
学位論文

歯周病変局所における上皮細胞間接着機構に関与する分子群の発現解析

米田 美穂

キーワード: 歯周病, 密着結合, クローデイン, 上皮細胞

The Analysis of Expression Pattern of Claudins Family, E-cadherin, JAM-A and Occludin in Periodontal Diseases

Miho YONEDA

Abstract: Tight junctions form the apical junctional complex in the epithelium and are essential for the tight sealing of cellular sheets. They are composed of three major integral membrane proteins, i.e., occludin, claudins, and junctional adhesion molecules. Expression patterns of claudins are tissue specific and most tissues express multiple claudins. The combination of claudin proteins is thought to determine the strength of the tight junctions of the tissue; however, the expression pattern of the claudin family in human gingival epithelium remains unclear. The aim of this study was to examine the expression pattern of the claudin family, E-cadherin, JAM-A and occludin, in chronic inflammatory lesions of gingival epithelium. Expression levels of mRNA in human gingival tissue from healthy gingivae and inflammation gingivae (probing depth > 6mm, sulcular bleeding on probing) were analyzed by RT-PCR. To determine the expression patterns of tight junction molecules *in situ*, claudin-10, E-cadherin and JAM-A was detected by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Sa3 (squamous carcinoma cell derived from human oral cancer) was cultured in the monolayer in the presence or absence of TNF- α and IL-13, and the expression of the claudin family and other TJ-related protein were detected by RT-PCR and flow cytometry. To confirm whether inflammatory cytokines, TNF- α and IL-13, affect the functional integrity of Sa3 cell layers, transepithelial electrical resistance (TER) and transepithelial cell permeability were measured.

RT-PCR analysis showed that claudin-1, -4, -7 and -12 were expressed but claudin-2, -6, -9 and -11 were not expressed in human normal gingival tissues. Of particular significance, the expression level of claudin-10 was increased in inflamed gingival tissues compared with normal gingival tissues. *In situ* hybridization and immunohistochemical analysis showed that claudin-10 expression was strongly detected in the basal layer of the epithelium in inflamed gingival tissues. In a monolayer culture of Sa3, TNF- α and IL-13 decreased the mRNA expression levels of E-cadherin, occludin and JAM-A in a dose-dependent manner, and increased those of claudin-2, 3, 4 and 8. In addition, TNF- α and IL-13 decreased TER and increased the transepithelial cell permeability of monolayer Sa3 cells.

These data suggest that periodontal inflammatory response induces claudin-10 expression and leads to modification of the function of gingival epithelium. This alteration in inflamed gingival tissues may contribute to the pathogenesis of periodontitis.

緒 言

歯周病変部では、プラーク中の歯周病関連細菌やそれらの細菌が産生する病原因子などが歯肉接合上皮を通過し、さらに結合組織に達すると、その局所に好中球、マクロファージ、ならびにリンパ球等の炎症性細胞が浸潤し、炎症反応および免疫応答が惹起され、病態が形成されると考えられている¹⁻⁵⁾。一般的に、歯周病関連細菌は、上皮細胞への侵入能が弱いため、病原因子は種々の外来刺激のバリアとなる上皮細胞を通過する必要がある。このように上皮組織から結合組織、さらには歯槽骨へと組織破壊が進行していく過程における歯周病変形成メカニズムを解明するには、歯周病関連細菌が上皮細胞に接触・付着することにより惹起される上皮細胞の透過性、すなわち歯周病関連細菌による上皮細胞間接着機構の変化を把握するという観点が重要と考えられる。

歯肉上皮組織では腸管や血管内皮の上皮組織と同様に上皮細胞間接着機構が存在する⁶⁾。細胞接着は、単に細胞同士の接着のみならず細胞の極性や増殖、運動等の様々な細胞機能に必須の役割を果たしているとともに、外来からの物質や病原微生物、アレルゲンなどの侵入を防ぐ生体の物理的バリアとして働いている⁷⁾。上皮細胞の細胞間接着機構として、タイトジャンクション（以下、TJと略す）とアドヘレンスジャンクション（以下、AJと略す）が中心的な役割を果たしている^{8,9)}。TJは上皮細胞に特異的な細胞接着装置であり、隣り合う細胞間の距離がほぼゼロになるまで細胞膜同士を近づけて、細胞間をシールしている¹⁰⁾。構造的には細胞膜タンパク質である claudin や occludin が TJ ストランドと呼ばれる細胞接着を形成し、細胞内で zonula occludens-1（以下、ZO-1と略す）と結合している（図1）¹¹⁻¹⁵⁾。TJに存在するタンパク質としては occludin が初めて同定されたが、occludin knockout マウスにおいて上皮の発達遅延、慢性炎症、胃上皮の増生や脳の石灰化が見られるものの、TJ ストランドは正常に形成されることから、

occludin は上皮のバリア機能に関与しないことが明らかにされた^{12,16,17)}。また、TJには新しい接着分子である Juncional Adherence Molecule（以下、JAMと略す）が局在している¹⁸⁻²¹⁾。AJは、一般的にTJのすぐ下方に存在し、上皮細胞の周りを帯状に取り囲んでいる。とくに上皮細胞に特有のタンパク質として知られる E-cadherin が AJ に必須の接着分子として機能しており、細胞間で結合している²²⁾。

TJの主要構成タンパク質である claudin は分子量約23 kDの4回膜貫通型タンパク質の接着分子であり、現在まで claudin には20種類を超えるサブタイプが知られている¹¹⁾。最近、上皮の種類ごとに異なる組み合わせの claudin が発現していることが明らかになり、この発現の違いにより上皮のバリアの多様性が説明できるのではないかと考えられている^{23,24)}。これまでに種々の claudin 遺伝子の knockout マウスが作り出され、claudin-1 knockout マウスは一見正常に生まれてくるが、24時間以内に皮膚からの水分の蒸発量が異常に多いために脱水に陥り、すべてが死に至ったという事実から、TJが実際に皮膚バリアに関与していることが初めて実証された²⁵⁾。また、血液脳関門などに関与して個体の生存に必須であることも実証された²⁶⁻³¹⁾。さらに、低マグネシウム血症、遺伝性難聴、魚鱗癬併発胆管炎といったヒト疾患に claudin 遺伝子の変異が関与していることが報告されている^{24,32,33)}。

歯周病変局所にはリンパ球など様々な免疫担当細胞が浸潤しているが、これらの免疫系細胞のみならず、歯周組織を構成している歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞もサイトカインネットワークを通じ、病態形成に関与しているものと考えられる。歯周病変は歯周病関連細菌が歯肉溝上皮に付着し、その細菌の産生する病原因子が上皮組織内に浸潤することにより始まると考えられる。事実、歯周病原細菌にさらされた歯肉上皮細胞はオートクラインやパラクラインによる種々の因子の影

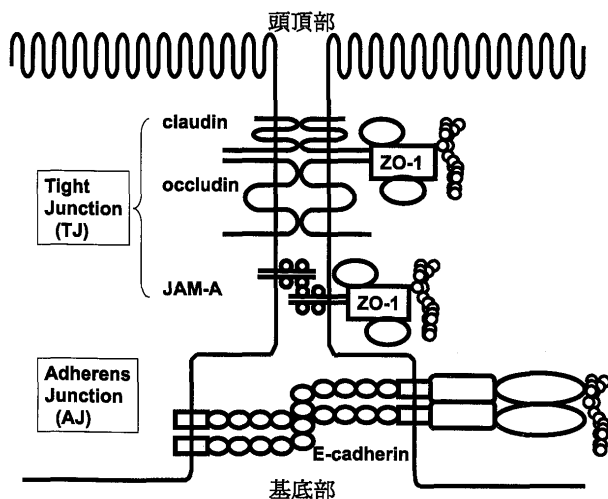


図1 上皮細胞間接着分子群の模式図

上皮細胞同士の細胞間接着部位では、頭頂部から基底側にかけて TJ と AJ の細胞間接着分子群が順番に並んで複合体を形成している。claudin, occludin および JAM-A のトランス結合により TJ が形成され、E-cadherin のトランス結合により AJ が形成される。claudin, occludin および JAM-A は ZO-1, 2, 3 を介して、E-cadherin は α -カテニン、 β -カテニン、 α -アクチニンおよびピンキュリンを介してアクチン骨格と連結している。

響を受け、炎症性サイトカインを産生して好中球の浸潤を惹起することが報告されている^{34, 35)}。しかしながら、歯肉上皮における病原因子の浸潤機構は不明な点が多い。そこで本研究では、細胞間の透過性に関与し TJ を構成している claudin family や JAM-A, AJ を構成している E-cadherin, それらの裏打ち構造である ZO-1 などに着目し、歯周病変局所におけるこれらの分子群の発現について検討した。すなわち、claudin family や occludin, JAM-A や ZO-1 の上皮細胞間接着分子群の歯周病患者の歯周組織における発現と局在を解析するとともに、培養したヒト歯肉上皮細胞を用いて、サイトカインが上皮細胞間接着分子群に及ぼす影響を解析することにより、歯周病の病態形成における上皮細胞間接着分子群の動態について検討した。

