

慢性関節リウマチにおける歯周病細菌
Actinobacillus actinomycetemcomitans 40kDa 熱
ショックタンパク質の病因論的役割

吉田, 明弘
九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学

<https://doi.org/10.15017/7183624>

出版情報：福岡醫學雑誌. 93 (7), pp.111-115, 2002-07-25. Fukuoka Medical Association
バージョン：
権利関係：



慢性関節リウマチにおける歯周病細菌
Actinobacillus actinomycetemcomitans
40 kDa 熱ショックタンパク質の病因論的役割

九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学

吉 田 明 弘

Immunodominant Region of
Actinobacillus actinomycetemcomitans
40-kilodalton Heat Shock Protein in Patients with Rheumatoid Arthritis

J Dent Res 80; 346-350, 2001

はじめに

感染症における細菌や寄生虫などの病原体の主要抗原の1つが熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein: HSP あるいはストレスタンパク質) であることが明らかになって以来, 感染症の発病における同タンパク質の役割に注目が集まっている³⁾. さらに, このタンパク質のアミノ酸配列は原核生物から真核生物にいたるまできわめてよく保存されている. この相同性の高いタンパク質でありながら免疫原性が非常に強いという相反する特徴により, HSP は慢性関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) などの自己免疫疾患との関連性も疑われている³⁾.

歯科における2大疾患の1つである歯周炎は, 近年の嫌気性菌の分離培養技術の進歩などにより, 歯肉縁下に生息するいくつかの嫌気性細菌がその原因として浮上しており, 歯周炎は特定の口腔内細菌が惹起する感染症であるという認識が強まりつつある. 中でもグラム陰性嫌気性桿菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* や *Porphyromonas gingivalis* がその原因菌として注目されている⁴⁾.

歯周炎は結合組織の破壊と骨吸収を特徴とする疾患であるという点で RA と病態がよく似ている. われわれはこれまでの臨床現場において, 慢性関節リウマチ患者は一般の歯周病患者と比較し

て重篤な症状を呈する場合が多いという現象をしばしば経験してきたため, 歯周病の原因菌が RA の原因となっている可能性について注目してきた. さらに最近, 歯周病と RA における臨床的, 疫学的研究が報告されている²⁾. しかし歯周病細菌の RA 発病における免疫学的な役割については現在のところ全く報告されていない. したがって本研究では, RA における歯周病細菌の病因論的役割を明らかにする目的で歯周病の原因菌の1つである *A. actinomycetemcomitans* の HSP40 (DnaJ) と RA 患者血清との免疫学的応答について解析した.

方 法

1. 供試菌およびベクタープラスミド

本研究で用いた *A. actinomycetemcomitans* Y4 株 (血清型 b) は九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座で継代保存されているものを用いた. ベクタープラスミドの宿主として, *Escherichia coli* DH5 α 株を用いた. また, DnaJ およびそのタンパク質断片を発現させる際には *lac* リプレッサー遺伝子を含む pREP4 を保持する *E. coli* M15 株を用いた. 発現ベクターとしては pQE30 (QIAGEN) を用いた.

2. *A. actinomycetemcomitans* の *dnaJ* 遺伝子および同遺伝子断片を発現させるプラスミドの構築

A. actinomycetemcomitans の *dnaJ* 遺伝子の塩基配列 (DDBJ 登録番号: D87753) を基に *Bam*HI および *Sal*I の制限酵素認識部位を付したオリゴヌクレオチドプライマーを設計し⁵⁾, PCR 法にて *DnaJ* タンパク質をコードする約 1.1 kb の DNA 断片を増幅した。また, 同タンパク質を断片化するために同様の制限酵素サイトを付したプライマーを設計し, PCR 法にて *dnaJ* 遺伝子を 3 分割した (図 1)。これらの遺伝子および遺伝子断片を *Bam*HI および *Sal*I サイトにて発現ベクターである pQE30 に挿入して各々 pQEJ, pQEJ1, pQEJ2, および pQEJ3 とした。

