

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	シャッキヤ スプリヤ
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 523 号
学位授与年月日	令和5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	Effects of polyphenols in non-centrifugal cane sugar on saliva secretion; <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> experiments and a randomized controlled trial (非遠心分離サトウキビ由来のポリフェノールが唾液分泌促進に及ぼす影響とそのメカニズム) Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition DOI: https://doi.org/10.3164/jcbn.22-114
論 文 審 査 委 員	主査 教授 山 越 康 雄 副査 教授 下 田 信 治 副査 教授 大 久 保 力 廣

内 容 の 要 旨

【緒 言】

非遠心分離サトウキビ糖 (NCS) は、一般に「黒糖」と呼ばれる食品である。NCS は遠心分離による精製工程を経ていないため、精製糖よりもミネラル、ビタミン、ポリフェノールなどを多く含み、抗酸化作用や抗癌作用もつことが知られる。特に沖縄産の NCS には、サボナリン (Sap)、スカフトシド (Sch)、イソスカフトシド (ISch) などのポリフェノールが他国の NCS と比較して多く含まれていることが報告されている。しかし、これらの NCS ポリフェノールが唾液分泌に及ぼす影響については知見が限られており、本研究ではこれらが唾液分泌を促進する可能性について検討した。

【方 法】

NCS ポリフェノール (Sap, Sch, ISch) の唾液分泌に対する効果およびメカニズムを評価するために、*in vitro* および *in vivo* の実験を行った。 *In vitro* 試験としてはまず、ヒト唾液腺由来不死化細胞株を用いて、トリパンブルー色素排除法による細胞毒性試験と、細胞増殖活性試験を行った。次に急性単離したマウス顎下腺 (mSMG) 細胞を用い、細胞内カルシウム応答、ATP 産生、細胞内活性酸素種 (ROS) 発生に対する NCS ポリフェノールの影響を検討した。続いて、NCS ポリフェノールによる mSMG における水チャネルタンパク質であるアクアポリン 5 (AQP5) の局在を、細胞膜マーカーである E-cadherin との免疫蛍光二重染色法とウェスタンブロットにより評価した。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をポリフェノールで刺激した後、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) のリン酸化レベルをウェスタンブロットで、一酸化窒素 (NO) 産生量をフローサイトメーターで検討した。 *In vivo* 試験として、6～13 週齢の C57BL/6N マウスに NCS ポリフェノール 8 mg/kg を投与の後、血流量をレーザー流量計で 20 分間測定した。加えて、マウスにピロカルピン 0.5 mg/kg および NCS ポリフェノール 8 mg/kg を同時投与の後、唾液分泌量を 30 分間測定し、コントロールと比較した。また、軽度の口渇感を有する健常者を対象としたプラセボ対照無作為化二重盲検並行群間比較試験を実施した (倫理審査承認番号 KSG22C1, UMIN-CTR 登録番号: UMIN000048129)。参加者は NCS 群 (n=15) とプラセボ群 (n=15) に分けられ、NCS を含有または含有しない飴を 1 日 4 個、4 週間継続して摂取し、介入前後の主要評価項目として唾液分泌量を測定した。

【結 果】

In vitro 試験において、NCS ポリフェノールは細胞毒性と細胞増殖活性への影響は軽微で、mSMG 細胞に対してカルバコールによるムスカリン受容体刺激が誘導する細胞内カルシウム応答を増強した。また、Sch および ISch は、mSMG 細胞

の ATP 産生 (counts/sec) を有意に促進した (Sch: 31928 ± 3520.09 , $p=0.043$, ISch: 30411 ± 1627.7 , $p=0.043$). 細胞内 ROS の発生を示す DCFH-DA の蛍光強度 (counts) は, mSMG 細胞を 1 mM H_2O_2 で処理すると増加したが, NCS ポリフェノールを添加した培養系では細胞内 ROS の発生がコントロール (93099.67 ± 11708.88) と比較して有意に抑制された (Sap: 64648.33 ± 2961.97 , $p=0.006$, Sch: 62960.00 ± 963.13 , $p=0.00005$, ISch: 75746.67 ± 3925.25 , $p=0.00012$). NCS ポリフェノールを作用させた mSMG の AQP5 と E-cadherin の共局在の程度を示した相関係数は, Sch (0.38 ± 0.14 , $p=0.003$) と, ISch (0.34 ± 0.36 , $p=0.029$) でありコントロール (0.21 ± 0.13) と比較し有意に増加した. そして, NCS ポリフェノールを作用させた mSMG 細胞において, 総タンパク質に対する AQP5 タンパク質の相対バンド強度は, 細胞質ではコントロールと比較して小さく, 細胞膜ではコントロールと比較して増大する傾向を示した. HUVEC を用いたウエスタンブロット解析では, eNOS タンパク質の発現量に有意差は認めなかった. しかし, リン酸化 eNOS (p-eNOS) の総タンパク質量に対する相対バンド強度は, Sap (77601.9 ± 14345.2 , $p=0.019$), ISch (63850.9 ± 5012.7 , $p=0.011$) であり, コントロール (51767.6 ± 4335.8) より有意に増加した. フローサイトメーターによる解析では, Sap と ISch の存在下で, NO 産生が促進された細胞の割合が, コントロール (12.8%) よりも増加することが示された (Sap: 20.7%, ISch: 14.3%). *In vivo* 試験では, Sap と ISch はマウスの血流量 (ml/min) をコントロール (0.989 ± 0.066) と比較し有意に増加させ (Sap: 1.13 ± 0.14 , $p=0.040$, ISch: 1.25 ± 0.18 , $p=0.0099$), Sap はピロカルピン誘導性の唾液分泌 ($\mu\text{l/g}$) をコントロール (2.78 ± 1.74) より有意に増強させた (Sap: 4.24 ± 1.81 , $p=0.031$). さらに, 臨床試験の結果, NCS は単回投与の前後で有意に唾液分泌を増加させ, 即時的な唾液分泌促進効果があることが示唆された (投与前: 4.440 ± 1.42752 , 投与後: 4.915 ± 1.45844 ; $p=0.003$).

