

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792344

研究課題名(和文) 歯周炎と Porphyromonas gingivalis 抗体：酵素抗原法の応用

研究課題名(英文) Periodontitis and antibodies to Porphyromonas gignivalis: The application of the enzyme-labeled antigen method

研究代表者

柘植 信哉 (Tsuge, Shinya)

藤田保健衛生大学・医学部・客員講師

研究者番号：30469035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：歯周病の病変部では抗体産生細胞の強い浸潤を認める。しかし、これらの細胞がつくる抗体の標的抗原は明らかにされていない。ポルフィロモナス・ジンジバリス(Pg)は歯周病の主要な原因菌であることから、これらの細胞がPgに対する抗体を産生していることが推測される。そこで本研究は、アルファスクリーン法と酵素抗原法を用いて、歯周病の病変部における抗Pg抗体産生細胞の検索を行った。その結果、Pgに対する抗体を産生する細胞が歯周病病変歯肉組織内に存在することが明らかとなり、Pgに対する炎症反応が歯周病の病態形成に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histologically, the gingival tissue in periodontitis shows dense infiltration of plasma cells. However, antigens recognized by antibodies secreted from the immunocytes remain unknown. Porphyromonas gingivalis (Pg) is the major pathogen of periodontitis. Therefore, it is possible that these immunocytes produce antibodies to antigens of Pg. In the present research, we attempted to demonstrate the Pg-specific antibody producing cells in the gingival tissues of periodontitis with the AlphaScreen method and the enzyme-labeled antigen method. As a result, the plasma cells producing antibodies specific to Pg antigens were detected in the diseased gingiva. This finding suggests inflammatory reactions to Pg is involved in periodontitis.

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：酵素抗原法 AlphaScreen コムギ無細胞タンパク質合成系 抗体産生細胞 Porphyromonas gingivalis
歯周病

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌感染によって引き起される炎症性の疾患である。日本人の成人における罹患率は6割を超えており、歯を失う原因としては齲蝕より多い。このように歯周病は症例数が多く、抜歯手術に際して臨床材料の入手が容易である。そのため、歯周炎歯肉を本研究の解析対象とした。

歯周病の病変部には、抗体産生細胞(形質細胞)の浸潤が目立つ。しかし、それらの形質細胞が産生する抗体が、どのような抗原に対するものなのか、明らかにされていない。病変部に浸潤することから、疾患に関連した抗体を産生しているものと予想される。したがって、これら病変部に浸潤する形質細胞が産生する抗体を解析することで、疾患の病態解明に貢献できる可能性が期待される。

歯周病は口腔内細菌、とくに *Porphyromonas gingivalis* (ポルフィロモナス・ジンジバリス、Pg) 菌の感染によってもたらされる疾患であることから、歯肉局所において、Pg 菌抗原に対する免疫応答が起きていることが予測される。したがって、病変局所における抗 Pg 菌抗体産生反応は必然と考えられる。さらに、研究代表者らは、これまでに慢性根尖性歯周炎に続発する歯根嚢胞の病変組織を対象に、アルファスクリーン法と酵素抗原法を用いて、抗 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 抗体産生細胞を証明してきた。

「酵素抗原法」は、酵素抗体法の裏返しの組織化学的手法であり、標識抗原を用いて組織内の特異抗体産生細胞を可視化する技術である。この方法を用いると、「特異抗体産生細胞の局在観察」という今までにない視点で、病態解析を行うことが可能となる。この方法は古く1968年に報告され、2009年、Mizutani らによってラットリンパ節を用いて実験的に再現された (Mizutani Y et al, 57(2):101-111, J Histochem Cytochem, 2009)。2011年には、Tsuge (研究代表者) らによってヒトの歯根嚢胞における抗 Pg 菌抗体がはじめて可視化された (Tsuge S et al. J Histochem Cytochem, 59:673-689)。これらの成果から、歯周病歯肉における抗 Pg 抗体産生細胞を可視化できる可能性が高いと期待された。

2. 研究の目的

本研究では、歯周炎の病変歯肉局所で産生される Pg 菌に対する抗体の産生を証明するために、「酵素抗原法」技法を応用する。歯周炎の病変歯肉局所には、多数の抗体産生細胞(形質細胞)が浸潤している。従来、これら抗体産生細胞が産生する抗体の対応抗原は明らかにされてこなかった。病変局所に浸潤することから、原因菌である Pg 菌の対応抗体が産生されていることが推測される。

