

Review Article

歯周炎病態形成における歯肉線維芽細胞とTリンパ球の接着性細胞間相互作用の意義—CD13陽性Tリンパ球の解析を中心に—

岸田 健, 佐保輝之, 平野裕之, 島袋善夫, 村上伸也

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座歯周病分子病態学

Possible involvement of adhesive interaction between T lymphocytes and gingival fibroblasts in establishment of periodontitis: Presence of CD13 positive T lymphocytes in inflamed periodontal tissues

In our previous studies, we examined the molecular mechanisms of adhesive interactions between lymphocytes and human gingival fibroblasts (HGF) that occur at inflammatory gingival connective tissues. We found that activation of lymphocytes led to their increased adhesiveness to HGF, and that adhesion pathways involving at least VLA integrins, LFA-1/ICAM-1, and CD44/hyaluronate play crucial roles in the binding of activated lymphocytes to HGF. Furthermore, possible activation of HGF by adhesive interactions with lymphocytes was examined by monitoring the inflammatory cytokine expression. IL-1 and IL-6 mRNA expression in the HGF was increased when HGF directly interacted with lymphocytes. These results strongly suggest that adhesive interaction between these heterotypic cell types transduces activation signals into HGF that induce an increase in inflammatory cytokine mRNA expression. Recently, we examined by monitoring the expression of CD13 (aminopeptidase N) whether the direct interactions between lymphocytes and HGF can also stimulate the lymphocytes. Peripheral blood T cells (PBT) which had been cultured in the presence or absence of PMA were added to the HGF monolayers. After incubation, the PBT were harvested and CD13 expression on the cell surfaces was analyzed by flow cytometry. Furthermore, the presence of CD13 positive T cells in inflamed gingival tissues was also examined *in vivo*. Interestingly, CD13 expression was induced on PMA-activated PBT only when they were cultured on HGF. When HGF and PMA-activated PBT were cultured in the same well but separated by a membrane, no expression of CD13 on the PBT was observed. In addition, CD13 positive T cells, which were not detected in PBT of the same patients, were isolated from gingival tissues. These results indicate that direct interactions with HGF were essential for the induction of CD13 expression on T cells, which were observed in periodontitis lesions.

Rec.10/6/2003, Acc.12/5/2003, pp92-99

Takeshi Kishida, Teruyuki Saho, Hiroyuki Hirano, Yoshio Shimabukuro, and Shinya Murakami

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

Key words cell adhesion molecule, CD13 (aminopeptidase N), gingival fibroblasts, T cells

はじめに

炎症歯周組織には多数のリンパ球系細胞が集積し、その病態形成に重要な役割を果たしていることが一連の研究により明らかにされてきた。リンパ球はサイトカインや抗体の産生を担い、免疫反応の中心的な働きを演じている細胞であるが、炎症部位で働きを終えたリンパ球は、通常アポトーシスあるいは貪食作用により炎症巣から排

除され、同部の炎症反応は終息へと向かうことになる。しかしながら、近年炎症結合組織においてリンパ球等の浸潤細胞と線維芽細胞が長期にわたり接触すると、リンパ球のアポトーシスが抑制され、炎症巣での定着・集積が促進されることになり、同部の炎症が遷延化し慢性炎症へと移行するモデルが提唱されている¹⁾。したがって、結合組織における炎症の慢性化には、リンパ球と線維芽細胞

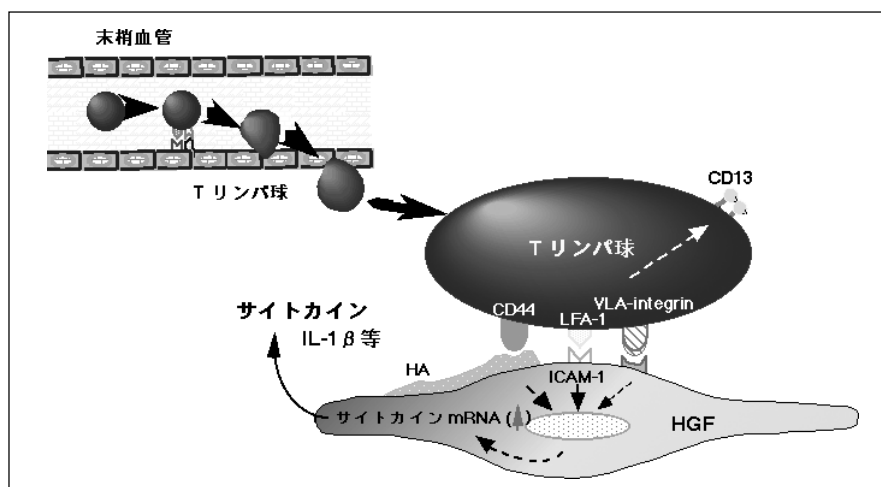


図1 リンパ球とHGF間との接着性細胞間相互作用

活性化Tリンパ球はヒト歯肉線維芽細胞(HGF)との接着能を獲得し、その接着にはVLAインテグリン、LFA-1/ICAM-1やCD44/HA等が関与している。また、この異種細胞間接着により両細胞が相互に活性化される可能性が示唆されている。