【考 察】

ムスカリン受容体刺激による細胞内カルシウム応答は唾液分泌の誘導に不可欠な初期シグナルである. NCS ポリフェノールは唾液腺細胞に対して, ムスカリン受容体アゴニストであるカルバコールが誘導する細胞内カルシウム応答を増強した. また, NCS ポリフェノールのうち Sch および ISch は, 唾液腺細胞内でプリン作動性受容体や Na^+/K^+ ポンプの活性化により唾液分泌に関与する ATP 産生を促進した. ROS による酸化ストレスは, 唾液分泌障害を起こすことが知られるが, NCS ポリフェノールは H_2O_2 による ROS の発生を有意に抑制した. 唾液分泌を制御する AQP5 の細胞膜上への移行を免疫蛍光二重染色法により評価した結果, Sch と ISch はコントロールと比較して有意に AQP5 の細胞膜上への移行を促進した. この現象はウエスタンブロットによる解析でも裏付けられた. そして, NCS ポリフェノールは血管内皮細胞に対し eNOS のリン酸化を介して血流促進に関与する NO の産生を促進し, 血流の増加による唾液分泌促進作用を持つことが推察された. さらに, *in vivo* 試験において NCS ポリフェノールはマウスの血流と唾液分泌を有意に増加させた. 加えて, 臨床試験によりヒトにおいてもその効果が実証された.

【結 語】

本研究において, NCS ポリフェノールは唾液腺に複数の作用機序で唾液分泌を促進することが示された. これは NCS ポリフェノールが唾液分泌促進および抗酸化作用により, 酸化ストレスなどによって引き起こされる唾液流量の減少を改善し得ることを示唆するものである.

審査の結果の要旨

非遠心分離サトウキビ糖 (NCS) は, 精製糖に比べてポリフェノール (PPh) を豊富に含み, 抗酸化作用や抗癌作用をもつことが知られている. 本研究では, 唾液分泌に及ぼす NCS-PPh の影響について調べることを目的とした.

In vitro 実験では, ヒト唾液腺由来不死化細胞株 (NS-SV-AC), マウス顎下腺細胞 (mSMG), ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて 3 種の NCS-PPh: サボナリン (Sap), スカフトシド (Sch), イソスカフトシド (ISch) に対する実験を行った. ① NS-SV-AC に対しては, 細胞毒性および細胞増殖活性を, ② mSMG に対しては, 細胞内 Ca の応答, ATP の産生, 細胞内活性酸素種 (ROS) の発生, アクアポリン 5 (AQP5) の細胞内局在を, ③ HUVEC に対しては内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) のリン酸化レベル (p-eNOS) と一酸化窒素 (NO) の産生量を調べた. *In vivo* 実験では, NCS-PPh 単独またはピロカルピンと NCS-PPh を併用投与したマウスに対する血流量および唾液分泌量を測定した. また, ③軽度の口渴感を有する健常者を対象として NCS 含有または含有しないキャンディーを摂取させた無作為化プラセボ対照二重盲検比較試験を行い, 唾液分泌量を評価した.

In vitro 実験では, NS-SV-AC に対する細胞毒性および細胞増殖活性への影響は, いずれの NCS-PPh 群でも認められなかった. mSMG 内の Ca 応答に対しては, いずれの NCS-PPh 群も応答性を増強させたが, ATP 産生に対しては, Sch 群および

ISch 群で有意に促進した。また、ROS の発生量は、いずれの NCS-PPh 群において抑制された。さらに AQP5 の細胞内局在は、Sch 群および ISch 群で有意に増加した。HUVEC に対する p-eNOS レベルは Sap 群および ISch 群で有意に増加した。

In vivo 実験では、Sap 群と ISch 群は血流量を、さらに Sap 群はピロカルピン誘導性の唾液分泌量を有意に増加させた。また、臨床試験において、NCS は単回投与の前後で唾液分泌量を有意に増加させ、即時的な唾液分泌促進効果があることが判明した。

以上より、本研究では NCS-PPh が唾液分泌を促進することが明確に示され、酸化ストレスによる唾液流量の減少の改善や唾液分泌の減少を伴う全身疾患や感染症に対する医療応用に大いに貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。

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 宮 川 友 里
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号 甲 第 524 号
学位授与年月日 令和 5 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 Response of TGF- β isoforms in epithelial-mesenchymal transition of enamel epithelial cells
(エナメル上皮細胞の上皮間葉転換に及ぼす TGF- β アイソフォームの応答性)
Archives of Oral Biology doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105540.
論 文 審 査 委 員 主査 教授 五 味 一 博
副査 教授 二 藤 彰 副査 教授 朝 田 芳 信

内 容 の 要 旨

【緒 言】

トランスフォーミング成長因子ベータ (TGF- β) は、細胞増殖、細胞分化、細胞死に影響を及ぼすサイトカインである。哺乳類の TGF- β には 3 つの主要なアイソフォームである TGF- β 1, 2, 3 が存在する。我々はこれまで、エナメル質形成中の TGF- β アイソフォームが、遺伝子発現、アポトーシス、およびエンドサイトーシスに対して異なる活性を示すことを見出した。TGF- β シグナル伝達は、I 型 (ALK5)/II 型 (TGFBR2) 受容体からなる複合体、および補助受容体 (ベータグリカン/エンドグリン) によって媒介されている。共通の受容体を介してシグナルを細胞内に伝達することが知られるアイソフォームが、異なる反応を示すことは大変興味深く、その伝達経路を調べることはエナメル質形成機構を解明するために必要だと考えた。

本研究では特に、エナメル上皮細胞における上皮間葉転換 (EMT) に及ぼす TGF- β アイソフォームの応答性の相違について調べることを目的とした。

【方 法】

マウスエナメル上皮細胞株 (mHAT9d) を各 TGF- β アイソフォーム (1 ng/ml) 添加または未添加の, DMEM/F12 培地を用いて培養し, 下記の実験を行った。

・上皮間葉転換 (EMT) に伴う細胞形態の変化の観察

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した後, 0.1% Triton-X100 に置き換え, 23°C, 30 分間静置した。その後, ローダミン/ファロイジン (RP) (100 nM) を用いたアクチン染色および 4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) (2 μ g/ml) を用いた核染色を行い, 蛍光顕微鏡にて細胞形態の観察を行った。

・スクラッチアッセイ

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞の一部をピペットチップにてスクラッチした。スクラッチ直後及び 55 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した後, 0.1% Triton-X100 に置き換え, 23°C, 30 分間静置した。その後, RP 染色を行い, スクラッチ領域に遊走した細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

・定量 PCR (qPCR)

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞から, High Pure RNA Isolation Kit を使用してトータル RNA を抽出した。SYBR Green 法を用いて, Light Cycler 96 システム上で EMT 関連遺伝子及び, TGF- β 受容体遺伝子の発現量を qPCR に

て解析した.

- ・次世代シーケンシング (NGS)

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞から抽出したトータル RNA を用いて, 次世代シーケンサーにてトランスクリプトーム解析を行った.