歯周炎に限らず、一般に炎症局所の抗体産生細胞が産生する抗体の対応抗原の解析は

十分に行われていない。炎症局所で産生される抗体の対応抗原を明らかにすることは、炎症病態を解析するうえで、新たな知見となる。本研究は、そのモデルケースを示すことも目的としている。

3. 研究の方法

(1) 症例およびサンプル: 20例の歯周病患者の抜歯手術の際に、切除した歯肉組織の一部を研究用に採取した。対照症例として3例の口唇・口蓋裂患者の形成手術の際に、切除した口蓋垂粘膜の一部を研究用に採取した。同時に血清も採取した。研究実施に際しては、本人または保護者から書面による同意を得た。

(2) コムギ無細胞系によるピオチン標識抗原タンパクの合成: Pg の抗原タンパク質として、外膜蛋白である Ag53 および病原性プロテアーゼであるジンジパインを検索対象とした。ジンジパインにはタンパク分解酵素 (pro) ドメインとヘマグルチニン (hgp) ドメインが存在する。そこでそれぞれのドメインを分けて合成した。さらにジンジパインは、ペプチド切断部位の異なる Arg-ジンジパインと Lys-ジンジパインが存在するため、これらの2種のジンジパインについて、pro ドメイン (Arg-pro, Lys-pro) と hgp ドメイン (Arg-hgp, Lys-hgp) を合成した。すなわち、合計5種類の Pg 蛋白を検索対象とした。

抗原タンパクの合成は、コムギ無細胞系により行った。ピオチン標識は、標的抗原をコードする DNA を転写鋳型作製用プラスミドへ組み込む段階で、DNA にピオチンリガーゼ認識ペプチドの遺伝子配列を付加する戦略をとった。これにより、タンパク合成時にピオチンリガーゼとピオチンを混在させておくことで、合成されたタンパクにピオチンが付加することができる。合成したタンパクはウェスタンブロットングにより合成の可否を確認した。

(3) アルファスクリーンの実施: 採取した組織を半割してリン酸緩衝液中で破碎した後、遠心上清を回収した。これをアルファスクリーンに用いた。簡潔には、ウェルプレート内で血清または組織抽出液とピオチン標識 Pg 抗原を反応させたのち、その反応液へストレプトアビジン標識ドナービーズとプロテイン G 標識アクセプタービーズを加えて反応後、励起光により発生する発光シグナルを抗原抗体反応シグナルとして検出した。シグナル/ノイズ (反応液中にタンパクを含まない場合シグナル) の比として算出した。

(4) 酵素抗原法の実施: 半割した採取組織の残りをパラホルムアルデヒドで固定した後、凍結組織切片を作製した。この凍結切片に対して、ピオチン標識 Pg 抗原をプローブとした酵素抗原法を実施した。簡潔には、組織切片とピオチン標識 Pg 抗原を反応させた後、結合したピオチン標識 Pg 抗原を西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビ

ジンで検出した。

さらに、酵素抗原法陽性細胞が抗体産生細胞であるか確認することを目的に、ビオチン標識 Pg タンパクと B 細胞マーカーである抗 CD79a 抗体による蛍光二重染色を実施した。ビオチン標識 Pg タンパクの結合をアレキサフルオロ 488 標識ストレプトアビジン、抗 CD79a 抗体をアレキサフルオロ 568 標識抗マウス免疫グロブリン G 抗体で検出した。

標識タンパクと未標識タンパクの競合反応を利用して切片上の抗体の特性を検証する吸収試験も実施した。

(5) 歯肉組織における Pg の局在と抗体産生との関連を観察する目的で、採取した歯肉組織の一部から DNA を抽出して、リアルタイム PCR 法により Pg のゲノム DNA を相対的に定量した。

(6) 血清および組織抽出液における IgG 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 血清および組織抽出液におけるアルファスクリーン法による抗Pg抗体の検出：アルファスクリーンの結果、血清では11例(55%)、組織抽出液では17例(85%)で、5種類のPg抗原のうちいずれかに対して陽性シグナルが検出された。

抗原ごとの血清と組織抽出液の陽性例数は、Ag53：血清で全例陰性、組織で6例(30%)陽性、Arg-hgp：血清で4例(20%)陽性、組織で13例(65%)陽性、Lys-hgp：血清で2例(10%)陽性、組織で15例(75%)陽性、Arg-pro：血清で6例(30%)陽性、組織で17例(85%)陽性、Lys-pro：血清で5例(25%)陽性、組織で3例(15%)陽性であり、Lys-proを除いて血清よりも組織で陽性率が高いという結果が得られた。陽性を示した症例のシグナルの平均値は、Ag53では組織で33.0、Arg-hgpでは血清で10.5、組織で66.6、Lys-hgpでは血清で12.0、組織で55.4、Arg-proでは血清で9.4、組織で52.9、Lys-proでは血清で9.1、組織で6.3であった。このように、アルファスクリーンシグナルが組織抽出液の方が血清よりも高い傾向が認められた。また対照である小児の口蓋垂粘膜では陽性シグナルは検出されなかった。

血清および組織抽出液のIgG濃度の平均値は、血清が11.8mg/ml、組織抽出液が0.31mg/mlであり、血清よりも組織抽出液で明らかにIgG濃度が低かった。このように、組織抽出液のIgG濃度が血清よりも低いにも関わらず、組織抽出液の方が血清よりもアルファスクリーンシグナルの陽性率およびシグナルが高い傾向が認められた。これは、Pg抗原特異的な抗体を産生する形質細胞が病変部に集中的に存在していることを示唆しているものと考えられる。

(2) ビオチン標識Pg抗原をプローブとした酵素抗原法：5種類のビオチン化Pgタンパクをプローブとして酵素抗原法を実施したと

ころ、16例(80%)において、5種類のPgタンパクのうち、いずれかの抗原に対する抗体を産生する形質細胞が検出された。抗原ごとにみると、Ag53では5例(25%)、Arg-hgpでは15例(75%)、Lys-hgpでは16例(80%)

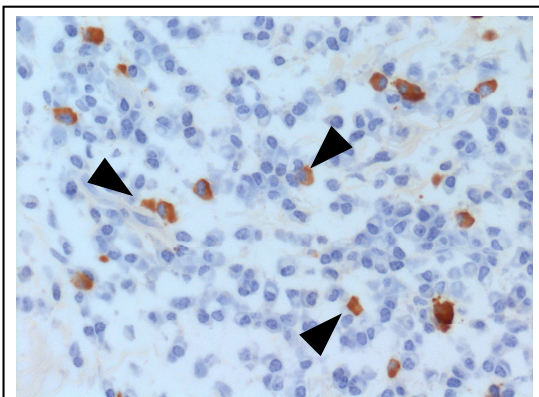


図1 . ビオチン標識 Arg-pro をプローブとした酵素抗原法 . 病変歯肉組織に多数の陽性細胞 (矢頭) が認められる。

Arg-proでは16例(80%)、Lys-proでは4例(20%)に陽性細胞が認められた。図1に実際の酵素抗原法の染色像を示した。

また、完全には一致しなかったが、組織抽出液によるAlphaScreen陽性例では、酵素抗原法も陽性の傾向が認められた。アルファスクリーンシグナルと酵素抗原法の結果の不一致の原因として、サンプリングエラーにより検索対象となる形質細胞が欠落した可能性が疑われる。

一方、ビオチン標識Pg抗原による酵素抗原法と抗CD79a抗体との二重染色では、酵素抗原法陽性細胞において、CD79aもまた陽性となり、酵素抗原法陽性細胞が抗体産生細胞であることが確認された。蛍光二重染色の組織像を図2に示した。

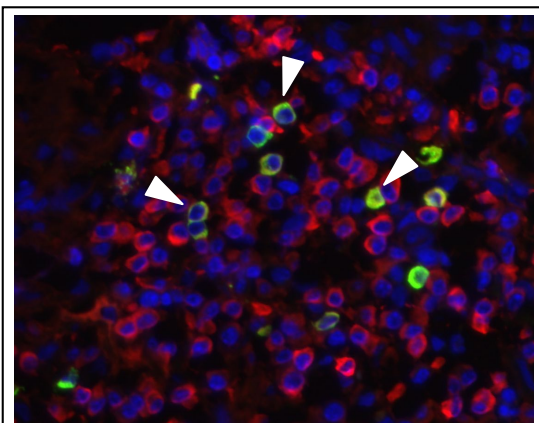


図2 . 酵素抗原法 (ビオチン標識 Ag53、緑) と抗 CD79a 抗体 (赤) による蛍光二重染色 . Ag53 による酵素抗原法陽性細胞が抗 CD79a 抗体にも陽性に染まる (矢頭)

