OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Porphyromonas gingivalis による上皮バリア破綻に関与する分子基盤の解析 |
| Author(s) | 山賀, 俊介 |
| Citation | 大阪大学, 2022, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/87968 |
| 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* による上皮バリア破綻に関与する分子基盤の解析

口腔分子免疫制御学講座
予防歯科学

山賀 俊介

本論文の内容の一部は, Cellular Microbiology 誌, 2021 年 23 巻 11 号 e13388, 第 29 回近畿中国四国口腔衛生学会総会 (2018, 徳島), 第 30 回近畿中国四国口腔衛生学会総会 (2019, 大阪), 第 24 回日本歯科医学会学術大会 (2021, 横浜), および第 16 回先端歯学スクール (2021, 大阪) において発表した.

# 要約

歯肉内縁上皮は外来異物の歯周組織内への侵入を防ぐ物理的な上皮バリアとして機能し，このバリアの破綻は歯周病の発症に関与すると考えられる．*Porphyromonas gingivalis* は歯周病の主要な病原因子であるが，本菌が歯肉の上皮バリアを破壊する分子機構には不明な点が多い．以前の研究において，歯肉上皮細胞で発現する細胞接着分子の一つである junctional adhesion molecule 1 (JAM1) が，*P. gingivalis* の産生するプロテアーゼであるジンジパインにより分解され，上皮バリアの異物透過性が亢進することが報告されている．しかし，*P. gingivalis* 感染による上皮バリアの破綻に関与する細胞接着分子が JAM1 以外にも存在する可能性が考えられたため，本研究では JAM1 と類似したアミノ酸配列をもつ JAM ファミリータンパク質に焦点を当て，*P. gingivalis* 感染による影響を評価した．その結果，*P. gingivalis* は歯肉上皮細胞で発現する JAM ファミリータンパク質のひとつである coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) の R145 および K235 を選択的に分解した．一方，ジンジパイン欠失株は CXADR のタンパク量に明らかな影響を与えなかった．また，CXADR をノックダウンした三次元歯肉上皮モデルでは，異物透過性が亢進した．また，*P. gingivalis* が産生するジンジパインは，三次元歯肉上皮モデルにおける異物透過性を亢進する一方で，CXADR を過剰発現させた歯肉上皮モデルでは *P. gingivalis* 感染時の異物透過性の亢進が阻害された．以上の結果より，*P. gingivalis* が産生するジンジパインは歯肉上皮細胞の CXADR を選択的に分解し，歯肉上皮バリアを破綻させることが示唆された．

# 背景

外部環境と接する上皮は, 物理的なバリア機能を備えることで生体恒常性の維持に関わっている. 歯肉における物理的な上皮バリアは, 主に細胞接着装置により維持されている[1, 2]. 細胞接着装置は密着結合 (タイトジャンクション), 接着結合 (アドヘレンスジャンクション), およびギャップ結合などから構成され, 隣り合う細胞は特異的な細胞接着分子により緊密に接着する[3]. 細胞頂端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するとともに, 細胞間の物質の透過を制御する. そして, 体内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組織内侵入を防ぐ上皮バリアとして重要な役割を担っている[4]. しかし, いくつかの病原体はタイトジャンクションを構成する細胞接着分子を標的にして, その機能を障害し, 組織内に侵入することが報告されている[5].

歯は歯肉上皮の連続性を断裂し, 生体を貫通して存在する硬組織である. 歯と近接する歯肉内縁上皮はバイオフィルムから産生される外来異物の標的となっており[6], 上皮バリアを担うタンパク質として junctional adhesion molecule 1 (JAM1) を含めたいくつかの細胞接着分子の発現が報告されている[7]. JAM1 は血管内皮細胞や粘膜上皮で発現する 40 kDa の膜貫通型タンパク質で[8], 同種分子間相互作用により隣接する細胞と密着結合する[9]. 歯肉上皮細胞で発現する JAM1 はノックダウンにより異物透過性が亢進することが報告されており[10], JAM1 は歯肉上皮における外来異物の組織内侵入の制御に関与していると考えられる. また, 細胞外にシグナルペプチドおよび 2 つの免疫グロブリン様ドメイン (Ig-like ドメイン), 膜貫通ドメイン (transmembrane domain: TMD), そして細胞内に PDZ 結合ドメインという JAM1 と共通した構造をもつタンパク質は JAM ファミリータンパク質と呼ばれ[9], JAM1 と似た機能をもつと考えられているが, ヒト歯肉上皮において JAM1 以外の JAM ファミリータンパク質がどのように機能するかは不明である.

歯周病はバイオフィルム由来の病原因子が歯周組織を破壊する慢性炎症で，人類で最も多くみられる感染症のひとつである[11]．歯周病の発症は歯肉内縁上皮のバリアが決壊し，歯肉溝内に潰瘍が形成されることにより始まる．この潰瘍面から供給される血液を得て，歯周病菌が増加し，高病原性化バイオフィルムが宿主の防御力を凌駕することで歯周ポケットが形成され歯周病が進行していく[12]．歯周病が重症化すると，歯槽骨の吸収に伴い歯の動揺や移動が生じ，最終的には歯の喪失につながる[13]．日本において歯周病は成人が歯を喪失する主要な原因となっている[14]．

歯周病は病原体関連分子パターン (Pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) の血中移行との関連も示唆されている．PAMPs とは病原微生物から放出される微小な分子モチーフで，Toll 様受容体に認識され，炎症を引き起こすシグナル伝達経路を活性化させる[15]．単層の腸管上皮において，バイオフィルム由来の刺激により上皮組織が障害を受けると，PAMPs のひとつである Lipopolysaccharide (LPS) や Peptidoglycan (PGN) が組織深部に侵入し，炎症反応を引き起こすことが報告されている[16, 17]．全身的に健康な患者において，プロービング時における出血部位の数は血清 LPS 濃度と正の相関を示し[18]，さらに，血漿中の LPS 濃度は歯周炎の複数の臨床パラメータと相関することが報告されている[19]．これらのことから，歯周病に罹患するとバイオフィルム由来の PAMPs が歯周組織に侵入し，炎症を惹起すると考えられるが，詳しい分子機構は分かっていない．

また，主要な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* は，歯周病菌群全体の病原性を高める可能性が指摘されている[20]．*P. gingivalis* の産生するシステインプロテアーゼであるジンジパインは，アルギニンを特異的に分解する RgpA と RgpB，およびリシンを特異的に分解する Kgp に分類され，強力なタンパク質分解活性を有す[21, 22]．細胞接着装置に関与するタンパク質において，*P. gingivalis* の培養上清から単離された Rgp は Ⅰ 型および Ⅳ 型コラーゲンを分解し[23]，また，ヒト歯肉線維芽細胞のフィブロネクチンやインテグリンサブユニット α2, β1, および β3 の分解に関与することが報告されている[24]．さらに Kgp は，

Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞における Cadherin-1 (CDH1) の分解に関与することが報告されている[25]. ただ, *P. gingivalis* およびジンジパインが, 歯肉上皮細胞で発現する細胞接着装置に与える影響については不明な点が多い.

三次元歯肉上皮モデルを用いた以前の研究により, 歯肉上皮細胞で発現する JAM1 が *P. gingivalis* のジンジパインにより分解され, LPS や PGN の透過性が亢進することが報告されている[10]. しかし, JAM1 以外にも *P. gingivalis* 感染により分解される細胞接着分子が存在する可能性が考えられる. 本研究では JAM1 と類似したアミノ酸配列をもつ JAM ファミリータンパク質[9] である JAM2, JAM3, JAM4, coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR), cluster of differentiation 2 (CD2), CXADR like membrane protein (CLMP), および endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM) に焦点を当て, 歯肉上皮細胞における発現の有無, および *P. gingivalis* 感染による影響について検討を行った.

## 材料と方法

1. 細菌の培養条件

*P. gingivalis* 野生株は, *P. gingivalis* ATCC 33277 株 (American Type Culture Collection) を使用した. *P. gingivalis* KDP136 Δ*kgp*Δ*rgpA*Δ*rgpB* 株 (*P. gingivalis* ジンジパイン欠失株) は, 長崎大学 中山浩次名誉教授より供与された. *P. gingivalis* TDC60 株 は, 東京歯科大学 石原和幸教授より供与された. *P. gingivalis*, *Streptococcus gordonii* ATCC 35105 株 (American Type Culture Collection), および *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 株 (American Type Culture Collection) の培養は, hemin (5 μg/mL, WAKO) および menadione (1 μg/mL, Sigma-Aldrich) を含む trypticate soy broth (BD) に播種し, 嫌気条件下で行った. *P. gingivalis* の培養上清は, 定常期に達した培養細菌を 3,300 ×*g* で 3 分間遠心分離して回収した上清を Humedia KG-2 (Kurabo) に 1:50 の割合で添加して使用した [10].

2. 細胞の培養条件

ヒト不死化歯肉上皮細胞 [Immortalized Human gingival epithelial cells: IHGE 細胞 (epi 4 cell)] は, 大阪大学歯学研究科 村上伸也教授より供与され, Humedia KG-2 を用いて培養した.

三次元培養による歯肉上皮モデルは Takeuchi らの方法 [10] 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, pH7.4) に溶解した 0.2 mg/mL フィブロネクチン (Sigma-Aldrich) および 0.1% (w/v) ゼラチン (Nacalai Tesque) で交互に 1 分間インキュベートした. 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. これを 9 回繰り返すことで, フィブロネクチンおよびゼラチンのナノフィルムを歯肉上皮細胞にコーティングした. そして 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 24 ウェルプレート (Iwaki) に設置したカバースリップ上に，歯肉上皮細胞を $2\times10^6$ 個播種し，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.

3. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction : RT-PCR)

TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を用いて歯肉上皮細胞から RNA を抽出し，iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) にて逆転写反応を行い complementary DNA (cDNA) を合成した. 次に，得られた cDNA を鋳型として *JAM1, JAM2, JAM3, JAM4, CD2, CLMP, ESAM,* および *CXADR* 遺伝子のそれぞれに特異的なプライマーを用いた PCR を行い，アガロースゲル電気泳動にて DNA のバンドを検出した. RT-PCR で用いたプライマーを表 1 に示す.

**表 1. RT-PCR で使用したプライマー**

| プライマー名 | 塩基配列 forward (5'~3') | 塩基配列 reverse (5'~3') |
|---|---|---|
| JAM1 | GTGCCTTCAGCAACTCTTCC | ACCAGATGCCAAAAACCAAG |
| JAM2 | TGCTCTGAGTGGAACTGTGG | CACCTGCGATATCCAACAGA |
| JAM3 | CAGACAAGTGACCCCAGGAT | CAGCGATAAAGGGCTGAGTC |
| JAM4 | TCAAAGTGCAGTGAGCATCC | CCCCAAGTAGGCAATGAAAA |
| CD2 | CAGCCTGAGTGCAAAATTC | CTCTGTGGGCTCTTGTCTCC |
| CLMP | CAGGAGCAGTGACAGGCATA | TATTTGCTGTGGAGCGAGTG |
| ESAM | GCCCTTTGTGATGTGGTTCT | TTGCCTTGTTTGTCTTGCAC |
| CXADR | ATGCCCACTTCATGGTTAGC | GCGCTAGAGCAAGCAAAGTT |

4. プラスミドの作製

歯肉上皮細胞の染色体 DNA を鋳型とした PCR 法により *CXADR* 遺伝子を増幅させた. 次に, *CXADR* 遺伝子を鋳型とした Fusion PCR により, ヒトインフルエンザヘマグルチニン (HA) タグで標識された *CXADR* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて目的の塩基配列を増幅させた. 得られた PCR 産物を pCMV-Myc (Clontech) の *KpnI* 領域に挿入し, HA タグで標識された CXADR 全長をコードするプラスミドを作製した. 同様に *CXADR* 遺伝子を鋳型とした Fusion PCR により *CXADR* Δ(1-234), *CXADR* Δ(1-234) K235H, *CXADR* Δ(1-225) K235H, *CXADR* Δ(1-225) R226H K235H, *CXADR* Δ(1-144) K235H, *CXADR* Δ(1-144) R145H K235H 遺伝子を増幅させた. 得られた PCR 産物を pCMV-HA (Clontech) の *KpnI* 領域に挿入し, それぞれの遺伝子をコードするプラスミドを作製した.

Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR (Myc-tagged HA-inserted CXADR) をコードするプラスミドは, HA タグで標識された CXADR 全長を EcoRI および KpnI にて制限酵素処理し, pCMV-Myc に挿入することで構築した. HA-EGFP および EGFP-SEC61β をコードするプラスミドは, Takeuchi らの方法[26] で作成した. PCR は KOD Plus Neo (TOYOBO) を用いて行い, ライゲーションは T4 DNA リガーゼ (New England Bio Labs) を用いて行った.

5. CXADR 過剰発現株の作製

pCMV-HA-CXADR を pMRX-IRES-Puro (大阪大学大学院歯学研究科, 古田信道助教より供与) に挿入し, pMRX-IRES-Puro-CXADR を作成した. FuGENE 6 Transfection Reagent (Promega) を用い, pMRX-IRES-Puro-CXADR プラスミドを歯肉上皮細胞に形質導入した. 形質導入から 72 時間後, CXADR を安定発現する歯肉上皮細胞を Puromycin (2 μg/mL, InvivoGen) にて選択し, CXADR 過剰発現株として用いた.

6. RNA 干渉

Linear DNA (Sigma-Aldrich) を pSIREN-RetroQ (631,526, Clontech) もしくは pSINsi-hU6 neomysin (3,661, Takara) にライゲーションすることで, 標的とする JAM ファミリータンパク質およびホタルルシフェラーゼ (Luciferase: Luc) に対する short hairpin RNA (shRNA) をコードする以下のプラスミドを作製した; pSIREN-RetroQ-shJAM1 puromycin #110 および pSIREN-RetroQ-shJAM1 #508, pSINsi-hU6-shJAM1 #508, pSIREN-RetroQ-shCXADR #38 および #317, pSIREN-RetroQ-shCLMP #661 および #771, および pSIREN-RetroQ-shLuc. それぞれの標的配列を表 2 に示す. これらのプラスミドを FuGENE 6 Transfection Reagent を用いて歯肉上皮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 を安定発現する歯肉上皮細胞を Puromycin および G418（2 μg/mL, InvivoGen）にて選択した.

**表 2. RNA 干渉における標的配列**

| プラスミド名 | 標的配列 |
|---|---|
| pSIREN-RetroQ-shJAM1 #110 | 5’-AAGTCAGAATTCCTGAGAATAAT-3’ |
| pSIREN-RetroQ-shJAM1 #508 | 5’-GGGATAGTGATGCCTACGAATCC-3’ |
| pSINsi-hU6-shJAM1 #508 | 5’-GGGATAGTGATGCCTACGAATCC-3’ |
| pSIREN-RetroQ-shCXADR #38 | 5’-TAGTGGATTTCGCCAGAAGTTTG-3’ |
| pSIREN-RetroQ-shCXADR #317 | 5’-ATGTAACGAATTTACAACTGTCA-3’ |
| pSIREN-RetroQ-shCLMP #661 | 5’-GTGCGAGTAACTGTACAGTATGT-3’ |
| pSIREN-RetroQ-shCLMP #771 | 5’ -AAGGAAAGACAAAGAAAGATATG-3’ |
| pSIREN-RetroQ-shLuc | 5’-CGTACGCGGAATACTTCGA-3’ |

7. ウエスタンブロット法

ウエスタンブロット法は Takeuchi らの方法 [27] で行った. 歯肉上皮細胞を溶解し, 遠心分離により上清を回収した. 抽出したタンパク質液を sulfuric acid dodecyl sodium poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で分離し, ニトロセルロースメンブレン (0.2 μm, Bio-Rad) に転写した. 3% スキムミルクを添加した 0.1% Tween-20 含有 PBS (PBST) にメンブレンを移し, 室温で 15 分振盪してブロッキングを行った. 次に, PBST で 5000 倍希釈した一次抗体液にメンブレンを移し, 室温で 1 時間振盪した. 一次抗体として以下のものを使用した ; Mouse monoclonal anti-c-Myc (M4439, Sigma-Aldrich), Mouse monoclonal anti-HA (H3663, Sigma-Aldrich), Mouse monoclonal anti-JAM1 (SAB4200468, Sigma-Aldrich), Mouse monoclonal anti-β-Actin (A2228, Sigma-Aldrich), Rabbit monoclonal anti-CXADR (10799-R271, Sino Biological), Rabbit polyclonal anti-JAM2 (12972-1-AP, Proteintech), および Rabbit polyclonal anti-CLMP (16127-1-AP, Proteintech). メンブレンを PBST で 3 回洗浄後, PBST で 5000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体液に移し, 室温で 1 時間振盪した. 二次抗体として Goat anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase (7076, Cell Signaling Technology) および Goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase (7074, Cell Signaling Technology) を使用した. 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 Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) , ChemiDoc XRS (Bio-Rad), および Quantity One software package (Bio-Rad) にて解析した.

