



Title	S-PRG 溶出液が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響
Author(s)	加藤, 祐太
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/96001
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

S-PRG 溶出液が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響

口腔感染制御学系部門

予防歯科学講座

加藤 祐太

要 約

歯肉内縁上皮は接着分子の結合による物理的な障壁を形成しており、歯周病原性因子などの上皮下組織への侵入を防ぐ上皮バリアとして機能する。これまでの研究において、歯肉上皮細胞に発現する細胞間接着分子である coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) および junctional adhesion molecule 1 (JAM1) が歯肉上皮のバリア機能を担うことが示されている。

様々な歯科材料に使用されている surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) フィラーは 6 種類のイオン徐放能を有し、種々の生物活性を有する物質であり、口腔疾患の発症予防への応用が期待されている。しかし、歯周病予防に関する報告は少ない。本研究では、CXADR および JAM1 に焦点を当て、S-PRG フィラーから調製した溶出液 (S-PRG 溶出液) の歯肉上皮のバリア機能への影響を検討した。

その結果、S-PRG 溶出液は不死化ヒト歯肉上皮細胞の CXADR の発現量を増加させる一方、JAM1 の発現量には顕著な影響を示さなかった。また、CXADR の発現量の増加には、リソソームの生合成やオートファジーを制御する転写因子である transcription factor EB (TFEB) の核移行が関与していた。加えて、TFEB の核移行の阻害剤である四逆散抽出液は、S-PRG 溶出液による CXADR の発現量の増加を抑制した。さらに、S-PRG 溶出液の添加により三次元歯肉上皮モデルにおける異物透過性は低下する一方、CXADR をノックダウンした歯肉上皮モデルでは S-PRG 溶出液の影響は認められなかった。

以上の結果より、S-PRG 溶出液は TFEB の核移行を促進させることにより、歯肉上皮細胞の CXADR の発現を増加させ、歯周病原性因子の上皮下組織への侵入を抑制することが示唆された。

背 景

歯周病は、バイオフィルムによる刺激により引き起こされる歯周組織の慢性炎症であり、全世界で 10 億人以上が罹患していると推定されている¹。歯肉溝に堆積したバイオフィルムが周囲環境の変化により高病原性化し **dysbiosis** と呼ばれる状態となると、バイオフィルムの病原性と歯周組織の抵抗性の均衡が崩壊し歯周病が発症する²。一般に上皮は、細胞間接着装置により物理的な障壁として機能している^{3,4}。上皮細胞における細胞間接着装置は、細胞頂端から基底部にかけて密着結合 (タイトジャンクション)、接着結合、デスモゾーム、およびギャップ結合の順に構成されており、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^{5,6}。その中でも上皮細胞の最も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⁶。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上皮バリアとしての役割を担っている^{7,8}。

歯肉上皮においては、タイトジャンクション関連タンパクである **coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR)** と **junctional adhesion molecule 1 (JAM1)** を含めた細胞間接着分子が、上皮バリアの機能を担うことが報告されている⁹。**CXADR** および **JAM1** は、ともに免疫グロブリンスーパーファミリーの **JAM** ファミリータンパクに属する。**JAM** ファミリータンパクは、細胞外に **N** 末端シグナルペプチド、2 つの免疫グロブリン様ドメインおよび膜貫通ドメインを有した構造をもつ。**JAM** ファミリータンパクは血液細胞や免疫細胞などの細胞表面に発現し、ホモ二量体を形成することで細胞間接着や細胞間のシグナル伝達に重要な役割を果たしている^{10,11}。しかし、歯肉上皮細胞に

おけるタイトジャンクション関連タンパクの発現制御については十分な報告が見られない。

病原微生物は病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) と呼ばれる微小な分子モチーフを産生する。PAMPs が細胞表面の Toll 様受容体 (Toll-like receptors : TLRs) を活性化することで、炎症を引き起こすシグナル伝達経路が活性化される¹²。PAMPs が歯肉上皮組織に侵入すると、上皮組織に存在するマクロファージ、線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞、抗原提示細胞などの TLRs が活性化される。その結果、様々な炎症性サイトカインにより歯周組織における炎症反応が惹起され、結合組織や歯槽骨の破壊が亢進し歯周病が進行することが知られている¹³。PAMPs の代表的なものとして、グラム陰性菌の内毒素である lipopolysaccharide (LPS) や、多くの細菌の細胞壁に存在する網目構造の peptidoglycan (PGN) 等が挙げられる¹⁴。三次元歯肉上皮モデルを用いた以前の研究において、CXADR と JAM1 がそれぞれあるいは共にノックダウンされた上皮細胞では、LPS および PGN に対する歯肉上皮層の透過性が亢進することが示唆されている^{15, 16}。このことから、CXADR および JAM1 は PAMPs の歯肉上皮への侵入を防ぎ、歯肉上皮のバリア機能に重要な役割を果たしていると推測される。

一般に歯周病の発症予防処置は、バイオフィルムの病原性と歯周組織の抵抗性の均衡状態を維持するために、バイオフィルムを機械的に除去することによりバイオフィルムの低病原性を図っている。一方で、宿主防御因子の増強により歯周組織の抵抗性を亢進させる方法として臨床応用に至っているものは数少ない。

バイオアクティブ効果を有する物質を用いて歯肉上皮のバリア機能を高めることにより、細菌由来の歯周病原性因子から歯周組織を保護できる可能性が考

えられる^{17, 18}。その物質の 1 つとして、フッ化アルミノホウケイ酸ガラスとポリアクリル酸溶液の反応を利用した surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) フィラーがあげられる¹⁹。S-PRG フィラーは、フッ化物イオン (F^-) およびナトリウムイオン (Na^+)、ホウ酸イオン (BO_3^{3-})、アルミニウムイオン (Al^{3+})、ケイ酸イオン (SiO_3^{2-})、ストロンチウムイオン (Sr^{2+}) の 6 種類のイオンを放出する。これらの内、 SiO_3^{2-} と F^- は象牙質マトリックスの再石灰化を促進することが報告されており²⁰、 Sr^{2+} と F^- はハイドロキシアパタイトをストロンチウムアパタイト^{21, 22} やフルオロアパタイト^{21, 23, 24} に変化させ、歯の耐酸性を向上させることが知られている。加えて、S-PRG フィラー含有歯磨剤がエナメル質の脱灰を阻害することが報告されている²⁵。これらの研究結果に基づき S-PRG フィラーはう蝕予防効果を有する製品として上市されている。S-PRG フィラーの歯周病予防効果についても期待がなされているものの、十分な研究成果は報告されていない。その一助として、S-PRG フィラーから徐放されるマルチイオンによる歯肉上皮のバリア機能の賦活化への効果が検証されれば、S-PRG フィラー含有製剤による歯周病予防が期待できる。

そこで本研究では、う蝕予防効果を有する S-PRG フィラーから徐放されるマルチイオンが歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響を調べることを目的とし、タイトジャンクション関連タンパクである CXADR および JAM1 に焦点を当て、S-PRG フィラーから調整した溶出液 (S-PRG 溶出液) が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

1. 細胞培養および三次元歯肉上皮モデルの作成

ヒト不死化歯肉上皮細胞 (immortalized human gingival epithelial cells : IHGE 細胞²⁶) は、大阪大学 村上伸也教授より供与され、表皮角化細胞増殖無血清液体培地 (Humedia KG-2, Kurabo) を用いて培養した。

三次元歯肉上皮モデルは Nishiguchi らの細胞集積法で作成した²⁷。トリプシン処理後に遠心分離して回収した IHGE 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) 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、上清を取り除いた。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を IHGE 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 well プレート (Iwaki) 内のカバーガラス (松浪硝子工業) 上に、IHGE 細胞を 2×10^6 個播種し、36 時間培養することで歯肉上皮の三次元歯肉上皮モデルを作製した。

2. S-PRG 溶出液の調整

S-PRG フィラーは松風 (株) から提供を受け、S-PRG 溶出液は Fujimoto らの方法で調整した²⁸。S-PRG フィラーを同量の蒸留水に浸漬し、室温で 24 時間緩やかに攪拌した後、3,000 g、23 °C で 6 時間遠心分離した。得られた上清を孔径 0.45 μm のフィルターで濾過して残留する不溶物を除去した濾液を、S-PRG 溶出液として用いた。S-PRG 溶出液中の Al^{3+} および BO_3^{3-} 、 Na^+ 、 SiO_3^{2-} 、 Sr^{2+} のイオン濃度は発光分光分析装置 (ICPS-8000, 島津製作所)、F-

はイオン選択電極計 (Model 720A , Orion Research) 、F⁻ 電極 (Model 9609BNWP, Orion Research) を用いて測定した。S-PRG 溶出液中のイオン濃度は以下の通りであった : Al³⁺ = 0.52 nmol/L、BO₃³⁻ = 132.60 nmol/L、Na⁺ = 19.58 nmol/L、SiO₃²⁻ = 0.49 nmol/L、Sr²⁺ = 1.64 nmol/L、F⁻ = 6.50 nmol/L

3. 四逆散抽出液の調整

四逆散エキス粉末は救心製薬 (株) から購入した。四逆散抽出液は Ikari らの方法で調整した²⁹。1.0 mL の蒸留水に 40 mg の四逆散エキス粉末を添加して攪拌し、98 °C、5 分間インキュベートした。20,400 g、常温で 10 分間の遠心分離により不溶物を沈殿させ、得られた上清を四逆散抽出液として用いた。IHGE 細胞培養液への四逆散抽出液の添加は、100 倍希釈 (v/v) となるように行った。

4. ウェスタンブロット法

IHGE 細胞をトリクロロ酢酸で処理し、Tween-20 含有尿素液にて変性・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、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。一次抗体として以下のものを使用した ; mouse monoclonal anti-JAM1 (SAB4200468, Sigma-Aldrich)、mouse monoclonal anti-β-ACTIN (M177-3, Sigma-Aldrich)、rabbit monoclonal anti-CXADR (10799-R271, Sino Biological)。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。二次抗体として goat anti-mouse antibody conjugated to HRP (7076, Cell Signaling Technology) および goat anti-rabbit antibody conjugated to HRP (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ウェスタンブロット用化学発光基質 (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific) にて処理し、化学発光撮影装置 (ChemiDoc XRS, Bio-Rad) および 1 次元ゲル解析ソフトウェア (Quantity One software package, Bio-Rad) にて解析した。また、バンドの蛍光強度の測定には画像解析ソフト (Fiji³⁰) を用いた。

5. 免疫染色

免疫染色は Takeuchi の方法で行った¹⁶。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 well プレート (Iwaki) 内のカバーガラス (松浪硝子工業) 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・リン酸緩衝液を使用した。ブロッキングには、PBS にゼラチン (gelatin fine powder, Sigma-Aldrich) を濃度 0.1 % 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。一次抗体として以下のものを使用した ; mouse monoclonal anti-JAM1 (SAB4200468, Sigma-Aldrich)、rabbit monoclonal anti-CXADR (10799-R271, Sino Biological)、rabbit polyclonal anti-TFEB (13372-1-AP, Proteintech)、rabbit monoclonal anti-NF- κ B (8242, Cell Signaling Technology)、rabbit polyclonal anti-c-FOS (26192-1-AP, Proteintech)、mouse monoclonal anti-c-JUN (66313-1-Ig, Proteintech)。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。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 635-conjugated goat anti-rabbit IgG (A-31576, Invitrogen)。IHGE 細胞の核染色には 4',6-diamidino-2-phenylindole (D1306, Invitrogen, 以下 DAPI) を使用した。細胞骨格アクチンの染色には Alexa Fluor 633-conjugated phalloidin (A22284, Invitrogen) を使用した。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) でスライドガラス (松浪硝子工業) 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) にて行い、Application Suite X ソフトウェアパッケージ (Leica Microsystems) にて解析した。

