

II. 分担研究報告

分担課題：金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチドの精製

分担研究者：菅原 俊二 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 教授

研究協力者：黒石 智誠 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 助教

研究要旨

金属アレルギーが誘導され発症に至る過程において、金属イオンと結合する自己タンパク質の存在が不可欠であるが、金属イオンがどのような仕組みで抗原提示されるかという点についてはいまだに解明されていない。そこで、本研究では、金属アレルギーマウスモデルを用いて金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド同定することを最終目標とし、今年度はニッケルイオン感作マウスの抗原提示細胞のMHCクラスII分子の溝に収容されている自己抗原ペプチドの精製方法の確立を目的として研究を行った。その結果、ニッケルイオン感作マウス脾細胞から分離した抗原提示細胞のMHCクラスII分子の溝に収容されているペプチドを約10種類検出することに成功し、来年度に予定しているペプチド同定のための技術的基盤を確立した。

A. 研究目的

金属アレルギーが誘導され発症に至る過程において、金属イオンと結合する自己タンパク質の存在が不可欠であるが、金属イオンがどのような仕組みで抗原提示されるかという点についてはいまだに解明されていない。そこで、本研究では、金属アレルギーマウスモデルを用いて金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチド同定することを最終目標とし、今年度はニッケルイオン感作マウスの抗原提示細胞のMHCクラスII分子の溝に収容されている自己抗原ペプチドの精製方法の確立を目的として研究を行った。

B. 方法

1) MHCクラスII分子の溝に収容されている自己抗原ペプチドの精製

すでに報告のあるSuriらの方法¹を参考に、以下の手順で行った。

遠藤らの方法²に従い、BALB/cマウス(H-2^d、メス4週令、n = 20)をニッケルイオンとLPSで感作し、10日後、脾細胞を調整し、MACSカラムにてCD90(Thy1.2)陽性細胞を除去した。

次に、精製した抗原提示細胞を界面活性剤(MEGA8とMEGA9)で処理し、可溶化画分を調整した。

抗マウスMHCクラスIIモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(M5/114.15.2, rat IgG2b kappa)をATCCより入手した。抗体の特異性はI-A^b, I-A^d, I-A^q, I-E^dおよびI-E^kである。ハイブリドーマをヌードマウスに腹腔注射し、腹水を得た。精製の後、CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flowに結合させ、上記の可溶化画分と反応させた。その後、0.1%トリフルオロ酢酸(pH 1.9)にてMHCクラスII分子と収容溝のペプチドを溶出した。溶出画分は直ちに1.5 M Tris-HCl(pH 8.8)で中性域に調整した。

溶出画分を限外濾過法(10 kDa)により分画し、10 kDa以下の低分子画分を得た。

2) 精製ペプチドの分析

精製した試料を、逆相HPLCカラム(Tosoh TSK ODS 120T, 4.6 × 250 mm, 40°C)にて分析した。溶出条件はEluent A(0.1% trifluoroacetic acid)とEluent B(80% acetonitrile in 0.08% trifluoroacetic acid)を用い、0分でEluent B 0%, 60分でEluent B 100%、溶出速度は1.0 ml/minとし

た。対照として蒸留水を用いた。

C. 結果

感作後の脾細胞 (10^9 細胞) を抗CD90抗体MACSカラムによりT細胞を除去することにより、約半数 (5×10^8 細胞) の抗原提示細胞を得た。可溶化後、抗MHCクラスII分子カラム、限外濾過法により最終的に2 ml ($OD_{280} = 0.03$) の精製サンプルを得た。逆相HPLCカラムの分析により、精製した試料中に約10のピークを得ることができた (図1)。

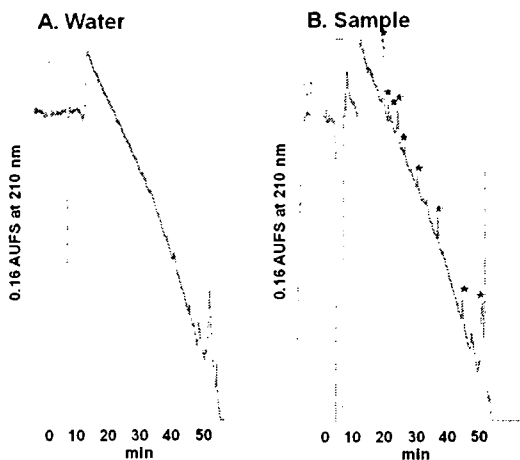


図1 逆相HPLCカラムによる分析

蒸留水をアプライした場合は全くピークは現れないが (A)、精製サンプルをアプライした場合は約10のピーク (*で示す) を得た (B)。

D. 考察

今年度は、予定した実験計画を遂行することにより自己抗原ペプチドを精製できることが判明した。今回入手したハイブリドーマはヌードマウスになかなか生着せず、フローサイトメトリによる検討の結果、精製した抗マウスMHCクラスIIモノクローナル抗体は必ずしも反応性の高いものではなかった。その後の検討により、ハイブリドーマ培養上清から精製した抗体は非常に反応性の高いものであるという結果を得た。今後は、培養上清から大量に抗体を精製することにより、精製の精度とスケールを上げ、対照として非感作マウスの試料も調整する計画である。マウスは100匹ずつを予定している。今

後は、この技術を基盤に精製サンプルをLC/MS/MSにて分析を行い、最終目標を達成する計画である。

E. 結論

金属アレルギー発症に関与する自己抗原ペプチドを同定する方法の技術基盤を確立した。

参考文献

1. Suri A, Walters JJ, Kanagawa O, Gross ML, Unanue ER. Specificity of peptide selection by antigen-presenting cells homozygous or heterozygous for expression of class II MHC molecules: The lack of competition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 5330-5, 2003.
2. Sato N, Kinbara M, Kuroishi T, Kimura K, Iwakura Y, Ohtsu H, Sugawara S, Endo Y. Lipopolysaccharide promotes and augments metal allergies in mice, dependent on innate immunity and histidine decarboxylase. *Clin. Exp. Allergy* 37 (5): 743-751, 2007.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(雑誌)

1. Komine K, Kuroishi T, Ozawa A, Komine Y, Minami T, Shimauchi H, Sugawara S. Cleaved inflammatory lactoferrin peptides in parotid saliva of periodontitis patients. *Mol. Immunol.* 44 (7): 1498-1508, 2007.
2. Kuroishi T, Tanaka Y, Sakai A, Sugawara Y, Komine K, Sugawara S. Human parotid saliva contains soluble Toll-like receptor (TLR) 2 and modulates TLR2-mediated interleukin-8 production by monocytic cells. *Mol. Immunol.* 44 (8): 1969-1976, 2007.

3. Deng X, Yu Z, Funayama H, Yamaguchi K, Sasano T, Sugawara S, Endo Y. Histidine decarboxylase-stimulating and inflammatory effects of alendronate in mice: involvement of mevalonate pathway, TNF α , macrophages, and T-cells. *Int. Immunopharmacol.* 7 (2): 152-161, 2007.
4. Sato N, Kinbara M, Kuroishi T, Kimura K, Iwakura Y, Ohtsu H, Sugawara S, Endo Y. Lipopolysaccharide promotes and augments metal allergies in mice, dependent on innate immunity and histidine decarboxylase. *Clin. Exp. Allergy* 37 (5): 743-751, 2007.
5. Deng X, Wu X, Yu Z, Arai I, Sasano T, Sugawara S, Endo Y. Inductions of histidine decarboxylase in mouse tissues following systemic antigen challenge: contributions made by mast cells, non-mast cells and IL-1. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 144(1): 69-78, 2007.
6. Nishioka T, Kuroishi T, Sugawara Y, Yu Z, Sasano T, Endo Y, Sugawara S. Induction of serum IL-18 with *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide in phagocytic macrophage-inactivated mice. *J. Leukoc. Biol.* 82 (2): 327-334, 2007.
7. Yoshida A, Deng X, Sasano T, Takada H, Sugawara S, Endo Y. Oral bacterial lipopolysaccharide acts in mice to promote sensitisation to ovalbumin and to augment anaphylaxis via platelets. *Arch. Oral Biol.* 52 (10): 990-994, 2007.
8. Minami T, Kuroishi T, Ozawa A, Shimauchi H, Endo Y, Sugawara S. Histamine amplifies immune response of gingival fibroblasts. *J. Dent. Res.* 86 (11): 1083-1088, 2007.
9. Kuroishi T, Endo Y, Muramoto K, Sugawara S. Biotin deficiency up-regulates TNF- α production in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 83 (4): in press, 2008.
10. Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. *J Immunol.* Revised. (書籍)
11. Kuroishi T, Endo Y, Sugawara S. Biotin-deficiency up-regulates TNF- α production in vivo and in vitro. *In Interface Oral Health Science 2007.* (Eds.) M. Watanabe, and O. Okuno. Tokyo, Japan: Springer, 2007. p. 249-254.
12. Nishioka T, Kuroishi T, Yu Z, Sugawara Y, Sasano T, Endo Y, Sugawara S. Phagocytic macrophages do not contribute to the induction of serum IL-18 in mice treated with *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. *In Interface Oral Health Science 2007.* (Eds.) M. Watanabe, and O. Okuno. Tokyo, Japan: Springer, 2007. p. 277-278.
13. Minami T, Kuroishi T, Ozawa A, Endo Y, Shimauchi H, Sugawara S. Histamine amplifies proinflammatory signaling cascade in human gingival fibroblasts. *In Interface Oral Health Science 2007.* (Eds.) M. Watanabe, and O. Okuno. Tokyo, Japan: Springer, 2007. p. 281-282.
14. Sakai A, Kuroishi T, Sugawara Y, Sasano T, Sugawara S. IL-18 expressed in salivary gland cells induces IL-6 and IL-8 in the cells in synergy with IL-17. *In Interface Oral Health Science 2007.* (Eds.) M. Watanabe, and O. Okuno. Tokyo, Japan: Springer, 2007. p. 287-288.
15. Sato K, Kuroishi T, Nishioka T, Sugawara Y, Hoshino T, Sasano T, Sugawara S. Infiltration of immune cells in salivary

gland by IL-18 overexpression in mice. *In Interface Oral Health Science 2007*. (Eds.) M. Watanabe, and O. Okuno. Tokyo, Japan: Springer, 2007. p. 289-290.

16. Sato N, Kinbara M, Kuroishi T, Takada H, Kimura K, Sugawara S, Endo Y. Priming effects of microbial and inflammatory agents in metal allergies. *In Interface Oral Health Science 2007*. (Eds.) M. Watanabe, and O. Okuno. Tokyo, Japan: Springer, 2007. p. 297-298.

2.学会発表 (国内)

1. 1. 南 匠、黒石智誠、小澤亜紀子、遠藤康男、島内英俊、菅原俊二. 炎症性サイトカイン及びLPS刺激によるヒト歯肉線維芽細胞からのIL-8産生誘導におけるヒスタミンの相乗効果とその機序. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
2. 金原正敬、佐藤直毅、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギー：交差反応およびLPSのニッケル濃度におよぼす効果. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
3. 高橋春江、佐藤直毅、金原正敬、黒石智誠、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギー：感作過程における各種微生物成分および炎症性物質の効果. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
4. 佐藤隆太郎、黒石智誠、越後成志、遠藤康男、菅原俊二. ヒスタミンによるヒト単球様細胞におけるNKG2Dリガンド発現抑制. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
5. 黒石智誠、遠藤康男、菅原俊二. ビオチン欠乏に伴うTNF- α 産生増強. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
6. 佐藤恭子、黒石智誠、西岡貴志、菅原由美子、笹野高嗣、菅原俊二. IL-18 Tgマウスにおける唾液腺浸潤リンパ球の解析. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
7. 四釜洋介、鄧 雪、島内英俊、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男. Muramyl-dipeptideによるマウス組織におけるIL-1 β の産生：LPS作用の増強効果との関連性. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
8. 大泉丈史、中目晴子、山口晃史、川村仁、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男. 窒素含有bisphosphonates (NBPs) の壊死作用：clodronate (Clo, non-NBP) による抑制とLPSによる増強. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
9. 中目晴子、大泉丈史、船山ひろみ、山口晃史、川村仁、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男. 窒素含有bisphosphonates (NBPs) の壊死作用：etidronateのNBPs代用薬としての可能性. 第4回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (仙台) 2007年6月4日
10. 大泉丈史、山口晃史、川村仁、菅原俊二、遠藤康男 (口演). 窒素含有bisphosphonates (NBPs) の壊死作用：clodronate (Clo, non-NBP) による抑制とLPSによる増強. 第51回東北大学歯学会 (仙台) 2007年6月22日
11. 大泉丈史、中目晴子、山口晃史、川村仁、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男 (口演). 窒素含有bisphosphonates (NBPs) の壊死作用：clodronate (Clo, non-NBP) による抑制とLPSによる増強. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
12. 佐藤恭子、黒石智誠、西岡貴志、菅原

- 由美子、菅原俊二. IL-18 Tg マウスにおける唾液腺浸潤リンパ球の解析. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
13. 黒石智誠、金原正敬、遠藤康男、菅原俊二. ビオチンによる金属アレルギー炎症の制御. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
14. 金原正敬、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男. マウスにおける金属アレルギー: 交差反応およびLPSのニッケル濃度におよぼす効果. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
15. 高橋春江、金原正敬、黒石智誠、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギー: 感作過程における微生物環境と炎症の効果. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
16. 佐藤隆太郎、黒石智誠、越後成志、遠藤康男、菅原俊二. ヒスタミンによるヒト単球様細胞におけるNKG2Dリガンド発現の抑制. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
17. 四釜洋介、鄧 雪、島内英俊、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男. Muramyl-dipeptideによるマウス組織におけるIL-1 β の産生: エンドトキシンショック (EtXS) 増強効果との関連性. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
18. 中目晴子、大泉丈史、船山ひろみ、山口晃史、川村仁、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男. 窒素含有bisphosphonates (NBPs) の壊死作用: etidronateのNBPs代用薬としての可能性. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
19. 西岡貴志、黒石智誠、菅原由美子、笹野高嗣、遠藤康男、菅原俊二. Keratin 5 (k5)/IL-18トランスジェニックマウスでの唾液腺障害の誘導. 第49回歯科基礎医学会学術大会 (札幌) 2007年8月30、31日
20. 酒井 梓、菅原由美子、黒石智誠、笹野高嗣、菅原俊二 (口演). IL-18はIL-17と共同してシェーグレン症候群患者唾液腺における病態発現に寄与する. 第16回日本シェーグレン症候群研究会 (京都) 2007年9月21、22日
21. 酒井 梓、菅原由美子、黒石智誠、笹野高嗣、菅原俊二. シェーグレン症候群病態発現におけるIL-18とIL-17の関与. 第35回日本臨床免疫学会総会 (大阪) 2007年10月19、20日
22. 金原正敬、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギー: 交差反応およびLPSのニッケル濃度におよぼす効果. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (東京) 2007年11月20~22日
23. 高橋春江、金原正敬、黒石智誠、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男. マウスにおけるニッケルアレルギー: 感作過程における各種微生物成分と炎症性物質の効果. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (東京) 2007年11月20~22日
24. 黒石智誠、金原正敬、遠藤康男、菅原俊二. Modulation of metal allergy by biotin via regulation of IL-1 β production. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (東京) 2007年11月20~22日
25. 四釜洋介、鄧 雪、島内英俊、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男. Muramyl-dipeptideによるマウス組織におけるIL-1 β の産生: エンドトキシンショック増強効果との関連性. 第37回日本免疫学会総会・学術集会 (東京) 2007年11月20~22日
26. 大泉丈史、山口晃史、船山ひろみ、黒石智誠、菅原俊二、遠藤康男. 骨吸収抑制薬bisphosphonates (BP) の壊死作用: 窒素含有BP (NBP) と窒素非含有PB (non-NBP) の作用の違い. 第37回日本

