抗 CD 3 抗体による歯周炎罹患歯肉 T 細胞の活性化に及ぼす インターリュウキン 1 刺激歯肉線維芽細胞の抑制効果

安 部 恒

新潟大学歯学部歯科保存学第 2 教室

(指導: 原 耕二教授)

(平成 5 年 12 月 16 日受付)

Suppressive Effect of IL-1-stimulated Gingival Fibroblast on Peripheral and Gingival T Cells Activated by Anti-CD 3 Antibody

Hisashi ABE

Department of Periodontology, Niigata University School of Dentistry

5274, Gakkochō-Dori 2-bancho, Niigata 951, Japan

(Director: Prof. Kohji HARA)

We examined the suppressive effect of human gingival fibroblast culture supernatant (FB sup) on the interleukin-2 receptor (CD 25: IL-2 R) expression on anti-CD 3-stimulated T-cells obtained both from peripheral blood (PB) and gingival tissues. The cells were incubated for 24 hours in the presence of FB sup in anti-CD 3-coated culture well plates in 5% CO₂ in air at 37°C, washed and prepared for two-color flow cytometry. Staining of PB-T-cells from healthy donors with FITC-labelled anti-IL-2 R combined with PE-labelled anti-CD 4, CD 8, or CD 45 RO showed that IL-1-stimulated FB sup suppressed T-cell activation. Within the IL-1-stimulated FB sup-incubated T-cells, the suppressive effect was significantly stronger on CD 8+ T cells and CD 45 RO+T cells than on CD 4+T cells and CD 45 RO-T cells, respectively. The same tendency was found within prostaglandin E₂ (PGE 2)-incubated T-cells. However, FB sup

containing both IL-1 and indomethacin did not exert this suppressive effect on T-cell activation (data not shown). We then assessed the difference of responsiveness to anti-CD 3, IL-1-stimulated FB sup, or PGE 2 between T-cells from periodontitis-affected gingiva and those from autologous PB. The activation of gingival CD 45 RO+T cells was also suppressed by IL-1-stimulated FB sup or PGE 2. However, gingival CD 45 RO+T cells displayed decreased responsiveness to anti-CD 3, IL-1-stimulated FB sup, or PGE 2. In conclusion, the findings suggest that IL-1-stimulated gingival fibroblast suppressed anti-CD 3-induced T cell activation by producing arachidonic acid metabolite via the cyclooxygenase pathway. However, the sensitivity of gingival CD 45 RO+T cells to IL-1-stimulated FB sup was less than that of autologous PB-CD 45 RO+T cells.

Key words: Gingival fibroblast, T cell, CD 45 RO, Interleukin-2 receptor, Interleukin-1

要旨: 歯周炎における免疫担当細胞に及ぼす間質細胞の影響を知る目的で, T細胞に抗 CD 3 抗体の活性化刺激を加え, その際の歯肉線維芽細胞培養上清 (FB sup) の抑制効果をインターリュウキン 2 レセプター (CD 25: IL-2 R) の発現を指標としてフローサイトメトリーにて検索した。健常者の末梢血 T 細胞で解析した結

果、線維芽細胞に IL-1 を添加後、培養して得られた FB sup は T 細胞の活性化を抑制した。この抑制は、CD 8+ T 細胞と CD 45 RO+T 細胞でそれぞれ、CD 4+T 細胞及び CD 45 RO-T 細胞より有意に大きかった。また、歯周炎罹患歯肉より抽出した CD 45 RO+T 細胞の活性化は IL-1 刺激 FB sup 添加で有意に抑制されたが、末梢血の CD 45 RO+T 細胞に比べ、抗 CD 3 抗体、IL-1 刺激 FB sup に対する応答性は低下していた。今回の所見から、歯肉線維芽細胞による T 細胞活性化の抑制は、PGE₂ の産生によって起こると考えられる。

索引用語: 歯肉線維芽細胞, T 細胞, CD 45 RO, インターリュウキン 2 レセプター, インターリュウキン 1

緒 言

歯肉線維芽細胞は歯周組織を構成する主要な細胞の一つであり、コラーゲン代謝の調節がその細胞の主たる役割と考えられている。一方、Schroeder と Page¹⁾ は歯肉炎罹患歯肉中で線維芽細胞とリンパ球が接触していることを電子顕微鏡像で示しており、何らかの相互作用が存在することを示唆した。また、歯肉線維芽細胞は prostaglandin E₂ (PGE 2)²⁾, interleukin-1 (IL-1)³⁾, IL-6^{3,4)}, そして IL-8⁵⁾ といった物質を産生し、歯周疾患での免疫応答の調節に関わっているといわれる。

慢性歯周炎罹患歯肉中では、ヘルパー T 細胞とサブレッサー T 細胞が相互に作用しながら免疫応答を調節しており、T 細胞による免疫応答の調節機構に何らかの異常が生じることによって歯周疾患は進行すると考えられている⁶⁻⁹⁾。特に歯周炎罹患歯肉中では末梢血中に比べ T 4 (ヘルパー T 細胞)/T 8 (サブレッサー T 細胞) 比が低下していることが報告されている^{10,11)}。

歯周炎罹患歯肉中では IL-1, IL-2, そして PGE 2 など多くの物質がお互いに関連を持ちながら T 細胞の活性をコントロールしていると考えられる⁶⁾。IL-1 は歯周炎罹患歯肉中ではおもにマクロファージや血管内皮細胞から産生され^{5,12)}、歯肉線維芽細胞からの PGE 2 産生を促進する²⁾。特に歯肉線維芽細胞は多くの IL-1 receptor を有し^{13,14)}、他の組織の線維芽細胞に比べ IL-1 によって PGE 2 産生が著明に増強する²⁾。PGE 2 は末梢血 T 細胞のマイトジェン刺激での増殖反応を抑制することが知られており、免疫応答の negative feedback regulation に関わっていると考えられる¹⁵⁾。PGE 2 による T 細胞機能の阻害は PGE 2 が細胞膜上の receptor に結合し細胞内の cAMP を増加させ、T 細胞活性化の初期の段階であるイノシトールリン脂質の代謝を阻害することで発現する^{16,17)}。また T 細胞サブセットによって PGE 2 に