間の接着が深く関与していると考えられている。

我々の研究室では、炎症歯周組織でのリンパ球の定着・集積のメカニズムを解明する一助として、歯肉線維芽細胞(HGF)とリンパ球との接着性細胞間相互作用に着目し、その分子機構と意義について検討を行ってきた。

リンパ球-HGF間の細胞接着に關与する接着分子

我々は⁵¹Crラベルしたリンパ球系細胞をHGF単層上に投入し、30分培養後にHGFと接着しなかったリンパ球を除去し、HGFに接着したリンパ球のみを残して、その放射活性を測定することによりHGFに接着したリンパ球の割合を*in vitro*において定量化するアッセイ系を確立した²⁾。この系を用いて以下の一連の研究を行った。ヒト末梢血Tリンパ球(PBT)は、実験目的を承諾し、実験に参加することを承諾した健康人および歯周病患者ボランティアより末梢血を採取し、比重遠心法によって単核球を分離、回収した後、ノイラミニダーゼ処理したヒツジ赤血球とロゼット形成した細胞を回収し、PBTとして実験に供した。また、HGFは組織提供を承諾した健康人ボランティアより採取した健康歯肉組織より増殖してきた細胞を継代培養し、これをHGFとして継代4代から10代目までの細胞を実験に供した。

まず、PBTは無刺激の状態ではHGFに対して接着能を示さなかったが、PMA刺激によって活性化されたPBTはHGFへの強い接着能を獲得することが明らかとなった。そこで、この両細胞間の接着に関わる分子を解析する目的で両細胞の接着阻害を有する単クローン抗体の作製を

試みたところ、VLAインテグリンβ1特異的抗体が上記細胞間接着を有意に阻害することが明らかとなった^{2,3)}。また、さらに検討を進めると、VLAインテグリン中のVLA4、VLA5が両細胞間の接着に関与することが明らかとなった。しかしながら、両細胞間の接着は先に述べたVLAインテグリンに対する抗体だけでは完全には阻害されなかったことから、VLAインテグリン以外にも複数の接着様式が関与している可能性が強く示唆された。我々はヒアルロン酸(HA)レセプターとして機能するCD44分子の機能的エピトープを認識する単クローン抗体OS/37の樹立に成功し⁴⁾、この抗体を用いた解析により、活性化Tリンパ球-HGF間の接着においてCD44/HAを介した接着が関与していることを明らかにした⁵⁾。さらに、HGFをIL-1β刺激するとリンパ球とHGF間の接着は亢進し、その細胞間接着はTリンパ球を抗LFA-1抗体あるいはHGFを抗ICAM-1抗体で処理することにより効果的に阻害されることが示された。この現象は、IL-1β刺激によりHGF上のICAM-1発現が亢進することに起因するものと考えられる。

以上の結果より、Tリンパ球とHGFとの細胞間の接着には、少なくともCD44/HA、VLAインテグリン、LFA-1/ICAM-1といった複数の接着分子を介した接着メカニズムの存在が明らかとなり、このことから、血管内から炎症巣内へと血管外遊走を果たしたリンパ球は、歯肉結合組織内のHGFと複数の特異的な細胞接着分子を介して接着することにより、同部に定着・集積を果たすものと考えられる(図1)。

