ヒト歯肉線維芽細胞膜上の CD 26/dipeptidyl peptidase IV

——サイトカインおよび菌体成分による発現増強——

根本英二^{*1)}, 菅原俊二・高田春比古^{*2)}, 庄司 茂・堀内 博^{*1)}

mini review

JAPANESE JOURNAL OF INFLAMMATION

CD26/dipeptidyl peptidase IV on human gingival fibroblasts —Increase of the expression upon stimulation with cytokines and bacterial components—

CD 26/dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) is a cell surface ectoenzyme which participates in immune and inflammatory reactions. We found that CD 26 was only partially expressed on human fibroblasts from periodontal tissues, whereas fibroblasts from lung and skin expressed CD 26 constitutively as revealed by flow cytometry. We examined the possible upregulation of CD 26-expression on human gingival fibroblasts in response to various stimulants. Interleukin (IL)-1 α , tumor necrosis factor (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , lipopolysaccharide (LPS) from *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Escherichia coli* and *Prevotella* glycoprotein augmented CD 26 expression on gingival fibroblasts. Among the stimulants, IL-1 α exhibited the most potent activity. Enzymatic activity of CD 26 was also induced by stimulation on fibroblasts. The upregulation of CD 26 mRNA expression upon stimulation with IL-1 α was also revealed by a quantitative RT-PCR assay. In the kinetic experiment, 48 h and several days were required for maximum CD 26 mRNA accumulation and CD 26 molecule expression on the cell surface, respectively. The addition of cycloheximide almost completely inhibited the accumulation of CD 26 mRNA induced by IL-1 α . These results suggested that induction of CD 26 on human gingival fibroblasts is regulated at the transcriptional level, and is also dependent on a *de novo* synthesized protein factor(s).

Rec. 10/15/1999, Acc. 12/13/1999, pp597~602

Eiji Nemoto^{*1)}, Shunji Sugawara・Haruhiko Takada^{*2)},
Shigeru Shoji・Hiroshi Horiuchi^{*1)}

key words : gingival fibroblast, CD26/dipeptidyl peptidase IV, cytokines,
bacterial components

歯周病とは歯の支持組織である歯肉、歯根膜、セメント質および歯槽骨から構成される歯周組織に現れる急性および慢性の炎症である。その特徴

は図1に示したように、歯槽骨の吸収、セメント質に付着している歯肉結合組織の破壊および接合上皮の根尖側への移動(歯周ポケットの形成)などがあげられる。歯周病は、歯垢細菌あるいは歯肉溝内細菌により惹起され、その発症および進行は歯周組織における自然(非特異)免疫および獲得(特異)免疫による応答が関与している。

歯肉線維芽細胞(human gingival fibroblast :

^{*1)} Department of Endodontics and Periodontics, ^{*2)} Department of Microbiology and Immunology, Tohoku University School of Dentistry ^{*1)} 東北大学大学院歯学研究科歯内歯周療法学, ^{*2)} 同 口腔微生物学
Offprint requests to : Eiji Nemoto, Department of Endodontics and Periodontics, Tohoku University School of Dentistry, 4-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

図 1 健康および歯周炎状態の歯周組織
細菌性プラークの蓄積は歯肉結合組織、歯槽骨、および歯根膜の破壊により、歯周ポケットが形成される。

表 1 種々のヒト組織由来線維芽細胞における
CD 26 と CD 14 の発現

線維芽細胞	由来	% Positive cells		
		CD 26	(MFV)	CD 14
MH-12	歯肉	32.5	(15.0)	56.1
KEK	歯肉	32.9	(11.1)	42.3
NIK	歯肉	5.2	(5.6)	61.3
YS-G	歯肉	22.6	(5.7)	69.9
AK-G	歯肉	5.2	(4.2)	58.6
FE	歯肉	26.1	(8.4)	ND
AK	歯根膜	19.7	(3.8)	24.9
TT	歯根膜	7.7	(5.2)	ND
YS	歯根膜	11.1	(7.9)	14.6
KS	歯根膜	18.1	(4.5)	10.9
IMR-90	肺	96.9	(51.9)	1.1
WI-38	肺	88.1	(94.5)	3.9
MRC-5	肺	99.2	(95.4)	0.5
FS-4	皮膚	87.2	(88.4)	0.7
SF-MA	皮膚	80.9	(96.8)	1.9