対する感受性に差があることが報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。近年、歯肉炎や歯周炎罹患歯肉中ではメモリー T 細胞 (CD 45 RO+T 細胞) が優位であることが報告されているが²¹⁾、メモリー T 細胞に対する PGE 2 の効果を検索したものは極めて少ない。

そこで本研究ではまず IL-1 刺激を受けた歯肉線維芽細胞の産生物質および PGE 2 の末梢血 T 細胞サブセットの活性化に与える影響をしらべ、次にこれら影響を末梢血及び歯周炎罹患歯肉の T 細胞サブセット間で比較することとした。

材料および方法

1. 線維芽細胞の培養と調整

ヒト歯肉線維芽細胞 (ATCC CRL 1292: 17~21 継代) は、非働化 10% 牛胎児血清 (FCS, Gibco, Grand Island, USA), 100 U/ml penicillin (Flow, Irvine, GB), 100 µg/ml streptomycin (Flow, Irvine, GB), そして 2 mM L-glutamine (Flow, Irvine, GB) を添加した 25 mM HEPES (Sigma, St Louis, USA) 緩衝 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM 培地, Flow, Irvine, GB) で維持した。

実験に先だって、細胞を 24 well の培養プレート (Coster, Cambridge, MA) に 1×10^5 個ずつ分注し、通常 4 日間 10% FCS 添加 DMEM 培地で培養した。

線維芽細胞が単層になった段階で、リン酸緩衝溶液 (PBS) で 2 回洗浄後、2 通りの方法で培養した。1) 2% FCS 添加 DMEM 培地のみ、2) 2% FCS および 100 U/ml human recombinant IL-1 β (Genzyme, Boston, USA) 添加 DMEM 培地でいずれも 6 時間培養後、PBS で 3 回洗浄し、刺激物質を除いて、新たな 2% FCS 添加 DMEM 培地におきかえてさらに 24 時間培養し、それぞれの培養上清を回収した。以後、これらの培養上清を、それぞれ FB sup 1, FB sup 2 と略記して述べる。なお、培養はすべて 5%

Table 1 Clinical assessment of the sampling sites

Subject	GI	Pd(mm)	LA(mm)	BL(%)	Sampling Sites(teeth)
1	0.4	3.8	3.8	41.8	13, 12, 11, 21, 22, 23, 24*
2	0.3	2.6	4.2	37.9	42, 43, 44, 45, 46, 47
3	1.5	4.3	7.9	65.0	25, 26, 27
4	1.5	7.4	7.5	53.8	33, 34, 35
5	0.3	3.9	4.0	33.1	44, 45, 46, 47
Mean±SD	0.8±0.6	4.4±1.8	5.5±2.0	46.3±13.0	

GI, Pd, LA and BL represent the mean of the respective parameter scores of subjects 1 to 5.

GI: Mean gingival index²²⁾ of the sampling teeth as per a 4-point evaluation, i.e., mesiobuccal, midbuccal, distobuccal and midlingual.

Pd & LA: Mean probing pocket depth and mean loss of attachment of the sampling teeth as per a 6-points evaluation, i.e., mesiobuccal, midbuccal, distobuccal, mesiolingual, midlingual, and distolingual.

BL: Mean interproximal alveolar bone loss of the sampling teeth as per a 2-point evaluation, i.e., mesial and distal by roentgenographically.

*: Two-digit System by the International Standards Organization.

CO₂, 37°Cで行い、回収した培養上清は-80°Cで保存した。

2. 単核細胞の採取と調整

歯周組織が健全でなら全身疾患を有しない健康者8名(年齢24~36歳:平均年齢29歳)から末梢静脈血を採取した。末梢静脈血中の単核細胞はFicoll-Paque比重遠心法によって分離した。

また中等度~高度の成人性歯周炎罹患者5名(年齢43~62歳:平均年齢52歳)より末梢静脈血と炎症歯肉を歯周外科手術の際に採取した。末梢血中の単核細胞は健康者と同様の方法で調整した。炎症歯肉は歯周外科手術の際に歯周炎罹患者歯数の全周より内斜切開により歯肉溝側3分の2の部分で採取した。Table 1に歯肉組織採取部位の臨床評価の結果を示す。歯肉の採取にさきだち、患者さんに十分な説明を行い、同意が得られた場合にのみ行った。採取歯肉湿重量は380~760 mgで平均544 mgであった。歯肉単核細胞はDalyらの方法²³⁾に準じて調整した。即ち、各々のサンプルをPBSで洗浄後、約1 mm³の小片に細切し、10% FCS, 2.5 µg/ml amphotericin B (Flow, Irvine, GB), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml High purity collagenase Type 3 (Sigma, St Louis, USA) 添加 25 mM HEPES緩衝 DMEM 培地中にて37°Cで振とうさせながら90分間培養した。組織と培養液の比率は組織100 mgに対して培養液1 mlとした。培養後、#80 stainless steel gridに歯肉小片を通

して組織残渣を除去し、さらにcollagenaseを除くためPBSで洗浄後、30% FCM添加DMEM培地に再浮遊し、Ficoll-Paque比重遠心法にて分離し、単核細胞画分を得た。

