

- 歯基礎誌49: 129, 2007
23. 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 $\beta$ 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回歯科基礎医学会総会(札幌) 2007. 8.29~31  
歯基礎誌49: 130, 2007
24. 高田春比古、上原亜希子  
ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)のToll-like receptor(TLR)系およびNOD系分子とその機能  
第49回歯科基礎医学会総会(札幌) 2007. 8.29~31  
歯基礎誌49: 157, 2007
25. 前田 瞳、上原亜希子、高田春比古  
ヒト $\beta$ ディフェンシン3(hBD3)はヒト歯肉線維芽細胞の肝細胞増殖因子(HGF)産生を増強する  
第49回歯科基礎医学会総会(札幌) 2007. 8.29~31  
歯基礎誌49: 207, 2007  
(ワークショップに選ばれて口演)
26. Takada, H., M. Hagiwara, H. Funayama, and A. Uehara.  
Enhancement of TLR-mediated innate immune responses by NOD1/2 signaling  
7<sup>th</sup> Awaji International Forum Infection and Immunity (Hyogo) 2007. 9.1~5  
Program and Abstracts of Papers p.46, 2007  
(Invited speaker)
27. Uehara, A., T. Sato, A. Iwashiro, S. Yokota, and H. Takada  
Crosstalk between protease-activated receptor and TLRs/NODs in innate immunity  
20<sup>th</sup> Naito Conference (Shonan) 2007.10.9~12  
Innate Immunity in Medicine and Biology [III] p.96, 2007
28. 上原亜希子、高田春比古  
プロテアーゼ活性化受容体(PAR)と各種TLR系およびNOD系リガンド刺激はヒト単球系細胞を相乗的に活性化する  
第13回日本エンドトキシン研究会(鹿児島) 2007. 10.19~20  
プログラム・講演抄録集 13: 24, 2007
29. 上原亜希子  
エンドトキシンを始めとする菌体成分とヒト上皮組織の自然免疫系に関する研究  
第13回日本エンドトキシン研究会(鹿児島) 2007. 10.19~20  
プログラム・講演抄録集 13: 2007  
(日本エンドトキシン研究会奨励賞 受賞記念講演)
30. 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および炎症性物質の効果  
第37回日本免疫学会学術総会・学術集会(東京) 2007.11.20~23  
日本免疫学会学術総会・学術集会記録 37:101 2007
31. 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 $\beta$ 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回日本免疫学会学術総会・学術集会(東京) 2007.11.20~23  
日本免疫学会学術総会・学術集会記録 37:161 2007
32. 上原亜希子、平林泰彦、高田春比古  
抗proteinase 3抗体およびWegener肉芽腫症患者血清はヒト末梢血単核球の各種TLR系、NOD系発現を高めて自然免疫応答を増幅する  
第37回日本免疫学会学術総会・学術集会(東京) 2007.11.20~23  
日本免疫学会学術総会・学術集会記録 37:271 2007
33. Takada H  
Bacterial peptidoglycan and innate immunity  
4<sup>th</sup> Lyon-Tohoku Engineering & Science Forum towards the Joint Laboratory (Sendai) 2007.12.13~14  
Program and Abstracts of Papers p. 26, 2007  
(Invited speaker)
34. 上原亜希子、今村隆寿、Jan Potempa、James Travis、高田春比古

*Porphyromonas gingivalis*が産生するジンジパインとTLR系およびNOD1/2リガンド刺激は単球系細胞を相乗的に活性化する

第6回感染症沖縄フォーラム（沖縄）2008.2.14~16

プログラム・講演要旨集 6: 10, 2008

35. 高田春比古

Overview: ペプチドグリカンの免疫生物活性研究の歴史

第81回日本細菌学会総会(京都) 2008.3.24~26

日本細菌学雑誌 63: 45, 2008

(シンポジウム)

36. 上原亜希子

上皮組織の自然免疫系、特にペプチドグリカン認識システム

第81回日本細菌学会総会(京都) 2008.3.24~26

日本細菌学雑誌 63: 46, 2008

(シンポジウム)