各組織由来線維芽細胞は10%FCS加 α MEM培地で継代培養した。コンフルエントになった細胞をトリプシン-EDTA処理により回収し、CD 26 と CD 14 の発現をフローサイトメトリー法で測定した。

MFV ; mean fluorescence value, ND ; not done

HGF)は歯肉結合組織にもっとも数多く存在している細胞成分である。通常は細胞外マトリックスの生合成、修飾および分解を通じて、結合組織の恒常性を維持している。加えて HGF は、抗原提示細胞としての機能¹⁾、サイトカイン(IL-1 α , β , IL-6, TNF- α など)、ケモカイン(IL-8, MCP-1 など)の産生能²⁻⁶⁾を有し、積極的に炎症および免疫反応に関与していることが明らかにされている。

細胞膜表面酵素は、細胞外ドメインに酵素活性を有し、近年、これらが活性ペプチド、サイトカインおよび細胞膜表面抗原の分解および修飾を通じて、炎症/免疫反応および細胞の分化において重要な役割を演じていることが明らかになった⁷⁾。そのなかで CD 26 は分子量 110 KD の膜糖蛋白であり、細胞外ドメインに dipeptidyl peptidase IV (DPPIV, EC 3. 4. 14. 5)活性を有する。DPPIV は N 末端から 2 番目のプロリンあるいはアラニンをも有するペプチドに高い特異性を示し、ジペプチドを切断する⁸⁾。近年、多数の生体内活性物質が DPPIV の基質となることが相次いで報告されている。特に、ケモカインの多くは N 末端から 2 番目にプロリンあるいはアラニンを有するものが多く、RANTES⁹⁾(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), SDF-1 α ¹⁰⁾(stromal cell-derived factor-1 α), eotaxin¹¹⁾, MDC¹²⁾(macrophage-derived chemokine), および GCP-2¹³⁾(granulocyte chemotactic protein-2)などは *in vitro* 実験で、基質となりうるものが証明されている。さらに、RANTES, SDF-1 α , eotaxin および MDC においては、分解されることにより、各種ケモカインレセプターとの反応パターンが変わることが明らかにされており⁹⁾、CD 26/DPPIV の炎症/免疫反応への関与が注目されている。

本稿では、HGF の炎症反応への関与の仕組みを解明する一つのテーマとして細胞膜表面酵素である CD 26/DPPIV の発現およびその調節機構について紹介する¹⁴⁾。

図2 各刺激物質によるHGFおよびPDL細胞表面CD26の発現誘導
コンフルエントに培養したHGF(A)およびPDL(B)をIL-1 α (10 ng/ml), PMA (100 ng/ml), IFN- γ (200 U/ml), TNF- α (40 ng/ml), あるいは*E. coli* LPS (10 μ g/ml)を用いて培養し, 経時的にCD26の発現をフローサイトメトリー法で解析した. $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*) vs control

表2 各刺激によるHGFおよびPDLのCD26発現誘導(平均蛍光強度)

Cell	Mean value($\pm$ SD)						
	Day 0	Day 6					
	Control	Control	IL-1 α	TNF- α	IFN- γ	PMA	LPS
HGF	5.66($\pm$ 0.42)	9.29($\pm$ 0.47)	26.36($\pm$ 5.35)	15.77($\pm$ 0.8)	14.67($\pm$ 0.92)	17.70($\pm$ 1.71)	12.94($\pm$ 1.91)
PDL	5.30	5.58	6.33	N. D.	9.35	N. D.	4.07

図2と同様の方法で実験を行い, その発現量を平均蛍光強度であらわした.

