

## 学位研究紹介

## 歯周炎における T 細胞レセプターレパトアの関与

## Evidence for the specific T cell response in periodontal disease

新潟大学歯学部歯科保存学第二講座  
中島貴子, 山崎和久, 原 耕二

Department of Periodontology,  
Niigata University School of Dentistry

Takako Nakajima, Kazuhisa Yamazaki, Kohji Hara

第1編 歯周炎歯肉組織 T 細胞レセプター V 領域遺伝子発現の偏り [1]

第2編 *Porphyromonas gingivalis* 由来抗原による刺激後の T 細胞クロノタイプの変化 [2]

## 緒 言

慢性炎症性歯周疾患のうち歯槽骨吸収と結合組織破壊を伴う歯周炎は B 細胞病変, 骨吸収を伴わない歯肉炎は T 細胞病変といわれる組織像を呈する。著者らは炎症歯肉中の T 細胞の Phenotype は歯周炎, 歯肉炎ともに CD45RO 陽性のメモリータイプである [3] もの, サイトカイン産生パターンを指標にした機能の解析からは, 歯周炎では B 細胞活性化サイトカイン, いわゆる Th2 タイプのサイトカインを産生する T 細胞が優勢で, 活性化 B 細胞の割合も高いことを示してきた [4, 5]。この T 細胞の機能の違いは認識している抗原の違いではないかと考えられるため, T 細胞上の抗原認識のレセプターである T 細胞レセプター (TCR) の  $\alpha$ ,  $\beta$  鎖の variable 領域 ( $V\alpha$ ,  $V\beta$ ) について検索した。第1編 (以下 [1]) では炎症歯肉組織中に浸潤している T 細胞の TCRV レパトアを, 第2編 (以下 [2]) では代表的歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) による刺激が TCRV $\beta$  レパトアの遺伝子 (TCRBV) 発現及び T 細胞のクロノタイプに及ぼす影響を検索した。

## 材 料 と 方 法

[1] においては歯周炎 (P), 歯肉炎 (G) の被験者より歯肉バイオプシーを採取し, 連続凍結切片を作製した。TCR の V 領域のうち  $V\alpha 2$ ,  $V\beta 5.2-3$ ,  $V\beta 5.3$ ,  $V\beta 5.1$ ,  $V\beta 6.7$ ,  $V\beta 8$  そして  $V\beta 12.1$  に特異的なモノクローナル抗体と T 細胞マーカーである CD3 に特異的なモノク

ローナル抗体を用いてアルカリフォスファターゼ抗アルカリフォスファターゼ法により免疫組織染色を行った。また歯肉バイオプシーを採取した被験者の一部より末梢血を採取し, 末梢血 T 細胞の上記の TCR レパトアについてフローサイトメトリーにより検索し歯肉と比較した。

[2] においては, P, G 被験者より末梢血単核細胞を分離後, *Pg* 外膜抗原 (*PgOM*) を添加と無添加で 6 日間培養した。AGPC 法にて全 RNA を抽出し, reverse transcription にて cDNA を合成, 22 種類の TCRBV 特異的プライマーを用いて PCR を行い PCR 産物をアガロースゲル電気泳動しエチジウムブロマイドで染色後画像解析 (NIH Image) した。さらにクロノタイプの検索のため single strand conformation polymorphism (SSCP) 解析を行った。上記の PCR 産物を加熱変性して 1 本鎖 DNA にし 4% アクリルアミドゲルに電気泳動後, メンブレンに転写, 特異的なビオチン化プローブをハイブリダイズさせ, Phototope star detection kit<sup>®</sup> (New England Biolab) を用いて X 線フィルムに感光させた。

## 結果及び考察

[1] では, 炎症歯肉において検索した 7 種類の TCR V レパトアの発現パターンには個人差がみられたが, 一般的に  $V\beta 5.1$ ,  $5.2-3$ ,  $5.3$ ,  $6.7$  は高い発現率を, 一方  $V\alpha 2$ ,  $V\beta 8$  は低い発現率を示した。歯肉の歯肉溝側と口腔側では異なる抗原の影響を受けている可能性があるため, 切片を歯肉溝側, 中央部, 口腔側の 3 つのエリアに分けて解析したが, エリアごとの差はみられなかった。同一個体の歯肉と末梢血との比較では, TCRV レパトアの発現は末梢血に比べて歯肉で偏っていた。末梢血では各 TCR の陽性率は概ね 1-5% だったが, 歯肉では末梢血での陽性率よりも低い傾向を示し,  $V\alpha 2$ ,  $V\beta 5.2-3$ ,  $V\beta 5.1$ ,  $V\beta 8$  では末梢血の方が有意に発現が高かった (図 1)。しかし 10 例中 3 例で 1 ないし 2 つのレパトア ( $V\beta 5.2-3$ ,  $6.7$ ,  $8$ ,  $12.1$ ) において末梢血での陽性率を大きく上回るものがみられた。各レパトアの歯肉での陽性率の高低は末梢血と平行に一致することはなかった。以上より, 炎症歯肉に浸潤している T 細胞は末梢血からランダムに移行してきているのではなく, 歯肉局所での宿主対パラサイトの応答は, 特定の TCR レパトアを有する T 細胞の歯肉局所への選択的な移動定着または増殖に関与していることが示唆された。

