

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍)	重 松 宏 昭 (埼玉県)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 419 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 14 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 metal-specific T cells in inflamed skin in a novel murine model of Chromium-induced allergic contact dermatitis (新規クロムアレルギー性皮膚炎マウスモデルを用いた炎症局所における金属特異的 T 細胞の集積について) PLOS ONE impress
論 文 審 査 委 員	主査 教授 里村一人 副査 教授 斎藤一郎 副査 教授 濱田良樹

内 容 の 要 旨

【諸言】

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数は増加しており、特にクロム(Cr)による皮膚炎は、Cr がセメントに含有されている影響で、職業性皮膚炎の代表的原因金属として報告されている。

Cr が皮膚へ暴露されることにより、刺激性あるいはアレルギー性皮膚炎を引き起こすことが知られているが、その病態発症機序や両者間における免疫応答の相違については不明な点が多い。本研究では、Cr を用いたアレルギー性皮膚炎発症マウスモデルを作製し、炎症局所に浸潤する T 細胞の T cell receptor (TCR) およびサイトカインプロファイルを解析することで、Cr アレルギーの病態形成に関わる T 細胞の性状や動態を明らかにすることを目的とした。加えて、刺激性皮膚炎発症マウスモデルも作製し、同様の検討を試みた。

【材料および方法】

1) マウスモデルの作製

実験動物としてBALB/c (6週齢・雌、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」に承認され、「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。

アレルギー性皮膚炎発症マウスモデルとして、BALB/c 5匹の鼠径部に $\text{CrCl}_2 \cdot \text{Lipopolysaccharide}$ 混合溶液を注射することで感作し、足底部への CrCl_2 溶液の皮内注射で誘導を行った。刺激性皮膚炎発症マウスモデルとして、感作をせずに足底部への CrCl_2 溶液の皮内注射を行ったBALB/c 5匹を用いた。対照として感作後の誘導時に生理食塩水を足底部に皮内注射したBALB/c 5匹を用いた。足底部への注射から1, 3, 7, 14日後の腫脹を測定した。

2) 定量PCR解析

足底部への注射から1, 3, 7日後の同組織よりTotal RNAを抽出しcDNAを合成, T細胞マーカー (CD3, CD4, CD8), 各種炎症性メディエーター (IL-1 β , HDC), ケモカイン (CXCL10, CXCR3), Th1サイトカイン (IFN- γ , TNF- α), Th2サイトカイン (IL-4, IL-5), TNF- α レセプター (TNF-R1)および細胞傷害性因子 (Fas, FasL, Perforin, GranzymeA, GranzymeB)の発現量を測定した.

3) 病理組織学的検索

足底部への注射から1, 3, 7日後の同組織を, HE染色標本にて病理組織学的検索を行うと共に, T細胞マーカー (CD3, CD4, CD8)ならびに成熟マクロファージマーカー (F4/80)の免疫組織化学的解析を行った.

4) TCR レパトア解析

足底部への注射から1, 3, 7日後の同組織中に存在するT細胞の抗原特異性を明らかにするためにTCRレパトア解析を行い, 各Vファミリーの発現頻度を網羅的に解析した. さらにTCRレパトア解析によって, 対照群と比べ有意な高発現を認めたVファミリーのComplementarity-determining region 3 (CDR3)領域における塩基配列を明らかにするために, 各TCR遺伝子をTA-cloning法によりプラスミドにクローニングし, CEQ8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter)にてシークエンス解析を行った.

統計解析

Student's unpaired t-test (Stat View 5.0)を用いて解析し, $P<0.05$ で有意差ありとした.

【結果】

3群とも足底部注射後1日目で腫脹は最大となり, その後7日目にかけて軽減した. 注射後1日目の腫脹は, アレルギー性皮膚炎マウスモデルおよび刺激性皮膚炎マウスモデルともに同程度であったが, 感作を行ったアレルギー性皮膚炎マウスモデルでは腫脹が長期に及んだ. 対照群の腫脹は, 実験群と比較し極めて軽度であった.

定量PCR解析において, アレルギー性皮膚炎マウスモデルでCD3, CD4, CXCR3, Th1サイトカイン, TNF-R1およびFasLの遺伝子発現量は, 対照群に比べて足底部注射後1日目から有意に上昇し7日目で最大となった. 感作の有無に関わらずアレルギー性皮膚炎マウスモデル, 刺激性皮膚炎マウスモデルともに, 注射後1日目にIL-1 β , HDC, CXCL10の高発現を認めた.

免疫組織化学的解析では, Crで感作と誘導を行ったアレルギー性皮膚炎マウスモデルにおいて, ヒトアレルギー性皮膚炎の特徴的所見であるケラチノサイトの海綿状浮腫や基底細胞層の液状変性と上皮内へのCD4陽性T細胞の浸潤を認めた. CD4陽性T細胞の浸潤は, 感作後7日目で最大となった. 感作の有無に関わらず, Crを足底部に注射した群では, 注射後1日目においてF4/80陽性細胞を上皮下組織に認めた. 対照群では上皮内やその周囲へのT細胞およびF4/80陽性細胞の浸潤は認められなかった.

浸潤していたT細胞に対してTCRレパトア解析を行ったところ, 例外なくTCR VA14Ja18/VB8-2およびTCR VA11-1/VB14-1を有意に高発現しているT細胞が認められた. さらに, TCR VA14Ja18/VB8-2を有意に高発現しているT細胞が炎症初期に認められ, TCR VA11-1/VB14-1を有意に高発現しているT細胞が炎症後期に認められた.

【考察とまとめ】

本研究において、刺激性皮膚炎マウスモデルとアレルギー性皮膚炎マウスモデルを作製した。

刺激性皮膚炎マウスモデルとアレルギー性皮膚炎マウスモデルは、足底部注射後 1 日目の腫脹は同程度であったが、刺激性皮膚炎マウスモデルにおいて、T 細胞の浸潤は認められず、F4/80 陽性細胞の浸潤と活性化を認めた。これは、金属注射による直接的な刺激と金属抗原を認識したマクロファージを中心とした自然免疫が惹起されていると考えられた。一方、Cr で感作誘導したアレルギー性皮膚炎マウスモデルにおいては、ヒト金属アレルギーの病態に類似した海綿状浮腫の形成や、上皮内への CD4 陽性 T 細胞浸潤を認めたことから、本マウスモデルが金属アレルギーマウスモデルとして有用であると考えられた。

アレルギー性皮膚炎マウスモデルにおいて、足底部への CD4 陽性 T 細胞の浸潤は金属注射 7 日目で最大となり、Th1/Th2 バランスは Th1 偏性であり細胞障害性因子によって組織障害を引き起こしていると考えられた。TCR レパトア解析により、炎症初期から TCR VA14Ja18/VB8-2 を有する NKT 細胞が誘導され、後期にかけて TCR VA11-1/VB14-1 を有する T 細胞が浸潤していた。

本研究結果から Cr アレルギー炎症局所では、NKT 細胞によって TCR VA11-1/VB14-1 を有する抗原特異的な T 細胞が誘導されて免疫応答が行われていることが明らかとなった。また我々の先行研究では、Ni アレルギー発症に NKT 細胞の関与が明らかになっており、Cr と Ni の交差反応においても NKT 細胞の関与が示唆された。