

氏名	平井 公人
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4721号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	<i>Methanobrevibacter oralis</i> およびヒトのグループII シャペロニンに対する免疫応答の解析
学位論文審査委員	大原 直也 教授 仲野 道代 教授 高柴 正悟 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周病はグラム陰性嫌気性桿菌を主体とした歯周病原細菌の感染によって発症・進行すると考えられている。ところが分子生物学的手法の発達によって、病態に関与する微生物は従来考えられていた以上に多岐にわたることが明らかとなってきた。古細菌である *Methanobrevibacter oralis* (*M. oralis*) は近年、歯周病への関与が示唆されている微生物種の一つであり、これまでの研究から歯肉縁下細菌叢と共生あるいは拮抗関係を示し、細菌叢に影響を与えることが明らかとなっている。また古細菌には真正細菌には存在しないグループIIのシャペロニン(Cpn)を抗原分子として保有する事、さらにこの分子は、ヒトのグループII Cpn (Chaperonin containing T-complex polypeptide : CCT) と相同性が高いことから、*M. oralis* のCpnが交差反応抗原となり、自己免疫応答を誘導していることが示唆されている。グループI Cpnである熱ショックタンパク(HSP60)の交差反応性と自己免疫応答への関与については多くの知見がある。しかし、ヒトのCCTについては、自己抗原となることが報告されているにも関わらず、詳細な解析が行われていない。

今回、歯周病における古細菌感染がCCTに対する自己免疫応答の誘導に繋がる可能性があると考え、歯周病患者ならびに自己免疫疾患患者血清のCCTならびに、*M. oralis* のCpnに対する応答性を解析した。

【方法と材料】

1. 被験者ならびに血清の調整

被験者は全身疾患の無い、歯周病患者30人と自己免疫疾患を有する歯周病患者32人とした。歯周病の無いボランティア18人を健常者群とし、静脈血から血清を調整した。

2. CCTと*M. oralis*のCpnのリコンビナントタンパクの構築

CCTサブユニットCCT3, CCT4, CCT8, そして*M. oralis*のCpnの遺伝子をPCR法にて増幅し、pEU-E01-GST-TEV-MCSに組み込み、発現用プラスミドを構築した。タンパクの発現にはコムギ胚芽無細胞タンパク合成技術を利用し、精製にはグルタチオンセファロースによるアフェニティークロマトグラフィーを応用した。

3. Dot blot法によるCpnサブユニットに対する血清反応の解析

構築したリコンビナントタンパク(CCT3, CCT4, CCT8, *M. oralis*のCpn), ならびに市販のCCT1, CCT5, CCT6, およびヒトHSP60をニトロセルロースメンブレンに500ng/dotの濃度

でブロッティングし、血清反応に使用した。血清は1,000倍に希釈し、各タンパクとの反応はペルオキシターゼ標識抗ヒトIgG抗体を用いて検出した。

4. Western blot 法による各 Cpn に対する血清反応の解析

CCT3, CCT4, CCT8, *M. oralis*のCpn, そしてヒトHSP60をSDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレンに転写した。血清反応はDot blot法と同様に抗ヒトIgG抗体を用いて検出した

【結果】

1. Dot blot 法において、歯周病患者は CCT4 ならびに CCT8 に対して健常者群よりも強い反応性を示した。自己免疫疾患患者は CCT3 ならびに CCT8 に対して強い反応性を示した。
2. *M. oralis* の Cpn と各 CCT サブユニットに対する血清反応性の相関は歯周病患者群で全体的に正の相関を示し、特に CCT3, CCT5, CCT6, CCT8 は有意差をもって相関が強かった。
3. Western blot 法においては、歯周病患者群ならびに自己免疫疾患患者群は CCT4 に対して健常者群よりも強い反応性を示した。
4. *M. oralis* の Cpn に対しては健常者群、患者群ともに強い反応性を示したが、被験者群間にその反応性の違いは無かった。
5. HSP60 に対しては、患者群ならびに健常者群ともにほとんど反応性を示さなかった。

