IMMUNOHISTOCHEMICAL INVESTIGATION OF OTOLARYNGOLOGICAL TISSUES LIKE TONSILS USING THE ANTIBODY WHICH SPECIFICALLY RECOGNIZES D-β-Asp.

Y. Takahashi*, N. Ohta, Y. Suzuki, S. Kakehata

Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, Yamagata University Faculty of Medicine
2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata-City, Yamagata 990-9585, Japan

e-mail*: yuichi@ksirius.kj.yamagata-u ac.jp & y-takahashi@med.id.yamagata-u.ac.jp
Department of Otolaryngology – Head and Neck Surgery, Yamagata University Faculty of Medicine
2-2-2 Iida-Nishi, Yamagata-City, Yamagata 990-9585, Japan
Fax +81-23-628-5382

N. Fujii (Graduate School of Science, Kyoto University)
Division of Radiation Life Science, Kyoto University, Research Reactor Institute
2, Asashiro-Nishi, Kumatori-Cho, Sennan-Gun, Osaka 590-0494, Japan

Abstract

The protein contains D-beta-Asp (D-β-Asp protein) on palatine tonsils, nasal mucosa and vocal cords was investigated. The lymphoid follicles were mainly stained with an anti-D-β-Asp antibody increased with age in case of palatine tonsils. New finding of the existence of the D-β-Asp protein which spread around from the center to periphery was shown in the lymphoid follicles of the palatine tonsils of a 3 and a 11 years-old infants. The turnover time of lymphoid folliclesin nasal mucosa are so fast (about two weeks), then it is difficult to consider D-β-Asp proteins of lymphoid follicles are made during the long time exposure to UV, oxidant etc.

The big difference to a staining pattern was not found in the palatine tonsils of a chronic tonsillitis and IgA nephropathy. From this point, D-β-Asp protein is not directly related to morbidity. Existence of D-β-Asp protein in lymphoid follicle of a child's palatine tonsil, and the D-β-Asp protein which is not directly related to morbidity was suggested.

(Keywords)
anti-D-β-Asp antibody, D-β-Asp, immunohistochemistry, nasal mucosa, palatine tonsil, tonsil, vocal cords

D-β-Asp を特異的に認識する抗体を用いた扁桃等耳鼻科領域組織の免疫組織化学的検討

高橋裕一、太田伸男、鈴木祐輔、欠畑誠治
(山形大学医学部耳鼻咽喉・頭頸部外科学)
藤井紀子（京都大学大学院理学研究科）

要旨

口蓋扁桃を中心に D-β-Asp を含有するタンパク質を調べたところ、抗 D-β-Asp 抗体で染色されるリンパ濾胞は年齢とともに増加した。３歳、11 歳児の小児の口蓋扁桃のリンパ濾胞も抗 D-β-Asp 抗体で染色された。この D-β-Asp 含有タンパク質は中心が濃く周囲に拡散しているパターンでこれまでの報告とは異なっていた。リンパ濾胞、鼻粘膜などはターンオーバーが速いので長い時間をかけて D-β-Asp-含有タンパク質ができたとは考えにくい。慢性扁桃炎群と IgA 腎症の口蓋扁桃の D-β-Asp-含有タンパク質は染色パターンに大きな違いがなかったので、病態と直接関係しない D-β-Asp 含有タンパク質の存在が示唆された。

１．緒　論

リボゾームで合成されることのない D-アミノ酸が時々タンパク質でみられる。それにはタンパク質に組み込まれた D-アミノ酸と遊離の形で体内に存在する D-アミノ酸とがある。タンパク質に組み込まれた D-アミノ酸は主に老人で検出されている。中でも D-β-aspartyl（D-β-Asp）残基が組み込まれたタンパク質については詳しく研究されている[1-3]。D-アミノ酸は、紫外線や酸化剤などで L-アミノ酸から D-アミノ酸に変化したものであると考えられてきた。タンパク質の一部が D-アミノ酸に変わると高次構造が変化し水に溶けなくなったり、機能が低下したりする。そのためクリスタリンのように代謝速度の遅いタンパク質は老化に伴い増加し白内障などの疾病を発症することが知られている[1,2]。皮膚の弾性繊維の D-β-Asp 含有タンパク質(D-β-Asp タンパク質)の形成には紫外線が関係している[4]。遊離の D-アミノ酸はバクテリアでは情報分子（Signal molecules）として機能している。D-アミノ酸はバイオフィルムの解離に一役を担っていることが報告されている[5,6]。環境に老廃物が蓄積してくると、集合していたバクテリアがバラバラに解離する。この際の情報分子に D-アミノ酸が関係している。ヒトや動物では D-アミノ酸が高濃度に存在し特有の生物機能を有することが最近わかってきた。中枢神経系には D-Ser と D-Asp が存在し、体内で合成代謝されている。統合失調症、局所貧血、神経変性疾患などの疾患と関係している。D-アミノ酸は脳卒中発作、てんかん、多発性神経炎、筋委縮性側索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病（加齢、ストレス）との関連が指摘されている[7]。健康体では D-Ser は神経伝達系に関与している D-アミノ酸であり、濃度が変化すると身体に異常をきたし、疾病の原因になると推定されている[7]。そのため診断や治療への応用が期待されている。D-β-Asp-含有タンパク質としては皮膚や動脈のエラスチン（elastin）、皮膚のケラチン(keratin)、水晶体のクリスタリン(crystallin)、脳細胞のアミロイドβタンパク質（amyloidβ protein）やα-シヌクレイン

© 2012 by SSOEL Japan

(α-synuclein)、骨のオステオカルシン(osteocalcin)、歯のフォスホフォリン（phosphophoryn）など、いずれもターンオーバーの遅いタンパク質として知られている[8]。中にはエラスチン（動脈硬化症)、アミロイドβタンパク質(アルツハイマー症）やα- シヌクレイン（パーキンソン病）のように疾病との関連が知られているものもある[8]。アルツハイマー病の脳では D-Asp タンパク質の量が正常人の脳に比べて高いという報告がある[9,10]。D-Amino タンパク質は年齢が増すと多くみられることから、独自の機能を持つというよりはむしろ老化の産物と考えられてきた。このように D-Amino タンパク質は様々な組織や疾病で報告されているが、耳鼻科領域の組織についての報告はみられない。我々は幅広い年齢層が摘出術の適応となる口蓋扁桃を中心に耳鼻科領域の組織について調べた。

２．材料と方法

試料は小児の口蓋扁桃 10 検体、成人の口蓋扁桃 15 検体(３歳～61 歳)、その他に声帯 7 検体、鼻粘膜 10 検体である。各試料についてパラフィン包埋組織切片を作成し、以下に示す方法で抗体処理した。抗 D-β-Asp 抗体は Fujii 等が作成した抗体を用いた[11]。この抗体は Gly-Leu- D-β-Asp -Ala-Thr- Gly-Leu- D-β-Asp -Ala-Thr- Gly-Leu- D-β-Asp -Ala-Thr（３R）を KLH(keyhole limpet hemocyanin)に結合したハプテンを抗原としている[11]。ハプテン（３R）はヒト αA-クリスタリンの 149-153 位に対応する配列である。その特異性は ELISA 法で調べられている。この抗体は D- β -Asp と強く反応するが、L- β -Asp、 L-α-Asp や D-α-Asp とは反応しない[3]。パラフィン包埋切片を抗 D- β -Asp 抗体で染色する方法[1,11]は Table １に示した。要約すれば、定法により脱パラフィン処理、賦活化処理、およびブロッキング処理を行った後に、試料を 100 倍に希釈した一次抗体（抗 D- β - Asp 抗体）で４℃、一晩処理した。一次抗体で処理した試料は洗浄した後に HRP(Horse radish peroxidase)で標識した抗ウサギ IgG で処理し、HRP の基質の DAB(diaminobenzidine)で発色させた。さらに核をマイヤーのヘマトキシリン法で青色に染色して鏡検した。

染色された領域の面積(pixel 値)は Adobe 社の Adobe Photoshop および NIH の ImageJ を用いて求めた。面積は処理する画像を開き、DAB(diaminobenzidine)で発色した領域を抽出し、

Table 1 Antibody staining method

1 Deparaffin → alcohol → distilled water (DW)
2 Washing with Tris buffered saline (TBS)
3 Activation at 120 ℃ in ten minutes by the autoclave
4 TBS washing
5 1% hydrogen peroxide / methanol
6 TBS washing
7 The first blocking with the skim milk
8 Reaction with antibody (anti D-β-Asp, 100X) at 4℃ overnight
9 TBS washing
10 Reaction with horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-rabbit IgG
11 TBS washing
12 DAB (diaminobenzidine) coloring → stop with DW
13 Nuclear staining (Mayer's Hematoxylin) → DW → alcohol →xylene

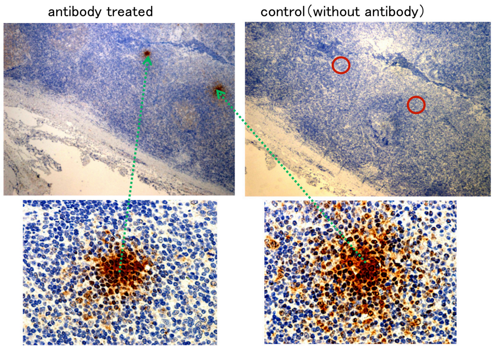

Fig.1(a) D-β-Asp protein which spread around from the center to periphery in the lymphoid follicle of the palatine tonsils of a 8 years-old infants.

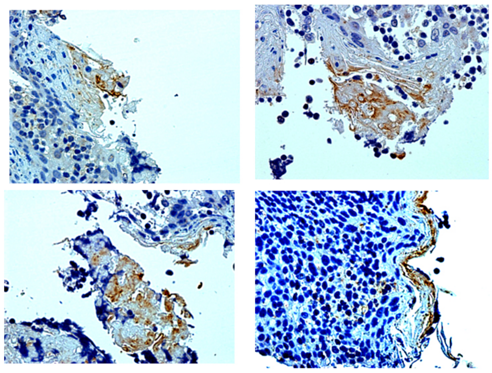

Fig.1 (b) Palatine tonsil from 5 years-old stained squamous cells

抽出された領域を二値化して染色領域の面積を求め、その面積が全領域に占める割合を求めた。すべての口蓋扁桃及び IgA 腎症患者の口蓋扁桃について統計解析を行い、年齢と染色された領域との関係を求めた。

３．結　果

3.1　染色部位

口蓋扁桃を染色した結果、染色の程度に違いがみられるものの、小児の試料から老人の試料まですべての試料が染色された。慢性扁桃炎症例ではリンパ濾胞が強く染色された。３才から 11 才の睡眠時無呼吸症候群の小児の口蓋扁桃は中心が濃く周囲に拡散している染色パターンが多くみられた（10 例中 9 例）(Fig.1a)。１例（10 例中１例）は成人の試料でみられたような特定の組織が染色された(Fig.1b)。IgA 腎症の症例は周囲の間質（線維化）組織や血管内上皮などが染色された(Fig.2a)。成人の口蓋扁桃の大半は IgA 腎症の患者由来であった。多くは血管内上皮など特定の組織が染色された。血管壁や分泌細胞が染色された試料もあった。小児に多く見られた中心が濃く周囲に拡散している染色パターンは成人の扁桃でもみられた（Fig.2b の上２試料)。扁桃以外に、鼻粘膜、声帯および筋層を調べた。いずれの試料も程度に違いはみられるものの抗 D- β -Asp 抗体で染色された(Fig.3)。鼻粘膜では繊毛円柱上皮もしくはその直下の分泌細胞が染色された(Fig.3a)。強陽性に染色される試料と弱陽性に染まる試料とがあった。声帯は扁平上皮細胞のみが染色された（Fig.3b の上の 2 試料)。また耳鼻科領域の組織ではないが、口蓋扁桃を摘出する際にともに摘

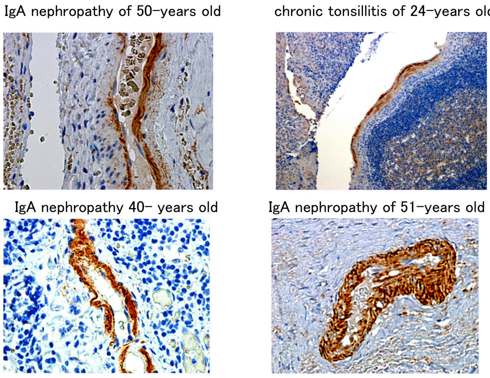

Fig.2a Examples of palatine tonsils of adult patients. Diseases are different, but the same part (squamous cells) is stained with 2 upper images.

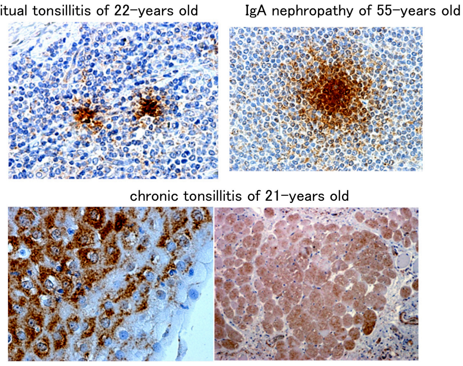

Fig.2b Examples of palatine tonsils of adult patients. Images of D-β-Asp protein spread around from the center to periphery like infants were observed, and images of nasal mucosa cells which stained secretory cells.

