

ニコチンによる口腔上皮における低比重リポタンパク受容体  
およびインターロイキン 8 の発現誘導

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

伊 藤 聖

(指導：宮崎 真至 教授, 浅野 正岳 准教授, 菅野 直之 准教授)

## 概 要

喫煙は、心血管疾患および歯周病の主要な危険因子の一つである。心血管疾患と歯周病の発症に、脂質代謝異常が関与する可能性のあることが多くの報告によって示唆されている。しかし、喫煙、歯周病および脂質代謝異常の三つの因子の関連性についてほとんど知られていない。好士らは、口腔扁平上皮癌細胞株をニコチンで刺激した後、DNA マイクロアレイ法によって網羅的に遺伝子の発現を解析した結果、炎症性サイトカイン、シグナル伝達分子あるいは酵素を含めた多くの遺伝子発現の上昇を認め、とくに low-density lipoprotein receptor (LDLR) 遺伝子発現が約 4 倍に上昇していることを明らかにした。そこで著者は、ニコチンによる LDLR 遺伝子発現誘導のシグナル伝達経路の解明を目的とするとともに炎症性サイトカイン interleukin-8 (IL-8) の発現について検討を加えた。

実験には、口腔扁平上皮癌細胞株である Ca9-22 および HSC-3 を用い、通法に従って培養した。LDLR と nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) のサブユニットの発現は、real-time polymerase chain reaction 法によって測定した。LDLR のタンパク発現は、免疫蛍光染色によって観察した。nAChR が関与する LDLR 誘導は、細胞に nAChR の特異的阻害薬である  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -Btx) を用いて検討した。

LDLR 遺伝子調節領域を組み込んだプラスミド (WT) を用いルシフェラーゼアッセイを行った。WT のプラスミドを使用して、Region1, 2 および 3 (R1, R2 および R3) を欠く欠失変異体を作製し、ルシフェラーゼアッセイに供した。

specificity protein 1 transcription factor (Sp1) の機能的な重要性については Ca9-22 をミトマイシンによる前処理によって、また Sp1 に対する siRNA トランスフェクションによって検討した。

LDLR 遺伝子調節領域における Sp1 と R3 の特異的結合は、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) およびストレプトアビジンアガロース沈降法に続くウェスタンブロットティングによって検討した。

歯肉上皮組織における LDLR タンパク発現については、喫煙者および非喫煙者から採取した歯肉上皮組織を使用し、免疫蛍光染色を行うことによって観察した。

ニコチン刺激による IL-8 発現の誘導は、培養上清を用いた enzyme-linked immunosorbent assay によって測定した。

その結果、ニコチン刺激が LDLR の発現に及ぼす影響では、100  $\mu$ M のニコチン刺激でコントロールに比べて 2.2 倍の発現増加が認められ、HSC-3 においても同様な発現増加が認められた。さらに、Ca9-22 をニコチンで 12 時間刺激した後に免疫蛍光染色したところ、LDLR の有意な発現増強が確認された。

Ca9-22 と初代培養ヒト歯肉上皮細胞の両方で、nAChR の  $\alpha$ 7 サブユニットの発現が認められ、これに対する特異的阻害薬である  $\alpha$ -Btx による前処理で、 $\alpha$ -Btx の濃度依存的に LDLR 遺伝子の発現は減少した。

LDLR 遺伝子調節領域を用いたルシフェラーゼアッセイでは、ニコチン添加によってルシフェラーゼ活性が増加し、3 時間後にコントロールの 2.8 倍となり、6 時間後まで維持されていた。R1 欠失変異体において、ニコチン刺激によるルシフェラー

ゼ活性の変化は認められず、R2 欠失変異体ではコントロールの 2.7 倍に増加した。

一方、R3 欠失変異体においては、ニコチン刺激の有無にかかわらず、WT と比較してルシフェラーゼ活性の著明な減少が認められた。

Sp1 の特異的阻害薬であるミトラマイシンによる処理で、ルシフェラーゼ活性がミトラマイシンの濃度依存的に減少した。さらに、siRNA による RNA サイレンシングにおいても、LDLR 遺伝子の発現は siRNA の濃度依存的に減少した。

Sp1 と R3 の結合については、ニコチンで刺激された細胞の核抽出物と R3 プロローブを泳動した場合にのみ移動度の遅いバンドが検出された。また、R2 プロローブを用いた EMSA においてもバンドが検出されたが、ウエスタンブロットティングから、Sp1 の結合は R3 のみに確認された。

非喫煙者の歯肉上皮組織では、主にケラチン層と有棘層で LDLR の弱い発現が観察された。一方、喫煙者の歯肉組織では、上皮全層の細胞膜に LDLR の強い発現が観察された。

ニコチンによる IL-8 発現は、ニコチン刺激後、24 時間で未刺激群の 45.2 倍、48 時間で 98.2 倍に上昇した。

以上のように、本実験の結果から、ニコチンは Ca9-22 の細胞膜表面に発現している nAChR を介しシグナル伝達を引き起こし、LDLR の発現を転写レベルで誘導することが明らかとなり、この現象は喫煙者の歯肉上皮組織においても確認された。

なお、本論文は原著論文 Ito S, Gojoubori T, Tsunoda K, Yamaguchi Y, Asano M, Goke

E, Koshi R, Sugano N, Yoshinuma N, Komiyama K, Ito K. Nicotine-induced expression of low-density lipoprotein receptor in oral epithelial cells. PLoS ONE 2013; 8: e82563 を基幹論文とし、これに口腔扁平上皮癌細胞株による IL-8 の発現について検討した新たな実験データを加えることによって総括したものである。

## 緒 言

喫煙は肥満、動脈硬化、クローン病あるいは歯周病発症における重要なリスクファクターとされている<sup>1-3)</sup>。タバコの煙には、7,000 以上の化学物質が含まれており、その中でも、とくにニコチンについては、生体に及ぼす作用について報告されている<sup>4)</sup>。ニコチンは、カテコールアミンの放出を誘発することによって血圧を上昇させ<sup>4)</sup>、また、ニコチンは nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) を介してアテローム性プラークの成長因子である血管平滑筋細胞の増殖を誘発するとともに、病的な血管新生作用によってプラーク形成に関与することで脂質代謝に影響を与えている<sup>5)</sup>。このようなニコチンの生体に対する影響は、アテローム性動脈硬化症の病態形成過程を促進するとされているものの、その直接的な関連性については明らかにされていない。

好士ら<sup>6)</sup>は、口腔扁平上皮癌細胞株をニコチンで刺激した後、DNA マイクロアレイ法によって網羅的に遺伝子の発現を解析した結果、炎症性サイトカイン、シグナル伝達分子あるいは酵素を含めた多くの遺伝子発現の上昇を認め、とくに low-density lipoprotein receptor (LDLR) 遺伝子発現が約 4 倍に上昇していることを明らかとした。しかし、ニコチンによる LDLR シグナル伝達の詳細は未だ明らかにされていない。

そこで著者は、ニコチンによる LDLR 遺伝子発現誘導のシグナル伝達経路の解明を目的とするとともに炎症性サイトカイン interleukin-8 (IL-8) の発現について検討した。

## 材料および方法

### 1. 細胞培養

実験には、口腔扁平上皮癌細胞株である Ca9-22 および HSC-3 (ヒューマンサイエンス研究資源バンク) を用いた。細胞の培養は、10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS), 1% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液を含む RPMI 1640 medium 溶液中で通法に従って 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 37°C で行った。細胞を  $2 \times 10^5$  cells/ml の濃度で播種し、ニコチン (Sigma) を 10, 100, 1,000 および 5,000  $\mu$ M の濃度で添加し、3 時間後にトータル RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。

### 2. real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) 法による分析

DNA マイクロアレイ解析の結果を検証するために、Ca9-22 および HSC-3 からトータル RNA の 1  $\mu$ g を Superscript III 逆転写酵素を用いて cDNA を作製した後、real-time PCR 法を行った<sup>7)</sup>。実験に用いた LDLR プライマー (Takara) の配列を Table 1 に示す。

Light Cycler Nano (Roche Applied Science) 検出システムを用いて、95°C, 10 分間 (1 サイクル) の加熱後、95°C, 10 秒および 60°C, 30 秒 (45 サイクル) の条件で増幅し、発現の強度はハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) および  $\beta$ -actin の増幅量で補正し、相対的な割合で表した。

nAChR のサブユニットを検出するために、Table 1 に示したプライマーを用いて

real-time PCR 法を行った。初代培養ヒト歯肉上皮細胞の採取は、日本大学歯学部倫理委員会の承認 (承認番号 2013-01) を得て、十分な倫理的配慮のもとに行った。Ca9-22 および初代培養ヒト歯肉上皮細胞のトータル RNA を抽出し、real-time PCR 法によって nAChR サブユニットの検出を行った。

遺伝子サイレンシングを行うために、specificity protein 1 transcription factor (Sp1) siRNA (Agilent Technologies) とコントロール siRNA (Agilent Technologies) に RNAi/MAX (Life Technologies) を添加して、Ca9-22 にトランスフェクションした。その後、細胞をニコチン濃度 100  $\mu\text{M}$  で刺激し、トータル RNA を抽出し、real-time PCR 法によって LDLR の検出を行った。また、siRNA のサイレンシング効果を、real-time PCR 法を用いて評価した。

### 3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Ca9-22 を、24 穴プレートに  $2 \times 10^5$  cells/ml の濃度で播種し、100  $\mu\text{M}$  のニコチンを添加して培養 24 および 48 時間後の培養上清中の IL-8 タンパク量を、Quantikine IL-8 ELISA Kit (R&D Systems) を用いて測定した。

### 4. LDLR 遺伝子の 5'-UTR のクローニングとルシフェラーゼアッセイ

LDLR の遺伝子調節領域を増幅した断片を、pGL4-basic ベクター の SacI と NheI 部位にサブクローニングを行い、このプラスミドを Wild type (WT) とした。WT プラスミドを使用して、Region1, 2 および 3 (R1, R2 および R3) を欠く欠失変異体を



Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を用いて作製した (Fig. 3A)。

Ca9-22 を 48 穴プレート に  $1 \times 10^5$  cells/ml の濃度で播種し, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 37°C で 18 時間培養した。細胞は, Lipofectamine (Life Technologies) を使用し, ルシフェラーゼリポーターベクターおよび内因性コントロールとして pRL-CMV ベクター (Promega) を Ca9-22 にダブルトランスフェクションした。処理後, 細胞を 100 μM ニコチンで 3 時間刺激した。

次いで, 転写因子 Sp1 が LDLR 発現に及ぼす影響について検討するために, トランスフェクションした細胞にミトラマイシン (和光純薬工業) の濃度を 0, 1 および 10 μM として 1 時間処理した後にニコチン刺激後 3 時間でルシフェラーゼ活性を測定した。

なお, ルシフェラーゼ活性はデュアルルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を用いて測定した。

## 5. 免疫蛍光染色

歯肉上皮組織は, 日本大学歯学部倫理委員会の承認を得て (承認番号 2011-24) 付属歯科病院に通院する患者から歯周外科手術を行った際に採取したものをを用いた。なお, 患者の概要については Table 2 に示した。

切除された組織は, 直ちに 5% 酢酸エタノールに浸漬して 18 時間固定した。次いで, パラフィン包埋を行って 4 μm の標本を作製し, 脱パラフィン後, 1% BSA/PBS

で 1 時間ブロッキングした。次いで、抗ヒト LDLR 抗体 (Santa Cruz) によって室温で 18 時間反応させた。次いで、FITC ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) で 2 時間反応させた後、TO-PRO-3 (Life Technologies) を用いて核染色を行った。染色強度の判断基準としては、0: 染色なし、1: ケラチン層のみ、2: ケラチン層と有棘層および 3: 全層とした。

Ca9-22 は、細胞をカバースリップ上に播種し、12 時間ニコチン 100  $\mu\text{M}$  で刺激した後、同様に免疫蛍光染色を行った。

## 6. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

核抽出液は、ニコチン刺激あるいは未刺激の Ca9-22 から Trans Factor Extraction Kit (Clontech Laboratories) を使用して精製した。タンパク質の濃度は、Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いて測定した。核抽出物 4  $\mu\text{g}$  を EMSA Kit (Affimetrix) を用いて混合して、5 分間室温で反応させた。次いで、ビオチン標識プローブ (FASmac) を加えて、15°C で 30 分間反応させた。非標識プローブによるビオチン標識プローブの競合的阻害を確認するために、非標識プローブを上記反応液に混合し、室温で 5 分間前反応させた後、ビオチン標識プローブを添加した。サンプルは、6% ポリアクリルアミドゲルに電気泳動させ、ナイロンメンブレン (Roche Applied Science) にトランスファーした。ストレプトアビジン HRP (Bio-Rad) は、1% BSA-PBST で 1,000 倍希釈したものを用いた。