さらに、切片上の抗体の特異性を検証する目的で、ビオチン標識タンパクと未標識タン

パクを用いた吸収試験を実施した。この方法では、未標識抗原を予め組織切片と反応させることで標識抗原の結合が抑制される結果、染色シグナルが減弱することを利用して抗体の特異性を検証する手法である。5種類のPgタンパクについて、それぞれ未標識タンパクを用いて吸収試験を実施したところ、すべての抗原で吸収反応が認められた。したがって、切片上の抗体の抗原特異性が確認された。(5)Pgの局在と抗体産生との関連の解析：歯肉組織の全DNAを抽出して、リアルタイムPCR法によりPgのゲノムDNA量を相対的に定量した。症例ごとに種々の程度にPgのDNAが検出された。PgのDNA量と各抗原に対するアルファスクリーンシグナル、PgのDNA量と酵素抗原法における抗Pg抗体産生細胞の割合の間に有意な相関は、認められなかった。(6)総括：今回の検討により、歯周病の歯肉組織における抗Pg抗体産生細胞の局在が組織学的に証明された。歯周病の病態形成においてPgが強く関与することが再確認された。これまでに組織内に抗Pg抗体が存在することを間接的に証明した報告はあるが、直接的に抗体産生部位を証明した例は他にない。その点で、本研究の意義は大きい。

またAlphaScreenにおいて、各抗原に対するシグナルが血清よりも組織抽出液で強く、酵素抗原法で各Pg抗原に対する抗体を産生する形質細胞が検出された。この結果は、組織内に特異抗体産生細胞が存在しており、その細胞から産生された抗体が、血中へ拡散されていくということを反映していると考えられる。すなわち、病変局所には炎症病態形成に関連した抗原に対して特異抗体を産生する形質細胞が集積しており、病変部の抗体を解析することで、疾患に関連する抗原および抗体を効率的にスクリーニングできる可能性を示唆する結果といえる。

さらに、今回使用した酵素抗原法やアルファスクリーン法は、他の感染症や一部の悪性腫瘍のような形質細胞浸潤が顕著な疾患にも応用可能である。今回、歯周病を対象として、病変組織内における抗病原菌抗体産生細胞を示すことができたことで、他の疾患に対して本研究手法を応用するための道筋を示すことができたと思われる。

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1件)

Mizutani Y, Tsuge S, Takeda H, Hasegawa Y, Shiogama K, Onouchi T, Inada KI, Sawasaki T, Tsutsumi Y. In situ visualization of plasma cells producing antibodies reactive to *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis: The application of the enzyme-labeled antigen method. Mol

Oral Microbiol. 査読有、In press.
<http://dx.doi.org/10.1111/omi.12052>

[学会発表](計3件)

水谷泰嘉、柘植信哉、塩竈和也、尾之内高慶、稲田健一、堤寛. 歯周病歯肉に浸潤する抗 *Porphyromonas gingivalis* 抗体産生細胞:「酵素抗原法」による可視化. 第103回日本病理学会総会. 2014年4月24~26日. 広島国際会議場(広島市)
水谷泰嘉、柘植信哉、塩竈和也、尾之内高慶、稲田健一、堤寛. 酵素抗原法による歯周病歯肉組織における抗 *Porphyromonas gingivalis* 抗体産生細胞の局在証明. 第54回日本組織細胞化学学会総会・学術集会 2013年9月27、28日. 航空会館(東京都)
水谷泰嘉、柘植信哉、塩竈和也、稲田健一、堤寛. 酵素抗原法の技術開発:歯根嚢胞の病変局所で産生される抗体の解析. 第31回分子病理学研究会. 2012年7月21、22日. 恵那グランドホテル(恵那市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柘植 信哉(TSUGE, Shinya)

藤田保健衛生大学・医学部・客員講師

研究者番号:30469035

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし