

Down 症候群由来歯肉線維芽細胞における歯周病原細菌および  
病原因子に対する異常応答性

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

比 嘉 桂 子

(指導 : 野 本 た か と 教授)

The abnormal cellular response in gingival fibroblasts by periodontal  
pathogens in Down syndrome

Keiko Higa

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo, Special Needs Dentistry, 870-1, sakaecho-

Nishi 2, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan.

(Director : Takato Nomoto)

*Key words* : Down syndrome, *Fusobacterium nucleatum*, ERK1/2, PAR2, IL-37

## Abstract

Down syndrome (DS) has high prevalence of severe periodontitis. The influence of *F. nucleatum* on cellular response was examined in gingival fibroblasts (GF) derived from non-DS (NGF) and from DS (DGF). GF were inoculated with *F. nucleatum*. The mRNA expressions of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , matrix metalloproteinase (MMP)-3, and MMP-9 in GF inoculated with *F. nucleatum* were quantified using quantitative PCR. The protein expressions of Toll like receptor (TLR) 2, TLR4, protease-activated receptor (PAR) 2, and phosphorylated (phospho)-extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 were also observed in GF inoculated with *F. nucleatum* by Western blotting.

In addition, GF were stimulated with outer membrane vesicles from *Porphyromonas gingivalis* (P-OMVs). IL-1 $\beta$  and IL-37 mRNA expressions were quantified using quantitative PCR. Phospho-ERK1/2 was also observed in GF stimulated with P-OMVs by Western blotting. The effect of an ERK1/2 inhibitor on IL-1 $\beta$  and IL-37 mRNA expressions was performed in GF stimulated with P-OMVs.

The mRNA expressions of IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , MMP-3, and MMP-9 in DGF inoculated with *F. nucleatum* were significantly higher than those in NGF. Although there were no differences in the protein expressions of TLR2 and TLR4 between NGF and DGF, PAR2 and phospho-ERK1/2 protein expressions in DGF inoculated with *F. nucleatum* were significantly higher than those in NGF.

IL-1 $\beta$  mRNA expression and phospho-ERK1/2 protein expression were significantly higher in P-OMVs-stimulated DGF than in NGF. In contrast, IL-37 mRNA expression was significantly lower in P-OMV-stimulated DGF than in NGF. P-OMVs-induced IL-1 $\beta$  and IL-37 mRNA expressions in NGF were reduced by an ERK1/2 inhibitor, while P-OMVs-induced IL-37 mRNA expression was not reduced by an ERK1/2 inhibitor in DGF.

It is considered that enhancement of inflammatory mediators by *F. nucleatum* was caused via over expressions of PAR2 and phospho-ERK1/2 in DGF. In addition, the imbalance of pro- and anti-inflammatory response in IL-1 family were observed in DGF stimulated with P-OMVs. There are other unidentified factors involved in the process from the recognition of P-OMVs to IL-37 mRNA expression. Further study is needed to be clear the reason for the low levels of IL-37 mRNA in DGF.

Altogether, it is considered that *F. nucleatum* and P-OMVs may be important pathogenic factors in gingival inflammation and periodontal tissue destruction in DS.

## 要 旨

Down 症候群 (DS) にみられる重度歯周病の原因として、免疫応答異常などが報告されている。歯周病原細菌の *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) は、慢性歯周炎患者の歯周ポケットから高頻度で検出され、他の口腔内細菌との共凝集能が高く、バイオフィルム形成過程において中心的役割を担う。従って歯周病発症を防ぐためには、*F. nucleatum* の制御が重要である。また、歯周病原細菌のグラム陰性菌は外膜小胞体 (OMVs) を産生することが知られている。*P. gingivalis* の産生する OMVs (P-OMVs) には lipopolysaccharide (LPS), 線毛ならびに強力な細胞障害性を示すタンパク分解酵素の gingipain などが含まれ、抗原性が高く、免疫応答を強く誘発する。本研究は、DS における重度歯周病の発症およびメカニズムを解明するために、*F. nucleatum* 接種ならびに P-OMVs 刺激による歯肉線維芽細胞 (GF) の応答性について、健常者由来 GF (NGF) と DS 由来 GF (DGF) を比較した。また、炎症は細菌やその病原因子の攻撃に対する宿主の防御反応として必要であるが、その過程における炎症誘発因子と炎症抑制因子のバランスの破綻は慢性炎症のような歯周病を誘発する。本研究では IL-1 ファミリーにおける IL-1 $\beta$  と IL-37 の遺伝子発現に着目した。

*F. nucleatum* を接種した GF において炎症誘発性サイトカインの interleukin(IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  ならびに好中球の走化性に関与するケモカインの IL-8 と、組織破壊に関与する matrix metalloproteinase (MMP) 3 および MMP9 の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて確認し、NGF と DGF を比較した。これらの遺伝子発現に関与する宿主細胞

表層の病原因子認識機構であるパターン認識受容体 toll like receptor (TLR) 2 および TLR4, 細菌の産生する酵素によって活性化される protease-activated receptor (PAR) 2 のタンパク質発現と, その後のシグナル伝達経路の一つで DS 責任遺伝子の dual- specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) が発現調整に関与しているリン酸化された extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (phospho-ERK1/2) のタンパク質発現について Western blotting 法にて確認し, NGF と DGF を比較した。

次に P-OMVs で刺激した NGF と DGF における炎症誘発性サイトカインである IL-1 $\beta$  と抗炎症性サイトカインである IL-37 の遺伝子発現を定量 PCR 法で, phospho-ERK1/2 のタンパク質発現を Western blotting 法にて比較した。さらに P-OMVs による IL-1 $\beta$  と IL-37 の遺伝子発現誘発の原因をより明確にするために, ERK1/2 の inhibitor によるこれらの遺伝子発現の変化についても定量 PCR 法にて確認し, NGF と DGF を比較した。

*F. nucleatum* によって誘導された IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, MMP-3 ならびに MMP-9 の遺伝子発現と PAR2 および phospho-ERK1/2 のタンパク質発現は共に NGF に比べて DGF の方が有意に高かった。P-OMVs 刺激によって誘導された IL-1 $\beta$  の遺伝子発現と phospho-ERK1/2 のタンパク質発現は NGF に比べて DGF の方が有意に高かったが, IL-37 の遺伝子発現は DGF の方が有意に低かった。さらに, ERK1/2 の inhibitor 添加により, NGF では P-OMVs で誘導された IL-1 $\beta$  と IL-37 の遺伝子発現は有意に低下したものの, DGF では IL-37 の遺伝子発現は低下しなかった。

DGFにおける *F. nucleatum* による炎症メディエーターの異常な発現増強には PAR2 と phospho-ERK1/2 が関与することが考えられた。さらに DGF においては P-OMVs による IL-1 $\beta$  および IL-37 の遺伝子発現誘導にアンバランスが生じていることが示された。また P-OMVs による DGF における IL-1 $\beta$  遺伝子の過剰な発現誘導には phospho-ERK1/2 が関与しているが、IL-37 の遺伝子発現誘導には別の経路が存在する可能性があることが推察された。

以上のことから、*F. nucleatum* および P-OMVs に対する宿主細胞の過剰な炎症反応と抗炎症性サイトカインである IL-37 の低発現によるサイトカイン発現のバランス破綻が、DS における重度歯周病の発症および進行に関与する可能性が示唆された。

## 緒 言

Down 症候群 (DS) は 21 番染色体のトリソミーに起因して様々な表現型を示すことが知られており、知的能力障害や免疫応答異常などの病態や晩年のアルツハイマー病の高罹患率を示す一方で固形癌の罹患率は低いことなどが報告されている<sup>1-5)</sup>。DS は、細菌やウイルスに易感染性であり<sup>6)</sup>、口腔領域では重度歯周病の罹患率が高いと言われており<sup>7,8)</sup>、知的能力障害による口腔清掃管理不足だけでは説明できないとの報告がある<sup>9)</sup>。現在までに DS における重度歯周病の原因として、歯肉における活性酸素の産生増大や免疫応答異常などがあげられている<sup>6,10,11)</sup>。

歯周病はバイオフィルムに存在する細菌の感染による慢性炎症性疾患である<sup>12)</sup>。我々は、主要な歯周病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) に由来する lipopolysaccharide (LPS) 刺激による歯肉線維芽細胞 (線維芽細胞) の prostaglandin E2 産生量、plasminogen activator 活性度および interleukin (IL) -6 発現量は、健常由来の線維芽細胞 (NGF) よりも DS 由来の線維芽細胞 (DGF) の方が有意に増大することを報告してきた<sup>13-17)</sup>。しかしながら、いまだ DS にみられる重度歯周病の発症および進行機序のメカニズムの解明には至っていない。

最近、大腸癌発症への関与が明らかになったことでその多面性が着目されるようになった歯周病原細菌のオレンジコンプレックスに属する *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) は、宿主細胞内へ侵入し免疫応答を調節することが報告されている<sup>18)</sup>。*F.*

*nucleatum* は、慢性歯周炎患者の歯周ポケットから高頻度で検出される<sup>19)</sup>。他の菌との凝集能が高く、*P. gingivalis* の栄養面をサポートすることで、歯周病の発症の原因となるバイオフィルムの成熟化を促すため、極めて重要な細菌であると考えられている<sup>20)</sup>。そこで本研究では、最初に *F. nucleatum* に対する NGF と DGF の細胞応答性を比較した。炎症誘発性サイトカインである IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  ならびに好中球の走化性に関与するケモカインである IL-8 と<sup>21-23)</sup>、組織破壊に関与する matrix metalloproteinase (MMP) 3 および MMP9<sup>24)</sup> の遺伝子発現量を定量 PCR 法により解析した。これらの遺伝子産物は、宿主の細胞表層のパターン認識受容体 (pattern recognition receptors, PRRs) の Toll like receptor (TLR) 2, TLR4 で認識された後、nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) や mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路を介して発現が誘導される<sup>25)</sup>。また、細胞表層に存在する 7 回膜貫通型受容体の protease-activated receptor (PAR) ファミリーに属する PAR2 は、セリンプロテアーゼの細胞作用を媒介しており、歯周病原細菌の産生するプロテアーゼによっても活性化される<sup>26-29)</sup>。PAR2 は炎症誘発性サイトカインの発現を誘導し、さらに MAPK の一つである extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化を介して細胞増殖、細胞分化、炎症、免疫応答など多様な応答を誘発することで癌や炎症の進行にも関与していることが報告されている<sup>30)</sup>。そして、ERK1/2 のリン酸化に DS 責任遺伝子である dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) が関与している<sup>31)</sup>。以上のことから、*F. nucleatum* による線維芽細胞の細胞応答性として、TLR2, TLR4, PAR2, および phosphorelated-

ERK1/2 (phospho-ERK1/2) のタンパク質発現量を Western blotting 法により解析した。

主要な歯周病原細菌である *P. gingivalis* は、細菌の情報伝達分子や遺伝物質を含んだ約 100 nm (20-300 nm) の小胞体 (outer membrane vesicles; OMVs) を放出する<sup>32)</sup>。グラム陰性菌は OMVs により、内毒素を宿主細胞へ運搬し炎症応答や細胞死を誘発すること、アシルホモセリンラクトンなどのオートインデューサーを産生し細菌間コミュニケーションや遺伝子水平伝播を担うこと、細胞外に酵素を放出することで細菌の栄養源を確保することなどが報告されている<sup>32-34)</sup>。*P. gingivalis* 由来の OMVs (P-OMVs) には LPS, gingipain, 線毛などほぼすべて細胞障害性因子が含まれ、生菌よりも口腔粘膜や線維芽細胞へ侵入しやすく、生菌が検出されない生体部位でも検出されるなど病原因子としての重要性が報告されている<sup>35-40)</sup>ことから、DGF における P-OMVs に対する細胞応答性を確認した。

また、炎症は細菌やその病原因子の攻撃に対する宿主の防御反応であり、サイトカインが重要な役割を担っている<sup>41,42)</sup>。炎症誘発性サイトカインだけではなく、過剰な防御反応が誘発されないように抗炎症性サイトカインもまた必要であり、両者のバランス関係が極めて重要であることが報告されており<sup>41,42)</sup>、このバランスの破綻によって歯周病のような慢性炎症性疾患が誘発される<sup>41,42)</sup>。炎症過程において重要な働きを示す IL-1 ファミリーには 11 種類のサイトカインが含まれ、炎症誘発性サイトカイン (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$  ならびに IL-36 $\gamma$ ) と抗炎症性サイトカイン {IL-1 receptor antagonist (Ra), IL-36Ra, IL-37 ならびに IL-38} が存在する<sup>43,44)</sup>。炎症誘発性サイトカインである IL-1 $\beta$  は、歯周組織

の炎症初期過程における宿主細胞の免疫応答に関与する重要な炎症メディエーターである<sup>43)</sup>。一方、IL-37は抗炎症性サイトカインであり、炎症誘発性サイトカインの抑制や他の抗炎症性サイトカインの発現誘導を担い免疫応答抑制に働く<sup>44)</sup>。Liら<sup>45)</sup>はマクロファージへのIL-37刺激によってLPS誘導の炎症誘発性サイトカイン産生、およびシグナル伝達経路の活性が抑制されることを報告しており、IL-37は歯周病における炎症抑制においても、抗炎症性サイトカインとして重要な役割を担うと考えられる。IL-1 $\beta$ 、IL-37ともにLPS、gingipain、P-OMVsなどの歯周病原細菌の病原因子によって直接的および間接的に発現誘導される<sup>43,44,46)</sup>。以上のことから、重度歯周病を示すDSでは、P-OMVsで刺激されたDGFにおいて、IL-1 $\beta$ とIL-37の遺伝子発現誘導パターンにアンバランスが生じていると考えられるため、P-OMVs刺激による線維芽細胞のIL-1 $\beta$ とIL-37の遺伝子発現ならびに細胞内シグナル伝達経路についてもDGFとNGFを比較した。

## 材料および方法

### 1. 細菌および培養

*F. nucleatum* ATCC 25586株および*P. gingivalis* ATCC 33277株をそれぞれ変法FM培地「ニッスイ」(日水製薬, 日本), CDC血液寒天培地(800 mg/L L-cysteine, 5 mg/L hemin, 10 mg/L vitamin K1, 0.5 % yeast extract, 5% 羊脱繊維血含有 tryptic soy agar)にて、37°Cの嫌気条件下(80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>)で培養した。それぞれシングルコロニ

一を液体培地 (trypticase peptone 15 g/L, phytone peptone 5 g/L, 0.5 % yeast extract, 800 mg/L L-cysteine, 5 mg/L hemin, 10 mg/L vitamin K1, 100 mg/L paromomycin) にて 37°C の嫌気条件下で培養した。*F. nucleatum* は生菌を実験に供し、*P. gingivalis* は OMVs を抽出した。

## 2. P-OMVs

*P. gingivalis* を log 対数期である細菌懸濁液の濁度 (OD<sub>600</sub>) が 0.6 になるまで培養し、これが  $6 \times 10^8$  CFU/ml であることを確認した。培養上清を回収し、ExoBacteria™ OMV Isolation Kit (System Biosciences, LLC, USA) を用いて P-OMVs を抽出した。抽出した P-OMVs は Bradford assay によりタンパク質量を測定した。

## 3. 培養細胞

インフォームドコンセントにより同意を得た DS (n=4, 年齢幅 : 8-12 歳) および健常者 (n=4, 年齢幅 : 16-18 歳) から、歯の交換期による抜歯時ないし、歯科矯正による便宜抜歯時に採取した辺縁歯肉切片を実験に供した。Somerman ら<sup>47)</sup>の方法に従い試料をアウトグロースさせ、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS) および抗菌薬 (50 units/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin : GIBCO, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM : Sigma, USA) を用いて線維芽細胞を 37°C, CO<sub>2</sub> インキュベーター