材料と方法

1. ヒト歯肉組織の採取

徳島大学附属病院歯科外来に来院し、基礎疾患がなく慢性歯周炎と診断された患者36名(男性20名, 女性16名, 平均年齢56.3歳)から歯周外科処置時に歯肉組織を採取し、これを炎症歯肉組織試料とした。炎症歯肉の基準として、プロービング深さが6 mm 以上、疾患感受性の臨床指標となるプロービング時の出血 (Bleeding On Probing ; BOP) が認められることを条件とした。また、基礎疾患がなく歯周病を有しない患者12名(男性3名, 女性9名, 平均年齢38.8歳)から埋伏智歯抜歯時に得られる炎症のほとんど認められない歯肉組織を採取し、これを臨床的健常歯肉組織試料とした。なお、本実験は徳島大学倫理委員会の認可を受けた上、研究内容が説明され、紙面での同意の得られた患者を被験者として実施された。

2. 細胞培養法

株化上皮細胞である Squamous cell carcinoma cells derived from human gingival cancer (以下 Sa3 と略す) は RIKEN Cell Bank (つくば) から購入した。培地は 10 % (容量/容量, 以下 v/v と略す) 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum : 以下 FBS と略す), 100 µg/ml ストレプトマイシン, 100 IU/ml ペニシリンを含むダルベッコ改変イーグル最小必須培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium : 以下 D-MEM と略す) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いた。すべての培養は 5 % CO₂ と 95 % 空気の気相下, 37 °C で行い, 培養液は 2 日毎に交換した。

3. RNA 抽出法

歯肉試料は直ちに -80 °C で冷凍, あるいは RNA later RNA Stabilization Reagent (QIAGEN Sciences, Maryland, USA) に浸漬した。原則的に歯肉試料は 24 時間以内に, Sa3 は回収後すぐに RNeasy Protect Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA 抽出を行った。DNA の混入を防ぐ

ために抽出時に RNase-Free DNase set (QIAGEN) にて 30 °C で 30 分間 DNase 処理を行った。

4. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法

total RNA は Nano drop ND-1000 (NanoDrop Technologies, DE, USA) を用いて濃度が 150 ng/µl となるように調製し, Oligo (dT) 20 (10 µM) (TOYOBO Biochemical Operation Department, 大阪) 4 µl, dNTP Mix (10 mM) (Invitrogen) 1 µl を加えたものを 65 °C で 5 分間, 4 °C で 1 分間 Thermal Cycler (タカラバイオ, 滋賀) を用いて反応させた。

次に 5 × First-Strand Buffer (Invitrogen) 4 µl, 0.1M DTT (Invitrogen) 1 µl, RNase OUT (Invitrogen) 1 µl, SuperScript III RT (Invitrogen) 1 µl を混和し, 55 °C で 60 分間, 70 °C で 15 分間, 4 °C で 1 分間 Thermal Cycler (タカラバイオ) を用いて反応させた後, RNaseH (Invitrogen) 1 µl (2 units) を添加し, 37 °C で 20 分間, 4 °C で 1 分間 Thermal Cycler (タカラバイオ) を用いて反応させ, cDNA を作成した。その後, 1.1 × ReddyMix TMPCR Master Mix (ABgene, Epsom, UK) 18.7 µl と表 1 に示す sense および antisense-primer を各 0.4 µl 加え, Thermal

表 1 プライマーの塩基配列および PCR 条件

増幅遺伝子		塩基配列	アニーリング温度(°C)	増幅産物 (bp)
GAPDH	sense	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	59	985
	antisense	5'-CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC-3'		
claudin-1	sense	5'-GATGAGGTGCAGAAGATGAGG-3'	57	200
	antisense	5'-AGAAGGCAGAGAGAAGCAGC-3'		
claudin-2	sense	5'-AAGACTGTGCATCTCATGCC-3'	55	206
	antisense	5'-AGCATTGTGACAGCAGTTGG-3'		
claudin-3	sense	5'-TCACGTCCGAGAACATCTGG-3'	57	236
	antisense	5'-GATGGTGATCTTGGCCTTGG-3'		
claudin-4	sense	5'-GATGCAGTGCAAGGTGTACG-3'	57	220
	antisense	5'-CACTATCACCATAAAGCCGG-3'		
claudin-5	sense	5'-TTCCCAACATTGTCTCC-3'	56	232
	antisense	5'-TCTTCTGTGTAGTCGCCG-3'		
claudin-6	sense	5'-GATGCAGTGCAAGGTGTACG-3'	57	161
	antisense	5'-CCTTGGAACTCTCTCTCC-3'		
claudin-7	sense	5'-AATGTACGACTCGGTCTCG-3'	56	238
	antisense	5'-AATCTGATGGCCATACCAGG-3'		
claudin-8	sense	5'-GAAGGACTGTGGATGAATTGC-3'	55	240
	antisense	5'-GATGAAGATGATCTTAGCCG-3'		
claudin-9	sense	5'-ACTATGTGTGAGGCTGAGGC-3'	57	182
	antisense	5'-GGTTGCAACCCTACAGAGG-3'		
claudin-10	sense	5'-CTCCAAGTCAAGGACTTCC-3'	55	224
	antisense	5'-ATCCAGTCATTGAGCAGCAGC-3'		
claudin-11	sense	5'-TGGTGGACATCCTCATCC-3'	55	195
	antisense	5'-AGAGAGCCAGCAGAAATGAGC-3'		
claudin-12	sense	5'-TTCCTTCTGTGTGGAATCG-3'	55	295
	antisense	5'-GTTGCACATCCAAATCAGGC-3'		
E-cadherin	sense	5'-AATGTACGACTCGGTCTCG-3'	56	238
	antisense	5'-AATCTGATGGCCATACCAGG-3'		
occludin	sense	5'-TGCATGTTCCACCAATGC-3'	55	235
	antisense	5'-AAGCCACTCTCCATCAAGG-3'		
ZO-1	sense	5'-CGGTCTCTGAGCCTGTAAG-3'	60	372
	antisense	5'-GGATCTACATGCGACGAGAA-3'		
JAM-A	sense	5'-GGTCAAGGTCAAGCTCAT-3'	55	765
	antisense	5'-CTGAGTAAGGCAATGCAG-3'		

Cycler (タカラバイオ) を用いて至適条件のもとで反応・増幅させた。得られた PCR 産物を 1.5 % Agarose gel (タカラバイオ) を用いた電気泳動により分離し、gel をエチルブロマイド (和光純薬, 大阪) で染色し、UV トランスイルミネーター (コスモバイオ, 東京) を用いてバンドを検出した後、Polaroid Type 66 (Polaroid Corporation, Waltham, MA02451, USA) で可視化されたバンドを撮影した。次に NIH Image (National Institutes of Health) を用いてバンドの発現量を数値化し、内部標準遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) を使用し、その発現量を 1 とした相対値を求めて比較した。

5. 免疫組織化学的解析

1) 薄切切片の作製とその調整

採取した歯肉試料の一部を 4 % パラホルムアルデヒド (和光純薬) にて 4 °C で一晩固定した後、蒸留水で洗浄し、通法に従い脱水・パラフィン包埋して、厚さ 5 µm の連続薄切切片を作製した。薄切切片は脱パラフィンした後、0.1 % (v/v) TWEEN20 (和光純薬)-TBS (以下 TBS-T と略す) で洗浄し、0.3 % 過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを除去した後、5 % スキムミルクで 60 分間ブロッキングを行った。

2) 一次抗体

一次抗体として抗ヒト E-cadherin ウサギモノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA)、抗ヒト claudin-1 ウサギポリクローナル抗体 (ZYMED LABORATORIES INC., South San Francisco, CA, USA)、抗ヒト JAM-A ウサギポリクローナル抗体 (ZYMED) を用いた。各種抗体は TBS で 1,000 倍に希釈し、4 °C で一晩反応させた後、以下の二種類の方法で検出した。

3) Labelled Streptoavidin-biotin (LSAB) 法

二次抗体としてビオチン標識抗マウス/ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体 (DAKO, Corporation, Carpinteria, CA, USA) を用いた。この二次抗体を 1,000 倍に希釈し、室温にて 60 分間反応させた後、TBS-T で 3 回洗浄し、パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (DAKO) を室温にて 60 分間反応させた。その後、TBS-T で 3 回洗浄し、発色基質 (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAKO) を切片に滴下し、室温にて 5 分間反応させた。反応液が茶色に発色したのを確認した後、ヘマトキシリンで核染色を行い、グリセロールゲル (DAKO) で封入した。

4) 蛍光染色法

二次抗体として Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular probes, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA, USA) を 1,000 倍希釈し、室温にて 60 分間反応させ、TBS-T で 2 回洗浄した。引き続き、VECTASHIELD H-100 (Vector Labs, CA, USA) にて封入した。

6. *in situ* hybridization 法

1) Probe の作製

炎症歯肉試料から増幅した claudin-10 の PCR 産物を QIA quick PCR purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製した DNA は、T4 DNA ligase を用いて TA cloning vector (Invitrogen) と 4 °C で一晩の ligation 反応を行った後、引き続き *E. coli* JM109 株への形質転換 (Transformation) を行った。形質転換株 (Transformant) を 100 µg/ml ampicillin, 80 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal), 200 µM isopropyl-β-D-galactoside (IPTG) 含有 Luria-Bertani (以下 LB と略す) 寒天培地 (Invitrogen) にて 37 °C で一晩培養し、白色コロニーを選択した。選択したコロニーを最終濃度 50 µg/ml ampicillin を加えた LB 培地で 37 °C にて一晩振とう培養し、その培養液より Quantum Prep Plasmid Mini Prep Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて plasmid DNA を精製した。この精製した plasmid DNA を鋳型として、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた Cycle Sequencing 反応を行った後、ABI PRISM3100-Avant (Applied Biosystems) にて Sequence 分析を行い、plasmid 内に挿入された claudin-10 遺伝子の塩基配列を確認した。さらに plasmid DNA を制限酵素 *Spe* I あるいは *Nco* I (ニッポンジーン) で線状化した後、QIAquick Nucleotide Removal kit (QIAGEN) による精製を行い、最終的に DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Roche, Basel, Switzerland) を用いて標識反応させて、*in situ* hybridization のための RNA probe と得た。

2) *in situ* hybridization

パラフィン包埋した歯肉試料から 5 µm 薄切切片を作製し、脱パラフィンした後、0.8 % ペプシン (DAKO) で酵素処理した。オートクレープ処理蒸留水で十分に洗浄し、上記より得られた probe を用いてハイブリダイゼーションを 37 °C で一晩行った。次に、55 °C の Standard Sodium Citrate (SSC) で 10 分間の浸漬操作を 2 回行った後、TBS-T にて洗浄し、Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Enzo, Mannheim, Germany) を用いて室温で 60 分間反応させた。さらに TBS-T にて 3 回洗浄し、AP Conjugate Substrate kit (Bio-Rad) を用いて発色させた後、最後に DakoCytomation Glycergel Mounting Medium (DAKO) にて封入した。

7. Sa3 培養系でのサイトカイン処理

24 穴プレートに Sa3 を 1.0×10^5 cells/well になるように播種し、コンフルエントに達するまで培養した。0, 10, 100 ng/ml の Tumor Necrosis Factor Alpha (以下、TNF-α と略す, PeproTech, London, UK) あるいは 0, 1, 10, 100 ng/ml の Interleukin-13 (以下、IL-13 と略す, STRATHMANN, Hamburg, Germany) を培地に添加し、さらに 12 あるいは 24 時間培養した Sa3 を遺伝子解析に使

用した。

8. フローサイトメトリー解析

6 穴プレートに Sa3 を 1.0×10^5 cells/well になるように播種し、コンフルエントに達するまで培養した。0, 10, 100 ng/ml の TNF- α あるいは 0, 1, 10, 100 ng/ml の培地に添加し24時間培養した後、Sa3 を BD Cytotfix (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) にて 4 °C で 20 分間固定し、0.2 % 牛血清アルブミン (Sigma, St Louis, MO, USA) を含む PBS 中で攪拌し20分間ブロッキングを行った。PBS にて 2 回洗浄した後、1 次抗体として 1,000 倍に希釈した抗ヒト E-cadherin ウサギポリクローナル抗体、抗ヒト claudin-1 ウサギポリクローナル抗体、抗ヒト JAM-A ウサギポリクローナル抗体をそれぞれ加え、4 °C で 30 分間反応させた。引き続き、PBS にて 2 回洗浄した後、蛍光色素 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ウサギイムノグロブリン抗体 (DAKO) を加えて 4 °C で 30 分間反応させた。再び PBS にて 2 回洗浄した後、細胞自動解析装置 (EPICS XL-MCL ; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を用いて Sa3 の各種抗体反応解析を行った。

9. Transepithelial Electrical Resistance (以下 TER と略す) 測定

24 穴 transwell chamber (直径 6.5 mm, ポアサイズ 0.4 mm ; Corning Coster, Rochester, NY, USA) を用い、upper chamber に Sa3 細胞数が 1.0×10^4 cells/well になるように播種した。細胞がコンフルエントに達するまで培養し、0, 10, 100 ng/ml の TNF- α あるいは 0, 1, 10, 100 ng/ml の IL-13 を培地に添加し、24 時間培養した後、Millicell-ERS (MILLIPORE, Billerica, MA, USA) にて upper chamber と lower chamber 間の電気抵抗値を測定することで細胞間接着強さを調べた。

10. Transepithelial cell permeability 測定

TER 測定と同様に Sa3 を播種後、0, 10, 100 ng/ml の TNF- α あるいは 0, 1, 10, 100 ng/ml の IL-13 を培地に添加し24時間培養し、upper chamber に Dextran Conjugated Fluorescein (Invitrogen) を 10 ng/ml に濃度希釈し添加した。遮光のまま 2 時間放置後、transwell chamber 内の Sa3 細胞シートを通過し lower chamber の培地中に移行したデキストランを CORONA MTP-32 MICROPLATE READER (コロナ電気株式会社, 茨城) にて計測し、細胞間における透過性の程度を測定した。

11. 統計学的解析法

得られたデータは平均±標準偏差で表し、Student's t-test または Mann-Whitney U-test により有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

1. ヒト炎症歯肉組織における上皮細胞間接着分子群の遺伝子発現

炎症歯肉と健常歯肉における上皮細胞間接着分子群の遺伝子発現を RT-PCR を用いて解析した。

1) claudin family の遺伝子発現

ヒト歯肉組織における claudin-1 から claudin-12 までの典型的な遺伝子発現の例を図 2 A に示す。ヒト歯肉組織では主に claudin-1, 4, 7 の遺伝子発現が認められた。結果には示していないが、claudin-3, 5, 8 の遺伝子発現がわずかに認められる症例もあった。Sa3 での claudin 遺伝子発現パターンはヒト歯肉組織における発現パターンと類似していた (図 2 A)。次に検索したすべての健常歯肉と炎症歯肉における claudin-1 から

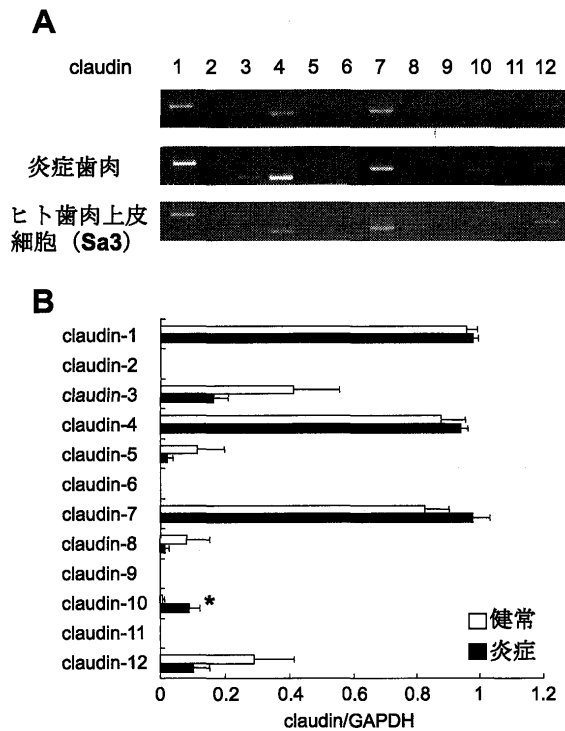


図 2 claudin family mRNA の発現

A. ヒト歯肉組織および Sa3 における claudin family mRNA の発現

ヒト歯肉組織から total RNA を抽出し、claudin-1~12 mRNA の発現を RT-PCR にて検討した。

B. 健常あるいは炎症歯肉組織における claudin family mRNA の発現

claudin-1~12 mRNA の発現量については、housekeeping gene である GAPDH に対する相対的発現量として NIH image を用いて算出した。□が健常歯肉を、■が炎症歯肉を示す。(健常歯肉組織 n=12, 炎症歯肉組織 n=36)

* $p < 0.05$; 健常歯肉組織群と炎症歯肉組織群の間で有意差を認めた。

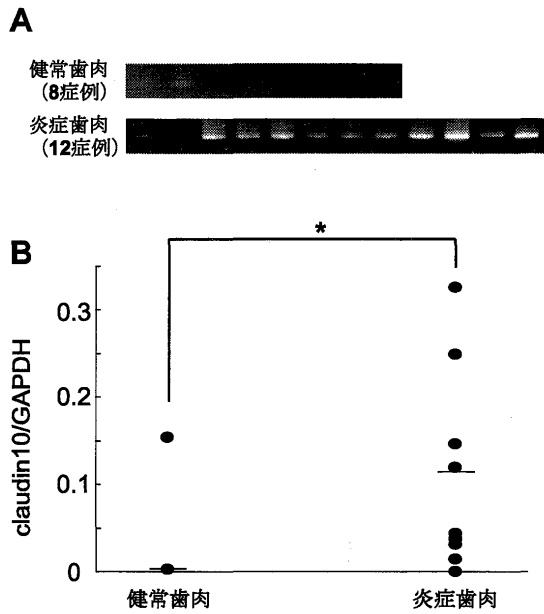


図3 健常あるいは炎症歯肉組織における claudin-10 mRNA の発現

A. claudin-10 mRNA の発現は、炎症歯肉組織では12症例中11症例に認められ、その発現量は様々であった。なお、健常歯肉組織では8症例中わずかに2症例において微弱な発現が認められた。

B. 図3 A で示した各症例の claudin-10 mRNA の発現量を housekeeping gene である GAPDH に対する相対的発現量を NIH image を用いて算出し、健常および炎症歯肉組織における相対的発現量を比較した。(健常歯肉組織 n=12, 炎症歯肉組織 n=36)

*p < 0.05; 健常歯肉組織群と炎症歯肉組織群の間で有意差を認めた。

claudin-12 までの遺伝子発現量を比較した結果、炎症歯肉における claudin-10 の遺伝子発現量は正常歯肉の遺伝子発現量より有意に上昇していたが、他の claudin 遺伝子の発現量は健常歯肉および炎症歯肉組織間で有意差は認められなかった(図2 B)。そこで claudin-10 遺伝子発現量を詳細に検討した結果、健常歯肉では8症例中2症例においてのみ微弱な遺伝子発現が認められただけであったが、炎症歯肉では12症例中11症例において遺伝子発現が認められた(図3 A)。すべての症例の健常歯肉および炎症歯肉における claudin-10 遺伝子発現量の分布図を図3 B に示す。その結果、炎症歯肉では健常歯肉と比べて約11倍の claudin-10 発現量が認められた。

2) E-cadherin, occludin, ZO-1 および JAM-A の遺伝子発現

上皮細胞間接着に関与する E-cadherin, occludin, ZO-1 および JAM-A の炎症歯肉と健常歯肉における遺伝子発現量を RT-PCR 法で比較した。炎症歯肉での

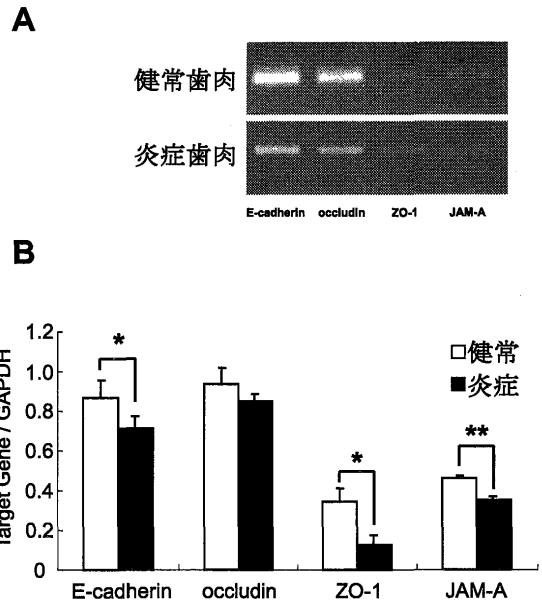


図4 健常あるいは炎症歯肉組織における E-cadherin, occludin, ZO-1 および JAM-A mRNA の発現

歯肉組織から total RNA を抽出し、E-cadherin, occludin, ZO-1, JAM-A mRNA の発現を RT-PCR にて検討した。その発現量については、housekeeping gene である GAPDH に対する相対的発現量として NIH image を用いて算出した。□が健常歯肉を、■が炎症歯肉を示す。

*p < 0.05, **p < 0.001; 健常歯肉組織群と炎症歯肉組織群の間で有意差を認めた。

E-cadherin, ZO-1, および JAM-A の発現量は健常歯肉と比較して、有意な低下が認められたが、occludin の発現量は健常歯肉と炎症歯肉で差が認められなかった(図4 A, B)。

2. ヒト炎症歯肉組織における claudin-10 の局在

炎症歯肉において claudin-10 遺伝子が有意に強く発現していることが確認されたため、ヒト歯肉組織における claudin-10 の局在を *in situ* hybridization と免疫組織化学的手法を用いて解析した。

in situ hybridization において、claudin-10 は炎症歯肉の基底細胞層で認められたが、健常歯肉ではその発現はほとんど認められなかった(図5 C, D)。また免疫組織化学的染色においても炎症歯肉の基底細胞層を中心に claudin-10 の発現が認められたが、細胞間境だけでなく、細胞質にも局在していた(図5 E, F)。

3. ヒト炎症歯肉上皮組織における E-cadherin, JAM-A, claudin-1 の発現

E-cadherin と JAM-A は炎症歯肉において健常歯肉より mRNA 発現が有意に低かったため、実際の炎症歯肉において、その発現が減弱しているかどうかを確認する

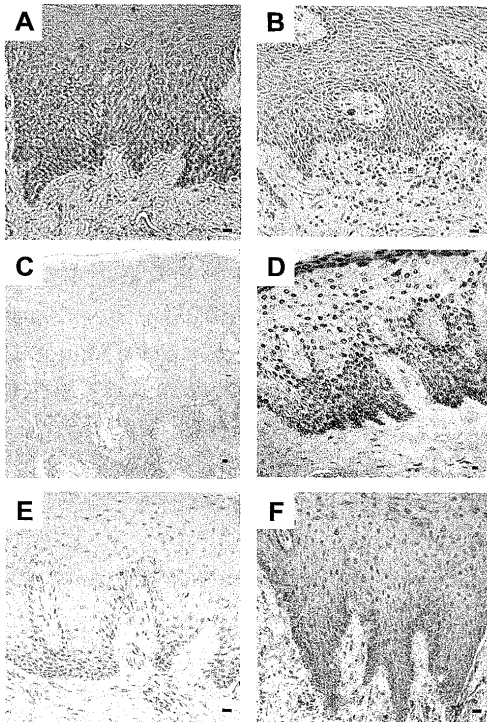


図5 健常あるいは炎症歯肉組織における claudin-10 mRNA の発現の比較

Aが健常歯肉組織, Bが炎症歯肉組織のHE染色像を示す。

1) *in situ* hybridization 法での解析

Cが健常歯肉組織, Dが炎症歯肉組織の染色像を示す。健常あるいは炎症歯肉組織より連続薄切切片を作製し, *in situ* hybridizationにより claudin-10を検出した。claudin-10は炎症歯肉の基底細胞層で認められたが, 健常歯肉ではその発現はほとんど認められなかった。

2) 免疫組織化学的解析

Eが健常歯肉組織, Fが炎症歯肉組織の染色像を示す。健常あるいは炎症歯肉組織より連続薄切切片を作製し, LSAB法を用いた染色により claudin-10を検出した。*in situ* hybridizationにおける結果と同様に炎症歯肉の基底細胞層で認められたが, 健常歯肉ではその発現はほとんど認められなかった。また, claudin-10は細胞間境だけではなく, 細胞質においても認められた。バーは10 μ mを示す。

ため免疫組織学的検索を行った。その結果, E-cadherinは健常歯肉では細胞間境において蛍光が濃く, はっきりと認められたが, 炎症歯肉では細胞間境における蛍光強度が低かったことから E-cadherinの構造が一部破壊あるいは発現の減少が起こっていると推測された(図6 A, B)。JAM-Aの発現は免疫組織化学的染色においても E-cadherinと同様の結果が認められた(図6 C, D)。なお, RT-PCRの結果において健常および炎症歯肉における発現量の差が認められなかった claudin-1は, 炎症・

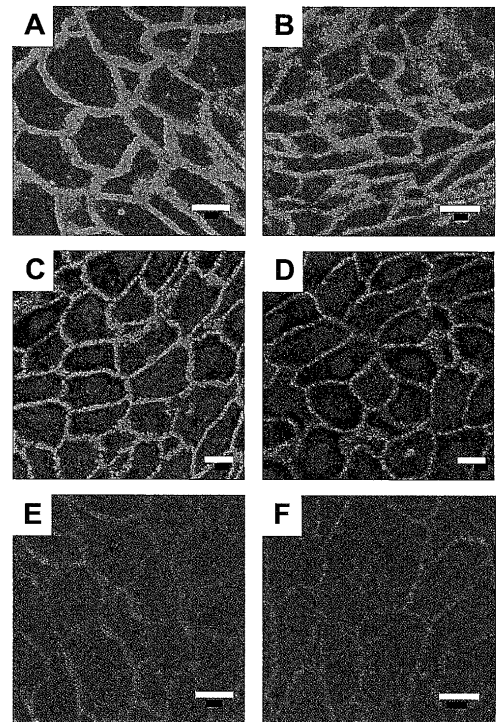


図6 健常あるいは炎症歯肉組織における E-cadherin, JAM-A および claudin-1 の免疫組織化学的解析

A:健常歯肉組織における E-cadherin 染色像, B:炎症歯肉組織における E-cadherin 染色像, C:健常歯肉組織における JAM-A 染色像, D:炎症歯肉組織における JAM-A 染色像, E:健常歯肉組織における claudin-1 染色像, F:炎症歯肉組織における claudin-1 染色像を示す。

健常あるいは炎症歯肉組織より連続薄切切片を作製し, 蛍光染色によりそれぞれの上皮細胞間接着装置に関与する分子を検出した。E-cadherin, JAM-A 染色像においては健常歯肉組織と比較して炎症歯肉組織の発現が低下および構造が破壊されている像が確認できる。細胞間境に存在する claudin-1は健常および炎症に関係なく染色像が確認できる。白いバーは10 μ mを示す。

健常の両群において細胞間境の蛍光強度に変化は認められなかった(図6 E, F)。このように遺伝子レベルと同様, タンパク質レベルでの発現変化も生じていなかった。

4. Sa3における上皮細胞間接着分子群の遺伝子発現に及ぼすサイトカインの影響

*in situ*における解析により, claudin-10は炎症歯肉の基底細胞層で発現していることが明らかとなった。また, E-cadherinとJAM-Aの炎症歯肉における発現は健常歯肉のそれより有意に低かった。それらがどのような機序により起こるかを明らかにするために種々のサイトカインがSa3の上皮細胞間接着分子群の遺伝子発現に与える影響を *in vitro*で検討した。

