

学 位 論 文

Reversible binding of heparin to high-dose LL37
eliminates its cytotoxicity with undiminished
antimicrobial and LPS-neutralizing abilities
(Heparin との可逆的な結合は抗菌活性および LPS
中和能を減弱することなく，高濃度 LL37 の細胞障
害性を改善する)

吉田 和真

広島大学大学院医歯薬保健学研究科
博士課程 医歯薬学専攻 歯学専門プログラム

2018 年度

主指導教員：柴 秀樹 教授
(医歯薬保健学研究科 歯髓生物学)

謝 辞

本研究のご指導および御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯髓生物学 柴秀樹教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究の遂行ならびに論文作成においてご指導，ご鞭撻いただきました広島大学大学院医歯薬保健学研究科小児歯科学 香西克之教授，生体分子機能学 宿南知佐教授，歯科矯正学 谷本幸太郎教授，国際歯科医学・分子腫瘍学 藤井万紀子教授，顎顔面解剖学 寺山隆司教授，また，本研究の遂行ならびに論文作成に際し，直接御指導いただきました東北大学大学院歯学研究科歯内歯周治療学部分野 鈴木茂樹講師に深く感謝いたします。また，常日頃より心温かいご支援を頂きました広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯髓生物学研究室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。最後に，勉学，研究の機会を与えると共に，常に私を支えてくれた家族に心から感謝いたします。

2018 年 12 月

広島大学大学院医歯薬学総合研究科医歯薬学専攻

吉田和真

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 145 回日本歯科保存学会秋期学術大会
(2016 年 10 月 27, 28 日, 松本)

第 147 回日本歯科保存学会秋期学術大会
(2017 年 10 月 26, 27 日, 盛岡)

第 1 章 序 論	1
第 2 章 実 験	3
第 1 節 LL37 の抗菌活性と細胞障害性の検討	3
第 1 項 概要	3
第 2 項 材料および方法	3
1) 細胞および細胞培養	
2) 抗菌活性の測定	
3) 細胞障害性の測定	
4) LL37 の細胞障害性に血清が与える影響	
第 3 項 結果	4
第 2 節 GAGs と LL37 の相互作用の検討	5
第 1 項 概要	5
第 2 項 材料および方法	5
1) GAG-LL37 complexes の調製	
2) GAG-LL37 complexes の抗菌活性 および細胞障害性の検討	

3) GAGs と LL37 の結合の検討

4) GAG-LL37 complexes のう蝕原性

および歯周病原性細菌への抗菌活性

第 3 項 結果 6

第 3 節 GAGs による LL37 細胞障害性抑制機序

の検討 8

第 1 項 概要 8

第 2 項 材料および方法 8

1) 細胞および培養条件

2) LL37 の細胞障害作用の検討

3) LL37 の hDPCs ならびに MG-63 に

おける局在の検討

第 3 項 結果 9

第 4 節 LL37 への Heparin 結合が LPS 中和能へ

およぼす影響の検討 11

第 1 項 概要 11

第 2 項	材料および方法	11
	1) 細胞および培養条件	
	2) LDH assay	
	3) ELISA 法	
	4) Quantitative PCR (qPCR) 法	
第 3 項	結果	12
第 5 節	Heparin と LL37 の結合様式の検討	14
第 1 項	概要	14
第 2 項	材料および方法	14
	1) 細胞および培養条件	
	2) Heparin-LL37 agarose beads complexes の 作製	
	3) Heparin-LL37 agarose beads complexes の 中の LL37 と LPS の会合の検討	
	4) Solid phase binding assay	
	5) Heparin agarose beads complexes の 抗菌活性および細胞障害性の検討	

6) ELISA 法

第 3 項 結果	15
第 3 章 考察	17
第 4 章 総括	20
参考文献	21
図の説明	26
図	30

第1章 序論

歯髄炎は主に深在性う蝕に起因する [1-3]。う窩最深部がエナメル象牙境を超えると、口腔内細菌やその産生物が象牙細管を通じて、歯髄細胞や象牙芽細胞、マクロファージなどを刺激し、歯髄腔内での炎症性反応を引き起こす [2-4]。歯髄腔は象牙質、エナメル質、セメント質といった硬組織に囲まれた閉鎖空間であるため内圧が高まりやすく、十分な側副循環に欠けることから、炎症が急性化しやすい組織と考えられている [2, 3]。歯髄組織の主体をなす細胞成分である歯髄細胞は、硬組織形成細胞に分化する能力を保持し歯髄組織修復に主体的に関与する [4]。また歯髄細胞は、*in vitro* において口腔内グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS) 刺激により炎症性サイトカインを放出することが知られており [5, 6]、硬組織形成のみならず歯髄炎の発症過程に関与していると推定されている。また、マウス臼歯の非露髄性象牙質窩洞への LPS 塗布によって歯髄炎が惹起されることが報告されており [7]、口腔内細菌そのもののみならず、LPS が歯髄炎の発症に主体的に関与していると考えられている。このような背景から、口腔内細菌に対する抗菌活性と LPS 中和能を併せ持つ薬剤のう蝕や歯髄炎への利用は、歯髄炎の発症および不可逆化抑制に対して非常に有効である。

抗菌ペプチド (Antimicrobial peptides, AMPs) は 5~50 程度のアミノ酸で構成され、原核生物から真核生物まで様々な生物によって合成・分泌されている [8-10]。AMPs の抗菌メカニズムは細胞膜や細胞壁を直接的に傷害することによって発揮されると考えられており、一般的に抗生剤と比較して耐性菌の発生が非常に少ないとされる [8~10]。また、一部の AMPs は抗菌活性だけではなく、自然免疫と獲得免疫の中間の作用を示し、過剰な免疫応答を抑制し、有益な反応を増強することによって宿主が感染を制御することを可能にする [8, 9, 11]。

LL37 は Cathelicidin family に属する AMPs の一つで比較的低濃度 (0.02 μM) から広範な抗菌活性を有するとともに LPS 中和能や血管新生能を有することが報告されており [8, 11-13]、以前より臨床応用が大いに期待されている。その一方で、*in vitro* および *in vivo* において至適濃度より高濃度の LL37 は、宿主細胞に取り込まれる際に細胞膜を穿孔する pore-formation mechanism と、細胞内において apoptosis pathway を活性化する双方の機序

により宿主細胞障害性を呈することから [8, 13, 14], 厳密な局所濃度管理が困難な *in vivo* においては, 至適濃度を維持しつつ, 細胞障害性を示さない濃度を長期間維持するのが困難である。このような背景から, LL37 単体での臨床応用は実現していない。これまでに, LL37 のアミノ酸配列を一部置換して立体構造を改変または基質に固相化することによって, 抗菌活性を維持しつつ細胞障害性を改善する試みがなされてきているものの [15-22], 臨床応用に至る成果は得られていない [23]。一方で, LL37 は cationic nature であるため, anionic molecule である Glycosaminoglycans (GAGs) や DNA, anionic polymer などと電気的に結合することが知られている [24, 25]。

本研究では, 主要な GAGs である heparin, chondroitin sulfate (CS), hyaluronic acid (HA) を結合体として LL37 に添加することで, 抗菌活性や LPS 中和能を減弱することなく, 細胞障害性を低減した複合体の作製を行うことを目的として, 種々の GAG-LL37 complexes を作製し, それらの抗菌活性, LPS 中和能, 細胞障害性を検討した。

第 2 章 実験

第 1 節 LL37 の抗菌活性と細胞障害性の検討

第 1 項 概要

抗菌ペプチド LL37 の大腸菌に対する抗菌活性および哺乳類細胞に対する細胞障害性を評価した。

第 2 項 材料および方法

1) 細胞および細胞培養

大腸菌は HST08 competent cells (Takara, Kyoto, Japan) を kanamycin (wako, Tokyo, Japan) 耐性遺伝子含有ベクターで形質転換したものを使用し, kanamycin 含有 Luria-Bertani (LB) 液体培地 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) にて培養した。

哺乳類細胞は MG-63 ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株とヒト歯髓細胞 (hDPCs) を使用した。MG-63 は理研セルバンク (Tsukuba, Japan) から購入した。hDPCs は, 広島大学疫学研究倫理委員会規程を遵守し, 歯科矯正治療に伴う便宜抜去歯の歯髓から分離培養した。抜去歯の歯髓腔から無菌的に歯髓組織を取り出した後にメスで細切にし, collagenase (wako) および dispase (wako) で処理した。続いて, 培養皿に播種し, out growth してきた細胞を hDPCs として実験に供した。培養には 10 % fetal bovine serum (FBS) (biowest, Nuaille, France), 1 % penicillin-streptomycin (PS) (wako) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Thermo fisher scientific, Waltham, MA) を用いた。細胞は湿潤下 5 % CO₂, 37 °C の条件下で維持した。

2) 抗菌活性の測定

濁度測定によって大腸菌を 1.0 x 10⁴ cells/ml の濃度で 10 mM sodium phosphate buffer (NaPi, pH=6.8) に懸濁した。100 μl の 0 ~ 10 μM LL37 (AnaSpec, Fremont, CA) に 5 μl の大腸菌懸濁液を混和し, 混合溶液を 37 °C で 2 時間振とう培養した後に, kanamycin 含有 LB 寒天

(Sigma Aldrich) 培地に大腸菌を播種した。37 °C で 16 時間培養後に colony forming unit (CFU) によって LL37 の抗菌活性を測定した。

3) 細胞障害性の測定

hDPCs を 1×10^4 cells/well および MG-63 を 2×10^3 cells/well の濃度で 96 well plate に播種し、10 % FBS 含有培地で 24 時間静置した。さらに、無血清条件下で 24 時間静置した後に、0 ~ 40 μ M の LL37 で 24 時間刺激した。その後、MTT cell proliferation assay (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) によって細胞生存率を測定した。

4) LL37 の細胞障害性に血清が与える影響の検討

前項に記載のように血清飢餓状態にした細胞を、種々の FBS 濃度 (0 ~ 10 %) および種々の LL37 (0 ~ 40 μ M) で刺激した際の細胞生存率を測定し、LL37 の細胞障害性に与える FBS の影響を検討した。

第 3 項 結果

大腸菌 (*E. coli* HST-08) に対する LL37 の抗菌活性は 0.1 μ M の低濃度から発揮され、0.5 μ M では寒天培地上にコロニーが観察されなかった (図 1)。

hDPCs および MG-63 に対する LL37 の細胞障害性は濃度依存的に発揮され、10 μ M 以上の高濃度では細胞生存率は LL37 無刺激群と比較して 10 % 以下になった (図 2)。

FBS 存在下での LL37 の細胞障害性は、hDPCs では FBS 濃度依存的に減少し、MG-63 では FBS の濃度に影響を受けなかった (図 3)。これら結果から、LL37 の細胞障害性に対する感受性は細胞によって異なることが明らかとなった。

第 2 節 GAGs と LL37 の相互作用の検討

第 1 項 概要

LL37 の有する抗菌活性を保持したまま宿主細胞障害性を改善するために、GAGs を高濃度 LL37 (10 μ M) と混合させて GAG-LL37 complexes を作製し、GAG-LL37 complexes の有する抗菌活性と細胞障害性について検討した。また、GAG-LL37 complexes を非変性および変性条件下でタンパク泳動し、抗 LL37 特異抗体を用いた Western blotting で GAGs と LL37 の結合状態について解析した。

第 2 項 材料および方法

1) GAG-LL37 complexes の調製

Heparin (H3149, Sigma Aldrich), Chondroitin sulfate (C4384, Sigma Aldrich, 以下 CS), および Hyaluronic acid (H5388, Sigma Aldrich, 以下 HA) の 3 種類の GAGs を本実験に供試した。各 GAGs (0 ~ 100 μ g/ml) と LL37 (10 μ M) を室温にて 1 時間転倒混和したものを GAG-LL37 complexes として実験に使用した。

2) GAG-LL37 complexes の抗菌活性および細胞障害性の検討

第 2 章 第 2 項 2) および 3) と同様に検討を行った。

3) GAGs と LL37 の結合の検討

変性条件下では NuPAGE® Bis-Tris 4-12 % Gel (Thermo Fisher Scientific) と NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (Thermo Fisher Scientific), 非変性条件下では NuPAGE® Tris-Acetate 3-8 % Gel (Thermo Fisher Scientific) と Novex™ Tris-Glycine Native Running Buffer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。Thermo Fisher Scientific の推奨する電圧および時間で泳動を行い、PVDF 膜 (wako) に転写した後、ウサギ抗ヒト LL37 抗体 (AnaSpec) を使用した Western blotting によって GAGs と LL37 の結合状態について検討を行った。

4) GAG-LL37 complexes のう蝕原性および歯周病原性細菌への抗菌活性

以下のう蝕原性・歯周病原性細菌および大腸菌に対して GAG-LL37

complexes の抗菌活性の検討を行った。菌種は *Escherichia coli* XL-II (Life Technologies), *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* OMZ176, *Streptococcus salivarius* GTC215, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* HK1651 および IDH781 を使用した。第 2 章 第 2 項 2) と同様に抗菌活性を調べた。

