activated receptors を介して血小板や口腔上皮細胞を活性化させる^{16,17)}。しかしながら, 本研究でヒト歯肉線維芽細胞から調製

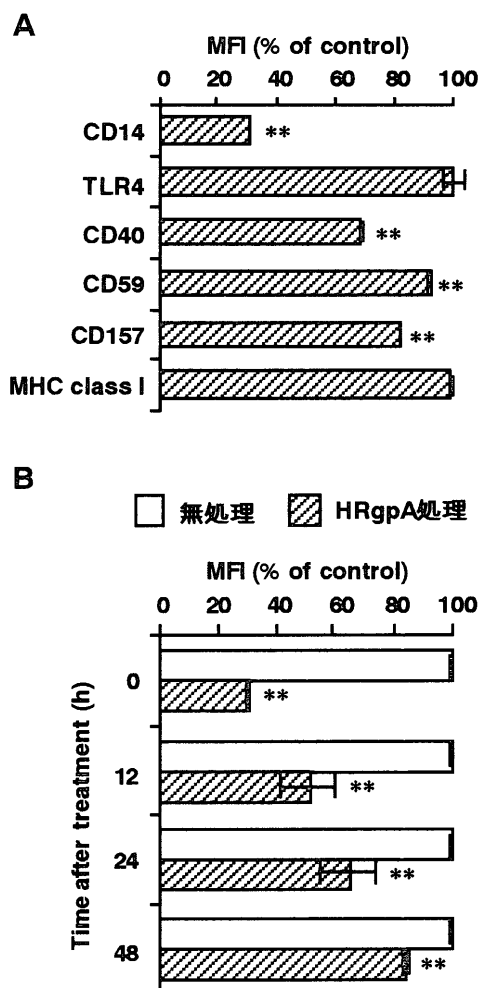


図5 HRgpA によるヒト歯肉線維芽細胞 CD14 の特異的分解と HRgpA 処理後の CD14 の再発現

ヒト歯肉線維芽細胞を HRgpA (0.3 μ M) で 37°C, 30 分間処理した。(A) CD14, TLR4, CD40, CD59, CD157 および MHC class I の発現をフローサイトメトリーにて解析した。同様の実験を 3 回 (各 3 通り) 繰り返して行い, 典型的なデータを MFI (% of control) の平均値で示した。**, $p < 0.01$ (対未処理細胞)。(B) HRgpA 処理後, 細胞を培養液にて 3 回洗浄し, 10% FCS 添加 α -MEM 培養液中で再び培養した。所定の培養時間後, トリプシン処理により細胞を回収し, MEM-18 で染色を行い, フローサイトメトリーにて解析した。データは MFI (% of control) で示した。同様の実験を 3 回 (各 3 通り) 繰り返して行い, 典型的なデータを示した。**, $p < 0.01$ [対未処理 (培地のみ) 対照]。

した細胞膜画分を *P. gingivalis* 培養上清ないし HRgpA で処理した結果, CD14 が抗 CD14 ポリクローナル抗体では検出できなくなる程度まで分解された (図 4)。以上の成績より, *P. gingivalis* 培養上清によるヒト歯肉線維芽細胞 CD14 減少は, ジンジパインが同細胞を活性化させたことによる CD14 の細胞表面からの分離ではなく, 直接的なタンパク分解作用による現象であり, また, ジンジパインによりタンパク分解された CD14 は遊離型として機能する可能性はないことが示唆された。従って, ジンジパインは CD14 を介した同細胞の活性化を

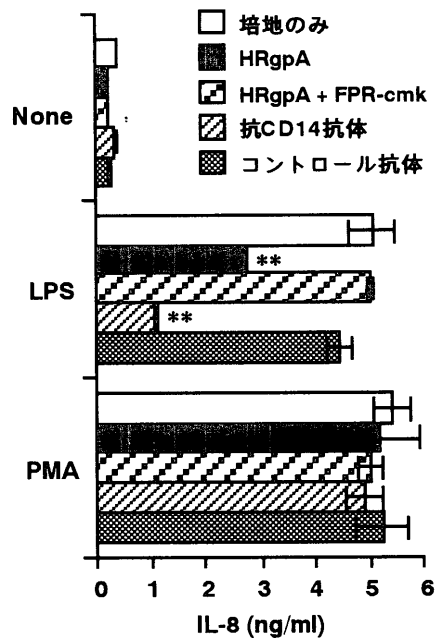


図6 HRgpA 処理したヒト歯肉線維芽細胞の LPS 不応答性
ヒト歯肉線維芽細胞の単層培養細胞に HRgpA (0.3 μ M), MY4 (10 μ g/ml) またはアイソタイプコントロール IgG2b 抗体 (10 μ g/ml) で 37°C, 30 分間処理した後, LPS (10 ng/ml) あるいは PMA (50 ng/ml) を加えて 1% FCS 添加 α -MEM 培養液にて 37°C, 4 時間刺激した。その後, 上清中の IL-8 量を ELISA にて測定した。同様の実験を 3 回 (各 3 通り) 繰り返して行い, その平均値と標準誤差を求めた。**, $p < 0.01$ [対未処理 (培地のみ) 対照]。

広範に抑制する可能性がある。

最近我々は, ヒト好中球由来のセリンプロテアーゼであるエラスターゼ (human leukocyte elastase; HLE) を 680 nM で 1 時間作用させるとヒト歯肉線維芽細胞の CD14 は完全に消失し, 同細胞は LPS に対して不応答性になることを明らかにした⁴⁹⁾。本研究では HRgpA が同程度の CD14 分解を誘導するのに 100 nM が必要であることが示された (図 3)。成人性歯周炎患者の炎症部位の歯肉溝浸出液から同濃度の HRgpA が検出されている (鹿児島大・歯・松下健二博士よりの私信)。また *P. gingivalis* W83 と ATCC 33277 の培養上清中に含まれるジンジパイン量を BAPNA を基質として測定した結果, 約 1.5 μ M HRgpA に匹敵した (データは省略)。ジンジパインは遊離型と同様に, 細胞膜と細胞質にも存在すること⁴⁰⁾ を考慮すると, *P. gingivalis* の近傍におけるジンジパインの局所濃度は歯肉溝浸出液中よりも高い可能性がある。従って, 生体内でジンジパインによりヒト歯肉線維芽細胞の CD14 を介する応答が抑制される可能性は十分に考えられる。

CD14 は GPI アンカー型タンパクであり細胞内ドメインを持たないため, LPS に対するシグナル伝達は TLR4 が担っている^{28,29,30)}。ヒト歯肉線維芽細胞も TLR4 を細胞表面に発現しており, さらに逆転写 PCR 法による検討で mRNA レベルでも発現することが示されている⁴⁹⁾。図 5A に示したように, ヒト歯

肉線維芽細胞に発現する TLR4 などの CD14 以外の分子は HRgpA による影響を受けなかった。我々は以前, HRgpA と Kgp によりヒト単球の細胞表面上の TLR4 発現は変化せず, TLR4 がジンジパイン処理後も同様に機能することを示した¹⁸⁾。以上の成績より, ジンジパイン処理で LPS 刺激ヒト歯肉線維芽細胞からの IL-8 産生が完全に抑制されなかった理由として, LPS が細胞表面に残存する CD14 を介した, あるいは直接に TLR4 を介して同細胞を活性化する可能性が考えられる (図 6)。

同じく GPI アンカー型タンパクで, 広範な細胞に発現する CD59 と CD157^{45,46)} は, CD14 とは異なり Rgp により分解されなかった (図 5A)。従って, Rgp は GPI アンカー型抗原全てを分解するのではなく, CD14 特異的に分解作用を発揮することが示唆される。ジンジパインは炎症性サイトカインである IL-8⁴⁷⁾, 腫瘍壊死因子⁴⁸⁾, IL-6⁴⁹⁾ を分解することにより, 宿主のサイトカインネットワークを攪乱し, *P. gingivalis* が免疫応答をエスケープする可能性が示唆されている。本研究では HRgpA 処理後, 細胞を洗浄してから LPS を刺激しており (図 6), HRgpA による直接の IL-8 分解の可能性はない。IL-8 は主要なケモカインの一つであり, 炎症巣において好中球の活性化と遊走に必須である⁵⁰⁾。ヒト歯肉線維芽細胞は IL-8 を産生することにより, 歯周組織での歯周病関連細菌の除菌に重要な役割を担っていると考えられる。だとすれば, 本研究で示したジンジパインによるヒト歯肉線維芽細胞の CD14 分解の結果として, LPS 不応答性が誘導され, IL-8 産生が低下することは, 同じ *P. gingivalis* の免疫応答のエスケープ機構として機能する可能性がある。成人性歯周炎は慢性炎症が主な病態であり, 急性転化することにより歯周組織の破壊を生ずると言われている。*P. gingivalis* はこのようなエスケープ機構によって歯周組織内で除去されずに生存し, 歯周局所の炎症反応を調節しているとも考えられる。今後, 低毒性のジンジパインインヒビターが開発されれば, 効率的な *P. gingivalis* の除菌が可能となり, 成人性歯周炎の治療において頻用されている抗菌剤による耐性菌の問題を解決できることが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究に着手する機会を与えて下さいました本学旧歯科保存学第一講座, 堀内 博教授 (現本学名誉教授), 本論文作成にあたりご指導, ご校閲を賜りました本研教科, 歯内・歯周療法学分野の島内英俊教授, ならびに口腔微生物学分野の高田春比古教授, 本研究の実施ならびに本論文の作成にあたり終始御懇篤なるご指導賜りました口腔免疫・遺伝子制御学分野の菅原俊二教授, 研究の実際にあたって, 様々なご指導下さいました歯内・歯周療法学分野の根本英二博士, *P. gingivalis* 培養上清サンプルの調製をご指導下さった口腔生化学分野の高橋信博教授, 精製ジンジパイン標品を御分与下さいました今村隆寿助教授 (熊本大学大学院医学研究科) に深