1) TNF- α が claudin family の遺伝子発現に及ぼす影響

種々の濃度の TNF- α (0, 10, 100 ng/ml) を培地に添加し, Sa3 を12あるいは24時間培養したときの claudin family の mRNA 発現を検索した (図7)。claudin-1 の mRNA 発現は TNF- α の濃度に関係なく一定の発現を示した。また, claudin-7 の mRNA 発現も TNF- α に関係なく恒常的に見られた。claudin-2, 3, 4, 6 の mRNA 発現は TNF- α 濃度依存的に増加した。とくに claudin-2 の発現量は100 ng/ml TNF- α 刺激により約3倍に増加した。100 ng/ml の濃度の TNF- α で Sa3 を刺激しても claudin-9, 10, 11, 12 の発現は認められなかった。

2) TNF- α が E-cadherin, occludin, JAM-A の遺伝子発現に及ぼす影響

種々の濃度の TNF- α (0, 10, 100 ng/ml) を培地に添加し, Sa3 を12時間培養したときの E-cadherin, occludin, JAM-A の mRNA 発現を検索した (図8)。10 ng/ml TNF- α 刺激により E-cadherin の mRNA 発現は著しく減少した。occludin および JAM-A の mRNA 発現も低下したが, その度合いは E-cadherin よりも少なかった。

5. TNF- α が E-cadherin, JAM-A, claudin-1 のタンパク質発現へ及ぼす影響

100 ng/ml TNF- α を添加した培地あるいは Sa3 と無添

加の培地で, Sa3 を24時間培養したときの E-cadherin, JAM-A, claudin-1 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。RT-PCR の結果と同様に E-cadherin と JAM-A の発現は TNF- α 刺激により低下したが, claudin-1 の発現はわずかに上昇傾向を認めた (図9)。

6. TNF- α , IL-13 が TER に及ぼす影響

TNF- α あるいは IL-13 を培地に添加すると, Sa3 の TER が経時的に低下した (図10A, B)。10 ng/ml TNF- α 添加では8時間以降, 100 ng/ml TNF- α 添加では4時間以降で, 無添加の場合と比較して有意に低下した。また, 1 ng/ml IL-13 添加では60時間以降, 10 ng/ml IL-13 添加では48時間以降で, 無添加の場合と比較して有意に低下した。

7. TNF- α が Transepithelial cell permeability に及ぼす影響

TNF- α を培地に添加すると, Sa3 の Transepithelial cell permeability が経時的に上昇し, 100 ng/ml TNF- α 添加では無添加の場合と比較して33%上昇した (図11A)。10 ng/ml IL-13 を添加した場合は64%上昇した (図11B)。

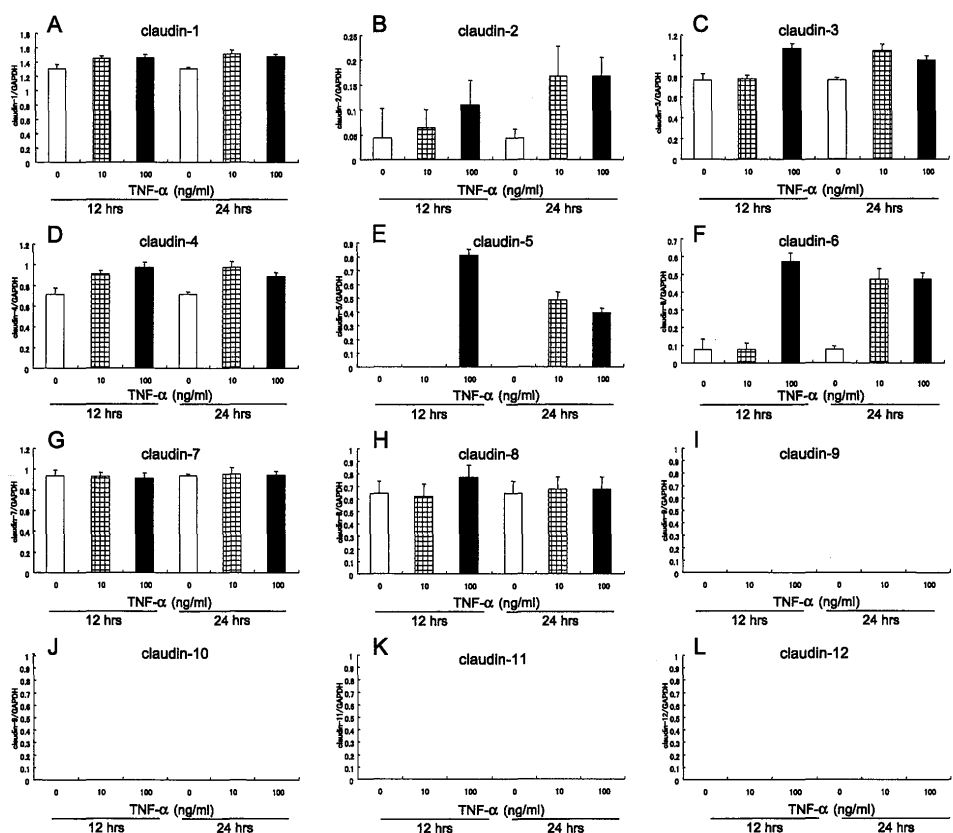


図7 TNF- α が Sa3 における claudin family 遺伝子発現に及ぼす影響

A: claudin-1, B: claudin-2, C: claudin-3, D: claudin-4, E: claudin-5, F: claudin-6, G: claudin-7, H: claudin-8, I: claudin-9, J: claudin-10, K: claudin-11, L: claudin-12 の mRNA 発現解析の結果を示す。

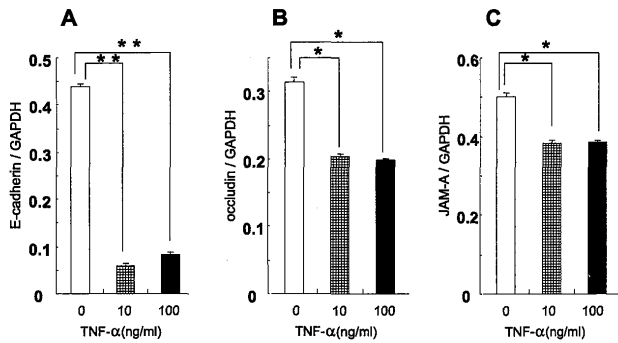


図8 TNF-αがSa3におけるE-cadherin, occludinおよびJAM-A遺伝子発現に及ぼす影響
 A: E-cadherin, B: occludin, C: JAM-AのmRNA発現解析の結果を示す。
 TNF-αはSa3におけるE-cadherin, occludin, JAM-AのmRNA発現を低下させた。
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$; 無添加コントロールと比較して有意差を認めた。

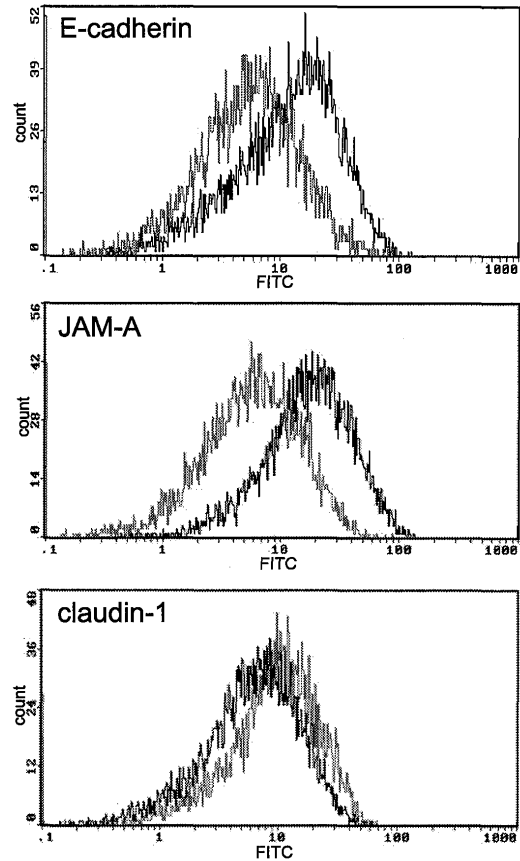


図9 TNF-αがSa3におけるタンパク質レベルでのE-cadherin, JAM-Aおよびclaudin-1発現に及ぼす影響
 無刺激時の状態を濃い線で、TNF-α刺激後の状態を薄い線で示す。E-cadherinとJAM-AはTNF-α刺激により発現が低下したが、claudin-1の発現はわずかに上昇傾向を認めた。

