

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目:若手研究 B

研究期間:平成19年度～平成21年度

課題番号:19791529

研究課題名(和文)口腔扁平苔癬の発症および病態形成の分子機構におけるT細胞マイクロキメリズムの関与

研究課題名(英文)Involvement of T lymphocyte microchimerism in molecular mechanism of the induction and development of oral lichen planus

研究代表者 林田淳之介

(九州大学・大学院歯学研究院・助教)

研究者番号:80432920

研究成果の概要(和文):

本研究の目的は、T細胞マイクロキメリズムによって移植片対宿主反応(GVHR)が引き起こされ、その結果口腔扁平苔癬(OLP)とシェーグレン症候群(SS)の両疾患の発症が惹起されるという仮説を証明することである。

1. 男児出産歴のあるOLP患者の頬粘膜生検組織からゲノムDNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いてY染色体特異的配列を増幅検出した。結果、27例のうち6例(22.2%)でY染色体特異的配列が検出された。

2. 1でY染色体特異的配列を増幅検出し得た6例において、FISH法を用いたT細胞マイクロキメリズムの検出を行った。この男児の出産歴があるOLP患者3例の病変部の凍結切片において、FISH法を用いてY染色体陽性細胞の存在が同定できた。しかし、FISH法と免疫組織化学染色の二重染色を用いたY染色体陽性T細胞の同定を進めているが、現在のところその同定が確認された。

3. 研究に対して同意が得られれば、患者本人とご子息(男女問わず)のHLAタイピングを行い、OLP患者のHLA遺伝子解析を行うことで、子供の性別を問わずに、胎児由来の細胞の移入があるかどうかを検討する予定であった。

最終的には、標的抗原が同定されることで、SSやOLP発症のメカニズムを解明できるだけでなく、有効的な治療法も開発できると考えているが、その治療法までは今回至らなかった。

研究成果の概要(英文):

Objective: It is possibly induced by graft versus host reaction (GVHR) following maternal-fetal microchimerism. We thus have reported a possible relation between maternal-fetal microchimerism and Sjögren's syndrome with some similarities to cGVHD. In this research, we investigated whether cells with male DNA exist in female patients with oral lichen planus (OLP), as OLP-like lesions were frequently observed in the patients with cGVHD.

1. Twenty-seven female patients with OLP of the bilateral buccal mucosa referred to our clinic were studied. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and biopsy specimens of

the lesions were obtained from 13 and all of the 27 patients respectively, and the DNA was extracted. The presence of male DNA was then examined by real-time polymerase chain reaction (PCR) with Y chromosome-specific sequences. The presence and distribution of cells containing the Y chromosome were examined in the biopsy specimens by double staining of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and immunohistochemical staining.

2. Six of 27 biopsy specimens tested positive by real-time PCR for the Y chromosome-specific sequence. The 6 patients whose biopsy specimens were positive for the Y chromosome-specific sequence experienced at least one of the followings: parturition of male child, abortion, and blood transfusion. Furthermore, double staining of FISH and immunohistochemical staining revealed that T cells with the Y chromosome are present in the biopsy specimens.

3. If an informed consent was obtained for the research, it was scheduled to be examined HLA typings, and analyzing OLP patient's HLA gene without asking child's sex by doing the patient himself and children.

Finally, it did not arrive at the treatment method this time though it was thought that the mechanism of SS and the OLP appearance of disease was able not to be only interpretable with the identification of the target antigen but also to develop an effective treatment method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1100000	0	1100000
2008年度	1100000	330000	1430000
2009年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
総計	3300000	660000	3960000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：口腔外科

キーワード：

口腔扁平苔癬、マイクログキメリズム、移植片対宿主反応

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平苔癬 (oral lichen planus: OLP) は口腔粘膜に生じる難治性疾患であり、アレルギーや自己免疫反応などの関与が考えられてはいるが未だ原因不明のである。OLPの病変部では胚中心様のリンパ球浸潤を認めることがあり、腸管免疫として注目されているパイエル板と類似している

(写真 1)。そもそも口腔粘膜は種々の抗原タンパクと常に接触し、多数の口腔内常在菌と免疫学的な攻防を行っている「腸管の入口」といえる器官である。そういった意味で、難治性の粘膜疾患である OLP は、口腔内の抗原に暴露されることで生じた免疫性疾患と考えることができるが、免疫学分野においても解明が成されていないのが

現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、T 細胞マイクロキメリズムによって GVHR が引き起こされ、その結果両疾患の発症が惹起されるという仮説を以下の段階を経て証明することにある。

(1) Y 染色体陽性細胞が T 細胞であることを FISH と免疫染色の二重染色法などで証明する。(2) これまでは女性患者への男児細胞の移入を検討したが、今回は HLA 遺伝子解析を行うことで、子供の性別を問わずに、胎児由来の細胞の移入があるかどうかを検討する。(3) 病変局所から T 細胞クローンを樹立し、T 細胞マイクロキメリズムを細胞レベルで証明後、その標的抗原を同定する。

3. 研究の方法

リアルタイム PCR 法を用いたマイクロキメリズムの検出。まず現在の症例に加えて、さらに男児出産歴のある OLP の患者の頬粘膜生検組織からゲノム DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて Y 染色体特異的配列を増幅検出する。次いで、FISH 法を用いた T 細胞マイクロキメリズムの検出。これまでに少数ではあるが、男児の出産歴のある OLP 患者の病変部の凍結切片において、FISH 法と免疫組織化学染色の二重染色を用いて Y 染色体陽性 T 細胞の同定ができた。そこで今回はさらに症例数を増やして同様の方法で Y 染色体陽性 T 細胞の同定を進める。さらに研究に対して同意が得られた患者本人とご子息(男女問わず)の HLA タイピングを行い、HLA 特異的配列プローブを作製する。そこで OLP 患者の病変部の凍結切片で FISH 法を用いて、その HLA 特異的配列陽性細胞を同定する。

4. 研究成果

男児出産歴のある OLP 患者の頬粘膜生検組織からゲノム DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いて Y 染色体特異的配列を増幅検出した。結果、27 例のうち 6 例(22.2%)で Y 染色体特異的配列が検出された。さらに、Y 染色体特異的配列を増幅検出し得た 6 例において、FISH 法を用いた T 細胞マイクロキメリズムの検出を行った。この男児の出産歴がある OLP 患者 3 例の病

変部の凍結切片において、FISH 法を用いて Y 染色体陽性細胞の存在が同定できた。しかし、FISH 法と免疫組織化学染色の二重染色を用いた Y 染色体陽性 T 細胞の同定を進めているが、現在のところその同定が確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

・83rd General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research, Detection of maternal-fetal microchimerism in patients with oral lichen planus. HAYASHIDA J-N, NAKAMURA S. et al., Baltimore, 2006.7.4

・第 7 回 九州シェーグレン症候群研究会
「ミクリッツ病とシェーグレン症候群
唾液腺病変における相違点」

森山雅文、大山順子、林田淳之介、篠崎昌一、他 福岡、2009.5.30.

・第 17 回 九州シェーグレン症候群研究会
「M3 型ムスカリン受容体アゴニストによる
ドライマウスの治療」

林田淳之介、大山順子、森山雅文、中村誠司、岐阜、2008.9.19

・第 8 回 九州シェーグレン症候群研究会
「M3 型ムスカリン受容体アゴニストによる
ドライマウスの治療」

林田淳之介、大山順子、森山雅文、中村誠司、福岡、2009.5.30

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
林田淳之介（助教）

研究者番号：
80432920
(2) 研究分担者
なし（ ）

研究者番号：
(3) 連携研究者
なし（ ）

研究者番号：