

## ヒト歯周組織構成細胞における anion exchanger (AE) の発現と分布

### Expression and distribution of anion exchangers in the human periodontal connective tissues.

西口栄子<sup>1)</sup>、金子和美<sup>1)</sup>、神部芳則<sup>2)</sup>、槻木恵一<sup>3)</sup>、川瀬俊夫<sup>4)</sup>、稲葉 睦<sup>5)</sup>

Eiko Nishiguchi<sup>1)</sup>, Kazumi Kaneko<sup>1)</sup>, Yoshinori Jinbu<sup>2)</sup>, Keiichi Tsukinoki<sup>3)</sup>, Toshio Kawase<sup>4)</sup>, Mutumi Inaba<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> 湘南短期大学歯科衛生学科

<sup>2)</sup> 自治医科大学口腔外科学教室

<sup>3)</sup> 神奈川歯科大学口腔病理学教室

<sup>4)</sup> 神奈川歯科大学学生体工学教室

<sup>5)</sup> 北海道大学大学院獣医学研究科臨床分子生物学教室

**Abstract:** Since periodontal ligament fibroblasts and gingival keratinocytes are closely related to periodontal diseases among human cells constituting periodontal connective tissue, we clarified the presence, distribution and types of AE in human gingival keratinocytes and periodontal ligament fibroblasts. In addition, oxidative stress-induced dynamics of anion exchanger were investigated.<sup>1)</sup> The presence of AE on human gingival keratinocytes and periodontal ligament fibroblasts was investigated by the fluorescence antibody method and the RT-PCR method using anti-anion exchanger 1 (AE1) antibody and anti-anion exchanger 2 (AE2) antibody. In both human gingival keratinocytes and periodontal ligament fibroblasts, no expression of AE1 was detected by either method, while AE2 was expressed. The distribution of AE2 was investigated by the fluorescence antibody method, and fluorescence was detected on the circumference of nuclear of human gingival keratinocytes, and entire cell body of human periodontal ligament fibroblasts.<sup>2)</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and nicotine-induced dynamics of AE2 on human gingival keratinocytes and periodontal ligament fibroblasts were investigated

by the RT-PCR method. No changes were observed after stimulation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or nicotine, but AE was present until the cells were destroyed and lysed by stimulation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nicotine.

These findings suggested that AE present on human gingival keratinocytes and human periodontal ligament fibroblasts is AE2, and AE2 protect the cell from oxidative stress.

#### 要旨

HGKとHPLFにおけるanion exchanger (AE) の発現状態、ファミリーのタイプ、分布、などを観察し、更に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチンを用いてAEへの酸化刺激の影響を観察した。その結果、①ヒト抗AE1、AE2抗体を用いて蛍光抗体法、RT-PCR法により観察した結果、両方法共に、両細胞上にAE2の存在が観察された。②AE2の分布を蛍光抗体法で観察した結果、蛍光は、HGKでは、細胞核周辺に多く、HPLFでは、細胞全体に観察された。③H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチン刺激によるHGK、HPLFの形態変化を観察した結果、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激でHGKはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度と作用時間に依存して、細胞間に隙間が出来、核を残す形で細胞が溶解した。HPLFは低濃度刺激では、細胞表面に網目構造を形成して次第に細胞が細くなり、細

胞間に隙間を生じ、次第に核を残す形で溶解した。ニコチン刺激でも同様の結果が観察された。③RT-PCRを用いてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチン刺激によるAE2への影響を観察した結果、両細胞共に、細胞が破壊寸前までAE2の存在が観察された。④H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチン刺激による細胞死を観察した結果、両細胞共に、細胞破壊の直前で、apoptosisが観察された。