ストレプトアビジンアガロース沈降法については、核抽出物に、ビオチン標識 R2

および R3 プローブを混合した。次いで、ストレプトアビジンアガロースを 10  $\mu$ l 添加し、4°C で 18 時間沈降させて、ウエスタンブロッティングを行った。抗ヒト Sp1 抗体 (Santa Cruz) を 1 次抗体として、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Bio-Rad) を 2 次抗体として、1% BSA-PBST でそれぞれ 1,000 倍希釈と 5,000 倍希釈にしたものを用いた。

## 7. 統計学的分析

real-time PCR 法, ルシフェラーゼアッセイおよび ELISA においては, one-way ANOVA およびボンフェローニ多重比較検定法を用い, 染色スコアについては student *t*-test を用いて有意水準を 5% の条件で統計学的検討を行った。

## 結 果

### 1. ニコチンによる LDLR 発現誘導

ニコチン刺激が Ca9-22 の LDLR 発現に及ぼす影響では, 100  $\mu\text{M}$  のニコチン刺激でコントロールに比べて 2.2 倍の LDLR の発現増加が認められた (Fig. 1A)。発現は 1,000  $\mu\text{M}$  で減少し, 5,000  $\mu\text{M}$  ではほとんど検出されなかった。LDLR 発現を, 100  $\mu\text{M}$  のニコチンで 0.5, 1, 3, 6, 8 および 12 時間刺激した結果, 3 時間で 2.4 倍, 6 時間で 4.9 倍および 12 時間で 15.1 倍となった (Fig. 1B)。HSC-3 においても, 同様な LDLR の発現増加が認められ, 3 時間刺激後に強い発現が認められ, 6 時間まで継続した (Fig. 1C)。ニコチンの暴露時間が LDLR 遺伝子の発現誘導に及ぼす影響では, LDLR 発現レベルは 5 時間で 7.8 倍であった (Fig. 1D)。さらに, Ca9-22 をニコチンで 12 時間刺激した後に免疫蛍光染色したところ, LDLR の有意な発現増強が確認された (Fig. 1E)。

### 2. nAChR の発現

nAChR の各サブユニットの発現レベルでは, Ca9-22 と初代培養ヒト歯肉上皮細胞の両方で, nAChR の  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットの発現が認められた (Fig. 2A)。nAChR の特異的阻害薬である  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -Btx) を 0.1, 1 および 10  $\mu\text{M}$  で前処理したところ,  $\alpha$ -Btx の濃度依存的に LDLR 遺伝子の発現は減少した (Fig. 2B)。

### 3. LDLR 発現の転写調節

Ca9-22 のルシフェラーゼ活性は、ニコチン添加によって増加し、1 時間後に有意差が認められ、3 時間後に 2.8 倍となり、以後 6 時間後まで維持されていた (Fig. 3B)。WT へのニコチン刺激によって 1.6 倍のルシフェラーゼ活性の増加が認められた。R1 欠失変異体において、ニコチン刺激によるルシフェラーゼ活性の変化は認められず、R2 欠失変異体ではコントロールの 2.7 倍に増加した。一方、R3 欠失変異体においては、ニコチン刺激の有無にかかわらず、WT と比較してルシフェラーゼ活性の著明な減少が認められた (Fig. 3C)。

### 4. ニコチンによる LDLR 発現における Sp1 の関与

Ca9-22 はミトラマイシン非存在下でニコチン刺激を加えるとルシフェラーゼ活性が 2 倍となった。一方、ミトラマイシンを添加した条件では、ルシフェラーゼ活性が濃度依存的に減少し、ミトラマイシン 1  $\mu\text{M}$  では増加した活性を約 50% 阻害した (Fig. 4A)。LDLR mRNA の発現はコントロール siRNA をトランスフェクトした細胞では 100  $\mu\text{M}$  のニコチン刺激によって 9.6 倍となったのに対し、Sp1 siRNA をトランスフェクトした細胞においては濃度依存的に減少した (Fig. 4B)。Sp1 発現に対する siRNA のサイレンシング効果は、real-time PCR 法で評価し、Sp1 遺伝子がノックダウンされているのを確認した (Fig. 4C)。

### 5. EMSA による Sp1 と R3 の結合の検討

非刺激の核抽出物とビオチン標識 R3 プローブを泳動したレーン 1 では移動度の遅いバンドは検出されず、ニコチンで刺激された細胞の核抽出物とビオチン標識 R3 プローブを泳動したレーン 2 には上方にバンドが検出された。これに非標識 R3 プローブを加えると、レーン 3 のバンドは完全に消失した (Fig. 5A 左)。また、ビオチン標識 R2 プローブを用いた EMSA においてもバンドが検出された (Fig. 5A 右)。ウエスタンブロッティングからは、Sp1 は核抽出物をビオチン標識 R3 プローブと混合したレーン 2 の時のみに検出され、非標識プローブを添加したレーン 3 では減少した (Fig. 5B 上段)。一方、Sp1 はビオチン標識 R2 プローブでは検出されなかった (Fig. 5B 下段)。

## 6. 歯肉上皮組織における LDLR の発現

非喫煙者の歯肉上皮組織では、主にケラチン層と有棘層で LDLR の弱い発現が観察された (Fig. 6 上段)。一方、喫煙者の歯肉組織では、上皮全層の細胞膜に LDLR の強い発現が観察された (Fig. 6 下段)。

## 7. ニコチンによる IL-8 の誘導

ニコチンが炎症に及ぼす影響では、100  $\mu$ M ニコチン刺激によって Ca9-22 の IL-8 発現は 24 時間後で未刺激群の 45.2 倍、48 時間後で 98.2 倍に上昇した (Fig. 7)。

## 考 察

一般に、血清中のニコチン濃度は、喫煙者で 30~40 ng/ml, 非喫煙者で 2.5~8.0 ng/ml とされている<sup>8)</sup>。本実験では、ニコチン濃度が LDLR の発現に及ぼす影響を検討し、以後の実験におけるニコチン濃度を 100  $\mu$ M とした。これは、血清中の濃度より約 5~60 倍高い値であるが、喫煙時の口腔内濃度<sup>9,10)</sup>を参考として設定した。

ニコチンが生体の生理機能に及ぼす影響に関しては、nAChR 依存性または非依存性の両経路を介して作用するとされている<sup>11)</sup>。nAChR は、5 つのサブユニットからなる 5 量体のリガント依存型イオンチャネルであり、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> および Ca<sup>2+</sup> が透過する。サブユニットである  $\alpha 2, 3, 5, 7, 9, \beta 2$  および 4 は、口腔上皮細胞に発現しておりニコチンのシグナルを伝達する<sup>12-18)</sup>。本実験において、nAChR 阻害薬の  $\alpha$ -Btx を添加した結果、ニコチンによる LDLR の発現が抑制されたことは、nAChR 依存性のシグナル伝達である可能性を示唆するものである。 $\alpha$ -Btx は、nAChR の  $\alpha 7$  サブユニットのアンタゴニストで、その下流のシグナル伝達を阻害する<sup>14,19)</sup>。nAChR の下流のシグナルは、いくつかの異なる経路によって伝達されるが、現在までにニコチン刺激が nAChR を介して LDLR 発現を上昇させたという報告はなく、本研究が初めてである。

さらに、LDLR の 5'-UTR を用いたルシフェラーゼアッセイの結果、この領域に存在する R3 に転写因子 Sp1 が結合し、これによって LDLR 遺伝子発現が増強されることが明らかとなった。これは、ミトラマイシン処理および Sp1 に対する siRNA

トランスフェクションが、それぞれ LDLR のプロモーター活性と遺伝子発現レベルで減少させたことによっても確認された。また、従来 R1 は転写を抑制するとされているが<sup>20)</sup>、本実験においても同様の結果が得られた。EMSA の結果から、R2 に結合するバンドの存在が確認されたが、ウエスタンブロッティングの結果からは、このバンドが Sp1 ではないことが明らかとなった。これは、R2 が sterol regulatory element binding proteins (SREBP) 結合領域であるとする報告<sup>21)</sup>と一致するものであるが、SREBP の関与についてはさらなる検討が必要と考えられた。

LDLR の基本的役割は、coated pit でのエンドサイトーシスを介して血中 LDL を吸収することである。LDL は、リソソームに運搬され、コレステロールに分解される。コレステロールは細胞膜の必須成分であり、細胞内のコレステロール濃度は厳密に維持されている<sup>22)</sup>。本実験の結果では、ニコチンが口腔上皮細胞において LDLR の発現を増大させた。動脈硬化の初期段階では、血管内膜に LDL の沈着が生じ、沈着した LDL は酸化し、特異的な受容体を発現するマクロファージによって吸収されプラークを形成する<sup>23)</sup>。動脈硬化巣と同様に、歯肉溝においても局所で LDL の酸化が起こると考えられる。したがって、口腔上皮細胞における LDLR の過剰な発現は、LDL の取り込みを顕著に増加させ、マクロファージの遊走や口腔上皮細胞の細胞死を引き起こす可能性がある。また、本研究ではニコチンによる、口腔扁平上皮癌細胞株での IL-8 の産生の増加をもたらすことが示された。ニコチンが IL-8 の局所における産生増加を促し、炎症細胞の遊走を促進することで歯周組織を破壊し、歯周病の病態形成に関与する可能性も示唆された。



以上のように、本実験の結果から、ニコチンは Ca9-22 の細胞膜表面に発現している nAChR を介してシグナル伝達を引き起こし、LDLR の発現を転写レベルで誘導することが明らかとなった。さらに、この現象は喫煙者の歯肉上皮組織においても確認され、このことからニコチンが歯周疾患の増悪因子となることが示された。

## 結 論

ニコチンが口腔上皮細胞に対して LDLR の発現に及ぼす影響を調べるとともに、そのシグナル伝達機構について検討した結果、以下の結論を得た。

1. ニコチン刺激は、口腔扁平上皮癌細胞株の LDLR の遺伝子およびタンパク発現を誘導した。
2. ニコチンによる LDLR 発現の上昇は、nAChR 依存性であった。
3. LDLR のプロモーターの解析から、R3 が LDLR 発現に必須であった。
4. LDLR のプロモーターの活性化には、R3 への転写因子 Sp1 の結合が関与していた。
5. 喫煙者の歯肉上皮組織では、非喫煙者に比べ LDLR 発現が増加していた。
6. ニコチン刺激は、口腔扁平上皮癌細胞株の IL-8 タンパク産生を増加させた。

## 謝 辞

本研究遂行にあたり、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座 宮崎真至教授および日本大学歯学部病理学講座 浅野正岳准教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言をいただきました歯科保存学第Ⅲ講座菅野直之准教授および同講座の皆様深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA (2005) Mechanisms of action of environmental factors-tobacco smoking. *J Clin Periodontol* 32, 180-195.
- 2) Laxman VK, Annaji S (2008) Tobacco use and its effects on the periodontium and periodontal therapy. *J Contemp Dent Pract* 9, 97-107.
- 3) van der Heide F, Dijkstra A, Weersma RK, Albersnagel FA, van der Logt EM, Faber KN, Sluiter WJ, Kleibeuker JH, Dijkstra G (2009) Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 15, 1199-1207.
- 4) Lee J, Cooke JP (2012) Nicotine and pathological angiogenesis. *Life Sci* 91, 1058-1064.
- 5) Santanam N, Thornhill BA, Lau JK, Crabtree CM, Cook CR, Brown KC, Dasgupta P (2012) Nicotinic acetylcholine receptor signaling in atherogenesis. *Atherosclerosis* 225, 264-273.
- 6) 好士亮介, 菅野直之, 難波幸一, 大塩薫里, 伊藤公一 (2007) ニコチンがヒト歯肉上皮細胞に及ぼす遺伝子発現変化のマイクロアレイ解析. *日大歯学* 81, 571-576.
- 7) Omagari D, Takenouchi-Ohkubo N, Endo S, Ishigami T, Sawada A, Moro I, Asano M, Komiyama K (2011) Nuclear factor kappa B plays a pivotal role in polyinosinic-polycytidylic acid-induced expression of human  $\beta$ -defensin 2 in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 165, 85-93.

- 8) Yildiz D (2004) Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol* 43, 619-632.
- 9) Lindell G, Farnebo LO, Chen D, Nexø E, Rask Madsen J, Bukhave K, Graffner H (1993) Acute effects of smoking during modified sham feeding in duodenal ulcer patients. An analysis of nicotine, acid secretion, gastrin, catecholamines, epidermal growth factor, prostaglandin E<sub>2</sub>, and bile acids. *Scand J Gastroenterol* 28, 487-494.
- 10) Ryder MI, Fujitaki R, Lebus S, Mahboub M, Faia B, Muhaimin D, Hamada M, Hyun W (1998) Alterations of neutrophil L-selectin and CD18 expression by tobacco smoke: implications for periodontal diseases. *J Periodontol* 33, 359-368.
- 11) Dunckley T, Lukas RJ (2003) Nicotine modulates the expression of a diverse set of genes in the neuronal SH-SY5Y cell line. *J Biol Chem* 278, 15633-15640.
- 12) Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndoye A, Jolkovsky DL, Webber RJ, Buchli R, Grando SA (2000) Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res* 79, 939-949.
- 13) Nguyen VT, Ndoye A, Grando SA (2000) Novel human  $\alpha 9$  acetylcholine receptor regulating keratinocyte adhesion is targeted by Pemphigus vulgaris autoimmunity. *Am J Pathol* 157, 1377-1391.
- 14) Arredondo J, Nguyen VT, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2001) A receptor-mediated mechanism of nicotine toxicity in oral keratinocytes. *Lab Invest* 81, 1653-1668.