6. 定量的リアルタイム PCR

RNeasy Micro Kit (Qiagen) を用い、IHGE 細胞から全 RNA を抽出した。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) および Rotor Gene Q (Qiagen)、各種プライマーを用いた。使用したプライマーを表 1 に示す。各サンプルにおける増幅産物は、 $\Delta\Delta$ CT法により *β -ACTIN* の mRNA の含有量と比較して定量した。

7. RNA 干渉

CXADR およびルシフェラーゼ (luciferase) に対する short hairpin RNA (shRNA) をコードするプラスミドは、Linear DNA (Sigma-Aldrich) を pSIREN-

RetroQ (Clontech) にライゲーションして作製した ; pSIREN-RetroQ-shCXADR #317 (標的配列 : 5'-ATGTAACGAATTTACAACGTCA-3') 、 pSIREN-RetroQ-shLuc (標的配列 : 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3') 。これらのプラスミドをトランスフェクション試薬 (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 puromycin (2 µg/mL, InvivoGen) にて選択した。

8. 歯肉上皮細胞間および歯肉上皮層のバリア機能の評価

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) PGN は Ishii らの方法で精製した³¹。Fluorescein isothiocyanate (FITC) -*P. gingivalis* LPS および FITC-*P. gingivalis* PGN は、*P. gingivalis* LPS (InvivoGen) および *P. gingivalis* PGN を抗体・タンパク質標識キット (Fluorescein Labeling Kit-NH2, DOJINDO) 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。細胞培養インサート (12 well cell culture insert, Corning) 上で培養した IHGE 細胞または三次元歯肉上皮モデルに S-PRG 溶出液を添加し 12 時間インキュベートした後、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は、プレートリーダー (1420 ARVO X device, PerkinElmer) で測定し、データ解析ソフト (WorkOut Plus software package, PerkinElmer) にて解析した。

9. IHGE 細胞内の各種イオン濃度の測定

IHGE 細胞を 100 mm 組織培養用ディッシュに入れ、S-PRG 溶出液を 250

μL 添加し培養した。1 時間培養後、トリプシン処理後に遠心分離して得られた IHGE 細胞を 10 mL の蒸留水で回収した。その後、回収した蒸留水サンプルを氷上にて 21 ゲージ針に 8 回強く押し通し、細胞溶解液を得た。細胞溶解液 (蒸留水, 10 mL/dish) 中の Al^{3+} および BO_3^{3-} 、 Na^+ 、 SiO_3^{2-} 、 Sr^{2+} の濃度は、発光分光分析装置 (ICPS-8000, 島津製作所) で測定した。一方、 F^- の濃度は、 F^- 電極 (Model 9609BNWP, Orion Research) を用いてイオン選択電極計 (Model 720A, Orion Research) で測定した。

10. 統計分析

p 値は、Excel software package (Microsoft) を用いた両側 t 検定によって算出し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. S-PRG 溶出液による IHGE 細胞の CXADR 発現への影響

S-PRG 溶出液の歯肉上皮バリア機能への影響を検討した。まず、S-PRG 溶出液中のマルチイオンの IHGE 細胞内への移行について調べた。S-PRG 溶出液を添加した培地で IHGE 細胞を 1 時間培養後、細胞を回収した。その後、IHGE 細胞を蒸留水により溶解し、細胞溶解液中の Al^{3+} および BO_3^{3-} 、 Na^+ 、 SiO_3^{2-} 、 Sr^{2+} 、 F^- の濃度を測定した。その結果、S-PRG 溶出液を添加して培養した IHGE 細胞の溶解液中には BO_3^{3-} および Na^+ 、 Sr^{2+} 、 F^- が増加していた (表 2)。この結果から、S-PRG 溶出液中のマルチイオンの一部は IHGE 細胞内に移行することが示された。

次に、S-PRG 溶出液が、IHGE 細胞の CXADR と JAM1 に及ぼす影響を調べるため、IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を添加して 12 時間後、ウェスタンブロット法により CXADR および JAM1 の発現量の変化を調べた。その結果、CXADR の発現量は S-PRG 溶出液の添加量に依存して増加し、S-PRG 溶出液を 1 well あたり 25 μL 添加した際に最も増加した。一方、JAM1 の発現量にはほとんど影響がなかった (図 1)。これらの結果から、S-PRG 溶出液は IHGE 細胞の CXADR の発現量を増加させることが示された。

IHGE 細胞における CXADR の局在に対する S-PRG 溶出液の影響を調べるために、IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を添加し 12 時間後、CXADR の局在の変化を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、細胞膜に局在する CXADR の量は非添加のものと比較して増加した (図 2A)。

さらに、歯肉上皮層における CXADR の局在に対する S-PRG 溶出液の影響を調べるために、三次元歯肉上皮モデルに S-PRG 溶出液を添加し 12 時間後、

CXADR の局在の変化を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、歯肉上皮モデル内に局在する CXADR の量は非添加のものと比較して増加することが観察された (図 2B)。

2. S-PRG 溶出液による CXADR 発現増加と TFEB の核移行との関連

IHGE 細胞における CXADR の mRNA への S-PRG 溶出液の影響を調べるため、S-PRG 溶出液を添加した IHGE 細胞から全 RNA を抽出し、相補的 DNA を合成した後にリアルタイム PCR を行い、CXADR mRNA 量を測定した。その結果、IHGE 細胞内の CXADR mRNA 量は、S-PRG 溶出液の添加により増加した (図 3)。次に、S-PRG 溶出液添加による CXADR mRNA 量の増加に関与する転写因子のスクリーニングを行った。まず、炎症性シグナル伝達を誘導する転写因子である nuclear factor- κ B (NF- κ B)、c-FOS および c-JUN の核移行に対する S-PRG 溶出液の影響を調べるために、IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 15、30 または 60 分間添加し、NF- κ B、c-FOS、および c-JUN の局在の変化を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、S-PRG 溶出液による NF- κ B、c-FOS、および c-JUN の核移行に及ぼす影響はみられなかった (図 4~6)。

S-PRG 溶出液には、 Al^{3+} 、 Na^{+} 、および Sr^{2+} の金属イオンが含まれる。そこで、細胞内への金属イオンの流入により核移行する転写因子 transcription factor EB (TFEB) を調べた³²。IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 15、30 または 60 分間添加し、TFEB の局在の変化を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、S-PRG 溶出液を添加後 30 分経過した IHGE 細胞において、TFEB の核移行が顕著に増加した (図 7)。これらの結果から、S-PRG 溶出液は IHGE 細胞における TFEB の核移行を促進させることが示された。

また、S-PRG 溶出液による TFEB の核移行と CXADR の発現量増加の関連

についても検討した。四逆散抽出液は、柴胡の根、枳実の根、甘草、芍薬の 4 種類の生薬の乾燥エキスを混合した漢方薬である四逆散を煮出したもので、リソソームに局在するタンパク複合体 mTORC1 を活性化することで TFEB の核移行を阻害することが報告されている²⁹。そこで、IHGE 細胞に S-PRG 溶出液および四逆散抽出液を添加後 15 または 30 分間反応させ、TFEB の局在への影響を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、S-PRG 溶出液の存在下でも、四逆散抽出液は TFEB の核移行を阻害した (図 8)。

次に、S-PRG 溶出液による TFEB の核移行が CXADR の局在に及ぼす影響を調べるため、IHGE 細胞に S-PRG 溶出液および四逆散抽出液を添加し、ウェスタンブロット法により CXADR の発現量の変化を調べた。その結果、S-PRG 溶出液の添加により増加した CXADR の発現量は、四逆散抽出液の添加により減少した (図 9A,B)。さらに、S-PRG 溶出液による TFEB の核移行が CXADR の局在に及ぼす影響を調べるため、IHGE 細胞に S-PRG 溶出液または四逆散抽出液を添加し、CXADR の局在の変化を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、S-PRG 溶出液の添加により増加した細胞膜上の CXADR は、四逆散抽出液の添加により減少した (図 9C)。これらの結果から、S-PRG 溶出液は IHGE 細胞の TFEB の核移行を誘導し、IHGE 細胞の細胞膜に局在する CXADR の発現量を増加させることが示された。

3. S-PRG 溶出液による歯肉上皮層の異物透過性への影響

IHGE 細胞間の異物透過性に対する S-PRG 溶出液の影響について検討した。細胞培養インサート上で S-PRG 溶出液を添加して培養した IHGE 細胞に、透過性を評価するトレーサーとして FITC-40 kDa dextran および FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN を添加し、30 分後にインサートを透過

したトレーサーの量を測定した (図 10A)。その結果、S-PRG 溶出液を添加した IHGE 細胞では非添加のものと比較し、FITC-40 kDa dextran および FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN の透過量がそれぞれ減少した (図 10B~E)。これらの結果から、S-PRG 溶出液は IHGE 細胞間の異物透過性を低下させることが示された。

次に、歯肉上皮層の異物透過性に対する S-PRG 溶出液の影響について検討した。三次元歯肉上皮モデルを用いて、IHGE 細胞と同様に透過性実験を行ったところ (図 11A)、S-PRG 溶出液を添加した上皮モデルでは非添加のものと比較し、FITC-40 kDa dextran および FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN の透過量がそれぞれ減少した (図 11B~D)。これらの結果から、S-PRG 溶出液は歯肉上皮層の異物透過性を低下させることが示された。

4. S-PRG 溶出液の歯肉上皮 CXADR に依存的なバリア機能への影響

歯肉上皮層の異物透過性に CXADR の発現が及ぼす影響について検討した。CXADR に対する shRNA(shCXADR) を IHGE 細胞に遺伝子導入し、CXADR ノックダウン細胞を作成した。一方、コントロールとして *luciferase* に対する shRNA(shLuc) を安定発現する IHGE 細胞を作成した。まず、CXADR ノックダウン細胞への S-PRG 溶出液の影響を調べるため、CXADR ノックダウン細胞に S-PRG 溶出液を添加して 12 時間後、ウェスタンブロット法により CXADR の発現量を調べた。その結果、コントロール細胞においてみられる S-PRG 溶出液による CXADR の発現増加が、CXADR のノックダウンでは認められないことを確認した (図 12A)。また、CXADR ノックダウン細胞を用いて三次元歯肉上皮モデルを作製し、CXADR の局在を共焦点顕微鏡で観察した結果、CXADR をノックダウンさせた三次元歯肉上皮モデルでは CXADR が発現