これらの結果より、HGK、HPLFのAEはAE2であり、AE2は酸化刺激より細胞を守り、細胞が破壊される直前まで機能していることが推測できる。

## 導入

anion exchanger (AE) は、細胞のガス交換に伴って細胞内に増減する重炭酸イオン (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) を細胞外の塩素イオン (Cl<sup>-</sup>) と交換して、細胞内pHの調節にも大きく関わっていることが知られており<sup>1-3)</sup>、そのファミリーとして、AE1、AE2、AE3の三種類が報告されている<sup>4)</sup>。AE1は、ヒト赤血球バンド3たんぱく質として良く知られており、分子量約10万、911個のアミノ酸残基から成る糖蛋白質で、赤血球1個当たり約120万コピー発現している。その分布は、細胞質側に存在する部分と膜に内在し、膜を14回貫通しているとされる部分とに区分出来る。膜貫通部分は、陰イオンチャネルを形成して細胞内外の陰イオンの交換、細胞内pHの調節作用をしている。AE2は、種々の器官、例えば、胃<sup>5)</sup>、回腸<sup>6)</sup>、腎<sup>7)</sup>、精液細胞<sup>8)</sup>、唾液腺<sup>9)</sup>、肝臓<sup>10)</sup>、皮膚<sup>11)</sup>、ゴルジの細胞膜骨格<sup>12)</sup>等に、AE3は、心臓<sup>13)</sup>、脳<sup>14)</sup>、神経組織<sup>15)</sup>、心筋<sup>16)</sup>等に広くその存在が報告されている。

ヒト歯肉上皮細胞(HGK)は、歯周組織の最外層に位置し、細菌や様々な刺激から組織を保護している細胞であり、歯根膜線維芽細胞(HPLF)は、歯を歯槽内に懸垂支持し、歯に加わる外力を直接骨に伝達しないための緩衝役を担う細胞である。歯周組織構成細胞の呼吸や細胞内pHの調節を司るAEについての報告は未だ少ない。歯周組織が種々の刺激で炎症を起す疾患の一つに歯周疾患がある。歯周疾患は、歯周病原性細菌あるいはその関連物質が歯周組織に侵入し、歯と歯肉の接合を破壊し

て歯槽骨吸収を起こす炎症性疾患である。歯周疾患の発症・進行に関わる危険因子として、生活習慣の乱れ(ストレス<sup>17-18)</sup>、喫煙<sup>19-20)</sup>、飲酒<sup>21-22)</sup>などが知られている。更に、最近、活性酸素などの酸化ストレスとの関連で多くの報告がなされている<sup>23-24)</sup>。歯周組織に及ぼす生体酸化の影響を観察する過程で、歯周組織構成細胞におけるAEの発現と分布、更に、AEに及ぼす酸化刺激の影響について観察を行った。

## [材料と方法]

培養用ヒト歯肉片採取に当たっては、それぞれ歯肉片は、自治医科大学倫理委員会の同意を得た上で、対象となる患者の人権保護を目的としたヘルシンキ宣言の精神に沿って、患者に十分な説明を行って同意を得た。ヒト歯根膜片の採取に当たっては神奈川県立歯科大学倫理委員会の同意を得た(第24号)。

## 材料と方法

### 1. 正常HGKの培養方法

HGKの培養は、野口の方法<sup>25)</sup>に従って培養した。18-45歳までの健常人(女子、3-4名)の埋伏知歯の抜去時に肉眼的に炎症が認められない辺縁歯肉を採取して一夜、4℃、10min、Keratinocyte basal medium(KBM)に incubateして上皮細胞を分離した。分離した上皮層を0.025% trypsin / 0.01% EDTA 溶液に37℃、10min、incubateして上皮細胞を分離した。分離した上皮細胞をKBM中に懸濁させてマイクロプレート(1.8 x 10<sup>4</sup> / cm<sup>2</sup>)に分注し、5% CO<sub>2</sub>、37℃で約1週間培養して、ほぼconfluentの状態の細胞を実験に使用した。

### 2. 正常ヒトHPLFの培養方法

歯根膜由来のHPLFは、歯根膜組織片のexplantによるサンドイッチ法<sup>26)</sup>により、遊走した細胞を初代培養細胞として得た。細胞をD-MEN培地に懸濁させ、マイクロプレート(1.8 x 10<sup>4</sup> / cm<sup>2</sup>)に分注後、5% CO<sub>2</sub>、37℃に4日間培養してほぼconfluentの状