リンパ球との細胞接着によるHGFの活性化

歯肉固有層を構成する中心的な細胞群であるHGFは、これまでに考えられていたような歯周組織の単なる一構成成分ではなく、種々の炎症メディエーターの産生等を介して局所の炎症反応へ積極的に関与することが強く示唆されている。そこでHGFとリンパ球との接着性細胞間相互作用により、いかなる変化がHGFに惹起され得るかを*in vitro*にて検討した。あらかじめPMA刺激によりHGFへの接着能を亢進させたTリンパ球をHGFと3時間共培養し、HGFにいかなる変化が起こるのかを炎症性サイトカインの産生を指標に検討した。共培養終了後のHGFからmRNAを抽出し、半定量性RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法を応用してサイトカインmRNA量を検出した。その結果、活性化Tリンパ球と細胞接着したHGFは、無刺激のHGFに比べIL-1 β やIL-6 mRNAの産生が飛躍的に上昇することが明らかとなった⁶⁾。しかしながら、HGFとTリンパ球を0.4 μ mポアサイズのメンブレンを持つチャンバーで隔離し、両細胞が接着できない条件下で同一プレート内にて培養すると、著明なmRNA産生の上昇は認められなかった。同様に、自身からのIL-1 β mRNA産生がなく、かつHGFと細胞接着する腫瘍細胞K562を選択し、リンパ球系細胞としてHGFと3時間共培養したところ、K562と共培養したHGFは、無刺激のHGFに比べIL-1 β 、IL-1 α 、IL-6 mRNAの産生が飛躍的に上昇することが明らかとなった。また、培養上清中にHGFからのIL-6の産生が誘導されることも確認している。つまり、HGFはリンパ球と接着性の細胞間相互作用を行うことによりHGF自身が活性化され、炎症性サイトカインを産生するようになる機構が存在することが明らかとなった。このことは、歯周炎の病巣局所においてHGFは浸潤してきたリンパ球の定着・集積に関与するのみならず、自らも活性化され炎症性サイトカインを産生し、局所の炎症反応を修飾している可能性を示唆している。

HGFとの細胞接着によるリンパ球の活性化 (Tリンパ球上へのCD13分子発現誘導)

近年、膜結合型メタロプロテアーゼの一つであるCD13分子がサイトカインや細胞外基質の分解等に関与していることが報告されている。小腸や脾臓の刷子縁、脳、また末梢血中においては、単球や顆粒球にCD13分子の発現が認められるが、通常リンパ球上には同分子は発現していない。興味深いことに、末梢血中には存在しないCD13陽性のTリンパ球が慢性炎症疾患の一つであるリウマチ患者の炎症関節腔内の滑液中に存在していること^{7,8)}、さら

に心臓弁膜症等の心疾患の局所⁹⁾や、腎細胞癌の病変部¹⁰⁾においてもCD13陽性Tリンパ球が存在していることが明らかにされ、病巣部で見出されるCD13陽性Tリンパ球が種々の病態形成に何らかの関与をしている可能性が示唆されている。そこで、炎症歯周組織においても、同部に血管外遊走を果たしたTリンパ球上にCD13分子が発現誘導され得るか否かを、HGFとTリンパ球との接着性細胞間相互作用の観点から解析した。

まず、PBT上のCD13分子発現状況をフローサイトメトリ (FCM) により解析したところ、無刺激のPBTの細胞表面上にはCD13分子の発現が認められず、またHGFと共培養することによっても、PBT上にはCD13分子の発現を誘導できなかった。そこで次に、あらかじめPBTをPMA刺激し、HGFに対する接着能を獲得した活性化PBTを用いて同様の実験を行い、PBT上にCD13分子の発現が誘導されるか否かを検討した。その結果、PMA刺激のみではCD13分子の発現は誘導されなかったが、PMAにて活性化され、HGFに対し接着能を獲得したPBTをHGFと共培養することにより、PBT細胞表面上にCD13分子の発現が誘導された¹¹⁾ (図2)。そこで、PBT細胞表面上へのCD13分子の発現誘導にPBT-HGF間の直接的な細胞接着が必要であるか否かを検討する目的で、前述の0.4 μ mポアサイズのメンブレンを介してPBT-HGF間の直接的接触を阻害し、液性因子のみ両細胞間を移動可能な状況下で同一ウェル内にて共培養を行った。その結果、HGFと直接接触しなかったPBTでは、その細胞表面上へのCD13分子の発現誘導は認められなかった (図2)。次にPBT-HGF間の接着によるCD13分子発現の変化をmRNAレベルで検討した。RT-PCR法による解析の結果、PBTにおけるCD13 mRNA発現は、HGFとの共培養30分後より検出され、2時間後まで上昇することが明らかとなった (図3)。このことから、PBT細胞表面上へのCD13分子の発現誘導には、PBTとHGF間の直接的接触が必要であること、また液性因子だけではPBT細胞表面上にCD13分子の発現は誘導されないことが明らかとなった。さらにこのPBT細胞表面上に発現したCD13分子が、アミノペプチダーゼとしての酵素活性を有しているか否かを調べるため、CD13分子に特異的な基質で、分解されることにより蛍光を発するよう調製された試薬であるCellProbe®を用いて解析を行った¹²⁾。その結果、PMA刺激によっても同酵素活性の上昇は認められず、また無刺激のPBTをHGFと共培養してもCD13分子の酵素活性の上昇は認められなかった。しかしながら、HGFと共培養することによりCD13分子をその細胞表面上に発現誘導されたPMA刺激PBTでは、CD13分子の酵素活性の上昇も起こることが確認され

