

学位申請論文

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

機能再生・再建科学専攻

口腔・顎・顔面機能再生制御学講座

顎口腔再建外科学分野

(指導：飯田征二教授)

藤田 佑貴

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第64回日本細菌学会中国・四国支部総会（2011年10月，岡山）

第85回日本細菌学会総会（2012年3月，長崎）

The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology

（2012年9月，ブヨ，韓国）

***Porphyromonas gingivalis* HbR刺激に対する歯肉上皮細胞の**

IL-8産生機構に関する研究

藤田 佑貴

Study on the IL-8 production in human gingival epithelial cells

by *Porphyromonas gingivalis* HbR stimulation

Yuki FUJITA

緒言

歯周病はう蝕と並び、口腔における二大感染症のひとつであり、ヒトにおいて最も頻度の高い感染症である^{1, 2)}。本疾患はプラーク中の種々の口腔細菌が混合感染を起こすことによって生じる炎症性疾患であり、その主な病態として、歯肉の炎症と歯槽骨の破壊を生じる。プラークを構成する細菌の中でもグラム陰性偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は歯周疾患の主たる原因菌として考えられている³⁾。歯周治療を行うことにより本菌の菌数は減少する⁴⁾。

P. gingivalis は糖非発酵性であり、菌体外のタンパクを分解し、ペプチドとして菌体内に取り込み、栄養源としている。本菌の持つタンパク質分解酵素としては現在6種類が知られているが、その中で2種類のアルギニン-ジンジパイン (Rgp) とリジン-ジンジパイン (Kgp) の計3種類の菌体外システインプロテアーゼが主要な病原性因子のひとつとして知られている^{5, 6)}。これらのジンジパインは3つの遺伝子 *rgpA*, *rgpB* および *kgp* によってコードされている。本菌は血液寒天培地上で鉄代謝によりヘムを蓄積することによって黒色の集落を形成し、また、増殖にヘミンおよびメナジオンを要求する⁷⁾。ヘモグロビン結合性や赤血球凝集性にはジンジパインの遺伝子が重要な働きをしており、ヘモグロビン結合性にはこれらの遺伝子の内部ドメインタンパク質であるヘモグロビン結合タンパク質 HbR (HGP15) が関わっていること、赤血球凝集性にはヘモアグルチニンドメインタンパク質 HA (HGP44, HGP17, HGP27) が関わっていることが明らかになっている^{8, 9)}。HbRを始めとするこれらのドメインタンパク質はヘマグ

ルチニンコード遺伝子である*hagA*によってもコードされている⁹⁾。*rgpA*, *kgp*, *hagA*の各遺伝子から転写, 翻訳によって合成されたポリペプチドは未熟型のタンパク質であり, ジンジパインによって切断されることで成熟型のタンパク質となり菌体外に分泌される⁹⁾。切断され成熟型となったHbRは*P. gingivalis*の菌体表面でヘモグロビンに強く結合する能力を有し^{9, 11)}, 赤血球からヘム鉄を捕捉する^{10, 11)}。

ところで*P. gingivalis*を培養した場合に, HbRは培養上清中の主要なタンパク質として認められる^{12, 13)}。このことから宿主細胞に直接的に作用していることが推測される。実際にFujimuraらは骨髓由来マクロファージから得られる破骨細胞前駆細胞にHbRを作用させると, 破骨細胞への分化が抑制されることを報告している¹³⁾。しかし, 口腔内においてHbRがもっとも接触することが推測される菌肉上皮細胞を始めとする宿主の多くの細胞に対して, HbRの作用を示した報告は我々の調べた限りほとんどなく, 未だ不明な点が多い。

本研究ではHbRがヒト菌肉上皮細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし, HbR刺激によって産生されるサイトカインおよびケモカインの種類をヒト菌肉上皮株化細胞であるCa9-22細胞を用いて網羅的に調べた。その結果, 産生が顕著に認められたインターロイキン8 (IL-8) 産生について, その産生における細胞内でのシグナル伝達経路を解析した。

材料と方法

1. 試薬

抗ヒトphospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) ウサギポリクローナル抗体, 抗ヒトErk1/2ウサギポリクローナル抗体, 抗ヒトphospho-p38 (Thr180/Tyr182) ウサギポリクローナル抗体, 抗ヒトp38ウサギポリクローナル抗体, 抗ヒトphospho-ATF-2 (Thr71)ウサギポリクローナル抗体, 抗ヒトATF-2ウサギポリクローナル抗体, 抗ヒトphospho-CREB (Ser133) ウサギポリクローナル抗体, および抗ヒトCREBウサギポリクローナル抗体はCell Signaling Technology (Danvers, MA) から購入した。p38阻害剤SB203580およびMEK1/2阻害剤PD98059は, 和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。I κ B- α 阻害剤BAY11-7082は, Sigma (St. Louis, MO) から購入した。ATF-2-siRNAとネガティブコントロールsiRNAは, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) から, CREB-siRNAは, Ambion Applied Biosystems (Grand Island, NY) からそれぞれ購入した。

2. リコンビナントHbRの精製

リコンビナントHbR (rHbR) は, Nakayamaら⁸⁾の方法に従って精製した。*Escherichia coli* BL21 (DE3) をpKD349⁸⁾で形質転換し, LB培地中で対数増殖期まで培養後, 1 mMのisopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加することにより目的タンパク質の発現を誘導した。その後, 12,000 rpm, 30分間遠心することにより菌体を回収後, 超音波破碎を行なった。超音波破碎後の可溶性画分

に終濃度35 %になるように硫酸アンモニウムを添加することでrHbRを含む画分を沈殿させた。沈殿物をリン酸緩衝液 (PBS) で再懸濁および透析を行ない、陰イオン交換カラムであるDEAE-Sepharose (GE Healthcare, Amersham Place, England) およびゲル濾過カラムであるSepharose CL-6B (GE Healthcare) を順次を用いることでrHbRの精製を行なった。得られたタンパク質の純度は98 %以上であることをSDS-PAGEによって確認した。さらにTriton X-114 (Sigma) を用いて相分離を行なうことで混在するリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) を除去した¹⁴⁾。最終標品に含まれるLPS量は検出限界 (1 μ gタンパク質中10 pg) 未満であることを確認した。

3. 細胞培養

ヒト歯肉上皮株化細胞Ca9-22細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンク (Osaka, Japan) から購入した。培養は、10 %濃度のウシ胎児血清 (fetal calf serum, Thermo SCIENTIFIC, Waltham, MA) を含む、 α MEM (和光純薬工業株式会社) を用いて37 °C, 5 % CO₂存在下で行った。

4. 抗体アレイを用いたサイトカインおよびケモカインの網羅的解析

rHbR刺激によりCa9-22細胞から産生されるサイトカインおよびケモカインは抗体アレイを用いて網羅的に解析した。Ca9-22細胞を24穴マルチプレート (Greiner bio-one, Stuttgart, Germany) に1.0 $\times$ 10⁵ cells/wellの密度で播種し、播種6時間後に培地を無血清培地に交換した。さらに16時間後に10 μ g/mL になるよ

うにrHbRを添加した。rHbR添加 4 時間および12時間後それぞれに細胞の培養上清を回収した。回収した培養上清に含まれるサイトカインおよびケモカインはRayBio Human Cytokine Antibody Array 3 (RayBiotech, Inc., Norcross, GA) を用いて定性的に解析した。メンブレン上の各スポットの検出は付属の検出試薬を用いて化学発光させた後, Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いて行なった。

5. ELISA 法によるIL-8量の測定

培養上清中に存在するIL-8量はサンドイッチ法によるELISAキット (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom) を用いて定量した。Ca9-22細胞を24穴マルチプレート (Greiner bio-one) に 1.0×10^5 cells/wellの濃度で播種し, 6時間後に無血清培地に交換した。さらに16時間の培養を行った後, rHbRを添加した。そして, 添加12時間後に培養上清を回収し, 実験に供した。すべての実験は独立して3回行い, すべての実験の平均値を算出した。

