The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯肉線維芽細胞との接着性細胞間相互作用によるCD13陽性Tリンパ球の誘導
Author(s)	岸田, 健
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44005
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【13】

氏　　名	岸　田　　健（きし　だ　たけし）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　17731　号
学位授与年月日	平成15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	**歯肉線維芽細胞との接着性細胞間相互作用によるCD13陽性Tリンパ球の誘導**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　村上　伸也 （副査） 教　授　伊集院直邦　　助教授　大倉　正也　　講　師　中川　一路

論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

炎症歯周組織には多数のTリンパ球が浸潤しており、これらTリンパ球は同組織での炎症反応ならびに免疫反応の制御に深く関与している。近年、慢性炎症疾患の1つであるリウマチの炎症関節腔内の滑液中にサイトカインや細胞外基質の分解等に関与すると考えられている膜結合型メタロプロテアーゼの1つであるCD13（aminopeptidase N）分子を発現しているTリンパ球が存在していること、さらに、心臓弁膜症等の心疾患の局所や腎細胞癌の病変部においてもCD13陽性Tリンパ球が検出されることが報告されており、病巣部で見いだされるCD13陽性Tリンパ球が、これら疾患の病態形成に何らかの関与をしている可能性が示唆されている。しかしながら、CD13分子は通常リンパ球には発現されておらず、リンパ球における同分子の発現誘導機構に関しては殆ど解明されていない。本研究では、炎症歯周組織においても、同部に血管外遊走を果たしたTリンパ球上にCD13分子が発現誘導され得るか否かを、HGFとTリンパ球との接着性細胞間相互作用の観点から解析するとともに、*in vivo*においてもCD13陽性Tリンパ球が実際に炎症歯周組織に局在しているか否かについて検討した。

【材料および方法】

1．末梢血Tリンパ球(PBT)細胞表面上のCD13分子の検出:①;無刺激あるいは0.5 μg/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）あるいは0.1 ng/ml IL-1β、100 U/ml IL-2、50 ng/ml IL-6、1000 U/ml IFNγにて24時間刺激したPBT、②；OKT3（抗-ヒトCD3抗体）を固相化したプレート上で24時間刺激を行ったPBT、③；*in vitro*にて継代培養したHGF単層上で24時間共培養したPBT、④；0.4 μm ポアサイズのメンブレンであるTranswell（Costar）を用いてHGFとPBTが直接接触しない状態で同一ウェル内にて培養したPBT、をそれぞれ回収し、ビオチン標識22A5(抗-ヒトCD13抗体:Leinco Technologies)と反応させ、洗浄後PE標識ストレプトアビジン(Sav-PE)もしくはEAS kit (Flow-Amp)を加え、フローサイトメトリー(FCM)にて解析した。2．PBT細胞表面上のHLA-DRおよびCD26分子の検出：上記PBTをそれぞれ回収し、2.06（抗-ヒトHLA-DR抗体）もしくは、PE標識M-A261（抗-ヒトCD26抗体）と4℃で30分間反応させ、2.06と反応させたサンプルは洗浄後さらにFITC標識-ヤギ抗-マウスIgGを加え、各々FCM解析を行った。3．抗-接着分子抗体によるPBT-HGF間細胞接着阻害がCD13分子発現誘導に及ぼす影響：PBTおよびHGFを、抗-LFA-1抗体および抗-ICAM-1抗体にてそれぞれ1時間前処理すること

