

氏名 河野 隆幸

授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学

学位授与の番号 博 乙 第 3575 号

学位授与の日付 平成 13 年 3 月 25 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題名 Human Fibroblasts Ubiquitously Express Glutamic Acid Decarboxylase 65(GAD 65):

Possible Effects of Connective Tissue Inflammation on GAD Antibody Titer
(歯肉線維芽細胞はグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)65を発現する:
結合組織における炎症がGAD抗体価に与える影響)

論文審査委員 教授 滝川 正春 教授 古田 裕昭 教授 村山 洋二

学位論文内容の要旨

【緒言】

1型糖尿病は、臓器特異的自己免疫疾患である。すなわち、自己反応性 T 細胞による細胞性免疫反応が、膵β細胞を破壊して発症する。そのため1型糖尿病では、多くの自己抗体が検出される。なかでも膵β細胞が産生するグルタミン酸脱炭酸酵素 (Glutamic acid decarboxylase, GAD) 65 に対する GAD 抗体が注目される。このものは1型糖尿病の発症前から多くの患者血清で検出されるので、1型糖尿病の診断や発症予知のマーカーとして利用される。また、膵β細胞の GAD65 発現を抑制したトランスジェニックマウスでは、自己反応性 T 細胞による膵β細胞の破壊が抑制され、1型糖尿病の発症は抑制されると考えられている (Yoon, 1999)。

一方、歯周炎の成因でも自己免疫的機序が考えられている。すなわち、結合組織破壊に伴い、自己抗原が免疫系に曝されることによって起こる自己免疫反応である。これを裏付ける事実として、歯周炎患者では、歯周組織の主要構成基質である I 型コラーゲンに対する抗体が産生されていることや、歯周組織の自己抗原に対する抗体産生細胞が存在することなどが挙げられる。

1型糖尿病患者では歯周炎が発症・進行しやすいことが知られている。また、歯周炎が糖尿病の症状を増悪させることも分かっている。しかし、そのメカニズムは未だよく解っていない。本研究は、1型糖尿病の重要な機序抗原である GAD65 を介する歯周病の1型糖尿病への関わりの一端を解明することを目的とした。すなわち、1) 歯周組織の細胞が GAD65 を産生するか、2) もし産生するとしたら、炎症の有無によって GAD65 発現がどのように変化するか、そして、3) 歯周病患者は GAD 抗体を有するかを調べようとするものである。

【材料および方法】

1. 細胞と培養： ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)、ヒト歯根膜線維芽細胞 (PDL)、ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) は Nishimura らの記載 (1996) に従って、口腔上皮癌由来 KB 細胞、骨肉種由来 Saos-2 細胞、子宮頸部癌由来 Hela 細胞は大日本製薬株式会社のカタログの記載に従って、そして腎臓のメサングウム細胞は Shikata らの記載 (1999) に従って培養し、実験に供した。

2. 歯肉組織： 慢性辺縁性歯周炎患者の歯周外科処置時に採取した炎症歯肉片、および埋伏第三大臼歯抜歯時に採取した健常歯肉片を、歯肉組織として供した。いずれの歯肉組織もインフォームドコンセントのもとに得た。

3. **GAD65 mRNA の検出と塩基配列の決定：** 培養 HGF, PDL, NHDF, KB 細胞, Saos-2 細胞, HeLa 細胞, およびメサンギウム細胞に TRIZOL[®] RNA 分離キット (GIBCO 社製) を用いて得られた mRNA 画分から, RT-PCR 法によって cDNA を増幅した。cDNA は, 2%アガロースを用いて電気泳動し分離した後, 0.5 μ g/ml のエチジウムプロマイドで染色して検出した。また, HGF の cDNA は ABI PRISM[®] DNA Sequencing Kit (Perkin Elmer) を用いて増幅したのち, 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems) を用いて分析し塩基配列を決定した。なお, このものの相同性の検索は, Buら (1992) が報告した GAD65 の塩基配列に比較して行った。
4. **ウエスタンブロット：** ウエスタンブロットは, HGF を可溶化し SDS-PAGE したものを PVDF 膜 (Millipore 社) に転写して行った。GAD65 に特異的な抗体として, 一次抗体に抗ウサギ GAD65 ポリクローナル抗体 (Affinity Research Products Limited) を, 二次抗体にペルオキシターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Life Science) を用いた。なお, 抗原・抗体結合物は 4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素水による発色によって検出した。
5. **免疫染色：** 免疫染色は, VECTASTAIN[®] (Vector) を用いた免疫ペルオキシダーゼ法により行った。すなわち, パラフィン包埋した歯肉組織切片を, 一次抗体に抗マウス GAD65 ポリクローナル抗体 (Affinity Research Products Limited) を, 二次抗体に抗マウス IgG 抗体 (Vector) を用い染色した。抗原・抗体結合物はアビジンとビオチン化西洋ワサビペルオキシターゼと反応させ, 3,3-ジアミノベンチジンで発色させることによって検出した。
6. **血清：** 全身疾患を有していない歯周病患者 63 名 (13-73 歳, 平均 40.9 歳), 歯周病を有する 1 型糖尿病患者 7 名 (15-32 歳, 平均 23.0 歳), 歯周病を有さない 1 型糖尿病患者 7 名 (13-31 歳, 平均 20.3 歳), そして, 全身疾患を有さずかつ歯周病にも罹患していない健常者 63 名 (10-46 歳, 平均 22.5 歳) から, 末梢血を採取し, 常法に従って血清を分離した。
7. **GAD 抗体価の測定：** 血清の GAD65 抗体価の測定は SRL 社 (東京) に依頼した。

【結果および考察】

1. **各種細胞における GAD65 の発現：** HGF, PDL, NHDF, およびメサンギウム細胞は GAD65 mRNA を発現した。また可溶化した HGF は, 抗 GAD65 抗体と反応した。すなわち, HGF および PDL が GAD65 を産生することを示した。
2. **歯周組織における GAD65 の発現：** GAD65 は, 健常歯周組織より炎症歯周組織に多く発現した。この発現量の違いは, 炎症に依拠すると考えられる。
3. **歯周病患者における GAD65 抗体の存在：** 歯周病患者 63 名中 2 名で GAD65 抗体価が, 正常値を超えて高かった。しかしながら, 健常者はすべて検出限界以下であった。なお, 1 型糖尿病を有する群では, 歯周病を有する者 7 名中 4 名, 歯周病を有さない者 7 名中 2 名で GAD65 抗体価が正常値を超えて高かった。したがって, 歯周病患者では糖尿病を有してなくても, 歯周組織で産生される GAD65 によって GAD65 抗体が誘導されると考えられる。

【結論】

HGF や PDL は GAD65 を産生し, その GAD65 の産生量は炎症の程度によって変化する。したがって, 歯周炎のような慢性的に結合組織が破壊される炎症性疾患では, その局所で産生される GAD65 が, 免疫担当細胞に働いて GAD 抗体を誘導したり, あるいは抗体産生を助長する可能性がある。

論文審査結果の要旨

1型糖尿病患者では歯周炎が発症・進行しやすいことが知られている。また、歯周炎が糖尿病の症状を増悪させることも分かっている。しかし、それらのメカニズムは未だよく解っていない。本研究は、1型糖尿病において発症や診断に関わる重要な自己抗原であるグルタミン酸脱炭酸酵素（Glutamic Acid Decarboxylase, GAD）65を介する、歯周病の1型糖尿病への関わりを、自己免疫の観点から明らかにすることを目的としている。

研究は、1) GAD65を産生する歯周組織の細胞の同定、2) 炎症がGAD65の発現に与える変化、そして、3) 歯周病患者におけるGAD抗体価の測定の3つのステップからなる。

結果として、1) 歯肉線維芽細胞や歯根膜線維芽細胞はGAD65を産生すること、2) そのGAD65の産生量は炎症の存在によって変化すること、そして3) 歯周炎のような慢性的に結合組織が破壊される炎症性疾患では、その局所で産生されるGAD65が免疫担当細胞に働いてGAD抗体を誘導したり、抗体産生を助長する可能性があることを示した。

本論文の結果は、ある種の歯周病は、GAD65に対する自己免疫反応を誘導し、その結果、歯周組織で産生されたGAD抗体が、1型糖尿病の診断や治療に影響を与えることを示した初めての所見である。

従って、本申請論文は学位論文の価値があると認めた。