末梢血単核細胞、歯肉単核細胞ともにPBSで洗浄後、10% FCS添加DMEM培地に再浮遊した。単核細胞はTurk液で染色後、細胞数を測定し、生存率はTrypan blue色素排除法にて測定した。末梢血単核細胞の生存率はすべて97%以上、歯肉単核細胞の生存率はすべて95%以上であった。また歯肉より抽出された単核細胞数は $0.46 \times 10^6 \sim 1.36 \times 10^6$ 個で平均 1.02×10^6 個であった。

3. 分離した単核細胞の抗CD3抗体による活性化

培養プレート(96 well 平底, Falcon, Oxnard, USA)の各々のウェルに4 µg/mlの抗CD3抗体(Immunotech, Marseille, France) 50 µlを入れて、4°Cで一晩静置し抗CD3抗体をコーティングした。遊離の抗CD3抗体を除くため、細胞の培養を開始する前に各々のウェルをPBSで3回洗浄した。ただし一部のウェルはコントロールとして抗CD3抗体でコーティングしなかった。ウェルあたり健康者の末梢血単核細胞では 2×10^5 個、歯周炎罹患者の末梢血と歯肉単核細胞では 5×10^4 個ずつ、先にコーティングしておいたウェルに分注し、PGE₂ (10^{-6} , 10^{-8} M) またはFB sup (100 µl/well) と共に10% FCS添加DMEM培地にて5% CO₂, 37°Cで24時間培養した。歯肉より抽出した単核細胞は回収できた細胞数が少な

いため、ウェルあたりの細胞数を 5×10^4 とした。

4. 単核細胞表面抗原の検索

単核細胞上の CD 4, CD 8, CD 45 RO, CD 25 (IL-2 R) 抗原の発現を武内らの方法²⁴⁾に準じてフローサイトメトリーにて解析した。即ち、培養後、回収した単核細胞を 0.1% NaN₃, 2% FCS を含む PBS (sPBS) で 3 回洗浄し、その細胞を 50 μ l の sPBS に浮遊した。このサンプルに FITC 標識抗 IL-2 R 抗体と PE 標識抗 T 細胞抗体を 5 μ l ずつ添加し 4°C にて 30 分間反応させた。健常者の単核細胞では抗 T 細胞抗体として抗 CD 4 (Leu 3 a), 抗 CD 8 (Leu 2 a), 抗 CD 45 RO (Leu 45 RO) 抗体を用いた。歯周炎罹患者の単核細胞では採取できた細胞数に限りがあったため抗 IL-2 R, 抗 CD 45 RO 抗体の二重染色のみ行った。抗体はすべて Becton Dickinson I.S. (San Jose, USA) 製を用いた。

抗体と反応させた後、遊離の抗体を除くため単核細胞を sPBS で 3 回洗浄し、200 μ l の sPBS に浮遊し、FACScan レーザーフローサイトメーターにて個々の細胞の情報を取り込み、Consort 30 software を用いて解析した。アルゴンレーザーは 15 mW, 488 nm の励起波長にセットした。forward scatter pattern と side scatter pattern を用いて赤血球や組織片を除くようにゲートを設定し、リンパ球を主としたゲート内 1 万個の細胞の情報を取り込んだ。さらに上記 2 種の pattern によってさらに小範囲のリンパ球画分にゲートを設定し、ゲート内の細胞に関して解析を行った。蛍光の陽性と陰性の判別に関しては、サブクラスの一致した FITC あるいは PE 標識 mouse IgG 抗体 (Becton Dickinson I.S.) をコントロールとして使用し mouse monoclonal 抗体のヒト細胞表面への非特異的結合を調べた。コントロールの抗体で染色したサンプルで蛍光強度の強い方から 1% の細胞数を含む部分を境界 (M) とし、これよりも蛍光強度の強い細胞を陽性細胞とした (Fig. 1)。

5. 線維芽細胞培養上清中の PGE 2 の定量

回収した線維芽細胞培養上清の一部をクエン酸にて pH 3.0 とした後、等量の methylene chloride (有機溶媒) を加えてボルテックスミキサーで混和し、有機溶媒層を別のチューブに移した。この操作を 3 回繰り返し、上清中の PGE 2 を有機溶媒中に抽出した。抽出した PGE 2 を含む有機溶媒を陰圧下で揮発させて、残存物質を 10% ethanol に溶解し、サンプルとした。このサンプル中の PGE 2 量を radioimmunoassay

(PGE₂ (¹²⁵I) RIA KIT: NEN, Du Pont de Nemours, Boston, USA) にて定量した。

6. 統計分析

実験データは distribution-free Wilcoxon signed rank test にて分析した。統計的な有意差は $p < 0.05$ に設定した。

結 果

1. 線維芽細胞培養上清による IL-2 発現の抑制

健常者末梢血単核細胞を未刺激 (抗 CD 3 抗体なし), 抗 CD 3 抗体で刺激, または抗 CD 3 抗体と共に FB sup 2 を添加, 培養したものについて, CD 4 抗原と IL-2 R 抗原の発現を解析した典型例を Fig. 1 に示す。さらに CD 4 抗原に加え, CD 8 抗原, CD 45 RO 抗原の解析に関しては, その結果を Table 2 に示す。FB sup 2, 即ち IL-1 β で刺激した歯肉線維芽細胞の培養上清を健常者末梢血単核細胞の培養系に加えると, 抗 CD 3 抗体で誘導される IL-2 R 発現がすべての T 細胞サブセットで抑制された ($p < 0.05$, Table 2)。

