



Title	タバコ煙が歯肉上皮細胞のバリア機能に与える影響
Author(s)	谷垣, 慶太
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/96002">https://doi.org/10.18910/96002</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

学位論文

タバコ煙が歯肉上皮細胞のバリア機能に与える影響

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

谷垣 慶太



## 要 旨

タイトジャンクション (TJ) 関連タンパクである junctional adhesion molecule 1 (JAM1) および coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) は、歯肉上皮におけるバリア機能の発揮に重要な役割を担うことが報告されている。一方、タバコは、歯周病の重大なリスクファクターと考えられている。本研究では、上記 TJ 関連タンパク質に焦点を当て、タバコ抽出液 (cigarette smoke extract: CSE) が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響を調べた。不死化ヒト歯肉上皮細胞への CSE の添加により、JAM1 の局在が細胞膜から epidermal growth factor receptor 陽性のエンドソームへ移行した。一方で、細胞表面の CXADR の局在には変化を認めなかった。また、CSE を添加した三次元歯肉上皮モデルにおいてリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) およびペプチドグリカン (peptidoglycan: PGN) の上皮透過量が増加した。この透過量の増加は、JAM1 の過剰発現により抑制された。さらに、ヒトの必須栄養素の 1 つであるビタミン C は JAM1 タンパクの発現量を増加させ、CSE の添加により引き起こされる LPS および PGN の三次元歯肉上皮モデルでの透過量の増加を抑制した。この抑制は、JAM1 のノックダウンにより認められなくなった。これらの結果より、CSE が JAM1 のエンドサイトーシスを過剰に誘導し、歯肉上皮のバリア機能を低下させることが示唆された。さらに、ビタミン C による JAM1 タンパク質の発現量の増加が、CSE の添加による歯肉上皮のバリア機能の低下を抑制する可能性が示された。

## 背 景

歯周病は、口腔内バイオフィルム細菌により引き起こされる慢性炎症性疾患であり、喫煙はその重要なリスクファクターとして知られている<sup>[1-3]</sup>。天然のタバコの葉およびタバコから出る煙は毒性の化学物質を含む。タバコ抽出液 (cigarette smoke extract: CSE) を用いた研究では、気道上皮および気管支上皮細胞層の異物透過性が亢進し、上皮のバリア機能が低下することが報告されている<sup>[4, 5]</sup>。口腔領域においては、喫煙により歯肉上皮細胞の増殖が阻害されるといわれている<sup>[6]</sup>。さらに、非喫煙者と比較し、喫煙者は歯周病治療への反応性が悪いことが報告されている<sup>[7, 8]</sup>。しかし、歯肉上皮のバリア機能への喫煙の影響には不明な点が多い。

ヒト粘膜表面は、多様な微生物に曝露されている<sup>[9]</sup>。病原体から産生される病原因子として、グラム陰性細菌の内毒素であるリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) およびペプチドグリカン (peptidoglycan: PGN) が挙げられる<sup>[10]</sup>。歯肉上皮モデルを用いた以前の研究により、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* がタイトジャンクション関連タンパク junctional adhesion molecule 1 (JAM1) および coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) を選択的に分解し、LPS および PGN の歯肉上皮への透過量を増加させることが報告されている<sup>[11-13]</sup>。このことは、JAM1 および CXADR が、歯肉上皮のバリア機能の発揮に重要な役割を果たしていると考えられる。

アメリカで実施された横断研究である NHANES III (National Health and Nutrition Examination Survey III) では、ヒトの必須栄養素であるビタミン C の血中濃度の低下が歯周病の発症と関連することが報告されている<sup>[14]</sup>。また、ビタミン C の欠乏患者における歯肉出血は、ビタミン C の補充により改善された<sup>[15, 16]</sup>。さらに、喫煙者の血中のビタミン C の量は、非喫煙者と比べて少ないことが知られている<sup>[17]</sup>。これらのことから、喫煙者の歯周病の発症および進行に対するビタミン C の効果を分子生物学的に解明することが

待たれる.

そこで本研究では, TJ 関連タンパクである JAM1 および CXADR に焦点を当て, タバコ煙が歯肉上皮のバリア機能に及ぼす影響およびタバコ煙の影響に対するビタミン C の抑制的な効果について検討した.

## 材料と方法

### 1. ヒト歯肉上皮検体の免疫組織化学

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得て実施した (R2-E8-1)。

非喫煙者 2 名 (非喫煙者 #1, 非喫煙者 #2) と喫煙者 3 名 (喫煙者 #1, 喫煙者 #2, 喫煙者 #3) から歯肉組織を採取した。各被験者の歯肉採取部位の歯周ポケット深さ (probing pocket depth: PPD) は 3 mm (非喫煙者 #1), 3 mm (非喫煙者 #2), 2 mm (喫煙者 #1), 6 mm (喫煙者 #2), 6 mm (喫煙者 #3) であった。プロービング時の出血 (bleeding on probing: BOP) は、非喫煙者では観察されなかったが、喫煙者では 2 名において観察された。各被験者に糖尿病を含む特記すべき既往歴はなく、ヒト免疫不全ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスは陰性であった。

免疫染色は中村らの方法で行った<sup>[18]</sup>。歯肉上皮細胞の固定には、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝生理食塩水 (paraformaldehyde/phosphate-buffer saline: PFA/PBS, WAKO) を使用した。4°C 下で一晩固定した後、パラフィンに包埋して厚さ 5 μm の切片とし、その後、脱パラフィンして再水和させた。抗原賦活には、抗原賦活用緩衝液 (pH9) (ニチレイバイオサイエンス) 中で電気ジャーポット (NC-BJ221, パナソニック) を用いて 98°C 下で 40 分間加熱後、室温まで冷却した。1% ウシ血清アルブミンでブロッキングした後、切片を抗 JAM1 抗体 (1:100 希釈, HPA-061700, Atlas Antibodies) とともに 4°C 下で 15 時間インキュベートし、tris buffered saline (TBS) で 3 回洗浄し、Alexa Fluor 635 標識抗ラビット免疫グロブリン G (1:500 希釈, A-31576, Thermo Fisher Scientific) と共にインキュベートした。核染色は、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) で行った。サンプルの免疫反応性は、共焦点顕微鏡 (TCS SP8, Leica Microsystems) にて観察した。

## 2. タバコ抽出液 (CSE) の調整

タバコ抽出液 (CSE) は Gellner らの方法で調整した<sup>[19]</sup>. 図 1 に示す装置を用い, 市販のタバコ (Kent: British American Tobacco Japan; Marlboro: Phillip Morris; Seven stars: Japan Tobacco Inc.) の各 1 本から生じる煙を表皮角化細胞増殖用液体培地 Humedia KG-2 (Kurabo) 10 mL の中で泡立てた. CSE は, ウェスタンブロット法のため 100 mm 細胞培養用ディッシュ (Iwaki) に 10 mL, 免疫染色法のため 12 ウェルプレート (Iwaki) に 1 mL, 上皮バリア機能アッセイのため細胞培養インサート (Corning) に 500  $\mu$ L 使用した.

## 3. 細胞の培養条件と三次元上皮組織の作成

大阪大学 村上伸也教授より供与された不死化ヒト歯肉上皮 (immortalized human gingival epithelial cells: IHGE) 細胞<sup>[20]</sup>, 大阪大学 竹内洋輝講師より供与された *JAMI* 過剰発現細胞<sup>[11]</sup>, および初代培養ヒト歯肉上皮細胞 (primary human gingival epithelial cells: HGEPP, CELLnTEC) を, 0.5 mg/mL ヒドロコルチゾン, 10 mg/mL インスリン, 0.4% (v/v) ウシ脳下垂体抽出物, 0.1 ng/mL ヒト上皮成長因子, 50 mg/mL ゲンタマイシン, 50 ng/mL アンホテリシン B を含有した Humedia-KG2 を用いて培養した.

三次元歯肉上皮モデルは竹内らおよび西口らの方法で作成した<sup>[11, 21]</sup>. トリプシン処理後に遠心分離して回収した IHGE 細胞を, 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% (v/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  $\times$ 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 IHGE 細胞にコーティングした. そして 24 ウェルプレート (Iwaki) に設置したカバースリップを PBS に溶解した 0.2 mg/mL フィブロネクチンでコートし, IHGE 細胞を  $2 \times 10^6$  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成した.

#### 4. 抗体と試薬

本研究で使用した抗体および試薬を表 1 に示す。

#### 5. ウェスタンブロット法および免疫組織化学

ウェスタンブロット法と免疫組織化学は、竹内らの方法で行った<sup>[11]</sup>。100 mm 細胞培養用ディッシュ (Iwaki) 中の IHGE 細胞を 10% トリクロロ酢酸で処理し、セルスクレーパー (Iwaki) でディッシュに付着している細胞を回収した。回収した細胞を含むトリクロロ酢酸溶液は、290 ×g, 4 °C で 2 分間遠心分離し、沈殿物を 8 M 尿素に溶解させた。その後、細胞溶解液を 13,700 ×g, 4 °C で 10 分間遠心分離し、回収した上清を泳動サンプルとした。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) にメンブレンを浸漬し、室温で 15 分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 Pierce ELC western blotting substrate (Thermo 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。

免疫染色のため、12 ウェルプレート (Iwaki) 中の IHGE 細胞を 4% PFA/PBS で固定した。免疫染色のブロッキングには、PBS にゼラチン (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。PBS で 3 回洗浄後、二次抗体反応を室温で 1 時間行った。PBS で 3 回洗浄後、蛍光染色封入剤 (VECTASHIELD mounting medium, VECTOR LABORATORIES)

を用いて試料を封入した。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レーザー顕微鏡 (TCS SP8, Leica Microsystems) にて行い、Application Suite X software package (Leica Microsystems) にて解析した。

## 6. 細胞膜および細胞質画分の単離

IHGE 細胞の分画は、竹内らの方法で行った<sup>[22]</sup>。100 mm 細胞培養用ディッシュ (Iwaki) 中の IHGE 細胞に CSE を添加した。1 時間後に PBS で洗浄し、1 mL のホモジナイゼーションバッファー (3 mM イミダゾール [pH 7.4], 250 mM スクロース, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) に懸濁した。懸濁液を氷上で 23 ゲージと 27 ゲージの注射針に 8 回激しく通過させてホモジナイズした。ホモジネートを 3,000 ×g, 4 °C で 15 分間遠心分離し、細胞デブリス、細胞核、細胞骨格成分を除去した。ホモジネートをさらに 17,400 ×g, 4 °C で 30 分間遠心分離し、上清を細胞質画分とした。ペレットに 250 μL の細胞溶解液 (2 M チオ尿素, 7 M 尿素, 3% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate: CHAPS, 1% Triton X-100) を添加し、氷上で 30 分間溶解させた。その後、17,400 ×g, 4 °C で 30 分間遠心分離し、上清を膜画分とした。

細胞膜の単離は、Mun らの方法で行った<sup>[23]</sup>。100 mm 細胞培養用ディッシュ (Iwaki) 中の IHGE 細胞に CSE を添加した。1 時間後に PBS で洗浄し、10 mL の氷冷蒸留水に懸濁して 4 °C で 1 時間静置して細胞を破裂させた。その後、PBS で洗浄して細胞小器官を除去し、ディッシュに付着している細胞膜を回収した。その後、250 μL の細胞溶解液を添加し、氷上で 30 分間溶解させ、17,400 ×g, 4 °C で 30 分間遠心分離し、上清を細胞膜画分とした。

## 7. 歯肉上皮細胞のバリア機能の評価

Fluorescein isothiocyanate (FITC) トレーサーは竹内らの方法で作成した<sup>[11]</sup>. 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-NH<sub>2</sub>, DOJINDO) で標識し作成した. IHGE 細胞を細胞培養インサート (Corning) にて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プレートリーダー (1420 ARVO X, PerkinElmer) およびデータ解析ソフト (WorkOut Plus software package, PerkinElmer) にて測定した.

## 8. 創傷治癒アッセイ

*In vitro* 創傷治癒アッセイは, 古田らの方法で行った<sup>[24]</sup>. IHGE 細胞を 6 ウェルプレート (Iwaki) で培養し, 細胞層にピペットチップ (110-705C, Watson) の先端で直線状に創傷部位を作成した. その後, CSE を添加し, 添加時, 12 時間後, 24 時間後, 48 時間後に, 創傷部位に遊走した細胞を位相差顕微鏡 (Axiovert 40 C, Carl Zeiss) にて解析した.

## 9. 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)

RNeasy Micro kit (Qiagen) を用い, トータル RNA を IHGE 細胞より抽出した. ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用い, 相補的 DNA を合成した. THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) と Rotor Gene Q (Qiagen) を用い, リアルタイム PCR を行った. プライマー配列は以下の通りである.