37. 佐藤 匡、遠藤康男、高田春比古

NOD1アゴニストFK565の鎮痛作用

第81回日本細菌学会総会(京都) 2008.3.24~26

日本細菌学雑誌 63: 80, 2008

38. 岩城篤史、佐藤 匡、横田 聡、上原亜希子、高田春比古

PR3-ANCAはヒト単球の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81回日本細菌学会総会(京都) 2008.3.24~26

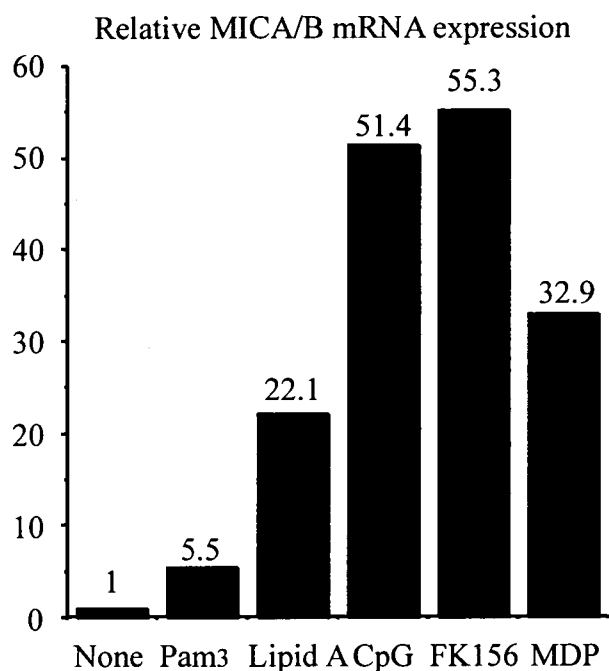
日本細菌学雑誌 63: 80, 2008

39. 上原亜希子、今村隆寿、高田春比古

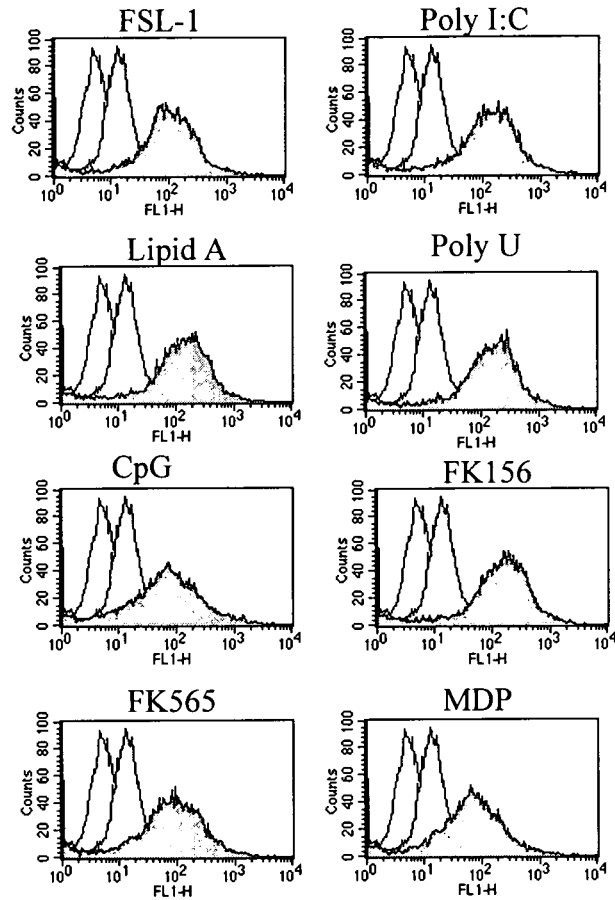
プロテアーゼ活性化受容体(PAR)とTLRおよびNOD1/2刺激はヒト単球を相乗的に活性化する

第81回日本細菌学会総会(京都) 2008.3.24~26

日本細菌学雑誌 63: 81, 2008

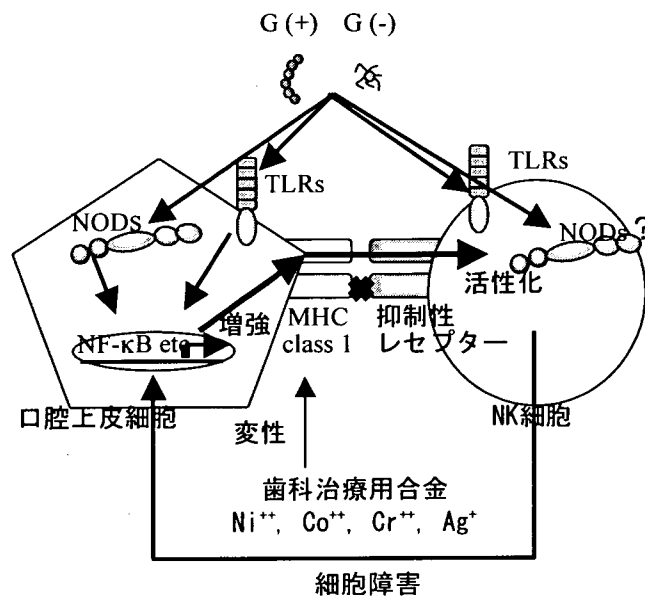


**図1** : TLR系およびNOD系リガンド刺激は口腔上皮細胞のMICA/B遺伝子発現を増強する  
 口腔上皮系HSC-2細胞をPam3CSSNA (100 pg/ml), lipid A (100 ng/ml), FK156 (100 µg/ml)およびMDP (100 µg/ml)で刺激し、8時間後にTotal RNA抽出しreal-time PCR法によりMICA/B遺伝子発現を検討した。データはハウスキーピング遺伝子GAPDHの成績で補正して表示した。  
 (小笠原康悦博士の協力を得て測定)



**図2** : TLR系およびNOD系リガンド刺激は口腔上皮細胞のMICA/B発現を増強する

口腔上皮系HSC-2細胞をFSL-1 (100 pg/ml), poly I:C (10 ng/ml), lipid A (100 ng/ml), poly U (100 μg/ml), CpG DNA (10 μM), FK156 (100 μg/ml), FK565 (100 μg/ml)およびMDP (100 μg/ml)で刺激し、24時間後に細胞を回収しフローサイトメトリーにて細胞膜上のMICA/B発現を検討した。



**図3**：TLR系およびNOD系を介する刺激はNK細胞の活性化レセプター発現を増強し（今後の課題）、口腔上皮細胞のNK活性化リガンド発現を増強する（今回証明）。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（今後の課題）。その結果、金属イオンと微生物に晒された口腔上皮はNK細胞によって障害される（今後の課題）。

分担課題：TLRによる抗原提示細胞の活性化と金属アレルギー発症との関連性に関する研究

分担研究者：西屋 禎 北海道大学大学院医学研究科、生理系薬理学講座、細胞薬理学分野 講師

### 研究要旨

金属アレルギーの発症には、金属イオンにより影響を受けた蛋白質由来ペプチド-MHC複合体のT細胞への提示が重要であり、これによるT細胞の活性化には補助刺激分子の相互作用が必須である。抗原提示細胞上の補助刺激分子の発現は、Toll様受容体 (TLR) による細菌成分の認識により著しく増大するが、この発現増強作用と金属アレルギーとの関連性は明確でない。本研究では、1) TLR4とTLR5が補助刺激分子とMHC分子の発現を高レベルに増強する、2) 細胞毒性を示さない濃度の金属イオンはTLRによる補助刺激分子とMHC分子の発現増強作用には関与しない、ことを明らかにした。

