

***Aggregatibacter actinomycetemcomitans*による歯肉上皮**

**細胞の細胞接着変化に関する研究**

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻  
病態機構学講座 歯周病態学分野

高知信介

**Alterations of cell adhesion in gingival epithelial cells infected  
with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University  
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Shinsuke KOCHI

(平成 25 年 12 月 13 日受付)

## 緒言

歯周炎は細菌感染を原因とする炎症性疾患である<sup>1)</sup>。歯周病原細菌に感染して炎症反応が深部に波及すると、歯槽骨は吸収され、歯周組織の破壊が生じる<sup>2)</sup>。この破壊は、細菌の刺激に対して免疫応答が展開された結果である。すなわち、歯周病原細菌が歯肉溝内に侵入すると、歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞が細菌の菌体成分を認識して、炎症反応を調節するサイトカインや炎症性メディエーターを産生し、これらの分子が好中球などの免疫細胞を活性化する。さらに免疫応答が持続し、免疫細胞が過剰に活性化した結果、歯槽骨の吸収など歯周組織の破壊が生じる<sup>4)</sup>。従って、歯肉溝上皮は最初に菌に曝されることで、上記の免疫応答の起点となる。さらに、持続的な炎症が生じた結果、歯肉溝底部の歯面と接合上皮の接着が破壊される。以上のことから、細菌の感染により歯肉上皮の細胞間接着、および歯面と接合上皮との接着の様式がどのように変化し、その変化が細菌の深部組織への侵入に関与しているかを調べることは、歯周病の進行や予防を考える上で大変重要である。

細胞間の接着は一般的に、密着結合<sup>5)</sup>、接着結合<sup>6)</sup>、デスモゾーム結合<sup>7)</sup>、およびギャップ結合<sup>8)</sup>によって接着しており、歯肉上皮細胞間の接着では occludin からなる密着結合や E-cadherin からなる接着結合が関与している<sup>9)</sup>。その一方で、歯面と接合上皮はヘミデスモゾーム結合を形成することによって接着しており、この接着には細胞接着分子である integrin と細胞外基質 (extracellular matrix : ECM) が関与している<sup>10)</sup>。integrin は、 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の 2 種のサブユニットからなるヘテロダイマーで構成され、 $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖ともに細胞膜を貫通しており、細胞と ECM の接着に関与する膜蛋白質である<sup>11)</sup>。現在までに integrin のサブユニットには 18 種類の  $\alpha$  鎖と 8 種類の  $\beta$  鎖が確認されており、それらの組み合わせによって 24 種類の integrin が形成される<sup>12)</sup>。さらに、それらの組み合わせによって、それぞれの ECM が特異的に結合する。また、integrin は、ECM と接着することによって、細胞外の情報を細胞内に伝えるシグナル伝達因子としても機能する。その一方で、この接着が ECM の発現を調節することによって、これらの細胞の増殖、分化、死、および遊走などに関与する<sup>13)</sup>。そのため、ECM は、細胞外の空間を満たす物質であると同時に、組織の骨格的役割、細胞接着におけ

る足場の役割, そして細胞増殖因子などの液性因子を保持・提供する役割などを担う。

代表的な ECM として collagen, proteoglycan, fibronectin, および laminin などが挙げられる<sup>14)</sup>。接合上皮では 5 種類の integrin ( $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ , および  $\alpha v\beta 6$ ) が発現しており, また歯面側にある内側基板では 4 種類の ECM (laminin-5, type VIII collagen, versican, および tenascin C) が, 発現している<sup>15)</sup>。歯周病原細菌によって細胞間接着が破壊されるという報告<sup>16)</sup>は存在するが, 細菌感染によって, 接合上皮と歯面の結合様式であるヘミデスモゾーム結合に関与するこれらの integrin と ECM が受ける影響については不明な点が多い。

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) は, 代表的な歯周病原細菌の一種であり, 通性嫌気性グラム陰性桿菌である。Aa によって産生されるリポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS)<sup>17)</sup>, ロイコトキシン<sup>18)</sup>, 細胞致死性膨張性毒素<sup>19)</sup>, および外膜蛋白質<sup>20)</sup>は, 歯肉上皮を損傷させ, 炎症を拡大させる。また, Aa は上皮細胞へ侵入する能力を持ち<sup>21)</sup>, 歯周炎発症の初期段階に深く関与する<sup>22)</sup>。さらに, 歯肉上皮細胞において, Aa の刺激により, 細胞間接着因子である E-

cadherin の発現が減少したことが報告されている<sup>16)</sup>。しかし、Aa がどのようなメカニズムで炎症に関わり、歯肉上皮細胞の integrin と ECM の発現変化に関与するかについては不明な点が多い。

このような背景から、歯周病原細菌が歯面と接合上皮の接着にどのように影響するかを解明することは、歯周炎進行の抑制手法を考える上で重要と考えられる。そこで本研究では、この接着に起こる変化を明らかにするために、培養ヒト歯肉上皮細胞株を用いて、細胞と Aa の共培養時、または共培養後に菌を除去した際に生じる、炎症および接着に関連する因子の発現の変化および細胞接着能の変化を調べた。

## 材料と方法

### 1. 歯肉上皮細胞の分離・培養

健康な歯周組織を有するドナー（28 歳，男性）から下顎右側智歯の抜歯時に同歯遠心頬側歯肉を採取し，研究に用いた。細胞の提供を受ける前に，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認の下（第 975 号），使用目的などを十分に説明して同意を得た。歯肉上皮細胞は Han らの方法<sup>23)</sup>を改変し分離した。すなわち，採取した歯肉組織を迅速に No.10 メス（フェザー安全剃刀株式会社，大阪）を用いて 1 mm<sup>3</sup> 以下に粉碎後，4 mg/mL の Collagenase Type I（Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA）と 2 mg/mL の DISPASE<sup>®</sup> II（三光純薬株式会社，千葉）を 1:1 で混合した溶液中で 37 °C において 90 分間処理した。さらに，同溶液を遠心分離（1,200 rpm, 5 分間）し，沈殿した細胞を直径 60 mm セルタイト C-1（collagen type I, ウシ真皮由来）シャーレ（住友ベークライト，東京）に播種した<sup>24)</sup>。5 ng/mL bovine pituitary extract（Life Technologies, Carlsbad, CA, USA）添加 Keratinocyte-SFM 培地（Life Technologies）を用いて，37 °C，5 % CO<sub>2</sub>，100 % 湿度の下で細胞培養を行った。細胞の継代には，0.005 % Trypsin と 0.5 mM ethylenediaminetetra-acetic acid（EDTA）（共に Life Technologies）との混合溶液（trypsin-EDTA）を用いた。細胞数の調整は，血球計算板 C-chip（NanoEnTek,

Guro-gu, Seoul, South Korea) を用いて行った。3 継代後, pLenti Simian virus 40

(SV40) (Applied Biological Materials, Richmond, BC, Canada) を用いて形質転換<sup>25)</sup>し, 不死化ヒト歯肉上皮細胞株 (Immortalized Human Gingival Epithelial Cell line ; IHGE 細胞) を樹立した。IHGE 細胞をさらに 7 世代継代し, 実験に使用した。

## 2. 細菌とその培養

Aa の中で日本人の限局型侵襲性歯周炎の患者から多く検出される血清型 b の Y4 株 (AaY4) を使用し<sup>26)</sup>, 1L 中に Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 5g を添加した Tryptic Soy Broth (Becton) 10 mL を用いて, 37 °C, 5 %CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。また, 嫌氣的条件にするためにアネロパック・ケンキ (三菱ガス科学, 東京) を使用した。細菌培養物は, 吸光度計 (miniphoto518 R : タイテック, 埼玉) を用いて波長 660 nm (A<sub>660</sub>) における吸光度を測定した。A<sub>660</sub> が 0.6 の時に菌液を希釈した後, 寒天培地に播種し, 形成された集落数から菌濃度が 6×10<sup>7</sup> cfu/mL であることを確認した。また, 上記濃度まで培養した細菌は, 3,000 rpm で 4 °C, 20 分間の遠心と phosphate buffer saline (PBS ; Life Technologies) への懸濁を 2 度繰り返して洗浄した後, 菌濃度を調整して実験に用いた。

### 3. IHGE 細胞と AaY4 の共培養

細胞培養用に表面をプラズマ処理された 6 穴プレート (Corning ; 3516, Corning, NY, USA) に  $2.4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> になるように IHGE 細胞を播種し, 抗菌薬を含まない培地で培養した。IHGE 細胞がコンフルエント ( $4.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) になった時に, IHGE 細胞と AaY4 を以下の 3 条件に分けて共培養した。なお, IHGE 細胞のみを 24 時間培養したものを陰性対照群とした。

1) AaY4 を multiplicity of infection (MOI) 10 あるいは 100 で 24 時間共培養した (共培養群)。

2) AaY4 を MOI=10 で 12 時間共培養した後に, PBS で IHGE 細胞を洗浄することにより細胞外の AaY4 を除去した。さらに, 細胞表面に残存する AaY4 を除去するために, Penicillin-Streptomycin (PS ; Life Technologies) を各 100  $\mu$ g/mL 含む培地に交換し, さらに 12 時間培養した (Aa 除去群)。

3) INTEGRIN  $\alpha$ 5 が FIBRONECTIN と結合することを阻害する抗体 BIIG2<sup>27)</sup>

(Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) を, 30  $\mu$ g/mL の濃度で IHGE 細胞に 1 時間作用させた後, AaY4 を MOI=10 で 24 時間培養した (INTEGRIN  $\alpha$ 5 阻害共培養群)。なお, 抗体のみ作用させた IHGE 細胞を INTEGRIN  $\alpha$ 5 阻害群とした。

#### 4. 細胞接着能の検討

上記の3条件で培養した IHGE 細胞の細胞接着能を接着アッセイ法により解析した<sup>28)</sup>。すなわち、上記実験で AaY4 と共培養したもの、またはしていない IHGE 細胞を trypsin-EDTA で剥離し、 $3.2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>になるように 96 穴プレート (Corning) に再播種した。播種後、24 時間の時点でプレートに付着していない細胞を PBS で 3 回洗浄することにより除去し、付着している細胞を paraformaldehyde (PFA) (ナカライテスク, 京都) を 4 %含む pH 7.4 の PBS にて 10 分間浸漬固定した。次に 10 % Non-Immune Goat Serum (Life Technologies) にて 30 分間ブロッキング後、VECTASHIELD<sup>®</sup> Mounting Medium with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて核染色を行なった。Cellomics ArrayScan<sup>®</sup> VTI (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) で染色像を撮影後、付着細胞数を測定した。

#### 5. 遺伝子発現解析

上記の3条件で培養した細胞において、細胞から全 RNA を回収し、ケモカイン、インテグリン類、および ECM 関連分子の遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR

(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 法で定量解析した<sup>29)</sup>。詳細は以下の手順で行った。

1) 全 RNA の抽出：全 RNA は、シリカ膜への吸着を利用した RNeasy Mini Kit

(QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行った。抽出した RNA の濃度は 260 nm の波長における吸光度 ( $A_{260}$ ) を用いて算出した。全ての RNA の  $A_{260} / A_{280}$  値は 1.9 ~ 2.1 の範囲であった。また、RNA の抽出過程で RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いて DNA を除去した。