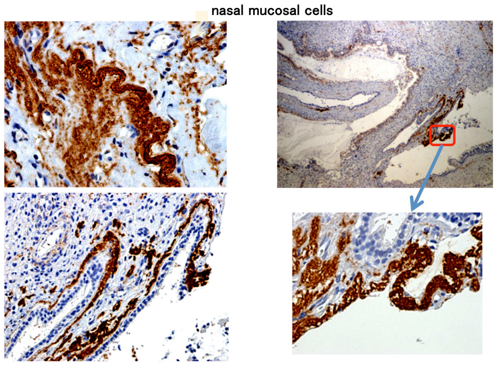

Fig.3a The examples of dyeing of nasal-mucosa cells. Cilia cylinder epithelium or the secretion cell underneath was stained

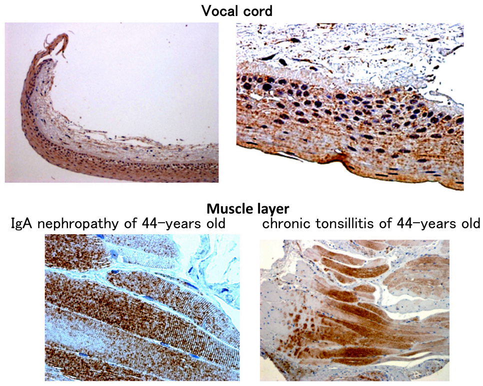

Fig.3b The examples of vocal cord and muscular fibers.The squamous cell was stained in vocal cord. The muscular fiber was stained in the muscle layer.

出された筋の筋繊維が染色された（Fig.3b の下 2 試料）。以上のように使用した抗 D- β -Asp 抗体は口蓋扁桃、鼻粘膜、声帯、筋層のいずれの組織とも反応した。炎症を起こしている部位が染色されるか調べたところ、口蓋扁桃では、必ずしも炎症部位は染色されず、染色された領域も試料ごとに大きく異なっていた。

3.2　染色領域と年齢との関係

画像から染色された領域を抽出し、全画像に占める染色された領域の割合を算出した。染色された領域と年齢との関係をグラフにしたのが Fig.4a と 4b である。口蓋扁桃についてみると年齢と染色される領域との間に正の相関がみられた（Fig.4a）。一方、IgA 腎症の患者口蓋扁桃では年齢と染色される領域との間に相関はみられなかった(p>0.05、n=9、Fig.4b)。IgA 腎症の患者では、強陽性に染色される試料から弱陽性に染まる試料までサンプルにより染色の程度に違いがみられた。

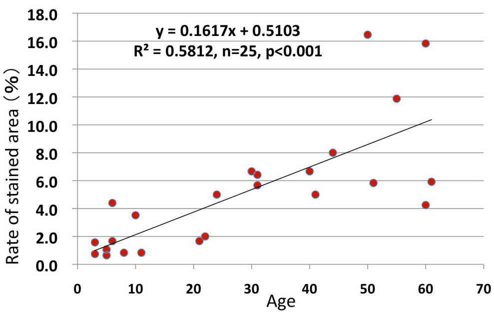

Fig.4(a) Relationship between the amount of D-β-Asp protein and age in all the samples of examined palatine tonsil. The positive correlation was found between them.

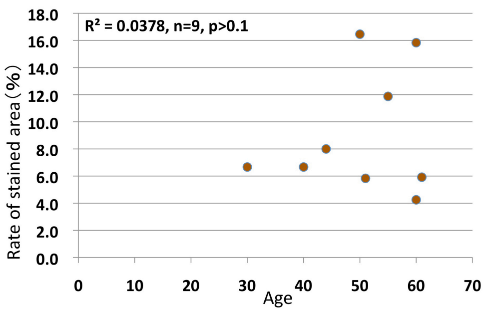

Fig.4(b) Relationship between the amount of D-β-Asp protein and age in the palatine tonsil of IgA nephropathy, The correlation was not found in case of IgA nephropathy

4．討　論

D-アミノ酸は L-アミノ酸が変化した無用のものではなく、中には生物学的な機能をもつものもあると考える。そのため濃度が変化すると身体に異常をきたし疾病の原因になることも考えられ、診断や治療への応用が期待されている。しかしこれまで機能が明らかになったのは遊離の D-アミ