- 免疫学会総会・学術集会（東京）2007年11月20～22日
27. 兪志前、山口晃史、DENG Xue、黒石智誠、一石英一郎、菅原俊二、遠藤康男。Concanavalin A肝炎のLPS前投与による抑制：血小板とマクロファージの関与。第37回日本免疫学会総会・学術集会（東京）2007年11月20～22日
28. 佐藤隆太郎、黒石智誠、遠藤康男、菅原俊二。ヒスタミン刺激によるヒト単球様細胞表面NKG2Dリガンド発現の抑制。第37回日本免疫学会総会・学術集会（東京）2007年11月20～22日
29. 佐藤恭子、黒石智誠、西岡貴志、菅原由美子、星野友昭、菅原俊二。K5/IL-18 Tg マウスにおける唾液腺浸潤細胞の解析。第37回日本免疫学会総会・学術集会（東京）2007年11月20～22日
30. 木山朋美、土谷昌広、西岡貴志、菅原俊二、遠藤康男、渡辺誠。咀嚼様運動負荷によるマウス咬筋でのIL-6発現に関する研究。第52回東北大学歯学会（仙台）2007年12月12日
31. 大泉丈史、山口晃史、菅原俊二、遠藤康男。骨吸収抑制薬bisphosphonates (BPs) による顎骨壊死：基礎研究に基づく発症機序および予防・治療に関する考察。第52回東北大学歯学会（仙台）2007年12月12日

(海外)

32. Kuroishi T, Sato N, Endo Y, Sugawara

S. Biotin modulates metal allergy via regulation of IL-1 beta production. 8th World Congress on Inflammation (Copenhagen, Denmark) 2007年6月16～20日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許第4029988号。ラクトフェリン・ポリペプチドの測定による歯周病リスクの検査方法。発明者：菅原 俊二、小峯 健一。特許権者：菅原 俊二、小峯 健一、株式会社インテリジェント・コスモス研究機構。（2007年10月26日）
2. 特願2005-515538号。ラクトフェリン・ポリペプチド及びその製造法。発明者：菅原 俊二、小峯 健一。出願人：菅原 俊二、小峯 健一、株式会社インテリジェント・コスモス研究機構。
3. Lactoferrin polypeptide, process for producing the same and inflammation inducing substance.
Applicants: Kenichi Komine, Shunji Sugawara
Publication No.: US-2007-0197426-A1
Publication Date: 08/23/2007

分担課題：マウスNiアレルギーモデルにおける交差反応と金属イオン濃度に関する研究

分担研究者：遠藤康男 東北大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学分野 非常勤講師

研究要旨

金属アレルギー成立機序の解析には動物モデルを必要とするが、適切なモデルがなかった。私達はLPSがマウスのpriming (or sensitization) phaseでNiなどの金属に対するアレルギーの成立を著しく促進することを見いだした (Sato et al 2007; Clin Exp Allergy 37:743-751)。便宜的に、このLPS促進性Ni-allergyをNi(+LPS)-allergyと呼称する。LPSはpriming phaseのみならず、elicitation phaseでの炎症反応も促進・増強する。不思議なことに、Ni(+LPS)-allergyはT細胞欠損マウスや免疫不全SCIDマウスでも正常対照マウスと同等に発症する。

本研究では、Ni(+LPS)-allergyの性質を解析する目的で、今回は、Niと他の金属との交差反応、および、elicitation phaseでのNi濃度に及ぼすLPSの効果について検討し、以下の結果を得た。(a) Ni 1 mMとLPS 1 $\mu\text{g/ml}$ の等量混合液で感作したマウスにおいて、Ni, Pd, Cr, Co, Cu, Agはいずれも、数 μM のelicitation濃度で炎症を誘導し、Pd, Cr, Ag, Cuは本来の抗原であるNiよりも強い炎症を誘導した。Cuはそれ自体が他の金属には見られない炎症反応を誘導したが、この炎症が起こらない低濃度でNiと交差反応を示した。(b) Elicitation phaseでの最少有効Ni濃度は、-LPSで 1×10^{-6} M, +LPSで 1×10^{-12} Mであった。

以上の結果は以下を示唆する。(i) 種々の金属がNiと交差反応を誘導したことは、金属-タンパク複合体の立体構造には、金属が違ってかなり共通な部分があり、この部分の認識が交差反応の背景となる可能性を示唆する。今後、金属イオンのパートナーとなる自己の分子の同定には、この点への考慮が必要と思われる。また、“交差反応を示さない金属の組み合わせ”の探索も必要であると思われる。(ii) Elicitationでの最少Ni濃度が +LPSで 1×10^{-12} Mの低濃度になることは、感染や細菌成分が極めて重要な金属アレルギー促進因子になることを示唆する。今後、関連する他の物質 (TLRsやNODsのligandsなど)についても、primingとelicitationの両段階で、その効果を調べる必要がある。(iii) LPS + Niによる感作時での最少Ni濃度は $1 \times 10^{-4} \sim 10^{-3}$ Mであり (Sato et al 上記論文)、この濃度はelicitationでの最少有効濃度 (上述) に比べ極めて高い。このことは、感作成立には比較的高いNi濃度が必要だが、いったん感作が成立すると、極めて低い濃度で、Niはもちろん、Ni以外の種々の金属イオンもアレルギー反応 (炎症) を誘導することを示唆する。

A. 研究目的

金属アレルギー成立機序の解析には動物モデルを必要とするが、適切なモデルがなかった。従って、金属アレルギー研究の多くはヒト感作リンパ球を用いたin vitro実験である。現在、金属アレルギーは通常のハプテンによる接触過敏症と同様に、T細胞主役の疾患と考えられている。通常のハプテンはパートナーとなるタンパク分子と非可逆的な共有結合による複合体を形成して抗原となる。しかし、金属イオンとパートナー分子との抗原複合体は“可逆的”な配位結合により形成される。

従って、抗原プロセッシングも含め、抗原認識機構は単純ではないと思われる。事実、パートナー分子の実体も含め、その詳細は明らかではない。アレルギー反応はpriming (or sensitization) phaseとelicitation phaseからなる。私達はLPSがマウスpriming phaseでNiアレルギーの成立を著しく促進することを見だし、このモデルをNi(+LPS)-allergyと呼称している (Sato et al 2007; Clin Exp Allergy 37:743-751)。LPSはelicitation phaseの炎症反応も促進・増強する。不思議なことに、Ni(+LPS)-allergyはT細胞欠損又

ードマウスや免疫不全 (IgやTCR遺伝子再配列不全) のSCIDマウスでも正常対照マウスと同等に発症する。本研究では, Ni(+LPS)-allergyの性質を解析する目的で, 今回は, (a) Niと他の金属との交差反応, (b) elicitation phaseでのNi濃度に及ぼすLPSの効果, について検討した。

B. 方法

NiCl₂ 溶液と LPS (*E. coli*) 溶液の1:1混合液をBALB/cマウス (6-7週齢♀) に腹腔内注射し (0.25 ml/mouse), 10日後, 金属塩溶液 (LPS添加または非添加) を耳介に皮内注 (20 μl) して, 以後その腫脹を測定した。

