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的実験を行った。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。