

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文  
内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍)	江口 貴紀 (神奈川県)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第 412 号
学位授与年月日	平成 25 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Accumulation of invariant NKT cells into inflamed skin in a novel murine model of nickel allergy (新規ニッケルアレルギーモデルマウスを用いた炎症局所における NKT 細胞の発現について) Cellular Immunology impress
論文審査委員	主査 教授 斎藤一郎 副査 教授 里村一人 副査 教授 濱田良樹

## 内容の要旨

### 緒言

近年、金属曝露の機会の増大に伴って金属アレルギー患者の数は増加しており、とくにニッケル(Ni)は、発症頻度が高い原因金属として知られている。

金属アレルギーは IV 型(遅延型)アレルギー反応のひとつであり、病理組織学的所見や *in vitro* の実験で、金属アレルギー患者から分離された T 細胞は特有の T cell receptor (TCR) を持つことが示唆されていることから、T 細胞依存性の反応と考えられている。しかしながら、金属アレルギーにおける特異的な T 細胞の同定や T 細胞による抗原の認識機構など詳細な免疫応答についてはほとんど解明されておらず、ヒトにおける金属アレルギーの臨床病態解明に対して、外挿性のある適切なモデル動物の確立が望まれている。

本研究では、Ni と lipopolysaccharide (LPS) を用いて新規の Ni アレルギーマウスモデルを作成し、アレルギー炎症局所に集積する T 細胞の TCR レパトア、及びサイトカインプロファイルを解析することによって、Ni アレルギー発症に関わる特異的な T 細胞の性状や動態を明らかにすることを目的とした。

### ・材料及び方法

#### 動物

BALB/c、C57BL/6 (雌、6 週齢) (日本クレア) を用いた。これらの動物の扱いは、独立行政法人国立病院機構相模原病院における「実験動物委員会」に認証され、「実験動物における管理と使用に関する指針」に沿って行った。

#### 感作と誘導

感作：10mM NiCl<sub>2</sub>・10 μg/ml LPS を 125 μl ずつ左右の鼠径部に皮内注射を行った。同様の方法

で生理食塩水を注射したものを対照群とした。

誘導：10mM Ni を 25  $\mu$ l ずつ左右の足底部に皮内注射を行った。同様の方法で生理食塩水を注射したものを対照群とした。

#### ① 金属アレルギーモデルマウスの確立

感作と誘導の適切な条件を明らかにするために、様々な条件で感作と誘導を行い、足底部腫脹の経時的変化および、T 細胞浸潤について解析した。足底部の腫脹は誘導後から 24 時間毎に測定をした。T 細胞浸潤については、定量 PCR 法にて足底部における CD3 の mRNA の発現量を測定し、さらに HE 染色による病理組織学的検索や、CD3、CD4、CD8 免疫染色による免疫組織化学的解析を行った。

#### ② TCR レパトア解析

足底部に浸潤した T 細胞の抗原特異性を明らかにするために、TCR レパトアを解析し、各サブファミリーの発現頻度を網羅的に解析した。足底部局所の T 細胞浸潤を最も多く認めた、感作 2 回/誘導 3 回後 7 日目のマウス足底部を検体とした。対照群として、感作と誘導を生理食塩水で行ったマウスの脾臓を用いた。各検体から Total RNA 抽出後、Adaptor-ligation PCR と Microplate hybridization assay を施行し、各 V ファミリーの中で蛍光強度が対照群と比較して有意に高いものを検出した。

#### ③ Complementarity-determining region 3 (CDR3) 領域におけるシークエンス解析

TCR レパトア解析によって、対照群に比べ有意な高発現を認めた V ファミリーにおける CDR3 領域を明らかにするために、シークエンス解析を行った。TA-cloning 法によりプラスミドにクローニングし、塩基配列を解析することにより CDR3 領域シークエンスレベルの発現頻度を解析し、クロノタイピングを行った。

③の実験により NKT 細胞の関与の可能性が示唆されたため以下の実験を行った。

#### ④ NKT 細胞関連分子及びサイトカインの解析

NKT 細胞が誘導される経過や、病態惹起に関与している因子を明らかにするため、NKT 細胞関連分子である V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18、NKG2D、CD1d、及び CD161c と NKT 細胞関連サイトカインである Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2)、Th2 サイトカイン (IL-4、IL-5、IL-10) 及び細胞障害性因子 (FasL、perforin、granzymeA、granzymeB) の mRNA の発現量を感作 2 回/誘導 3 回後 1 日目、3 日目及び、7 日目のマウス足底部を検体とし、定量 PCR 法にて解析した。同じ回数感作、誘導を生理食塩水でおこなったマウス足底部を対照群とした。

#### ⑤ Ni 存在下での NKT 細胞の FACS を用いた機能的解析

NKT 細胞が Ni 存在下で活性化されることを明らかにするために、マウスの脾臓及び肝臓から抽出した NKT 細胞を、 $\alpha$ -GalCel1 及び様々な濃度で振り分けた NiCl<sub>2</sub> の下で、IFN- $\gamma$  の分泌量をフローサイトメトリーにて解析した。

#### 統計解析

すべての実験は、それぞれの実験群を n=7 とし、Student's unpaired t-test (Stat View 5.0) を用いて解析した。P<0.05 で有意差ありとした。

#### • 結果

① 感作 2 回/誘導 3 回の条件における足底部の腫脹が最大であった。また、CD3 の mRNA 発現量は、感作 2 回/誘導 3 回の条件下で、対照群に比べて誘導後 3 日目から有意に上昇し 7 日目で

最大となった。他の条件では対照群と比較して有意な変化は無かった。CD3 の mRNA 発現量が最大であった感作 2 回/誘導 3 回後 7 日目の足底部を HE 染色による病理組織学的解析ならびに、CD3、CD4、CD8 免疫染色による免疫組織化学的解析に供したところ、上皮基底層周囲に CD4、CD8 共に陰性の T 細胞の浸潤を認めた。

②  $V\alpha 14-1$  及び、 $V\beta 8-2$  の発現頻度が対照群と比較して有意に高かった。

③  $V\alpha 14-1$  においては全ての個体で高頻度に invariant なアミノ酸配列である  $V\alpha 14J\alpha 18$  が検出された。 $V\beta 8-2$  では全ての個体で全く同じアミノ酸配列は検出できなかったが、 $J\beta 2.7$  が高頻度に検出された。これは BALB/c も C57BL/6 も同じ結果であった。

④ NKT 細胞関連分子、Th1 サイトカイン及び、細胞障害性因子は誘導後 3 日目で対照群と比較して有意に上昇し 7 日目で最大となった。一方 Th2 サイトカインは対照群と比較して有意な変化は認めなかった。

⑤ 10mM の NiCl<sub>2</sub> 存在下では NiCl<sub>2</sub> 非存在下と比較して有意に IFN- $\gamma$  の上昇を認めた。

### 考察とまとめ

本研究において、ヒト金属アレルギーの局所病理組織学的に類似した反応を呈する Ni アレルギーマウスモデルを作成した。その確立には、感作 2 回/誘導 3 回が適切な条件であると考えられた。

近年、ヒトのアレルギー性接触性皮膚炎において NKT 細胞の関与が示唆されているが、本研究においても Ni によって誘導された T 細胞は NKT 細胞であると考えられた。これらの細胞は、誘導後期に局所に集積し、Th1 偏性で細胞障害性因子を誘導していることが示唆された。また、Ni によって NKT 細胞が活性化されることも確認できた。

以上より、Ni アレルギーの病態形成においては、局所に誘導された NKT 細胞が重要な役割りを演じていると考えられた。