

## 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)  | 仲宗根康成(沖縄県)  |
| 博士の専攻分野 | 博士(歯学)  |
| 学位記番号   | 甲第488号  |
| 学位授与年月日 | 平成31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<br>(博士課程) 歯学専攻   |
| 学位論文題目  | Characterization of T cell receptors in a novel murine model of nickel-induced intraoral metal contact allergy<br>(新規口腔粘膜ニッケルアレルギーモデルマウスにおけるT細胞受容体の特徴について)<br>PLOS ONE 第17巻 第13号 e0209248 平成30年12月17日発行 |
| 論文審査委員  | 主査 教授 斎藤 一郎<br>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、歯科用金属が要因とされる口腔内の金属アレルギー発症報告があり、その病態の解明が必要とされている。とくにニッケル(Ni)は、最もパッチテスト陽性率が高い金属であり、またその汎用性からも主要な金属アレルギーの原因金属とされている。しかし、これまでに口腔内に金属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なT細胞の存在は不明である。そこで、本研究では口腔粘膜におけるNiアレルギーを発症させたモデルマウスを作製し、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、口腔粘膜におけるNi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。

## 【材料および方法】

## 1) モデルマウスの作製

実験動物としてBALB/cAJcl(4週齢, 雌, 66匹, 日本クレア), C57BL/6(16週齢, 雌, 8匹, 日本クレア), C57BL/6 CD1d<sup>-/-</sup>(16週齢, 雌, 6匹, 北里大学医学部免疫学研究室)を用いた。これらの動物実験は、独立行政法人国立病院機構相模原病院「実験動物委員会」および鶴見大学歯学部「動物実験委員会」「遺伝子組み換えバイオセーフティー委員会」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。

両側耳介部後方皮膚にNiCl<sub>2</sub> + LPS混合溶液10mMを1週おきに2回、皮内注射(片側125 μl)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NiCl<sub>2</sub>溶液10mMを粘膜下注射(片側25 μl)し、誘導を行うことで口腔粘膜Niアレルギーモデルマウス群(以下, Allergic contact mucositis: ACM群)を作製した。対照として、両側頬粘膜にNiCl<sub>2</sub>溶液の注射のみ施行した群(以下, Irritant contact mucositis: ICM群)と、感作はACM群と同一で誘導時に生理食塩水を注射した群(以下, Control群)、両側鼠径部に感作を行い、両側足底部に誘導を行った群(以下, Footpad-allergic contact dermatitis: F-ACD群)を作製した。ACM群とF-ACD群においては誘導1回目の14日後に2回目の誘導を行った。全ての群で、誘導後に両側頬粘膜腫脹を経時的に測定した。

## 2) 病理組織・免疫組織学的解析

誘導から1, 3, 7日後に採取した頬粘膜からHE染色標本を作製し、病理組織学的解析を行うと共に、T細胞マーカー

(CD3), 成熟マクロファージマーカー (F4/80) を用いて免疫組織化学的解析を行った.

### 3) 定量 PCR 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 (CD4, CD8), 各種サイトカイン (IFN- $\gamma$ , Granzyme B, IL-4, IL-10), 制御性 T 細胞転写因子 (Foxp3), Natural killer T (NKT) 細胞マーカー (NK1.1, CD1d) の遺伝子発現量を定量 PCR 法にて測定した.

### 4) TCR レパトア解析

ACM, ICM 群の誘導後 1 日目における頬粘膜および頸部リンパ節より抽出した Total RNA から cDNA を合成し, Adaptor Ligation 法を用いて TCR 遺伝子を増幅した. 次世代シーケンサー (Illumina Miseq paired-end platform) を用いて TCR 遺伝子上に存在する V, J 遺伝子の発現頻度, および Complementarity-determining region 3 (CDR3) 領域における塩基配列を網羅的に解析した.

#### 統計解析

Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison tests, Mann-Whitney U-test (GraphPad Prism 7) を用いて解析し,  $P < 0.05$  で有意差ありとした.

#### 【結 果】

頬粘膜腫脹測定の結果, ACM, ICM 群は Control 群と比較して有意に腫脹を認め, ACM 群が最も腫脹していた.

病理組織学的解析および免疫組織化学的解析結果では, ACM 群の誘導後 1 日目に最も口腔粘膜上皮の肥厚や上皮細胞間の海綿状浮腫が認められ, 上皮下への炎症細胞, T 細胞, マクロファージの浸潤も多く認めた.

定量 PCR 解析結果では, ACM 群は ICM 群と比較して誘導後 1 日目に CD8, IFN- $\gamma$ , Granzyme B が, 誘導後 7 日目には Foxp3, IL-4, IL-10, NK1.1, CD1d の発現量が有意に増加していた.

TCR レパトア解析結果では, 頸部リンパ節において ACM, ICM 群共に *Trav11d-Traj18* を有する NKT 細胞が最も多く認められ, 頬粘膜においては ACM 群の方が同細胞を多く認めた. また, ACM 群においては頬粘膜, 頸部リンパ節共に *Trav6-6-Traj57* を有する T 細胞を多く認めたが, ICM 群および正常 *BALB/cAJcl* の脾臓では同細胞はほぼ検出されなかった.

Ni アレルギーを惹起させた頬粘膜および足底部皮膚の腫脹測定結果では, 誘導 1 回目の 1 日後において ACM 群は F-ACD 群と比較して有意に腫脹を認めたが, 誘導 2 回目の 1 日後から 7 日後にかけては F-ACD 群の方が有意に腫脹を認めた. また, F-ACD 群での腫脹は誘導 1 回目と比較して誘導 2 回目の方が増大したが, ACM 群は誘導 2 回目の方が減少した.

