



Title	Cohen症候群の責任遺伝子VPS13Bがヒト歯肉上皮組織におけるバリアタンパクの細胞内輸送に及ぼす影響の解析
Author(s)	松村, 莉彩子
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105349
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

Cohen 症候群の責任遺伝子 *VPS13B* がヒト歯肉上皮組織
におけるバリアタンパクの細胞内輸送に及ぼす影響の解析

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻 口腔感染制御学系部門
予防歯科学講座

松村 莉彩子

本論文の内容の一部は、第 34 回近畿中国四国口腔衛生学会総会 (2023, 広島)
および The 18th Congress of the International Union of Microbiological Societies (2024,
Florence, Italy) において発表した。

要 旨

Cohen 症候群は、*vacuolar protein sorting 13 homolog B* (*VPS13B*) 遺伝子の機能喪失により発症する常染色体潜性の遺伝性疾患である。多様な全身症状を伴い、歯周病を随伴することで知られている。しかし、*VPS13B* の欠失が歯周病を引き起こす分子的基盤については不明である。これまでの研究から、細胞間接着分子である coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) および junctional adhesion molecule 1 (JAM1) が、lipopolysaccharide (LPS) や peptidoglycan (PGN) の歯肉上皮組織下への侵入を防ぎ、上皮のバリア機能の維持に重要な役割を担うことが報告されている。本研究では、*VPS13B* が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響について解析した。

不死化ヒト歯肉上皮細胞において *VPS13B* は CXADR と共局在していた。また、*VPS13B* ノックアウト細胞では野生株と比較し、細胞膜上の CXADR の局在および細胞総タンパク量が減少した一方、mRNA 量は減少しなかった。また、*VPS13B* ノックアウト細胞にリソソームの分解機能を阻害する薬剤を作用させると、CXADR のリソソームへの貯留および細胞膜への局在の回復が確認された。加えて、CXADR の膜貫通領域以降の C 末端を JAM1 の相同するアミノ酸残基に置換したキメラタンパク (CXADR-JAM1^{c-term}) を発現させたノックアウト細胞では細胞膜への局在が維持された。さらに、*VPS13B* をノックアウトした歯肉上皮組織モデルでは、野生株の組織モデルと比較し、LPS および PGN の上皮透過量が増加した。この増加は、CXADR-JAM1^{c-term} の過剰発現により抑制された。

以上より、*VPS13B* は CXADR の細胞膜への輸送に関与し、ヒト歯肉上皮組織におけるバリア機能に寄与していることが示唆された。この知見は、Cohen 症候群における歯周病発症の分子的メカニズムの理解につながると考えられる。

緒 言

歯周病は、歯肉、歯根膜、セメント質および歯槽骨で構成される歯周組織を破壊する慢性炎症性疾患であり、歯肉上皮細胞上に存在する口腔常在菌の持続感染により引き起こされる¹⁾。上皮細胞における細胞間接着装置には、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモソームおよびギャップジャンクションが知られ、これら特異的な接着分子の結合により上皮細胞は隣接する細胞と緊密に接着する^{2), 3)}。その中でも最外側に位置するタイトジャンクションは、強固な結合により細胞の極性を維持して細胞内外の物質の透過を制御している³⁾。タイトジャンクションは細胞内の物質の漏出を防ぐだけでなく、菌やウイルスなどの病原因子の上皮下組織への侵入を防ぐバリアとしての役割を担っている^{4), 5)}。これまでの研究で、歯肉上皮のタイトジャンクションを構成する細胞間接着分子の一つである coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) が歯肉上皮組織のバリア機能に関与することが報告されている⁶⁾。一方、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は CXADR を選択的に分解し、リポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) およびペプチドグリカン (peptidoglycan : PGN) に対する歯肉上皮組織の透過性を亢進させることが示唆されている⁶⁾。

今日、遺伝性疾患における歯周炎の進行には、好中球の機能障害との関連が指摘されてきた一方で^{7), 8), 9), 10)}、歯肉上皮のバリア機能との関連はほとんど解析されていない。Cohen 症候群は、1973 年に Cohen らにより報告された稀な常染色体潜性の遺伝性疾患である^{11), 12) 13)}。Cohen 症候群の臨床徴候として、発達遅延や体幹肥満、眼機能の低下、筋緊張の低下、好中球減少症等が認められ、歯周炎を随伴することが報告されている^{12), 14), 15)}。Cohen 症候群は *vacuolar protein sorting 13 homolog B* (*VPS13B*) 遺伝子の機能欠失により引き起こされる¹⁶⁾。

VPS13B はゴルジ体に関連した細胞内での小胞輸送を担うタンパクとされ、ゴルジ体の機能および構造の維持に関わることが報告されている^{16), 17)}。ゴルジ体は真核細胞の細胞小器官であり、小胞体から送られてきたタンパク質に化学的修飾を行うことにより輸送先を選別し、小胞を介して送り出す役割を担う。この輸送機構は、分泌経路、リソソーム経路、エンドサイトーシス経路が交錯するところにあるが¹⁸⁾、VPS13B の機能欠失がどのように歯周病の発症に寄与しているのかについては不明な点が多い。一方で、Cohen 症候群における好中球減少症の重症度と感染症の重篤化に関連はみられないという報告があることを考慮すると¹⁵⁾、Cohen 症候群患者でみられる歯周病の発症機序には CXADR の機能障害による上皮バリアの破綻が関与している可能性がある。

CXADR は、細胞膜を通過する細胞間のタンパク質輸送やタンパク質間相互作用に関わる膜貫通領域を有する¹⁹⁾。また、細胞膜中の受容体タンパク質を細胞骨格の構成要素へ固定し、他のタンパク質との相互作用による細胞内シグナル伝達などに関わる postsynaptic density-95/disc-large/zonula occludens-1 (PDZ) ドメイン^{20), 21)}を含むアミノ酸領域を有している。これらの領域は CLAUDIN や OCCLUDIN など、他のタイトジャンクションタンパク質とは異なる構造である²²⁾。一般的に、タンパク質の細胞内輸送は、RAB GTPase 等の制御因子が標的となる受容体の細胞質ドメインを認識し、オルガネラにおける輸送小胞の係留、融合および輸送を調節する役割を担っている²³⁾。このことは、CXADR に特徴的な膜貫通領域および細胞質領域を介して、VPS13B が直接的あるいは間接的に CXADR の細胞内輸送に関与する可能性を示している。

そこで本研究では、Cohen 症候群の責任遺伝子である *VPS13B* が歯周病の病因にどのように関連しているのか、歯肉上皮のバリア機能をもつ CXADR に焦点を当て解析した。

材料と方法

1. 細胞の培養条件

不死化ヒト歯肉上皮細胞（immortalized human gingival epithelial cells : IHGE 細胞）は、大阪大学大学院歯学研究科口腔治療学講座 村上伸也教授より供与され、Murakami らの方法で Humedia KG-2（Kurabo, 大阪）にて培養した²⁴⁾。ヒト歯肉線維芽細胞（human gingival fibroblasts : HGF）は、大阪大学歯学部附属病院 障害者治療部 村上旬平講師より供与され、Murakami らの方法でダルベッコ変法イーグル培地（Nacalai Tesque, 京都）にて培養した²⁵⁾。三次元培養による歯肉上皮モデルは、Takeuchi らの方法^{26), 27)} で作製した。トリプシン処理後に遠心分離して回収した歯肉上皮細胞を、phosphate buffered saline（PBS, pH 7.4）に溶解した 0.2 mg/mL フィブロネクチン（Sigma-Aldrich, St, Louis, MO）で 1 分間反応させた。その後、180×g で 2 分間の遠心分離を行い、吸収されなかったポリマーを除去した。次に、細胞を 0.1 mg/mL ゼラチン液（Nacalai Tesque）にて 1 分間反応させ、180×g で 2 分間の遠心分離を行い、吸収されなかったポリマーを除去した。これらの処理を 3 回繰り返し、歯肉上皮細胞上にフィブロネクチンおよびゼラチンを交互に薄膜上に積層させた。そして、PBS に溶解した 0.1 mg/mL ビトロネクチン（#A14700 : Invitrogen, Carlsbad, CA）にて 24 ウェルプレートに設置したカバースリップ（Iwaki, 東京）をコーティングし、その上に歯肉上皮細胞を 2×10^6 個播種して 36 時間培養することで三次元歯肉上皮モデルを作製した。三次元歯肉上皮モデルを用いた透過性実験は、フィブロネクチンおよびコラーゲンでコーティングした 1×10^6 個の歯肉上皮細胞を 24 ウェルの細胞培養インサート上（#353096 : Corning, NY）に播種して 36 時間培養したものを用いた。

2. プラスミドの構築

歯肉上皮細胞の total RNA を RNeasy Mini kit (#74104, Qiagen, Venlo, The Netherlands) を用いて精製し, 得られた mRNA を鋳型とした逆転写反応を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo, 大阪) にて行った. 得られた cDNA を鋳型とし, *CXADR* 遺伝子および *junctional adhesion molecule 1* (*JAM1*) 遺伝子を polymerase chain reaction (PCR) 法にて増幅させた.

HA タグで標識した *CXADR* (Myc-tagged HA-inserted *CXADR*) をコードするプラスミドは, Takeuchi らの方法で作成した⁶⁾. すなわち, HA タグで標識した *CXADR* 遺伝子を PCR 法により増幅して制限酵素 *EcoR*I (New England Biolabs, Ipswich, MA) および *Kpn*I (New England Biolabs) にて切断し, T4 DNA ligase (New England Biolabs) を用いて pCMV-Myc (Takara Bio, 滋賀) に挿入することで構築した.

CXADR の膜貫通領域以降の C 末端を *JAM1* の相同するアミノ酸残基に置換して (*CXADR-JAM1*^{c-term}) HA タグタンパクで標識したキメラタンパクをコードするプラスミド (pCMV-HA-inserted *CXADR-JAM1*^{c-term}) または *JAM1* の膜貫通領域以降の C 末端を *CXADR* の相同するアミノ酸残基に置換して (*JAM1-CXADR*^{c-term}) HA タグタンパクで標識したキメラタンパクをコードするプラスミド (pCMV-HA-inserted *JAM1*^{c-term}) は, Takeuchi ら⁶⁾ の方法にて構築した. すなわち, *CXADR* 遺伝子の 238-365 番目の配列と *JAM1* 遺伝子の 237-259 番目の遺伝子配列をオーバーラップエクステンション法によるフュージョン PCR 法にて融合させ, 得られた塩基配列を制限酵素 *Kpn*I および *Not*I (New England Biolabs) で切断し, pCMV-Myc (Clontech) に挿入して作製した. また, *CXADR-JAM1*^{c-term} または *JAM1-CXADR*^{c-term} を安定発現する細胞株を樹立するためのベクター (p*CXADR-JAM1*^{c-term}-IRES-NEO または p*JAM1-CXADR*^{c-term}-IRES-NEO) は,

pCMV-HA-inserted CXADR-JAM1^{c-term} または, pCMV-HA-inserted JAM1-CXADR^{c-term} を制限酵素 BamH I (New England Biolabs) および Not I で切断し, 得られた DNA 断片を pBApo-EF1 α NEO (Takara Bio) に挿入した. 歯肉上皮細胞への遺伝子導入には, FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega, Madison, WI) を使用した.

3. 抗体と試薬

本研究で使用した抗体と試薬を表 1 に示す.

4. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法は, Takeuchi らの方法にて行った²⁶⁾. IHGE 細胞を 10 % (w/v) トリクロロ酢酸 (Nacalai Tesque) で処理し, 99.0 % (v/v) Tween-20 (Wako, 大阪) および 8 M 尿素液にて変性・溶解し遠心分離により上清を回収した. 回収したタンパク質液を sulfuric acid dodecyl sodium poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分離し, 孔径 0.2 μ m のニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) に転写した. 3 % (w/v) スキムミルクを添加した 0.1 % (v/v) Tween-20 含有 PBS (PBST) にメンブレンを浸漬し, 室温で 15 分間振盪してブロッキングを行った. 次に, PBST で 5,000 倍希釈した一次抗体液にメンブレンを浸漬し, 室温で 1 時間振盪した. メンブレンを PBST で 3 回洗浄後, PBST で 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識の二次抗体液に浸漬し, 室温で 1 時間振盪した. メンブレンを PBST で 3 回洗浄後, 免疫反応を示したバンドのタンパク量を, PierceTM ウェスタンブロット用化学発光基質 (Pierce ELC Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) を用いて, 化学発光撮影装置 ChemiDoc Touch MP (Bio-Rad Laboratories) お

および画像解析ソフトウェア ImageLab Touch ver. 2.1 (Bio-Rad Laboratories) にて解析した。

5. 免疫細胞化学

免疫細胞化学は、Takeuchi らの方法にて行った^{28), 29)}。PBS に溶解した 0.2 mg/mL フィブロネクチンを底面に塗布した 12 または 24 ウェルプレート (Iwaki) 内のカバーガラス (Matsunami Glass Ind, 大阪) 上に IHGE 細胞を培養した。IHGE 細胞の固定は、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Nacalai Tesque) を使用した。ブロッッキングには、PBS にゼラチンパウダー (gelatin fine powder, Sigma-Aldrich) を濃度 0.1% (w/v) で溶解させたものを使用した。次に、固定した細胞サンプルを PBS で 500 倍に希釈した一次抗体液と室温で 1 時間反応させた。さらに、細胞サンプルを PBS で 3 回洗浄後、二次抗体液と室温で 1 時間反応させた。細胞サンプルを PBS で 3 回洗浄後、カバーガラスを蛍光染色封入剤 VECTASHIELD mounting medium (Vector Laboratories, Newark, CA) でスライドガラス (Matsunami Glass Ind) に封入した。細胞の観察は、開口数 1.4 の 64×油浸対物レンズを用いて共焦点顕微鏡 TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて行い、Leica Application Suite X ソフトウェアパッケージ ver. 3.3.0.16799 (Leica Microsystems) にて解析した。

6. RNA 干渉

VPS13B, *RAB6A*, *FAM177A1*, *SEC23IP*, *STX13* および firefly *luciferase* (Luc) に対する short hairpin RNA (shRNA) をコードするプラスミドは、人工合成した linear DNA (Sigma-Aldrich) を pSIREN-RetroQ (Clontech) にライゲーションして作製した；pSIREN-RetroQ-shVPS13B #1458 (標的配列：5'-GAGTACGAAAG

GTTTCACATACC-3'), pSIREN-RetroQ-shRAB6A #263 (標的配列: 5'-TGGCAGT TGGTGTATGATATC-3'), pSIREN-RetroQ-shRAB6A #549 (標的配列: 5'-AAGC AGAGAAGATATGATTGACA-3'), pSIREN-RetroQ-shFAM177A1 #186 (標的配列: 5'-TGGTGAAACAATGGAAGAATATA-3'), pSIREN-RetroQ-shSEC23IP #880 (標的配列: 5'-TTGAATCTTGAAGAAATCTATAA-3'), pSIREN-RetroQ-shSEC23IP #2941 (標的配列: 5'-CTGTTACTACTTAAAGAAATTAA-3'), pSIREN-RetroQ-shSTX13 #526 (標的配列: 5'-CAGGATTGGAAGTTATTAAAGA-3'), pSIREN-RetroQ-shSTX13 #587 (標的配列: 5'-TGGATGTCAATCAGATATTAA-3'), pSIREN-RetroQ-shLuc (標的配列: 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3'). これらのプラスミドを FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega) を用い, IHGE 細胞に形質導入した. 形質導入から 72 時間後, それぞれの shRNA を安定発現させた IHGE 細胞を, 最終濃度が 2 $\mu\text{g/mL}$ となるよう puromycin (InvivoGen, San Diego, CA) を添加した培地にて選択的に培養し, 標的分子ノックダウン細胞株を得た.

7. 相対的リアルタイム PCR 解析

RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用いて IHGE 細胞から RNA を抽出した. 抽出した RNA を鋳型とし, ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用いて相補的 DNA を合成した. リアルタイム PCR には THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo), Rotor Gene Q (Qiagen), および表 2 に示す各プライマーを用いた. 熱変性, アニーリングおよび伸長反応の条件はそれぞれ 95°C/10 秒, 58°C/15 秒および 72°C/30 秒とし, サイクル数は 45 サイクルとした. 各増幅産物は, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法により, β -ACTIN の含有量と比較して相対定量した.