2) 逆転写反応：抽出した RNA 1  $\mu\text{g}$  と Nuclease-Free Water (QIAGEN) を混合して総量が 11  $\mu\text{L}$  になるように調整し、その溶液に 50  $\mu\text{M}$  oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer と 10 mM dNTP Mix (共に Life Technologies) をそれぞれ 1  $\mu\text{L}$  ずつ加え、65 °C で 5 分間熱処理後に氷上で 1 分間急冷した。次に、4  $\mu\text{L}$  の 5 × First Strand Buffer, 1  $\mu\text{L}$  の 0.1 M dithiothreitol, 1  $\mu\text{L}$  の 200 U/ $\mu\text{L}$  SuperScript III Reverse Transcriptase (すべて Life Technologies) 及び 1  $\mu\text{L}$  の RNase-free Water (QIAGEN) を混合した溶液 (20  $\mu\text{L}$ ) 中で、50 °C で 1 時間の逆転写反応を行い cDNA を合成した。その後、70 °C 15 分間の加温処理を行なうことによって逆転写酵素の不活化を行った。

3) プライマーの作製：*INTERLEUKIN 8 (IL-8)*, *PROLIFERATION CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)*, *INTEGRIN ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$ )*, *FIBRONECTIN 1*,

*TENASCIN C*, *LAMININ* ( $\alpha 1$ ,  $\gamma 2$ ), そして *GLYCERALDEHYDE 3-*

*PHOSPHATEDEHYDROGENASE* (*GAPDH*) の cDNA を増幅する PCR プライマー

を, オンラインソフトウェアである Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) を用いて設

計した (表 1)。プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの合成と簡易逆相カ

ラムカートリッジによる精製はシグマアルドリッチ ジャパン (東京) に委託し

た。

- 4) リアルタイム RT-PCR 法 : PCR 反応は, cDNA 合成後の反応液を 10 倍希釈した溶液 2  $\mu\text{L}$  を用いて, 上記で作製した 0.5  $\mu\text{L}$  ずつのセンスならびにアンチセンス PCR プライマー (10  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{L}$  の 2  $\times$  Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), および 7  $\mu\text{L}$  の RNase-free Water (QIAGEN) と混合し, 95  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間の初期変性の後, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 秒, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 分のステップでアニーリングと伸長反応を 40 サイクル行った。この反応は 7300 Fast Real-Time PCR System を用いて行い, その際に PCR 産物が発する発光量を SDS v1.X with RQ Software (共に Life Technologies) にて測定した。なお, 内部対照は *GAPDH* の mRNA 量とした。

## 6. INTEGRIN $\alpha 5$ , $\beta 4$ の免疫細胞化学染色

免疫細胞化学染色のために AaY4 と共培養した IHGE 細胞を，PFA を 4 % 含む PBS で 10 分間浸漬固定した。10 % Non-Immune Goat Serum (Life Technologies) を用いて 30 分間のブロッキング操作を行なった後，免疫細胞化学染色に供した。一次抗体として，抗 INTEGRIN  $\alpha 5$  マウスモノクローナル抗体あるいは抗 INTEGRIN  $\beta 4$  マウスモノクローナル抗体（共に Abcam, Cambridge, UK）を PBS にて 1 : 100 の濃度に希釈した溶液を用い，4 °C で 12 時間反応させた。PBS で洗浄後，二次抗体として Alexa Flour<sup>®</sup> 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies) を PBS にて 1 : 500 の濃度に希釈した溶液を用い，室温にて 30 分間反応させた。その後，核の染色として VECTASHIELD<sup>®</sup> Mounting Medium with DAPI を室温で 10 分間反応させ，染色された細胞を Cellomics ArrayScan<sup>®</sup> VTI を用いて観察した（倍率は 20 倍）。

## 7. 統計処理

すべての実験データは，分散分析 (ANOVA) および Scheffe's test を用いて検定した。なお， $p$  値 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

## 結果

### 1. IHGE 細胞と AaY4 の共培養による細胞接着の変化

IHGE 細胞と AaY4 の共培養群で培養プレートに接着した細胞数は、対照群と比較して、半減した ( $p < 0.05$ )。しかし、MOI=10 と MOI=100 で行った群間に差は認められなかった (図 1)。

### 2. 共培養によるサイトカイン、インテグリン、および ECM 関連遺伝子の発現変化

IHGE 細胞と AaY4 の共培養により接着細胞数が低下したことから、その機序を探るため、サイトカイン、インテグリン、および ECM 関連分子の遺伝子の発現変化を調べた。歯面と接合上皮の接着部に発現する integrin と ECM<sup>13</sup>)に加え、代表的な炎症性ケモカインとして IL-8 の遺伝子を、また増殖関連因子として PCNA の遺伝子を同時に調べた。IL-8 の発現量は、共培養群で著明に増加したが、MOI=100 の場合に比べて MOI=10 の方が多かった (図 2A)。PCNA の発現量は、共培養群で 50%以上減少した (図 2B)。INTEGRIN のうち  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$  の発現量は、共培養群で減少した (図 2C)。このうち、INTEGRIN  $\beta 6$  は、MOI 依存的に減少した (図 2C)。なお、INTEGRIN  $\alpha 5$  の発現量は、共培養群で MOI 依存的に約 3.5 倍まで増加した。

一方、*LAMININ  $\alpha 1$* ,  *$\gamma 2$* , *FIBRONECTIN 1*, そして *TENASCIN C* の発現量は共培養群で減少した (図 2D)。このうち、*TENASCIN C* は MOI に依存的に減少した。なお、*LAMININ  $\gamma 2$*  と *FIBRONECTIN 1* の発現量が減少したのは、MOI が 10 の時であり、MOI が 100 の時には減少しなかった (図 2D)。

### 3. 共培養後に AaY4 を除去した時の細胞接着の変化

共培養後に AaY4 を除去した群 (Aa 除去群) では、共培養により減少した接着細胞数が、約 2 倍に回復した (図 3)。しかし、AaY4 を共存させない陰性対照群に対しては約 30%に留まった。

### 4. AaY4 除去によるサイトカイン, インテグリン, および ECM 関連遺伝子の発現変化

IHGE 細胞と AaY4 の共培養後に AaY4 を除去すると接着細胞数に回復が認められたことから、その機序を探るために前述の遺伝子群の発現変化を調べた。共培養群で増加した *IL-8* の発現量は、Aa 除去群では約 1/6 に減少した (図 4A)。また共培養群で減少した *PCNA* の発現量は、AaY4 を除去することにより約 5 倍に増加した (図 4B)。ただし、陰性対照群に対しては約 30%に留まった。

一方、共培養群で減少した *INTEGRIN*  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$  の発現量は、Aa 除去群でも AaY4 共培養群と同程度に減少したままであった (図 4C)。共培養群で増加した *INTEGRIN*  $\alpha 5$  の発現量は、Aa 除去群では約 30% まで減少したが、陰性対照群の 1.5 倍であった (図 4C)。共培養群で減少した *FIBRONECTIN 1* の発現量は、Aa 除去群では僅かに増加したものの、有意差は認められなかった。*TENASCIN C* の発現量は、Aa 除去群でも共培養群と同程度に減少したままであった (図 4D)。

## 5. AaY4 除去による INTEGRIN の発現変化

歯面と接合上皮における接着で最も多い接着分子である *INTEGRIN*  $\beta 4$ <sup>30)</sup> と、上述の遺伝子発現解析の結果から他の *INTEGRIN* と異なる発現変化を示した *INTEGRIN*  $\alpha 5$  について、IHGE 細胞における発現を両者に対する抗体を用いて調べた。陰性対照群では、*INTEGRIN*  $\beta 4$  は細胞膜上に多く存在 (緑色) していたが、共培養群ではほとんど見られなかった。Aa 除去群でもその量は減少したままであった。(図 5A)。*INTEGRIN*  $\alpha 5$  は、共培養群では陰性対照群と比較して、細胞膜上で多く存在していた (緑色)。Aa 除去群ではその量は、共培養群と比較して減少したが、陰性対照群と同程度にまでには減少しなかった (図 5B)。

## 6. 共培養時における INTEGRIN $\alpha 5$ の機能阻害が細胞接着に及ぼす影響

抗 INTEGRIN  $\alpha 5$  抗体 BIIG2 を用いて INTEGRIN  $\alpha 5$  と FIBRONECTIN の結合を阻害した場合、AaY4 共培養群では培養プレートに接着した細胞数は、INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害群の場合と比較して、差は認められなかった (図 6)。なお、INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害群において培養プレートに接着した細胞数は、陰性対照群 (INTEGRIN  $\alpha 5$  非阻害群) のものと比較し、約 3 倍であった。

## 7. INTEGRIN $\alpha 5$ 機能阻害時における、歯肉上皮細胞と AaY4 共培養時のサイトカイン、インテグリン、および ECM 関連遺伝子の発現変化

共培養時に BIIG2 を使用すると、AaY4 を共存させても接着細胞数に変化が見られなかったことから、その機序を探るために前述の遺伝子群の発現変化を調べた。*IL-8* の発現量は、陰性対照群 [AaY4 (-), BIIG2 (-)] に比較して共培養群 [AaY4 (+), BIIG2 (-)] で、そして INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害群 [AaY4 (-), BIIG2 (+)] に比較して INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害共培養群 [AaY4 (+), BIIG2 (+)] で、それぞれ増加した (図 7A)。*PCNA* の発現量は、陰性対照群に対して共培養群で、INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害群に対して INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害共培養群で、それぞれ減少した (図 7B)。

*INTEGRIN*  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 6$  の発現量は、陰性対照群に比較して共培養群で低かったが、*INTEGRIN*  $\alpha 5$  阻害群と *INTEGRIN*  $\alpha 5$  阻害共培養群の間には差は無かった (図 7C)。なお、*INTEGRIN*  $\alpha 2$ ,  $\beta 6$  の発現量は、陰性対照群と比較して *INTEGRIN*  $\alpha 5$  阻害群では減少した。また、*INTEGRIN*  $\alpha 5$  の発現量は、共培養群では増加したが、*INTEGRIN*  $\alpha 5$  阻害共培養群では増加しなかった (図 7C)。

*LAMININ*  $\alpha 1$  の発現量は、共培養群と *INTEGRIN*  $\alpha 5$  阻害共培養群で共に減少した (図 7D)。そして、*LAMININ*  $\gamma 2$  と *FIBRONECTIN 1* の発現量は、共培養群では減少したが、*INTEGRIN*  $\alpha 5$  阻害共培養群では減少しなかった (図 7D)。

## 考察

歯周組織に歯周病原細菌が感染した時に、歯面と接合上皮の接着に起こる変化の機序を解明することは、歯周炎の治療や予防に繋がると考えられる。本研究では、これらのことを明らかにするために、炎症、細胞増殖、そして細胞と歯面の接着の変化に注目した。プレート上で培養された歯肉上皮細胞では、ヘミデスモゾーム結合の主な構成成分である INTEGRIN  $\alpha 6\beta 4$  と LAMININ-5 が発現することが確認されていることから<sup>30)</sup>、本研究では、使用した培養プレート底面と細胞の接着様式は歯面と接合上皮の接着様式と同様であると想定した。

本研究では歯肉上皮細胞に対する AaY4 の影響を調べるために生菌を用いて共培養を行った。接着アッセイの結果、IHGE 細胞と AaY4 の共培養群では細胞接着能は低下した。そして、共培養後に AaY4 を除去することにより IHGE 細胞の性状が AaY4 を共存させないときの状態に戻ったことから、IHGE 細胞に生じた変化は AaY4 が細胞内に侵入することによって生じたと考えられる。しかし、生菌のみならず、Aa の LPS や外膜蛋白質も上皮細胞を刺激し、上皮細胞の性状に変化をもたらすことが報告されていることから<sup>31,32)</sup>、今回認められた細胞接着能の変化がこれらの菌体成分の刺激による可能性があり、今後、死菌および菌体成