[2] においては *PgOM* で刺激後の 22 種類の TCRBV 遺伝子の発現を PCR-アガロースゲル電気泳動解析したところ, P 群及び G 群ともに *PgOM* 刺激により有意な

変化は認められなかった。しかし症例によってはあるレパトアで刺激後に発現率が増加または減少したが、一定の傾向はみられなかった。SSCP 解析では全サンプルで、刺激後検出されるバンドの数、位置に変化がみられ、それは被験者により異なっていた(図2)。全般的にはクロノタイプの数を示すバンドの数はP、G群ともに刺激後減少した(P: 40.2本→30.2本, G: 46.0本→26.2本(p < 0.05))。一方BV1, 3, 5S1, 6, 8, 13S1, 14, 15, 16, 18, 20で新たなバンドの発現がみられる症例がそれぞれ1ないし2例示された。これはこのバンドの位置に集積したクロノタイプのT細胞がPg刺激に反応して増殖したことを示唆する。

SSCP 解析はTCRの complementarity-determining region 3 (CDR3) 領域の塩基配列の違いに基づいてT細胞のクローナリティを明らかにする方法である。CDR3領域は抗原認識の際に直接抗原を認識する部位である。Pg 外膜抗原に対する反応はTCRV 遺伝子の発現を調

べるだけでは検出できないが(PCR-アガロース電気泳動解析), SSCP 解析においてPg 刺激後にバンドが出現、消失したことは特定のCDR3領域を有するT細胞クロノタイプが抗原特異的に増殖あるいは消失したことを示唆している。バンドの出現、消失のパターンがヒトにより異なっていたことは、ヒトにより認識する抗原エピトープが異なっている可能性、HLA-DR (ヒト主要組織適合抗原)の違いのためと考えられる。出現、消失したT細胞クロノタイプが真にPgの病原性のエピトープ特異的であるのかどうか、P群とG群あるいはヒト間で共通したエピトープが認識されているのかどうか明らかにするためには、今後、CDR3領域のシーケンスやより精製された抗原エピトープが必要である。

[1] 及び [2] の研究より、歯周炎の病因には病原特異的にT細胞の歯肉局所への移動定着, clonal expansion, clonal deletion が関わっている可能性が示唆された。

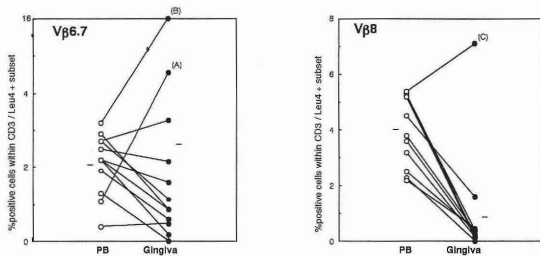


図1 末梢血及び歯周炎歯肉におけるVβ6.7及びVβ8陽性T細胞の比率の比較。線で結ばれた点は同一個人からのサンプルを示す。○:末梢血; ●:歯肉

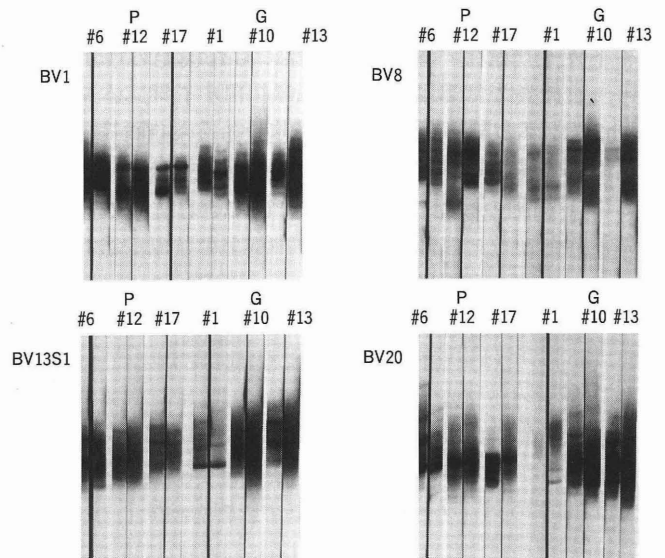


図2 PgOMで刺激後のT細胞クロノタイプの変化をSSCP解析により示す。左レーンは無刺激、右レーンはPgOM刺激後のサンプル。#:患者の番号、P:歯周炎、G:歯肉炎