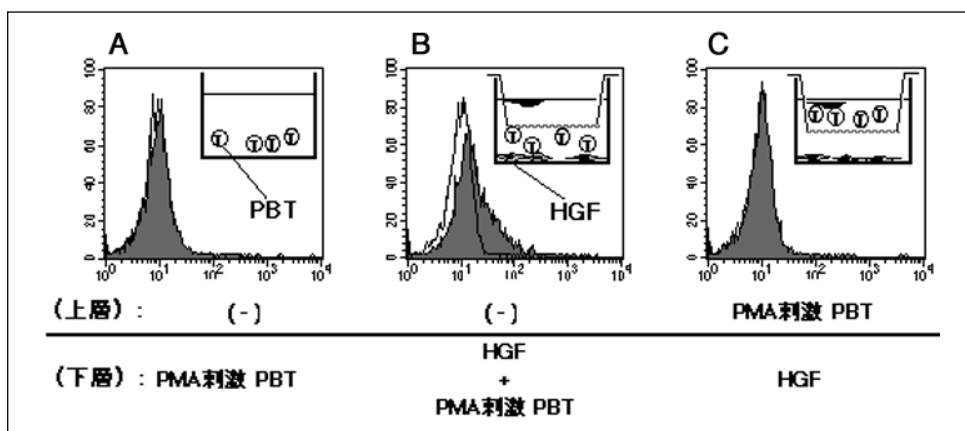


図2 PBT-HGF 間の接着障害が CD13 分子発現誘導に及ぼす影響

0.5 μ g/ml PMA刺激したPBTを,RPMI1640培地中(A),HGF上(B)および0.4 μ mポアサイズのメンブレンを介してHGFとPBTが直接接触しない状態(C)で24時間共培養を行った後,PBTの回収を行った.そして回収したPBT 1×10^6 個あたり1.0 μ gのBiotin標識抗CD13抗体と4°Cで30分間反応させ,洗浄後PE標識ストレプトアビジン(Sav-PE)を加え,4°Cで30分間反応させFCM解析を行った(—).抗体を加えずSav-PEのみを加えたものを対照(---)として用いた.
(文献11)より改変)

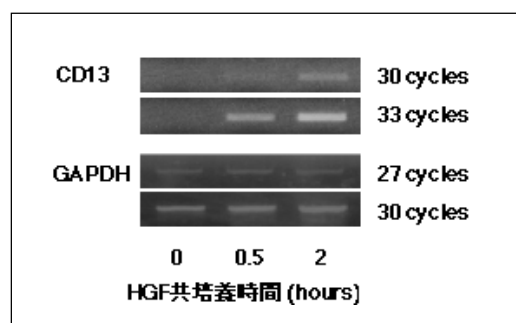


図3 HGF との共培養による PMA 刺激 PBT 内での CD13 mRNA 発現誘導

0.5 μ g/ml PMA刺激したPBTを,HGFと0時間,0.5時間,2時間共培養を行った後,PBT中のmRNAの発現量をRT-PCR法を用いて検出した.同一の実験を3回行い,代表的な結果を本図に示す.

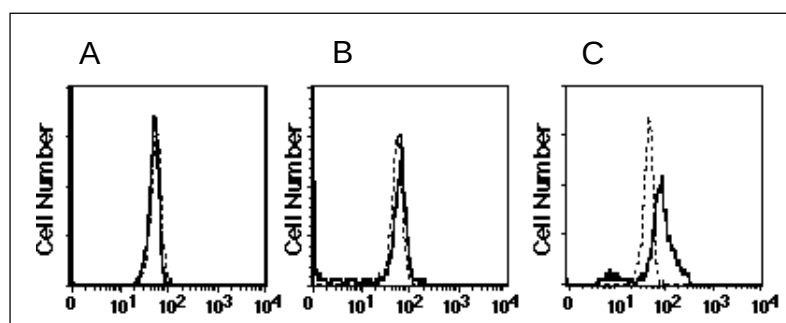


図4 HGF との共培養による CD13 分子の酵素活性の変化

無刺激あるいは0.5 μ g/ml PMA刺激したPBT,およびそれらをHGFと共培養したPBTにCellProbe®を添加し37°Cで5分間反応させ,CD13分子酵素活性の変化をFCMにて測定した.

- A: 無刺激PBT(---)と,PMA刺激PBT(—)のCD13分子の酵素活性をFCM解析した.
B: 無刺激PBTをRPMI1640培地中(---)およびHGF上(—)で24時間培養し,CD13分子の酵素活性をFCM解析した.
C: PMA刺激PBTをRPMI1640培地中(---)およびHGF上(—)で24時間培養し,CD13分子の酵素活性をFCM解析した.