分を用いた検討が必要である。さらに、MOI 以外に共培養の時間等の因子が細胞接着能に影響する可能性もあり、これらの点についても今後検討する必要がある。

PCNA は、細胞周期の DNA 合成準備期および DNA 合成期に出現する細胞増殖マーカーである<sup>33)</sup>。接合上皮では、常に細胞増殖によるターンオーバーを行い組織の恒常性を保っている<sup>30)</sup>。共培養群で PCNA の発現量が減少したことから、細胞の増殖が抑制され、ターンオーバーに乱れが生じた可能性がある。そして細胞の増殖、接着および遊走のバランスが崩れ、その結果、歯面と接合上皮間を構成する INTEGRIN と ECM に変化が起こった可能性がある。

*INTEGRIN*  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$  と ECM 関連分子の遺伝子の発現量は、共培養群では減少した。*INTEGRIN*  $\alpha 2\beta 1$  と *INTEGRIN*  $\alpha 3\beta 1$  は、主に細胞の接着と遊走に関与する<sup>30, 34)</sup>。また *INTEGRIN*  $\alpha 6\beta 4$  は、LAMININ-5 と結合して歯面と接合上皮のヘミデスモゾームを形成し細胞接着に直接関与する<sup>30)</sup>。さらに、*INTEGRIN*  $\alpha v\beta 6$  は潜在型 transforming growth factor- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) の latency associated protein と結合することで、TGF- $\beta 1$  を活性化させる<sup>35)</sup>。また本郷は、TGF- $\beta$  シグナルが ECM の発現を調節していることを報告している<sup>36)</sup>。

INTEGRIN  $\alpha 5\beta 1$  は細胞の遊走に関与することに加え<sup>37)</sup>, INTEGRIN 結合蛋白質である focal adhesion kinase のリン酸化を介したシグナル伝達物質に関与する<sup>38)</sup>。さらに INTEGRIN  $\alpha 5\beta 1$  が *Porphyromonas gingivalis* の上皮細胞内への侵入<sup>39)</sup> や, *Helicobacter pylori* の病原因子の細胞内侵入に関与することが報告されている<sup>27)</sup>。このように, INTEGRIN  $\alpha 5$  は細菌感染に深く関わっている。大変興味深いことに, 共培養群において複数の INTEGRIN と ECM 分子の関連遺伝子の発現量が減少した一方で, INTEGRIN  $\alpha 5$  の発現量は約 3 倍に増加した。これらの結果から, IHGE 細胞と AaY4 の共培養時において, 菌を認識した細胞では, INTEGRIN  $\alpha 5$  がオートクライン的にシグナル伝達因子として作用していると考え, さらなる検討を行なった。

まず, 歯肉上皮細胞の細菌による刺激時において, INTEGRIN  $\alpha 5$  はシグナルを細胞内へ伝達する受容体様の働きをすると仮説を立て, INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害共培養群を設定した。接着アッセイの結果では, INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害共培養群の細胞接着能は低下しなかったが, 共培養を行っていない INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害群の細胞接着能は上昇した。integrin  $\alpha 5$  は細胞の遊走に関与する<sup>37)</sup>ことから, この上昇には, INTEGRIN  $\alpha 5$  の阻害による細胞遊走能の低下が関係したことが考えられる。一

方, *INTEGRIN*  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$ , *LAMININ*  $\gamma 2$ , および *FIBRONECTIN 1* の発現量は, 共培養群では減少し, *INTEGRIN*  $\alpha 5$  阻害共培養群では減少しなかった。逆に, *INTEGRIN*  $\alpha 5$  の発現量は, 共培養群で増加し, *INTEGRIN*  $\alpha 5$  阻害共培養群では増加しなかった。接着アッセイとこれらの遺伝子発現の結果から, AaY4 を共培養すると, *INTEGRIN*  $\alpha 5$  を介してシグナルが 歯肉上皮細胞内へ伝達され, その結果, 他の *INTEGRIN* と ECM の発現量が減少し, 歯面と接合上皮の接着能が低下したことが考えられる。

ところで, *IL-8* と *PCNA* の発現は *INTEGRIN*  $\alpha 5$  によっては制御されないという結果が示された。 このことから, IHGE 細胞と AaY4 の共培養時における *IL-8* と *PCNA* の産生に関与するシグナル伝達経路は, *INTEGRIN*  $\alpha 5$  を介した接着細胞制御のシグナル伝達とは異なると考えられる。

AaY4 との共培養によって *INTEGRIN*  $\alpha 5$  の産生量の増加と細胞接着能の低下が同時に起こったが, その際に *INTEGRIN*  $\alpha 5$  の機能を阻害しても AaY4 の共存による接着能の低下は見られなかったこと, また共培養を行わずに *INTEGRIN*  $\alpha 5$  の機能のみを阻害した場合では接着能が上昇したことから, *INTEGRIN*  $\alpha 5$  は細胞の接着を弱めている可能性がある。しかし, 接着に関わる分子である *INTEGRIN*

$\alpha 2$  と  $\beta 6$  の発現量は INTEGRIN  $\alpha 5$  の阻害で減少したこと (図 7C) から, IHGE 細胞の細胞接着における INTEGRIN  $\alpha 5$  の作用機序についてはさらなる検討が必要がある。

以上のことから, AaY4 と の共培養時に IHGE 細胞では, ①ケモカインの活性化, ②細胞のターンオーバーの抑制による接着分子発現の構成の乱れ, ③接着に関わる INTEGRIN の発現量の減少, ④INTEGRIN  $\beta 6$  依存的 TGF- $\beta$  1 の活性化抑制による ECM 産生の減少, が生じたことが示唆された。 また, これらの機序には integrin  $\alpha 5$  を介したシグナル伝達が関与していることが示唆された。 これらの 現象は生体では次のように考えられる。 歯肉溝上皮の底部で上皮細胞は, AaY4 の抗原刺激を受けると,  $\beta$ -defensin 等の抗菌ペプチドや IL-8 を産生する<sup>40)</sup>。そして, 抗菌ペプチドによって非特異的な菌の排除が行われる。その後, 産生された IL-8 によって, 好中球が集積し, さらに菌の排除を行う。その時に, 接着に関わる integrin と ECM の発現を減少させ, さらに細胞増殖能を減少させる。そして, 歯面と接合上皮の接着は弱まり, 好中球が細胞間や歯肉溝内に遊走してきて働くことで, 菌は排除される。その結果, 歯面と接合上皮の付着が喪失され, 歯周ポケットが形成される。

日常の臨床の場において、歯周炎によって破壊された歯面と接合上皮の接着は、歯周治療によって再び形成される<sup>41)</sup>。その機序を調べるために、本研究では治療後の再付着を想定して、菌の刺激を除去した時に起こる歯面と接合上皮の接着に起こる変化を、IHGE細胞を用いて考えた。共培養群で増加した*IL-8*の発現量は、共培養後に菌を除去したAa除去群では著しく減少した。また、共培養群で減少した*PCNA*の発現量は、Aa除去群では増加した。そして、共培養群で低下した細胞接着能は、Aa除去群では僅かに回復した。これらの結果から、共培養後に菌を除去することで、Aaによる炎症反応が急速に収束していくこと、さらには低下した細胞増殖能と接着能が再び上昇すること、すなわち細胞のターンオーバーが亢進することが示唆された。なお、Aa除去群では、共培養群で減少した*INTEGRIN α2, α3, β4, β6*の発現量は増加しなかったが、共培養群で増加した*INTEGRIN α5*の発現量は減少した。これらの結果から、Aaを除去した時に、*INTEGRIN α5*は他の*INTEGRIN*より速やかに発現量を変化させ、シグナル伝達を行うことによって再度接着能を上昇させると考えられる。その際には、細胞の遊走能や接着能が上昇し、歯面と接合上皮のヘミデスモゾーム結合が再構成されると推測される。

細胞の遊走や接着に関与する *INTEGRIN*  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 6$  の発現量は Aa 除去群でも回復しなかったことに加えて, Aa を除去した後に速やかに変動した *IL-8*, *PCNA*, および *INTEGRIN*  $\alpha 5$  の発現さえも, 陰性対照のレベルまでには回復しなかった。この原因としては, Aa を除去後の 12 時間という短い時間のみでこれらの変動を観察したことが考えられる。また, 組織の修復には他の細胞からの刺激が必要である可能性がある。今後は, 共培養によって減少した *integrin* と ECM の発現量が, Aa を除去した後に陰性対照までに回復するにはどのくらいの時間およびどのような因子が必要かを検討する必要がある。

以上をまとめると次のようになる。 歯肉溝内に歯周病原細菌が侵入した時に, ケモカインの産生による好中球の遊走, 細胞のターンオーバーの抑制, および *integrin*  $\alpha 5$  の細胞内へのシグナル伝達を介した接着に関連する因子の発現の減少が起こる。その結果, 歯面と接合上皮の接着は破壊され, 歯周炎発症の初期段階に関わると考えられる (図 8)。今後の展望として, *integrin*  $\alpha 5$  を介した細胞接着の変化の機序をさらに詳しく調べることで, 歯周炎進行の抑制に寄与できると考える。

## 結論

培養ヒト歯肉上皮細胞株と AaY4 を共培養すると、IL-8 の発現は増加し、PCNA の発現は減少した。また、INTEGRIN  $\alpha 5$  を介した INTEGRIN と ECM の発現の減少によって、細胞接着能は低下した。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野高柴正悟教授に心から感謝致します。また，様々な面にわたり貴重なご助言とご協力下さいました，岡山大学病院歯周科の山本直史講師，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の山城圭介助教，本郷昌一博士（現，国立療養所大島青松園歯科医師），ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 特定非営利活動法人 日本歯周病学会 「歯周病の診断と治療の指針 2007」,  
2007.
- 2) Kennedy, J. E. and Polson, A. M.: Experimental marginal periodontitis in squirrel  
monkeys. *J. Periodontol.*, **44**, 140-144, 1973.
- 3) Schroeder, H. E. and Lindhe, J.: Conditions and pathological features of rapidly  
destructive, experimental periodontitis in dogs. *J. Periodontol.*, **51**, 6-19, 1980.
- 4) Bartold, P. M., Cantley, M. D. and Haynes, D. R.: Mechanisms and control of pathologic  
bone loss in periodontitis. *Periodontol. 2000*, **53**, 55-69, 2010.
- 5) Myal, Y., Leygue, E. and Blanchard, A. A.: Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation  
of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers. *J. Biomed. Biotechnol.*,  
2010, Article ID 956897, 2010.
- 6) Satterfield, M. C., Dunlap, K. A., Hayashi, K., Burghardt, R. C., Spencer, T. E. and  
Bazer, F. W.: Tight and adherens junctions in the ovine uterus: differential regulation by  
pregnancy and progesterone. *Endocrinology*, **148**, 3922-3931, 2007.
- 7) Delva, E., Tucker, D. K. and Kowalczyk, A. P.: The desmosome. *Cold Spring Harb.  
Perspect. Biol.*, **1**, a002543, 2009.

- 8) Nielsen, M. S., Nygaard, Axelsen, L., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M. and Holstein-Rathlou, N. H.: Gap junctions. *Compr Physiol.* **2**, 1981-2035, 2012.
- 9) Katz, J., Sambandam, V., Wu, J. H., Michalek, S. M. and Balkovetz, D. F.:  
Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect. Immun.*, **68**, 1441-1449, 2000.
- 10) Kinumatsu, T., Hashimoto, S., Muramatsu, T., Sasaki, H., Jung, H. S., Yamada, S. and Shimono, M.: Involvement of laminin and integrins in adhesion and migration of junctional epithelium cells. *J. Periodontal Res.*, **44**, 13-20, 2009.
- 11) Hynes, R. O.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673-687, 2002.
- 12) Takada, Y., Ye, X. and Simon, S.: The integrins. *Genome Biol.*, **8**, 215-223, 2007.
- 13) Gräber, H. G., Conrads, G., Wilharm, J. and Lampert, F.: Role of interactions between integrins and extracellular matrix components in healthy epithelial tissue and establishment of a long junctional epithelium during periodontal wound healing: a review. *J. Periodontol.*, **70**, 1511-1522, 1999.
- 14) De Arcangelis, A. and Georges-Labouesse, E.: Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet.*, **16**, 389-395, 2000.

- 15) Larjava, H., Koivisto, L., Häkkinen, L. and Heino, J.: Epithelial integrins with special reference to oral epithelia. *J. Dent. Res.*, **90**, 1367-1376, 2011.
- 16) Fujita, T., Kishimoto, A., Shiba, H., Hayashida, K., Kajiya, M., Uchida, Y., Matsuda, S., Takeda, K., Ouhara, K., Kawaguchi, H., Abiko, Y. and Kurihara, H.: Irsogladine maleate regulates neutrophil migration and E-cadherin expression in gingival epithelium stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Biochem. Pharmacol.*, **79**, 1496-1505, 2010.
- 17) Kiley, P. and Holt, S. C.: Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect. Immun.*, **30**, 862-873, 1980.
- 18) Lally, E. T., Kieba, I. R., Demuth, D. R., Rosenbloom, J., Golub, E. E., Taichman, N. S. and Gibson, C. W.: Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 256-262, 1989.
- 19) Sugai, M., Kawamoto, T., Pérès, S. Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., Kurihara, H., Suginaka, H. and Oswald, E.: The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.*, **66**, 508-5019, 1998.

- 20) Asakawa, R., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Yamada, S., Goncalves, R. B., Izumi, S., Fujiwara, T., Nakano, Y., Suzuki, N., Uchida, Y., Ouhara, K., Shiba, H., Taubman, M. A., Kurihara, H. and Sugai, M.: Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol. Microbiol.*, **50**, 1125-1139, 2003.
- 21) Meyer, D. H., Sreenivasan, P. K. and Fives-Taylor, P. M.: Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.*, **59**, 2719-2726, 1991.
- 22) Fine, D. H., Kaplan, J. B., Kachlany, S. C. and Schreiner, H. C.: How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontol.* **2000**, **42**, 114-157, 2006.
- 23) Han, Y. W., Shi, W., Huang, G. T., Kinder, Haake, S., Park, N. H., Kuramitsu, H. and Genco, R. J.: Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.*, **68**, 3140-3146, 2000.
- 24) Fujita, T., Yumoto, H., Shiba, H., Ouhara, K., Miyagawa, T., Nagahara, T., Matsuda, S., Kawaguchi, H., Matsuo, T., Murakami, S. and Kurihara, H.: Irsogladine maleate

- regulates epithelial barrier function in tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated human gingival epithelial cells. *J. Periodontal Res.*, 47, 55-61, 2012.
- 25) Wong, S. Y., Seol, A. D., So, P. L., Ermilov, A. N., Bichakjian, C. K., Epstein, E. H. Jr., Dlugosz, A. A. and Reiter, J. F.: Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nat. Med.*, 15, 1055-1061, 2009.
- 26) Wang, D., Kawashima, Y., Nagasawa, T., Takeuchi, Y., Kojima, T., Umeda, M., Oda, S., and Ishikawa, I.: Elevated serum IgG titer and avidity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype c in Japanese periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.*, 20, 172-179, 2005.
- 27) Kwok, T., Zabler, D., Urman, S., Rohde, M., Hartig, R., Wessler, S., Misselwitz, R., Berger, J., Sewald, N., König, W. and Backert, S.: *Helicobacter exploits* integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, 449, 862-866, 2007.
- 28) Margadant, C., Raymond, K., Kreft, M., Sachs, N., Janssen, H. and Sonnenberg, A.: Integrin  $\alpha 3\beta 1$  inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *J. Cell. Sci.*, 122, 278-288, 2009.

- 29) Ogura, N., Akutsu, M., Tobe, M., Sakamaki, H., Abiko, Y. and Kondoh, T.: Microarray analysis of IL-1 $\beta$ -stimulated chemokine genes in synovial fibroblasts from human TMJ. *J. Oral. Pathol. Med.*, **36**, 223-228, 2007.
- 30) Sugisawa, M., Masaoka, T., Enokiya, Y., Muramatsu, T., Hashimoto, S., Yamada, S. and Shimono, M.: Expression and function of laminin and integrins on adhesion/migration of primary culture cells derived from rat oral epithelium. *J. Periodontal Res.*, **45**, 284-291, 2010.
- 31) Suga, T., Mitani, A., Mogi, M., Kikuchi, T., Fujimura, T., Takeda, H., Hishikawa, T., Yamamoto, G., Hayashi, J., Ishihara, Y. and Noguchi, T.: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulated epithelial cells produce interleukin-15 that regulates T cell activation. *Arch. Oral Biol.*, **58**, 1541-1548, 2013.
- 32) Kishimoto, A., Fujita, T., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Takeda, K., Kajiya, M., Hayashida, K., Kawaguchi, H. and Kurihara H.: Irsogladine maleate abolishes the increase in interleukin-8 levels caused by outer membrane protein 29 from *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* through the ERK pathway in human gingival epithelial cells. *J. Periodontal Res.*, **43**, 508-513, 2008.

- 33) Zeng, H. and Davis, C. D.: Down-regulation of proliferating cell nuclear antigen gene expression occurs during cell cycle arrest induced by human fecal water in colonic HT-29 cells. *J. Nutr.*, **133**, 2682-2687, 2003.
- 34) Grenache, D. G., Zhang, Z., Wells, L. E., Santoro, S. A., Davidson, J. M. and Zutter, M. M.: Wound healing in the  $\alpha 2\beta 1$  integrin-deficient mouse: altered keratinocyte biology and dysregulated matrix metalloproteinase expression. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 455-466, 2007.
- 35) Ghannad, F., Nica, D., Fulle, M. I., Grenier, D., Putnins, E. E., Johnston, S., Eslami, A., Koivisto, L., Jiang, G., McKee, M. D., Häkkinen, L. and Larjava, H.: Absence of  $\alpha v\beta 6$  integrin is linked to initiation and progression of periodontal disease. *Am. J. Pathol.*, **172**, 1271-1286, 2008.
- 36) 本郷昌一 : Smad2 による歯肉上皮細胞と細胞外基質の接着促進に関する研究.  
岡山歯誌, **32**, 学位論文 (Thesis), 2013.
- 37) Liu, Z., Kobayashi, K., van, Dinther, M., van, Heiningen, S. H., Valdimarsdottir, G., van, Laar, T., Scharpfenecker, M., Löwik, C. W., Goumans, M. J., Ten, Dijke, P. and Pardali, E.: VEGF and inhibitors of TGF $\beta$  type-I receptor kinase synergistically promote blood-

- vessel formation by inducing  $\alpha 5$ -integrin expression. *J. Cell. Sci.*, **122**, 3294-3302, 2009.
- 38) Xu, J. K., Chen, H. J., Li, X. D., Huang, Z. L., Xu, H., Yang, H. L. and Hu, J.: Optimal intensity shock wave promotes the adhesion and migration of rat osteoblasts via integrin  $\beta 1$ -mediated expression of phosphorylated focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.*, **287**, 26200-26212, 2012.
- 39) Tsuda, K., Furuta, N., Inaba, H., Kawai, S., Hanada, K., Yoshimori, T., and Amano, A.: Functional analysis of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicles. *Cell Struct. Funct.*, **33**, 123-132, 2008.
- 40) Rizzo, A., Losacco, A. and Carratelli, C. R.: *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human  $\beta$ -defensins 2 and 3. *Immunol. Lett.*, **156**, 2013.
- 41) Waerhaug, J.: Healing of the dento-epithelial junction following subgingival plaque control. I. As observed in human biopsy material. *J. Periodontol.*, **49**, 1-8, 1978.

## 表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座

歯周病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 135 回日本歯科保存学会秋季大会 (2011 年 10 月, 大阪)

第 136 回日本歯科保存学会春季大会 (2012 年 6 月, 大阪)

第 91 回 International Association for Dental Research (2013 年 3 月, シアトル, アメリ

カ合衆国)

第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会 (2013 年 9 月, 群馬)

## 図の説明

### 図 1. IHGE 細胞と AaY4 の共培養時における細胞接着能の変化

陰性対照群と共培養群の細胞を播種し、24 時間後の付着細胞数を測定した。

1 回 (n=8) の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。陰性対照群の細胞数を基準 (=1) とした比を算出した。\* :  $p < 0.05$ , ANOVA および Scheffe's test

### 図 2. IHGE 細胞と AaY4 の共培養時におけるサイトカイン, 増殖関連因子, インテグリン, および ECM 関連遺伝子の発現変化

陰性対照群と共培養群の全 RNA を回収して、リアルタイム RT-PCR 法によって定量した。A) *IL-8*, B) *PCNA*, C) *INTEGRIN*  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$ , および  $\beta 6$ , D) *LAMININ*  $\alpha 1$ ,  $\gamma 2$ , *FIBRONECTIN 1*, および *TENASCIN C* をそれぞれの発現量を示す。

1 回 (n=3) の実験結果の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。すべての発現量は、内部対照の *GAPDH* の発現量で補正し、陰性対照群の発現量を基準 (=1) とした比を算出した。\* :  $p < 0.05$ , ANOVA および Scheffe's test

### 図 3. 共培養後に AaY4 を除去した時の細胞接着能の変化

陰性対照群，共培養群，および Aa 除去群の細胞を再播種し，24 時間後の付着細胞数を測定した。

1 回 (n=8) の実験結果の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す。陰性対照群の細胞数を基準 (=1) とした比を算出した。PS: 共培養後の Aa の除去。 \* :  $p < 0.05$ , ANOVA および Scheffe's test

### 図 4. 共培養後に AaY4 を除去した時のサイトカイン，増殖関連因子，インテグリン，および ECM 関連遺伝子の発現変化

陰性対照群，共培養群，および Aa 除去群から全 RNA を回収して，リアルタイム RT-PCR 法によって定量した。A) *IL-8*, B) *PCNA*, C) *INTEGRIN*  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$ , および  $\beta 6$ , D) *LAMININ*  $\alpha 1$ ,  $\gamma 2$ , *FIBRONECTIN 1*, および *TENASCIN C* をそれぞれの発現量を示す。

1 回 (n=3) の実験結果の平均値を示し，エラーバーは標準偏差を示す。すべての発現量は，内部対照の *GAPDH* の発現量で補正し，陰性対照群の発現量を基準 (=1) とした比を算出した。PS: 共培養後の Aa の除去。 \* :  $p < 0.05$ , ANOVA および Scheffe's test

## 図 5. 共培養後に AaY4 を除去した時の INTEGRIN の局在の変化

陰性対照群, 共培養群, および Aa 除去群に各 INTEGRIN に対する特異抗体と DAPI を用いて蛍光免疫染色を行い, Cellomics ArrayScan<sup>®</sup> VTI を用いて観察した。  
抗 INTEGRIN  $\beta$ 4 抗体 (緑色) と DAPI (青色) (A) あるいは抗 INTEGRIN  $\alpha$ 5 抗体 (緑色) と DAPI (青色) (B) を用いた結果を示す。

1 回 (n=3) の培養-染色系の代表例を示し, スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。

## 図 6. INTEGRIN $\alpha$ 5 阻害における IHGE 細胞と AaY4 の共培養による細胞接着の変化

陰性対照群, 共培養群, INTEGRIN  $\alpha$ 5 阻害群, および INTEGRIN  $\alpha$ 5 阻害共培養群の細胞を回収, 再播種し, 24 時間後の付着細胞数を測定した。