- ・EMT に関連する TGF- β シグナル経路の阻害実験

mHAT9d 細胞を 23 時間培養した後, ALK5 キナーゼ阻害剤 (SB431542), Smad3 のリン酸化阻害剤 (SIS3), ERK1/2 阻害剤 (PD98059), p38MAP キナーゼ阻害剤 (SB203580), PI3 キナーゼ阻害剤 (Wortmannin) または Rho キナーゼ阻害剤 (Y-27632) をそれぞれ 2 μ M の濃度で培地に加えた. さらに 1 時間培養後, TGF- β 1 を添加し, 10 日間培養した. 細胞の形態変化は, RP 染色後, 蛍光顕微鏡で観察した.

- ・TGF- β アイソフォームを添加した mHAT9d 細胞のデュアルルシフェラーゼアッセイ

mHAT9d 細胞を 24 時間培養し, TGF- β 応答性 PAI-1 プロモーター領域を持つ p3TP-lux と, 内部標準である pRL-SV 40 を Lipofectamine 2000 を使用して mHAT9d 細胞にトランスフェクションした. トランスフェクション 3 時間後に各 TGF- β アイソフォームを添加し, さらに 24 時間培養した. ルシフェラーゼ活性の測定は Minilumat Lb 9506 を用いて行った.

- ・リン酸化 Smad3 のウェスタンブロット解析による TGF- β シグナルの活性化の測定

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞から RIPA バッファーを用いてタンパク質を抽出し, ウェスタンブロットティング用サンプルを調製した. 電気泳動は, 5 ~ 20% の ePAGEL ミニゲルを使用して行った. ゲルを Invitrolon ポリフッ化ビニリデン膜に転写し, 抗リン酸化 Smad3 モノクローナル抗体 (1 : 2000, 4°C, 20 時間) またはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 抗体 (1 : 1000, 4°C, 20 時間) を一次抗体として使用した. 抗リン酸化 Smad3 抗体に対してヤギ抗ウサギ IgG (H+L)-HRP 結合抗体 (1 : 2000, 23°C, 1 時間) を, GAPDH 抗体に対してウサギ抗ヤギ IgG (H+L)-HRP 結合抗体 (1 : 2000, 23°C, 1 時間) をそれぞれ二次抗体として使用した. ECL Prime を使用した化学発光によりバンドを検出し, ImageJ ソフトウェアを用いて, GAPDH のバンド強度でリン酸化 Smad3 のバンド強度を標準化し, 定量化した.

- ・TGF- β アイソフォームの結合親和性に起因する TGF- β 受容体遺伝子発現の解析 (免疫蛍光染色)

TGF- β 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 23°C, 15 分間固定し, ブロッキング溶液 (5% 正常ヤギ血清) で 23°C, 1 時間インキュベートした. 次に, 抗エンドグリン抗体を一次抗体として 1 : 2000 希釈で使用し 4°C で一晩インキュベートした後, 二次抗体である Alexa FluorTM488 ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体を 1 : 500 希釈で, 遮光下 23°C で 1 時間インキュベートした. 細胞核は, DAPI (2 μ g/ml) を使用して対比染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した. 重ね合わせ画像は, ImageJ ソフトウェアを使用して作成した.

- ・統計分析

qPCR およびルシフェラーゼアッセイのすべての値は, 平均値 $\pm$ 平均値の標準誤差 (SEM) として表示した. 統計的有意差検定は, Steel-Dwass 検定を使用した.

【結 果】

・TGF- β 1 または TGF- β 3 添加後, 10 日間培養した mHAT9d 細胞では, EMT によって上皮系特有の敷石状の形態から間葉系特有の突起状に形態変化した細胞が観察されたが, TGF- β 2 添加群では観察されなかった.

- ・スクラッチアッセイより, TGF- β 1 または TGF- β 3 添加後に形態が変化した細胞が遊走能を持っていることが示された.

・qPCR より, 上皮系マーカーである E-カドヘリンの遺伝子発現は TGF- β 未添加群であるコントロールおよび TGF- β 2 添加群でより高く, 間葉系マーカーである N-カドヘリンおよびビメンチンの遺伝子発現は, TGF- β 1 添加群および TGF- β 3 添加群で高い値を示した.

- ・NGS 解析では, EMT に関連する TGF- β シグナル伝達経路として, ERK 経路と Rho 経路が候補として挙げられた.

・阻害剤実験より, TGF- β 1 を添加した mHAT9d 細胞では, PD98059 添加群でも EMT が生じたが, Y-27632 添加群および SB431542 添加群では EMT が抑制された.

・各 TGF- β アイソフォームによる PAI-1 遺伝子プロモーター活性は, TGF- β の濃度に依存して増加することがわかった. 濃度 1 ng/ml では, TGF- β 1 または TGF- β 3 添加群のルシフェラーゼ活性は, TGF- β 2 添加群よりも高かった.

・抗リン酸化 Smad3 抗体を用いたウェスタンブロット解析により, TGF- β による Smad3 のリン酸化は TGF- β 2 添加群よりも TGF- β 1 または TGF- β 3 添加群で顕著であった.

・qPCRによるTGF- β 受容体発現の解析では、TGF- β アイソフォームそれぞれの添加後にI型受容体の遺伝子発現が減少する傾向が見られた。一方、II型受容体の遺伝子発現は、TGF- β 1またはTGF- β 3添加群で有意に増加したが、TGF- β 2添加群ではコントロールとほぼ同等であった。さらに、TGF- β シグナル伝達の補助受容体である、ベータグリカンの遺伝子発現は各TGF- β アイソフォーム添加後に減少した。対照的に、エンドグリンの遺伝子発現はTGF- β 1または β 3添加群で増加したが、TGF- β 2添加群には変化は認められなかった。免疫蛍光染色におけるエンドグリンの染色強度は、TGF- β 1またはTGF- β 3添加群で強く、さらに同じ群内においてはEMTにより細胞形態の変化が生じた細胞ほど強かった。

【考 察】

TGF- β アイソフォームを添加したエナメル上皮細胞においてTGF- β 1または β 3添加群のみにEMTが認められた。EMTは主にRhoシグナル伝達経路を介して生じ、TGF- β アイソフォーム間の応答性の違いは、TGF- β 受容体に対するエンドグリンを介した結合親和性に起因するものであることが示唆された。

審査の結果の要旨

トランスフォーミング成長因子ベータ（TGF- β ）は、細胞増殖、細胞分化、細胞死に影響を及ぼすサイトカインであり、そのアイソフォームにより作用が異なる。エナメル質形成においてもTGF- β アイソフォームが異なる活性を示すことが示されている。本研究ではエナメル上皮細胞における上皮間葉転換（EMT）に及ぼすTGF- β アイソフォームの影響についてマウスエナメル上皮細胞株（mHAT9d）を用いて調べた。