していないことを確認した (図 12B)。

また、**CXADR** をノックダウンさせた三次元歯肉上皮モデルでは、shLuc を発現する歯肉上皮モデルと比較して、FITC-40 kDa dextran および FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN の透過量はそれぞれ約 15 倍、約 1.5 倍、約 25 倍減少することが以前の研究から報告されている¹⁵。そこで、**CXADR** ノックダウンの歯肉上皮モデルに S-PRG 溶出液を添加し、FITC-40 kDa dextran および FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN をそれぞれ添加して 30 分後に、インサートを透過したトレーサーの量を測定し、S-PRG 溶出液が **CXADR** ノックダウンの歯肉上皮モデルに及ぼす影響を調べた (図 13A)。その結果、対照とした shLuc を発現する歯肉上皮モデルでは、FITC-40 kDa dextran および FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN の透過量が減少した。一方、**CXADR** ノックダウンの歯肉上皮モデルでは、S-PRG 溶出液の添加による 3 種類のトレーサーの透過量は減少しなかった (図 13B~D)。これらの結果から、歯肉上皮層の異物透過性に対する S-PRG 溶出液の効果は **CXADR** に依存することが示された。

考 察

本研究の結果、S-PRG 溶出液の添加により TFEB の核移行が誘導され、IHGE 細胞における CXADR の発現量が増加することが示された。また、S-PRG 溶出液は CXADR の発現量を促進させることにより、三次元歯肉上皮モデルの異物透過性を低下させ、歯肉上皮のバリア機能を強化することが示された。

S-PRG 溶出液が歯肉上皮のバリア機能を強化することを示唆する知見は他にもひとつ報告されている。炎症に伴って宿主細胞から分泌されるタンパク分解酵素 matrix metalloproteinase (MMP) は歯周組織を破壊し、歯周病の進行を促進する⁵。炎症性サイトカインの 1 つである TNF- α は MMP-9 の産生を誘導し、歯肉上皮細胞の接着結合に関与する E-cadherin を解離させ、上皮バリア機能を低下させることが報告されている³³。一方、S-PRG 溶出液は、歯肉線維芽細胞からの MMP-1 ならびに MMP-3 の分泌を抑制することが知られている³⁴。

本研究において検討した転写因子のうち、NF- κ B は RelA/p65 サブユニットを含むホモダイマーとヘテロダイマーから構成されるタンパクで³⁵、c-FOS ならびに c-JUN はヘテロダイマーを形成して activator protein-1 (AP-1) 複合体を構成するタンパクである³⁶。NF- κ B や AP-1 は、宿主細胞による炎症性サイトカインの発現を誘導する³⁷。肺胞上皮細胞では、新型コロナウイルスの感染により NF- κ B ならびに AP-1 が過剰に活性化され、肺胞上皮細胞間の異物透過性を亢進し、肺胞上皮のバリア機能が低下することが報告されている³⁸。S-PRG 溶出液の添加により、歯肉上皮細胞における NF- κ B および AP-1 の過剰な核内移行は認められなかった (図 4~6)。一方、基底レベルの NF- κ B の活性化は、宿主細胞の自然免疫応答に重要である³⁵。本研究において、S-PRG 溶

出液の添加では **NF-κB** の核内移行の顕著な阻害は認めなかった(図 4) 。これらのことから、**S-PRG** 溶出液は歯肉上皮のバリア機能を強化する一方、局所の恒常性維持に必要な自然免疫応答の阻害は行わないと推測された。

S-PRG 溶出液による歯肉上皮の透過性の低下には、透過物質である **LPS** と **PGN** との間で差を認められた (図 10、11) 。本研究で用いた **LPS** の分子量は約 10~20 kDa であるのに対し、**PGN** は細胞膜を構成する巨大分子である。**S-PRG** 溶出液による上皮透過性の低下は、分子量が大きい透過物質に対して顕著である可能性が考えられた。

本研究において、歯肉上皮層の異物透過性への **CXADR** の影響を検討した際(図 13) 、コントロールとして *luciferase* ノックダウン細胞を用いた。これは、ターゲット特異的なノックダウンのベースラインを比較することで、トランスフェクションに起因するオフターゲット効果を否定するためである。また、本研究で使用したトランスフェクション試薬は、細胞生存率、表現型、標的となる mRNA およびタンパク質レベルにほとんど影響を及ぼさないため、非ノックダウン細胞を使用しなかった。

現在、**S-PRG** フィラー含有濃度 5 % の歯科専用ペースト (**PRG** プロケアジェル α、松風 (株)) が歯科医院でのプロフェッショナルケアに用いられている。本商品と **S-PRG** 溶出液から徐放されるマルチイオンの濃度には相違を認めることがメーカーより示されている (表 3) 。本研究において、**CXADR** のタンパク量を最も増加させる **S-PRG** 溶出液の添加量を調べた結果 (図 1) 、細胞培養培地 1 mL に対して **S-PRG** 溶出液を 12.5 μL 添加した際に最大のタンパク量の増加を認めた。本市販製品の改良の機会には、本研究の結果を一助としていただければ幸いである。

本研究において、**S-PRG** 溶出液中のマルチイオンの一部が歯肉上皮細胞内に

移行することが示された (表 2)。しかし、これらのイオンがどのように宿主細胞内に取り込まれているのかは不明である。以前より、 Ca^{2+} は飢餓状態や運動時において、細胞内分解の場であるリソソームに存在するカルシウムチャネルを通じて細胞質へ放出され、脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが活性化されて、TFEB の脱リン酸化および核移行が促進されることが報告されている³⁹。一方、歯肉上皮細胞内に移行する S-PRG 溶出液中のマルチイオンについては、リソソームを介した細胞質への取り込みに関する報告はなく、各イオンを透過させるイオンチャネルおよびその調節因子の同定が S-PRG 溶出液の細胞内動態の理解に必要である。リソソーム内に貯蔵されている金属イオンには、 Ca^{2+} 以外に Fe^{2+} および Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} などが存在するが、これらイオンのうち Fe^{2+} は、活性酸素を生成するフェントン反応に応じてリソソーム内から細胞質に放出されることが報告されている⁴⁰。そして、細胞内で産生された活性酸素は TFEB の 212 番目のシステインを酸化し、 Ca^{2+} 非依存的な経路により TFEB の脱リン酸化および核移行を促進することが報告されている^{41, 42}。これらのことから、S-PRG 溶出液中のマルチイオンの歯肉上皮細胞内への取り込みが、フェントン反応による活性酸素の生成を誘導し、TFEB の核移行を促進する可能性が考えられる。これについては、今後の検討課題である。

S-PRG 溶出液の添加による CXADR タンパクの発現増加には、本研究で示された CXADR 遺伝子発現の促進以外にも関与するメカニズムが存在する可能性がある。TFEB の核移行は、リソソームの生合成を促進し細胞の恒常性を維持するオートファジーを活性化することが知られている⁴³。一般的に、細胞は不要な膜タンパクを細胞内へ取り込みリソソームで分解するエンドサイトーシス経路と、リサイクリングエンドソームおよびレトロマーを介して細胞内に取り込まれた膜タンパクを細胞膜へ戻すリサイクリング経路の 2 つの経路により、

膜タンパク全体のバランスを維持している⁴⁴。レトロマーは、エンドソームにある特定の膜タンパク質と結合してゴルジ体や細胞膜に膜タンパク質を輸送するタンパク複合体で、リサイクリング経路において重要な役割を担う⁴⁵。例えば、体内に最も多く存在するアミノ酸であるグルタミンの欠乏時には TFEB の核移行が促進し、レトロマーを構成するタンパクの発現が増加することで、グルタミントランスポーターのリサイクリングを活性化することが報告されている⁴⁶。歯肉上皮細胞における S-PRG 溶出液による TFEB の核移行が、CXADR 遺伝子発現の増加だけでなく、リサイクリング経路を介した CXADR の再利用を促進している可能性がある。したがって、S-PRG 溶出液が CXADR の細胞内動態に及ぼす影響を理解するために、CXADR の細胞質ドメインである C 末端領域に結合するレトロマーの同定、および S-PRG 溶出液の添加による当該レトロマーの遺伝子発現や活性化への影響についての検討も今後の課題である。

一般的に、医薬部外品および化粧品の分野では、皮膚角層の水分量の測定、および細胞間脂質であるセラミドの定量を行い、上皮バリア機能への影響を間接的に評価している。しかし、ヒト歯肉上皮のバリア機能の評価法についての報告は見られない。今後、ヒト歯肉の異物透過性への S-PRG 溶出液の効果を調べるために、歯肉上皮のバリア機能についての直接的、または間接的な評価法の確立が必要である。

本研究で得られた結果より、S-PRG 溶出液は TFEB の核移行を促進させることにより、歯肉上皮細胞の CXADR の発現を増加させ、歯周病原性因子の上皮下組織への侵入を抑制することが示唆された。今後さらなる検討を加え、歯肉上皮バリアの分子機構の理解を深めていきたい。

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、終始にわたり懇篤なる御指導と御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 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感染制御学系部門予防歯科学講座 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. World Health Organization. (2022) : Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>
2. Hajishengallis, G. (2015) : Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* **15**, 30-44.
3. Presland, R.B. & Jurevic, R.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**, 564-574.
4. Schroeder, H.E. & Listgarten, M.A. (1997) : The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* **13**, 91-120.
5. Groeger, S.E. & Meyle, J. (2015) : Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol 2000* **69**, 46-67.
6. Naser, A.N., Lu, Q. & Chen, Y.H. (2023) : Trans-compartmental regulation of tight junction barrier function. *Tissue Barriers* **11**, 2133880.
7. Tsukita, S., Furuse, M. & Itoh, M. (2001) : Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 285-293.
8. Boivin, F.J. & Schmidt-Ott, K.M. (2017) : Transcriptional mechanisms coordinating tight junction assembly during epithelial differentiation. *Ann N Y Acad Sci* **1397**, 80-99.
9. Mitchell, L.A. & Koval, M. (2010) : Specificity of interaction between clostridium perfringens enterotoxin and claudin-family tight junction proteins. *Toxins (Basel)* **2**, 1595-1611.

10. Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. & Vestweber, D. (2004) : Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* **117**, 19-29.
11. Mandell, K.J. & Parkos, C.A. (2005) : The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 857-867.
12. Kawai, T. & Akira, S. (2011) : Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637-650.
13. Hans, M. & Hans, V.M. (2011) : Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *J Oral Sci* **53**, 263-271.
14. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006) : Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
15. Takeuchi, H. *et al.* (2021) : *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of coxsackievirus and adenovirus receptor. *Cell Microbiol* **23**, e13388.
16. Takeuchi, H. *et al.* (2019) : *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via degradation of junctional adhesion molecule 1. *Plos Pathogens* **15**.
17. Golub, L.M. & Lee, H.M. (2020) : Periodontal therapeutics: current host-modulation agents and future directions. *Periodontol 2000* **82**, 186-204.
18. Dhaifullah, E., Seayed, H.S., Mostafa, D., Alharbi, A.M.M. & Alotaibi, W.M. (2021) : Does chemically modified curcumin control the progression of periodontitis? a systematic review. *J Exp Pharmacol* **13**, 565-575.
19. Ikemura, K. *et al.* (2003) : Optimizing filler content in an adhesive system

- containing pre-reacted glass-ionomer fillers. *Dent Mater* **19**, 137-146.
20. Saito, T., Toyooka, H., Ito, S. & Crenshaw, M.A. (2003) : In vitro study of remineralization of dentin: effects of ions on mineral induction by decalcified dentin matrix. *Caries Res* **37**, 445-449.
 21. Featherstone, J.D., Shields, C.P., Khademazad, B. & Oldershaw, M.D. (1983) : Acid reactivity of carbonated apatites with strontium and fluoride substitutions. *J Dent Res* **62**, 1049-1053.
 22. Dedhiya, M.G., Young, F. & Higuchi, W.I. (1973) : Mechanism for the retardation of the acid dissolution rate of hydroxapatite by strontium. *J Dent Res* **52**, 1097-1109.
 23. Iijima, Y. & Koulourides, T. (1989) : Fluoride incorporation into and retention in remineralized enamel. *J Dent Res* **68**, 1289-1292.
 24. Zero, D.T., Fu, J., Espeland, M.A. & Featherstone, J.D. (1988) : Comparison of fluoride concentrations in unstimulated whole saliva following the use of a fluoride dentifrice and a fluoride rinse. *J Dent Res* **67**, 1257-1262.
 25. Amaechi, B.T. *et al.* (2018) : Effectiveness of S-PRG filler-containing toothpaste in inhibiting demineralization of human tooth surface. *Open Dent J* **12**, 811-819.
 26. Murakami, S. *et al.* (2002) : Activation of adenosine-receptor-enhanced iNOS mRNA expression by gingival epithelial cells. *J Dent Res* **81**, 236-240.
 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**, 3506-3510.
28. Fujimoto, Y. *et al.* (2010) : Detection of ions released from S-PRG fillers and their modulation effect. *Dent Mater J* **29**, 392-397.
 29. Ikari, S. *et al.* (2020) : Starvation-induced autophagy via calcium-dependent TFEB dephosphorylation is suppressed by Shigyakusan. *PLoS One* **15**, e0230156.
 30. Schindelin, J. *et al.* (2012) : Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.
 31. Ishii, K. *et al.* (2010) : *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J Biol Chem* **285**, 33338-33347.
 32. Peña, K.A. & Kiselyov, K. (2015) : Transition metals activate TFEB in overexpressing cells. *Biochem J* **470**, 65-76.
 33. Oh, C., Kim, H.J. & Kim, H.M. (2019) : Vitamin D maintains E-cadherin intercellular junctions by downregulating MMP-9 production in human gingival keratinocytes treated by TNF- α . *J Periodontal Implant Sci* **49**, 270-286.
 34. Inoue, H. *et al.* (2022) : Effects of S-PRG filler eluate on MMP-1 and MMP-3 secretion by human gingival fibroblasts. *Dent Mater J* **41**, 159-166.
 35. Zhang, Q., Lenardo, M.J. & Baltimore, D. (2017) : 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell* **168**, 37-57.
 36. Chiu, R. *et al.* (1988) : The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* **54**, 541-552.

37. Wullaert, A., Bonnet, M.C. & Pasparakis, M. (2011) : NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res* **21**, 146-158.
38. Barilli, A. *et al.* (2022) : Immune-mediated inflammatory responses of alveolar epithelial cells: implications for COVID-19 lung pathology. *Biomedicines* **10**.
39. Nakamura, S. *et al.* (2015) : LC3 lipidation is essential for TFEB activation during the lysosomal damage response to kidney injury. *Nat Cell Biol* **22**, 1252-1263.
40. Xu, H. & Ren, D. (2015) : Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* **77**, 57-80.
41. Zhou, J. *et al.* (2022) : Full-coverage regulations of autophagy by ROS: from induction to maturation. *Autophagy* **18**, 1240-1255.
42. Wang, H. *et al.* (2020) : Oxidation of multiple MiT/TFE transcription factors links oxidative stress to transcriptional control of autophagy and lysosome biogenesis. *Autophagy* **16**, 1683-1696.
43. Settembre, C. *et al.* (2011) : TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**, 1429-1433.
44. Grant, B.D. & Donaldson, J.G. (2009) : Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 597-608.
45. Carosi, J.M., Denton, D., Kumar, S. & Sargeant, T.J. (2023) : Receptor recycling by retromer. *Mol Cell Biol* **43**, 317-334.
46. Curnock, R., Calcagni, A., Ballabio, A. & Cullen, P.J. (2019) : TFEB controls retromer expression in response to nutrient availability. *J Cell Biol*

218, 3954-3966.

表 1. リアルタイム **PCR** で使用したプライマー

プライマーの名称		塩基配列 (5'~3')
CXADR	forward	ATGCCCACTTCATGGTTAGC
	reverse	GCGCTAGCAAGCAAAGTT
GAPDH	forward	CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA
	reverse	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC

表 2. IHGE 細胞溶解液に含まれるイオン濃度

	BO ₃ ³⁻		Al ³⁺		SiO ₃ ²⁻		Sr ²⁺		Na ⁺		F ⁻	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Mock	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00	207.38	1.15	0.00	0.00
S-PRG 溶出液 (250 µL/dish)	1.70*	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.16*	0.00	210.82*	1.29	0.16*	0.01

データは parts per million (ppm) で示している。*p < 0.05 (両側 *t* 検定)、n = 5。

表 3. PRG プロケアジェル α および S-PRG 溶出液から徐放されるイオン
濃度

	BO_3^{3-}	Al^{3+}	SiO_3^{2-}	Sr^{2+}	Na^+	F^-
PRG プロケアジェル α	474.2	383.6	25.9	1063.6	1346.6	332.0
S-PRG 溶出液	1457.8	14.7	13.5	168.3	509.3	137.7

データは parts per million (ppm) で示している。松風 (株) より提供された。

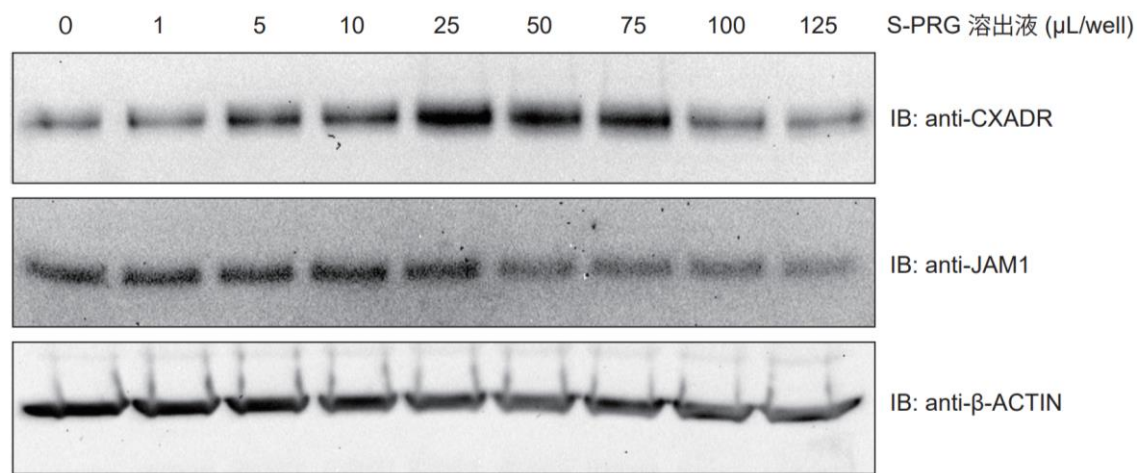


図 1. S-PRG 溶出液による IHGE 細胞の CXADR および JAM1 発現量への影響

6 well プレートで培養した IHGE 細胞に種々の量の S-PRG 溶出液を添加して 12 時間後、ウェスタンブロット法により、CXADR および JAM1 の発現量の変化を確認した。コントロールとして β-ACTIN を用いた。IB: immunoblot。

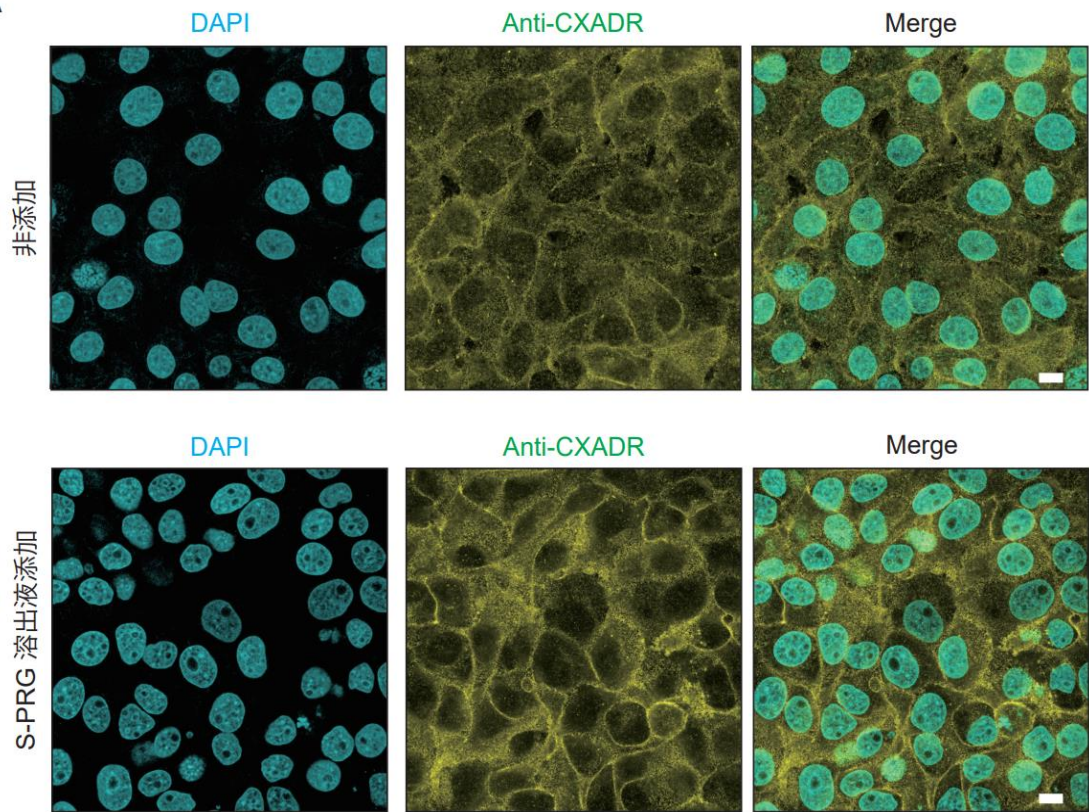
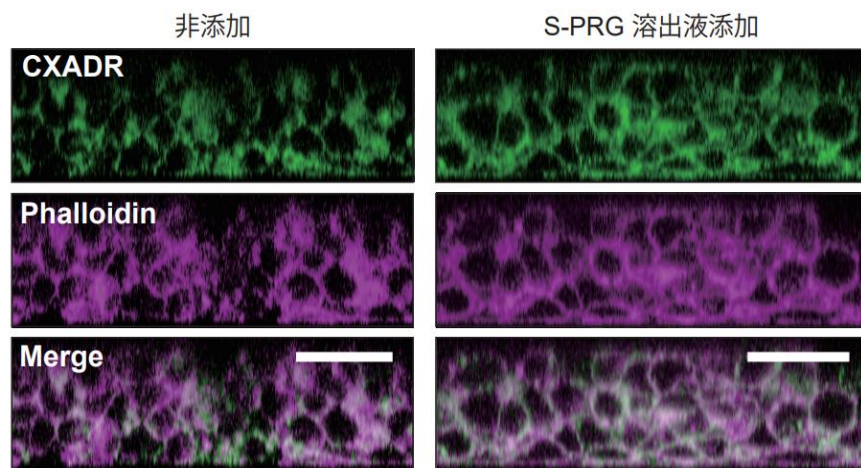
A**B**