た(図4).また,その酵素活性は,CD13の特異的インヒビターであるBestatinにより濃度依存的に抑制されることも確認されている.

炎症歯周組織におけるCD13陽性Tリンパ球の検出

次に,CD13陽性Tリンパ球が炎症歯周組織に実際に局在しているか否かについて検討を加えた.大阪大学歯学

部附属病院歯周科を受診し,歯周病と診断され,再評価後歯周外科処置を行うこととなった患者中,実験目的を承諾し,実験に参加することを応諾した10名(年齢27歳~61歳,男性4名,女性6名)を被験対象とした.歯周外科処置時に採取された歯肉片を3mm角に細断した後,従来からの酵素処理による細胞抽出法に代わる半自動組織粉碎器であるMedimachine System®(ダコ・ジャパン)を用いて短時間に単細胞を抽出した^{13,14}.Percoll-1.077を用い

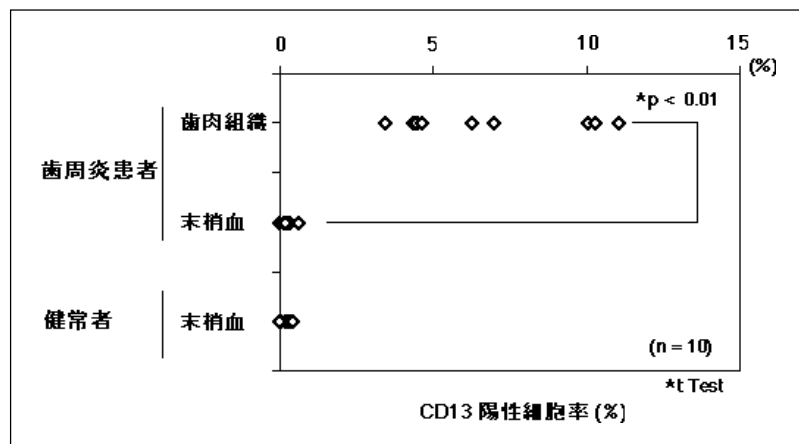


図5 歯肉組織および末梢血中Tリンパ球のCD13陽性細胞率
同一歯周病患者10症例より採取した歯肉浸潤単核球および末梢血単核球をFITC標識抗CD3抗体ならびにBiotin標識抗CD13抗体と4°Cで30分間反応させた。洗浄後Sav-PEを加え、4°Cで30分間反応させFCM解析を行った。全Tリンパ球中のCD13陽性細胞率(%)は、CD3陽性細胞中のCD13陽性細胞率(100分率)を算出することにより求めた。本研究の群間比較はStudent *t* testを用い、1%以下の危険率で有意差ありと判定した。

た比重遠心法により単核球を分離し、歯肉組織浸潤単核球として実験に供した。全Tリンパ球中のCD13陽性細胞率(%)は、CD3陽性細胞中のCD13陽性細胞率(100分率)を算出することにより求めた。本研究の群間比較はStudent *t* testを用い、1%以下の危険率で有意差があるものと判定した。その結果、これまでの報告の通り、慢性歯周病患者および健康人ボランティアの末梢血より分離した単核球中にはCD13陽性Tリンパ球は検出されなかった。しかしながら、歯周外科処置時に末梢血と同時に歯肉を採取し、同一患者の末梢血中および歯肉組織中Tリンパ球を直接比較することができた10症例においてCD13陽性細胞率を算出したところ、どの症例においても歯肉組織に浸潤したTリンパ球は、末梢血では発現していないCD13分子を高頻度に発現していることが明らかとなった(図5)。

考察

慢性炎症疾患である歯周病の病巣局所では、リンパ球を主体とする多数の炎症細胞の浸潤が観察される。一般的に炎症巣では、急性期に浸潤してきた炎症細胞はその働きを終えた後、アポトーシスや貪食作用により排除され炎症が消退する。一方、慢性炎症巣の形成過程においては、線維芽細胞との接着によりリンパ球が線維芽細胞の産生するIFN β やSDF-1等のサイトカインの影響を受け、同リンパ球のアポトーシスが抑制される可能性が指摘されている¹⁾。そして、この接着機構により、リンパ球が線

維芽細胞を足場として長期にわたり排除されることなく炎症巣に定着するようになり、炎症性サイトカインが恒常的に炎症巣で産生され続けるため同部の炎症反応が遷延化し、組織破壊を伴う慢性炎症へと移行するというモデルが提唱されている^{1, 15)}。これらのことは、リンパ球と線維芽細胞との異種細胞間接着¹⁶⁻²⁰⁾が単にリンパ球の炎症結合組織への定着・集積機構として機能するのみならず、組織破壊を伴う慢性炎症の成立そのものにも深く関与し得る可能性を示唆している。