態の細胞を実験に使用した。

### 3. AE 1、AE2のペプチド合成と抗体作成

AE1は、細胞外突出部分の24アミノ酸残基 (621 ~ 644)、AE2 (865 ~ 879) を用いてFmoc固相合成法によりペプチド合成を行い、合成したペプチドを用いてポリクローナル抗体を作成した。

### 3. 蛍光抗体法によるHGK、HPLF上のAE発現の観察

フォーチャンバーに両細胞を培養し、各種濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を高濃度の場合10分間、低濃度の場合5時間、5% CO<sub>2</sub>、37°Cに作用させた。作用後冷やしたアセトンで固定した後、ヒト抗AE1抗体、ヒト抗AE2抗体を5% CO<sub>2</sub>、37°C、30分間作用させた。その後、細胞をPBS(-)で5分間3回洗浄した。次に、二次抗体 (FITC conjugated anti-rabbit IgG antibody) を30分間作用させた後、細胞をPBS(-)で5分間3回洗浄し、細胞を室温乾燥させる。乾燥後グリセロールで包埋し蛍光顕微鏡 (Nikon, UFX-DX, Japan) で形態変化を観察した。

### 4. RT-PCR法によるHGK、HPLF上のAE発現の観察

ニコチン、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>無刺激、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>HPLFを2% SDS溶液 (30mM Tris buffer, pH7.4) で可溶化し、QIAsure (QIAGEN GmbH, Germany)でDNAを断片化して、12000 r.p.m. 3 min遠心してサンプルとし、電気泳動、ウエスタンブロットの後、ヒト抗AE1抗体、ヒト抗AE2抗体を用いてSatoらの方法<sup>27)</sup>により観察した。操作手順は、

- ①HGK、HPLF各 1 フラスコから、Rneasy Mini(QIAGEN)を用いてトータルRNAを調製した。
- ②その1 μgを鋳型とし、oligo(dT)12-18をprimerとして、Super ScriptIIで1st strand cDNAを合成した。
- ③これを鋳型にしてPCR増幅を行った。  
\*AE1 primer

sense(B3p5),5' -CGTGATATCCGGCGCCGC  
TAC-3' ; nt 1150-1170

antisense(B3p14),5' -GCAAACATCATCCAG  
ATGGGA-3' ; nt 1977-1997

\*AE2 primer

sence(AE2p3),5' -CGGCAGATCCCCCTGGC  
CGTG-3' ; nt 2203-2223

antisense(AE2p4),5' -GAGCACCACCATGC  
GGAGCGG-3' ; nt 2464-2484

\*PCR反応条件

熱変性 : 95°C × 30 sec

アニーリング : 58°C × 30 sec

伸張反応 : 72°C × 1 min

サイクル数 : 45回

### 5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激による細胞破壊の観察

HGK、HPLFに1.5 μMのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を作用させ、37°C、5% CO<sub>2</sub>の下に3日間作用させた。作用1日、2日、3日後、位相差顕微鏡 (Nikon TE 300) で細胞の形態を観察した。また、両細胞に1.5 μM、3.1 μMのニコチンを37°C、5% CO<sub>2</sub>の下に3日間作用させ、1日、2日、3日作用後、位相差顕微鏡 (Nikon TE 300) で細胞の形態を観察した。

### 6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチン刺激による細胞死の観察

ほぼconfluentな細胞に種々の濃度のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を作用させ、GavrieliらのTUNNEL法<sup>28)</sup> (TdT-mediated dUTP nick end labeling) の変法「Apoptosis in situ Detection Kit」(NIPPON GENE Ltd.) を使用してサンプルを作成し、蛍光顕微鏡 (Olympus Dp71) にてapoptosisの発現状態を観察した。

## 結果

### 1. 蛍光抗体法、RT-PCR法によるHGK、HPLF上のAEの発現

合成したヒト抗AE1抗体、ヒト抗AE2抗体を用いて蛍光抗体法により、HGK、HPLF上のAEの存在を観察した結果、両細胞にAE2の蛍光が観察された (Fig. 1)。その分布状態を観察すると、HGKでは、核付近に局在し (Fig.1A)、HPLFでは細胞全体に観