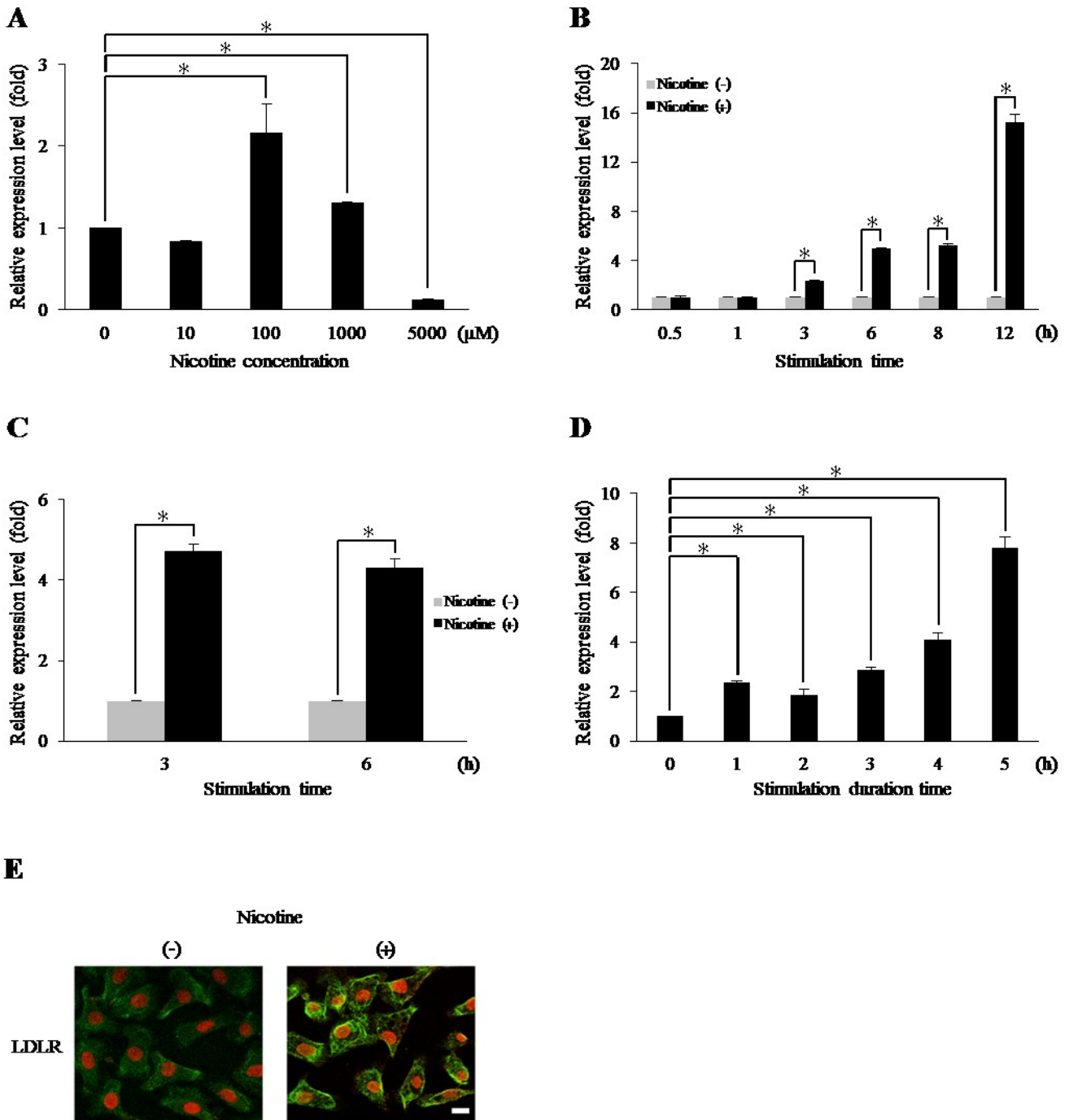
- 15) Arredondo J, Chernyavsky AI, Marubio LM, Beaudet AL, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2005) Receptor-mediated tobacco toxicity: regulation of gene expression through  $\alpha 3 \beta 2$  nicotinic receptor in oral epithelial cells. *Am J Pathol* 166, 597-613.
- 16) Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2007) Receptor-mediated tobacco toxicity: alterations of the NF- $\kappa$ B expression and activity downstream of  $\alpha 7$  nicotinic receptor in oral keratinocytes. *Life Sci* 80, 2191-2194.
- 17) Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Eksomtramate M, Rerkyen P, Phairat B, Schaecher KE, Fukuda MM, Pichyangkul S (2009) Cigarette smoke extract modulates human  $\beta$ -defensin-2 and interleukin-8 expression in human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res* 44, 557-564.
- 18) Kashiwagi Y, Yanagita M, Kojima Y, Shimabukuro Y, Murakami S (2012) Nicotine up-regulates IL-8 expression in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1  $\beta$  or *P. gingivalis* lipopolysaccharide via nicotinic acetylcholine receptor signalling. *Arch Oral Biol* 57, 483-490.
- 19) Arredondo J, Chernyavsky AI, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando SA (2006) Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of  $\alpha 7$  nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J* 20, 2093-2101.
- 20) Peeters AV, Kotze MJ, Scholtz CL, De Waal LF, Rubinsztein DC, Coetzee GA, Zuliani G, Streiff R, Liu J, van der Westhuyzen DR (1998) A3-basepair deletion in repeat 1 of the

LDL receptor promoter reduces transcriptional activity in a South African Pedi. *J Lipid Res* 39, 1021-1024.

21) Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.

22) Goldstein JL, Brown MS (2009) The LDL Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 431-438.