により、両細胞間の接着率およびPBT細胞表面上のCD13分子発現に如何なる影響が及ぼされるかを解析した。4．細胞接着実験：24穴平底培養プレートで単層培養したHGF上で、^{51}Crにて標識したPBTを30分間培養した。洗浄により非接着細胞を除去した後、HGF上に接着したPBTからの放射活性をガンマカウンターにて測定し、HGFに接着したPBT細胞数の定量化を行った。5．PBTにおけるCD13 mRNA発現：PMA刺激したPBTをHGF単層上にて共培養後mRNAを抽出し、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction（RT-PCR）法により検出した。6．CD13分子の酵素活性の検索：CD13分子と特異的に酵素反応することにより蛍光を発する基質であるCellProbe®（A・Aminopeptidase M：Coulter）をPBTに添加し、CD13分子酵素活性をFCMにて測定した。7．歯肉浸潤単核球の調製：実験目的を理解し、実験に参加することを応諾した25人の慢性歯周病患者より歯局外科手術時に採取した歯肉組織をMedimachine System（Dako）を用いることにより、単核球を分離した。8．歯周組織浸潤Tリンパ球上のCD13分子の検出：歯肉浸潤単核球をFITC標識UCHT1（抗-ヒトCD3抗体：Pharmingen）ならびにビオチン標識22A5とSav-PEにて二重染色を行い、FCMを用いてCD13陽性Tリンパ球の解析を行った。Tリンパ球中のCD13陽性細胞率は、CD3陽性細胞中のCD13陽性細胞の割合を100分率で表すことにより算出した。

【結果】

①無刺激あるいは、OKT3や上記サイトカインにて刺激されたPBT細胞表面上にはCD13分子の発現は認められなかった。また、PMA刺激PBT細胞表面上にもCD13分子の発現誘導は出来なかった。②無刺激のPBTはHGF単層上で共培養されても細胞表面上にCD13分子を発現することはなかったが、PMAにて活性化されHGFに強固に接着するようになったPBTは、HGF単層上で共培養されることにより、共培養2時間後よりその細胞表面上にCD13分子が誘導され、24時間でその発現は定常状態に達した。③PBT-HGF間の直接的接触を阻善した条件下でPBTとHGFを共培養すると、PBT細胞表面上へのCD13分子の発現誘導が阻害された。④CD13陽性PBT細胞表面上では、MHC class IIの発現が上昇するが、同じアミノペプチダーゼのCD26分子発現は変化しなかった。⑤単クローナル抗体によりLFA-1/ICAM-1間の結合を阻害すると、PBT-HGF間の接着率は抑制され、それに伴い、CD13分子の発現も抑制された。⑥PMA刺激されたPBTをHGFと共培養すると、PBTにおけるCD13 mRNA発現は、HGFとの共培養30分後より上昇し、2時間で最大となりその後減少した。⑦PBT細胞表面上にCD13分子が誘導されるに伴って、酵素活性が上昇することが確認された。⑧解析した全ての歯肉浸潤Tリンパ球中に平均5.78%のCD13陽性Tリンパ球が確認された。

【結論と考察】

以上の研究結果から、通常末梢血においてはCD13分子を細胞表面上に発現していないTリンパ球がHGFと接着することにより、CD13分子の発現が誘導されることが明らかとなった。また、*in vivo*の解析により、歯肉組織中にCD13分子を発現したTリンパ球が局在することが証明された。これらの結果より考察すると、歯肉に浸潤したTリンパ球が歯肉結合組織の主要な構成細胞であるHGFと実際の歯肉組織中において接着することにより活性化を受け、CD13分子を細胞表面上に発現誘導されることが強く示唆された。またこの接着に伴い、慢性炎症に特徴的なリンパ球の定着・集積さらには炎症反応の遷延化が惹起されている可能性が想定された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Tリンパ球上には通常発現していないCD13分子に着目し、CD13陽性Tリンパ球の誘導を、ヒト歯肉線維芽細胞（HGF）とTリンパ球との接着性細胞間相互作用の観点から検討したものである。その結果、末梢血Tリンパ球はHGFと直接接着することにより、CD13分子を細胞表面に発現し、この発現誘導にはLFA-1/ICAM-1を介した接着経路が関与している可能性を示した。また、実際の炎症歯周組織中においても、CD13陽性Tリンパ球が存在していることを明らかにした。これらの知見は、歯周病の病巣局所において血管外遊走をはたしたTリンパ球がHGFと実際に接着性細胞間相互作用を介して活性化を受けていることを強く示唆するものであり、歯周病の病態形成の機序を知る上で貴重な情報と考えられることから、本研究は博士（歯学）の学位を得るに値するものと認める。