

ふりがな	あまぬま りょうこ
氏名	天 沼 亮 子
学位	博 士 (歯学)
学位記番号	新大院博 (歯) 第 9 2 号
学位授与の日付	平成 1 9 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Increased infiltration of CD1d ⁺ and natural killer T cells in periodontal disease tissues (歯周炎罹患歯肉組織において CD1d 陽性細胞とナチュラルキラー T 細胞の浸潤は増加している)
論文審査委員	主査 教授 山 崎 和 久 副査 教授 吉 江 弘 正 教授 星 野 悦 郎

博士論文の要旨

【目的】

近年、脂質抗原に対する免疫応答が感染防御やトランス維持に重要であり、これには抗原提示細胞上の CD1 分子と自己あるいは外来抗原反応性 T 細胞が関与していることが知られるようになった。中でも CD1d 分子は免疫調節機能を持つ natural killer (NK) T 細胞に抗原提示を行い活性化させることが明らかとなっている。ヒトの NKT 細胞は TCR V α 24 インバリアント鎖を有しており、免疫応答を負に制御する制御性細胞の 1 つとして近年着目されている。我々はこれまで、歯周炎の組織破壊には感染防御免疫のみでなく自己免疫的応答が関与すること、さらに V α 24 インバリアント NKT 細胞(V α 24iNKT)の炎症歯肉組織における比率が末梢血と比較すると有意に高いことを遺伝子発現解析により明らかにしてきた。そこで今回我々は、歯周組織局所における CD1 アイソフォーム、V α 24iNKT の発現と局在を免疫組織学的手法により解析した。

【方法】

1. インフォームドコンセントの得られた慢性歯周炎患者 19 名、歯肉炎患者 8 名より歯肉組織を採取し連続凍結切片を作成し、各試料について H-E 染色により歯肉組織中の炎症性細胞浸潤の程度を確認した。
2. CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, invariant V α 24J β Q TCR, CD3, CD19, CD83 に対する特異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, ABC-ペルオキシダーゼ法による単染色および二重染色を行った。
3. 歯周ポケット上皮または歯肉溝上皮直下の結合組織内炎症細胞浸潤について、CD3/CD19 の二重染色の結果をもとに T 細胞及び B 細胞を含む 5-6 カ所の 0.04mm² のエリアを任意に選択し、連続切片上で各種陽性細胞数と単核球細胞数を測定した。
4. 各測定値の統計学的解析には Mann-Whitney U-test, Wilcoxon's signed rank test および相関

分析を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

【結果】

1. 歯周炎，歯肉炎病変部ともに $CD1d^+$ 細胞数は $CD1a^+$ ， $CD1b^+$ ， $CD1c^+$ 細胞数に比べ有意に上昇していた。
2. 歯周炎において $CD1d^+$ 細胞と $V\alpha 24iNKT$ が歯肉炎に比較して有意に多く浸潤しており，互いの浸潤増加には相関が認められた。
3. $CD1d^+$ 細胞と B 細胞の分布に一致が認められた。
4. $V\alpha 24iNKT$ と $CD1d^+$ 細胞が近接している像が認められた。

【考察】

B 細胞病変である歯周炎組織において，浸潤細胞に占める $CD1d$ 陽性細胞と $V\alpha 24iNKT$ の割合が上昇していること，また $CD1d$ 発現と B 細胞の分布が一致していたことから，浸潤 B 細胞上の $CD1d$ が $V\alpha 24iNKT$ に抗原を提示し，NKT 細胞活性化を誘導することが考えられる。

【結論】

歯周炎罹患歯肉組織における $V\alpha 24iNKT$ の局在と $CD1d$ との関与が明らかとなり，歯周病原細菌の感染の過程で生じた自己免疫応答の制御に関与する可能性が示唆された。

(審査結果の要旨)

慢性炎症性歯周疾患は歯周病原細菌の感染により発症するが，炎症反応の過程で炎症性サイトカインなどの炎症メディエーターや抗体の産生が上昇すると同時に歯周組織構成細胞に熱ショックタンパク 60 (HSP60) が発現することが知られている。ヒト HSP60 は歯周病原細菌の GroEL と相同性が高く，歯周炎組織にはヒト HSP60、細菌性 GroEL 両者を認識する T 細胞の集積が認められる。さらに，互いに交叉反応性を持った抗ヒト HSP60 抗体、抗 GroEL 抗体の産生も認められる。これらのことは歯周炎の病態において分子相同性に基づく免疫応答が関与していることを強く示唆している。一方，歯周炎の臨床的病態においては原因である細菌の量と疾患重症度にしばしば関連がみられないことから，患者の免疫能の違いが病態形成に大きく関わっていると考えられる。このことは少なくとも一部は免疫抑制機能をもった細胞集団の影響によるものと考え、申請者は感染防御免疫と自己トレランスの維持の双方に重要な働きをする natural killer T (NKT) 細胞に注目した。

これまで，申請者の所属する研究グループは歯周炎において invariant NKT 細胞が炎症歯肉組織における比率が末梢血と比較すると有意に高いことを示している。脂質抗原提示分子である CD1 分子のひとつ、 $CD1d$ は α -Galactosylceramide を invariant NKT 細胞へ提示し、 $CD1d$ 拘束性に活性化することが示されている。 $CD1$ 分子は細菌由来糖脂質抗原を提示することが明らかとなっており，歯周病原細菌抗原の提示への関与が示唆される。しかしながら，invariant NKT 細胞及び、その誘導に密接に関係している $CD1d$ 分子の歯周炎罹患局所での局在については明らかとされていなく、ましてや歯周組織における invariant NKT 細胞の機能も明らかとなっていない。そこで本研究では invariant NKT 細胞、 $CD1d$ 分子の歯周組織における局在と invariant NKT 細胞の歯周病原性細菌由来抗原刺激によ

る反応性を明らかにすることを目的とし、以下の方法で解析した。

慢性歯周炎患者 19 名および歯肉炎患者 8 名よりインフォームドコンセントを得た上で歯周手術や抜歯の際に歯周組織を採取し、連続凍結切片を作成した。Invariant NKT 細胞、CD1a,b,c,d 各分子に対するモノクローナル抗体、さらに CD3, CD19, CD68, CD83 の 4 種類のフェノタイプマーカー抗体を用いて、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(APAAP 法)と ABC ペルオキシダーゼ法(ABC-PO 法)により免疫組織染色を行い、病型による違いを検討した。その結果、4 種類の CD1 分子のすべての発現が歯周組織中で認められたことより、タンパク抗原のみならず、脂質抗原も歯周炎の病態形成に関わっていることが強く示唆された。4 つの CD1 分子の中でも、NKT 細胞に脂質抗原を提示するための分子 CD1d が歯周組織中でもっとも高い頻度で認められ、また、歯肉炎よりも歯周炎組織で高頻度に認められた。さらに CD1d 分子の発現頻度は invariant NKT 細胞の浸潤頻度と正の相関を示したこと、invariant NKT 細胞と CD1d 陽性細胞が近接している像が認められたことより、歯周組織において NKT 細胞が CD1d 拘束性に活性化され、免疫応答の制御に関係している可能性が示唆された。

感染症、炎症における NKT 細胞の役割については自己免疫応答の制御、感染防御機構において注目されているが、慢性炎症、とりわけ歯周炎における動態を調べた報告は極めて少ない。本研究は歯周炎組織における invariant NKT 細胞の分布、頻度、分子拘束性を明らかにした。これらの結果は歯周炎の病態形成メカニズムの解明に寄与するものであり、学位論文として十分な価値を認める。