

氏名	大 山 秀 樹
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博乙第 3151号
学位授与の日付	平成9年9月30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	HLA class II genotypes associated with early-onset periodontitis: DQB1 molecule primarily confers susceptibility to the disease（早期発症型歯周炎に関連するHLAクラスII遺伝子型：DQB1分子が疾患感受性に大きく関与する）
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】

歯周炎は細菌感染によって生ずる慢性炎症である。その発症と進行は、個体あるいは生体防御細胞の特性が多様なため多型性を示す。若年に発症し急速な進行型をとる早期発症型歯周炎（EOP）は、同一家系内に発症することが多いことから、一部のEOP患者集団疾患感受性には遺伝的な発症因子が関与していると考えられる。この因子の一つにヒト白血球型抗原（HLA）がある。

HLAは外来および内在性の抗原に対する免疫応答を発動させる第一ステップに関わる分子である。その数種類のハプロタイプとして表現される遺伝的多型性は、抗原に対する個体間の免疫応答性を規定する。この観点から様々な感染症において疾患感受性の高い個体集団のHLAハプロタイプの偏りが論じられてきた。歯周病においても、患者集団のHLAハプロタイプの偏りが調べられたが、統一した見解は得られていない。高柴（1990）は、DQB1遺伝子第3エクソン上流のイントロン部に非典型的*Bam*HI認識部位を有する早期発症型歯周炎患者が存在することを報告した。このことは、HLA分子の多型性を遺伝子のレベルで解析することが、HLA分子の多型性と歯周病に対する疾患感受性との関わりを明らかにする上での糸口となることを示唆する。

そこで、EOPに対する疾患感受性の個体差を分子遺伝学的に解明するために、どのようなHLA class II alleleがEOPに対する疾患感受性マーカーとなり得るかどうかを調べ、EOP患者に特徴的なHLA class II抗原 alleleの検出を試みた。

【材料ならびに方法】

1. 被験者

Murayamaらの診断基準に基づいて、臨床的にEOPと診断された歯周病患者24名（男性7名、女性17名、平均年齢 26.5 ± 9.8 歳）、および歯周組織が臨床的に健康と見られる健常者47名（男性35名、女性12名、平均年齢 29.7 ± 5.6 歳）を遺伝子解析の被験者とした。

2. HLA class II 抗原 allele の同定

各被験者のHLA class II領域（DRB1, DQA1, DQB1）alleleをInokoらの方法に従い、

polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を用いることによって同定した。すなわち、被験者末梢血単核球から全ゲノム DNA を分離調整後、各遺伝子領域の第 2 エクソンに存在する可変部分をグループ特異的にアニールするプライマーを用いた PCR を行い、増幅された DNA を各種制限酵素によって消化後、その泳動像をポリアクリルアミドゲル上に展開し、その泳動パターンによって HLA class II 抗原 allele を同定した。

3. HLA-DQB1 遺伝子上の非典型的 *Bam*HI 認識部位の検出

高柴の方法に従い、HLA-DQB1 遺伝子上の非典型的 *Bam*HI 認識部位の検出を行った。すなわち、HLA-DQB1 遺伝子第 3 エクソン上流のイントロン部を含む 1kb の領域を PCR 法で増幅後、制限酵素 *Bam*HI 消化することによって非典型的 *Bam*HI 認識部位の有無を決定した。

【結果】

1. EOP 患者群の HLA class II allele は健常者群のそれに比較して、DRB1*1401, *1501, DQB1*0503, *0602 の各 allele の検出頻度が高く、逆に DRB1*0405 および DQB1*0401 の各 allele の頻度が低い傾向にあった。しかし、これらの偏りは有意なものではなかった ($p>0.05$)。
2. DQB1 分子において、EOP 患者群に高頻度に検出された DQB1*0503, *0602 と検出頻度が低かった DQB1*0401 の各 allele のアミノ酸配列を比較したところ、DQB1 分子の 57 番目および 70 番目のアミノ酸残基の組み合わせに、これら allele 間の違いを見つけた。さらに、DQB1 分子の 57 番目および 70 番目のアミノ酸残基の組み合わせが Asp - Gly である allele を有する EOP 患者群に有意に多かった ($p=0.0216$)。
また、DRB1 分子においては、86 番目アミノ酸残基の違いによって EOP 患者群に高頻度に検出された DRB1*1401, *1501 と低頻度にしか検出されない DRB1*0405 との間に違いを見つけたが、この position のアミノ酸残基の違いによる患者群と健常者群との間の比較では有意な差は得られなかった。
3. HLA-DQB1 遺伝子上に非典型的 *Bam*HI 認識部位を有する者は、DQB1*0602 および*0604=5 のどちらかの DQB1 allele を有した。逆に、DQB1*0602 を有する者はすべてこの非典型的 *Bam*HI 認識部位を有したが、DQB1*0604=5 についてはその限りではなかった。

【考察ならびに結論】

HLA class II 分子は抗原ペプチドを構成するアミノ酸残基の側鎖を収納する 5 個のポケットを有し、DQB1 分子の 57 番目および 70 番目のアミノ酸残基は β 1 ドメインのポケット部分に位置して抗原ペプチドとの結合に関与することが分かっている。この部位のアミノ酸の違いによって患者群と健常者群を区別できたことによって、この部分のアミノ酸残基の違いがある抗原に対する結合性および T 細胞への応答性を支配し、さらには歯周病に対する疾患感受性をも規定するという可能性が示唆される。

以上の結果および考察から以下の結論を得た。

HLA-DQB1 分子において、抗原ペプチドとの結合に関与する 57 番目および 70 番目のアミノ酸残基の違いは、ある一部の EOP 患者の疾患感受性を規定する要因となり得る。

論文審査結果の要旨

ヒト白血球型抗原 (HLA) クラス II 分子は、ヒトの免疫系における外来抗原提示分子である。その数種類のハプロタイプとして表現される遺伝的多型性は、抗原に対する個体間の免疫応答性を規定する。

本論文は、早期発症型歯周炎 (EOP) 患者の HLA クラス II allele を PCR-RFLP 法を用いて同定し、その検出頻度の偏りを評価することによって、どのような HLA クラス II allele が EOP に対する疾患感受性マーカーとなり得るかを調べたものである。

その結果、1) EOP 患者群に多く見られる HLA クラス II allele と検出頻度の低い allele とは、DQB1 分子の 57 番目および 70 番目のアミノ酸残基の組み合わせの違いによって、区別することが可能であること、さらに、2) DQB1 分子の 57 番目および 70 番目のアミノ酸残基の組み合わせが Asp-Gly である allele を有する者が EOP 患者群に有意に多いことを示した。

これらの結果は、ある一群の EOP 患者では、DQB1 分子上で抗原ペプチドとの結合に関与する 57 番目および 70 番目のアミノ酸残基が、疾患感受性を規定する要因になり得ることを示唆するものである。

本論文は、HLA class II 分子との関わりにおいて、ある EOP 患者群では抗原認識および抗原提示が EOP の病態を規定することを示唆するものであり、診断、治療および予防に繋がる重要な知見を提示したものと評価した。

従って、本申請論文は学位論文としての価値があると認めた。