また FB sup 2 を添加した際の IL-2 R 発現抑制の程度を T 細胞サブセット間で比較した。その結果 CD 4+T 細胞 (ヘルパー T 細胞), CD 45 RO-T 細胞 (ナイーブ T 細胞) に比べ, CD 8+T 細胞 (サブレッサー T 細胞), CD 45 RO+T 細胞 (メモリー T 細胞) でそれぞれ IL-2 R 発現抑制が大きかった ($p < 0.05$, Fig. 2)。

2. PGE 2 による単核細胞の IL-2 R 発現抑制

Table 2 に示すように IL-1 で刺激された歯肉線維芽細胞は 10^{-8} M レベルの PGE 2 を産生した。そこで 10^{-8} M PGE 2 存在下での IL-2 R 発現抑制を T 細胞サブセット間で比較した。その結果, FB sup 2 を添加したと同様に, 調べたすべての T 細胞サブセットで IL-2 R の発現抑制が認められ, CD 4+T 細胞, CD 45 RO-T 細胞 に比べ, CD 8+T 細胞, CD 45 RO+T 細胞でそれぞれ IL-2 R 発現抑制が大きかった ($p < 0.05$, Fig. 2)。

3. 末梢血単核細胞と歯肉単核細胞での抗 CD 3 抗体に対する応答性の比較

歯周炎罹患者の末梢血 CD 45 RO+T 細胞は抗 CD 3 抗体で刺激しない状態では 14.8% の IL-2 R 発現があり, 抗 CD 3 抗体で刺激することによって 58.4% に IL-2 R 発現が上昇した。したがって抗

Figure 1 Typical 2-dimensional contour graphs and single histograms showing suppression of IL-2 R expression on CD 4+ cells by FB sup 2. Peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) from a healthy donor were incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ without anti-CD 3 (left panels), with anti-CD 3 (middle panels), or with both anti-CD 3 and FB sup 2 (right panels). MNCs were stained with FITC-labelled anti-IL-2 R and PE-labelled anti-CD 4. Upper row ; CD 4+ cells determined and gated in a rectangular frame. Lower row ; determination of IL-2 R positive fraction. The marker (M) was set as described in Materials and Methods. Proportions of IL-2 R+CD 4+ cells were 11.3% without anti-CD 3, 80.5% with anti-CD 3, and 76.8% with both anti-CD 3 and FB sup 2.

Table 2 Effects of FB supernatant on IL-2 R expression of CD 4+, CD 8+, CD 45 RO+ and CD 45 RO- cells

anti-CD 3	FBsup	PGE ₂ concentration in FBsup. ($\times 10^{-8}$ M)	IL-2 R(+) cells(%)			
			CD 4+	CD 8+	CD 45 RO+	CD 45 RO-
-	NONE		11.5(100*) $\pm$ 3.7	1.3(100) $\pm$ 0.7	14.8(100) $\pm$ 1.8	6.9(100) $\pm$ 1.3
+	NONE		80.7(0) $\pm$ 5.4	63.7(0) $\pm$ 10.5	75.7(0) $\pm$ 3.4	62.0(0) $\pm$ 3.4
+	FBsup 1	0.055	80.2(1) $\pm$ 6.2	63.8(0) $\pm$ 11.9	72.3(6) $\pm$ 4.1	60.0(4) $\pm$ 5.3
+	FBsup 2	1.1	73.8(10) $\pm$ 5.6 ^a	50.8(21) $\pm$ 11.1 ^a	63.7(20) $\pm$ 4.8 ^a	57.6(8) $\pm$ 5.4 ^a

Peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) isolated from five healthy donors were incubated for 24hr at 37°C in 5% CO₂ and air.

All values are the mean $\pm$ SE from five experiments.

* : Suppression rate(%) = $(A - C / A - B) \times 100$

A : IL-2 R expression on MNCs cultured with anti-CD 3.

B : IL-2 R expression on MNCs cultured without anti-CD 3.

C : IL-2 R expression on MNCs cultured with anti-CD 3 in the presence of stimuli (e.g. FBsups).

a : Statistically significant compared with FB sup 1 at $p < 0.05$.

Figure 2 The comparison of sensitivity of IL-1-stimulated FB sup or PGE 2 between T cell subsets. PB-MNCs isolated from seven healthy donors were incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ with anti-CD 3 in the presence of 10⁻⁸ M PGE 2 (■) or FB sup 2 (▨).

Suppression rate(%) = $(A - C / A - B) \times 100$

A : IL-2 R expression on MNCs cultured with anti-CD 3.

B : IL-2 R expression on MNCs cultured without anti-CD 3.

C : IL-2 R expression on MNCs cultured with anti-CD 3 in the presence of FB sup 2 or PGE 2.

Results represent the mean $\pm$ SE of each five (FB sup 2) or seven (PGE 2) experiments.

* : Significant at $p < 0.05$.

CD 3 抗体によって 43.6% の細胞が IL-2 R を発現したと考えられる。これに対して、歯肉 CD 45 RO+T 細胞では抗 CD 3 抗体によって 17.2% (36.3–19.1%) の細胞が IL-2 R を発現するにとどまり、末梢血 CD 45 RO+T 細胞と比べて有意差が認められた (Table 3)。

4. 歯周炎罹患歯肉由来の CD 45 RO+T 細胞と CD 45 RO-T 細胞の IL-2 R 発現に対する FB sup の影響

歯周炎罹患患者末梢血および炎症歯肉より抽出した単核細胞を FB sup 2 と共に培養し、CD 45 RO 抗原と IL-2 R 抗原の発現を解析した典型例を Fig. 3, 4 に、同様に 5 例の結果をまとめたものを Table 3, 4 に示す。炎症歯肉由来の CD 45 RO+T 細胞は FB sup 2 によって IL-2 R の発現が有意に抑制された (Table 3 : Fig. 4) が、CD 45 RO-T 細胞では有意な抑制は示されなかった (Table 4)。