内で継代し、継代数 6~10 を実験に供した。実験は日本大学倫理審査委員会によって承認を受けたのちに行った（日本大学倫理審査承認番号：EC 21-014）。

#### 4. *F. nucleatum* 接種

線維芽細胞に抗菌薬および 10% FBS 含有 D-MEM を加え、遺伝子発現解析には 60 mm 細胞培養ディッシュを、またタンパク質発現解析には 6 well 細胞培養プレートを使用し、near confluent になるまで 37°C, CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置培養した。それぞれの細胞数は、 $4 \times 10^5$  および  $2 \times 10^5$  であった。抗菌薬を含まない 10% FBS 含有 D-MEM に代え、さらに 2 時間同条件で静置した後、抗菌薬を含まない 10% FBS 含有 D-MEM に *F. nucleatum* を加え線維芽細胞に添加した。*F. nucleatum* は、Ichikawa ら<sup>48)</sup>および小野ら<sup>49)</sup>の報告を参考にし、線維芽細胞数に対する *F. nucleatum* 接種濃度の割合を 1 : 100 (multiplicity of infection ; MOI 100) とした。*F. nucleatum* 接種は、遺伝子発現解析には予備実験により 3, 6, 9 時間行い、細胞表層の TLR2, TLR4, PAR2 および細胞内シグナル伝達経路の phospho-ERK1/2 のタンパク質発現解析には、予備実験にて検出可能となった 5, 15 分とした。

#### 5. P-OMVs 刺激

P-OMVs 刺激の条件は予備実験の結果により、タンパク質濃度を 1.0 µg/ml とした。刺激時間については、細胞内シグナル伝達経路の phospho-ERK1/2 のタンパク質発現を検出

が可能であった 15 分, IL-1 $\beta$  および IL-37 の遺伝子発現解析を 6 時間とした。

## 6. ERK1/2 inhibitor の添加

線維芽細胞に抗菌薬を含まない 10% FBS 含有 D-MEM と 25  $\mu$ M の ERK1/2 inhibitor である PD98059 (Alexis Biochemicals, USA) <sup>50)</sup>を添加し, 15 分間 37°C, CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置した後 P-OMVs で刺激し, 遺伝子発現を定量 PCR 法にて確認した。PD98059 添加濃度は, 過去の報告を参考に予備実験を行い, 線維芽細胞が死滅せずに ERK1/2 が抑制される濃度を確認して決定した。

## 7. 定量 PCR

*F. nucleatum* 接種または P-OMVs 刺激後の線維芽細胞から QIAshredder® (Qiagen, Germany) および RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Germany) を用いて total RNA を抽出し, PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa, Japan) にて cDNA 合成を行った。TaqMan™ probe を使用し, Applied Biosystem StepOnePlus™ real time PCR system (Applied Biosystems, USA) を用いて定量 PCR 法による遺伝子発現解析を行った。18S rRNA を内因性 RNA コントロールとして標準化に用いた。対象遺伝子の特異的 primer と TaqMan™ probe は Applied Biosystems で合成された IL-1 $\beta$  (Hs01555410\_m1), TNF- $\alpha$  (Hs00174128\_m1), IL-8 (Hs00174103\_m1), IL-37 (Hs00367201\_m1), 18S rRNA (4318839) を使用した。相

対比率による各遺伝子発現レベルは、 $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  法を用いて表した<sup>51)</sup>。

## 8. Western blotting

*F. nucleatum* または P-OMVs で刺激した線維芽細胞を滅菌 PBS にて 2 回洗浄し、protease inhibitor cocktail® (Thermo Fisher Scientific, USA) および phosphatase inhibitor cocktail solution® (Wako, Japan) を含む RIPA buffer® (Wako, Japan) にてタンパク質を抽出した。Bradford 法にてタンパク質を定量後、10% SDS-polyacrylamide gel を用いて電気泳動を行い、Thermo Scientific™Pre-Cut Nitrocellulose Membranes, 0.45µm (Thermo Fisher Scientific, USA) に転写した。特異的な一次抗体および HRP 標識の二次抗体を反応させた後に発色させ、ChemiDoc™ Touch MP system (Bio-Rad, USA) を使用しタンパク質の検出を行った。バンド画像を Image J (NHI, USA) ソフトウェアで処理し、得られたバンド輝度を数値化した。各タンパク質は、β-actin で標準化し相対シグナル強度 (relative signal intensity ; rSI = 各種タンパク質の輝度値/β-actin reference 値) を算出した。用いた一次抗体および二次抗体を Table 1 に示した。

Table 1 一次抗体および二次抗体

Target protein	primary antibody			secondary antibody		
	dilution	Company	Source	dilution	Company	Source
TLR2	1 : 1000	Santa cruz biotechnology	mouse monoclonal	1 : 10000	GE healthcare	anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep
TLR4	1 : 1000	Santa cruz biotechnology	mouse monoclonal	1 : 10000	GE health	anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep
PAR2	1 : 1000	Abcam	Rabbit polyclonal	1 : 10000	Thermo	anti-Rabbit IgG (H+L)HRP-Linked Whole Ab Goat
phospho-ERK1/2	1 : 1000	Cell signaling	Rabbit polyclonal	1 : 10000	Thermo	anti-Rabbit IgG (H+L)HRP-Linked Whole Ab Goat
β-actin	1 : 1000	Sigma	mouse monoclonal	1 : 10000	GE healthcare	anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep

## 9. 統計処理

SPSS Version 26.0 (IBM, USA) を用いて、二元配置分散分析後、Tukey-Kramer test を用い有意水準 5% で統計処理を行った。

## 結 果

### 1. *F. nucleatum* による線維芽細胞の遺伝子発現への影響

*F. nucleatum* 接種 3, 6, 9 時間後の IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , および IL-8 遺伝子発現は, NGF, DGF とともに非接種群に比べて接種群の方がすべての時間において有意に上昇し, かつ DGF の方が NGF よりも有意に高かった (Fig.1A, B, C)。また, これらの遺伝子発現上昇は, NGF, DGF とともに 1.5 時間で上がり始め (データ未発表), 3 時間でピークとなりその後時間依存的に低下する傾向であった。

MMP-3, MMP-9 の遺伝子発現も NGF, DGF とともに非接種群に比べて接種群の方がすべての時間において有意に上昇し, DGF の方が NGF よりも有意に高かった (Fig.1D, E)。これらの遺伝子発現上昇は, NGF, DGF とともに時間依存的に上昇する傾向であった。



**Fig. 1 Influence of *F. nucleatum* on mRNA expressions in NGFs and DGFs**

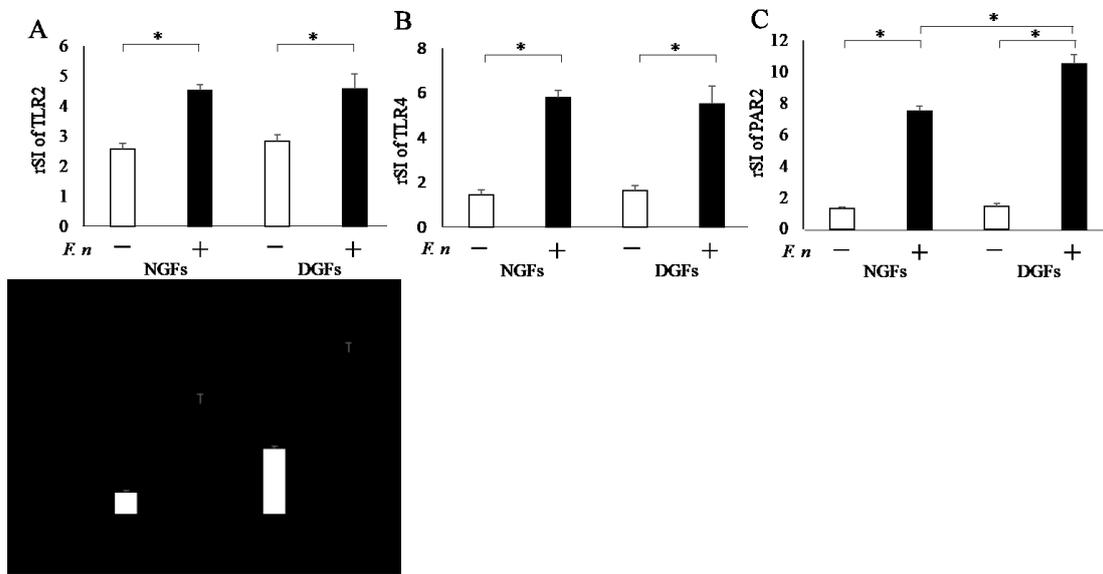
GFs (n=4 each) were inoculated with *F. nucleatum* (*F. n*). After inoculation, total RNAs were isolated at 3, 6, and 9 hrs. The IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-8 (C), MMP-3 (D), MMP-9 (E) mRNA expressions were performed by quantitative PCR. Gene expressions were normalized by 18S rRNA. These expressions were done in GFs in triplicate. Data show the mean  $\pm$  SD. \*p < 0.05 .