EMTに伴う細胞形態の変化を調べたところTGF- β 1、 β 3添加によりmHAT9dが上皮特有の敷石状の形態から間葉系特有の突起状に変化した。TGF- β 2添加群では観察されなかった。スクラッチアッセイではTGF- β 1、 β 3において遊走能が認められたがTGF- β 2では認められなかった。定量PCR（qPCR）では上皮系マーカーであるE-カドヘリンの遺伝子発現はTGF- β 未添加群およびTGF- β 2群で高く、間葉系マーカーであるN-カドヘリンおよびビメンチンの遺伝子発現はTGF- β 1、 β 3群で高い値を示した。TGF- β シグナル経路の阻害実験ではTGF- β 1群にERK1/2阻害剤（PD98059）添加してもEMTが認められたが、Rhoキナーゼ阻害剤（Y-27632）添加するとEMTの抑制が認められた。リン酸化Smad3のウェスタンブロット解析ではTGF- β によるSmad3のリン酸化はTGF- β 2群よりもTGF- β 1、 β 3群で顕著であった。qPCRによるTGF- β 受容体発現の解析では補助受容体であるエンドグリンの遺伝子発現がTGF- β 1、 β 3で増加したがTGF- β 2では変化は認められなかった。免疫蛍光染色におけるエンドグリンの染色強度はTGF- β 1、 β 3群で強く、特にEMTを生じた細胞ほど強かった。

以上の結果より、TGF- β 1、 β 3群のみにEMTが生じた。EMTはRhoキナーゼ阻害剤により阻害されることからRhoシグナル伝達経路を介して生じると考えられた。TGF- β アイソフォーム間の応答性の違いはTGF- β 受容体に対するエンドグリンを介した結合親和性に起因するものであることが示唆された。

本研究における結果は、エナメル質の形成メカニズムを知る上で重要な基礎的データを示しており有用な研究であると考ええる。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。

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	田 中 健
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 525 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 31 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	Intraperitoneal injection of Nrf2 activator inhibited calvarial bone destruction in mice (Nrf2 活性化剤全身投与による局所的骨吸収の人為的制御) Dent Oral Maxillofac Res, 2021 doi: 10.15761/DOMR.1000375
論 文 審 査 委 員	主査 教授 二 藤 彰 副査 教授 奥 村 敏 副査 教授 友 成 博

内 容 の 要 旨

【緒 言】

歯周病などの骨破壊性疾患は、破骨細胞による過剰な骨吸収が特徴である。破骨細胞の分化・活性化は主に Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand (RANKL) によって制御されており、その細胞内シグナル伝達に活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) が利用されている。我々は以前に、抗酸化酵素発現制御因子である Nuclear-factor E2-related Factor 2 (Nrf2) の局所活性化により破骨細胞分化を抑制し骨破壊を阻止できることを報告した (JBC 2013)。

本研究課題では、Nrf2 活性化剤を全身投与した際、破骨細胞の分化を抑制し、骨破壊を阻止できると仮説を立て、その検証を細胞培養実験と動物実験を用いて行った。

【資料および方法】

In vitro において、まずマウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 cell (RAW cell) 培養実験系を用いて各抗酸化剤の Nrf2 活性化能の有無による破骨細胞分化抑制能を比較した。96 well plate に RAW cell を plating (10^3 cells/well) し組換え RANKL (100 ng/ml) および各抗酸化剤 [Catechin (100 μ M), Epigallocatechin-Gallate (EGCG, 10 μ M), Sulforaphane (SFN, 10 μ M), Vitamin C (50 μ g/ml)] の存在下 / 非存在下で培養後、酸性ホスファターゼキットを用いて、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。暗赤色の多核細胞 (3 核以上) を TRAP 陽性多核細胞、すなわち破骨細胞として計測した。また、RAW cell に各抗酸化剤を添加し、抗酸化酵素発現解析およびレポーターアッセイを行った。抗酸化酵素発現解析では、RAW cell に各抗酸化剤を添加培養後 RNA を抽出し real-time RT-PCR 法にて抗酸化酵素群 [Heme Oxygenase 1 (HO-1), γ -Glutamyl Cysteine Synthetase (GCS)] の発現解析を行った。レポーターアッセイは RAW cell に Nrf2 レポータープラスミドを遺伝子導入した後に各抗酸化剤を添加培養後、発光基質を含む細胞溶解液を調整し、Synergy HTX Multi-Mode plate reader で化学発光強度を計測した。次に、*in vivo* においてマウス頭蓋冠での Lipopolysaccharide (LPS) 誘発骨破壊実験 (動物実験承認番号: 28A087) を行った。7 週齢 BALB/C 雄性マウス 25 匹を 5 匹ずつ 5 群にランダムに振り分けた (コントロール群, LPS+PBS 群, LPS+SFN 群, LPS+Catechin 群, LPS+EGCG 群)。コントロール群には頭蓋冠の正中線部へ Phosphate-Buffered Saline (PBS) 注射を行い、その他 4 群には 1, 3, 5, 7, 9 日目に頭蓋冠の正中部へ LPS を繰り返し注射した。それぞれ抗酸化剤または PBS を 1, 3, 5, 7, 9 日目に腹腔内注射した。11 日目に屠殺、4% パラホルムアルデヒド PBS 溶液で浸漬固定後、軟部組織を頭蓋骨から剥離し、MicroCT にて骨破壊の程度を比較した。

【結 果】

破骨細胞形成抑制試験において、SFN および EGCG は強力に破骨細胞形成を抑制したが、Catechin や Vitamin C では弱く破骨細胞形成を抑制した。抗酸化酵素発現解析では、SFN および EGCG は強力に HO-1 と GCS の発現量を増加させたが、Catechin や Vitamin C では抗酸化酵素発現誘導は弱かった。レポーターアッセイでは、SFN および EGCG によるレポーター遺伝子の強い発現誘導、すなわち Nrf2 転写活性の増加が見られたが、Catechin や Vitamin C ではレポーター遺伝子の発現誘導は弱かった。LPS 誘発骨破壊実験において、SFN および EGCG の腹腔内投与は LPS による骨破壊を強力に抑制したが、Catechin では骨破壊の抑制がほとんどみられなかった。

