

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	まし だ たけし 岸 田 健
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、慢性炎症疾患の一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一つである 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 μ g/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) あるいは 0.1 ng/ml IL-1 β 、100 U/ml IL-2、50 ng/ml IL-6、1000 U/ml IFN γ 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 μ m 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 $^{\circ}$ C 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害した条件下で 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。