*JAM1* (accession: AF111713.1) forward, 5'-GTGCCTTCAGCAACTCTTCC-3'; reverse, 5'-ACCAGATGCCAAAAACCAAG-3'. *β-ACTIN* (accession: X00351.1) forward, 5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCCT-3'; reverse, 5'-TCGTCCCAGTTGGTGACGAT-3'.

各サンプルにおける増幅産物量は,  $\Delta\Delta Ct$  法にて各サンプルでの  $\beta$ -ACTIN の mRNA の

含有量を比較して解析した.

## 10. 統計学的解析

両側  $t$  検定および片側  $t$  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 software package, Microsoft) を用いた.  $p < 0.05$  を有意差ありとした.

## 結 果

### 1. CSE が歯肉上皮細胞の細胞膜の JAM1 および CXADR の局在に及ぼす影響

最初に, IHGE 細胞および HGEpP における JAM1 および CXADR の局在に CSE が及ぼす影響について調べた. Kent, Marlboro および Seven stars の 3 種の銘柄を用いて各々の CSE を作成し, IHGE 細胞および HGEpP に CSE を添加した. 添加から 1 時間後, JAM1 の局在は細胞膜から細胞内へと移行した (図 2, 3). 一方で, IHGE 細胞において CXADR の局在は変化しなかった (図 4). 加えて, CSE の添加により IHGE 細胞における JAM1 および CXADR のタンパク量は変化しないことを認めた (図 5). すなわち, CSE は JAM1 の局在を細胞膜から細胞内へと移行させるが, JAM1 のタンパク量には影響を及ぼさないことが示唆された.

次に, 喫煙者および非喫煙者の歯肉組織における JAM1 の局在について調べた. 対照群として歯周炎を伴わない非喫煙者から採取した歯肉組織の標本では, JAM1 は格子状の局在を示した (図 6). 一方, 喫煙者から採取した歯肉組織の標本では, 歯周炎の有無に関わらず, JAM1 は格子状の局在を示さなかった (図 6). すなわち, 喫煙が歯肉上皮細胞における細胞膜の JAM1 の局在を減少させることが観察された.

### 2. CSE による JAM1 の細胞膜からエンドソームへの局在移行

JAM1 は真核細胞の細胞内膜系を経由し, 細胞膜へ輸送されることが報告されている<sup>[11]</sup>. そこで, CSE の添加による JAM1 の細胞内への移行にもメンブレントラフィックが関与すると推察した. 一般的に, 細胞膜のタンパクが細胞内のエンドソームに取り込まれる過程はエンドサイトーシスとよばれる<sup>[25]</sup>. そこで, IHGE 細胞に CSE を添加して 1 時間後, 細胞をエンドソームのマーカである抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体で染色し<sup>[26]</sup>, 細胞内の JAM1 の局在を観察した. その結果, 細胞内の JAM1 は EGFR

陽性のエンドソームに局在していた (図 7).

エンドサイトーシスは 10 °C 以下で阻害されることが報告されている<sup>[27]</sup>. そこで, CSE の添加が細胞膜の JAM1 をエンドサイトーシス経路へ誘導するかを確認するため, 37 °C または 4 °C 下で IHGE 細胞および HGEPp に CSE を添加し, JAM1 の局在を共焦点顕微鏡で観察した. その結果, CSE の添加後 1 時間において, 37 °C で培養した細胞では JAM1 が細胞内へ移行したのに対し, 4 °C で培養した細胞では JAM1 は細胞膜から変化しなかった (図 8, 9). これらの結果から, CSE の添加により細胞膜の JAM1 がエンドサイトーシス経路によりエンドソームへ輸送されることが示唆された.

次に, *JAM1* 遺伝子を過剰発現させた IHGE 細胞に CSE を添加し, 細胞膜の JAM1 に及ぼす影響を調べた. その結果, *JAM1* 過剰発現細胞株では, 野生株と比較し, 細胞内に加えて細胞膜に JAM1 の局在を認めた (図 10). この結果から, *JAM1* の過剰発現が, CSE による細胞膜の JAM1 の減少を抑制する可能性が示された.

### 3. CSE の添加が細胞膜画分の JAM1 に及ぼす影響

さらに, CSE を添加が IHGE 細胞の細胞膜に局在する JAM1 に及ぼす影響を, 細胞膜画分を用いたウェスタンブロット法にて調べた (図 11a). その結果, CSE 添加群および非添加群において JAM1 は膜画分においてのみ認められ, 細胞質画分においては認められなかった. また, CSE を非添加群の細胞膜画分において JAM1 タンパクを認めた一方, CSE 添加群では JAM1 タンパクの減少を認めた (図 11b). これらの結果から, CSE を添加した IHGE 細胞において, 細胞膜の JAM1 は細胞膜から細胞内の膜画分に局在移行することが示唆された.

### 4. CSE による LPS および PGN の歯肉上皮における透過量の増加

歯肉上皮における JAM1 の局在への CSE の影響を評価するため, 細胞集積法にて三次

元歯肉上皮モデルを作成した<sup>[11, 21]</sup> (図 12a). CSE を添加しない三次元歯肉上皮モデルでは, JAM1 タンパクは phalloidin で染色された ACTIN 線維に沿った細胞膜に局在していることが確認された (図 12b). 一方, CSE を添加した三次元歯肉上皮モデルでは, 添加後 1 時間において, JAM1 タンパクは格子状の局在を失った. この局在の異常は, *JAM1* を過剰発現させた三次元上皮モデルでは部分的に回復した. これらの結果から, CSE は三次元歯肉上皮モデルにおいて細胞間の JAM1 を消失させることが示唆された.

タバコ煙はヒト気管支上皮細胞に対するアレルゲンの透過を促進することが報告されている<sup>[4]</sup>. 気管支上皮は多列線毛円柱上皮である一方, 歯肉上皮細胞は重層扁平上皮である. そこで, IHGE 細胞の野生株あるいは *JAM1* の過剰発現細胞株から成る歯肉上皮モデルを作成し, FITC で標識された *P. gingivalis* LPS および PGN を用いて透過性実験を行った (図 13a). その結果, Seven Stars で作成した CSE の添加後 3 時間において, 歯肉上皮モデルにおける LPS (図 13b) および PGN (図 13c) の透過量が増加した. この透過量の増加は, *JAM1* の過剰発現により抑制された (図 13b-g). これらの結果から, CSE を添加した歯肉上皮モデルにおいて, 細胞膜の JAM1 の減少により, LPS および PGN の透過量が増加することが示唆された.

## 5. CSE による JAM1 に依存した細胞遊走阻害

細胞遊走および増殖は, 歯周病菌により破壊された歯周組織の創傷治癒および組織再生に重要な機能である<sup>[28]</sup>. 例えば, JAM1 はヒト臍静脈内皮細胞の遊走を調節していることが報告されている<sup>[29]</sup>. そこで, CSE が IHGE 細胞の遊走や増殖を阻害するか検討するため, *in vitro* における創傷治癒アッセイを行った. 単層の IHGE 細胞を培養プレートで培養してピペットチップにより細胞単層に無細胞部分を付与した後, 細胞遊走を評価した. CSE を添加しない細胞では経時的に剥離部分が閉鎖したのに対し (図 14), CSE を添加した細胞では閉鎖の遅延を認めた. 一方, *JAM1* 過剰発現細胞において, この閉鎖の阻害は

認められなかった。この結果より、CSE による細胞遊走の阻害に JAM1 が関与することが示唆された。

## 6. ビタミン C による JAM1 発現の誘導

これまでの研究により、ビタミン C は喫煙者における歯周病の進行に対し、臨床的な抑制効果を示したことが報告されている<sup>[30]</sup>。このことより、タバコ煙に曝露した宿主細胞の機能異常に対してビタミン C がその影響を抑制する可能性が考えられる。そこで、CSE を添加した IHGE 細胞内の JAM1 へのビタミン C の影響を調べた。ビタミン C の添加後 24 時間において、IHGE 細胞の *JAM1* 遺伝子およびタンパクの発現の増加が認められた (図 15a, b)。また、ビタミン C 添加により、IHGE 細胞表面の JAM1 タンパクの増加が共焦点顕微鏡観察により認められた (図 15c)。さらに、CSE を添加した IHGE 細胞をビタミン C で処理した結果、細胞表面に存在する JAM1 タンパクの減少の抑制を認められた (図 15c)。この結果より、ビタミン C は CSE の添加による JAM1 の局在異常の効果を抑制することが示唆された。

## 7. ビタミン C による LPS および PGN の歯肉上皮透過量への影響

CSE を添加した歯肉上皮のバリア機能に対するビタミン C の影響への JAM1 の関与を調べるため、*Renilla luciferase* または *JAM1* に対する short hairpin RNA (shLuc または shJAM1) を安定発現する IHGE 細胞を用いて三次元歯肉上皮モデルを作成し、組織内の JAM1 の局在を共焦点顕微鏡で観察した (図 16a)。その結果、shLuc を発現する三次元歯肉上皮モデルでは CSE の添加により JAM1 の格子状の局在が消退し、この減少はビタミン C の添加により抑制された。しかし、この抑制は shJAM1 を発現した三次元歯肉上皮モデルにおいては認めなかった (図 16b)。この結果より、ビタミン C は三次元歯肉上皮モデルにおいて CSE による JAM1 の局在異常を抑制することが示唆された。次に、

ビタミン C を添加した上記三次元歯肉上皮モデルに CSE を添加し, LPS および PGN の透過量を調べた. その結果, shLuc を発現する三次元歯肉上皮モデルにおいては CSE の添加による *P. gingivalis* LPS (図 16c) および PGN (図 16d) の透過量の増加がビタミン C の添加により認められなかったのに対し, shJAM1 を発現する三次元歯肉上皮モデルにおいてはビタミン C の効果を認めなかった (図 16c, d). これらの結果から, CSE を添加した三次元歯肉上皮モデルにおける, LPS および PGN の透過量の増加に対するビタミン C の抑制効果は, JAM1 の発現に依存することが示唆された.

## 考 察

本研究により、CSE は IHGE 細胞における JAM1 の細胞膜からエンドソームへの移行を過剰に誘導し、三次元歯肉上皮モデルにおける LPS および PGN の透過量を増加させることが示された。さらに、ビタミン C は CSE の添加による三次元歯肉上皮モデルにおける LPS および PGN の透過量の増加を JAM1 に依存して抑制することも示された。本研究は、タバコ煙による歯肉上皮のバリア機能の低下の分子メカニズムについての初めての検討である。

今回の三次元歯肉上皮モデルおよび喫煙者の歯肉組織標本から得られた結果により、タバコ煙は歯肉内縁上皮における JAM1 の局在異常を起こし、上皮のバリア機能を低下させ、異物透過性を亢進させることが示された。このことは、*P. gingivalis* 感染でみられる JAM1 の分解による歯肉上皮のバリア機能の破綻と同様の特徴を示した (図 2, 3, 6)。つまり、タバコ煙による歯肉上皮組織における JAM1 の局在異常により引き起こされる、歯肉上皮組織のバリア機能の破綻が歯周病の共通した病因のひとつである可能性が推測される。

本研究では、CSE が歯肉上皮組織のバリア機能に及ぼす影響について調べたが、タバコ煙に曝露し得る他の組織における感染性疾患でも、JAM1 の局在異常が病因に関与している可能性が考えられる。喫煙は、肺炎<sup>[31]</sup> や髄膜炎菌疾患<sup>[32]</sup> を含む急性呼吸器細菌感染症の重要なリスクファクターであると知られている。肺炎の原因菌である *Streptococcus pneumoniae* は、タイトジャンクション関連タンパク質である CLAUDIN-7 および CLAUDIN-10 を減少させる<sup>[33]</sup>。また、髄膜炎菌性肺炎を起こす *Neisseria meningitides* は、タイトジャンクション関連タンパク質である OCCLUDIN を分解させることが知られている<sup>[34]</sup>。一般に、LPS の組織侵入は、肺組織内で好中球を誘導して肺炎を引き起こす。一方、上記の細菌感染が、細菌毒素の透過性に及ぼす影響は不明である。喫煙と肺炎重症化リスク上昇の因果関係を明らかにするために、肺上皮組織における細菌毒素に対する上皮