8. VPS13B ノックアウト細胞株の樹立

VPS13B 遺伝子をノックアウトした歯肉上皮細胞は、CRISPR/Cas9 ゲノム・ノックアウトキット#KN404879 (OriGene, Rockville, MD) のガイドベクターおよびドナーベクターを用いて樹立した。*VPS13B* に対するガイドベクターの標的配列は 5'-AGTGAAAGCTGTAGATCCGA-3' (エクソン 1 内) とした。また、DNA 二本鎖切断部位への puromycin 耐性遺伝子の挿入は、ドナーベクターを用いた相同組み換え修復により行った。このベクターをトランスフェクション試薬 FuGENE 6 (Promega) を用いて歯肉上皮細胞に形質導入した。72 時間後にノックアウト細胞を puromycin (2 µg/mL, InvivoGen) にて選択した。選択した細胞における *VPS13B* のタンパク発現または遺伝子発現は、それぞれ免疫組織染色または逆転写 PCR 法にて確認した。

HA タグを挿入した CXADR-JAM1^{c-term} を安定発現する *VPS13B* ノックアウト細胞を樹立するため、pCXADR-JAM1^{c-term}-IRES-Puro を、トランスフェクション試薬 FuGENE6 (Promega) を用いて形質導入した。72 時間後に *VPS13B* ノックアウト細胞を G418 (200 µg/mL, InvivoGen) に選択的に培養して細胞株を得た。

9. 阻害薬の調製

Bafilomycin A1 (Sigma-Aldrich), ethyl {2- (5-nitrothiophene-2-carboxamido) thiophene-3-carbonyl} carbamate (EACC; MedChemExpress LCC, Monmouth Junction, NJ), methyl-beta-cyclodextrin (MβCD; Sigma-Aldrich), dynasore (AdipoGen Life Sciences, San Diego, CA), または latrunculin A (Wako) は、dimethyl sulfoxide (DMSO, Nacalai Tesque) にそれぞれ 100 µM, 500 µM, 1 µM, 1 nM, または 30 µM となるよう溶解し、細胞培養培地への添加時に終濃度をそれぞれ 100 nM, 500 nM, 1 nM, 30 µM, または 500 nM となるよう調製した。

10. 歯肉上皮細胞におけるバリア機能の評価

P. gingivalis PGN は Ishii らの方法で精製した³⁰⁾. Fluorescein isothiocyanate (FITC) -*P. gingivalis* LPS および FITC-*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) PGN は, *P. gingivalis* LPS (InvivoGen) および *S. aureus* PGN を抗体・タンパク質標識キット NH2 (DOJINDO, 熊本) で標識し作成した. 透過性を評価するトレーサーとして, 他に FITC-40 kDa dextran (Sigma-Aldrich) を使用した. 12 ウェル細胞培養プレート用インサート (Corning) 上で培養した, IHGE 細胞または三次元歯肉上皮モデルに, 各種トレーサーをインサート上部の培地に添加した. 30 分後に, IHGE 細胞層または三次元歯肉上皮モデルを透過したトレーサー量を Nivo マルチモードマイクロプレートリーダー (PerkinElmer, 神奈川) で測定し, データ解析ソフト VICTOR Nivo ® Control Software ver. 5.1.0 (PerkinElmer) にて解析した.

11. 統計学的解析

両側 *t* 検定または Dunnett 検定により, 各サンプル群間の有意差を検討した. 解析には, 表計算ソフトウェア Excel ver. 2511 (Microsoft, Redmond, WA) および EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉) を使用した. $p < 0.05$ を有意差ありとした.

12. 画像解析

共焦点顕微鏡画像およびウエスタンブロットの検出画像の解析には, 画像処理ソフトウェア (ImageJ ver. 2.16.0 : National Institutes of Health, Bethesda, MD) を使用した. Manders らの Manders 相関係数は Wortzel らの方法に基づき, 同ソフトウェアの colocalization threshold プラグイン (https://imagej.net/imagej-wiki-static/Colocalization_Threshold) を用い, 2 つの蛍光シグナルの共局在の割合を算

出した³¹⁾,³²⁾.

結 果

1. 歯肉上皮細胞における VPS13B の局在

VPS13B については、HeLa 細胞等を用いて解析が行われてきたが^{33), 34)}、ヒト歯肉上皮細胞において調べられた報告はない。VPS13B はシスゴルジやトランスゴルジ区画を含むゴルジ複合体に局在するとされる^{14), 33)}。シスゴルジは、ゴルジ体の構造のうち小胞体側に位置して小胞体で生成されたタンパク質（積荷タンパク）を受け入れ、トランスゴルジは細胞質側に位置し、修飾を受けた積荷タンパクを仕分けて最終目的地へと送る役割を担う。そこで、IHGE 細胞を用いて VPS13B の局在を共焦点顕微鏡にて確認したところ、130 kDa cis-Golgi matrix protein 1（図 1a, GM130：シスゴルジマーカー、図 1b）陽性区画と近接した局在を認めた。さらに、VPS13B は p230 trans Golgi（GOLGA4：トランスゴルジマーカー）と比較し、GM130 とより共局在していた（図 1c）。これらの結果より、歯肉上皮細胞において VPS13B はシスゴルジ近傍に局在することが示された。

一般的に、線維芽細胞は上皮細胞とともに歯周組織を構築し³⁵⁾、組織の創傷治癒や再生に重要な役割を担っている^{36), 37)}。一方、Cohen 症候群患者は皮膚感染や歯肉出血を慢性的に繰り返すことが報告されている³⁸⁾。そこで、VPS13B のヒト歯肉線維芽細胞（HGF）における発現をリアルタイム PCR 法にて確認したところ、本遺伝子の発現を認めた（図 1d）。このことから、VPS13B は歯肉上皮細胞のみならず歯肉線維芽細胞においても発現し、歯周組織の恒常性維持に関与している可能性が示された。

2. VPS13B ノックアウトによる CXADR の細胞膜への局在に対する影響

CXADR は小胞体でシグナルペプチドが切断され成熟型となり、細胞膜表面に

輸送される⁶⁾。この輸送経路に VPS13B が関連している可能性を調べるため、シグナルペプチドの N 末端側を Myc タグで標識し、シグナルペプチドより C 末端側のアミノ酸領域（137-138 番目のアミノ酸）を HA タグで標識した CXADR キメラタンパク⁶⁾を発現する IHGE 細胞を作製した（図 2a）。この細胞を HA 抗体で免疫染色して共焦点顕微鏡にて観察したところ、VPS13B と HA タグで標識した CXADR の共局在を認めた（図 2b）。VPS13B は Myc タグで標識した CXADR と比較し、HA タグで標識した CXADR と高頻度の共局在を認めた（図 2b, 2c）。この結果より、VPS13B は小胞体におけるシグナルペプチドの切断以降の経路において CXADR の輸送に関与していることが示唆される。次に、VPS13B が CXADR の細胞膜への輸送に及ぼす影響を調べるため、CRISPR-Cas9 システムを用いて *VPS13B* ノックアウト細胞を作製した。*VPS13B* のノックアウトの奏功は、共焦点顕微鏡および逆転写 PCR にて確認した（図 2d, 図 3）。先行研究では、*VPS13B* のノックダウンにより、130 kDa cis-Golgi matrix protein 1（GM130：シスゴルジマーカー）陽性のゴルジ体が散在化することが報告されている^{17), 34)}。そこで、*VPS13B* のノックアウトがゴルジ体の局在に及ぼす影響を共焦点顕微鏡にて確認したところ、上記の先行研究と同様に、GM130 陽性のゴルジ体が散在する傾向を認めた（図 2e）。これらの結果より、本研究で作製した *VPS13B* ノックアウト細胞の表現型が先行研究と一致し、VPS13B がゴルジ体の正常な構造維持に関与することが示唆された。

次に、VPS13B が CXADR の細胞内局在に及ぼす影響を共焦点顕微鏡により調べた結果、野生株と比較して *VPS13B* ノックアウト細胞における細胞膜上の CXADR の局在の減少を認めた（図 2f）。この結果が CRISPR-Cas9 システムのオフターゲット効果による可能性を排除するため、Luc（shLuc, コントロール）または *VPS13B* に対する shRNA（shVPS13B #1458）をコードした配列を pSiren-

RetroQ に組み込み、作成したベクターを IHGE 細胞に形質導入し、CXADR の細胞内局在を共焦点顕微鏡により確認した。VPS13B のノックダウンの奏功は、リアルタイム PCR 法にて確認した (図 4a)。その結果、shLuc と比較して VPS13B をノックダウンした細胞において CXADR のシグナルの減少を認めた (図 4b)。この結果から、VPS13B のノックアウトおよびノックダウンによる CXADR の減少は、オフターゲット効果に依るものではないと判断した。

先行研究において CXADR に加え、タイトジャンクション関連タンパクである JAM1 が歯肉上皮組織のバリア機能に関与していることが報告されている²⁶⁾、³⁹⁾。そこで、VPS13B ノックアウト細胞における細胞膜上の JAM1 の局在を共焦点顕微鏡にて調べると、野生株と比較して明らかな変化を認めなかった (図 5)。これらの結果より、CXADR と JAM1 のタンパク構造の違いが、VPS13B ノックアウト細胞における両タンパクの局在への影響の違いに関与していることが示唆された。

3. VPS13B が CXADR の細胞内輸送に及ぼす影響

VPS13B ノックアウト細胞において、CXADR の細胞膜における局在量の減少が CXADR 遺伝子発現の減少に依るものか、ウェスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法により確認した。その結果、野生株と比較して VPS13B ノックアウト細胞において CXADR のタンパク量の減少を認めたが (図 6a)、CXADR の mRNA 発現量の減少は認めなかった (図 6b)。これらの結果より、VPS13B ノックアウト細胞における CXADR の細胞膜における局在の減少は、CXADR の遺伝子発現の低下に依るものではないことが示唆された。

次に、VPS13B のノックアウトが CXADR の過剰な分解を引き起こしている可能性を検討した。リソソームは 60 種類以上の加水分解酵素を有する酸性の細胞

小器官であり、エンドサイトーシス経路やオートファジーにより細胞内外から取り込まれた生体分子を分解する場として知られている^{40), 41), 42)}。そこで、IHGE細胞をリソソームのタンパク質分解機能を阻害する bafilomycin A1 で処理し⁴³⁾、*VPS13B* ノックアウト細胞における CXADR と lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1, リソソームマーカー) の細胞内局在を共焦点顕微鏡にて確認した。その結果、野生株の bafilomycin A1 非添加群と比較し、添加群においてリソソームの肥大化を認め、これは先行研究の結果と一致していた⁴³⁾。そこで、*VPS13B* ノックアウト細胞を本剤で処理した結果、野生株と同様に、CXADR と LAMP1 との共局在、および細胞膜上の CXADR の局在の回復を認めた (図 7, 図 8)。これらの結果から、*VPS13B* のノックアウトによる CXADR の局在の減少は、CXADR タンパクのリソソームでの過剰な分解に依ることが示唆された。次に、*VPS13B* のノックアウトによる CXADR タンパクの減少におけるオートファジーへの関与を調べるため、オートファゴソームとリソソームの融合を阻害するオートファジー阻害剤 (EACC) を IHGE 細胞に添加し、*VPS13B* ノックアウト細胞における CXADR の細胞膜における局在を共焦点顕微鏡にて確認した。その結果、野生株と比較して *VPS13B* ノックアウト細胞において細胞膜上の CXADR の局在の回復を認めなかった (図 9)。さらに、*VPS13B* のノックアウトによる CXADR タンパクの減少におけるエンドサイトーシス経路の関与を調べるため、細胞膜におけるエンドサイトーシスを阻害し、細胞内へのタンパク質の取り込みを抑制する薬剤である M β CD (カベオラエンドサイトーシス経路阻害剤)、dynasore (クラスリン依存性エンドサイトーシス経路阻害剤) または latrunculin A (アクチン依存性エンドサイトーシス阻害剤) を IHGE 細胞にそれぞれ添加し^{44), 45), 46)}、*VPS13B* ノックアウト細胞における CXADR の細胞膜における局在を共焦点顕微鏡にて確認したところ、野生株と比較して、いずれも

VPS13B ノックアウト細胞において細胞膜上の CXADR の局在の回復を認めなかった (図 10). これらの結果から, *VPS13B* のノックアウトによる CXADR のリソソームへの局在に, オートファジーおよびエンドサイトーシス以外の経路が関与していることが示唆された.

4. *VPS13B* ノックアウトに影響される CXADR タンパクの責任領域の解析

VPS13B は, 細胞内輸送の過程で小胞と標的膜との膜融合を促進する soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) タンパク質⁴⁷⁾に結合すると報告されている⁴⁸⁾. SNARE タンパクが有する SNARE モチーフはエンドソームまたは細胞膜等の脂質二重膜の細胞質側に局在すること, および *VPS13B* のノックアウトにより JAM1 の細胞内局在に顕著な変化が認められないこと (図 5) から, *VPS13B* はタイトジャンクション関連タンパクの膜貫通領域以降の細胞質内に位置する C 末端領域を認識し, 細胞内輸送に関与している可能性があると考えた. CXADR は 582 のアミノ酸からなるタンパク質であり, 238-258 番目のアミノ酸領域に膜貫通領域を有する^{49), 50)}. 一方, JAM1 は 299 のアミノ酸からなるタンパク質であり, 239-259 番目のアミノ酸領域に膜貫通領域を有する⁵¹⁾. そこで, CXADR のどの領域が *VPS13B* ノックアウトによる影響に関与しているのかを調べるため, CXADR の 238-365 番目のアミノ酸領域を JAM1 の 237-299 番目のアミノ酸領域に置換したものに HA タグを標識した CXADR のキメラタンパク (CXADR-JAM1^{c-term}, 図 11a) および JAM1 の C 末端を CXADR の C 末端に置き換えたものに HA タグ (137-138 番目のアミノ酸領域内) を挿入した JAM1 キメラタンパク (JAM1-CXADR^{c-term}, 図 12a) をコードするベクターを作製し, IHGE 細胞に形質導入して HA タグで標識した CXADR の細胞内局在を共焦点顕微鏡により確認した. *VPS13B* ノックアウト細胞における

細胞膜上の CXADR の局在は HA タグで標識した野生型では減少し (図 11b), CXADR-JAM1^{c-term} では減少しなかった. 一方で, JAM1 の細胞膜における局在は HA タグで標識した野生型では顕著な減少は見られず, JAM1-CXADR^{c-term} では減少していた (図 12b). これらの結果から, CXADR の膜貫通領域を含む C 末端領域が, VPS13B に依る CXADR の細胞内輸送に関与することが示唆された.

5. VPS13B の結合因子が CXADR の細胞内輸送に及ぼす影響

VPS13B は RAB6A, FAM177A1, SEC23IP または STX13 と結合することが報告されている^{31), 52), 53), 3)}. しかし, VPS13B の局在や機能については不明な点が多い. そこで, CXADR の細胞内輸送に関与する VPS13B の結合因子について, CXADR に及ぼす影響を検討した. *RAB6A*, *FAM177A1*, *SEC23IP* または *STX13* に対する shRNA (shRAB6A #263, shRAB6A #549, shFAM177A1 #186, shSEC23IP #880, shSEC23IP #2491, shSTX13 #526, shSTX13 #587) を IHGE 細胞に形質導入し, CXADR の細胞内局在を共焦点顕微鏡により確認した. 各ノックダウンの奏功は, リアルタイム PCR 法にて確認した (図 13a, b, c, d). その結果, shLuc と比較し, *RAB6A* をノックダウンした細胞において細胞膜上の CXADR の減少を認めた一方, *FAM177A1*, *SEC23IP* および *STX13* のノックダウンでは, CXADR の細胞膜における局在およびタンパク量の減少は認めなかった (図 13e, 14). これらの結果から, VPS13B-RAB6A 経路が CXADR の細胞内輸送に関与することが示唆された.

6. CXADR を介した VPS13B の歯肉上皮バリア機能への影響

VPS13B をノックアウトした歯肉上皮細胞層のバリア機能に, CXADR の局在異常が及ぼす影響を調べるため, HA タグで標識した CXADR-JAM1^{c-term} を過剰

に発現させた *VPS13B* ノックアウト細胞を作製した (図 15a, 16). *VPS13B* ノックアウト細胞における CXADR-JAM1^{c-term} の細胞膜上の蛍光シグナルは, 野生株の CXADR とおおよそ同程度検出されることを確認した (図 15b). これらの細胞をセルカルチャーインサート上で, 透過性を評価するトレーサーとして FITC で標識された 40 kDa デキストラン, *P. gingivalis* LPS および *S. aureus* PGN を添加した培地で培養し, 30 分後に上皮細胞層を透過したトレーサー量を測定した (図 15a). その結果, 野生株と比較して *VPS13B* をノックアウトした歯肉上皮細胞は, 40 kDa デキストラン (図 15c), *P. gingivalis* LPS (図 15d) および *S. aureus*-PGN (図 15e) の透過性がそれぞれ 12.0 倍, 8.9 倍および 1.5 倍と有意に亢進したのに対し, CXADR を過剰発現させた *VPS13B* ノックアウト細胞は, この透過性の亢進をそれぞれ 0.9 倍, 0.3 倍および 1.1 倍にまで抑制した. 次に, *VPS13B* をノックアウトした三次元歯肉上皮モデルを用いて, 上皮組織における LPS および PGN の透過性評価を行った (図 17a). *VPS13B* ノックアウト歯肉上皮モデルにおける CXADR-JAM1^{c-term} の細胞表面のシグナルは, 野生株の CXADR とおおよそ同程度検出されることを確認した (図 17b). 野生株と比較し LPS (図 17c) および PGN (図 17d) の透過性がそれぞれ 2.5 倍および 1.5 倍亢進した. 一方, CXADR を過剰発現させた *VPS13B* ノックアウト歯肉上皮モデルは, この透過性の亢進をそれぞれ 1.2 倍および 0.9 倍にまで抑制した. これらの結果から, *VPS13B* は CXADR の細胞膜への輸送を介し, 歯肉上皮組織における LPS および PGN の透過性に関与していることが示唆された.

加えて, *RAB6A* をノックダウンした三次元歯肉上皮モデルを用い, 歯肉上皮組織における 40 kDa デキストランの透過性評価を行った. 野生株の組織と比較し, 40 kDa デキストランの透過性が 54.4 倍亢進した (図 18). この結果から, *VPS13B* と同様に, *RAB6A* は歯肉上皮組織のバリア機能に関与していることが

示唆された.

考 察

本研究により, Cohen 症候群の責任遺伝子である *VPS13B* のノックアウトにより, 歯肉上皮組織への歯周病原因子の透過性が亢進することが示唆された. 過去の臨床研究において, Cohen 症候群患者群と健常者群の歯周病原細菌叢を比較したところ, *P. gingivalis* や *Tannerella forsythia* をはじめとする歯周病菌が高頻度に検出されたことが報告されている¹⁰⁾. このことから, このことから, LPS や PGN 等の細菌毒素だけではなく, 歯周病菌に対する歯肉上皮組織のバリア機能にも, *VPS13B* がタイトジャンクション関連タンパクを介して関与している可能性がある.

