

学位研究紹介

慢性炎症性歯周疾患における V₆T細胞レセプター発現T細胞の集積 Clonal accumulation of T cells bearing V₆T-cell receptor in chronic inflammatory periodontal disease

新潟大学医学総合研究科摂食環境制御学講座
歯周診断再建学分野

大澤 豊, 山崎和久

Division of Periodontology, Department of
Oral Biological Science,
Niigata University Graduate school of
Medical and Dental Sciences
Yutaka Ohsawa, Kazuhisa Yamazaki

慢性炎症性歯周疾患是一群の歯周病関連細菌により発症することが明らかにされているが、病態の違いや発症時期、進行のスピードを規定するのは主として宿主の免疫応答と考えられている。T細胞は抗原の認識、それに伴うサイトカインの産生を通して免疫応答を調節し、歯周炎の成立に深く関与している。T細胞はT細胞レセプター(TCR)を介して抗原認識を行うが、その多様性はgerm lineのV_H(D), J, C領域遺伝子の再構成と再構成の過程でV_H(D)-J間に生ずる塩基の付加や欠失によって生み出される。この領域はcomplementarity determining region 3 (CDR3)と呼ばれ、抗原ペプチドの結合部位と考えられている。CDR3領域が共通のT細胞は一つのクローンに由来するのでこの領域を検索することでT細胞応答の特異性を知ることができる。

われわれはこれまで、TCRレパトアをRT-PCR法により検索し、患者の病変部局所に浸潤しているT細胞のTCR鎖V領域遺伝子は末梢血のそれと比較して偏りがあり、特にV₆での上昇とV₁₆での減少があることを示した。このことはこれらのレセプターを発現しているT細胞クローンが歯周炎の病態と深く関与していることを示唆する¹⁾。

そこで、本研究では炎症歯肉組織において発現の高かったV₆遺伝子を発現しているT細胞に注目し、歯周炎患者10名について歯周炎組織と末梢血とのclonalityの違いを明らかにする目的でSingle strand conformation polymorphisms (SSCP)解析を行い、さらにCDR3領域のアミノ酸配列をシーケンシングにより検索した。またCDR3領域の3'末端側にあるJ遺伝子の使用頻度

についても検索した。

【材料と方法】

被検者は新潟大学歯学部附属病院第二保存科を受診し、インフォームドコンセントの得られた中等度から高度の歯周炎患者10名。

歯周外科処置時に歯肉組織と末梢血を採取し、AGPC法でRNAを抽出、M-MLV逆転写酵素とrandom hexamerによりcDNAを合成後、V₆特異的primerとC primerによりTCR鎖V₆-C領域をPCR増幅した。PCR産物を2%アガロースゲル電気泳動したのち、ゲルからバンドを切り出しDNAを精製。精製したDNAをOriginal TA Cloning Kit (Invitrogen)にてサブクローニングを行い、1サンプルにつき20~30のコロニーを無作為に選択した。アルカリ-SDS法でplasmid DNAを精製後、ALF express DNA sequencer (Pharmacia Biotech)でCDR3領域の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。

SSCP解析は、同様に増幅させたPCR産物を1本鎖DNAに熱変性させ、4%アクリルアミドゲルに展開し、メンブレンに転写します。その後ビオチン化Cプローブをハイブリダイズし、Phototope star detection kitにて、X線フィルムに感光させた。

【結果と考察】

その結果、患者個々における末梢血と歯周炎組織での比較では、歯周炎組織で特定のクローンの集積が認められたのに対して、末梢血ではクローンの集積がほとんど認められなかった。またシーケンシング解析で集積していたクローンの数はSSCP解析で示されたバンドの数とほぼ一致していた (Table 1)。これらのことは歯周炎組織に浸潤しているT細胞は抗原特異的に反応していることを強く示唆する。さらに集積したクローンのCDR3領域のアミノ酸配列において共通のモチーフと考えられる配列が数人の患者で認められた (Table 2)。また歯周炎組織において集積した群と集積しなかった群ではJ遺伝子の使用頻度に偏りが認められた。これらのことは歯周ポケット内には約300種以上の細菌が棲息していることにもかかわらず、比較的限られた種類の抗原とそれを認識するT細胞が病態形成に関わっていることを示唆する。

Patient	Gingival tissue		Peripheral blood	
	Number of bands on SSCP gel	Number of expanded clones by sequencing	Number of bands on SSCP gel	Number of expanded clones by sequencing
P1	1	4	0	0
P2	3	4	1	1
P3	0	3	0	0
P4	3	6	1	1
P5	0	0	0	0
P6	0	3	3	2
P7	1	2	2	3
P8	1	2	0	0
P9	0	2	0	1
P10	1	3	0	0

Table 1. Comparison of SSCP analysis and nucleotide sequencing for detection of T-cell clones

Patient	V 6	N-D-N	J	J family	Frequency
P1	CASS	LSSGDS	NQPQHFGDGTRLSIL	1.5	7/38
	CASS	LSGA	DTQYFGPGTRLTVL	2.3	3/38
	CASS	LASGGFY	EQYFGPGTRLTVL	2.1	2/38
	CASS	WKTTSGRAF	YNEQFFGPGTRLTVL	2.1	2/38
P2	CASS	FGGSH	YGTYFGSGTRLTVV	1.2	4/39
	CASS	GRQELG	EQYFGPGTRLTVT	2.7	2/39
	CASS	LRKGF	YEYFGPGTRLTVT	2.7	2/39
	CASS	LSGASS	YEYFGPGTRLTVT	2.7	2/39
P3	CASS	GEAG	DTQYFGPGTRLTVL	2.3	2/30
	CASS	RWREG	TGELFFGEGSRLTVL	2.2	2/30
	CASS	SNPGIT	GELFFGEGSRLTVL	2.2	2/30
P4	CASS	LAVGAQG	NQPQHFGDGTRLSIL	1.5	6/33
	CASS	RTGGT	DTQYFGPGTRLTVL	2.3	4/33
	CASS	E	NTGELFFGEGSRLTVL	2.2	3/33
	CASS	LTGGLAGA	EQYFGPGTRLTVT	2.7	2/33
	CASS	LTGTPKI	NTGELFFGEGSRLTVL	2.2	2/33
	CASS	LTSDK	NYEQYFGPGTRLTVT	2.7	2/33
P6	CASS	LEAEYS	DTQYFGPGTRLTVL	2.3	2/27
	CASS	LSLAGS	GNTIYFEGSWLTVV	1.3	2/27
	CASS	LIS	YEYFGPGTRLTVT	2.7	2/27
P7	CASS	PRSD	YEYFGPGTRLTVT	2.7	4/30
	CASS	LAGLV	GQYFGAGTRLSVL	2.4	2/30
P8	CASS	TGVG	TGELFFGEGSRLTVL	2.2	7/23
	CASS	LDPGRG	QPQHFGDGTRLSIL	1.5	2/23
P9	CASS	QIAGGRG	DTQYFGPGTRLTVL	2.3	4/22
	CASS	LTWAV	QETQYFGPGTRLLVL	2.5	2/22
P10	CASS	LARSGDRS	NQPQHFGDGTRLSIL	1.5	2/23
	CASS	LGQN	TEAFFGQGTRLTVV	1.1	2/23
	CASS	YRGGY	TEAFFGQGTRLTVV	1.1	2/23

Table 2. Expanded amino acid sequences of T cells bearing V 6 gene in periodontitis lesion

periodontitis patients. Clin. Exp. Immunol. 1996
106 : 329 - 335.

【参考文献】

- 1) Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. et al. Biased expression of T cell receptor V genes in