【考 察】

本研究では、各試薬の Nrf2 活性化能と破骨細胞分化阻止能との関係を調べた。培養系で見られた破骨細胞分化阻止能は Nrf2 活性化能と強い相関を示し、SFN、EGCG は破骨細胞分化を阻害したが、Nrf2 活性化能が見られない Vitamin C は破骨細胞分化を阻害しなかった。さらに、薬剤間で抗酸化酵素発現を比較したところ、SFN、EGCG は抗酸化酵素発現を顕著に増大させた。*in vitro* の結果と同様に、動物実験で Nrf2 活性化能を示す SFN、EGCG の腹腔内投与で骨破壊が阻止できた。この結果は、より強い Nrf2 活性化を誘導する SFN、EGCG が、破骨細胞分化および骨破壊に対してより強力な阻害効果を有することを示唆している。このことから、Nrf2 活性化剤は全身投与によっても骨破壊性疾患の新規治療法となる可能性が示唆された。骨破壊性疾患は、一般的に骨形成と骨吸収のバランスが破綻することによって引き起こされる。破骨細胞形成抑制試験では破骨細胞および破骨細胞前駆細胞に対する各抗酸化剤の直接的な影響を調べており、ROS スカベンジングによる破骨細胞形成の阻害と比較して、Nrf2 活性化を介した抗酸化酵素発現増強による ROS シグナル阻害のほうが破骨細胞形成をより強く阻害するということが明らかとなった。Vitamin C は破骨細胞分化を阻害しなかったことや、Vitamin E は結紮誘発性歯周炎のラットの骨量減少を抑制できないと報告されていることから、Nrf2 活性化能のない薬剤と比較し Nrf2 活性化能を有する薬剤は、骨破壊性疾患への新規治療薬としてより効果的である可能性が示唆された。

本研究では、破骨細胞および破骨細胞前駆細胞に対する直接的な影響に焦点を当てたが、破骨細胞分化支持細胞を介した破骨細胞に対する各薬剤の間接的な影響の可能性も考慮する必要がある。軟骨/骨の破壊部位を考慮すると、骨芽細胞、滑膜細胞、免疫系細胞などの破骨細胞分化支持細胞は、RANKL を含む破骨細胞分化サイトカインを産生すると報告されている。抗酸化剤によって RANKL 産生が減弱されるかどうかは確認していないが、EGCG は骨芽細胞における LPS 誘導性の RANKL の発現を抑制し、SFN は骨細胞の RANKL 産生も抑制することで、間接的に破骨細胞分化を阻害することが報告されている。

以上のことから、抗酸化剤は Nrf2 活性化能に応じて破骨細胞分化を抑制し、遠隔部位での骨破壊を全身投与により抑制できたことから、Nrf2 活性化剤は骨破壊性疾患の新規治療薬として利用できる可能性が示唆された。

【結 論】

Nrf2 活性化能を有する SFN および EGCG の全身投与は、マウス頭蓋冠における骨破壊を抑制した。

審査の結果の要旨

歯周病などの骨破壊性疾患は、破骨細胞による過剰な骨吸収が特徴である。破骨細胞の分化・活性化は主に Receptor Activator of Nuclear factor Kappa B Ligand (RANKL) によって制御されており、その細胞内シグナル伝達に活性酸素種が利用されている。我々は以前に、抗酸化酵素発現制御因子である Nuclear-factor E2-related Factor 2 (Nrf2) の局所活性化により破骨細胞分化を抑制し骨破壊を阻止できることを報告した。本研究では、Nrf2 活性化剤を全身投与した際、破骨細胞の分化を抑制し、骨破壊を阻止できると仮説を立て、その検証を細胞培養実験と動物実験を用いて行った。

In vitro において、まずマウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 cell (RAW cell) 培養実験系を用いて各抗酸化剤の Nrf2 活性化能有無による破骨細胞分化抑制能を比較した。各抗酸化剤 [Catechin, Epigallocatechin-Gallate (EGCG), Sulforaphane (SFN), Vitamin C] の存在下 / 非存在下で培養後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。また、RAW cell に各抗酸化剤を添加し、抗酸化酵素発現解析およびレポーターアッセイを行った。次に、*in vivo* においてマウス頭蓋冠での Lipopolysaccharide (LPS) 誘発骨破壊実験を行った。7 週齢 BALB/C 雄性マウス 25 匹を 5 匹ずつ 5 群にランダムに振り分けた (コントロール群, LPS+PBS 群, LPS+SFN 群, LPS+Catechin 群, LPS+EGCG 群)。コントロール群には頭蓋冠の正中線部へ Phosphate-Buffered Saline (PBS) 注射を行い、その他 4 群には 1, 3, 5, 7, 9 日目に頭蓋冠の正中部へ LPS を繰り返し注射した。それぞれ抗酸化剤または PBS を 1, 3, 5, 7, 9 日目に腹腔内注射した。11 日目に安楽死、

4%パラホルムアルデヒド PBS 溶液で浸漬固定後、軟部組織を頭蓋骨から剥離し、MicroCT にて骨破壊の程度を比較した。

その結果、破骨細胞形成試験において、SFN および EGCG は強力に破骨細胞形成を抑制した。抗酸化酵素発現解析では、SFN および EGCG は強力に抗酸化酵素の発現量を増加させた。レポーターアッセイでは、SFN および EGCG によるレポーター遺伝子の強い発現誘導、すなわち Nrf2 転写活性の増加が見られた。LPS 誘発骨破壊実験において、SFN および EGCG の腹腔内投与は LPS による骨破壊を強力に抑制した。

以上のことから、抗酸化剤は Nrf2 活性化能に応じて破骨細胞分化を抑制し、遠隔部位での骨破壊を全身投与により抑制できたことから、Nrf2 活性化剤は骨破壊性疾患の新規治療薬として利用できる可能性が示唆された。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分価値を有するものと判定した。

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	那 須 啓 佑
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 526 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 31 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	Type IVb Hypersensitivity Reaction in the Novel Murine Model of Palladium-Induced Intraoral Allergic Contact Mucositis (口腔内パラジウムアレルギー発症マウスモデルにおけるIVb型アレルギー反応) International Journal of Molecular Sciences doi: 10.3390/ijms24043137
論 文 審 査 委 員	主査 教授 山 越 康 雄 副査 教授 里 村 一 人 副査 教授 濱 田 良 樹

内 容 の 要 旨

【緒 言】

金属によるアレルギー性接触皮膚炎（ACD）は、腐食により生じた金属イオンが抗原性を発揮するハプテンとして機能することで生じる遅延型過敏反応（DTH）に分類され、T細胞依存性と考えられている。しかし、口腔粘膜でのDTHは、皮膚における抗原提示細胞やT細胞の局在と性状が異なるため、その発症メカニズムについては不明な点が多い。

本研究では、口腔粘膜におけるPdアレルギーマウスモデルを作製し、口腔粘膜と顎下リンパ節のT cell receptor (TCR)とサイトカインプロファイルを解析することで、そ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。