バリア機能の研究が重要であると考えられる。

以前の研究により、喫煙者ではインフルエンザ<sup>[35]</sup> や severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)<sup>[36]</sup> による新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が重症化しやすいことが報告されている。インフルエンザウイルス A 型 (H3N2) は human lung microvascular endothelial cells においてタイトジャンクション関連タンパク質である CLAUDIN-5 を減少させ<sup>[37]</sup>、一方で COVID-19 の重症患者の肺切片においても同タンパク質が減少することが報告されている<sup>[38]</sup>。ヒト気管支上皮モデルにおいて、SARS-CoV-2 感染はタイトジャンクション関連タンパク質である ZONULA OCCLUDENS-1 (ZO-1) の局在異常を引き起こすことが報告されている<sup>[39]</sup>。一方で、ヒト結腸癌由来細胞 (Caco-2 細胞) において JAM1 は ZO-1 と複合体を形成することが確認されている<sup>[40]</sup>。これらの結果から、喫煙による上皮バリアの機能低下は、組織内におけるインフルエンザウイルスおよび新型コロナウイルスの感染拡大と密接に関わっている可能性が考えられる。

本研究より、CSE は同じ JAM ファミリータンパク質である CXADR ではなく JAM1 の局在異常を引き起こすことが示された。CXADR と比較して JAM1 の細胞内ドメインは短く、JAM1 タンパク質の C 末端側 5 残基は PDZ ドメインクラス II 結合モチーフをもつ一方、CXADR は細胞内ドメインに PDZ ドメインクラス I 結合モチーフをもつ。このことから、CSE は JAM1 に特異的な細胞内ドメインを標的にして局在異常を引き起こす可能性がある。

JAM1 過剰発現細胞では、CSE の添加に関わらず細胞膜に JAM1 の局在が認められた (図 10)。このことより、CSE による JAM1 のエンドサイトーシスの誘発には、タバコ成分に対する受容体等に依存する有効限界が存在すると考えられる。一般的に、細胞は膜タンパク質を細胞内へ取り込むエンドサイトーシス経路と、エンドサイトーシスされた膜タンパク質を細胞膜へ戻すリサイクリング経路により全体の膜タンパク質のバランスが保たれている<sup>[41]</sup>。本研究では、CSE の添加後に細胞内に取り込まれた JAM1 は顕著に分解さ

れなかった (図 2)。この結果より、CSE は *JAM1* の細胞内への取り込みを誘発するだけでなく、通常のエンドサイトーシス経路でみられる細胞内分解を阻害していることが示唆される。

ビタミン C は、sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT) 1 および SVCT2 により細胞内に輸送されることが知られている<sup>[42, 43]</sup>。一方、glucose transporter 1 (GLUT1) および GLUT3 は、ビタミン C の酸化型であるデヒドロアスコルビン酸の輸送に関わることが報告されている<sup>[44]</sup>。これらのことから、歯肉上皮細胞においてもビタミン C またはその酸化物の細胞内への取り込みが *JAM1* 遺伝子の発現の増加に関与している可能性がある。ビタミン C は、細胞核内で DNA やヒストンの脱メチル化によるエピジェネティクスの制御に関与することが報告されている<sup>[45]</sup>。ビタミン C は DNA の脱メチル化酵素である ten-eleven translocation 1 (TET1) の補酵素として関与していることが報告されている<sup>[46]</sup>。一方、ヒト遺伝子のデータベースである Gene Cards による *JAM1* 遺伝子の転写因子結合領域の予測では、GATA binding protein 1, H6 family homeobox 3, nuclear factor 1A, および paired box 2 が *JAM1* 遺伝子の発現を制御する転写因子の候補として挙げられる<sup>[47]</sup>。これらのことから、本研究におけるビタミン C の添加による *JAM1* 遺伝子の発現の増加の原因は、核内に移行したビタミン C による *JAM1* 遺伝子のプロモーター領域の脱メチル化、および *JAM1* 遺伝子を発現させる転写因子の発現の増加という 2 つの側面から検討する必要があると考えられる。

## 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 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，本研究を進めるにあたり，直接のご指導とご鞭撻を賜りました同予防歯科学講座 竹内洋輝講師に深謝いたします．

最後に，本研究に際し，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を申し上げます．

## 参考文献

- 1 Bergström, J. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol* **17**, 245-247, 1989. doi:10.1111/j.1600-0528.1989.tb00626.x
- 2 Ojima, M., Hanioka, T., Tanaka, K., Inoshita, E. & Aoyama, H. Relationship between smoking status and periodontal conditions: findings from national databases in Japan. *J Periodontol Res* **41**, 573-579, 2006. doi:10.1111/j.1600-0765.2006.00915.x
- 3 Tonetti, M. S., Greenwell, H. & Kornman, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* **89 Suppl 1**, S159-S172, 2018. doi:10.1002/JPER.18-0006
- 4 Gangl, K. *et al.* Cigarette smoke facilitates allergen penetration across respiratory epithelium. *Allergy* **64**, 398-405, 2009. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01861.x
- 5 Heijink, I. H., Brandenburg, S. M., Postma, D. S. & van Oosterhout, A. J. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery. *Eur Respir J* **39**, 419-428, 2012. doi:10.1183/09031936.00193810
- 6 Semlali, A., Chakir, J., Goulet, J. P., Chmielewski, W. & Rouabhia, M. Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *J Periodontol Res* **46**, 533-541, 2011. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01370.x
- 7 Palmer, R. M., Wilson, R. F., Hasan, A. S. & Scott, D. A. Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *J Clin Periodontol* **32 Suppl 6**, 180-195, 2005. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00786.x
- 8 Labriola, A., Needleman, I. & Moles, D. R. Systematic review of the effect of smoking

- on nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000* **37**, 124-137, 2005.  
doi:10.1111/j.1600-0757.2004.03793.x
- 9 Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised estimates for the number of human and  
bacteria cells in the body. *Plos Biology* **14**, 2016. doi:10.1371/journal.pbio.1002533
- 10 Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate  
receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637-650, 2011.  
doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006
- 11 Takeuchi, H. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of  
lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via  
degradation of junctional adhesion molecule 1. *PLoS Pathog* **15**, e1008124, 2019.  
doi:10.1371/journal.ppat.1008124
- 12 Takeuchi, H. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* induces penetration of  
lipopolysaccharide and peptidoglycan through the gingival epithelium via  
degradation of coxsackievirus and adenovirus receptor. *Cell Microbiol* **23**, e13388,  
2021. doi:10.1111/cmi.13388
- 13 Takeuchi, H., Nakamura, E., Yamaga, S. & Amano, A. Infection induces  
lipopolysaccharide and peptidoglycan penetration through gingival epithelium.  
*Front Oral Health* **3**, 845002, 2022. doi:10.3389/froh.2022.845002
- 14 Nishida, M. *et al.* Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease. *J*  
*Periodontol* **71**, 1215-1223, 2000. doi:10.1902/jop.2000.71.8.1215
- 15 Leggott, P. J., Robertson, P. B., Rothman, D. L., Murray, P. A. & Jacob, R. A. The  
effect of controlled ascorbic acid depletion and supplementation on periodontal  
health. *J Periodontol* **57**, 480-485, 1986. doi:10.1902/jop.1986.57.8.480
- 16 Leggott, P. J. *et al.* Effects of ascorbic acid depletion and supplementation on

- periodontal health and subgingival microflora in humans. *J Dent Res* **70**, 1531-1536, 1991. doi:10.1177/00220345910700121101
- 17 Pelletier, O. Vitamin C and cigarette smokers. *Ann NY Acad Sci* **258**, 156-168, 1975.
- 18 Nakamura, E. *et al.* Zfhx4 regulates endochondral ossification as the transcriptional platform of Osterix in mice. *Commun Biol* **4**, 1258, 2021. doi:10.1038/s42003-021-02793-9
- 19 Gellner, C. A., Reynaga, D. D. & Leslie, F. M. Cigarette smoke extract: a preclinical model of tobacco dependence. *Curr Protoc Neurosci* **77**, 9.54.51-59.54.10, 2016. doi:10.1002/cpns.14
- 20 Murakami, S. *et al.* Activation of adenosine-receptor-enhanced iNOS mRNA expression by gingival epithelial cells. *J Dent Res* **81**, 236-240, 2002. doi:10.1177/154405910208100403
- 21 Nishiguchi, A., Yoshida, H., Matsusaki, M. & Akashi, M. Rapid construction of three-dimensional multilayered tissues with endothelial tube networks by the cell-accumulation technique. *Adv Mater* **23**, 3506-3510, 2011. doi:10.1002/adma.201101787
- 22 Takeuchi, H. *et al.* The serine phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis* suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF- $\kappa$ B RelA/p65. *PLoS Pathog* **9**, e1003326, 2013. doi:10.1371/journal.ppat.1003326
- 23 Mun, J. Y. *et al.* Efficient adhesion-based plasma membrane isolation for cell surface N-glycan analysis. *Anal Chem* **85**, 7462-7470, 2013. doi:10.1021/ac401431u
- 24 Furuta, N., Takeuchi, H. & Amano, A. Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment. *Infect Immun* **77**, 4761-4770, 2009. doi:10.1128/IAI.00841-09

- 25 Doherty, G. & McMahon, H. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**, 857-902, 2009. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540
- 26 Sorkin, A. & Goh, L. K. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* **315**, 683-696, 2009. doi:10.1016/j.yexcr.2008.07.029
- 27 Silverstein, S. C., Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Endocytosis. *Annu Rev Biochem* **46**, 669-722, 1977. doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.003321
- 28 Häkkinen, L., Uitto, V. J. & Larjava, H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol 2000* **24**, 127-152, 2000.
- 29 Naik, M. U., Vuppalanchi, D. & Naik, U. P. Essential role of junctional adhesion molecule-1 in basic fibroblast growth factor-induced endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 2165-2171, 2003. doi:10.1161/01.ATV.0000093982.84451.87
- 30 Hideki N., *et al.* Effect of vitamin C and vitamin E supplements on periodontal disease in smokers. *J Dent Hlth* **53**, 544-553, 2003.
- 31 Arcavi, L. & Benowitz, N. L. Cigarette smoking and infection. *Arch Intern Med* **164**, 2206-2216, 2004. doi:10.1001/archinte.164.20.2206
- 32 Fischer, M. *et al.* Tobacco smoke as a risk factor for meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* **16**, 979-983, 1997. doi:10.1097/00006454-199710000-00015
- 33 Clarke, T. B., Francella, N., Huegel, A. & Weiser, J. N. Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell Host Microbe* **9**, 404-414, 2011. doi:10.1016/j.chom.2011.04.012
- 34 Schubert-Unkmeir, A. *et al.* Neisseria meningitidis induces brain microvascular endothelial cell detachment from the matrix and cleavage of occludin: a role for

- MMP-8. *PLoS Pathog* **6**, e1000874, 2010. doi:10.1371/journal.ppat.1000874
- 35 Lawrence, H., Hunter, A., Murray, R., Lim, W. S. & McKeever, T. Cigarette smoking and the occurrence of influenza - Systematic review. *J Infect* **79**, 401-406, 2019. doi:10.1016/j.jinf.2019.08.014
- 36 World Health Organization, WHO statement: Tobacco use and COVID-19. Available from, <https://www.who.int/news/item/11-05-2020-who-statement-tobacco-use-and-covid-19>, 2020.
- 37 Armstrong, S. M. *et al.* Influenza infects lung microvascular endothelium leading to microvascular leak: role of apoptosis and claudin-5. *PLoS One* **7**, e47323, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0047323
- 38 D'Agnillo, F. *et al.* Lung epithelial and endothelial damage, loss of tissue repair, inhibition of fibrinolysis, and cellular senescence in fatal COVID-19. *Sci Transl Med* **13**, eabj7790, 2021. doi:10.1126/scitranslmed.abj7790
- 39 Robinot, R. *et al.* SARS-CoV-2 infection induces the dedifferentiation of multiciliated cells and impairs mucociliary clearance. *Nat Commun* **12**, 4354, 2021. doi:10.1038/s41467-021-24521-x
- 40 Bazzoni, G. *et al.* Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* **275**, 20520-20526, 2000. doi:10.1074/jbc.M905251199
- 41 Grant, B. D. & Donaldson, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 597-608, 2009. doi:10.1038/nrm2755
- 42 Daruwala, R., Song, J., Koh, W. S., Rumsey, S. C. & Levine, M. Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters

- hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett* **460**, 480-484, 1999.  
doi:10.1016/s0014-5793(99)01393-9
- 43 Wang, H. *et al.* Human Na(+)-dependent vitamin C transporter 1 (hSVCT1): primary structure, functional characteristics and evidence for a non-functional splice variant. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 1-9, 1999. doi:10.1016/s0005-2736(99)00182-0
- 44 Rumsey, S. C. *et al.* Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem* **272**, 18982-18989, 1997.  
doi:10.1074/jbc.272.30.18982
- 45 Zhitkovich, A. Nuclear and cytoplasmic functions of vitamin C. *Chem Res Toxicol* **33**, 2515-2526, 2020. doi:10.1021/acs.chemrestox.0c00348
- 46 Minor, E. A., Court, B. L., Young, J. I. & Wang, G. Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem* **288**, 13669-13674, 2013.  
doi:10.1074/jbc.C113.464800
- 47 Gene Cards, *F11R* Gene - F11 Receptor. Available from, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=F11R>

表 1. 供試した抗体および試薬

抗体と試薬	販売元	品番
Mouse monoclonal anti-JAM1	Sigma-Aldrich	SAB4200468
Rabbit polyclonal anti-F11R	Atlas Antibodies	HPA061700
Rabbit monoclonal anti-CXADR	Sino Biological	10799-R271
Rabbit monoclonal anti-EGFR	Cell Signaling Technology	4267
Rabbit monoclonal anti-CALNEXIN	Cell Signaling Technology	2679
Rabbit monoclonal anti-EEA1	Abcam	ab109110
Rabbit monoclonal anti-GAPDH	Cell Signaling Technology	5174
Mouse monoclonal anti- $\beta$ -ACTIN	Sigma-Aldrich	M177-3
FITC-conjugated goat anti-mouse IgG	MBL	238
Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG	Invitrogen	A-11008
Alexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit IgG	Abcam	ab150078
Alexa Fluor 635-conjugated anti-rabbit IgG	Invitrogen	A31576
Goat anti-mouse antibody conjugated to horseradish peroxidase	Cell Signaling Technology	7076
Goat anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase	Cell Signaling Technology	7074
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Invitrogen	D1306
Alexa Fluor 633-conjugated phalloidin	Invitrogen	A12380
pMRX-IRES-Puro	Takeuchi <i>et al.</i> , 2019	-
pMRX-IRES-Puro-JAM1	Takeuchi <i>et al.</i> , 2019	-
pSINsi-hU6-shLuc	Takeuchi <i>et al.</i> , 2021	-
pSINsi-hU6-shJAM1 #508	Takeuchi <i>et al.</i> , 2021	-
Puromycin	Invitrogen	ant-pr-1
Neomycin	Invitrogen	ant-gn-1
Fluorescein Labeling Kit-NH2	Dojindo	LK-01
<i>P. gingivalis</i> LPS	Invitrogen	14F18-MM
<i>P. gingivalis</i> PGN	Takeuchi <i>et al.</i> , 2019	-
Vitamin C (L-Ascorbic acid)	Nacalai tesque	11691-62

表 2. 歯肉組織採取被験者

被験者	年齢	性別	歯種	PPD (mm)	BOP	既往歴	抜歯の理由	喫煙歴
非喫煙者 #1	82	男性	37 (残根)	3	-	狭心症	垂直性歯根破折	なし
非喫煙者 #2	42	男性	47	3	-	なし	垂直性歯根破折	なし
喫煙者 #1	79	女性	22 (残根)	2	-	肺癌	歯肉縁下カリエス	10 年以上
喫煙者 #2	55	女性	37	6	+	鬱病	歯周炎の急性発作	10 年以上
喫煙者 #3	63	男性	16	6	+	なし	歯周炎の急性発作	10 年以上

表 3. 試供タバコ銘柄

タバコの種類	販売元	タール量 (mg)	ニコチン量 (mg)
Seven Stars Box	Japan Tobacco Inc.	14	1.2
Marlboro	Phillip Morris	12	0.9
KENT 1 100S Box	British American Tobacco Japan	1	0.1

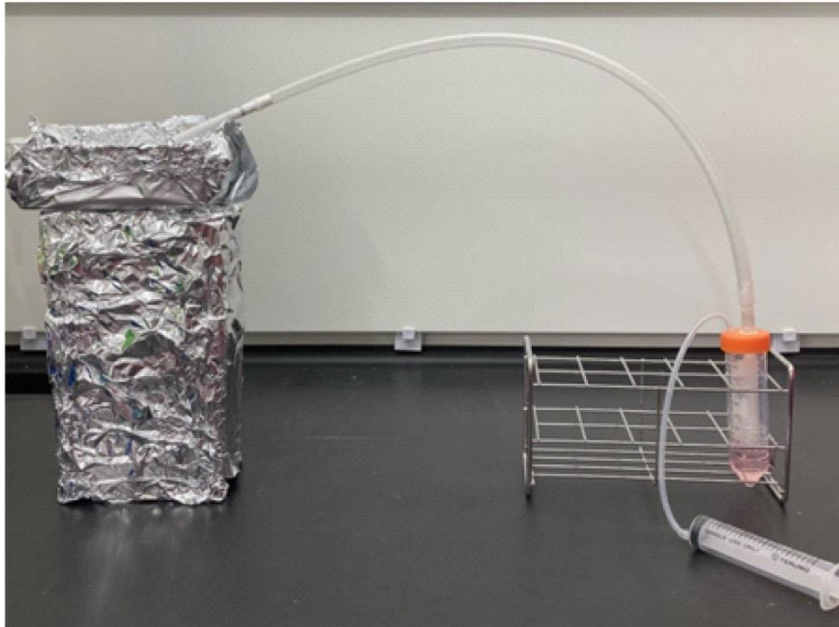


図 1. CSE の調整

タバコ煙をシリンジの操作で吸引し、50 mL チューブ内の培地に添加した。  
手順の詳細は、Gellner らの方法を参考にした<sup>[19]</sup>。

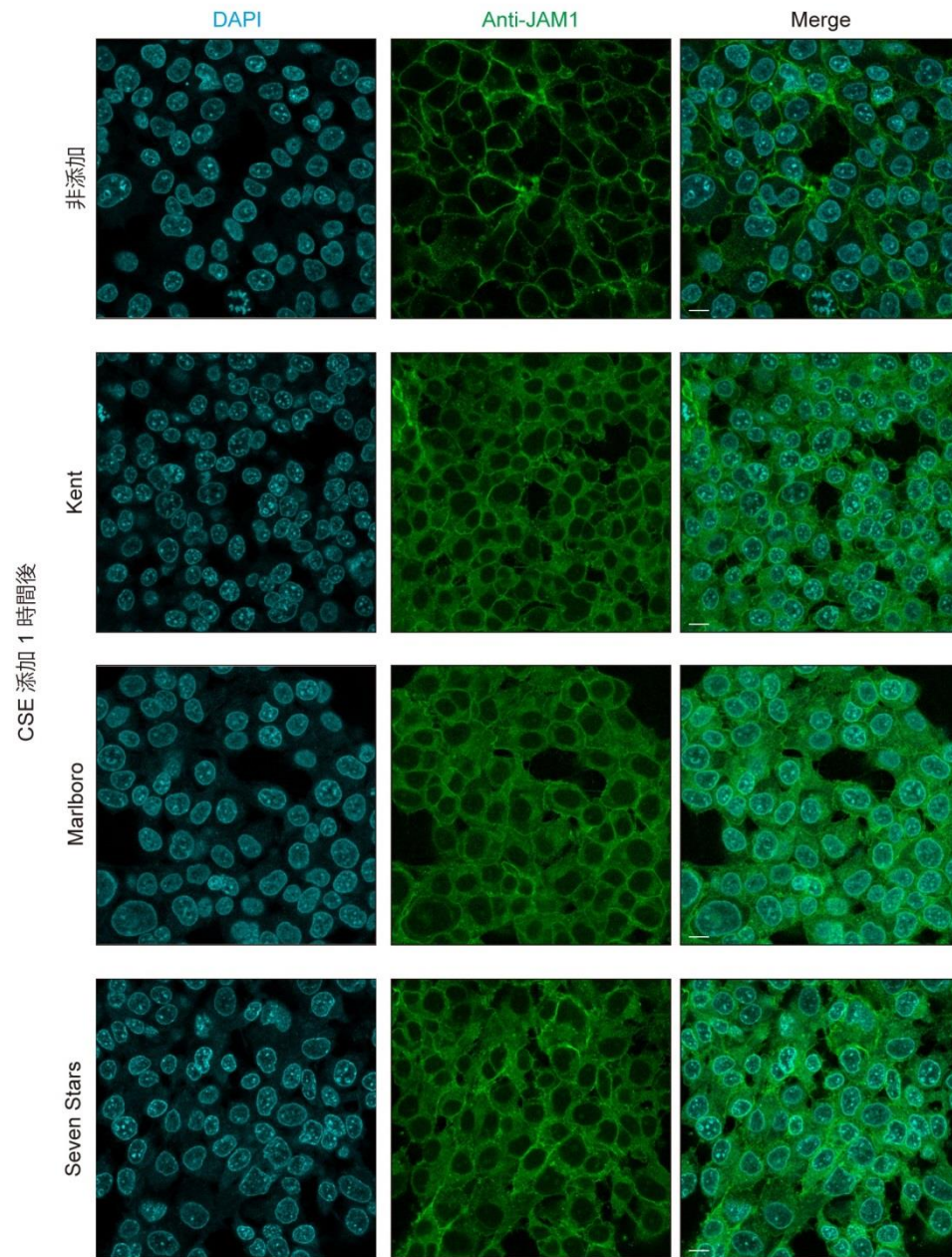


図 2. CSE が IHGE 細胞における JAM1 の局在に及ぼす影響

IHGE 細胞に CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) を添加した. 1 時間後に細胞を固定し, DAPI (シアン) および抗 JAM1 抗体 (緑) で染色し, 共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す.

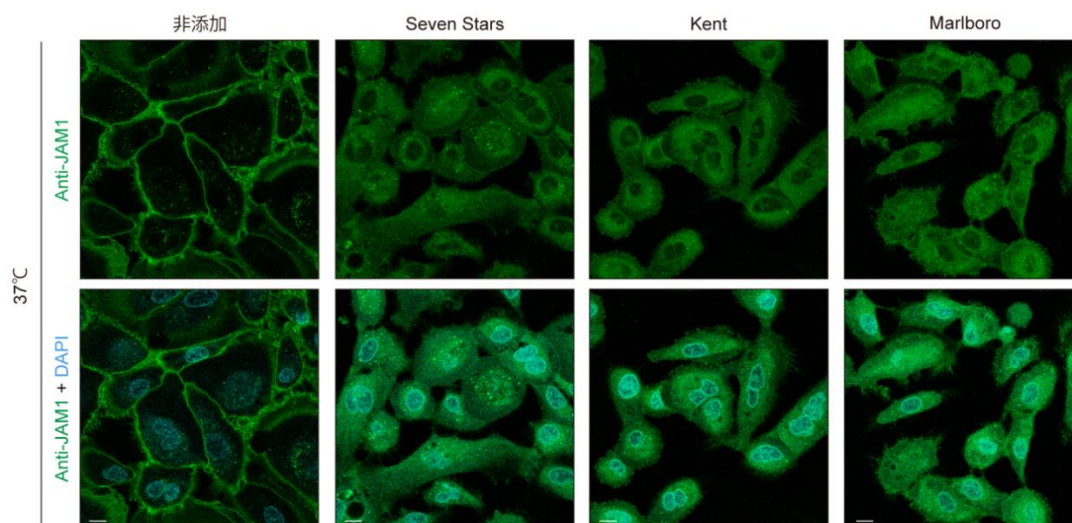


図 3. CSE が HGEpP における JAM1 の局在に及ぼす影響

HGEpP に CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) を添加した. 1 時間後に細胞を固定し, DAPI (シアン) および抗 JAM1 抗体 (緑) で染色し, 共焦点顕微鏡像にて観察した. スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す.

