

研究者：山賀 俊介

(所属：大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座 (予防歯科学教室))

研究題目：歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の感染による歯肉上皮バリアの破綻機構の解析

目的：

歯肉内縁上皮は、細菌と宿主が最初に遭遇する場であり、歯周病発症に重要な役割を果たすと考えられる。一般的に、上皮は細菌感染に対するバリア機能をもつことが知られている。一方、歯周病菌 *P. gingivalis* の感染による歯肉上皮バリア機能の破綻機構については、不明な点が多い。以前の研究で上皮細胞のバリア機能を担うタンパク質群のひとつとして知られる junctional adhesion molecule 1 (JAM-1) が歯肉上皮細胞で発現し、*P. gingivalis* 感染により JAM1 が分解されることが示唆されている (Takeuchi *et al.*, PLoS Pathog, 2019)。そこで今回 JAM-1 と類似したアミノ酸配列を持つ JAM ファミリータンパク質 (JAM1, JAM2, JAM3, JAM4, CD2, CLMP, ESAM, CXADR) に焦点を当て、歯肉上皮細胞における役割および *P. gingivalis* 感染による JAM ファミリータンパク質への影響を調べた。

対象および方法：

ヒト不死化歯肉上皮細胞 (IHGE 細胞：Murakami S. *et al.*, J Dent Res, 2002) は、Humedia KG-2 (Kurabo) で培養した。標的とするタンパク質の中から歯肉上皮細胞で発現しているものを調べるため、歯肉上皮細胞の cDNA を鋳型とした逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 Reverse Transcription PCR (RT-PCR) を行った。RNA は TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を用いて IHGE 細胞から抽出した。cDNA は iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) にて合成した。ヒト歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* ATCC 33277 株または KDP136 株 (ジンジパイン欠失株) を感染させ、以下の項目を比較した。

- ① ウェスタンブロット法：タイトジャンクション関連タンパク質の量
- ② 免疫組織染色：タイトジャンクション関連タンパク質の細胞内局在
- ③ 標的タンパクをノックダウンした歯肉上皮細胞の透過性

ウェスタンブロット法では、一次抗体に mouse monoclonal anti-JAM1 抗体 (SAB4200468, Sigma-Aldrich), rabbit monoclonal anti-JAM2 抗体 (12972-1-AP, Cell Signaling Technology), rabbit monoclonal anti-CXADR 抗体 (10799-R271, Cell Signaling Technology), rabbit monoclonal anti-CLMP 抗体 (16127-1-AP, Cell Signaling Technology) および mouse monoclonal anti- β -Actin 抗体 (A2228, Sigma-Aldrich) を使用した。二次抗体に、Goat anti-mouse 抗体 (7076, Cell Signaling Technology) および Goat anti-rabbit 抗体 (7074, Signaling Technology) を使用した。発現したタンパク質量は、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific), ChemiDoc XRS (Bio-Rad) および Quantity One software package (Bio-Rad) で解析した。

免疫組織染色には、rabbit monoclonal anti-CXADR 抗体 (10799-R271, Cell Signaling Technology), Alexa Fluor 635-conjugated secondary 抗体 (goat anti-rabbit IgG, A-31576,

Invitrogen) および 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 抗体 (D1306, Invitrogen) を用いた。細胞像は共焦点顕微鏡 (TCS SP8; Leica Microsystems) および Leica Application Suite X (LAS X, Leica Microsystems) で解析した。

細胞透過性実験では firefly Luciferase (Luc), JAM1, CXADR, CLMP に対する shRNA (pSINsi-hU6, 3661, Takara) を安定発現させる歯肉上皮細胞を用いた。12 well cell culture inserts (353180; Corning) 上に培養した各種歯肉上皮細胞に 2% FITC-dextran (FD40, Sigma-Aldrich) を 20 μ l 入れ、30 分後に細胞を透過した量を 1420 ARVO X (PerkinElmer) および WorkOut Plus software (PerkinElmer) で解析した。

結果および考察：

まず、今回標的とするタンパク質の中から歯肉上皮細胞で発現しているものを調べるために、歯肉上皮細胞の cDNA を鋳型とした RT-PCR を行った。この結果、歯肉上皮細胞において *JAM-1*, *JAM-2*, *CLMP*、および *CXADR* の発現を認めた。

次に、歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* の野生株または、ジンジパイン欠失株を 1 時間感染させた後、ウェスタンブロット法によりタンパク質の発現量の変化を調べた。その結果、コントロールと比較し、*P. gingivalis* の野生株を感染させたものでは *JAM-1*, *CXADR*, *CLMP* で有意なタンパク量の減少を認めた、一方、ジンジパイン欠失株を感染させたものでは大きな差を認めなかった。