第 3 項 結果

2 $\mu\text{g/ml}$ 以上の Heparin と LL37 (10 μM) の複合体は、Heparin および LL37 無添加である対照群と比較して hDPCs と MG-63 に対する細胞生存率に有意な差を認めなかった (図 4)。9 $\mu\text{g/ml}$ 以上の Heparin と LL37 の複合体は抗菌活性を示さなかった (図 4)。これら実験結果から、2 ~ 8 $\mu\text{g/ml}$ の Heparin と LL37 の複合体は、抗菌活性を示しつつ hDPCs と MG-63 に対する細胞障害性を示さないことが明らかとなった (図 4)。

3 $\mu\text{g/ml}$ 以上の CS と LL37 (10 μM) の複合体は CS および LL37 無添加である対照群と比較して細胞生存率に有意な差を認めなかった (図 5)。4 $\mu\text{g/ml}$ 以上の CS と LL37 の複合体は抗菌活性を示さなかった (図 5)。これら実験結果から、3 $\mu\text{g/ml}$ の CS と LL37 の複合体は、抗菌活性を示しつつ細胞障害性を示さないことが明らかとなった (図 5)。

種々濃度の HA を用いて作製した HA-LL37 complexes は、Heparin や CS と比較して高い濃度 (100 $\mu\text{g/ml}$) の HA を用いても、LL37 の細胞障害性を改善する効果を認めなかった (図 6)。

引き続き、各 GAGs (5 $\mu\text{g/ml}$) と LL37 (10 μM) を一定比で混和し作製した GAG-LL37 complexes を未変性および変性下でタンパク質泳動し、単体として存在している LL37 の絶対量を LL37 の分子量である 4.5 kDa のバンド濃淡を用いて定量したところ、未変性下では、Heparin-LL37 complexes および CS-LL37 complexes では著明な減少を示した。変性条件下で GAGs-LL37 complexes を解離させた時の LL37 量を 100 % として表すと、GAG と結合している LL37 の割合は、Heparin, CS, HA においてそれぞれ 89.0 %, 43.2 %, 0 % であった (図 7)。

続いて、様々な Heparin 濃度で作製した Heparin-LL37 complexes を用いて、う蝕原性細菌および歯周病原細菌に対する抗菌活性を検討したところ、

S. mutans UA159, *S. salivarius* GTC215, *A. actinomycetemcomitans* IDH781, *E. coli* XL-II に対しては 10 µg/ml の Heparin を用いて作製した Heparin-LL37 complexes においても有意な抗菌活性を示した (図 8)。一方, *A. actinomycetemcomitans* HK1651 に対しては 2~8 µg/ml の Heparin と LL37 で作製した複合体が, *S. sobrinus* OMZ176 に対しては 2~6 µg/ml の Heparin と LL37 で作製した複合体がそれぞれ抗菌活性を示した (図 8)。これら結果と図 4 を勘案し, 2~6 µg/ml の Heparin と LL37 で作製した複合体が, グラム陰性陽性を問わず様々な菌に対して抗菌活性を維持しつつ, 細胞障害性を低減する濃度であることが明らかとなった。

第 3 節 GAGs による LL37 細胞障害性抑制機序の検討

第 1 項 概要

LL37 の宿主細胞障害性は、取り込まれる際に細胞膜を穿孔する pore-formation mechanism と、細胞内において apoptosis pathway を活性化する双方の機序によって引き起こされることから、GAGs の LL37 への結合が LL37 の細胞障害性を抑制するメカニズムについて検討した。

第 2 項 材料および方法

1) 細胞および培養条件

第 2 節 第 2 項 3) と同様に培養を行った。

2) LL37 の細胞障害作用の検討

hDPCs を LL37 (10 μ M) および種々の濃度の Heparin と LL37 (10 μ M) の complexes で刺激した際の細胞生存率は MTT assay によって評価した。

LL37 および種々の Heparin-LL37 complexes による hDPCs への細胞障害性は Cytotoxicity Detection Kit (Takara) を用いて、細胞膜破壊の際に放出される乳酸脱水素酵素 (LDH) を定量し、評価した。hDPCs を 1.0×10^4 cells/well の濃度で 96 well plate に播種し、10 % FBS 含有培地で 24 時間静置した。続いて、無血清条件下で 24 時間静置した後に、さらに 0 ~ 40 μ M の LL37 で 24 時間刺激し細胞上清を回収した。回収した上清を等量の detection buffer と混合し室温で 20 分間保温し、プレートリーダー (Varioskan Flash, Thermo fisher scientific) を用いて 490 nm の吸光度とリファレンス波長として 600 nm の吸光度を測定した。1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich) で刺激した際の LDH 放出を 100 % として表示した。

次に、Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, Madison, WI) を用いて LL37 および種々の Heparin-LL37 complexes による hDPCs における apoptosis pathway の活性化を検討した。hDPCs を上記 LDH assay と同様に培養・刺激し回収した培養上清を等

量の detection buffer と混合し、室温で 16 時間保温した後に、プレートリーダー (Varioskan Flash) を用いて、励起波長 499 nm, 蛍光波長 521 nm で測定した。apoptosis pathway 活性化試薬である Actinomycin D (10 ng/ml, wako) で刺激した hDPCs を positive control とした。

3) LL37 の hDPCs ならびに MG-63 における局在の検討

LL37 単体および Heparin-LL37 complexes を hDPCs ならびに MG-63 に添加したこれら細胞における LL37 の局在を、ウサギ抗ヒト LL37 抗体を用いた蛍光免疫染色で検討した。hDPCs および MG-63 をそれぞれ 3.0×10^4 cells/well, 1.5×10^4 cells/well の濃度で 8 well ノンコートチャンバースライド (Matsunami, Osaka, Japan) に播種し、10 % FBS 含有培地で 24 時間静置し接着させた。続いて、無血清条件下で 24 時間静置後、10 μ M の LL37, Heparin-LL37 complexes (5 μ g/ml-10 μ M), および Heparin 単体 (5 μ g/ml) でさらに 24 時間刺激した。37 °C に加温した 4 % Paraformaldehyde / PBS (nacalai tesque, Kyoto, Japan) によって 10 分間細胞を固定し、0.5 % Triton X-100 / PBS によって 10 分間透過処理を行い、1 % BSA, 10 % normal goat serum / PBS によって 4 °C で 16 時間ブロッキングし、ウサギ抗ヒト LL37 抗体 (1:250) を 4 °C で 16 時間反応させた。続いて、Cy3®-conjugated 抗ウサギ抗体 (Thermo Fisher Scientific) (1:1000) を室温で 1 時間反応させた後に、100 nM Acti-stain 488 phalloidin (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO) を室温で 30 分反応させ、ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific) を用いて封入した。封入剤硬化後、FV 1000-D 共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) によって、LL37 の細胞局在を観察した。

第 3 項 結果

図 2 と同様に LL37 濃度依存的に hDPCs の生存率が低下する条件下 (図 9 上段) において hDPCs から放出される LDH 量は、LL37 の濃度依存的に増加した (図 9 中段)。一方、hDPCs における apoptosis pathway 活性は LL37 によって誘導されなかった (図 9 下段)。これらの結果から、LL37 による hDPCs に対する障害性は、apoptosis pathway 活性を誘導する機構でな

く、直接的に細胞膜を傷害することによって生じることが明らかとなった。

続いて、hDPCs および MG-63 に対する蛍光免疫染色を用いた検討 (図 10) から、Heparin 単独刺激群や対照群において細胞は伸展したアクチン繊維が明視される紡錘形を示した。LL37 単独刺激群においては、hDPCs および MG-63 はともに萎縮し、細胞内容物の漏出や細胞の断片化が見られ、明らかな細胞傷害性が観察された。その一方、Heparin-LL37 complexes 刺激群では、hDPCs および MG-63 の細胞形態は Heparin 単独刺激群や対照群同様に紡錘形を保持されており、添加した LL37 が細胞膜近傍および細胞内局在に観察された。これらの結果から、Heparin は LL37 の細胞膜傷害損傷を防ぐことによって、細胞障害性を低減していることが明らかとなった。

続いて、Heparin-LL37 complexes による LL37 による細胞障害性抑制を LDH assay によって定量的に検討した。hDPCs および MG-63 からの LDH の放出量は LL37 と結合させる Heparin の濃度依存的に低下した (図 11)。

第 4 節 LL37 への Heparin 結合が LPS 中和能へおよぼす影響の検討

第 1 項 概要

Heparin-LL37 complexes の LPS 中和能を検討するために、マクロファージ様細胞を Heparin-LL37 complexes 存在下で LPS 刺激した際の各種炎症性サイトカイン発現を qPCR 法および ELISA 法によって測定した。

第 2 項 材料および方法

1) 細胞と培養条件

ヒト急性単球性白血病細胞株 THP-1 は理研セルバンク (Tsukuba, Japan) から購入した。培養には非働化 10 % FBS, 1 % penicillin-streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine 含有 RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。細胞は湿潤下 5 % CO₂, 37 °C の条件下で維持した。

2) LDH assay

ヒト急性単球性白血病細胞を LL37 (10 μM), Heparin-LL37 complexes (5 μg/ml-10 μM), Heparin (5 μg/ml) で刺激した際の LDH 放出量を第 3 章 第 2 項 2) と同様に測定した。

3) ELISA 法

5.0 x 10⁵ cells/well の濃度でヒト急性単球性白血病細胞を 24 well plate に播種し 30.8 ng/ml の Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) (wako) で 24 時間刺激し、マクロファージ様細胞へ分化誘導した。その後、無血清培地で洗浄後、1 μg/ml LPS (Sigma Aldrich) および LL37 (10 μM), Heparin-LL37 complexes (5 μg/ml-10 μM), Heparin (5 μg/ml) で分化させたマクロファージ様細胞を 24 時間刺激した後に培養上清を回収した。培地上清中に含まれる TNFα 量を Human TNF-alpha Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA) を用いて測定した。

4) Quantitative PCR (qPCR) 法

前項と同様に刺激したマクロファージ様細胞から RNAiso Plus (Takara) を用いて total RNA を回収した。total RNA (0.5 μg) を ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo,

Osaka, Japan) を用いて逆転写を行い cDNA を作製した。続いて、KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEMS, Wilmington, MA) を用いて *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6* の遺伝子発現を qPCR 法で評価した。内部標準として *GAPDH* を使用した。使用したプライマーの塩基配列は、*TNF α* forward (5'-TGCTTGTTCCCTCAGCCTCTT-3'), reverse (5'-TGGGGAACTCTTCCCTCTG-3'), *IL-1 β* forward (5'-TCCAGGAGAATGACCTGAGC-3'), reverse (5'-GTGATCGTACAGGTGCATCG-3'), *IL-6* forward (5'-TACATCCTCGACGGCATCTC-3'), reverse (5'-TTTCAGCCATCTTTGGAAGG-3'), *GAPDH* forward (5'-TCGTGGAAGGACTCATGACC-3'), reverse (5'-GAGGCAGGGATGATGTTCTG-3') である。

第 3 項 結果

マクロファージ様細胞を LL37 で単体刺激すると、細胞膜破壊剤である Triton X-100 と同等の LDH 放出量を認めたことから、LL37 単独ではマクロファージ様細胞の細胞死が誘導されることが明らかとなった (図 12)。この結果より、以降の ELISA 法や qPCR 法での検討において LL37 単独刺激群は実験から除外した。一方、マクロファージ様細胞を Heparin-LL37 complexes で刺激すると、LL37 単独刺激と比較して LDH 放出量の著しい抑制を認め、マクロファージ様細胞が生存しうるということが明らかとなった (図 12)。

続いて、ELISA 法を用いて、LPS 単独、LPS と Heparin-LL37 complexes, Heparin 単独刺激によるマクロファージ様細胞からの TNF α 産生量を検討したところ、LPS によって上昇する TNF α 産生は Heparin-LL37 complexes によって有意に減少するものの Heparin 単独では減少しなかった (図 13)。続いて、qPCR 法により、炎症性サイトカイン *TNF α* , *IL-1 β* , *IL-6* の遺伝子発現を検討したところ、Heparin-LL37 complexes は LPS によって上昇したこれら炎症性サイトカイン遺伝子発現を有意に抑制させた (図 14)。興味深いことに、*IL-1 β* と *IL-6* の遺伝子発現は検出できないレベルまで抑制されていたのに対して、*TNF α* の遺伝子発現の抑制レベルはおおよそ半減であっ

た (図 14)。これらの結果から, Heparin-LL37 complexes が LPS 中和能を有していることが判明した。

第 5 節 Heparin と LL37 の結合様式の検討

第 1 項 概要

上記第 4 節までに得られた結果から，至適 Heparin 濃度を用いて作製した Heparin-LL37 complexes は，細胞障害性を低減しつつも抗菌活性および LPS 中和能を保持する理想的な炎症制御物質となりうることが示された。しかしながら，作製した Heparin-LL37 complexes には図 7 に示す通り，Heparin に結合しない，もしくは Heparin への結合が弱い LL37 が含まれている。そこで本節では，Heparin-LL37 complexes の抗菌活性および LPS 中和能が Heparin と結合した LL37 によって惹起されているか否かを Heparin agarose beads と複合させた LL37 を用いて検討した。