8. 免疫染色

歯肉上皮細胞の固定は，4% paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (WAKO) を使用した．透過処理は，PBS に Triton X-100 (WAKO) を濃度 0.1% で溶解したものを使用した．免疫染色のブロッキングには，PBS に gelatin fine powder (1631-92, Sigma-Aldrich) を濃度 0.1% で溶解させたものを使用した．次に，PBS で 500 倍希釈した一次抗体液を室温で 1 時間反応させた．一次抗体として以下のものを使用した ；Mouse monoclonal anti-c-Myc, Mouse monoclonal anti-HA, Mouse monoclonal anti-JAM1, Rabbit monoclonal anti-CXADR, Rabbit monoclonal anti-HA (3724, Cell Signaling Technology), および Rabbit monoclonal anti-translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOMM20 ; ab78547, Abcam). PBS で 3 回洗浄した後，二次抗体反応を室温で 1 時間行った．二次抗体として以下のものを使用した ；FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (A-11001, MBL), Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit igG (A-11008, Invitrogen), Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (A-11004, Invitrogen), および Alexa Fluor 635-conjugated goat anti-rabbit IgG (A-31576, Invitrogen). 歯肉上皮細胞の核染色には 4’,6-diamidino-2-phenylindole：DAPI (D1306, Invitrogen), アクチン染色には Alexa Fluor 568-conjugated phalloidin (A12380, Invitrogen) および Alexa Fluor 633-conjugated phalloidin (A22284, Invitrogen) を使用した. PBS で 3 回洗浄した後, VECTASHIELD Mounting Medium (VECTOR LABORATORIES) を用いて試料を封入した．細胞の観察は共焦点顕微鏡 (SP8, Leica) および 64× 油浸対物レンズを用いて行った.

9. 歯肉上皮細胞のバリア機能の評価

*P. gingivalis* PGN は Ishii らの方法[28)] に従い作成した. FITC- *P. gingivalis* LPS および FITC- *P. gingivalis* PGN は, *P. gingivalis* LPS (InvivoGen) および *P. gingivalis* PGN を Fluorescein Labeling Kit-NH2 (LK01, DOJINDO) で標識し作成した. その他トレーサーとして, FITC-dextran 40 kDa (Sigma-Aldrich), 大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の LPS (*E. coli* LPS, Sigma-Aldrich), および黄色ブドウ球菌 (*Streptoccocus aureus*) 由来の PGN (*S. aureus* PGN, Sigma-Aldrich) を使用した. 歯肉上皮細胞を 12-well cell culture insert (Corning) 上で, 各種トレーサーを含む培地で培養し, 30 分後に上皮細胞層を透過したトレーサー量を 1420 ARVO X (PerkinElmer) および WorkOut Plus software (PerkinElmer) を用いて測定した.

10. 統計学的解析

両側 *t* 検定, 片側 *t* 検定および 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 Excel application (Microsoft) を用いた. $p < 0.05$ を有意差ありとした.

# 結果

## 1. ジンジパインにより影響を受ける JAM ファミリータンパク質の探索

歯肉の上皮バリアに関与する JAM1 以外の細胞接着分子として, JAM1 と類似したアミノ酸配列をもつ JAM ファミリータンパク質 [9] である JAM2, JAM3, JAM4, CXADR, CD2, CLMP, および ESAM の歯肉上皮細胞における発現を調べた. 歯肉上皮細胞の cDNA を鋳型とした RT-PCR を行ったところ, 歯肉上皮細胞において *JAM1* に加えて *JAM2*, *CLMP*, および *CXADR* の発現が確認された. 一方, *JAM3, JAM4, CD2,* および *ESAM* の明らかな発現は認めなかった (図 1A).

次に, 歯肉上皮細胞において発現している JAM ファミリータンパク質のなかで, *P. gingivalis* が産生するジンジパインによって分解されるものを探索した. 歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* ATCC 33277 株 (野生株) または *P. gingivalis* KDP136 Δ*kgp*Δ*rgpA*Δ*rgpB* 株 (ジンジパイン欠失株) を感染多重度 (multiplicity of infection: MOI) 100 で 1 時間感染させ, ウエスタンブロット法によりタンパク量を解析した. その結果, 非感染の歯肉上皮細胞と比較し, *P. gingivalis* 野生株を感染させた細胞では JAM1, CXADR, および CLMP のタンパク量が減少した. 一方, ジンジパイン欠失株の感染による JAM1, CXADR, および CLMP の明らかなタンパク量の変化は認めなかった. また, *P. gingivalis* 野生株感染による JAM2 の明らかなタンパク量の変化は認めなかった (図 1B). これらの結果から, ジンジパインは JAM1 に加えて, CXADR および CLMP を選択的に分解することが示唆された.

次に, CXADR および CLMP が歯肉上皮細胞層の異物透過性に与える影響を調べるため, 標的遺伝子に対する shRNA (small hairpin RNA) をコードした配列 (JAM1; shJAM1 #110 および shJAM1 #508, CXADR; shCXADR #38 および shCXADR #317, CLMP; shCLMP #661 および shCLMP #771) を pSiren-RetroQ に組み込み, 作成したベクターを歯肉上皮細胞に形質導入した. 歯肉上皮細胞にお

ける JAM1, CXADR, および CLMP のノックダウンの奏功をウエスタンブロット法により確認した (図 2B, C, D). これらの細胞を cell culture insert 上で, 透過性を評価するトレーサーとして 40 kDa の蛍光デキストラン, FITC- *P. gingivalis* LPS, および FITC- *P. gingivalis* 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 2A). その結果, CXADR または JAM1 をノックダウンした歯肉上皮細胞層は, コントロールとして使用した shLuc と比較し, 40 kDa 蛍光デキストラン, FITC- *P. gingivalis* LPS, および FITC- *P. gingivalis* PGN に対する透過性が有意に高かった. 一方, CLMP をノックダウンした歯肉上皮細胞層ではこれらのトレーサーに対する透過性の明らかな変化を認めなかった (図 2E, F, G). これらの結果より, CXADR は JAM1 とともに歯肉上皮のバリア機能に関与している可能性が示された. また, *P. gingivalis* の菌体成分による影響を排除するため, *P. gingivalis* 野生株の培養上清を作成し, 歯肉上皮細胞に添加した. 1 時間後, ウエスタンブロット法によりタンパク量を解析したところ, *P. gingivalis* 野生株の培養上清を添加した歯肉上皮細胞は, 非添加のものと比較して CXADR のタンパク量の減少が認められた. 一方, ジンジパイン欠失株の培養上清を添加したものでは, 非添加のものと比較して明らかな変化を認めなかった (図 3). これらの結果から, *P. gingivalis* から分泌されたジンジパインが CXADR を分解していることが示唆された.

次に, 歯肉上皮細胞において *P. gingivalis* が CXADR に与える形態学的な影響について共焦点顕微鏡を用いて観察した. 非感染の歯肉上皮細胞において CXADR は主に細胞膜上に局在していた. また, *P. gingivalis* 野生株を 1 時間感染させると, 細胞膜上に局在する CXADR の量が減少した. 一方, *P. gingivalis* ジンジパイン欠失株感染による CXADR の局在量に明らかな変化を認めなかった (図 4A). 次に, 三次元培養による歯肉上皮モデル [29] を作製し, *P. gingivalis* 野生株またはジンジパイン欠失株を感染させた後, 歯肉上皮モデル深部の CXADR の局在を共焦点顕微鏡にて観察した. 感染 2 時間後, *P. gingivalis* 野生株を感染させた歯肉上皮モデル

における CXADR の局在量は, 表層から 3〜4 層深部でも減少していた (図 4B). 一方, ジンジパイン欠失株を感染させた三次元歯肉上皮モデルでは, 非感染のものと比較して CXADR の局在量に明らかな変化を認めなかった. これらの結果から, ジンジパインは歯肉上皮モデルの深部まで侵入し, CXADR を分解することが示唆された.

## 2. 歯肉上皮細胞における CXADR の細胞内輸送経路

*P. gingivalis* は歯肉上皮細胞内に侵入することが報告されており [30], 細胞膜上の CXADR だけでなく細胞内の CXADR も分解している可能性がある. そのため, 歯肉上皮細胞内に局在する CXADR を確認し, *P. gingivalis* 感染による影響を評価する必要があるが, CXADR の細胞膜への輸送経路は未だ解明されていない. CXADR は 365 のアミノ酸からなる膜貫通型タンパク質で, 細胞外にシグナルペプチド, 2 つの Ig-like ドメイン, 細胞膜上に TMD, 細胞内に PDZ ドメインが存在する [31, 32]. シグナルペプチド切断の前後で CXADR が局在するオルガネラを確認するために, Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR キメラタンパク質を作成した (図 5). 歯肉上皮細胞における Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR の局在を調べるため, 透過処理の有無による染色への影響を確認した. まず, HA タグのついた enhanced green fluorescent protein (HA-EGFP) を形質導入した歯肉上皮細胞を作製し, HA 抗体を用いて染色した. その結果, 透過処理した歯肉上皮細胞では, HA-EGFP タンパク質が抗 HA 抗体で染色されたが, 透過処理がされていない歯肉上皮細胞では染色されなかった (図 6A). 一方, Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR タンパク質は, 透過処理を行わなくても HA 抗体で染色することができた (図 6B). このことから, Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR は, 細胞膜に適切に輸送されたと考えられる.

次に, 歯肉上皮細胞における EGFP-SEC61β (小胞体に局在), および TOMM20 (ミトコンドリアに局在) との共局在率を共焦点顕微鏡にて確認した. その結果,

SEC61β では Myc タグと HA タグとの共局在が検出された (図 7). 一方, TOMM20 とは共局在がみられなかった (図 8). これらの結果から, CXADR は細胞内膜系により輸送されていることが示唆された. さらに, 歯肉上皮細胞のアクチン (Phalloidin 染色) は, Myc タグではなく, HA タグと共局在していることがわかった (図 9) . これらの結果から, Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR は, 小胞体に局在し, 適切にシグナルペプチドが切断され, 細胞膜に輸送されることが示唆された.

### 3. *P. gingivalis* の細胞膜および細胞内に局在する CXADR への影響

細胞膜に局在する CXADR および細胞内 CXADR における *P. gingivalis* の分解能を調べるため, Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を発現する歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* を 1 時間もしくは 2 時間感染させ, CXADR のタンパク量を解析した. その結果, *P. gingivalis* 感染により, HA タグで染色される細胞膜 CXADR のタンパク量は非感染と比較して減少した (図 10A). 一方, Myc タグで染色される細胞内 CXADR のタンパク量は *P. gingivalis* 感染後も非感染と比較して明らかな変化を認めなかった (図 10A). このことから, *P. ginigivalis* は細胞膜に局在する CXADR を標的にしていることが示唆された. また, *P. gingivalis* 野生株として使用している, *P. gingivalis* ATCC 33277 株以外の菌株が CXADR に与える影響を調べるため, 重度歯周病患者から単離した *P. gingivalis* TDC60 株 [33] を歯肉上皮細胞へ同様に感染させたところ, 非感染と比較して細胞膜 CXADR のタンパク量が顕著に減少した (図 10B). 一方, 細胞内 CXADR のタンパク量は *P. gingivalis* TDC60 株感染後も非感染と比較して明らかな変化を認めなかった (図 10B). このことから, *P. gingivalis* の他の菌株も細胞膜に局在する CXADR を標的にして分解することが示唆された.

**4.　*S. gordonii* および *F. nucleatum* 感染による CXADR への影響**

*P. gingivalis* 以外の菌が歯肉上皮細胞で発現する CXADR に与える影響についても検討した. *S. gordonii* および *F. nucleatum* は, ヒトの口腔内に生息し, 歯周病原性バイオフィルムの形成に関与する細菌である [34]. これら菌種が CXADR に与える影響を調べるため, Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を発現する歯肉上皮細胞に *S. gordonii* または *F. nucleatum* を 1 時間または 2 時間感染させウエスタンブロット法によりタンパク量を解析した. その結果, HA タグで染色される細胞膜 CXADR および Myc タグで染色される細胞内 CXADR のタンパク量は *S. gordonii* および *F. nucleatum* 感染による明らかな変化を示さなかった (図 10C, D). このことから, *S. gordonii* および *F. nucleatum* は CXADR を分解できないことが示唆された.

**5.　ジンジパインによる CXADR の分解における R145 および K235 アミノ酸残基の関与**

ジンジパインにはタンパク質のアルギニン残基を切断する Rgp, およびリシン残基を切断する Kgp が存在している. ジンジパインの CXADR の分解に関与するアミノ酸残基を確認するために, CXADR の N 末端欠失変異体, およびアルギニン残基およびリシン残基を同じ塩基性アミノ酸であるヒスチジンに点変異させたプラスミドを作製し, 歯肉上皮細胞に形質導入した. これらの歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* を 1 時間感染させ, ウエスタンブロット法によりタンパク量を解析した (図 11A).

まず, アミノ酸配列の 137-138 番目に HA タグを挿入した CXADR 全長および, CXADR の 1-234 番目を欠失させた CXADR Δ(1-234), 同じ部位の欠失変異体に 235 番目のリシンをヒスチジンに点変異した変異体 CXADR Δ(1-234) K235H を用い, *P. gingivalis* 感染による影響をウエスタンブロット法により比較した. その結果, CXADR 全長および CXADR Δ(1-234) は分解を受けたが, CXADR Δ

(1-234) K235H は分解を受けなかった (図 11B). この結果は, K235 がタンパク質の分解に関与していることを示している.

次に, CXADR の 1-225 番目を欠失させ K235 をヒスチジンに点変異した CXADR Δ(1-225) K235H, および, さらに R226 をヒスチジンに点変異した変異体 CXADR Δ(1-225) R226H K235H を比較した. その結果, CXADR Δ(1-225) K235H および CXADR Δ(1-225) R226H K235H のタンパク量は, *P. gingivalis* 感染後も減少しなかった (図 11B). このことから, R226 はジンジパインによる分解には関与していないと考えられた.

最後に, CXADR の 1-144 番目を欠失させ K235 をヒスチジンに点変異した CXADR Δ(1-144) K235H, および, さらに R145 をヒスチジンに点変異した変異体 CXADR Δ(1-144) R145H K235H を同様の実験により比較した. その結果, CXADR Δ(1-144) K235H のタンパク量は *P. gingivalis* 感染によって低下したが, CXADR Δ(1-144) R145H K235H のタンパク量は減少しなかった (図 11B). これらの結果から, CXADR の R145 残基と K235 残基がジンジパインによる分解に関与することが明らかになった.

### 6. 歯肉上皮モデルの異物透過性における CXADR の役割

次に, 三次元歯肉上皮モデルの異物透過性に CXADR の発現が及ぼす影響について検討した. 三次元歯肉上皮モデルに関しては, *P. gingivalis* 感染により異物透過性が亢進すること, および JAM1 ノックダウンにより異物透過性が亢進することが報告されている [10]. 三次元歯肉上皮モデルの異物透過性における CXADR の役割を調べるため, shLuc または shCXADR を安定発現する三次元歯肉上皮モデルを作製した. CXADR のノックダウンの奏功は, 共焦点顕微鏡にて確認した (図 12B). これらの歯肉上皮モデルを cell culture insert 上で, 透過性を評価するトレーサーとして 40 kDa の蛍光デキストラン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 12A). その結果, CXADR をノッ

クダウンした歯肉上皮モデルでは, shLuc を発現させたものと比較して, 40 kDa 蛍光デキストランの透過性が有意に亢進した (図 12C). また, FITC- *P. gingivalis* LPS および FITC- *P. gingivalis* PGN の透過性も同様に亢進した (図 12D, E).

次に, CXADR のノックダウンにより, *P. gingivalis* 以外の菌が産生した LPS および PGN の透過性も亢進する可能性を検討した. *E. coli* LPS および *S. aureus* PGN に対する歯肉上皮組織の透過性を調べた結果, CXADR をノックダウンした歯肉上皮モデルでは, 投与 30 分後に FITC で標識された *E. coli* LPS (FITC- *E. coli* LPS) および *S. aureus* PGN (FITC- *S. aureus* PGN) に対する透過性の亢進が認められた (図 12 F, G). これらの結果から, CXADR が歯肉上皮周囲に存在する種々の LPS および PGN に対する透過性の制御に関与する可能性が示された.