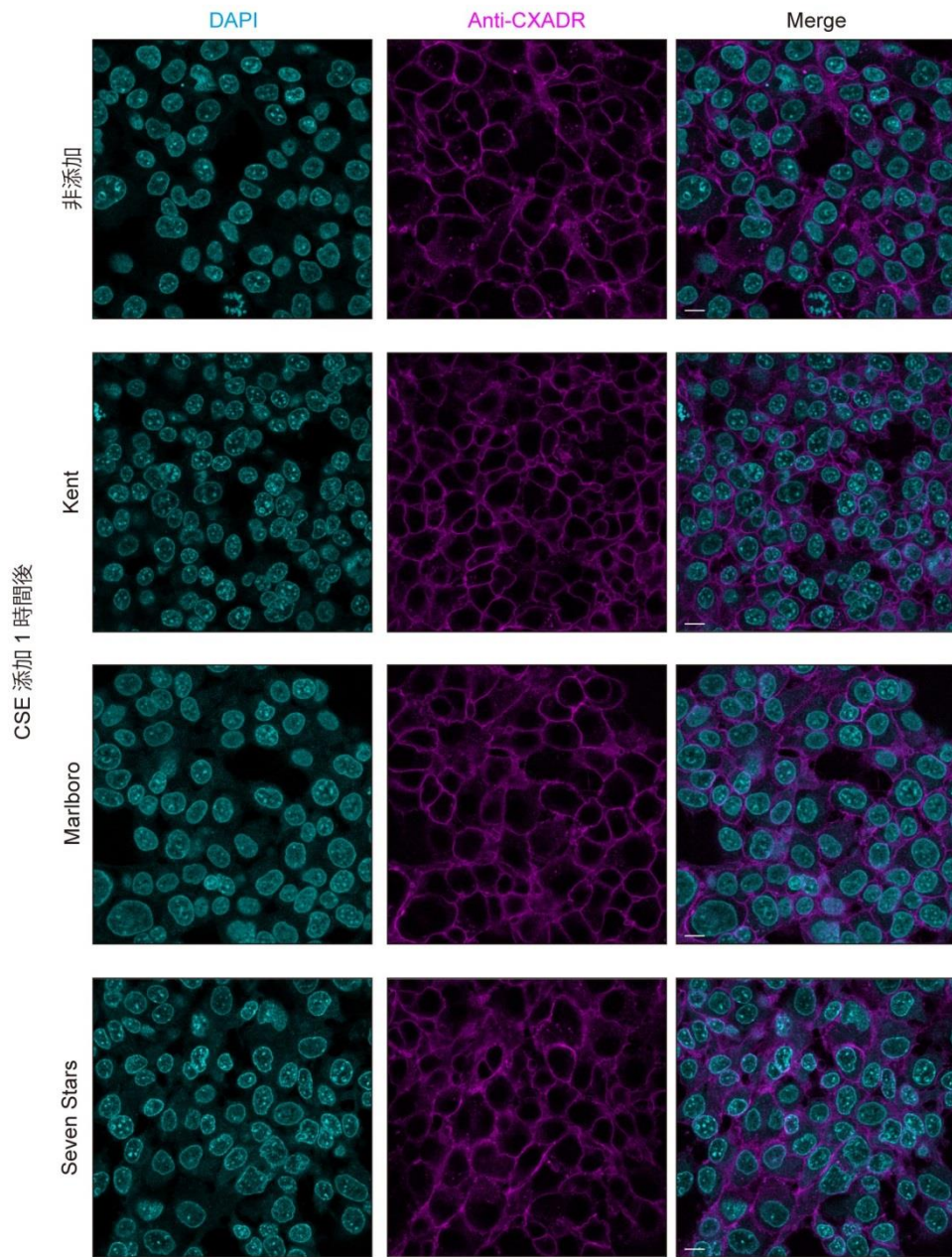


図 4. CSE が IHGE 細胞における CXADR の局在に及ぼす影響

IHGE 細胞に CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) を添加した. 1 時間後に細胞を固定し, DAPI (シアン) および抗 CXADR 抗体 (マゼンタ) で染色し, 図 2 と同じ視野を共焦点顕微鏡にて観察した. スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す.

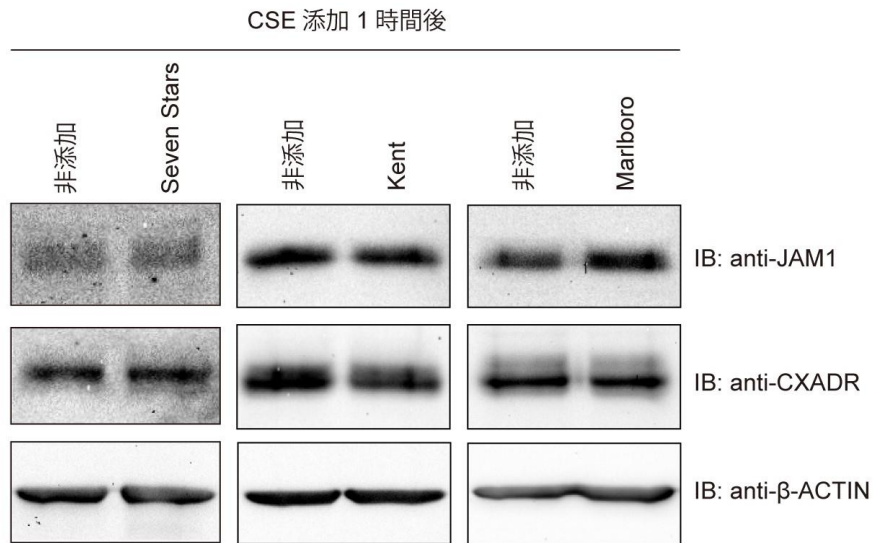


図 5. CSE が IHGE 細胞における JAM1 および CXADR のタンパク質量に及ぼす影響

IHGE 細胞に CSE を添加して 1 時間培養した後, ウェスタンブロット法により JAM1 タンパク質および CXADR タンパク質の量の変化を確認した. コントロールとして  $\beta$ -ACTIN を使用した. IB: immunoblot.

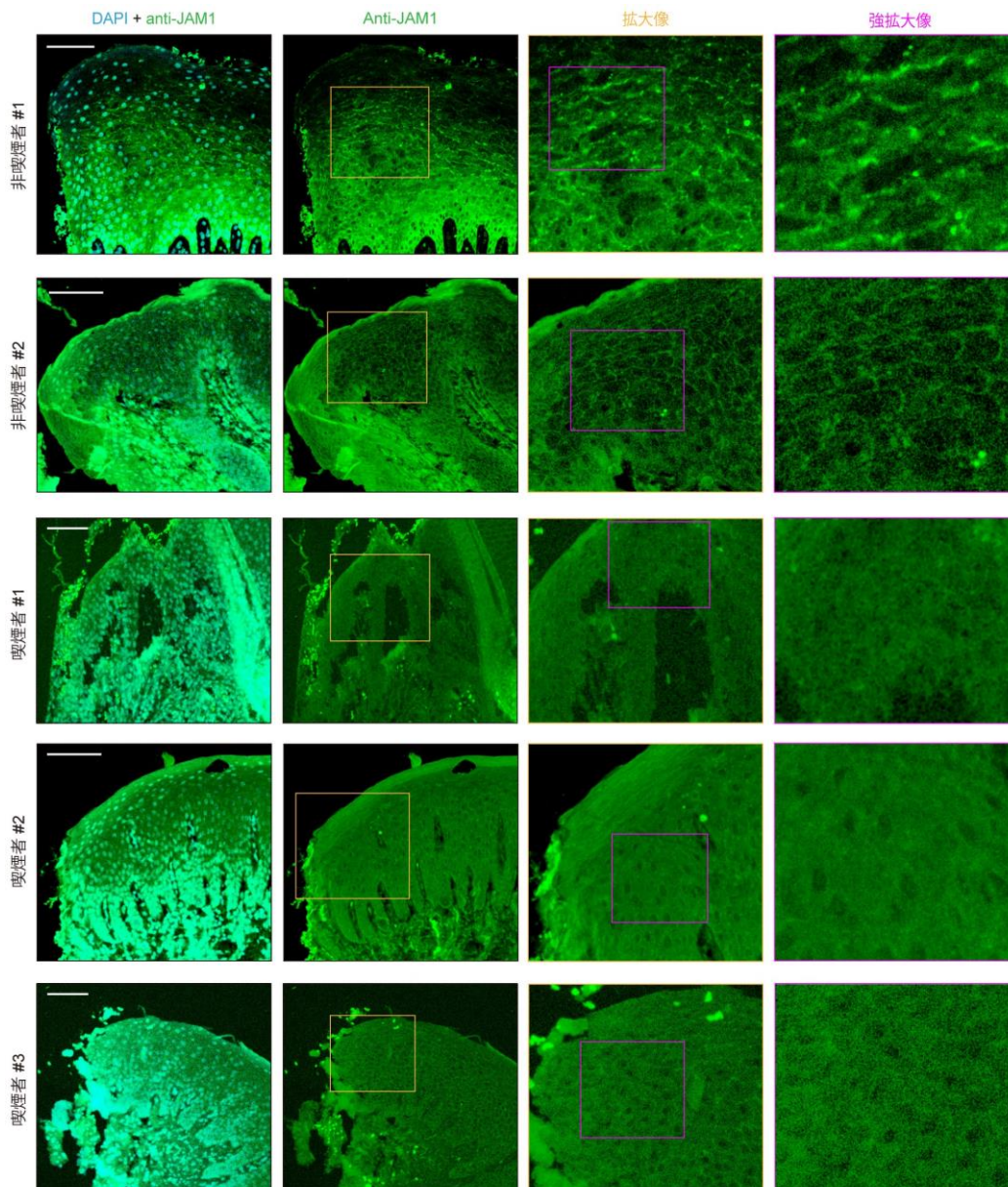


図 6. 喫煙者および非喫煙者のヒト歯肉組織における JAM1 の局在

非喫煙者 2 名および喫煙者 3 名から採取したヒト歯肉組織を共焦点顕微鏡で観察した。組織を固定後、それぞれ DAPI (シアン) および抗 JAM1 抗体 (緑) で染色した。拡大像 (黄色) と強拡大像 (マゼンタ) を右に示す。スケールバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。

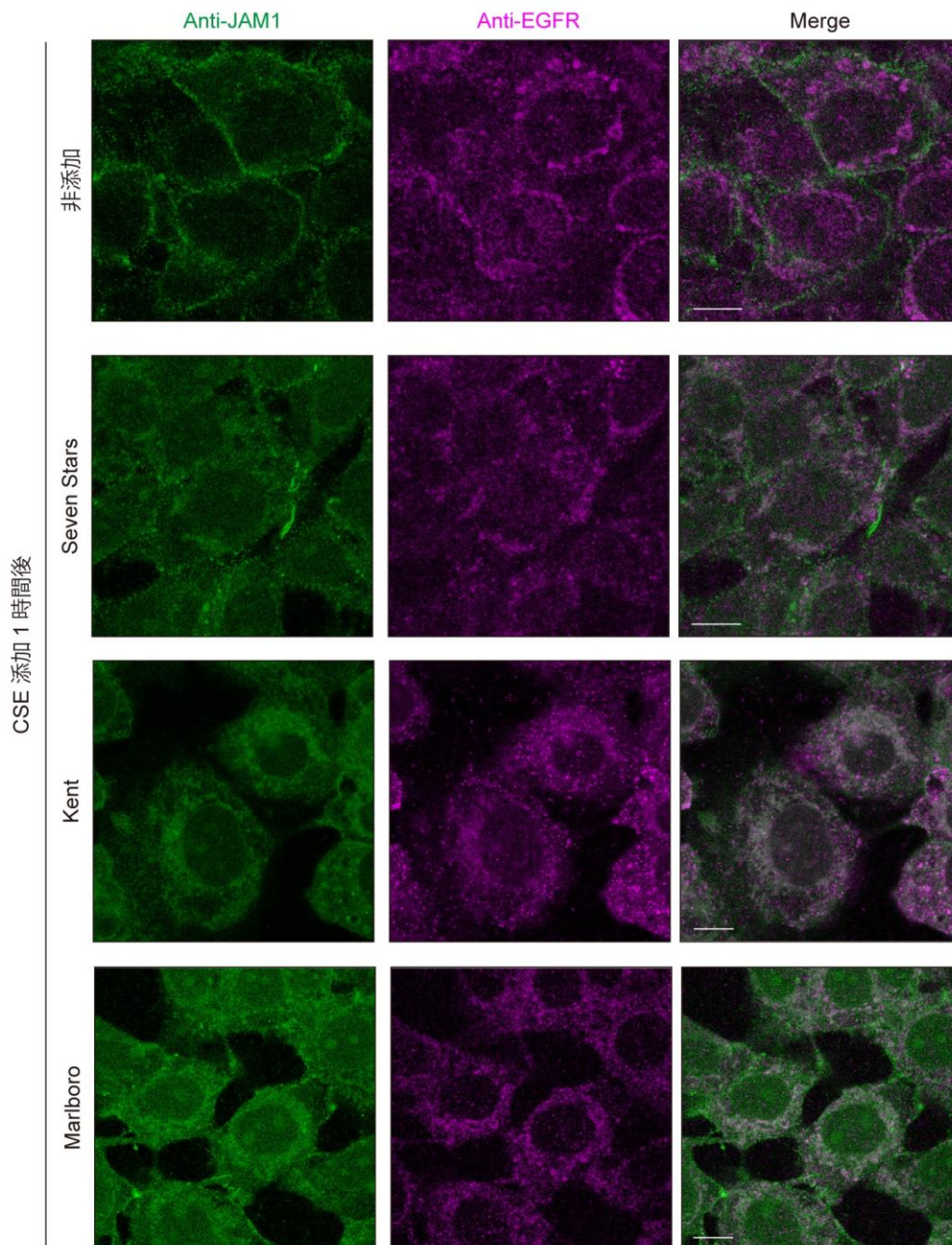


図 7. CSE が IHGE 細胞における JAM1 のエンドサイトーシスへ及ぼす影響

IHGE 細胞に CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) を添加した. 1 時間後に細胞を固定し, 抗 JAM1 抗体 (緑) と抗 EGFR 抗体 (マゼンタ) 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  $\mu\text{m}$  を示す.