6. ウェスタンブロット法

Ca9-22細胞をrHbR (10 μ g/mL) で刺激し一定の時間培養した。培養後, 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し, 2 mMオルトバナジウム酸塩および1 mMフッ化ナトリウムを含有するドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファーを用いて溶解した。還元状態で95 °C, 10分間の加熱によって変性した後, ポリアクリルアミドを10 %含むゲルと泳動用緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 200 mM

グリシン, 35 mM SDS) を用いて泳動することでタンパク質を分画した。分画したタンパク質を湿式転写装置 (Mini Trans-Blot Cell ; Bio-Rad Laboratories) を用い, 転写用緩衝液 (25 mM Tris・HCl, 192 mMグリシン, 20 %メタノール) 中でpolyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へ転写した。転写後のPVDF膜をウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS, 和光純薬工業株式会社) を1 %含有するトリス - Tween緩衝食塩水 (TBST緩衝液 ; 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) に1時間浸すことでブロッキング操作を施した。その後PVDF膜を一定の希釈率の1次抗体を含有するTBST緩衝液中において4 °Cで一晩反応させた後, TBST緩衝液で洗浄した。次いでhorseradish peroxidase (HRP) で標識した抗ウサギIgG抗体および抗マウスIgG抗体 (Dako) を2次抗体として1時間反応させた後, TBST緩衝液を用いて洗浄した。検出にはECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) およびImage Quant LAS 4000を用いた。

7. 蛍光免疫染色

10 µg/mL濃度のrHbR存在下にLab-Tek 8 chamber (Nunc, Roskilde, Denmark) 上で2時間培養を行なった細胞を2% paraformaldehyde含有PBSを用いて固定した。その後0.1 % Triton X-100含有PBSにて10分間透過処理後, 1 %濃度のFBSを含むTBST緩衝液中でブロッキング操作を施した。その後1次抗体を4 °Cにて一晩反応させ, 洗浄後, さらに蛍光色素で標識した2次抗体を室温にて1時間反応させた。核染色には4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI : Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた。染色した細胞は, 蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000, KEYENCE Corp., Osaka,

Japan) を用いて観察した。

1 次抗体は抗ヒト phospho-ATF-2 ウサギポリクローナル抗体および抗ヒト phospho-CREB ウサギポリクローナル抗体を1:300の希釈率で使用し, 2 次抗体はAlexa Flour 546標識抗ウサギIgG抗体 (Invitrogen) を用いた。

8. siRNAによるノックダウン実験

Ca9-22細胞におけるATF-2およびCREBの遺伝子発現抑制は各遺伝子特異的 siRNAを導入することで行なった。24穴マルチプレートに 0.5×10^5 cells/wellの濃度で播種した細胞に対し, Lipofectamine RNAiMAXトランスフェクション試薬 (Invitrogen) を用いてATF-2-siRNA (100 μ mol), CREB-siRNA (100 μ mol) あるいはネガティブコントロールsiRNA (NC-siRNA, 100 μ mol) を導入した。

9. 統計処理

各実験系における統計解析には, 対応のない群間のStudent's *t* testを用いた。
なお, *p*値が0.01以下をもって有意差ありと判定した。

結果

1. Ca9-22細胞におけるrHbR刺激によるIL-8産生

rHbRに反応してヒト歯肉上皮細胞から産生されるサイトカインおよびケモカインの種類はサイトカイン抗体アレイを用いて網羅的に調べた(図1A, B)。rHbR非存在下と比較して, rHbR (10 μ g/mL) 刺激4時間及び12時間でともにIL-8の強い産生が認められた。またIL-6, IL-10, GM-CSFおよびCXCL1・CXCL2・CXCL3の産生量の増加が認められた。ELISAによりrHbR刺激によって産生されるIL-8量を定量的に調べたところ, IL-8の産生量はrHbR濃度に依存的に, また経時的に増加していた ($p < 0.01$) (図1C, D)。

2. rHbR刺激に対するCa9-22細胞内MAPキナーゼの活性化

骨髄由来マクロファージではHbR刺激がMAPキナーゼのp38とErk1/2を活性化する¹³⁾。このためrHbR刺激によるCa9-22細胞内MAPキナーゼの活性化に対する作用を調べた。図2Aに示すようにCa9-22細胞においてrHbRの濃度依存的にp38 Thr180/Tyr182およびErk1/2 Thr202/Tyr204のリン酸化が認められた。また経時的な変化においてはrHbR刺激10分後でp38およびErk1/2の強いリン酸化が認められ, Erk1/2のリン酸化はその後減衰した(図2B)。HbRによってCa9-22細胞においてIL-8産生の増加及びMAP キナーゼ (p38, Erk1/2) のリン酸化が認められた。観察されたp38およびErk1/2のリン酸化がrHbRにLPSが混入したことによるものではないことを明らかにするため, rHbRに100 $^{\circ}$ C, 10分間の熱処理を行ない,

Ca9-22細胞に添加した。図2C およびD に示すように非加熱rHbRを用いた場合に観察されたp38およびErk1/2のリン酸化，および培養上清中のIL-8量の増加は加熱処理を行なったrHbRを用いた場合には認められなかった。

3. rHbR刺激によるIL-8産生におけるMAPキナーゼの関与

MAPキナーゼは種々の細胞においてIL-8産生に関与していることが知られている。rHbR刺激によるIL-8産生にMAPキナーゼが関与していることを調べるために，rHbR刺激1時間前にMEK1/2及びp38の阻害剤をCa9-22細胞に添加することにより前処理を行なった。p38阻害剤であるSB203580を用いて前処理した場合にはrHbR刺激によるp38のリン酸化は抑制されなかった（図3A）。しかし，MEK1/2阻害剤であるPD98059で前処理すると，rHbR刺激によるErk1/2のリン酸化は抑制された（図3B）。rHbR刺激によるIL-8の産生誘導に対してはSB203580またはPD98059のいずれを用いて前処理を行なった場合においてもその産生量は減少した。また両阻害剤を併用した場合には，単独使用の場合に比べ，rHbR刺激によるIL-8の産生は顕著に減少した（図3C）。これらの結果より，rHbR刺激によるIL-8の産生にMAPキナーゼp38およびErk1/2が関与していることが示唆された。

4. rHbR刺激によるIL-8産生におけるATF-2およびCREBの関与

これまでにMAPキナーゼを介したIL-8産生誘導に転写因子であるATF-2，CREBが関与していることが報告されている^{15, 16)}。rHbR刺激によるIL-8産生にATF-2およびCREBが関与しているかを明らかにするため，HbR刺激後にCa9-22

細胞の核内に局在するATF-2およびCREBのリン酸化状態とIL-8産生の関係を調べた。リン酸化状態のATF-2およびCREBそれぞれに特異的に結合する抗体を用いた免疫蛍光染色ではHbR刺激後にリン酸化ATF-2およびリン酸化CREBが核内に局在することが観察された（図4A, B）。次にATF-2-siRNAあるいはCREB-siRNAをCa9-22細胞に導入することでATF-2とCREBの発現を抑制した（図4C）。このATF-2あるいはCREBの発現抑制によりrHbR刺激Ca9-22細胞におけるIL-8の産生量は顕著に減少した（図4D）。

5. rHbR刺激によるIL-8の産生におけるNF- κ Bの関与.