種々のヒト組織由来線維芽細胞におけるCD26の発現(表1)

歯肉, 歯根膜, 肺および皮膚由来線維芽細胞におけるCD26の発現をフローサイトメトリー法で解析した. 肺および皮膚由来線維芽細胞では, それぞれ平均98.7%および84.1%と非常に高い発現率を示し, 構成的にCD26を発現していた. 一方, 歯周組織由来の歯肉(HGF)および歯根膜(PDL)由来線維芽細胞では, それぞれ平均20.8%および17.5%と低発現率を示した. 以上の知見はそれぞれの発現量(mean fluorescence value)とも一致していた.

歯周組織由来線維芽細胞におけるサイトカインおよび菌体成分刺激によるCD26/DPPIVの発現誘導

歯周組織由来線維芽細胞においてCD26の発

図3 各刺激物質によるHGF上のDPPIV活性の誘導

図2と同様にHGFを刺激し, 6日間培養した後, Gly-Pro pNAを基質として, DPPIV活性を測定した. $p < 0.001$ (**), $p < 0.01$ (*) vs control

図4 歯肉線維芽細胞における、種々菌体成分刺激による、DPPIV 活性の誘導

コンフルエントに培養した HGF を種々菌体成分で 6 日間培養し、Gly-Pro pNA を基質として、DPPIV 活性を測定した。E. coli LPS : E. coli O127 : B 8 より熱フェノール・水抽出した LPS, P. g. LPS : P. gingivalis 381 より熱フェノール・水抽出した LPS, P. i. LPS (PW) : P. intermedia より熱フェノール・水抽出した LPS, P. i. LPS (PCP) : P. intermedia よりフェノール・クロロホルム・石油エーテル混液抽出した LPS, P. i. PGP : P. intermedia より熱フェノール・水抽出した糖蛋白, P. g. fimbriae : P. gingivalis 線毛。p < 0.01 (**), p < 0.05 (*) vs control

図5 歯肉線維芽における、IL-1 α 刺激による CD 26/DPPIV mRNA の発現誘導
コンフルエントに培養した HGF を IL-1 α (10 ng/ml) で刺激し、経時的に RNA を抽出し定量性 RT-PCR 法で CD 26/DPPIV mRNA を測定した。Day 0 の値を 1 に換算した。p < 0.001 (**), p < 0.02 (*) vs control

図6 サイクロヘキシミドは、IL-1 α による CD 26/DPPIV mRNA の発現誘導を抑制した。

コンフルエントに培養した HGF を CHX (10 µg/ml) 存在下で IL-1 α (10 ng/ml) で 24 時間培養後 RNA を抽出し定量性 RT-PCR 法で CD 26/DPPIV mRNA を測定した。Day 0 の値を 100% に換算した。

現誘導されるかどうか検討した。HGF と PDL を IL-1 α (10 ng/ml), PMA (100 ng/ml), IFN- γ (200 U/ml), TNF- α (40 ng/ml) および E. coli LPS (10 µg/ml) で刺激した後、フローサイトメトリ法で経時的に測定した(図2)。HGF では IL-1 α において非常に強い誘導がみられ、その誘導は 6 日目前後をピークとする比較的遅い反応であった。また、他の刺激物質においても、無刺激と比べて統計学的に有意な誘導がみられた。一方、PDL では、IL-1 α , IFN- γ および E. coli LPS に

おいて、有意な発現誘導はみられなかった(図2)。また、表2に示した発現量は、ほぼおののの発現率と一致していた。また PDL に対して E. coli LPS がほとんど活性を示さなかったことは、表1に示した CD 14 の発現パターンの違い、すなわち HGF は CD 14 を高発現しているが、PDL はほとんど発現していないことに関係している可能性がある。