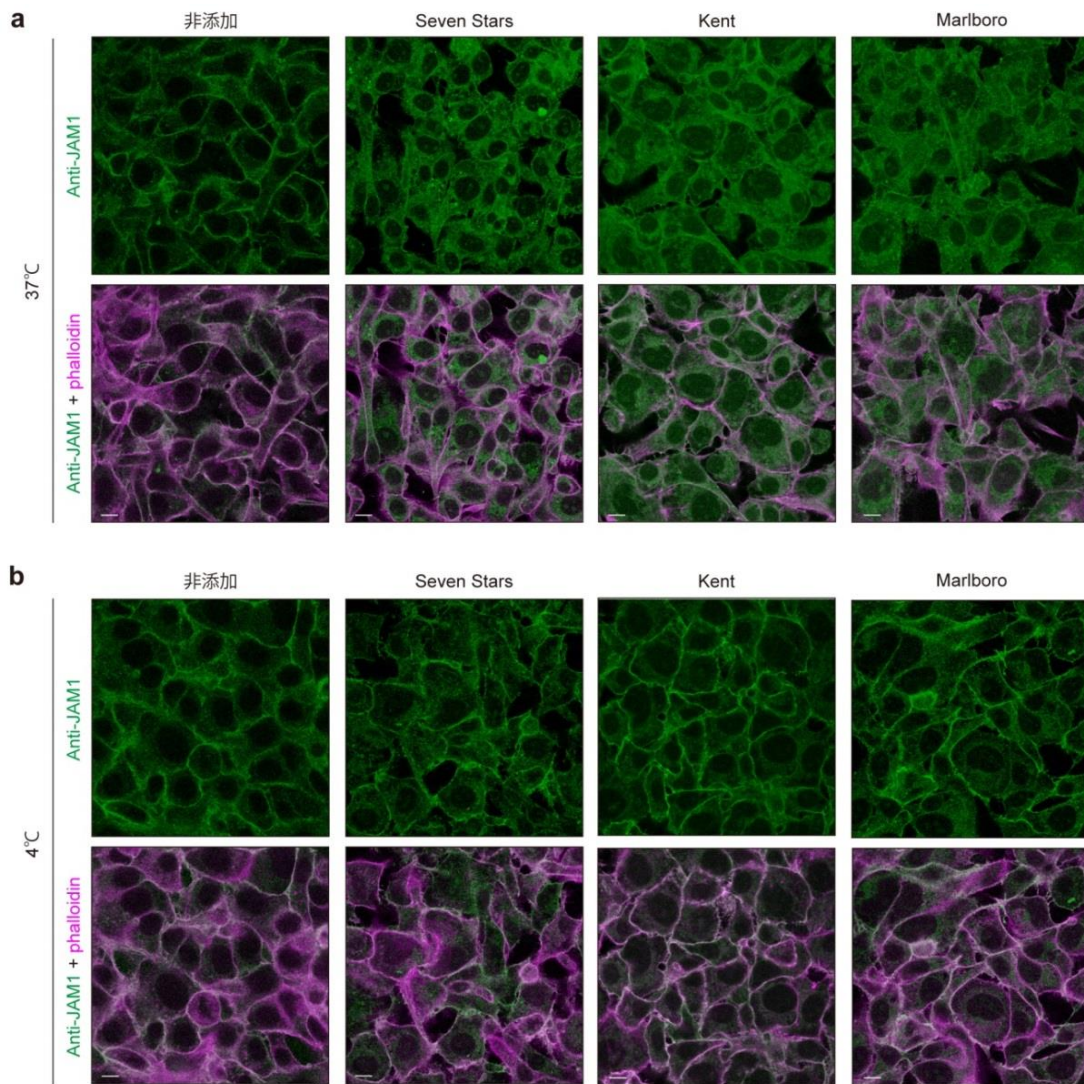


図 8. 4 °C の低温状態が CSE を添加した IHGE 細胞における JAM1 の局在へ及ぼす影響

IHGE 細胞を (a) 37 °C または (b) 4 °C で 30 分培養した後、CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) を添加した。1 時間後に細胞を固定し、抗 JAM1 抗体 (緑) と Alexa Fluor 633 標識の phalloidin (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  $\mu\text{m}$  を示す。

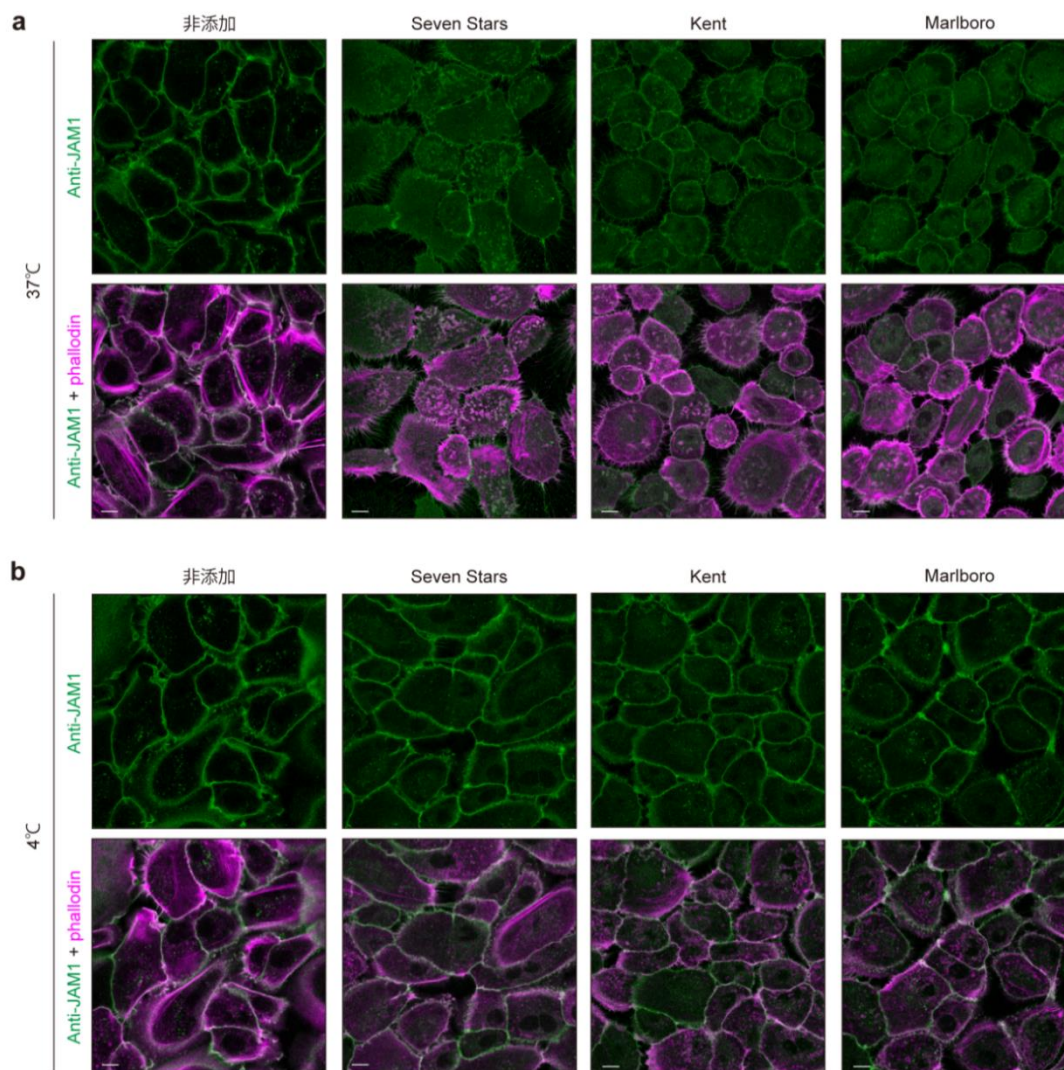


図 9. 4 °C の低温状態が CSE を添加した HGEPP における JAM1 の局在へ及ぼす影響

HGEPP を (a) 37 °C または (b) 4 °C で 30 分培養した後、CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) を添加した。1 時間後に細胞を固定し、抗 JAM1 抗体 (緑) と Alexa Fluor 633 標識の phalloidin (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  $\mu\text{m}$  を示す。

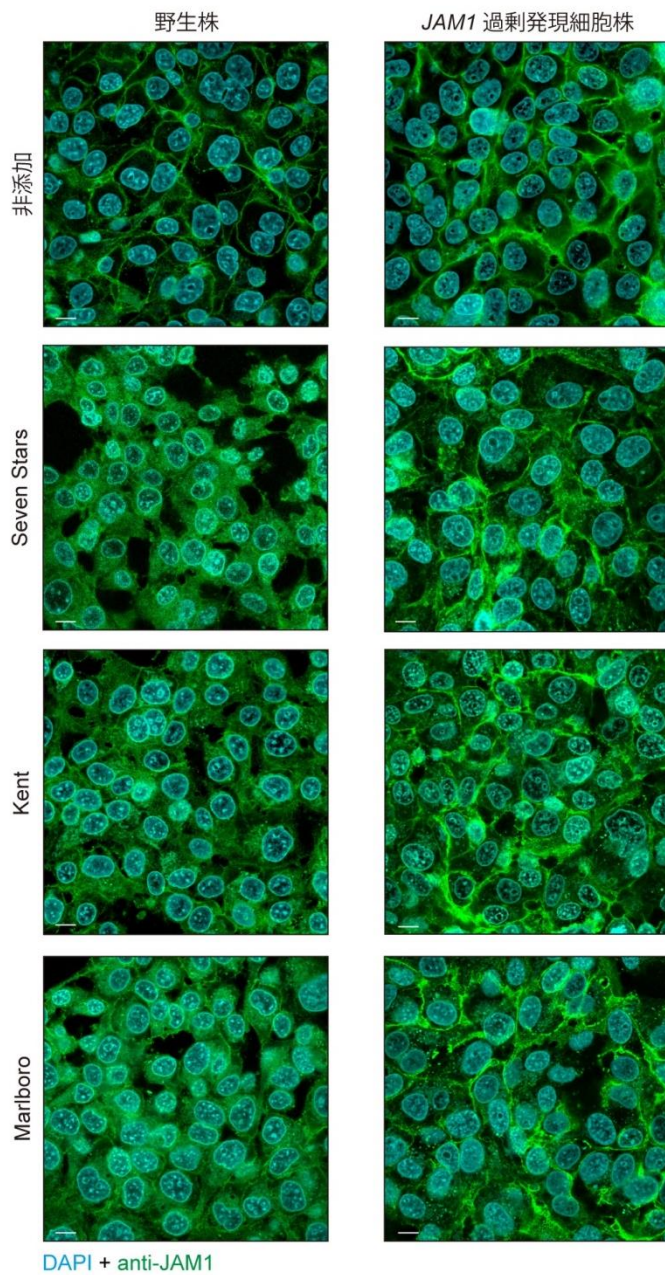


図 10. CSE が *JAM1* を過剰発現させた IHGE 細胞における *JAM1* の局在に及ぼす影響

IHGE 細胞（野生株あるいは *JAM1* 過剰発現細胞株）に CSE を添加した。1 時間後に固定し、DAPI (シアン) および抗 *JAM1* 抗体 (緑) で染色し、共焦点顕微鏡にて観察した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。