察された (Fig.1B)。

RT-PCR法によるHGK、HPLF上のAEの存在とそのタイプを観察した結果、蛍光抗体法での結果と同様に、HGK、HPLF共に、AE1は発現されずAE2の発現が観察された (Fig.2)。

更にAE2に及ぼす $H_2O_2$ 、ニコチン刺激の影響を観察した結果、 $H_2O_2$ 、ニコチンの高濃度、長時間刺激により細胞が破壊される直前まで、AE2の存在

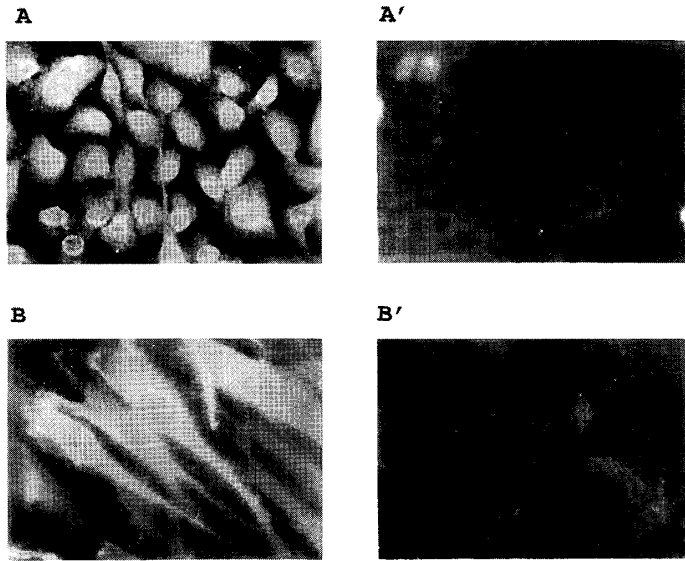


Fig.1. Immunohistochemical detection of expression, distribution and family type of AE polypeptides in cultured HGKs and HPLFs.

A and B were stained with anti-AE2 antibodies, while A' and B' were stained without anti-AE2 antibodies. ( $2 \times 10^6/cm^2$  cells), (x 100)

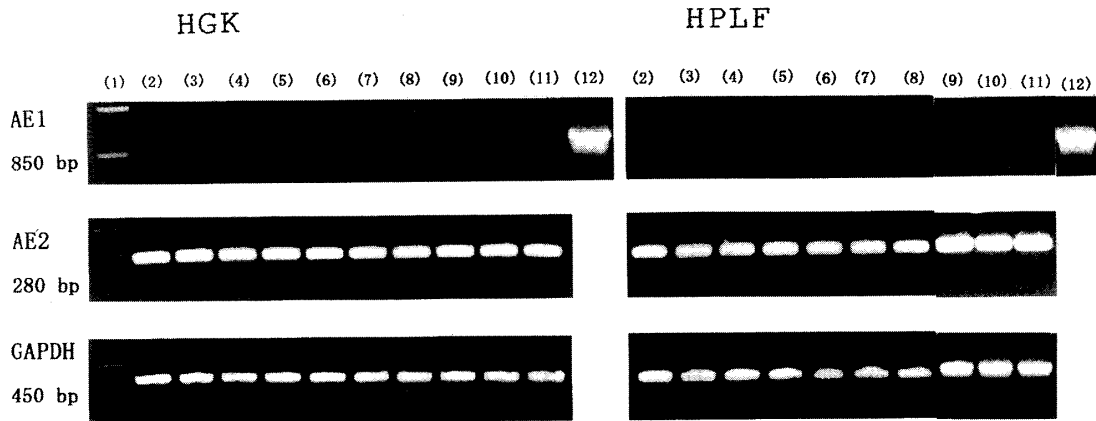


Fig.2. Gel electrophoretic analysis of RT-PCR amplification products obtained from HGKs and HPLFs.