#### A. 研究目的

ニッケルやコバルト、パラジウムといった金属が引き起こす金属アレルギー発症の分子メカニズムとして、金属イオンにより影響を受けた蛋白質由来ペプチド-MHC複合体のT細胞への抗原提示とその活性化が深く関与することが示唆されている<sup>1,2</sup>。一般的に、T細胞への抗原提示は、マクロファージや樹状細胞、さらには皮下に存在するランゲルハンス細胞といったプロフェッショナル抗原提示細胞により行われ、その際にMHCやT細胞受容体の他に補助刺激分子 (CD28とB7 (CD80およびCD86)) が重要な役割を果たしている。B7は抗原提示細胞に発現しており、これらの発現は各種細菌成分の存在下で著しく増大することがわかっている (図1)。抗原提示細胞に発現するToll様受容体 (TLR) は各種細菌成分を認識し、自然免疫および獲得免疫反応を活性化する<sup>3</sup>。TLRは現在ヒトで約10種類同定されているが、各々結合する細胞内アダプター分子が異なり、その結果発現する生理作用も異なっている<sup>4</sup>。本研究では、TLRを介した自然免疫反応と金属アレルギー発症との関連性を明確にする目的の一つとして、抗原提示細胞においてB7及びMHC class II分子の発現を最も高レベルに誘導するTLRの同定を試みた。さらに、TLRを介したB7及びMHC class II分子の発現増

強作用における金属イオンの効果を検討する研究を行った。

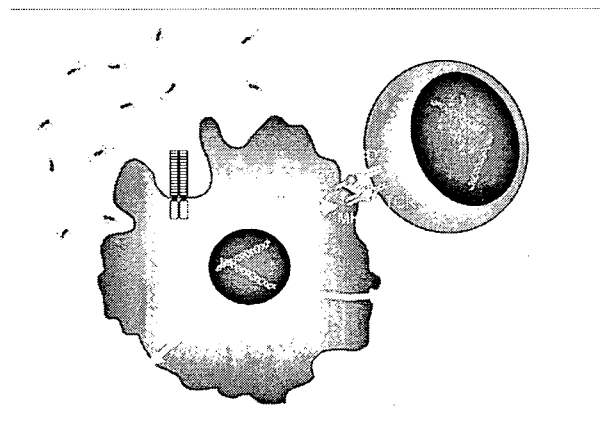


図1. 細菌感染における抗原提示細胞とT細胞の相互作用。

#### B. 研究方法

1) TLR4欠損マウス由来樹状細胞 (ScN-BMDC) の調製とTLRキメラ受容体の導入  
TLR4遺伝子座を欠損していることが明らかにされているC57BL/10ScNマウス<sup>5</sup>から骨髓細胞を調製し、10 ng/ml GM-CSF存在下で二日間培養した。その細胞にIRES-GFPシステムを持つレトロウイルスベクターを用いてTLRキメラ受容体 (TLR4の細胞外部分と他のTLRの細胞膜及び細胞質部分を結合したキメラ受容体、図2)<sup>6</sup>を導入し、さらに4日間GM-CSFの存在下で培養し

た。細胞を回収し、CD11cの発現を調べたところ、ほぼ100%の細胞がCD11c+であった。また、レトロウイルスの感染効率を調べた結果、約30%の細胞がGFP+であった。

## 2) TLRキメラ受容体を介した樹状細胞の活性化

TLRキメラ受容体を発現したScN-BMDCをTLRキメラ依存的に活性化するために、TLR4のリガンドであるLPS (20 ng/ml) を培養液中に加えて24時間培養した。細胞を回収した後phycoerythrin-conjugated-anti-CD80、CD86、およびMHC class II antibodyを用いて染色し、フローサイトメーターを用いてそれらの分子の発現レベルを解析した。

## 3) 樹状細胞に対する金属塩の毒性の検討

C57BL/6マウスの骨髄細胞を10 ng/ml GM-CSF存在下で6日間培養して調製した樹状細胞 (B6 BMDC) に各濃度の金属塩 (NiCl<sub>2</sub>およびPdCl<sub>2</sub>) を加えて24時間培養した。細胞を回収した後7-AADを用いて染色し、フローサイトメーターを用いて死細胞の割合を測定した。