第 2 項 材料および方法

1) 細胞と培養条件

細胞は hDPCs, MG-63 およびマクロファージ様細胞を使用した。培養条件は第 2 章 第 1 節 第 2 項 1) および第 2 章 第 4 節 第 2 項 1) と同様に行った。

2) Heparin-LL37 agarose beads complexes の作製

Heparin agarose beads (Heparin 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 相当) (Sigma Aldrich) と LL37 (10 μM) を室温で 1 時間転倒混和した後に，3 回洗浄し，未結合の遊離した LL37 を除去した Heparin-LL37 agarose beads complexes を作製し実験に供した。Control として，LL37 が結合していない Heparin agarose beads 単体を使用した。

3) Heparin-LL37 agarose beads complexes 中の LL37 と LPS の会合の検討

Heparin-LL37 agarose beads complexes と 0~200 μg の LPS を混合し，室温で 1 時間転倒混和した後に agarose beads を洗浄した。続いて，agarose beads を LDS sample buffer で 70 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間 boiling し，遠心後の上清中に存在する LL37 量を，ウサギ抗ヒト LL37 抗体を用いた Western blotting によって定量した。同等量の Heparin agarose

beads を各サンプルに使用しているかを確認する目的で、Heparin agarose beads 中に存在する Heparin 量を colorimetric assay によって測定した。

4) Solid phase binding assay

Heparin と LL37, LPS の直接的相互作用の有無を検討するため、Heparin および LL37 を固相化した solid phase binding assay を行った。タンパク高吸着 96 well plate (Thermo Fisher Scientific) に Heparin (100 µg/ml) または LL37 (0.5 µg/ml) を固相化した後、Pierce™ Protein-Free (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher Scientific) で室温 1 時間ブロッキングした後に、0 ~ 1000 pg の biotinylated LPS (LPS-EB Biotin, Invivo Gen, San Diego, CA) を各ウェルに添加し 4 °C で 16 時間反応させた。引き続き、ウェルを PBS で洗浄し、HRP-conjugated streptavidin peroxidase (Streptavidin-Peroxidase Polymer, Ultrasensitive, S2438, Sigma) (1:1000) を添加した後に、20 分間 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) を反応させ、結合している biotinylated LPS を検出した。2N HCl を用いて反応を停止させた後に、プレートリーダー (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

5) Heparin-LL37 agarose beads complexes の抗菌活性および細胞障害性の検討

第 2 章 第 2 項 2) および 3) と同様に実験を行った。

6) ELISA 法

第 4 章 第 2 項 3) と同様に実験を行った。

第 3 項 結果

各サンプルには同等量の Heparin agarose beads が使用されていた (図 15)。Heparin-LL37 agarose beads complexes に存在する LL37 は、添加する LPS の濃度が高くなるにつれて減少したことから、LPS は Heparin-LL37 の結合を競合的に阻害していることが明らかとなった (図 15)。続いて、この拮抗的阻害が、LPS への Heparin または LL37 いずれへの結合により惹起されているかを、Heparin または LL37 を固相化したプレートへの LPS 結合を Solid phase binding assay によって検討したところ、LL37 固相

化ウェルでは LPS の濃度依存的に吸光度が増加したが、Heparin 群では吸光度に変化が見られなかったことから (図 16), LPS は Heparin ではなく, LL37 と結合することで Heparin-LL37 結合を拮抗阻害していることが明らかとなった。

続いて, Heparin-LL37 agarose beads complexes の細胞障害性を hDPCs と MG-63 を用いて検討したところ, Heparin-LL37 agarose beads complexes は Heparin agarose beads と同様に宿主細胞への障害性を示さなかった。一方で, Heparin-LL37 agarose beads complexes は LL37 同様の抗菌活性を示したが, Heparin agarose beads は示さなかった (図 17)。ELISA 法によって Heparin-LL37 agarose beads complexes の LPS 中和能を検討したところ, Heparin-LL37 agarose beads complexes は LPS によって上昇したマクロファージ様細胞からの TNF α 産生量を LL37 単独群と同様に有意に減少させたが, Heparin agarose beads は減少させなかった (図 18)。これら実験結果から, Heparin-LL37 complexes の抗菌活性および LPS 中和能は, Heparin と直接会合した LL37 によって発揮されていることが示された。

第 3 章 考察

本研究において、Heparin と LL37 の至適濃度での複合体の形成によって、抗菌活性および LPS 中和能を維持したまま、LL37 の細胞障害性を減弱することができることが明らかとなった。さらには、LPS は競合的に Heparin-LL37 complexes から LL37 を遊離させ、遊離した LL37 は遊離後も LPS 中和能を保持していたことから、Heparin-LL37 complexes は周囲の LPS 量に依存して LL37 を放出できることが示された。

これまでの先行研究から、血清の添加は LL37 の細胞障害性に影響を与えないとされてきた [26]。本研究においても、MG-63 に対しては血清濃度を 10 % に上げて LL37 の IC50 は大きく改善しなかった。一方で、hDPCs は MG-63 と比較して、LL37 への感受性が低く、血清添加によって LL37 への感受性のさらなる低下を示した (図 3)。これは、hDPCs は GAGs に富んだ proteoglycan-rich な歯髄組織を形成する主要な細胞成分であり [27]、その分泌が血清添加によって増強されたためと推定される。

DNA, GAGs および polyanionic polymers などの陰性荷電分子は陽性に帯電した AMPs と電気的に結合することが報告されている [28, 29, 30]。実際、嚢胞性線維症の肺組織において、損傷部位を GAG-分解酵素で処理すると内因性 LL37 が活性化することが知られている [29]。CS や HA と比較して Heparin の LL37 への結合が、抗菌活性を維持しつつ LL37 の細胞障害性を低減させた (図 4, 5, 6)。その差異はこれら GAGs の LL37 への結合能の差異によると考えられた (図 7)。さらには、CS-LL37 complexes (5 μ g/ml-10 μ M) では、Heparin-LL37 complexes と比較して遊離 LL37 が多く残存していたが抗菌活性を保持しなかったこと、ならびに遊離 LL37 を除去した Heparin-LL37 agarose beads complexes が抗菌活性を示したことから、遊離 LL37 でなく Heparin と会合している LL37 が抗菌活性の主体であることが明らかになった (図 17)。

AMPs による抗菌活性メカニズムはこれまで多くのモデルが提唱されてきたが、現在では 3 つの細菌細胞膜溶解機構 (Carpet model, Barrel-stave model および Toroidal pore model) に集約される [31]。この中で、LL37 は Carpet model に基づく抗菌活性を誘導すると考えられている [32, 33]。Carpet model では、AMPs はその疎水性領域を介して細菌細胞膜に結合し、

凝集した AMPs が次第に細胞膜を破壊する結果、細菌表層に Pore-formation を起こすという機序であり、理論的には LL37 は露出した α -helix 構造を必要としない [34, 35]。実際に、LL37 は溶液中で球状構造として存在している。しかしながら、陰性荷電分子や親油性膜に電氣的に結合したときに α -helix 構造を伸張させる [32]。このような知見から、Heparin-LL37 complexes 中の LL37 は、LL37 単体を取る球状構造とは異なり、Heparin と結合することで α -helix 構造を伸張させた構造が維持されていると推定される。親水性の α -helix 構造を取る AMPs の細菌細胞膜溶解機構は Barrel-stave model で説明される [31]。グラム陰性菌では主に LPS、グラム陽性菌では主にタイコ酸で細菌細胞膜表層は陰性に荷電している [36]。Heparin-LL37 complexes が LPS またはタイコ酸との電氣的結合により細菌細胞膜表面に会合すると、Heparin-LL37 complexes 中の LL37 は、伸張した親水性の α -helix 構造によって、細胞膜の脂質二重膜に侵入し細胞膜を破壊すると考えられる。本研究で創出した Heparin-LL37 複合体は、これまでグラム陰性菌に対してのみ有用であった LL37 tethering 法 [37] と異なり、グラム陽性菌とグラム陰性菌に対して同等の効果を示した (図 8)。歯髄炎および根尖性歯周炎の原因菌は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の口腔常在菌であり [1-3]、広いスペクトルの抗菌活性を保持している Heparin-LL37 complexes は歯髄炎および根尖性歯周炎の治療に有用であると考えられる。

高用量の LL37 の細胞障害性は細胞膜破壊によるもの、もしくは細胞内 apoptosis 誘導によって生じるものと報告されている [32, 38-40]。本研究結果から (図 9)、hDPCs と MG-63 において、apoptosis 経路ではなく、細胞溶解作用が細胞膜の障害に起因していることが明らかとなった (図 10, 11)。興味深いことに、Heparin-LL37 complexes 添加群では細胞障害性を示すことなく高濃度の LL37 が hDPCs および MG-63 の細胞質内および細胞膜近傍に局在していた。中等度の LL37 (5 μ M) は血管新生、免疫反応、細胞遊走、骨再生といった細胞活動に対して広範な調節作用を有する [41-46]。Heparin-LL37 complexes は細胞傷害性を引き起こすことなく LL37 を細胞に供給することができるので、抗菌作用に加えて、歯髄組織に対して血管新生誘導能等、根尖歯周組織に対しては骨再生能等を誘導することができると考えられ、歯髄組織の保護または根尖歯周組織の再生に有用な手段となりうる可能性がある。

TNF α は炎症サイトカインの決定的なメディエーターで、自然免疫および獲得免疫に関与している [47]。LPS 誘導性炎症反応時の IL-1 β や IL-6 の遺伝子発現変化は TNF α によって制御される [47]。図 14 においては、LPS 依存性の IL-1 β や IL-6 遺伝子発現上昇は Heparin-LL37 complexes によって完全に抑制されたが、TNF α の遺伝子発現上昇は完全に抑制されなかった。このことは、Heparin-LL37 complexes としてマクロファージ様細胞に取り込まれた LL37 が TNF α 非依存的に IL-1 β や IL-6 の遺伝子発現を抑制している可能性を示唆する。メラノーマ細胞においては内在性の LL37 が核・クロマチンに局在し遺伝子転写制御に関与していることが報告されている [48]。

Heparin は抗凝固薬として用いられ、マクロファージは循環系においては投与された Heparin に積極的に結合し、その循環量を減少させると報告がある [49]。このような知見から、局所では菌感染症、全身ではグラム陰性菌敗血症において Heparin-LL37 complexes は優先的にマクロファージに作用すると考えられる。歯髄組織内に存在するマクロファージ等の免疫担当細胞に Heparin-LL37 complexes を分布させることによって、歯髄組織内への過度の炎症発生を抑制することができれば不可逆性歯髄炎の発生を予防できる可能性がある。

以上、AMPs の抗菌活性を維持しつつ低細胞障害性の Heparin-LL37 complexes を作製することにはじめて成功した。Heparin-LL37 complexes は細胞障害性を持つような高濃度の LL37 と限られた濃度の Heparin と混合することによって様々な菌種に対して抗菌活性を有することおよび LPS 中和能を保持していることを示した。歯内疾患の主要な原因は細菌感染である。このように、Heparin-LL37 complexes による歯内疾患の治療は、生物学的概念に基づいた新規歯内療法シーズになりうることを示唆された。

第 4 章 総括

本研究では、陽性帯電の LL37 が陰性帯電分子の GAGs と電気的に結合することに着目し、GAGs と LL37 の複合体を作製し、その複合体が歯内疾患治療薬として必要な活性を有しているかどうかを検討し、以下の結果を得た。

1. 1.0 μM 以上の LL37 で大腸菌の CFU は 0 になった。
2. LL37 は濃度依存的に供試細胞の生存率を低下させ、LDH 放出量を増加させたが、apoptosis 活性を増加させなかったことから、LL37 の細胞障害性は細胞膜傷害に起因することが判明した。
3. 供試した GAGs の中で Heparin が最も有用であることが判明した。すなわち、口腔内細菌である *S. mutans* UA159, *S. salivarius* GTC215, *S. sobrinus* OMZ176, *A. actinomycetemcomitans* HK1651 および IDH781 に対する抗菌活性を妨げず、細胞障害性を改善する Heparin と LL37 の特定の混合比 (2~6 $\mu\text{g/ml}$ Heparin-10 μM LL37) が存在した。
4. Heparin と LL37 は直接的に結合していた。LPS は、Heparin ではなく LL37 と直接的に会合した。LPS との競合的な会合によって Heparin-LL37 complexes は LL37 を遊離した。
5. Heparin-LL37 agarose beads complexes から遊離された LL37 は LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) によって誘導される TNF α 産生および TNF α , IL-1 β , IL-6 mRNA 発現を抑制した。

以上の結果から、LL37 と可逆的に結合した Heparin は LL37 の細胞障害性を低減し、抗菌活性と LPS 中和能を抑制しないことが明らかとなった。さらに、LL37 の細胞障害性低減は、高濃度投与を可能にすることから、より強い抗菌活性と LPS 中和能を発揮できると考えられた。以上から、Heparin-LL37 complexes は歯内疾患の感染と炎症制御に有用であることが示唆された。