図 2. S-PRG 溶出液による IHGE 細胞および三次元歯肉上皮モデルの CXADR 局在への影響

(A) 12 well プレート内のカバーガラス上で培養された IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 12.5 μ L 添加して 12 時間後に細胞を固定し、DAPI (シアン) および CXADR 抗体 (黄) で免疫染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μ m を示す。

(B) 24 well プレート内のカバーガラス上で培養し三次元歯肉上皮モデルに、S-PRG 溶出液を 6.25 μ L 添加して 12 時間後に細胞を固定し、CXADR 抗体 (緑) および Alexa Fluor 633 で標識した phalloidin (マゼンタ) で免疫染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 30 μ m を示す。

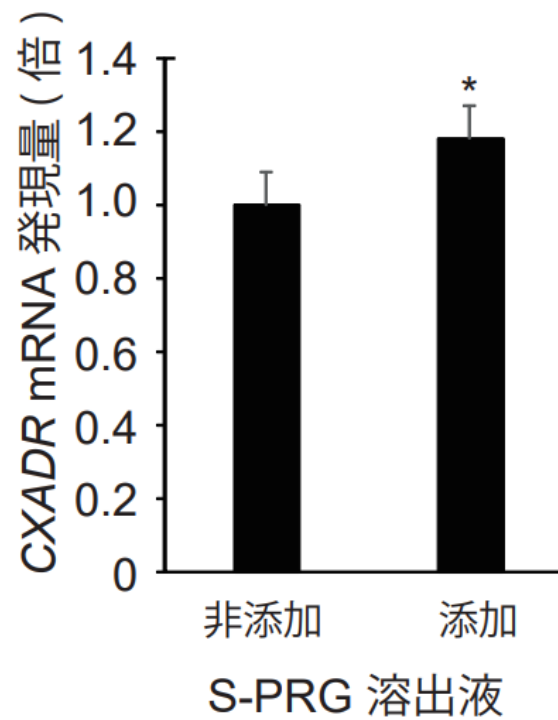


図 3. S-PRG 溶出液による IHGE 細胞の CXADR mRNA 発現量への影響

6 well プレートで培養した IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 25 μ L 添加して 12 時間後の CXADR mRNA の発現量を測定した。グラフの縦軸は、S-PRG 溶出液非添加における mRNA 発現量を対照とした倍数で示している。* $p < 0.05$ (両側 t 検定)、 $n = 6$ 、bar：標準偏差。

S-PRG 溶出液添加後

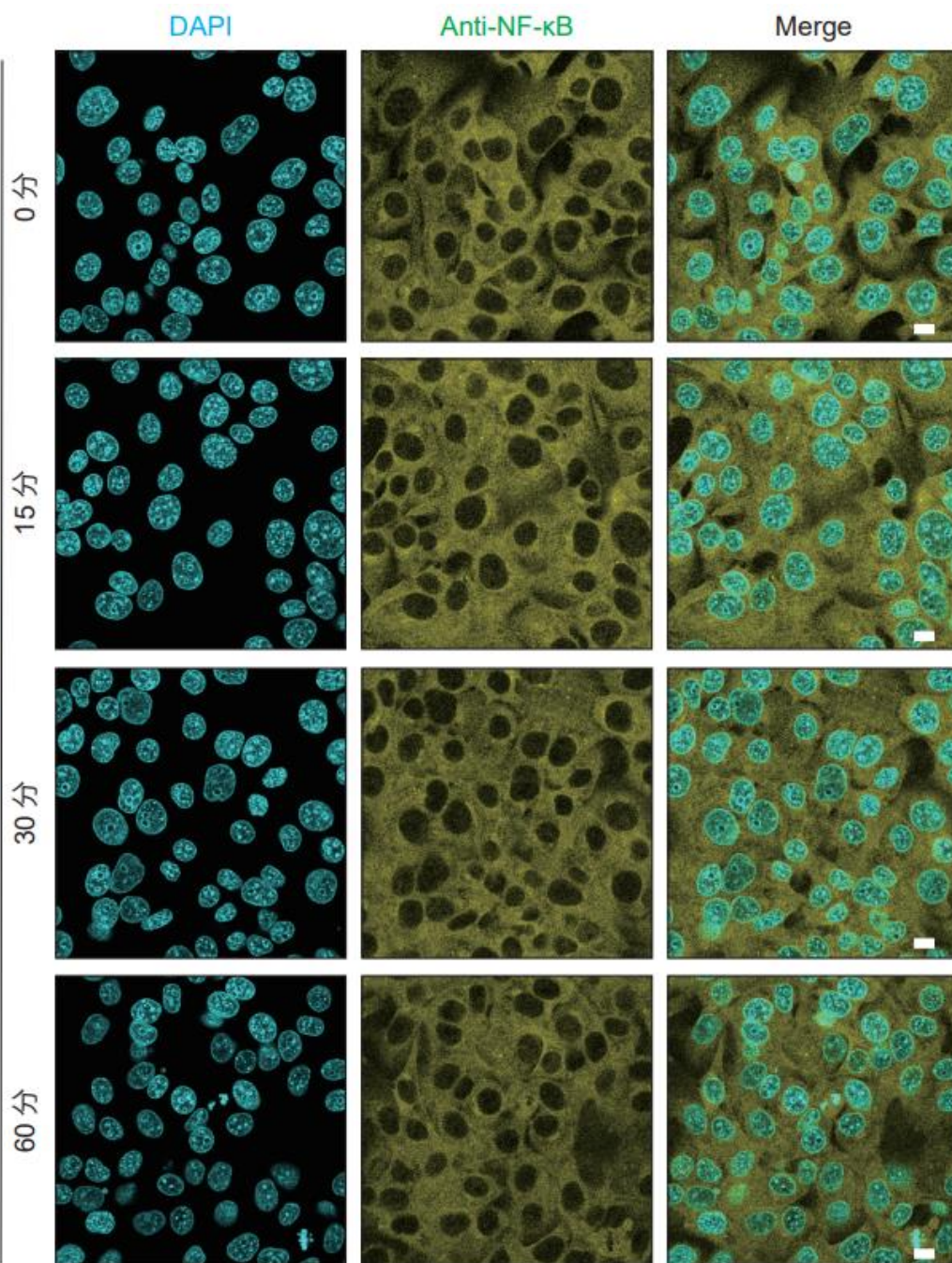


図 4. IHGE 細胞における NF- κ B の核移行への S-PRG 溶出液の影響

12 well プレート内のカバーガラス上で培養した IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 12.5 μ L 添加して 15 または 30、60 分間反応させた後に、細胞を固定し、DAPI (シアン) および NF- κ B 抗体 (黄) で染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μ m を示す。

S-PRG 溶出液添加後

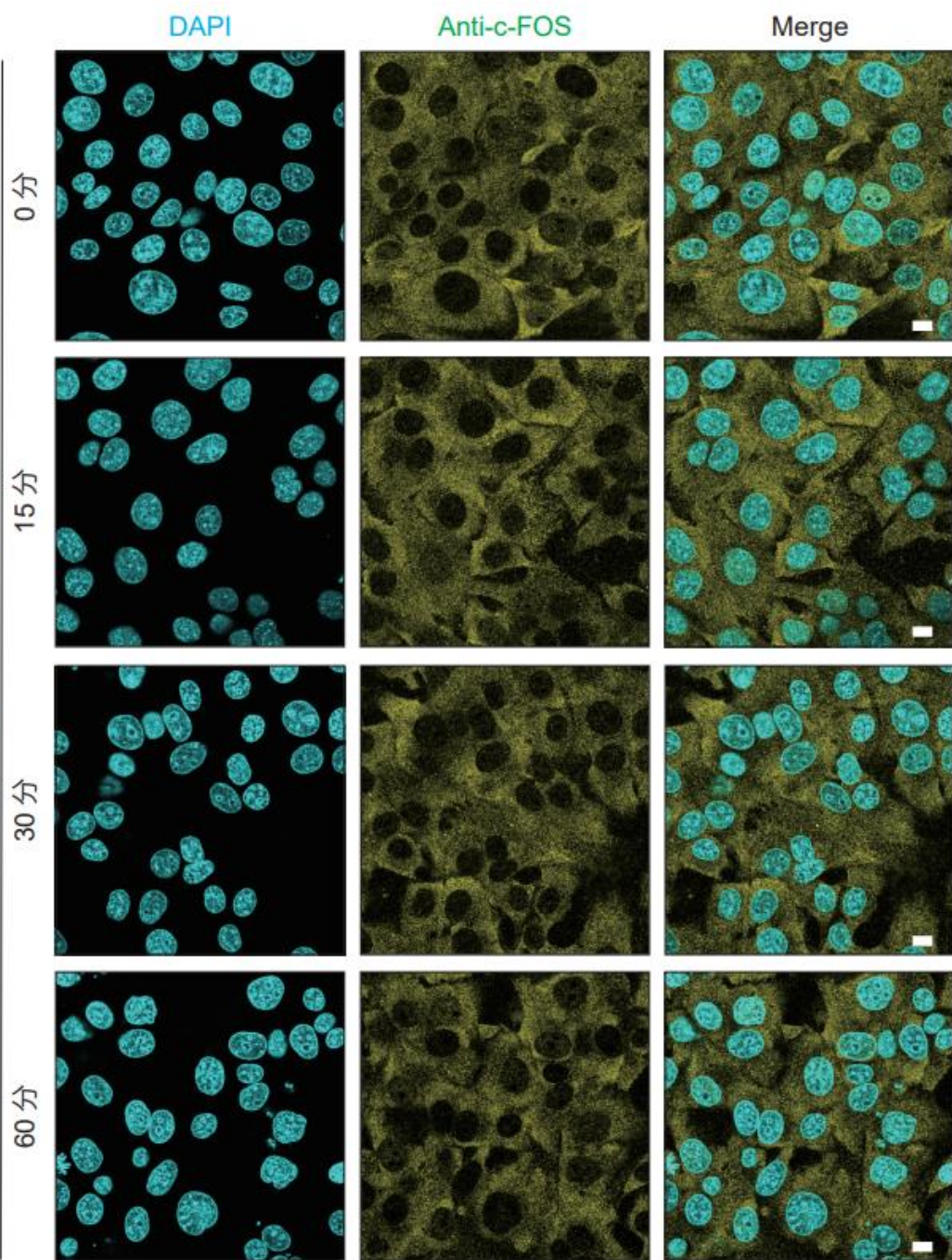


図 5. IHGE 細胞における c-FOS の核移行への S-PRG 溶出液の影響

12 well プレート内のカバーガラス上で培養した IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 12.5 μ L 添加して 15 または 30、60 分間反応させた後に、細胞を固定し、DAPI (シアン) および c-FOS 抗体 (黄) で染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μ m を示す。

