

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10146

研究課題名(和文) 口腔扁平苔癬モデル動物の確立とdopamineシグナル制御治療薬の開発

研究課題名(英文) Establishment of animal model of oral lichen planus and development of dopamine signal-regulated therapeutics

研究代表者

伊藤 耕 (Ko, Ito)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20419758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜に発症する好中球性炎症が主体の慢性炎症性病変である口腔扁平苔癬(OLP)は、その発症要因が不明で難治性である場合も多い。OLPでは唾液中IL-8濃度が高いことが報告されており、その病態には細胞性免疫が関与しているとされている。本研究では、oxazolone, DSS, TNBS, iodoacetamideの4種類の薬剤を用いたIBDモデル動物を参考に、これらの薬剤を口腔粘膜に応用したOLPモデル動物を作製した。OLP患者より得られた臨床検体と各OLP動物モデルの組織像との比較を行った。ヒト検体でのサイトカインプロファイリングと比較して類似したプロファイルを示すのかを調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
本研究によって、口腔扁平苔癬の病態解明に役立つ成果を得ることができた。動物モデルの作製について、技術的な困難が存在することを示した。

研究成果の概要(英文)：Oral lichen planus (OLP), a chronic inflammatory lesion that develops on the oral mucosa and is mainly caused by neutrophilic inflammation, is often refractory because the pathogenesis is unknown; high salivary IL-8 levels have been reported in OLP, and cellular immunity has been implicated in its pathogenesis. In the present study, we used four IBD animal models of oxazolone, DSS, TNBS, and iodoacetamide as references to create animal models of OLP in which these drugs were applied to the oral mucosa; we compared clinical specimens obtained from OLP patients with the histology of each OLP animal model; the results showed that the OLP animal models were more sensitive to cytokines than the human specimens, and the OLP animal models were more sensitive to cytokines than the human specimens. We examined whether the profiles showed similar profiles compared to cytokine profiling in human specimens.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平苔癬 ラット TGF-beta

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜に発症する好中球性炎症が主体の慢性炎症性病変である口腔扁平苔癬 (oral lichen planus, OLP) は、その発症要因が不明で難治性である場合も多い[Eversole LR, *Semin Cutan Med Surg* 1997]。OLP では唾液中 IL-8 濃度が高いことが報告されており[Mozaffari HR, *Postepy Dermatol Alergol* 2018]、その病態には細胞性免疫が関与している。上皮に存在するリンパ球は CD8 陽性 T 細胞であるが、粘膜固有層に存在するリンパ球のほとんどが CD4 陽性 T 細胞であり、Th1 反応が優位となって CD8 陽性 T 細胞の活性化が引き起こされていると考えられている[Khan A, 2003; Scully C, 2008]。CD4 陽性 T 細胞は別々のサイトカインによってナイーブ T 細胞より Th1 細胞, Th2 細胞, iTreg 細胞, Th17 細胞に分化することが知られている (図 1) [Littman DR, 2010]。

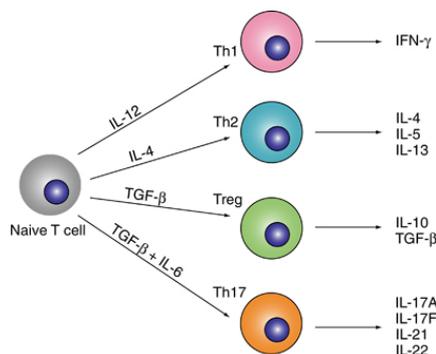


図1. T細胞分化

共同研究者の松下博士らは、T 細胞 - 樹状細胞インターフェイスにおけるドーパミンの機能を解明した (図 2) [Nakano K, Matsushita S, *Biochem Biophys Res Commun* 2008][Nakano K, Matsushita S, *Int Immunol* 2009]。さらに、D2 様受容体アゴニストは、自然免疫と獲得免疫を介して、すでに成立している好中球性炎症を抑制することも発見した[Matsuyama T, Matsushita S, *Clin Exp Neuroimmunol* 2018]。

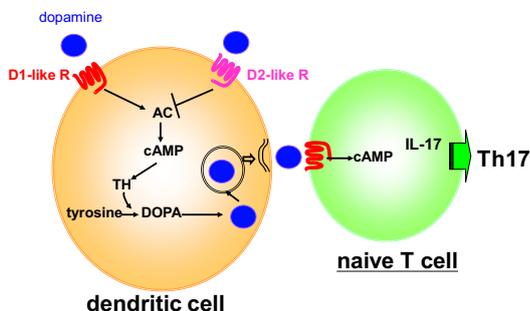


図2.T細胞間のコミュニケーションを行う分子dopamine

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease : IBD) は消化管に発症する、好中球性炎症が主体の疾患である。Th17 細胞は IBD の病因と深く関連があることが明らかになってきた[Gálvez J; *ISRN Inflamm* 2014]。IBD における Th17 細胞誘導性自然免疫細胞は過剰な炎症性サイトカインの放出によって炎症性 Th17 細胞を過剰に誘導するとともに、Th1 細胞も誘導し腸の粘膜が攻撃される。IBD モデル動物では、oxazolone、dextran sodium sulfate (DSS)あるいは trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)を用いて病変を模倣することが多い[Boirivant M, *J Exp Med* 1998][Catana CS, *Adv Clin Exp Med* 2018]。最近、iodoacetamide を用いた IBD モデル動物が報告された[Breitrück A, *Dis Model Mech* 20132]。この iodoacetamide を用いた IBD モデルにおいて、D2 受容体アゴニストが腸における炎症を軽減することが明らかとなった[Tolstanova G, *Dig Dis Sci* 2015]。OLP 治療薬が開発されていない理由として、病態モデル動物が存在しないからであると考えられる。病態モデル動物作製に成功すると、治療薬の開発のための研究を飛躍的に促進できる。研究代表者は炎症性腸疾患モデル動物に着目し、同じ消化管の一部である口腔粘膜に対して、これらの薬剤で処理することで Th17 細胞を誘導し、OLP の病態を模倣することが可能と考えた。

炎症性腸疾患モデル動物の作製で使用する T 細胞性炎症を引き起こすいくつかの薬剤を口腔粘膜に用いて、患者サンプルとの比較を行い、OLP モデル動物の樹立を目指す。さらに新たな治療法として dopamine シグナル制御治療薬の開発の基礎となるデータを出す。

本研究では、今まで確立されていない OLP のモデル動物を作製する点において独創的な研究である。そしてモデル動物および in vitro において D2 受容体アゴニストの有効性が確認されれば、これまで難治性であった OLP の治療薬の開発のための基礎的研究となる。松下博士らの見

出した、D2 様受容体アゴニストがすでに分化した活性化 Th1/Th17 細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制するという現象で特筆すべきは、①既存の治療薬が使えること、②発症後の炎症抑制に有効であること、である。したがって、OLP をすでに発症していても D2 様受容体アゴニストの投与によって OLP を改善する可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、oxazolone, DSS, TNBS, iodoacetamide の4種類の薬剤を用いた IBD モデル動物を参考に、これらの薬剤を口腔粘膜に応用した OLP モデル動物を作製する。OLP 患者より得られた臨床検体と各 OLP 動物モデルの組織像との比較を行い、最も類似した組織像を呈する OLP モデル動物を見出す。また、見出した OLP モデル動物において、D2 受容体アゴニストを投与し、炎症を軽減することができるかどうか検討する。ヒト検体でのサイトカインプロファイリングと比較して類似したプロファイルを示すのかを調べる。

## 3. 研究の方法

OLP を疑い生検を行い、病理診断にて OLP の確定診断を得た患者に対して、生検で作製したスライドを用いて免疫染色を行った。免疫染色として、Th1, Treg, Th17 サブセットに特異的なサイトカインである Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ )、Treg サイトカイン (TGF- $\beta$ )、Th17 サイトカイン (IL-17) について発現を検討した。

一方、動物実験として、Wistar ラット (♀) に対して三種混合麻酔下 (塩酸メドミジン (0.15 mg/kg) ・ミダゾラム (2 mg/kg) ・酒石酸ブトルファンオール (2.5 mg/kg)) にて、両側の頬部粘膜へ薬剤を 50  $\mu$ L 粘膜下に投与した (表 1)。薬剤は 4 種類で、それぞれの溶媒をコントロールとして、各群のラットは Test : N=5、Control : N=5 とした。各群のラットについて、ペントバルビタールナトリウム 100 mg/kg の腹腔内投与による安楽死処分後に、右頬部口腔粘膜をサンプリングし、4% PFA に浸漬して固定し、パラフィン包埋を行い、HE 染色を施行した。

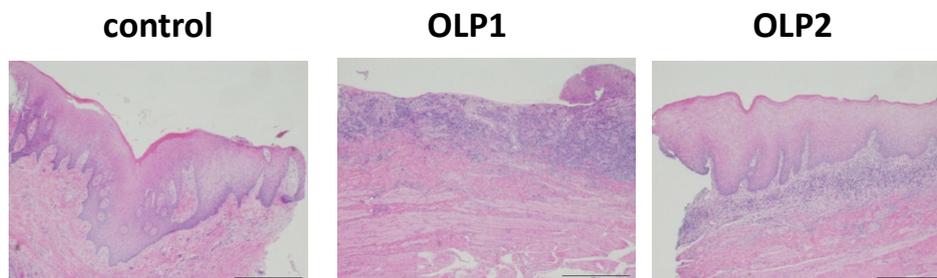
表 1

	薬剤	濃度/用量	溶媒	投与期間	文献
Group 1	Test : Oxazolone	30 mg/mL	50% エタノール	7日間、毎日	Zhang L, Molecules 2020 PMID: 31878303
	Control : エタノール	50%	-	7日間、毎日	
Group 2	Test : Dextran sulfate sodium	5%	水 (精製水)	7日間、毎日	Wadie W, Int J Colorectal Dis 2012 PMID: 22562255
	Control : 水 (精製水)	-	-	7日間、毎日	
Group 3	Test : 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)	30 mg/mL	50% エタノール	28日間、週1回 投与4回	Zhu MY, J Dig Dis 2012 PMID: 22788928
	Control : エタノール	50%	-	28日間、週1回 投与4回	
Group 4	Test : Iodoacetamide	6%	methylcellulose	56日間、週1回 投与8回	Hussein I, World J Gastroenterol 2008 PMID: 18609687
	Control : methylcellulose	-	-	56日間、週1回 投与8回	

## 4. 研究成果

OLP の確定診断を得た患者 (OLP1, OLP2) の生検で作製したスライドを用いて HE 染色を施行した結果を示す (図 3)。

図3. ヒト舌組織 HE染色像



また、IFN- $\gamma$ 、IL-17、TGF- $\beta$ の抗体を用いて免疫染色を行った結果を示す (図 4)。炎症性歯肉であるコントロール群では IFN- $\gamma$ および IL-17 が陽性を示していたことから、Th1 細胞ならびに Th17 細胞の割合が高かったが、OLP 群では陽性の症例と陰性の症例があった。前者は炎症を伴っている OLP で、後者は炎症を伴わない OLP であると推測された。一方で、TGF- $\beta$ はコントロール群では陰性であったが、OLP の 2 症例ともに陽性率が高かった。つまり、OLP では炎症の程度に関わらず、Treg 細胞の割合が高いと考えられた。次に、ラットの頬粘膜への薬剤塗布を行い、組織を採取して HE 染色を施行した結果を示す。Iodoacetamide 処理について図 5、DSS 処理について図 6 に、Oxazolone 処理したものを図 7 に、TNBS 処理したものを図 8 に示す。

図4. ヒト舌組織 免疫染色像

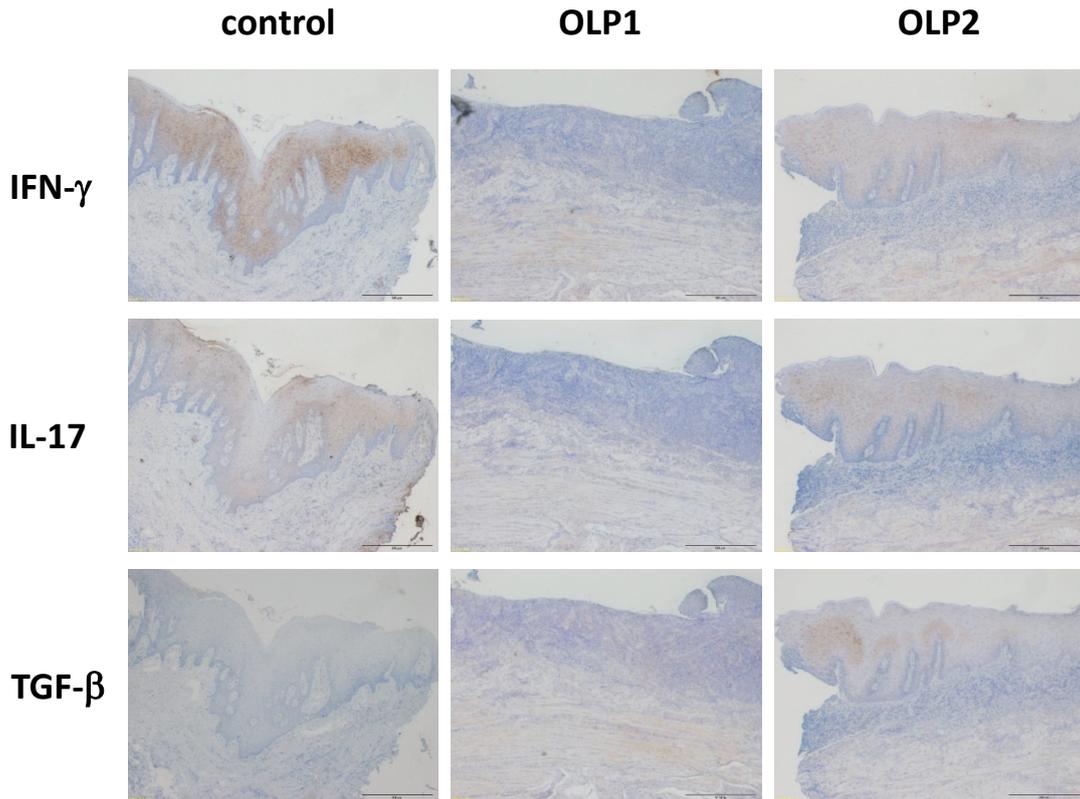


図5. ラット頬粘膜組織 HE染色像(Iodoacetamide 処理)

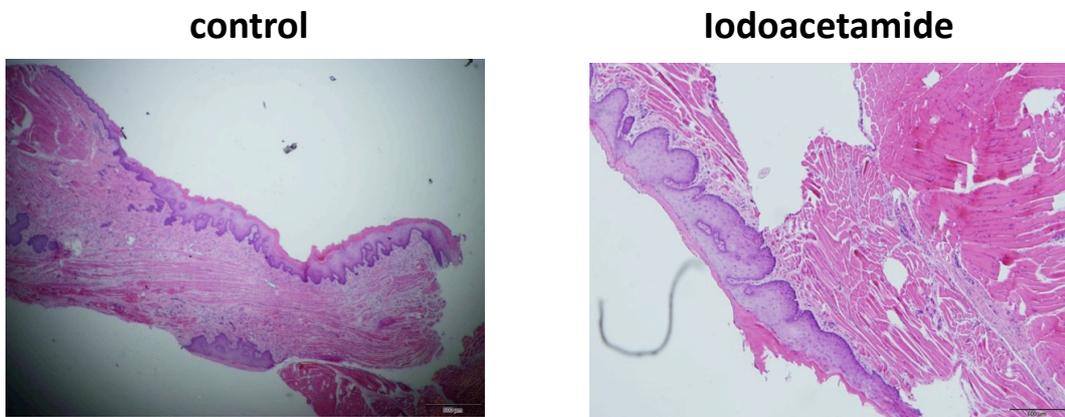


図6. ラット頬粘膜組織 HE染色像(DSS 処理)

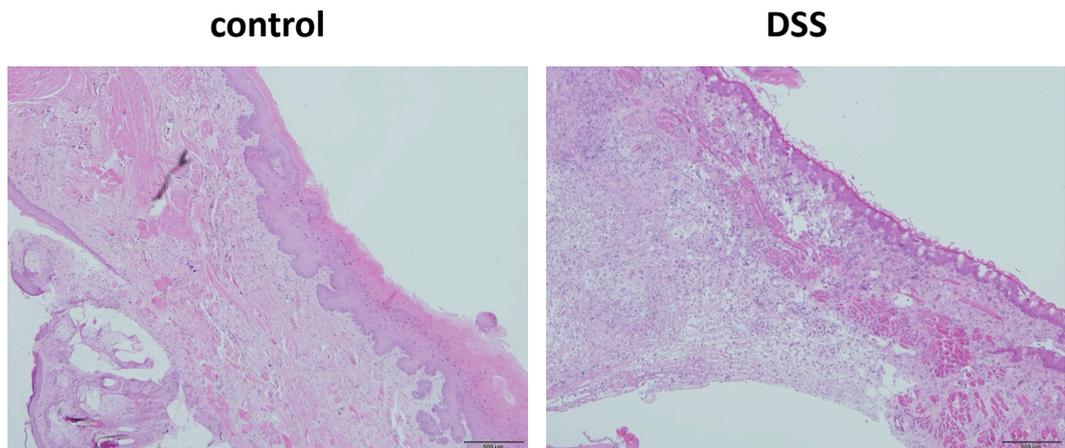


図7. ラット頬粘膜組織 HE染色像(Oxazolone 処理)

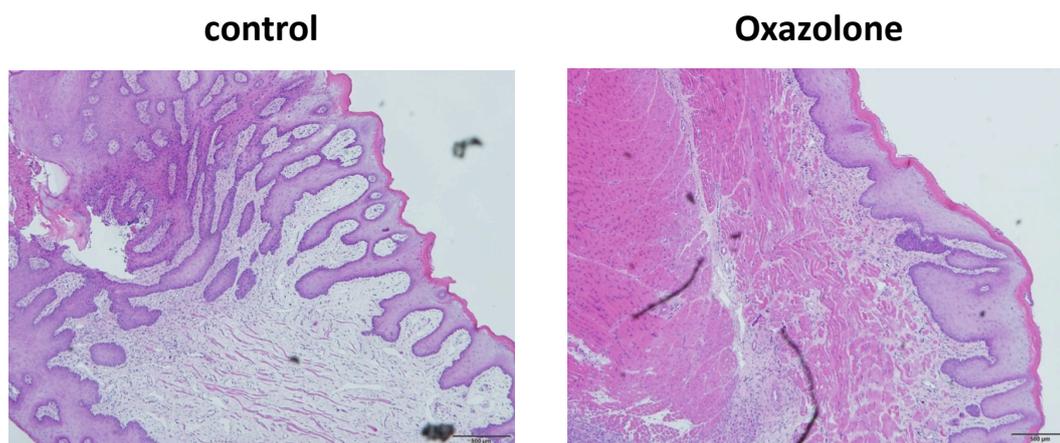
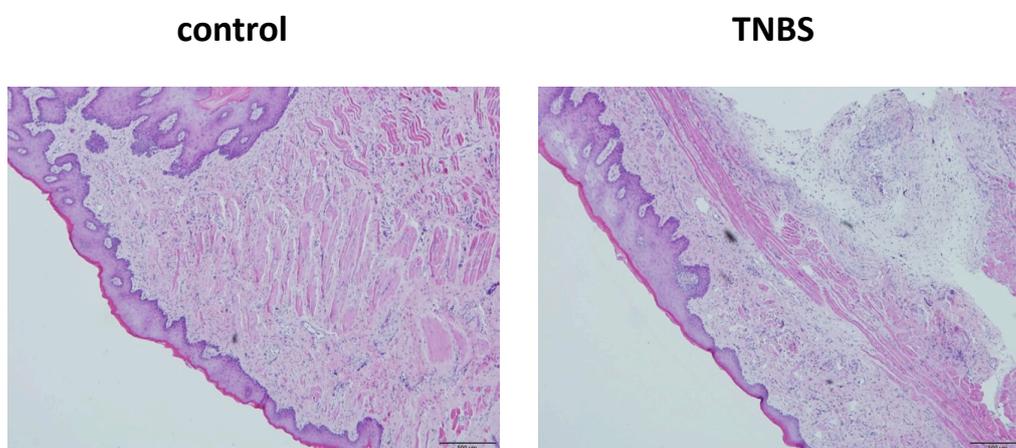


図8. ラット頬粘膜組織 HE染色像(TNBS 処理)



いずれの薬剤処理においても、全体に帯状のリンパ球浸潤という扁平苔癬に特徴的な病理学的所見は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川野 雅章  (Masaaki Kawano)  (30447528)	埼玉医科大学・医学部・准教授   (32409)	
研究分担者	佐藤 毅  (Tsuyoshi Sato)  (60406494)	埼玉医科大学・医学部・准教授   (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関