【材料および方法】

1) Pdアレルギーマウスモデルの作製

BALB/cAJclマウス（4週齢，雌，45匹，日本クレア）を用いた。動物実験は、鶴見大学歯学部「動物実験委員会」に承認され（承認番号：21A025）、「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。

アレルギー性接触粘膜炎マウス（ACM）モデルとして、左右耳介部後方の皮膚に1週おきに、2回10 mM PdCl₂ + 10 μg/ml Lipopolysaccharide 混合溶液を125 μl注射して感作し、感作終了1週間後に、左右頬粘膜への10 mM PdCl₂ 溶液 25 μlの粘膜下注射で誘導を行った。刺激性粘膜炎マウス（ICM）モデルとして、感作せずに、頬粘膜に10 mM PdCl₂ 溶液 25 μlを粘膜下注射したものを用いた。対照群として、ACMと同様の方法で感作を行い、誘導時に頬粘膜に生理食塩水 25 μlを粘膜下注射したものを用いた。すべてのマウスで誘導前、誘導1, 2, 3, 5, 7日後の頬粘膜の腫脹を測定した。

2) 病理組織学的および免疫組織化学的解析

誘導2, 5日後に採取した口腔粘膜のHE染色標本を作製した。免疫組織化学的解析には、T細胞マーカー（CD3）およびマクロファージマーカー（F4/80）を用いた。

3) 定量PCR解析

誘導2, 5日後に採取した口腔粘膜からTotal RNAを抽出し、相補的DNAを合成し、T細胞関連CD抗原（CD3, CD4, CD8）、Th1型サイトカイン（IL-2, IFNγ, TNFα）Th2型サイトカイン（IL-4, IL-10）の発現量を定量PCR解析で測定した。

4) TCR レパトア解析

誘導5日後のACMとICMの口腔粘膜ならびに顎下リンパ節において、次世代シーケンサーを用いたTCRレパトア解析を行い、T細胞受容体 α 鎖(TRA)、T細胞受容体 β 鎖(TRB)ごとのV、J遺伝子の発現頻度とCDR3領域における塩基配列を網羅的に解析した。

5) 統計解析

Kruskal-Wallis検定(Steel-Dwass多重比較検定)、Mann-Whitney U検定を用いて解析し、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

【結 果】

頬粘膜の腫脹は、ACMでは誘導2日後で最大となり、ICMと対照群では誘導1日後で最大となった。その後、すべてのマウスで誘導7日後まで腫脹は経時的に減少した。誘導2、3、5日後の口腔粘膜の腫脹は、ICMと比較してACMで有意に大きかった。そこでACMの口腔粘膜の腫脹が最大で、さらにACMとICMの腫脹差が最も大きい誘導2日後と、ACM口腔粘膜組織中のCD3発現量が最も大きかった誘導5日後に着目して解析した。

病理組織学的には、ACMの誘導5日後で、顕著な粘膜上皮の肥厚、海綿状浮腫、炎症細胞の浸潤を認めた。免疫組織化学的解析では、誘導2日後のACMにおいて、ICMよりもマクロファージの浸潤が顕著であったが、誘導5日後にはACMとICMともに消失していた。T細胞浸潤は、ICMと対照群でほとんど認められなかったが、ACMでは顕著な浸潤を認め、誘導2日後から5日後まで継続していた。

定量PCR解析では、ACMでのCD3とCD4の発現量は、ICMと比較して有意に高く経時的に増加したが、CD8の発現量に差はなかった。また、Th1、Th2関連サイトカインの発現量を比較したところ、誘導2、5日後とも、ACMのTh2関連サイトカインの発現量がICMに比べて有意に高かった。Th1関連サイトカインの発現量は、ICMとACMの間に差はなかった。

TCRレパトア解析の結果、誘導5日後のACMの口腔粘膜では、ICMよりもTRA、TRBのV-J遺伝子の組合せが共に多く検出され、Shannon indexが有意に高かった。ACMの口腔粘膜におけるTCRレパトアは、ACMの顎下リンパ節のTCRレパトアと数多く共通しており、ICMの顎下リンパ節のTCRレパトアともいくつか共通していたが、ICMの口腔粘膜には共通のTCR遺伝子を有するクローンは認められなかった。また、iNKT細胞のTRA配列は全てのサンプルで検出されたが、その頻度は低く、ICMの口腔粘膜の方がACMの口腔粘膜よりも高かった。ACMの口腔粘膜と顎下リンパ節で共通するTCR遺伝子をV、J領域で解析したところ、TRAV7D-2、TRAV14-1、TRAJ18、TRBV5、TRBJ2-7が平均+2SDを超えていた。

【考 察】

本研究において、ACMの口腔粘膜に有意な腫脹を認め、顎下リンパ節と共通のTCR遺伝子を有するT細胞が検出されたことから、口腔粘膜Pdアレルギーマウスモデルが確立されたと考えられた。病理組織学的および免疫組織化学的解析にて、誘導2日後のACMの口腔粘膜にマクロファージの顕著な浸潤を認め、誘導5日後に遅延型アレルギーの特徴である粘膜上皮の肥厚、海綿状浮腫、T細胞の顕著な浸潤を認めたことから、獲得免疫の関与が示唆された。また、粘膜上皮肥厚、海綿状浮腫、T細胞浸潤が誘導2～5日後にかけて増加したことから、DTHの経時的な増悪が示唆された。また、ACMの口腔粘膜においてCD4+T細胞の浸潤を認め、Th2型サイトカインがTh1型サイトカインよりも優勢であったことから、本マウスモデルは、IVb型(遅延型)アレルギーの病態を再現できているものと考えられた。

TCRレパトア解析において、ACMの口腔粘膜ではICMよりもTCRレパトアが多様で、アレルギー反応によって局所に多様なT細胞が誘導されたことが示唆された。また、ACMの口腔粘膜と顎下リンパ節に共通するTCRレパトアは多様性を示したが、特定のVまたはJ遺伝子に偏っており、これらのTCR遺伝子を有するT細胞が、口腔粘膜のPdアレルギーで特異的に誘導されることが示唆された。

一方、固有のTRA配列をもつiNKT細胞は、Ni、Cr、TiによるACDにおいて高頻度に確認されている。我々も、NiによるACM口腔粘膜のTCR解析において、iNKT細胞の免疫反応への関与を示唆する所見を報告しているが、本研究では、ACMの口腔粘膜においてiNKT細胞由来のTRA配列を有するT細胞の存在頻度は少なかった。これは、Pdアレルギー特異的と考えられるT細胞の増加により、iNKT細胞の存在比率が減少した結果と考えられた。