当教室でのこれまでの研究成果より、活性化リンパ球がHGFに対して能動的に細胞接着し、その異種細胞間接着には複数の接着分子が関与していることを明らかにしている²¹⁻²³⁾。また、PBT-HGF間の細胞接着によりHGFが活性化され、炎症性サイトカインの発現が上昇することを報告している⁶⁾。さらに我々は、種々の病変部において特徴的に検出されるCD13陽性Tリンパ球が、炎症歯周組織における特異的な活性化機構の一つと考えられるPBT-HGF間の接着性細胞間相互作用により誘導されることを初めて明らかにするとともに、炎症歯肉組織において実際にCD13陽性Tリンパ球が局在していることを明らかにした。

先にも述べたが、各種疾患の病変部において、細胞表面上に通常は発現していないCD13分子を発現するTリンパ球が存在することが報告されており、このようなCD13陽性Tリンパ球がこれら疾患の発症・成立において何らかの特徴的機能を担っていると考えられる。今回の研究に

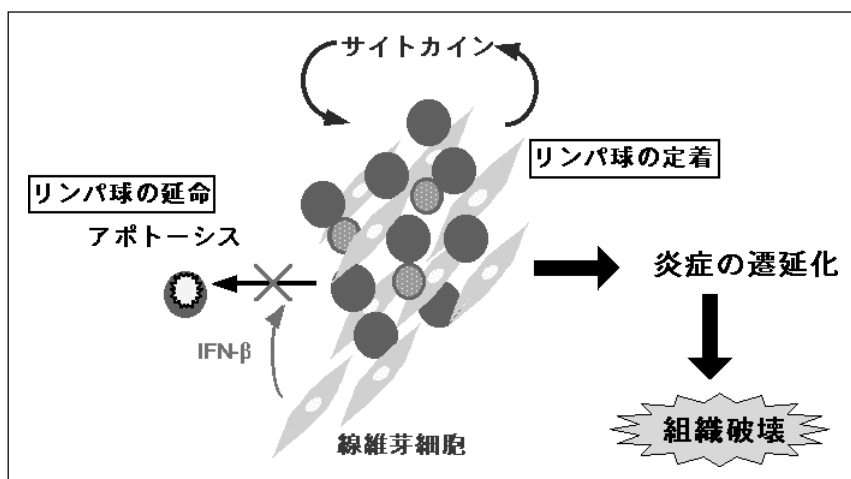


図6 リンパ球とHGFとの接着性細胞間相互作用による炎症巣の病態形成
炎症結合組織においてリンパ球等の浸潤細胞と線維芽細胞が長期にわたり接触すると、リンパ球のアポトーシスが抑制され、炎症巣での定着・集積が促進されることになり、同部の炎症が遷延化し慢性炎症へと移行する。
(文献1)より改変)

よって、Tリンパ球上に発現したCD13分子は実際に酵素活性を有していることが明らかとなったが、CD13陽性PBTがいかなる性状あるいは機能を有する細胞であるかは、未だ十分に解明されてはならず、今後の解析が待たれるところである。

HGFとの細胞接着により誘導されるCD13分子のPBT細胞表面への発現は共培養2時間後より認められた。一方、Werfelらは、白血球をアナフィラトキシンC5aにて刺激することにより、数分以内にその細胞表面上にCD13分子が誘導されるが、その発現誘導は蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサマイドによっても阻害されないことを報告している²⁴⁾。これらのことより、HGFとの接着によりPBT細胞表面上に初期に誘導されるCD13分子は、新たに蛋白が合成された結果ではなく、PBT細胞質内にすでに貯留されていたCD13蛋白がHGFとの接着を介した何らかの細胞内シグナルを機にPBT細胞表面へと発現誘導されたものである可能性が示唆される。また、PBTにおけるCD13 mRNAが、HGFとの共培養後30分から2時間後に発現誘導されることから、PBT細胞表面上に後期に誘導されるCD13分子は、HGFとの接着後、新たに蛋白合成されたものである可能性が考えられる。

PBT-HGF間の接着性細胞間相互作用には複数の接着経路が関与しており、PBT細胞表面上へのCD13分子の発現誘導に関与するシグナル伝達に関しても、単一もしくは複数の接着分子が関与している可能性が考えられる。HGFと接着したPBTを回収する際に、プレートミキサーの振動強度を変化させることによりHGFとの結合力