3. 組換え *A. actinomycetemcomitans* *DnaJ* および *DnaJ* 断片の精製

E. coli M15 株に *dnaJ* 遺伝子および同遺伝子断片を保持する pQE30 を形質導入した後, それらの形質転換株によるタンパク質発現を IPTG にて誘導した。さらに超音波破碎機にて菌体破碎を行った後, Ni-NTA レジンによるアフィニティークロマトグラフィーを用いて目的タンパク質を精製した。

4. ヒト血清の採取

ヒト血清は RA 患者, 感染症患者および健康人の 3 群より各々 20 名ずつ採取した。RA 患者は国立病院九州医療センターにて加療中の 20 名 (男性 4 名, 女性 16 名, 平均年齢±標準偏差: 58.7±11.1 歳, 年齢範囲 23-73 歳) より採取した。RA の診断は米国リウマチ協会の 1987 年の診断基準に基づき行われた。疾患コントロールとして採血を行った感染症患者の内訳は腸炎 9 名,

肺炎 8 名, 上顎洞炎 2 名そして大腿部蜂窩織炎 1 名であり, 性別および年齢は RA 患者群と一致させた。また, 健康者コントロールとして採血を行った健康人においても RA 患者群と性別および年齢を一致させた。さらに両コントロール群の患者が自己免疫疾患に罹患していないこと, および全ての血液供給者が免疫抑制剤あるいはステロイド系抗炎症剤を使用していないことを確認した。また, 重度の歯周炎に罹患している患者は対象から除外した。いずれの血液供給者においても十分なインフォームドコンセントを得た上で試料の提供を受けた。

5. ELISA 法による慢性関節リウマチ患者における *A. actinomycetemcomitans* *DnaJ* の免疫学的性状の解析

精製した *DnaJ* タンパク質および同タンパク質断片は重炭酸緩衝液にて 5 µg/ml の濃度に調整し, 96 穴ポリスチレンマイクロタイタープレートに固定した。ブロッキング後, ヒト血清を反応させ, アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体を用いて抗体価を測定した。ヒト血清は 1:100 から 1:25600 まで段階希釈し, 405 nm での吸光度が 0.1 となる最大希釈倍数の逆数を抗体価とした。ELISA 法によるデータの統計学的解析は t-検定によって行った。

結 果

1. 組換え *A. actinomycetemcomitans* *DnaJ* および *DnaJ* 断片の発現と精製

A. actinomycetemcomitans *DnaJ* タンパク質の推定構造を図 1 に示す。N 末端側から順に, アミノ酸番号 1-69 が J-ドメイン, 70-106 がグリシン, フェニルアラニンに富む G/F 領域, 145-205 が CxxCxGxG の配列が 4 回繰り返して存在する Cys 領域, 残りの C 末端側が保存性の低い高変異領域であることが推定される。我々は 1. *DnaJ* タンパク質全体 (*DnaJ*), 2. N 末端側の J-ドメインおよび G/F 領域 (*DnaJ*1), 3. Cys 領域 (*DnaJ*2), 4. C 末端側の高変異領域 (*DnaJ*3) のそれぞれをコードする 4 つのプラスミドを作製した。さらにそれぞれのプラスミドを有する形質転換株から得られた粗抽出標品について SDS-PAGE 法により解析した。その結果, *DnaJ* タンパク質の分子量の大きさはアミノ酸配

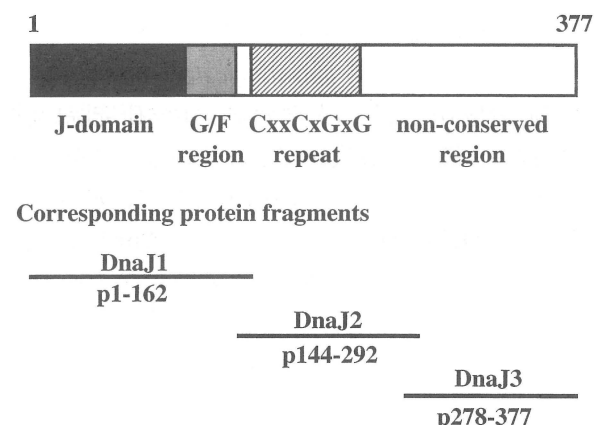


図 1 *A. actinomycetemcomitans* の *DnaJ* タンパク質の推定構造と同タンパク質断片。数字はアミノ酸番号を示す。

列より推定される分子量とほぼ同じ値を示した。しかし、DnaJ タンパク質断片においてはアミノ酸配列より推定される分子量よりも大きい値を示した。アフィニティークロマトグラフィーによる精製標品についても粗抽出標品と同様の分子量であることが確認された (図2)。

2. ヒト血清における *A. actinomycetemcomitans* DnaJ タンパク質の抗原エピトープの解析

ヒト血清中の DnaJ, DnaJ1, DnaJ2, および DnaJ3 に特異的な IgG 抗体価について ELISA 法を用いて解析した。ヒト血清としては RA 患者, 感染症に罹患した患者, 健常人各 20 名ずつから採取したものをを用いた。DnaJ タンパク質全体に対する平均抗体価は RA 患者と健常人について有意差は認められなかった (図3 A)。しかし, DnaJ タンパク質断片に対する平均抗体価を調べたところ, DnaJ1 においてのみ RA 患者と健常人について有意差を認めた (図3 B) が, DnaJ2 および DnaJ3 においては認められなかった (図3 C, および 3 D)。また, この反応が RA

に特異的なものであることを確認するため RA 患者と感染症患者との平均抗体価を調べたところ, DnaJ タンパク質全体および同タンパク質断片のいずれにおいても有意差を認めなかった (図3 A, 3 B, 3 C, および 3 D)。

考 察

HSP は種を越えて保存性の高い, 免疫原性の強いタンパク質である。そのため, HSP は感染症のみならず RA のような自己免疫疾患においてもその関連が疑われている³⁾。さらに, RA と歯周病の病態が似ていること, RA 患者に重度の歯周病に罹患している場合が多いことなどから, 我々は RA と歯周病との関連について, 特に HSP に注目してきた。そこで今回我々は歯周病細菌である *A. actinomycetemcomitans* の HSP40 である DnaJ タンパク質と RA 患者血清との反応性を解析した。

まず, 我々は *A. actinomycetemcomitans* の DnaJ タンパク質全体に対する RA 患者の全抗体価が感染症患者や健常人のそれと等しいことを確認した。このことはリウマチ因子が ELISA 法による今回のアッセイに影響しなかったことを示している (データ省略)。その一方, DnaJ タンパク質の J-ドメインおよび G/F 領域に対する RA 患者血清の IgG 抗体価は健常人や感染症患者のそれと比べ, 著しく高い値を示した。

原核生物から真核生物において, DnaJ/HSP40 ファミリーの N 末端側 105 アミノ残基は J-ドメインおよび G/F 領域という 2 つのきわめて保存性の高い領域からなる³⁾。以前, RA 患者は大腸菌 DnaJ の N 末端側 100 アミノ残基において著しく高い抗体価を示すことが報告されている⁵⁾。さらに, 重度 RA 患者の約 90% が HLA-DR ハプロタイプに QK/RRAA という配列を DRB1 鎖に持ち, 大腸菌の DnaJ タンパク質にも QKRAA という配列があることを示している¹⁾。我々は以前, *A. actinomycetemcomitans* の DnaJ タンパク質には QKRAA の代わりに EKRAA (アミノ酸番号 61-65) という配列があることを報告している (DDBJ 登録番号: D87753)。今回, グルタミンとグルタミン酸の違いにもかかわらず RA 患者の血清は IgG レベルにおいて *A. actinomycetemcomitans* の DnaJ タ