【結 論】

本研究において、口腔粘膜におけるIVb型(遅延型)Pdアレルギーマウスモデルを確立できた。Pdアレルギー特異的T細胞は特有の多様性を有するTCRレパトアによって構成されていることが示唆された。

審査の結果の要旨

金属によるアレルギー性接触皮膚炎は、遅延型過敏反応（DTH）に分類され、T細胞依存性と考えられている。しかし、口腔粘膜でのDTHは、皮膚における抗原提示細胞やT細胞の局在と性状が異なるため、その発症メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、口腔粘膜におけるPdアレルギーマウスモデルを作製し、口腔粘膜と顎下リンパ節のT細胞受容体（TCR）とサイトカインプロファイルを解析することで、そ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。

Pdアレルギー性接触粘膜炎を誘導したマウス（ACM）およびPd刺激性粘膜炎マウス（ICM）を作製して、病理組織学的実験および免疫組織化学の実験を行った。次いで、Pd誘導後に採取した口腔粘膜からtotal RNAを抽出し、T細胞関連CD抗原、Th1型およびTh2型サイトカインの発現量を定量PCRにて解析した。さらにPd誘導後のACMとICMの口腔粘膜ならびに顎下リンパ節において、次世代シーケンサーを用いたTCRレパトア解析を行った。

ACMにおいて、口腔粘膜はPd誘導後2日目で最大の腫脹が観察され、ICMの腫脹より有意に大きかった。さらに5日目ではT細胞マーカーであるCD3の発現量も高かった。定量PCR解析では、ACMのCD3とCD4の発現量は、ICMと比較して有意に高く経時的に増加した。また、Th1、Th2サイトカインの発現量を比較したところ、Th1サイトカインの発現量は、ICMとACMの間に差はなかったが、ACMのTh2サイトカイン発現量はICMに比べて有意に高かった。TCRレパトア解析の結果、Pd誘導5日後のACMの口腔粘膜では、ICMよりもTCRレパトアが多様で、アレルギー反応によって局所に多様なT細胞が誘導されたことが示唆された。また、ACMの口腔粘膜と顎下リンパ節に共通するTCRレパトアは多様性を示したが、特定のVまたはJ遺伝子に偏っており、遺伝子再編成によりこれらのTCRを有するT細胞が、口腔粘膜のPdアレルギーで特異的に誘導されることが示唆された。

以上より、本研究では口腔粘膜におけるIVb型（遅延型）Pdアレルギーマウスモデルの確立と共にその発症メカニズムを明確に示しており、今後の歯科用金属アレルギーに伴う疾患に対する臨床応用に大いに貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。

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 吉 澤 孝 昌
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号 甲 第 527 号
学位授与年月日 令和 5 年 3 月 31 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 Characterization of Metal-Specific T Cells in Inflamed Oral Mucosa in a Novel Murine Model of Chromium-Induced Allergic Contact Dermatitis
(口腔粘膜で惹起させたクロムアレルギーモデルマウスの金属特異的 T 細胞の特性評価)
International Journal of Molecular Sciences doi: 10.3390/ijms24032807
論 文 審 査 委 員 主査 教授 里 村 一 人
副査 教授 朝 田 芳 信 副査 教授 濱 田 良 樹

内 容 の 要 旨

【緒 言】

金属アレルギーは遅延型アレルギー反応のひとつで、金属に特異的な T 細胞を主体とした獲得免疫機構が挙動しているとされている。近年、歯科用金属による口腔内の金属アレルギーの発症例が増加し、その病態解明が求められている。クロムは歯科医療では幅広く使われる一方、金属アレルギーの原因金属の一つとされているが、口腔内でのクロムアレルギーを惹起させた動物モデルは存在せず、その病態や金属特異的 T 細胞の関与については不明である。そこで本研究では、口腔粘膜における Cr アレルギーを発症させたモデルマウスを作製し、炎症部位における病理組織学的検討と、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、口腔粘膜における 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解明することを目的とした。

【材料及び方法】

動物

実験動物として BALB/cAJcl (4 週齢, 雌, 45 匹, 日本クレア) を用いた。本研究における動物実験は、鶴見大学歯学部「動物実験委員会」にて承認され (承認番号: 21A025), 「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。

口腔粘膜クロムアレルギーモデルマウスの確立

両側耳介部後方の皮膚に、CrCl₂ + LPS 混合溶液 10 mM を 1 週おきに 2 回、皮内注射 (片側 125 μ l) することで感作を行い、感作終了から 1 週間後に、両側頬粘膜に CrCl₂ 溶液 10 mM を粘膜下注射 (片側 25 μ l) し誘導を行うことで口腔粘膜 Cr アレルギーモデルマウス群 (以下, ACM 群) を作製した。対照群としては、感作は同一条件下で、誘導時に生理食塩水を注射した群 (以下, Control 群) と、感作は行わずに、同一条件下で CrCl₂ 溶液による誘導を施行した群 (以下, ICM 群) を作製した。誘導後、各群のマウスの両側頬粘膜の腫脹を経時的に測定した。

アレルギーを惹起させた口腔粘膜の病理組織学的評価

誘導から 1, 7 日後に採取した頬粘膜の組織採取を行い、HE 染色による病理組織学的検討を行うとともに、T 細胞マーカー (CD3), 成熟マクロファージマーカー (F4/80) を用いた免疫組織化学的検討を行った。

定量 PCR による mRNA レベルにおけるサイトカイン解析

誘導から 1, 7 日後に採取した頬粘膜より Total RNA を抽出し cDNA を合成した。次に、T 細胞マーカー (CD3, CD4,

CD8), 各種サイトカイン (IL-1 β , IFN- γ , IL-4, Granzyme B) の遺伝子発現量を定量 PCR 法にて測定した.

TCR repertoire 解析

口腔粘膜に浸潤した T 細胞の抗原特異性を明らかにするために, TCR レパトアを解析した. 病理組織学的評価と定量 PCR によるサイトカイン解析において, 局所に T 細胞の浸潤を多く認めた誘導後 1 日後の口腔粘膜組織を検体とした. 各検体から Total RNA を抽出後, Adaptor-ligation 法を用い, V, J 遺伝子の発現頻度, および CDR3 領域における塩基配列を網羅的に解析した.

統計解析

すべての実験は, それぞれの実験群を n=15 とし, Kruskal-Wallis test (SPSS Ver.27) を用いて解析した. $P < 0.05$ で有意差ありと設定した.

【結 果】

頬粘膜の腫脹について, 全ての群で誘導 1 日後が最大となった. ICM 群では Control 群と比較して誘導 5 日後まで有意な腫脹を認めた. ACM 群では誘導 12 日後まで有意な腫脹を認めた.