参考文献

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of Dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 20:340-9, 1965.
2. Agnihotry A, Fedorowicz Z, van Zuuren EJ, Farman AG, Al-Langawi JH. Antibiotic use for irreversible pulpitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2:CD004969, 2016.
3. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. *Mediators Inflamm.* 230251, 2015.
4. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:13625-30, 2000.
5. Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC, Moreau A, Alliot-Licht B. Immune cells and molecular networks in experimentally induced pulpitis. *J Dent Res.* 95:196-205, 2016.
6. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res.* 2:e1, 2012.
7. Chung MK, Lee J, Duraes G, Ro JY. Lipopolysaccharide-induced pulpitis up-regulates TRPV1 in trigeminal ganglia. *J Dent Res.* 90:1103-7, 2011.
8. Ulm H, Wilmes M, Shai Y, Sahl HG. Antimicrobial host defensins – specific antibiotic activities and innate defense modulation. *Front Immunol.* 14:249, 2012.
9. Zhang LJ, Richard LG. Antimicrobial peptide. *Current Biology.* 1:14-19, 2016.
10. Kumar P, Kizhakkedathu JN, Straus SK. Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules.* 8:4, 2018.
11. Khung R, Shiba H, Kajiya M, Kittaka M, Ouhara K, Takeda K, Mizuno N, Fujita T, Komatsuzawa H, Kurihara H. LL37 induces VEGF expression in dental pulp cells through ERK signalling. *Int Endod J.* 48:673-9, 2015.
12. Bucki R, Leszczyńska K, Namiot A, Sokołowski W. Cathelicidin LL-37:

- amultitask antimicrobial peptide. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 58:15-25, 2010.
13. Duplantier A. J., van Hoek M. L. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds. *Front Immunol*. 4:143, 2013.
 14. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 6:1543-75, 2013.
 15. Piktel E, Prokop I, Wnorowska U, Król G, Cieśluk M, Niemirowicz K, Savage PB, Bucki R. Ceragenin CSA-13 as free molecules and attached to magnetic nanoparticle surfaces induce caspase-dependent apoptosis in human breast cancer cells via disruption of cell oxidative balance. *Oncotarget*. 9:21904-20, 2018.
 16. Bagheri M, Beyermann M, Dathe M. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:1132-41, 2009.
 17. Gabriel M, Nazmi K, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV, Zentner A. Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity. *Bioconjug Chem*. 17:548-50, 2006.
 18. Kenawy el-R, Worley SD, Broughton R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review. *Biomacromolecules*. 8:1359-84, 2007.
 19. Lozeau LD, Grosha J, Kole D, Prifti F, Dominko T, Camesano TA, Rolle MW. Collagen tethering of synthetic human antimicrobial peptides cathelicidin LL37 and its effects on antimicrobial activity and cytotoxicity. *Acta Biomater*. 52:9-20, 2017.
 20. Edwards IA, Elliott AG, Kavanagh AM, Zuegg J, Blaskovich MA, Cooper MA. Contribution of amphipathicity and hydrophobicity to the antimicrobial activity and cytotoxicity of β -hairpin peptides. *ACS Infect Dis*. 2:442-50, 2016.
 21. Ma Z, Yang J, Han J, Gao L, Liu H, Lu Z, Zhao H, Bie X. Insights into the antimicrobial activity and cytotoxicity of engineered α -helical peptide amphiphiles. *J Med Chem*. 59:10946-62, 2016.
 22. Almaaytah A, Qaoud MT, Abualhajaa A, Al-Balas Q, Alzoubi KH.

- Hybridization and antibiotic synergism as a tool for reducing the cytotoxicity of antimicrobial peptides. *Infect Drug Resist.* 1:835-47, 2018.
23. Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opin Pharmacol.* 6:468-72, 2006.
 24. Sol A, Wang G, Blotnick E, Golla R, Bachrach G, Muhlrad A. Interaction of the core fragments of the LL-37 host defense peptide with actin. *RSC Adv.* 5:9361-7, 2015.
 25. Stephan A, Batinica M, Steiger J, Hartmann P, Zaucke F, Bloch W, Fabri M. LL37: DNA complexes provide antimicrobial activity against intracellular bacteria in human macrophages. *Immunology.* 148:420-32, 2016.
 26. Barańska-Rybak W, Sonesson A, Nowicki R, Schmidtchen A. Glycosaminoglycans inhibit the antibacterial activity of LL-37 in biological fluids. *J Antimicrob Chemother.* 57:260-5, 2006.
 27. Anders E, Dahl S, Svensson D, Nilsson BO. LL-37-induced human osteoblast cytotoxicity and permeability occurs independently of cellular LL-37 uptake through clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 501:280-5, 2018.
 28. Sandgren S, Wittrup A, Cheng F, Jönsson M, Eklund E, Busch S, Belting M. The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J Biol Chem.* 279:17951-6, 2004.
 29. Bergsson G, Reeves EP, McNally P, Chotirmall SH, Greene CM, Greally P, Murphy P, O'Neill SJ, McElvaney NG. LL-37 complexation with glycosaminoglycans in cystic fibrosis lungs inhibits antimicrobial activity, which can be restored by hypertonic saline. *J Immunol.* 183:543-51, 2009.
 30. Zughaier SM, Svoboda P, Pohl J, Stephens DS, Shafer WM. The human host defense peptide LL-37 interacts with *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharides and inhibits inflammatory mediators release. *PLoS One.* 5:e13627, 2010.

31. Le CF, Fang CM, Sekaran SD. Intracellular targeting mechanisms by antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 61: e02340-16, 2017.
32. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J.* 341 :501-13, 1999.
33. Epand RF, Wang G, Berno B, Epand RM. Lipid segregation explains selective toxicity of a series of fragments derived from the human cathelicidin LL-37. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:3705-14, 2009.
34. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta.* 1462:55-70, 1999.
35. Jean-François F, Elezgaray J, Berson P, Vacher P, Dufourc EJ. Pore formation induced by an antimicrobial peptide: electrostatic effects. *Biophys J.* 95:5748-56, 2008.
36. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000414, 2010.
37. Lozeau LD, Grosha J, Kole D, Prifti F, Dominko T, Camesano TA, Rolle MW. Collagen tethering of synthetic human antimicrobial peptides cathelicidin LL37 and its effects on antimicrobial activity and cytotoxicity. *Acta Biomater.* 52:9-20, 2017.
38. Barlow PG, Beaumont PE, Cosseau C, Mackellar A, Wilkinson TS, Hancock RE, Haslett C, Govan JR, Simpson AJ, Davidson DJ. The human cathelicidin LL-37 preferentially promotes apoptosis of infected airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 43:692-702, 2010.
39. Mader JS, Ewen C, Hancock RE, Bleackley RC. The human cathelicidin, LL-37, induces granzyme-mediated apoptosis in regulatory T cells. *J Immunother.* 34:229-35, 2011.
40. Anders E, Dahl S, Svensson D, Nilsson BO. LL-37-induced human osteoblast cytotoxicity and permeability occurs independently of cellular LL-37 uptake through clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Biophys*

- Res Commun. 501:280-5, 2018.
41. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krötz F, Zahler S, Gloe T, Issbrücker K, Unterberger P, Zaiou M, Lebherz C, Karl A, Raake P, Pfosser A, Boekstegers P, Welsch U, Hiemstra PS, Vogelmeier C, Gallo RL, Clauss M, Bals R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest.* 111:1665-72, 2003.
 42. Kajiya M, Shiba H, Komatsuzawa H, Ouhara K, Fujita T, Takeda K, Uchida Y, Mizuno N, Kawaguchi H, Kurihara H. The antimicrobial peptide LL37 induces the migration of human pulp cells: a possible adjunct for regenerative endodontics. *J Endod.* 36:1009-13, 2010.
 43. Salvado MD, Di Gennaro A, Lindbom L, Agerberth B, Haeggström JZ. Cathelicidin LL-37 induces angiogenesis via PGE2-EP3 signaling in endothelial cells, in vivo inhibition by aspirin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33:1965-72, 2013.
 44. Kittaka M, Shiba H, Kajiya M, Fujita T, Iwata T, Rathvisal K, Ouhara K, Takeda K, Fujita T, Komatsuzawa H, Kurihara H. The antimicrobial peptide LL37 promotes bone regeneration in a rat calvarial bone defect. *Peptides.* 46:136-42, 2013.
 45. Mai S, Mauger MT, Niu LN, Barnes JB, Kao S, Bergeron BE, Ling JQ, Tay FR. Potential applications of antimicrobial peptides and their mimics in combating caries and pulpal infections. *Acta Biomater.* 49:16-35, 2017.
 46. Amatngalim GD, Nijnik A, Hiemstra PS, Hancock RE. Cathelicidin peptide LL-37 modulates TREM-1 expression and inflammatory responses to microbial compounds. *Inflammation.* 34:412-25, 2011.
 47. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 214:149-60, 2008.
 48. Muñoz M, Craske M, Severino P, de Lima TM, Labhart P, Chammas R, Velasco IT, Machado MC, Egan B, Nakaya HI, Pinheiro da Silva F. Antimicrobial peptide LL-37 participates in the transcriptional regulation of melanoma cells. *J Cancer.* 7:2341-5, 2016.
 49. Rosenberg RD. Heparin, antithrombin, and abnormal clotting. *Annu Rev Med.* 29:367-78, 1978

図の説明

図 1. LL37 の抗菌活性

LB 寒天培地上の CFU を測定した。濃度依存的に LL37 は CFU を減少させた。

図 2. LL37 の細胞障害性

MTT assay によって細胞生存率を測定した。無刺激群の吸光度を 100 % とした。濃度依存的に LL37 は細胞生存率を低下させた。

図 3. LL37 の細胞障害性に血清が与える影響

横軸に血清濃度，縦軸に LL37 の半数阻害濃度を示す。
各血清濃度にて LL37 の半数阻害濃度を求めた。

図 4. Heparin-LL37 complexes の細胞障害性および抗菌活性

無刺激群 (LL37 (-) かつ Heparin (-)) を対照群としてグラフに示す。
N.D.: not detected。N = 3, 平均値 ± SD。統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

図 5. CS-LL37 complexes の細胞障害性および抗菌活性

無刺激群 (LL37 (-) かつ CS (-)) を対照群としてグラフに示す。N.D.: not detected。N = 3, 平均値 ± SD。統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。*** $p < 0.001$ 。

図 6. HA-LL37 complexes の細胞障害性および抗菌活性

無刺激群 (LL37 (-) かつ HA (-)) を対照群としてグラフに示す。N.D.: not detected。N = 3, 平均値 ± SD。統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。*** $p < 0.001$ 。

図 7. GAGs と LL37 の結合量の検討

LL37 単独群を対照群としてグラフに示す。非変性条件下で泳動したバンドの濃淡を ImageJ (NIH, MD, USA) によって測定し、変性条件下で泳動したバンドの濃淡を用いて normalize した。N.S.: not significant。N = 3, 平均値 ± SD。統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。*p < 0.05; ***p < 0.001。

図 8. Heparin-LL37 complexes のう蝕原性細菌および歯周病原細菌に対する抗菌活性

無刺激群 (LL37 (-) かつ Heparin (-)) を対照群としてグラフに示す。N.D.: not detected。N = 3, 平均値 ± SD。統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001。

図 9. LL37 の細胞障害様式の検討

無刺激群を negative control として, positive control 群を対照群と設定した。細胞生存率は無刺激群を 100 % として, LDH 細胞障害 assay は Triton X-100 群を 100 % としてそれぞれグラフに示す。Apoptosis assay の蛍光量は相対蛍光単位で示す。

図 10. 外来性 LL37 の細胞周囲での局在

ウサギ抗ヒト LL37 抗体を用いた蛍光免疫染色によって, 細胞周囲での LL37 の局在を観察した。Blue = nucleus, Green = actin, Red = LL37 を示す。

図 11. Heparin-LL37 complexes で刺激した際の細胞からの LDH 放出量

Triton X-100 で刺激した際の LDH 放出量を 100 % としてグラフに示す。N = 3, 平均値 ± SD。LL37 単独群 (LL37 (+) and 0 µg/ml Heparin group) を比較対象として, 統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001。

図 12. ヒトマクロファージ様細胞を LL37 および Heparin-LL37 complexes で刺激した際の LDH 放出量

Triton X-100 で刺激した際の LDH 放出量を 100 % としてグラフに示す。N = 3, 平均値 \pm SD。LL37 単独群を比較対象として, 統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。***p < 0.001。

図 13. マクロファージ様細胞を LPS で刺激した際の TNF α 分泌量

縦軸に TNF α 分泌量を示す。N = 3, 平均値 \pm SD。LPS 単独群を比較対象として, 統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。***p < 0.001。

図 14. マクロファージ様細胞を LL37 または Heparin-LL37 complexes 存在下で LPS 刺激した際の TNF α , IL-1 β , IL-6 の mRNA 発現

縦軸には内部標準遺伝子を用いて normalize した後の遺伝子発現量を示す。N.D.: not detected。N = 3, 平均値 \pm SD。統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。***p < 0.001。

