

歯周炎発症における歯肉上皮細胞の役割に関する研究

柴 秀 樹

広島大学病院 口腔維持修復歯科 歯周診療科

Study on a Role of Gingival Epithelial Cells in the Onset of Periodontitis

Hideki Shiba

Periodontics and Endodontics, Hiroshima University Hospital

はじめに

上皮細胞は病原性微生物の侵入に対して最前線に位置し、物理的なバリアーとして機能している。また、細菌の付着（侵入）に反応して抗菌ペプチド産生などの自然免疫機能を有する一方で、インターロイキン（IL）-1 α やIL-8などの炎症性サイトカインを産生し、炎症の惹起に積極的な役割を果たしている（図1）。歯周炎は歯周病原性細菌と宿主細胞との相互作用によって組織の破壊が引き起こされる感染症である。歯肉上皮細胞は歯周病原性細菌と最初に接する細胞であることから、歯周炎の発症や進行に関わっていると考えられるが、歯周病原性細菌やサイトカインに対する歯肉上皮細胞の反応についてはほとんど知られていない。我々は歯周炎発症における歯肉上皮細胞の役割を防御と破壊の両面から明らかにし、歯肉上皮細胞の反応制御が歯周病の予防や治療に有効であることを示した。さらに、歯周病原性細菌に対する歯肉上皮細胞の反応が、病原性微生物構成成分認識分子の遺伝子型に依存して変化することを明らかにした。本稿では歯周炎発症における歯肉上皮細胞の役割に関して、我々のこれまでの研究成果を他の研究者によって明らかにされた

知見を交えて簡潔に紹介する。

1. 歯周病原性細菌に対する歯肉上皮細胞の反応

サイトカイン発現、エンドセリン発現、細胞連結装置発現および抗菌ペプチド発現などの反応に着目した。

1) サイトカインおよびエンドセリン発現

Streptococcus pyogenes と共培養したヒト角化上皮細胞株（HaCaT 細胞）の IL-1 β mRNA 発現量は増加する¹⁾。一方、ヒトの尿管上皮細胞株（J82 細胞）やヒトの口腔癌細胞株（KB 細胞）に *Escherichia coli* や *Eikenella corrodens* を作用させた場合、IL-1 β mRNA 発現誘導は認められない^{2,3)}。我々は *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 生菌体と死菌体および *A. actinomycetemcomitans* の外膜タンパク質 (OMP) 29 と OMP100 で刺激した培養ヒト歯肉上皮細胞の IL-1 β mRNA 発現が促進されることを示した^{4,5)}。このように同じ上皮細胞であっても病原性細菌に対する IL-1 β 発現の反応は細胞の由来に依存している。一方、細菌の刺激によって、ヒト歯肉上皮細胞、J82 細胞、KB 細胞、ヒト角化上皮細胞株 (HaCaT, HOK-18A, HOK-16B-Bap-T1)、いずれの細胞においても IL-8 産生量は増加する¹⁻⁸⁾。このように病原性細菌によって刺激された上皮細胞の

連絡先：柴 秀樹

〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3

広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座歯周病態学分野

Hideki Shiba

Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, 1-2-3, Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, Japan, 734-8553