S-PRG 溶出液添加後

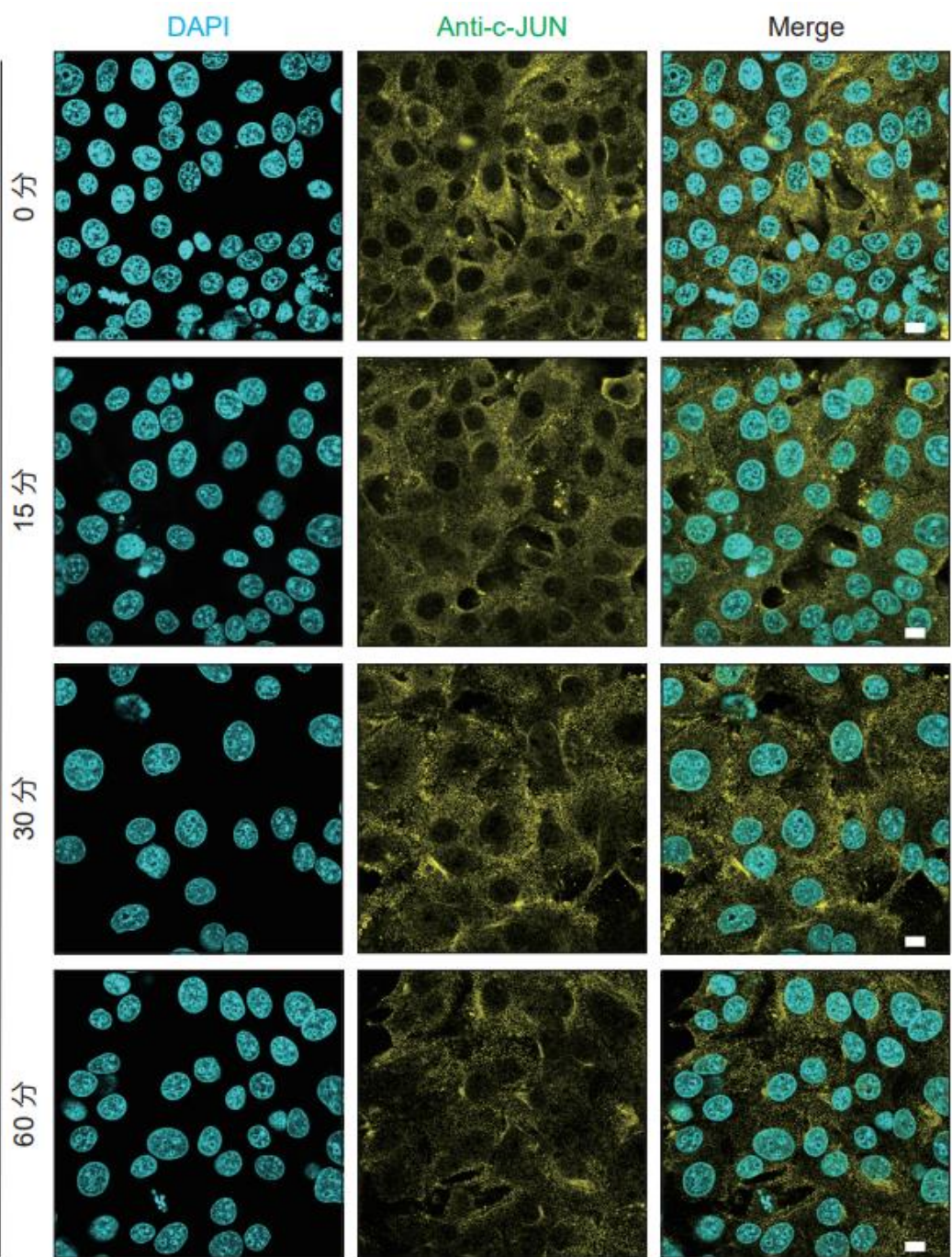


図 6. IHGE 細胞における c-JUN の核移行への S-PRG 溶出液の影響

12 well プレート内のカバーガラス上で培養した IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 12.5 μ L 添加して 15 または 30、60 分間反応させた後に、細胞を固定し、DAPI (シアン) および c-JUN 抗体 (黄) で染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μ m を示す。

S-PRG 溶出液添加後

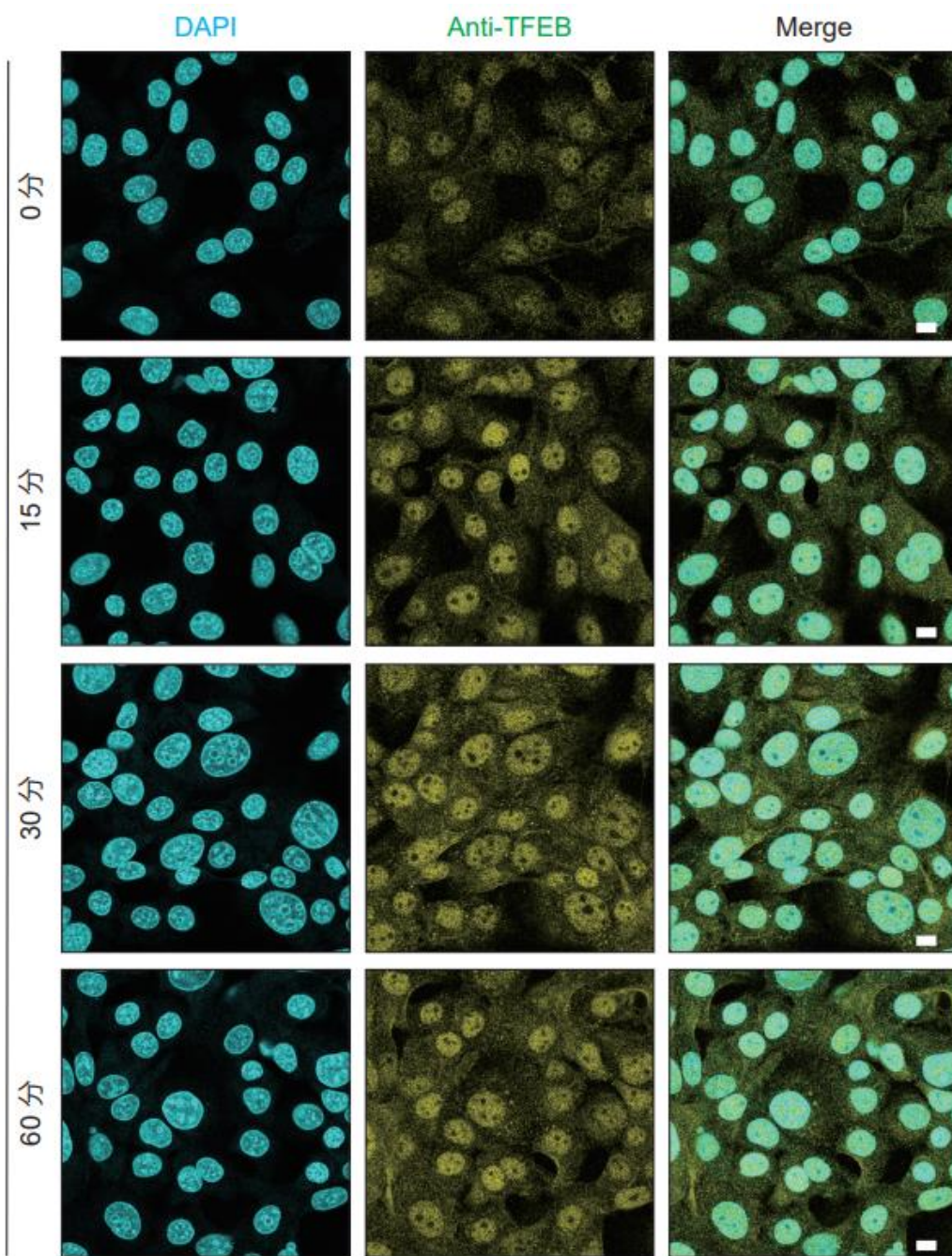


図 7. IHGE 細胞における TFEB の核移行への S-PRG 溶出液の影響

12 well プレート内のカバーガラス上で培養した IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 12.5 μ L 添加して 15 または 30、60 分間反応させた後に、細胞を固定し、DAPI (シアン) および TFEB 抗体 (黄) で免疫染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μ m を示す。

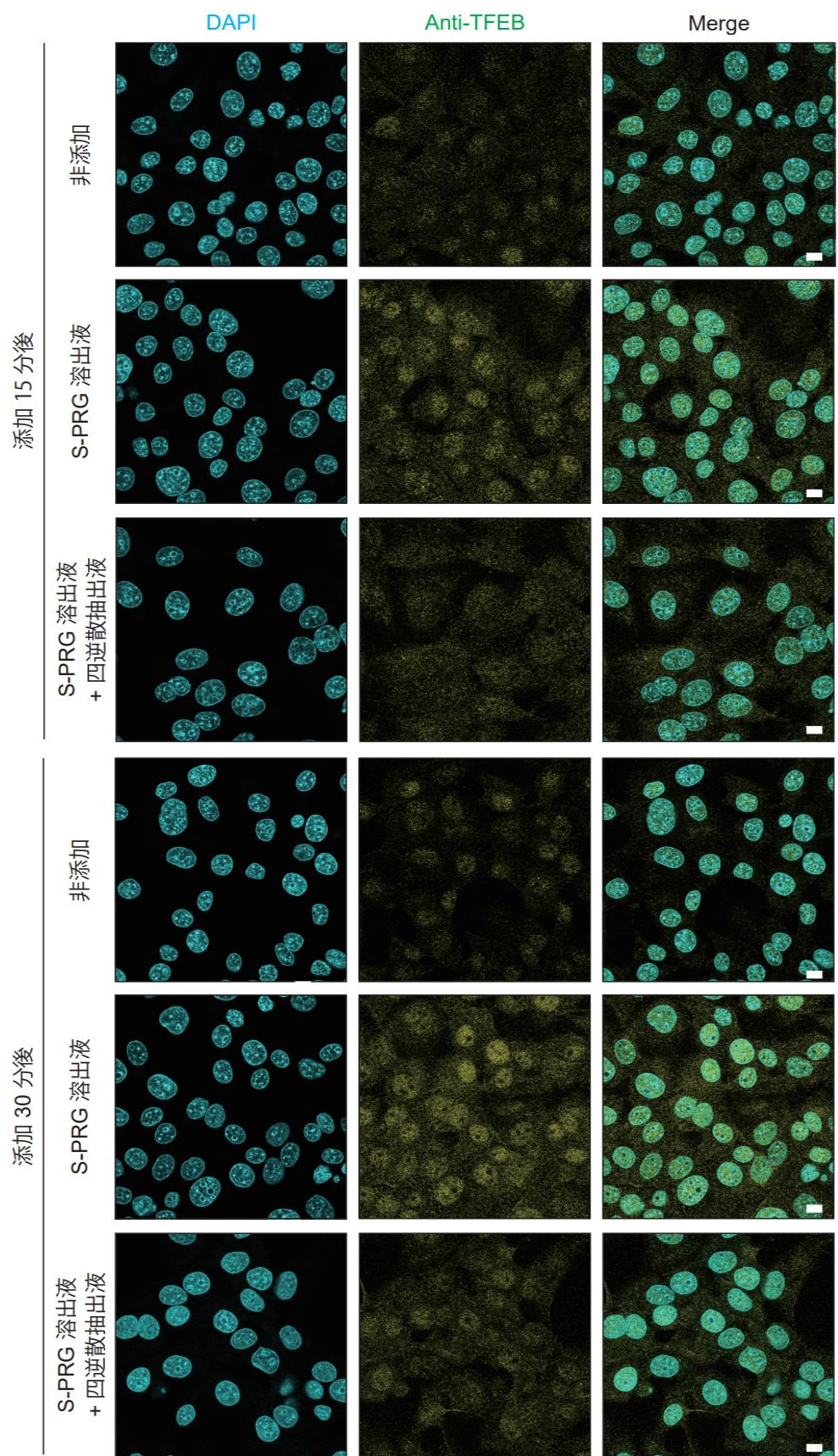


図 8. IHGE 細胞における TFEB の核移行への四逆散抽出液の影響

12 well プレート内のカバーガラス上で培養した IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 12.5 μL または四逆散抽出液を 10 μL 添加して 15 または 30 分間反応させた後に、細胞を固定し、DAPI (シアン) および TFEB 抗体 (黄) で染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μm を示す。

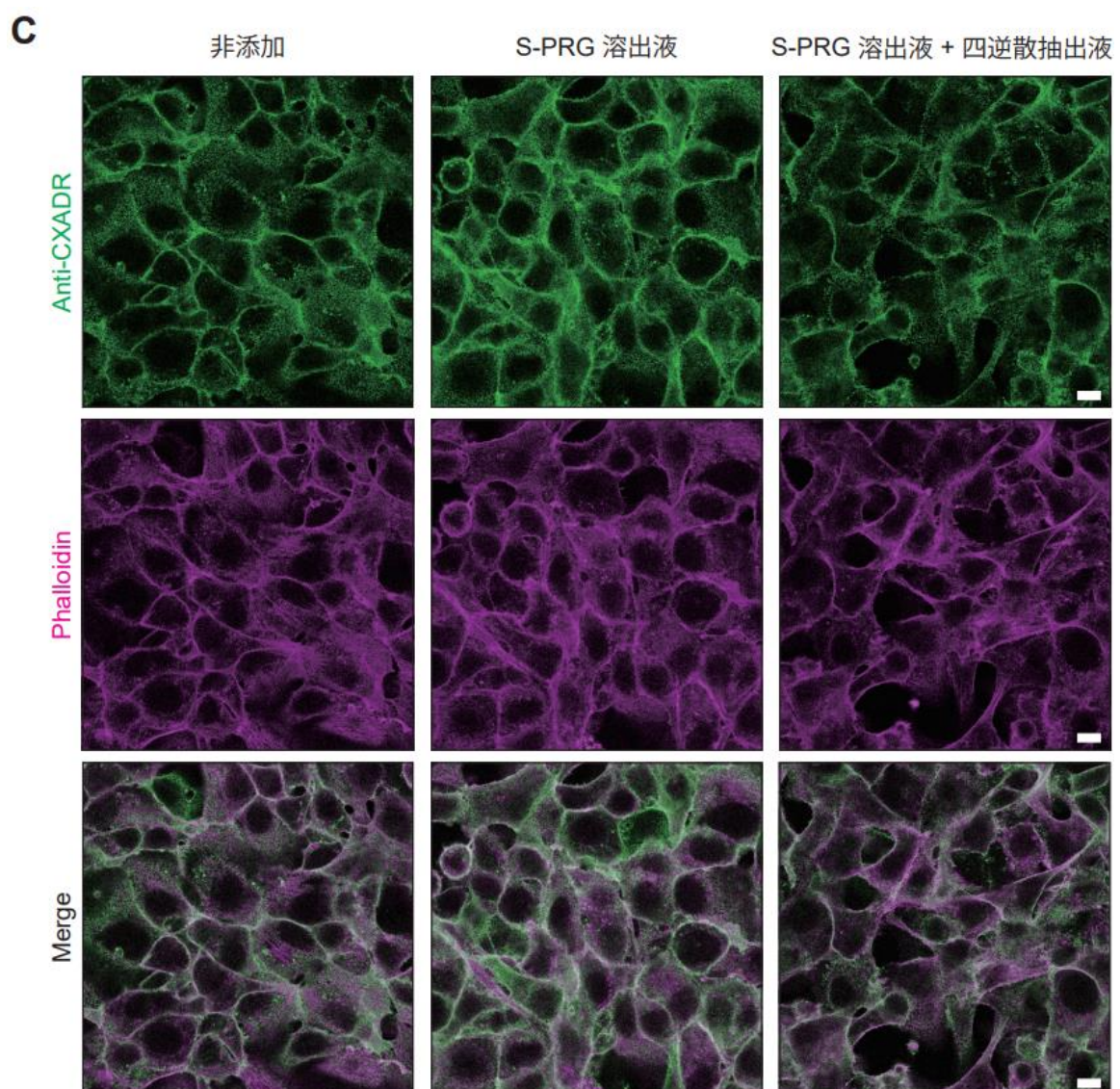
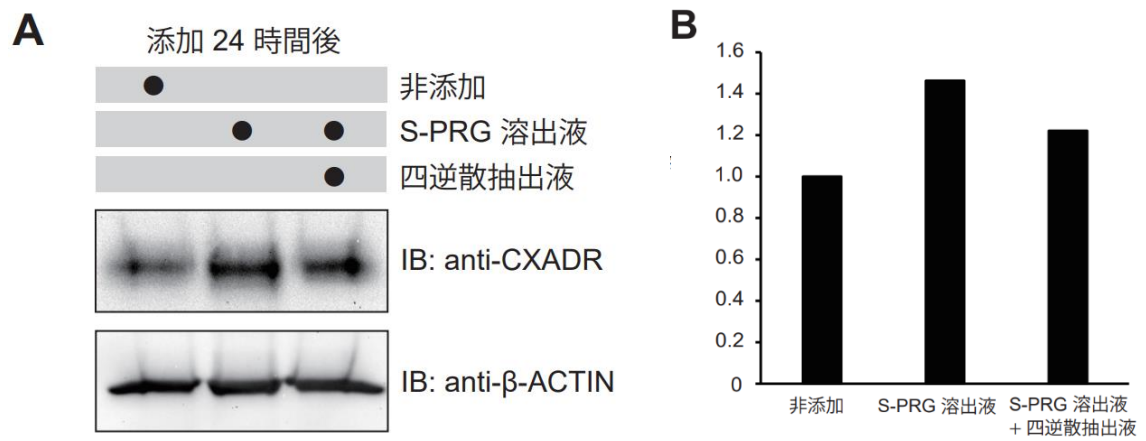


図 9. S-PRG 溶出液による TFEB の核移行と CXADR の発現量増加の関連

(A) 6 well プレートで培養した IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 25 μ L または四逆散抽出液を 20 μ L 添加して 24 時間後、ウェスタンブロット法により、IHGE 細胞における CXADR の発現量の変化を確認した。

(B) (A) における CXADR の発現量の蛍光強度を示す。グラフの縦軸は、非添加における蛍光強度をコントロールとした倍数で示している。

(C) 12 well プレート内のカバーガラス上で培養した IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 12.5 μ L または四逆散抽出液を 10 μ L 添加し、24 時間後に細胞を固定し、CXADR 抗体 (緑) および Alexa Fluor 633 で標識した phalloidin (マゼンタ) で免疫染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μ m を示す。

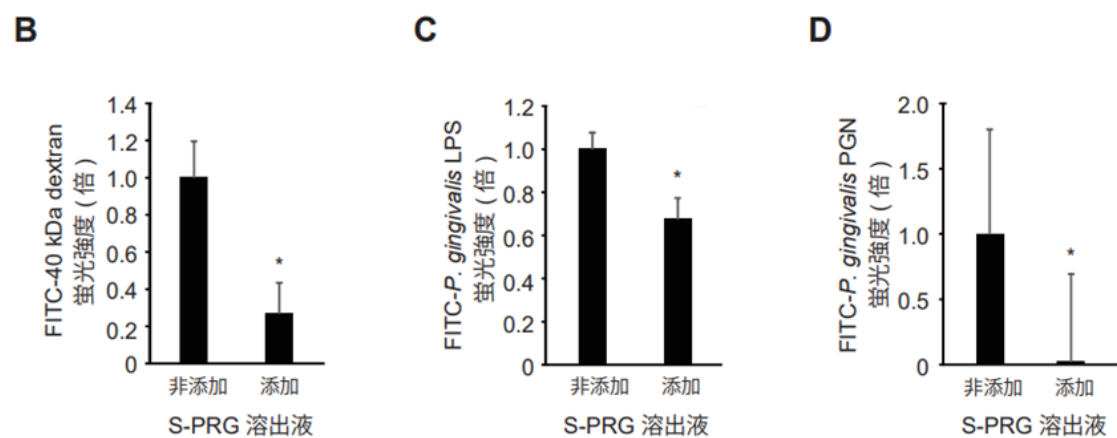
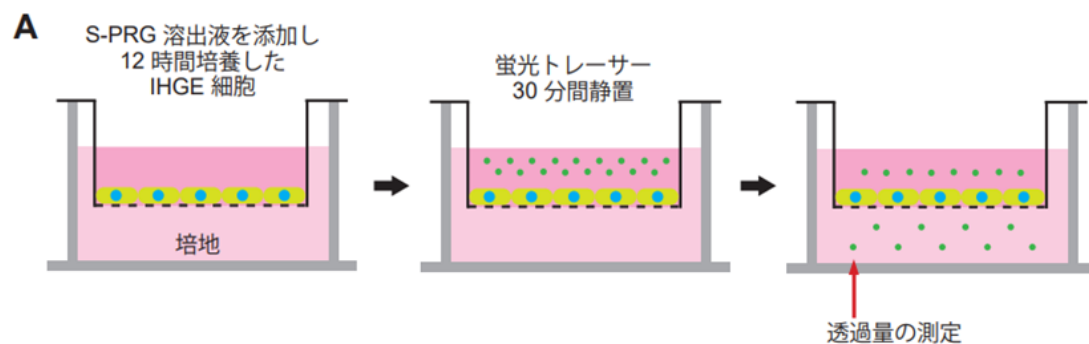


図 10. S-PRG 溶出液による IHGE 細胞間の異物透過性への影響

(A) 本実験の模式図。IHGE 細胞は細胞培養インサート上で培養した。インサートに S-PRG 溶出液を 12.5 μ L 添加して 12 時間培養した後、FITC-40 kDa dextran および FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN をインサート上部の培地に添加した。その後 30 分間静置し、インサートを透過したトレーサーの量を測定した。

(B-D) S-PRG 溶出液を添加後に、IHGE 細胞間を透過した FITC-40 kDa dextran (B)、FITC-*P. gingivalis* LPS (C)、FITC-*P. gingivalis* PGN (D) の量を示す。グラフの縦軸は、S-PRG 溶出液非添加における各種トレーサー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)、 $n = 8$ 、bar: 標準偏差。