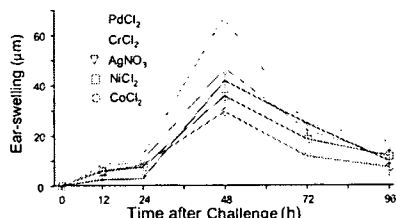
(倫理面への配慮: 本研究は「東北大学における動物実験に関する指針」に従い, 東北大学実験動物委員会の承認を得て行った)

C. 結果

(a) Ni 1 mM とLPS 1 μg/mlの等量混合液でpriming (感作) したマウスにおいて, Ni, Pd, Cr, Co, Cu, Agはいずれも, 数 μMのelicitation濃度で炎症を誘導し, Pd, Cr, Ag, Cu は本来の抗原であるNiよりも強い炎症を誘導した (Fig. 1)。Cuはそれ自体が他の金属には見られない炎症反応を誘導したが, この炎症が起こらない低濃度でNiと交差反応を示した。

Fig. 1. Ni(+LPS)-allergyにおける各種金属イオンとの交差反応

Sensitization: 1:1 mixture of 1 mM NiCl₂ and 1 μg/ml LPS
Challenge: 1 mM 各種金属

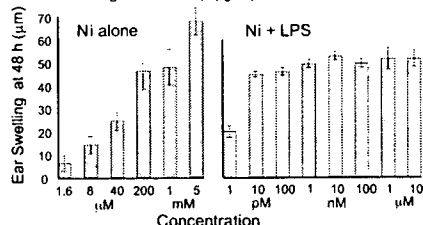


● Pd, Cr, Ag, Co はいずれも交差 allergy 反応を誘導し, Pd, Cr, Ag は, Ni よりも強い炎症を誘導した。
(非感作マウスでは, swelling はみられなかった: データ省略)

(b) Elicitation phaseでの最少有効Ni濃度は, -LPSで 1×10^{-6} M, +LPSで 1×10^{-12} Mであった (Fig. 2)。

Fig. 2. Ni-challenge での Ni 濃度: LPSの効果

Sensitization: 1:1 mixture of 1 mM NiCl₂ and 1 μg/ml LPS
Challenge: Ni ± LPS (1 μg/ml)



● challenge での最少 Ni 濃度
- LPS で 約 10 μM (1×10^{-5} M)
+ LPS で 1 pM (1×10^{-12} M)

D. 考察

(i) 種々の金属がNiと交差反応を誘導したこと

は, 金属-タンパク複合体の立体構造には, 金属が違ってもかなり共通な部分があり, この部分の認識が交差反応の背景となる可能性を示唆する。今後, 金属イオンのパートナーとなる自己の分子の同定には, この点への考慮が必要と思われる。また, “交差反応を示さない金属の組み合わせ”の探索も必要であると思われる。(ii) Elicitationでの最少Ni濃度が +LPSで 1×10^{-12} Mの低濃度になることは, 感染や細菌成分が極めて重要な金属アレルギー促進因子になることを示唆する。今後, 関連する他の物質 (TLRsやNODsのligandsなど) についても, primingとelicitationの两段階で, その効果を調べる必要がある。(iii) LPS + Niによる感作時での最少Ni濃度は $1 \times 10^{-4} \sim 10^{-3}$ M であり (Sato et al 上記論文), この濃度はelicitationでの最少有効濃度 (上述) に比べ極めて高い。このことは, 感作成立には比較的高いNi濃度が必要だが, いったん感作が成立すると, 極めて低い濃度で, Niはもちろん, Ni以外の種々の金属イオンもアレルギー反応 (炎症) を誘導することを示唆する。

E. 結論

Ni-アレルギーの発症とその程度を左右する因子として感染状態が極めて重要であり, また, 金属間の交差反応はかなり広いことが示唆された。背景に述べた知見も含め, 以上の知見は従来の金属アレルギーの理解に再考を促すものと思われ, また, 金属アレルギーの診断と治療には, これらの視点からの配慮が必要であると思われる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Histidine decarboxylase-stimulating and inflammatory effects of alendronate in mice: involvement of mevalonate pathway, TNF α , macrophages, and T-cells. Xue Deng, Zhiqian Yu, Hiromi Funayama, Kouji Yamaguchi, Takashi Sasano, Shunji Sugawara, Yasuo Endo. *Int Immunopharmacol* 2007;7:152-161.
- Inductions of Histidine Decarboxylase in Mouse Tissues Following Systemic Antigen-challenge: Contributions Made by Mast Cells, Non-mast Cells, and IL-1. Xue Deng, Xia Wu, Zhiqian Yu, Iwao Arai, Takashi Sasano, Shunji Sugawara, Yasuo Endo. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;144:69-78.
- Lipopolysaccharide promotes and augments metal allergies in mice, dependent on innate immunity and histidine decarboxylase. Naoki Sato, Masayuki Kinbara, Toshinobu Kuroishi, Kohei Kimura, Yoichiro Iwakura, Hiroshi

- Ohtsu, Shunji Sugawara, Yasuo Endo. Clin Exp Allergy 2007;37:743-751.
4. Oral bacterial lipopolysaccharide acts in mice to promote sensitization to ovalbumin and to augment anaphylaxis via platelets. Atsushi Yoshida, Xue Deng, Takashi Sasano, Haruhiko Takada, Shunji Sugawara, Yasuo Endo. Arch Oral Biol 2007;52:990-994.

2. 学会発表

1. マウスにおける金属アレルギー：交差反応およびLPSのニッケル濃度におよぼす効果. 金原正敬, 黒石智誠, 菅原俊二, 遠藤康男. 免疫学会. 2007年11月, 東京.

分担課題：金属アレルギーにおけるNKレセプターの関与の可能性

分担研究者：小笠原 康悦 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 臨床免疫研究室 室長

研究協力者 笹月健彦 国立国際医療センター 総長

浦野奈央子 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 研究生

田中和沙 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 特任研究員

岩崎之克 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 研究生

研究要旨

金属アレルギーはT細胞依存性のIV型（遅延型）アレルギー反応と考えられているが、その分子機構は不明のままである。しかし最近、T細胞欠損マウスにおいても接触性皮膚炎を発症し、NK細胞が重要な働きをしているという報告があり、NK細胞もT細胞依存性の遅延型過敏反応に関与している可能性が指摘されている。我々は当研究班で開発した金属アレルギー動物モデルを用いて、金属アレルギーの発症にかかわる細胞群およびその相互作用の解明を目標に、NK細胞とNKレセプターの観点から追究している。NKG2DはNK細胞の主たる活性化レセプターであるとともに、T細胞においては共刺激分子としても機能している。我々は、金属アレルギー発症の前後におけるNKG2DおよびそのリガンドのmRNAの発現を定量的PCR法を用いて検出したところ、発症に伴いNKG2DリガンドであるRAE-1の発現が誘導されることを見いだした。今後、NKG2Dおよびそのリガンドの金属アレルギーにおける役割を追究していく予定である。

A. 研究目的

金属アレルギーは我々にとって身近なアレルギー性疾患であり、口内炎、口角炎、舌炎、口腔扁平苔癬などの口腔症状や、接触皮膚炎、掌蹠膿疱症、扁平苔癬、偽アトピー性皮膚炎、顔面湿疹などの全身症状が見られ、患者にとってQOLの著しい低下を招く。金属アレルギーは、ピアスなどの装飾品や、歯科医療で用いられるパラジウム(Pd)、銀(Ag)、銅(Cu)、ニッケル(Ni)など多様な金属を含む合金がその原因となる場合が多い。例えば、口腔内ではこれらの金属がイオン化し、口腔細菌、唾液、血液などのタンパクと結合して抗原性を持つのではないかと考えられている。このように金属アレルギーは、イオン化した金属に細菌成分などがアジュバントとして働き、アレルギーの発症および増悪に関与している可能性が考えられる。しかしなが

らその発症の分子機構は不明である。

金属アレルギーは以前よりT細胞依存性の遅延型過敏反応とされてきた。しかし最近、T細胞欠損マウスにおいても接触性皮膚炎を発症し、NK細胞が重要な働きをしているという報告(Nat Immunol 2006)があり、NK細胞もT細胞依存性の遅延型過敏反応に関与している可能性も指摘されている。我々は、金属アレルギーの発症にかかわる細胞群およびその相互作用を明らかにすることを目的とし、特にNK細胞とNKレセプターの観点からの追究を試みた。

B. 方法

1) 金属アレルギーマウスモデル

当研究班の遠藤らの方法に基づき、NiCl₂(1mM～10mM)、PdCl₂(1mM～10mM)をアジュバントとなるLPS(1 μg/ml～100 μg/ml)またはPBSと等量混

和し、C57BL/6マウスに200~250 μ l腹腔内注射 (i. p.) し、免疫を行った。そして、10日後に誘導 (challenge) として耳介にNiCl₂(1mM, 10mM), PdCl₂(1mM, 10mM)とLPS (1 μ g/ml), PBSをそれぞれ等量混和したもの、controlとしてLPS (1 μ g/ml)、PBSのみを20 μ lずつ皮内注射 (i. d.) を行い、0h, 24h, 48h, 72h, 96hと24時間ごとの耳介の腫脹をDIAL THICKNESS GAUGE (PEACOCK OZAKI MFG. CO., LTD) を用いて測定を行った。

2) NKG2Dおよびそのリガンドの検出

定量的PCR法 (taqman) を用いてNKG2Dリガンドの検出を行った。はじめにcontrolとして感作を行っていないC57BL/6マウスとNKG2Dリガンド (RAE-1) 強制発現トランスジェニックマウスの耳介を用いてRAE-1の発現を、本プライマー、プローブで検出可能か確認した後、上述1)の方法で感作しchallengeを行ったマウスの耳介を経時的に摘出しRAE-1の発現を比較検討した。

定量的PCR法に用いたプライマー、プローブの塩基配列は以下の通りである。

プローブ: FAM-CCA GCA GAT GAA G-MGB (RAE-1 δ), VIC-GCC ACT GGC AAA T-MGB (RAE-1 ϵ), VIC-CTT GCC ATT TTC AAA GAG ACG TTT CAG CC-TAMRA (NKG2D), FAM-CAA ACT TTG CTT TCC CTG GTT AAG CAG TAC AGC-TAMRA (HPRT). PCR プライマー: RAE-1 δ ; sense CAA CTT GAC CAT CAA GGC TCC TA, antisense GAT AAG TAT TTC ACC CAC GAA GCA, RAE-1 ϵ ; sense CAG GTG ACC CAG GGA AGA TG, antisense CTC AAC TCC TGG CAC AAA TCG. NKG2D; sense CGA TTC ACC CTT AAC ACA TTG ATG, antisense GGG ACT T CC TTG TTG CAC AAT AC, HPRT; sense TGG AAA GAA TGT CTT GAT TGT TGA A, antisense AGC TTG CAA CCT TAA CCA TTT TG.

C. 研究結果

1) 金属アレルギーマウスモデル

金属アレルギーマウスモデルの耳介の腫脹は、24~48時間にピークが見られ (図1)、パラジウム (Pd) 感作がニッケル (Ni) 感作より耳介の腫脹が強いことが判明した。また、LPSまたはPBS

単独で皮内に接種を行った耳介に関しては、計測のわずかな誤差があるのみで腫脹は見られなかった (図2)。また、NK細胞の主たる活性化レセプターNKG2Dの発現が減弱しているモデルマウスであるRAE-1トランスジェニックマウスを用いて、パラジウム (Pd) 感作、challengeを行ったところ耳介の腫脹の程度が、controlマウス (C57BL/6) に比べ低いというpreliminaryな結果も得られている。

2) 定量的PCR法を用いたNKG2Dリガンドの検出

金属アレルギーを発症し腫脹した耳介および金属アレルギーを発症しないcontrol群の耳介それぞれを採取、RNAを抽出し、定量的PCR法にてNKG2DリガンドであるRAE-1の発現を測定した結果、control群と比較して、NiCl₂ challengeの耳介でRAE-1が有意に発現していることが明らかになった (図3)。

D. 考察

金属アレルギーマウスモデルにおいて、NKG2Dリガンド (RAE-1) のmRNAの発現が認められたことより、NKG2DリガンドがNKG2Dと作用し、金属アレルギーに関与している可能性が示唆された。NKG2Dは、全てのNK細胞に発現するとともに、T細胞においては活性化T細胞で発現すること、共刺激分子として働くことが知られており、今後、金属アレルギーの発症において、T細胞およびNK細胞の関与と相互作用について検討する必要がある。現在、金属アレルギーを発症したマウスの病理標本を作成中であり、腫脹した耳介に浸潤する細胞群を特定する予定である。preliminaryな結果ではあるが、NKG2Dの発現が低下したマウスにおいて、金属アレルギーが発症しにくいという結果は、我々の仮説をサポートするものと考えられる。さらに、精製した抗NKG2D抗体を用いて、金属アレルギー動物モデルに接種しNKG2Dの阻害による発症の程度を評価することによりNKG2Dの関与を明らかにする予定である。

E. 結論

金属アレルギーマウスモデルの耳介の腫脹は、24～48時間にピークが見られ、パラジウム(Pd)感作がニッケル(Ni)感作より耳介の腫脹が強いことが判明した。また、金属アレルギーマウスの発症部位では、NKG2Dリガンド(RAE-1)の有意な発現が認められた。このことからNKレセプターが金属アレルギーに関与している可能性が示唆された。

F. 研究危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Vilarinho S, Ogasawara K, Nishimura S, Lanier LL, Baron JL. (2007) Blockade of NKG2D on NKT cells prevents hepatitis and the acute immune response to hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(46):18187-92.
2. Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T, Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito N, Kawachi Y, Shibuya K, Otsuka F, Shibuya A, Takahashi S. (2007) Th1 and type 1 cytotoxic T cells dominate responses in T-bet overexpression transgenic mice that develop contact dermatitis. *J Immunol*. 178(1):605-12.

1) 総説論文

1. 著者: Anthony L. DeFranco, Richard M. Locksley, Miranda Robertson
題名: Immunity -The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease Chapter 8, Specialized Lymphocytes in Early Responses and Homeostasis
出版社: Oxford University Press
(翻訳: 小笠原康悦, 監訳: 笹月健彦)
年月: in press
2. 著者: 小笠原康悦
題名: NK activating receptor in

autoimmune diabetes

掲載誌: *Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology* 年月: in press

3. 著者: 小笠原康悦

題名: 発症にかかわる免疫異常

掲載誌: *新時代の糖尿病学* (1) 年月: in press

4. 著者: 小笠原康悦

題名: 自然免疫と適応免疫を繋ぐNK細胞群

掲載誌: *The Frontiers in Medical Sciences*

「免疫応答と免疫病態の統合的分子理解に向けて」年月: 2007

5. 著者: 小笠原康悦

題名: NK細胞の制御シグナルと疾患

掲載誌: *実験医学* Vol 25 頁: 1282-1285
年月: 2007

6. 著者: Lewis L. Lanier (翻訳: 小笠原康悦)

題名: NK活性化レセプター複合体

掲載誌: *実験医学* Vol 25 頁: 1287-1292
年月: 2007

7. 著者: 石崎和沙、小笠原康悦

題名: NK細胞活性化レセプターNKG2Dの生体内における機能

掲載誌: *実験医学* Vol 25 頁: 1321-1325
年月: 2007

2. 学会発表

国外学会

1. Ogasawara K, Ishizaki K, Urano N, Fjiwara N, Sasazuki T. Genomic analysis of RAE-1 genes. 10th Meeting of the Society for Natural Immunity, Cambridge, UK, 2007.
2. Wada H, Kakugawa K, Ogasawara K, Kawamoto H. Notch signaling promotes IFN-g production in NK cell maturation. 10th Meeting of the Society for Natural Immunity, Cambridge, UK, 2007.
3. Ogasawara K, Ishizaki K, Fjiwara N, Sasazuki T. Genomic analysis of RAE-1

genes. 94th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, Miami, USA, 2007.

国内学会

1. Ogasawara K
「NK細胞による骨髄移植拒絶の分子機構」(特別講演) 第1回血液免疫研究会 東京、2007年11月
2. Ogasawara K
「NK細胞の認識機構と骨髄移植」(特別講演) 第60回山梨血液研究会 甲府、2007年10月
3. Ogasawara K
"NKG2D in Autoimmune diabetes"
The first Diabetes Leading-edge Conference. Shizuoka, Aug 4-5, 2007
4. Tanaka K, Urano N, Ogasawara K. Sp1 regulates NKG2D ligand RAE-1 epsilon transcription. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Tokyo, 2007.
5. Wada H, Ogasawara K, Seino K, Kawamoto H. Notch signaling promotes IFN- γ production in NK cell maturation. 37th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Tokyo, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

図1 : PdCl₂,NiCl₂による金属アレルギー発症マウスモデル
 PdCl₂(10mM)+LPS (100 μg/ml) 250 μl i.p. (C57BL/6マウス3匹を対象)
 Challenge : PdCl₂(1mM)+PBS 20 μl i.d.

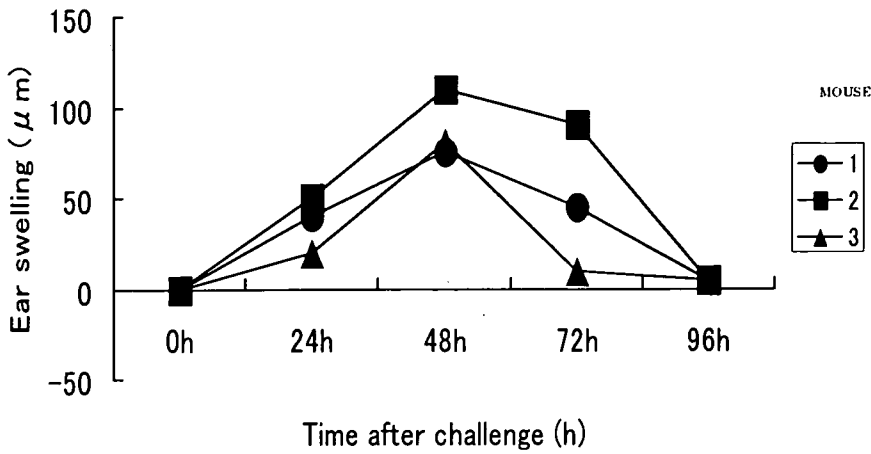


図2 : control L:PBS 20 μl i.d. (1~3)
 PdCl₂(10mM)+LPS (100 μg/ml) 250 μl i.p. ※感作なしC57BL/6マウスとRAE-1発現を比較した。
 (C57BL/6マウス3匹を対象)
 Challenge : PBS 20 μl i.d.

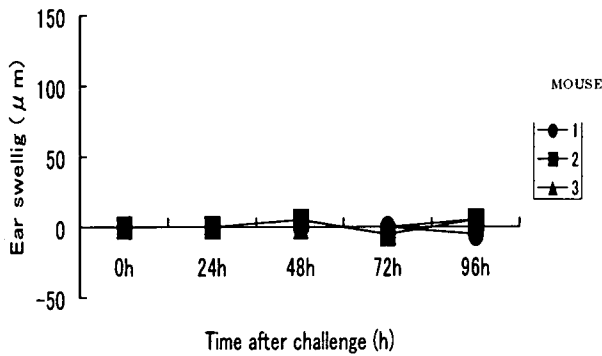
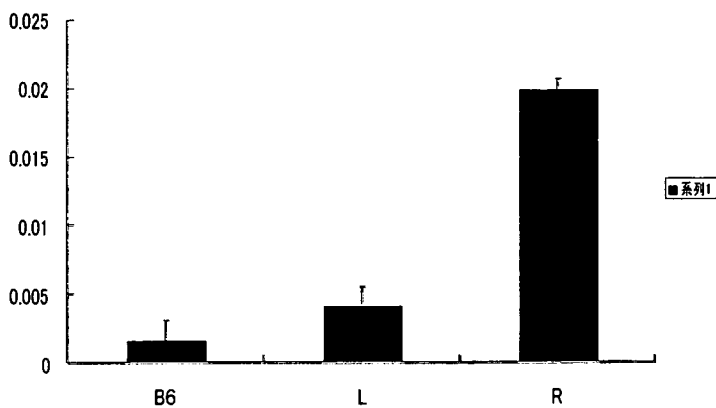


図3 : 定量的PCR法によるNKG2Dリガンドの発現状態

NiCl₂(10mM)+LPS(1 μl) 200 μl i.p.
 Challenge 48h (腫脹ピーク時のRAE-1の発現状態)



R : NiCl₂(10mM)+LPS(1 μl) 20 μl i.d.

分担課題：口腔上皮細胞の自然免疫系と金属アレルギーに関する研究

分担研究者：高田春比古 東北大学大学院、歯学研究科、口腔微生物学分野

研究協力者：上原亜希子 東北大学大学院、歯学研究科、口腔微生物学分野

研究要旨

口腔上皮細胞は微生物をパターン認識する各種Toll-like receptor (TLR)系およびNOD系分子を恒常的に発現している。近年、接触過敏症がT細胞よりもNK細胞に依存して発現するとの報告がなされている。一方、金属イオンの存在下ではMHCクラスI分子の立体構造が変化して、アレルギーを発症するとの説がある。これらの可能性をふまえて我々は「自然免疫系を介して微生物刺激を受けた口腔上皮細胞ではNK活性化リガンドの発現が高まる。NK細胞も自然免疫系を介してNK活性化レセプター発現が高まる。一方、金属イオン存在下では口腔上皮細胞のMHCクラスI分子が変化してNK細胞の抑制が解除される。その結果、口腔上皮はNK細胞の障害を受ける」との作業仮説を立てた。作業仮説のうち、本年度はTLR系ならびにNOD系リガンド刺激を受けた口腔上皮細胞ではNK細胞活性化レセプターのリガンドにあたるMICA/B等の発現が増強されることを明らかにした。

A. 研究目的

我々は口腔上皮の自然免疫系に関して研究を進めてきた。その結果、口腔上皮細胞は各種Toll-like receptor (TLR-2, 3, 4, 7等)やNOD1ならびにNOD2を発現しているが、対応するリガンドで刺激しても炎症性サイトカイン (IL-8, IL-6, MCP-1等)を産生しないことを見出した。他方、同じ条件下で、リガンド刺激に応じて、4種のペプチドグリカン認識タンパク (PGRP-S, I α , I β , L) や β -defensin 2等の抗菌因子産生は明確に増強される。このような知見は常に口腔常在微生物叢に晒されている口腔上皮細胞にあっては合理的な反応と思われる。ちなみに、口腔上皮に護られて、通常は微生物叢と隔離されている歯肉線維芽細胞では、同じリガンド刺激に応じて活発な炎症性サイトカイン応答が認められる。