E-mail bashihi@hiroshima-u.ac.jp

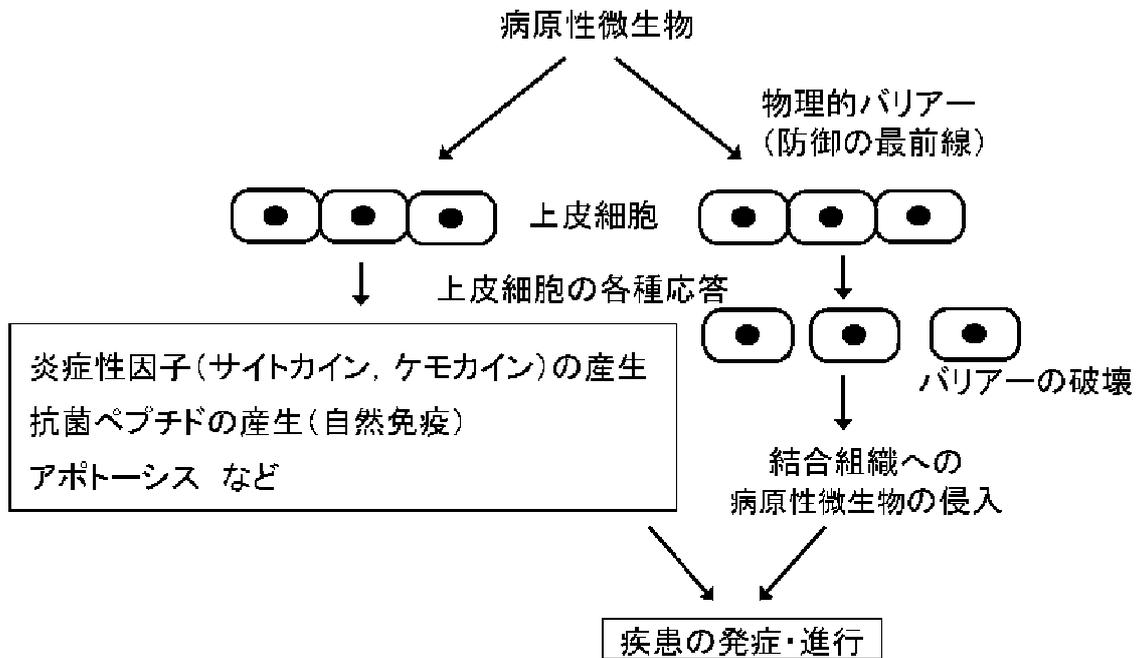


図1 疾患発症への上皮細胞の関わり

IL-8 発現は、IL-1 β 発現とは異なり、上皮細胞の由来に依存せず上皮細胞間で同じ応答を示すと考えられる。

エンドセリン (ET) は、1988 年にブタ大動脈の血管内皮細胞培養上清から単離・精製された強力な血管収縮作用をもつ生理活性物質である。ET は 21 個のアミノ酸残基から構成されるペプチドで、これまでに ET-1, ET-2 および ET-3 の 3 つのアイソフォームが同定されている。ET は血管以外にも脳、肺、心臓、肝臓および腎臓など多くの組織での発現が認められている。ET は炎症性サイトカインの産生促進および増殖促進など、多様な生理機能を有することから、高血圧、動脈硬化症および肝硬変などの全身疾患との関わりが示唆されている。我々は歯周炎患者の歯肉溝滲出液中の ET-1 濃度が健常者と比較して有意に高いこと、IL-1 β および腫瘍壊死因子 (TNF)- α の刺激によって培養ヒト歯肉上皮細胞から ET-1 の産生が誘導されることを明らかにした⁹⁾。これらのことから、歯肉上皮細胞によって産生される炎症性サイトカインや ET が歯周炎病態形成へ関与することが示唆された。

2) 細胞連結装置発現

細胞連結装置にはギャップジャンクション、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクションおよびデスモゾームがある。これらの細胞連結装置は正常な細胞群の統合性および個々の細胞の正常な細胞機能維持に重要な役割を担っている。したがって、歯周病原

性細菌による歯肉上皮細胞の物理的なバリアーの破壊に伴い、歯周病原性細菌の結合組織への侵入および細胞の正常な統合性や細胞機能の維持の困難が生じ、歯周炎の発症に関係している可能性がある。我々は、*A. actinomycetemcomitans* あるいは *A. actinomycetemcomitans* 由来の OMP29 の刺激が培養ヒト歯肉上皮細胞のギャップジャンクション、タイトジャンクションおよびアドヘレンスジャンクションに与える影響を調べた。

(1) ギャップジャンクション

ギャップジャンクションは、細胞膜上に形成されるコネクソンというサブユニットが隣接する二つの細胞同士が互いに結合することによって形成される直径 1.5 から 2.0nm のチャンネルである。コネクソンはコネキシン (CX) と呼ばれるタンパク分子の 6 量体として形成されている。CX は予想される分子量に基づいて CX26, CX31, CX43 など 13 種類からなる CX ファミリーを形成している。ギャップジャンクションの機能は分子量 1200 Da 以下の物質、たとえば cyclic AMP, Ca²⁺, inositol triphosphate などを隣接する細胞間の濃度勾配に従って輸送することである。この隣接する細胞間の物質輸送は細胞間コミュニケーションと呼ばれる。これによって、細胞は細胞群としての正常な機能発現や細胞群の統合性維持を行っている。*A. actinomycetemcomitans*, *A. actinomycetemcomi-*