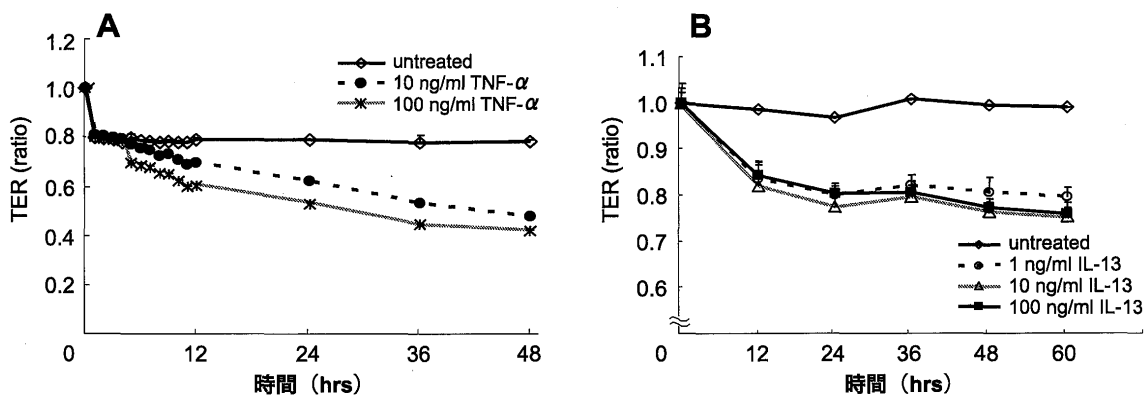


図10 サイトカインがTERに及ぼす影響
 A. TNF-αがTERに及ぼす影響
 TNF-αを培地に添加するとSa3のTERが経時的に低下した。10 ng/ml TNF-α添加では8時間以降、100 ng/ml TNF-α添加では4時間以降で無添加の場合と比較して有意に低下した。
 B. IL-13がTERに及ぼす影響
 IL-13を培地に添加するとSa3のTERが経時的に低下した。1 ng/ml IL-13添加では60時間以降、10 ng/ml IL-13添加では48時間以降で無添加の場合と比較して有意に低下した。
 * $p < 0.05$; 無添加コントロールと比較して有意差を認めた。

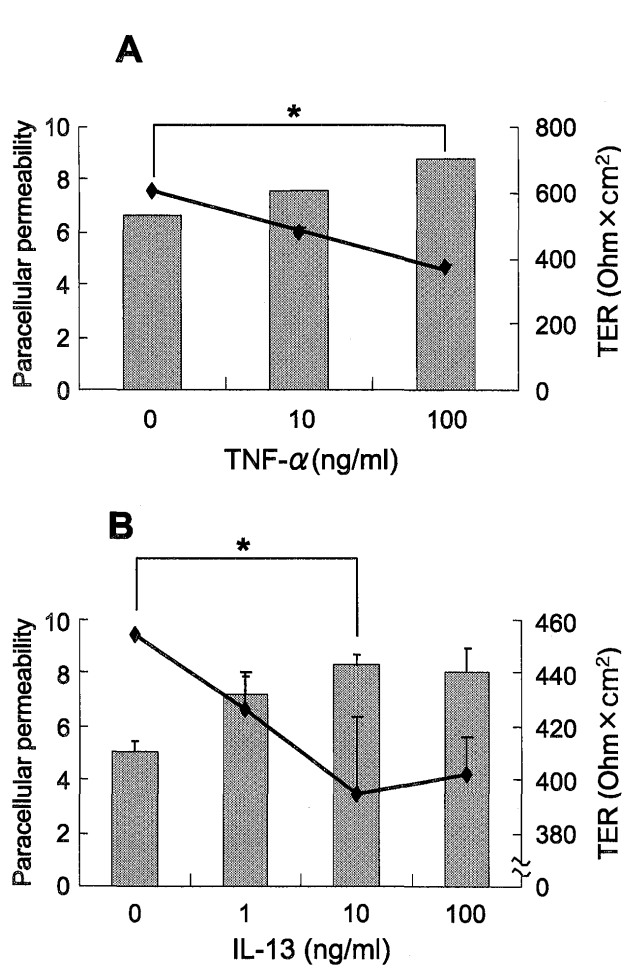


図11 サイトカインが transepithelial cell permeability に及ぼす影響

A. TNF-α が transepithelial cell permeability に及ぼす影響

TNF-α を培地に添加すると, Sa3 の transepithelial cell permeability が経時的に上昇した。100 ng/ml TNF-α 添加では無添加の場合と比較して有意に 33 % 程度上昇した。Transepithelial cell permeability は棒グラフ, 同時に同条件で測定した TER は折れ線グラフにて示す。

B. IL-13 が transepithelial cell permeability に及ぼす影響

IL-13 を培地に添加すると, 10 ng/ml の IL-13 添加では無添加の場合と比較して 64 % 上昇した。Transepithelial cell permeability は棒グラフ, 同時に測定した TER は折れ線グラフにて示す。

* $p < 0.05$; 無添加コントロールと比較して有意差を認めた。

考 察

TJ は主に上皮細胞同士の細胞間接着部位に認められ, 水溶性分子を自由に通過させないバリア機能と, 頭頂部と基底側にある細胞膜上のタンパク質や脂質の混在を防ぐフェンスの役割を有している。TJ においては, カルシウムイオン非依存性の接着分子 claudin が細胞膜裏打ちタンパク質である ZO-1, 2, 3 を介してアクチン細胞骨格に連結している^{9, 19)}。現在, claudin はマウスやヒトで 24 種類が同定され, claudin family を構成しているが, 重層上皮である表皮では, 顆粒層に連続した TJ が存在し, その TJ は claudin-1 と 4 から成り立っていることが知られている^{11, 23-25)}。そして, claudin-1 knockout マウスは一見正常に生まれてくるが, 24 時間以内に皮膚からの水分の蒸発量が異常に多いために脱水に陥り, すべてが死に至ること, さらに claudin-1 knockout マウスの皮下に注射したトレーサーが皮膚から漏れることから, マウスの表皮における TJ の役割の重要性が明らかにされている²⁵⁾。本研究では, 重層扁平上皮組織である歯肉上皮組織の claudin 発現について検討した。

claudin family の発現に関して重要なことは 2 つある。第 1 点は, 各 claudin は特有の組織発現パターンを示し, 細胞のタイプによって発現がかなり細かく規定されていることである²³⁾。例えば claudin-1 と -10 は精巢上皮細胞の基底外側膜にそって発現が見られ, claudin-7 は概ね遠位尿管の基底外側膜に沿って発現が見られる³⁶⁻³⁸⁾。claudin-3 は胃と大腸, -4 は小腸と大腸, -5 は胃の上皮細胞の側面に沿って限局している³⁹⁾。claudin-10 は光学顕微鏡レベルにおいて, 脾臓, 大唾液腺, 涙腺, 気管支腺のような外分泌腺の腺房細胞の壁に沿って発現が確認されている^{36, 40)}。第 2 点は, ほとんどの細胞では複数の claudin が同一細胞に発現していることである^{14, 41)}。すなわち, TJ ストランドには異なる claudin が混在しており, 細胞間で見た場合, claudin はホモにもヘテロにも会合でき, 構造的に多様性を持っている¹⁴⁾。本研究では, 歯肉上皮組織の claudin-1 から claudin-12 までの mRNA 発現を RT-PCR にて検索した結果, 歯肉上皮細胞には claudin-1, 3, 4, 5, 7, 8, 10 および 12 が発現しており, そのうち claudin-1, 4 および 7 の mRNA の発現量が相対的に多いことが明らかになった (図 2)。また, 歯肉上皮細胞は他の組織の上皮細胞と同様にヘテロな claudin を発現していることも今回, 明らかになった。Sa3 における claudin の mRNA の発現パターンと歯肉上皮試料におけるそれとは若干の相違が認められるものの主要な claudin は同じであったことから (図 2 A), 歯肉上皮細胞の発現する claudin のうち主要なものは claudin-1, 4 および 7 であることが示された。

次に炎症歯肉組織と健常歯肉組織における claudin の発現パターンを比較した結果, 主要な claudin である claudin-1, 4 および 7 の発現の変化は認められなかったが, 炎症歯肉組織においては claudin-10 の発現の上昇が

認められた (図3)。現在, claudin-10 は甲状腺癌の乳頭型と濾胞型の鑑別診断のマーカーとして活用されており, また肝癌の再発に関与をしているとの報告⁴²⁾ など腫瘍の分野での研究が進んでいるが, 炎症性疾患において claudin-10 が病態に何らかの関与をする可能性があるという報告は本研究が初めてである。

炎症歯肉組織で発現が上昇することが明らかとなった claudin-10 の局在を *in situ* hybridization および免疫組織学的に調べたところ, claudin-10 は炎症歯肉上皮組織の基底細胞層に多く発現していることが確認された (図5)。この結果から, claudin-10 の発現が上昇することにより, TJ の paracellular permeability が減少, すなわち細胞間のシールが強化されることにより歯肉上皮組織から結合組織への起炎物質の浸透を妨げ, 炎症の波及をくいとめる防波堤の役割を果たしている可能性が考えられる。しかしながら, claudin-2 のように発現が上昇しても, 逆に paracellular permeability の増加が報告⁴³⁾ されていることや, 種々の claudin は matrix metalloproteinase (以下 MMP と略す) を局所にリクルートし, これを活性化することも報告⁴⁴⁾ されている。これらのことから, claudin-10 の発現上昇が起きると, 細胞間の透過性が上昇することで起炎物質をより透過させたり, 炎症局所において MMP が活性化されることにより, 歯周組織破壊が進行したりする可能性が考えられる。しかしながら claudin-10 の生理的役割に関しては現在も不明であり, 今後 claudin-10 の過剰発現細胞を作製し, 歯周病変局所における claudin-10 の機能解析をする必要があると思われる。