## 4) TLR4を介した樹状細胞の活性化における金属イオンの影響

(3) のように調製したB6 BMDCに125 μM PdCl<sub>2</sub>と20 ng/ml LPSを加えて24時間培養した。細胞を回収した後、(2)と同様の方法により染色し、CD80、CD86、及びMHC class II分子の発現レベルを解析した。

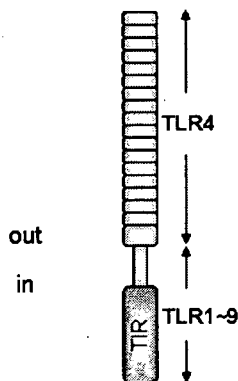


図2. TLRキメラ受容体. TLR4の細胞外領域と他のTLR (TLR1~TLR9) の細胞膜及び細胞質ドメインを融合したキメラ受容体。

## C. 研究結果

### 1) 補助刺激分子の発現を高レベルに増強するTLRの同定

TLRのシグナリングは、TLRの細胞質領域の大部分を占めるToll-interleukin 1 receptor-resistance (TIR) domainにより下流に伝達される<sup>4</sup>。我々は、各TLRに特異的なシグナリングの活性化と生理作用を検討するために、TLRキメラ受容体を作製した(図2)<sup>6</sup>。このキメラ受容体をTLR4欠損細胞に発現させ、TLR4のリガンドであるLPSで刺激することにより、各TLRに特異的な細胞応答を解析することができる<sup>6</sup>。そこで、最も高レベルに補助刺激分子の発現を増強するTLRを同定するために、各TLRキメラ受容体を発現させた骨髄由来樹状細胞をLPSで刺激し、CD80、CD86、及びMHC class II分子の発現レベルを解析した。その結果、TLR4及びTLR4/TLR5キメラを発現した樹状細胞においてこれらの分子の発現レベルが著しく増大することがわかった(図3)。一方、TLR4/TLR1、TLR4/TLR2、またはTLR4/TLR6キメラを発現したScN-BMDCでは発現レベルの増大は観察されなかった。

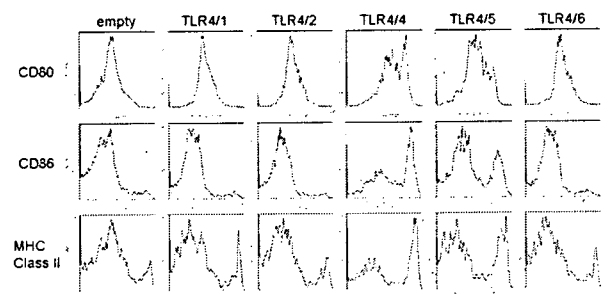


図3. TLRキメラ受容体を介した補助刺激分子及びMHC class II分子の発現増強作用. 細点線、無刺激；太実線、LPS刺激。

### 2) TLR4を介した補助刺激分子とMHC class II分子の発現増強に及ぼす金属イオンの影響

金属アレルギーを引き起こすニッケルやパラジウムの樹状細胞活性化に及ぼす効果を検討するために、まず初めに樹状細胞をこれらの金属塩で処理し、その細胞毒性を検討した。その結果、0.5 mM以上の濃度のNiCl<sub>2</sub>及びPdCl<sub>2</sub>で処理したB6 BMDCは7-AAD陽性を示した(図4)。TLR4を介したCD80、CD86、及びMHC class II分子の発現増強作用に対して、細胞毒性を示さない0.25 mMのPdCl<sub>2</sub>において検討した結果、金属塩

単独処理により補助刺激分子及びMHC class II分子の発現レベルは影響を受けず、また金属塩はLPSによるこれらの分子の発現増強作用にも影響を与えなかった(図5)。

