



Title	Porphyromonas gingivalis感染がヒト口腔癌細胞の浸潤におよぼす影響
Author(s)	杉田, 英之
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/34359">https://doi.org/10.18910/34359</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

***Porphyromonas gingivalis* 感染が  
ヒト口腔癌細胞の浸潤におよぼす影響**

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻(療護歯科保健学)

杉田 英之

(指導教官:天野 敦雄 教授)

## はじめに

頭頸部領域で最も頻発する悪性腫瘍は口腔扁平上皮癌である(Stewart ら, 2003). 2008 年の 1 年間に全世界で新たに 263,900 人が口腔扁平上皮癌を発症し, 128,000 人が死の転帰をとったと考えられている(Jemal ら, 2011). 一般に口腔扁平上皮癌は浸潤能を有し, リンパ節転移および早期再発の頻度が高い. 本疾患は多因性と考えられており, 喫煙, 飲酒, 食事のような生活習慣あるいは職業, 遺伝, そして感染などの因子がリスク因子となる(Petti ら, 2009; da Silva ら, 2011).

ヒトパピローマウイルス B 型, C 型肝炎ウイルス, エプスタインバーウイルス, ヒトヘルペスウイルス 8, ヘリコバクターピロリなどの微生物は, 多種多様な腫瘍の発生や癌の進行に関与している(Jemal ら, 2011). 一方, 慢性辺縁性歯周炎 (以下歯周炎とする)は代表的な細菌感染症のひとつであり(Aas ら, 2005), 近年の疫学研究により歯周炎と口腔扁平上皮癌との間に密接な関連があることが示された(Tezal ら, 2007; 2009; Fitzpatrick and Katz, 2010; Maruyama ら, 2012). また, 歯周炎罹患による口腔扁平上皮癌発生リスク(オッズ比)は 4.52 倍(Tezal ら, 2009), 舌癌の発生リスクは 5.23 倍と報告されており(Tezal ら, 2007), 歯周炎罹患と口腔癌発症との関連が強く示唆されている. その上, 歯周炎罹患の有無と口腔および消化管癌による死亡との間には有意な関連が認められると共に, *Porphyromonas gingivalis* 感染が口腔および消化管癌のリスクを増加させる可能性も報告されている(Ahn ら, 2012).

口腔扁平上皮癌は歯肉, 頬粘膜, 舌背, 舌縁, 硬口蓋ならびに軟口蓋などに発症し, 病変部には多様な微生物が細菌叢を形成している(Aas ら, 2005). この細菌叢に *P. gingivalis* が存在し, 口腔扁平上皮癌に持続的に接触し続けることが癌発症リスク因子となるという仮説とともに, 口腔癌患者の病変部細菌叢からの同菌の高頻度での検出が報告されている(Mager ら, 2005; Lanzós ら, 2011). また, 歯肉扁平上皮癌組織からは *P. gingivalis* 抗原が検出されている(Katz ら, 2011). 癌細胞に発現する B7-H1 は, リンパ節転移, 腫瘍の大きさ, 核の高悪性度, 分化の程度などの病理学的特徴と関連している

(Thompson ら, 2007; Mu ら, 2011). 舌癌培養細胞の B7-H1 の発現が *P. gingivalis* 感染により増加したことから, 舌癌の遠隔転移, 核異型への本菌の関与も示唆されている (Groeger ら, 2011). これらのことから, 口腔扁平上皮癌と *P. gingivalis* との相互作用が, 癌の進行ならびに転移に影響を与えている可能性が考えられている. しかしながら, これらの因果関係の分子基盤に関する検討は十分ではない.

Matrix metalloproteinases (MMPs) は, 細胞外マトリックスや基底膜の分解において重要な役割を担っている. 細胞外マトリックスや基底膜が分解されると, 基底膜や間質細胞への癌細胞の穿孔が起こり, 癌細胞の遊走および浸潤が亢進される. さらに, 遊走および浸潤が亢進されると所属リンパ節への転移に至り, 血行性に遠隔臓器へ転移する (Sternlicht and Werb, 2001; Friedl and Wolf, 2003). MMPs は哺乳類の細胞から酵素前駆体として産生され, トリプシン様プロテアーゼによってプロペプチド部分が切断されることによって活性型となる (Lijnen, 2001). MMP ファミリーの中でも, MMP2 と MMP9 は癌の浸潤・転移において重要な役割を担うことが知られている (Krüger ら, 2005). 消化管癌細胞, 単球, 肺上皮細胞ならびに滑膜細胞において, バルクホルデリアセパシア, ブルセラアボータス, ヘリコバクターピロリ, サルモネラエンテリカ, ストレプトコッカスパイオジェネスなどの感染によって, 前駆体 MMP9 が活性化され, 感染細胞の遊走性と浸潤能の亢進が *in vitro* 実験により示されている (Tamura ら, 2004; Oliveira ら, 2006; Ramu ら, 2008; Scian ら, 2011; Wright ら, 2011). また, *P. gingivalis* の lipopolysaccharide (LPS) は, ヒト口腔粘膜細胞の前駆体 MMP9 の産生を誘導し (Andrian ら, 2007; Jotwani ら, 2010), *P. gingivalis* 培養上清は, 単球から分泌される前駆体 MMP9 の産生と活性化を誘導している (Zhou ら, 2012). 一方, *P. gingivalis* の細胞外代謝産物である酪酸は, 数種類の癌細胞株の遊走能に影響を及ぼさない (Miyazaki ら, 2010).

本研究は, 口腔扁平上皮癌細胞の MMP2 と MMP9 の産生ならびに活性化におよぼす *P. gingivalis* の影響を解析し, 歯周炎と関連性を示す口腔扁平上皮癌の進行ならびに細胞浸潤の分子基盤を明らかにしたものである.

## 材料と方法

### 1. 使用した細菌、培養細胞と培養方法

供試した菌株は *P. gingivalis* ATCC 33277, *kgp* 欠損株 (Okamoto ら, 1998), *rgpA* *rgpB* 欠損株 (Nakayama ら, 1995), *rgpA* *rgpB* *kgp* 欠損株 (Shi ら, 1999) および *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 である。培地は Trypcase Soy Broth (Beckton Dickinson, Sparks, MD, USA) に yeast extract (1mg/ml), menadione (1μg/ml), hemin (5μg/ml) を添加したものを使用した (Inaba ら, 2009)。

口腔扁平上皮癌由来である SAS 細胞および Ca9-22 細胞は JCRB 細胞バンク - 独立行政法人 医薬基盤研究所より入手した。これらの細胞は 10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS) を添加した RPMI1640 培地 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) にて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

### 2. ゼラチンザイモグラフィー

細胞培養上清中の MMP2 と MMP9 の酵素活性はゼラチンザイモグラフィーにより測定した。増殖飽和状態の SAS 細胞ならびに Ca9-22 細胞に, multiplicity of infection (MOI) 1 となるように調整した *P. gingivalis* を添加し, 採取した培養上清を SDS サンプルバッファーと混和し, 0.1%ゼラチン含有 10%SDS アクリルアミドゲル上に展開した。ゲルは 2.5%Triton-X-100 溶液で1時間洗浄し, 200mM 塩化ナトリウム溶液/5mM 塩化カリウム溶液0.02% (v/v) アジ化ナトリウムを含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) に浸漬し 37°C, 48 時間反応させ, 5%クマシーブルーR-250 で染色した後に洗浄を行い, MMP 活性を評価した。

### 3. 阻害剤と発現誘導剤

NF-κB 阻害剤 ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), p38 特異的阻害剤 SB203580, JNK 特異的阻害剤 SP600125, ERK1/2 特異的阻害剤 PD98059, ならびに MMP14 発現誘導剤コンカナバリン A (ConA) は Sigma-Aldrich より購入した。PDTC は超純水を用いて 100μM に, SB203580 は dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いて 10μM,

SP600125 も DMSO を用いて 10 $\mu$ M に, ConA は超純水を用いて 20 $\mu$ g/ml に調製した. これら薬剤の細胞への添加は *P. gingivalis* の添加 2 時間前に行った.

#### 4. ウェスタンブロッティング

感染細胞はプロテアーゼフォスファターゼインヒビターカクテル (Thermo Scientific, Rockford, IL) ならびにジンジパイン阻害剤である KYT-1 と KYT-36 (Peptide Institute, Osaka) を含む cell lysis/extract reagent (Sigma-Aldrich) に溶解させた. また, Nuclear/Cytosol Fractionation kit (Bio Vision, Palo Alto, CA, USA) を用い, 核と細胞質の分離を行った. 細胞溶解物の上清, 核タンパクならびに細胞質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で展開させた後, ウェスタンブロット法により解析した. ウェスタンブロット法に用いた抗体として, 抗 Phospho-ERK1/2 抗体 (Thr202/Tyr 264, 1:1000), 抗 ERK1/2 抗体 (1:1000), 抗 Phospho-p38 抗体 (1:1000), 抗 p38 抗体 (1:1000), 抗 phospho-JNK (Thr183/Tyr185, 1:1000), 抗 JNK 抗体 (1:1000), 抗 Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  抗体 (Ser32/36, 1:1000), 抗 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体 (1:1000), 抗 Phospho-p38 抗体 (Thr180/Tyr182, 1:1000), 抗 Phospho-c-Jun 抗体 (1:1000), 抗 c-Jun 抗体 (1:1000), 抗 Phospho-HSP27 抗体 (Ser82, 1:1000), 抗 HSP27 抗体 (1:1000), は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) より購入した. 抗 Ets1 抗体 (1:500), 抗 Ets2 抗体 (1:500), 抗 MMP14 抗体 (1:500) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より購入し, 抗 MDM2 抗体 (NOVUS Biologicals, Littleton, CO, USA, 1:1000) および  $\beta$ -actin (Cell Signal Technology, Beverly, MA, USA, 1:1000) を用いた. タンパク質ならびにリン酸化タンパク質は Pierce ECL Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) を用いて検出した.

#### 5. RNA 干渉

PAR2, Ets1, HSP27 ならびにコントロール Small interfering RNA (siRNA) は Santa Cruz Biotechnology から購入した. 細胞への遺伝子導入は Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った.

