

## 研究者：古澤 慧美

(所属：東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 小児歯科学分野)

## 研究題目：口腔粘膜炎の慢性化メカニズム解析

### 目的：

口腔扁平苔癬、慢性移植片対宿主病、およびベーチェット病による口腔粘膜炎は T 細胞の浸潤を特徴とし、炎症の増悪と寛解を繰り返す慢性炎症性疾患である。急性炎症は、起炎物質が取り除かれれば、恒常性維持機構によって組織は速やかに元の状態に戻るが、慢性炎症では組織のリモデリングや線維化が生じ、恒常性維持機構が破綻した状態にある。近年の病理組織解析から、慢性炎症の場には、免疫応答にアクセラをかける細胞だけでなく、ブレーキをかける細胞も出現し、これらは末梢組織のサイトカイン環境によって様々に修飾されることがわかってきた。

本研究では、口腔粘膜における T 細胞介在性の慢性炎症性疾患において、末梢組織に集積するリンパ球が局所環境によりどのように修飾され、口腔粘膜特有の病態を形成するのかについて解析を行うこととした。本研究目的を達成するため、卵白アルブミン (OVA) 抗原を用いて、口腔粘膜に慢性炎症性疾患を惹起させるマウスモデルを樹立し、口腔粘膜に集積するリンパ球の性質をリンパ節のリンパ球と比較検討することとした。研究初年度である 2019 年度は、口腔粘膜組織に集積する T 細胞のうち、血液循環に戻ることなく、末梢組織において長期生存する T 細胞集団 (レジデントメモリー T 細胞;  $T_{RM}$ ) に着目して解析を行った。

### 対象および方法：

7 週齢の C57BL/6 マウス (雌) を用いて、頬粘膜に OVA 抗原を反復塗布し、頬粘膜に慢性口腔粘膜炎を惹起させるモデルを樹立した。まず、complete Freund's adjuvant (CFA) 存在下で OVA 蛋白 (2mg/ml, 500/ $\mu$ l) を足底から注射投与し、全身性に感作を行った後、OVA 蛋白 (2mg/ml, 5/ $\mu$ l) の頬粘膜への塗布をアジュバント非存在下において 3 回繰り返した。抗原塗布に伴う一過性の炎症が、反復抗原塗布により過剰に増幅するのを防ぐため、抗原の塗布は 15 日間隔で行うこととした (図 1)。最終抗原塗布から 15 日後の頬粘膜と顎下リンパ節を採取し、頬粘膜に分布する T 細胞集団について顎下リンパ節と比較検討した。頬粘膜からのリンパ球の単離に際しては、Liberase (Roche 社) を用いて酵素処理した後、Percoll (GE ヘルスケアライフサイエンス社) を用いてリンパ球の単離を行った。頬粘膜または顎下リンパ節から単離したり

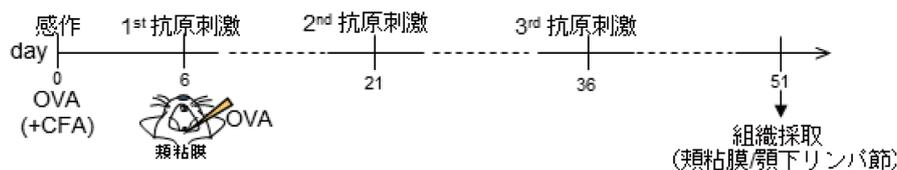


図 1 頬粘膜への卵白アルブミン (OVA) 抗原反復塗布モデル

表1 フローサイトメーターを用いた T 細胞の解析項目

(i) T 細胞サブセット	(ii) 各 T 細胞サブセットにおける T <sub>RM</sub> マーカーの発現
CD8T 細胞 : CD45 <sup>+</sup> TCRbeta <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	T <sub>RM</sub> マーカーである CD103 や CD69 の発現を (i) の各 T 細胞サブセットに対して解析
Foxp3 <sup>-</sup> CD4T 細胞 : CD45 <sup>+</sup> TCRbeta <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>-</sup>	
制御性 T 細胞 (Treg): CD45 <sup>+</sup> TCRbeta <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup>	

リンパ球における、CD45、TCRbeta、CD4、CD8、Foxp3、CD103、CD69 の発現を、フローサイトメーターを用いて解析し、表1の細胞集団の割合について解析した。また、頬粘膜への反復抗原塗布に伴う組織構造の変化や、T細胞分布の経時変化、および各T細胞サブセットが分布する組織学的位置については、HE染色や蛍光免疫組織染色により解析を行った。

## 結果および考察：

### 結果

#### 1. 頬粘膜への OVA 抗原の反復塗布に伴う組織構造の変化と T 細胞浸潤の経時変化

図1のマウスモデルを用いて、最終抗原塗布後から15日後の頬粘膜を採取し、HE染色にて、組織構造の変化を観察した。頬粘膜にOVA抗原を3回塗布した後、15日経過したマウスの頬粘膜では、慢性炎症の特徴でもある、上皮脚の伸長や、角化の亢進が認められた(図2)。また、抗CD8および抗CD4

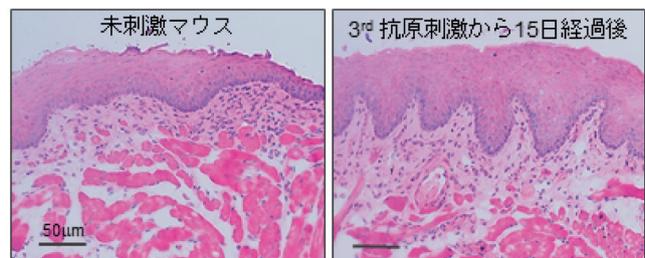


図2 頬粘膜への反復抗原塗布に伴う組織構造の変化

抗体を用いた蛍光免疫組織染色により、抗原塗布後の頬粘膜組織におけるT細胞分布の経時変化を解析したところ、1~3回目の抗原塗布のいずれにおいても、CD4およびCD8T細胞の分布は抗原塗布から24~48時間後に最も多くなり、抗原塗布から15日経過した頬粘膜では、一過性に起きる、血中由来のT細胞の浸潤は収束していることが明らかとなった。一方で、最終抗原塗布から15日後においても、一部のCD8およびCD4T細胞は頬粘膜に存在し、CD4T細胞が粘膜下組織のやや深い位置に分布するのに対し、CD8T細胞は上皮に近い位置に分布していた。

#### 2. 反復抗原塗布後の頬粘膜に分布する T 細胞サブセットの解析とレジデントメモリー T 細胞 (T<sub>RM</sub>) の同定

次に、頬粘膜への反復抗原塗布から15日後の組織に分布するCD8T細胞、Foxp3-CD4T細胞、制御性T細胞(regulatory T; Treg)比率について顎下リンパ節における各T細胞比率と比較検討した。興味深いことに、頬粘膜では顎下リンパ節と比較してTregの比率が高く、この値は未刺激マウスの頬粘膜に分布するTreg比率と比較しても高い値を示していた。また、CD8T細胞、Foxp3-CD4T細胞、Tregの3つのサブセットにおけるCD103およびCD69の発現を解析したところ、典型的なT<sub>RM</sub>と考えられているCD8T細胞だけでなく、Treg上においてもCD103やCD69の発現が確認された。

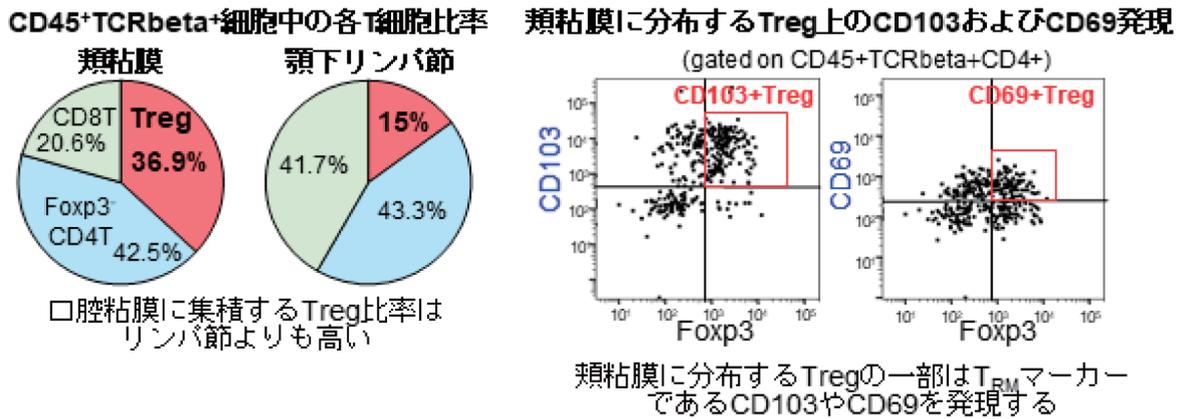


図3 OVA 抗原を反復塗布した類粘膜に集積する T 細胞サブセットの解析

## 考 察

OVA 抗原を用いた類粘膜への繰り返しの抗原塗布により、上皮下への細胞浸潤だけでなく、上皮脚の伸長や角化の亢進といった慢性炎症の特徴的な病態が認められたことから、本モデルにより類粘膜に慢性化した病変が形成されたと考えられる。また、反復抗原塗布後の類粘膜には Treg が多数存在していたことから、類粘膜では、抗原刺激が反復される過程で、免疫賦活に機能する CD8T 細胞以上に Treg が多く誘導され、炎症の過度な増幅を制御している可能性が示唆された。

近年、慢性ウイルス感染や癌において、末梢組織に移行後、血中を再循環することなく、局所において長期生存する T<sub>RM</sub> の解析が進み、T<sub>RM</sub> マーカーである CD103 や CD69 を発現する CD8T 細胞が、再抗原刺激に対し、速やかに活性化して免疫応答を開始させることがわかってきた。一方で、これまでの T<sub>RM</sub> の研究の主体は、CD8T<sub>RM</sub> をはじめとする、免疫賦活に働く T<sub>RM</sub> の解析であり、本研究で同定された T<sub>RM</sub> 様マーカーを発現する Treg の機能は明確ではない。今後は、類粘膜に集積する Treg の遺伝的形質や免疫抑制能について更に解析を進めることで、口腔慢性病変の形成過程における Treg の関与について更なる研究を遂行する予定である。

**成果発表：**(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

### 国内学会

#### 【シンポジウム】

古澤慧美、宮新美智世、東みゆき：口腔粘膜におけるレジデントメモリー T 細胞の同定と機能の検討。第 84 回口腔病学会 最先端口腔科学研究推進プロジェクトシンポジウム、2019 年 12 月 7 日（東京）（口頭発表）