

氏名	葛 城 教 子
学位(専攻分野)	博 士(歯 学)
学位授与番号	博 甲 第 1107 号
学位授与の日付	平成 5 年 3 月 28 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)
学位論文題目	LFA-1 family の発現異常が関わる歯周病患者由来 B 細胞の生物学的ならびに分子生物学的研究
論文審査委員	教授 村山 洋二    教授 谷口 茂彦    教授 福井 一博

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【研究目的】

LFA-1 family が関わって起こる疾患に、重篤な細菌感染を繰返し死の転起を取る遺伝性疾患の白血球粘着異常症 (LAD) がある。この疾患では、白血球細胞表面に LFA-1 family 分子を発現しないことが示されている。また、特定の全身疾患を有していないが LFA-1 family の発現量が著明に少ない早期発症型歯周炎患者のあることも、2つの研究施設から報告されている。LAD 患者の LFA-1 family 発現異常の機序は、LFA-1 family  $\beta$  鎖 mRNA のスプライシングの異常、 $\beta$  鎖 mRNA 上の変異、および  $\beta$  鎖前駆体の構造異常などによって説明されている。しかし、早期発症型歯周炎のみを発症した症例の LFA-1 family 発現異常が起こる機序は明確にされていない。

本研究は、LFA-1 family の発現が歯周病の発症と進行に関わる機序を推察することを目的として、LADを有する前思春期性歯周炎 (PP) 患者 2 名と LFA-1 family の発現異常を認めるが限局性若年性歯周炎 (LJP) のみを発症している患者 1 名を含む複数の歯周病患者および健常者由来の B 細胞株について、LFA-1 family  $\beta$  鎖の関わりが示唆されている 2, 3 の生物学的性状ならびに  $\beta$  鎖 mRNA レベルの変異を調べたものである。

#### 【研究方法】

1. 被験細胞：好中球膜への LFA-1 family の発現異常のあることが確かめられている被験者は、LAD を発症した姉弟の PP 患者 2 名 (PP1: 5 歳女性, PP2: 3 歳男性) (Kobayashi ら 1984, Fujita ら 1985) および LJP 患者 1 名 (LJP1: 18 歳女性) (小林 1990) である。LFA-1 family の発現に異常がない被験者は、上記とは別の LJP 患者 1 名 (14 歳女性) と PP 患者 1 名 (6 歳男性) および健常者 2 名 (32 歳男性および 28

- 歳男性)である。PP1およびPP2のB細胞株は小林邦彦博士(山口大学医学部小児科)から恵与を受けた。その他の被験細胞は、各被験者の末消血から分離したB細胞について、EBウイルストランスフォームB細胞株を樹立した。
2. B細胞凝集能: Rothleinらの記載(1986)に従って、凝集細胞数とクラスターの形状を調べた。
  3. RNA: 被験細胞からChirgwinらの記載(1979)によって抽出した全RNAを用いた。
  4. ノーザンプロット法: 全RNAをゲル上で電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した後、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTPで標識したDNAプローブとハイブリダイズさせ、オートラジオグラムで $\beta$ 鎖mRNAを検出した。DNAプローブには $\beta$ 鎖cDNA(T.A. Springer博士, Harvard Medical School)のうち5'側の1Kbを用いた。
  5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法: Rappoleeらの方法(1989)に順じて行なった。すなわち、 $\beta$ 鎖cDNAのcoding regionの全長のものおよび73ntから1191ntまでのものを増幅した。
  6. RNase cleavage法: Ribonuclease protection assay kit (Ambion Inc.)を用いてmRNAの塩基配列の変異を検索した。なお、 $\beta$ 鎖cDNAの全長をカバーするアンチセンスRNAプローブは、cDNAから得た5種類の連続する断片をプラスミドベクターpGEM7にサブクローニングして作成した。

#### 【研究結果】

1. 被験細胞株の生物学的性状
  - 1) 凝集細胞数: PP1とPP2を除く被験株では85%以上の細胞が凝集した。しかし、PP1とPP2では1%以下の細胞が凝集したに過ぎなかった。
  - 2) クラスター形成: PP1とPP2の細胞では、クラスター形成を全くみなかった。LJP1の細胞は、その他の被験細胞に比較して、小さいクラスター、つまり構成細胞数の少ないクラスターを多数形成した。
2. LFA-1 family  $\beta$ 鎖mRNAの検出: ノーザンプロットによって $\beta$ 鎖mRNAに相当するバンドを、PP1とPP2の細胞では約4.4Kbとして検出し、その他の細胞では約3.2Kbとして検出した。 $\beta$ 鎖mRNAの発現量は、PP1とPP2の細胞ではその他の被験細胞に比較して少なかった。
3. LFA-1 family  $\beta$ 鎖mRNA塩基配列
  - 1) RT-PCR法によるmRNA解析: すべての被験細胞から、coding regionが73ntから1191ntのcDNAを増幅することができた。PP1とPP2の細胞のcDNAからはcoding regionの全長を増幅することはできなかった。
  - 2) RNase cleavage法によるmRNA解析: PP1とPP2のmRNAにおいて、coding regionの965ntから1450ntの間に遺伝子の変異が存在することを検出した。その他の被験者のmRNAにおいては、遺伝子変異を検出しなかった。

## 【考察と結論】

LJP1の細胞では、LFA-1 family  $\beta$ 鎖 mRNA 上に変異がないが、特異な細胞凝集反応を示す性状が示された。PP1とPP2の細胞では、mRNA 上に変異の位置を特定することができた。LFA-1 familyの細胞膜への発現異常が歯周疾患に関わるメカニズムは多様であり、LFA-1 family  $\beta$ 鎖 mRNAの変異のみから説明できるものではないことが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

本研究はLFA-1 family  $\beta$ 鎖が歯周病の発症と進行に関わる機序を推察することを目的に、LFA-1 familyの発現異常を認める患者を含む複数の歯周病患者および健常者由来のB細胞株について、細胞凝集に関する細胞生物学的性状ならびにLFA-1 family  $\beta$ 鎖のmRNAレベルにおける変異を調べたものである。論文の要旨は次の通りである。1) LFA-1 familyの発現異常をもつあるLJP患者由来のB細胞株は、特異な細胞凝集反応を示した。2) LADを発症している前思春期性歯周炎患者(姉弟)由来のB細胞株は、細胞凝集能をもたなかった。3) 1)に挙げたLJP患者由来B細胞から、LFA-1 family  $\beta$ 鎖 mRNA 上に変異を検出しなかった。4) 2)に挙げた2人の前思春期性歯周炎患者のB細胞から、 $\beta$ 鎖 mRNA 上の965ntから1450ntの領域に変異が存在することを検出した。

上述の知見は、多彩な実験技術を駆使することによって得られたものであり、LFA-1 familyの発現異常が歯周病に関わるメカニズムを知る上で価値ある研究業績であると判定される。

なお、論文に用語の使い方および文章の表現において適切でない所が数箇所あった。それらは、いずれも論旨に関わることではないので、論文の該当箇所を修正することとした。よって、本申請者は博士(歯学)の学位を得る資格があると認める。