歯周炎罹患患者の歯肉 CD 45 RO+T 細胞は末梢血 CD 45 RO+T 細胞に比べ、FB sup 2 による IL-2 R 発現抑制の程度は小さかった ($p < 0.05$, Table 3)。CD 45 RO-T 細胞では同様の傾向は示されなかった (Table 4)。

5. 歯周炎罹患歯肉由来の CD 45 RO+T 細胞と CD 45 RO-T 細胞の IL-2 R 発現に対する PGE 2 の影響

歯肉由来の CD 45 RO+T 細胞と CD 45 RO-T 細胞のいずれの場合も PGE 2 によって IL-2 R の発現が抑制された ($p < 0.05$, Table 3, 4)。

歯周炎罹患患者の歯肉 CD 45 RO+T 細胞は末梢血 CD 45 RO+T 細胞に比べ、PGE 2 による IL-2 R 発現抑制の程度は小さかった ($p < 0.05$, Table 3)。CD 45 RO-T 細胞では同様の傾向は示されなかった (Table 4)。

考 察

本研究における IL-1 β 刺激 FB sup の T 細胞活性化系に対する抑制効果は PGE 2 を添加した場合と非常に類似した傾向を示した。アラキドン酸カスケードの産生を抑えるために IL-1 β と共に indomethacin を加えて歯肉線維芽細胞を培養した場合、FB sup 中の PGE 2 量が低レベルに抑えられると共に T 細胞活性化系に対する抑制効果も消失した (data not shown)。これらのことから、PGE 2 を主体としたアラキドン酸のサイクロオキシゲナーゼ系の代謝産物が IL-1 刺激歯肉線維芽細胞による T 細胞活性化抑制を引き起こしたと考えられる。

PGE 2 による T 細胞活性化抑制の程度には T 細胞サブセット間で差がみられた。PGE 2 による T 細胞の活性化抑制は細胞内の cAMP 濃度を長時間にわ

Figure 3 Typical 2-dimensional contour graphs and single histograms showing suppression of IL-2 R expression on PB-CD 45 RO+ cells by FB sup 2. PB-MNCs from a periodontitis patient were incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ without anti-CD 3 (left panels), with anti-CD 3 (middle panels), or with both anti-CD 3 and FB sup 2 (right panels). MNCs were stained with both FITC-labelled anti-IL-2 R and PE-labelled anti-CD 45 RO. Upper row ; CD 45 RO+ cells determined and gated in a rectangular frame as described in Materials and Methods. Lower row ; determination of IL-2 R positive fraction. The marker (M) was set as described in Materials and Methods. Proportions of IL-2 R+CD 45 RO+ cells were 15.5% without anti-CD 3, 77.5% with anti-CD 3, and 54.2% with both anti-CD 3 and FB sup 2.

たって上昇させてしまい細胞内の信号伝達系を阻害することにより生じると考えられている¹⁵⁾。Sunderら²⁰⁾は健康者の末梢血分離 CD 4+T 細胞, CD 8+T 細胞, CD 45 RO+T 細胞, CD 45 RA+T 細胞の増殖反応は, PGE 2 の添加によって, CD 4+T 細胞, CD 45 RA+T 細胞に比べて, CD 8+T 細胞, CD 45 RO+T 細胞でそれぞれ増殖抑制が強く生じることを示した。また, CD 4+T 細胞に比べ CD 8+T 細胞では cAMP 産生が高まるが, CD 45 RO+T 細胞と CD 45 RA+T 細胞では cAMP 量に有意差は認められなかった。今回の実験では T 細胞の初期の活性化マーカーである IL-2 R (CD 25) 発現を指標として培養時間を 1 日に短縮し, さらにフローサイトメーター

で死細胞をゲートアウトすることで, 死細胞の影響を極力排除した。その結果, 今回の実験でも CD 8+T 細胞と CD 45 RO+T 細胞が強く抑制されることが確認された。以上, T 細胞サブセットの PGE 2 に対する感受性の違いについては細胞表面の PGE 2 receptor 数の違い, signal transducing protein Gs の量的な違いなどが考えられるが²⁰⁾, これらに関してはさらに今後の検索が必要である。

ヒトの歯周炎罹患歯肉や犬の実験的炎症歯肉より抽出した単核細胞は, 末梢血のものよりもマイトジェンに対する幼若化反応が低下すると報告されている^{25,26)}。これらの研究の T 細胞活性化に PHA, ConA が用いられたのに対し, 本研究では抗 CD 3 抗

Figure 4 Typical 2-dimensional contour graphs and single histograms showing suppression of IL-2 R expression on gingival CD 45 RO+ cells by FB sup 2. Gingival MNCs from a periodontitis patient were incubated for 24 hours at 37°C in 5% CO₂ without anti-CD 3 (left panels), with anti-CD 3 (middle panels), or with both anti-CD 3 and FB sup 2 (right panels). MNCs were stained with both FITC-labelled anti IL-2 R and PE-labelled anti-CD 45 RO. The cells were analyzed as described in Fig. 3 legend. Proportions of IL-2 R+CD 45 RO+ cells were 17.0% without anti-CD 3, 39.3% with anti-CD 3, and 34.0% with both anti-CD 3 and FB sup 2.