【考察】

今回の結果から、CCT に対する自己免疫応答が誘導されており、その中でもサブユニット CCT3, CCT4, そして CCT8 が自己抗体の標的となっていることが示唆された。さらにこれまで報告の多かった HSP60 では今回用いた被験者血清においては、ほとんど血清反応が確認できなかったことから、HSP60 よりも CCT の方がより自己免疫応答を誘導しやすいことが考えられる。一方で仮説と異なり、患者群、さらに *M. oralis* が口腔内にほとんど生息していないと考えられる健常者群の両群ともに、*M. oralis* の Cpn に対する反応性が非常に強く、群間の差がなかった。これは、*M. oralis* の Cpn が口腔内以外の全身に分布する他の類似古細菌の Cpn とのアミノ酸類似性が高く、特に *M. smithii* (腸内古細菌) の Cpn とは 91 % と高いアミノ酸類似性があるため、これらの類似古細菌が保有する Cpn との交差反応の結果と考えられる。

今回は *M. oralis* に対する抗 Cpn 抗体が、ヒトの CCT との間で交差反応しているかを直接的に示せる結果はない。しかし、*M. oralis* の Cpn に対する血清反応性と各 CCT サブユニットに対する血清反応性の相関を解析したところ、歯周病患者群においては正の相関があった。これは、CCT に対する自己抗体の産生には *M. oralis* の Cpn に対する抗体産生が関連している可能性を示唆するものとする。

【結論】

歯周病患者ならびに自己免疫疾患を有する歯周病患者においては、HSP60 よりも CCT がより自己抗体を産生されやすいこと、またその中でもサブユニット CCT3, CCT4, そして CCT8 に対する自己免疫応答が強く誘導されており、病態に関与していることが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

歯周病はグラム陰性嫌気性桿菌を主体とした歯周病原細菌の感染によって進行すると考えられてきた。古細菌である *Methanobrevibacter oralis* は近年、歯肉縁下のプラークから検出されることが報告されるようになり、歯周病への関与が示唆されている。古細菌には真正細菌には存在しないグループIIのシャペロニン(Cpn)を抗原分子として保有すること、さらにヒトのグループII Cpn (Chaperonin containing T-complex polypeptide : CCT) と相同性が高いことから、*M. oralis* のCpnが交差反応抗原となり、自己免疫応答を誘導していることが示唆されている。グループI Cpnである分子量が60 kDaの熱ショックタンパク60 (HSP60)の交差反応性と自己免疫応答への関与については多くの知見がある。しかし、ヒトのCCTについては、自己抗原となることが報告されているにも関わらず、不明な点が多い。

今回、歯周病における古細菌感染がCCTに対する自己免疫応答の誘導に繋がる可能性があると考え、歯周病患者ならびに自己免疫疾患患者血清のCCTならびに、*M. oralis* のCpnに対する応答性を解析した。

研究結果は、以下の内容であった。

1. ドットプロット法において、歯周病患者はCCT4ならびにCCT8に対して健常者群よりも強い反応性を示した。自己免疫疾患患者はCCT3ならびにCCT8に対して強い反応性を示した。
2. *M. oralis* のCpnと各CCTサブユニットに対する血清反応性の相関は歯周病患者群で全体的に正の相関を示し、特にCCT3, CCT5, CCT6, CCT8は有意差をもって相関が強かった。
3. ウェスタンブロット法においては、歯周病患者群ならびに自己免疫疾患患者群はCCT4に対して健常者群よりも強い反応性を示した。
4. *M. oralis* のCpnに対しては健常者群、患者群ともに強い反応性を示したが、被験者群間にその反応性の違いは無かった。
5. HSP60に対しては、患者群ならびに健常者群ともにほとんど反応性を示さなかった。

以上の結果から、CCTに対する自己免疫応答が誘導されており、その中でもサブユニットCCT3, CCT4, CCT8が自己抗体の標的となっていることが示唆された。さらにHSP60は今回の結果からは、ほとんど血清反応が確認できなかったことから、HSP60よりもCCTがより自己免疫応答を誘導しやすいと考えられる。今回は*M. oralis*に対する抗Cpn抗体が、ヒトのCCTとの間で交差反応していることを直接的に示せる結果は示されていない。しかし、*M. oralis* のCpnに対する血清反応性と各CCTサブユニットに対する血清反応性の相関を解析したところ、歯周病患者群においては正の相関があった。これは、CCTに対する自己抗体の産生には*M. oralis* のCpnに対する抗体産生が関連している可能性が示唆される。これらの新たな成果は、歯周病の病態とリスク因子の解明に寄与するものである。

以上に基づき、審査委員会は本申請論文が博士(歯学)の学位論文として価値があるものと認める。