### 7. CXADR と JAM1 の独立した補完性

CXADR と JAM1 はともに類似したアミノ酸配列をもつ JAM ファミリーのタンパク質に属していることから [9], それぞれのタンパク質が相互に依存して機能する可能性がある. そこで, JAM1 をノックダウンした歯肉上皮細胞における CXADR のタンパク量, および CXADR をノックダウンした歯肉上皮細胞における JAM1 のタンパク量をウエスタンブロット法により解析した. その結果, JAM1 をノックダウンした歯肉上皮細胞では JAM1 の発現をほとんど認めなかったのに対し, CXADR の発現は shLuc を形質導入した歯肉上皮細胞と同程度確認できた. 同様に, CXADR をノックダウンした歯肉上皮細胞では, shLuc を形質導入した歯肉上皮細胞と同程度の JAM1 の発現が確認できた (図 13A). 次に, 三次元歯肉上皮モデルにおける CXADR と JAM1 の局在に対する相互依存性を評価するため, JAM1 をノックダウンした歯肉上皮モデルにおける CXADR の局在, および CXADR をノックダウンした歯肉上皮モデルにおける JAM1 の局在を共焦点顕微鏡にて観察した. その結果, JAM1 のノックダウンにより, 歯肉上皮モデルの JAM1 の局在量が顕著に減少したのに対し, CXADR の局在量は表層から 3〜4 層

深部の組織でも shLuc を形質導入した歯肉上皮モデルと比較して明らかな差を認めなかった (図 13B). 同様に, CXADR のノックダウンでは, 歯肉上皮モデルの CXADR の局在量が顕著に減少したのに対し, JAM1 の局在量は表層から 3〜4 層深部の組織でも shLuc を形質導入した歯肉上皮モデルと比較して明らかな差を認めなかった (図 13B). また, CXADR と JAM1 のダブルノックダウンでは, 両方のタンパク質が組織から消失した (図 13B). これらの結果から, 歯肉上皮モデルにおいて CXADR と JAM1 の発現と局在は相互依存性を有さないことが示唆された.

最後に, CXADR と JAM1 のいずれかをノックダウンした歯肉上皮モデルで透過性実験を行うと, shLuc を形質導入した歯肉上皮モデルと比較して歯肉上皮における 40 kDa 蛍光デキストランの透過性が亢進した. また, JAM1 と CXADR をダブルノックダウンすると, JAM1 または CXADR 単独のノックダウンと比較し, さらに透過性が亢進した (図 13C). これらの結果から, CXADR は JAM1 と独立して歯肉上皮のバリア機能を担うと考えられる.

### 8. CXADR の分解によるジンジパインの歯肉上皮細胞深部への侵入

歯肉上皮細胞おいてジンジパインは JAM1 を分解することで上皮深層に侵入することが報告されている [10]. そこで, 上層と下層に分けられた 2 層構造の細胞培養モデルを用いて, 上層には歯肉上皮細胞を培養し, 下層には Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を形質導入した歯肉上皮細胞を培養した (図 14A). この二層構造の細胞培養モデルにて, *P. gingivalis* 野生株およびジンジパイン欠失株の培養上清を添加し, 6 時間後, 下層の歯肉上皮細胞における Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR の局在を共焦点顕微鏡にて確認した. その結果, 非添加のものと比較して, *P. gingivalis* 野生株の培養上清を添加したものは HA タグで染色された細胞膜 CXADR の局在量が減少した. 一方, Myc タグで染色された細胞内 CXADR の局在量は非添加のものと比較して明らかな差を認めなかった. また, ジンジパイン欠失株の培養上清を添加したものでは, HA タグで染色された細

胞膜 CXADR および Myc タグで染色された細胞内 CXADR は共に非添加のものと比較して明らかな差を認めなかった (図 14B, 図 15).

次に, CXADR を過剰に発現させた歯肉上皮細胞への *P. gingivalis* の影響を調べた. CXADR を過剰発現させた歯肉上皮細胞を *P. gingivalis* を含む培地で 30 分間培養しても, CXADR のタンパク量は非感染の歯肉上皮細胞とおおよそ同程度検出された (図 16). また, CXADR を過剰発現させた歯肉上皮細胞を上記の 2 層モデルの上層で培養し, *P. gingivalis* の培養上清を添加後, 同様の実験を行った (図 14A). その結果,下層の HA タグで染色された細胞膜 CXADR の局在量は, 培養上清を添加していない歯肉上皮細胞野生株と明らかな差を認めなかった (図 14B, 図 15). これらの結果から, 歯肉上皮細胞おいてジンジパインは JAM1 だけでなく CXADR も分解することで上皮深層に侵入することが示唆された.

**9. 歯肉上皮モデルにおける *P. gingivalis* の CXADR 分解による異物透過性の亢進**

以前の研究において, *P. gingivalis* 感染により歯肉上皮モデルの異物透過性が亢進することが報告されている [10]. この現象に *P. gingivalis* 感染による CXADR の分解が関与しているかどうかを調べるため, 歯肉上皮細胞の野生株および CXADR を過剰発現させた歯肉上皮細胞を用いて三次元歯肉上皮モデルを作製した. これらの歯肉上皮モデルに *P. gingivalis* を 30 分感染後, 共焦点顕微鏡で CXADR の局在を調べたところ, 歯肉上皮モデル野生株における CXADR 局在量は減少した. 一方, CXADR を過剰発現させた歯肉上皮モデルは *P. gingivalis* 感染後も表層および深部において CXADR の局在が確認された (図 17B).

次に, これらの歯肉上皮モデルを cell culture insert 上で培養し, *P. gingivalis* を感染させるとともに, 40 kDa 蛍光デキストラン, FITC- *P. gingivalis* LPS, または FITC- *P. gingivalis* PGN を添加し, 30 分後, 細胞層を透過したトレーサー量を測定した (図 17A). その結果, 歯肉上皮モデル野生株は *P. gingivalis* 感染によりこれ

らトレーサーの透過性が亢進したのに対し, CXADR を過剰発現させた歯肉上皮モデルは, *P. gingivalis* 感染による透過性の亢進を抑制した (図 17C, D, E). 同様に, FITC- *E. coli* LPS および FITC- *S. aureus* PGN を用いた透過性実験においても, 歯肉上皮モデル野生株は *P. gingivalis* 感染によりこれらトレーサーの透過性が亢進したのに対し, CXADR を過剰発現させた歯肉上皮モデルは, *P. gingivalis* 感染による透過性の亢進を抑制した (図 17F, G). これらの結果から, *P. gingivalis* 感染による CXADR の分解が, LPS および PGN の歯肉上皮への侵入に重要であることが示された.

# 考察

本研究では，*P. gingivalis* 感染により歯肉上皮バリアの破綻が生じる分子基盤について, JAM ファミリータンパク質に焦点を当て検討を行った．その結果, JAM ファミリータンパク質のひとつである CXADR は歯肉上皮細胞で発現し，歯肉上皮のバリア機能を担う細胞接着分子として JAM1 と独立して機能していることが示された．また，*P. gingivalis* が産生するジンジパインは JAM1 と CXADR を分解することで歯肉上皮のバリア機能を破綻させ, LPS, PGN，およびジンジパインを歯肉上皮組織の深部へ誘導することが示唆された (図 18).

また，*P. gingivalis* は CXADR の R145 および K235 のアミノ酸残基を分解することも本研究で明らかとなった．以前の研究において，ジンジパインは歯肉上皮細胞の JAM1 の K134 および R234 のアミノ酸残基を分解することが示されている [10]．JAM1 の R234 および, CXADR の K235 は，ともに膜貫通ドメインと Ig-like ドメインの間のヒンジ領域に存在している．この領域には，N-グリコシル化および，$\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどのタンパク質の二次構造は含まれておらず [35, 36]，アミノ酸残基が露出した構造となっているため，ジンジパインの分解を受けるのではないかと考えられる．また，CXADR および JAM1 は N 末端側の Ig-like ドメインで二量体を形成することが報告されており [37, 38]，ジンジパインは膜貫通ドメインに近接した部位を標的とすることで，効率的に JAM1 や CXADR の機能を障害していると考えられる．

本研究において，*P. gingivalis* は歯肉上皮細胞内のシグナルペプチドを有する未成熟な CXADR ではなく，細胞膜上の成熟した CXADR を分解することが示された．*P. gingivalis* により切断された CXADR の N 末端側は，膜貫通ドメインを持たない形で細胞外に移行すると考えられる．CXADR には膜貫通ドメインを持たない可溶型のアイソフォームが存在することが報告されている [39, 40]．HeLa 細胞において，可溶型 CXADR は心筋炎の原因として知られる Coxsackievirus B3 (CVB3)

と細胞膜上で発現する CXADR の結合を阻害し，CVB3 の細胞内侵入を抑制することが報告されている[40]．今回，ジンジパインにより分解された CXADR の N 末端側も，細胞膜で発現する細胞接着分子と結合し，さらなる機能障害を引き起こす可能性がある．

また本研究では，*P. gingivalis* 以外の菌種として，*S. gordonii* および *F. nucleatum* を用いて，歯肉上皮細胞で発現する CXADR に与える影響について検討した．その結果，CXADR は *S. gordonii* および *F. nucleatum* 感染により分解されず，今回検討した菌種の中で CXADR の分解能を示したものは *P. gingivalis* のみであった．しかし，*P. gingivalis* とともに Red complex に分類され[41]，歯周炎の発症と進行に強く関連する *Treponema denticola* や *Tannerella forsythia* が JAM1 や CXADR に与える影響については分かっていない． *T. denticola* はセリンプロテアーゼである dentilisin とオリゴペプチダーゼ B を発現し[42, 43]，*T. forsythia* はシステインプロテアーゼである forsythia detachment factor を発現することが報告されている[44]．今後，これらのプロテアーゼが CXADR や JAM1 に与える影響について，さらなる検討が必要である．

また，今回検討した JAM ファミリータンパク質のひとつである JAM2 は *P. gingivalis* 感染による分解を受けなかった．JAM2 は JAM1 および CXADR と同じく 2 つの Ig-like ドメインと膜貫通ドメインを持ち，JAM1 と約 30% のアミノ酸配列の相同性をもつ膜貫通タンパク質である[45]． JAM2 は，シグナルペプチドと Ig-like ドメインの間，Ig-like ドメインの間，または膜貫通ドメインと Ig-like ドメインの間のヒンジ領域に，ジンジパインの標的となるリシンおよびアルギニン残基を認めない[46]．タンパク質の二次構造を持たない脆弱な部位にジンジパインが標的とするアミノ酸残基をもたないことが，JAM2 が分解を受けない理由と考えられる．また，JAM ファミリータンパク質以外の細胞接着分子に関して，Claudin (CLDN) 1 や CLDN 4 は *P. gingivalis* 感染により分解されないことが報告されている[10]．これに関しても JAM ファミリーと CLDN ファミリーのタンパク構造の

違いが関与している可能性がある．JAM ファミリータンパク質は 1 つの膜貫通ドメインを有しているが，CLDN ファミリーはテトラスパンの膜貫通型タンパク質であり，2 つの細胞外ループを有している [4]．ジンジパインは，細胞外に露出した JAM1 および CXADR のアミノ酸を標的としていたことから，JAM ファミリーと CLDN ファミリーの細胞外のタンパク質の構造の違いがジンジパインによる分解の受けやすさに関与している可能性がある．

今回，JAM ファミリータンパク質のひとつである CLMP が歯肉上皮細胞の異物透過性に与える影響についても評価した．その結果，shCLMP #771 を形質導入した歯肉上皮細胞は，40 kDa 蛍光デキストラン，FITC- *P. gingivalis* LPS，および FITC- *P. gingivalis* PGN の透過性に明らかな影響を認めなかった (図 2E, F, G)．しかし，shCLMP #661 を形質導入した歯肉上皮細胞では FITC- *P. gingivalis* PGN の透過性が，JAM1 や CXADR のノックダウンと比較して透過量は低いものの，shLuc と比較して有意に亢進した (図 2G)．shCLMP #661 と shCLMP #771 の表現型の違いはオフターゲット効果によるものと考えられる．CLMP は MDCK 細胞における上皮バリアに影響を与えることが報告されており [47]，ノックダウン効率をさらに高めた場合，歯肉上皮細胞における異物透過性が亢進する可能性が考えられる．今回は CXADR に着目して研究を進めたが，今後は CLMP の歯肉上皮細胞における機能についても調べていきたい．

本研究で得られた結果は，歯周病原性因子が歯周組織内に侵入する分子機構の解明に寄与するものと考える．今後さらなる検討を加え，歯肉上皮バリアの分子機構の全貌を明らかにしたいと考えている．

# 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えていただき，終始にわたりご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分子免疫制御学講座(予防歯科学) 天野敦雄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，直接の御指導と御鞭撻を賜りました同口腔分子免疫制御学講座 (予防歯科学) 竹内洋輝講師に深謝致します．

最後に，本研究に際し，幅広い御援助と御協力を頂きました予防歯科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます．

# 参考文献


1) Richard, B. P., Richard, J. J. (2002) : Making Sense of the Epithelial Barrier: What Molecular Biology and Genetics Tell Us About the Functions of Oral Mucosal and Epidermal Tissues. *J Dent Educ.* **66 (4)**, 564-574.

2) Hubert, E.S., Max, A. L. (1997) : The gingival tissue: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000*. **13**, 91-120.

3) Sabine, E. G., Joerg, M. (2015) : Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol 2000*. **69 (1)**, 46-67.

4) Tsukita, S., Furuse, M., Itoh, M. (2001) : Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2 (4)**, 285-293.

5) Laslie, A. M., Michel, K. (2010) : Specificity of interaction between *Clostridium perfringens* enterotoxin and Claudin-family tight junction proteins. *Toxins (Basel)*. **2 (7)**, 1595-1611.

6) Douglas, R. D., Brian, W. B., Richard, P. D. (2004) : Modulation of the innate response within the periodontium. *Periodontol 2000.* **35**, 53-74.

7) Georgios, N. B., Jeannette, I. K., Thomas, T., *et al*. (2015) : The expression of gingival epithelial junctions in response to subgingival biofilms. *Virulence.* **6 (7)**, 704-709.

8) Liang, T. W., DeMacro, R. A., Mrsny, R. J., *et al.* (2000) : Characterization of huJAM; evidence for involvement in cell-cell contact and tight junction regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* **279 (6)**, C1733-1743.

9) Klaus, E., Suzuki, A., Ohno, S., *et al*. (2004) : Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*. **117**, 19-29.

10) Takeuchi, H., Sasaki, N., Yamaga, S., *et al*. (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.

11) Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., *et al*. (2012) : Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res.* **91 (10)**, 914-920.

12) George, H. (2014) : Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* **35 (1)**, 3-11.

13) Bruce, L. P., Bryan, S. M., Newell, W. J. (2005) : Periodontal diseases. *The Lancet.* **366 (9499)**, 1809-1820.

14) Aida, J., Ando, Y., Akhter, R., *et al*. (2006) : Reasons for permanent tooth extractions in Japan. *J Epidemiol.* **16(5)**, 214-219.

15) Kawai, T., Akira, S. (2011) : Toll-like receptors and their cross talk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* **34 (5)**, 637-650.

16) König, J., Wells, J., Cani, P. D., *et al.* (2016) : Human intestinal barrier function in health and disease. *Clin Transl Gastroenterol.* **7 (10)**, e196.

17) Wolf, A. J., Underhill, D. M. (2018) : Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* **18 (4)**, 243-254.

18) Pirkko, J. P., Tiina, V. R., Georg, A., *et al.* (2004) : Severe periodontitis enhances macrophage activation via increased serum lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **24 (11)**, 2174-2180.

19) Shaddox, L. M., Wiedley, J., Calderon, N. L., *et al.* (2011) : Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res.* **90 (9)**, 1140-1144.

20) Richard, J. L., Hyun, K., George, H. (2018) : The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* **16 (12)**, 745-759.

21) Potempa, J., Pike, R., Travis, J. (1995) : The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of Porphyromonas gingivalis are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun.* **63 (4)**, 1176-1182.

22) Nakayama, K., Kadowaki, T., Okamoto, K., *et al*. (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 (40)**, 23619-23626.

23) Kadowaki, T., Yoneda, M., Okamoto, K., *et al*. (1994) : Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of Porphyromonas gingivalis. *J Biol Chem.* **269 (33)**, 21371-21378.

24) Baba, A., Abe, N., Kadowaki, T., *et al*. (2001) : Arg-gingipain responsible for the degradation of cell adhesion molecules of human gingival fibroblasts and their death induced by Porphyromonas gingivalis. *J Biol Chem.* **382 (5)**, 817-824.

25) Katz, J., Sambandam, V., Wu, J. H., *et al*. (2000) : Characterization of Porphyromonas gingivalis-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun.* **68 (3)**, 1441-1449.

26) Takeuchi, H., Takada, A., Kuboniwa, M., and Amano, A. (2016) : Intracellular periodontal pathogen exploits recycling pathway to exit from infected cells. *Cell Microbiol*. **18 (7)**, 928-948.

27) Takeuchi, H., Takanori, H., Sarah, E, W., *et al*. (2013) : The Serine Phosphatase SerB of Porphyromonas gingivalis Suppresses IL-8 Production by Dephosphorylation of NF-κB RelA/p65. *PLoS Pathog.* **9 (4)**, e1003326.

28) Ishii, K., Hamamoto, H., Imamura, K., *et al.* (2010) : Porphyromonas gingivalis peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J Biol Chem*. **285 (43)**, 33338–33347.

29) Nishiguchi, A., Yoshida, H., Matsusaki, M., and Akashi, M. (2011) : Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube network by the cell-accumulation technique. *Advanced Materials*. **23 (31)**, 3506–3510.

30) Amano, A., Furuta, N., Tsuda, K. (2010) : Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens. *Periodontol 2000.* **52(1)**, 84-93.

31) Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., *et al*. (1997) : Isolation of a common receptor for coxsackie B virus and adenoviruses 2 and 5. *Science.* **275 (5304)**, 1320–1323.

32) Tomko, R. P., Xu, R., Philipson, L. (1997) : HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *PNAS*. **94 (7)**, 3352–3356.

33) Watanabe, T., Maruyama, F., Nozawa, T., *et al*. (2011) : Complete genome sequence of the bacterium Porphyromonas gingivalis TDC60, which causes periodontal disease. *J Bacteriol*. **193 (16)**, 4259-4260.

34) Paul, E. K., Roxanna, N. A., David, S. B., *et al*. (2002) : Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66 (3)**, 486–505.

35) Uniplot, JAM1: https://www. uniprot.org/uniprot/Q9Y624

36) Uniplot, CXADR: https://www.uniprot.org/uniprot/P78310

37) Kenneth, J. M., Ingrid, C. M., Charies, A. P. (2004) : Involvement of the junctional adhesion molecule-1 (JAM1) homodimer interface in regulation of epithelial barrier function. *J Biol Chem.* **279 (16)**, 16254–16262.

38) Christopher, P., Klaas, E. M., Joachim, B., *et al.* (2010) : The coxsackievirus-adenovirus receptor reveals complex homophilic and heterophilic interactions on neural cells. *J Neurosci.* **30 (8)**, 2897–2910.

39) Katherine, J. D. A. E., Jonathan, R. B., Priyanka, S. (2014) : Alternative splicing of viral receptors: A review of the diverse morphologies and physiologies of adenoviral receptors. *Recent Res Dev Virol.* **9**. 1-24.

40) Andrea. D., DingDing. X., Kellie. C., *et al.* (2004) : Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection. *J Biol Chem.* **279 (18)**, 18497-18503.

41) Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., *et al*. (1998) : Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* **25 (2)**, 134–144.

42) Fenno, J. C., Lee, S. Y., Bayer, C. H., and Ning, Y. (2001) : The opdB locus encodes the trypsin-like peptidase activity of Treponemma denticola. *Infect Immun*. **69 (10)**, 6193–6200.

43) Ishihara, K., Miura, T., Kuramitsu, H. K., and Okuda, K. (1996) : Characterization of the Treponema denticola prtP gene encoding a prolyl-phenylalaninespecific protease (dentilisin). *Infect Immun*. **64 (12)**, 5178–518.

44) Nakajima, T., Tomi, N., Fukuyo, Y., *et al*. (2006) : Isolation and identification of a cytopathic activity in Tannerella forsythia. *Biochem Biophys Res Commun*. **351 (1)**, 133–139.

45) Michel, A. L., Caroline, J. L., Cindy, W., *et al*. (2001) : Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood.* **98**, 3699-3707.

46) Uniplot, JAM2: https://www.uniprot.org/uniprot/P57087

47) Elisabeth, R., Ulla, E., Ralf, F. P., *et al.* (2004) : CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem.* **279 (1)**, 796-804.

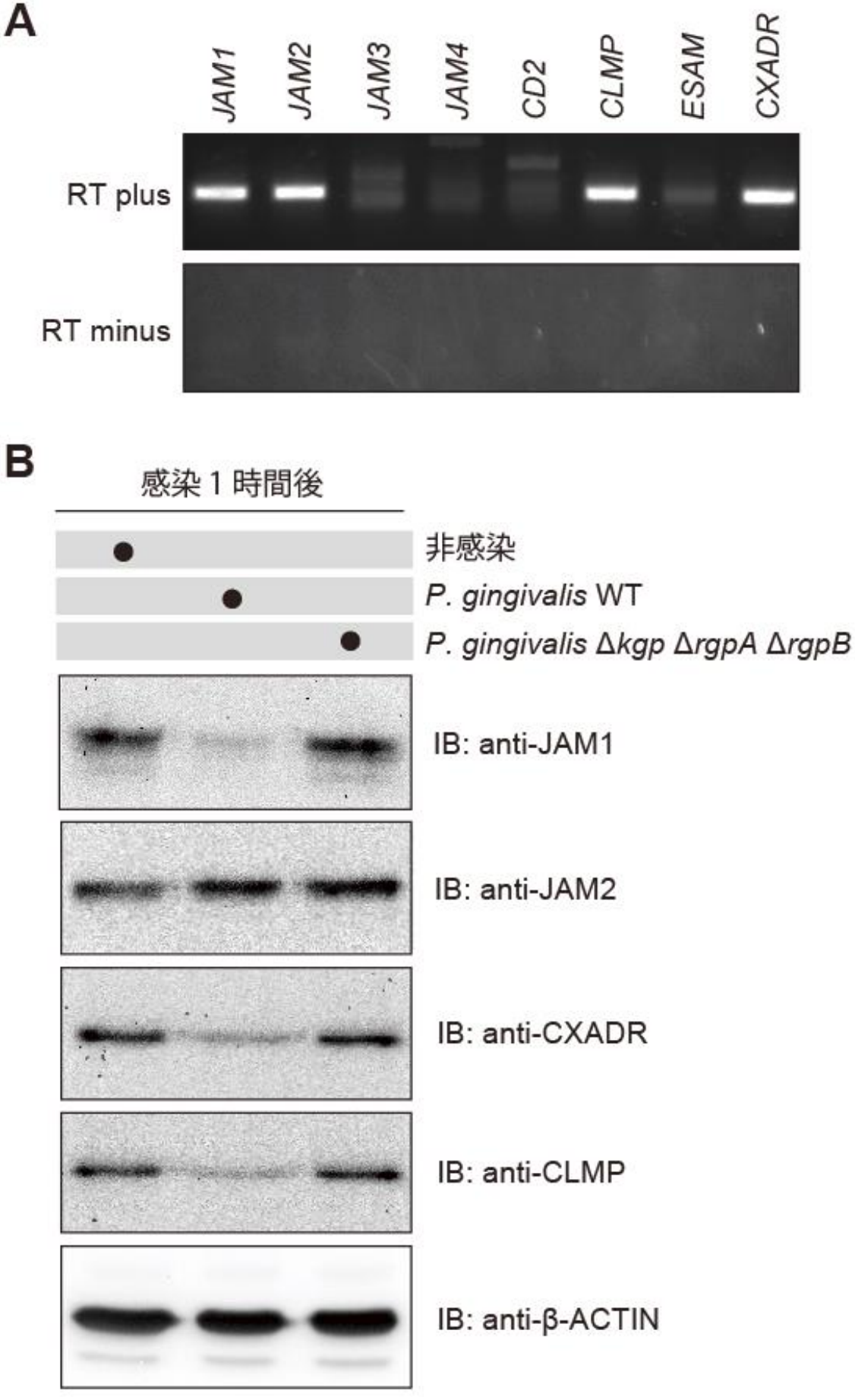

A
JAM1
JAM2
JAM3
JAM4
CD2
CLMP
ESAM
CXADR
RT plus
RT minus
B
感染 1 時間後
非感染
P. gingivalis WT
P. gingivalis Δkgp ΔrgpA ΔrgpB
IB: anti-JAM1
IB: anti-JAM2
IB: anti-CXADR
IB: anti-CLMP
IB: anti-β-ACTIN

**図 1. 歯肉上皮細胞で発現する JAM ファミリータンパク質の *P. gingivalis* 感染によるタンパク量の変化.**

(A) RT-PCR により, 歯肉上皮細胞における *JAM1*, *JAM2*, *JAM3*, *JAM4*, *CD2*, *CLMP*, *ESAM*, および *CXADR* の発現を確認した. (B) ウエスタンブロット法により, *P. gingivalis* 野生株およびジンジパイン欠失株感染後の歯肉上皮細胞における JAM ファミリータンパク質の量の変化を確認した. β-ACTIN はコントロールとして使用した. IB : immunoblot, RT : reverse transcription, *P. gingivalis* WT : *P. gingivalis* ATCC 33277 株, *P. gingivalis* Δ*kgp*Δ*rgpA*Δ*rgpB* : *P. gingivalis* KDP 136 Δ*kgp*Δ*rgpA*Δ*rgpB* 株.

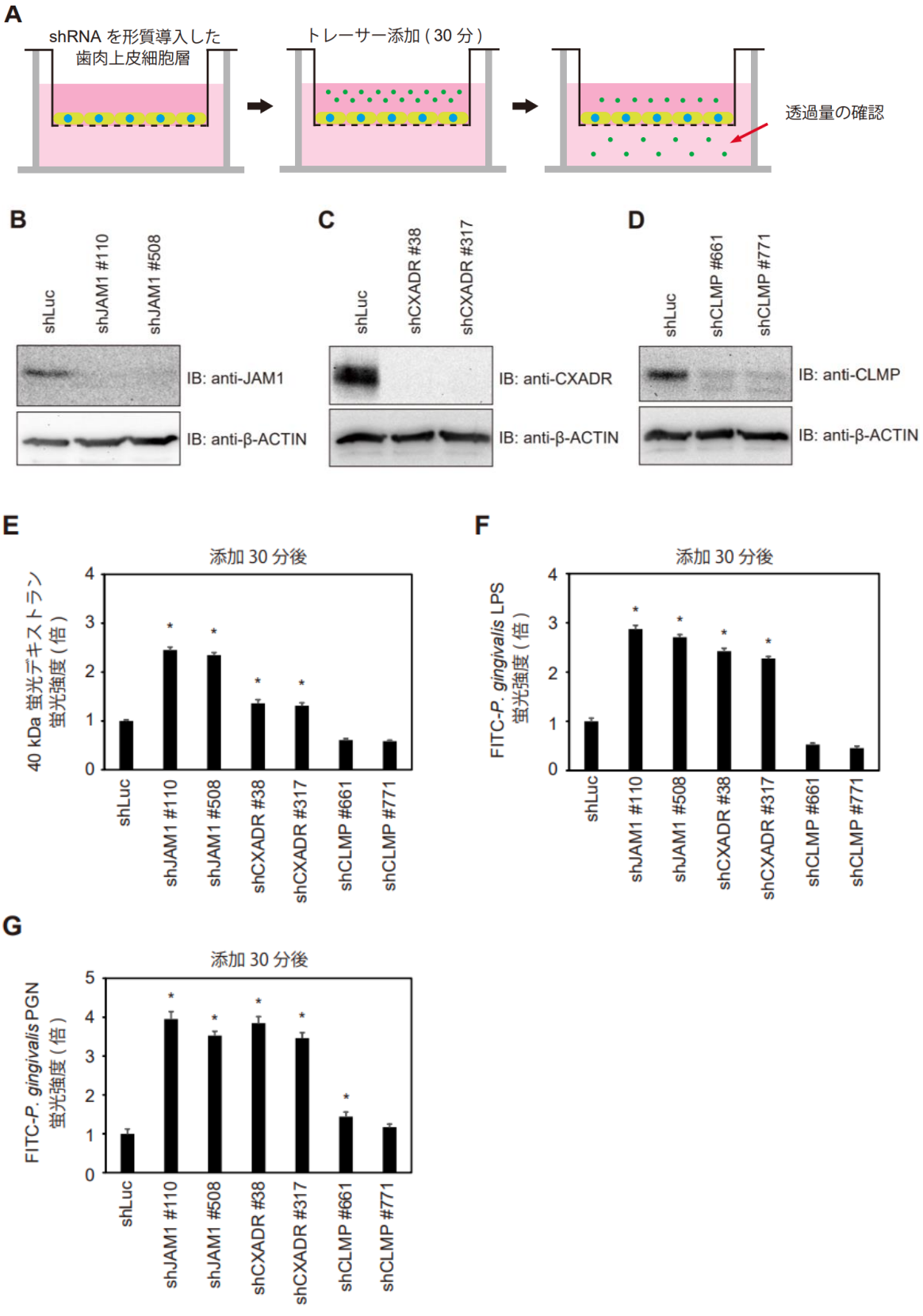

A
shRNA を形質導入した
歯肉上皮細胞層
トレーサー添加 ( 30 分 )
透過量の確認
B
shLuc
shJAM1 #110
shJAM1 #508
IB: anti-JAM1
IB: anti-β-ACTIN
C
shLuc
shCXADR #38
shCXADR #317
IB: anti-CXADR
IB: anti-β-ACTIN
D
shLuc
shCLMP #661
shCLMP #771
IB: anti-CLMP
IB: anti-β-ACTIN
E
添加 30 分後
40 kDa 蛍光デキストラン
蛍光強度 ( 倍 )
shLuc
shJAM1 #110
shJAM1 #508
shCXADR #38
shCXADR #317
shCLMP #661
shCLMP #771
F
添加 30 分後
FITC-P. gingivalis LPS
蛍光強度 ( 倍 )
G
添加 30 分後
FITC-P. gingivalis PGN
蛍光強度 ( 倍 )

**図 2. JAM ファミリータンパク質が歯肉上皮細胞の異物透過性に与える影響.**

(A) 本実験の模式図. shRNA を形質導入した歯肉上皮細胞層を cell culture insert 上で培養し, FITC で標識された各種トレーサーを上部の培地に加えた. 30 分後, 上部から下部構造に透過したトレーサー量を分光光度計にて解析した. (B-D) 歯肉上皮細胞において標的タンパク質がノックダウンされていることをウエスタンブロット法にて確認した. (E-G) ホタルルシフェラーゼ (Luc) および各種 JAM ファミリータンパク質の shRNA が形質導入された歯肉上皮細胞における FITC で標識された (E) 40 kDa 蛍光デキストラン, (F) *P. gingivalis* LPS, および (G) *P. gingivalis* PGN の透過性を評価した. 結果は shLuc における透過量をコントロールとした倍数で示している. $*p < 0.05$ (Dunnett 検定), n = 8, Bar: 標準偏差.

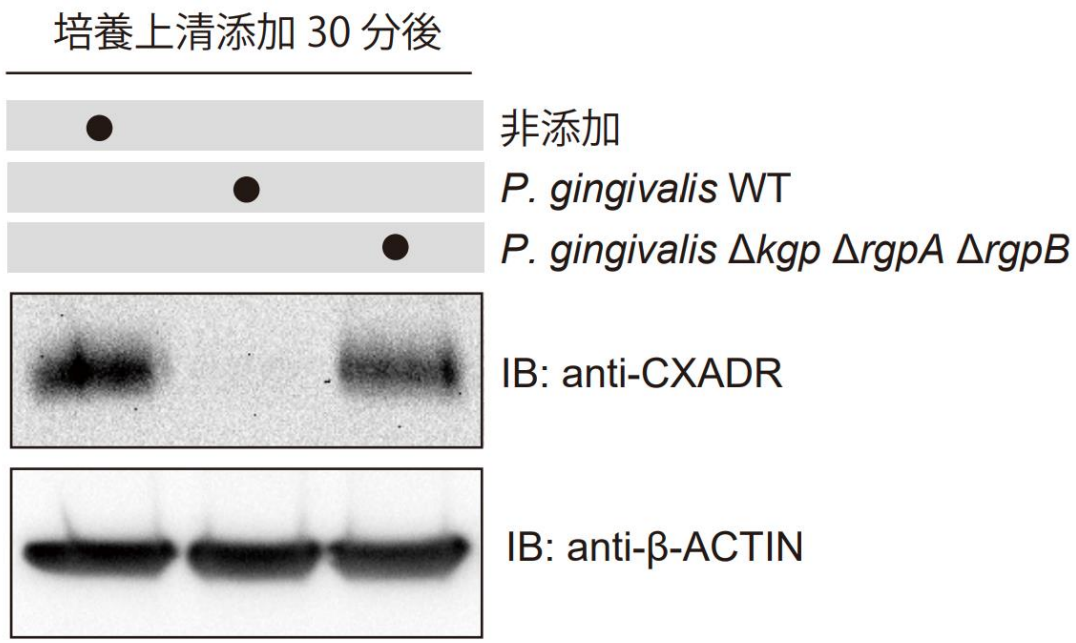



**図 3.　*P. gingivalis* の培養上清の添加による CXADR の分解.**

歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* 野生株またはジンジパイン欠失株の培養上清を添加後, CXADR のタンパク量の変化をウエスタンブロット法により確認した.

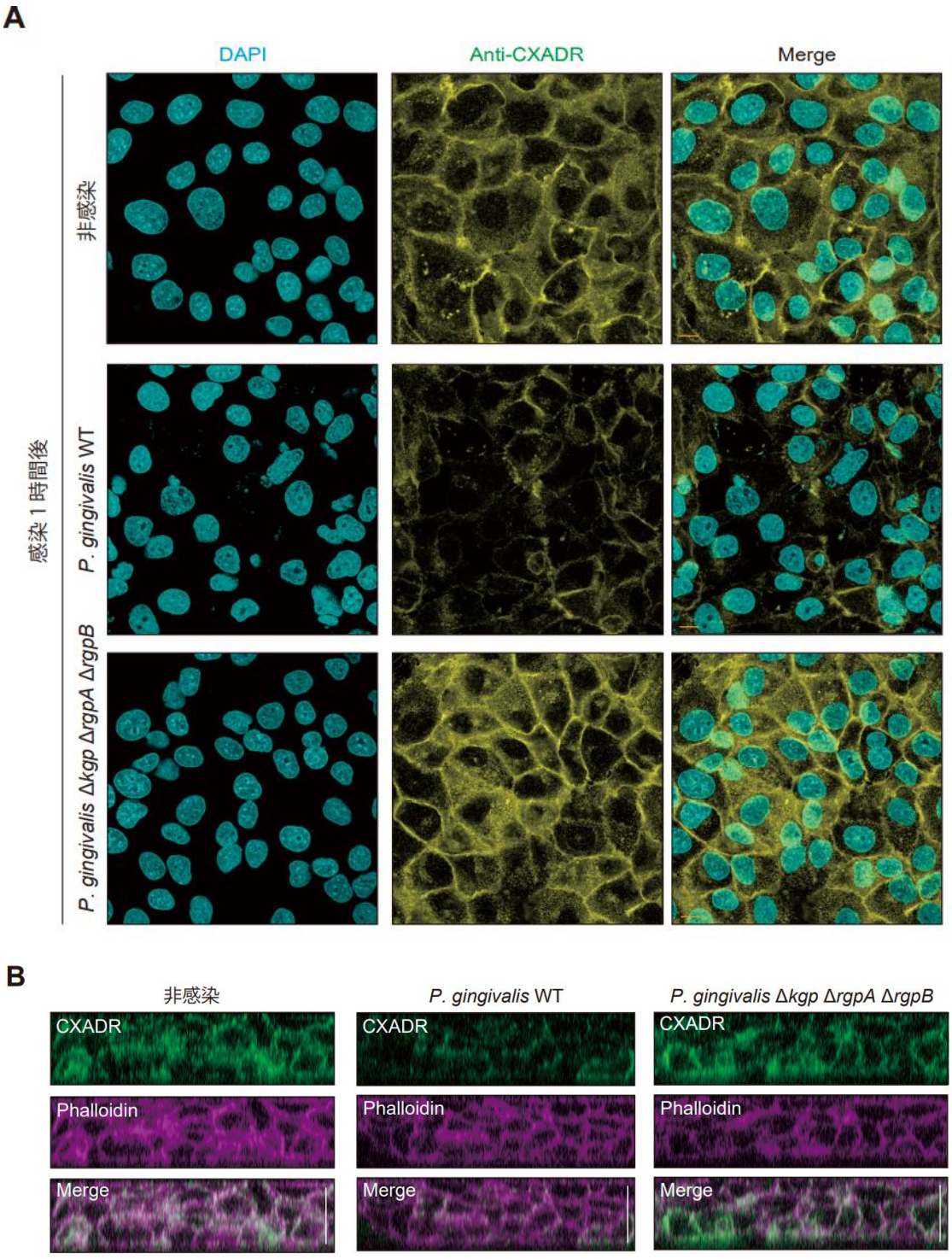

A
DAPI
Anti-CXADR
Merge
感染 1 時間後
非感染
P. gingivalis WT
P. gingivalis ΔkgpΔrgpAΔrgpB
B
非感染
P. gingivalis WT
P. gingivalis ΔkgpΔrgpAΔrgpB
CXADR
Phalloidin
Merge

**図 4. 歯肉上皮細胞および三次元歯肉上皮モデルにおける *P. gingivalis* による CXADR の分解.**

(A) *P. gingivalis* 野生株およびジンジパイン欠失株を 1 時間感染させた歯肉上皮細胞を，共焦点顕微鏡にて観察した．細胞を固定後，DAPI (シアン) および CXADR (黄色) にて免疫染色した．スケールバーは 10 μm を示す. (B) *P. gingivalis* 野生株およびジンジパイン欠失株を 2 時間感染させた三次元歯肉上皮モデルを，共焦点顕微鏡にて観察した.三次元モデルは固定後，CXADR (緑) および Alexa Fluor 568 標識のファロイディン (マゼンタ) にて免疫染色した．スケールバーは 30 μm を示す.

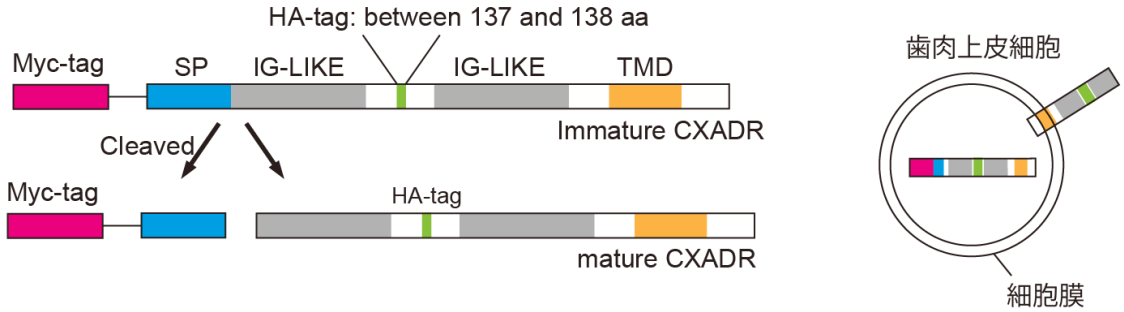



**図 5. Myc タグおよび HA タグにて標識された CXADR の模式図**

Myc タグおよび HA タグで標識される未成熟型の CXADR, およびシグナルペプチドが離れ, HA タグのみで標識される成熟型の CXADR の模式図. Myc タグはマゼンタ色, HA タグは緑色で示している. また, シグナルペプチドは青色, Ig-like ドメインは灰色, 膜貫通ドメイン (TMD) はオレンジ色で示している. Immature CXADR : 未成熟型 CXADR, mature CXADR : 成熟型 CXADR.

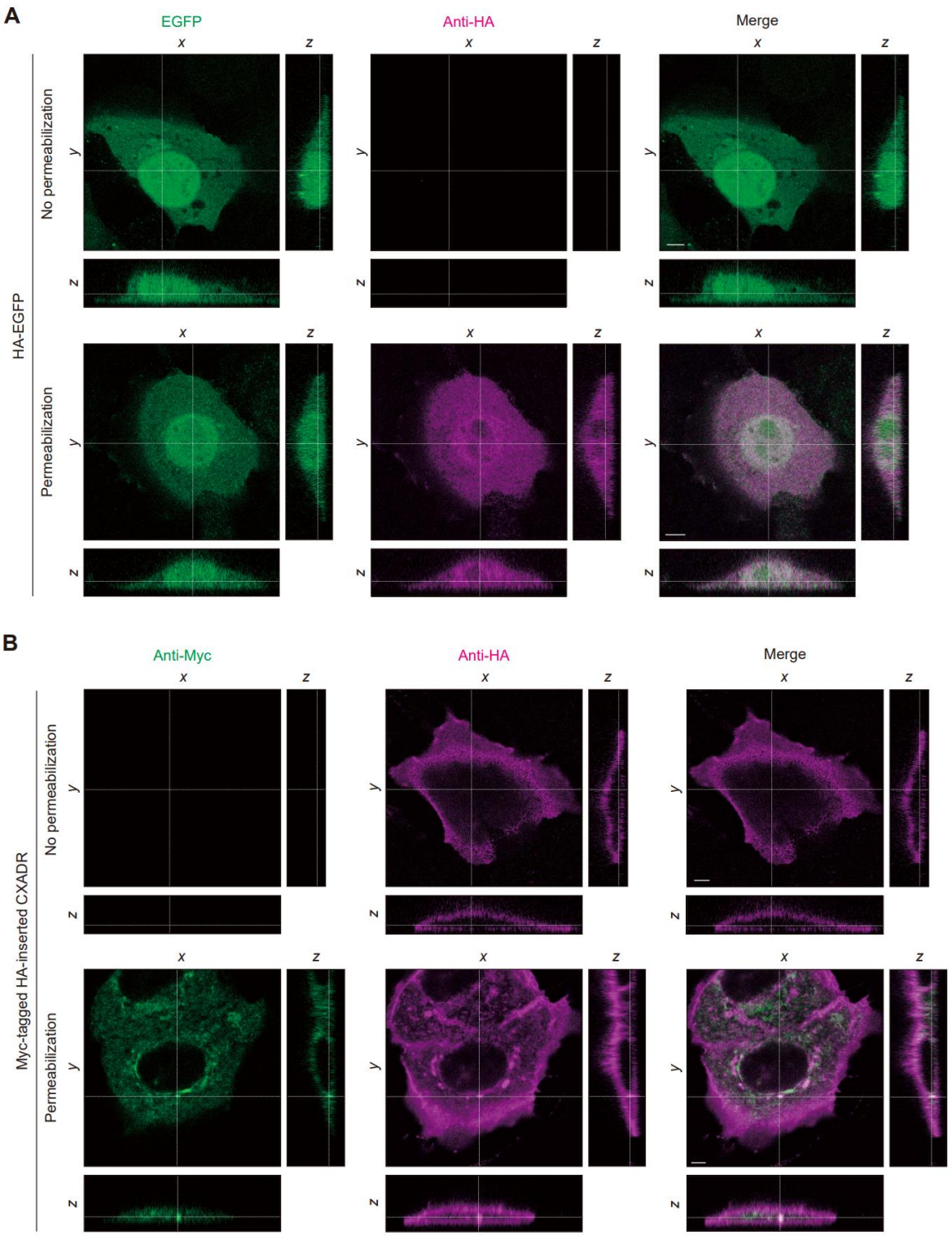

A
EGFP
Anti-HA
Merge
HA-EGFP
No permeabilization
Permeabilization
x
y
z
B
Anti-Myc
Anti-HA
Merge
Myc-tagged HA-inserted CXADR
No permeabilization
Permeabilization

**図 6. Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を形質導入した歯肉上皮細胞の共焦点顕微鏡像.**

(A) HA タグで標識された EGFP (緑) を形質導入した歯肉上皮細胞は透過性処理の有無で区別した後, HA 抗体 (マゼンタ) にて染色した. タンパク質の局在は共焦点顕微鏡にて観察した. (B) Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を形質導入した歯肉上皮細胞は, Myc 抗体 (緑) および HA 抗体 (マゼンタ) にて染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 5 μm を示す. Permeabilization : 透過処理

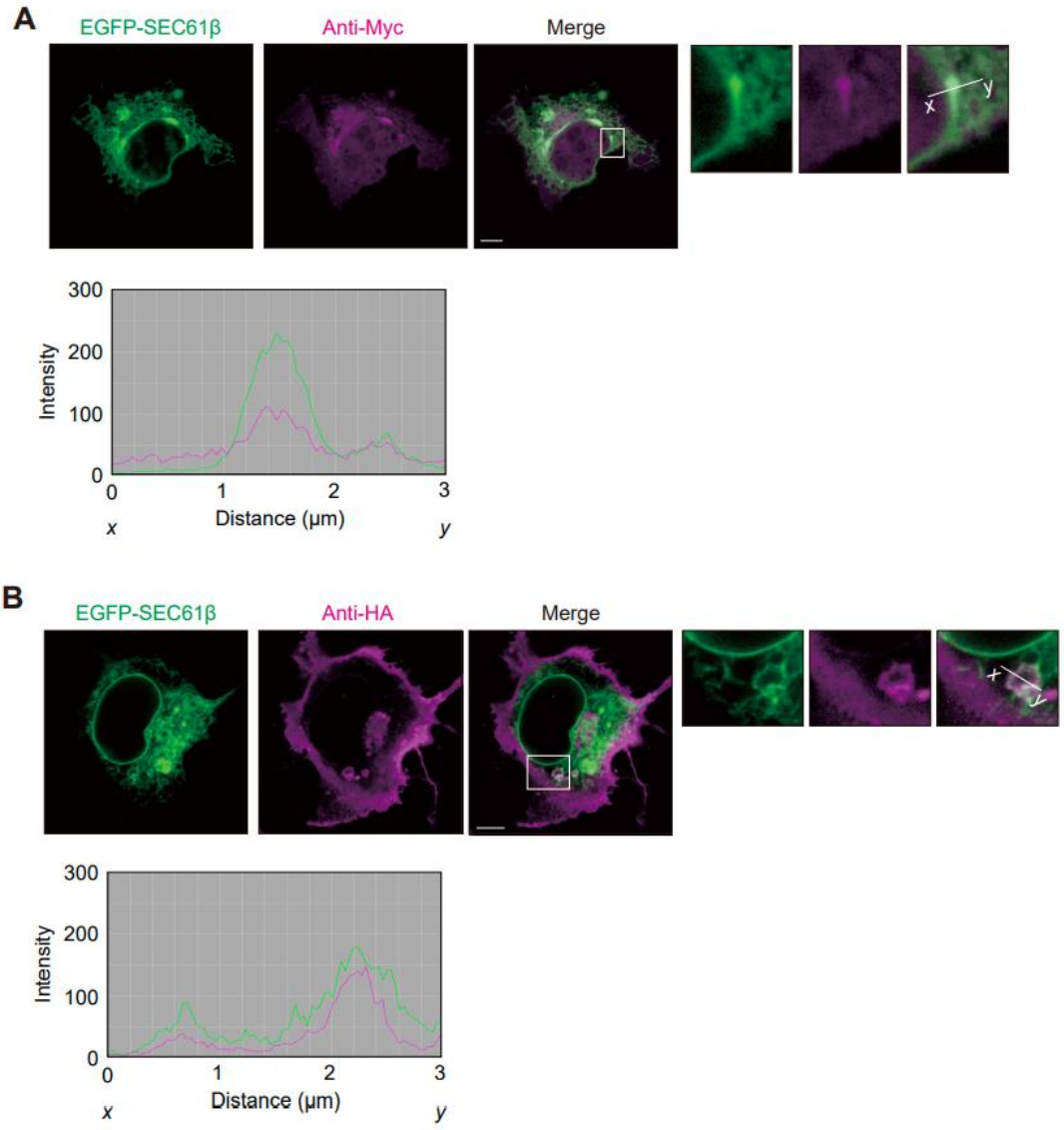



**図 7. 歯肉上皮細胞における CXADR および SEC 61β の局在.**

(A,B) Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR と EGFP 標識された SEC61β (緑) を歯肉上皮細胞に形質導入した. 48 時間培養後, 固定し, Myc 抗体 (A: マゼンタ) および HA 抗体 (B: マゼンタ) にて染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. 白色の枠で示した部分を拡大した像を右に示す. Myc タグおよび HA タグを挿入した CXADR (マゼンタ) と SEC61β (緑) の x-y 線上での蛍光シグナル強度 (Leica LAS X software) を下段に示す. スケールバーは 5 μm を示す. Intensity : 光度, Distance : 距離

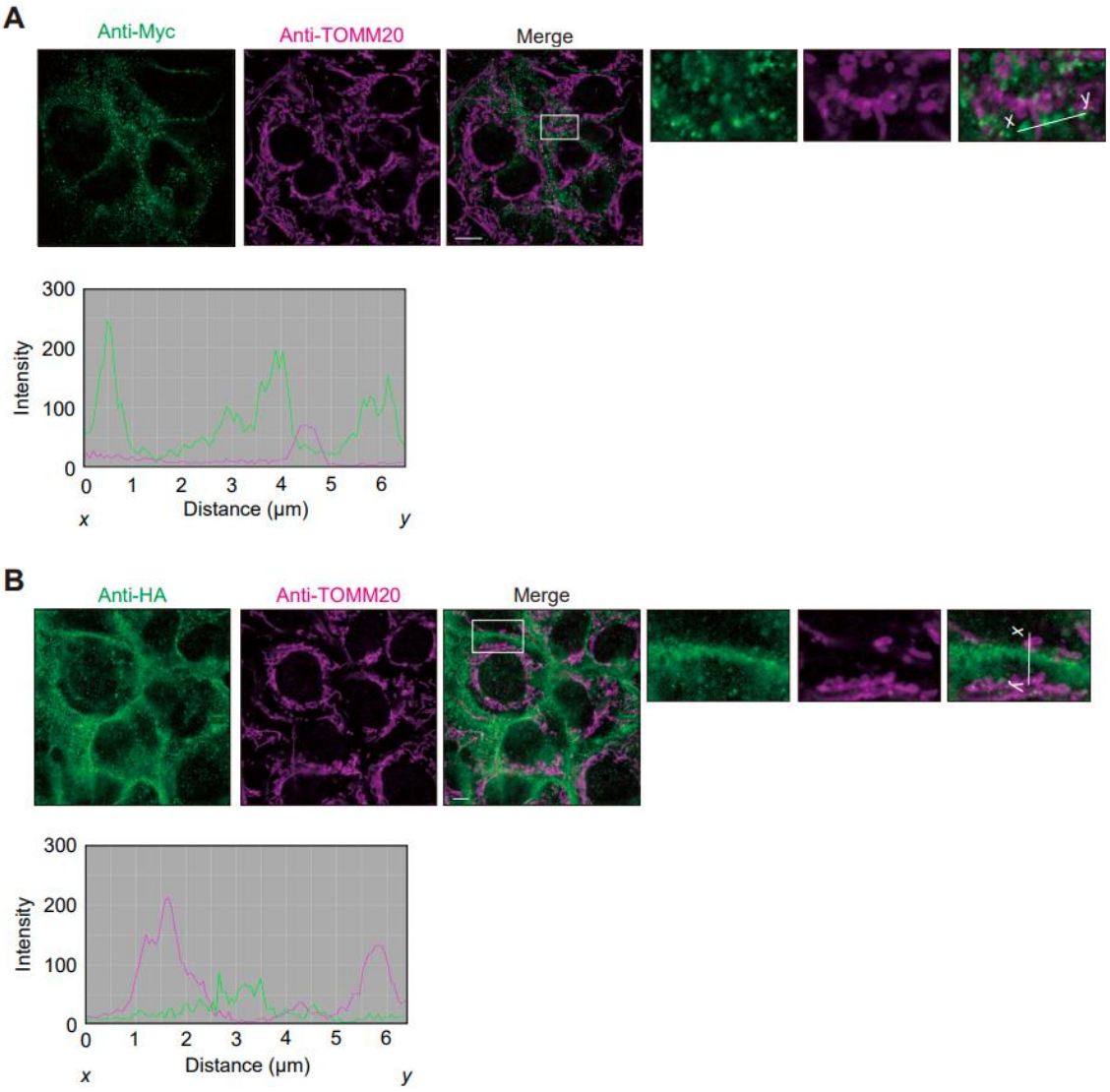



**図 8. 歯肉上皮細胞における CXADR および TOMM20 の局在.**

(A,B) Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を歯肉上皮細胞に形質導入した. 48 時間培養後, Myc 抗体 (A: 緑) , HA 抗体 (B: 緑) および TOMM20 (マゼンタ) にて染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. 白色の枠で示した部分を拡大した像を右に示す. Myc タグおよび HA タグを挿入した CXADR (緑) と SEC61β (マゼンタ) の x-y 線上での蛍光シグナル強度 (Leica LAS X software) を下段に示す. スケールバーは 5 μm を示す.

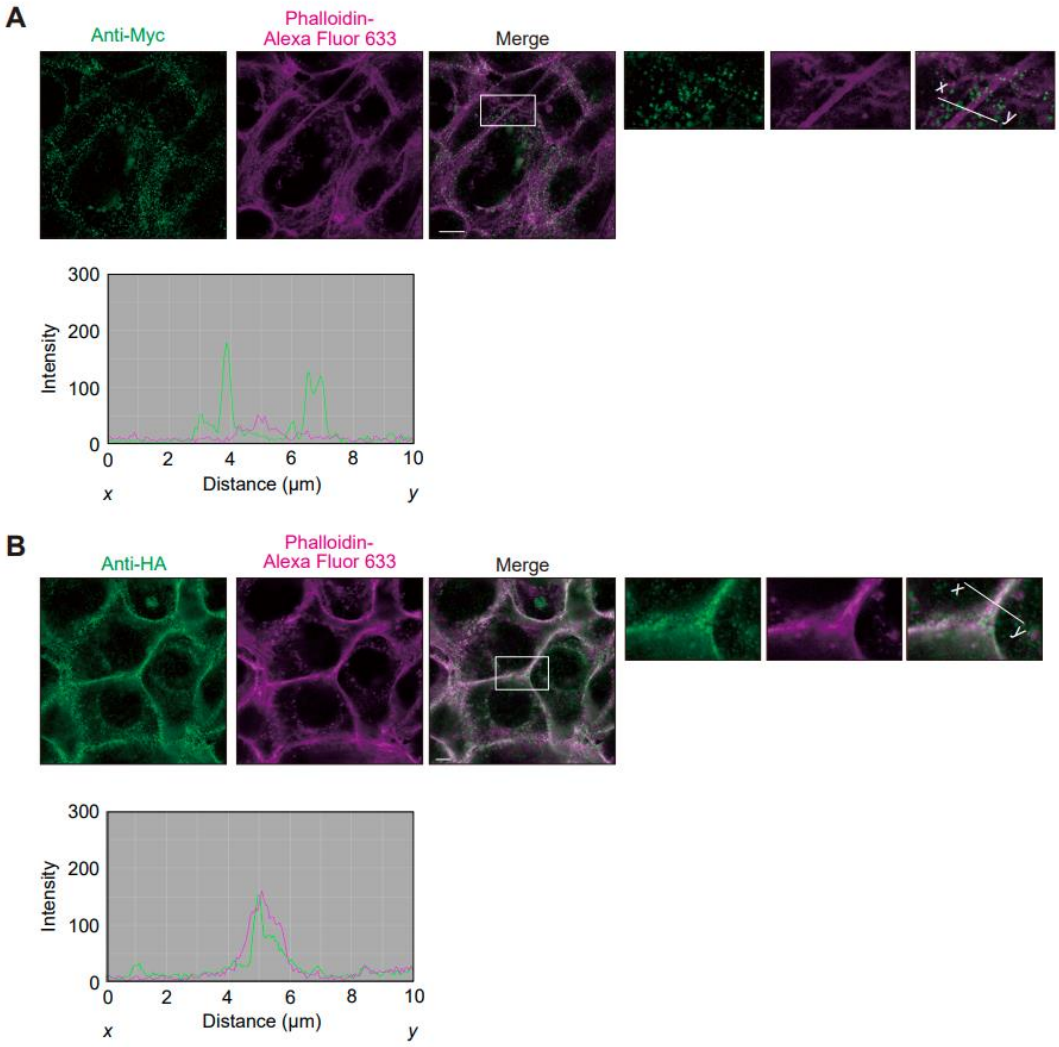



**図 9. 歯肉上皮細胞におけるアクチンおよび CXADR の局在.**

(A, B) Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を歯肉上皮細胞に形質導入した. 48 時間培養後, Myc 抗体 (A: 緑), HA 抗体 (B: 緑) および Alexa Fluor 633 にて標識された ファロイディン (マゼンタ) で免疫染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. 白枠の部分を拡大した像を右に示す. Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR (緑) と ファロイディン (マゼンタ) の x-y 線上での蛍光シグナル強度 (Leica LAS X software) を下段に示す. スケールバーは 5 μm を示す.

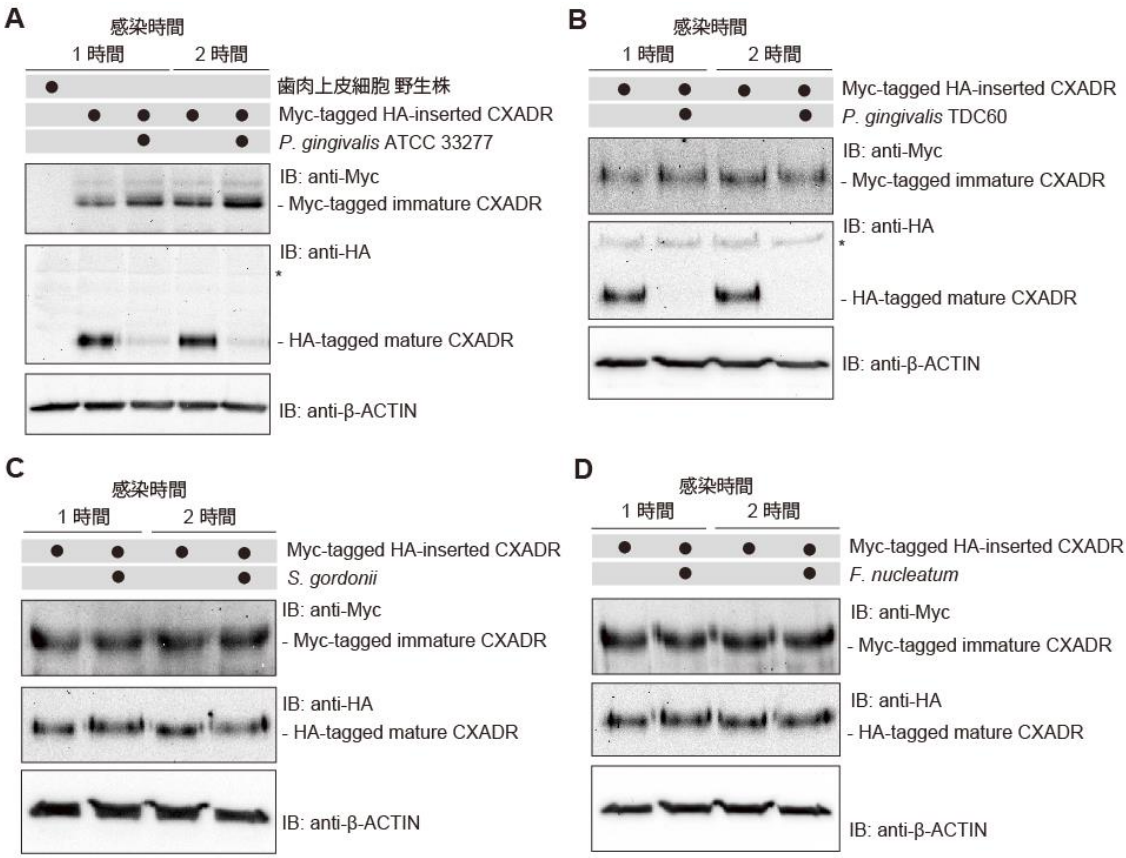
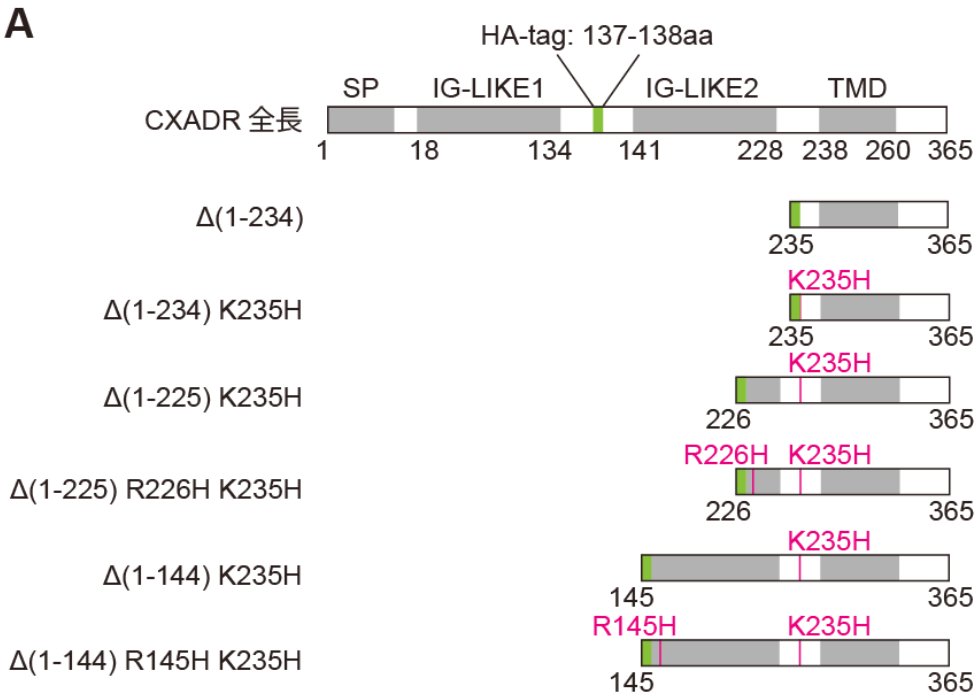



**図 10. *P. gingivalis, S. gordonii,* および *F. nucleatum* 感染による CXADR への影響.**

(A-D) Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を歯肉上皮細胞に形質導入した. 48 時間培養後, MOI 100 に調整した *P. gingivalis* ATCC 33277 株 (A), *P. gingivalis* TDC60 株 (B), *S. gordonii* DL-1 株 (C), または *F. nucleatum* ATCC 25586 株 (D) をそれぞれ感染させ, ウエスタンブロット法により Myc 抗体および HA 抗体にて検出されるタンパク量を解析した.