体を用いた。CD 3 抗原はすべての末梢血 T 細胞に発現しており²⁷⁾、抗原認識機構と密接に関わっている^{28,29)}。CD 3 抗原は T 細胞活性化において signal transducer としてはたらく。また、抗 CD 3 抗体による T 細胞の活性化は、抗原によって引き起こされる T 細胞の活性化系と類似した経路をへて IL-2 R 発現から増殖反応へと続く^{30,31)}。本研究では、山崎ら²¹⁾の報告と同様に、歯周炎罹患歯肉中では CD 45 RO-T 細胞に比べ CD 45 RO+T 細胞が優位を占めた (data not shown)。また、マイトジェンを用いた場合主として CD 45 RO-T 細胞が活性化される³²⁾のに対して、抗 CD 3 抗体を使用した場合 CD 45 RO+T 細胞が活性化する³³⁾と考えられている。したがって本研究で、成人性歯周炎罹患歯肉 CD 45 RO+T 細胞は抗原類似の活性化刺激に対する応答性は低いことが示され

た。

歯周炎罹患歯肉 T 細胞の抗 CD 3 抗体に対する応答性が低い理由として 2 つの可能性が考えられる。ひとつは歯肉 T 細胞は既に活性化を受けており、新たな抗 CD 3 抗体刺激によってさらに活性化することができない。もうひとつは何らかの免疫抑制機構が歯周炎罹患歯肉中で、はたらいっている可能性がある。

まず歯肉の T 細胞が既に活性化している点に関しては、Seymour ら³⁴⁾は歯周炎罹患歯肉より抽出したリンパ球は無刺激で IL-2 を産生することを示し、すでに歯肉中では T 細胞が活性化されていることを報告している。また、武内ら²⁴⁾が歯周炎罹患歯肉より抽出した T 細胞の約半分は活性化の指標である HLA-DR 抗原の発現が高まっていることを報告している。歯肉 T 細胞の抗 CD 3 抗体に対する応答性の低下は、HLA

Table 3 Effects of FB supernatant and PGE 2 on IL-2 R expression of CD 45 RO+ cells isolated from peripheral blood (PB) and inflamed gingival tissue (G)

anti-CD 3	inhibitor	IL-2 R(+)cells(%)	
		CD 45 RO+	
		PB	G
—	NONE	14.8 (100*) $\pm$ 2.2	19.1 (100) $\pm$ 3.0
+	NONE	58.4# (0) $\pm$ 8.0	36.3# (0) $\pm$ 2.6 ^b
+	FBsup 1	55.4 (7) $\pm$ 6.4	35.5 (5) $\pm$ 3.4 ^a
+	FBsup 2	44.1 (33**) $\pm$ 5.8	33.2 (18) $\pm$ 3.0
+	PGE 2(10 ⁻⁶ M)	30.7 (64**) $\pm$ 5.0	28.6 (45) $\pm$ 3.5

PB-and G-MNCs isolated from five patients were incubated for 24hr at 37°C in 5% CO₂.

All values are the mean $\pm$ SE from five experiments.

* : Suppression rate described in Table 2..

** : Statistically significant difference in suppression rate compared with G-MNCs incubated with FBsup 2 and PGE 2 at $p < 0.05$, respectively.

: Enhancement of IL-2 R expression by anti-CD 3 (A—B) is significantly higher in PB as compared to G ($p < 0.05$).

A : IL-2 R expression on MNCs cultured with anti-CD 3.

B : IL-2 R expression on MNCs cultured without anti-CD 3.

a and b : Statistically significant compared with FBsup 2 and PGE 2 at $p < 0.05$, respectively.

Table 4 Effects of FB supernatant and PGE 2 on IL-2 R expression of CD 45 RO— cells isolated from peripheral blood (PB) and inflamed gingival tissue (G)

anti-CD 3	inhibitor	IL-2 R(+)cells(%)	
		CD 45 RO—	
		PB	G
—	NONE	6.4(100*) $\pm$ 0.4	26.2(100) $\pm$ 4.3
+	NONE	44.9(0) $\pm$ 3.2	35.2(0) $\pm$ 3.5 ^a
+	FBsup 1	45.3(—1) $\pm$ 3.3	33.6(18) $\pm$ 3.4 ^{NS}
+	FBsup 2	38.7(16**) $\pm$ 2.7	33.7(17) $\pm$ 3.7
+	PGE 2(10 ⁻⁶ M)	31.1(36**) $\pm$ 3.7	31.5(41) $\pm$ 4.0

PB-and G-MNCs isolated from five patients were incubated for 24hr at 37°C in 5% CO₂.

All values are the mean $\pm$ SE from five experiments.

* : Suppression rate described in Table 2.

** : No significant difference in suppression rate compared with G-MNCs incubated with FBsup 2 and PGE 2, respectively.

a : Statistically significant compared with PGE 2 at $p < 0.05$.

NS : No significant difference compared with FBsup 2.

-DR 抗原が細胞周期のS期あるいはそれ以降に発現する³⁵⁾ことや、G₀期~G₁期の細胞のみにIL-2Rの発現があることと³⁶⁾考え合せると、ほとんどの歯肉T細胞はS期あるいはそれ以降の期にあるためと推察される。

何らかの免疫抑制機構が働いている可能性に関しては、武内ら²⁴⁾は歯周炎罹患歯肉中でヘルパーT細胞にくらべサプレッサーT細胞のほうがHLA-DRを発現している割合が高いと報告している。このことは歯周炎罹患歯肉中のサプレッサーT細胞はヘルパーT細胞に比べてより活性化しており、サプレッサーT細胞による免疫抑制がはたらいっている可能性を示唆するものである。また本研究では、IL-1刺激FB supは歯肉のCD45RO+T細胞のIL-2R発現を抑制したこと、さらに、Interferon- γ で処理したヒト歯肉線維芽細胞はT細胞と接触して幼若化反応を低下させること³⁷⁾などが考えられ、歯肉CD45RO+T細胞の抗CD3抗体に対する応答性の低下は、歯肉線維芽細胞の液性因子の放出や線維芽細胞との細胞間接触によるものとも思われる。