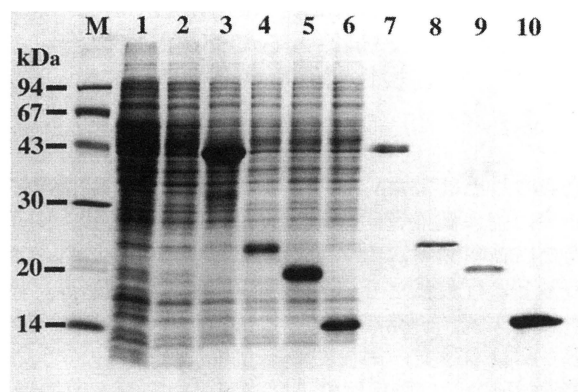


図2 *A. actinomycetemcomitans* の組換え DnaJ タンパク質と同タンパク質断片の SDS-PAGE 解析。M, サイズマーカー; レーン 1, pREP4 を持つ *E. coli* M15 株; レーン 2, pREP4 および pQE30 を持つ *E. coli* M15 株; レーン 3, pREP4 および pQEJ を持つ *E. coli* M15 株; レーン 4, pREP4 および pQEJ1 を持つ *E. coli* M15 株; レーン 5, pREP4 および pQEJ2 を持つ *E. coli* M15 株; レーン 6, pREP4 および pQEJ3 を持つ *E. coli* M15 株; レーン 7, DnaJ の精製標品; レーン 8, DnaJ1 の精製標品; レーン 9, DnaJ2 の精製標品; レーン 10, DnaJ3 の精製標品