(avidity)が相対的に弱いPBTと、相対的に強いPBTを各々回収し、CD13分子の発現状況に差異があるか否かを解析したところ、HGFに対して強い結合力を示すPBTは、そうでないPBTに比較してCD13分子の発現が高いことが明らかとなった。このことは、PBT細胞表面上にCD13分子を誘導するには、PBTが単にHGFに接触するのみならず、HGFと強固に接着する必要があることを示唆するものと考えられる。さらに今回の研究で、抗-接着分子抗体によるPBT-HGF間細胞接着阻害がCD13分子発現誘導に及ぼす影響を調べたところ、LFA-1/ICAM-1間の結合を阻害することにより、PBT-HGF間の接着が阻害されることが確認され、それに伴いPBT細胞表面上へのCD13分子の発現も部分的に抑制された。これらの結果より、PBT上のLFA-1を介したシグナルが、CD13分子の発現誘導に関与している可能性、あるいはLFA-1/ICAM-1間の強固な結合を阻害することにより、直接CD13分子の発現に関わる他のシグナル伝達分子間の接触が間接的に減じられている可能性、またそれら複数の接着分子がCD13分子の発現誘導に関与している可能性が推測される。しかしながら、抗-LFA-1抗体と同様にPBT-HGF間の接着を部分的に抑制する抗-VLA β1抗体の添加がCD13分子の発現誘導にほとんど影響を及ぼさないことから、LFA-1分子を介したシグナルが、少なくとも部分的にはCD13分子の発現誘導に関与しているものと考察される。

CD13陽性Tリンパ球は、これまで*in vivo*においてリウマチの炎症関節腔内の滑液中等において検出されることが報告されている。本研究では、炎症歯周組織中にCD13

陽性Tリンパ球が実在しているか否かについても、FCM法を用いて検討した。その結果、末梢血より分離されたPBTでは細胞膜表面にCD13分子が発現していないのに対し、歯肉に浸潤しているTリンパ球に関しては、症例間に差は認めるものの、先のPBTと比し統計学的に有意に高いCD13陽性細胞率を認めた。つまり、同一の個人において末梢血ではCD13分子を発現していないTリンパ球が、歯周病の病巣局所に定着・集積することによりCD13分子を細胞表面上に発現誘導されるようになることが確認された。これらの結果を*in vitro*の実験結果より考察すると、所属リンパ節において抗原特異的にT細胞レセプターを介して活性化されたTリンパ球が、炎症歯周組織において血管外に遊走し、HGFに対して接着することによりさらなる活性化を受け、CD13陽性Tリンパ球が炎症歯肉組織に出現するものと考えられる。

細胞接着の現象を*in vivo*において直接的に証明することは容易ではないが、今回の研究結果は炎症歯周組織において、Tリンパ球-HGF間の細胞間接着が実際に試されていることを強く示唆するデータであると解釈することもできるであろう。これらの結果から考察すると、炎症歯周組織において、Tリンパ球はHGFとの接着性細胞間相互作用を通じて細胞死から免れ、長期にわたり同部で生存することにより、結果的に同組織の炎症反応の遷延化に関与しているのかもしれない(図6)。また、Tリンパ球-HGF間の接着によるCD13分子の発現誘導の制御に関して、LFA-1分子を介したシグナルが少なくとも部分的に関与している可能性が示唆された。現在、Tリンパ球におけるLFA-1を介したシグナル伝達の下流因子として、protein kinase C- β I (PKC- β I)²⁵⁾、phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1)²⁶⁾、focal adhesion kinase (FAK) および proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK-2)²⁷⁾ 等の存在が報告されている。Tリンパ球細胞表面へのCD13分子の発現誘導にどの細胞間シグナル伝達機構が関与しているかを解明することは、興味深い今後の研究課題の一つである。また、CD13分子を発現したTリンパ球の機能や性状のさらなる解明も、検討を要する課題として残されている。CD13陽性Tリンパ球に関するこれらの課題への取り組みが、歯周病の病態形成を理解する上で非常に有益な情報を提供してくれるものと期待される。