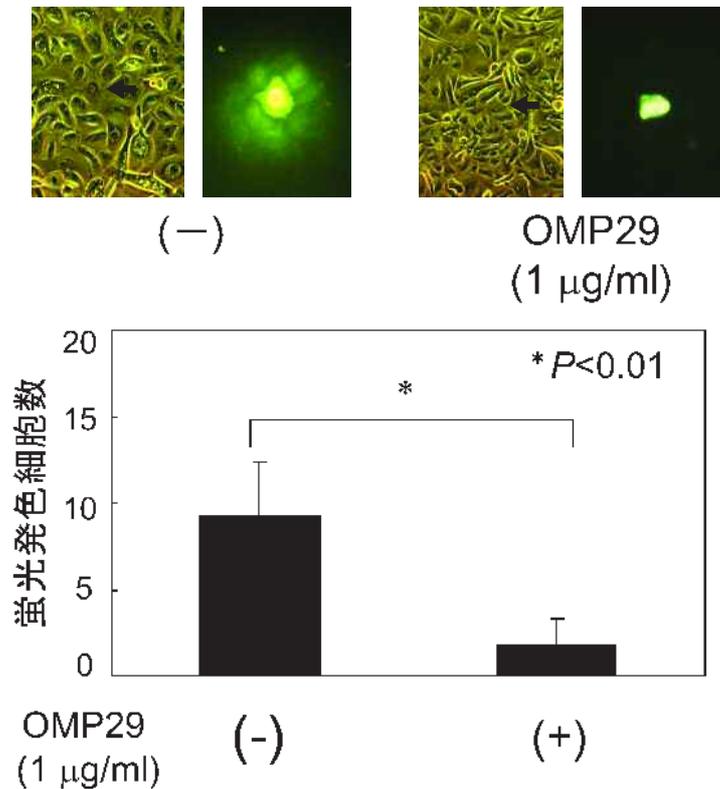


図2 歯肉上皮細胞の細胞間コミュニケーションに及ぼす OMP29 の影響

Dye transfer 法を用いて、ギャップジャンクションを介した細胞間コミュニケーション能の分析を行った。各グループの左は位相差顕微鏡像、右は色素注入5分後の蛍光顕微鏡像である。矢印は色素注入細胞を示す。グラフは細胞間コミュニケーション能としてカウントされた蛍光発色細胞数を表している。Uchida et al., 2005 から引用、一部改変

tans 由来の OMP29 あるいは IL-8 によって培養ヒト歯肉上皮細胞を刺激したところ、歯肉上皮細胞の CX43 発現およびギャップジャンクションを介した細胞間コミュニケーション能が低下した^{10,11)} (図2)。また、*A. actinomycetemcomitans* の刺激によって誘導された IL-8 が CX43 の発現を減少させ、ギャップジャンクションを介する細胞間コミュニケーションが抑制される経路の存在が明らかになった¹¹⁾。

(2) タイトジャンクション

一層の円柱上皮において、タイトジャンクションは細菌の侵入に対して最前線に位置している。タイトジャンクションは細胞間の接着、液体や低分子の細胞外拡散の制御および細胞極性維持に関与すると考えられている。タイトジャンクションの構成タンパク質には Zonula occludens-1 (ZO-1), Occludin, Claudin-1 などがある。*Porphyromonas gingivalis* と上皮細胞である Madin-parby canine kidney (MDCK) 細胞とを共培養すると、MDCK 細胞の Occludin の発現が減少す

る¹²⁾。我々は *A. actinomycetemcomitans* が角化上皮細胞である培養ヒト歯肉上皮細胞の ZO-1 発現を低下させるが、IL-8 は ZO-1 発現に影響を及ぼさないことを明らかにした¹¹⁾。

(3) アドヘレンスジャンクション

アドヘレンスジャンクションは、細胞接着分子であるカドヘリンを主体とした接着装置である。カドヘリンは細胞外でカルシウムイオン依存性にホモフィリックに結合する。カドヘリンには E 型、N 型、P 型などが知られているが、上皮細胞には E-カドヘリンが発現している。E-カドヘリンは細胞と細胞の結合に関わるばかりでなく、細胞の増殖、分化、極性および層形成を制御する。*P. gingivalis* を MDCK 細胞に添加すると、MDCK 細胞の E-カドヘリン発現が減少するという報告がある¹²⁾。我々は *A. actinomycetemcomitans* が *P. gingivalis* 同様に歯肉上皮細胞の E-カドヘリン発現を低下させることを明らかにした¹³⁾。