IL-8プロモーターの活性化には転写因子NF- κ Bの活性化が必要だと考えられている。rHbR刺激によるIL-8の産生にNF- κ Bが介在していることを明らかにするために、rHbR刺激後におけるNF- κ Bの核内への移行を調べた。抗NF- κ B -P65抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果、rHbR刺激後のCa9-22細胞では核内にNF- κ B-p65が存在する細胞数が有意に上昇した（図5A）。さらにrHbR刺激によるIL-8産生にNF- κ Bが関与していることを明らかにするために、Ca9-22細胞をI κ B α 阻害剤であるBAY11-7082で前処理した後にrHbRで刺激した。その結果、BAY11-7082で前処理を行ったものではrHbR刺激に対して産生されるIL-8の量は顕著に減少した（図5B）これらの結果より、rHbR刺激によるIL-8の産生にはNF- κ Bが介在していることが明らかになった。

6. rHbR刺激によるIL-8の産生におけるMAPキナーゼ, ATF-2, CREBおよびNF- κ B

の関係

rHbR刺激によるIL-8の産生におけるp38およびErk1/2 MAPキナーゼと転写因子ATF-2, CREBおよびNF- κ Bの関係を調べた。まずp38およびErk1/2 MAPキナーゼと、転写因子ATF-2およびCREBの関係を調べた。p38阻害剤SB203580で前処理するとrHbR刺激によるCREBのリン酸化は抑制されたが、ATF-2のリン酸化の抑制は認められなかった(図6A)。対象的にMEK1/2阻害剤PD98059で前処理するとrHbR刺激によるATF-2のリン酸化は抑制されたが、CREBのリン酸化の抑制は認められなかった(図6B)。これらの結果から、rHbR刺激においてp38のリン酸化はCREBのリン酸化を誘導し、Erk1/2のリン酸化はATF-2のリン酸化を誘導することが示唆された。次にrHbR刺激によるIL-8産生におけるp38およびErk1/2 MAPキナーゼとNF- κ Bの関係を明らかにするために、MAPキナーゼおよびNF- κ Bそれぞれに対する阻害剤を併用した場合のrHbR刺激によるIL-8の産生量を調べた。IkB α 阻害剤BAY11-7082とp38阻害剤SB203580を併用した場合、いずれかの単独使用に比べ、産生されるIL-8の量は減少した。しかし、IkB α 阻害剤BAY11-7082とMEK1/2阻害剤PD98059を併用した場合、いずれかの単独使用の場合に比べ、IL-8の産生量に有意な差は認められなかった(図6C)。これらの結果から、NF- κ Bはp38の下流ではなくErk1/2の下流に存在することが示唆された。

これまでの結果から、Ca9-22細胞におけるrHbR刺激によるIL-8の産生には少なくとも2つの経路Erk1/2/ATF-2, NF- κ B経路、及びp38/CREB経路が使用されていることが示された(図7)。

考察

本研究では*P. gingivalis* のHbRによる刺激に対してヒト歯肉上皮細胞からIL-8が容量依存的に、また経時的に産生されることを明らかにし、そして、HbR刺激によるIL-8産生に関与する細胞内のシグナル伝達経路の解析を行なった。

歯周疾患の発症および進行には様々なサイトカインネットワークが関与する。多くのサイトカインの中で炎症性サイトカインIL-8は歯周組織の炎症反応における主たるメディエーターのひとつと考えられている。IL-8は歯肉溝における主要な防御的因子として種々の細胞から産生され、好中球の浸潤や遊走に重要な役割を果たしている¹⁷⁾。臨床的には歯周疾患に罹患している成人の歯周組織や歯肉溝滲出液中のIL-8 mRNAの発現量およびIL-8の産生量は健常人に比べて高いことが示される¹⁸⁻²¹⁾。ところで、これまでも*P. gingivalis*の菌体成分がIL-8の産生を誘導することが報告されている。*P. gingivalis*のLPS刺激によりヒト歯肉線維芽細胞、単球、好中球、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にIL-8遺伝子の発現が生じる²²⁻²⁶⁾。*P. gingivalis*の線毛構成タンパク質やジンジパインの刺激によりHUVECからIL-8が産生される²³⁾。また、単球およびヒト臍帯静脈内皮細胞において*P. gingivalis*のストレスタンパク質HtpGが単球およびHUVECにおけるIL-8 mRNAの発現レベルおよびIL-8産生量を増加させることが報告されている²⁴⁾。さらにジンジパインRgpAがLPSあるいは熱処理した菌体に反応してHUVECから産生されるIL-8の産生量を増加させることも報告されている²⁷⁾。ジンジパインについてはタンパク質分解作用によりIL-8の生物学的活性を変化させるという報

告もある^{23, 28)}。O'Brien-Simpsonらはヒト歯肉および線維芽細胞において低い菌数の*P. gingivalis*や低濃度のRgpA-Kgp複合体はICAM-1, IL-8, IL-6, macrophage chemoattractant protein (MCP) を誘導し, 高い菌数の*P. gingivalis*菌体や高濃度のジンジパインはこれらの化学誘導物質は減少させることを報告している²⁹⁾。同様の現象をGrenierとTanabeらも報告しており, ArgジンジパインA/BおよびLysジンジパインはマクロファージからのTNF- α やIL-8を誘導する一方で, 高濃度のArgジンジパインA/Bはこれらのサイトカインの産生量を減少させるとしている³⁰⁾。

HbRは*rgp*, *kgp* あるいは *hagA* にドメインタンパク質としてコードされている主要なタンパク質であり, 炎症性サイトカインの産生などをはじめとする宿主免疫応答を誘導する主要な菌体成分のひとつである。HbRは*P. gingivalis*の菌体表面に存在し, 長期培養した際に培養上清中に主要なタンパク質として認められる^{12, 13)}。またHbRは宿主細胞表面に強く結合する¹³⁾。これらの性状が宿主免疫応答に影響すると考えられる。DeCarloらは抗HbR抗体が歯周疾患患者に見出されること, HbRに対する血清中の抗体価は歯周疾患の重症度とは反比例することを示している³¹⁾。

ところで, 感染の結果生じるIL-8産生にMAPキナーゼ経路が関与することはこれまでも複数の病原細菌で知られており, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium³²⁾, *Salmonella typhimurium*³³⁾, *Helicobacter pylori*^{15, 34, 35)}, 腸管出血性*E. coli*³⁶⁾, 腸管病原性*E. coli*³⁷⁾, *Clostridium perfringens*³⁸⁾などで報告がある。

MAPキナーゼは多くの細胞内シグナル伝達経路で重要な役割を示している^{39, 41)}。MAPキナーゼスーパーファミリーはErk, c-jun N末端キナーゼ (c-jun

N-terminal kinase, JNK), p38 からなる。一般にLPSはこれら3種類のMAPキナーゼ経路を活性化させるが⁴²⁾, *P. gingivalis* のLPSもMAPキナーゼを活性化させる⁴³⁻⁴⁶⁾。さらに*P. gingivalis*の菌体成分ではLPS以外にアルギニン-ジンジパイン, 線毛タンパク質FimA, ヘモアグルチニンB (hemagglutinin B, HagB) がMAPキナーゼ経路を活性化させることが報告されている⁴⁷⁻⁵⁰⁾。

最近, 骨髄由来マクロファージ細胞がHbRに応答してErk1/2およびp38をリン酸化させることが示されている¹³⁾。本研究ではHbRに最も接触する可能性のあるヒト歯肉上皮細胞で, HbRに応答して生じるIL-8産生に, MAPキナーゼの活性化が関与しているかを調べた。ヒト歯肉上皮株化細胞Ca9-22細胞をp38特異的阻害剤SB203580, MEK1/2特異的阻害剤PD98059で前処理することによりrHbR刺激によるIL-8の産生は顕著に抑制された (図3C) ことから, rHbR刺激によるIL-8の産生にはp38およびErk1/2の活性化が関与していることが示された。また, ATF-2-siRNAおよびCREB-siRNAの導入によりATF-2, CREBの発現を抑制するとrHbR刺激によるIL-8の産生が抑制されたこと (図4D), そして, SB203580とPD98059による前処理はrHbR刺激に応答して生じるCREBとATF-2のリン酸化をそれぞれ抑制したこと (図6A, B) から, HbR刺激によるIL-8産生においてp38 - CREBおよびErk1/2 - ATF-2の経路が関与することが示された。さらにCa9-22細胞を, SB203580とともにI κ B α 特異的阻害剤であるBAY-11-7082を併用して前処理した場合, それぞれの阻害剤単独で前処理した場合に比較し, HbR刺激によるIL-8の産生量は減少した (図6C)。このことから, Erk1/2の活性化はATF2とともにNF- κ Bも活性化することが示された。

ヒト細胞に菌体構成成分が接触すると、MAPキナーゼを介してIL-8の産生が誘導されることがこれまでも報告されている。これらの報告をみると、使用されるMAPキナーゼスーパーファミリーの経路およびその下流に位置する分子はそれぞれ異なっている。*H. pylori* VacAはp38およびErk1/2のリン酸化を介してIL-8を産生させる¹⁵⁾。しかし、今回のrHbRの実験結果とは異なり、AZ521細胞においてVacA刺激によって生じるp38の活性化はATF-2のリン酸化を引き起こすことが報告されている⁵¹⁾。また、A549細胞は*C. perfringens*のアルファ毒素に応答してIL-8を産生するが、この場合、Erk1/2 - NF- κ B-p65およびp38 MAPキナーゼ経路が使用される³⁸⁾。*Moroxella catarrhalis*に応答して上皮細胞に生じるIL-8の産生ではErk1/2とp38のリン酸化は関与するが、JNKは関与しない⁵²⁾。また、*P. gingivalis*のHagBが樹状細胞のErk1/2, p38 MAPK, NF- κ BおよびCREBを活性化し、その結果、炎症性および抗炎症性サイトカインの産生が誘導されることが示されている⁴⁹⁾。しかし、マクロファージにおいてはHagBはErk1/2, p38, JNK MAPキナーゼを介してIL-8産生を誘導することが報告されている⁵⁰⁾。

NF- κ B-p65/RelAはIL-8産生における重要な転写因子として知られている⁵³⁾。本研究においても、rHbRの刺激によりNF- κ B-p65はリン酸化され、核内へ移行したこと（図5A）、そして、I κ B α 特異的阻害剤BAY-11-7082によりIL-8の産生量は顕著に減少したこと（図5B）が示され、rHbRに応答して生じるIL-8産生の誘導においてNF- κ Bは重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

結論

*P. gingivalis*培養上清中の主要なタンパク質HbRはヒト歯肉上皮細胞にIL-8の産生を誘導すること,このIL-8産生にはp38 - CREB およびErk1/2 - ATF-2/NF- κ Bの両経路が使用されることが明らかとなった。

謝辞

稿を終えるにあたり，懇篤なる御指導，御高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野，大原直也教授，そして主任教授であります岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野，飯田征二教授に謹んで感謝の意を表します。また，懇切なる御指導を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野，中山真彰助教に心より感謝いたします。さらに，実験試料を恵与いただきましたとともに貴重な御助言を頂きました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病原微生物学分野，中山浩次教授と内藤真理子准教授に感謝申し上げます。最後に本研究を行うにあたり，貴重なご援助と御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科顎口腔再建外科学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Page, R. C., S. Offenbacher, H. E. Schroeder, G. J. Seymour, and K. S. Kornman. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol.* 2000., **14**:216-248. 1997.
2. Armitage, G. C. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann. Periodontol.*, **1**:37-215. 1997.
3. Holt, S. C., and J. L. Ebersole. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol.* 2000., **38**:72-122. 2005.
4. Kawada, M., A. Yoshida, N. Suzuki, Y. Nakano, T. Saito, T. Oho, and T. Koga. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral microbiol. Immunol.*, **19**:289-292. 2004.
5. Nakayama, K., T. Kadowaki, K. Okamoto, and K. Yamamoto. Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. *J. Biol. Chem.*, **270**:23619-23626. 1995.

6. Potempa, J., R. Pike, and J. Travis. 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.
7. ShahHN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int. J. Sys. Bac.*, **38**, 128-131, 1988.
8. Nakayama K, Ratnayake DB, Tsukuba T, Kadowaki T, Yamamoto K, Fujimura S. Haemoglobin receptor protein is intragenically encoded by the cysteine proteinase-encoding genes and the haemagglutinin-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Microbiol.*, **27**, 51-61, 1998.
9. Shi Y, Ratnayake DB, Okamoto K, Abe N, Yamamoto K, Nakayama K. Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17955-17960. 1999.
10. DeCarlo, A. A., M. Paramasvaran, P. L. Yun, C. Collyer, and N. Hunter. Porphyrin-mediated binding to hemoglobin by the HA2 domain of cysteine proteinases (gingipains) and hemagglutinins from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.*, **181**:3784-3791. 1999.

11. Paramaesvaran, M., K. A. Nguyen, E. Caldon, J. A. McDonald, S. Najdi, G. Gonzaga, D. B. Langley, A. DeCarlo, M. J. Crossley, N. Hunter, and C. A. Collyer. Porphyrin-mediated cell surface heme capture from hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.*, **185**:2528-2537. 2003.
12. Kamaguchi, A., M. Nakano, M. Shoji, R. Nakamura, Y. Sagane, M. Okamoto, T. Watanabe, T. Ohyama, M. Ohta, and K. Nakayama. Autolysis of *Porphyromonas gingivalis* is accompanied by an increase in several periodontal pathogenic factors in the supernatant. *Microbiol. Immunol.*, **48**:541-545. 2004.
13. Fujimura, Y., H. Hotokezaka, N. Ohara, M. Naito, E. Sakai, M. Yoshimura, Y. Narita, H. Kitaura, N. Yoshida, and K. Nakayama. The hemoglobin receptor protein of *Porphyromonas gingivalis* inhibits receptor activator NF-kappaB ligand-induced osteoclastogenesis from bone marrow macrophages. *Infect. Immun.*, **74**:2544-2551. 2006.
14. Liu, S., R. Tobias, S. McClure, G. Styba, Q. Shi, and G. Jackowski. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin. Biochem.*, **30**:455-463. 1997.
15. Hisatsune, J., M. Nakayama, H. Isomoto, H. Kurazono, N. Mukaida, A. K. Mukhopadhyay, T. Azuma, Y. Yamaoka, J. Sap, E. Yamasaki, K. Yahiro, J. Moss,

- and T. Hirayama. Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAPK in activating transcription factor-2, cAMP response element binding protein, and NF-kappaB activation. *J. Immunol.* **180**:5017-5027. 2008.
16. Tancowny, B. P., V. Karpov, R. P. Schleimer, and M. Kulka. Substance P primes lipoteichoic acid- and Pam3CysSerLys4-mediated activation of human mast cells by up-regulating Toll-like receptor 2. *Immunol.*, **131**:220-230. 2010.
 17. Okada, H., and S. Murakami. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **9**:248-266. 1998.
 18. Dongari-Bagtzoglou, A. I., and J. L. Ebersole. Increased presence of interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secreting fibroblast subpopulations in adult periodontitis. *J. Periodontol.*, **69**:899-910. 1998.
 19. Fitzgerald, J. E., and D. L. Kreutzer. Localization of interleukin-8 in human gingival tissues. *Oral Microbiol. Immunol.*, **10**:297-303. 1995.
 20. Gamonal, J., A. Acevedo, A. Bascones, O. Jorge, and A. Silva. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J. Periodontol.*, **71**:1535-1545. 2000.

21. Tsai, C. C., Y. P. Ho, and C. C. Chen. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J. Periodontol.*, **66**:852-859. 1995.
22. Agarwal, S., N. P. Piesco, L. P. Johns, and A. E. Riccelli. Differential expression of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J. Dent. Res.*, **74**:1057-1065. 1995.
23. Nassar, H., H. H. Chou, M. Khlgatian, F. C. Gibson, 3rd, T. E. Van Dyke, and C. A. Genco. Role for fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect. Immun.*, **70**:268-276. 2002.
24. Shelburne, C. E., M. D. Coopamah, D. G. Sweier, F. Y. An, and D. E. Lopatin. HtpG, the *Porphyromonas gingivalis* HSP-90 homologue, induces the chemokine CXCL8 in human monocytic and microvascular vein endothelial cells. *Cell. Microbiol.*, **9**:1611-1619. 2007.
25. Sugita, N., A. Kimura, Y. Matsuki, T. Yamamoto, H. Yoshie, and K. Hara. Activation of transcription factors and IL-8 expression in neutrophils stimulated with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Inflammation*,

22:253-267. 1998.

26. Tamura, M., M. Tokuda, S. Nagaoka, and H. Takada. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect. Immun.*, **60**:4932-4937. 1992.
27. Mikolajczyk-Pawlinska, J., J. Travis, and J. Potempa. Modulation of interleukin-8 activity by gingipains from *Porphyromonas gingivalis*: implications for pathogenicity of periodontal disease. *FEBS lett.*, **440**:282-286. 1998.
28. Zhang, J., H. Dong, S. Kashket, and M. J. Duncan. IL-8 degradation by *Porphyromonas gingivalis* proteases. *Microb. Pathog.*, **26**:275-280. 1999.
29. O'Brien-Simpson, N. M., R. D. Pathirana, G. D. Walker, and E. C. Reynolds. *Porphyromonas gingivalis* RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes penetrate gingival tissue and induce proinflammatory cytokines or apoptosis in a concentration-dependent manner. *Infect. Immun.*, **77**:1246-1261. 2009.
30. Grenier, D., and S. Tanabe. *Porphyromonas gingivalis* gingipains trigger a proinflammatory response in human monocyte-derived macrophages through the p38alpha mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Toxins*, **2**:341-352. 2010.

31. DeCarlo, A. A., M. Nadkarni, M. Paramaesvaran, P. W. Yun, C. A. Collyer, and N. Hunter. Serum antibodies against the hemoglobin-binding domain (HA2) of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodont. Res.*, **39**:228-235. 2004.
32. Mynott, T. L., B. Crossett, and S. R. Prathalingam. Proteolytic inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. *Infect. immun.*, **70**:86-95. 2002.
33. Hobbie, S., L. M. Chen, R. J. Davis, and J. E. Galan. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J. Immunol.*, **159**:5550-5559. 1997.
34. Bhattacharyya, A., S. Pathak, S. Datta, S. Chattopadhyay, J. Basu, and M. Kundu. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *Helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. *Biochem. J.*, **368**:121-129. 2002.
35. Ritter, B., P. Kilian, M. R. Rebol, K. Resch, J. K. DiStefano, R. Frank, W. Beil, and M. Nourbakhsh. Differential effects of multiplicity of infection on *Helicobacter pylori*-induced signaling pathways and interleukin-8 gene

- transcription. *J. Clin. Immunol.*, **31**:60-68. 2011.
36. Dahan, S., V. Busuttil, V. Imbert, J. F. Peyron, P. Rampal, and D. Czerucka. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection induces interleukin-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-kappaB and AP-1 in T84 cells. *Infect. Immun.*, **70**:2304-2310. 2002.
 37. Semiramo, N., A. Gleizes, I. Turbica, C. Sandre, R. Gorges, I. Kansau, A. Servin, and S. Chollet-Martin. *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J. Leukoc. Biol.*, **85**:310-321. 2009.
 38. Oda, M., R. Shiihara, Y. Ohmae, M. Kabura, T. Takagishi, K. Kobayashi, M. Nagahama, M. Inoue, T. Abe, K. Setsu, and J. Sakurai. *Clostridium perfringens* alpha-toxin induces the release of IL-8 through a dual pathway via TrkA in A549 cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1822**:1581-1589. 2012.
 39. Brunet, A., and J. Pouyssegur. Mammalian MAP kinase modules: how to transduce specific signals. *Essays Biochem.*, **32**:1-16. 1997.
 40. Pelech, S. L., and J. S. Sanghera. MAP kinases: charting the regulatory pathways. *Science*, **257**:1355-1356. 1992.
 41. Brown, J., H. Wang, G. N. Hajishengallis, and M. Martin. TLR-signaling

- networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.*, **90**:417-427. 2011.
42. Guha, M., and N. Mackman. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell signal.*, **13**:85-94. 2001.
 43. Choi, H., W. Lim, I. Kim, J. Kim, Y. Ko, H. Kwon, S. Kim, K. M. Kabir, X. Li, O. Kim, Y. Lee, S. Kim, and O. Kim. Inflammatory cytokines are suppressed by light-emitting diode irradiation of *P. gingivalis* LPS-treated human gingival fibroblasts: inflammatory cytokine changes by LED irradiation. *Lasers. Med. Sci.*, **27**:459-467. 2012.
 44. Darveau, R. P., S. Arbabi, I. Garcia, B. Bainbridge, and R. V. Maier. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide is both agonist and antagonist for p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Infect. Immun.*, **70**:1867-1873. 2002.
 45. Diya, Z., C. Lili, L. Shenglai, G. Zhiyuan, and Y. Jie. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immun.*, **14**:99-107. 2008.
 46. Morimoto, Y., K. Kikuchi, T. Ito, M. Tokuda, T. Matsuyama, S. Noma, T.

- Hashiguchi, M. Torii, I. Maruyama, and K. Kawahara. MK615 attenuates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine release via MAPK inactivation in murine macrophage-like RAW264.7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **389**:90-94. 2009.
47. Inomata, M., T. Into, Y. Ishihara, M. Nakashima, T. Noguchi, and K. Matsushita. Arginine-specific gingipain A from *Porphyromonas gingivalis* induces Weibel-Palade body exocytosis and enhanced activation of vascular endothelial cells through protease-activated receptors. *Microb. Infect.*, **9**:1500-1506. 2007.
48. Zhou, Q., and S. Amar. Identification of signaling pathways in macrophage exposed to *Porphyromonas gingivalis* or to its purified cell wall components. *J. Immunol.*, **179**:7777-7790. 2007.
49. Gaddis, D. E., S. M. Michalek, and J. Katz. Requirement of TLR4 and CD14 in dendritic cell activation by Hemagglutinin B from *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Immunol.*, **46**:2493-2504. 2009.
50. Zhang, P., M. Martin, S. M. Michalek, and J. Katz. Role of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB in the regulation of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin B. *Infect. immun.*, **73**:3990-3998. 2005.

51. Nakayama, M., M. Kimura, A. Wada, K. Yahiro, K. Ogushi, T. Niidome, A. Fujikawa, D. Shirasaka, N. Aoyama, H. Kurazono, M. Noda, J. Moss, and T. Hirayama. *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J. Biol. Chem.*, **279**:7024-7028. 2004.
52. Slevogt, H., B. Schmeck, C. Jonatut, J. Zahlten, W. Beermann, V. van Laak, B. Opitz, S. Dietel, P. D. N'Guessan, S. Hippenstiel, N. Suttorp, and J. Seybold. *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am. J. Physiol. Lung cell. Mol. Physiol.*, **290**:818-826. 2006.
53. Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J. Leukoc. Biol.*, **72**:847-855. 2002.

図の説明

図 1. rHbR 刺激に対する Ca9-22 細胞による IL-8 の産生

(A) サイトカインアレイ上にスポットされているサイトカインの種類を示した。(B) rHbR (10 $\mu\text{g/ml}$) 刺激 4, 12 時間後に Ca9-22 細胞の培養上清中に存在するサイトカインとケモカインを抗体アレイを用いて定性的に評価した。(C) Ca9-22 細胞を rHbR で刺激し 12 時間後に培養上清中に存在する IL-8 量を ELISA にて評価した。(D) Ca9-22 細胞を rHbR (10 $\mu\text{g/mL}$) で刺激した培養上清中における IL-8 量の経時的な変化を ELISA にて評価した。なお、図は独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図 2. rHbR による MAP キナーゼ (p38, Erk1/2) の活性化

(A) Ca9-22 細胞を種々の濃度 (1 – 10 $\mu\text{g/mL}$) の rHbR で刺激し、MAP キナーゼ (p38, Erk1/2) のリン酸化をウエスタンブロット法で検討した。(B) Ca9-22 細胞を rHbR (10 $\mu\text{g/mL}$) で 0 - 120 分間刺激し、MAP キナーゼ (p38, Erk1/2) のリン酸化をウエスタンブロット法で検討した。(C) Ca9-22 細胞を rHbR (10 $\mu\text{g/mL}$) あるいは熱処理 (100 $^{\circ}\text{C}$, 10 分間) した rHbR で刺激し、MAP キナーゼ (p38, Erk1/2) のリン酸化をウエスタンブロット法で検討した。(D) Ca9-22

細胞を rHbR (10 μ g/mL) あるいは熱処理 (100 $^{\circ}$ C, 10 分間) した rHbR で刺激し, 12 時間後に培養上清中にある IL-8 産生量を ELISA にて評価した。なお, 図は独立した 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。

図 3. rHbR による IL-8 産生における MAP キナーゼ (p38, Erk1/2) の関与

SB203580 (3 μ M) (A) あるいは PD98059 (3 μ M) (B) で 1 時間前処理を行った Ca9-22 細胞を rHbR (10 μ g/mL) で刺激し, p38 および Erk1/2 のリン酸化をウエスタンブロット法にて検討した。(C) SB203580 (3 μ M), PD98059 (3 μ M) あるいは両阻害剤で 1 時間前処理を行った Ca9-22 細胞を rHbR (10 μ g/mL) で刺激し, 12 時間後の培養上清中の IL-8 産生量を ELISA で調べた。なお, 図は独立した 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。

図 4. rHbR による IL-8 産生における転写因子 ATF-2, CREB の関与

Ca9-22 細胞を rHbR (10 μ g/ml) で刺激し, 核内に局在する ATF-2 (A) および CREB (B) のリン酸化を蛍光免疫染色で評価した。下図は 300 個の細胞中における核内移行した細胞数の割合を示す。(C) ATF-2 あるいは CREB の siRNA をトランスフェクションした Ca9-22 細胞における ATF-2, CREB の発現抑制をウエスタンブロット法にて確認した。(D) ATF-2 および CREB の siRNA をトラン

スフェクションした Ca9-22 細胞を rHbR (10 $\mu\text{g/ml}$) で 12 時間刺激し、培養上清中の IL-8 産生量を ELISA で調べた。なお、図は独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図 5. rHbR による IL-8 産生における NF- κ B の関与

(A) Ca9-22 細胞を rHbR (10 $\mu\text{g/ml}$) で刺激し、NF- κ B (p65) の核内移行を蛍光免疫染色で評価した。下図は 300 個の細胞中における核内移行した細胞数の割合を示す。(B) BAY11-7082 で 1 時間前処理を行った Ca9-22 細胞を rHbR (10 $\mu\text{g/mL}$) で刺激し、0 - 12 時間後の培養上清中の IL-8 産生量を ELISA で調べた。なお、図は独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図 6. rHbR による IL-8 産生における MAP キナーゼ (p38, Erk1/2) と各転写因子の関係

SB203580 (3 μM) (A) あるいは PD98059 (3 μM) (B) で 1 時間前処理を行った Ca9-22 細胞を rHbR (10 $\mu\text{g/ml}$) で 2 時間刺激し、ATF-2 および CREB のリン酸化をウェスタンブロット法にて検討した。(C) BAY11-7082 (3 μM) あるいは SB203580 (3 μM)、PD98059 (3 μM) あるいは両阻害剤で 1 時間前処理を行

った Ca9-22 細胞を rHbR (10 μ g/mL) で刺激し、12 時間後の培養上清中の IL-8 産生量を ELISA で調べた。なお、図は独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。

図 7. 図は rHbR による IL-8 産生におけるシグナル伝達経路の略図

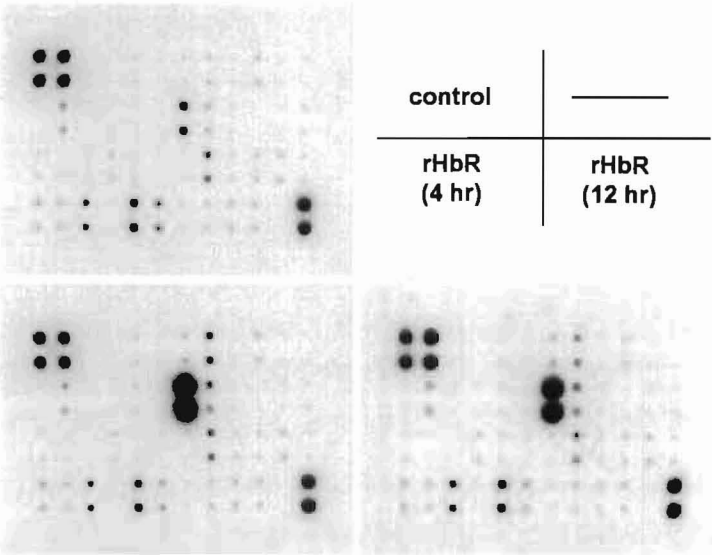
rHbR によって Erk1/2 が活性化し、それに続いて NF- κ B および ATF-2 が活性化され IL-8 産生が促進する。これと同様に rHbR によって p38 が活性化され、それに続いて CREB の活性化が起こる。

図. 1.

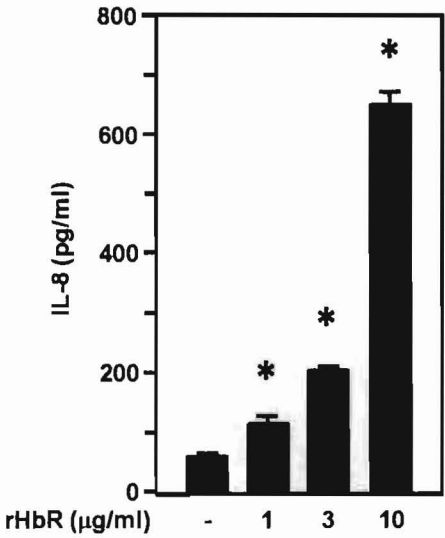
A

Positive	Positive	Negative	Negative	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
Positive	Positive	Negative	Negative	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40p70	IL-13	IL-15	IFN- γ
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40p70	IL-13	IL-15	IFN- γ
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TRAC	TGF- β 1
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 δ	RANTES	SCF	SDF-1	TRAC	TGF- β 1
TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Negative	Positive
TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-I	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Negative	Positive

B



C



D

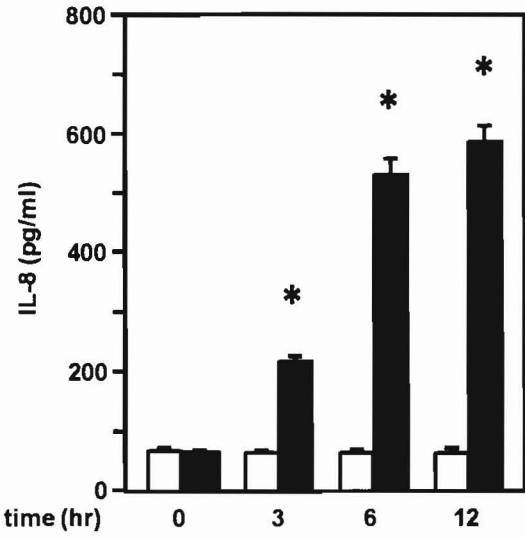


図. 2.

