



| | |
|--------------|--|
| Title | 歯肉線維芽細胞とTリンパ球との接着に関する細胞接着分子の解析 |
| Author(s) | 佐保, 輝之 |
| Citation | 大阪大学, 1993, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38054 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

| | |
|------------|---|
| 氏名 | 佐保輝之 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 第10692号 |
| 学位授与年月日 | 平成5年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻 |
| 学位論文名 | 歯肉線維芽細胞とTリンパ球との接着に関する細胞接着分子の解析 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 岡田 宏 (副査) 教授 浜田 茂幸 助教授 小川 裕三 講師 杉 政和 |

論文内容の要旨

(研究目的)

慢性炎症疾患である歯周病の病巣局所では多数のリンパ球浸潤が認められるが、その遊走、定着機構はほとんど解明されていない。近年、リンパ球、好中球などの免疫担当細胞に種々の細胞接着分子が発現されていることが証明され、これらの細胞がリンパ組織中の高内皮小静脈(HEV)や活性化血管内皮細胞さらには種々の細胞外基質などに接着する際に重要な働きをしていることが報告されている。そして、これらの分子は単に接着だけでなく接着を介して細胞の活性化にも関与していることが明らかになってきている。炎症部位へのリンパ球の定着、集積という現象には接着分子を介したリンパ球の血管内皮細胞への接着、血管外遊走、そして、それに続く組織への定着といったプロセスが働いているに違いない。そこで今回、炎症歯周組織へ浸潤したリンパ球が、その局所へ定着する分子機構を解明するために、歯周結合組織の主要な構成細胞であるヒト歯肉線維芽細胞(HGF)とTリンパ球との接着にいかなる接着分子が関与しているかについて検討した。

(材料と方法)

1. ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)：健常人の健康辺縁歯肉より採取した歯肉片からoutgrowthしてきた歯肉線維芽細胞をin vitroにて継代培養し、継代4代から10代目までの細胞を実験に供した。
2. ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)：市販の皮膚線維芽細胞をin vitroにて継代培養し、継代4代から10代目までの細胞を実験に供した。
3. ヒト腫瘍細胞：in vitroにて継代培養されたMolt-4(T cell leukemia), K 562(erythroleukemia), Ramos(B cell lymphoma)を実験に供した。
4. ヒト末梢血T細胞(PBT)の分離：健常人より採取した末梢血より比重遠心法を用い单核球を分離、回収した後、羊赤血球とロゼットを形成させ、ロゼット形成した細胞をPBTとして用いた。
5. 細胞接着実験：各細胞を⁵¹Crにてラベルし、HGFおよびHDFをコンフルエンスにした24穴プレート上にのせ、30分間培養後、特異的に接着した細胞の放射活性を測定することにより評価した。
6. 上述の細胞間接着に関与する細胞接着分子を検討する目的でモノクローナル抗体TS 1/22(抗-LFA-1 α)、84H10(抗-ICAM-1)、SG/73(抗-VLA-4)、KH/33(抗-VLA-5)を実験に供した。
7. モノクローナル抗体の作製：Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)により活性化したMolt-4をBALB/cマウスに免疫し、その脾細胞とsp2/0とを融合させることにより作製されたハイブリドーマを活性化Molt-4とHGFとの細胞間接着を阻害する活性を基にスクリーニングし、モノクローナル抗体4-145を樹立した。また、4-145の認識する分子の性状を検討する目的で、Molt-4の可溶化膜

画分を4-145にて免疫沈降を行い、ラウリル硫酸ナトリウム存在下ポリアクリルアミド電気泳動法にて展開後ウエスタンブロッティングを行った。8. リンパ球表面に発現された細胞接着分子のフローサイトメトリー（FCM）による解析：細胞を種々の細胞接着分子に特異的なマウスモノクローナル抗体と培養後、FITC標識-ヤギ抗-マウスIgG（H & L）を添加することにより蛍光染色を行いFCMによる解析を行った。

（結果及び考察）

T細胞とHGFとの細胞間接着に着目したところ、PBT及びMolt-4は無刺激の状態ではHGFに対する接着能をほとんど示さないが、PMA刺激により著しい接着能を獲得するようになった。そこで、これらの接着が如何なる分子によって担われているかを明らかにするために、これらの接着を特異的に阻害するモノクローナル抗体の作製を試み、モノクローナル抗体4-145を樹立した。この抗体はPBT及びMolt-4とHGF間の接着を濃度依存的に阻害した。そこで、4-145が認識する分子を生化学的に解析したところ、この抗体がVLAインテグリンの β_1 鎖を認識することが明かとなり、T細胞とHGFとの接着にVLAインテグリンが強く関与していることが明かとなった。そこでさらに、VLAインテグリン中のどの α 鎖がこれらの接着に関与しているかについて調べるために抗-VLA α 鎖モノクローナル抗体を用いた細胞間接着阻害実験を行った結果、Molt-4及びPBTのHGFに対する接着には、VLA-4が重要な役割を果していることが明かとなった。また、T細胞系以外のK562及びRamosに関しても検討したところ、これらT細胞系以外の細胞とHGFとの接着においてもVLAインテグリンが関与していることが明かとなった。T細胞の活性化前後のT細胞上のVLAインテグリンの発現量をFCMにより比較したところ、その発現量に殆ど変化がないことから、T細胞の接着能獲得はVLA分子の発現量の増大によるものではなく、VLA分子における何等かの質的变化が関与しているものと考えられた。また、歯肉線維芽細胞とTリンパ球との接着は抗-LFA-1、抗-ICAM-1モノクローナル抗体よりむしろ4-145によって阻害されたのに対して皮膚線維芽細胞とTリンパ球との接着は逆に4-145ではあまり阻害されなかった。このことからTリンパ球は各組織に定着する際に、異なった分子機構によって定着している可能性が示唆された。さらに、VLA-4のリガンドのひとつであるVCAM-1のHGF上での発現をFCMで調べたところ、HGF表面上にはVCAM-1は検出されず、また、VLA-4のもうひとつのリガンドであるフィブロネクチンに対する抗血清を用いた細胞間接着阻害実験の結果、Molt-4とHGFとの接着に対する抗血清による明かな阻害はみられなかった。これらのことからT細胞とHGFとの接着においてはHGF上にVLA-4に対する現在のところ同定されていないリガンドが存在している可能性が示唆された。

以上、VLAインテグリンは炎症部位におけるリンパ球と血管内皮細胞との接着に関与しているだけでなく、血管内皮を通り抜け歯周結合組織中に浸潤していったリンパ球が、歯周病の炎症局所に定着、集積する際にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、活性化T細胞と歯周組織の主要な構成細胞である歯肉線維芽細胞との細胞間接着の分子機構を解析したものである。

その結果、細胞の活性化に依存してT細胞が歯肉線維芽細胞に対して接着能を獲得し、その細胞間接着はVLAインテグリン分子により担われていることを明らかにした。また、歯肉線維芽細胞上にはVLA-4分子に対するこれままでに同定されていないリガンドが存在している可能性が示唆された。

これらの知見は、歯周炎病巣局所におけるリンパ球の挙動を知る手がかりを与えるものであり、本研究は博士（歯学）の学位請求に十分に値するものと認める。