2. *F. nucleatum* 刺激による線維芽細胞のタンパク質発現への影響

*F. nucleatum* 接種 5 分後の TLR2, TLR4 タンパク質発現量は, NGF, DGF とともに非接種群に比べて接種群の方が有意に上昇し, NGF と DGF の比較では, 有意差を認めなかった (Fig. 2A, B)。一方接種 5 分後の PAR2 タンパク質発現量は, NGF, DGF とともに非接種群

より接種群が有意に上昇し、NGF と DGF の比較では 接種群で DGF の方が有意に高かった (Fig. 2C)。

接種 15 分後の phospho-ERK1/2 タンパク質発現量は、NGF、DGF とともに非接種群よりも接種群の方が上昇し、NGF と DGF の比較では非接種群および接種群ともに DGF の方が NGF よりも有意に高かった (Fig. 2D)。

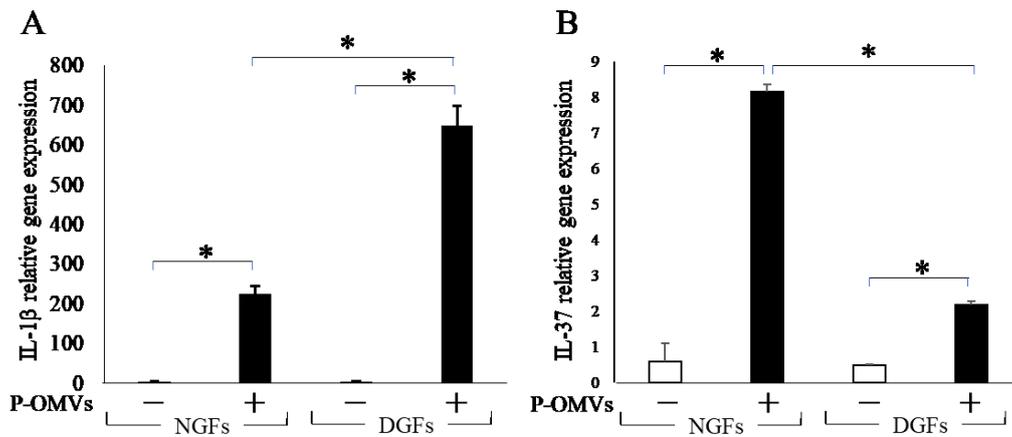


### Fig.2 Influence of *F. nucleatum* on protein expressions in NGFs and DGFs

GFs (n=4 each) were inoculated with *F. nucleatum* (*F.n*). After inoculation, total proteins were isolated at 5 min for TLR2, TLR4, and PAR2, and at 15 min for phospho-ERK1/2. The protein expressions of TLR 2 (A), 4 (B), PAR2 (C), and phospho-ERK1/2 (D) were also observed in NGF and DGF inoculated with *F. n* by Western blotting. The signal of the target protein band was quantified, normalized by  $\beta$ -actin, and calculated the relative signal intensity (rSI). Data show the mean  $\pm$  SD. \*p < 0.05

### 3. P-OMVs 刺激による線維芽細胞の遺伝子発現への影響

P-OMVs 刺激 6 時間後の IL-1 $\beta$  および IL-37 の遺伝子発現を Fig. 3 に示す。NGF, DGF は共に上昇した。IL-1 $\beta$  遺伝子発現は NGF より DGF の方が有意に高く, IL-37 遺伝子発現は DGF の方が有意に低かった。

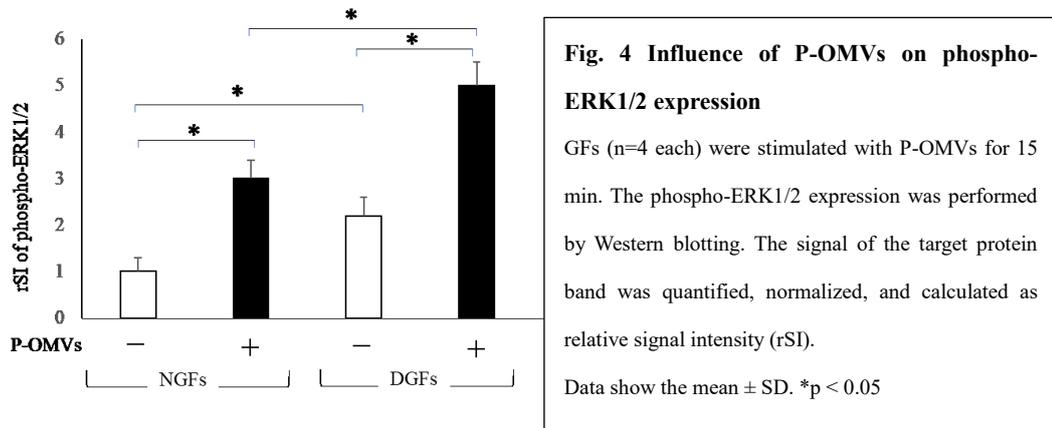


**Fig. 3 Influence of P-OMVs on IL-1 $\beta$  and IL-37 mRNA expression in NGFs and DGFs**

GFs (n=4 each) were stimulated with P-OMVs for 6 hrs. The mRNA expressions of IL-1 $\beta$  (A) and IL-37 mRNA (B) were performed by quantitative PCR. Gene expressions were normalized by 18S rRNA. These experiments were performed in GFs in triplicate. Data show the mean  $\pm$  SD. \*p < 0.05

### 4. P-OMVs 刺激による線維芽細胞の phospho-ERK1/2 への影響

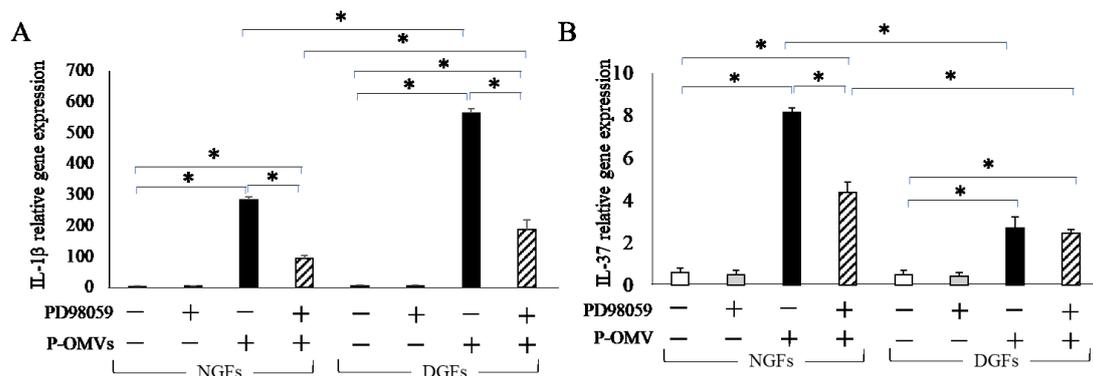
P-OMVs 刺激 15 分後の phospho-ERK1/2 タンパク質発現は P-OMVs 刺激で NGF, DGF 共に上昇し, 刺激の有無にかかわらず, NGF より DGF の方が有意に高かった (Fig.4)。