図 15. Heparin-LL37 agarose beads complexes の LPS との会合

縦軸には Heparin を基準にして normalize した後の, agarose 中に存在する LL37 の量を示す。LPS 0 μ g 群を 1 としてグラフに示す。N = 3, 平均値 \pm SD。LPS 0 μ g 群を比較対象として, 統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001。

図 16. Heparin または LL37 を固相化した Solid phase binding assay

縦軸には 450 nm の波長の吸光度を示す。固相化した Heparin または LL37 と反応した Biotinylated LPS を streptavidin と TMB によって検知した。

図 17. Heparin-LL37 agarose beads complexes の細胞障害性および抗菌活性

Heparin agarose beads complexes 群を対照群としてグラフに示す。上段および中段では, Heparin agarose beads 群を 100 % とした。下段で

は測定した CFU を示す。N = 3, 平均値 \pm SD。統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。***p < 0.001。

図 18. Heparin-LL37 agarose beads complexes の LPS 中和能

LPS 単独刺激群を対照群としてグラフに示す。縦軸にはマクロファージ様細胞からの TNF α 分泌量を示す。N = 3, 平均値 \pm SD。統計処理は一元配置分散分析とその後の Dunett's test によって行った。***p < 0.001。

図

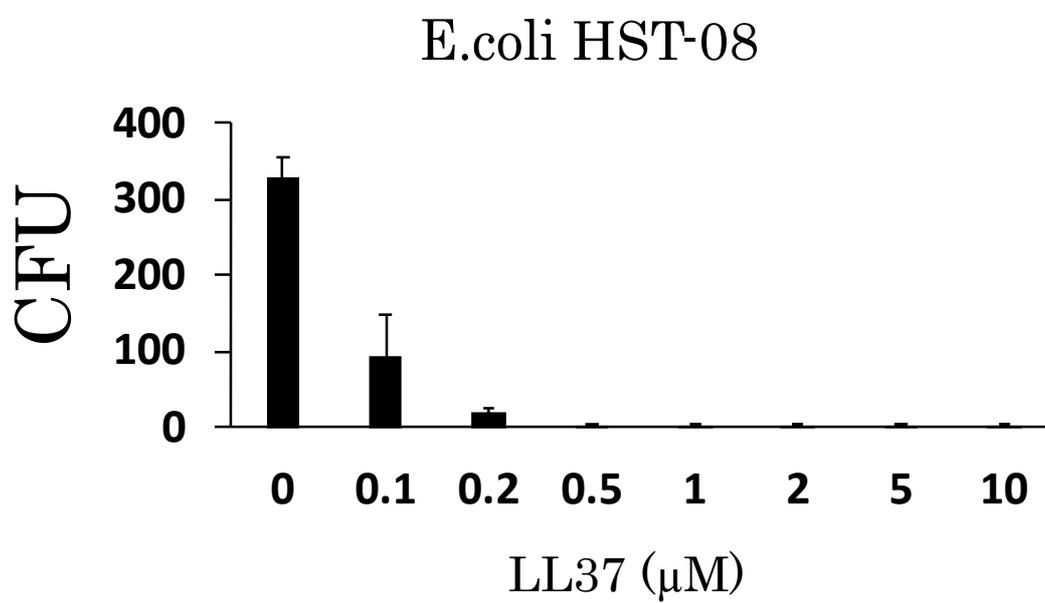


図 1. LL37 の抗菌活性

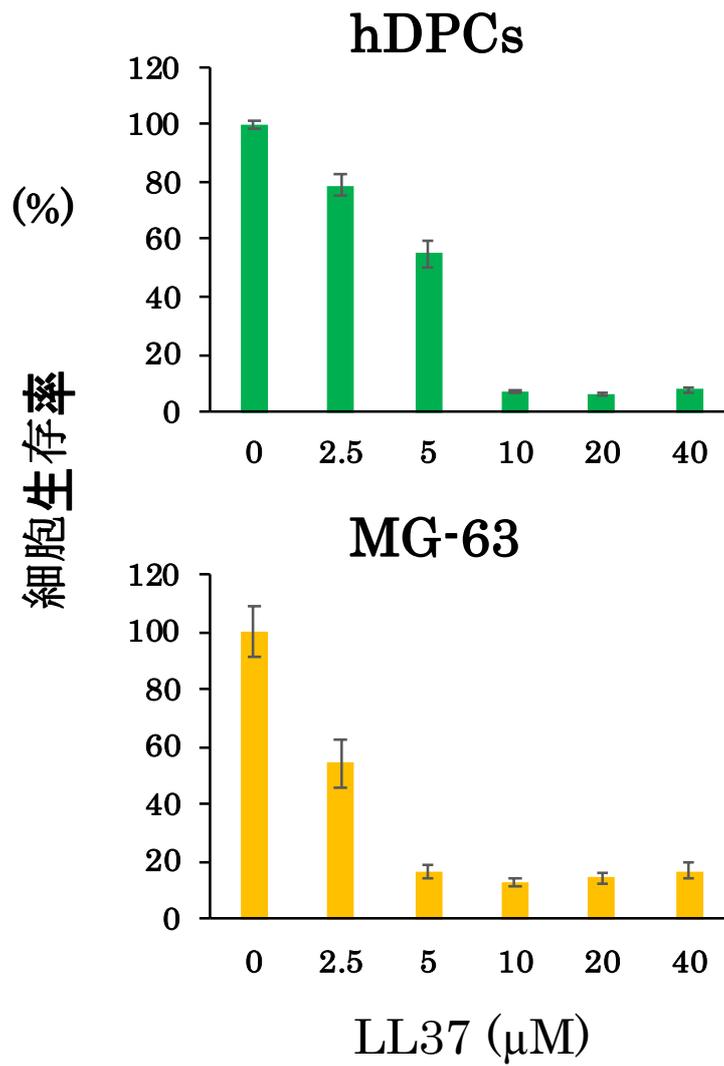


図 2. LL37 の細胞障害性

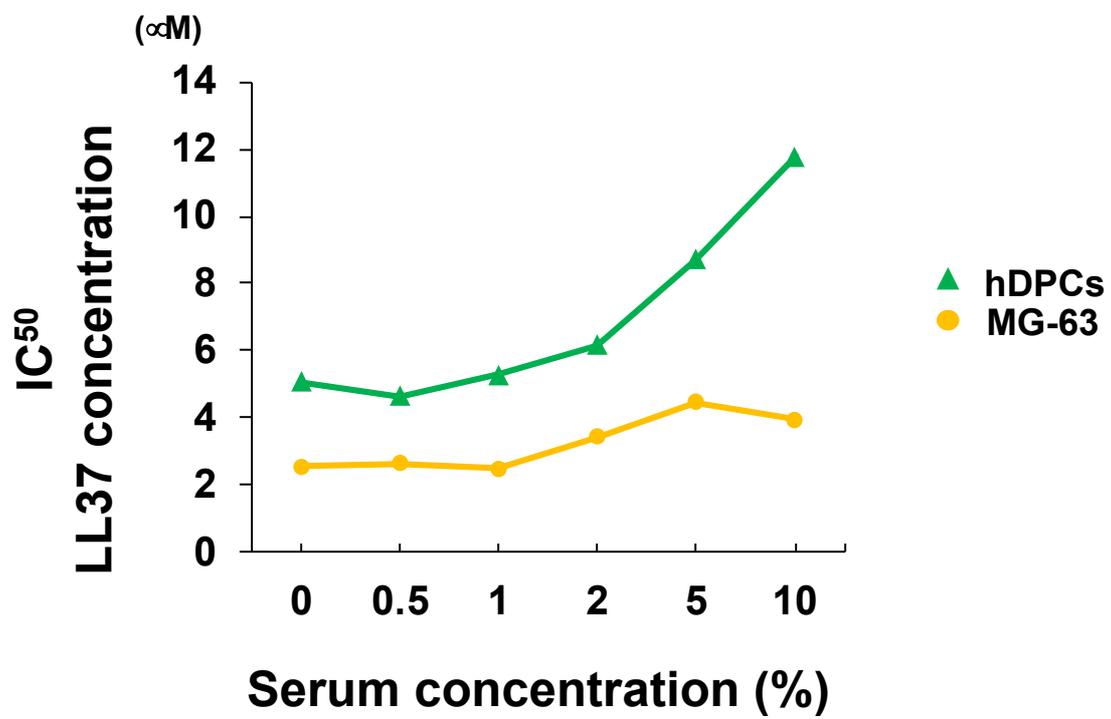


図 3. LL37 の細胞障害性に血清が与える影響

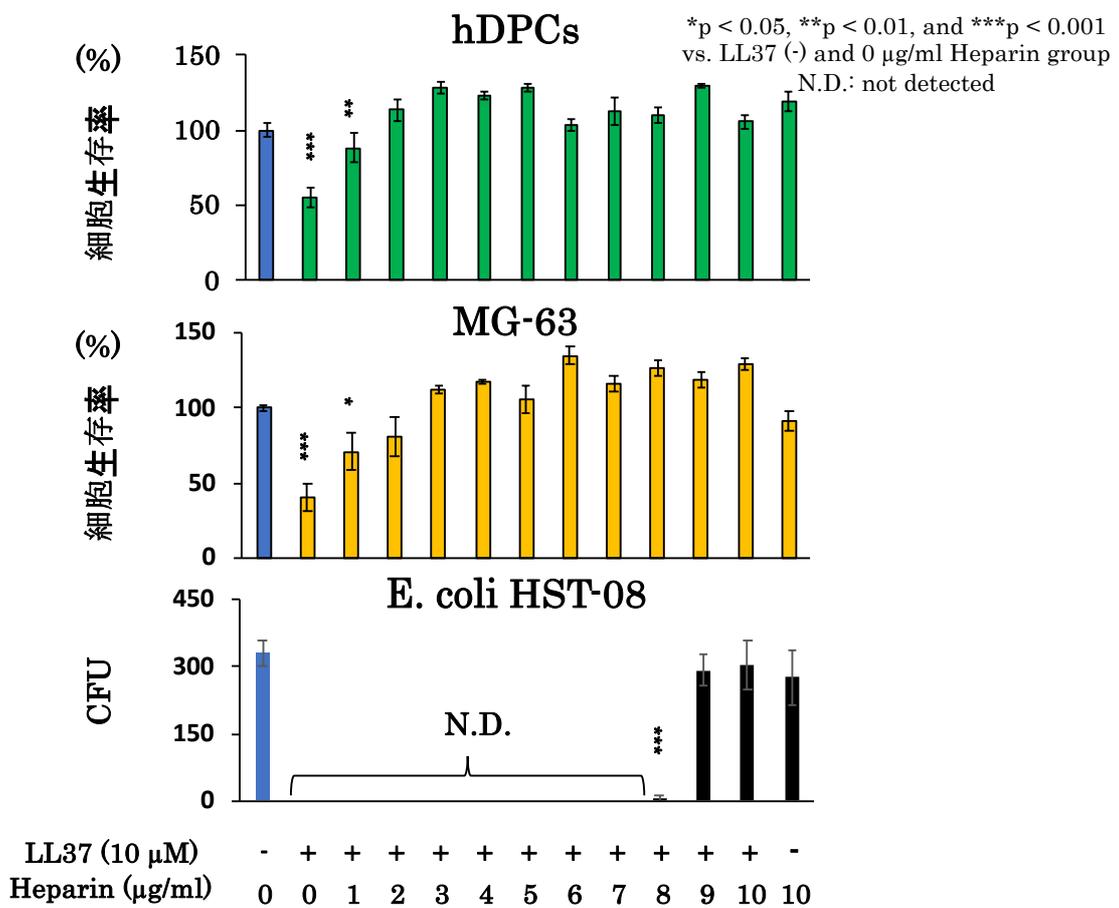


図 4. Heparin-LL37 complexes の細胞障害性および抗菌活性

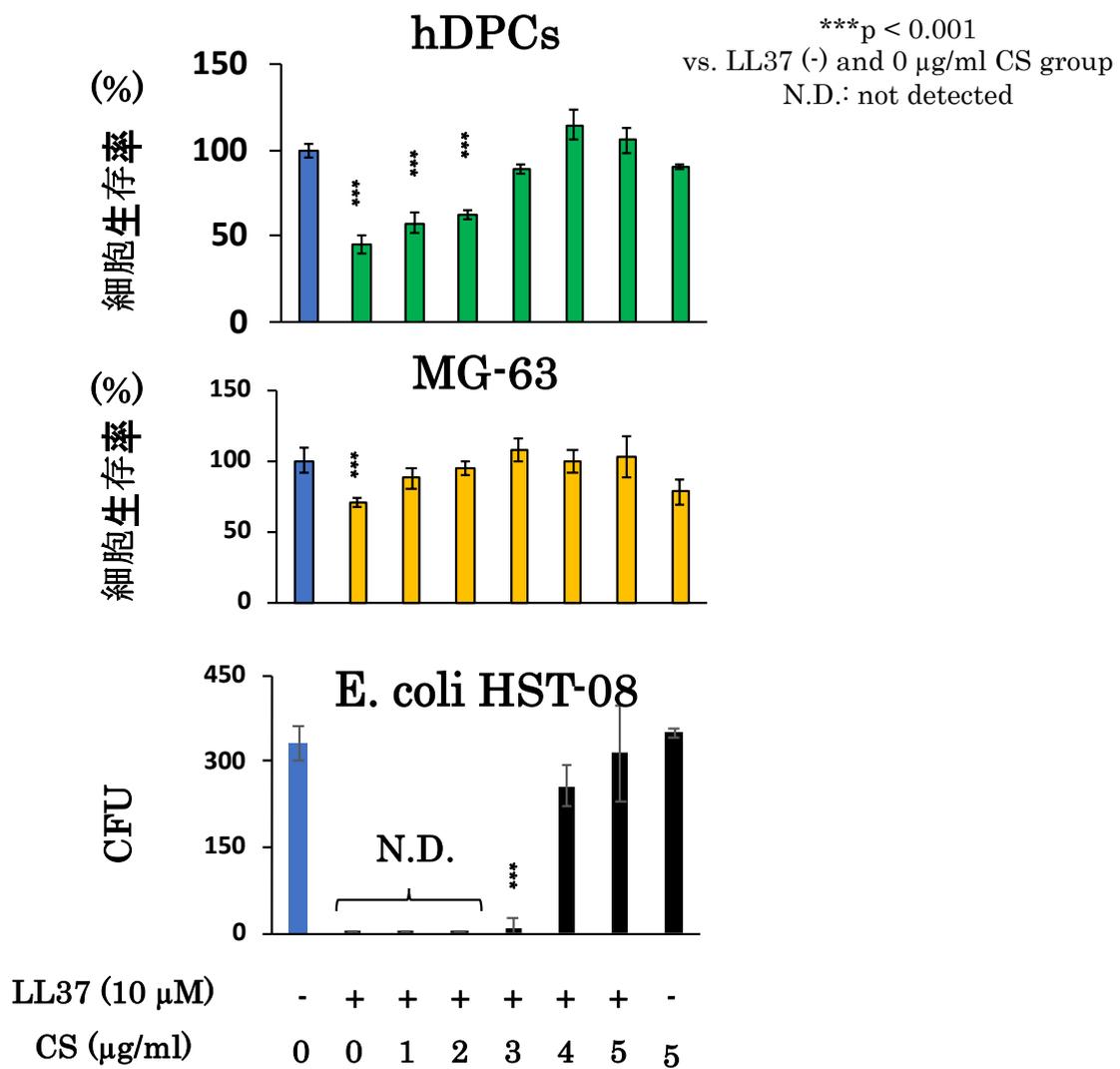


図 5. CS-LL37 complexes の細胞障害性および抗菌活性

***p < 0.001
 vs. LL37 (-) and 0 μg/ml HA group
 N.D.: not detected

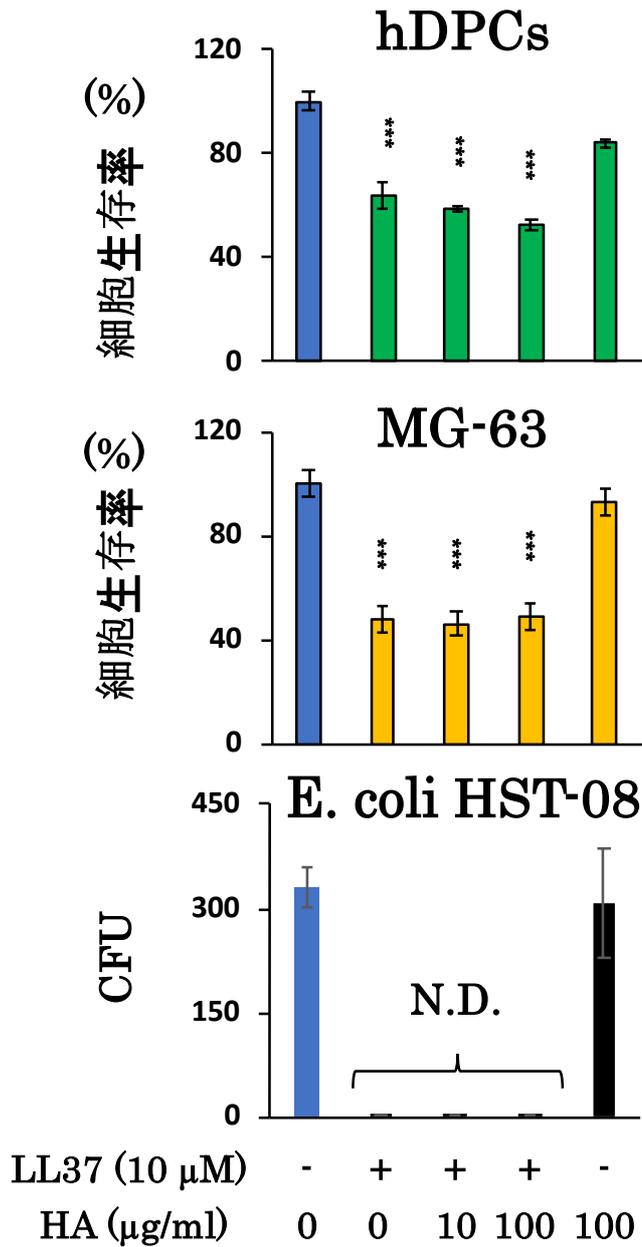


図 6. HA-LL37 complexes の細胞障害性および抗菌活性

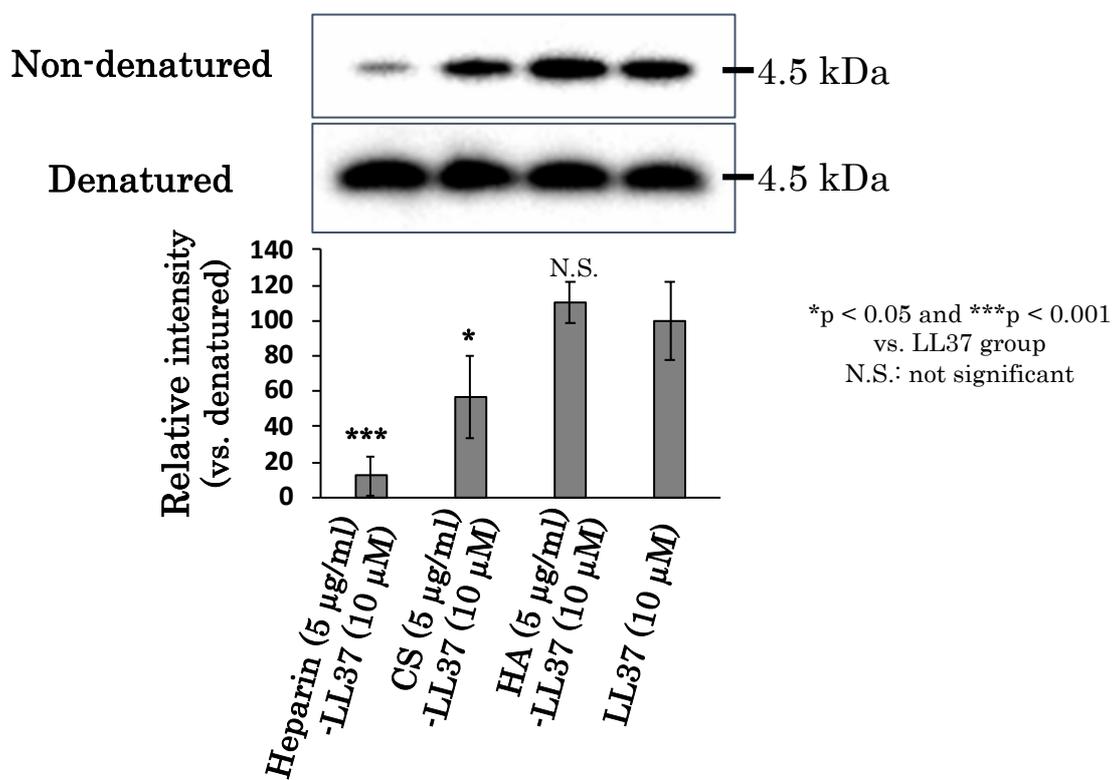


図 7. GAGs と LL37 の結合量の検討

*p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001
vs. LL37 (-) and 0 µg/ml Heparin group
N.D.: not detected

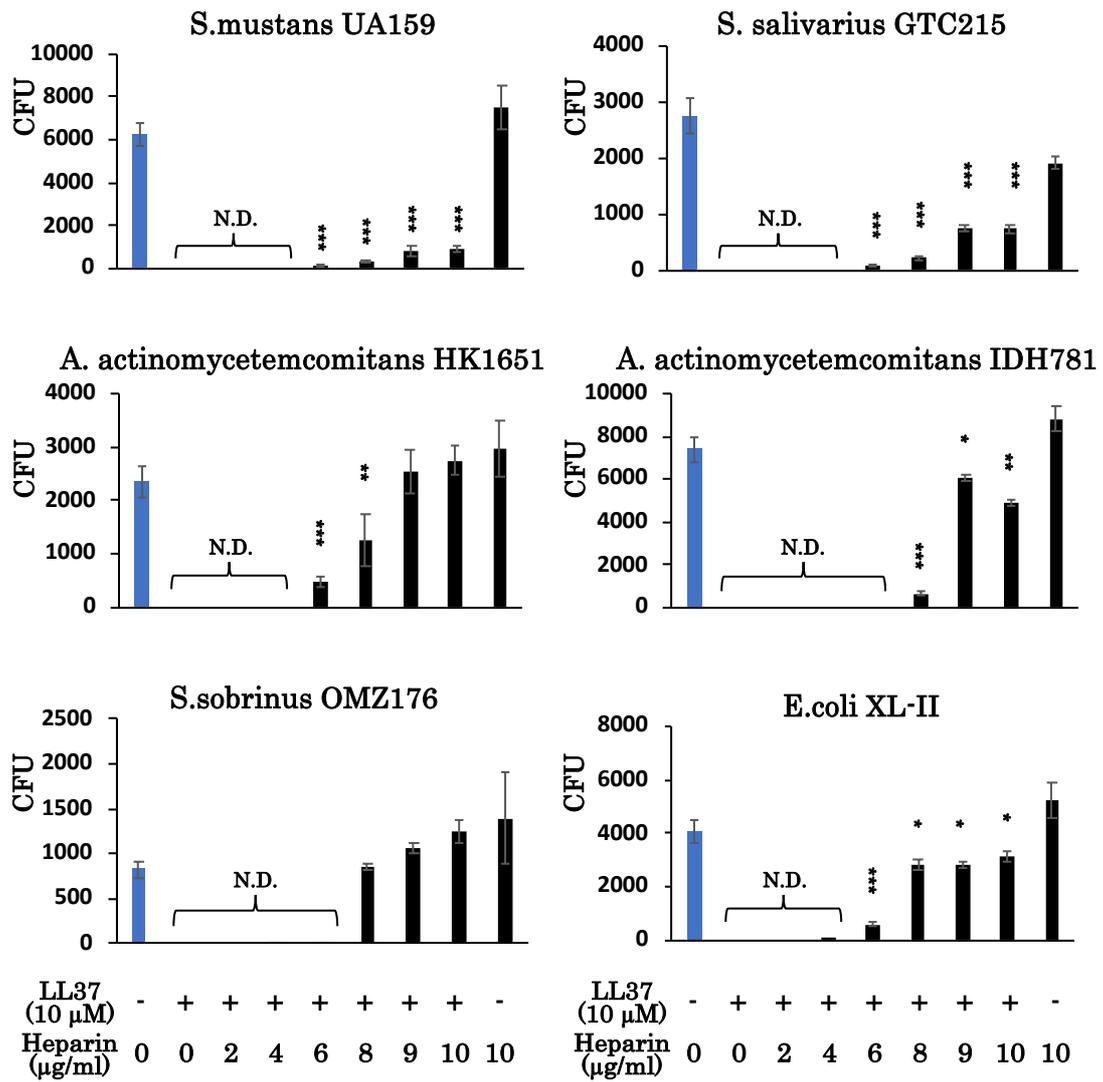


図 8. Heparin-LL37 complexes のう蝕原性細菌および
歯周病原細菌への抗菌活性

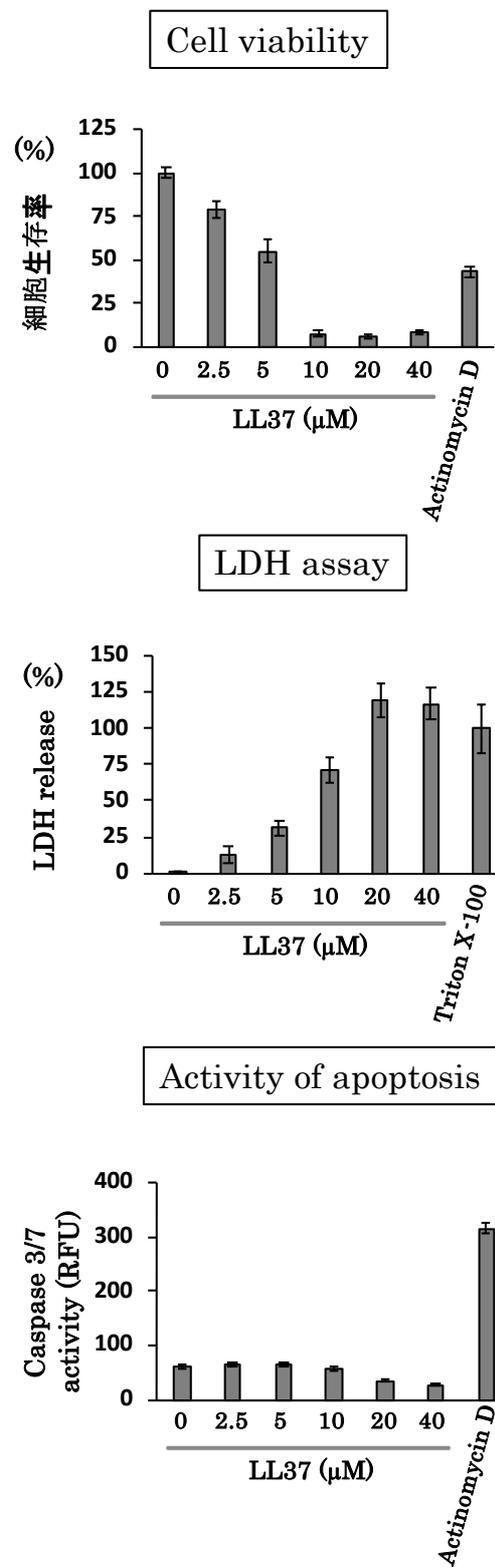


図 9. LL37 の細胞障害様式の検討

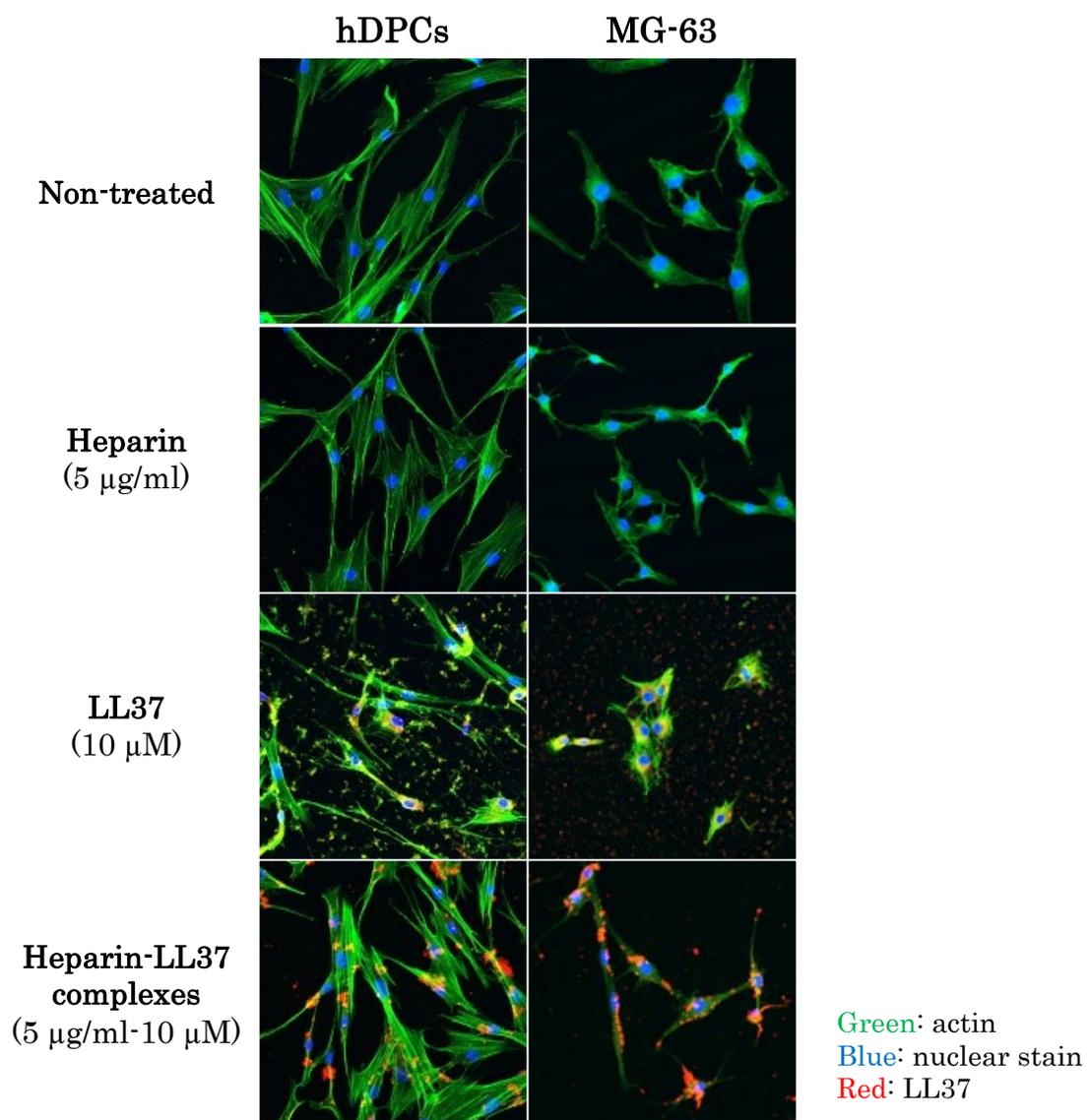


図 10. 外来性 LL37 の細胞周囲での局在

*p < 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.001 vs. LL37 (+) and 0 μg/ml Heparin group