## 6. 癌細胞浸潤能試験

24 ウェルマトリゲルインベージョンチャンバー (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) を用いて癌細胞浸潤能試験を行った。チャンバー上部に無血清 RPMI1640 培地で調整した SAS 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) を加え, MOI 1 で *P. gingivalis* を同時に添加した。ウェル底部に 10% FBS 含有 RPMI1640 培地を加え, 37°C で 24 時間培養した。その後チャンバー上部の細胞を取り除き, メンブレン底部の細胞を固定後, Diff-Quick (シスメック, 神戸) で染色し 200 倍視野にて浸潤細胞の観察を行った。

## 7. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

総 RNA の抽出は TRIsure (BIOLINE, Luckenwalde, Germany) のプロトコールに従って行った。さらに iscript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて cDNA を合成した。SAS 細胞における PAR の発現を確認するため, 表 1 に示すプライマーを用いて PCR を行った。遺伝子発現解析として Taq PCR Master Mixkit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて反応を行った。PCR プロトコールは初期熱変性として 95°C で 5 分間処理を行った後, 熱変性を 95°C で 30 秒, アニーリングを 60°C で 30 秒, 伸長反応を 72°C で 30 秒の 3 ステップ PCR を 30 サイクル行い, 最後 72°C で 7 分間伸長反応を行った。得られた PCR 産物はエチジウムブロマイド添加 1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行った後, 波長 302nm の紫外線で DNA のバンドを可視化した。

## 8. リアルタイム PCR

表 2 に示すプライマーを用いて, PAR2 の発現量をリアルタイム PCR で測定した。リアルタイム PCR は, Quanti Fast SYBR Green PCR kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用い, Step one plus (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) にて増幅産物を定量および解析を行った。PAR2 mRNA の発現量は, GAPDH を内部標準として, 比較 Ct 法により相対的発現量を解析した。

表1 使用したプライマー(RT-PCR)

プライマー	配列(5末端-3末端)	引用
PAR1	TACACCGGAGTGTTTGTAGT TTGAGGACGAGAGGCACTAC	Tancharoen ら, 2005
PAR2	GGTAAGGTTGATGGCACATC TGGTCTGCTTCACGACATAC	Tancharoen ら, 2005
PAR3	ATCTCATAGCTTTGTGCCTG CACGCCTGTAATCCAGCACT	Tancharoen ら, 2005
PAR4	AGTCTGTGCCAATGACAGTG TCATGGCAGAGCACGCGATC	Tancharoen ら, 2005
$\beta$ -actin	GATATCGGCCGCGCTCGTCGTCGAC CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTGC	Inaba ら, 2004

表2 使用したプライマー(real time PCR)

プライマー	配列(5末端-3末端)	引用
PAR2	ATACATGGCAACAACCTGG TTCACGATGACCCAATACCT	St-Onge ら, 2010
GAPDH	GTCTTCACCACCATGGAGAAG GTTGTCATGACCCAATACCT	Kato ら, 2005

## 結果

### 1. *P. gingivalis* による口腔扁平上皮癌細胞株の浸潤能亢進

癌浸潤のためには、癌細胞が産生する前駆体 MMP2 ならびに MMP9 が活性型に転換されることが必要である(Ramos-DeSimone ら, 1999; Cheung ら, 2006). そこで, 本研究では, 高浸潤型口腔癌細胞株 SAS 細胞から産生される前駆体 MMP2 と 9 の活性化によぼす *P. gingivalis* の影響を調べた.

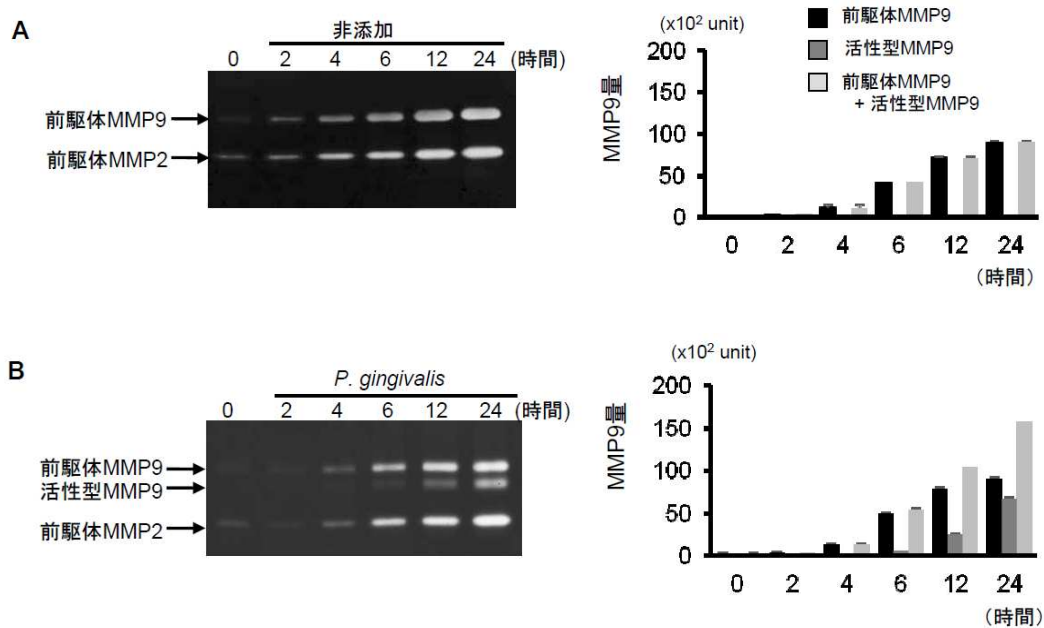


図1 *P. gingivalis* による SAS 細胞の前駆体 MMP9 分泌亢進と活性化

A: *P. gingivalis* 非添加群

B: *P. gingivalis* 添加群

高浸潤型 SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ, 2, 4, 6, 12, 24 時間培養した. 培養上清の MMP9 活性はゼラチンザイモグラフィーの画像を Image J により数値化を行い評価した.

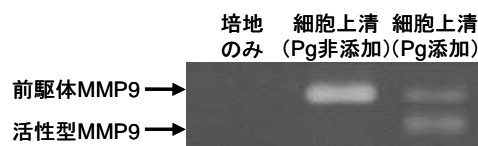


図2 *P. gingivalis* による SAS 細胞培養上清中の前駆体 MMP9 分泌亢進と活性化

24時間培養した SAS 細胞の培養上清を採取し, *P. gingivalis* ( $1 \times 10^6$  cfu) を添加した. 24時間後, ゼラチンザイモグラフィーにより MMP9 の活性化を評価した. 新鮮培地をコントロールとした.

前駆体 MMP2 ならびに MMP9 は、時間依存的に SAS 細胞から産生・分泌され(図1A), *P. gingivalis* の感染により前駆体 MMP9 の分泌が誘導され、活性化も認められた(図1B). SAS 細胞のみを培養した上清を採取し、*P. gingivalis* を添加したところ、前駆体 MMP9 が活性化された(図2). この現象は、*P. gingivalis* が細胞への付着・侵入にかかわらず、細胞外へ分泌された前駆体 MMP9 が *P. gingivalis* により活性化されることを示している.

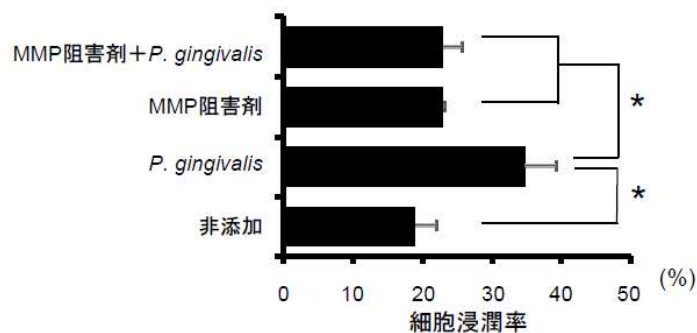


図3 MMP9 特異的阻害剤による *P. gingivalis* 感染 SAS 細胞の浸潤能への影響

MMP9 特異的阻害剤を添加した培地での *P. gingivalis* 感染 SAS 細胞の浸潤能をマトリゲルインベージョンチャンバーを用いて評価した. \* t 検定  $p < 0.01$

次に *P. gingivalis* による前駆体 MMP9 活性化が SAS 細胞の浸潤能におよぼす影響を調べた. 図3に示すように、*P. gingivalis* 感染により SAS 細胞の浸潤能は有意に亢進され、これは MMP9 阻害剤により顕著に抑制された. 一方、前駆体 MMP2 には *P. gingivalis* による活性化が見られなかった(図1). 前駆体 MMP2 は細胞膜表面上で MMP14 により活性化されるため、MMP2 の活性化には MMP14 の活性化も必要である(Barbolina and Stack, 2008). そこで、*P. gingivalis* 感染の MMP14 活性化への影響を調べた. しかし、MMP14 は *P. gingivalis* 感染では産生も活性化も誘導されなかった(図4). 活性化 MMP14 を欠くことが前駆体 MMP2 の活性化が起こらない理由と考えられた. このため、以降の研究では、*P. gingivalis* 感染と MMP9 の産生誘導ならびに活性化についての検討を行った.

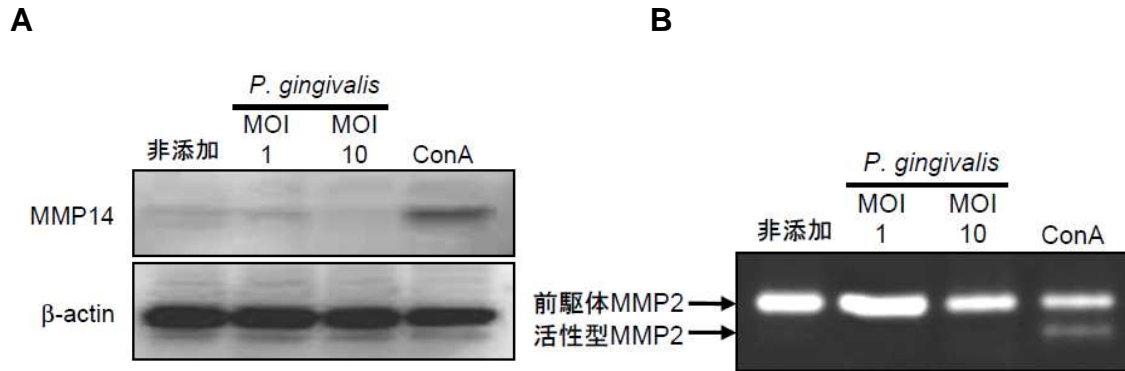


図4 SAS 細胞の MMP14 の発現と前駆体 MMP2 活性

A: SAS 細胞に *P. gingivalis* 感染, あるいはコンカナバリン A (ConA, 20μg/ml) を添加し, MMP14 の発現を評価した.

B: SAS 細胞に ConA (20μg/ml) を添加し, 24 時間後, 細胞培養上清の MMP2 活性をゼラチンザイモグラフィーにて評価した.

大腸癌のリンパ節転移との関連性が示唆されている *F. nucleatum* の口腔癌に対する前駆体 MMP9 の活性化ならびに浸潤能への影響を調べた. *F. nucleatum* は前駆体 MMP2 ならびに 9 を活性化せず, 細胞浸潤能の亢進能も示さなかった (図5). この結果から, 口腔癌細胞における前駆体 MMP9 の活性化や浸潤能の亢進は, *P. gingivalis* に特徴的であることが示唆された.

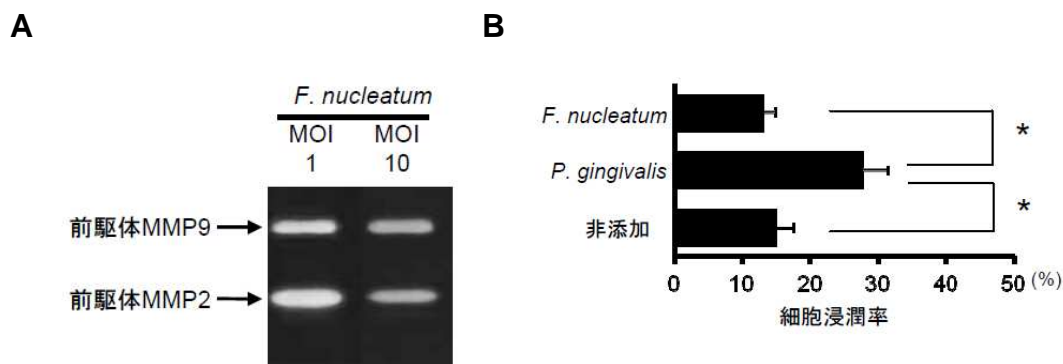


図5 *F. nucleatum* による SAS 細胞の前駆体 MMP9 分泌亢進と活性化ならびに浸潤能への影響

A: SAS 細胞に *F. nucleatum* (MOI 1 と 10) を感染させ, 24 時間後に細胞培養上清の MMP9 活性をゼラチンザイモグラフィーにて評価した.

B: *P. gingivalis* または *F. nucleatum* (MOI 1) を感染させ, 24 時間感染させた SAS 細胞の浸潤能をマトリゲルインベージョンチャンバーを用いて評価した. \* t 検定  $p < 0.01$

口腔扁平上皮癌はしばしば所属リンパ節に転移し、その後血行性に遠隔転移する (Chandler ら, 2011). 浸潤能が異なる代表的な口腔扁平上皮癌培養細胞株として、高浸潤能株である SAS 細胞と、低浸潤能株 Ca9-22 細胞が用いられている (Shindoh ら, 1996). Ca9-22 細胞では前駆体 MMP2 の産生が認められたが、前駆体 MMP9 の産生はほとんど認められず、*P. gingivalis* 感染によっても前駆体 MMP9 産生と細胞浸潤に影響は見られなかった (図6A). 一方、*P. gingivalis* により活性化された MMP9 を添加したところ、有意な浸潤能の亢進が認められた (図6B). これらのことから、*P. gingivalis* は MMP9 の活性化を介して口腔癌の浸潤能を亢進することが示唆された.

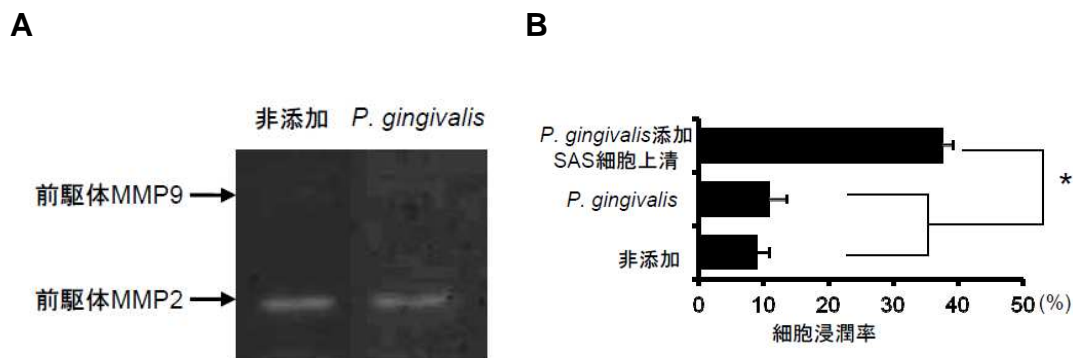


図6 *P. gingivalis* による Ca9-22 細胞の前駆体 MMP9 分泌亢進と活性化ならびに浸潤能への影響

A: Ca9-22 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、24 時間細胞培養した。培養上清を採取し、ゼラチンザイモグラフィーにて MMP9 の活性を評価した。

B: Ca9-22 細胞を、*P. gingivalis* 感染 SAS 細胞培養上清で培養し、マトリゲルインベージョンチャンバーを用いて浸潤能を評価した。\* t 検定  $p < 0.01$

## 2. PAR2 を介した前駆体 MMP9 の産生誘導

前立腺癌細胞において、PAR2 を介したシグナル伝達経路の活性化により前駆体 MMP9 が産生されることが報告されている (Wilson ら, 2004). 口腔癌細胞における前駆体 MMP9 産生と PAR 群との関連を調べるために、SAS 細胞での PAR 群の発現を RT-PCR 法により解析した (図7A). その結果、PAR2 mRNA の発現のみが明確に観察され、他の PAR 群の発現はほとんど見られなかった。*P. gingivalis* 感染 24 時間後には PAR2 mRNA の発現が 1.8 倍まで増加した (図7B)

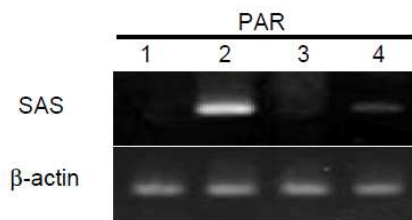
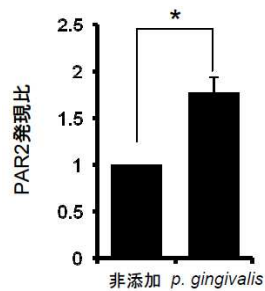
**A****B**

図7 *P. gingivalis* による SAS 細胞の PAR2 の発現変化

A: SAS 細胞における PAR の発現を評価した.

B: SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、24 時間後に RNA を抽出し、cDNA を作成し、Real-time PCR により PAR2 の発現を評価した. \* t 検定  $p < 0.01$

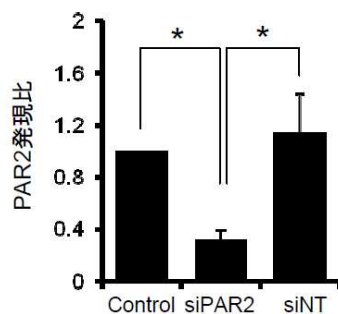
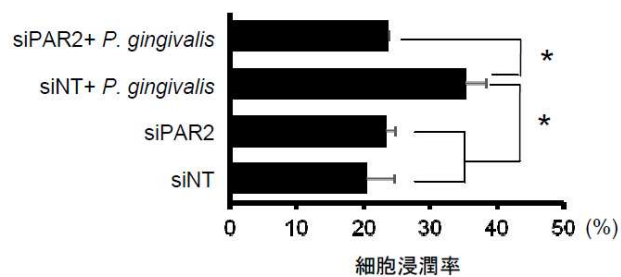
**A****B****C**

図8 PAR2 ノックダウン SAS 細胞の前駆体 MMP9 分泌と浸潤能への影響

A: siPAR2 による PAR2 発現への効果を Real-time PCR により確認した.  
siNT=陰性対照.

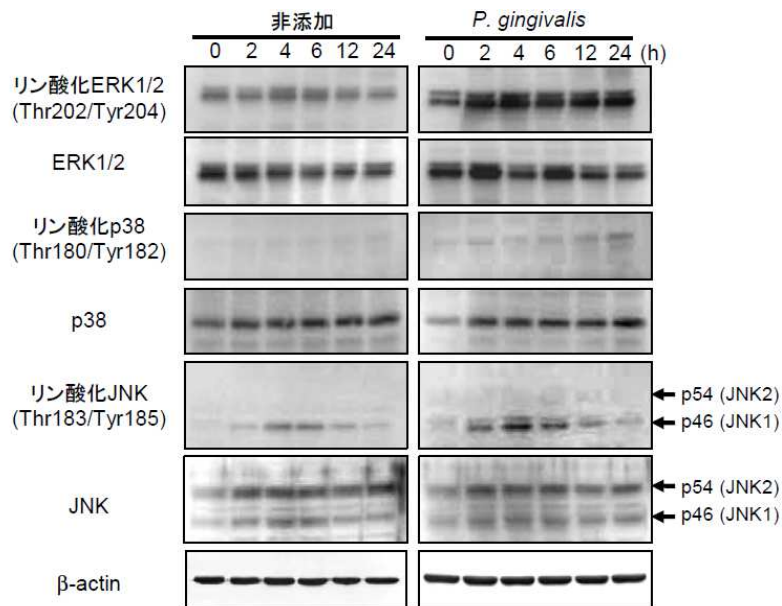
B: PAR2 ノックダウン SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、24 時間後に培養上清中の MMP9 活性をゼラチンザイモグラフィーにて評価した.

C: PAR2 ノックダウン SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、細胞浸潤能をマトリゲルインベーションチャンバーを用いて評価した. \* t 検定  $p < 0.01$

そこで PAR2 発現と前駆体 MMP9 産生の関連を調べるために、PAR2 ノックダウン SAS 細胞を用いた。SAS 細胞における遺伝子発現抑制効果を、リアルタイム PCR を用い確認

したところ、陰性対照 siRNA (siNT) 導入細胞に比べて、mRNA の発現が約 82% 減少していた(図8A). PAR2 ノックダウン細胞に *P. gingivalis* を感染させたところ、感染 24 時間後において前駆体 MMP9 の発現が有意に抑制された(図8B). さらに、細胞浸潤も顕著に抑制された(図8C).

## A



## B

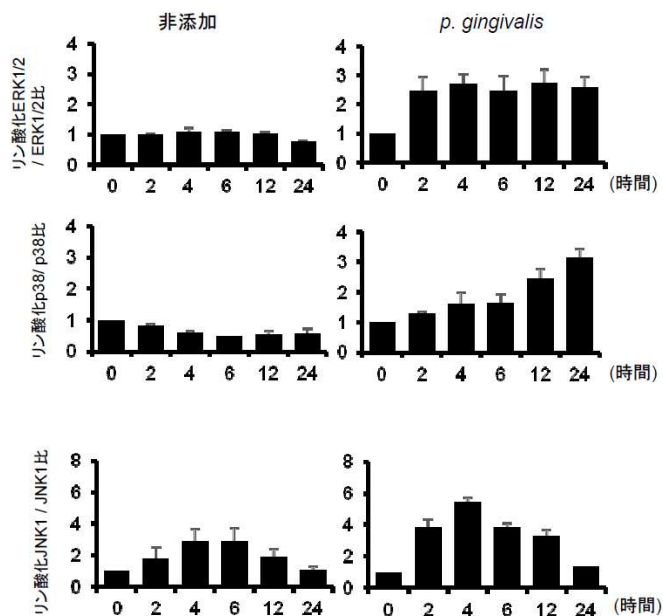


図9 *P. gingivalis* 感染 SAS 細胞における ERK1/2, p38, JNK リン酸化への影響

A: SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、2, 4, 6, 12, 24 時間細胞培養した。細胞を溶解後、ウエスタンブロット法で評価した。β-actin はコントロールとして用い

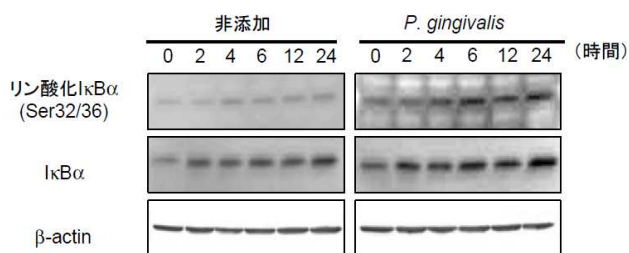
た.

B: ウェスタンブロットの結果は Image J により数値化を行った.

### 3. *P. gingivalis* による MAPK のリン酸化ならびに NF- $\kappa$ B の核移行の促進

PAR2 は細胞特異的に ERK1/2, p38, JNK ならびに NF- $\kappa$ B のシグナル伝達経路を活性化する(Kanke ら, 2005; Seitz ら, 2007; Kida ら, 2007). そこで, SAS 細胞の前駆体 MMP9 産生に関与するシグナル伝達経路を検証した. *P. gingivalis* 感染により SAS 細胞の ERK1/2, p38 ならびに JNK1 がリン酸化された(図9). Ser32 と Ser36 で I $\kappa$ B がリン酸化されることにより I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B 複合体の解離ならびに NF- $\kappa$ B の核移行が生じ, その後 NF- $\kappa$ B はユビキチン-プロテアソーム系にて分解される. (Wasserman, 1993). 本研究においても *P. gingivalis* により, SAS 細胞の I $\kappa$ B $\alpha$  の Ser32/36 リン酸化ならびに NF- $\kappa$ B の核移行が認められた(図10).

A



B



C

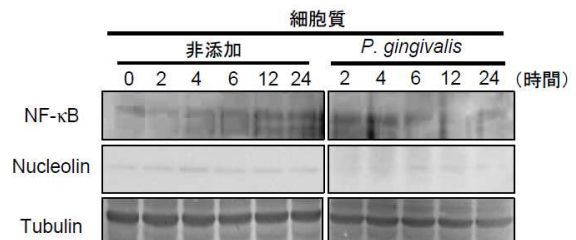


図10 *P. gingivalis* 感染 SAS 細胞における I $\kappa$ B のリン酸化と NF- $\kappa$ B 核移行

A: SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ, 2, 4, 6, 12, 24 時間細胞培養した.

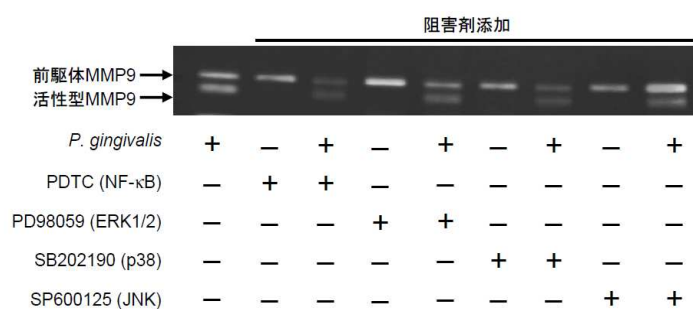
細胞を溶解後, ウェスタンブロット法で評価した.  $\beta$ -actin はコントロールとして用いた.

B: 核抽出タンパク質の NF- $\kappa$ B の発現.

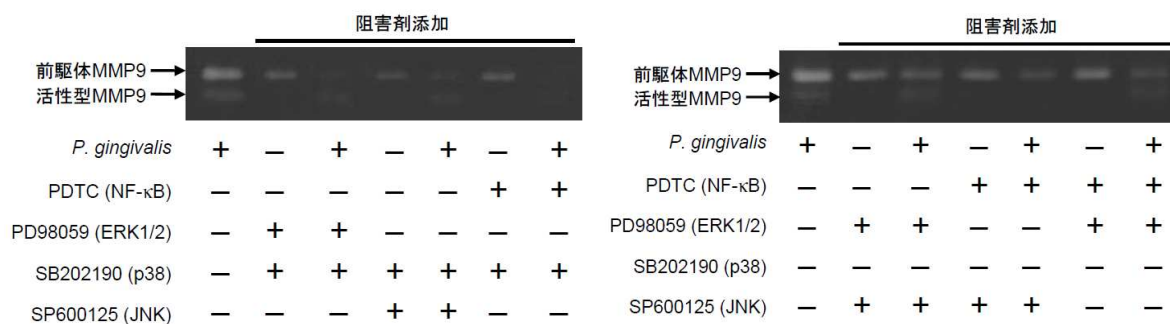
C: 細胞質抽出タンパク質の NF- $\kappa$ B の発現.

*P. gingivalis* が ERK1/2, p38, JNK1 のリン酸化ならびに NF- $\kappa$ B の核移行にどのような影響をおよぼし, さらには前駆体 MMP9 の産生誘導への影響を検討するため, 各シグナル伝達経路の阻害剤を用いた. SAS 細胞に *P. gingivalis* を感染させ, 24 時間後の上清中の前駆体 MMP9 の産生を観察した. PDTC (NF- $\kappa$ B 阻害剤), PD98059 (ERK1/2 阻害剤) および SB202190 (p38 阻害剤) は, *P. gingivalis* による前駆体 MMP9 産生を抑制するだけでなく, 培養上清中での活性化 MMP9 量も抑制した (図 11). 各阻害剤を組み合わせる前処理した場合においても, 抑制効果を示した. これに対し, SP600125 (JNK 阻害剤) は抑制効果を示さなかった.

## A



## B



## C



図11 ERK1/2, p38, JNK ならびに NF- $\kappa$ B 阻害剤の前駆体 MMP9 産生への影響

PDTC (NF- $\kappa$ B 阻害剤), SB203580 (p38 阻害剤), SP600125 (JNK 阻害剤), PD98059 (ERK1/2 阻害剤)をそれぞれ添加した培地で 24 時間培養を行い,ゼラチンゼイモグラフィーにより MMP9 の活性化を評価した.

- A: 阻害剤を1種類添加
- B: 阻害剤を2種類添加
- C: 阻害剤を3種類添加

これらの結果から, *P. gingivalis* 感染により誘導される前駆体 MMP9 産生は, p38, ERK1/2 および NF- $\kappa$ B を含む複数のシグナル伝達経路を介することが示唆された. そこで, p38 と ERK1/2 のリン酸化ならびに NF- $\kappa$ B の核移行におよぼす PAR2 の影響を更に検討した. PAR2 ノックダウン細胞においては, *P. gingivalis* 感染による p38 と ERK1/2 のリン酸化の抑制は認められなかった(図12). 一方, NF- $\kappa$ B の核移行に対する抑制効果は明確に認められた(図13). これらの結果から, *P. gingivalis* に活性化された PAR2 による NF- $\kappa$ B 経路を介したシグナルにより前駆体 MMP9 の産生が誘導されることが示唆された.

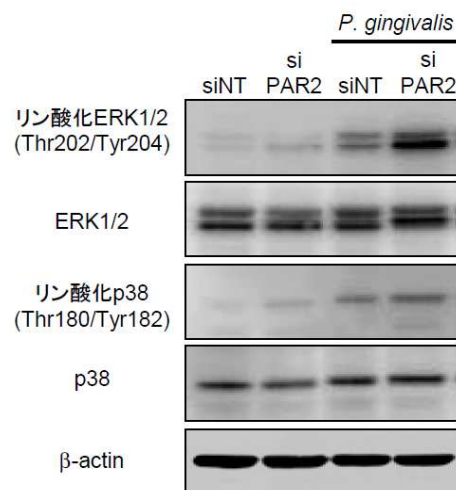


図12 PAR ノックダウン SAS 細胞における ERK1/2 と p38 リン酸化への影響

PAR2 ノックダウン SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1)を感染させ, 24 時間培養した. 細胞を溶解後, ウェスタンブロット法より評価した.  $\beta$ -actin はコントロールとして用いた.

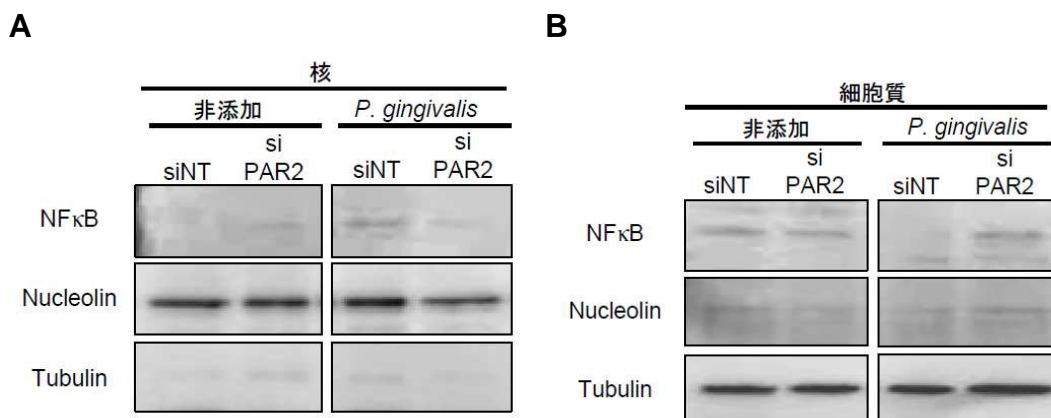


図13 PAR2 ノックダウンの SAS 細胞における NFκB の核移行への影響

PAR2 ノックダウン SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、24 時間培養した。細胞を溶解後、ウエスタンブロット法で評価した。β-actin はコントロールとして用いた。

A: 核抽出タンパク質の NF-κB の発現

B: 細胞質抽出タンパク質の NF-κB の発現

#### 4. Ets1 を介した前駆体 MMP9 の産生誘導

ERK 依存的シグナル伝達経路ならびに転写因子 Ets1 は前駆体 MMP9 の産生を制御する (Dittmer, 2003)。 *P. gingivalis* 感染の ERK/Ets 経路への影響を更に検討するために、ERK シグナル伝達経路の下流に位置する Ets1 ならびに Ets2 の発現を観察した。 *P. gingivalis* 感染 SAS 細胞では、Ets1 の発現が時間依存的に増加するものの、Ets2 の発現には影響が見られなかった (図14)。そこで Ets1 発現と前駆体 MMP9 産生の関連を調べるために、Ets1 ノックダウン SAS 細胞での前駆体 MMP9 の産生を評価した (図15A)。その結果、Ets1 ノックダウン細胞では *P. gingivalis* による前駆体 MMP9 の発現が顕著に抑制された (図15B)。

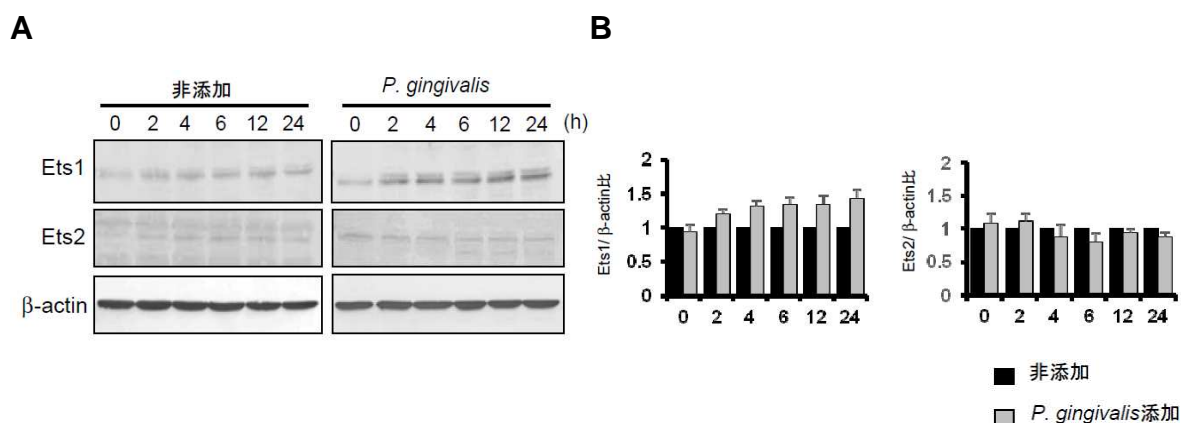


図14 SAS 細胞における転写因子 Ets1 と Ets2 発現への *P. gingivalis* 感染の影響

A: SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、2, 4, 6, 12, 24 時間培養した。細胞を溶解後、ウエスタンブロット法で評価した。β-actin はコントロールとして用いた。

B: ウエスタンブロットの結果は Image J により数値化をおこなった。

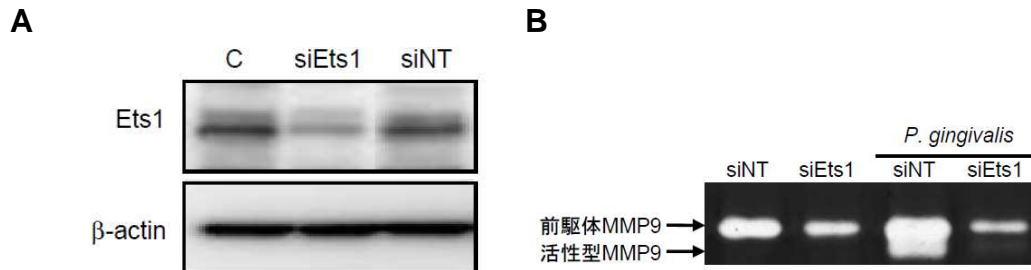


図15 Ets1 ノックダウン SAS 細胞の前駆体 MMP9 分泌への影響

A: siEts1 による前駆体 MMP9 発現への影響を、ウエスタンブロッティングにより確認した。siNT=陰性対照。

B: Ets1 ノックダウン SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、24 時間培養した。細胞培養上清を採取し、ゼラチンゼイモグラフィーにて MMP9 の活性化を評価した。

## 5. HSP27 リン酸化により前駆体 MMP9 の産生誘導

ヒト肝細胞癌の研究において、PKC-β/ERK1/2 ならびに PKC-β/p38 シグナル伝達経路を介して Heat Shock Protein27 (以下 HSP27 と省略) のリン酸化が制御されていることが報告された (Guo ら, 2008)。膀胱癌細胞では、HSP27 のリン酸化が前駆体 MMP9 の産生誘導と癌細胞の浸潤亢進に関与する (Kumar ら, 2010)。さらに、ヒト大腸癌細胞では p38/c-Jun を介して前駆体 MMP9 産生が誘導される (Loesch ら, 2010)。一方、JNK のリン酸化は c-Jun を活性化し、細胞周期、アポトーシス、MMPs の発現に関連する AP-1 結合部位を保有する様々な遺伝子群を制御する (Wagner and Nebreda, 2009)。そこで *P. gingivalis* 感染による p38 ならびに JNK シグナル伝達経路の下流に位置する分子への影響を更に解析するために、HSP27 ならびに c-Jun のリン酸化を観察した。

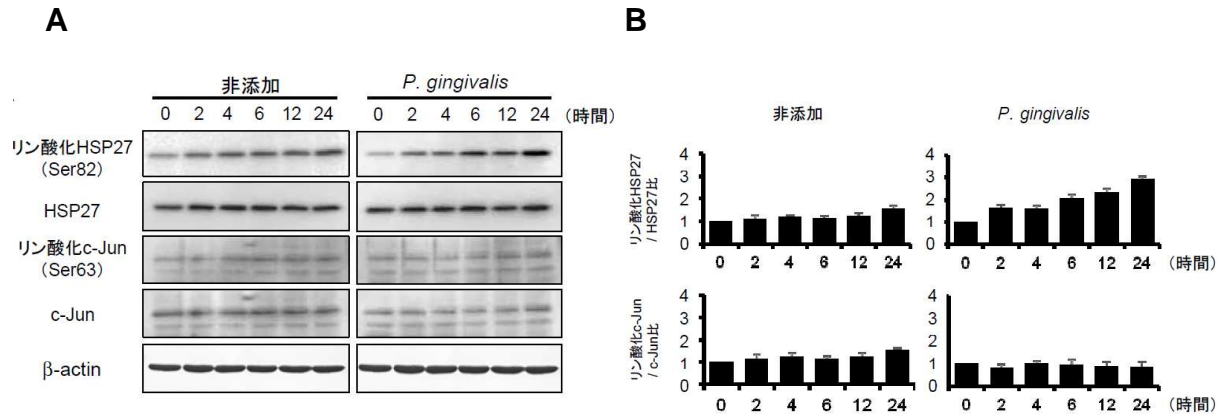


図16 *P. gingivalis* 感染 SAS 細胞における HSP27 と c-Jun のリン酸化

A: SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、2, 4, 6, 12, 24 時間培養した。細胞を溶解後、ウエスタンブロット法で評価した。β-actin はコントロールとして用いた。

B: ウエスタンブロットの結果は Image J により数値化をおこなった。

*P. gingivalis* 感染 SAS 細胞では、HSP27 が時間依存的にリン酸化される一方、c-Jun のリン酸化には影響が見られなかった(図16)。そこで HSP27 のリン酸化と前駆体 MMP9 産生との関連を調べるために、HSP27 をノックダウンした SAS 細胞を用いた(図17)。その結果、HSP27 ノックダウン細胞では *P. gingivalis* 感染による前駆体 MMP9 の発現誘導は抑制された。

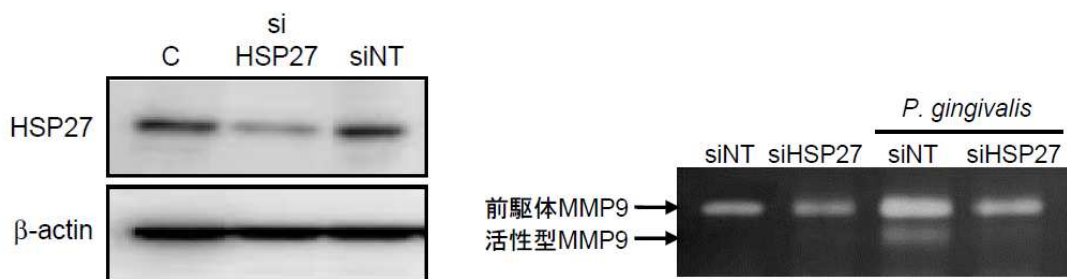


図17 HSP27 ノックダウン SAS 細胞の前駆体 MMP9 分泌への影響

A: siHSP27 による前駆体 MMP9 発現への影響を、ウエスタンブロッティングにより評価した。siNT=陰性対照。

B: HSP27 ノックダウン SAS 細胞に *P. gingivalis* (MOI 1) を感染させ、24 時間細胞培養した。細胞培養上清を採取し、ゼラチンザイモグラフィーにて MMP9 の活性化を評価した。

## 6. ジンジパインの前駆体 MMP9 活性化と浸潤能亢進への影響

*P. gingivalis* はシステインプロテアーゼであるアルギニン—ジンジパイン(Rgp)とリジン—ジンジパイン(Kgp)からなるジンジパインを産生する(Guo ら, 2010). 前駆体 MMP9 の活性化と浸潤能亢進へのジンジパインの関与を調べるために, ジンジパイン欠損変異株を用いた. *kgp* 欠損株, *rgpA rgpB* 欠損株による感染では前駆体 MMP9 の産生誘導が認められたが, *rgpA rgpB kgp* 欠損株による誘導は見られなかった(図18A). 一方, いずれの欠損株においても前駆体 MMP9 の活性化は認められず, 浸潤能の亢進も見られなかった(図18BC). 前駆体 MMP9 の産生は Rgp と Kgp のどちらか一方により誘導されるが, その活性化には Rgp と Kgp の両方が必要であることが示された. これらの結果から *P. gingivalis* が有するジンジパインが, 前駆体 MMP9 の活性化を促進し, 結果的に浸潤能の亢進に関与していることが示唆された.

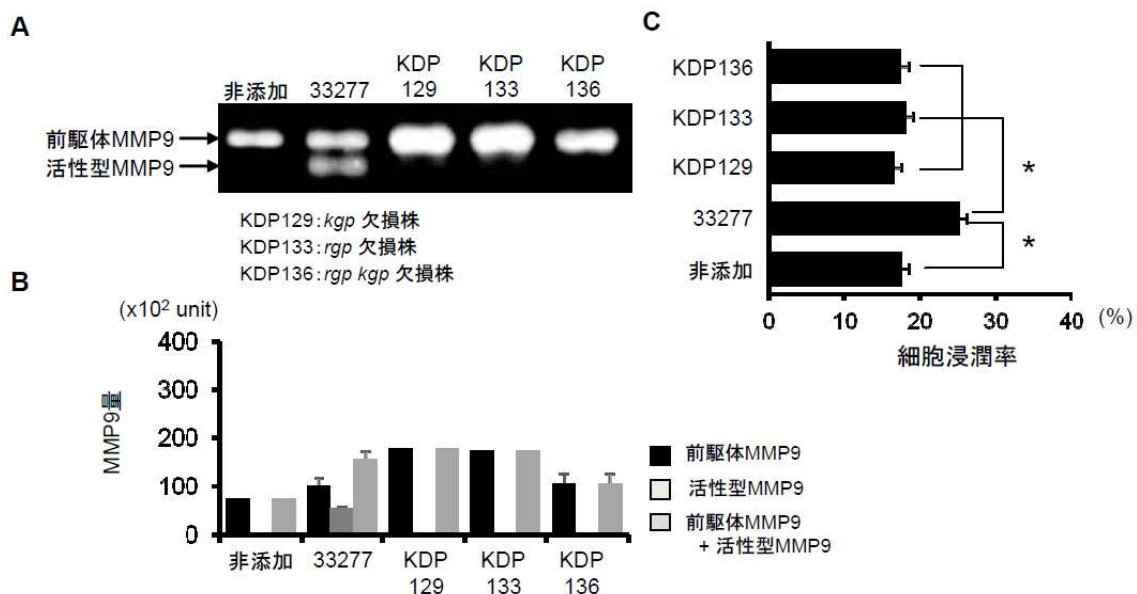


図18 *P. gingivalis* ジンジパインノックアウト株感染 SAS 細胞での前駆体 MMP9 分泌と活性化ならびに細胞浸潤能への影響

A: *P. gingivalis* ジンジパインノックアウト株(MOI 1)に 24 時間感染させた後, 培養上清を採取し, ゼラチンザイモグラフィーにより MMP9 の活性を評価した.

B: ゼラチンザイモグラフィーの結果を Image J により数値化を行った.

C: SAS 細胞の浸潤能をマトリゲルインベージョンチャンバーを用いて評価した.

\* t 検定  $p < 0.01$

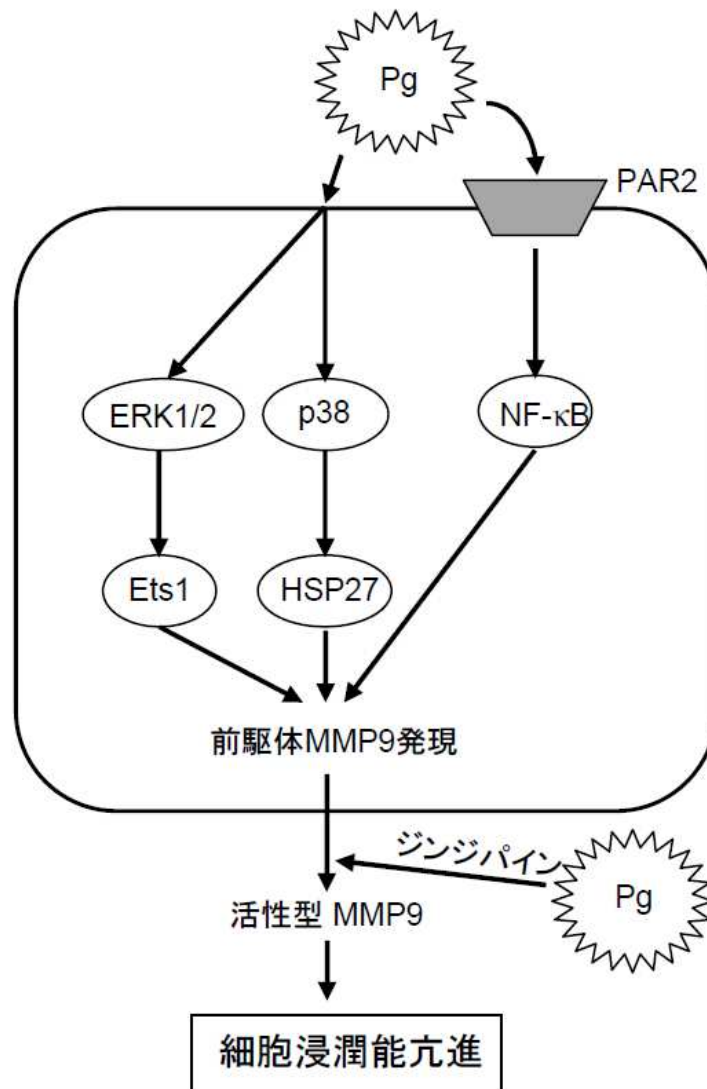


図19 本研究の結果から推定される仮説

*P. gingivalis* により ERK1/2-Ets1, p38/HSP27 ならびに PAR2/NF-κB 経路が活性化され, 前駆体 MMP9 が産生される. 細胞外へ分泌された前駆体 MMP9 は *P. gingivalis* ジンジパインによって活性化され, 口腔癌細胞の浸潤能を亢進する.

## 考察

疫学研究および培養細胞を用いた研究では、口腔癌の病態への *P. gingivalis* を含む歯周病菌の関与が示唆されている。しかしながら、その因果関係を示す分子基盤は明らかにされていない。そこで本研究では、*P. gingivalis* の口腔癌細胞の浸潤能亢進に関与する分子基盤に解析を加えた。その結果、*P. gingivalis* は p38/HSP27, ERK1/2-Ets1 ならびに PAR2/NF- $\kappa$ B を含む複数のシグナル伝達経路を介して前駆体 MMP9 の産生を誘導すること、さらに前駆体 MMP9 がジンジパインにより活性化され、SAS 細胞の浸潤能を亢進することにより、*P. gingivalis* が口腔癌の浸潤を促進する可能性が示された(図19)。

シグナル伝達は、各々の細胞活動を統合し調和させる複雑な情報伝達系の一部である。細胞を取り巻く微小環境における適切な刺激応答は、ヒト組織の恒常性、免疫の基盤となり、これらの破綻が癌を含む疾患へとつながる。活性化された MMP9 が基底膜や細胞外基質の IV 型コラーゲンを分解することにより、癌は進行する(Westermarck and Kähäri, 1999; Raffetto and Khalil, 2008)。 *P. gingivalis* は口腔粘膜、樹状細胞、単球の前駆体 MMP9 の産生を誘導し活性化することにより、細胞の遊走能を亢進することが報告されている(Andrian ら, 2007; Jotwani ら, 2010; Zhou ら, 2012)。一方で、*P. gingivalis* の LPS は、細胞の遊走性や前駆体 MMP9 の活性化を誘導しないとする報告もある(Zhou ら, 2012)。また、いくつかの細菌種が前駆体 MMP9 産生を誘導するという知見が報告されているが、関与するシグナル伝達経路についての詳細はこれまで明らかにされてはいなかった。

PAR2 は炎症反応に影響をおよぼすだけでなく、感染時に生じるタンパク分解酵素を感知するセンサーとしての役割を担っている。また、PAR2 は乳がん、メラノーマ、大腸がんならびにリンパ腫の癌細胞の遊走や転移にも関与している(Hjortor ら, 2004; Shi ら, 2004; Wilson ら, 2004; Dejean ら, 2012)。実際、臨床検体においても PAR2 の発現誘導が消化器癌や鼻咽頭癌の進行に相関していることが報告されている(Caruso ら, 2006; Li ら, 2009)。さらに、PAR2 の活性化は ERK1/2 や NF- $\kappa$ B を介して腺癌大腸癌や膠芽腫の細胞

増殖と遊走を亢進している (Guo ら, 2011; Svensson ら, 2011). プロピオニバクテリウム アクネスのセリンプロテアーゼは角化細胞の PAR2 を活性化し, MMP9 mRNA の発現を増加する (Lee ら, 2010). 気道上皮においては, PAR2 の活性化により前駆体 MMP9 が細胞外に分泌されることが知られている (Vliagoftis ら, 2000). 本研究では, *P. gingivalis* が PAR2 を活性化し, I $\kappa$ B のリン酸化ならびに NF- $\kappa$ B の核移行を介して前駆体 MMP9 の産生を誘導した. 一方, 歯髄細胞において, *P. gingivalis* の RgpB は PAR2 を刺激し, AP-1, p38 および ERK1/2 経路を活性化すると報告されている (Tancharoen ら, 2005). また腸上皮細胞では, PAR2 が活性化しても NF- $\kappa$ B の核移行は認められなかった (Fyfe ら, 2005). しかしながら SAS 細胞では, PAR2 活性化による p38 と ERK1/2 のリン酸化は認められないものの, NF- $\kappa$ B の核移行は認められた. これらのことは, PAR2 が活性化された後, 細胞特異的に様々なシグナル伝達経路を介した細胞応答が誘導されていることを示唆している. さらに *P. gingivalis* による PAR2 の活性化は, ジンジパインによるタンパク質分解活性によると考えられた.

様々な癌細胞株において, 転写因子 Ets1 は MMPs の転写調節因子として, 癌の浸潤能や転移に重要な役割を担っている (Dittmer, 2003; Hahne ら, 2005; Seth and Watson, 2005; Ghosh ら, 2012). さらに HSP27 のリン酸化が MMP9 発現を制御し, 浸潤能に影響をおよぼすことが知られている (Hansen ら, 2001). 本研究では, *P. gingivalis* を感染させた SAS 細胞では Ets1 の発現増加と HSP27 のリン酸化が誘導されたが, Ets1 ノックダウンならびに HSP27 ノックダウン細胞では前駆体 MMP9 の産生が阻害された. 様々な細胞株において, ERK1/2-Ets1 ならびに p38/HSP27 のシグナル伝達経路を介して前駆体 MMP9 の発現が制御されることが示されている (Hansen ら, 2001; Liu ら, 2005; Ghosh ら, 2012). ERK1/2 ノックダウン細胞ならびに Ets1 ノックダウン細胞を用いた研究では, TGF $\beta$ 1 に誘導される前駆体 MMP9 の産生が抑制されている (Liu ら, 2005). HeLa 細胞では Ets1 の発現が癌細胞の遊走と浸潤に関与していると報告され, 乳癌細胞における HSP27 のリン酸化も同様である (Hahne ら, 2005; Shin ら, 2005). また p38 をノックダウ

ンした膀胱癌細胞では、HSP27 のリン酸化や前駆体 MMP9 の産生が阻害され、細胞の遊走と浸潤が抑制された (Kumar ら, 2010)。これらの報告は、本研究で得られた *P. gingivalis* が ERK1/2-Ets1 と p38/HSP27 シグナル経路を活性化するという知見に合致するものである。

JNK1 のリン酸化はマウスの胚線維芽細胞における c-Jun の発現や細胞増殖の正の制御因子であり、JNK2 はその負の制御因子である (Jaeschke ら, 2006)。一方、JNK1 ではなく JNK2 と c-Jun とは、ヒト扁平上皮癌臨床検体において高頻度で活性化しており、浸潤性の癌細胞において重要な分子であると考えられている (Zhang and Selim, 2012)。さらに、p38 は JNK の活性に負の制御を行っている可能性がある (Wagner and Nebreda, 2009)。本研究において、SAS 細胞では *P. gingivalis* 感染により JNK1 と p38 がリン酸化されるが、JNK2 はリン酸化されなかった。このことから、SAS 細胞では p38 のリン酸化により JNK2/c-Jun 経路の活性化が阻害されることが示唆される。

ジンジパイン欠損株は前駆体 MMP9 を活性化しなかった。MMP9 の前駆体 (92KD) はトリプシンにより C 末端のアルギニンならびにリジン残基が開裂され、活性型 (82KD) が生じる (Duncan ら, 1998)。従って、前駆体 MMP9 の活性化には Rgp ならびに Kgp の両方の基質特異性が求められると考えられる。

癌細胞の浸潤ならびに転移は MMP2 ならびに MMP9 だけでなく、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター (uPA) および MMP7 の発現にも影響を受けることが知られている (Crawford ら, 2002; Baker ら, 2007)。本研究の癌細胞浸潤能試験において、前駆体 MMP9 が活性化していない *P. gingivalis* 非添加群においても約 10% の癌細胞が浸潤することが観察された (図3)。これには、SAS 細胞では MMP7 は発現していないが、uPA が発現している (Lu ら, 2011) ことが考えられる。

本研究の結果を要約すると、*P. gingivalis* は、ERK1/2-Ets1, p38/HSP27 ならびに PAR2/NF- $\kappa$ B 経路を活性化して前駆体 MMP9 の産生を誘導する。細胞外に分泌された前駆体 MMP9 はジンジパインにより活性化され、口腔扁平上皮癌細胞の細胞浸潤が亢進さ

れる. これまで *P. gingivalis* は様々な全身疾患に関連することが示唆されてきたが (Amano ら, 2012), 本研究により口腔扁平上皮癌の進行ならびに転移にも *P. gingivalis* が関与する可能性が示された。

## 文献

Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., and Dewhirst, F.E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43: 5721–5732.

Ahn, J., Segers, S., and Hayes, R.B. (2012) Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis* 33: 1055–1058.

Amano A, Inaba H. (2012) Cardiovascular diseases and periodontal diseases. *Clin Calcium*. 2012 Jan;22(1):43-8.

Andrian, E., Mostefaoui, Y., Rouabhia, M., and Grenier, D. (2007) Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by *Porphyromonas gingivalis* in an engineered human oral mucosa model. *J Cell Physiol* 211: 56–62.

Baker, E.A., Leaper, D.J., Hayter, J.P., and Dickenson, A.J. (2007) Plasminogen activator system in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 45: 623–627.

Barbolina, M.V., and Stack, M.S. (2008) Membrane type-1 matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. Seminars in cell and developmental biology. *Semin Cell Dev Biol* 19: 24–33.

Caruso, R., Pallone, F., Fina, D., Gioia, V., Peluso, I., Caprioli, F., et al. (2006) Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *Am J Pathol* 169: 268–278.

Castellarin, M., Warren, R.L., Freeman, J.D., Dreolini, L., Krzywinski, M., Barnes, R., et al. (2012) *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 22: 299–306.

Chandler, K., Vance, C., Budnick, S., and Muller, S. (2011) Muscle invasion in oral tongue squamous cell carcinoma as a predictor of nodal status and local recurrence: just as effective as depth of invasion? *Head Neck Pathol* 5: 359–363.

Cheung, L.W., Leung, P.C., and Wong, A.S. (2006) Gonadotropin-releasing hormone promotes ovarian cancer cell invasiveness through c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9. *Cancer Res* 66: 10902–10910.

Crawford, H. C., Scoggins, C. R., Washington, M. K., Matrisian, L. M., and Leach, S. D. (2002) Matrix metalloproteinase-7 is expressed by pancreatic cancer precursors and regulates acinar-to-ductal metaplasia in exocrine pancreas. *J Clin Invest* 109: 1437–1444.

Dejean, E., Foisseau, M., Lagarrigue, F., Lamant, L., and Prade, N. (2012) ALK+ALCLs induce cutaneous, HMGB-1-dependent IL-8/CXCL8 production by keratinocytes through NF- $\kappa$ B activation. *Blood* 119: 4698–4707.

Dittmer, J. (2003) The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2: 29.  
<http://www.molecular-cancer.com/content/2/1/29>.

Duncan, M.E., Richardson, J.P., Murray, G.I., Melvin, W.T., and Fothergill, J.E. (1998) Human matrix metalloproteinase-9: activation by limited trypsin treatment and generation of monoclonal antibodies specific for the activated form. *Eur J Biochem* 258: 37–43.

Fitzpatrick, S.G., and Katz, J. (2010) The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. *J Dent* 38: 83–95.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362–374.

Fyfe, M., Bergström, M., Aspengren, S., and Peterson, A. (2005) PAR-2 activation in intestinal epithelial cells potentiates interleukin-1 $\beta$ -induced chemokine secretion via MAP kinase signaling pathways. *Cytokine* 31: 358–367.

Ghosh, S., Basu, M., and Roy, S.S. (2012) ETS-1 protein regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3. *J Biol Chem* 287: 15001–15015.

Groeger, S., Domann, E., Gonzales, J.R., Chakraborty, T., and Meyle, J. (2011) B7-H1 and B7-DC receptors of oral squamous carcinoma cells are upregulated by *Porphyromonas gingivalis*. *Immunobiology* 216: 1302–1310.

Guo, D., Zhou, H., Wu, Y., Zhou, F., Xu, G., Wen, H., and Zhang, X. (2011) 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.

Guo, K., Liu, Y., Zhou, H., Dai, Z., Zhang, J., Sun, R. et al. (2008) Involvement of protein kinase C  $\beta$ -extracellular signal-regulating kinase 1/2/p38 mitogen-activated protein kinase-heat shock protein 27 activation in hepatocellular carcinoma cell motility and invasion. *Cancer Sci* 99: 486–496.

Guo, Y., Nguyen, K.A., and Potempa, J. (2010) Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol* 2000 54:15–44.

Hahne, J.C., Okuducu, A.F., Kaminski, A., Florin, A., Soncin, F., and Wernert, N. (2005) Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth. *Oncogene* 24: 5384–5388.

Hansen, R.K., Parra, I., Hilsenbeck, S.G., Himelstein, B., and Fuqua, S.A. (2001) HSP27-induced MMP-9 expression is influenced by the Src tyrosine protein kinase yes. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 186–193.

Hjortoe, G.M., Petersen, L.C., Albrektsen, T., Sorensen, B.B., Norby, P.L., Mandal, S.K. et al. (2004) Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 103: 3029–3037.

Inaba, H., Kawai, S., Nakayama, K., Okahashi, N., and Amano, A. (2004) Effect of enamel matrix derivative on periodontal ligament cells in vitro is diminished by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 75: 858–865.

Inaba, H., Kuboniwa, M., Bainbridge, B., Yilmaz, O., Katz, J., Shiverick, K.T., et al. (2009) *Porphyromonas gingivalis* invades human trophoblasts and inhibits proliferation by inducing G1 arrest and apoptosis. *Cell Microbiol* 11: 1517–1532.

Jaeschke, A., Karasarides, M., Ventura, J.J., Ehrhardt, A., Zhang, C., Flavell, R.A., et al. (2006) JNK2 is a positive regulator of the c-Jun transcription factor. *Mol Cell* 23: 899–911.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69–90.

Jotwani, R., Eswaran, S.V., Moonga, S., and Cutler, C.W. (2010) MMP-9/TIMP-1 imbalance induced in human dendritic cells by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58: 314–321.

Kanke, T., Takizawa, T., Kabeya, M., and Kawabata, A. (2005) Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs) : PAR-2 as a potential therapeutic target. *J Pharmacol Sci* 97: 38–42.

