

論文要旨等報告書

氏	岡田 祐佳
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 甲 第 3568 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	歯肉線維芽細胞上のヒト白血球抗原クラスII分子を介した刺激により産生される生理活性物質がヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖へ及ぼす影響に関する研究
論文審査委員	教授 福井 一博 准教授 長塚 仁 教授 高柴 正悟

学位論文内容の要旨

【緒言】

ヒトにおける主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex : MHC) であるヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen : HLA) クラスII (HLA-II) 分子は、抗原提示細胞上に発現し、外来性抗原をT細胞に提示することで、T細胞を活性化する。しかし近年では、HLA-II分子は抗原を介してT細胞受容体と結合することでマクロファージやB細胞を活性化する機能を持つ受容体分子であることが明らかにされつつある。

非抗原提示細胞であるHGF上に発現したHLA-II分子は、本来の役目である抗原を提示する能力を有さないが、HLA-抗原ペプチド-T細胞受容体複合体を形成することによって細胞内へシグナルを伝達する能力を有し、さらにHGFからの種々のサイトカインやケモカインの産生を誘導する。したがって、HGF上に発現する本分子は生理活性物質の産生を介して慢性炎症の病態において何らかの役割を担っている可能性が考えられる。

慢性炎症の進展には、免疫担当細胞の炎症巣への遊走のみではなく、血管の新生が関与していることが知られている。したがって、歯周病のような慢性炎症状態においてはHGF上のHLA-II分子を介した刺激によって産生される生理活性物質が細胞遊走や血管新生に関わっていることが予想される。そこで本研究では、非抗原提示細胞であるHGF上に発現するHLA-II分子が産生する生理活性物質が、血管新生に関わるかどうかを明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

1. **試薬**：細胞膜上へのHLA-II分子の発現誘導には、組換えヒトIFN- γ (R&D Systems) を用いた。抗HLA-DR抗体としてマウス抗HLA-DRモノクローナル抗体 (clone L243 : Leinco) を、陰性対照抗体として抗HLA-DR抗体とIgGサブクラスを合わせた抗原非特異的マウスIgG抗体 (IgG2a : BD Pharmingen) を用いた。ケモカインあるいはケモカインのレセプターに対する中和抗体として、抗GRO抗体、抗IL-8抗体、抗CXCR1抗体および抗CXCR2抗体 (すべてR&D Systems) を用いた。

2. **HGFの培養**: HGFを健康なヒトの歯肉からNishimuraらの方法に従って分離・培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は, Cambrex Bioscienceから購入した。HUVECの培養は, 2% ウシ胎児血清, 内皮細胞増殖添加因子を含むEndothelial Basal Medium-2 (いずれもLonza Biologics) を用いて行った。
3. **サイトカインアレイ解析**: 抗HLA-DR抗体を用いた刺激によってHGFの細胞内において産生が増加した生理活性物質を, Human Angiogenesis Antibody Array 1.1 (RayBiotech) を用いて検出した。
4. **培養上清中のサイトカイン量の測定**: 抗HLA-DR抗体を用いて刺激したHGFの細胞内で産生量が増加していた生理活性物質の細胞外における産生性を, ELISA法を用いて調べた。さらに, GROおよびIL-8の産生量を経時的に測定した。陽性対照刺激には, リコンビナント腫瘍壊死因子 α (PEPROTECH) あるいは*Escherichia coli* リポポリサッカライド (SIGMA) を使用した。
5. **MTT増殖アッセイ**: HGFを抗HLA-DR抗体あるいは陰性対照抗体を用いて刺激して16時間後の培養上清を回収し, HUVECの培養系に添加した。HGFの培養上清を添加してから72時間後に, 500 μ g/mlとなるようにThiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (SIGMA) を添加し, その4時間後に吸光度を測定した。さらに, どの分子がHUVECの増殖に関与するのかを調べるために, 前述の中和抗体をHGFの培養上清とともにHUVECの培養系に添加し, これらがHUVECの増殖に及ぼす影響を調べた

【結果】

1. HLA-DR分子を抗HLA-DR抗体で刺激すると, HGFは血管新生に関わる分子としてIL-8およびGROを産生した。
2. HLA-DR分子を抗HLA-DR抗体で刺激した際の培養上清を添加して培養したHUVECの細胞増殖活性は亢進した。
3. HGFの培養上清を添加した際のHUVECの細胞増殖活性の亢進は, 抗IL-8抗体あるいは抗CXCR1抗体によって抑制された。

【考察】

HGF上のHLA-DR分子を刺激した際に血管新生に関与する生理活性物質が産生されるのかを調べた。血管新生に関与する分子としてIL-8およびGROを検出し, VEGF等の増殖因子を検出しなかった。そこで次に, HGFを抗HLA-DR抗体で刺激した際の培養上清が, HUVECの増殖に及ぼす影響を調べた。その結果, 抗HLA-DR抗体を用いた系では, HUVECの細胞増殖活性が促進した。さらに中和抗体を用いて検討したところ, この増殖促進作用は主にIL-8によって誘導されていることが明らかとなった。このように, HGF上のHLA-DR分子を介した刺激によって産生される生理活性物質のうち, 主にIL-8の作用によって血管内皮細胞の増殖を促進していることが明らかとなった。このことは, HLA-DR分子を介した刺激によって産生されるケモカインが, 歯周病のような局所における慢性炎症をさらに進展させる可能性を示唆する。

【結論】

本研究の結果から, HGF 上の HLA-II 分子を介した刺激によって産生される生理活性物質は血管内皮細胞の増殖を促進し, その増殖には主に IL-8 が関与していることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen) クラスII分子 (HLA-II分子) は、抗原提示能だけでなく、外来性抗原を介してT細胞受容体と結合することで、マクロファージやB細胞を活性化する機能を持つ受容体分子でもあることが明らかにされつつある。

非抗原提示細胞であるヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts : HGFb) 上に発現するHLA-II分子は、抗原提示能を有さないがHLA-抗原ペプチド-T細胞受容体複合体を形成することによって細胞内へシグナルを伝達する能力を有し、さらにHGFbからの種々の生理活性物質の産生を誘導する。したがって、HGFb上に発現する本分子は生理活性物質の産生を介して慢性炎症の病態において何らかの役割を担っている可能性が考えられる。慢性炎症の進展には免疫担当細胞の遊走のみならず、血管新生が関与していることが知られている。したがって、HGFb上の本分子が産生する生理活性物質が血管新生に関与していることが予想される。慢性炎症においてHGFbが産生する生理活性物質が血管新生に関与することを示すことは、歯周組織における慢性炎症の病態の理解の一助になり得ると考える。

本研究は、HLA-II分子のうちのHLA-DR分子を介した刺激によってHGFbが産生する生理活性物質が、血管新生に関与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

- 1) HGFb上のHLA-DR分子を介した刺激によって誘導される分子のうち血管新生に関与する分子は、Interleukin (IL) -8とgrowth-related oncogene (GRO) であった。
- 2) HGFb上のHLA-DR分子を刺激した際の培養上清はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の増殖を促進した。
- 3) そのHUVECの増殖は、抗IL-8抗体あるいはそのレセプターに対する抗体である抗CXCR1抗体によって抑制された。

これらのことから、HGFb上のHLA-DR分子を介した刺激によって産生される生理活性物質が血管内皮細胞の増殖を促進することが明らかとなった。したがって、HGFb上のHLA-DR分子を介した刺激によって産生される生理活性物質が、歯周病のような局所における慢性炎症をさらに進展させる可能性が示唆された。

以上によって本申請論文は博士(歯学)の学位論文として価値があるものと認めた。