1 回 (n=8) の実験結果の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。陰性対照群の細胞数を基準 (=1) とした比を算出した。\* :  $p < 0.05$ , ANOVA および Scheffe's

test

## 図 7. INTEGRIN $\alpha 5$ 阻害における IHGE 細胞と AaY4 の共培養によるサイトカイ

ン, 増殖関連因子, インテグリン, および ECM 関連遺伝子の発現変化

陰性対照群, 共培養群, INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害群, および INTEGRIN  $\alpha 5$  阻害共培養群の全 RNA を回収して, リアルタイム RT-PCR 法によって定量した。A) *IL-8*, B) *PCNA*, C) *INTEGRIN  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 4$ , および  $\beta 6$* , D) *LAMININ  $\alpha 1$ ,  $\gamma 2$ , FIBRONECTIN 1*, および *TENASCIN C* の それぞれの発現量を示す。

1 回 (n=3) の実験結果の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。すべての発現量は, 内部対照の *GAPDH* の発現量で補正し, 陰性対照群の発現量を基準 (=1) とした比を算出した。\* :  $p < 0.05$ , ANOVA および Scheffe's test

## 図 8. 歯周病原細菌による刺激時の歯面と接合上皮の接着時に起こると考えられる反応

歯周病原細菌の抗原刺激に対して, INTEGRIN  $\alpha 5$  のシグナル伝達から他の INTEGRIN と ECM の発現減少が起こる。IL-8 の発現増加と PCNA の発現減少はこの経路を介さず, 好中球の遊走, ターンオーバーの抑制, および細胞接着能の低下が起こり, 歯面と接合上皮の接着の破壊が起こる。

表1. リアルタイムRT-PCR法で用いたプライマー

標的遺伝子	プライマーの塩基配列	増幅産物 (bp)
<i>GAPDH</i>	F : 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT- 3' R : 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG- 3'	185
<i>IL-8</i>	F : 5' -GTGCAGTTTTTGCCAAGGAGT- 3' R : 5' -AATTTCTGTGTTGGCGCAGT- 3'	134
<i>PCNA</i>	F : 5' -GAAGCACCAAACCAGGAGAA- 3' R : 5' -TCACTCCGTCTTTTGCACAG- 3'	193
<i>INTEGRIN α2</i>	F : 5' -GGGCATTGAAAACACTCGAT- 3' R : 5' -TCGGATCCCAAGATTTTCTG- 3'	183
<i>INTEGRIN α3</i>	F : 5' -GCCTGCCAAGCTAATGAGAC- 3' R : 5' -CACCAGCAGAGTGAGGATCA- 3'	192
<i>INTEGRIN α5</i>	F : 5' -AGCCTCAGAAGGAGGAGGAC- 3' R : 5' -GGTTAATGGGGTGATTGGTG- 3'	186
<i>INTEGRIN β4</i>	F : 5' -TGGAAGTACTGTGCCTGCTG- 3' R : 5' -TGCATGTTGTTGGTGACCTT- 3'	200
<i>INTEGRIN β6</i>	F : 5' -CTCTTTCCAGTGTGGGGTGT- 3' R : 5' -CTGGCAATAAGGCCCATAAA- 3'	199
<i>LAMININ α1</i>	F : 5' -AGCGGATATGCAGCTCTTGT- 3' R : 5' -GTTATCCTGCCAGCACCATT- 3'	191
<i>LAMININ γ2</i>	F : 5' -GTCACTGGAGAACGCTGTGA- 3' R : 5' -AGACCCATTTCGTTGGACAG- 3'	198
<i>FIBRONECTIN 1</i>	F : 5' -TGTTTCGTGCAGCTGTTTACC- 3' R : 5' -GCCACCGTAAGTCTGGGTTA- 3'	196
<i>TENASCIN C</i>	F : 5' -GGTACAGTGGGACAGCAGGT- 3' R : 5' -GTTAACGCCCTGACTGTGGT- 3'	191

プライマーの塩基配列および増幅産物のサイズを示す。F, Forward ; R, Reverse

表2 Aaの感染時と感染除去時のインテグリン発現変化

INTEGRIN	共培養 (Aa感染)	感染除去 (抗菌剤処理)
$\alpha 5$	▲	▼
$\alpha 2$	▽	→
$\alpha 3$	▽	→
$\beta 4$	▼	→
$\beta 6$	▽	→

↑:発現が増加, ↓:発現が減少, →:発現に変化なし  
 黒色:遺伝子と蛋白のレベル, 白色:遺伝子レベルのみ

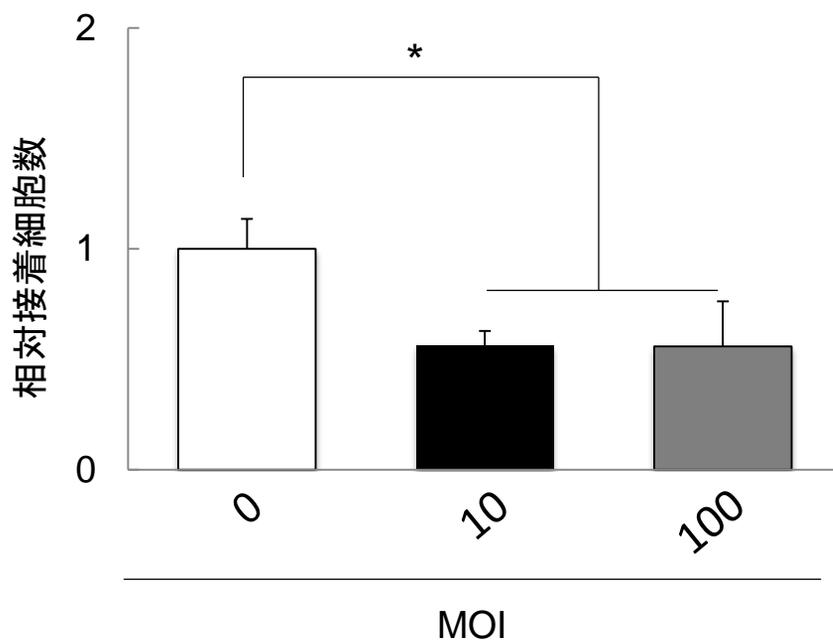


図1  
高知信介

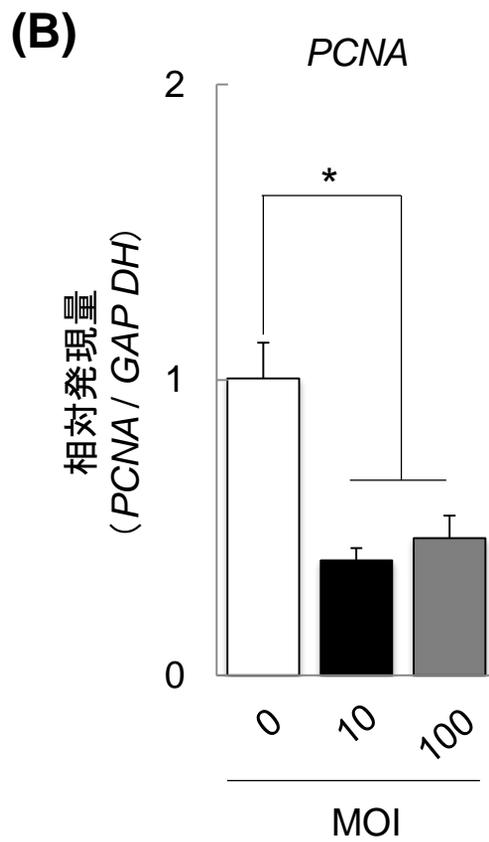
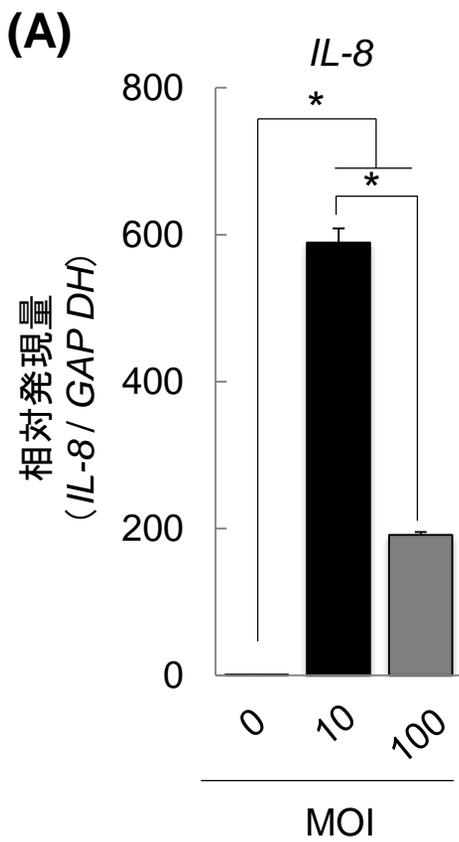
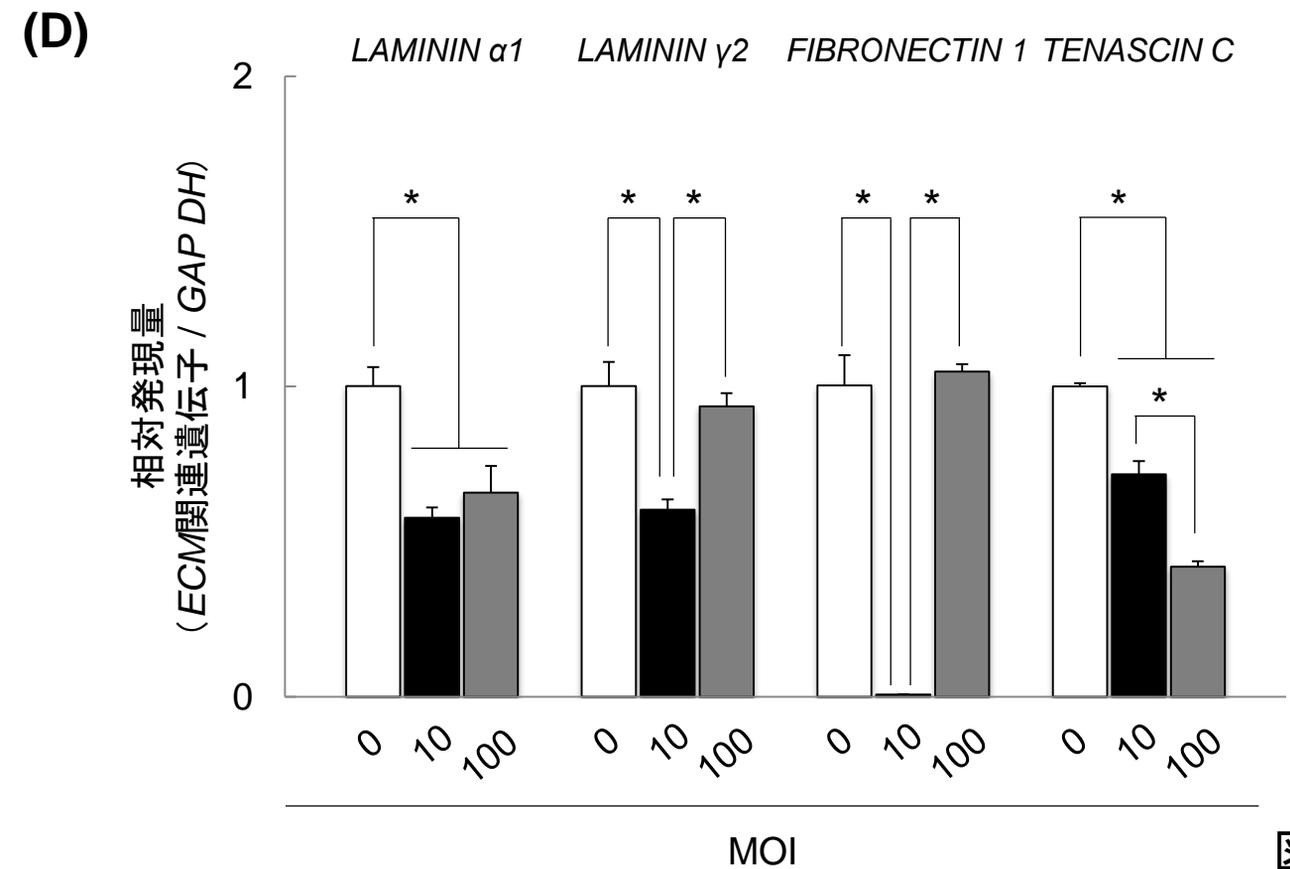
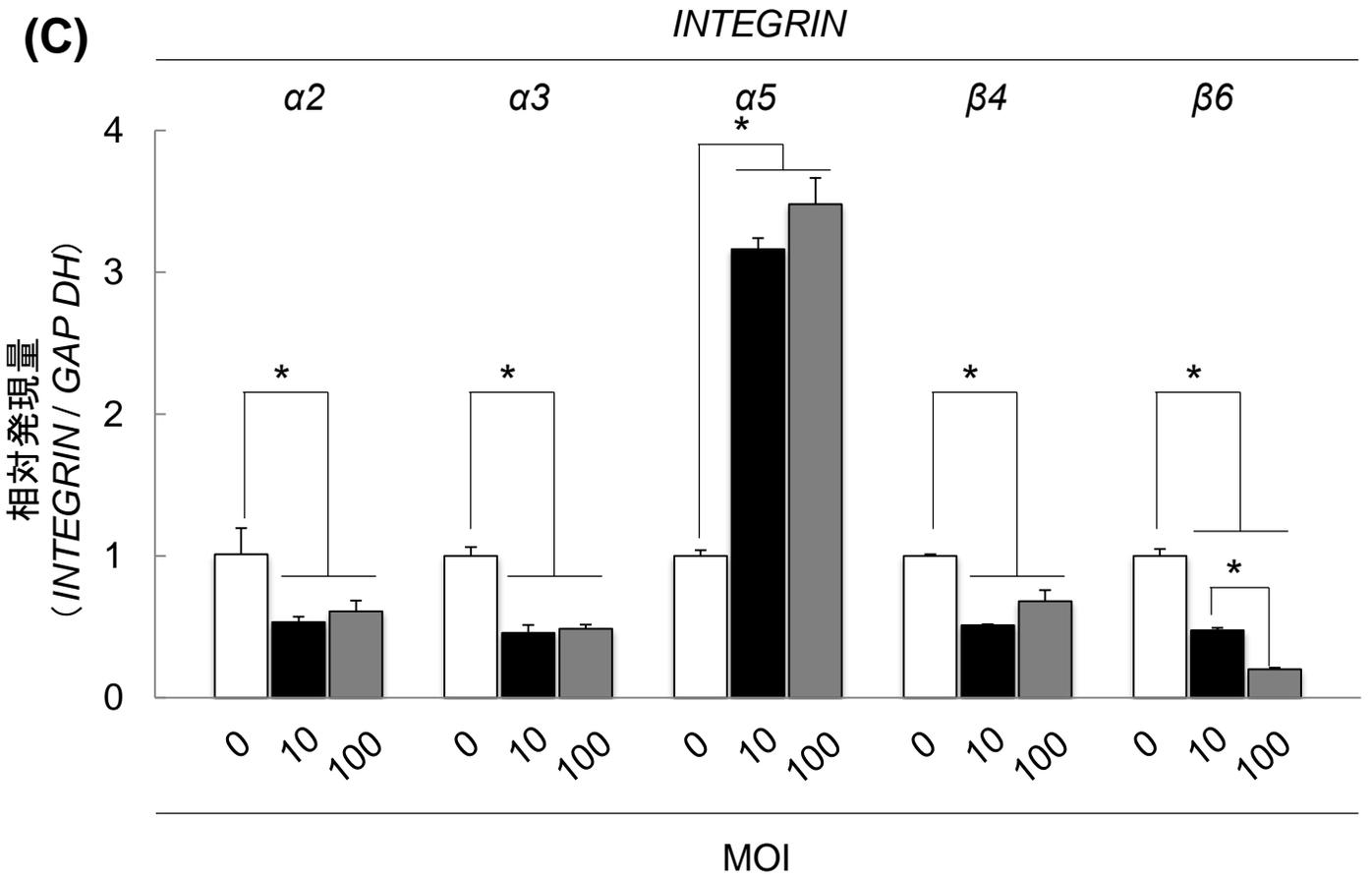


