

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20991

研究課題名（和文）喫煙が歯肉上皮のバリア機能に与える影響の探索

研究課題名（英文）The Effects of Smoking on Gingival Epithelial Barrier Function

研究代表者

山賀 俊介（YAMAGA, SHUNSUKE）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50964863

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではタイトジャンクション構成タンパク質に焦点を当て、喫煙がヒト歯肉上皮細胞のバリア機能に与える影響を調べた。その結果、紙たばこから作成したタバコ抽出液が細胞接着分子のひとつである junctional adhesion molecule 1 (JAM1) の局在を細胞膜上から細胞質内へ移行させ、異物透過性を亢進させることを確認した。また、喫煙者の患者より採取したヒト歯周組織サンプルでは、細胞膜上に局在する JAM1 が非喫煙者と比較して減少していた。これらの結果より、喫煙は歯肉上皮に発現する JAM1 の局在移行を惹起し、歯肉上皮バリアを破綻させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、喫煙によりタイトジャンクション関連タンパク質の一つである JAM1 の局在移行を通じて歯肉上皮バリア機構が障害されること、そしてビタミンCを添加した歯肉上皮細胞ではその効果が抑制されることを確認した。喫煙は歯周病の主要なリスク因子であり、喫煙による歯周病発症・進行を抑制するためには、国民の禁煙行動を高めることが最も効果的である。しかし、我が国の喫煙者の割合は減少傾向にあるものの、依然として高い水準で推移している。そのため、禁煙の励行とともに喫煙による歯周組織の破壊メカニズムおよびその抑制因子を解明することは社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Smoking is a significant risk factor of periodontal diseases. However, the molecular mechanisms involved in the negative influence of smoking on gingival epithelium are not fully understood. We have previously shown that junctional adhesion molecule 1 (JAM1) and coxsackievirus and adenovirus receptor 1 (CXADR), tight junction associated proteins, play important role to maintain epithelial barrier function in gingival tissues. In this study, we show that cigarette smoke extract disrupts barrier function of gingival epithelium via JAM1 translocation, allowing bacterial virulence factors to penetrate into subepithelial tissues. In human gingival tissue of smokers, JAM1 apparently lost intercellular localization compared to that of nonsmokers. The present findings would provide the molecular basis for cigarette smoking being as a risk factor of periodontal diseases.

研究分野：予防歯科学

キーワード：歯周病 喫煙 タイトジャンクション 細胞接着

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

喫煙は、歯周病の発症および進行を誘発する主要なリスク因子である。我が国の喫煙者の割合は 16.7% と減少傾向にあるものの、依然として高い水準である(令和元年度 国民健康栄養調査)。喫煙による歯周病発症・進行を抑制するためには、国民の禁煙行動を高めることが最も効果的である。しかし、我が国における禁煙意欲のある喫煙者の割合は 26.1% と低く、さらにその割合は減少傾向が続いている(令和元年度 国民健康栄養調査)。そのため喫煙者の歯周病罹患率および重症化リスクを軽減するためには禁煙の推進とともに、喫煙による歯周組織の破壊メカニズムの解明、および歯周組織の破壊を抑制する方法を見出すことが重要である。

歯肉上皮は、タイトジャンクションを主体とするバリア機能により外来異物の組織内侵入を防ぎ、歯周組織の恒常性の維持に寄与している。歯肉上皮バリアの破綻は歯周病の発症に関与すると考えられる。以前、我々は歯肉上皮細胞が発現するタイトジャンクション構成タンパク質のひとつである junctional adhesion molecule 1 (JAM1) および coxsackievirus and adenovirus receptor (CXADR) が歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* により特異的に分解され、異物透過性が亢進することを報告した (Takeuchi *et al.*, PLoS Pathogens, 2019; Takeuchi, Yamaga *et al.*, Cellular Microbiology, 2021) 本研究では、喫煙が歯肉上皮バリアに与える影響について、タイトジャンクション構成タンパク質に焦点を当て検討を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、歯周病の発症および進行への喫煙の影響を、歯肉上皮防御機構の観点から明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