Kato, T., Okahashi, N., Kawai, S., Kato, T., Inaba, H., Morisaki, I., and Amano, A. (2005) Impaired degradation of matrix collagen in human gingival fibroblasts by the antiepileptic drug phenytoin. *J Periodontol* 76: 941–950.

Katz, J., Onate, M.D., Pauley, K.M., Bhattacharyya, I., and Cha, S. (2011) Presence of *Porphyromonas gingivalis* in gingival squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci* 3: 209–215.

Kida, Y., Inoue, H., Shimizu, T., and Kuwano, K. (2007) *Serratia marcescens* serralyisin induces inflammatory responses through protease-activated receptor 2. *Infect Immun* 75: 164–174.

Krüger, A., Arlt, M.J., Gerg, M., Kopitz, C., Bernardo, M.M., Chang, M., et al. (2005) Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res* 65: 3523–3526.

Kumar, B., Koul, S., Petersen, J., Khandrika, L., Hwa, J.S., Meacham, R.B. et al. (2010) p38 mitogen-activated protein kinase-driven MAPKAPK2 regulates invasion of bladder cancer by modulation of MMP-2 and MMP-9 activity. *Cancer Res* 70: 832–841.

Lanzós, I., Herrera, D., Santos, S., O'Connor, A., Peña, C., Lanzós, E., and Sanz, M. (2011)

Microbiological effects of an antiseptic mouthrinse in irradiated cancer patients. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 16: e1036–1042.

Lee, S.E., Kim, J.M., Jeong, S.K., Jeon, J.E., Yoon, H.J., Jeong, M.K., and Lee, S.H. (2010) Protease-activated receptor-2 mediates the expression of inflammatory cytokines, antimicrobial peptides, and matrix metalloproteinases in keratinocytes in response to *Propionibacterium acnes*. *Arch Dermatol Res* 302: 745–756.

Li, Z., Bian, L.J., Li, Y., Liang, Y.J., and Liang, H.Z. (2009) Expression of protease-activated receptor-2 (PAR-2) in patients with nasopharyngeal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognosis. *Pathol Res Pract* 205: 542–550.

Lijnen, H.R. (2001) Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 86: 324–333.

Liu, S., Liang, Y., Huang, H., Wang, L., Li, Y., Li, J. et al. (2005) ERK-dependent signaling pathway and transcriptional factor Ets-1 regulate matrix metalloproteinase-9 production in transforming growth factor-beta1 stimulated glomerular podocytes. *Cell Physiol Biochem* 16: 207–216.

Loesch, M., Zhi, H.Y., Hou, S.W., Qi, X.M., Li, R.S., Basir, Z., et al. (2010) p38gamma MAPK cooperates with c-Jun in trans-activating matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 285: 15149–15158.

Lu, K.W., Chen, J.C., Lai, T.Y., Yang, J.S., Weng, S.W., Ma, Y.S., et al. (2011) Gypenosides inhibits migration and invasion of human oral cancer SAS cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 -9 and urokinase-plasminogen by ERK1/2 and NF-kappa B signaling pathways. *Hum Exp Toxicol* 30:406-415.

Mager, D.L., Haffajee, A.D., Devlin, P.M., Norris, C.M., Posner, M.R., and Goodson, J.M. (2005) The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: a descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med* 3: 27. <http://www.translational-medicine.com/content/3/1/27>.

Maruyama, T., Yamanaka, R., Yokoi, A., Ekuni, D., Tomofuji, T., Mizukawa, N. et al. (2012) Relationship between serum albumin concentration and periodontal condition in patients with head and neck cancer. *J Periodontol* 83: 1110–1115.

Miyazaki, Y., Kikuchi, K., González-Alva, P., Inoue, H., Noguchi, Y., Tsuchiya, H. et al. (2010) Association of Butyric Acid Produced by Periodontopathic Bacteria with Progression of Oral Cancer. *J Cancer Sci Ther* 2: 26–32.

Mu, C.Y., Huang, J.A., Chen, Y., Chen, C., and Zhang, X.G. (2011) High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol* 28: 682–688.

- Nakayama, K., Kadowaki, T., Okamoto, K., and Yamamoto, K. (1995) Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. *J Biol Chem* 270: 23619–23626.
- Okamoto, K., Nakayama, K., Kadowaki, T., Abe, N., Ratnayake, D.B., and Yamamoto, K. (1998) Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 273: 21225–21231.
- Oliveira, M.J., Costa, A.C., Costa, A.M., Henriques, L., Suriano, G., Atherton, J.C., et al. (2006) *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner. *Biol Chem* 281: 34888–34896.
- Petti, S. (2009) Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncology* 45: 340–350.
- Raffetto, J.D., and Khalil, R.A. (2008) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 75: 346–359.
- Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D.L., and Quigley, J.P. (1999) Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274: 13066–13076.
- Ramu, P., Lobo, L.A., Kukkonen, M., Bjur, E., Suomalainen, M., Raukola, H., et al. (2008) Activation of pro-matrix metalloproteinase-9 and degradation of gelatin by the surface protease PgtE of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Int J Med Microbiol* 298: 263–278.
- Scian, R., Barrionuevo, P., Giambartolomei, G.H., De Simone, E.A., Vanzulli, S.I., Fossati, C.A., et al. (2011) Potential role of fibroblast-like synoviocytes in joint damage induced by *Brucella abortus* infection through production and induction of matrix metalloproteinases. *Infect Immun* 79: 3619–3632.
- Seitz, I., Hess, S., Schulz, H., Eckl, R., Busch, G., Montens, H.P., et al. (2007) Membrane-type serine protease-1/matriptase induces interleukin-6 and -8 in endothelial cells by activation of protease-activated *Serratia marcescens* receptor-2: potential implications in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 769–775.
- Seth, A., and Watson, D.K. (2005) ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 41: 2462–2478.
- Shi, X., Gangadharan, B., Brass, L.F., Ruf, W., and Mueller, B.M. (2004) Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res* 2: 395–402.
- Shi, Y., Ratnayake, D.B., Okamoto, K., Abe, N., Yamamoto, K., and Nakayama, K. (1999)

Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*. *J Biol Chem* 274: 17955–17960.

Shin, K.D., Lee, M.Y., Shin, D.S., Lee, S., Son, K.H., Koh, S., et al. (2005) Blocking tumor cell migration and invasion with biphenyl isoxazole derivative KRIBB3, a synthetic molecule that inhibits Hsp27 phosphorylation. *J Biol Chem* 280: 41439–41448.

Shindoh, M., Higashino, F., Kaya, M., Yasuda, M., Funaoka, K., Hanzawa, M., et al. (1996) Correlated expression of matrix metalloproteinases and ets family transcription factor E1A-F in invasive oral squamous-cell-carcinoma-derived cell lines. *Am J Pathol* 148: 693–700.

da Silva, S.D., Ferlito, A., Takes, R.P., Brakenhoff, R.H., and Valentin, M.D. (2011) Advances and applications of oral cancer basic research. *Oral Oncol* 47: 783–791.

St-Onge, M., Lagarde, S., Laflamme, C., Rollet-Labelle, E., Marois, L., Naccache, P.H., Pouliot, M. (2010) Proteinase-activated receptor-2 up-regulation by Fcγ-receptor activation in human neutrophils. *FASEB J* 24: 2116–2125.

Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463–516.

Stewart, B.W., Greim, H., Shuker, D., and Kauppinen, T. (2003) Defence of IARC monographs. *Lancet* 361: 13003–13006.

Svensson, K.J., Kucharzewska, P., Christianson, H.C., Sköld, S., Löfstedt, T., Johansson, M.C. et al. (2011) Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2-mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 13147–13152.

Tamura, F., Nakagawa, R., Akuta, T., Okamoto, S., Hamada, S., Maeda, H., et al. (2004) Proapoptotic effect of proteolytic activation of matrix metalloproteinases by *Streptococcus pyogenes* thiol proteinase (Streptococcus pyrogenic exotoxin B). *Infect Immun* 72: 4836–4847.

Tancharoen, S., Sarker, K.P., Imamura, T., Biswas, K.K., Matsushita, K., Tatsuyama, S. et al. (2005) Neuropeptide release from dental pulp cells by RgpB via proteinase-activated receptor-2 signaling. *J Immunol* 174: 5796–5804.

Tezal, M., Sullivan, M.A., Hyland, A., Marshall, J.R., Stoler, D., Reid, M.E. et al. (2009) Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 2406–2412.

Tezal, M., Scannapieco, F.A., Wactawski-Wende, J., Hyland, A., Marshall, J.R., Rigual, N.R., and Stoler, D.L. (2007) Chronic periodontitis and the risk of tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133: 450–454.

Thompson, R.H., Dong, H., and Kwon, E.D. (2007) Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin Cancer Res* 13: 709s–715s.

Vliagoftis, H., Schwingshackl, A., Milne, C.D., Duszyk, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., et al. (2000) Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 106: 537–545.

Wagner, E.F., and Nebreda, A.R. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9: 537–549.

Wasserman, S.A. (1993) A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. *Mol Biol Cell* 4: 767–771.

Westermarck, J., and Kähäri, V.M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13: 781–792.

Wilson, S.R., Gallagher, S., Warpeha, K., and Hawthorne, S.J. (2004) Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors. *Prostate* 60: 168–174.

Wright, C., Pilkington, R., Callaghan, M., and McClean, S. (2011) Activation of MMP-9 by human lung epithelial cells in response to the cystic fibrosis-associated pathogen *Burkholderia cenocepacia* reduced wound healing in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L575–586.

Zhang, J.Y., and Selim, M.A. (2012) The role of the c-Jun N-terminal Kinase signaling pathway in skin cancer. *Am J Cancer Res* 2: 691–698.

Zhou, J., Zhang, J., and Chao, J. (2012) *Porphyromonas gingivalis* promotes monocyte migration by activating MMP-9. *J Periodontal Res* 47: 236–242.

## 謝辞

本研究を行う機会を与えていただき、終始ご懇篤なるご指導とご検閲を賜りました、口腔分子免疫制御学講座 天野敦雄教授、療護歯科保健学講座 森崎市治郎教授および口腔科学フロンティアセンター 野田健司教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行に当たり、様々なご指導とご教示を頂いた口腔科学フロンティアセンター 稲葉裕明助教に深謝いたします。最後に、本研究を行うに際し、幅広いご援助とご協力をいただいた口腔分子免疫制御学講座、口腔科学フロンティアセンターおよび障害者歯科治療部の皆様に感謝いたします。