図2  
高知信介



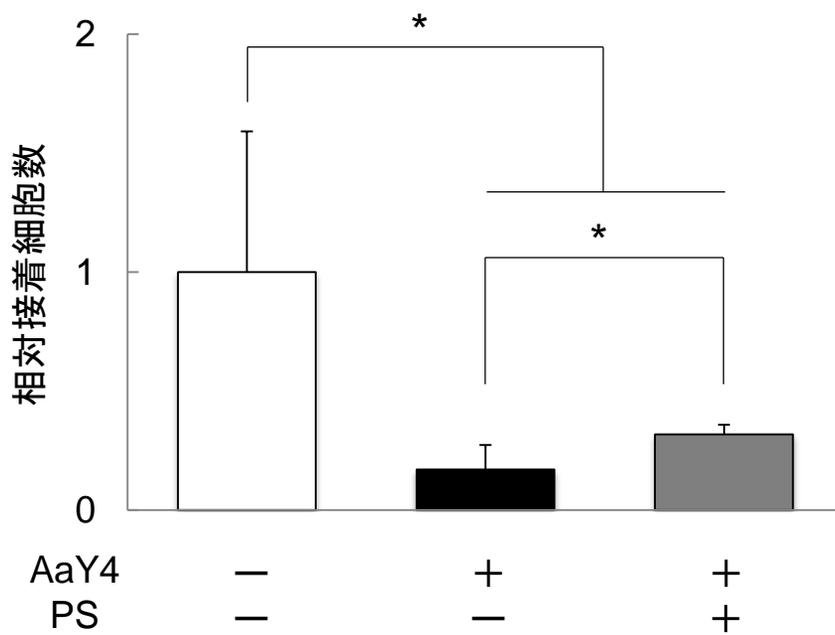


図3  
高知信介

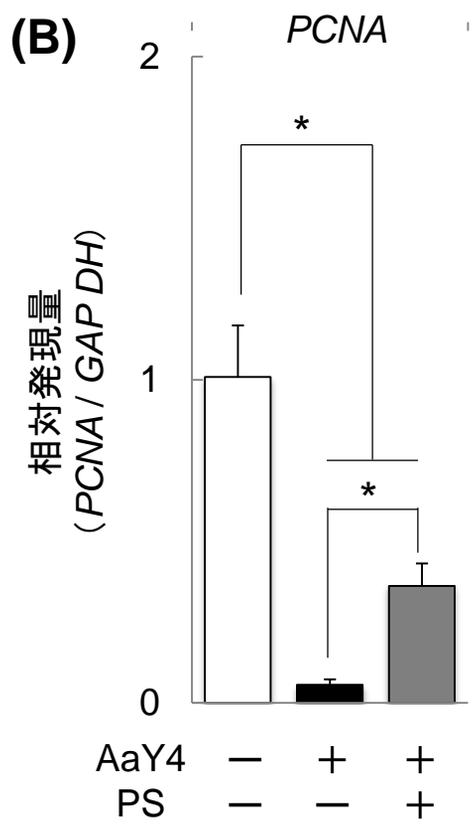
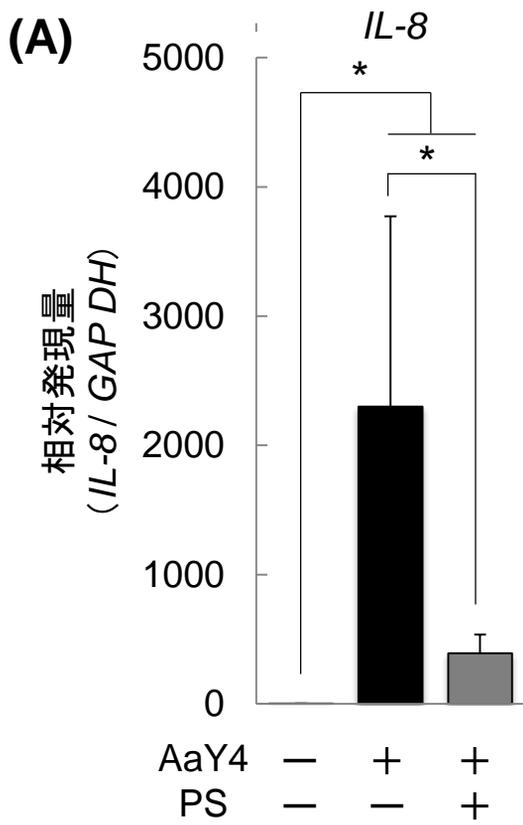
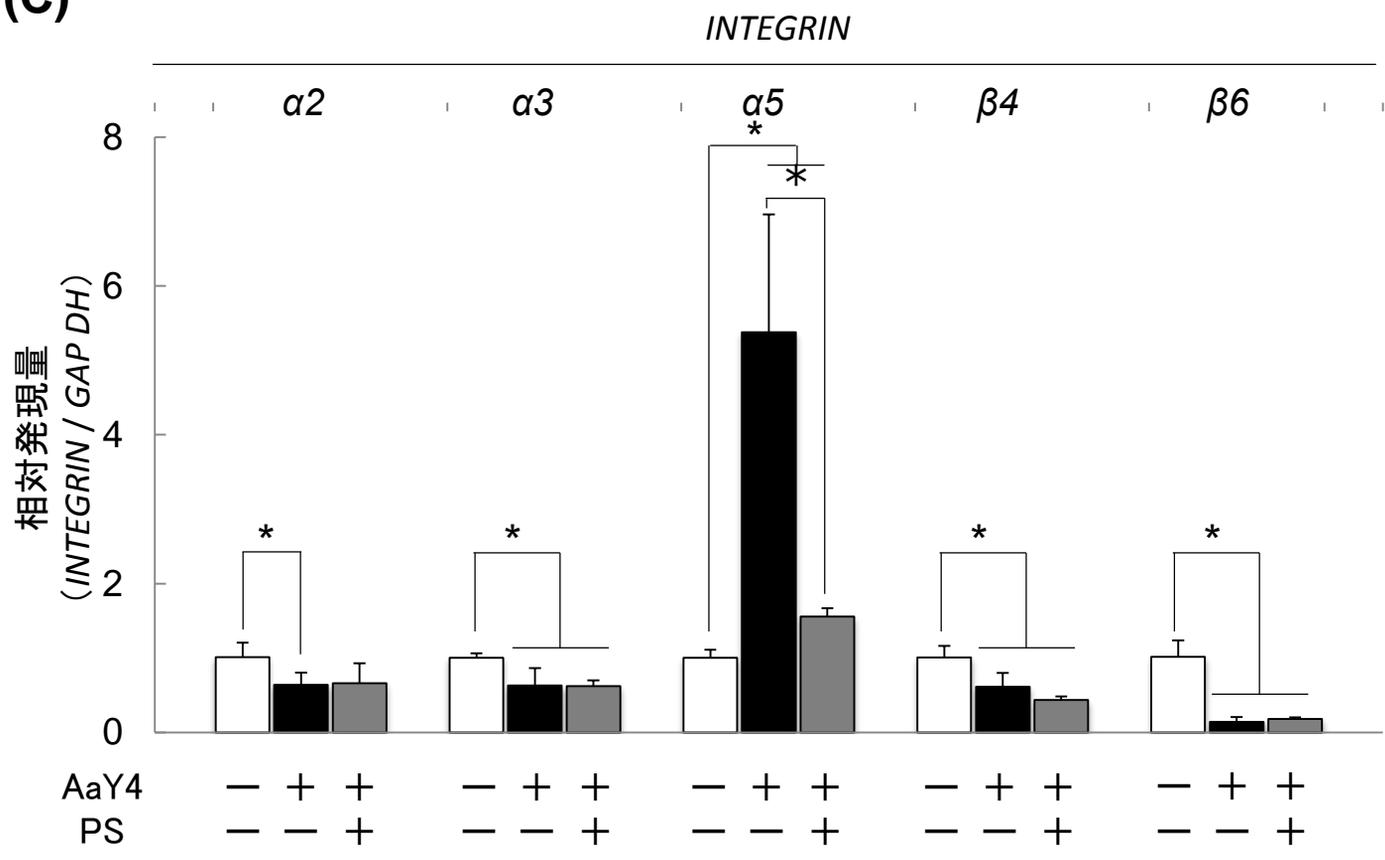