宿主細胞は、不死化ヒト歯肉上皮細胞 (Immortalized human gingival epithelial: IHGE) 細胞 (Murakami *et al.*, journal of Dental Research, 2002) を用いた。JAM1 およびホタルルシフェラーゼに対する short hairpin RNA (shJAM1 または shLuc) をコードするプラスミドをトランスフェクション試薬 (FuGENE 6 Transfection Reagent, Promega) を用いて形質導入し、それぞれの shRNA を安定発現する歯肉上皮細胞を作製した。

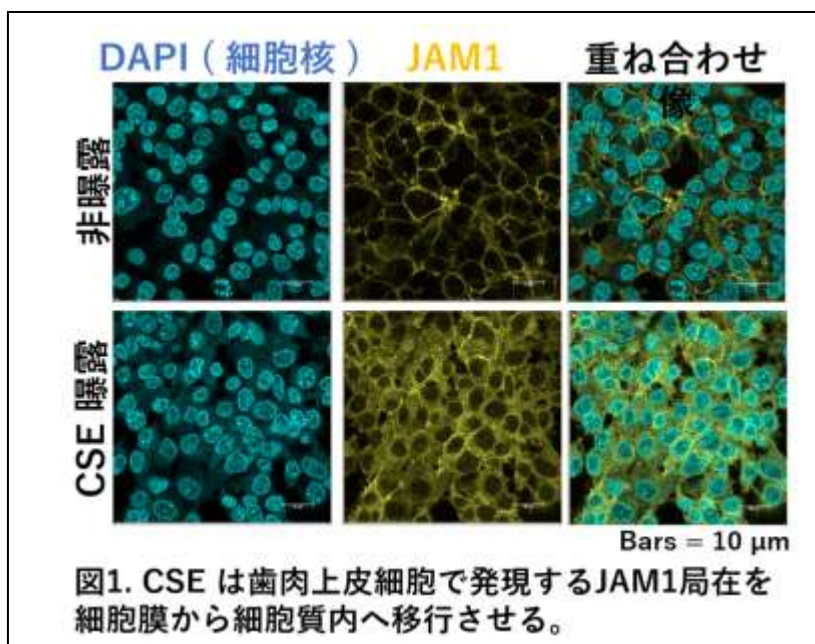
タバコ抽出液 (Cigarette Smoke Extract: CSE) は Humedia KG-2 (Kurabo) に KENT (British American Tobacco Japan), Marlboro (Phillip Morris) または Seven stars (JT) を抽出し作製した。CSE を歯肉上皮細胞に 1 時間曝露後、JAM1 および CXADR の細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。透過性実験は、以前の報告に従って行った (Takeuchi, Sasaki, Yamaga *et al.*, PLoS Pathogens, 2019)。標識トレーサーとして、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* から産生される LPS に FITC 標識したものを使用した。

ヒト歯肉上皮検体の免疫組織化学は、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)。歯肉採取部位の歯周ポケット深さ (probing pocket depth: PPD) は非喫煙者で 3 mm、喫煙者で 2 mm だった。プロービング時の出血は認めなかった。

#### 4. 研究成果

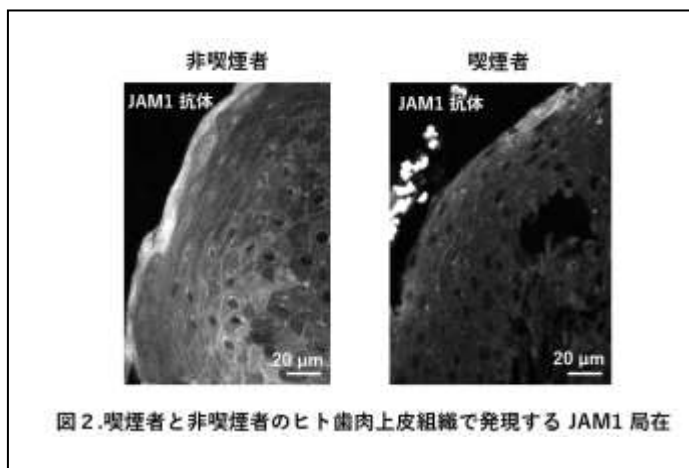
##### (1) CSE は歯肉上皮細胞で発現する JAM1 の局在を細胞膜から細胞質内へ移行させる

以前我々は、歯肉上皮細胞における *junctional adhesion molecule 1* (JAM1) のノックダウンにより、*P. gingivalis* LPS および PGN の透過性が亢進することを報告している (Takeuchi, Sasaki, Yamaga *et al.*, PLoS Pathogens, 2019). そこで本研究ではヒト歯肉上皮細胞に CSE を 1 時間暴露後、JAM1 の局在変化を共焦点顕微鏡にて観察した. その結果、CSE を暴露した歯肉上皮細胞では JAM1 局在が細胞膜から細胞内へ移行した. (図 1).



##### (2) 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

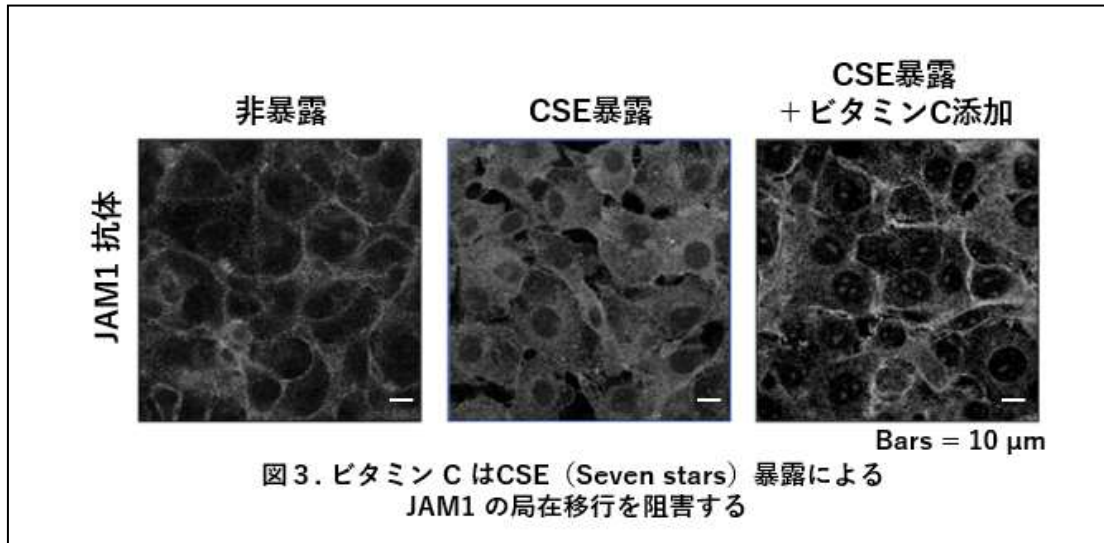
次に、ヒト歯肉組織を用いて、喫煙者および非喫煙者の歯肉における JAM1 の局在を評価した. 歯周炎を伴わない非喫煙者の歯肉標本では、JAM1 は細胞膜状に格子状に局在していた. 一方、喫煙者から採取した歯肉標本では JAM1 は格子状の局在を示さなかった. このことから、喫煙が歯肉上皮における JAM1 の局在を変化させることが示唆された (図 2).



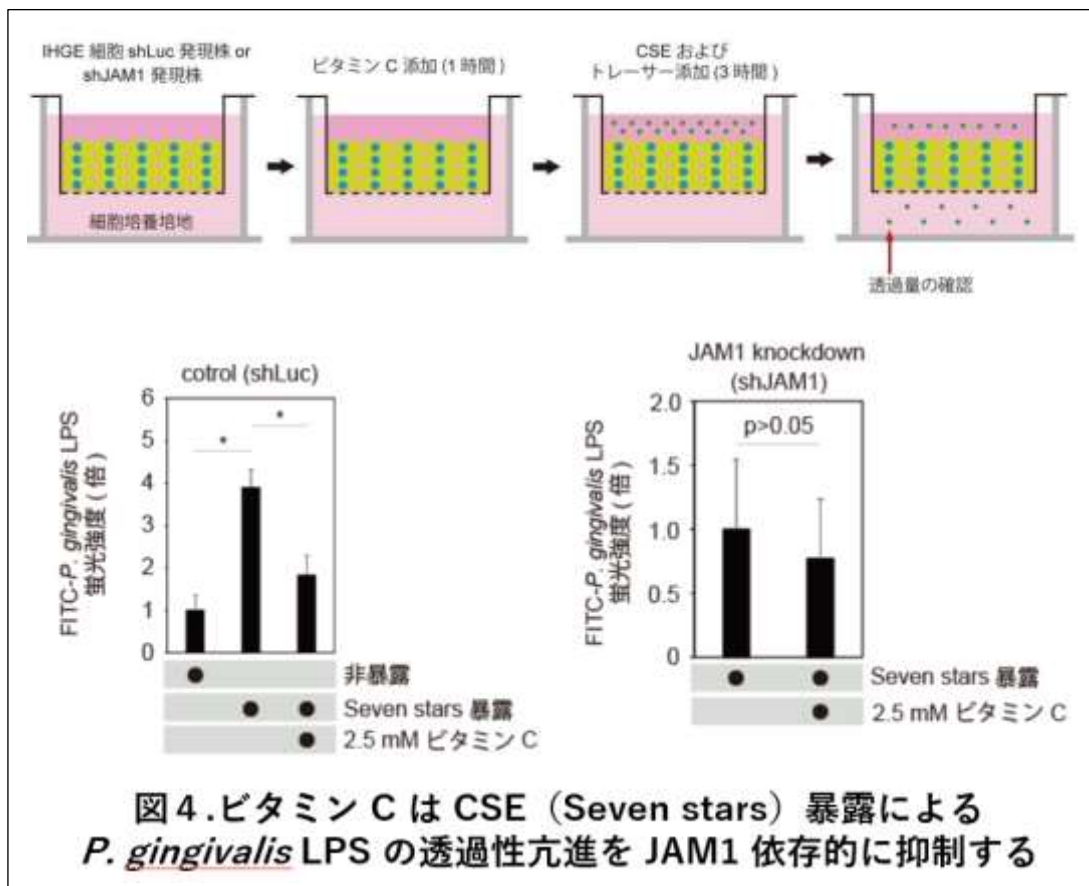
##### (3) ビタミン C は CSE 暴露による歯肉上皮バリアの機能障害を抑制する

喫煙者の血清ビタミン C 濃度と歯周組織検査の指標 (PPD および クリニカルアタッチメントレベル) は逆相関することが報告されている (Yoshihara *et al.*, *Journal of periodontal research*, 2022). そこで、ビタミン C 添加が CSE 暴露による歯肉上皮のバリア機能障害に与える影響について検討した. 歯肉上皮細胞に 2.5 mM のビタミン C を 1 時間添加後、CSE (Seven stars 暴露) を 1 時間暴露した. その後、歯肉上皮細胞における JAM1 局在を共焦点

顕微鏡にて評価した。その結果、ビタミン C を添加した歯肉上皮細胞では、CSE 暴露による JAM1 の局在移行が抑制された (図 3)。



次に、CSE およびビタミン C を添加した三次元歯肉上皮モデルにおける異物透過性の評価を行った。その結果、CSE 暴露により、*P. gingivalis* LPS の透過量が亢進した一方、ビタミン C を添加した歯肉上皮モデルではその効果が抑制された。また、JAM1 をノックダウンした歯肉上皮モデルでは、ビタミン C 添加による *P. gingivalis* LPS 透過量の変化は認めなかった (図 4)。これらの結果より、ビタミン C は CSE 暴露による異物透過性亢進を JAM1 依存的に抑制することが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaga Shunsuke, Tanigaki Keita, Nakamura Eriko, Sasaki Naoko, Kato Yuta, Kuboniwa Masae, Matsusaki Michiya, Amano Atsuo, Takeuchi Hiroki	4. 巻 13
2. 論文標題 Cigarette smoke extract impairs gingival epithelial barrier function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-36366-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山賀俊介、竹内洋輝、天野敦雄
2. 発表標題 タバコ抽出液は歯肉上皮細胞のバリア機能を低下させる
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山賀俊介、谷垣慶太、中村恵理子、竹内洋輝、天野敦雄
2. 発表標題 タバコ抽出液が歯肉上皮細胞のバリア機能に及ぼす影響
3. 学会等名 第134回大阪大学歯学会例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamaga S, Tanigaki K, Nakamura E, Kato Y, Amano A, Takeuchi H
2. 発表標題 Ascorbic acid compensates barrier function of gingival epithelial cells exposed by cigarette smoke extract.
3. 学会等名 15th International Conference of the Asian Academy of Preventive Dentistry (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------