VPS13B のノックアウトにより, シスゴルジマーカーである GM130 陽性のゴルジ体区画の断片化が観察された (図 2e). GM130 はゴルジ体囊表面に位置し, 小胞同士あるいは小胞とゴルジ体囊を融合させる役割をもつ⁵⁴⁾. ゴルジ体は, 小胞体に面するシス側から小胞が集合して囊を形成することにより成熟するが, 細胞分裂時には, GM130 がリン酸化されて小胞同士の融合が阻害されることにより, ゴルジ体の囊が分散されることが報告されている⁵⁵⁾. *VPS13B* のノックアウトは GM130 のリン酸化を介し, ゴルジ体の断片化を引き起こしている可能性がある.

本研究において, HGF で *VPS13B* の発現を認めた (図 1d). HGF は, 歯肉上皮細胞とともに歯周組織を構築する足場となる⁵⁶⁾. 本細胞は, コラーゲン, フィブロネクチン, ラミニンといった細胞外マトリクス成分を産生および分泌し, 細胞の機能制御や細胞間接着の維持に関連する. また, Cohen 症候群患者の皮膚から採取した線維芽細胞において, ゴルジ体の断片化が報告されている¹⁷⁾. これらのことから, HGF においても, *VPS13B* が特定の細胞間接着分子の輸送機構

を制御している可能性が考えられる．歯肉線維芽細胞における *VPS13B* の役割は未だ明らかにされておらず，検討すべき課題である．

CXADR および *JAM1* は，小胞体でシグナルペプチドが切断されると，Ig ドメインと膜貫通領域を有する成熟型となり，細胞膜へ輸送される．本研究において，*VPS13B* のノックアウトによって選択的に *CXADR* の細胞膜上の局在が減少した（図 2f, 5）．また，*VPS13B* は *CXADR* と細胞内において共局在を認めたことから（図 2b），*VPS13B* は *CXADR* と複合体を形成する可能性がある．*CXADR-JAM1^{c-term}* では，*VPS13B* のノックアウトによる細胞膜への局在の変化を認めなかった（図 11b）．一方，*JAM1-CXADR^{c-term}* では，*VPS13B* のノックアウトによる細胞膜への局在の減少を認めた（図 12b）．よって，*VPS13B* は *CXADR* の膜貫通領域以降の C 末端領域を標的とし，その細胞膜への輸送に関与していることが示唆される．*CXADR* は C 末端側の 5 残基に PDZ ドメインクラス 1 結合モチーフを有する一方，*JAM1* は PDZ ドメインクラス 2 結合モチーフをもつ^{57), 58)}．²¹⁾ *VPS13B* は *CXADR* の PDZ ドメインに選択的に認識し，本タンパクの細胞内輸送に関与している可能性がある．

VPS13B ノックアウト細胞を bafilomycin A1 で処理すると，*CXADR* のリソソームへの高頻度の局在を認めた（図 7, 8）．さらに，EACC, MβCD, dynasore および latrunculin A で処理した *VPS13B* ノックアウト細胞では，細胞膜における *CXADR* の局在量は回復しなかった（図 9, 10）．エンドサイトーシス経路は被覆小胞を介し，細胞膜タンパクなどを細胞内に取り込む機構であり，その経路はカベオラエンドサイトーシス，脂質ラフトエンドサイトーシス，クラスリンエンドサイトーシス，マクロピノサイトーシスなどに分類される．一般的に，本経路により取り込まれたタンパクは，小胞融合により初期エンドソームに輸送された後，後期エンドソームを経て最終的にリソソームで分解される．本経路はゴルジ

体からの小胞輸送経路と交叉することが知られている¹⁸⁾。エンドサイトーシス阻害薬である M β CD, dynasore および latrunculin A はいずれも細胞膜における被覆小胞の形成を抑制し、細胞内へのタンパクの取り込みを阻害する^{41), 42), 43)}。したがって、本研究結果より *VPS13B* のノックアウト細胞における細胞膜上の CXADR の減少が、エンドサイトーシス経路の亢進に起因するものである可能性は低い。一方、オートファジー経路は、オートファゴソームと呼ばれる膜小胞の形成を特徴とする分解機構である。オートファジーが誘導されると隔離膜と呼ばれる膜構造が細胞内に形成される。隔離膜はその後伸張することにより開口部が閉じられ、二重膜小胞のオートファゴソームが形成される、オートファゴソームが完成すると、細胞内のオルガネラや小胞同士を融合させるのに必要な SNARE 分子群の 1 つである syntaxin 17 (STX17) と呼ばれるタンパクがオートファゴソームの外膜上にリクルートされる⁵⁹⁾。これがリソソームと結合し、オートリソソームと呼ばれる小胞となると、オートファゴソームの内膜および内容物がリソソーム内の加水分解酵素によって分解される。リソソーム膜にある液胞型プロトンポンプ (V-ATPase) は ATP を分解して水素イオンをリソソーム内に輸送することにより、リソソームの分解酵素の活性化に必要な酸性環境を維持する役割を担う。本研究で使用した bafilomycin A1 は、リソソーム中の ATPase 活性を阻害し、リソソーム内の酸性環境を中性付近に変化させることにより、その機能を抑制する^{60), 43)}。EACC は STX17 のオートファゴソームへのリクルートを阻害することにより、オートファゴソームとリソソームの融合過程を抑制し、リソソームの内部環境に影響を及ぼさないことから⁶¹⁾、オートファジー経路に選択的に作用することが報告されている。以上のことから、*VPS13B* ノックアウトによる CXADR のリソソームでの過剰な分解に、オートファジー経路やエンドサイトーシス経路ではなく、エキソサイトーシスの障害が関与し

ていることが推察される。

VPS13B は C 末端に pleckstrin-homology (PH) ドメインと呼ばれる構造を持つ。PH ドメインはリン脂質のリン酸基に結合するとされ⁶²⁾、本タンパクのゴルジ体へのターゲティングに重要であることが明らかになっている⁴⁹⁾。先行研究において、Cohen 症候群の患者のエクソーム解析により、*VPS13B* 遺伝子の C 末端領域のナンセンス変異；c.9844 A>T : p.K3282X (エクソン 54) を認めた症例が報告されている⁶³⁾。VPS13B の PH ドメインを含む C 末端構造は、3543 アミノ酸領域以降に存在していることが報告されていることから³⁴⁾、この変異では PH ドメインを欠失している可能性がある。加えて、RAB6A が VPS13B の C 末端領域に結合することが報告されている⁶⁴⁾。これらのことから、VPS13B の C 末端構造の異常が Cohen 症候群の病態に関与していることが考えられる。本研究において、*VPS13B* のノックダウン・ノックアウトと *RAB6A* のノックダウンが、細胞膜に存在する CXADR の減少という同じ表現型を示したことから、両タンパクは協調して CXADR の細胞内輸送に関与していることが示唆される。

FAM177A1 のノックダウンにより CXADR の発現量の有意な減少を認めなかった (図 13e, 14)。FAM177A1 はゴルジ複合体に局在するタンパクであり、本タンパクの機能喪失が、巨頭症や発達遅延を伴う神経発達障害を引き起こすことが報告されている^{65), 66)}。この障害は Cohen 症候群の合併症に類似していることから、VPS13B と FAM177A1 は互いに協調して機能を発揮する可能性がある。一方、本研究では *FAM177A1* のノックダウンでは CXADR のタンパク量に減少が認められなかったことから、CXADR の細胞内輸送においては VPS13B の機能に FAM177A1 が必須ではない可能性がある。

遺伝性疾患に伴う歯周炎の進行には、好中球の機能異常との関連が指摘されてきた^{7), 8), 9), 10)}。一方、Cohen 症候群患者は必ずしも好中球減少症を併発しな

いことが明らかになっている⁶⁷⁾。一般的に、Cohen 症候群における好中球減少症に対する治療には、顆粒球コロニー形成刺激因子が用いられているが、感染症の進行に対しては完全には奏効しないという報告がある⁶⁸⁾。これらのことは、Cohen 症候群に随伴する歯周病の病因に、好中球とは異なる要因が関与している可能性が高い。加えて、*P. gingivalis* をはじめとする歯周病原細菌が歯肉に侵入する過程において最初に接するところは歯肉内縁上皮であることから、そのバリア機能は歯周病菌および細菌由来物質の侵入への防御に重要と考えられる。

Cohen 症候群は発達遅延を伴う先天性疾患であることが知られている²⁾。一方で、CXADR は中枢神経組織に発現していることが、ヒト組織の免疫化学染色により明らかになっており⁶⁹⁾、CXADR 遺伝子が脳組織で発現していることが報告されている⁷⁰⁾。また、アルツハイマー型認知症患者の海馬では神経細胞のシナプスが破壊されるが、CXADR の発現が健常人と比較し低下していることが明らかになっている⁷¹⁾。さらに、VPS13B と相互作用するとされる RAB6A のノックダウン細胞では、細胞膜上において CXADR の発現量の有意な減少を認めた (図 13e, 14)。RAB6A はゴルジ体に局在し、微小管のモータータンパクである dynein-dynactin 複合体をリクルートし、小胞輸送の制御を担うタンパクとして知られている⁷²⁾。RAB6A はヒト大脳皮質の神経細胞において高頻度に発現していることが報告されている⁷³⁾。以上のことから、Cohen 症候群の脳組織においては、VPS13B-RAB6A の相互作用を介した CXADR の輸送障害による CXADR の機能不全により神経突起の成熟が妨げられ、Cohen 症候群の発達障害が引き起こされている可能性がある。

Cohen 症候群患者はゴルジ体の機能不全によるグリコシル化の欠陥を伴うことが報告されており⁷⁴⁾、体幹肥満といった身体的特徴を有する。先行研究では、Cohen 症候群患者が 2 型糖尿病を発症する症例が報告されている⁷⁵⁾。2 型糖尿病

は、膵臓の β 細胞表面に存在するグルコーストランスポーターによる血糖の認識機構が障害されることにより、インスリン分泌機能が低下することが知られている。さらに、糖鎖合成酵素である N-Acetylglucosaminyltransferase IVa (GnT-IVa) が持つ特異的なレクチンドメインと呼ばれる構造は、グルコーストランスポーターに対する特有の多分岐型の糖鎖修飾の活性化に関与する。しかしながら、その特有の糖鎖が付加されない場合、 β 細胞による血糖の認識機能が損なわれることが報告されている⁷⁶⁾。CXADR は膵臓において高頻度に発現し、 β 細胞においても発現していることが確認されている^{70), 77)}。膵臓における CXADR の機能については未だ不明な点が多く、GnT-IVa との関連とともに検討する必要があると考える。

本研究は、Cohen 症候群の責任遺伝子が歯肉上皮組織のバリア機能に関与していることを示す初めての報告である。Cohen 症候群は 2021 年度に「小児慢性特定疾患医療費助成制度」の対象となった。一方、本患者の口腔ケアは、未だ行き渡っていないとは言えない。本研究結果を通して、患者が健常者と比較して宿主因子の観点から歯周病の進行リスクが高いことを認識し、全ての小児が幼少期より適切な口腔ケアを受けられるように、歯科医院で支援環境を構築することが望まれる。歯周病のリスクが他人と比較して高い小児を早期に発見することが出来れば、隠れた遺伝性疾患の早期診断につながる可能性がある。本研究が Cohen 症候群に伴う歯周病の病因論の理解に繋がれば幸いである。

結 語

Cohen 症候群の責任遺伝子 *VPS13B* の機能欠失は歯肉上皮細胞の細胞間接着分子の一つである CXADR の細胞膜への輸送機構を選択的に障害し、分解経路であるリソソームへ局在を変化させた。このことは *VPS13B* の欠失が CXADR の過分解を引き起こし、歯肉上皮組織における歯周病原因子に対する透過性を亢進させる可能性を示している。

本研究により、Cohen 症候群の歯周病発症の分子機構に歯肉上皮のバリア機能が関連していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えていただくとともに，終始にわたり懇篤なるご指導とご教授を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔感染制御学系部門予防歯科学講座 久保庭雅恵教授ならびに天野敦雄特任教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究を遂行するにあたり，直接のご指導とご鞭撻を賜りました同歯学部附属病院予防歯科 竹内洋輝講師に深謝いたします．最後に，本研究に際して幅広いご援助とご協力をいただきました予防歯科学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます．

参考文献

- 1) Lamont RJ, Miller DP & Bagaitkar J. (2023) Illuminating the oral microbiome: cellular microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* **47**(4):fuad045. doi: 10.1093/femsre/fuad045
- 2) Groeger SE & Meyle J. (2015) Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol 2000.* **69**(1):46-67. doi: 10.1111/prd.12094
- 3) Naser AN, Lu Q & Chen YH. (2023) Trans-Compartmental Regulation of Tight Junction Barrier Function. *Tissue Barriers.* **11**(4):2133880. doi: 10.1080/21688370.2022.2133880
- 4) Tsukita S, Furuse M & Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**(4):285-293. doi: 10.1038/35067088
- 5) Boivin FJ & Schmidt-Ott KM. (2017) Transcriptional mechanisms coordinating tight junction assembly during epithelial differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* **1397**(1):80-99. doi: 10.1111/nyas.13367
- 6) Takeuchi H, Yamaga S, Sasaki N, Kuboniwa M, Matsusaki M & Amano A. (2021) *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of coxsackievirus and adenovirus receptor. *Cell Microbiol.* **23**(11):e13388. doi: 10.1111/cmi.13388
- 7) Kajikawa T, Wang B, Li X, Wang H, Chavakis T, Moutsopoulos NM & Hajishengallis G. (2020) Frontline Science: Activation of metabolic nuclear receptors restores periodontal tissue homeostasis in mice with leukocyte adhesion deficiency-1. *J Leukoc Biol.* **108**(5):1501-1514. doi: 10.1002/JLB.5HI0420-648R
- 8) Hajishengallis G. (2014) Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* **35**(1):3-11. doi:

10.1016/j.it.2013.09.001

- 9) Silva LM, Brenchley L & Moutsopoulos NM. (2019) Primary immunodeficiencies reveal the essential role of tissue neutrophils in periodontitis. *Immunol Rev.* **287**(1):226-235. doi: 10.1111/imr.12724
- 10) Alaluusua S, Kivitie-Kallio S, Wolf J, Haavio ML, Asikainen S & Pirinen S. (1997) Periodontal findings in Cohen syndrome with chronic neutropenia. *J Periodontol.* **68**(5):473-478. doi: 10.1902/jop.1997.68.5.473
- 11) Cohen MM, Hall BD, Smith DW, Graham CB & Lampert KJ. (1973) A new syndromewith hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. *J Pediatr.* **83**(2):280-284. doi: 10.1016/s0022-3476(73)80493-7
- 12) Wang H, Falk MJ, Wensel C & Traboulsi EI. Cohen Syndrome. (Eds.). (2006) *GeneReviews®* [Internet]. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1482/>
- 13) NORD. Cohen Syndrome. <https://rarediseases.org/rare-diseases/cohen-syndrome/>. (2024 年 12 月参照)
- 14) Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, Demirel K, de Sanctis M, Ercoli C, Fan J, Geurs NC, Hughes FJ, Jin L, Kantarci A, Lalla E, Madianos PN, Matthews D, McGuire MK, Mills MP, Preshaw PM, Reynolds MA, Sculean A, Susin C, West NX & Yamazaki K. (2018) Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* **89**(Suppl 1):S237-S248. doi: 10.1002/JPER.17-0733
- 15) Lafon A, Faivre L, Seux D, Gautier E, Duplomb L, Grogogeat B, Marcelet A &

- Laforest L. (2021) Periodontal disorders in a cohort of patients with Cohen syndrome. *Spec Care Dentist*. **41**(1):118-124. doi: 10.1111/scd.12544
- 16) Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Träskelin AL, Perveen R, Kivitie-Kallio S, Norio R, Warburg M, Fryns JP, de la Chapelle A & Lehesjoki AE. (2003) Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am J Hum Genet*. **72**(6):1359-1369. doi: 10.1086/375454
 - 17) Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, Horn D, Haucke V & Hennies HC. (2011) Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J Biol Chem*. **286**(43):37665-37675. doi: 10.1074/jbc.M111.267971
 - 18) 中野明彦 「細胞内輸送の交通整理のメカニズム—2013 年ノーベル生理学・医学賞受賞に寄せて—」, 実教出版, 2014, p.6-8
 - 19) van't Hof W & Crystal RG. (2002) Fatty acid modification of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Virol*. **76**(12):6382-6386. doi: 10.1128/jvi.76.12.6382-6386
 - 20) Ranganathan R & Ross EM. (1997) PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes. *Curr Biol*. **7**(12):R770-773. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00401-5
 - 21) Excoffon KJ, Hruska-Hageman A, Klotz M, Traver GL & Zabner J. (2004) A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J Cell Sci*. **117**(Pt 19):4401-4409. doi: 10.1242/jcs.01300
 - 22) Mandell KJ & Parkos CA. (2005) The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. **57**(6):857-867. doi: 10.1016/j.addr.2005.01.005

- 23) Waters MG & Pfeffer SR. (1999) Membrane tethering in intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol.* **11**(4):453-459. doi: 10.1016/s0955-0674(99)80065-9
- 24) Murakami S, Yoshimura N, Koide H, Watanabe J, Takedachi M, Terakura M, Yanagita M, Hashikawa T, Saho T & Okada H. (2002) Activation of adenosine-receptor-enhanced iNOS mRNA expression by gingival epithelial cells. *J Dent Res.* **81**(4):236-240. doi: 10.1177/154405910208100403
- 25) Murakami J, Kato T, Kawai S, Akiyama S, Amano A & Morisaki I. (2008) Cellular motility of Down syndrome gingival fibroblasts is susceptible to impairment by *Porphyromonas gingivalis* invasion. *J Periodontol.* **79**(4):721-727. doi: 10.1902/jop.2008.070400
- 26) Takeuchi H, Sasaki N, Yamaga S, Kuboniwa M, Matsusaki M & Amano A. (2019) *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1. *PLoS Pathog.* **15**(11):e1008124. doi: 10.1371/journal.ppat.1008124
- 27) Nishiguchi A, Yoshida H, Matsusaki M & Akashi M. (2011) Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube networks by the cell-accumulation technique. *Adv Mater.* **23**(31):3506-3510. doi: 10.1002/adma.201101787
- 28) Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T, Akira S, Noda T & Yoshimori T. (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol.* **11**(4):385-396. doi: 10.1038/ncb1846
- 29) Takeuchi H & Amano A. (2021) Invasion of Gingival Epithelial Cells by

- Porphyromonas gingivalis. *Methods Mol Biol.* **2210**:215-224. doi: 10.1007/978-1-0716-0939-2_21
- 30) Ishii K, Hamamoto H, Imamura K, Adachi T, Shoji M, Nakayama K & Sekimizu K. (2010) Porphyromonas gingivalis peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J Biol Chem.* **285**(43):33338-33347. doi: 10.1074/jbc.M110.112987
- 31) Manders EMM, Verbeek FJ & Aten JA. (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *J Microsc.* **169**(3):375-382. doi: 10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x
- 32) Wortzel I, Koifman G, Rotter V, Seger R & Porat Z. (2017) High Throughput Analysis of Golgi Structure by Imaging Flow Cytometry. *Sci Rep.* **7**(1):788. doi: 10.1038/s41598-017-00909-y
- 33) Seifert W, Kühnisch J, Maritzen T, Lommatzsch S, Hennies HC, Bachmann S, Horn D & Haucke V. (2015) Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J Biol Chem.* **290**(6):3349-3358. doi: 10.1074/jbc.M114.608174
- 34) Zorn M, Kühnisch J, Bachmann S & Seifert W. (2022) Disease relevance of rare VPS13B missense variants for neurodevelopmental Cohen syndrome. *Sci Rep.* **12**(1):9686. doi: 10.1038/s41598-022-13717-w
- 35) 成石浩司 「線維芽細胞を中心とした歯周病・歯肉増殖症の病態形成に関する基礎的研究」, 日本歯周病学会会誌, 2009, p.7-18
- 36) Moulin V, Castilloux G, Jean A, Garrel DR, Auger FA & Germain L. (1996) In vitro models to study wound healing fibroblasts. *Burns.* **22**(5):359-362. doi:

10.1016/0305-4179(95)00167-0

- 37) Chaussain Miller C, Septier D, Bonnefoix M, Lecolle S, Lebreton-Decoster C, Coulomb B, Pellat B & Godeau G. (2002) Human dermal and gingival fibroblasts in a three-dimensional culture: a comparative study on matrix remodeling. *Clin Oral Investig.* **6**(1):39-50. doi: 10.1007/s00784-001-0143-2
- 38) Kivitie-Kallio S, Rajantie J, Juvonen E & Norio R. (1997) Granulocytopenia in Cohen syndrome. *Br J Haematol.* **98**(2):308-311. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.2323049.x
- 39) Takeuchi H, Nakamura E, Yamaga S & Amano A. (2022) *Porphyromonas gingivalis* Infection Induces Lipopolysaccharide and Peptidoglycan Penetration Through Gingival Epithelium. *Front Oral Health.* **3**:845002. doi: 10.3389/froh.2022.845002
- 40) De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R & Appelmans F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* **60**(4):604-617. doi: 10.1042/bj0600604
- 41) Dunn WA Jr. (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* **4**(4):139-143. doi: 10.1016/0962-8924(94)90069-8
- 42) Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, Puri C, Pignata A, Martina JA, Sardiello M, Palmieri M, Polishchuk R, Puertollano R & Ballabio A. (2011) Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell.* **21**(3):421-430. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.016
- 43) Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M & Tashiro Y. (1991) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and

- protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem.* **266**(26):17707-17712
- 44) Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B & Sandvig K. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell.* **10**(4):961-974. doi: 10.1091/mbc.10.4.961
 - 45) Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C & Kirchhausen T. (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell.* **10**(6):839-850. doi: 10.1016/j.devcel.2006.04.002
 - 46) Yarar D, Waterman-Storer CM & Schmid SL. (2005) A dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* **16**(2):964-975. doi: 10.1091/mbc.e04-09-0774
 - 47) Koike S & Jahn R. (2019) SNAREs define targeting specificity of trafficking vesicles by combinatorial interaction with tethering factors. *Nat Commun.* **10**(1):1608. doi: 10.1038/s41467-019-09617-9
 - 48) Jahn R & Scheller RH. (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**(9):631-643. doi: 10.1038/nrm2002
 - 49) Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL & Finberg RW. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* **275**(5304):1320-1323. doi: 10.1126/science.275.5304.1320
 - 50) Tomko RP, Xu R & Philipson L. (1997) HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(7):3352-3356. doi: 10.1073/pnas.94.7.3352

- 51) Naik UP, Naik MU, Eckfeld K, Martin-DeLeon P & Spsychala J. (2001) Characterization and chromosomal localization of JAM-1, a platelet receptor for a stimulatory monoclonal antibody. *J Cell Sci.* **114**(Pt 3):539-547. doi: 10.1242/jcs.114.3.539
- 52) Du Y, Fan X, Song C, Chang W, Xiong J, Deng L & Ji WK. (2024) Sec23IP recruits VPS13B/COH1 to ER exit site-Golgi interface for tubular ERGIC formation. *J Cell Biol.* **223**(12):e202402083. doi: 10.1083/jcb.202402083
- 53) Ugur B, Schueder F, Shin J, Hanna MG, Wu Y, Leonzino M, Su M, McAdow AR, Wilson C, Postlethwait J, Solnica-Krezel L, Bewersdorf J & De Camilli P. (2024) VPS13B is localized at the interface between Golgi cisternae and is a functional partner of FAM177A1. *J Cell Biol.* **223**(12):e202311189. doi: 10.1083/jcb.202311189
- 54) Sönnichsen B, Lowe M, Levine T, Jämsä E, Dirac-Svejstrup B & Warren G. (1998) A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol.* **140**(5):1013-1021. doi: 10.1083/jcb.140.5.1013
- 55) Nakamura N, Lowe M, Levine TP, Rabouille C & Warren G. (1997) The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell.* **89**(3):445-455. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80225-1
- 56) Kinane DF. (2000) Regulators of tissue destruction and homeostasis as diagnostic aids in periodontology. *Periodontol 2000.* **24**:215-225. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2240110.x
- 57) Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Anderson JM & Cantley LC. (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science.* **275**(5296):73-77. doi: 10.1126/science.275.5296.73

- 58) Ebnet K, Schulz CU, Meyer Zu Brickwedde MK, Pendl GG & Vestweber D. (2000) Junctional adhesion molecule interacts with the PDZ domain-containing proteins AF-6 and ZO-1. *J Biol Chem.* **275**(36):27979-27988. doi: 10.1074/jbc.M002363200
- 59) Itakura E & Mizushima N. (2013) Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE. *Autophagy.* **9**(6):917-919. doi: 10.4161/auto.24109
- 60) Bowman EJ, Siebers A & Altendorf K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**(21):7972-7976. doi: 10.1073/pnas.85.21.7972
- 61) Vats S & Manjithaya R. (2019) A reversible autophagy inhibitor blocks autophagosome-lysosome fusion by preventing Stx17 loading onto autophagosomes. *Mol Biol Cell.* **30**(17):2283-2295. doi: 10.1091/mbc.E18-08-0482
- 62) Bean BDM, Dziurdzik SK, Kolehmainen KL, Fowler CMS, Kwong WK, Grad LI, Davey M, Schluter & Conibear E. (2018) Competitive organelle-specific adaptors recruit Vps13 to membrane contact sites. *J Cell Biol.* **217**(10):3593-3607. doi: 10.1083/jcb.201804111
- 63) Zhao S, Luo Z, Xiao Z, Li L, Zhao R, Yang Y, Zhong Y. Case report: two novel VPS13B mutations in a Chinese family with Cohen syndrome and hyperlinear palms. *BMC Med Genet.* 2019 Nov 21;20(1):187. doi: 10.1186/s12881-019-0920-x
- 64) Dziurdzik SK, Conibear E. The Vps13 Family of Lipid Transporters and Its Role at Membrane Contact Sites. *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 12;22(6):2905. doi: 10.3390/ijms22062905

- 65) Alazami AM, Patel N, Shamseldin HE, Anazi S, Al-Dosari MS, Alzahrani F, Hijazi H, Alshammari M, Aldahmesh MA, Salih MA, Fageih E, Alhashem A, Bashiri FA, Al-Owain M, Kentab AY, Sogaty S, Al Tala S, Temsah MH, Tulbah M, Aljelaify RF, Alshahwan SA, Seidahmed MZ, Alhadid AA, Aldhalaan H, AlQallaf F, Kurdi W, Alfadhel M, Babay Z, Alsogheer M, Kaya N, Al-Hassnan ZN, Abdel-Salam GM, Al-Sannaa N, Al Mutairi F, El Khashab HY, Bohlega S, Jia X, Nguyen HC, Hammami R, Adly N, Mohamed JY, Abdulwahab F, Ibrahim N, Naim EA, Al-Younes B, Meyer BF, Hashem M, Shaheen R, Xiong Y, Abouelhoda M, Aldeeri AA, Monies DM & Alkuraya FS. (2015) Accelerating novel candidate gene discovery in neurogenetic disorders via whole-exome sequencing of prescreened multiplex consanguineous families. *Cell Rep.* **10**(2):148-161. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.015
- 66) Kohler JN, Legro NR, Baldridge D, Shin J, Bowman A, Ugur B, Jackstadt MM, Shriver LP, Patti GJ, Zhang B, Feng W, McAdow AR, Goddard P, Ungar RA, Jensen T, Smith KS, Fresard L, Alvarez R, Bonner D, Reuter CM, McCormack C, Kravets E, Marwaha S, Holt JM; Undiagnosed Diseases Network; Worthey EA, Ashley EA, Montgomery SB, Fisher PG, Postlethwait J, De Camilli P, Solnica-Krezel L, Bernstein JA & Wheeler MT. (2024) Loss of function of FAM177A1, a Golgi complex localized protein, causes a novel neurodevelopmental disorder. *Genet Med.* **26**(9):101166. doi: 10.1016/j.gim.2024.101166
- 67) Hennies HC, Rauch A, Seifert W, Schumi C, Moser E, Al-Taji E, Tariverdian G, Chrzanowska KH, Krajewska-Walasek M, Rajab A, Giugliani R, Neumann TE, Eckl KM, Karbasiyan M, Reis A & Horn D. (2004) Allelic heterogeneity in the COH1 gene explains clinical variability in Cohen syndrome. *Am J Hum Genet.*

- 75(1):138-145. doi: 10.1086/422219
- 68) Martin KR, Wong HL, Witko-Sarsat V & Wicks IP. (2021) G-CSF - A double edge sword in neutrophil mediated immunity. *Semin Immunol.* **54**:101516. doi: 10.1016/j.smim.2021.101516
- 69) Persson A, Fan X, Salford LG, Widegren B & Englund E. (2007) Neuroblastomas and medulloblastomas exhibit more Cocksackie adenovirus receptor expression than gliomas and other brain tumors. *Neuropathology.* **27**(3):233-236. doi: 10.1111/j.1440-1789.2007.00767.x
- 70) Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J & Poller W. (1999) Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther.* **6**(9):1520-1535. doi: 10.1038/sj.gt.3301030
- 71) Zussy C, Loustalot F, Junyent F, Gardoni F, Bories C, Valero J, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J & Kremer EJ. (2016) Cocksackievirus Adenovirus Receptor Loss Impairs Adult Neurogenesis, Synapse Content, and Hippocampus Plasticity. *J Neurosci.* **36**(37):9558-9571. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0132-16.2016
- 72) Short B, Preisinger C, Schaletzky J, Kopajtich R & Barr FA. (2002) The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr Biol.* **12**(20):1792-1795. doi: 10.1016/s0960-9822(02)01221-6
- 73) Melzer L, Freiman TM & Derouiche A. (2021) Rab6A as a Pan-Astrocytic Marker in Mouse and Human Brain, and Comparison with Other Glial Markers (GFAP, GS, Aldh1L1, SOX9). *Cells.* **10**(1):72. doi: 10.3390/cells10010072

- 74) Duplomb L, Duvet S, Picot D, Jego G, El Chehadeh-Djebbar S, Marle N, Gigot N, Aral B, Carmignac V, Thevenon J, Lopez E, Rivière JB, Klein A, Philippe C, Droin N, Blair E, Girodon F, Donadieu J, Bellanné-Chantelot C, Delva L, Michalski JC, Solary E, Faivre L, Foulquier F & Thauvin-Robinet C. (2014) Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects. *Hum Mol Genet.* **23**(9):2391-2399. doi: 10.1093/hmg/ddt630
- 75) Nambu M, Oshima Y, Kakiuchi T, Hayakawa Y, Ito T, Hasegawa T & Fujita H. (1988) Cohen's syndrome with diabetes mellitus. *Acta Paediatr Jpn.* **30**(1):84-88. doi: 10.1111/j.1442-200x.1988.tb02502.x
- 76) Ohtsubo K, Chen MZ, Olefsky JM & Marth JD. (2011) Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nat Med.* **17**(9):1067-1075. doi: 10.1038/nm.2414
- 77) Ifie E, Russell MA, Dhayal S, Leete P, Sebastiani G, Nigi L, Dotta F, Marjomäki V, Eizirik DL, Morgan NG & Richardson SJ. (2018) Unexpected subcellular distribution of a specific isoform of the Coxsackie and adenovirus receptor, CAR-SIV, in human pancreatic beta cells. *Diabetologia.* **61**(11):2344-2355. doi: 10.1007/s00125-018-4704-1

図表の説明

表 1. 本研究で使用した抗体および試薬

抗体と試薬	販売元	品番
DAPI	Invitrogen	D1306
Mouse monoclonal anti-HA	MBL	M180-3
Rabbit monoclonal anti-HA	Cell Signaling Technology	3724
Mouse monoclonal anti-c-Myc	Sigma-Aldrich	M4439
Mouse monoclonal anti-JAM1	Sigma-Aldrich	SAB4200468
Rabbit monoclonal anti-CXADR	Sino Biological	10799-R271
Rabbit polyclonal anti-VPS13B	Proteintech	24505-1-AP
Mouse monoclonal anti- β -ACTIN	Sigma-Aldrich	M177-3
Mouse monoclonal anti-GM130	BD	610823
Mouse monoclonal anti-GOLGA4	BD	611280
Mouse monoclonal anti-LAMP1	Santa Cruz	sc-20011
FITC-conjugated goat anti-mouse IgG	MBL	A-11001
Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	ab150077
Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-mouse IgG	Invitrogen	ab150114
Alexa Fluor 555-conjugated goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	ab150078
Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-mouse IgG	Cell Signaling Technology	4410
Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit IgG	Invitrogen	ab150079
Alexa Fluor 633 phalloidin	Thermo Fisher Scientific	A22284
Goat anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase	Cell Signaling Technology	7076
Goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase	Cell Signaling Technology	7074
pSIREN-RetroQ	Clontech	631526
pSIREN-RetroQ-shLuc	Takeuchi <i>et al.</i> , 2019	-
pBApo-EF1 α NEO	Takara	3243
pCMV-HA-inserted CXADR	Takeuchi <i>et al.</i> , 2021	-
pIRES-Puro-HA-inserted CXADR	Takeuchi <i>et al.</i> , 2021	-
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich	B1793
EACC	MedChemExpress	HY-129111
M β CD	Sigma-Aldrich	C4555
Dynasore	AdipoGen Life Sciences	HY-15304
Latrunculin A	Wako	12-0436
Fluorescein Labeling Kit-NH2	Dojindo	LK-01
FITC- <i>P. gingivalis</i> LPS	Takeuchi <i>et al.</i> , 2019	-
FITC- <i>P. gingivalis</i> PGN	Takeuchi <i>et al.</i> , 2019	-
KOD plus Neo	Toyobo	KOD-401
T4 DNA ligase	New England Biolabs	M0202

表 2. 本研究で使⽤したプライマー

プライマー	プライマー塩基配列 (5'-3')
<i>β-ACTIN</i> forward	GCATGGGTCAGAAGGATTCCT
<i>β-ACTIN</i> reverse	TCGTCCCAGTTGGTGACGAT
<i>VPS13B</i> forward	AGGCACAGCTCCTCCAGATA
<i>VPS13B</i> reverse	AACACGTCCACTGGTTCCTC
<i>CXADR</i> forward	CAGTGCCTGTTGCGTCTAAA
<i>CXADR</i> reverse	CTTTGGAGGTGGCACATCTT
<i>JAM1</i> forward	GTGCCTACTCGGGCTTTTCTT
<i>JAM1</i> reverse	GTCACCCGGTCCTCATAGGAA
<i>RAB6A</i> forward	GAGCAAAGCGTTGGAAAGAC
<i>RAB6A</i> reverse	TGACCTGCTGTGTCCCATAA
<i>FAM177A1</i> forward	TGTGGAACGAGGAGAAGCCGTC
<i>FAM177A1</i> reverse	CCAGTTCTACATTTTCAAAGCCTC
<i>SEC23IP</i> forward	GAACCCAGACTTCAAAGGAGGTG
<i>SEC23IP</i> reverse	AGCAAGAGGTCCAGGGCACTTT
<i>STX13</i> forward	GCCAATGTGGAAAGCTCAGAGG
<i>STX13</i> reverse	TCACTGACAGGACAAGCACCAG

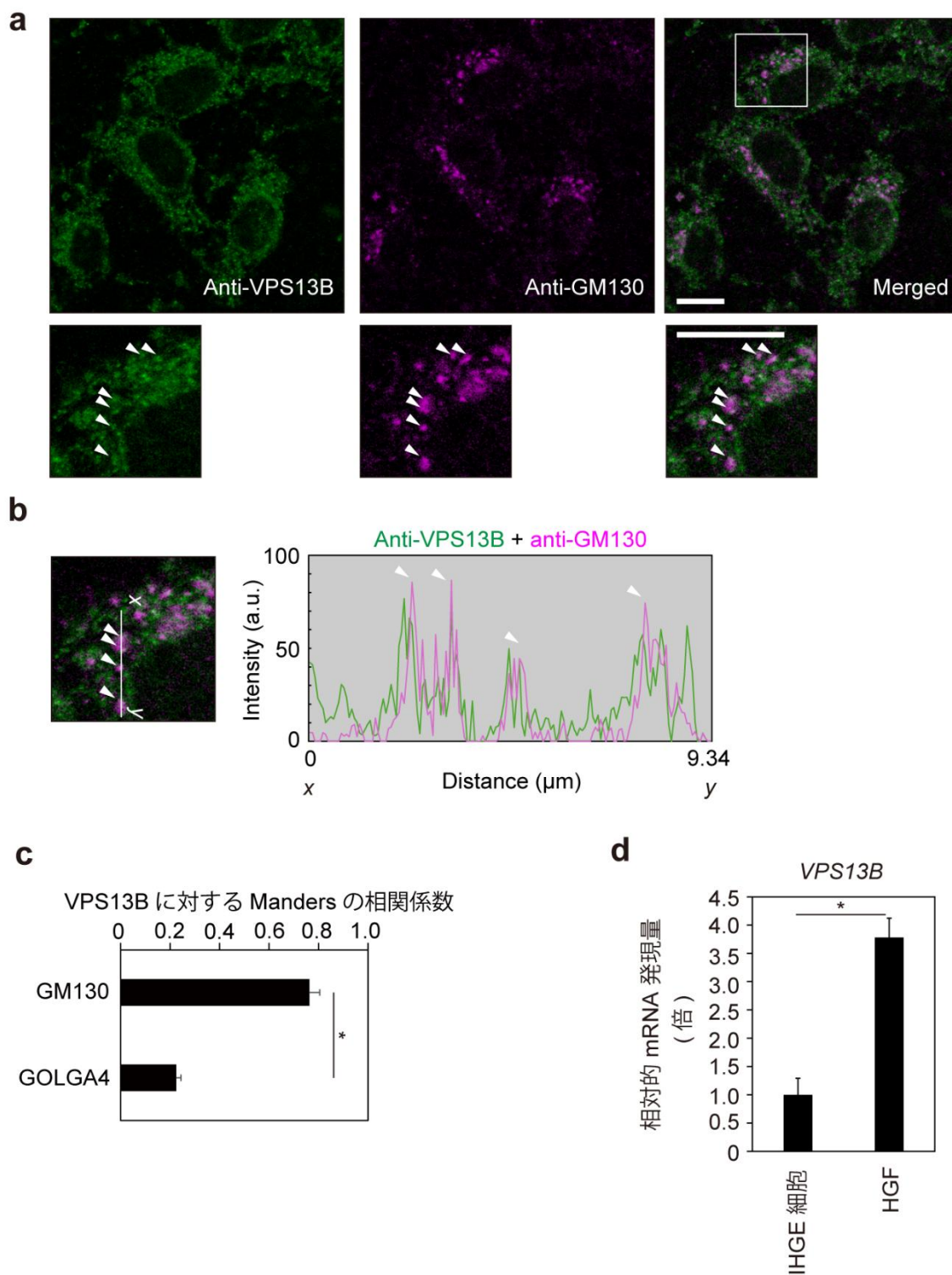


図 1. ヒト歯肉上皮細胞における VPS13B の局在

(a) IHGE 細胞を固定し，VPS13B 抗体（緑色）およびシスゴルジマーカである GM130 抗体（赤紫色）で免疫染色し，共焦点顕微鏡にて観察した．白矢印

は2つのタンパクが共局在していることを示す. スケールバーは $10\ \mu\text{m}$ を示す.

(b) VPS13B と GM130 との共局在の評価. 左図に示す x - y 線上の VPS13B (緑色) と GM130 (赤紫色) の蛍光強度を解析した. 解析したグラフを右図に示す. 縦軸は, シグナルの蛍光強度を表し, a.u.は任意単位 (arbitrary unit) を表す. 横軸は x - y 間の距離 (μm) を表す.

(c) VPS13B と, GM130 または GOLGA 4 との共局在の評価. VPS13B のシグナルに対する, GM130 またはトランスゴルジマーカーである GOLGA4 のシグナルの空間的な重なりを, Manders 相関係数を用いて評価した. $*p<0.05$ (両側 t 検定), $n=10$. バーは標準偏差を示す.

(d) HGF における *VPS13B* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した. 結果は, IHGE 細胞の mRNA 発現量を 1 とした倍数で示している. $*p<0.05$ (両側 t 検定), $n=5$. バーは標準偏差を示す.

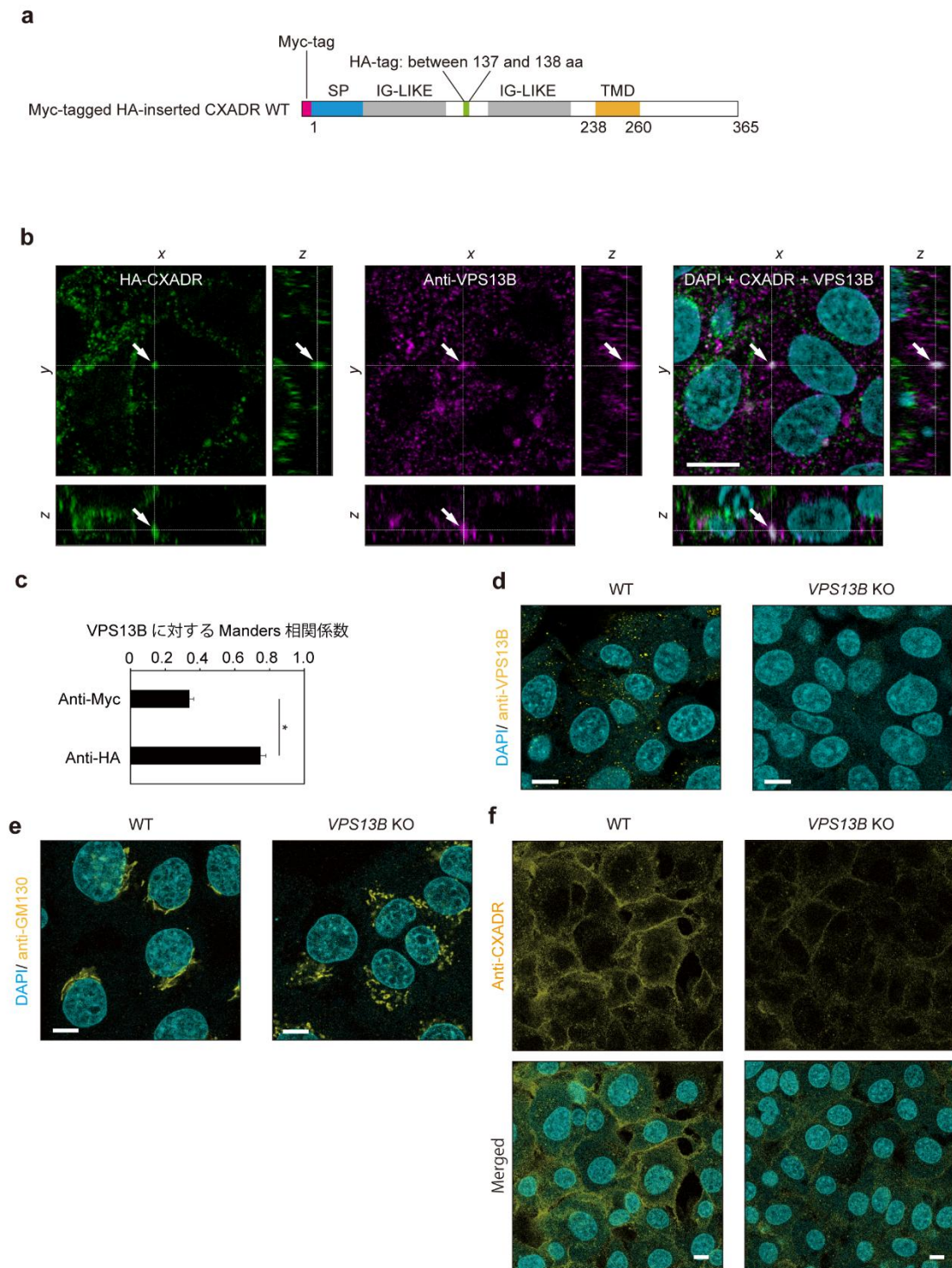


図 2. ヒト歯肉上皮細胞における VPS13B と CXADR との関連

(a) Myc タグおよび HA タグを挿入した CXADR の模式図を示す. 青色はシグナルペプチド (SP), 灰色は Ig ドメイン, 黄色は膜貫通領域 (transmembrane

domain, TMD), マゼンタ色は Myc タグ, 緑色は HA タグを表す.

(b) IHGE 細胞を固定後, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 青色), VPS13B 抗体 (赤紫色), HA タグで標識した CXADR を HA 抗体 (緑色) で免疫染色した. スケールバーは 10 μm を示す.

(c) VPS13B と, Myc タグまたは HA タグで標識された CXADR との共局在の評価. VPS13B のシグナルに対する, Myc タグまたは HA タグのシグナルの空間的な重なりを, Manders 相関係数を用いて評価した. $*p<0.05$ (両側 t 検定), $n=10$. バーは標準偏差を示す.

(d) IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* ノックアウト細胞を固定し, DAPI (青色) および VPS13B 抗体 (黄色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. WT は野生株, KO はノックアウト細胞株を表す. スケールバーは 10 μm を示す.

(e) IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* のノックアウト細胞を固定後, DAPI (青色) および シスゴルジマーカである GM130 抗体 (黄色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

(f) IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* のノックアウト細胞を固定後, DAPI (青色) および CXADR 抗体 (黄色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

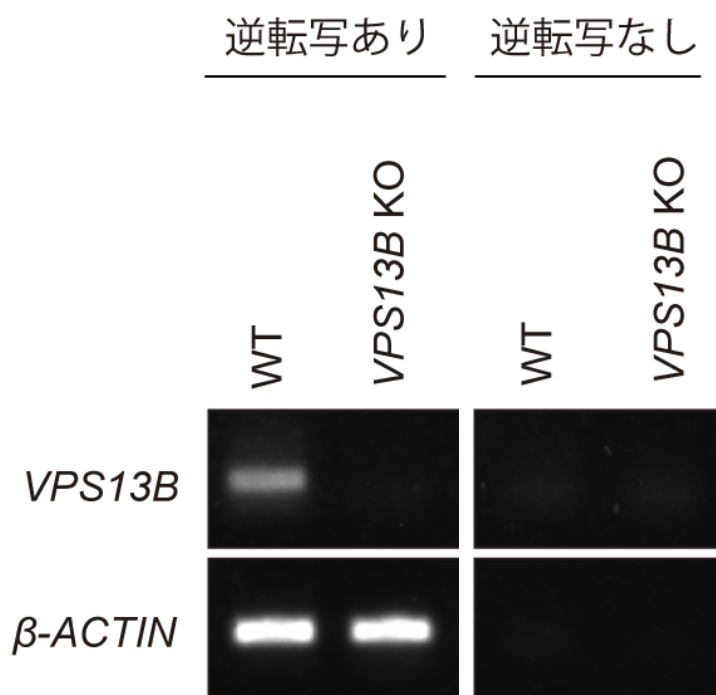


図 3. RT-PCR 法による，*VPS13B* ノックアウト細胞における *VPS13B* 欠失の確認

IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* ノックアウト細胞株における *VPS13B* の発現を確認した．コントロールとして， β -*ACTIN* を使用した．

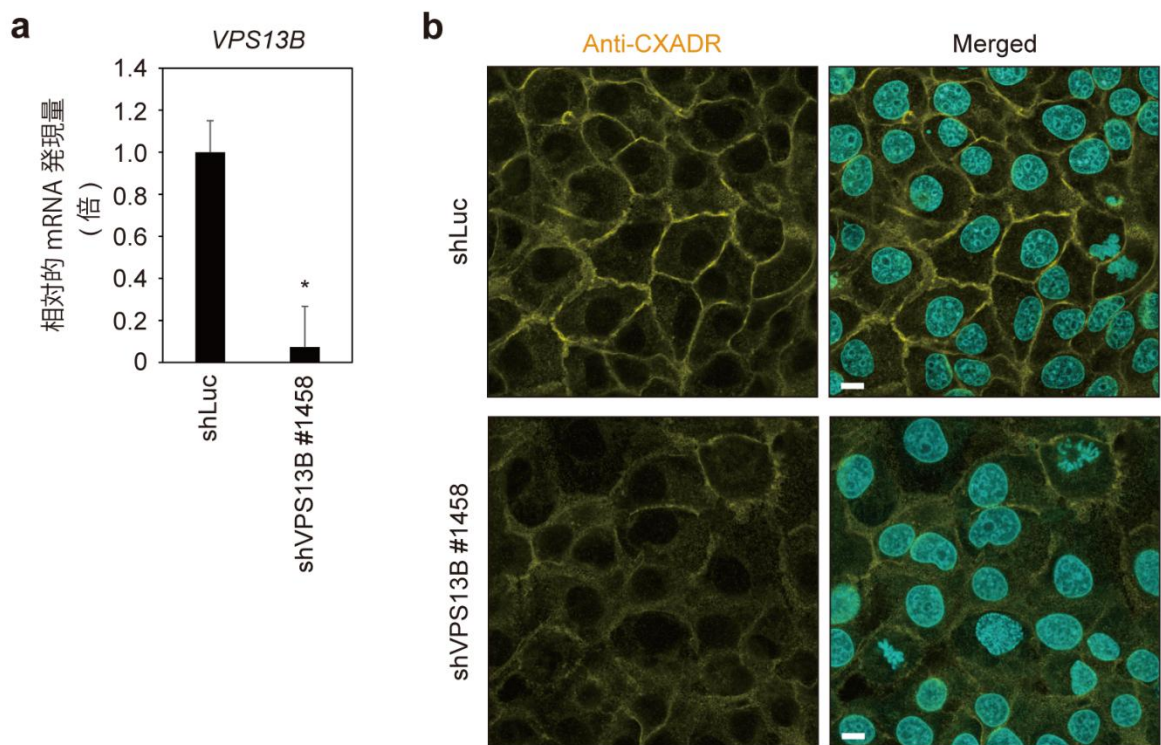


図 4. *VPS13B* をノックダウンした IHGE 細胞における CXADR の減少

(a) qRT-PCR 法にて *VPS13B* の mRNA 発現量を測定した．縦軸は，shLuc（コントロール）を 1 とした相対的な mRNA 量を示す．* $p < 0.05$ （両側 t 検定）， $n = 5$ ．バーは標準偏差を示す．

(b) IHGE 細胞のコントロール株（shLuc）および *VPS13B* のノックダウン細胞を固定後，DAPI（青色）および CXADR 抗体（黄色：FITC）で免疫染色し，共焦点顕微鏡にて観察した．スケールバーは 10 μm を示す．

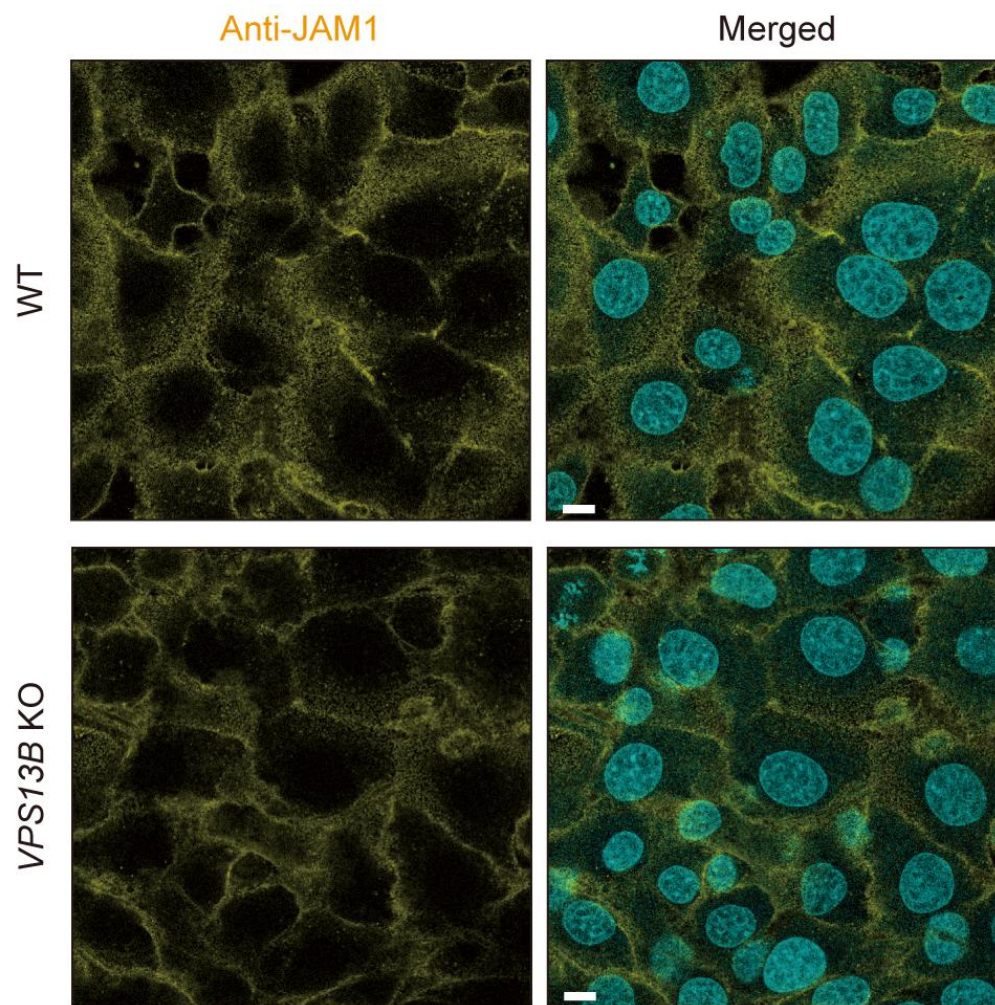


図 5. ヒト歯肉上皮細胞における VPS13B と JAM1 との関連

IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* のノックアウト細胞を固定し，DAPI（青色）および JAM1 抗体（黄色）で染色し，共焦点顕微鏡にて観察した．スケールバーは 10 μm を示す．

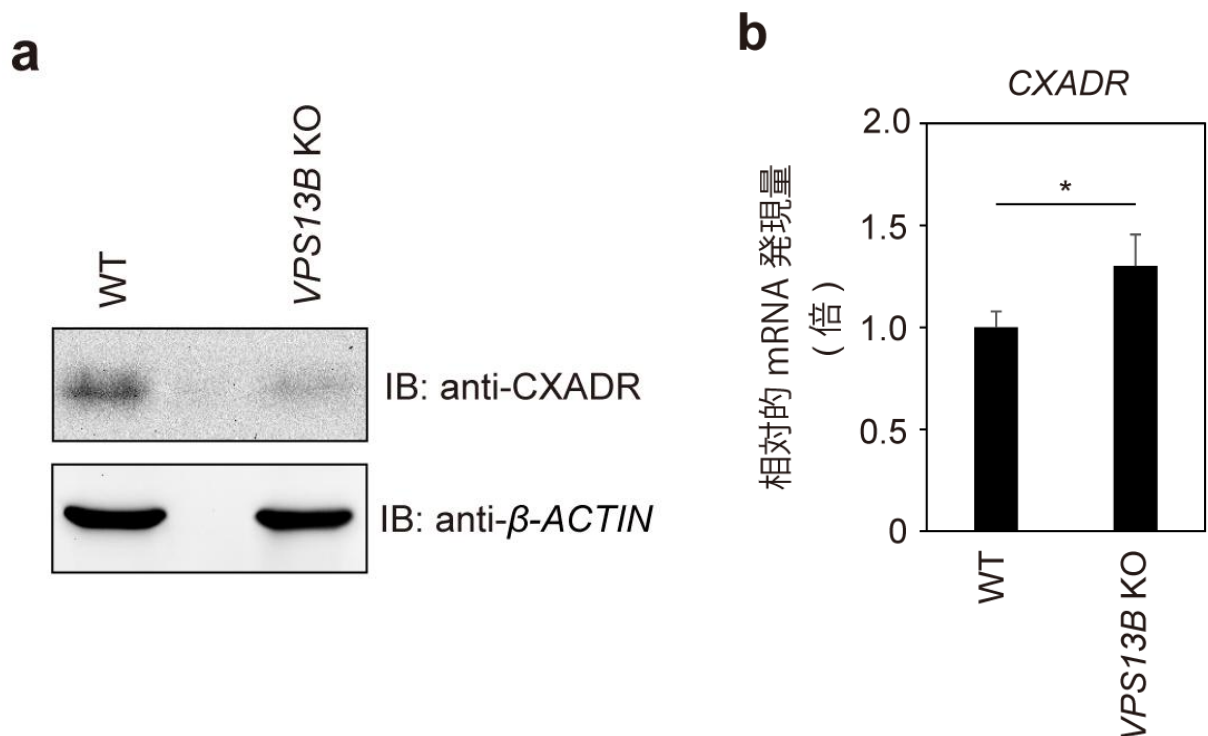


図 6. *VPS13B* をノックアウトした IHGE 細胞における CXADR のタンパク発現量および mRNA 発現量の評価

(a) ウェスタンブロット法にて *VPS13B* のノックアウトによる CXADR のタンパク発現量の変化を確認した. コントロールとして β -ACTIN 抗体を使用した. IB は immunoblot を示す.

(b) qRT-PCR 法にて *VPS13B* のノックアウトによる CXADR の mRNA 発現量を測定した. 縦軸は, 野生株を 1 とした相対的な mRNA 量を示す. * $p < 0.05$ (両側 t 検定), $n=5$. バーは標準偏差を示す.

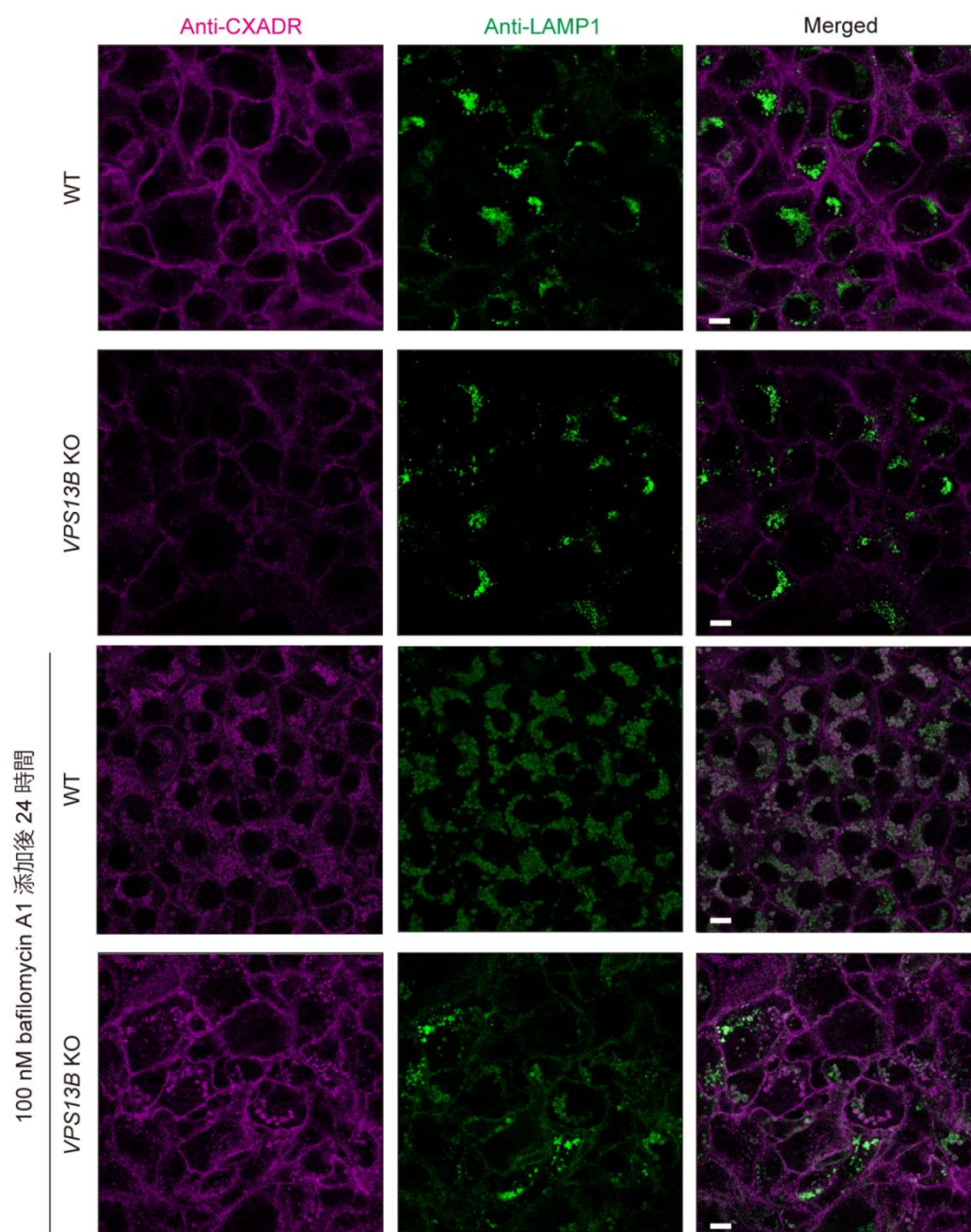


図 7. *VPS13B* をノックアウトした IHGE 細胞における CXADR とリソソームとの共局在

IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* ノックアウト細胞に bafilomycin A1 (100 nM) を添加した. 24 時間後に細胞を固定し, CXADR 抗体 (赤紫色) およびリソソームマーカーである LAMP1 抗体 (緑色) で染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

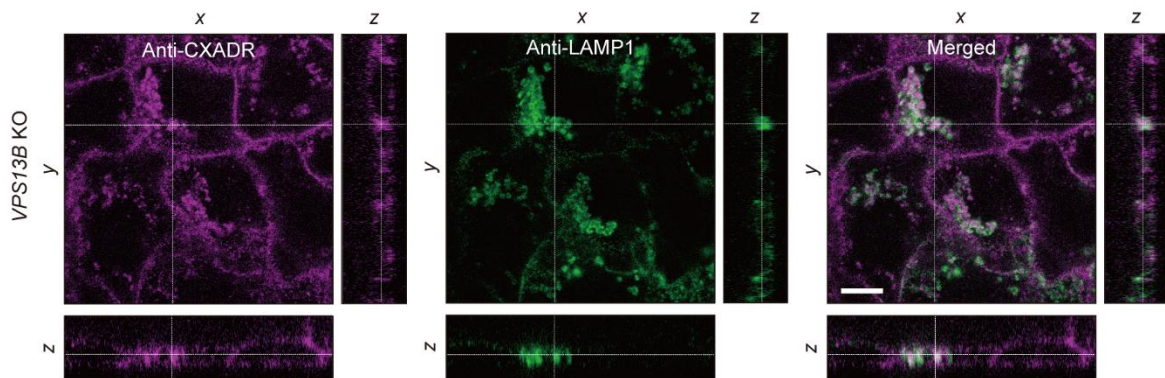


図 8. 三次元共焦点顕微鏡像で示す *VPS13B* をノックアウトした IHGE 細胞における CXADR とリソソームとの共局在

VPS13B のノックアウト細胞に bafilomycin A1 (100 nM) を添加した. 1 時間後に細胞を固定し, CXADR 抗体 (赤紫色) およびリソソームマーカーである LAMP1 抗体 (緑色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

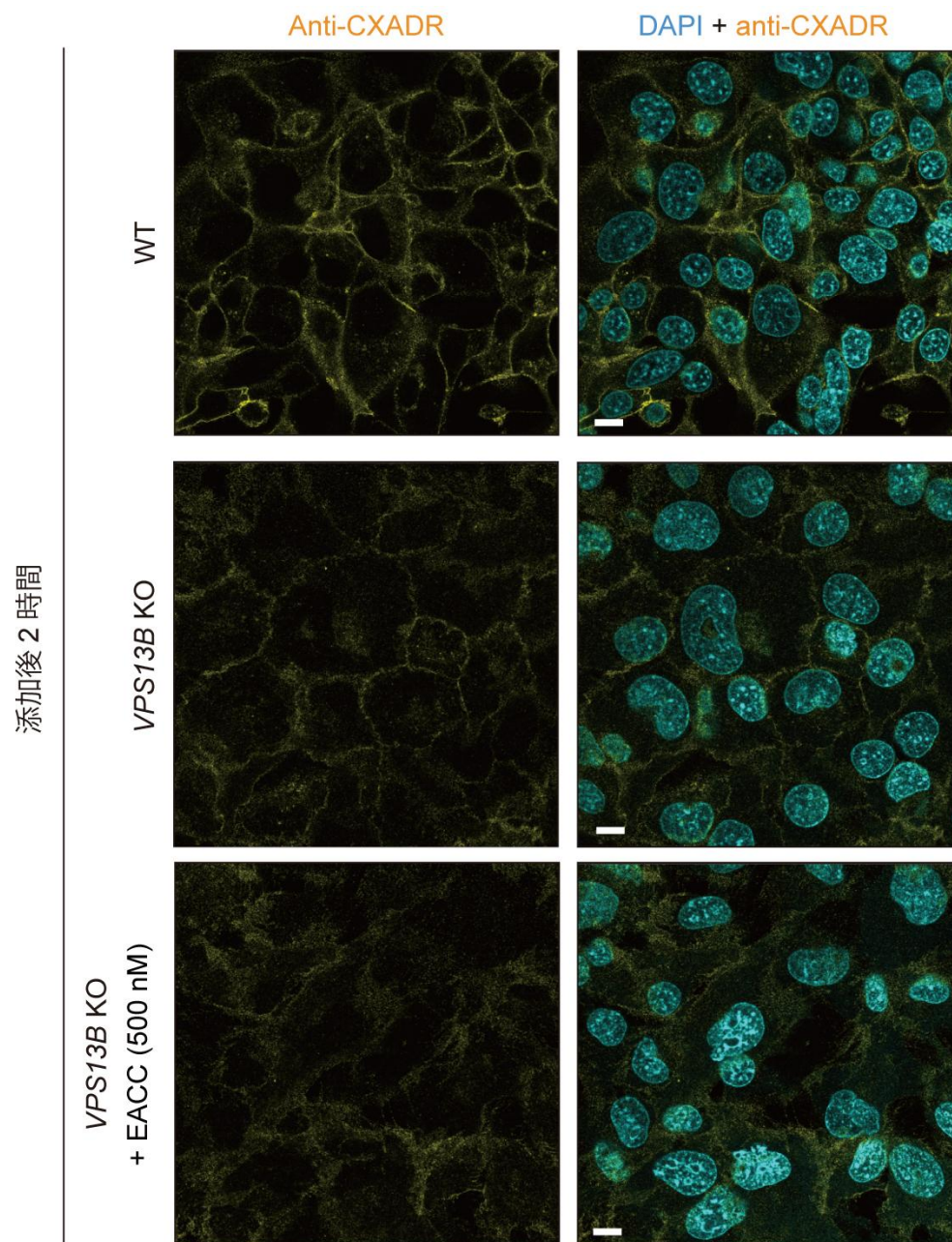


図 9. オートファジー阻害薬で処理した *VPS13B* ノックアウト細胞における CXADR の細胞膜上への局在

IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* のノックアウト細胞をオートファジー阻害薬である EACC で処理した. 2 時間経過後に固定し, DAPI (青色) および CXADR 抗体 (黄色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

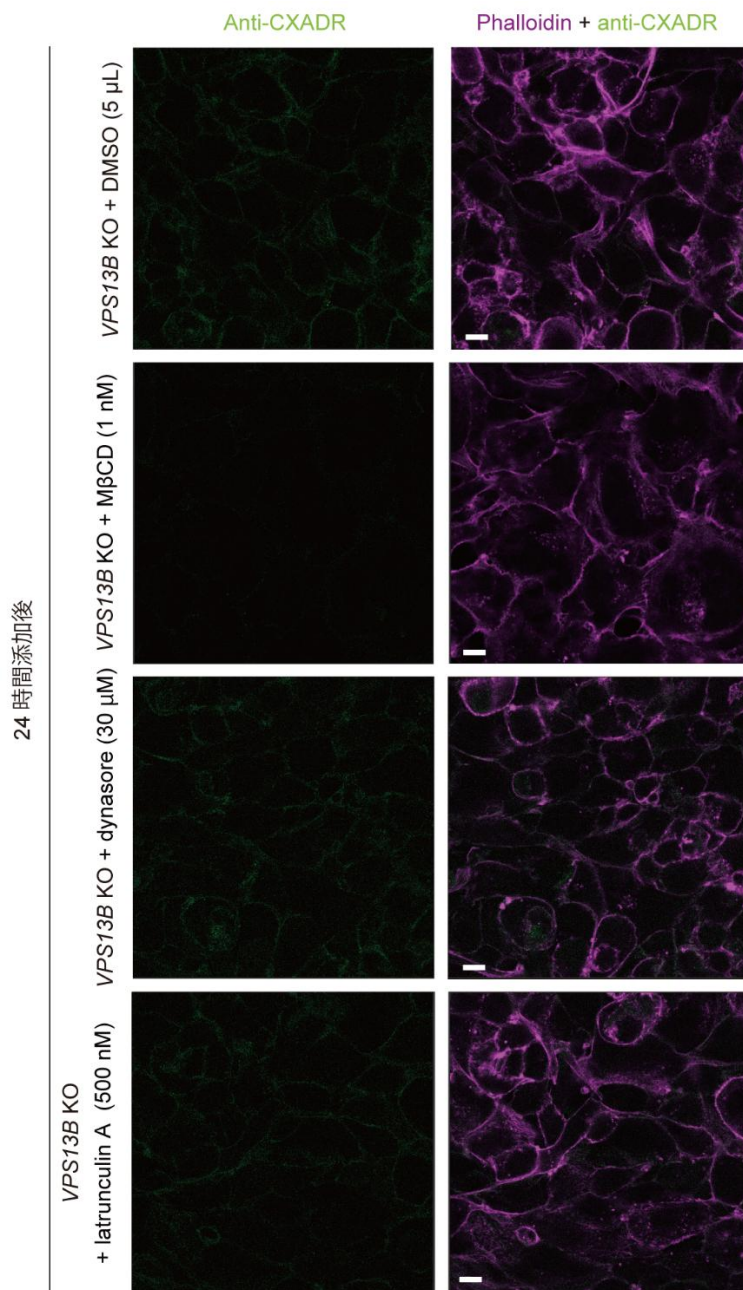


図 10. エンドサイトーシス阻害薬で処理した *VPS13B* ノックアウト細胞における CXADR の細胞膜上への局在

IHGE 細胞の *VPS13B* のノックアウト細胞をエンドサイトーシス阻害薬である MβCD, dynasore および latrunculin A で処理した. 24 時間経過後に固定し, phalloidin (赤紫色) および CXADR 抗体 (緑色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