病理組織学的ならびに免疫組織化学的解析では, 腫脹が最大であった誘導 1 日後の ACM 群で上皮細胞間の海綿状浮腫と, 粘膜上皮下と粘膜上皮内への T 細胞の浸潤を多く認めた. Control 群では明らかな炎症所見は認めず, ICM 群では粘膜上皮下には炎症性細胞の浸潤を認めたが, ACM 群のような粘膜上皮内の所見は認められなかった. 誘導 7 日後の ACM 群では, 誘導 1 日後のような所見は認められなかった.

T 細胞マーカーである CD3, CD4, CD8 の発現量を定量 PCR で解析した結果, 誘導 1, 7 日後における ACM 群の CD3 の発現量は他の群と比べて有意に高かった. CD8/CD4 比は, 誘導 1 日後では ACM 群は他の群に比べて有意に高かったが, 誘導 7 日後では全ての群間で有意差はなかった. T 細胞関連サイトカインの発現量を定量 PCR で解析したところ, 誘導 1, 7 日後において, ACM 群の IL-1 β , Granzyme B, IFN- γ の発現量は, 他の群に比べ有意に高かったが, IL-4 については, ACM 群と Control 群の間には有意差を認めたが, ICM 群との間には有意差は認めなかった. 誘導 7 日後では IL-4 とともに ACM 群は他の群に比べて有意差に高かった.

TCR レパトア解析の結果, 口腔粘膜と頸部リンパ節において, ACM, ICM 群共に Trav11d-Traj18 を有する iNKT 細胞が最も多く認められた. ACM 群においては, 頬粘膜に Trav12D-1-Traj22 を有する T 細胞も多く認め, 頸部リンパ節においても同様であった. ICM 群では, 頬粘膜と頸部リンパ節において iNKT 細胞以外で共通した T 細胞のクローンは認められなかった.

【考 察】

口腔粘膜における Cr を用いた遅延型アレルギー反応は誘導 1 日後に最も強く認められた. ACM 群は誘導 1 日後に炎症局所への T 細胞の浸潤を認め, CD8, IFN- γ , IL-1 β , Granzyme B の発現量が有意に高かったことから, 口腔粘膜における Cr アレルギーの免疫応答は Th1 偏性であることが示唆された. また, このことは, CD8 陽性 T 細胞が口腔粘膜における Cr アレルギーの初期段階で炎症局所に浸潤し, IFN- γ を産生していることを示唆している. 本研究における口腔粘膜での Cr アレルギーモデルマウスでは, 足底部でのモデルマウスと違い, 誘導 1 日後には, 顕著なアレルギー反応がみられた. このような所見は Ni アレルギーモデルマウスでも確認されている. なお, 口腔粘膜と皮膚におけるアレルギー発現の時間的な差は, 物質透過性や毛細血管網の拡張度および密度の違いが関与しているのではないかと考えている.

また, TCR レパトア解析の結果, ACM 群と ICM 群の口腔粘膜ならびに頸部リンパ節に, Trav11D-Traj18 を有する iNKT 細胞が, 他の T 細胞に比べて高発現していた. さらに, ACM 群では, Trav12D-1-Traj22 を有する T 細胞の高発現も認められ, この T 細胞が, 抗原特異的に口腔粘膜の Cr アレルギーに関与していると考えられた.

【結 論】

本モデルマウスは免疫生物学的に口腔粘膜における Cr アレルギーの病態を反映した外挿性の高い動物モデルで, その病態形成には Trav12D-1-Traj22 を有する抗原特異的な T 細胞が関与しているものと考えられた. また口腔粘膜の Cr アレルギー反応の初期段階において上皮内に顕著に浸潤した CD8 陽性 T 細胞が産生する IFN- γ と IL-1 β が重要な役割を演じていることが示唆された.

審査の結果の要旨

近年歯科用金属アレルギー症例が増加し、その病態解明が求められている。本研究では、口腔粘膜における Cr アレルギーを発症させたモデルマウスを作製し、口腔粘膜における 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解明することを目的とした。

BALB/cAJcl (4 週齢, 雌) マウスの両側耳介後方皮膚に、CrCl₂ + LPS 混合溶液 10 mM を 2 回皮内注射し感作を行い、その 1 週後に両側頬粘膜に CrCl₂ 溶液の粘膜下注射を行い、アレルギー反応を誘導した (ACM 群)。さらに同一条件下での感作後、誘導時に生理食塩水を注射した群 (Control 群)、および感作は行わずに CrCl₂ 溶液による誘導のみを行った群 (ICM 群) を設定し、各群のマウスの両側頬粘膜の腫脹を経時的に測定するとともに、誘導から 1, 7 日後の頬粘膜の病理組織学的検討、免疫組織化学的検討、さらに頬粘膜における T 細胞マーカー (CD3, CD4, CD8)、各種サイトカイン (IL-1 β , IFN- γ , IL-4, Granzyme B) の発現量を定量的 PCR 法にて測定した。さらに誘導 1 日後の口腔粘膜組織に浸潤している T 細胞の TCR レパトア解析を行った。

その結果、すべての群で頬粘膜の腫脹が確認され、ICM 群では誘導 5 日後まで、ACM 群では誘導 12 日後まで有意な腫脹が認められた。腫脹が最大であった誘導 1 日後の ACM 群では粘膜上皮下および粘膜上皮内への T 細胞浸潤が認められた。一方 Control 群では明らかな炎症所見は認めず、ICM 群では粘膜上皮下に炎症性細胞浸潤を認めたのみであった。また ACM 群において、誘導 1, 7 日後における CD3, IL-1 β , Granzyme B および IFN- γ の発現量、誘導 1 日後の CD8/CD4 比が他の群に比べて有意に高かった。さらに口腔粘膜と頸部リンパ節において、ACM 群、ICM 群共に Travl1d-Traj18 を有する iNKT 細胞が最も多く認められ、ACM 群においては Trav12D-1-Traj22 を有する T 細胞も多く認められた。

本研究により、口腔粘膜における Cr アレルギーの病態を反映した外挿性の高い動物モデルが作製され、その病態形成には Travl1d-Traj18 を有する iNKT 細胞と Trav12D-1-Traj22 を有する抗原特異的な T 細胞、さらには IFN- γ と IL-1 β が重要な役割を演じていることが示唆された。本研究は口腔粘膜における Cr アレルギーの病態解明に資するものであり、金属アレルギーの予防や制御に繋がることが期待できるものと考えられた。

よって、本研究は博士 (歯学) の学位を請求するにあたり、十分な価値を有するものと判定した。