図4  
高知信介

(C)



(D)

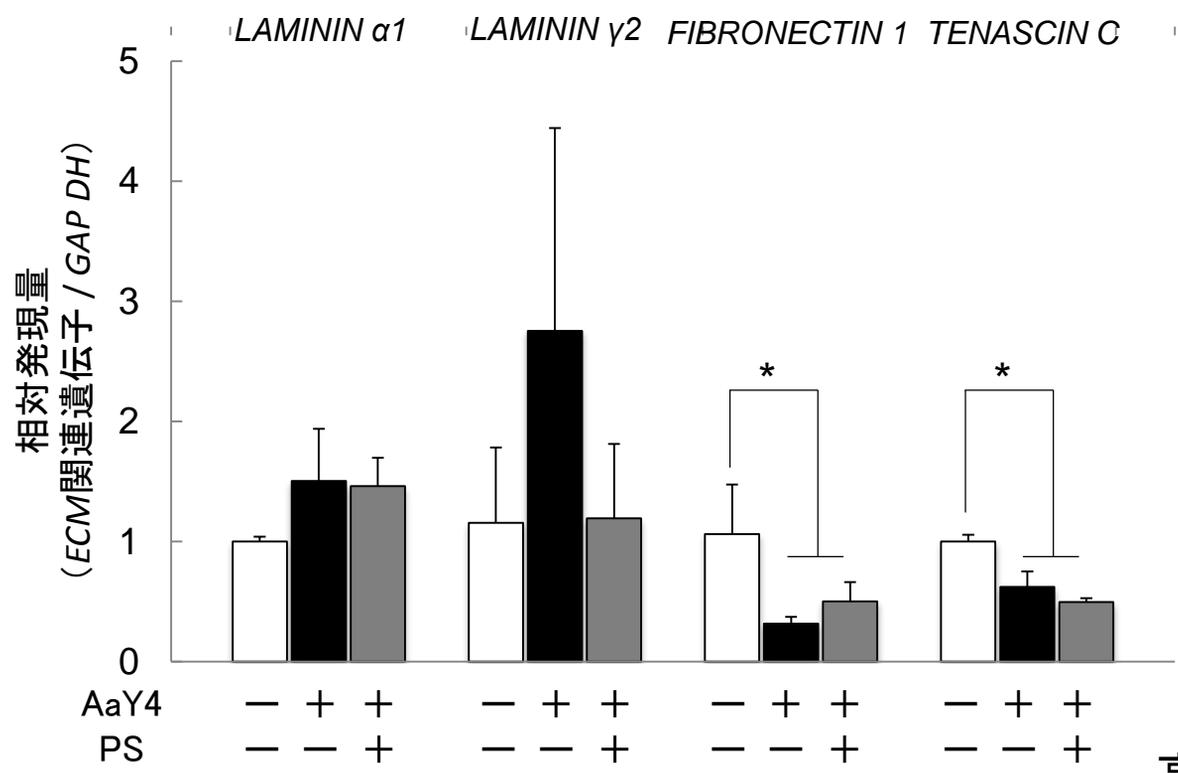


図4  
高知信介

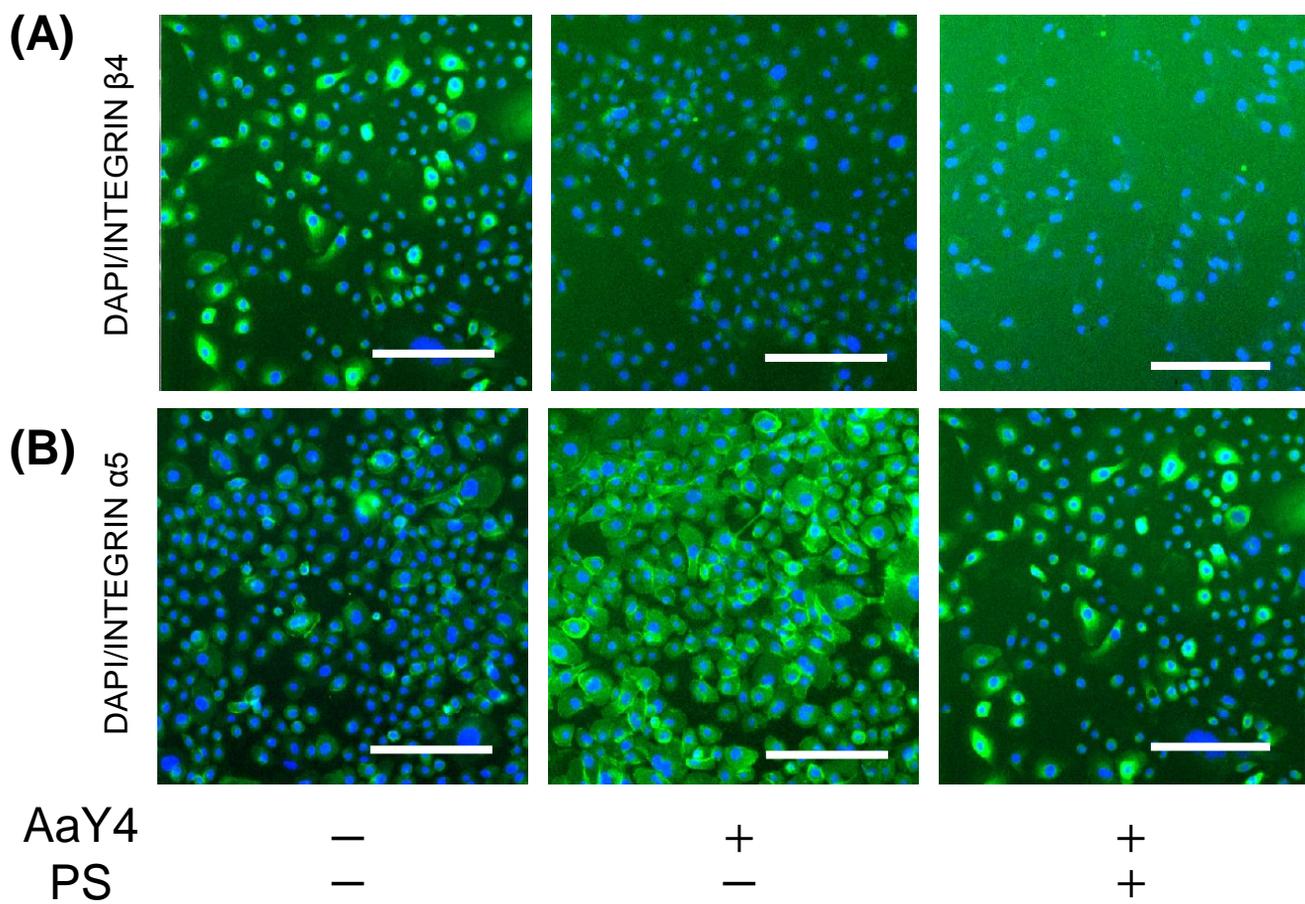


図5  
高知信介

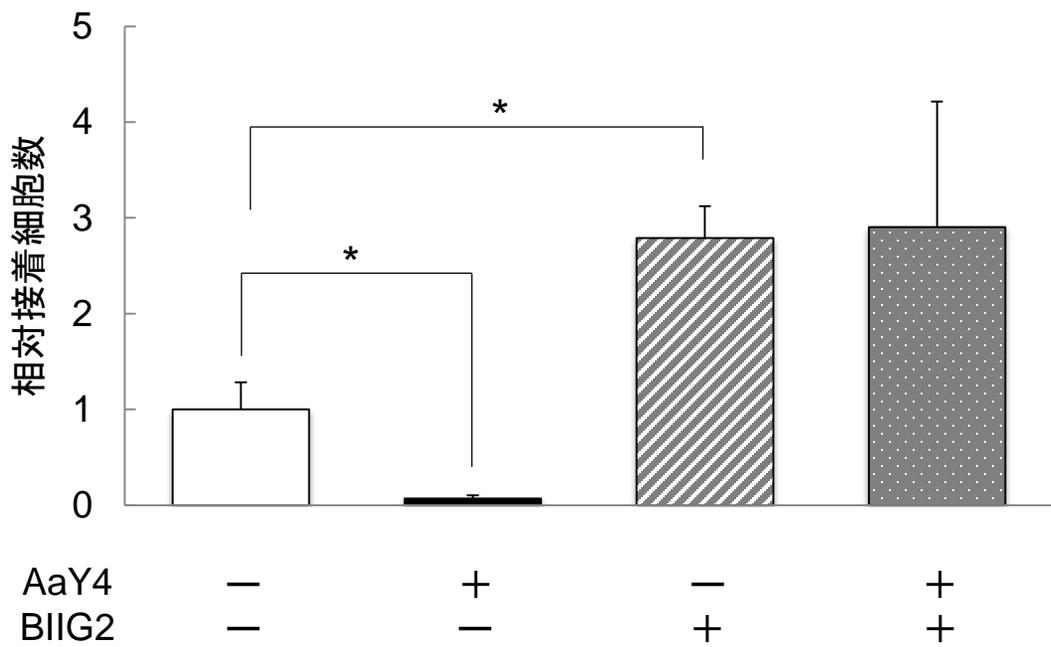
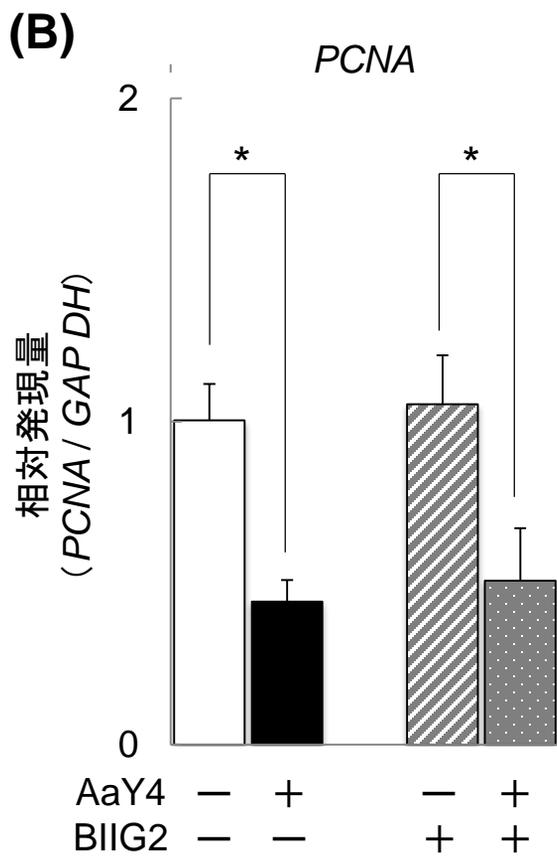