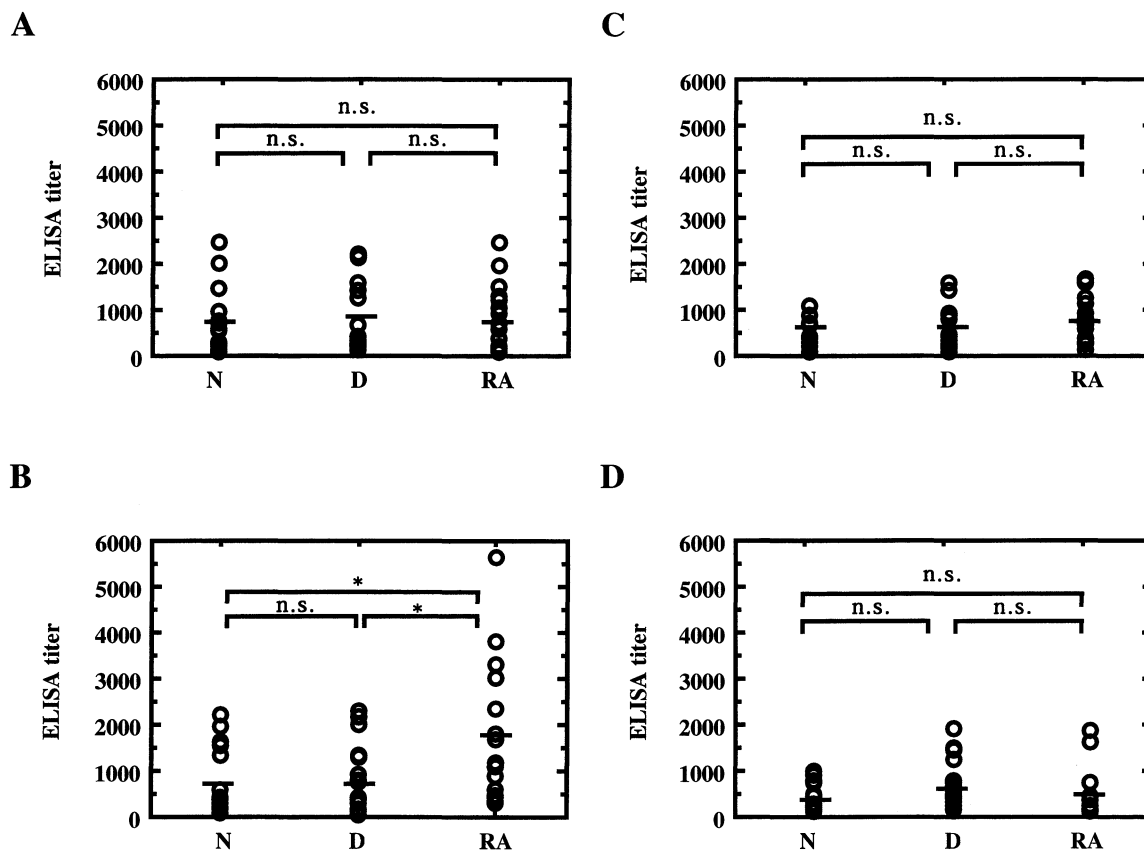


図3 *A. actinomycetemcomitans* の組換え DnaJ タンパク質と同タンパク質断片に対するヒト IgG 抗体価. 横線は平均値を示す. *A. actinomycetemcomitans* の DnaJ (A), DnaJ1 (B), DnaJ2 (C), および DnaJ3 (D) を ELISA 法の抗原として使用した場合のヒト IgG 抗体価. N, 健康人, D, 感染症罹患者, RA, 慢性関節リウマチ患者. n. s., 統計学的有意差なし. * $P < 0.05$.

ンパク質の保存性の高い領域に強い反応を示すことが明らかになった. RA 患者血清がこのような領域に強い免疫応答を示すことは HSP40 の J-ドメインが RA の自己免疫的な発症に関与している可能性があることを示唆するものである.

最後に, 我々は RA 患者に特異的な免疫原性の強い領域を歯周病細菌である *A. actinomycetemcomitans* の DnaJ タンパク質より発見した. ただし, この結果が直接歯周病細菌の HSP が RA 発症の主要因子になっていることを示唆するものではなく, 更なる抗原エピトープの解析などを行い, 歯周病細菌と RA の関連を検討していく必要があると思われる.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究を評価していただき, 平成 13 年度福岡医学会賞を授与していただいた福岡医学会, ならびに福岡医学会幹事の諸先生方に深く

感謝申し上げます. 本研究は九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座, 故古賀敏比古教授, 同研究院口腔顎顔面病態学講座, 大石正道教授の御指導のもとに行われたものであり, 先生方の御指導に感謝致します. 研究を遂行するにあたり, 終始御指導さらには本論文の御校閲を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座, 中野善夫助教授, 於保孝彦講師, 日本大学歯学部衛生学講座, 山下喜久教授に謹んでお礼申し上げます. また, 慢性関節リウマチの病態について御指導いただきました国立病院九州医療センター近藤正一部長, 終始御支援下さいました九州大学歯学部附属病院総合歯科診療部, 樋口勝規教授に深く感謝致します. 最後に, 昨年他界されました故古賀敏比古教授にこの論文を捧げ, 受賞の御報告を申し上げます.

文 献

- 1) Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Ollier WE, La Cava A, Montemayor AC, Weber DA, Montecucco C, Martini A and Carson DA: Positive selection in autoimmunity: abnor-

- mal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nature Med.* 1: 448-452, 1995.
- 2) Kåßer UR, Gleissner C, Dehne F, Michel A, Willershausen-Zonnchen B and Bolten WW: Risk for periodontal disease in patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 40: 2248-2251, 1997.
- 3) Kaufmann SH: Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today.* 11: 129-136, 1990.
- 4) Socransky SS and Haffajee AD: The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 63: 322-331, 1992.
- 5) Yoshida A, Nakano Y, Yamashita Y, Oho T, Ito H, Kondo M, Ohishi M and Koga T: Immunodominant region of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 40-kDa heat shock protein in patients with rheumatoid arthritis. *J Dent Res.* 80: 346-350, 2001.

著者プロフィール

吉田 明弘（よしだ あきひろ）

九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学 医員 歯学博士

1993年4月 九州大学歯学部卒業 1993年6月-1995年3月 同大学歯学部附属病院研修医（口腔外科学第1） 1995年4月 同大学大学院歯学研究科歯学臨床系専攻入学 1999年3月同上終了（博士（歯学）取得） 1999年4月-2002年3月 日本学術振興会特別研究員 1999年7月-2001年1月 ニューヨーク州立大学 Postdoctoral Fellow 2002年4月 九州大学歯学部附属病院医員（予防歯科）現在に至る。◇研究テーマ：口腔バイオフィルムが全身疾患におよぼす影響に関する分子生物学的研究◇趣味：ジョギング，読書