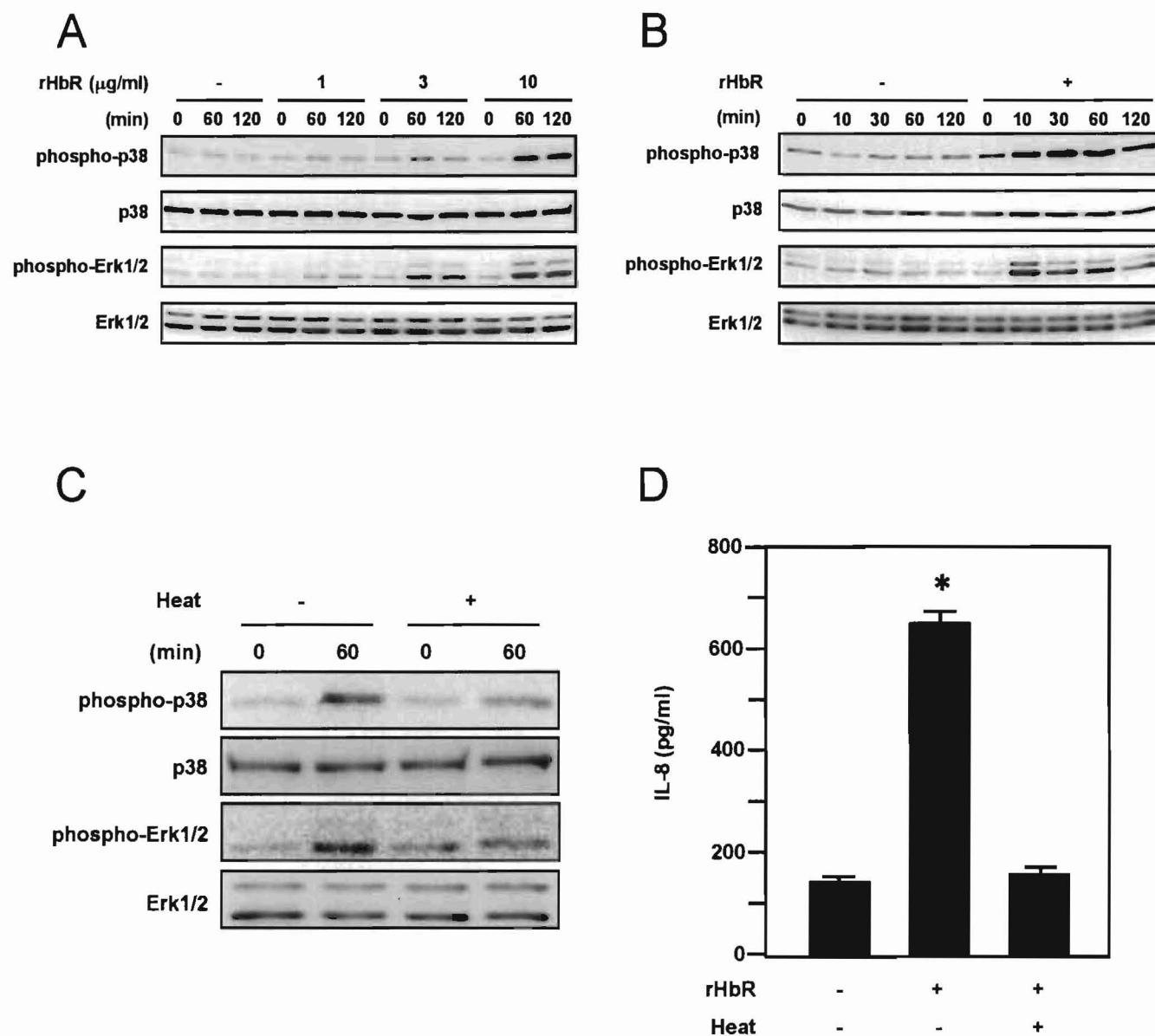


图 3.

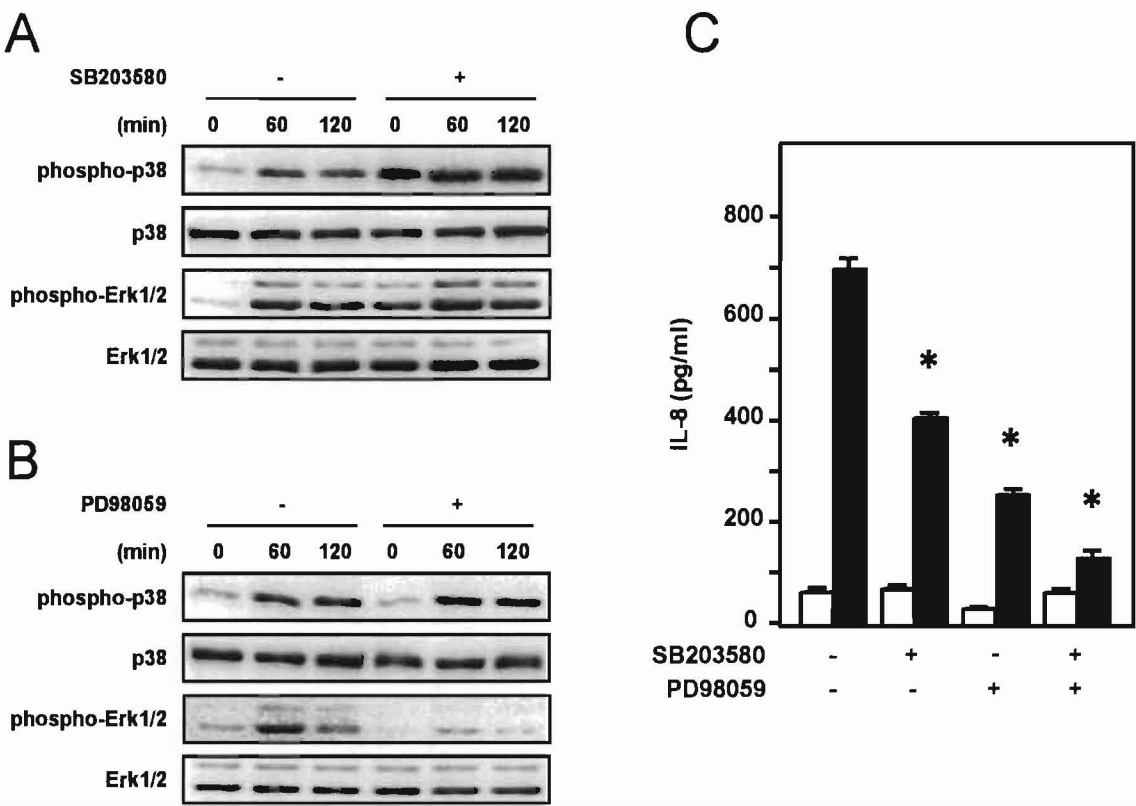


图 4.