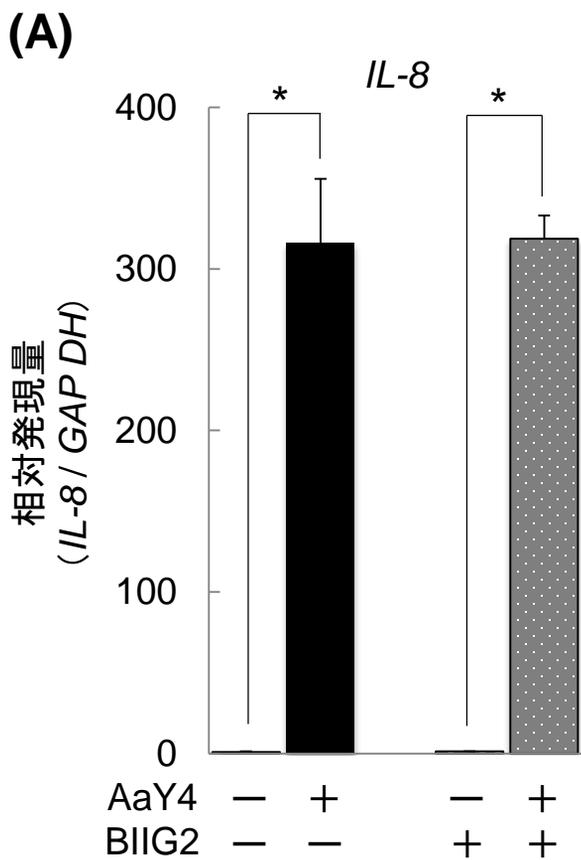
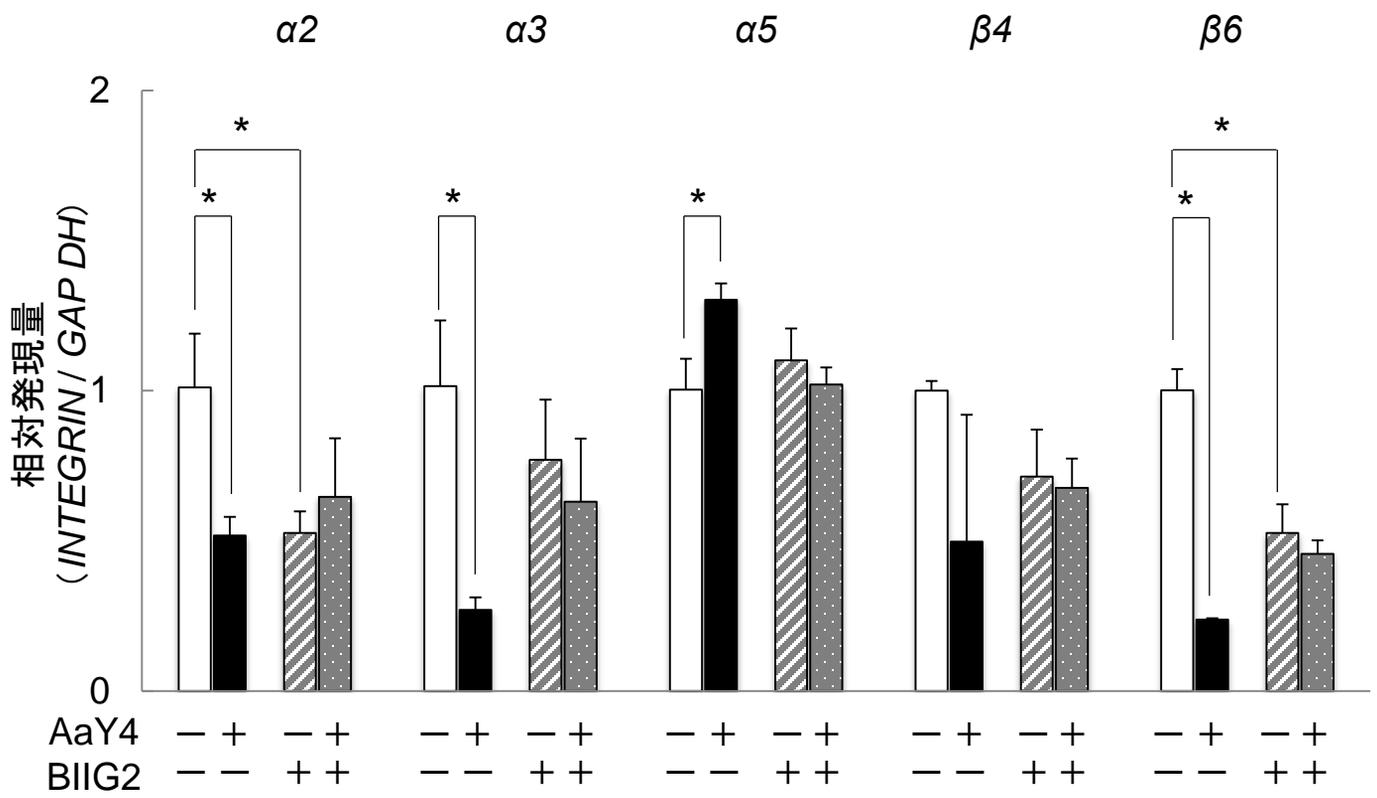


図6  
高知信介



(C)

INTEGRIN



(D)

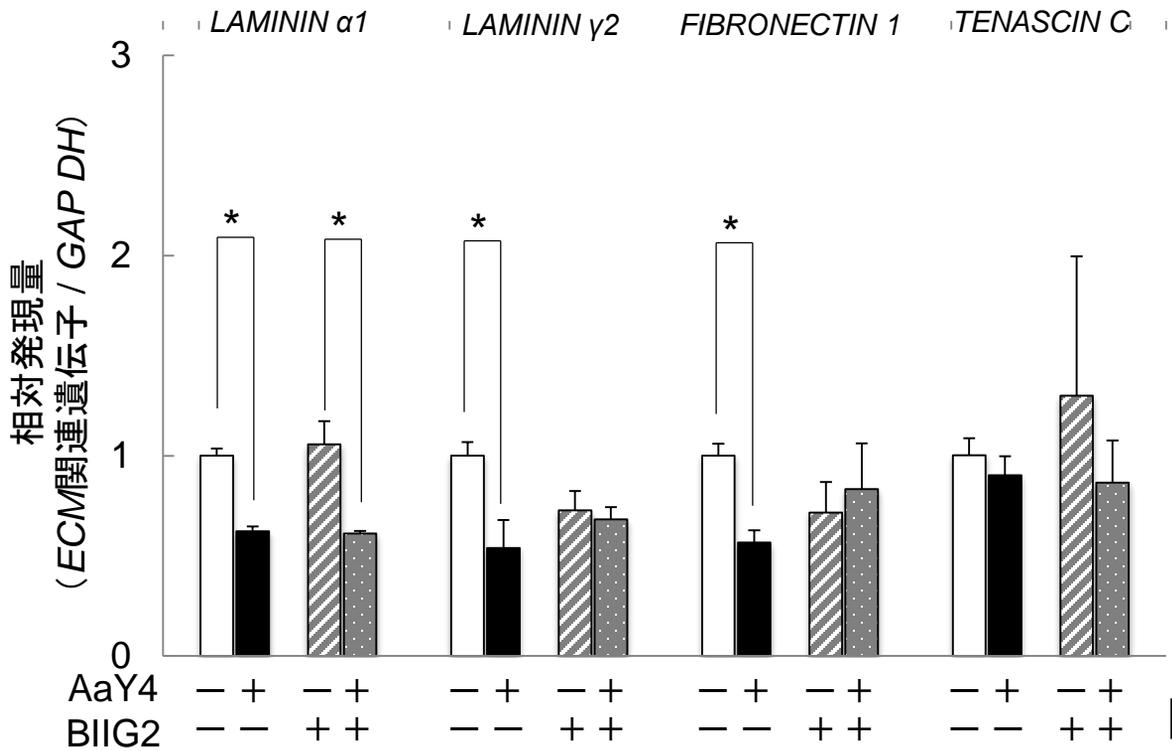


図7

高知信介

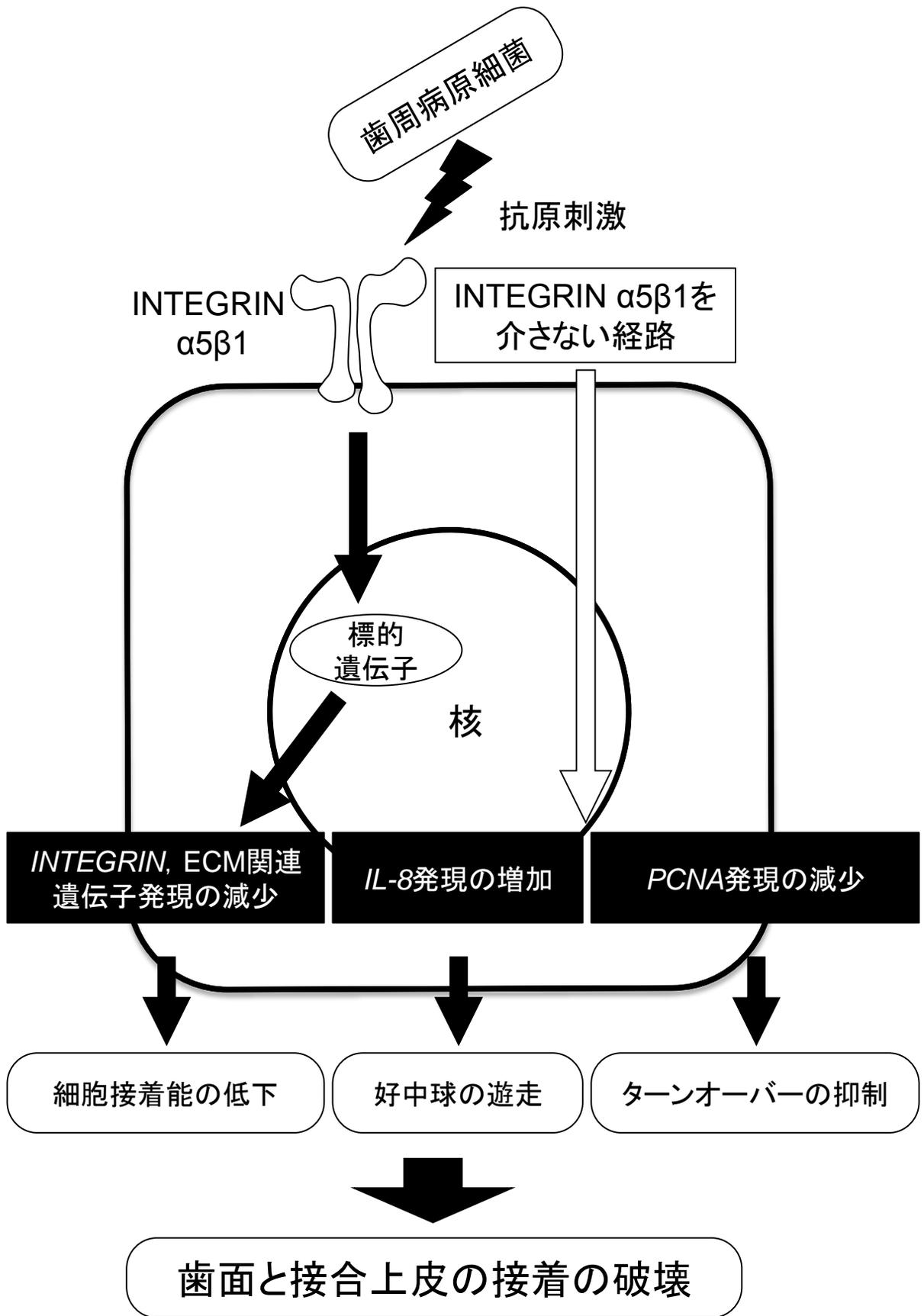


図8  
高知信介