歯周ポケット上皮の CX26, CX43 および E-カドヘ

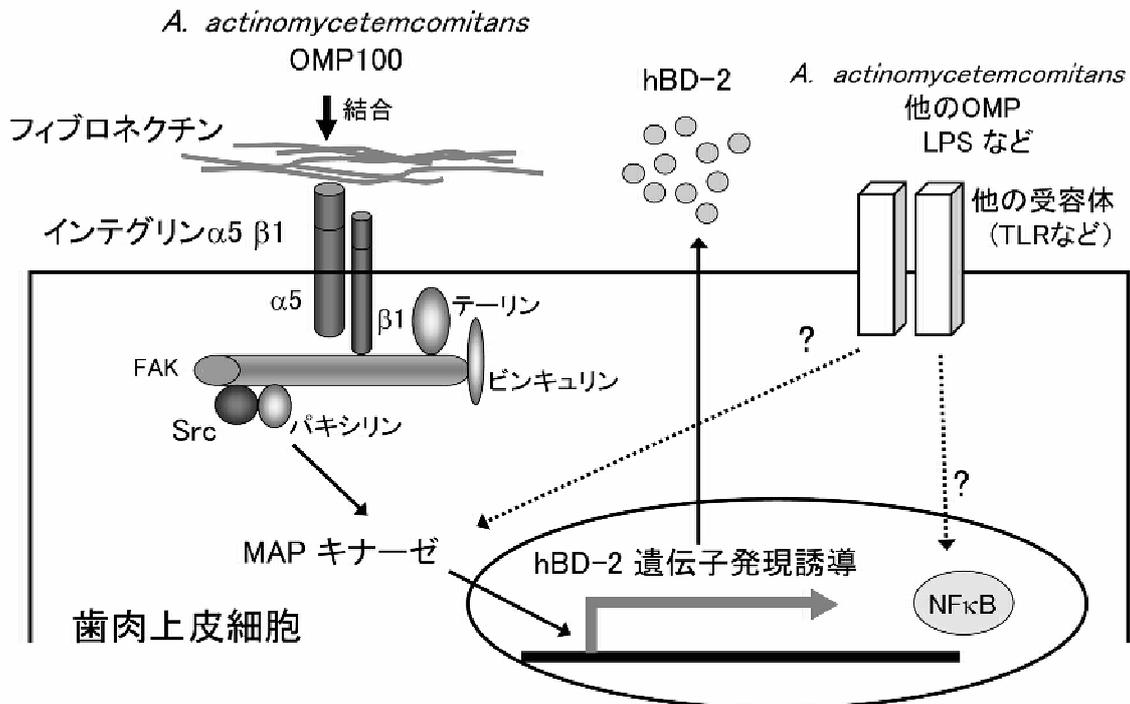


図3 OMP100による歯肉上皮細胞のhBD-2発現誘導メカニズム

リン発現レベルは、健康歯肉組織の歯肉溝上皮における発現レベルと比較して低いことが知られている¹⁴⁾。この *in vivo* の結果と我々が示した *in vitro* の結果から、歯周病原性細菌が歯肉上皮細胞における細胞連結装置発現の抑制や細胞間コミュニケーション能の低下を引き起こすことによって、歯肉上皮細胞の物理的なバリアーとしての機能が破壊され、歯周病原性細菌の歯肉上皮結合組織への侵入が容易となり、さらに、歯肉上皮細胞の正常な機能が抑制される可能性が示唆された。このように、歯肉上皮細胞における細胞連結装置発現の変化が歯周炎の発症に関わっていると考えられる。

3) 抗菌ペプチド発現

上皮組織は、生体の防御反応として様々な自然免疫能を有している。自然免疫の一つとして生体が産生する抗菌ペプチドが注目されており、ヒト上皮細胞が産生する主な抗菌ペプチドとしては human β -defensin (hBD) や Cathelicidin ファミリーに属する 18 kDa cationic antimicrobial protein (CAP18) が知られている^{13, 15-17)}。歯周病原性細菌と最初に接する歯肉上皮細胞は、細菌感染に対する防御能として抗菌ペプチドを産生していると考えられる。そこで、我々は *A. actinomycetemcomitans* で刺激した培養ヒト歯肉上皮細胞

における各種抗菌ペプチド発現を調べた。*A. actinomycetemcomitans* は、培養歯肉上皮細胞において hBD-2, hBD-3 および CAP18 の遺伝子発現を誘導した^{13, 17)}。hBD-2 発現は hBD-3 や CAP18 発現に比べて著しく誘導された¹⁷⁾。また、hBD-2, hBD-3 および CAP18 の発現増加量は *A. actinomycetemcomitans* の臨床分離株間で差があった。*A. actinomycetemcomitans* 刺激による歯肉上皮細胞における hBD-2 発現誘導メカニズムを明らかにするために、*A. actinomycetemcomitans* 由来の OMP100 による hBD-2 発現誘導を調べたところ、① OMP100 はフィブロネクチンに結合すること、② OMP100 による hBD-2 の誘導に歯肉上皮細胞のインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 、Src キナーゼおよび MAP キナーゼが関わるということが明らかになった (図 3)。さらに、*A. actinomycetemcomitans* の刺激によって歯肉上皮細胞から産生された TNF- α や IL-8 が hBD-2 発現を誘導することを明らかにし、2 次的な hBD-2 発現誘導メカニズムの存在を示した¹⁷⁾。*A. actinomycetemcomitans* 由来の OMP100 同様、*Fusobacterium nucleatum* 由来の外膜タンパク質刺激に対するヒト歯肉上皮細胞の hBD-2 発現は、MAP キナーゼを介して調節されている¹⁸⁾。一方、*Salmonella enteritidis* によって刺激されたヒト腸管上皮細胞の hBD-2 発現誘