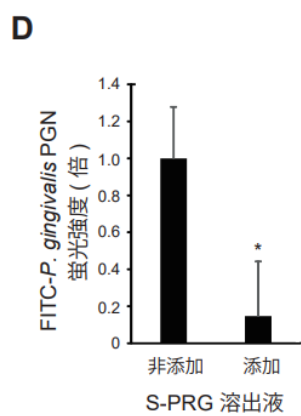
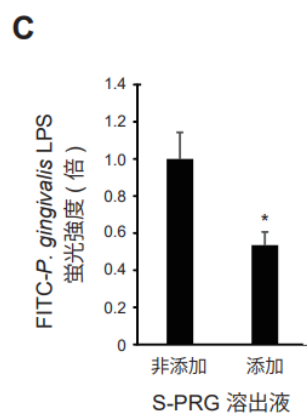
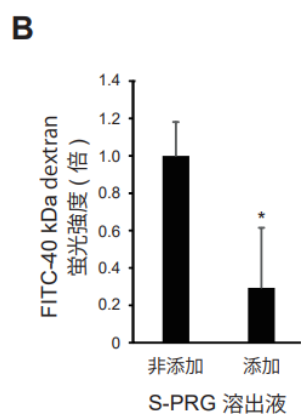
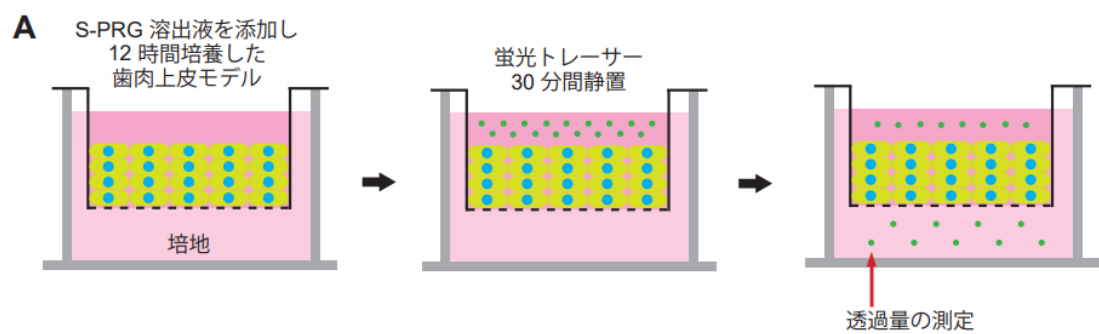


図 11. S-PRG 溶出液による三次元歯肉上皮モデルの異物透過性への影響

(A) 本実験の模式図。三次元歯肉上皮モデルは、細胞培養インサート上で培養した。インサートに S-PRG 溶出液を 12.5 μ L 添加して 12 時間培養した後、FITC-40 kDa dextran および FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN をインサート上部の培地に添加した。その後 30 分間静置し、インサートを透過したトレーサー量を測定した。

(B-D) S-PRG 溶出液を添加後に、三次元歯肉上皮モデルを透過した FITC-40 kDa dextran (B)、FITC-*P. gingivalis* LPS (C)、FITC-*P. gingivalis* PGN (D) の量を示す。グラフの縦軸は、S-PRG 溶出液非添加における各種トレーサー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)、 $n = 8$ 、bar : 標準偏差。

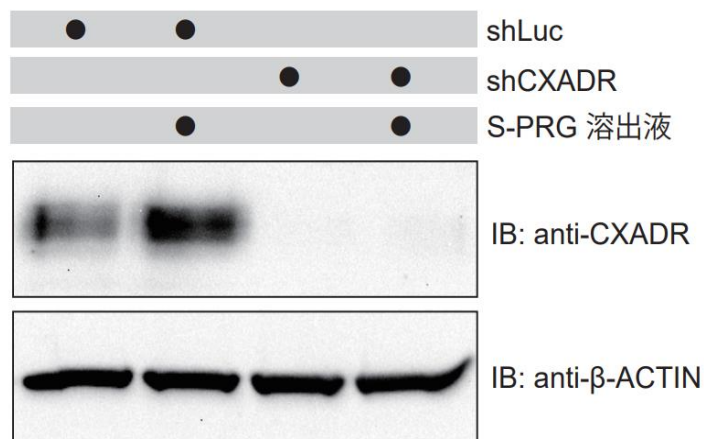
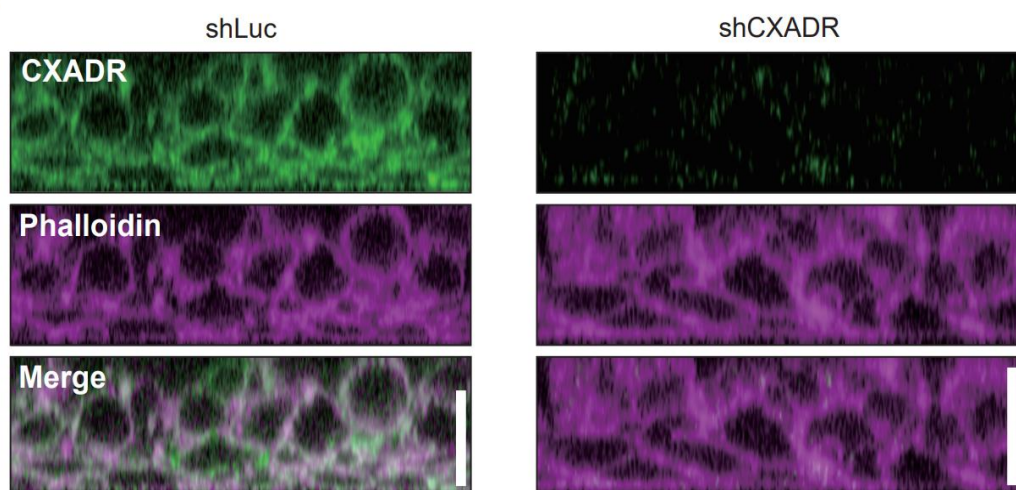
A**B**

図 12. *CXADR* ノックダウン三次元歯肉上皮モデルの作製

(A) 6 well プレートで shLuc または sh*CXADR* を安定発現させた IHGE 細胞に S-PRG 溶出液を 25 μ L 添加して 12 時間培養した後に、ウェスタンブロット法により *CXADR* をノックダウンした IHGE 細胞における *CXADR* の発現量の変化を確認した。

(B) 24 well プレート内のカバーガラス上で shLuc または sh*CXADR* を安定発現する三次元歯肉上皮モデルを作成後に固定し、*CXADR* 抗体 (緑) および Alexa Fluor 568 で標識した phalloidin (マゼンタ) で染色して、共焦点顕微鏡で観察した。スケールバーは 20 μ m を示す。

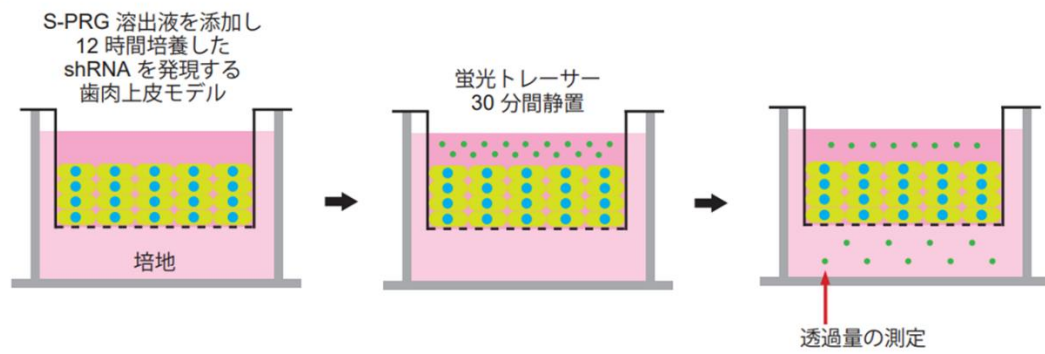
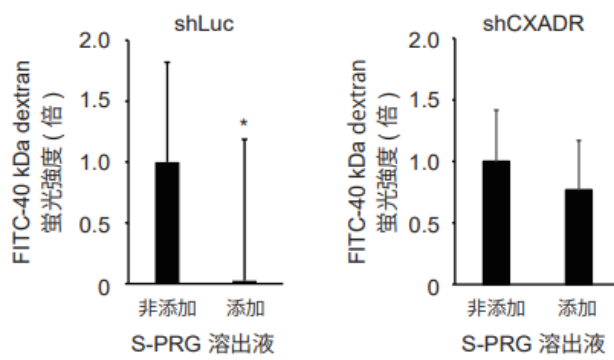
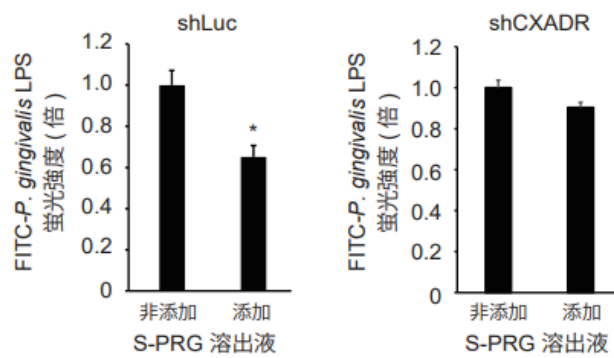
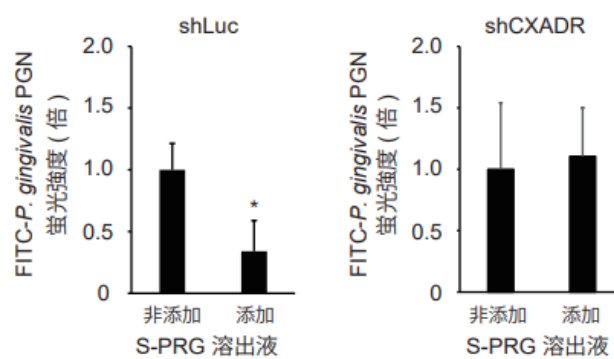
A**B****C****D**

図 13. S-PRG 溶出液による CXADR の発現量増加が三次元歯肉上皮モデルの異物透過性に及ぼす影響

(A) 本実験の模式図。shLuc または shCXADR を安定発現させた三次元歯肉上皮モデルを細胞培養インサート上で培養した。インサートに S-PRG 溶出液を 12.5 μ L 添加して 12 時間培養した後、FITC-40 kDa dextran、FITC-*P. gingivalis* LPS、FITC-*P. gingivalis* PGN をインサート上部の培地に添加した。その後 30 分間静置し、インサートを透過したトレーサーの量を測定した。

(B-D) S-PRG 溶出液を添加後、shLuc または shCXADR を安定発現させた三次元歯肉上皮モデルを透過した FITC-40 kDa dextran (B)、FITC-*P. gingivalis* LPS (C)、FITC-*P. gingivalis* PGN (D) の量を示す。グラフの縦軸は、S-PRG 溶出液非添加における各種トレーサー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)、 $n = 8$ 、bar : 標準偏差。