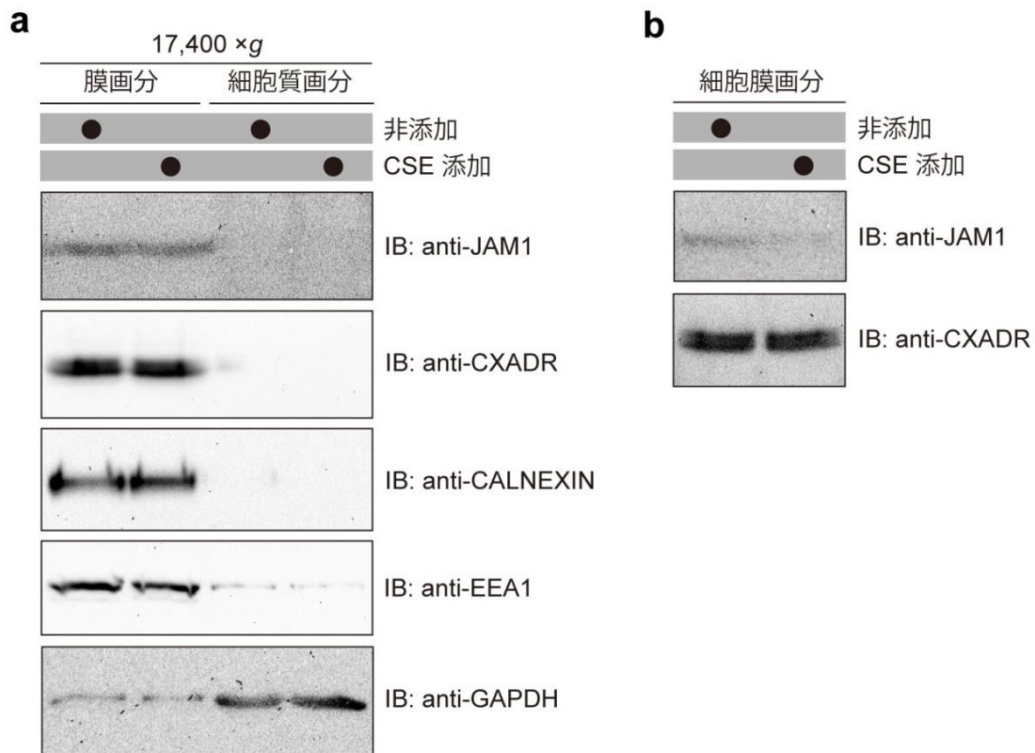
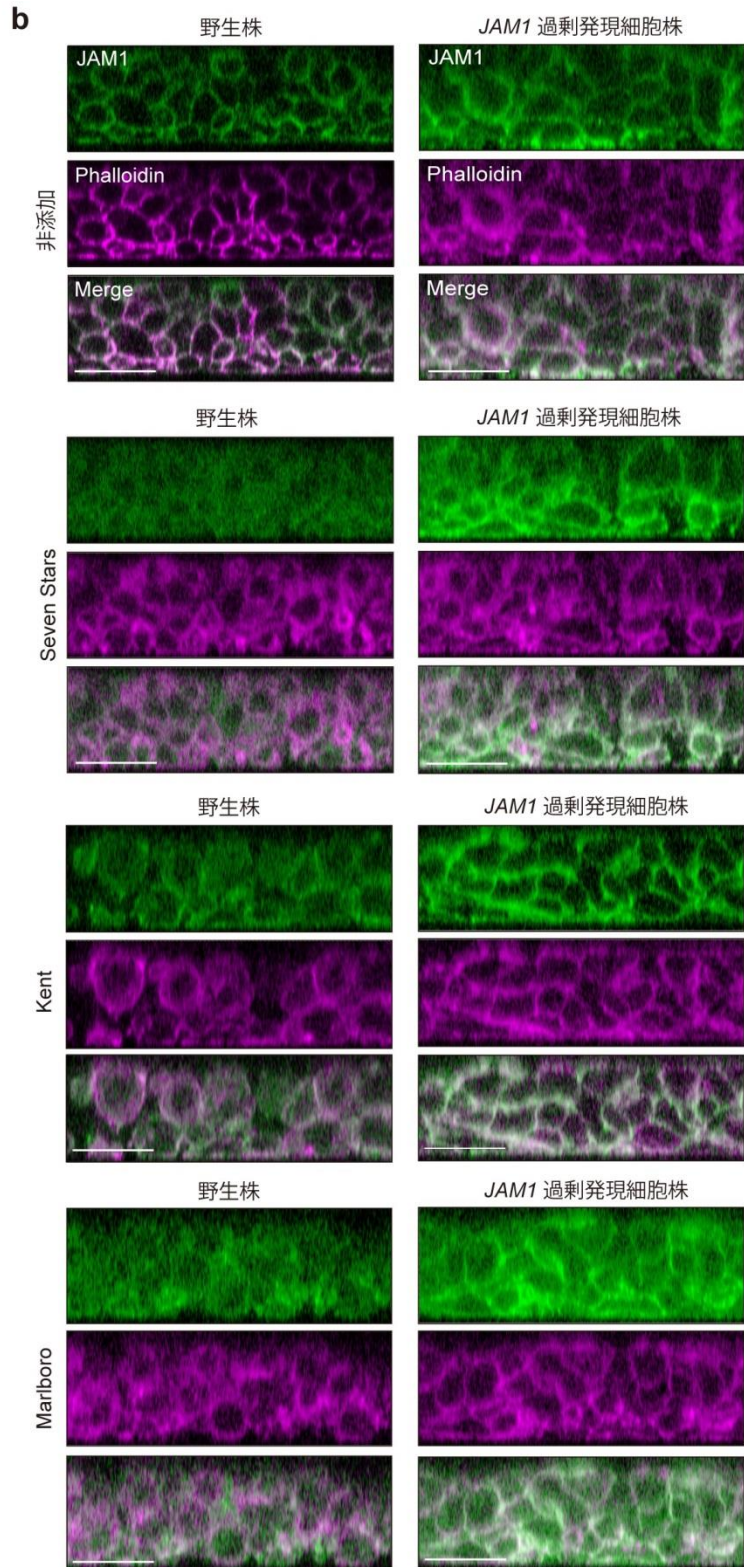
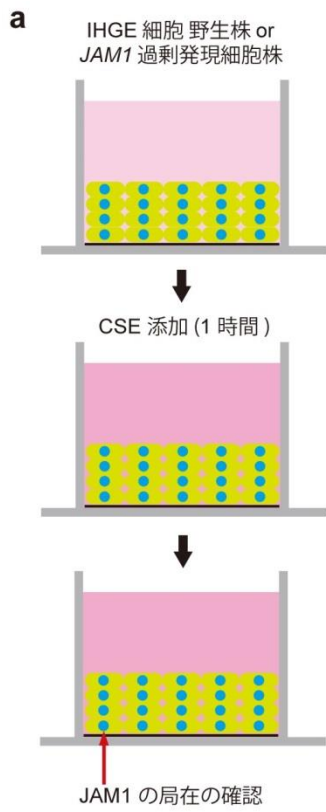


図 11. CSE の添加が IHGE 細胞における JAM1 の局在する分画に及ぼす影響

(a, b) IHGE 細胞に Seven stars で作成した CSE を添加した. 1 時間後に, 膜画分および細胞質画分 (a), あるいは細胞膜画分 (b) に分け, ウェスタンブロット法にて解析した. CALNEXIN を小胞体のマーカー, EARLY ENDOSOME ANTIGEN 1 (EEA1) をエンドソームのマーカー, および GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE (GAPDH) を細胞質のマーカーとして使用した.



**図 12. CSE が三次元歯肉上皮モデルにおける JAM1 の局在に及ぼす影響**

(a) 本実験の模式図. (b) 三次元歯肉上皮モデル (野生株または *JAM1* 過剰発現細胞株) をカバーガラス上で培養し, CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) を培地に加えた. 1 時間後に三次元歯肉上皮モデルを固定し, 抗 JAM1 抗体 (緑) および Alexa Fluor 633 標識の phalloidin (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 30  $\mu\text{m}$  を示す.

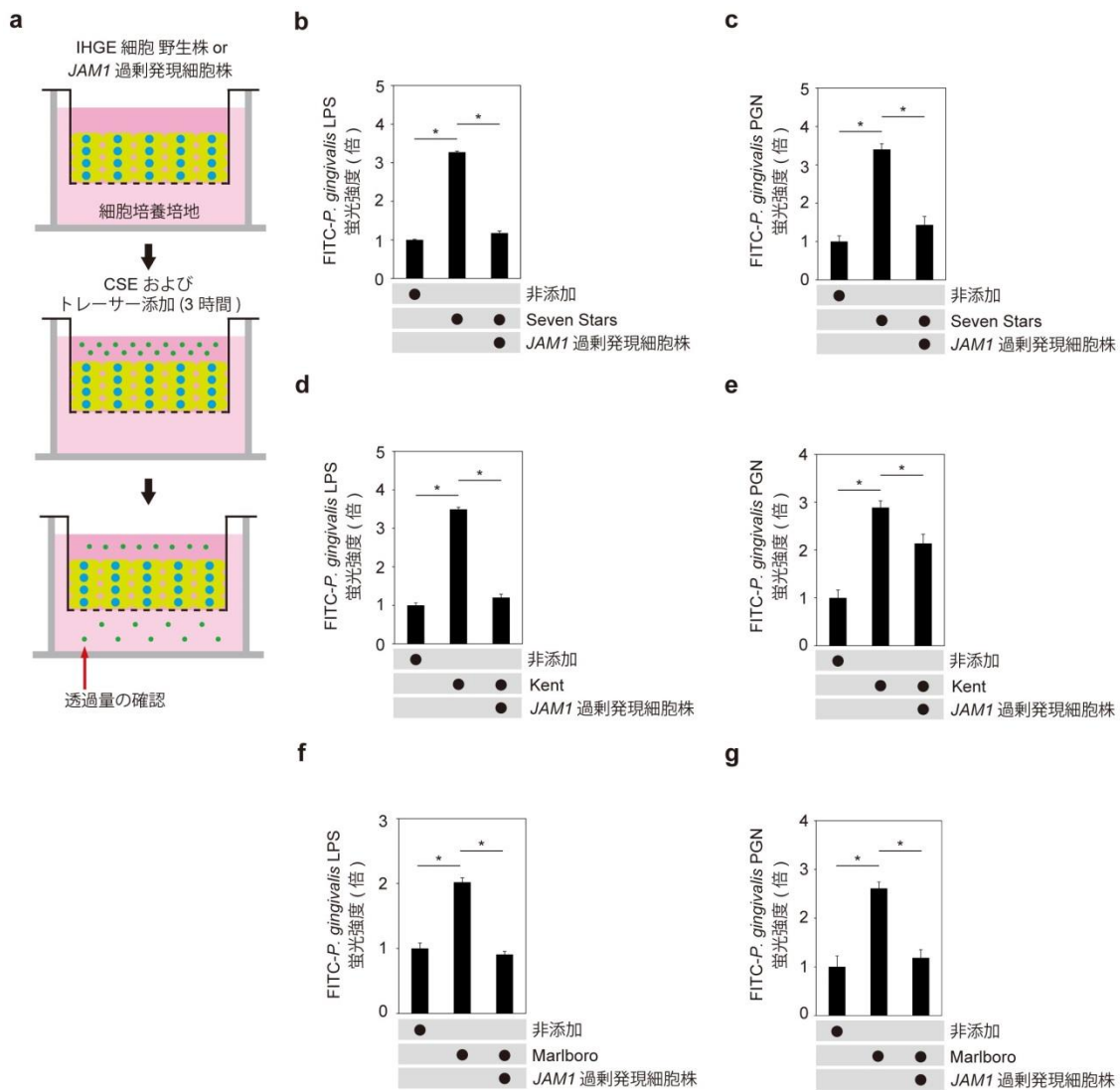


図 13. CSE が三次元歯肉上皮モデルのバリア機能へ及ぼす影響

(a) 本実験の模式図. 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, FITC 標識トレーサーを上部の培地 (CSE 含有または非含有) に加えた. 3 時間後, 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-g) CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) 添加後の三次元歯肉上皮モデル (野生株または *JAM1* 過剰発現細胞株) における, FITC-*P. gingivalis* LPS (b, d, f) および FITC-*P. gingivalis* PGN (c, e, g) の透過性を評価した. 上部区画に CSE を添加あるいは添加していないカルチャーインサート内の三次

元歯肉上皮モデルを各種レーザーで処理した。結果は、CSE を添加していない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, closed-testing procedure),  $n = 8$ , Bar = 標準偏差.