#### 5. ERK1/2 inhibitor (PD98059) 添加による線維芽細胞の遺伝子発現への影響

PD98059 無添加および P-OMV 非刺激群をコントロール群とした。PD98059 単独添加では、NGF および DGF における IL-1 $\beta$  および IL-37 の遺伝子発現量はコントロール群と比べて有意な差を認めなかった。さらに、P-OMVs 刺激群は NGF および DGF における IL-1 $\beta$  および IL-37 の遺伝子発現はコントロール群と比べて有意に上昇した (Fig. 5)。

P-OMVs で誘導された IL-1 $\beta$  遺伝子発現は、NGF, DGF ともに PD98059 添加により有意に低下した (Fig. 5)。一方 P-OMVs に誘導された IL-37 遺伝子発現は、PD98059 添加により NGF では有意に低下するものの、DGF では有意差を認めなかった (Fig. 5B)。



**Fig. 5 Effect of an ERK1/2 inhibitor on IL-1 $\beta$  and IL-37 mRNA expression in NGFs and DGFs**

GFs (n=4 each) were treated with ERK1/2 inhibitor (PD98059) for 15 min prior to stimulation of P-OMVs. After stimulation of P-OMV for 6 hrs, IL-1 $\beta$  (A) and IL-37 (B) mRNA expressions were performed by quantitative PCR. Gene expressions were normalized by 18S rRNA. These expressions were performed in GFs in triplicate. Data show the mean  $\pm$  SD. \*p < 0.05

## 考 察

本研究は、DS に認められる重度歯周病の発症と進行のメカニズムの解明を目的に、NGF と DGF における *F. nucleatum* 接種または P-OMVs 刺激に対する細胞応答性の違いを検討した。

*F. nucleatum* による IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, MMP-3 ならびに MMP-9 遺伝子発現の上昇は NGF よりも DGF の方が高かった。IL-1 $\beta$  と TNF- $\alpha$  は細菌感染によって発現誘導され、初期の炎症応答において中心的役割を担っており、様々な細胞に作用して多彩な免疫応答を誘発している<sup>21, 22, 52, 53</sup>)。IL-8 はケモカインの一つであり、炎症部位への白血球遊走や活性作用を有する<sup>23</sup>) だけでなく好塩基球・好酸球・T 細胞の遊走活性、好中球活性など多彩な

影響を及ぼすことが報告されている<sup>54)</sup>。これらの炎症メディエーターは、慢性炎症である歯周病においても同様な働きを示す<sup>55, 56)</sup>。また細胞外マトリックス分解酵素である MMP は組織破壊に関与し、線維芽細胞では MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13 が産生されることが知られている<sup>57)</sup>。そのなかでも MMP-3 は、MMP-9 など他の MMP の前駆体を活性化させるため歯周病において重要な役割を担っていることが知られている<sup>24, 57, 58)</sup>。さらに MMP-9 は歯周病の重症度と進行に関与しているため病態の指標としての有用性が報告されている<sup>59-61)</sup>。*F. nucleatum* だけでなく<sup>62, 63)</sup>、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  もまた MMP-3 や MMP-9 の遺伝子発現誘導因子である<sup>39, 58, 64)</sup>。つまり、DGF おける *F. nucleatum* 接種後 9 時間の MMP-3 および MMP-9 の遺伝子発現上昇は、過剰に発現した IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  による影響も考えられる。このような負のスパイラルは DS における重度歯周病の原因となっている可能性が考えられる。

*F. nucleatum* が上皮細胞に認識される機構として、菌表層に存在する LPS は TLR2 および TLR4、菌表層タンパク質の FomA は TLR2、FadA は E-cadherin、Fap2 は糖鎖である D-galactose- $\beta$  (1-3) -N-acetyl-D-galactosamine とそれぞれ結合することが報告されている<sup>65-70)</sup>。今回 *F. nucleatum* によって線維芽細胞の TLR2, TLR4 が発現が上昇したのは、主に *F. nucleatum* の表層の LPS ならびに FomA が TLR2 および TLR4 に結合したことによるものと推察されるが、NGF と DGF に有意差を認めなかった。これまでの報告では、DS における TLR2 や TLR4 について様々な見解がある<sup>71-73)</sup>。Huggard ら<sup>71)</sup>は LPS と TLR1/2 のアゴニストで刺激した好中球と単球における TLR2 の遺伝子発現は健常者由来よりも DS 由来の方が

有意に高くなると報告している。さらに TLR アダプタータンパク質において、myeloid differentiation factor 88 遺伝子発現は DS 由来の方が低くなり、TIR domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$  (TRIF) 遺伝子発現は DS 由来の方が高くなるといった異常な応答性があることも報告されている<sup>71)</sup>。これらの異常は、DS 責任遺伝子の Down syndrome critical region protein 1 (DSCR1) が関与していると考えられている<sup>71, 72)</sup>。一方、舌粘膜細胞における一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNPs) 解析では歯周病の有無も加えた DS および健康者の TLR2, TLR4 の SNPs 発生パターンは全ての実験グループで同じであったとの報告もある<sup>73)</sup>。研究結果がこれらの論文と本研究結で異なるのは、用いた細胞が異なることや解析の対象が遺伝子とタンパク質で異なるためであると考えられる。本研究は、TLR のアダプタータンパク質についての検討は行っていない。NGF と DGF で TLR2, TLR4 のタンパク質発現量は変わらないものの、アダプターの発現パターンが異なったことで、その後のシグナル伝達系路の phospho-ERK1/2 のタンパク質発現量に有意差がでた可能性も否定できないため、今後さらなる解明が必要である。

本研究では、TLR2, TLR 4 と同様に細胞表層に存在する PAR2 発現は NGF よりも DGF の方が有意に高い結果であった。*F. nucleatum* 菌体が線維芽細胞の PAR2 を活性化させる報告はないものの、他の細胞種に対しては *F. nucleatum* から産生される Fusolisin などのタンパク質分解能をもつセリンプロテアーゼが、炎症や癌などの進行において影響を示すことが報告されている<sup>74-77)</sup>。以上のことから本研究において NGF, DGF 共に *F. nucleatum* の

産生するプロテアーゼによって PAR2 が反応したものと推察され、プロテアーゼ阻害剤による応答性の確認も今後必要である。そして、TLR2, TLR4 ならびに PAR2 の下流である phospho-ERK1/2 のタンパク質発現は NGF よりも DGF の方が *F. nucleatum* 非接種群でも高かったが、DS 責任遺伝子である DYRK1A は ERK1/2 の活性を増大させるとの報告<sup>31)</sup>があり、トリソミーである DGF においては DYRK1A が NGF の 1.5 倍の発現になることに起因すると思われる。PAR2 は ERK1/2 を介して炎症性サイトカインの発現誘導を担うとの報告<sup>78-81)</sup>があることから、DGF においては *F. nucleatum* によってより強く発現上昇した PAR2 とトリソミーに起因した過剰な DYRK1A が phospho-ERK1/2 の過剰な発現上昇を誘導し、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 ならびに MMP-3, MMP-9 の遺伝子発現上昇につながったのではないかとと思われる。以上のことから *F. nucleatum* は DS においてより一層の歯周組織の炎症の増悪と組織破壊を招き、重度歯周病を誘発する主要な病原因子の一つとなりうることを示された。

P-OMVs 刺激によって誘導された炎症誘発性サイトカインである IL-1 $\beta$  遺伝子発現は、NGF よりも DGF の方が有意に高かったものの、抗炎症性サイトカインである IL-37 遺伝子発現は NGF よりも DGF の方が有意に低かった。つまりサイトカインにおける炎症誘発と抑制のアンバランスが DS に生じていることが推定された。P-OMVs 刺激による phospho-ERK1/2 のタンパク質発現の結果は線維芽細胞への *F. nucleatum* 接種実験と同様に P-OMVs 非刺激群、刺激群ともに DGF の方が NGF より高かった。つまり DGF ではトリソミーに起因する DYRK1A の過剰な発現が phospho-ERK1/2 の発現上昇に関与している可能

性が考えられた。この知見は過去の報告と同様である<sup>31,82,83</sup>)。そして、ERK1/2 の inhibitor である PD98059 添加によって、P-OMVs 刺激で誘導された IL-1 $\beta$  遺伝子発現は NGF, DGF ともに有意に低下した。一方 IL-37 遺伝子発現は PD98059 添加によって、NGF では有意に低下するものの、DGF では有意差を認めなかった。つまり、NGF では IL-1 $\beta$ , IL-37 ともに遺伝子発現には phospho-ERK1/2 が関与している<sup>84-86</sup>) が、DGF では IL-37 遺伝子発現に異常を認め、phospho-ERK1/2 以外の経路が関与していることが示唆された。IL-37 遺伝子は染色体 2q12 に存在しており<sup>87</sup>)、21 番染色体異常の DS と 2 番染色体との関係性についての報告はなく、なぜ IL-37 の遺伝子発現が弱いのかについてはさらなる探求が必要である。

以上のことから、*F. nucleatum* および P-OMVs に対する宿主細胞の過剰な炎症反応と抗炎症性サイトカインである IL-37 の低発現によるサイトカイン発現のバランス破綻が、DS における重度歯周病の発症および進行に関与する可能性が示唆された。また、最近では *P. gingivalis* も発癌との関連性が報告され始めている<sup>88,89</sup>)。発癌のメカニズムの一つである *P. gingivalis* や *F. nucleatum* による炎症性サイトカインの発現とそれに伴う好中球からの ROS 産生の増大による DNA 損傷の流れにおける応答性は *P. gingivalis* よりも *F. nucleatum* の方が強いと報告されており<sup>68, 88</sup>)、*F. nucleatum* の制御は癌発症および進行抑制においても重要である。また、IL-37 は炎症抑制機能だけでなく、癌細胞の増殖抑制や転移制御などが報告されている<sup>85,90,91</sup>)。一方で、DS は大腸癌などの固形癌の発症率が低いことが知られ、21 番染色体上にある DSCR1 や DYRK1A が関与することが報告されている<sup>5</sup>)。 *F. nucleatum* 接種

による過剰な細胞応答性や P-OMVs 刺激による IL-37 の低発現を示す DGF は、癌発症や進行のメカニズムの解明のための実験モデルとしての有用性も高い可能性があると思われ、本研究結果は非常に有意義であると考えられる。

## 結 論

DGF において、*F. nucleatum* は PAR2 およびその下流の phospho-ERK1/2 をより過剰に反応させ、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-8、MMP3 および MMP9 の遺伝子発現誘導をより著しく増大させる。さらに、DGF では P-OMVs 刺激によって IL-1 $\beta$  と IL-37 の遺伝子発現誘導にアンバランスが生じ、IL-37 の遺伝子発現誘導には phospho-ERK1/2 以外の経路の関与が疑われた。これらのことが、DS における重度歯周病の発症および進行に関与している可能性が示唆された。

本論文は、主となる参考論文「Imbalance of IL-1 family mRNA Expression and IL-37 as a Potential Therapeutic Target for Periodontal Inflammation in Down Syndrome」International Journal of Oral-Medical Sciences 掲載予定、および副となる参考論文「Down 症候群由来歯肉線維芽細胞への *Fusobacterium nucleatum* 接種の影響」日大口腔科学掲載予定、をまとめたものである。

## 参考文献

- 1) Hernandez D, Fisher EM: Down Syndrome Genetics: Unravelling a Multifactorial Disorder. *Hum Mol Genet*, 5: 1411-1416, 1996.
- 2) van Trotsenburg AS, Heymans HS, Tijssen JG, et al.: Comorbidity, Hospitalization, and Medication Use and Their Influence on Mental and Motor Development of Young Infants with Down Syndrome. *Pediatrics*, 118: 1633-1639, 2006.
- 3) Ram G, Chinen J: Infections and Immunodeficiency in Down Syndrome. *Clin Exp Immunol*, 164: 9-16, 2011.
- 4) Elizabeth H, David P, Brian TG, et al.: Alzheimer's Disease in Down Syndrome. *Eur J Neurodegener Dis*, 1: 353-364, 2012.
- 5) Baek KH, Zaslavsky A, Lynch RC, et al.: Down's Syndrome Suppression of Tumour Growth and the Role of the Calcineurin Inhibitor DSCR1. *Nature*, 459: 1126-1130, 2009.
- 6) Ram G, Chinen J: Infections and Immunodeficiency in Down Syndrome. *Clin Exp Immunol*, 164: 9-16, 2011.
- 7) Amano A, Murakami J, Akiyama S, et al.: Etiologic Factors of Early-onset Periodontal Disease in Down Syndrome. *Jpn Dent Sci Rev*, 44: 118-127, 2008.
- 8) Morgan J: Why is Periodontal Disease More Prevalent and More Severe in People with Down Syndrome? *Spec Care Dentist*, 27: 196-201, 2007.

- 9) Cohen MM, Winer RA, Schwartz S, et al.: Oral Aspects of Mongolism. Part I. Periodontal Disease in Mongolism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 14: 92-107, 1961.
- 10) Komatsu T, Lee MC, Miyagi A, et al.: Reactive Oxygen Species Generation in Gingival Fibroblasts of Down Syndrome Patients Detected by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Redox Report*, 11: 71-77, 2007.
- 11) Reuland-Bosma W, van Dijk J: Periodontal Disease in Down's Syndrome: a review. *J Clin Periodontol*, 13: 64-73, 1986.
- 12) 山崎和久 : 歯周病と非感染性疾患・慢性疾患との関連. *生物試料分析*, 41 : 135-141, 2018.
- 13) Tanaka Y, Abiko Y, Mega J: The Relationship between Premature Ageing and Immune Responses in the Oral Cavity of Down Syndrome. *Jpn Dent Sci Rev*, 46: 78-85, 2010.
- 14) Otsuka Y, Ito M, Yamaguchi M, et al.: Enhancement of Plasminogen Activator Activity Stimulated by LPS in Gingival Fibroblasts of Individuals with Down Syndrome. *J Oral Sci*, 43: 207-212, 2001.
- 15) Otsuka Y, Ito M, Yamaguchi M, et al.: Enhancement of Lipopolysaccharide-Stimulated Cyclooxygenase-2 mRNA Expression and Prostaglandin E2 Production in Gingival Fibroblasts from Individuals with Down Syndrome. *Mech Ageing Dev*, 123: 663-674, 2002.
- 16) 田中陽子, 矢口学, 野本たかと : Down 症歯肉線維芽細胞における細胞内シグナル伝達系への Lipopolysaccharide (LPS)の影響. *医学と生物学*, 157: 1107-1112, 2013.
- 17) 根岸浩二, 田中陽子 : Down 症候群由来歯肉線維芽細胞にみられる IL-4 の炎症抑制反応

阻害と転写因子の関係性. 障歯誌, 42 : 33-42, 2021.

18) Desvaux M, Khan A, Beatson SA, et al.: Protein Secretion Systems in *Fusobacterium nucleatum*:

Genomic Identification of Type 4 Piliation and complete Type V Pathways Brings New Insight into

Mechanisms of Pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1713 : 92-112, 2005.

19) 多田 浩之, 西岡 貴志, 松下 健二, 他 : *Fusobacterium nucleatum* によるマスト細胞の

細胞外トラップ放出と炎症誘導. エンドトキシン・自然免疫研究, 22 : 63-66, 2019.

20) Sakanaka A, Kuboniwa M, Shimma S, et al.: *Fusobacterium nucleatum* Metabolically Integrates

Commensals and Pathogens in Oral Biofilms. *mSystems*, 7: e0017022, doi:

10.1128/msystems.00170-22, 2022.

21) 小野寄菊夫: インターロイキン 1-細胞増殖制御から慢性炎症性疾患までー.

YAKUGAKU ZASSHI, 133: 645-660, 2013.

22) Jang Di, Lee AH, Shin HY, et al.: The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in

Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*, 22: 2719, doi:

10.3390/ijms22052719, 2021.

23) 稲寺秀邦, 松島綱治: ケモカインと炎症. 日本老年医誌, 36: 82-89, 1999.