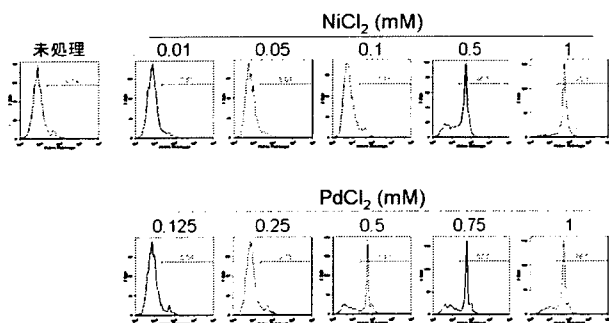


図4. 樹状細胞に対する金属塩の毒性。

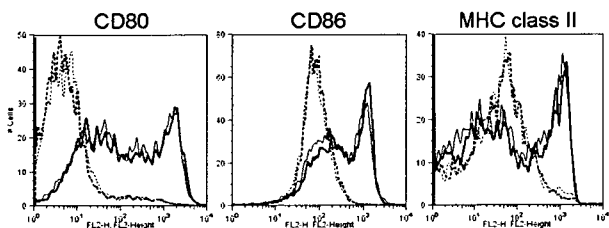


図5. TLR4を介した補助刺激分子及びMHC class II分子の発現増強におけるPdCl<sub>2</sub>の効果. 細点線、無刺激；太点線、125 μM PdCl<sub>2</sub>；細実線、LPS；太実線、PdCl<sub>2</sub>+LPS。

#### D. 考察

TLRファミリー分子のシグナリングは、細胞質に存在する4種類のTIRアダプター分子により下流に伝達される。TIRアダプターはそれぞれ異なるシグナル経路を活性化し、異なる細胞応答を誘導する。今回、TLR4とTLR5がCD80、CD86、及びMHC class II分子の発現を効果的に増強することがわかり、これらのリガンドが金属イオンにより影響を受けた蛋白質由来ペプチド-MHC複合体のT細胞への提示を効果的に誘導しうることが示唆された。また、金属塩がCD80、CD86、及びMHC class II分子の発現に影響を与えなかったことから、金属イオンは補助刺激分子やMHC分子の発現増強を介してT細胞の活性化を誘導する可能性は低いことがわかった。また、0.5 mM以上の濃度の金属塩が細胞死を誘導したことから、ピアスなど直接金属と皮膚が接

触するような状況において、高濃度の金属イオンにより暴露された細胞からタンパク質の漏出が起こり、これにより抗原性の高い金属イオン-蛋白質結合体が生成される可能性が示唆された。今後、金属イオンにより誘導される細胞死の分子機構およびその金属アレルギー発症における役割について検討する予定である。

#### E. 結論

TLR4とTLR5が樹状細胞上に補助刺激分子ならびにMHC分子を高レベルに発現誘導することがわかった。この発現増強作用に金属イオンは直接的には関与しないことが明らかとなった。また、一定濃度以上の金属イオンが樹状細胞の細胞死を誘導することがわかった。

#### 参考文献

1. Sinigaglia, F. The molecular basis of metal recognition by T cells. *J Invest Dermatol* **102**, 398-401 (1994).
2. Thierse, H.J., Gamerding, K., Junkes, C., Guerreiro, N. & Weltzien, H.U. T cell receptor (TCR) interaction with haptens: metal ions as non-classical haptens. *Toxicology* **209**, 101-7 (2005).
3. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **1**, 135-45 (2001).
4. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
5. Poltorak, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-8 (1998).
6. Nishiya, T. & DeFranco, A.L. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**, 19008-17 (2004).

#### F. 研究危険情報

なし



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nishiya T et al. Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88. *FEBS Lett.* 581, 3223-3229 (2007).
2. Maekawa S. et al. OCTN2VT, a splice variant of OCTN2, does not transport carnitine because of the retention in the endoplasmic reticulum caused by insertion of 24 amino acids in the first extracellular loop of OCTN2, *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1773, 1000-1006 (2007).
3. Horinouchi T. et al. Endothelin-1 decreases  $[Ca^{2+}]_i$  via  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger in CHO cells stably expressing endothelin  $ET_A$  receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 566, 28-33 (2007).
4. Horinouchi T. et al. Characterization of noradrenaline-induced increases in intracellular  $Ca^{2+}$  levels in Chinese hamster ovary cells stably expressing human  $\alpha_1A$ -adrenoceptor. *J. Pharmacol. Sci.* 105, 103-111 (2007).