近年、接触過敏症がT細胞よりもむしろNK細胞に依存して発現するとの報告が注目を集めている。本研究班のテーマである金属アレルギーも接触過敏症と共通のメカニズムが想定されている。一方、金属イオンの存在下ではMHCクラスI分子の立体構造が変化して、IV型アレルギー

を発症するとの説がある。クラスI分子の変化はNK細胞の抑制機構を解除する可能性がある。以上をふまえて、我々は次のような作業仮説を立てた「自然免疫系を介して微生物刺激を受けた口腔上皮細胞ではNK活性化リガンドの発現が高まる。NK細胞も自然免疫系を介してNK活性化レセプター発現が高まる可能性がある。一方、金属イオン存在下では口腔上皮細胞のMHCクラスI分子が変化してNK細胞の抑制が解除される。その結果、口腔上皮はNK細胞の障害を受ける」(図3参照)。

初年度にあたる本年度は、口腔上皮細胞におけるNK活性化レセプターのリガンド発現増強の可能性を検討することにした。

B. 方法

1)培養細胞：口腔上皮細胞株HSC-2を主として供試した。

2)合成リガンド：マイコプラズマ型リポペプチドFSL-1 (TLR2/6リガンド)、poly I:C (TLR3リガンド)、大腸菌型リポドA (TLR4リガンド)、一本鎖RNA (TLR7リガンド)、細菌型CpG DNA

(TLR9リガンド)、FK156 (NOD1リガンド) ならびにムラミルジペプチドMDP (NOD2リガンド) を供試した。

3) 各種TLR系ならびにNOD系リガンドによる口腔上皮細胞のNK活性化レセプターのリガンドとして、MICA/BならびにULBP-1~3の発現動態を遺伝子レベル (real-time PCR)ならびにタンパクレベル (フローサイトメトリーならびに免疫蛍光染色法) で検討した。

C. 結果

各種TLR系ならびにNOD系リガンドによる口腔上皮系細胞株HSC-2の各種NK活性化レセプターリガンド (NKG2Dリガンド) 発現増強を、検討した。その結果、供試した限りの各種TLR系ならびにNOD系リガンドで刺激した口腔上皮細胞では、NK活性化リガンドのうち、ULBP-2, ULBP-3およびMICA/Bの遺伝子発現 (図1) ならびに分子の発現 (図2) が発現は明瞭に増強された。特に、MICA/Bの発現は顕著に増強された。一方、ULBP-1に関しては、増強作用はほとんど認められなかった。

D. 考察

今回得られた成績によって、微生物刺激を受けた口腔上皮細胞にあつては、NK活性化レセプターリガンドシステムを介する傷害作用に対する感受性が高まることが示唆された。

今後は上記作業仮説を実証すべく、①各種TLR系ならびにNOD系リガンドによるNK細胞の活性化レセプター発現増強の検討、②各種金属イオン存在下でのNK細胞による口腔上皮細胞傷害活性の検討、③活性化レセプターを有するNK以外の細胞が関与する可能性も勘案して、口腔上皮細胞傷害の可能性を検討したいと考えている (図3参照)。

E. 結論

各種TLR系ならびにNOD系リガンド刺激によって口腔上皮細胞の各種NK細胞活性化レセプター発現が増強された。

F. 研究危険情報
なし

研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Uehara, A., and H. Takada. 2007. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. *J. Dent. Res.* 86:249-254.

2. Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada. 2007. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* 44:3100-3111.

3. Uehara, A., A. Iwashiro, T. Sato, S. Yokota, and H. Takada. 2007. Antibodies to proteinase 3 prime human monocytic cells via protease-activated receptor-2 and NF- κ B for Toll-like receptor- and NOD-dependent activation. *Mol. Immunol.* 44:3552-3562.

4. Yoshida, A., X. Deng, T. Sasano, H. Takada, S. Sugawara, and Y. Endo. 2007. Oral bacterial lipopolysaccharide acts in mice to promote sensitisation to ovalbumin and to augment anaphylaxis via platelets. *Arch. Oral Biol.* 52:990-994.

5. Tohno, M., W. Ueda, Y. Azuma, T. Shimazu, S. Katoh, J.M. Wang, H. Aso, H. Takada, Y. Kawai, T. Saito, H. Kitazawa. 2008. Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2). *Mol. Immunol.* 45:194-203.

6. Tohno, M., T. Shimazu, H. Aso, A. Uehara, H. Takada, A. Kawasaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Saito, H. Kitazawa. 2008. Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-1 (NOD1) recognizing minimum agonists, *meso*-diaminopimelic acid and *meso*-lanthionine. *Mol. Immunol.* 45:1807-1817.

7. Uehara, A., M. Naito, T. Imamura, J. Potempa, J. Travis, K. Nakayama, and H. Takada. 2008. Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Med. Microbiol.* 57:500-507.
8. Uehara, A., T. Imamura, J. Potempa, J. Travis, and H. Takada. 2008. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* synergistically induce the production of proinflammatory cytokines through protease-activated receptors with Toll-like receptor and NOD1/2 ligands in human monocytic cells. *Cell. Microbiol.* In press
9. Uehara, A., and H. Takada. 2008. Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. *J. Dent. Res.* In press

2) 総説論文

10. 上原亜希子 高田春比古 2007. 口腔細菌と歯周病 — 口腔粘膜の自然免疫系 — *CLINICAL CALCIUM* 17:173-178.
11. 上原亜希子 高田春比古 2007. cANCAによる単球・マクロファージ系細胞活性化 臨床免疫・アレルギー科 48(5):559-563.
12. 上原亜希子 菅原由美子 高田春比古 2007. 口腔粘膜の自然免疫 実験医学 (増刊) 粘膜免疫からの感染と免疫応答機構 体の入口から呼吸器・消化器、生殖器、皮膚までの防御システム 25(20): 3126-3132.

3) 分担執筆等

13. 上原亜希子 高田春比古 2007 抗PR3抗体はPAR-2を介してヒト単球系細胞の各種TLR系およびNOD系発現を高めて自然免疫応答を増強する p. 110-114. 日本エンドトキシン研究会 (上西 紀夫 小川利久 小玉正智 横地高志 谷 徹) 編 エンドトキシン研究10 — 基礎と臨床の最新知見 — 医学図書出版、東京
14. Sugawara, Y., A. Uehara, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Sasano, and H. Takada. 2007. Expression of various Toll-like receptors, NOD1,

and NOD2, in human oral epithelial cells, and their function, p. 225-230. In M. Watanabe & O. Okuno (ed.) *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo.

15. Uehara, A., T. Sato, S. Yokota, A. Iwashiro, and H. Takada. 2007. Antibodies against protease 3 prime human monocytic cells in culture in a protease-activated receptor 2- and NF- κ B-dependent manner for various Toll-like receptor-, NOD1-, and NOD2-mediated activation, p. 237-242. In M. Watanabe & O. Okuno (ed.) *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo.

16. Uehara, A., Y. Fujimoto, A. Kawasaki, K. Fukase, and H. Takada. 2007. *Meso*-diaminopimelic acid and *meso*-lanthionine, amino acids peculiar to bacterial cell-wall peptidoglycans, activate human epithelial cells in culture via NOD1, p. 275-276. In M. Watanabe & O. Okuno (ed.) *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo.

17. Maeda, H., A. Uehara, T. Saito, H. Mayanagi, I. Nagaoka, and H. Takada. 2007. An antibacterial protein CAP18/LL-37 enhanced production of hepatocyte growth factor in human gingival fibroblast cultures, p. 283-284. In M. Watanabe & O. Okuno (ed.) *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo.