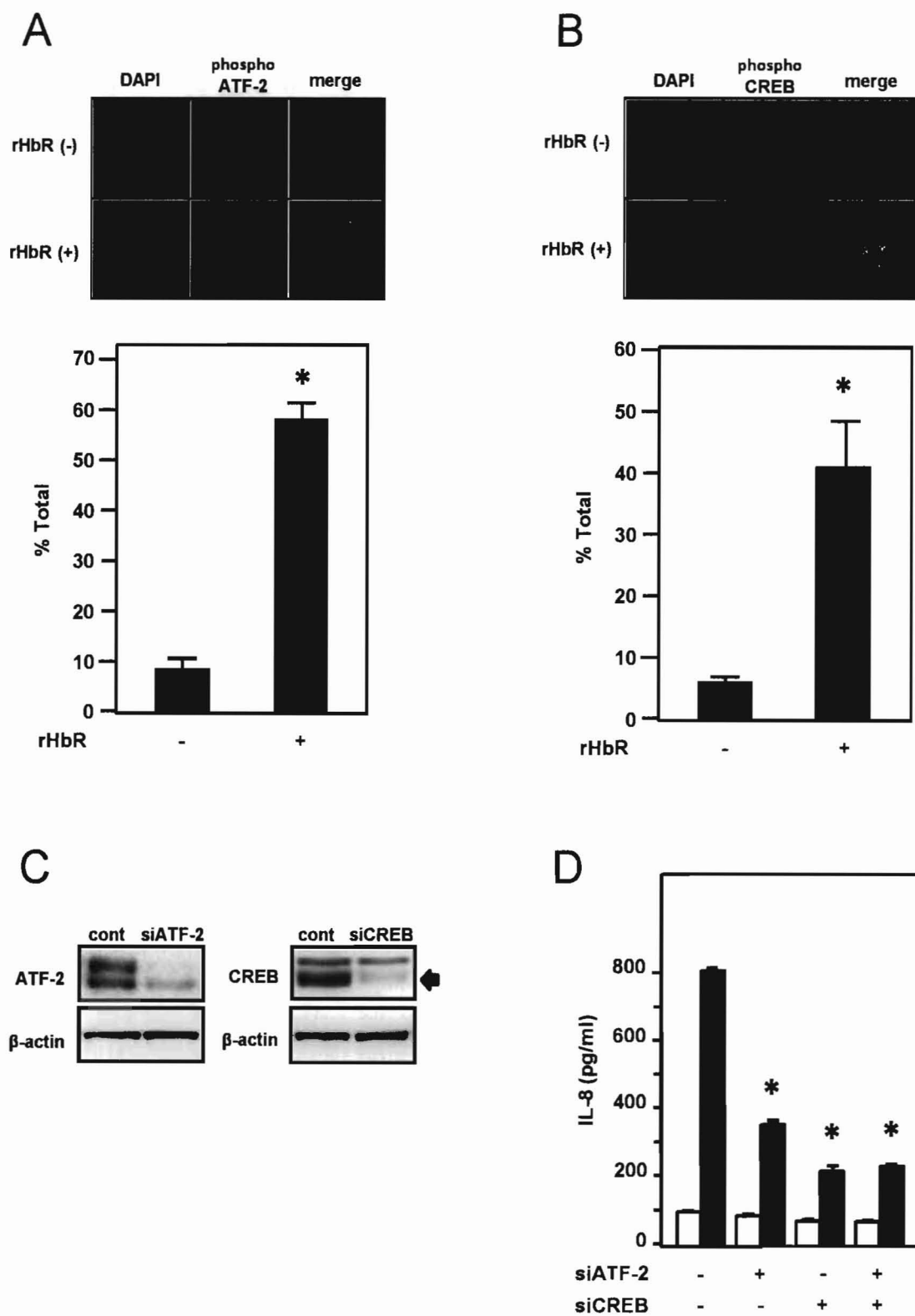


図. 5.

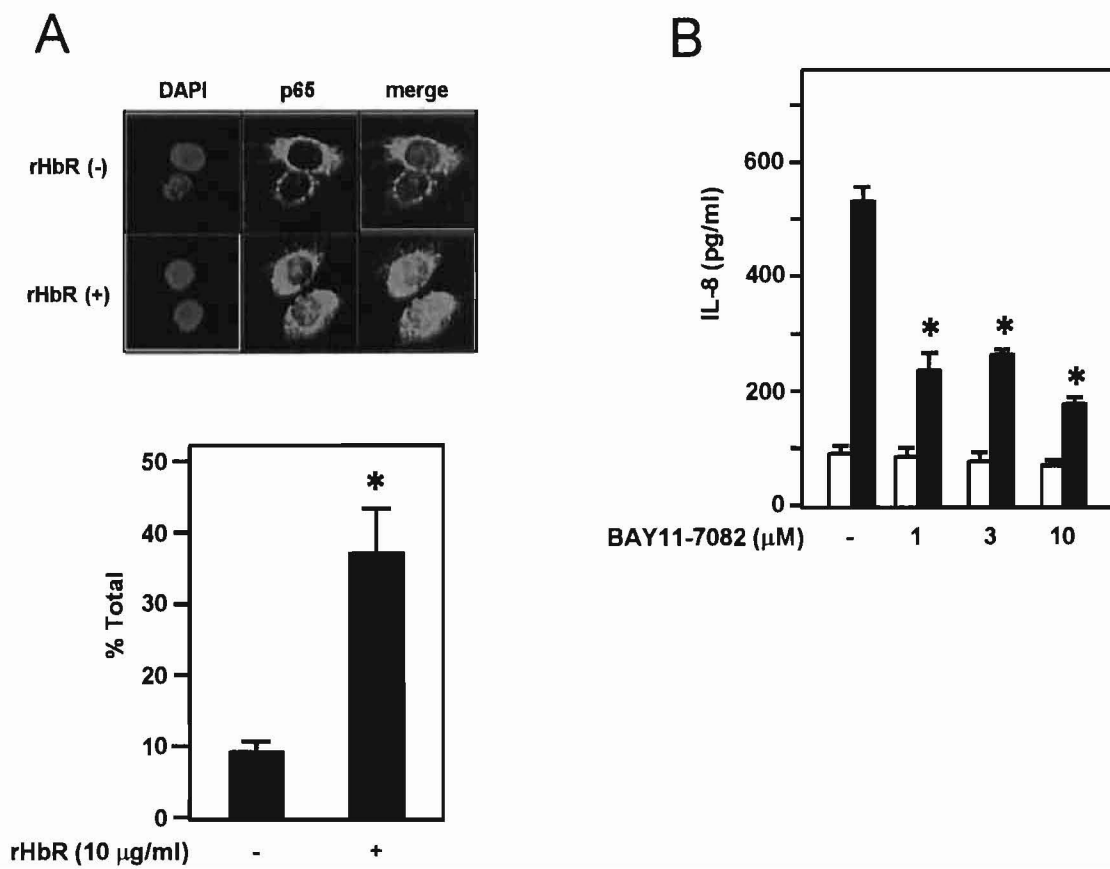
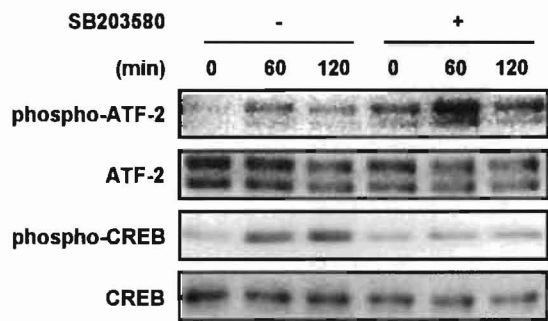
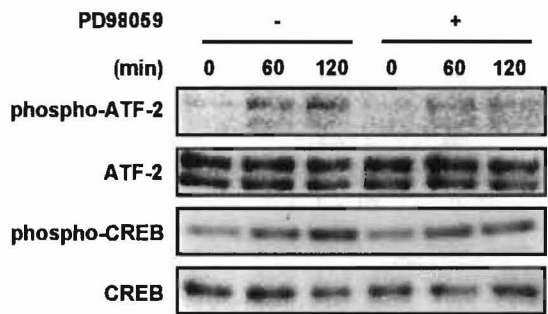


図. 6.

A



B



C

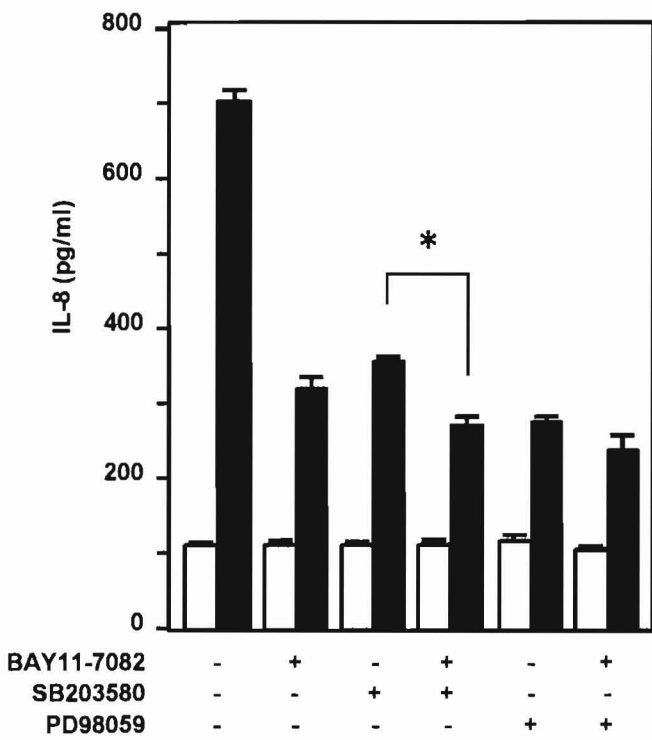


图. 7.