甚なる感謝を捧げます。最後に、様々な御助力を戴きました本研究科歯内・歯周療法学分野ならびに口腔微生物学分野の教室員の方々に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Holt, S.C. and Bramanti, T.E. : Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2** : 177-281, 1991.
- 2) Shah, H.N., Mayrand, D. and Genco, R. eds. : *Biology of the species Porphyromonas gingivalis*. CRC Press, Boca Raton., 1993.
- 3) Cutler, C.W., Kalmar, J.R. and Genco, C.A. : Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* **3** : 45-51, 1995.
- 4) Potempa, J., Banbula, A. and Travis, J. : Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol.* **2000** **24** : 153-192, 2000.
- 5) Chen, Z., Potempa, J., Polanowski, A., Wikstrom, M. and Travis, J. : Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **267** : 18896-18901, 1992.
- 6) Pike, R., McGraw, W., Potempa, J. and Travis, J. : Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis* : isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J. Biol. Chem.* **296** : 406-411, 1994.
- 7) Imamura, T., Pike, R.N., Potempa, J. and Travis, J. : Pathogenesis of periodontitis : a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J. Clin. Invest.* **94** : 361-367, 1994.
- 8) Imamura, T., Potempa, J., Pike, R.N. and Travis, J. : Dependence of vascular permeability enhancement on cysteine proteinases in vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **63** : 1999-2003, 1995.
- 9) Hosotaki, K., Imamura, T., Potempa, J., Kitamura, N. and Travis, J. : Activation of protein C by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. *Biol. Chem.* **380** : 75-80, 1999.
- 10) Imamura, T., Banbula, A., Pereira, P.J.B., Travis, J. and Potempa, J. : Activation of human prothrombin by arginine-specific cysteine proteinases (gingipains R) from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **276** : 18984-18991, 2001.
- 11) Imamura, T., Potempa, J., Pike, R.N., Moore, J.N., Barton, M.H. and Travis, J. : Effect of free and vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation : implications for bleeding tendency at periodontitis sites. *Infect. Immun.* **63** : 4877-4882, 1995.
- 12) Imamura, T., Potempa, J., Tanase, S. and Travis, J. : Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain-Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **272** : 16062-16067, 1997.
- 13) Imamura, T., Potempa, J. and Travis, J. : Comparison of pathogenic properties between two types of arginine-specific cysteine proteinases (gingipains-R) from *Porphyromonas gingivalis*. *Microb. Pathog.* **29** : 155-163, 2000.
- 14) Imamura, T., Tanase, S., Hamamoto, T., Potempa, J. and Travis, J. : Activation of blood coagulation factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem. J.* **353** : 325-331, 2001.
- 15) Jagels, M.A., Travis, J., Potempa, J., Pike, R. and Hugli, T.E. : Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **64** : 1984-1991, 1996.
- 16) Lourbakos, A., Potempa, J., Travis, J., D'Andrea, M.R., Andrade-Gordon, P., Santulli, R., Mackie, E.J. and Pike, R.N. : Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect. Immun.* **69** : 5121-5130, 2001.
- 17) Lourbakos, A., Yuan, Y., Jenkins, A.L., Travis, J., Andrade-Gordon, P., Santulli, R., Potempa, J. and Pike, R.N. : Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation : a new trait in microbial pathogenicity. *Blood* **97** : 3790-3797, 2001.
- 18) Sugawara, S., Nemoto, E., Tada, H., Miyake, K., Imamura, T. and Takada, H. : Proteolysis of human monocyte CD14 by cysteine proteinases (gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* leading to lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J. Immunol.* **165** : 411-418, 2000.
- 19) Wingrove, J.A., DiScipio, R.G., Chen, Z., Potempa, J., Travis, J. and Hugli, T.E. : Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **267** : 18902-18907, 1992.
- 20) Kadowaki, T., Nakayama, K., Yoshimura, F., Okamoto, K., Abe, N. and Yamamoto, K. : Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **273** : 29072-29076, 1998.
- 21) Pugin, J., Heumann, D., Tomasz, A., Kravchenko, V.V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M.P., Tobias, P.S. and Ulevitch, R.J. : CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* **1** : 509-516, 1994.
- 22) Wright, S.D. : CD14 and innate recognition of bacteria. *J. Immunol.* **155** : 6-8, 1995.
- 23) Haziot, A., Chen, S., Ferrero, E., Low, M.G., Silber, R. and Goyert, S.M. : The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J. Immunol.* **141** : 547-552, 1988.
- 24) Ulevitch, R.J. and Tobias, P.S. : Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13** : 437-457, 1995.
- 25) Akira, S. : Toll-like receptors and innate immunity. *Adv. Immunol.* **78** : 1-56, 2001.
- 26) Akira, S., Takeda, K. and Kaisho, T. : Toll-like receptors :

- critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**: 675-680, 2001.
- 27) Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S.: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**: 443-451, 1999.
- 28) Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**: 2085-2088, 1998.
- 29) Qureshi, S.T., Larivière, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K.J., Gros, P. and Malo, D.: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J. Exp. Med.* **189**: 615-625, 1999.
- 30) 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.
- 31) Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M.: MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**: 1777-1782, 1999.
- 32) Griffin, J.D., Ritz, J., Nadler, L.M. and Schlossman, S.F.: Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. *J. Clin. Invest.* **68**: 932-941, 1981.
- 33) Todd, R.F., Nadler, L.M. and Schlossman, S.F.: Antigens on human monocytes identified by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **126**: 1435-1442, 1981.
- 34) Haziot, A., Tsuberi, B.-Z. and Goyert, S.M.: Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor- α in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **150**: 5556-5565, 1993.
- 35) Sugawara, S., Sugiyama, A., Nemoto, E., Rikiishi, H. and Takada, H.: Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: characterization and CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **66**: 3043-3049, 1998.
- 36) Watanabe, A., Takeshita, A., Kitano, S. and Hanazawa, S.: CD14-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infect. Immun.* **64**: 4488-4494, 1996.
- 37) Wang, P.-L., Sato, K., Oido, M., Fujii, T., Kowashi, Y., Shinohara, M., Ohura, K., Tani, H. and Kuboki, Y.: Involvement of CD14 on human gingival fibroblasts in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-mediated interleukin-6 secretion. *Arch. Oral Biol.* **43**: 687-694, 1998.
- 38) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **59**: 295-301, 1991.
- 39) Takahashi, N., Sato, T. and Yamada, T.: Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **182**: 4704-4710, 2000.
- 40) Potempa, J., Pike, R. and Travis, J.: The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect. Immun.* **63**: 1176-1182, 1995.
- 41) Pike, R.N., Potempa, J., McGraw, W., Coetzer, T.H.T. and Travis, J.: Characterization of the binding activities of proteinase-adhesin complexes from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **178**: 2876-2882, 1996.
- 42) Bažil, V. and Strominger, J.L.: Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J. Immunol.* **147**: 1567-1574, 1991.
- 43) Nemoto, E., Sugawara, S., Tada, H., Takada, H., Shimouchi, H. and Horiuchi, H.: Cleavage of CD14 on human gingival fibroblasts cocultured with activated neutrophils is mediated by human leukocyte elastase resulting in down-regulation of lipopolysaccharide-induced IL-8 production. *J. Immunol.* **165**: 5807-5813, 2000.
- 44) Tamai, R., Sakuta, T., Matsushita, K., Torii, M., Takeuchi, O., Akira, S., Akashi, S., Espevik, T., Sugawara, S. and Takada, H.: Human gingival CD14⁺ fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression. *Infect. Immun.* **70**: 1272-1278, 2002.
- 45) Davies, A., Simmons, D.L., Hale, G., Harrison, R.A., Tighe, H., Lachmann, P.J. and Waldmann, H.: CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J. Exp. Med.* **170**: 637-654, 1989.
- 46) Kaisho, T., Ishikawa, J., Oritani, K., Inazawa, J., Tomizawa, H., Muraoka, O., Ochi, T. and Hirano, T.: BST-1, a surface molecule of bone marrow stromal cell lines that facilitates pre-B-cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5325-5329, 1994.
- 47) Mikolajczyk-Pawlinska, J., Travis, J. and Potempa, J.: Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS Lett.* **440**: 282-286, 1998.
- 48) Calkins, C.C., Platt, K., Potempa, J. and Travis, J.: Inactivation of tumor necrosis factor- α by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: implications of immune evasion. *J. Biol. Chem.* **273**: 6611-6614, 1998.
- 49) Banbula, A., Bugno, M., Kuster, A., Heinrich, P.C., Travis, J. and Potempa, J.: Rapid and efficient inactivation of IL-6 gingipains, lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**: 598-602, 1999.
- 50) Baggolini, M., Dewald, B. and Moser, B.: Interleukin-8 and related chemotactic cytokines; CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* **55**: 97-179, 1994.