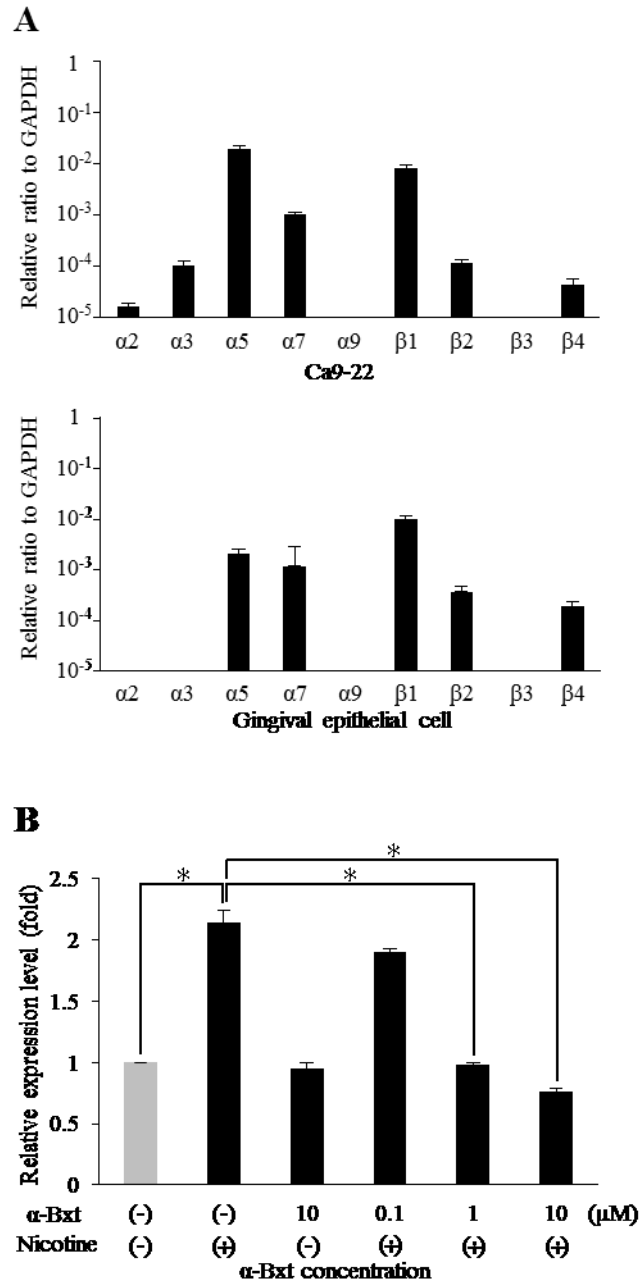
23) Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M (2001) Role of oxidized LDL in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 947, 199-206.



**Fig. 1** 口腔上皮癌細胞株におけるニコチンによる LDLR の発現誘導

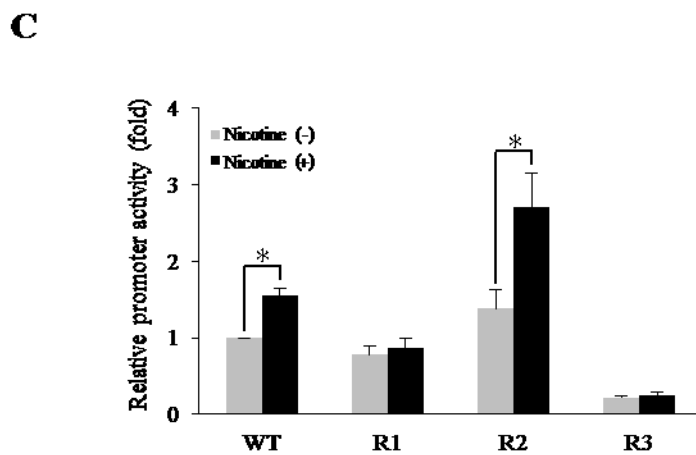
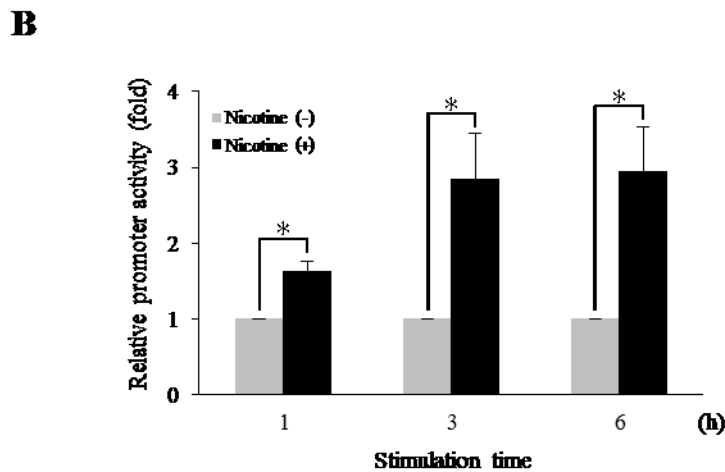
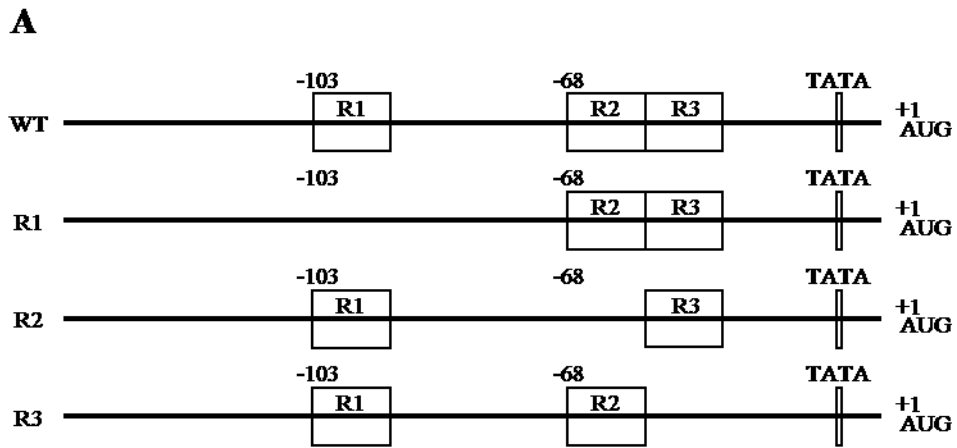
Ca9-22 を種々の濃度のニコチン存在下で 3 時間刺激した (A)。100  $\mu\text{M}$  のニコチン刺激による LDLR の経時的発現変化 (B)。HSC-3 は 100  $\mu\text{M}$  のニコチンで 3 および 6 時間刺激した (C)。LDLR 発現誘導に必要なニコチン刺激時間についての検討 (D)。それぞれの実験は 3 回行った。\* $p < 0.05$ 。Ca9-22 を 100  $\mu\text{M}$  ニコチン存在下または非存在下で 12 時間刺激した後に、LDLR 発現を免疫蛍光染色により観察した (E)。緑: LDLR, 赤: 核, スケールバー (白線): 10  $\mu\text{m}$ 。





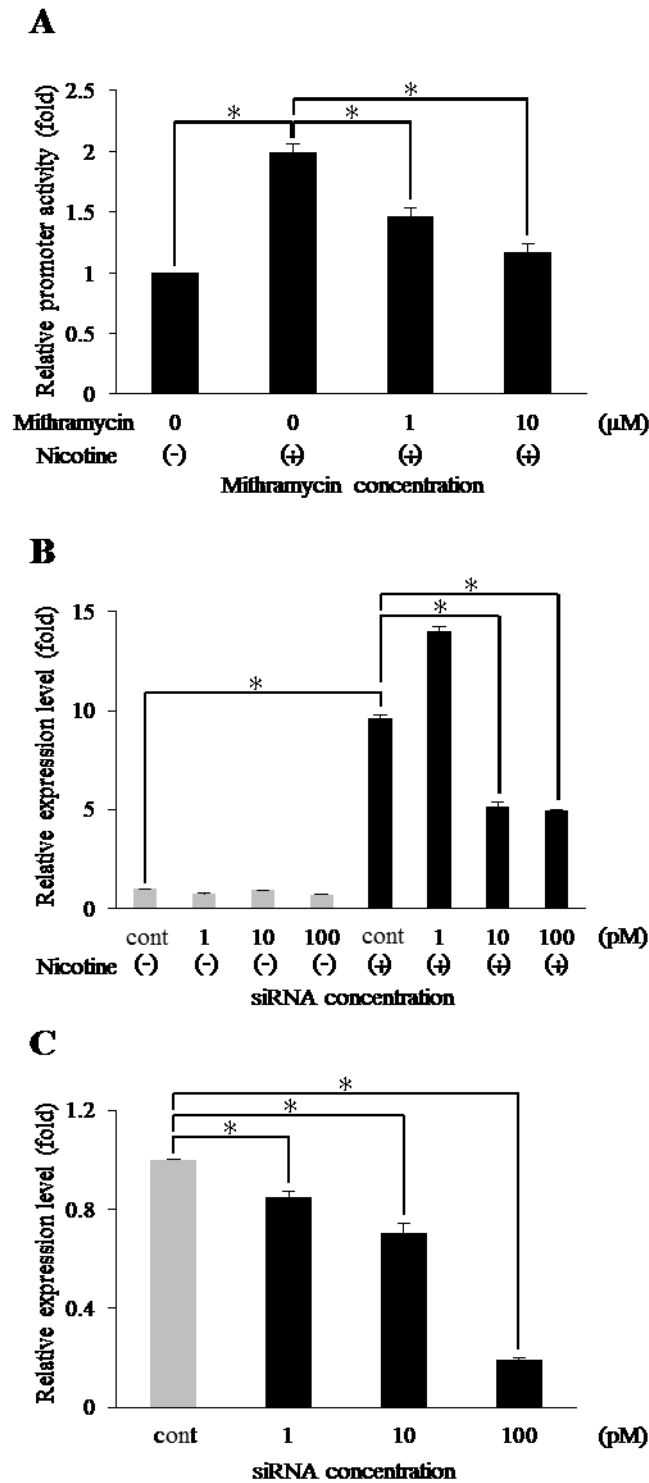
### Fig. 2 nAChR の発現

Ca9-22 および初代培養ヒト歯肉上皮細胞の nAChR サブユニット発現を, real-time PCR 法により検討した (A)。Ca9-22 を 1 時間  $\alpha$ -Btx 存在下または非存在下で培養し, 細胞を洗浄した後, 3 時間 100  $\mu\text{M}$  のニコチン存在下で培養した。LDLR 発現は, real-time PCR 法により検討した (B)。それぞれの実験は 3 回行った。\* $p < 0.05$ 。



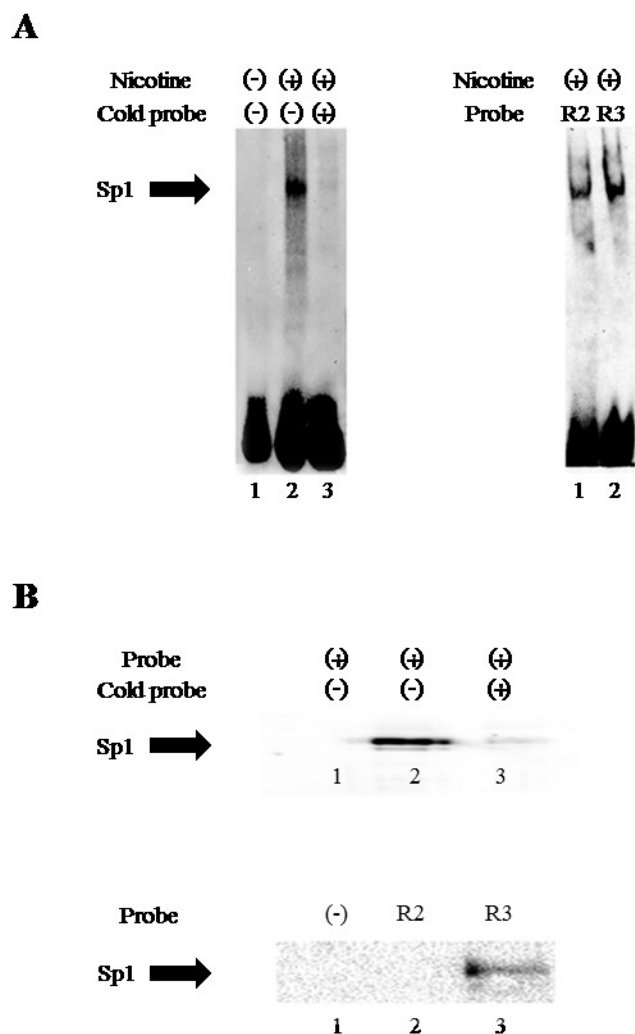
**Fig. 3 LDLR 遺伝子調節領域における R1, R2 および R3 の関与の検討**

LDLR 遺伝子の 5'-UTR の概略図を示す。それぞれ 16 bp からなる R1, R2 および R3 は転写開始点を 1 とした時 -103 から -68 に位置に存在する。WT は野生型構造を示し, R1, R2 および R3 のそれぞれの欠失変異体の構造を示した (A)。WT において 1, 3 および 6 時間でルシフェラーゼ活性を測定した (B)。WT, R1, R2 および R3 において 3 時間刺激後, ルシフェラーゼ活性を測定した (C)。それぞれの実験は 3 回行った。\* $p < 0.05$ 。



**Fig. 4** ニコチンによる LDLR 発現誘導における Sp1 の関与

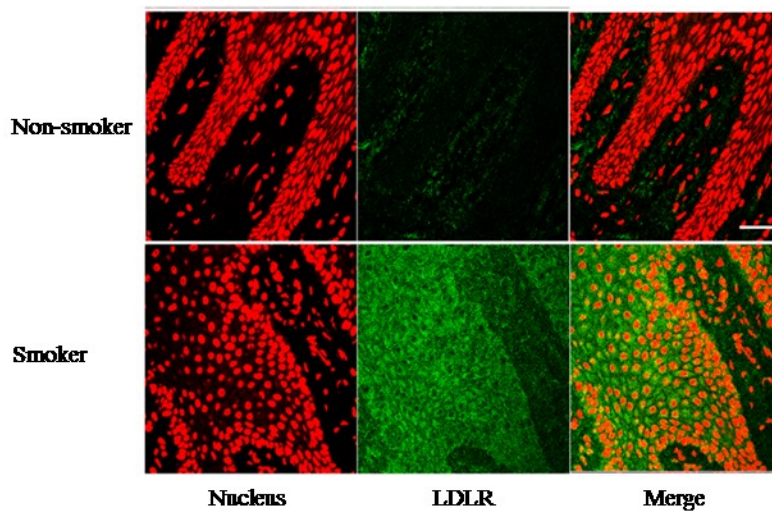
Ca9-22 にミトラマイシンの濃度を 0, 1 および 10 μM として 1 時間処理した後、ニコチンで刺激してルシフェラーゼ活性を測定した (A)。Ca9-22 に Sp1 siRNA とコントロール siRNA (cont) をトランスフェクションした後、100 μM のニコチンで 3 時間刺激した。LDLR 発現は、real-time PCR 法により検討した (B)。siRNA のサイレンシング効果を、real-time PCR 法を用いて評価した (C)。それぞれ実験は 3 回行った。  
\* $p < 0.05$ 。



**Fig. 5 EMSA による Sp1 と R3 の結合の検討**

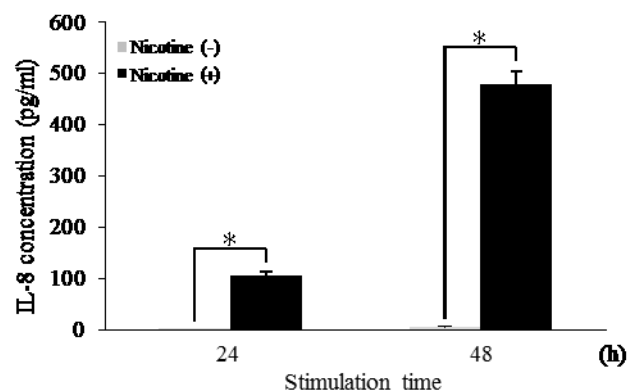
A: R3 プローブを用いた EMSA。レーン 1: ニコチン非刺激核抽出物とビオチン標識 R3 プローブ。レーン 2: ニコチン刺激核抽出物とビオチン標識 R3 プローブ。レーン 3: ニコチン刺激核抽出物、ビオチン標識および非標識 R3 プローブ (Cold probe) (A 左)。レーン 1: ニコチン刺激核抽出物とビオチン標識 R2 プローブ。レーン 2: ニコチン刺激核抽出物とビオチン標識 R3 プローブ (A 右)。

B: ストレプトアビジンアガロース沈降法に続くウエスタンブロッティング。レーン 1: 核抽出物なし。レーン 2: ニコチン刺激核抽出物とビオチン標識 R3 プローブ。レーン 3: ニコチン刺激核抽出物とビオチン標識および非標識 R3 プローブ (B 上段)。レーン 1: ニコチン刺激核抽出物のみ。レーン2: ニコチン刺激核抽出物とビオチン標識 R2 プローブ。レーン 3: ニコチン刺激核抽出物とビオチン標識 R3 プローブ (B 下段)。



**Fig. 6** 歯肉上皮組織における LDLR の発現

喫煙者または非喫煙者から歯肉組織を切除し、5% 酢酸エタノールで固定した。パラフィン包埋後、4  $\mu\text{m}$  の薄切標本を作製し、免疫蛍光染色を行った。緑: LDLR, 赤: 核, スケールバー (白線): 50  $\mu\text{m}$ 。



**Fig. 7** ニコチンによる IL-8 の誘導

Ca9-22 を 100  $\mu\text{M}$  のニコチン存在下または非存在下で 24 時間 および 48 時間培養後、培養上清を回収し、IL-8 濃度を ELISA により測定した。それぞれ実験は 3 回行った。\* $p < 0.05$ 。

**Table 1** プライマー配列

Gene	Forward primer	Reverse primer	Genebank accession number
LDLR	GGAGCAAGTATCTTGATCTTC	CCTTCCTGCGCATGGAGTCCTG	NC_000019
<i>alpha2</i>	ACACTTCAGACGTGGTGATTG	CCACTCCTGTTTTAGCCAGAC	U62431
<i>alpha3</i>	TGAGCACCGTCTATTTGAGCG	TGGACACCTCGAAATGGATGAT	U62432
<i>alpha5</i>	ACGTTTTGAAGGGACCAGTACG	ACTCACAATCTCCCATTCTCCAT	U62434
<i>alpha7</i>	GCTGGTCAAGAACTACAATCCC	CTCATCCACGTCCATGATCTG	U40583
<i>alpha9</i>	AAATCTGGCACGATGCCTATC	GCAGGACCACATTGGTGTTCA	AY123244
<i>beta1</i>	CTCTGGACATTAGCGTCGTGG	GCTGAACACCATAGTGCAATTCT	NM_000747
<i>beta2</i>	CAATGCTGACGGCATGTACGA	CACGAACGGAACCTTCATGGTG	U62437
<i>beta3</i>	ATCGCCGAAAATGAAGATGCC	GCCACACATTGGTTGTCATCA	U62438
<i>beta4</i>	AACCCGTTACAATAACCTGATCC	ATTCACGCTGATAAGCTGGGC	U62439

**Table 2 患者概要**

Patient	Sex	Age	Smoking	Duration (years)	Cigarettes / day	Score
1	M	51	Yes	20	10	3
2	M	58	No	0	0	1
3	M	51	Yes	25	15	1
4	M	56	Yes	25	10	2
5	M	46	Yes	26	13	0
6	M	56	Yes	24	10	1
7	M	61	Yes	20	10	ND
8	F	59	Yes	25	10	3
9	F	32	Yes	12	13	3
10	M	52	Yes	30	10	ND
11	M	55	Yes	25	10	ND
12	M	69	Yes	40	20	2
13	M	52	No	0	0	0
14	F	56	No	0	0	0
15	M	50	Yes	30	5	3
16	M	41	No	0	0	1
17	M	27	No	0	0	1

M: male, F: female

ND: not determined