

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。