文 献

- 1) Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M: Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*, 22: 199-204, 2001.
- 2) Murakami S, Saho T, Shimabukuro Y, Isoda R, Miki Y, Okada H: Very late antigen integrins are involved in the adhesive interaction of lymphoid cells to human gingival fibroblasts. *Immunology*, 79: 425-433, 1993.
- 3) Murakami S, Shimabukuro Y, Saho T, Isoda R, Kameyama K, Yamashita K, Okada H: Evidence for a role of VLA integrins in lymphocyte-human gingival fibroblast adherence. *J Periodont Res*, 28: 494-496, 1993.
- 4) Murakami S, Shimabukuro Y, Miki Y, Saho T, Hino E, Kasai D, Nozaki T, Kusumoto Y, Okada H: Inducible binding of human lymphocytes to hyaluronate via CD44 does not require cytoskeleton association but does require new protein synthesis. *J Immunol*, 152: 467-477, 1994.
- 5) Murakami S, Saho T, Asari A, Hino E, Kasai D, Shimabukuro Y, Okada H: CD44-hyaluronate interaction participates in the adherence of T lymphocytes to gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 75: 1545-1552, 1996.
- 6) Murakami S, Hino E, Shimabukuro Y, Nozaki T, Kusumoto Y, Saho T, Hirano F, Hirano H, Okada H: Direct interaction between gingival fibroblasts and lymphoid cells induces inflammatory cytokine mRNA expression in gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 78: 69-76, 1999.
- 7) Riemann D, Schwachula A, Hentschel M, Langner J: Demonstration of CD13/aminopeptidase N on synovial fluid T cells from patients with different forms of joint effusions. *Immunobiol*, 187: 24-35, 1993.
- 8) Shimizu T, Tani K, Hase K, Ogawa H, Huang L, Shinomiya F, Sone S: CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 46: 2330-2338, 2002.
- 9) Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S, Langner J: Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 104: 48-56, 1994.
- 10) Riemann D, Gohring B, Langner J: Expression of aminopeptidase N/CD13 in tumour-infiltrating lymphocytes from human renal cell carcinoma. *Immunol Lett*, 42: 19-23, 1994.
- 11) Saho T, Kishida T, Hirano H, Hashikawa T, Shimabukuro Y, Murakami S: Induction of CD13 on T lymphocytes by adhesive interaction with gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 82: 893-898, 2003.
- 12) Schaller J, Glander HJ: Flow cytometric analysis of enzymes in live spermatozoa before and after cryostorage. *Andrologia*, 32: 357-364, 2000.

- 13) Ottesen GL, Christensen IJ, Larsen JK, Hansen B, Andrsen JA: Tissue disaggregation for flow cytometric DNA analysis: Comparison of fine-needle aspiration and an automated mechanical procedure. *Cytometry*, 26: 65-68, 1996.
- 14) Yamagami K, Wato M, Fang Y, Kobayashi H, Tanaka A: Application of mechanically-dispersed human gingival tissues to flow cytometry. *Dentistry in Japan*, 36: 113-115, 2000.
- 15) Murakami S, Miyake K, Kincade PW, Hodes RJ: Functional role of CD44 (Pgp-1) on activated B cells. *Immunol Res*, 10: 15-27, 1991.
- 16) Haskard D, Cavender D, Beatty P, Springer T, Ziff M: T lymphocyte adhesion to endothelial cells: mechanisms demonstrated by anti-LFA-1 monoclonal antibodies. *J Immunol*, 137: 2901-2906, 1986.
- 17) Bevilacqua M, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MAJ: Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 9238-9242, 1987.
- 18) Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC: A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature*, 331: 41-46, 1988.
- 19) Dustin ML, Springer TA: Lymphocyte function-associated antigen-1(LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol*, 107: 321-331, 1988.
- 20) Shimizu Y, Newman W, Gopal TV, Horgan KJ, Graber N, Beall LD, van Seventer GA, Shaw S: Four molecular pathways of T cell adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1, and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol*, 113: 1203-1212, 1991.
- 21) Murakami S, Shimabukuro Y, Saho T, Hino E, Kasai D, Hashikawa T, Hirano H, Okada H: Immunoregulatory roles of adhesive interactions between lymphocytes and gingival fibroblasts. *J Periodont Res*, 32: 110-114, 1997.
- 22) Okada H: Phenotypic and functional characterization of peripheral blood T cells in adult periodontitis. *J Periodont Res*, 26: 289-292, 1991.
- 23) Murakami S, Okada H: Lymphocyte-fibroblast interactions. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8: 40-50, 1997.
- 24) Werfel T, Sonntag G, Weber MH, Gotze O: Rapid increases in the membrane expression of neutral endopeptidase (CD10), aminopeptidaseN(CD13), tyrosine phosphatase (CD45), and Fc gamma-RIII (CD16) upon stimulation of human peripheral leukocytes with human C5a. *J Immunol*, 147: 3909-3914, 1991.
- 25) Volkov Y, Long A, McGrath S, Eidhin DN, Kelleher D: Crucial importance of PKC- β I in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells. *Nat Immunol*, 2: 508-514, 2001.
- 26) Kanner SB, Grosmaire LS, Ledbetter JA, Damle NK: β_2 -Integrin LFA-1 signaling through phospholipase C- γ 1 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 7099-7103, 1993.
- 27) Rodriguez-Fernandez JL, Gomez M, Luque A, Hogg N, Sanchez-Madrid F, Cabanas C: The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol Biol Cell*, 10: 1891-1907, 1999.