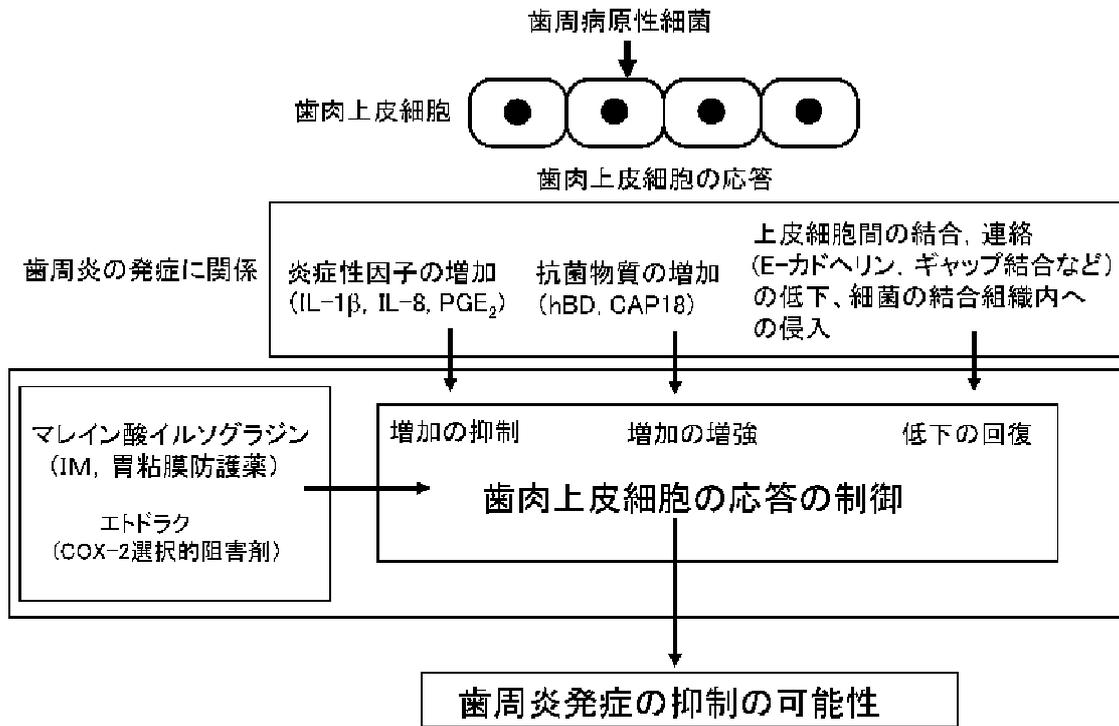


図4 IMとエトドラクによる歯周炎の予防の可能性

導はNF-κBを介して生じる¹⁹⁾。また、皮膚あるいは口腔内に常在している *Staphylococcus epidermidis* や *S. gordonii* 刺激による包皮および口腔の上皮細胞の抗菌ペプチド発現はMAPキナーゼを介して、また、病原性の強い *S. pyogenes* や *P. gingivalis* に刺激よる発現はNF-κBとMAPキナーゼを介して誘導される²⁰⁾。このように、抗菌ペプチドは、宿主である細胞や寄生体である細菌の種類に依存して発現誘導されると考えられる。

歯肉上皮細胞は、hBDやCAP18の他に抗菌物質として、Calprotectinおよびparotid secretory proteinを発現していることが明らかにされている^{21,22)}。また、我々は合成した4種類の抗菌ペプチド(hBD-1,-2,-3およびLL37(CAP18のC末端で、抗菌活性を示す部位))の歯周病原性細菌,*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *F. nucleatum* に対する抗菌活性を検討したところ、いずれの菌に対しても抗菌活性を示し、その活性強度には菌種、菌株間で差が認められた¹⁶⁾。

歯肉上皮細胞の抗菌ペプチド発現は、歯周病原性細菌、サイトカイン、細胞表層の受容体、細胞内伝達経路に依存して制御されていることから、歯肉上皮細胞によって産生される抗菌ペプチドが歯周炎発症の際の

生体防御反応において重要な役割を担っていると考えられる。歯周病原性細菌やサイトカインによって歯肉上皮細胞から産生される各種抗菌ペプチド産生量の個体差、あるいは抗菌ペプチドに対する歯周病原性細菌の感受性の個体差に関する研究が、歯周炎発症機序の解明や抗菌ペプチドを用いた歯周炎予防法(治療法)開発のために必要と思われる。

2. マレイン酸イルソグラジンとCOX-2選択的阻害剤が歯肉上皮細胞の応答に及ぼす影響

歯周病を予防する方法としては、感染細菌を標的とする方法と宿主細胞の機能を制御する方法が考えられる。歯肉上皮による物理的なバリアーとしての機能および自然免疫の強化、あるいは歯肉上皮細胞における炎症起因为物質発現の抑制は、歯周炎発症の抑制につながると考えられる。そこで、我々は医科領域ですでに臨床応用されているマレイン酸イルソグラジンとCOX-2選択的阻害剤を用いて、歯肉上皮細胞の機能を制御することによって歯周炎の発症を抑制するための基礎的研究を行った。