免疫組織化学的解析により claudin-10 の局在を検討したところ, 細胞間隙だけではなく, 細胞質にも存在しているという結果を得た (図5 F)。claudin は一般的に細胞間隙に存在しているものと考えられているが, claudin-1 や claudin-10 が細胞質にも存在していることが最近報告されている^{36, 37)}。このことは claudin が細胞間隙にのみ存在して paracellular permeability を制御するという従来考えられていたような働きだけではなく, MMP を活性化する機能のような, さらに未知の働きを持つ可能性を示している。また, 大腸癌組織における claudin-1 の発現を検索した報告では, 癌化に伴い claudin-1 の発現が細胞膜から細胞質および核内に移行すると報告されている⁴⁵⁾。炎症歯肉上皮組織では claudin-1 は細胞膜にほぼ局限されていたが, claudin-10 は細胞質内にも発現が認められた。このことは, 歯周病変の病態の変化に伴い基底細胞層に何らかの変化が生じ, その結果 claudin-10 が発現するとともに, その発現が細胞膜から細胞質へと変化する可能性を示している。したがって歯周病変部の claudin-10 発現の有無や変化が歯周炎進行のある種のマーカーになる可能性も考えられる。しかしながら, 今回, interferon gamma (以下 IFN- γ と略す) や interleukin-1beta (IL-1 β) などのサイトカイン

や歯周病関連細菌である *Porphyromonas gingivalis* を Sa3 に作用させたが, claudin-10 の mRNA 発現を上昇させることはできず, 発現の変化は確認できなかった (データ示さず)。Sa3 に対する刺激因子を変えることにより Sa3 における claudin-10 の mRNA が認められるようになるのか, 単独刺激あるいは単層培養状態では Sa3 から claudin-10 の mRNA を誘導することが無理なのかどうかを明らかにすることは今後の課題である。

TJ には claudin 以外にもカルシウムイオン非依存性の接着分子である occludin や, 免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子 JAM も局在しており, 細胞内で ZO-1, 2, 3 と結合している^{46, 47)}。occludin の生理的機能については明らかにされていないが, JAM-A は上皮細胞の極性形成に関与していることが明らかになっている¹⁸⁾。また, 内皮細胞上の JAM の研究も進んでおり, TJ の安定化に加え, 白血球遊走, 血小板活性化, 血管形成において重要な役割を果たすことが報告されている¹⁸⁻²¹⁾。AJ はカルシウムイオン依存性にホモフィリックな結合をする接着分子 cadherin が主要な接着分子として機能しており, その細胞内領域で β -カテニン, α -カテニンとさらにピンキュリン, α -アクチニンと結合している²²⁾。cadherin には多数のサブタイプが知られており, 上皮細胞に主に E-cadherin が発現している^{48, 49)}。今回の結果から, 歯肉上皮組織にも occludin, JAM-A, ZO-1 および E-cadherin の存在が確認された。炎症歯肉上皮組織においては, JAM-A, ZO-1 および E-cadherin の発現は mRNA レベルでもタンパク質レベルでも抑制されていた (図4 および 6 A~D)。単層培養した Sa3 を炎症性サイトカインである TNF- α で刺激すると, JAM-A, ZO-1 および E-cadherin の mRNA レベルおよび細胞表面でのタンパク質レベルでの発現が低下した (図8 および 9) から, 歯肉上皮組織においても浸潤してきた好中球やマクロファージ等が産生する因子により上皮細胞間接着分子群が部分的に破壊される可能性が示唆された。

歯周病は Th1/Th2 バランスの破綻により生ずるとの報告がある⁵⁰⁾。Th1細胞から産生される代表的なサイトカインである IFN- γ を Sa3 に作用させると, TNF- α と同様に JAM-A, ZO-1 および E-cadherin の mRNA レベルおよび細胞表面でのタンパク質レベルでの発現が低下した (データ示さず) ことから, Th2 細胞から産生されるサイトカインである IL-13 による Sa3 の細胞間接着因子への影響を検討した。その結果, IL-13 も IFN- γ と同じ影響を Sa3 に与えたことから, 上皮細胞間接着因子の発現に関しては, Th1/Th2 バランスがどちらに傾いても抑制されることが明らかになった。

TJ のバリア機能は上皮細胞のタイプによって大きく異なる⁵¹⁻⁵³⁾。TJ のバリア機能を簡便に最も感度よく検出する方法として TER の測定がある。細胞膜の電気抵抗値が極めて高いのに対して, 実際の上皮細胞シー

トの電気抵抗値は paracellular pathway の寄与によって低くなる。その程度から、イオンに対する paracellular pathway の透過性、すなわち TJ のバリア機能を評価することが可能になる。上皮細胞シートの由来により、TER 値は $5 \Omega \times \text{cm}^2 \sim 5,000 \Omega \times \text{cm}^2$ 以上と様々である⁵⁴⁾。上皮のタイプによって TJ ストランドの形態的な複雑度に多様性があることが知られており、TJ ストランドの本数と TER 値には概ね相関があると報告されていた^{55, 56)}。しかし、なかには TJ ストランドの発達度が似通った上皮間でも TER 値が大きく異なる場合があり、paracellular pathway の電荷選択性が上皮細胞によって異なるという事実から、TJ にはストランドの本数の違い以外になんらかの質的な違いが存在するのではないかと考えられている^{54, 57)}。現在、この質的な違いは、各上皮細胞の TJ ストランドを構成する claudin タイプのセットの多様性に起因すると考えられている。たとえば、claudin-1, 4 陽性、claudin-2 陰性のイヌ腎臓由来の MDCK 細胞に claudin-2 を強制発現させることによって、TJ ストランドの形態はほとんど影響を受けないにもかかわらず、TER が数十分の一に減少するとともに、paracellular pathway の陽イオン選択性が高まる^{58, 59)}。一方、claudin-4 や 8 を強制発現させると、TER は上昇し、陽イオンに対する透過性が下がるが、陰イオンの透過性にはほとんど影響がない^{60, 61)}。腸管細胞では claudin-1 の発現の程度により、TER がコントロールされていることが報告⁶¹⁾されているが、Sa3 を TNF- α で刺激して TER を減少させた状態において、Sa3 における claudin-1 の発現の変化が認められなかったことにより、歯肉上皮細胞では claudin-1 は細胞透過性には深くは関与していない可能性が示唆された。Sa3 では TER の減少に伴い claudin-2 の発現上昇が認められたので、歯肉上皮細胞においては、paracellular permeability は claudin-2 の発現の増減が関与していると考えられる。

このように、現在の研究は、一層の細胞からなる単層上皮に注目して進められているが、重層上皮における研究は進んでいない。実際の生体では多層からなる重層上皮が多細胞の体を外界から隔離し、また、体の中の多くのコンパートメントを作るために重要な役割を果たしている。とくに口腔を覆う歯肉は典型的な重層扁平上皮であり、そのバリア機能は生体の生存に必要不可欠である。また、本実験に使用した Sa3 はヒト歯肉由来の癌細胞株であることから正常上皮細胞とは性質が異なっている可能性があり、今後、正常ヒト歯肉細胞を用いて、上皮細胞内における claudin や JAM-A などの細胞間接着に関与する分子群の発現機構やそれに伴う細胞間接着強さの制御機構を検討していくことが今後の課題の一つである。つまり、歯周病における上皮細胞間接着機構やそのバリア機能についてより詳細に解析していくためには、ヒト歯肉細胞による 3 次元構築した重層上皮を用いるなど、より歯周病に近似した歯肉モデルを用いて検討する必要

がある。

また、試料採取が困難であったため病態の詳細な解明がなされていない歯周ポケット底部の接合上皮周辺組織に着目し、mRNA レベルで病態の解明を行い、炎症のより早期での組織変化を知ることにより歯周炎の予防法の開発が期待される。さらに歯周病治療の最終目標として歯周組織を再生させるためには、炎症初期における上皮細胞間の接着の破壊機構の解析のみならず、破壊された上皮細胞間の接着細胞間の接着再生機能の解明も必要である。

ま と め

歯周病変局所における上皮細胞間接着機構に関与する分子群の発現解析することを目的として claudin family や occludin, JAM-A や ZO-1 の上皮細胞間接着分子群の歯周病患者の歯周組織における発現と局在を RT-PCR および *in situ* hybridization 法や免疫組織化学的手法を用いて検討した。また、サイトカインが上皮細胞間接着分子群に及ぼす影響を解析するために、Sa3 を用い、TNF- α および IL-13 を培地に添加し培養した場合の上皮細胞間接着分子群の動態についても検討し、以下のような結果を得た。

1. ヒト歯肉組織においては炎症の有無に関わらず全症例において claudin-1, 4, 7 の遺伝子発現が認められたが claudin-2, 6, 9, 11 の遺伝子発現は認められなかった。ただし、炎症歯肉における claudin-10 の遺伝子発現量は正常歯肉の遺伝子発現量より有意に上昇していた。
2. claudin-10 は炎症歯肉の基底細胞層で認められたが、健常歯肉ではその発現はほとんど認められなかった。
3. TNF- α を培地に添加し培養すると、Sa3 での claudin-2, 3, 4, 6 の mRNA 発現は TNF- α 濃度依存的に増加していた。
4. TNF- α を培地に添加し培養すると、Sa3 での E-cadherin, occludin および JAM-A の発現は低下した。
5. TNF- α あるいは IL-13 を培地に添加すると、Sa3 の TER が経時的に低下し、Transepithelial cell permeability が経時的に上昇した。

