

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22792085

研究課題名（和文） 上皮細胞が産生する IgG 能動輸送タンパク質 FcRn の機能解析と歯周治療への応用

研究課題名（英文） The analysis and application for periodontal treatment of FcRn which is the passive IgG transporter in epithelial cells

研究代表者

應原 一久 (OUHARA KAZUHISA)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80550425

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、歯肉上皮細胞において FcRn が IgG 輸送に関与しているのか検討した。免疫組織学的染色によりヒト歯肉組織において、炎症部位では健常部位より強く FcRn の産生が認められた。In vitro の実験で、IgG が時間依存的に、また pH の濃度勾配に従って輸送された。さらに、FcRn 欠失マウスではこの能動輸送が認められなかった。以上から FcRn が歯肉上皮細胞に発現しており、IgG または IgG 融合タンパク質の能動輸送に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The neonatal Fc receptor (FcRn) for IgG expressed in intestinal epithelium has been shown to be responsible for IgG transport. In this study, we determined the expression of FcRn in gingival epithelium and the function of FcRn. Our results suggested that FcRn expressed in GEC may contribute to the recycling of IgG in the oral cavity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯肉上皮細胞

FcRn

歯周炎

Ig

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯周病原細菌と宿主細胞との相互作用によって成立する感染症である。歯肉上皮細胞は歯周病原細菌と最初に接する組織である。したがって、この機能制御が歯周病の治療や予防に有効である。これまでに、歯肉上皮細胞が産生する抗菌ペプチドの歯周病原細菌に対する抗菌力および抗菌ペプチド発現制御メカニズム、さらに、歯周病原細菌に対する歯肉上皮細胞の応答に及ぼす選択的シクロオキシゲナーゼ2阻害剤の効果を明らかにしてきた。近年、胎児が母体から胎盤を介して免疫グロブリン IgG を取り込む際に、IgG を能動輸送するタンパク質 FcRn が発見された [Raghavan M. et al (1994) Immunity]。さらに、FcRn は腸管上皮細胞においても発現が確認され、IgG の Fc 領域が FcRn と特異的に結合し、腸管内腔から組織内に輸送されることが示された [Yoshida M. et al (2006) J Clin Invest.]。これまでに歯肉上皮細胞が、1. ヒト正常歯肉上皮細胞が FcRn を発現していること、2. その発現は歯周病原細菌や炎症性サイトカインによって誘導されること、3. 歯周炎患者の歯肉組織では FcRn の発現が上昇していること、4 上皮細胞を用いた *in vitro* の系で、IgG の Fc 領域を有するタンパク質が FcRn を介して輸送されることを明らかにした [Ouhara K et al (2008) AADR annual meeting]。つまり FcRn は IgG の Fc 領域と特異的に結合する性質を持つ。したがって FcRn は IgG やその Fc 領域を有する組み換えタンパク質の輸送だけではなく、歯周病治療に有効な生理活性を有するタンパク質を特異的な非中和抗体と結合させることによって、その複合体を輸送できると考えられる。以上から、歯肉上皮細胞

が発現する FcRn によって、抗炎症作用、骨吸収抑制作用あるいは歯周組織再生促進作用を有する抗体やタンパク質を口腔内から歯周組織内へ輸送するデリバリーシステムによる新しい歯周病の治療が可能になるという仮説を立て、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

In vitro

- 1) 歯肉上皮細胞 FcRn による抗体や Fc 領域を有するタンパク質の輸送
- 2) FcRn を介して輸送されたタンパク質の活性

In vivo

- 1) マウス実験的歯周炎モデルにおける FcRn の局在
- 2) マウス実験的歯周炎モデルにおける FcRn を介して輸送されたタンパク質の治療効果と有効性
- 3) 投与したタンパク質を効果的に輸送させるための溶媒の検討を目的とした。

3. 研究の方法

FcRn を介したドラッグデリバリーシステム確立のための基礎的研究

(*in vitro*)

- 1) 歯肉上皮細胞の FcRn による抗体や Fc 領域を有するタンパク質の輸送について、ヒト由来正常歯肉上皮細胞を Transwell® upper well で培養し、タンパク質が FcRn を介して lower well に経時的に輸送されること確認する。方法は経時的に lower well の培地を回収し、その中に含まれる輸送されたタンパク質を ELISA 法で検出する。供試するタンパク

質は、抗 TNF- α 抗体、OPG-Fc (AMGEN, USA から無償供与) および Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) である。抗 TNF- α 抗体は抗炎症作用として用いる。OPG-Fc は破骨細胞活性化因子 RANKL に対する decoy receptor として働き、歯槽骨吸収を抑制する [Simonet WS et al (1997) Cell]。BDNF は神経栄養因子として神経細胞の分化増殖だけではなく、歯周組織の再生能が報告されている。(Takeda et. al. 2005)。また BDNF については、特異的な非中和抗体と結合させた複合体をゲル濾過精製後に供す。