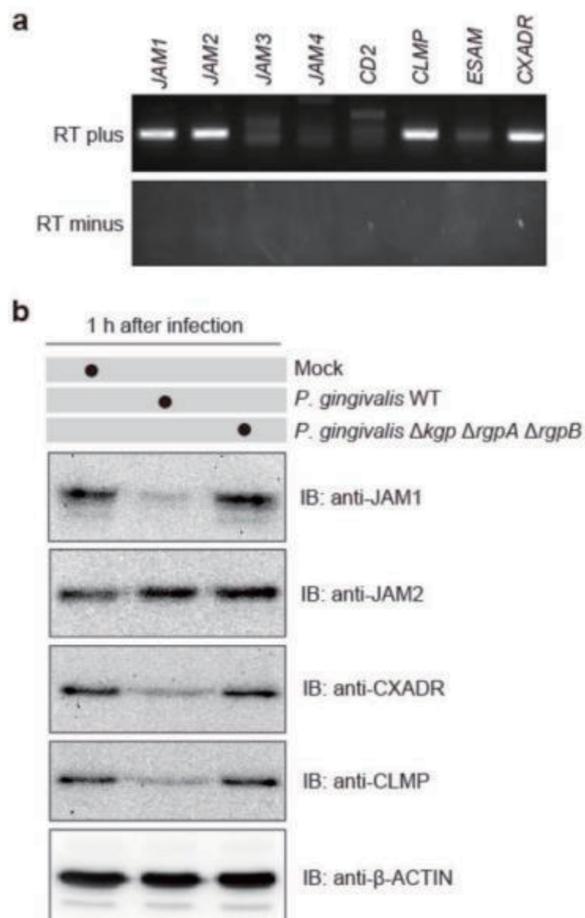


Figure 1 *P. gingivalis* gingipains degrade CXADR in IHGE cells.

- (a) Expression of *JAM1*, *JAM2*, *JAM3*, *JAM4*, *CD2*, *CLMP*, *ESAM*, and *CXADR* by IHGE cells analyzed by RT-PCR.
 (b) IHGE cells were infected with *P. gingivalis* WT or $\Delta kgs \Delta rgpA \Delta rgpB$ mutant at an MOI of 100 for 1 h. The cells were then analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. β -ACTIN was used as a loading control. RT, reverse transcription. IB, immunoblot.

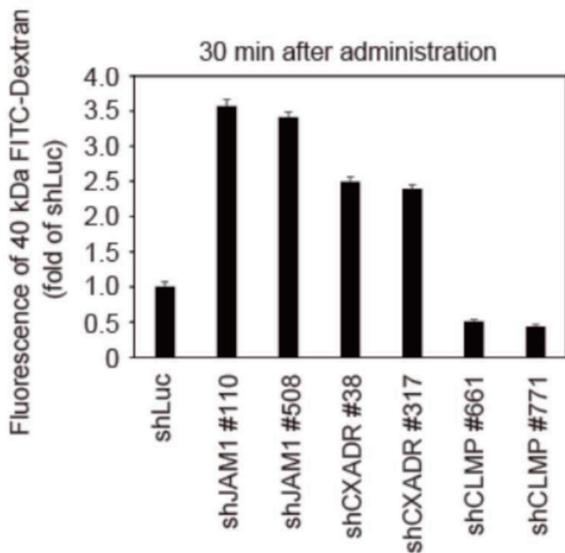


Figure 2 Loss of CXADR increased the epithelial barrier permeability. Permeability to 40 kDa FITC-dextran in IHGE cells expressing indicated shRNA. Results are expressed as fold change relative to cells expressing shLuc and are the means \pm SD of eight technical replicates.

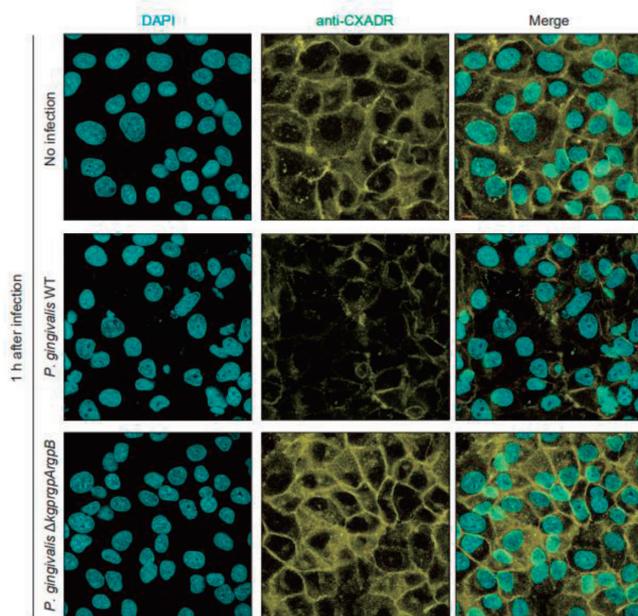


Figure 3 Degradation of CXADR in IHGE cells infected with *P. gingivalis* gingipains IHGE cells were infected with *P. gingivalis* WT or Δ kgp Δ rgpA Δ rgpB mutant at an MOI of 100 for 1 h. The cells were then fixed, stained with DAPI (cyan) and anti- CXADR (yellow), and analyzed by confocal microscopy. Scale bars, 10 μ m.

また、CXADR、CLMP をノックダウンした歯肉上皮細胞に、40kDa のデキストランを含む培地で培養し、30 分後に透過したデキストランの量を調べた。その結果、JAM1 または CXADR をノックダウンした歯肉上皮細胞は、コントロールと比較してデキストランの透過性が優位に亢進した。一方、CLMP をノックダウンした歯肉上皮細胞では 40kDa のデキストランに対する透過性の亢進を認めなかった。

さらに、歯肉上皮細胞内の CXADR を免疫染色し共焦点顕微鏡において局在の変化を調べた、歯肉上皮細胞に発現する CXADR は細胞膜に局在しているが、*P. gingivalis* 野生株を 1 時間感染させると、CXADR の細胞膜の局在が著しく減少した。一方、ジンジパイン欠失株を 1 時間感染させたものでは、CXADR の細胞膜への局在に大きな変化は認めなかった。

以上より *P. gingivalis* が産生するジンジパインは歯肉上皮細胞の CXADR を分解し、歯肉上皮バリアを破綻する可能性が示された。

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）
論文投稿中です。