IL-1刺激歯肉線維芽細胞培養上清やPGE2の歯周炎罹患歯肉CD45RO+T細胞に対する抑制効果は、末梢血CD45RO+T細胞よりも有意に小さい。この理由として二つのことが考えられる。ひとつはPGE2はT細胞活性化の極めて初期の段階に作用し、IL-2Rの発現を含めたその後続く一連の活性化段階をすべて阻害することが考えられる^{16,17)}。したがって歯肉CD45RO+T細胞の多くは、すでに初期の活性化を完了しているため、末梢血のものに比べPGE2による抑制が受けにくくなっている。もうひとつの考え方としては、CD45RO+T細胞はさらにいくつかのサブグループに分けられるが、これらのサブグループのうちPGE2に対する感受性の低いものが、末梢血に比べ歯肉中では優位に存在している可能性が考えられる。いずれにしても歯周炎罹患歯肉線維芽細胞由来のPGE2の抑制効果を検索する際にはT細胞サブセットがそれぞれどのような段階で活性化されるのかを今後しらべていく必要がある。

結 論

健常者8名の末梢血、または、歯周炎罹患患者5名の末梢血および歯肉より単核細胞をそれぞれ分離し、抗CD3抗体でT細胞を特異的に活性化させ、その際、

IL-1刺激FB supあるいはPGE2の抑制効果をIL-2R発現を指標として検討した。

その結果、

1. IL-1刺激FB supはすべての末梢血T細胞サブセットCD4+, CD8+, CD45RO+, CD45RO-T細胞のIL-2R発現を抑制した。しかしながらT細胞サブセット間で抑制の程度に差がみられ、CD8+T細胞やCD45RO+T細胞では強く抑制された。
2. 歯周炎罹患歯肉のCD45RO+T細胞の抗CD3抗体による活性化の割合は、末梢血CD45RO+T細胞に比べて小さかった。
3. 歯周炎罹患歯肉CD45RO+T細胞のIL-2R発現はIL-1刺激FB supやPGE2で抑制されるが、その感受性は末梢血CD45RO+T細胞より低かった。

謝 辞

本稿を終えるにあたって、本研究の遂行にあたり、親切丁寧な御教示並びに御助言を賜りました新潟大学歯学部歯科保存学第2教室 原耕二教授並びに山崎和久講師、御助言を賜りました新潟大学名誉教授 野原廣美先生並びに歯科保存学第2教室 吉江弘正助教授、青柳昌子助手、鈴木卓助手に謹んで感謝の意を表するとともに、保存学第2教室と生化学教室の教員の方々の皆様のご協力に感謝申し上げます。

本研究の一部は、平成4年度科学研究費補助金(奨励研究A)課題番号(04771499)の補助を受けて行われたことを付記する。

文 献

- 1) Schroeder, H.E. and Page, R.: Lymphocyte-fibroblast interaction in the pathogenesis of inflammatory gingival disease. *Experientia*, 28: 1228-1230, 1972.
- 2) Newton, R.C. and Covington, M.: The activation of human fibroblast prostaglandin E production by interleukin 1. *Cell. Immunol.*, 110: 338-349, 1987.
- 3) Takada, H., Mihara, J., Morisaki, I. and Hamada, S.: Induction of interleukin-1 and -6 in human gingival fibroblast cultures stimulated with *Bacteroides lipopolysaccharides*. *Infect. Immun.*, 59: 295-301, 1991.
- 4) Yamazaki, K., Ikarashi, M., Aoyagi, T., Takahashi, K., Nakajima, T., Hara, K. and Seymour, G.