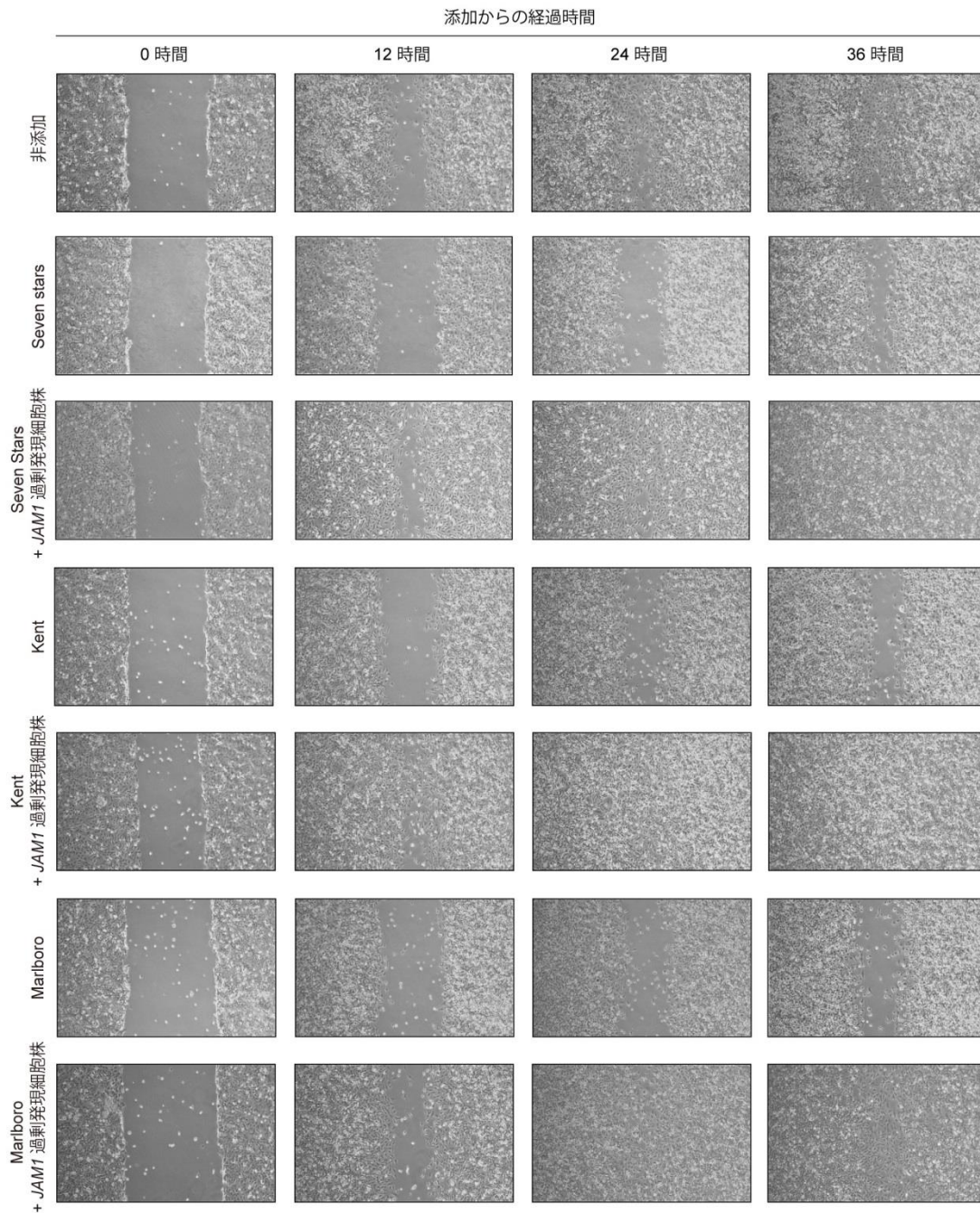


図 14. CSE が IHGE 細胞の遊走に及ぼす影響

IHGE 細胞（野生株あるいは *JAM1* 過剰発現細胞株）を単層培養し、20  $\mu$ L 用のピペットチップの先端で無細胞部分を付与し、CSE (Seven Stars, Kent, または Marlboro) を添加した。添加時、12 時間後、24 時間後、および 48 時間後に、間隙の大きさを位相差顕微鏡で観察した。

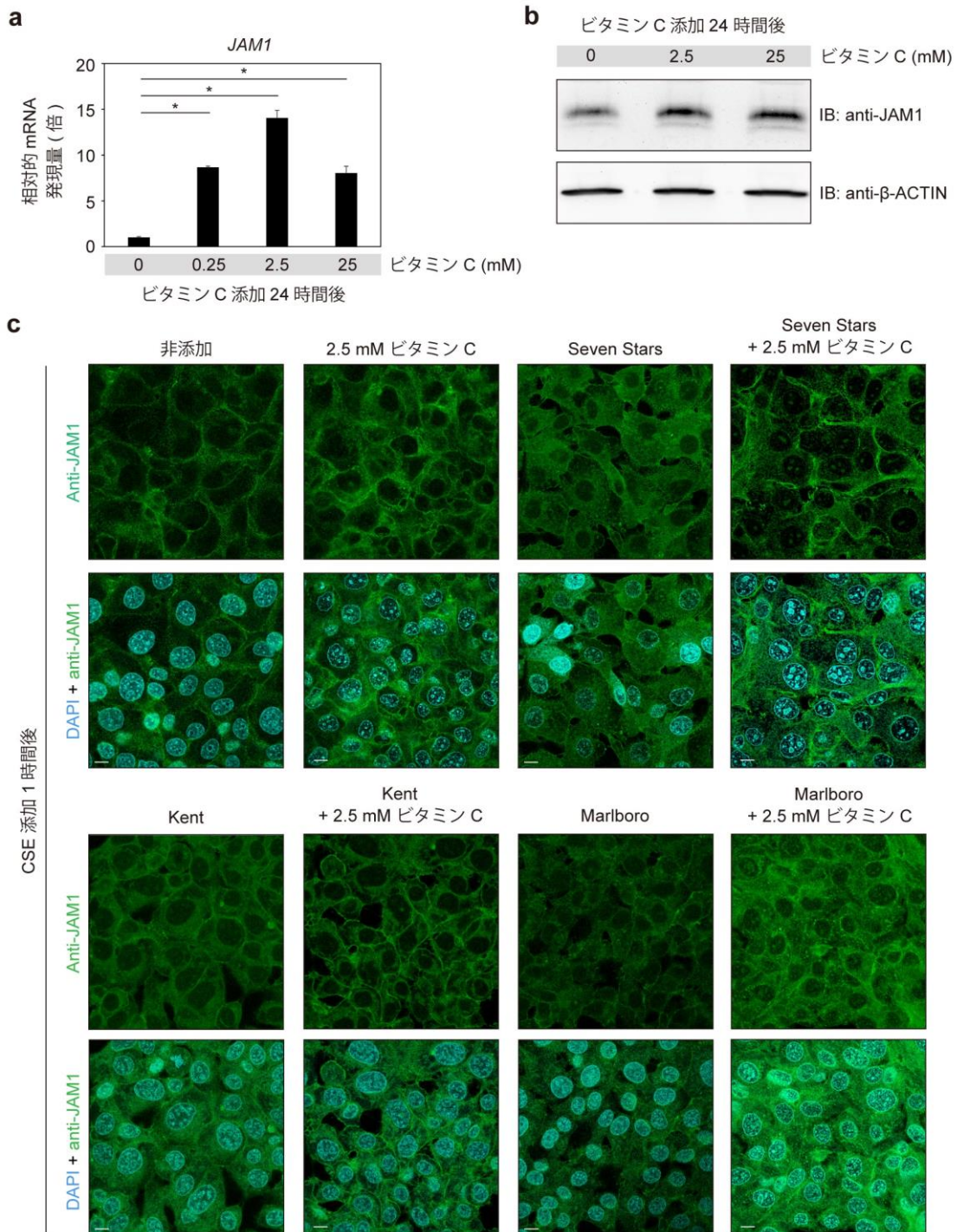


図 15. ビタミン C が IHGE 細胞の JAM1 発現へ及ぼす影響

(a) IHGE 細胞にビタミン C を非添加あるいは 0.25 mM, 2.5 mM, 25 mM の濃度で添加し, 24 時間後に mRNA を回収した. その後, 逆転写 PCR を行い cDNA を精製し, 定量的リアルタイム PCR を行った. 結果は, ビタミン C

非添加時の mRNA の発現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),  $n = 5$ , Bar = 標準偏差. (b) IHGE 細胞にビタミン C を 2.5 mM または 25 mM 濃度で添加し, 24 時間後にタンパクを回収し, ウェスタンブロット法にて解析した. (c) IHGE 細胞に 2.5 mM の濃度のビタミン C を添加した. 1 時間後に CSE を添加した. 1 時間後に細胞を固定し, DAPI (シアン) および抗 JAM1 抗体 (緑) で染色し, 共焦点顕微鏡で観察した. スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す.

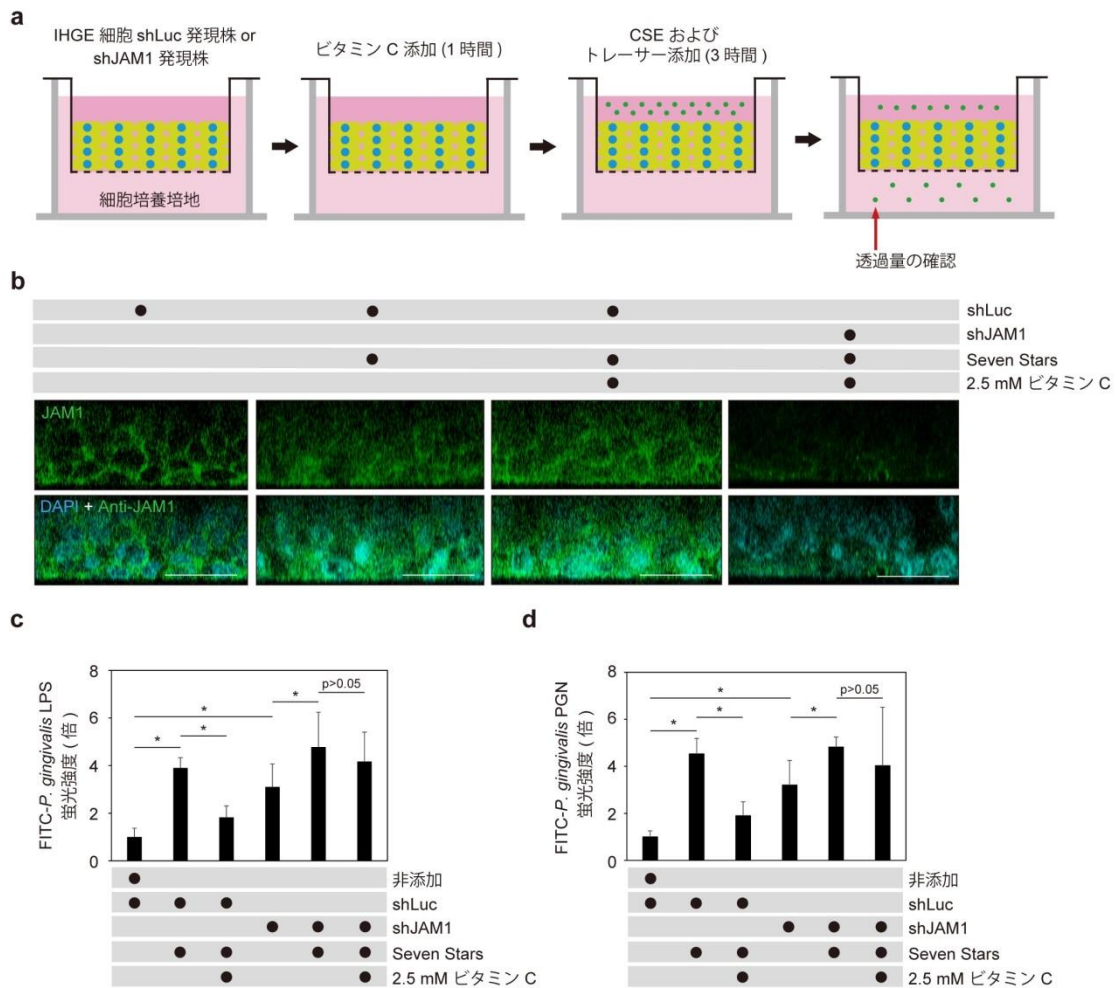


図 16. LPS および PGN への三次元歯肉上皮モデルのバリア機能に及ぼす CSE の影響と JAM1 の関与

(a) 培養インサートの装置の模式図. (b) 三次元歯肉上皮モデルに 2.5 mM の濃度のビタミン C を添加した. 1 時間後に CSE を添加した. 3 時間後に組織を固定し, DAPI (シアン) および抗 JAM1 抗体 (緑) で染色し, 共焦点顕微鏡で観察した. スケールバーは 30  $\mu\text{m}$  を示す. (c, d) shLuc または shJAM1 を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, ビタミン C を上部の培地に添加した. 1 時間後, FITC 標識トレーサーを上部の培地 (CSE 含有または非含有) に添加した. 3 時間後, 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。結果は、CSE およびビタミン C を添加していない時の透過量をコントロールとした倍数で示している。\* $p < 0.05$  (両側  $t$  検定, closed-testing procedure),  $n = 8$ , Bar = 標準偏差.