2) FcRn を介して輸送されたタンパク質の活性を検討する。

次に (in vitro) で輸送されたタンパクがそれぞれ生物学的活性を有しているのか検討する。具体的には輸送されたタンパク質を含む lower well の condition medium を使用して以下の実験を行う。i) 抗 TNF- α 抗体活性については、TNF- α とともに上皮細胞を 24 時間培養し、IL-6、IL-8 の誘導抑制効果をリアルタイム PCR 法で遺伝子レベルで検討する。また細胞の培養上清中のサイトカイン量 (TNF- α 、IL-6、IL-8) を ELISA 法で測定する。ii) OPG-Fc の活性は RANKL とともにマウス単球系細胞 RAW 264 cell の培養液中に添加し、この細胞の破骨細胞への分化誘導阻害効果を確認する。iii) BDNF はヒト歯根膜由来線維芽細胞培養中に添加し 10 日間培養後、アリザリンレッド染色で新生骨形成、石灰化物形成能そしてアルカリフォスファターゼ反応 (Bessey-Lowery 法) で骨芽細胞への分化能を確認する。1) マウス歯周炎における FcRn の局在と輸送タンパク質の局在 (In vivo) では C57BL/6 wild type マウス腹腔にホルマリン固定した歯周病原細菌 *A. actinomycetemcomitans* (Aa) を実験開始 0、2、4 日目に注入する。実験開始 2、4 週間

後に採血し、Aa に対する抗体価の上昇したものを歯周炎モデルとして使用する。歯周炎の程度の評価は露出歯根面積、血清中の Aa に対する抗体量、歯肉ホモジネート中の炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6 そして RANKL) 量、マウス頸部リンパ節由来 T cell の Aa に対する応答性について BrdU 取り込みを指標とした増殖能で評価する。またこの歯周炎モデルの歯肉上皮における FcRn の局在について免疫組織化学的に検討する。2) マウス歯周炎における FcRn を介して輸送されたタンパク質の治療効果と有効性 (In vivo) 投与するサンプルは口腔内に長時間局在できるように 1%カルボキシメチルセルロース (CMC) に溶解させマウス口腔内に投与する。また投与時のサンプルの pH 値による輸送能の違いについても検討する。抗炎症作用として用いる抗 TNF- α 抗体と破骨細胞活性化抑制因子 OPG-Fc は 7 日ごとに経口投与する。BDNF は骨吸収が確立後、つまり実験開始 4 週間後から 7 日ごとに経口投与する。マウスはそれぞれ実験開始から 5 週間および 7 週目に評価する。

4. 研究成果

免疫組織学的染色によりヒト歯肉組織において、炎症部位では健常部位より強く FcRn の産生が認められた。OBA-9 を transwell を用いて培養し、IgG 融合タンパク質 (OPG-Fc) の輸送能を検討したところ時間依存的に、また pH の濃度勾配に従って輸送が確認された。さらに siRNA を用いて FcRn 発現を抑制することにより、この能動輸送を抑制した。マウスの口腔内に OPG-Fc を投与したところ野生株では OPG-Fc の歯周組織への浸透が確認できたのに対して、FcRn 欠失マウスではこの能動輸送が認められなかった。以上から FcRn が歯肉上皮細胞に発現しており、IgG または

IgG 融合タンパク質の能動輸送に関与していることが明らかとなった。これらの知見から FcRn を利用したドラッグデリバリーシステムを構築し、歯周治療に応用できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice. Furusho H, Miyauchi M, Hyogo H, Inubushi T, Ao M, Ouhara K, Hisatune J, Kurihara H, Sugai M, Hayes CN, Nakahara T, Aikata H, Takahashi S, Chayama K, Takata T. *J Gastroenterol.* 2013 Jan 11. [Epub ahead of print] 査読あり
- ② Irsogladine maleate regulates the inflammatory related genes in human gingival epithelial cells stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Miyagawa T, Fujita T, Ouhara K, Matsuda S, Kajiya M, Hayashida K, Imai H, Yoshimoto T, Iwata T, Shiba H, Abiko Y, Kurihara H. *Int Immunopharmacol.* 2013 Feb;15(2):340-7. doi: 10.1016/j.intimp.2012.12.011. Epub 2013 Jan 8 査読あり
- ③ Expression levels of novel cytokine IL-32 in periodontitis and its role in the suppression of IL-8 production by

human gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis*. Ouhara K, Kawai T, Silva MJ, Fujita T, Hayashida K, Karimbux NY, Kajiya M, Shiba H, Kawaguchi H, Kurihara H. *J Oral Microbiol.* 2012;4. doi: 10.3402/jom.v4i0.14832. Epub 2012 Mar 16. 査読あり

[学会発表] (計2件)

① 應原 一久

嚢胞様根尖病巣由来滲出液中のサイトカイン産生量プロファイリング第5回日本口腔検査学会総会・学術大会 2012年08月25日～2012年08月26日 東京

② 應原 一久

ヒト歯肉上皮細胞における *Porphyromonas gingivalis* 刺激時の microRNA 発現の網羅的解析
日本歯周病学会 2012 秋季学術大会
2012年09月22日～2012年09月23日 つくば市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

應原 一久 (OUHARA KAZUHISA)
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：80550425

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし