

氏名	澤 孝 賢
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第 1715 号
学位授与の日付	平成10年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）
学位論文題名	慢性歯周炎病巣に局在する単核球のアポトーシス回避機構に関する研究
論文審査委員	教授 福井一博 教授 滝川正春 教授 村山洋二

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周病病巣は、開放巣であり、口腔内常在細菌抗原による持続的刺激に曝されている。したがって、病巣は炎症性浸潤細胞とりわけ単核球が長期に亘り局在することとなり、慢性病型を呈する。その機序は、歯周炎局所に浸潤した単核球がアポトーシスを回避することによっているという作業仮説のもとに本研究を行った。

単核球のアポトーシスに関するこれまでの研究から、アポトーシス誘導系の分子シグナルは次のように理解される。一般に、ヒト単核球は抗原刺激によって活性化され、細胞膜上に Fas および Fas-ligand (FasL) 分子を発現する。Fas に FasL が結合すると、Fas のシグナル伝達が始動し、Fas 陽性細胞に限っては、アポトーシス誘導シグナルの伝達経路に沿うこととなる。一方、細胞内ではアポトーシス抑制分子である Bcl-2 および Bcl-X_L が伝達経路に沿うシグナル伝達を制御するので、細胞にはアポトーシス耐性を示す機構が働く。しかし、単核球の細胞内 Bcl-2 および Bcl-X_L の発現が抑制されると、Fas を介したアポトーシスが再び誘導されるようになる。

本研究は、前述の作業仮説をアポトーシス誘導因子系 (Fas/FasL 系) ならびにアポトーシス抑制因子系 (Bcl-2, Bcl-X_L 系) の発現様態から説明できるか否かを検討することを目的として、1) Bcl-2, Bcl-X_L の過剰発現、2) Fas/FasL 系の破綻、3) Fas を介するアポトーシスに対する感受性の3点から歯周炎病巣の単核球がアポトーシスを回避する機作を調べ、慢性炎症巣成立機序を解明する一助としようとするものである。

【材料および方法】

1. 単核球の調製

慢性辺縁性歯周炎患者の歯周外科時に採取した肉芽組織を含む辺縁歯肉を、歯肉組織として実験に供した。歯肉組織を細切して得た細胞成分を、Ficoll-paque® (Pharmacia 社製) を用いた比重遠心法によって単核球を調製した。なお、同一患者から末梢血単核球も調製した。

2. 歯肉組織の凍結切片

歯肉組織を液体窒素に浸漬凍結し、Tissue-Tek® (Miles 社製) を用いて歯肉組織凍結切片を作製した。

3. アポトーシス抑制分子の同定

単核球の Triton X-100 を 1% に含む細胞溶解バッファーで可溶化したものをウェスタンブロットし、Bcl-2 および Bcl-X_L 分子を同定した。

4. アポトーシス誘導因子の検出

歯肉組織凍結切片および歯肉由来単核球から TRIZOL® RNA 分離キット (GIBCO 社製) を用いて得た mRNA 画分から RT-PCR 法を用いて, Fas および FasL の mRNA 分子を検出した。

5. 単核球に占める Fas 陽性細胞率

歯肉由来の全単核球数に対する Fas 陽性細胞数の割合で表わした。Fas 陽性細胞数は, アポトーシス誘導能を有しない抗 Fas IgG1 抗体 (UB2) 反応細胞から, 陰性コントロールのマウス IgG1 抗体反応細胞を減じて算出した。なお, 細胞数算出は FITC 標識後, フローサイトメーターを用いる方法で行った。

6. Fas 陽性単核球の単離

UB2 を反応させた単核球を抗マウス IgG 抗体標識マイクロビーズに結合させ, 磁気細胞分離装置を用いて単離した。

7. *in vitro* のアポトーシス誘導系

Fas 陽性単核球にアポトーシス誘導能を有する抗 Fas IgM 抗体 (CH-11) を添加し, 細胞に Fas を介するアポトーシス誘導シグナルを伝達させる系を設けた。なお, 対照系にはアポトーシス誘導能のないマウス IgM 抗体を添加した系および CH-11 の中和抗体である抗 Fas IgG1 抗体 (ZB4) を添加した系を設けた。

8. アポトーシス誘導性の検定系

アポトーシスが誘導された細胞では細胞膜の内側面にあるフォスファチジルセリンが外側面に移動する。この原理を用いて前項の系にフォスファチジルセリンに高い親和性を有する Annexin V-FITC を添加し, アポトーシス誘導の有無・程度を検定する系とした。アポトーシス誘導の有無・程度は前項の 3 系間で FITC 蛍光強度を比較して評価した。

【結果および考察】

1. アポトーシス抑制分子の発現

歯肉由来単核球の発現 Bcl-2 と Bcl-X_L 量は, 末梢血単核球のそれらに比べ, 著明に少なかった。すなわち, 歯肉由来単核球はアポトーシス抑制分子の発現が低いことを示唆する。

2. アポトーシス誘導因子の発現

歯肉組織凍結切片および歯肉由来単核球は恒常的に Fas mRNA を発現していたが, FasL mRNA の発現は微弱であった。すなわち, Fas/FasL を介するアポトーシス刺激伝達は働かないかも知れない。

3. Fas 陽性細胞率

歯肉由来単核球の 46% が Fas 陽性細胞であった。

4. Fas 陽性単核球のアポトーシス誘導

歯肉由来 Fas 陽性単核球は, CH-11 添加の系において蛍光強度が増大したが, 末梢血 Fas 陽性単核球は, CH-11 添加の系でも蛍光強度に変化はなかった。また, ZB4 添加の系では, 歯肉由来単核球および末梢血単核球いずれも蛍光強度に変動はなかった。すなわち, Fas 陽性の歯肉由来単核球は, 末梢血単核球に比べ, Fas を介するアポトーシスにより感受性が高いことを示唆する。

【結論】

歯周炎病巣に局在する単核球は, 1) Fas を介するアポトーシスに感受性を示すが, 2) アポトーシス誘導因子の FasL を欠いているため, 3) Fas を介するアポトーシスを回避している可能性がある。このことが, 歯周組織が慢性病巣を呈する機作に関わっているかもしれない。

論文審査結果の要旨

本論文は、慢性歯周炎病巣の成立機序には、病巣に局在する単核球（歯肉由来単核球）がアポトーシスを回避することが関与しているとの作業仮説のもとに、アポトーシス誘導系（Fas/Fas ligand 系）ならびにアポトーシス抑制系（Bcl-2, Bcl-X_L 系）の発現様態を調べたものである。具体的には、以下の点から検討されている：

- 1) Bcl-2 および Bcl-X_L 分子の過剰発現,
- 2) Fas/Fas ligand 系の破綻,
- 3) Fas/Fas ligand 系の破綻の *in vitro* 系での裏付け。

その結果、以下の知見を得た：

- 1) 歯肉由来単核球のアポトーシス抑制分子発現は末梢血単核球に比べ低い,
- 2) 歯肉組織および歯肉由来単核球では Fas は発現しているが、Fas ligand の発現はないかもしくは低い,
- 3) 欠乏している Fas ligand を補うことによって、歯肉由来単核球はアポトーシスに陥る。

これらの結果は、歯周炎病巣に局在する単核球はアポトーシスに感受性になっているにも関わらず、アポトーシス誘導因子を有しないためにアポトーシスを回避していることを裏付けるものである。

本論文は歯周炎における慢性炎症の成立機序に単核球のアポトーシス回避という現象が関与していることを示唆するものと評価した。

従って、本申請論文は学位論文としての価値を有すると認めた。