1) マレイン酸イルソグラジン

マレイン酸イルソグラジン(IM)は胃粘膜防護薬として臨床応用されている。IMは胃粘膜上皮細胞の細胞間コミュニケーション活性化作用を持つことが知ら

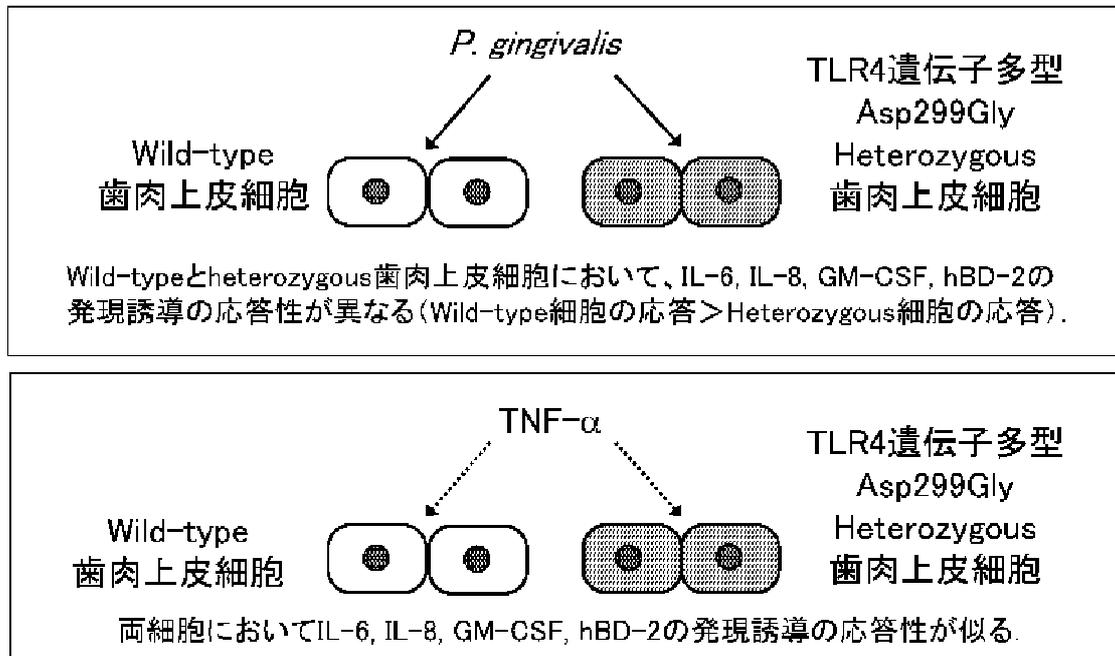


図5 TLR4 遺伝子型と歯肉上皮細胞の応答性

れている²³⁾。さらにIMは胃潰瘍の修復に密接に関係しているCX32の発現を促進する²⁴⁾。したがって、IMが歯肉上皮細胞の細胞連結装置の機能およびサイトカイン発現を調節することによって、歯周炎の発症を抑制できる可能性があると考え、我々はIM(日本新薬株式会社(京都)から供与)が歯周病原性細菌に対する歯肉上皮細胞の応答に及ぼす影響を調べた。その結果、IMは*A. actinomycetemcomitans*刺激による培養ヒト歯肉上皮細胞のIL-8産生促進を抑制した¹⁰⁾。また、IMは*A. actinomycetemcomitans*刺激による培養ヒト歯肉上皮細胞のCX43発現、ZO-1発現および細胞間コミュニケーションの低下を回復させた^{10,11)}。*A. actinomycetemcomitans*刺激によって低下した細胞間コミュニケーション能のIMによる回復には、歯肉上皮細胞のcAMP量の増加とIL-8産生の減少が関係していた^{10,11)}。

2) COX-2 選択的阻害剤

現在では、非ステロイド性抗炎症薬であるCOX-2選択的阻害剤は心筋梗塞など心血管疾患の副作用と関連が深いとして非常に慎重な使用が勧告されているが、我々はエトドラク製剤(COX-2選択的阻害薬、日本新薬株式会社から供与)が*A. actinomycetemcomitans*によって刺激された培養ヒト歯肉上皮細胞のPGE₂産生、hBD-2発現およびE-カドヘリン発現に及ぼす影響を調べた。その結果、エトドラクは*A. ac-*

*tinomycetemcomitans*刺激による歯肉上皮細胞からのPGE₂産生の促進を抑制し、E-カドヘリン発現の抑制を阻止し、hBD-2遺伝子発現の促進を増強した¹³⁾。また、我々はエトドラクが炎症性歯槽骨吸収を抑制する可能性を示唆している²⁵⁾。

以上、IMやエトドラクは炎症の惹起の抑制、抗菌ペプチド発現促進あるいは歯肉上皮細胞の正常な細胞間接合や細胞間連絡の維持に有効な薬剤と考えられることから、これらの薬剤は歯肉組織における炎症の惹起および波及を抑制する上で有用であることが示唆された(図4)。

3. TLR4 遺伝子型と歯肉上皮細胞の応答性

Toll-like receptor (TLR)は病原体に特有な構造(Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs)を認識する膜タンパク質であり、自然免疫応答に関与する。すなわち、TLRがPAMPsを認識すると細胞内シグナルが生じ、炎症性サイトカイン、ケモカイン、抗菌ペプチドなどの産生およびアポトーシスが誘導される²⁶⁻²⁹⁾。ヒトにおいては、TLR1からTLR10が同定されており、リポタンパク質やペプチドグリカンを認識するTLR2およびLPSを認識するTLR4は歯周炎の発症に関わっていると考えられる³⁰⁾。実際、正常歯肉と比較して重度歯周炎罹患歯肉ではTLR2およびTLR4の発現が上昇することが明らかにされている³⁰⁾。