NKT 細胞ノックアウトマウスを用いた実験結果では, CD1d<sup>-/-</sup> ACM 群は ACM 群と比較して有意に頬粘膜の腫脹を認め, 誘導後 7 日目に CD8, IFN- $\gamma$  の発現量が有意に増加し, IL-4 の発現量が有意に低下していた.

#### 【考察とまとめ】

本研究結果から, 口腔粘膜における Ni を用いた遅延型アレルギー反応が誘導後 1 日目に最も強く認められた. さらに, ACM 群は誘導後 1 日目に炎症局所への T 細胞, マクロファージの浸潤を認め, CD8, IFN- $\gamma$ , Granzyme B の発現量が有意に増加していたことから, 口腔粘膜における Ni アレルギーでは IFN- $\gamma$  が有意であり, 同サイトカインに活性化されたマクロファージや CD8 陽性 T 細胞より分泌される細胞毒性顆粒によって口腔粘膜上皮細胞のアポトーシスが誘導されていると考えられる.

一方, 粘膜免疫系のひとつである口腔粘膜は, 免疫寛容を誘導することができる. 本実験において, 誘導後 7 日目の ACM 群は ICM 群と比較すると Foxp3, IL-10 の発現量が有意に増加していたことから ACM 群では制御性 T 細胞が誘導されることで, 過剰な金属アレルギー反応が抑制されている可能性が示唆された.

口腔粘膜と皮膚における Ni アレルギーの違いを明らかにするため ACM 群と F-ACD 群の腫脹を比較した結果, ACM 群において, 早期に重篤な Ni アレルギー反応が惹起された. この原因としては, 口腔粘膜と皮膚の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と考えられる. さらに, F-ACD 群での腫脹は誘導 1 回目と比較して誘導 2 回目の方が増大したのに対し, ACM 群では誘導 2 回目の方が減少したことから, ACM 群では誘導 2 回目においても制御性 T 細胞が誘導され続けることで, 過剰な Ni アレルギー反応が抑制されている可能性が示唆された.

TCR レパトア解析結果より, 口腔粘膜および頸部リンパ節において ACM 群のみ *Trav11d-Traj18* と *Trav6-6-Traj57* 遺伝子が高発現であったことから, NKT 細胞が感作における自然免疫から誘導における獲得免疫への橋渡しを担うことで

口腔粘膜における Ni アレルギーの免疫制御を司っており、*Trav6-6-Traj57* を有する T 細胞が口腔粘膜における Ni アレルギーの免疫応答に直接関与している可能性が示唆された。

また、NK1.1, CD1d, IL-4 の遺伝子発現量解析結果、および NKT 細胞ノックアウトマウスを用いた実験結果より、NKT 細胞が IL-4 を産生し、CD8 陽性 T 細胞が IFN- $\gamma$  を産生していることが示唆された。

以上より、本モデルマウスは免疫生物学的に口腔内における Ni 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あり、その病態形成には TCR *Trav6-6-Traj57* を有する T 細胞が金属特異的 T 細胞として関与しており、一方、NKT 細胞は口腔内における過剰な Ni アレルギー反応を抑制していると考えられた。

### 審査の結果の要旨

遅延型アレルギー反応の一つである金属アレルギーには金属に特異的な T 細胞による病態の成立機序が示唆されており、近年では歯科用金属が原因とされる口腔内の金属アレルギーの報告が多い。特にニッケル (Ni) は最もパッチテスト陽性率が高い金属であり、またその汎用性からも主要な金属アレルギーの原因金属とされている。そこで、本研究では口腔粘膜における Ni アレルギーを発症させたモデルマウスを作製し、炎症局所に浸潤する T 細胞の T 細胞受容体 (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 Ni アレルギーの病態形成に関わる T 細胞の性状や動態の検討を行ったところ、以下の結果が得られた。

1) 頬粘膜腫脹測定の結果、ACM (口腔粘膜の Ni アレルギーモデルマウス : Allergic contact mucositis) 群ならびに ICM (両側頬粘膜に NiCl<sub>2</sub> 溶液の注射のみ施行 : Irritant contact mucositis) 群は対照群と比較して有意に腫脹を認め、ACM 群が最も腫脹していた。

2) 病理組織学的解析および免疫組織化学的解析結果では、ACM 群の誘導後 1 日目に最も口腔粘膜上皮の肥厚や上皮細胞間の海綿状浮腫が認められ、上皮下への炎症細胞、T 細胞、マクロファージの浸潤も多く認められた。

3) 定量 PCR 解析結果では、ACM 群は ICM 群と比較して誘導後 1 日目に CD8, IFN- $\gamma$ , Granzyme B が、誘導後 7 日目には Foxp3, IL-4, IL-10, NK1.1, CD1d の発現量が有意に増加していた。

4) TCR レパトア解析結果では、頸部リンパ節において ACM, ICM 群共に NKT 細胞が最も多く認められ、頬粘膜においては ACM 群の方が同細胞を多く認めた。

5) Ni アレルギーを惹起させた頬粘膜および足底部皮膚の腫脹測定結果では、頬粘膜は足底部皮膚とは異なる挙動を示した。

6) NKT 細胞ノックアウトマウスを用いた実験結果では、ACM 群と比較して有意に頬粘膜の腫脹を認め、誘導後 7 日目に CD8, IFN- $\gamma$  の発現量が有意に増加し、IL-4 の発現量が有意に低下していた。

以上のことから、本モデルマウスは口腔内における Ni アレルギーの病態を再現した動物モデルであり、その病態形成には特有な TCR を有する T 細胞や、さらに NKT 細胞の本症における抑制的な役割が示唆された。このように本研究により金属アレルギーによる病態の成立機序を明らかにしたことの意義は大きく、今後の臨床応用への道を拓くものと考えられる。

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。