18. Sato, N., M. Kinbara, T. Kuroishi, H. Takada, K. Kimura, S. Sugawara, and Y. Endo. 2007. Priming effects of microbial or inflammatory agents in metal allergy, p. 297-298. In M. Watanabe & O. Okuno (ed.) *Interface Oral Health Science 2007*, Springer, Tokyo.

19. 上原亜希子、菅原由美子、高田春比古 2007. 口腔粘膜の自然免疫 実験医学 (増刊) : 粘膜免疫からの感染と免疫応答機構 体の入口から呼吸器・消化器、生殖器、皮膚までの防御システム) 25(20): 3126-3132.

2. 学会発表

1. 上原亜希子、高田春比古

口腔粘膜の自然免疫系、特に細菌細胞壁ペプチドグリカン認識システム

第5回口腔医科学フロンティア（仙台）2007.2.3
プログラム・要旨集 5:12, 2007

(招待講演)

2. Sugawara, Y., A. Uehara, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Sasano, and H. Takada

Functional various Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells

2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 2007.2.18~19

Program and Abstracts of Papers 2:39, 2007

(Selected paper)

3. Sato, N., M. Kinbara, T. Kuroishi, H. Takada, K. Kimura, S. Sugawara, and Y. Endo

Priming effects of microbial or inflammatory agents on metal allergies

2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 2007.2.18~19

Program and Abstracts of Papers 2:39, 2007

4. Uehara, A., A. Iwashiro, T. Sato, S. Yokota, and H. Takada

Protease-activated receptor 2- and NF- κ B-dependent manner for CD14-, various Toll-like receptors-, NOD1-, and NOD2-mediated activation

2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 2007.2.18~19

Program and Abstracts of Papers 2:38, 2007

(Selected paper)

5. Uehara, A., Y. Fujimoto, A. Kawasaki, K., Fukase, and A. H. Takada

Meso-Diaminopimelic acid *meso*-lanthionine, amino acids peculiar to bacterial cell-wall peptidoglycans, activate human epithelial cells in culture via NOD1

2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 2007.2.18~19

Program and Abstracts of Papers 2:38, 2007

6. Maeda, H., A. Uehara, T. Saito, H. Mayanagi, and H. Takada

An antibacterial protein CAP18/LL-37 enhanced

production of hepatocyte growth factor in human gingival fibroblast cultures.

2nd International Symposium for Interface Oral Health Science (Sendai) 2007.2.18~19

Program and Abstracts of Papers 2:47, 2007

7. 上原亜希子、高田春比古

抗proteinase 3抗体はPAR-2, NF- κ Bを介してヒト単球系細胞のTLR系およびNOD系分子発現を高めて自然免疫応答を増強する

第5回感染症沖縄フォーラム（沖縄）2007.2.22~24

プログラム・講演要旨 5: 9, 2007

8. 上原亜希子、高田春比古

抗PR3抗体はヒト単球系細胞の各種TLR系とNOD系分子発現を高めて自然免疫応答を増幅する

第80回日本細菌学会総会(大阪) 2007.3.26~28

日本細菌学雑誌 80: 62, 2007

9. 高田春比古、上原亜希子

ヒト歯肉線維芽細胞のToll-like receptor系およびNOD系分子発現とその機能

第80回日本細菌学会総会(大阪) 2007.3.26~28

日本細菌学雑誌 80: 168, 2007

10. 前田 瞳、上原亜希子、長岡 功、高田春比古

塩基性抗菌ペプチドCAP18/LL-37による肝細胞増殖因子(HGF)産生増強

第80回日本細菌学会総会(大阪) 2007.3.26~28

日本細菌学雑誌 80: 168, 2007

11. Sugawara, T., A. Uehara, Y. Fujimoto, S. Kusumoto, K. Fukase, T. Sasano, and H. Takada

Functional toll-like receptors and NODs in human oral epithelial cells

1st Congress of the Society of Innate Immunity (Ankara, Turkey) 2007. 3.13~16

Experimental and Clinical Transplantation 5(suppl): 5, 2007

(Oral presentation)

12. Uehara, A., and H. Takada

Antibodies against proteinase 3 (PR3) prime human monocytic cells in a protease-activated receptor (par)-2- and NF- κ B-dependent manner for CD14-,

various Toll-like receptors, NOD1-, and 2-mediated activation.

1st Congress of the Society of Innate Immunity(Ankara, Turkey) 2007. 3.13~16

Experimental and Clinical Transplantation 5(suppl): 7, 2007

(Oral presentation)

13. Natsuka M., A. Uehara, and H. Takada

A polymer-type water-soluble peptidoglycan exhibited both toll-like receptor 2- and NOD2-agonistic activities, resulting in synergistic activation of human monocytic cells

1st Congress of the Society of Innate Immunity(Ankara, Turkey) 2007. 3.13~16

Experimental and Clinical Transplantation 5(suppl): 11, 2007

(Oral presentation)

14. 高橋春江、佐藤直毅、金原正敬、黒石智誠、高田春比古、菅原俊二

マウスにおけるニッケルアレルギー：感作過程における各種微生物成分および炎症性物質の効果

第4回東北バイオサイエンスシンポジウム（仙台）2007. 6.4

講演要旨集 5: 186, 2007

15. 上原亜希子、佐藤 匡、横田 聡、岩城篤志、高田春比古

抗proteinase 3抗体はPAR-2を介してヒト単球系細胞の各種TLR系およびNOD系分子の発現を高めて自然免疫応答を増幅する

第4回東北バイオサイエンスシンポジウム（仙台）2007. 6.4

講演要旨集 5: 188, 2007

16. 萩原資久、上原亜希子、横山成邦、宮田 剛、高田春比古

NOD1ないしNOD2リガンドでプライムされたマウスでは様々なTLRリガンド刺激に対するサイトカイン応答が亢進する

第4回東北バイオサイエンスシンポジウム（仙台）2007. 6.4

講演要旨集 5: 189, 2007

17. 四釜洋介、鄧 雪、島内英俊、高田春比古、

菅原俊二、遠藤康男

Muramyl-dipeptideによるマウス組織におけるIL-1 β の産生：LPS作用の増強効果と関連性

第4回東北バイオサイエンスシンポジウム（仙台）2007. 6.4

講演要旨集 5: 194, 2007

18. Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada

Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce antimicrobial peptides, but not proinflammatory cytokines

13th International Congress of Mucosal Immunology (Tokyo) 2007. 7.9~12

Program and Abstracts of Papers p. 299, 2007

19. 四釜洋介、鄧 雪、島内英俊、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男

ムラミルジペプチド(MDP)投与マウスでは各種臓器でIL-1 β 産生が誘導される

第61回日本細菌学会東北支部総会（仙台）2007. 8.23~24

日本細菌学会東北支部総会講演要旨集 61: 22, 2007

20. 高田春比古

歯学領域の自然免疫研究

第49回歯科基礎医学会総会(札幌) 2007. 8.29~31
歯基礎誌49: 67, 2007

(シンポジウム)

21. 上原亜希子、内藤真理子、中山浩次、高田春比古

*Porphyromonas gingivalis*の産生するジンジパインHRgpAとKgpはヒト口腔上皮細胞のIL-8産生を抑制する

第49回歯科基礎医学会総会(札幌) 2007. 8.29~31

歯基礎誌49: 95, 2007

(シンポジウム)

22. 高橋春江、金原正敬、黒石智誠、高田春比古、菅原俊二、遠藤康男

マウスにおけるニッケルアレルギー：感作過程における微生物環境と炎症の効果

第49回歯科基礎医学会総会(札幌) 2007. 8.29~31