A
HA-tag: 137-138aa
SP
IG-LIKE1
IG-LIKE2
TMD
CXADR 全長
1
18
134
141
228
238
260
365
Δ(1-234)
235
365
Δ(1-234) K235H
K235H
235
365
Δ(1-225) K235H
K235H
226
365
Δ(1-225) R226H K235H
R226H
K235H
226
365
Δ(1-144) K235H
K235H
145
365
Δ(1-144) R145H K235H
R145H
K235H
145
365

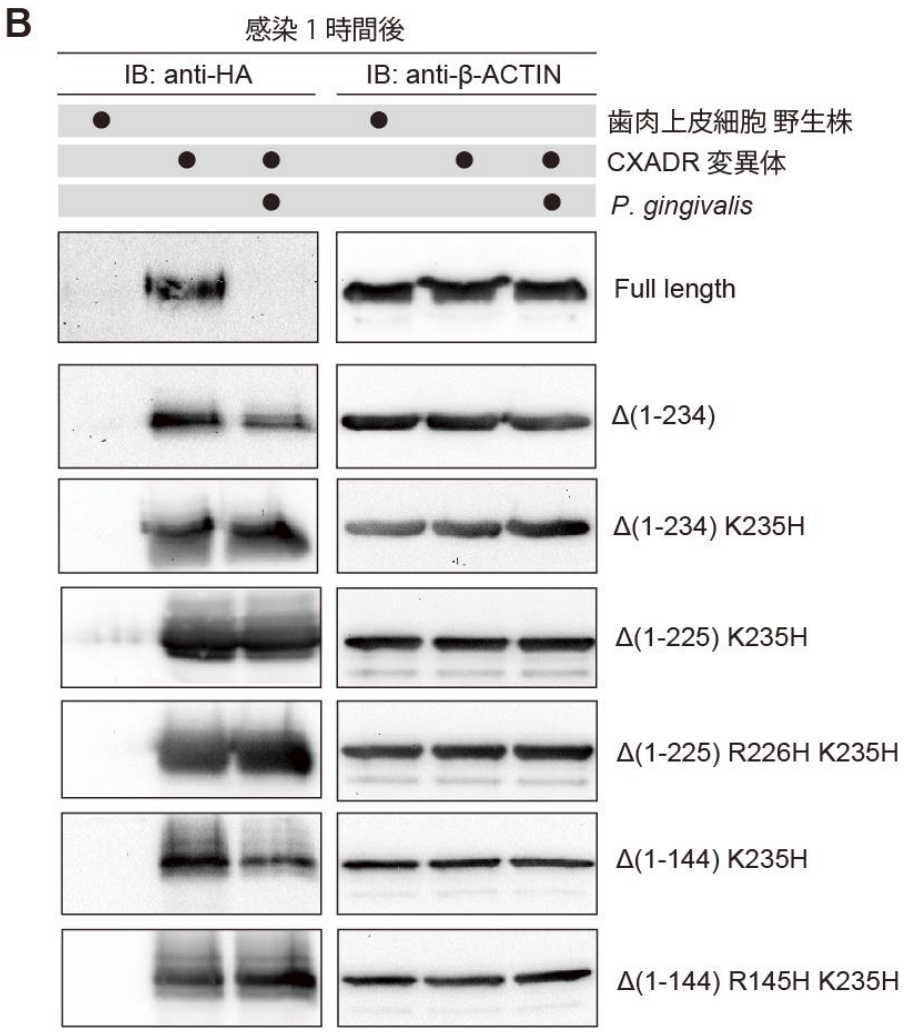

B
感染 1 時間後
IB: anti-HA
IB: anti-β-ACTIN
歯肉上皮細胞 野生株
CXADR 変異体
P. gingivalis
Full length
Δ(1-234)
Δ(1-234) K235H
Δ(1-225) K235H
Δ(1-225) R226H K235H
Δ(1-144) K235H
Δ(1-144) R145H K235H

**図 11. *P. gingivalis* の分解を受ける CXADR のアミノ酸残基.**

本実験で使用した CXADR の構造と変異体の模式図. シグナルペプチド, Ig-like ドメイン および TMD ドメインは灰色で, HA タグは緑色で示す. また, R145H および K235H のポイントミューテーションをマゼンタ色で示す. (B) HA タグで標識された CXADR 変異体を形質導入した歯肉上皮細胞を 48 時間培養し, MOI 100 の *P. gingivalis* にて 1 時間感染後, HA 抗体およびアクチン抗体にて検出されるタンパク量をウエスタンブロット法で解析した.

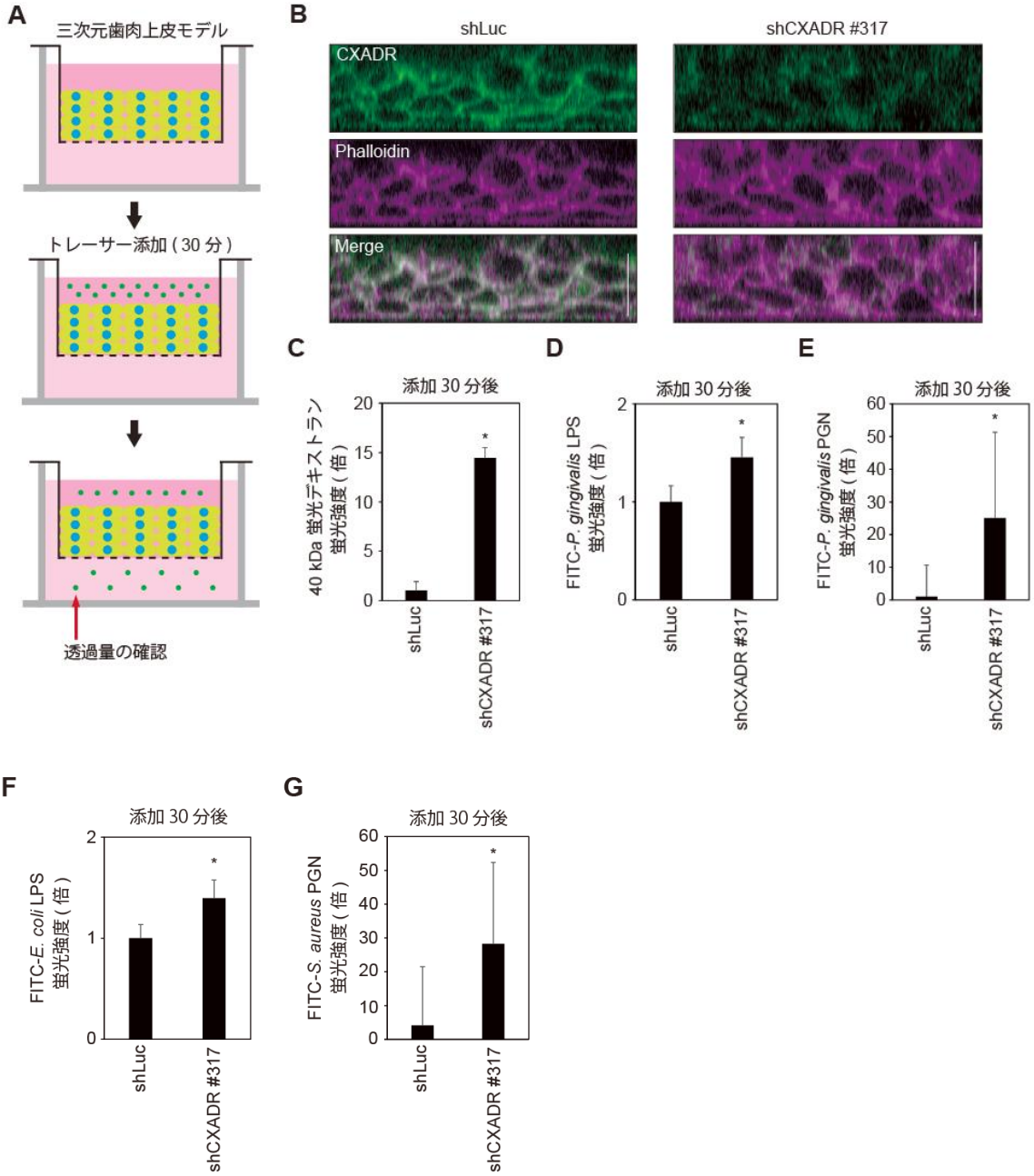

A
三次元歯肉上皮モデル
トレーサー添加（30 分）
透過量の確認
B
shLuc
shCXADR #317
CXADR
Phalloidin
Merge
C
添加 30 分後
40 kDa 蛍光デキストラン 蛍光強度（倍）
shLuc
shCXADR #317
D
添加 30 分後
FITC-P. gingivalis LPS 蛍光強度（倍）
shLuc
shCXADR #317
E
添加 30 分後
FITC-P. gingivalis PGN 蛍光強度（倍）
shLuc
shCXADR #317
F
添加 30 分後
FITC-E. coli LPS 蛍光強度（倍）
shLuc
shCXADR #317
G
添加 30 分後
FITC-S. aureus PGN 蛍光強度（倍）
shLuc
shCXADR #317

**図 12. CXADR の三次元歯肉上皮モデルのバリア機能への関与.**

**(**A) 本実験の模式図. shRNA を形質導入した三次元歯肉上皮モデルを cell culture insert 上で培養し, FITC で標識された各種トレーサーを上部の培地に加えた. 30 分後, 上部から下部構造に透過したトレーサー量を分光光度計にて解析した. (B) shRNA を形質導入した三次元歯肉上皮モデルにおける共焦点顕微鏡像.三次元モデルは固定後, CXADR (緑) および Alexa Fluor 568 標識のファロイディン (マゼンタ) にて染色した. スケールバーは 30 μm を示す. (C-G) Luc および CXADR をノックダウンした歯肉上皮細胞における 40 kDa 蛍光デキストラン (C), FITC- *P. gingivalis* LPS (D), FITC- *P. gingivalis* PGN (E), FITC- *E. coli* LPS (F), FITC- *S. aureus* PGN (G) の透過性を評価した. 結果は shLuc における透過量をコントロールとした倍数で示している. * $p < 0.05$ (片側 $t$ 検定), n = 7, Bar : 標準偏差.

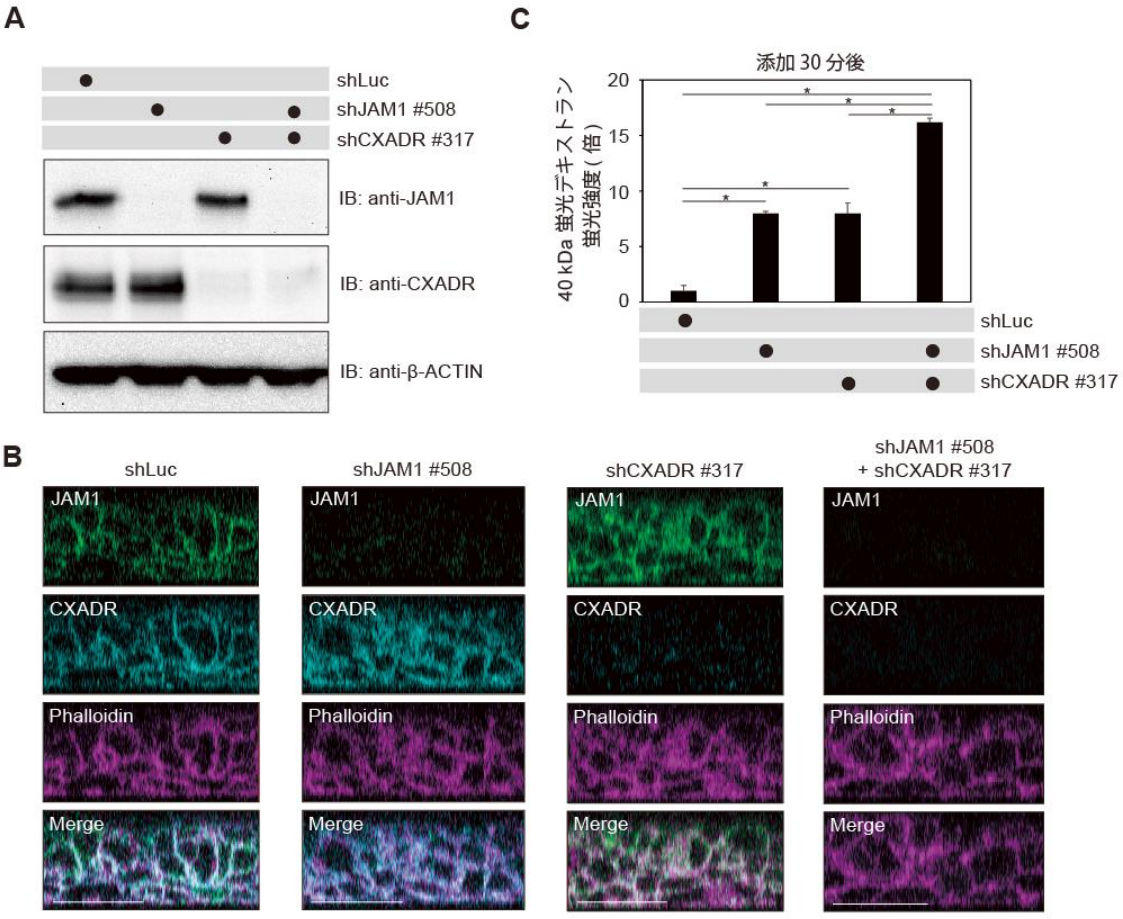

A
shLuc
shJAM1 #508
shCXADR #317
IB: anti-JAM1
IB: anti-CXADR
IB: anti-β-ACTIN
C
添加 30 分後
40 kDa 蛍光デキストラン
蛍光強度（倍）
20
15
10
5
0
shLuc
shJAM1 #508
shCXADR #317
B
shLuc
shJAM1 #508
shCXADR #317
shJAM1 #508
+ shCXADR #317
JAM1
CXADR
Phalloidin
Merge

**図 13. CXADR と JAM1 の独立性の検討.**

(A) 歯肉上皮細胞における JAM1 および CXADR のノックダウンをウエスタンブロット法で確認した. また, JAM1 ノックダウン時における CXADR のタンパク量および CXADR ノックダウン時における JAM1 のタンパク量を評価した. (B) JAM1 および CXADR の shRNA を形質導入した三次元歯肉上皮モデルにおける共焦点顕微鏡像. 三次元モデルは固定後, JAM1 (緑), CXADR (シアン), および Alexa Fluor 568 標識のファロイディン (マゼンタ) にて染色した. スケールバーは 30 μm を示す. (C) Luc , JAM1, または CXADR の shRNA がそれぞれ形質導入された歯肉上皮細胞における 40 kDa 蛍光デキストランの透過性を評価した. 結果は shLuc における透過量をコントロールとした倍数で示している. データは 8 回の生物学的反復における平均値 ± SD を示す. * $p < 0.05$ (両側 $t$ 検定), n = 7, Bar : 標準偏差.

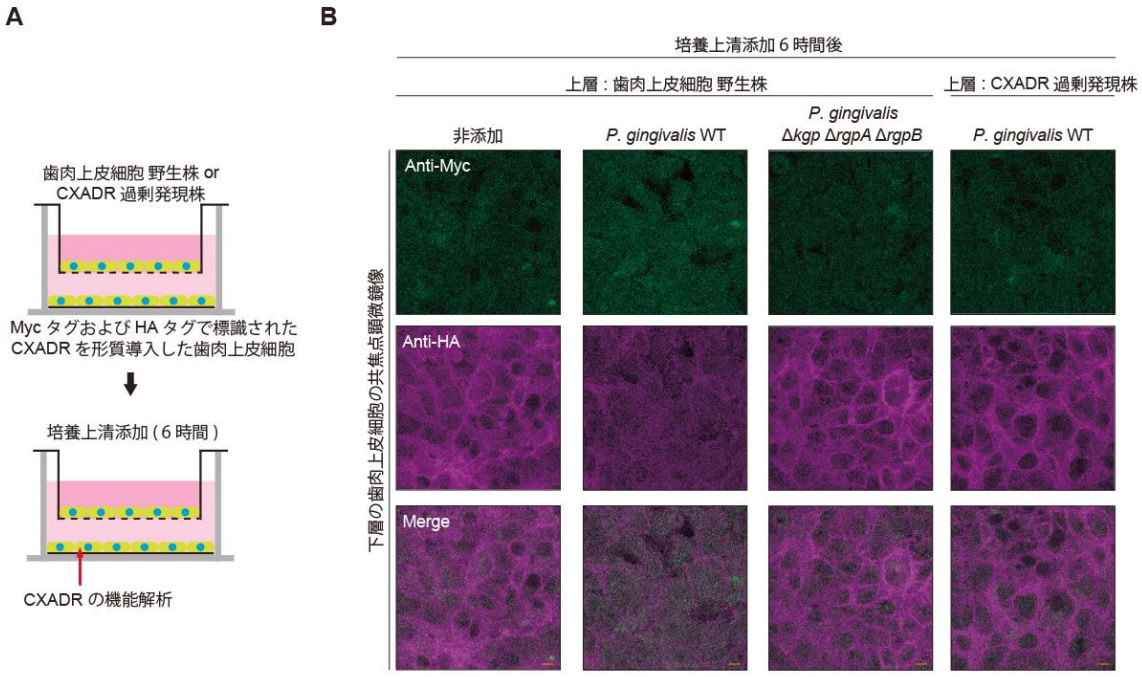
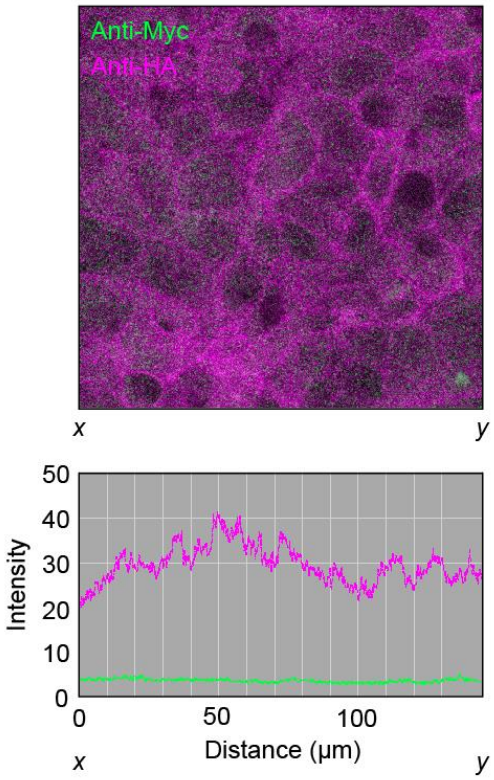


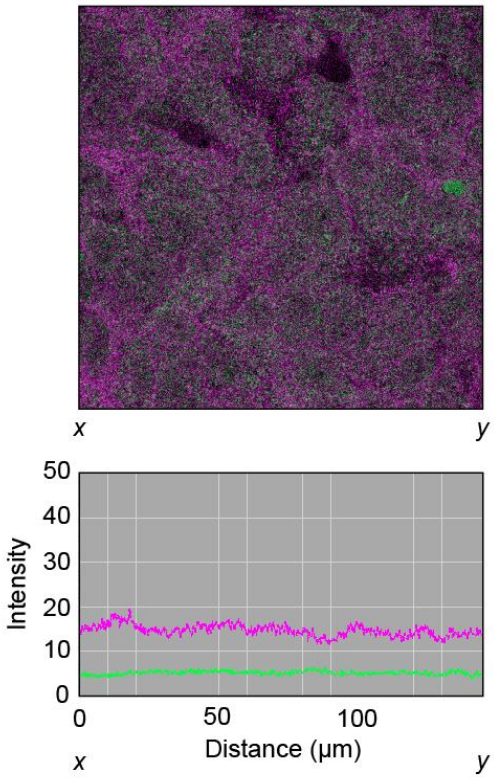

**図 14. CXADR の分解によるジンジパインの歯肉上皮細胞深部への侵入.**

**(A)** 本実験の模式図. 上部構造では歯肉上皮細胞, または CXADR を過剰発現させた歯肉上皮細胞を cell culture insert 上で培養した. 下部構造では, Myc タグおよび HA タグで標識された CXADR を形質導入した歯肉上皮細胞を培養した. *P. gingivalis* 野生株, またはジンジパイン欠失株の細胞上清を上部構造の歯肉上皮細胞に 6 時間投与後, 下部構造の歯肉上皮細胞における影響を評価した. (B) 下部構造の歯肉上皮細胞は固定後, Myc 抗体 (緑) および HA 抗体 (マゼンタ) 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.

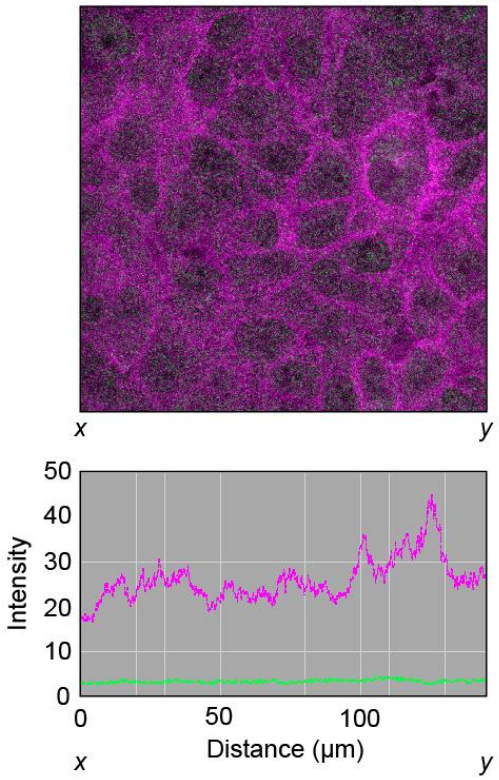
上層 : 歯肉上皮細胞 野生株
培養上清：非添加




上層 : 歯肉上皮細胞 野生株
培養上清 : *P. gingivalis* WT




上層 : 歯肉上皮細胞 野生株
培養上清 : *P. gingivalis* Δ*kgp* Δ*rgpA* Δ*rgpB*




上層 : CXADR 過剰発現株
培養上清 : *P. gingivalis* WT

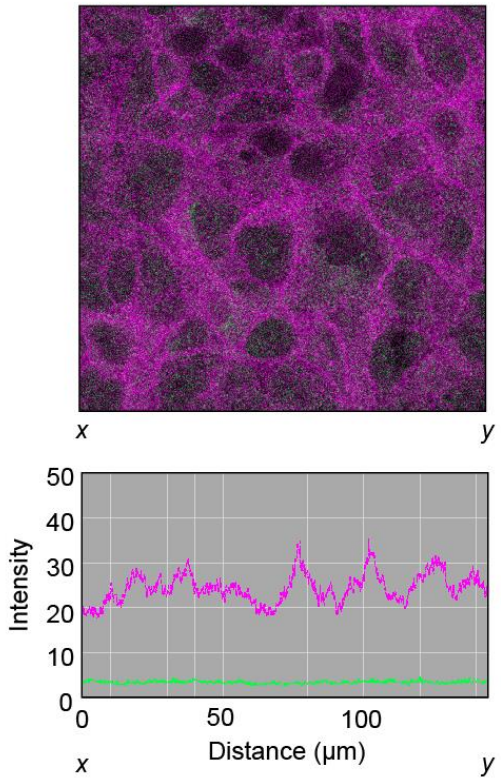


**図 15. 図 14B の蛍光レベルの解析**

下部構造で培養した, Myc タグ および HA タグで標識された CXADR を形質導入した歯肉上皮細胞における Myc 抗体 (緑) および HA 抗体 (マゼンタ) の x-y 線上における蛍光シグナル強度を共焦点顕微鏡にて解析した.

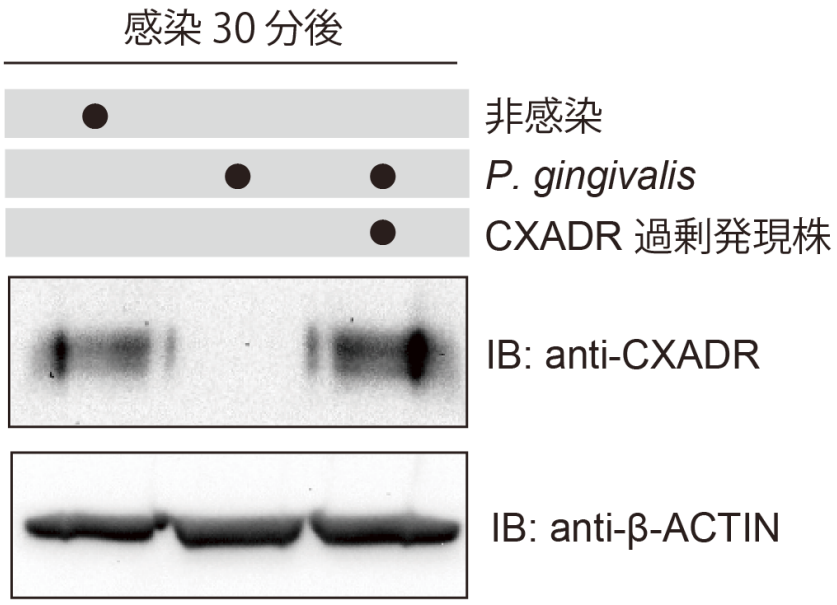



**図 16. *P. gingivalis* の CXADR を過剰発現させた歯肉上皮細胞への影響**

歯肉上皮細胞および CXADR を過剰発現させた歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* を 30 分感染後，ウエスタンブロット法にて CXADR のタンパク量を確認した.

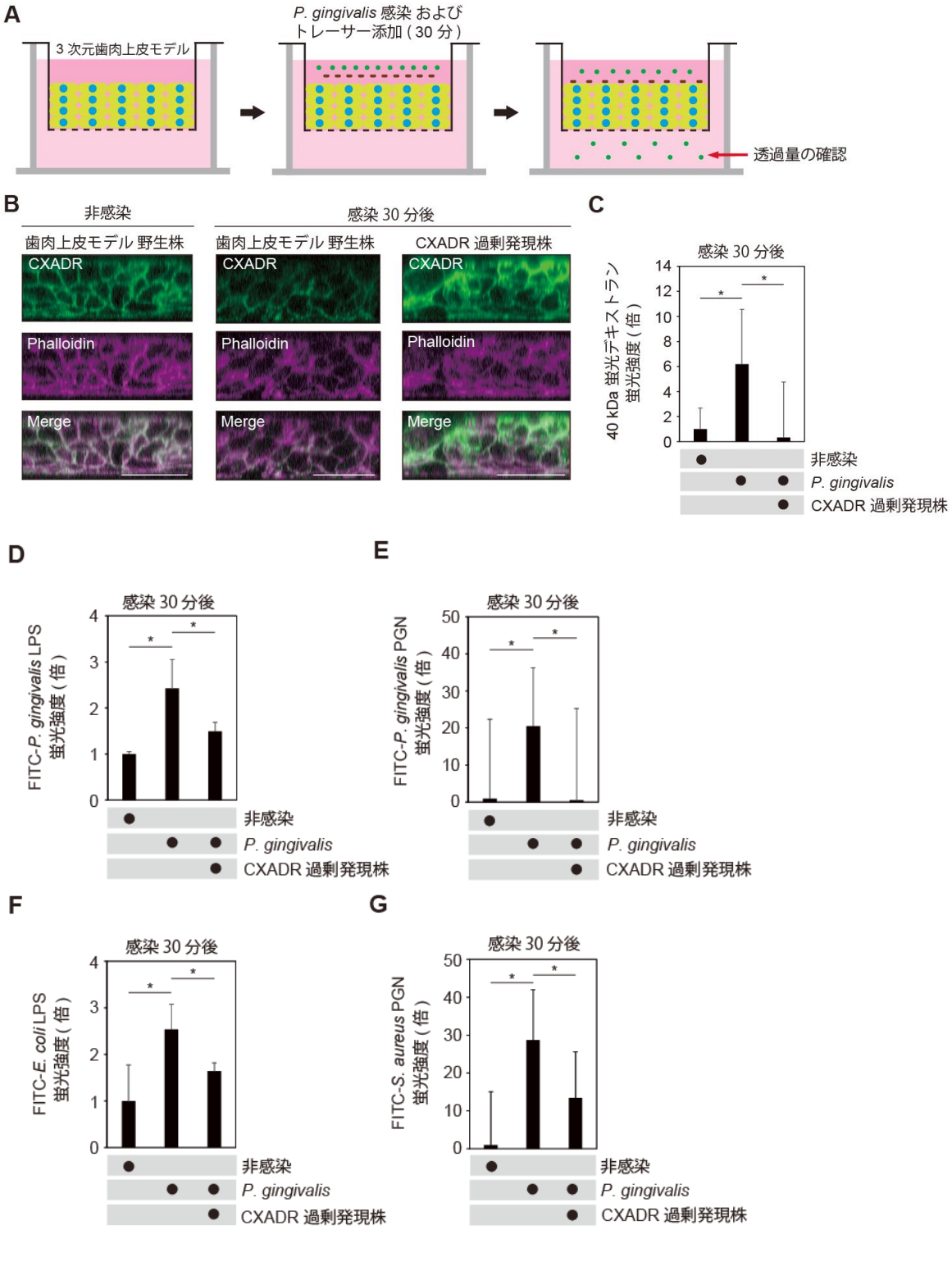

A
3 次元歯肉上皮モデル
P. gingivalis 感染 および
トレーサー添加 ( 30 分 )
透過量の確認
B
非感染
感染 30 分後
歯肉上皮モデル 野生株
歯肉上皮モデル 野生株
CXADR 過剰発現株
CXADR
Phalloidin
Merge
C
感染 30 分後
40 kDa 蛍光デキストラン
蛍光強度 ( 倍 )
非感染
P. gingivalis
CXADR 過剰発現株
D
感染 30 分後
FITC-P. gingivalis LPS
蛍光強度 ( 倍 )
非感染
P. gingivalis
CXADR 過剰発現株
E
感染 30 分後
FITC-P. gingivalis PGN
蛍光強度 ( 倍 )
非感染
P. gingivalis
CXADR 過剰発現株
F
感染 30 分後
FITC-E. coli LPS
蛍光強度 ( 倍 )
非感染
P. gingivalis
CXADR 過剰発現株
G
感染 30 分後
FITC-S. aureus PGN
蛍光強度 ( 倍 )
非感染
P. gingivalis
CXADR 過剰発現株

**図 17. 三次元歯肉上皮モデルにおける *P. gingivalis* の CXADR 分解による, LPS および PGN 透過性の亢進.**

(A) 本実験の模式図. 三次元歯肉上皮モデルおよび CXADR を過剰発現させた歯肉上皮モデルを cell culture insert 上で培養し, *P. ginigivalis* および FITC で標識された各種トレーサーを上部の培地に加えた. 30 分後, 上部から下部構造に透過したトレーサー量を分光光度計にて解析した. (B) *P. ginigivalis* 野生株を 30 分感染させた三次元歯肉上皮モデルおよび CXADR を過剰発現させた歯肉上皮モデルの共焦点顕微鏡像. 三次元モデルは固定後, CXADR (緑) および Alexa Fluor 568 標識のファロイディン (マゼンタ) にて染色した. スケールバーは 30 μm を示す. (C-G) 歯肉上皮細胞および CXADR を過剰発現させた歯肉上皮細胞における 40 kDa 蛍光デキストラン (C), FITC- *P. gingivalis* LPS (D), FITC- *P. gingivalis* PGN (E), FITC- *E. coli* LPS (F), FITC- *S. aureus* PGN (G) の透過性を評価した. 結果は非感染時の透過量をコントロールとした倍数で示している. * $p < 0.05$ (片側 *t* 検定), n = 7, Bar: 標準偏差.

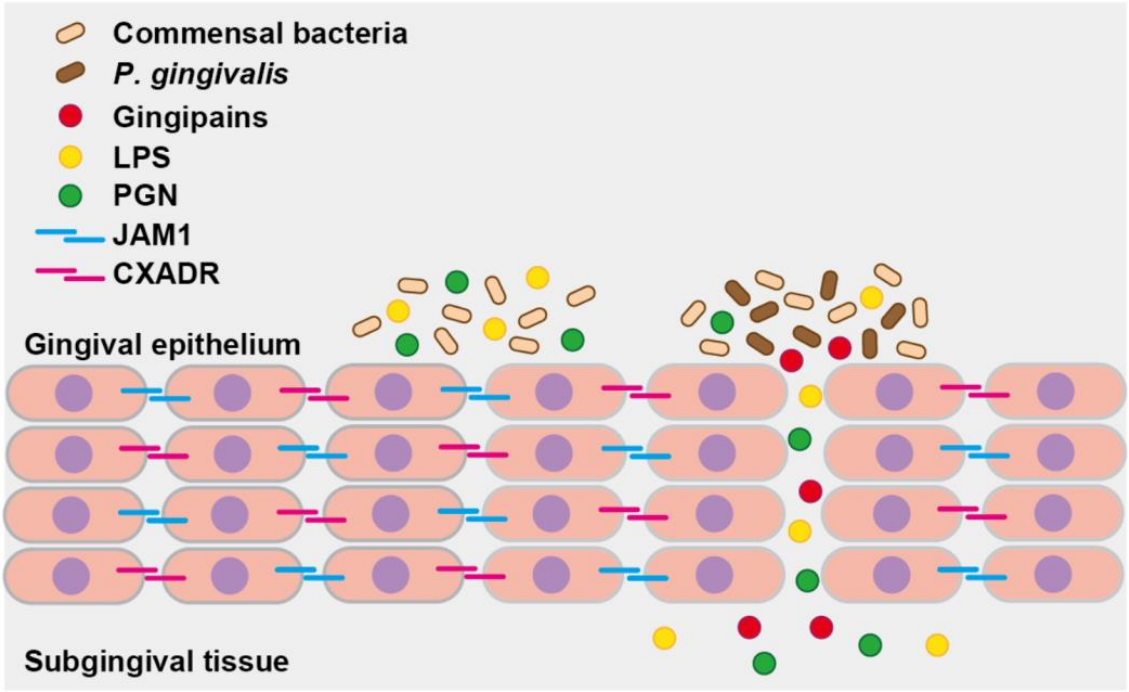



**図 18. *P. gingivalis* による LPS および PGN の歯周組織内侵入への誘導.**

歯肉上皮において CXADR (マゼンタ) および JAM1 (シアン) は独立してバリア機能を担っている．しかし, *P. gingivalis* が産生するジンジパインは, CXADR および JAM1 を分解し，ジンジパインおよびその他の病原因子の透過性を亢進させる．その後，ジンジパインは歯肉上皮深部へ侵入し，JAM1 および CXADR を分解することで, LPS や PGN の上皮下組織への侵入を誘導する.