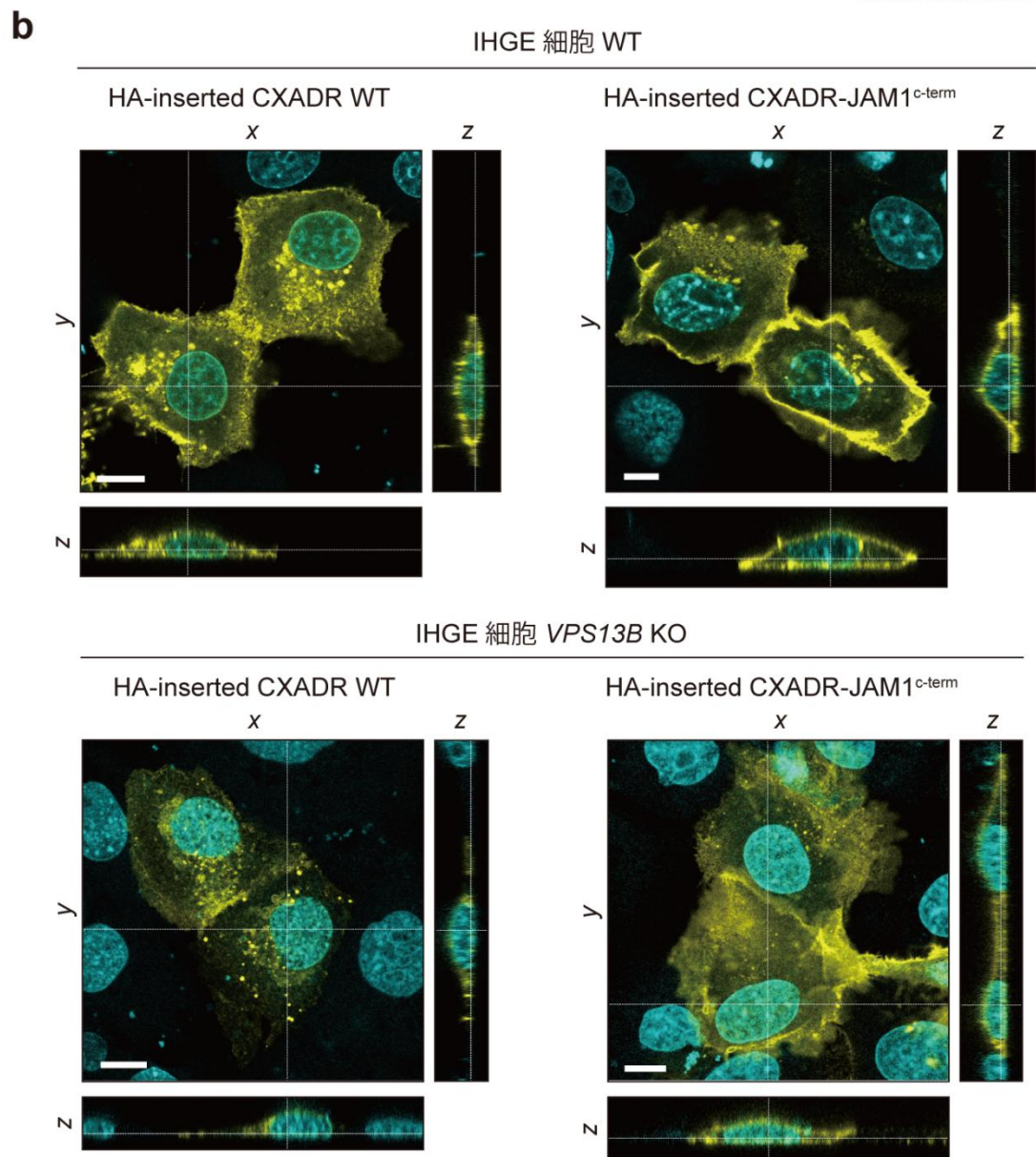
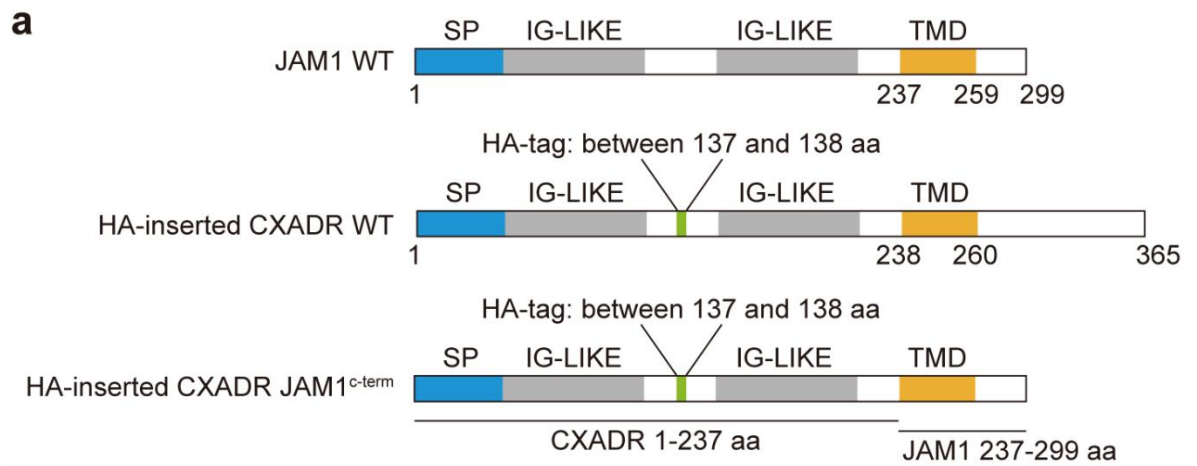


図 11. *VPS13B* をノックアウトした IHGE 細胞における CXADR の野生型および CXADR-JAM1^{c-term} の細胞膜上への局在

(a) JAM1 野生型および HA タグを挿入した CXADR 野生型, CXADR-JAM1^{c-term} キメラタンパクの模式図を示す. 青色はシグナルペプチド (SP), 灰色は Ig ドメイン, 黄色は膜貫通領域 (TMD), 緑色は HA タグを表す.

(b) HA タグを挿入した CXADR 野生型または CXADR-JAM1^{c-term} を一過性発現させた IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* ノックアウト細胞を固定後, DAPI (青色) および, HA 抗体 (黄色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

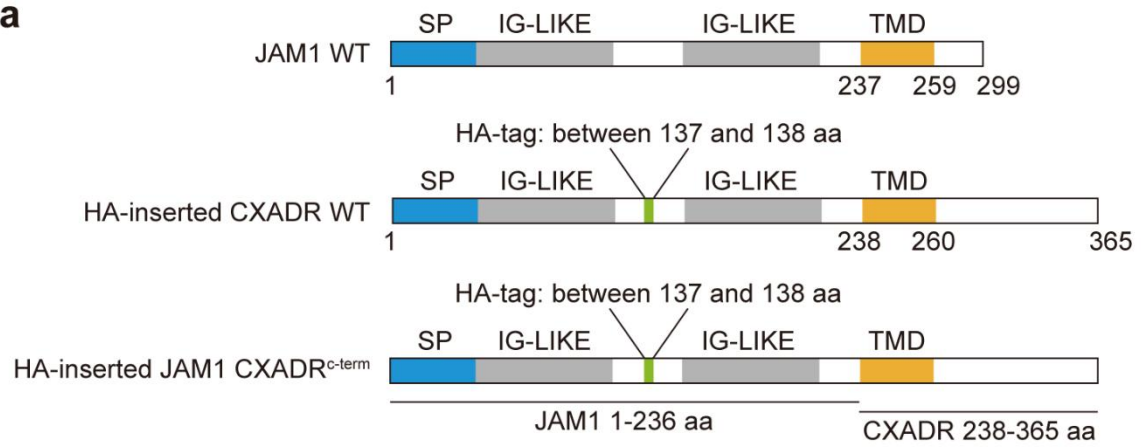
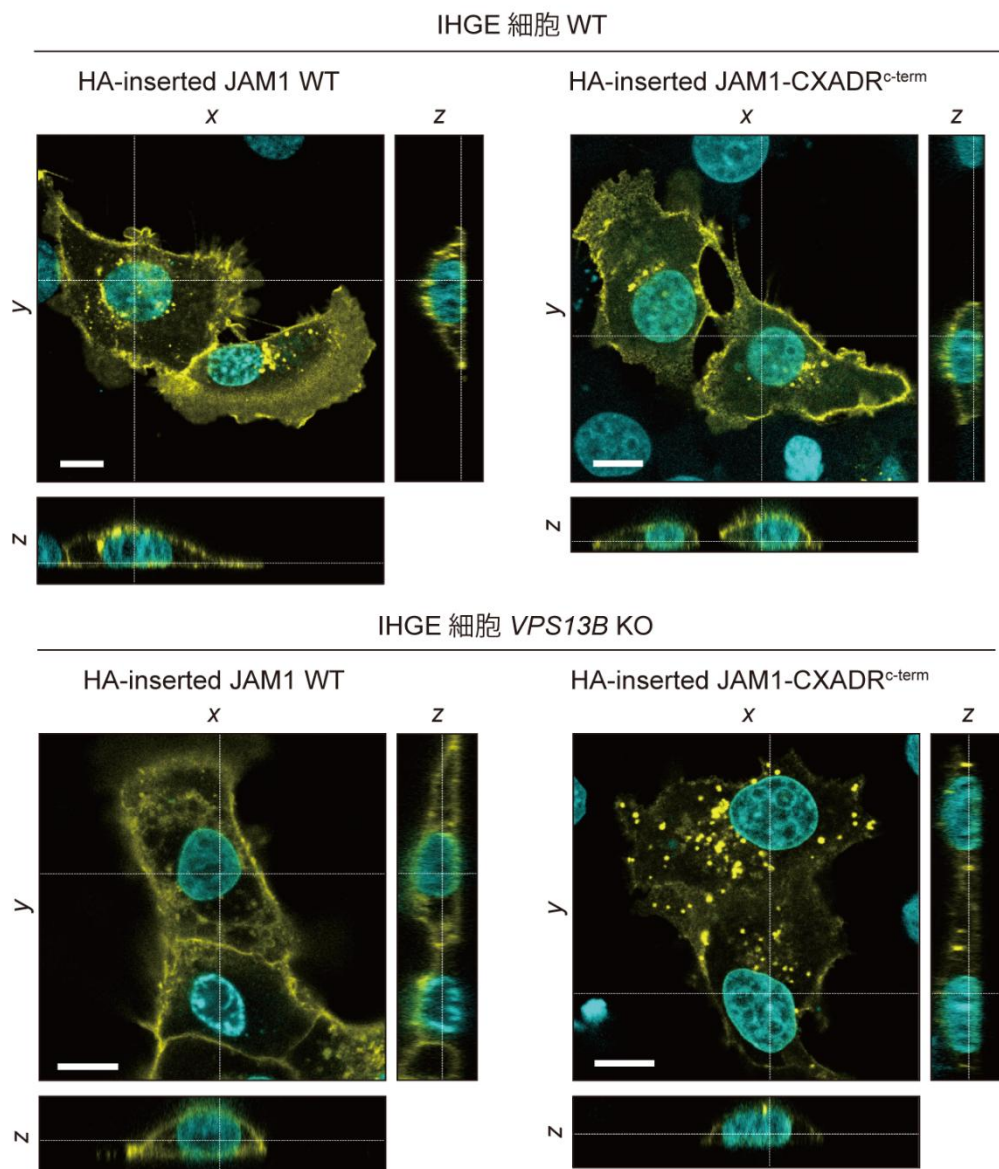
a**b**

図 12. *VPS13B* をノックアウトした IHGE 細胞における JAM1 の野生型および JAM1-CXADR^{c-term} の細胞膜上への局在

(a) JAM1 野生型および HA タグを挿入した JAM1 野生型, JAM1-CXADR^{c-term} キメラタンパクの模式図を示す. 青色はシグナルペプチド (SP), 灰色は Ig ドメイン, 黄色は膜貫通領域 (TMD), 緑色は HA タグを表す.

(b) HA タグを挿入した JAM1 野生型または JAM1-CXADR^{c-term} を一過性発現させた IHGE 細胞の野生株および *VPS13B* のノックアウト細胞を固定後, DAPI (青色) および HA 抗体 (黄色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

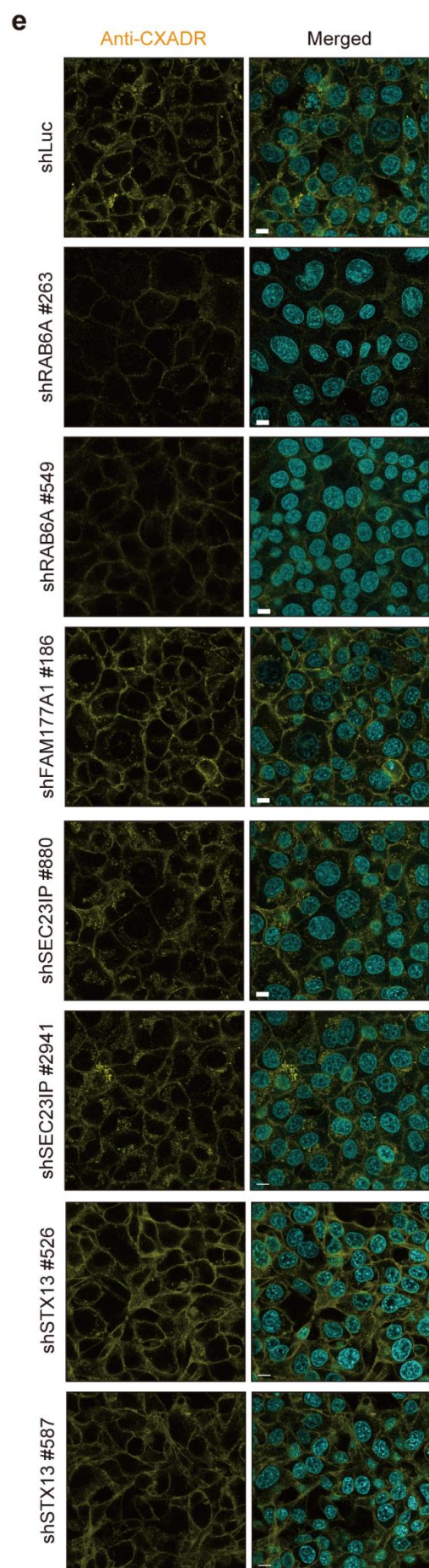
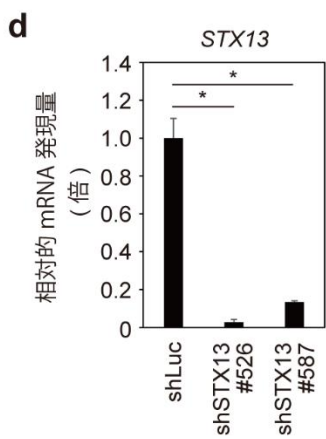
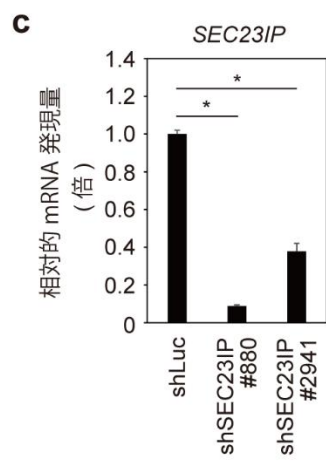
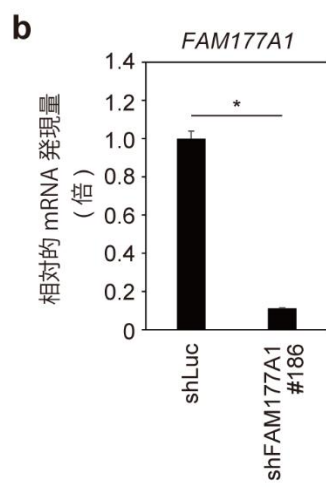
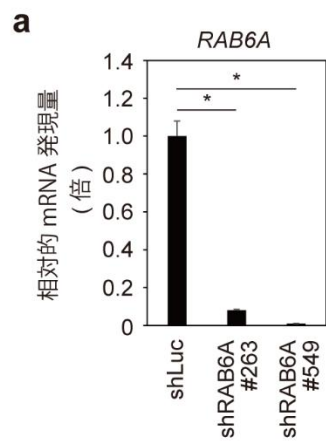


図 13. IHGE 細胞における VPS13B 結合タンパクのノックダウンが CXADR の細胞膜への局在に及ぼす影響

(a-d) *RAB6A*, *SEC23IP*, *FAM177A1* および *STX13* に対する shRNA をそれぞれ IHGE 細胞に形質導入した. qRT-PCR 法にて, 各 mRNA 発現量を測定した. 縦軸は, shLuc (コントロール) を 1 とした相対的な mRNA 量を示す. * $p < 0.05$ (両側 t 検定), $n=5$. バーは標準偏差を示す.

(e) *RAB6A*, *SEC23IP*, *FAM177A1* および *STX13* に対する shRNA をそれぞれ形質導入した IHGE 細胞を固定し, 細胞を DAPI (青色) および CXADR 抗体 (黄色) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10 μm を示す.

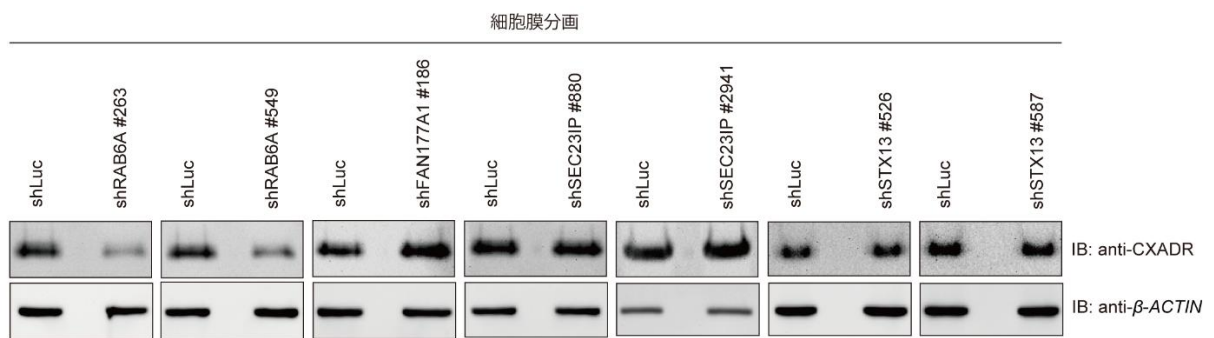


図 14. VPS13B 結合タンパクのノックダウンが CXADR の細胞膜分画への局在に及ぼす影響

RAB6A, *FAM177A1*, *SEC23IP* および *STX13* に対する shRNA をそれぞれ形質導入した IHGE 細胞から細胞膜画分のみを取り出し, CXADR のタンパク発現量をウエスタンブロット法にて解析した. コントロールとして β -ACTIN 抗体を使用した. IB は immunoblot を示す.

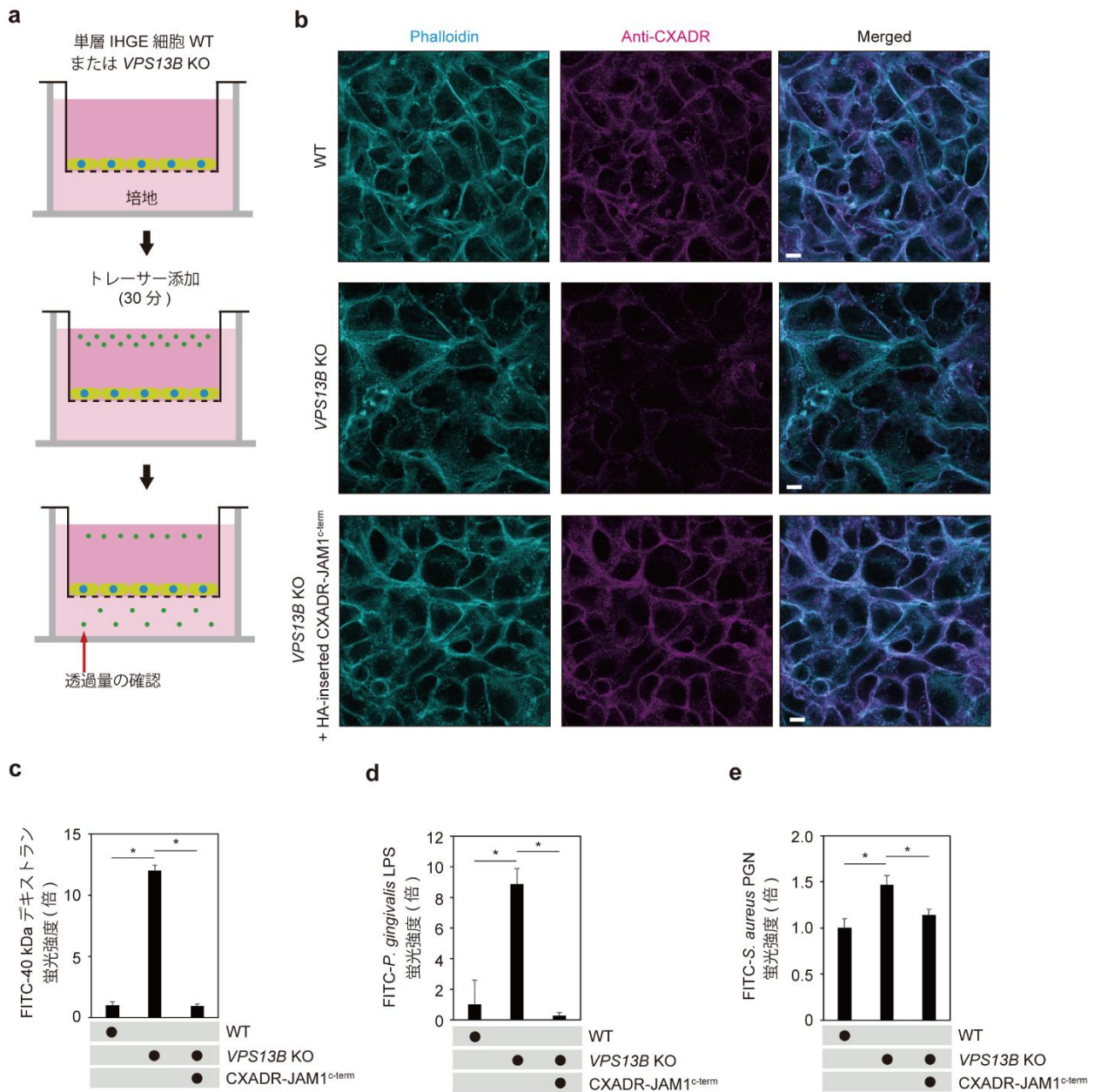


図 15. CXADR の細胞外領域に依存した *VPS13B* ノックアウトによる歯肉上皮細胞層のバリア機能の低下

(a) 本実験の模式図を示す．歯肉上皮細胞層の野生株および *VPS13B* ノックアウト細胞株を上部のインサート上にて培養した．そこに FITC を標識するトレーサーを添加し，30 分培養を行った後，上部のインサートから下部のウェルプレート

ートへのトレーサーの透過量をプレートリーダーにて測定した.

(b) CXADR-JAM1^{c-term} を過剰発現させた IHGE 細胞層の野生株または VPS13B をカバーガラス上で培養した. これらを固定し, Alexa Fluor 633 を標識した phalloidin (青色) および CXADR (赤紫色) で染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 30 μm を示す.

(c-e) 上記細胞層における 40 kDa 蛍光デキストラン (c), FITC-*P. gingivalis* LPS (d), FITC-*S. aureus* PGN (e) の透過性を評価した. 結果は, 野生株の透過量をコントロールとした倍数で示している. $*p<0.05$ (両側 t 検定), $n=8$. バーは標準偏差を示す.

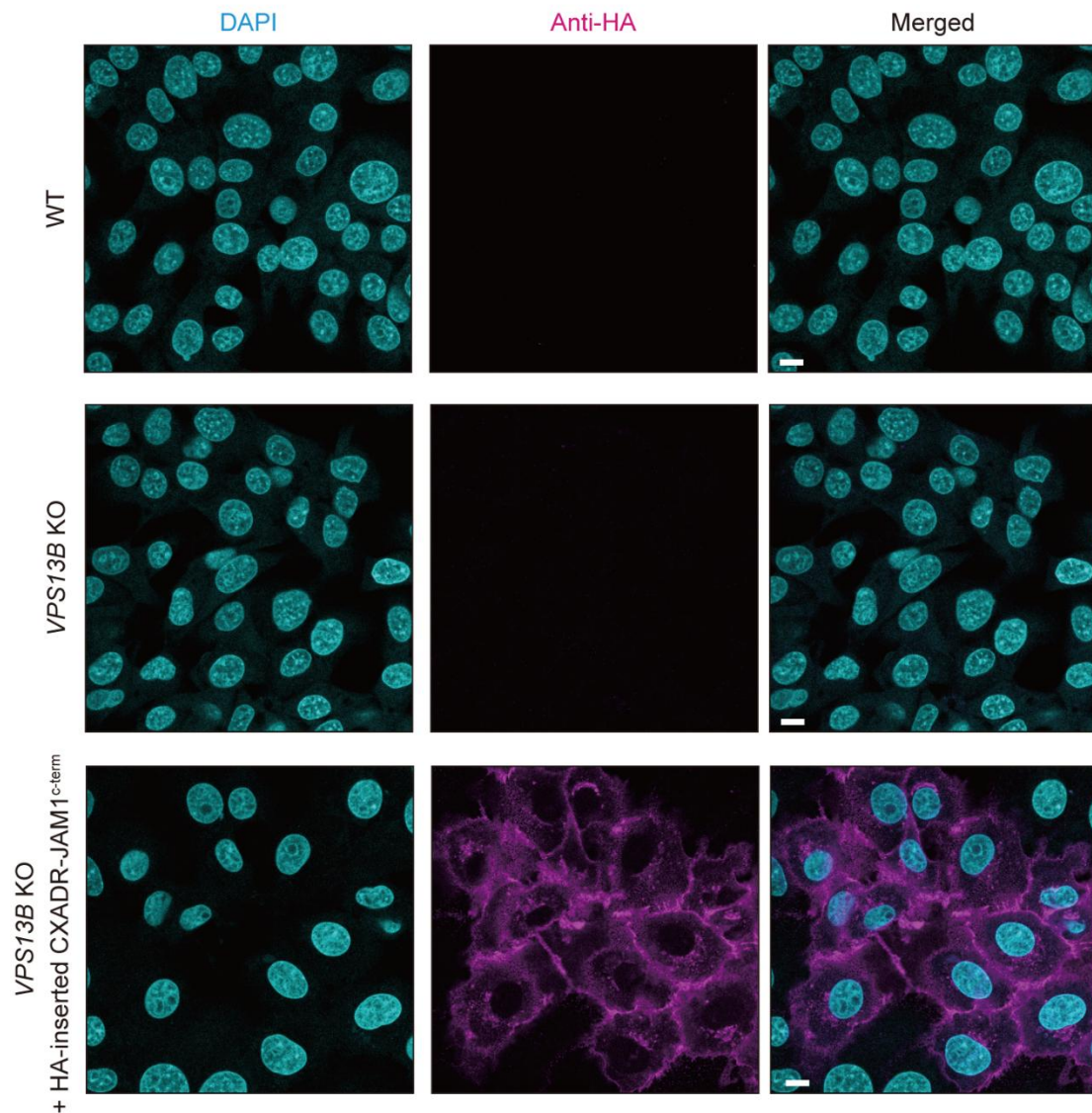


図 16. *VPS13B* ノックアウト細胞における *CXADR-JAM1^{c-term}* の発現の確認

CXADR-JAM1^{c-term} を過剰発現させた IHGE 細胞層の野生株または *VPS13B* KO をカバーガラス上で培養した。これらを固定し、DAPI（青色）および *CXADR*（赤紫色）で免疫染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。スケールバーは 10 μ m を示す。

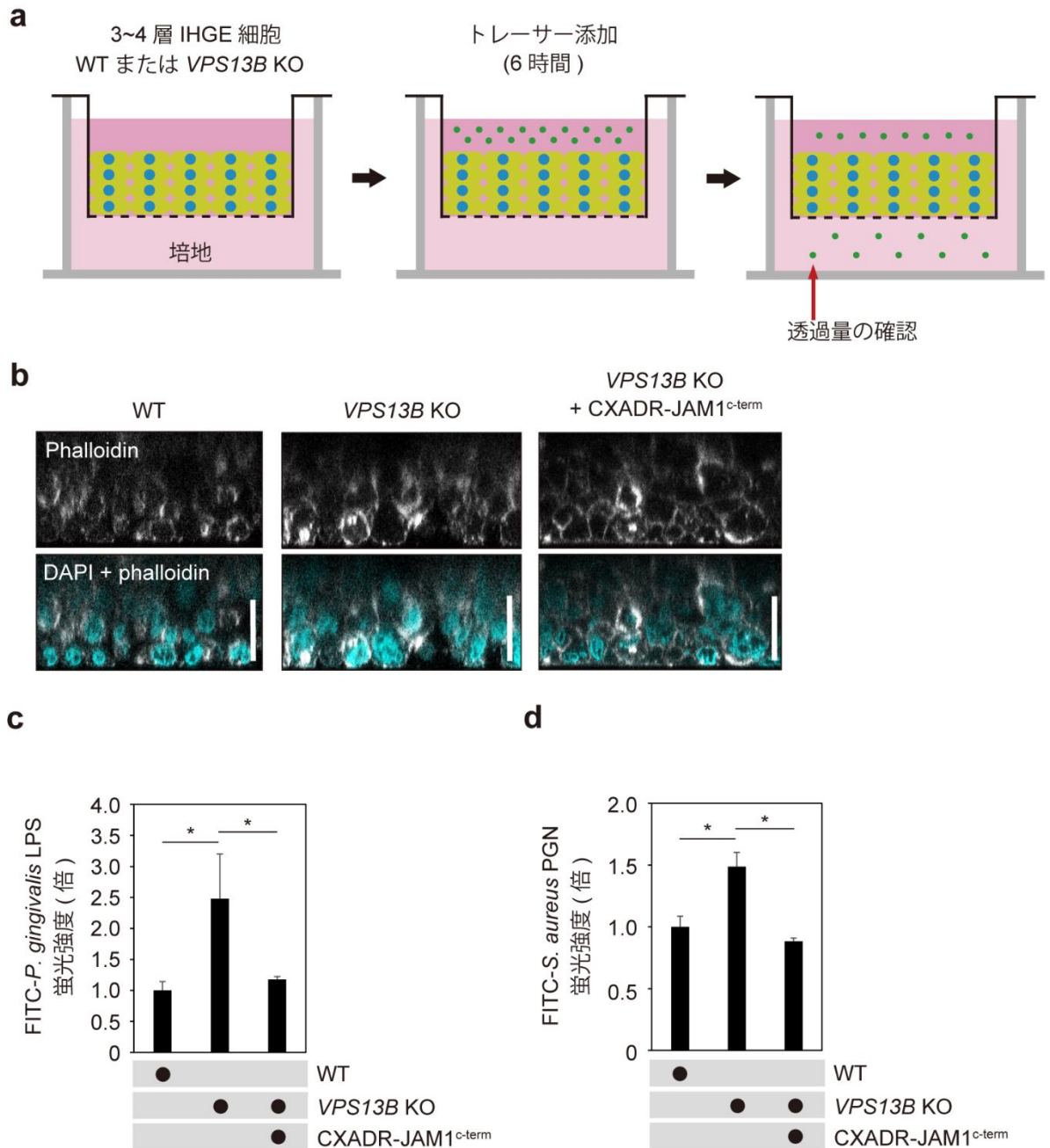


図 17. CXADR の細胞外領域に依存した *VPS13B* ノックアウトによる，三次元歯肉上皮モデルにおける上皮のバリア機能の低下

(a) 本実験の模式図を示す．野生株と *VPS13B* ノックアウト細胞株の三次元歯肉上皮モデルおよび CXADR を過剰発現させた *VPS13B* ノックアウト歯肉上皮

モデルを上部のインサート上で培養し、FITC で標識した各種トレーサーを上部の培地に加えた。30 分後、上部のインサートから下部のウェルプレートへのトレーサーの透過量をプレートリーダーにて測定した。

(b) 野生株と *VPS13B* ノックアウト細胞株の三次元歯肉上皮モデルおよび CXADR を過剰発現させた *VPS13B* ノックアウト歯肉上皮モデルの共焦点顕微鏡像。これらの三次元モデルは固定後、DAPI（青色）および Alexa Fluor 633 を標識した phalloidin（赤紫色）にて染色した。スケールバーは 30 μm を示す。

(c, d) 上記細胞層における FITC-*P. gingivalis* LPS (c) および FITC-*S. aureus* PGN (d) の透過性を評価した。結果は、野生株の透過量をコントロールとした倍数で示している。* $p < 0.05$ （両側 t 検定）， $n=8$ 。バーは標準偏差を示す。

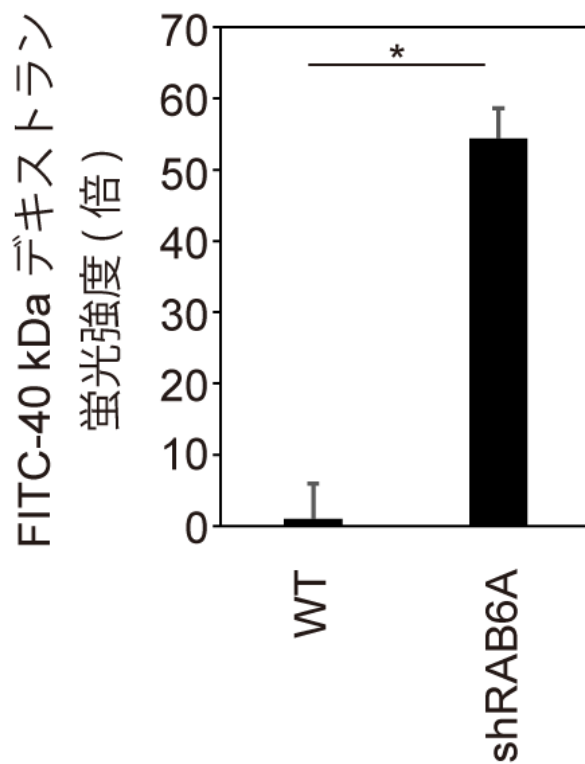


図 18. *RAB6A* ノックダウンによる，三次元歯肉上皮モデルにおけるバリア機能の低下

三次元モデルにおける 40 kDa 蛍光デキストランの透過量をプレートリーダーにて測定した．結果は，野生株の透過量をコントロールとした倍数で示している．

* $p < 0.05$ (両側 t 検定)， $n=8$ ．バーは標準偏差を示す．