TLR4 遺伝子型と歯周疾患感受性との関係を示す論文が報告されている。Schröder らは TLR4 遺伝子多型 Asp299Gly と Thr399Ile が侵襲性歯周炎の感受性には影響を与えないが、慢性歯周炎の感受性に関与することを明らかにした³¹⁾。また、Thr399Ile が侵襲性歯周炎と慢性歯周炎を含む歯周炎のリスク因子であることが示唆されている³²⁾。我々は *P. gingivalis* 加熱死菌に対するサイトカイン (IL-6, IL-8 など) 発現応答性が、TLR4 遺伝子多型 Asp299Gly heterozygous ヒト培養歯肉上皮細胞では、wild-type と比べて低くなることを突き止めた³³⁾ (図 5)。この結果は、TLR4 遺伝子多型 Asp299Gly と Thr399Ile を有するヒトの気道上皮細胞では、LPS 刺激による IL-1 産生量の増加を示さないという結果に一致する³⁴⁾。TLR やサイトカインなどの遺伝子型と歯周炎感受性や抵抗性との関連について多くの発表がなされているが、疫学的な解析による研究が多い³⁵⁾。歯周病原性細菌に対する歯肉上皮細胞の応答性と遺伝子型が密接に関連し、歯周疾患に対する感受性 (抵抗性) を生じさせているかもしれない。しかしながら、TLR4 遺伝子多型 Asp299Gly と Thr399Ile が歯周炎の疾患感受性に影響を与えないという報告³⁶⁾や、Asp299Gly はヒト白血球において LPS の低感受性とは関係しないという報告³⁷⁾がある。人種、宿主細胞や歯周病原性細菌の種類および多くの疾患関連遺伝子を考慮したさらなる解析が必要である。

おわりに

歯周炎は「宿主寄生体相互作用」によって成立することから、我々は歯肉上皮細胞の役割に関する研究を宿主応答を積極的に制御しようとする基本的な概念によって推進してきた。すなわち、歯肉上皮細胞の歯周病原性細菌やサイトカインに対する応答と IM などによる応答制御機構の詳細な解析、および薬物による歯周炎抑制効果などの *in vivo* の研究を重ねていくことによって、歯肉上皮細胞の機能制御による歯周炎予防薬や治療薬の開発に繋がると考えられる。また、歯周病原性細菌に対する歯肉上皮細胞の応答性が病原性微生物構成成分認識分子の遺伝子型に依存して変化することの発見から、これまで多くの疫学調査で明らかになっている遺伝子型と歯周炎罹患状態との関係に歯肉上皮細胞の応答性を加えることによって、歯周疾患感受性の新しい検査法の開発を可能にするかもしれない。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の遂行をご指導いただきました本学歯周病態学分野 栗原英見教授に深く感謝の意を表します。また、私の留学先であったルイビル大学において歯肉上皮細胞を用いた研究を行う機会を与えていただき、ご指導いただきました Denis F Kinane 教授に深謝いたします。さらに、研究を進展させる上で心良く共同研究に応じてくださり、細菌学的な立場から適切にご支援いただいた広島大学歯学部同期生 (19 回生) である小松澤 均先生 (本学細菌学、准教授) に感謝いたします。最後に本研究に対し多大なご協力をいただいた多くの先生方に感謝いたします。

本総説の要旨は、第 50 回春季日本歯周病学会学術大会 (平成 19 年 5 月 18 日) において発表しました。

文 献

- 1) Wang B, Ruiz N, Pentland A, Caparon M: Keratinocyte proinflammatory responses to adherent and nonadherent group A streptococci. *Infect Immun*, 65: 2119-2126, 1997.
- 2) Agace W, Hedges S, Andersson U, Andersson J, Ceska M, Svanborg C: Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 61: 602-609, 1993.
- 3) Yumoto H, Nakae H, Fujinaka K, Ebisu S, Matsuo T: Interleukin (IL) -6 and IL-8 are induced in human oral epithelial cells in response to exposure to periodontopathic *Eikenella corrodens*. *Infect Immun*, 67: 384-394, 1999.
- 4) Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, Sakata M, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M, Kurihara H: Expression of IL-1 β and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine*, 14: 152-161, 2001.
- 5) Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, Fujiwara T, Nakano Y, Suzuki N, Uchida Y, Ouhara K, Shiba H, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M: Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol*, 50: 1125-1139, 2003.
- 6) Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ: Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 66: 1660-1665, 1998.
- 7) Huang GT-J, Haake SK, Kim JW, Park NH: Differential expression of interleukin-8 and intercel-