- J. : Direct and indirect effects of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol. Immunol.*, 7 : 218-224, 1992.
- 5) Matsuki, Y., Yamamoto, T. and Hara, K. : Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA) -expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*, 76 : 42-47, 1992.
 - 6) Seymour, G.J. : Possible mechanisms involved in the immunoregulation of chronic inflammatory periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 66 : 2-9, 1987.
 - 7) Ivanyi, L. and Lehner, T. : Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. *Archs. oral Biol.*, 15 : 1089-1096, 1970.
 - 8) Yoshie, H., Taubman, M.A., Ebersole, J.L., Smith, D.J. and Olson, C.L. : Periodontal bone loss and immune characteristics of congenitally athymic and thymus cell-reconstituted athymic rats. *Infect. Immun.*, 50 : 403-408, 1985.
 - 9) Taubman, M.A., Wang, H.Y., Lundqvist, C.A., Seymour, G.J., Eastcott, J.W. and Smith, D.J. : The cellular basis of host responses in periodontal diseases. In : *Periodontal disease : Pathogens & Host immune responses* (Edited by Hamada, S., Holt, S.C. and McGhee, J.R.) Chap. 14, P. 199-208, Quintessence Publishing Co., Ltd. Tokyo, 1991.
 - 10) Okada, H., Kassai, Y. and Kida, T. : T lymphocyte subsets in the inflamed gingiva of human adult periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 19 : 595-598, 1984.
 - 11) Taubman, M.A., Stoufi, E.D., Ebersole, J.L. and Smith, D.J. : Phenotypic studies of cells from periodontal disease tissues. *J. Periodont. Res.*, 19 : 587-590, 1984.
 - 12) Matsuki, Y., Yamamoto, T. and Hara, K. : Localization of interleukin-1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid. *J. Periodont. Res.*, 28 : 35-42, 1993.
 - 13) Dower, S.K. and Urdal, D.L. : The interleukin-1 receptor. *Immunol. Today*, 8 : 46-51, 1987.
 - 14) Qwarnstrom, E.E., Page, R.C., Gillis, S. and Dower, S.K. : Binding, internalization, and intracellular localization of interleukin-1 β in human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 263 : 8261-8269, 1988.
 - 15) Goodwin, J.S. and Webb, D.R. : Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 15 : 106-122, 1980.
 - 16) Rincón, M., Tugores, A., López-Rivas, A., Silva, A., Alonso, M., De Landázuri, M.O. and López-Botet, M. : Prostaglandin E₂ and the increase of intracellular cAMP inhibit the expression of interleukin 2 receptors in human T cells. *Eur. J. Immunol.*, 18 : 1791-1796, 1988.
 - 17) Vercammen, C. and Ceuppens, J.L. : Prostaglandin E₂ inhibits human T-cell proliferation after crosslinking of the CD3-Ti complex by directly affecting T cells at an early step of the activation process. *Cell. Immunol.*, 104 : 24-36, 1987.
 - 18) Stobo, J.D., Kennedy, M.S. and Goldyne, M.E. : Prostaglandin E modulation of the mitogenic response of human T cells. *J. Clin. Invest.*, 64 : 1188-1195, 1979.
 - 19) Chouaib, S., Chatenoud, L., Klatzmann, D. and Fradelizi, D. : The mechanisms of inhibition of human IL 2 production. II. PGE₂ induction of suppressor T lymphocytes. *J. Immunol.*, 132 : 1851-1857, 1984.
 - 20) Sunder-Plaßmann, R., Majdic, O., Knapp, W. and Holter, W. : In vitro and in vivo activated T cells display increased sensitivity of PGE₂. *Cell. Immunol.*, 138 : 289-299, 1991.
 - 21) Yamazaki, K., Nakajima, T., Aoyagi, T. and Hara, K. : Immunohistological analysis of memory T lymphocytes and activated B lymphocytes in tissues with periodontal disease. *J. Periodont. Res.*, 28 : 324-334, 1993.
 - 22) Löe, H. and Silness, J. : Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol. Scand.*, 21 : 533-551, 1963.
 - 23) Daly, C.G., Clancy, R.L. and Cripps, A.W. : Lymphocytes from chronically inflamed human gingiva. I. Cell recovery and characterization in vitro. *J. Periodont. Res.*, 18 : 67-74, 1983.
 - 24) Takeuchi, Y., Yoshie, H. and Hara, K. : Expression of interleukin-2 receptor and HLA-DR on lymphocyte subsets of gingival crevicular fluid in patients with periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 26 : 502-510, 1991.
 - 25) Seymour, G.J., Cole, K.L. and Powell, R.N. : Analysis of lymphocyte populations extracted from chronically inflamed human periodontal tissues. II. Blastogenic response. *J. Periodont. Res.*, 20 : 571-579, 1985.
 - 26) Yamashita, K., Ohfuji, Y., Yoshie, H. and Hara, K. : Blastogenic response and immunoglobulin production by inflamed gingival lymphocytes from dogs. *J. Periodont. Res.*, 23 : 322-327, 1988.
 - 27) Kung, P.C., Goldstein, G., Reinherz, E.L. and Scholssman, S.F. : Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science*, 206 : 347-349, 1979.
 - 28) Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Scholssman, S.F. and Reinherz, E.L. : Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J. Exp. Med.*, 157 : 705-

- 719, 1983.
- 29) Meuer, S.C., Acuto, O., Hussey, R.E., Hodgdon, J. C., Fitzgerald, K.A., Schlossman, S.F. and Reinherz, E.L. : Evidence for the T 3-associated 90 K heterodimer as the T-cell antigen receptor. *Nature*, 303 : 808-810, 1983.
- 30) Meuer, S.C., Hodgdon, J.C., Hussey, R.E., Protentis, J.P., Schlossman, S.F. and Reinherz, E. L. : Antigen-like effects of monoclonal antibodies directed at receptors on human T cell clones. *J. Exp. Med.*, 158 : 988-993, 1983.
- 31) Meuer, S.C., Hussey, R.E., Cantrell, D.A., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F., Smith, K.A. and Reinherz, E.L. : Triggering of the T 3-Ti antigen-receptor complex results in clonal T-cell proliferation through an interleukin 2-dependent autocrine pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 1509-1513, 1984.
- 32) Akbar, A.N., Salmon, M. and Janossy, G. : The synergy between naive and memory T cells during activation. *Immunol. Today*, 12 : 184-188, 1991.
- 33) Sander, M.E., Makgoba, M.W., June, C.H., Young, H.A. and Shaw, S. : Enhanced responsiveness of human memory T cells to CD 2 and CD 3 receptormediated activation. *Eur. J. Immunol.*, 19 : 803-808, 1989.
- 34) Seymour, G.J., Cole, K.L., Powell, R.N., Lewins, E., Cripps, A.W. and Clancy, R.L. : Interleukin-2 production and bone-resorption activity in vitro by unstimulated lymphocytes extracted from chronically-inflamed human periodontal tissues. *Archs. Oral Biol.*, 30 : 481-484, 1985.
- 35) Loken, M.R., Shah, V.O., Dattilio, K.L. and Civin, C.I. : Flow cytometric analysis of human bone marrow. II. Normal B lymphocyte development. *Blood*, 70 : 1316-1324, 1987.
- 36) Smith, K.A. : Interleukin- 2 : Inception, Impact and Implications. *Science*, 240 : 1169-1176, 1988.
- 37) Shimabukuro, Y., Murakami, S. and Okada, H. : Interferon-gamma-dependent immunosuppressive effects of human gingival fibroblasts. *Immunol.*, 76 : 344-347, 1992.

連絡先 :

新潟大学歯学部歯科保存学第2教室

〒 951 新潟市学校町通り 2 番町 5274 番地