ノ酸であり､タンパク質に組み込まれた D-Amino タンパク質についてはあきらかでない。一般には D-Amino タンパク質は年齢に伴い増加することから､老化の産物と考えられてきた。D-アミノ酸を含むタンパク質であるクリスタリン､エラスチンやアミロイドβ -タンパク質などはターンオーバーの遅いタンパク質として知られている。今回､我々が用いた扁桃はリンパ組織で､リンパ球は２週間ほどで交代している。鼻粘膜や声帯の組織もターンオーバーが早く数週間で交代している。このようにターンオーバーの速い組織での D- β-Asp-含有タンパク質をみている点がこれまでの報告と異なる。ただし、これまでも 480mJ/cm^2 の UVA や UVB 照射で D- β-Asp-含有タンパク質が生成することは報告されている（これはおよそ夏場の一週間分の UVB 量）ので、必ずしも老化と関係しない報告もある[4]。

この度の検討でも口蓋扁桃の D- β-Asp-含有タンパク質は年齢とともに増加するという結果を得た。この度年齢と D- β-Asp-含有タンパク質の量との間に正の相関が得られた。これは口蓋扁桃のターンオーバーの速度は若年者で速く年を取るにつれ遅くなるために相関が得られたものと考える。IgA 腎症患者の口蓋扁桃や鼻粘膜では染色の程度は試料ごとに大きく異なっていた。これは D- β-Asp-含有タンパク質の量の個人差に起因すると考えられるものの､使用した抗体に起因することも考えられる。今回使用した抗体は D- β-Asp があればすべて検出するのではないようである。D- β-Asp の周囲に小さなアミノ酸が結合している場合と大きなアミノ酸が結合している場合では反応の程度に違いがみられるようである[3]。したがって染色の程度の違いは D- β-Asp-含有タンパク質の種類の違いによる可能性もある。小児の口蓋扁桃のリンパ濾胞には、量は少ないものの､中心が濃く周囲に拡散している染色パターンを示す D- β-Asp-含有タンパク質がみられた。抗 D- β-Asp 抗体と反応するタンパク質はすでに３歳､５歳児のリンパ濾胞内にも存在していた。このような小児の試料で抗 D- β-Asp 抗体と反応するタンパク質の存在を示す報告はこれまでない。口蓋扁桃のリンパ濾胞は B リンパ球が有意なリンパ組織で、IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF(Tumor Necrosis Factors), インターフェロンなど多くのサイトカインが産生され､その中心には多くの樹状細胞が存在し司令塔の役目を果たしている。リンパ濾胞内で抗 D- β-Asp 抗体と反応するタンパク質がどのような分子なのか明らかではない。サイトカインなどの情報分子かどうかを調べるには、どのような細胞が抗 D- β-Asp 抗体と反応するか調べれば良い。つまり連続切片を作成し、一方を抗 D- β-Asp 抗体で染め他方を細胞の膜表面のマーカーで染める方法が考えられる。仮に樹状細胞(DC)が分泌しているとすれば、DC のマーカーの CD23 で染色し、抗 D- β -Asp 抗体と抗-CD23 抗体が同一の細胞で染色されていれば機能分子である可能性があるといえる[12]。さらに小児の口蓋扁桃からタンパク質を抽出し Western blotting を行い目的物質を取り出し抗体と反応した D- β-Asp-含有タンパク質の種類を同定する方法も考えられる。しかし小児の D- β-Asp-含有タンパク質（中心が濃く周囲に拡散している染色パターンを示す）はごくわずかなことに加え、成人の口蓋扁桃に多くみられる D- β-Asp-含有タンパク質が入らないように精製しなければならないため容易ではない。

成人の口蓋扁桃の多くは IgA 腎症患者由来のものであった。IgA 腎症患者の口蓋扁桃や鼻粘膜ではサンプルにより濃く染色される試料と弱い染色しかみられない試料とがあった。関係している D- β-Asp-含有タンパク質が一種類とは限らないので D- β-Asp-含有タンパク質がヒトにより異なることも考えられる。ところで IgA 腎症患者のうちでステロイドパルスを施行した 10 症例と施行しなかった 14 症例について口蓋扁桃の D- β-Asp 染色面積に違いがあるか検討したところ、面積に違いはみられなかった（Mann-Whitney の U 検定で有意差なし、鈴木祐輔他 unpublished data）。このことからステロイドの作用機序と D-アミノ酸の発現機序に関連はないと考えられる。また慢性扁桃炎群の口蓋扁桃と IgA 腎症群の口蓋扁桃では染色パターンには大きな違いは認められなかった（Fig.2）。そのため、この種の D- β-Asp-含有タンパク質は疾病と関係がなく、疾病のマーカーではないと思われる。以上のように、口蓋扁桃や鼻粘膜などの D- β-Asp-含有タンパク質の多くはターンオーバーが短く､長い期間に D-アミノ化したタンパク質というよりはむしろ何らかの理由で D-アミノ化しているタンパク質である可能性がある。現段階ではいずれも推測の域を出ない。確実にいうにはさらに例数を増し､これらの D-Amino タンパク質がどのような細胞に存在し､どのような機能を持つタンパク質であるかをつきとめることが今後の課題である。

５．結論

口蓋扁桃を中心に D- β-Asp を含有するタンパク質を調べたところ、抗 D- β-Asp 抗体で染色される領域は年齢とともに増加した。小児の口蓋扁桃のリンパ濾胞にはすでに抗 D- β-Asp 抗体と反応するタンパク質が存在した。リンパ濾胞、鼻粘膜などはターンオーバーが速いので、長い間に D-アミノ化したタンパク質とは考えにくい。慢性扁桃炎群と IgA 腎症の口蓋扁桃の D- β-Asp-含有タンパク質は染色パターンに大きな違いがなく、病態と直接関係しない D- β-Asp 含有タンパク質の存在が示唆された。

謝辞

本研究は山形大学理学部物理学の柴田晋平教授（宇宙物理学）との“宇宙における D-アミノ酸の起原”に関する話し合いが発端となった。

References

1. Kaji, Y., Oshika, T., Takazawa, Y., Fukayama, M., Takata, T. and Fujii, N. Localization of D- β -Aspartic acids-containing proteins in human eyes. IOVS (Investigative Ophthalmology & Visual Science) 48, 3923-3927 (2007)
2. Fujii, N., Shimmyo, Y., Sakai, M., Sadakane, Y., Nakamura, T., Morimoto, Y. Kinouchi, T., Goto, T. and Lampi, K. Aged related changes of alpha-crystallin aggregate in human lens. Amino Acid 32, 87-94 (2007)
3. Aki, K., Fujii, N., Saito, T. and Fujii, N. Characterization of an antibody that recognizes peptides containing D-β-aspartyl residues. Molecular Vision 18, 996-1003 (2012)
4. Fujii, N., Tajima, S., Tanaka, N., Fujimoto, N., Takata, T. and Simo-Oka, T. The presence of D-β-aspartic

acidcontainingpeptidesinelasticfibersofsun-damagedskin:apotentmarkerforultraviolet-induced skin aging. Biochem. Biophys. Res. Commun. 294, 1047-1051 (2002).

5. Kolodkin-G,I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R. and Losick, K.R. D-amino acids trigger biofilm disassembly. Science 328, 627-629 (2010)
6. Cava, F., Lam, H., de Pedro, M.A. and Waldor, M.K. Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. Cell. Mol. Life Sci. 68, 817–831 (2011)
7. Fuchs, S.A., Berger, R., Klomp, L.W.J. and de Koning, T.J. D-amino acids in the central nervous system in healthy and disease. Molecular Genetics and Metabolism 85, 168-180, (2005).
8. Fujii, N., Kaji, Y. and Fujii, N. D-Amino acids in aged proteins: Analysis and biological relevance. J. Chromatogr. 879 3141–3147 (2011)
9. Fisher, G.H., D'Aniello, A., Vetere, A., Cusano, G.P., Chavez, M. and Petrucelli, L. Quantification of D-aspartate in normal and Alzheimer brains. Neurosci. Lett. 143, 215-218 (1992).
10. Roher ,A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Wolkow, C., Wang, R., Cotter, R.J., Reardon, I.M., Ziircher-Neely, H.A., Heinrikson, H.A., Ball, M.J. and Greenberg, B.D. Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. J BiolChem 268, 3072-83 (1993).
11. Fujii, N., Simo-Oka, T., Ogiso, M., Momose Y., Kodama, T., Kodama, M., Akabashi, M. Localization of biologically uncommon D-β-aspartate-containing alpha A crystalline in human eye lens. Mol. Vis. 6, 1-5 (2000).
12. Kijimoto and Ochiai. CD23 (the low-affinity IgE receptor) as a C-type lectin: a multidomain and multifunctional molecule. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 59, 648–664, (2002)