24) Cox SW, Eley BM, Kiili M, et al.: Collagen Degradation by Interleukin-1 beta-Stimulated Gingival

Fibroblasts is Accompanied by Release and Activation of Multiple Matrix Metalloproteinases and

Cysteine Proteinases. *Oral Dis*, 12: 34-40, 2006.

- 25) 金子高士：歯周組織破壊に導く歯周病原細菌-宿主間相互作用の解明. 日歯周誌, 53 : 1-12, 2011.
- 26) Belibasakis GN, Bostanci N, Reddi D: Regulation of Protease-Activated Receptor-2 Expression in Gingival Fibroblasts and Jurkat T Cells by *Porphyromonas gingivalis*. Cell Biol Int, 34: 287-292, 2010.
- 27) 今村隆寿: 歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* システインプロテアーゼ (gingipains) —構造, 病原作用および歯周炎予防・治療への有用性—. 炎症, 18 : 335-340, 1998.
- 28) Holzhausen M, Spolidorio LC, Ellen RP, et al.: Protease-Activated Receptor-2 Activation: A Major Role in the Pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis* Infection. Am J Pathol, 168: 1189-1199, 2006.
- 29) 川畑篤史: プロテアーゼ受容体 PAR-2 (protease-activated receptor-2) の生理機能. 日薬理誌, 121: 411-420, 2003.
- 30) Darmoul D, Gratio V, Devaud H, et al.: Protease-Activated Receptor 2 in Colon Cancer: Trypsin-Induced MAPK Phosphorylation and Cell Proliferation are Mediated by Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation. J Biol Chem, 279 : 20927-20934, 2004.
- 31) Kelly PA, Rahmani Z: DYRK1A Enhances the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in PC12 Cells by Forming a Complex with Ras, B-Raf, and MEK1. Mol Biol Cell, 16: 3562-3573, 2005.

- 32) 渡部邦彦：細菌が放出する膜小胞（Membrane Vesicles）の機能と生合成機構そして応用に向けた研究動向. 化学と生物, 54 : 720-725, 2016.
- 33) Kikuchi Y, Obana N, Toyohuku M, et al.: Diversity of Physical Properties of Bacterial Extracellular Membrane Vesicles Revealed Through Atomic Force Microscopy Phase Imaging. *Nanoscale*, 12: 7950-7959, 2020.
- 34) 中山二郎：細菌の世界における細胞間ケミカルコミュニケーションとその分子メカニズム. 腸内細菌学雑誌, 25: 221-234, 2011.
- 35) Farrugia C, Stafford GP, Murdoch C: *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles Increase Vascular Permeability. *J Dent Res*, 99:1494-1501, 2020.
- 36) Zhang Z, Liu D, Liu S, Zhang S, Pan Y: The Role of *Porphyromonas gingivalis* Outer Membrane Vesicles in Periodontal Disease and Related Systemic Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*, 10: 585917, doi: 10.3389/fcimb.2020.585917, 2020.
- 37) Okamura H, Hirota K, Yoshida K, et al.: Outer Membrane Vesicles of *Porphyromonas gingivalis*: Novel Communication Tool and Strategy. *Jpn Dent Sci Rev*, 57:138-146, 2021.
- 38) Mantri CK, Chen CH, Dong X., et al.: Fimbriae-Mediated Outer Membrane Vesicle Production and Invasion of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiologyopen*, 4: 53-65, 2015.
- 39) Ho MH, Chen CH, Goodwin JS, et al.: Functional Advantages of *Porphyromonas gingivalis* Vesicles. *PLoS One*, 10: e0123448. Doi: 10.1371/journal.pone.0123448, 2015.

- 40) Nakao R., Hasegawa H., Ochiai K., et al.: Outer Membrane Vesicles of *Porphyromonas gingivalis* Elicit a Mucosal Immune Response. PLoS One, 6: e26163. Doi: 10.1371/journal.pone.0026163, 2011.
- 41) Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L: Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs. Oncotarget, 9: 7204–7218, 2018.
- 42) Keane MP, Strieter RM: The Importance of Balanced Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Mechanisms in Diffuse Lung Disease. Respir Res, 3: 5, doi: 10.1186/rr177, 2001.
- 43) Cheng R, Wu Z, Li M, et al.: Interleukin-1 $\beta$  is a Potential Therapeutic Target for Periodontitis: a Narrative Review. Int J Oral Sci, 12: 2, doi: 10.1038/s41368-019-0068-8, 2020.
- 44) Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, et al: IL-37 is a Fundamental Inhibitor of Innate Immunity. Nat Immunol, 11: 1014–1022, 2010.
- 45) Li S, Neff P, Barber K, et al.: Extracellular Forms Of IL-37 Inhibit Innate Inflammation in Vitro and in Vivo but Require the IL-1 Family Decoy Receptor IL-1R8. Proc Natl Acad Sci U S A, 112: 2497-2502, 2015.
- 46) Bufler P.: Interleukin-37 as Fundamental Inhibitor of innate immunity. Arthritis Res Ther. 13 O15, 2011.
- 47) Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA: A Comparative Study of Human Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts in Vitro. J Dent Res, 67: 66-70, 1988.

- 48) Ichikawa K, Yaguchi M, Tanaka Y: The Effect of *Porphyromonas gingivalis* Augmented Invasion by TNF- $\alpha$  on Gingival Fibroblasts Derived from Down Syndrome. *Int J Oral-Med Sci*, 20: 87-97, 2021.
- 49) 小野晃弘, 矢口学, 田中陽子: Down 症候群由来歯肉線維芽細胞にみられる *Porphyromonas gingivalis* 生菌体に対する応答性の異常. *日大口腔科学*, 47: 239-251, 2021.
- 50) Matsumoto E, Hatanaka M, Bohgaki M, Maeda S: PKC Pathway and ERK/MAPK Pathway are Required for Induction of Cyclin D1 and p21Waf1 during 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate-Induced Differentiation of Myeloleukemia Cells. *Kobe J Med Sci*, 52: 181-94, 2006.
- 51) Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.
- 52) Pan W, Wang Q, Cheng Q: The Cytokine Network Involved in the Host Immune Response to Periodontitis. *Int J Oral Sci*, 11: 30, doi: 10.1038/s41368-019-0064-z, 2019.
- 53) 鈴木賢一, 北川誠一: IL-1 $\beta$  によるヒト好中球の活性化と p38 MAP キナーゼ. *炎症・再生*, 23: 204-210, 2003.
- 54) 辻宏和, 松島網治: Interleukin-8 (IL-8), および Monocyte Chemotactic and Activating Factor (MCAF)/Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1). *動脈硬化*, 24: 15-22, 1996.
- 55) Gomes FIF, Aragão MGB, Barbosa FCB, et al.: Inflammatory Cytokines Interleukin-1 $\beta$  and Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ -Novel Biomarkers for the Detection of Periodontal Diseases: a Literature

- Review. *J Oral Maxillofac Res*, 7: e2, doi: 10.5037/jomr.2016.7202, 2016.
- 56) Finoti LS, Nepomuceno R, Pigossi SC, et al.: Association Between Interleukin-8 Levels and Chronic Periodontal Disease. *Medicine (Baltimore)*, 96: e6932, doi: 10.1097, 2017.
- 57) Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H: Matrix Metalloproteinase 3 (Stromelysin) Activates the Precursor for the Human Matrix Metalloproteinase 9. *J Biol Chem*, 267: 3581-3584, 1992.
- 58) Song HK, Noh EM, Kim JM, et al.: Evodiae Fructus Extract Inhibits Interleukin-1 $\beta$ -Induced MMP-1, MMP-3, and Inflammatory Cytokine Expression by Suppressing the Activation of MAPK and STAT-3 in Human Gingival Fibroblasts In Vitro. *Evid Based Complement Alternat Med*, doi: 10.1155/2021/5858393, 2021.
- 59) Pan Y, Li D, Cai Q, et al.: MMP-9 -1562C>T Contributes to Periodontitis Susceptibility. *J Clin Periodontol*, 40: 125-130, 2013.
- 60) Arshad R, Ismail WA, Zara B, et al.: Salivary MMP-9 Levels in Chronic Periodontitis Patients with Type-II Diabetes Mellitus. *Molecules*, 27: 2174, doi: 10.3390/molecules27072174, 2022.
- 61) Luchian I, Goriuc A, Sandu D, et al.: The Role of Matrix Metalloproteinases (MMP-8, MMP-9, MMP-13) in Periodontal and Peri-Implant Pathological Processes, *Int J Mol Sci*, 23: 1806, doi: 10.3390/ijms23031806, 2022.
- 62) Kim S, Ahn SH, Jin-Sil Lee SH, et al.: Differential Matrix Metalloprotease (MMP) Expression Profiles Found in Aged Gingiva. *PLoS One*, 11: e0158777, doi: 10.1371/journal.pone.0158777,

2016.

63) Salvucci M, Crawford N, Stott K, et al.: Patients with Mesenchymal Tumours and High *Fusobacteriales* Prevalence Have Worse Prognosis in Colorectal Cancer (CRC). *Gut*, 71:1600-1612, 2022.

64) Ahn SJ, Rhim EM, Kim JY, et al.: Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Matrix Metalloproteinases-3, -10, and -13 in Human Periodontal Ligament Cells. *J Periodontol*, 85: 490-497, 2014.

65) 中西康大, 田村優志, 高橋美穂, 他 : 口腔がんと細菌・真菌・ウイルス. 腸内細菌学雑誌, 34: 197-208, 2020.

66) Jia YP, Wang K, Zhang ZJ, et al.: TLR2/TLR4 Activation Induces Tregs and Suppresses Intestinal Inflammation Caused by *Fusobacterium nucleatum* In Vivo. *PLoS One*, 12: e0186179, doi: 10.1371/journal.pone.0186179, 2017.

67) Park SR, Kim DJ, Han SH, et al. : Diverse Toll-Like Receptors Mediate Cytokine Production by *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinotakahamycetemcomitans* in Macrophages. *Infect Immun*, 82: 1914-1920, 2014.

68) Proença MA, Biselli JM, Succi M, et al. : Relationship between *Fusobacterium nucleatum*, Inflammatory Mediators and microRNAs in Colorectal Carcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 24 : 5351-5365, 2018.

69) Suk J, Shin JE, Kim YS, et al.: Toll-like Receptor 2 and NALP2 Mediate Induction of Human

- beta-Defensins by *Fusobacterium nucleatum* in Gingival Epithelial cells. *Infect Immun*, 77 : 1044-1052, 2009.
- 70) Gallausiaux CM, Malabirade A, Habier J, et al.: *Fusobacterium nucleatum* Extracellular Vesicles Modulate Gut Epithelial Cell Innate Immunity via FomA and TLR2. *Front Immunol*, 11 : 5836-5844, 2020.
- 71) Huggard D, Koay WJ, Kelly L, et al.: Altered Toll-Like Receptor Signalling in Children with Down Syndrome. *Mediators Inflamm*, 2019: 4068734, doi: 10.1155/2019/4068734, 2019.
- 72) Pang Z, Junkins RD, Raudonis R, et al.: Regulator of Calcineurin 1 Differentially Regulates TLR-dependent MyD88 and TRIF Signaling Pathways. *PLoS One*, 13: e0197491, doi: 10.1371/journal.pone.0197491, 2018.
- 73) Oomori Y, Imamura Y, Fujigaki Y, et al.: Analysis of Mutations of Inflammatory Cytokine and Toll-like Receptor Genes in Periodontitis in Down Syndrome Patients. *Pediatr Dent J*, 17: 19-26, 2007.
- 74) Doron L, Copenhagen-Glazer S, Ibrahim Y, et al.: Identification and Characterization of Fusolisins, the *Fusobacterium nucleatum* Autotransporter Serine Protease. *PLoS One*, 9: e111329, doi: 10.1371/journal.pone.0111329, 2014.
- 75) Bachrach G, Rosen, Bellalou M, et al.: Identification of a *Fusobacterium nucleatum* 65 kDa Serine Protease. *Oral Microbiol Immunol*, 19: 155-159, 2004.

- 76) Bi D, Zhu Y, Gao Y, et al.: Profiling *Fusobacterium* Infection at High Taxonomic Resolution Reveals Lineage-Specific Correlations in Colorectal Cancer. *Nat Commun*, 13:3336, doi: 10.1038/s41467-022-30957-6, 2022.
- 77) Kumar A, Thotakura PL, Tiwary BK, et al.: Target Identification in *Fusobacterium nucleatum* by Subtractive Genomics Approach and Enrichment Analysis of Host-Pathogen Protein-Protein Interactions. *BMC Microbiol*, 16: 84, doi: 10.1186/s12866-016-0700-0, 2016.
- 78) Guo D, Zhou H, Wu Y, et al.: Involvement of ERK1/2/NF- $\kappa$ B Signal Transduction Pathway in TF/FVIIa/PAR2-Induced Proliferation and Migration of Colon Cancer Cell SW620. *Tumour Biol*, 32: 921-930, 2011.
- 79) Yoshida N, Katada K, Handa O, et al.: Interleukin-8 Production via Protease-Activated Receptor 2 in Human Esophageal Epithelial Cells. *Int J Mol Med*, 19: 335-340, 2007.
- 80) Tanaka Y, Sekiguchi F, Hong H, et al.; PAR2 Triggers IL-8 Release via MEK/ERK and PI3-Kinase/Akt Pathways in GI Epithelial Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 377: 622-626, 2008.
- 81) Fyfe M, Bergström M, Aspengren S, et al.: PAR-2 Activation in Intestinal Epithelial Cells Potentiates Interleukin-1 $\beta$ -Induced Chemokine Secretion via MAP Kinase Signaling Pathways. *Cytokine*, 31: 358-367, 2005.
- 82) Arron JR, Winslow MM, Polleri A, et al.: NFAT Dysregulation by Increased Dosage of DSCR1 and DYRK1A on Chromosome 21. *Nature*, 441: 595-600, 2006.

- 83) Kawakubo T, Mori R, Shirotani K, et al.: Neprilysin is Suppressed by Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylation Regulated Kinase 1A (DYRK1A) in Down-Syndrome-Derived Fibroblasts. *Biol Pharm Bull*, 40: 327-333, 2017.
- 84) Wang L, Quan Y, Yue Y, et al.: Interleukin-37: a Crucial Cytokine with Multiple Roles in Disease and Potentially Clinical therapy. *Oncol Lett*, 15: 4711–4719, 2018.
- 85) Su Z, Tao X: Current Understanding of IL-37 in Human Health and Disease. *Front Immunol*, 12:696605, doi: 10.3389/fimmu.2021.696605, 2021.
- 86) Kim HK, Lim S, Bae MJ, et al.: PG102 upregulates IL-37 through p38, ERK, and Smad3 pathways in HaCaT Keratinocytes. *Mediators Inflamm*, 2019:6085801, doi: 10.1155/2019/6085801, 2019.
- 87) Offenbacher S, Jiao Y, Kim SJ, et al.: GWAS for Interleukin-1 $\beta$  Levels in Gingival Crevicular Fluid Identifies IL37 variants in Periodontal Inflammation. *Nat Commun*, 9: 3686, doi: 10.1038/s41467-018-05940-9, 2018.
- 88) 高橋直樹, 多部田康一.: 歯周病原細菌による消化器がん発症・進行メカニズム. *日歯周誌*, 63 : 151-157, 2021.
- 89) Wang X, Jia Y, Wen L, et al.: *Porphyromonas gingivalis* Promotes Colorectal Carcinoma by Activating the Hematopoietic NLRP3 Inflammasome, *Cancer Res*, 81 : 2745-2759, 2021.
- 90) Zhao T, Jin F, Xiao Di, et al.: IL-37/ STAT3/ HIF-1 $\alpha$  Negative Feedback Signaling Drives Gemcitabine Resistance in Pancreatic Cancer. *Theranostics*,

10: 4088-4100, 2020.

91) Li Y, Zhao M, Guo D, et al.: Intracellular Mature IL-37 Suppresses Tumor Metastasis via Inhibiting Rac1 Activation. *Oncogene*, 37: 1095-1106, 2018.