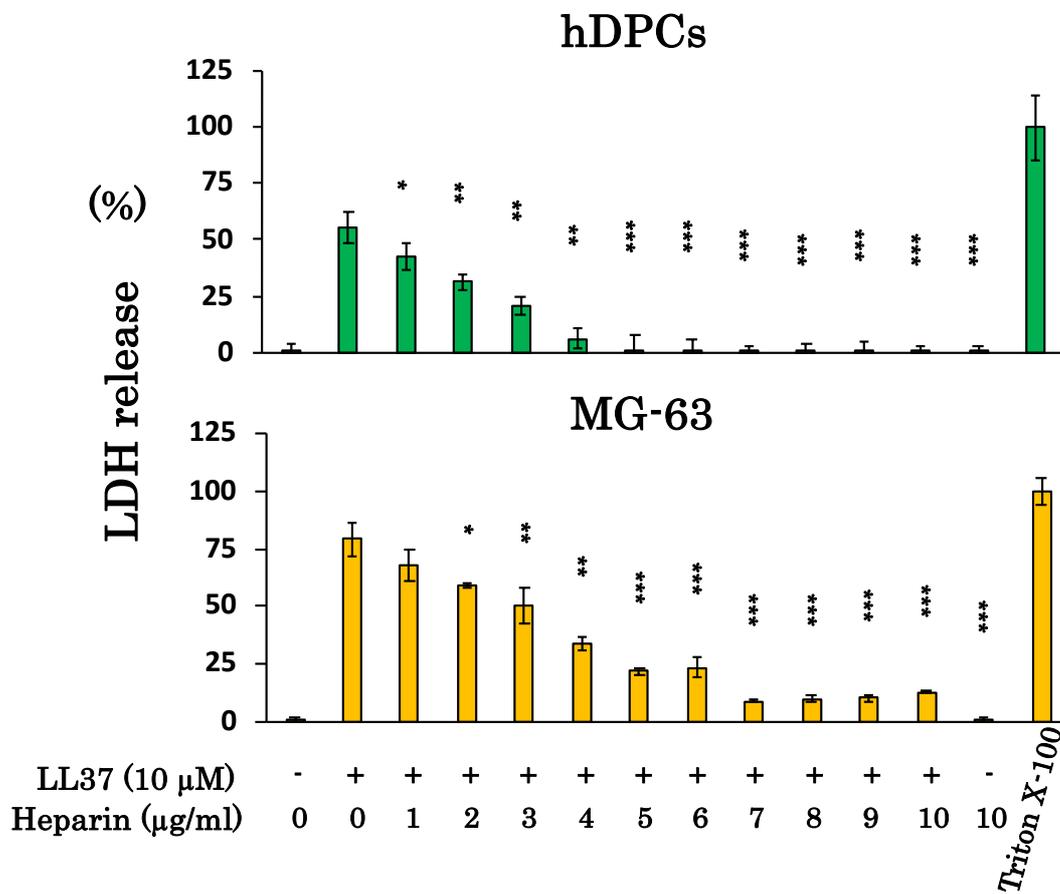


図 11. Heparin-LL37 complexes で刺激した際の細胞からの LDH 放出量

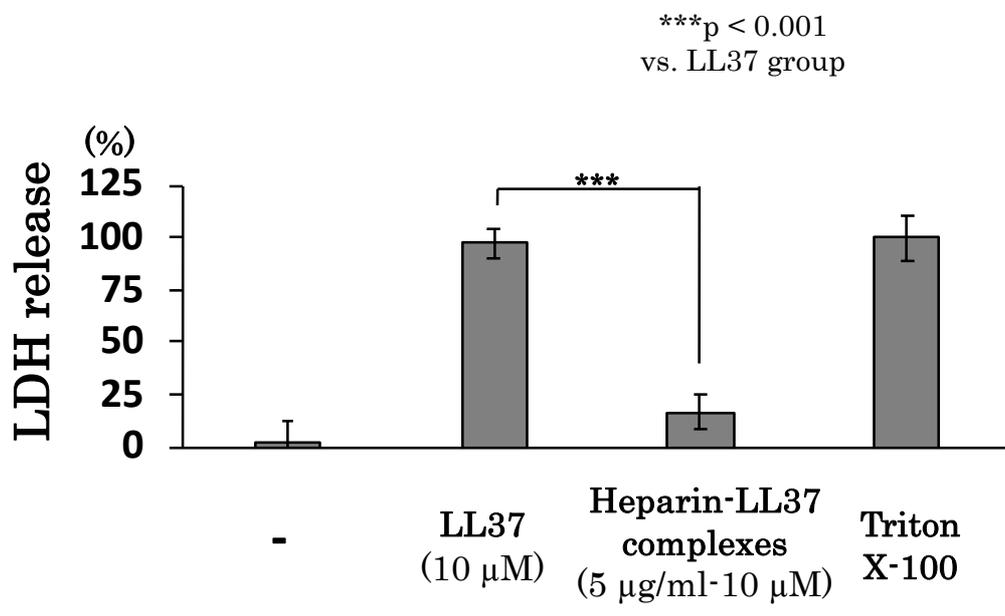


図 12. マクロファージ様細胞を LL37 および Heparin-LL37 complexes で刺激した際の LDH 放出量

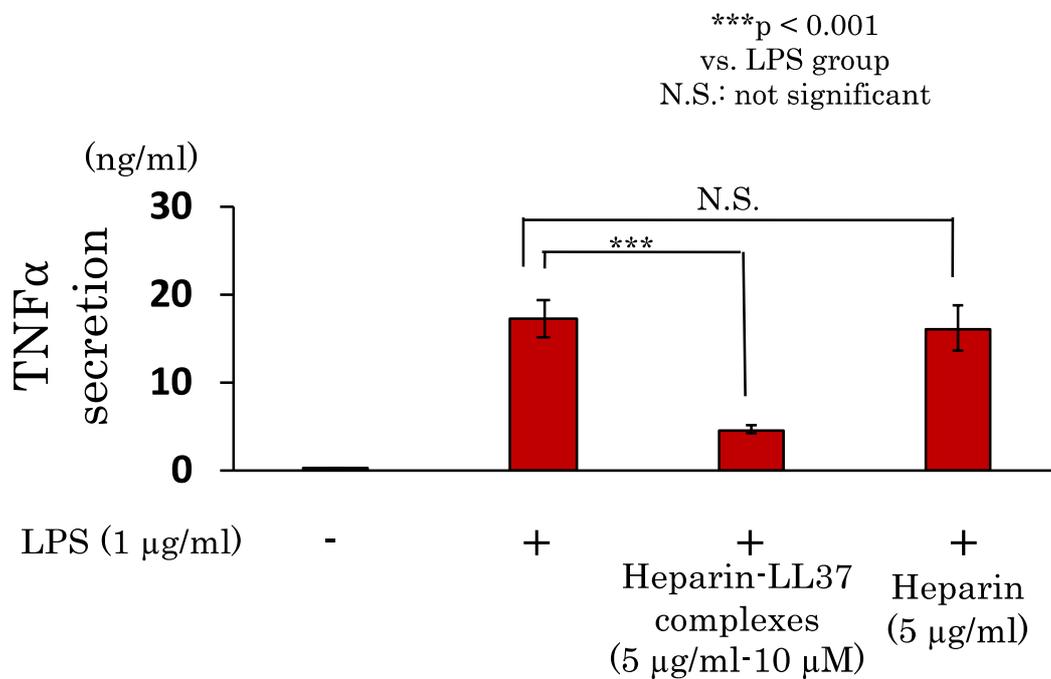


図 13. マクロファージ様細胞を LPS で刺激した際の TNFα 分泌量

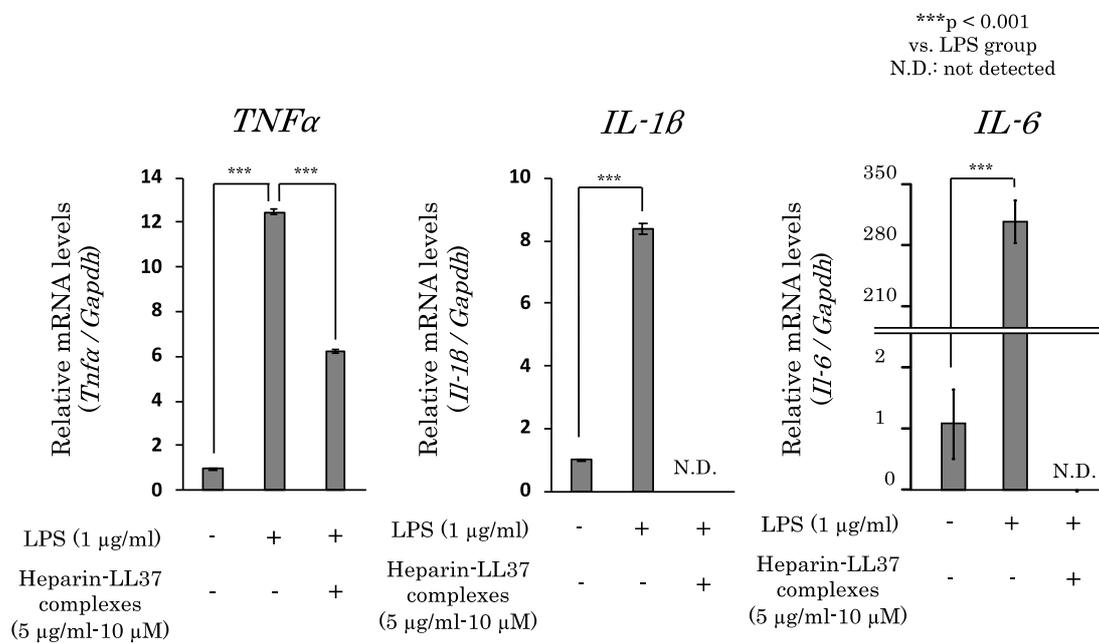


図 14. マクロファージ様細胞を LL37 または Heparin-LL37 complexes 存在下で LPS 刺激した際の *TNFα*, *IL-1β*, *IL-6* の mRNA 発現

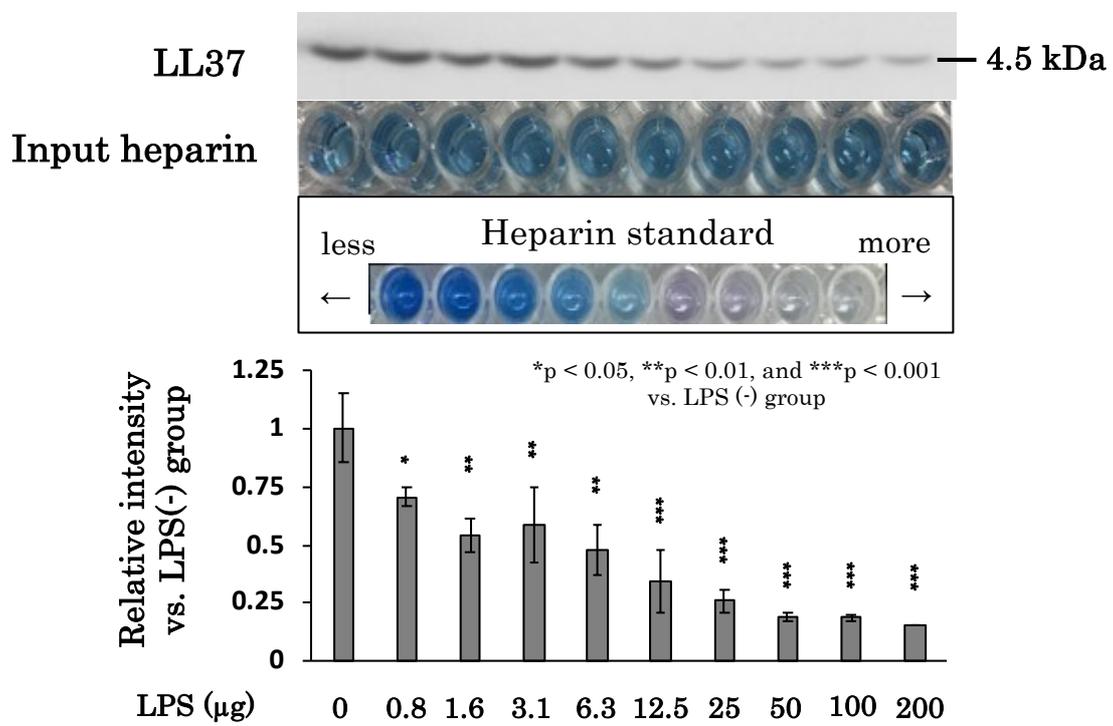


図 15. Heparin-LL37 agarose beads complexes の LPS との会合

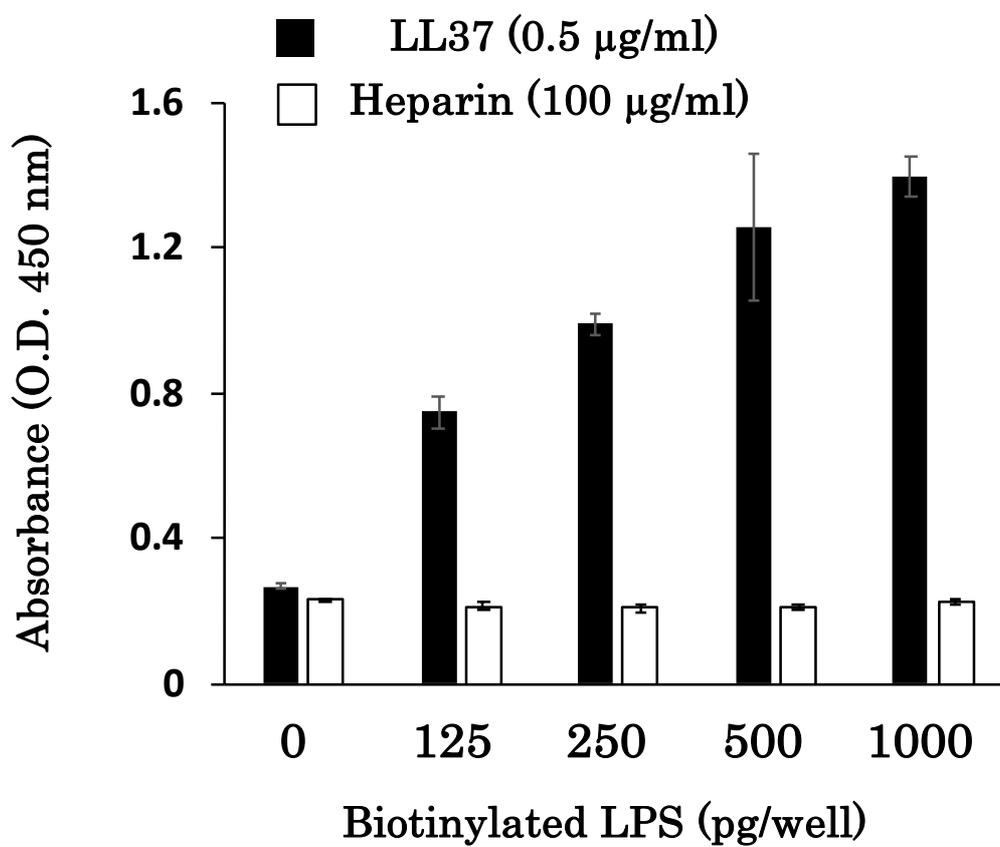


図 16. Heparin または LL37 を固相化した Solid phase binding assay

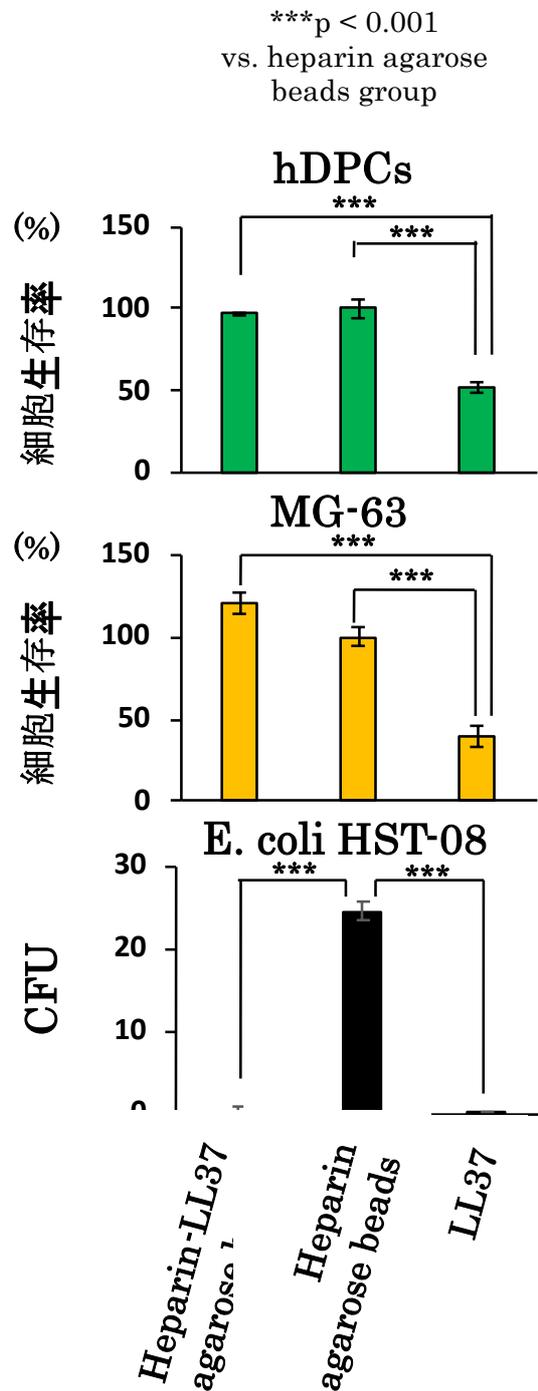


図 17. Heparin-LL37 agarose beads complexes の
抗菌活性および細胞障害性

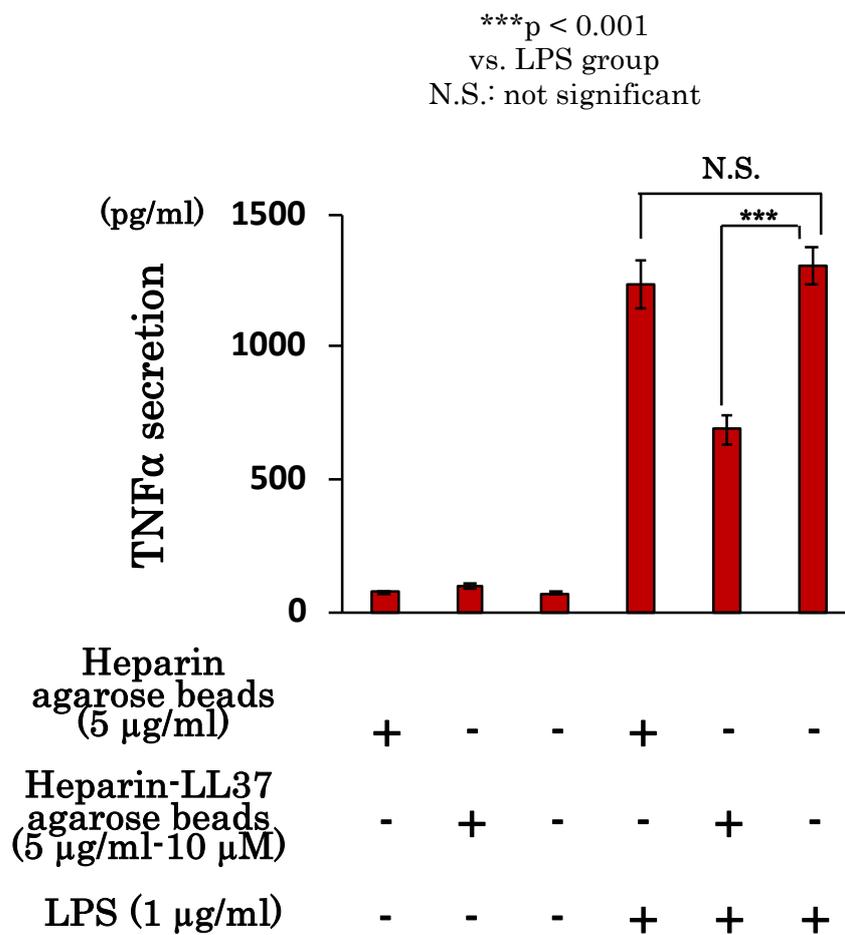


図 18. Heparin-LL37 agarose beads complexes の LPS 中和能