以上のことから、歯周炎に罹患することにより、TJ や AJ 等の上皮細胞間接着機構に関与する蛋白分子群の発現が変化することが明らかとなった。さらに歯周組織に炎症が惹起されると、歯肉上皮の細胞間接着強さ、すなわちバリア機能に変化する可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御高閲を賜った徳島大学大学院 HBS 研究部 歯科保存学分野 松尾敬志教授に深甚なる謝辞を表しますとともに、御高閲御助言頂いた歯周歯肉治療学分野 永田俊彦教授、口腔顎顔面外

科学分野 長山 勝教授に感謝します。また、直接御指導と御助言を頂いた、歯科保存学分野 中江英明助教授に厚く御礼申し上げます。また、御支援御協力を頂いた湯本浩通博士に厚く御礼申し上げます。最後に、数々の御教示と御援助を頂いた歯科保存学分野の諸先生方に深謝し、最後まで応援してくれた両親に感謝します。

参考文献

- 1) 加藤 熙: 最新歯周病学; 第1版, 東京, 医歯薬出版, 1994, 25-63
- 2) Socransky SS: Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* 49, 203-222 (1970)
- 3) Slots J: Subgingival micro flora and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 6, 351-382 (1979)
- 4) Listgarten MA and Hellden L: Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J Clin Periodontol* 5, 115-132 (1978)
- 5) Slots J and Genco RJ: Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 63, 412-421 (1984)
- 6) Hatakeyama S, Yaegashi T, Oikawa Y, Fujiwara H, Mikami T, Takeda Y and Satoh M: Expression pattern of adhesion molecules in junctional epithelium differs from that in other gingival epithelia. *J Periodont Res* 41, 322-328 (2006)
- 7) 宮坂昌之: 接着分子ハンドブック; 第1版, 東京, 秀潤社, 2000, 175-179
- 8) 古瀬幹夫: タイトジャンクションのバリア機能を担う分子基盤. *生化学* 78, 601-608 (2006)
- 9) 藤田直之, 高井義美: 細胞接着 上皮細胞における接着と極性を中心に. *Molecular Medicine* 42, 1311-1374 (2005)
- 10) Farquhar MG and Palade GE: Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412 (1963)
- 11) Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K and Tsukita S: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141, 1539-1550 (1998)
- 12) Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S and Tsukita S: Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123, 1777-1788 (1993)
- 13) Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS and Goodenough DA: Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103, 755-766 (1986)
- 14) Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M and Tsukita S: Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147, 1351-1363 (1999)
- 15) Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M and Tsukita S: Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277, 455-461 (2002)
- 16) Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T and Tsukita S: Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141, 397-408 (1998)
- 17) Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T and Tsukita S: Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11, 4131-4142 (2000)
- 18) Muller WA: Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 24, 327-334 (2003)
- 19) Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D and Dejana E: Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142, 117-127 (1998)
- 20) Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A and Weber C: JAM-1 is a ligand of the β_2 integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* 3, 151-158 (2002)
- 21) Bazzoni G, Tonetti P, Manzi L, Cera MR, Balconi G and Dejana E: Expression of junctional adhesion molecule-A prevents spontaneous and random motility. *J Cell Sci* 118, 623-632 (2005)
- 22) Takeichi M: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451-1455 (1991)
- 23) Morita K, Furuse M, Fujimoto K and Tsukita S: Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 511-516 (1999)
- 24) Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S and Friedman TB: Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness. *Cell* 104, 165-172 (2001)
- 25) Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A and Tsukita S: Claudin-based

- tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156, 1099-1111 (2002)
- 26) Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M and Tsukita S: Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161, 653-660 (2003)
 - 27) Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper SA and Friedman TB: Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 12, 2049-2061 (2003)
 - 28) Kitajiri S, Miyamoto T, Mineharu A, Sonoda N, Furuse K, Hata M, Sasaki H, Mori Y, Kubota T, Ito J, Furuse M and Tsukita S: Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J Cell Sci* 117, 5087-5096 (2004)
 - 29) Gow A, Davies C, Southwood CM, Frolenkov G, Chrustowski M, Ng L, Yamauchi D, Marcus DC and Kachar B: Deafness in claudin 11-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci* 24, 7051-7062 (2004)
 - 30) Gow A, Southwood C, Li J, Pariali M, Riordan G, Brodie S, Danias J, Bronstein J, Kachar B and Lazzarini R: CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *osp/claudin-11* null mice. *Cell* 99, 649-659 (1999)
 - 31) Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M and Tsukita S: Tight junctions in schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* 169, 527-538 (2005)
 - 32) Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S and Lifton RP: Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 285, 103-106 (1999)
 - 33) Hadj-Rabia S, Baala L, Vabres P, Hamel-Teillac D, Jacquemin E, Fabre M, Lyonnet S, De Prost Y, Munnich A, Hadchouel M and Smahi A: Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology* 127, 1386-1390 (2004)
 - 34) Uchida Y, Shiba H, Komatsuzawa H, Takemoto T, Sakata M, Fujita T, Kawaguchi H, Sugai M and Kurihara H: Expression of IL-1 β and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Cytokine* 14, 152-161 (2001)
 - 35) Tonetti MS: Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune responses and transepithelial neutrophil migration. *J Periodont Res* 32, 104-109 (1997)
 - 36) Guan X, Inai T and Shibata Y: Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Arch Histol Cytol* 68, 213-225 (2005)
 - 37) Gregory M, Dufresne J, Hermo L and Cyr DG: Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology* 142, 854-863 (2001)
 - 38) Li WY, Huey CL and Yu AS: Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. *Am J Physiol Renal Physiol* 286, F1063-1071 (2004)
 - 39) Rahner C, Mitic LL and Anderson JM: Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology* 120, 411-422 (2001)
 - 40) Inai T, Sengoku A, Guan X, Hirose E, Iida H and Shibata Y: Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol* 68, 349-360 (2005)
 - 41) Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y and Tsukita S: Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13, 875-886 (2002)
 - 42) Aldred MA, Huang Y, Liyanarachchi S, Pellegata NS, Gimm O, Jhiang S, Davuluri RV, de la Chapelle A and Eng C: Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol* 22, 3531-3539 (2004)
 - 43) Furuse M, Furuse K, Sasaki H and Tsukita S: Conversion of Zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153, 263-272 (2001)
 - 44) Oku N, Sasabe E, Ueta E, Yamamoto T and Osaki T: Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 γ 2 chain via matrix metalloproteinase (MMP) -2 and membrane-type MMP-1. *Cancer Res* 66, 5251-5257 (2006)
 - 45) Dhawan P, Singh AB, Deane NG, No Y, Shiou SR, Schmidt C, Neff J, Washington MK and Beauchamp RD: Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. *J Clin Invest* 115, 1765-1776 (2005)

- 46) Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S and Tsukita S: Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127, 1617-1626 (1994)
- 47) Wittchen ES, Haskins J and Stevenson BR: Protein interactions at the tight junction. *J Biol Chem* 274, 35179-35185 (1999)
- 48) Takeichi M: Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 619-627 (1995)
- 49) Tanaka Y, Nakanishi H, Kakunaga S, Okabe N, Kawakatsu T, Shimizu K and Takai Y: Role of nectin in formation of E-cadherin-based adherens junctions in keratinocytes: analysis with the N-cadherin dominant negative mutant. *Mol Biol Cell* 14, 1597-1609 (2003)
- 50) Takeichi O, Haber J, Kawai T, Smith DJ, Moro I and Taubman MA: Cytokine profiles of T-lymphocytes from gingival tissues with pathological pocketing. *J Dent Res* 79, 1548-1555 (2000)
- 51) Meyle J, Gultig K, Rascher G and Wolburg H: Transepithelial electrical resistance and tight junctions of human gingival keratinocytes. *J Periodontal Res* 34, 214-222 (1999)
- 52) Jiang WG, Martin TA, Matsumoto K, Nakamura T and Mansel RE: Hepatocyte growth factor/scatter factor decreases the expression of occludin and transendothelial resistance (TER) and increases paracellular permeability in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 181, 319-329 (1999)
- 53) Martin TA, Mansel RE and Jiang WG: Antagonistic effect of NK4 on HGF/SF induced changes in the transendothelial resistance (TER) and paracellular permeability of human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 192, 268-275 (2002)
- 54) Powell DW: Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241, G275-288 (1981)
- 55) Claude P: Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Memb Biol* 39, 219-232 (1978)
- 56) Claude P and Goodenough DA: Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58, 390-400 (1973)
- 57) Stevenson BR, Anderson JM, Goodenough DA and Mooseker MS: Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J Cell Biol* 107, 2401-2408 (1988)
- 58) Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD and Fromm M: Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115, 4969-4976 (2002)
- 59) Van Itallie C, Rahner C and Anderson JM: Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107, 1319-1327 (2001)
- 60) Yu AS, Enck AH, Lencer WI and Schneeberger EE: Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem* 278, 17350-17359 (2003)
- 61) Inai T, Kobayashi J and Shibata Y: Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 78, 849-855 (1999)