CD 26 は細胞膜表面酵素であるので CD 26 の発現誘導と DPPIV の活性誘導が一致するかどうか

が検討した(図3)。HGFを6日間、種々の刺激物質で培養し、Gly-Pro- α NAを基質としてDPPIV活性を測定した。その結果、図2に示したCD26の発現誘導のパターンとDPPIV活性のそれとは、ほぼ一致していた。さらに、口腔内黒色色素産生菌由来のLPSは*E. coli* LPSとは異なった生物活性を示すことが報告されている¹²⁾ので、種々の菌体成分を用いてDPPIV活性の誘導を調べた。すなわち*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)および*Prevotella intermedia* (*P.i.*)を用いて熱フェノール・水(PW)法、およびフェノール・クロロホルム・石油エーテル混液法(PCP)で抽出したLPS、*Prevotella* 表層糖蛋白(PGP)、および*P.g.*線毛蛋白(朝日大学、口腔細菌学、小川歯博より供与)を用いて同様の実験を行った(図4)。*P.g.*および*P.i.*由来LPS(PW)と*P.g.*線毛蛋白は*E. coli* LPSと比べ程度は弱い、有意な活性を誘導した。また、*P.i.* LPS(PCP)では、ほとんど活性を示さなかった。一方、PGPは*E. coli* LPSと同程度の強い活性を示した。

HGFにおけるIL-1 α 刺激によるCD26 mRNAの誘導

IL-1 α によるCD26の発現誘導が遺伝子レベルでどのように調節されているかを検討する目的で、定量性RT-PCR法を用いてmRNAの発現を経時的に測定した(図5)。約6時間で有意な誘導がみられ、48時間をピークとした強い誘導がみられた。さらにCD26の蛋白レベル(図2)とmRNAレベル(図5)における誘導が比較的遅い反応であることから、IL-1 α によるCD26の発現誘導は新生蛋白合成を必要とする反応であることが示唆された。そこで、蛋白合成阻害剤のサイクロヘキシミド(CHX 10 μ g/ml)を加えて同様の実験を行ったところ(図6)、CHXによりIL-1 α によるCD26 mRNA誘導は、ほぼ完全に阻害され、新生蛋白合成が必要であることが明らかにになった。

考 察

今回、種々の臓器/組織由来線維芽細胞を用いた

が、CD14とCD26の発現に関して肺および皮膚由来線維芽細胞と歯周組織由来線維芽細胞では異なったパターンを示した。さらに歯周組織内でもその由来の違い(歯肉および歯根膜)によってCD26の発現誘導が異なっていた。これらの知見は、線維芽細胞は組織/臓器によって形態的にも機能的にも異なるという報告¹⁶⁾を支持している。

歯肉線維芽細胞におけるCD26の発現誘導はIL-1 α がもっとも強い活性を有していたが、菌体成分においても高濃度(10 μ g/ml)では有意な誘導がみられた。LPSの生物活性はその由来によって異なるとの報告¹⁵⁾がある。実際*P. i.* LPS(PCP)はDPPIV誘導能がみられなかった。ところが*P. i.* PGP画分は強い誘導能を示し、その活性は*E. coli* LPSと同程度であった。これらの知見と壺岐ら¹⁷⁾の報告を合わせて考えると、黒色色素産生菌LPS(PW)の活性は主としてLPS画分に混在するPGPに由来するもので、黒色色素産生菌LPS自体の活性は*E. coli* LPSのそれと比べてかなり弱いと考えられる。

線維芽細胞のCD26の発現パターンは、関節リウマチや乾癬では、その発現が亢進しており¹⁸⁾、硬皮症では、低下している¹⁹⁾との報告がある。また、歯周病においても、進行の程度と歯肉溝浸出液中のDPPIV活性が相関しているという報告がある²⁰⁾。これらの知見は、線維芽細胞上のCD26/DPPIVはその酵素活性を通じて実際の生体内でも炎症反応を調節していることを示唆するものである。今後、さらに歯周病の発症と進行にCD26/DPPIVがどのように関連しているかを解明したいと考えている。

文 献

- 1) Shimabukuro Y, Murakami S, Okada H: Antigen-presenting-cell function of interferon γ -treated human gingival fibroblasts. J Periodont Res 31: 217-228, 1996.
- 2) Patil RR, Borch RF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression by human fibroblasts is both upregulated and subsequently downregulated by interleukin-1. Blood 85: 80-86, 1995.
- 3) Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP: Fibroblasts as sentinel cells: Synthesis of chemo-