- lular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbiol Immunol*, 13: 301-309, 1998.
- 8) Huang GT-J, Haake SK, Park NH: Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. *J Periodontol*, 69: 1105-1110, 1998.
 - 9) Fujioka D, Nakamura S, Yoshino H, Shinohara H, Shiba H, Mizuno N, Hasegawa N, Shindoh N, Uchida Y, Ogawa T, Kawaguchi H, Kurihara H: Expression of endothelins and their receptors in cells from human periodontal tissues. *J Periodont Res*, 38: 269-275, 2003.
 - 10) Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Hirono C, Ashikaga A, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M, Shiba Y, Kurihara H: Irsogladine maleate influences the response of gap junctional intercellular communication and IL-8 of human gingival epithelial cells following periodontopathogenic bacterial challenge. *Biochem Biophys Res Commun*, 333: 502-507, 2005.
 - 11) Fujita T, Ashikaga A, Shiba H, Uchida Y, Hirono C, Iwata T, Takeda K, Kishimoto A, Hirata R, Kawaguchi H, Shiba Y, Kurihara H: Regulation of IL-8 by Irsogladine maleate is involved in abolishment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced reduction of gap-junctional intercellular communication. *Cytokine*, 34: 271-277, 2006.
 - 12) Katz J, Sambandam V, Wu JH, Michalek SM, Balkovetz DF: Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun*, 68: 1441-1449, 2000.
 - 13) Noguchi T, Shiba H, Komatsuzawa H, Mizuno N, Uchida Y, Ouhara K, Asakawa R, Kudo S, Kawaguchi H, Sugai M, Kurihara H: Syntheses of prostaglandin E₂ and E-cadherin, and gene expression of β -defensin-2 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Inflammation*, 27: 341-349, 2003.
 - 14) Ye P, Chapple CC, Kumar RK, Hunter N: Expression patterns of E-cadherin, involucrin, and connexin gap junction proteins in the lining epithelia of inflamed gingiva. *J Pathol*, 192: 58-66, 2000.
 - 15) Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ: The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci*, 58: 978-989, 2001.
 - 16) Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M: Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*, 55: 888-896, 2005.
 - 17) Ouhara K, Komatsuzawa H, Shiba H, Uchida Y, Kawai T, Sayama K, Hashimoto K, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* outer membrane protein 100 triggers innate immunity and production of β -defensin and the 18-kilodalton cationic antimicrobial protein through the fibronectin-integrin pathway in human gingival epithelial cells. *Infect Immun*, 74: 5211-5220, 2006.
 - 18) Krisanaprakornkit S, Kimball JR, Dale BA: Regulation of human beta-defensin-2 in gingival epithelial cells: the involvement of mitogen-activated protein kinase pathways, but not the NF- κ B transcription factor family. *J Immunol*, 168: 316-324, 2002.
 - 19) Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, Takahashi A, Asakura H, Makino S, Hojo H, Nakahara Y, Ohsaki M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Moss J, Hirayama T: *Salmonella enteritidis* FljC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem*, 276: 30521-30526, 2001.
 - 20) Chung WO, Dale BA: Innate immune response of oral and foreskin keratinocytes: utilization of different signaling pathways by various bacterial species. *Infect Immun*, 72: 352-358, 2004.
 - 21) Nisapakultorn K, Ross KF, Herzberg MC: Calprotectin expression in vitro by oral epithelial cells confers resistance to infection by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 69: 4242-4247, 2001.
 - 22) Shiba H, Venkatesh SG, Gorr SU, Barbieri G, Kurihara H, Kinane DF: Parotid secretory protein is expressed and inducible in human gingival keratinocytes. *J Periodont Res*, 40: 153-157, 2005.
 - 23) Ueda F, Ban K, Ishima T: Irsogladine activates gap-junctional intercellular communication through M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 274: 815-819, 1995.
 - 24) Iwata F, Joh T, Ueda F, Yokoyama Y, Itoh M: Role of gap junctions in inhibiting ischemia-reperfusion injury of rat gastric mucosa. *Am J Physiol*, 275: G883-G888, 1998.
 - 25) Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M, Suginaka H, Kurihara H: Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis

- inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res*, 14: 1486-1492, 1999.
- 26) Bals R, Hiemstra PS: Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23: 327-333, 2004.
- 27) Tosi MF: Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol*, 116: 241-249, 2005.
- 28) Brozovic S, Sahoo R, Barve S, Shiba H, Uriarte S, Blumberg RS, Kinane DF: *Porphyromonas gingivalis* enhances FasL expression via up-regulation of NF κ B-mediated gene transcription and induces apoptotic cell death in human gingival epithelial cells. *Microbiology*, 152: 797-806, 2006.
- 29) Mak RH, Kuo HJ: Pathogenesis of urinary tract infection: an update. *Curr Opin Pediatr*, 18: 148-152, 2006.
- 30) Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y: Immunohistochemical localization of toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 18: 54-58, 2003.
- 31) Schröder NW, Meister D, Wolff V, Christan C, Kaner D, Haban V, Purucker P, Hermann C, Moter A, Gobel UB, Schumann RR: Chronic periodontal disease is associated with single-nucleotide polymorphisms of the human TLR-4 gene. *Genes Immun*, 6: 448-451, 2005.
- 32) Brett PM, Zygianni P, Griffiths GS, Tomaz M, Parkar M, D' Aiuto F, Tonetti M: Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res*, 84: 1149-1153, 2005.
- 33) Kinane DF, Shiba H, Stathopoulou PG, Zhao H, Lappin DF, Singh A, Eskan MA, Beckers S, Waigel S, Alpert B, Knudsen TB: Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile are hypo-responsive to *Porphyromonas gingivalis*. *Genes Immun*, 7: 190-200, 2006.
- 34) Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nature Genetics*, 25: 187-191, 2000.
- 35) Kinane DF, Shiba H, Hart TC: The genetic basis of periodontitis. *Periodontol*. 2000, 39: 91-117, 2005.
- 36) Folwaczny M, Glas J, Tóth HP, Limbersky O, Folwaczny C: Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 mutations in periodontal disease. *Clin Exp Immunol*, 135: 330-335, 2004.
- 37) Imahara SD, Jelacic S, Junker CE, O'Keefe GE: The TLR4 +896 polymorphism is not associated with lipopolysaccharide hypo-responsiveness in leukocytes. *Genes Immun*, 6: 37-43, 2005.
-