- |                                     |                                     |                                     |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| (1) : marker(100-bp ladder)         | (5) : 1.5 $\mu$ M $H_2O_2$ , 3 days | (9) : 3.1 $\mu$ M nicotine, 1 day   |
| (2) : control                       | (6) : 1.5 $\mu$ M nicotine, 1 day   | (10) : 3.1 $\mu$ M nicotine, 2 days |
| (3) : 1.5 $\mu$ M $H_2O_2$ , 1 day  | (7) : 1.5 $\mu$ M nicotine, 2 days  | (11) : 3.1 $\mu$ M nicotine, 3 days |
| (4) : 1.5 $\mu$ M $H_2O_2$ , 2 days | (8) : 1.5 $\mu$ M nicotine, 3 days  | (12) : positive control             |

が確認された (Fig.2 (5),(8),(11))。

## 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチン刺激による細胞の形態変化の観察

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>低濃度刺激でHGKは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度、作用時間に依存して、細胞間に隙間を生じ、次第に溶

解した(Fig.3A)。HPLFは、作用初期、細胞間に隙間を生じ、更に、細胞表面に網の目構造を形成した。その後作用時間の経過に伴って細胞は、線維状に細くなり、長時間作用では溶解した (Fig.3B)。

ニコチン刺激の場合も同様の状態を呈した

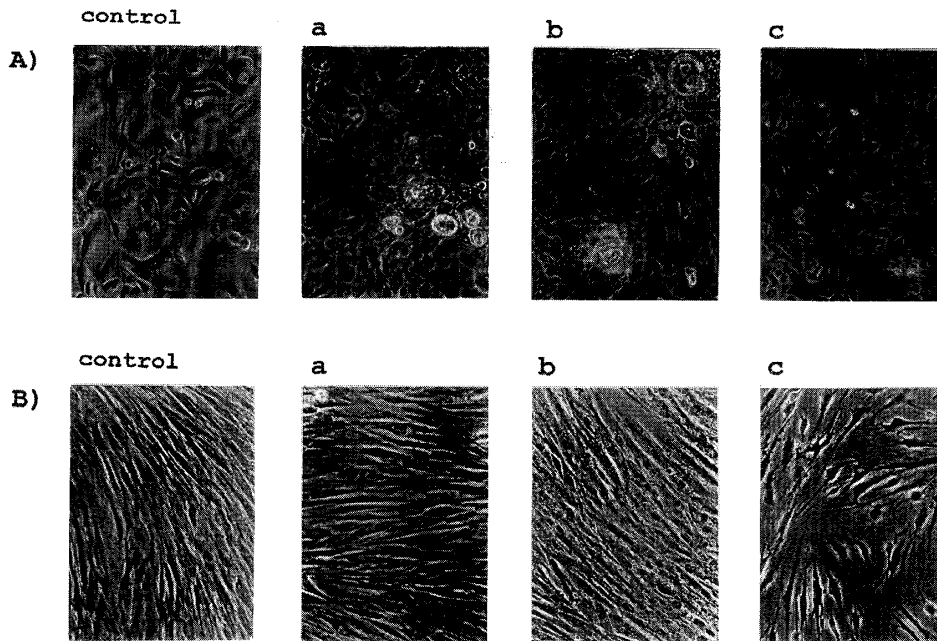


Fig.3. Shape change of HGKs and HPLFs after incubation with 1.5  $\mu$  M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 day (Aa,Ba), 2 days (Ab,Bb) and 3 days (Ac,Bc). ( $2 \times 10^6/\text{cm}^2$  cells), (x 100)

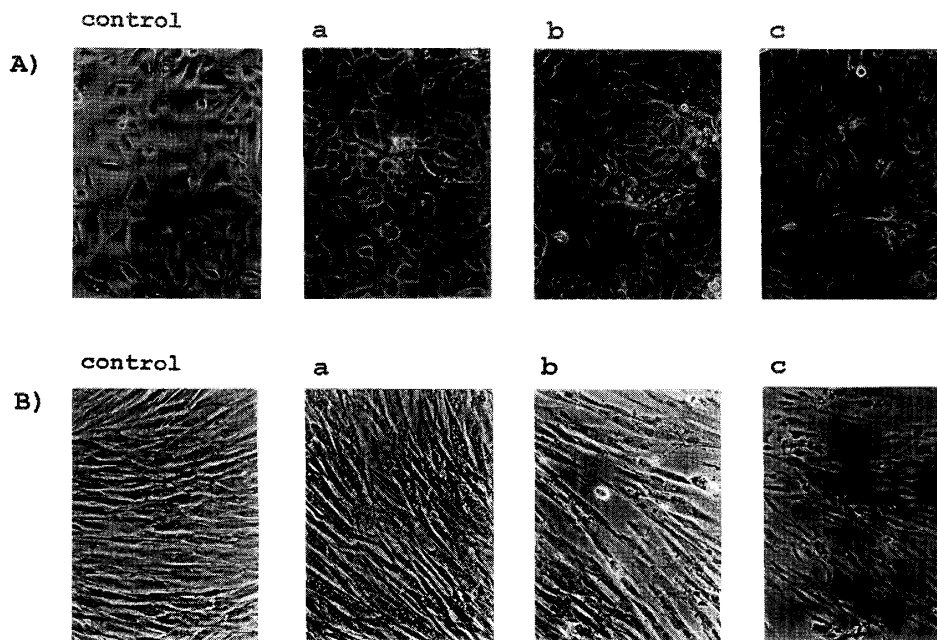


Fig.4. Shape changes of HPLFs after incubation with 1.5  $\mu$  M nicotine for 1 day (Aa,Ba), 2 days (Ab,Bb) and 3 days (Ac,Bc). ( $2 \times 10^6/\text{cm}^2$  cells), (x 100)

### 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチン刺激による細胞死の観察

ほぼconfluentなHPLFに1.5μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を3日間作用させて、細胞死の状態を観察した結果、作用後細胞間に隙間ができ、序々に細胞が細くなり、3日間の作用で細胞が破壊された。細胞が細く、線維状

態を示した時点でapoptosisが観察された (Fig.5)。また、結果は示さないが1.5 μ Mニコチンを作用させた場合も1.5μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を作用させた場合と同様の結果が観察された。

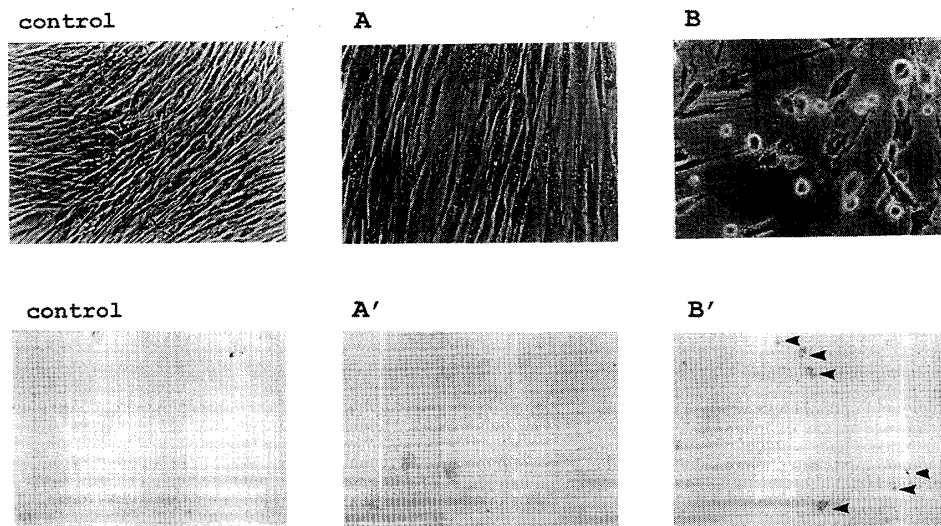


Fig.5. Observation of cell death of HPLFs with various concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A and B show morphological change of HPLFs incubated with 0 μ M (control), 4.6 μ M (A) and 13.8 μ M (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C for 5hrs. A' and B' are photographs of HPLFs treated with 0 μ M (control), 4.6 μ M (A) and 13.8 μ M (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under 5 % CO<sub>2</sub> at 37°C for 5hrs and stained by the TUNEL method. Arrows show apoptosis. (2x10<sup>6</sup> /cm<sup>2</sup> cells), (x 100)

#### 考 察

細胞の呼吸やpH調節作用に関与するAEのHGKとHPLF上の存在とAEのタイプ、また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチン刺激によるAEの動態を観察した。その結果、蛍光抗体法、RT-PCR法の二つの方法によって観察した結果、両方法共にHGK、HPLF上にAEの存在が確認され、そのタイプは、ヒト赤血球膜に存在することが広く知られているAE1ではなく、その他多くの組織・器官に存在することが知られているAE2であった。このことは、証明はできていないが、AE1の方がAE2より能力が強いとも言われているため、AE1とAE2の能力に関係があるのかも知れない。また、生体内では、HGKやHPLFより赤血球の働きのほうが大きいと考えられるためかもしれない。

次に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激によるHGKの形態変化を観察した結果、HGKの形態は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度と作用時間に

依存して次第に細胞が溶解していき作用時間の経過と共に核の部分のみが残る状態を経て溶解した。HPLFは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>低濃度ではわずかに網の目構造が形成され、細胞間に隙間が出来、高濃度では、網の目構造形成の段階を経ず、細胞は、作用時間の経過と共に溶解した。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチン刺激によるHPLFの形態変化と併せて細胞死をapoptosisの発現状態で観察した結果、細胞が一部内容物を放出して、網目の構造を形成している段階ではapoptosisは観察されず、細胞が細くなって溶解に向かい始めて後に、apoptosisが観察されたことより、AE2はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ニコチンなどの刺激から、細胞を最後まで守ろうとしているものと推測する。この結果は、AE2は酸化刺激により活性化するとのTuri JL<sup>29)</sup>、Ghio AJ<sup>30)</sup>らの結果を支持するものである。

また、今回、HGK, HPLFにおけるAE2の存在と分布状態、ファミリーのタイプ、細胞の形態変化、細胞死の状態などを観察したが、ニコチン刺激による細胞の反応はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激の場合と非常に良く似ている。このことから、ニコチンも酸化物質の一つと考える。