- kines and regulation of inflammation. *J Immunol* 151 : 317-322, 1997.
- 4) Takada H, Mihara J, Morisaki I, Hamada S : Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides* lipopolysaccharides. *Infect Immun* 59 : 295-301, 1991.
 - 5) Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H : Lipopolysaccharides *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. *Infect Immun* 60 : 4932-4937, 1992
 - 6) Sugawara S, Sugiyama A, Nemoto E, Rikiishi H, Takada H : Heterogeneous expression and release of CD 14 by human gingival fibroblasts : Characterization and CD 14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun* 66 : 3043-3049, 1998.
 - 7) Shipp MA, Look AT : Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes : Cutting is the key! *Blood* 82 : 1052-1070, 1993.
 - 8) Meester ID, Korom S, Damme JV, Scharpe S : CD 26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* 20 : 367-375, 1999.
 - 9) Oravecz T, Pall M, Roderiquez G, Gorrell MD, Ditto M, Nguyen NY, Boykins R, Unsworth E, Norcross MA : Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD 26)-mediated cleavage. *J Exp Med* 186 : 1865-1872, 1997.
 - 10) Shioda T, Kato H, Tashiro Y, Ikegawa M, Nakayama EE, Hu H, Kato A, Sakai Y, Liu H, Honjo T, Nomoto A, Iwamoto A, Morimoto C, Nagai Y : Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) and SDF-1 β are abolished by CD 26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 6331-6336, 1998.
 - 11) Struyf S, Proost P, Schols D, De Clercq E, Opdenakker G, Lenaerts JP, Detheux M, Parmentier M, De Meester I, Scharpe S, Van Damme J : CD 26/Dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3. *J Immunol* 162 : 4903-4909, 1999.
 - 12) Proost P, Struyf S, Schols D, Opdenakker G, Sozani S, Allavena P, Mantovani A, Augustyns K, Bal G, Haemers A, Lambeir AM, Scharpe S, Van Damme J, De Meester I : Truncation of macrophage-derived chemokine by CD 26/dipeptidyl-peptidase IV beyond its predicted cleavage site affects chemotactic activity and CC chemokine receptor 4 interaction. *J Biol Chem* 274 : 3988-3993, 1999.
 - 13) Proost P, De Meester I, Schols D, Struyf S, Lambeir AM, Wuyts A, Opdenakker G, De Clercq E, Scharpe S, Van Damme J : Amino-terminal truncation of chemokines by CD 26/dipeptidyl-peptidase IV. conversion of RANTES into a potent inhibitor of monocyte chemotaxis and HIV-1-infection. *J Biol Chem* 273 : 7222-7227, 1998.
 - 14) Nemoto E, Sugawara S, Takada H, Shoji S, Horiuchi H : Increase of CD 26/Dipeptidyl peptidase IV expression on human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial components. *Infect Immun* 67 : 6225-6233, 1999.
 - 15) Hamada S, Takada H, Ogawa T, Fujiwara T, Mihara J : Lipopolysaccharides of oral anaerobes associated with chronic inflammation : chemical and immunomodulating properties. *Intern Rev Immunol* 6 : 247-261, 1990.
 - 16) Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP : Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 72 : 283-292, 1994.
 - 17) Iki K, Kawahara K, Sawamura S, Arakaki R, Sakuta T, Sugiyama A, Tamura H, Sueda T, Hamada S, Takada H : A novel component different from endotoxin extracted from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 activates lymphoid cells from C 3 H/HeJ mice and gingival fibroblasts from humans. *Infect Immun* 65 : 4531-4538, 1997.
 - 18) Raynaud F, Bauvois B, Gerbaud P, Evain-Brion D : Characterization of specific proteases associated with the surface of human skin fibroblasts, and their modulation in pathology. *J Cell Physiol* 151 : 378-385, 1992.
 - 19) Bou-Gharios G, Osman J, Amanda A, Monaghan P, Vancheeswaran R, Black C, Olsen I : Expression of ectopeptidase in scleroderma. *Ann Rheum Dis* 54 : 111-116, 1995.
 - 20) Eley BM, Cox SW : Cathepsin B/L-, elastase-, trypsin- and dipeptidylpeptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid : Correlation with clinical parameters in untreated chronic periodontitis patients. *J Periodont Res* 27 : 62-69, 1992.