これらの結果から、HGK、HPLFに存在するAEは、AE2であり、AE2は、生体酸化などから細胞を守っていることが推測できる。

### 参考文献

1. Kopito RR: Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int Rev Cytol*, 123:177-199, 1990.
2. Sekler I, Lo RS, Kopito RR: A conserved glutamate is responsible for ion selectivity and pH dependence of the mammalian anion exchangers AE1 and AE2. *J Biol Chem*, 270:28751-28758, 1995.
3. Stewart AK, Chernova MN, Kunes YZ, Alper ASL: Regulation of AE2 anion exchanger by intracellular pH: critical regions of the NH<sub>2</sub>-terminal cytoplasmic domain. *Am. J. physiol. Cell Physiol*, 281:C1344-C1354, 2001.
4. Alper SL, Darman RB, Chernova MN, Dahl NK: The AE gene family of Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchangers. *J Nephrol*, 15:S41-S53, 2002.
5. Jöns T, Warrings B, Jöns A, Drenkahn D: Basolateral localization of anion exchanger 2 (AE2) and actin in acid-secreting (parietal) cells of the human stomach. *Histochemistry*, 102:255-263, 1994.
6. Chow A, Dobbins JW, Aronson PS, Igarashi P: cDNA cloning and localization of a band 3-related protein from ileum. *Am J Physiol*, 263:G345-G352, 1992.
7. Gehrig H, Müller W, Appelhans H: Complete nucleotide sequence of band 3 related amino transport protein AE2 from human kidney. *Biochim Biophys Acta*, 1130:326-328, 1992.
8. Parkkila S, Rajaniemi H, Kellokumpu S: Polarizes expression of a band 3-related protein in mammalian sperm cells. *Biol Reprod*, 49:326-331, 1993.
9. Vázquez J, Vázquez M, Idoate MA, Montuenga L, Martínez-Ansô E, Castillo JE, Gracia N, Medina JF, Prieto J: Anion exchanger immunoreactivity in human salivary glands in health and Sjögren's syndrome. *Am J Pathol*, 146:1422-1432, 1995.
10. Martínez-Ansô E, Castillo JE, Díez J, Medina JF, Prieto J: Immunohistochemical detection of chloride/bicarbonate anion exchangers in human liver. *Hepatology*, 19:1400-1406, 1994.
11. Woodcock-Mitchell J, Eichner R, Nelson WG, Sun T: Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol*, 95:580-588, 1982.
12. Holappa K, Suokas M, Soininen P, Kellokumpu S: Identification of the full-length AE2 (AE2a) isoform as the Golgi-associated anion exchanger in fibroblasts. *J Histochem Cytochem*, 49:259-269, 2001.
13. Linn SC, Roger Askew G, Menon G, Shull GE: Conservation of an AE3 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger cardiac-specific exon and promoter region and AE3 mRNA expression patterns in murine and human hearts. *Circ Res*, 76:584-91, 1995.
14. Morgans CW, Kopito RR: Generation of truncated brain AE3 isoforms by alternate mRNA processing. *J Cell Sci*, 106:1275-1282, 1993.
15. Kopito RR, Lee BS, Simmons DM, Lindsey AE, Morgans CW, Schneider K: Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell*, 59:927-937, 1989.
16. Yannoukakos D, Stuart-Tilley A, Fernandez HA, Fey P, Duyk G, Alper SL: Molecular cloning,

- expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart. *Circ Res*, 75:603-614, 1994.
17. Green LW, Tryon WW, Marks B, Huryn J. Periodontal disease as a function of life events stress. *J Human Stress*, 12:32-6, 1986.
  18. Deinzer R., Rüttermann S., Möbes O., Herforth A. Increase in gingival inflammation under academic stress. *J Clin Periodontol*, 25:431-433, 1998.
  19. Gamal AY, Bayomy MM. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. *J Clin Periodontol*, 29: 763-770, 2002.
  20. Calsina G, Ramón J-M, Echeverria J-J. Effect of smoking on periodontal tissues. *J Periodontol*, 29:771-776, 2002.
  21. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol*, 72:183-189, 2001.
  22. Okamoto Y, Tsuboi S, Suzuki S, Nakagaki H, Ogura Y, Maeda K, Tokudome S. Effect of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males: a 4-yr longitudinal study. *J periodont Res* 41:560-566, 2006.
  23. Chapple ILC. Reactive oxygen species and antioxidant in inflammatory diseases. *J clin Periodontol*, 24:287-296, 1997.
  24. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal disease: The challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10:458-476, 1999.
  25. Noguchi T, Jinbu Y, Naito H, Akasaka Y, Yaoita H: Difference in the interferon- $\gamma$  induced ICAM-1 expression between cultured gingival and epidermal keratinocytes. *J Jpn Stomatol Soc*, 49:239-245, 2000.
  26. Kawase T, Sato S, Yamada M, Saito S: Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cell. *Adv Dent Res*, 2:234-239, 1988.
  27. Sato K, Inaba M, Suwa Y, Matsuu A, Hikasa Y, Ono K, Kagota K: Inherited defect of sodium-dependent glutamate transport mediated by glutamate/aspartate transporter in canine red cells due to a decreased level of transporter protein expression. *J Biol Chem*, 275:6620-6627, 2000.
  28. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119:493-501, 1992.
  29. Turi JL, Jaspers I, Dailey LA, Madden MC, Brighton LE, Carter JD, Nozik-Grayck E, Piantadosi CA, Ghio A: Oxidative stress activates anion exchange protein 2 and AP-1 in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol*, 283:L791-L798, 2001.
  30. Ghio AJ, Nozik-Grayck E, Turi J, Jaspers I, Mercatante DR, Kole R, Piantadosi CA: Superoxide-dependent iron uptake. A new role