### 2. 学会発表 (国内)

1. 三輪聡一、堀之内孝広、西本新、西屋禎：循環系調節因子としてのエンドセリンにより活性化される細胞内カルシウムシグナルとその調節系、第11回日本適応医学会・学術集会、札幌、2007年6月8～9日
2. 西本新、魯凌云、西屋禎、堀之内孝広、梶田絵美、三輪聡一：新規エンドセリンA型受容体結合蛋白質Jab1はその受容体発現レベルとシグナル伝達を制御する、第11回日本適応医学会・学術集会、札幌、2007年6月8～9日
3. 前川聡、森大輔、西屋禎、堀之内孝広、西本新、梶田絵美、三輪聡一：有機カチオントランスポーターOCTN2のスプライスバリエント(OCTN2VT)の単離と機能解析、第21回北海道薬物作用談話会、札幌、2007年7月28日
4. 朝野拓史、堀之内孝広、西屋禎、西本新、三

輪聡一：タバコ煙に含まれる血管壁構成細胞障害因子の性状解析、第21回北海道薬物作用談話会、札幌、2007年7月28日

5. 西屋禎、梶田絵美、堀之内孝広、西本新、三輪聡一：MyD88の細胞局在及びシグナル伝達におけるTIRドメインとnon-TIR領域の機能的差異、第58回日本薬理学会北部会、札幌、2007年9月28日
6. 前川聡、森大輔、西屋禎、堀之内孝広、西本新、梶田絵美、三輪聡一：有機カチオントランスポーターOCTN2のスプライス体の単離と機能解析、第58回日本薬理学会北部会、札幌、2007年9月28日
7. 西本新、魯凌云、西屋禎、堀之内孝広、三輪聡一：エンドセリンA型受容体(ETAR)の蛋白質分解における新規結合蛋白質Jab1の役割、第58回日本薬理学会北部会、札幌、2007年9月28日
8. 朝野拓史、堀之内孝広、西本新、西屋禎、三輪聡一：タバコ煙による細胞障害の性状解析、第58回日本薬理学会北部会、札幌、2007年9月28日
9. 三宅由美恵、堀之内孝広、西屋禎、西本新、三輪聡一： $\alpha_1A$ -アドレナリン受容体を介した細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇反応の分子メカニズム、第58回日本薬理学会北部会、札幌、2007年9月28日
10. NISHIYA, Tadashi : Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88、第37回日本免疫学会総会・学術集会、東京、2007年11月20～22日
11. 西本新、魯凌云、西屋禎、堀之内孝広、三輪聡一：エンドセリンA型受容体(ETAR)の蛋白質分解における新規結合蛋白質Jab1の役割、第17回日本循環薬理学会、大阪、2007年11月30日
12. 堀之内孝広、三宅由美恵、西屋禎、西本新、森島繁、村松郁延、三輪聡一、第17回日本循環薬理学会、大阪、2007年11月30日
13. 西本新、魯凌云、西屋禎、堀之内孝広、三輪聡一：エンドセリンA型受容体結合蛋白質

によるエンドセリンA型受容体蛋白質の分解制御機構の解明、第81回日本薬理学会年会、横浜、2008年3月16～18日

14. 堀之内孝広、三宅由美恵、西屋禎、西本新、森島繁、村松郁延、三輪聡一：G蛋白質共役型受容体を介して引き起こされる持続性Ca<sup>2+</sup>流入の分子メカニズム、第81回日本薬理学会年会、横浜、2008年3月16～18日
15. 三宅由美恵、堀之内孝広、西屋禎、西本新、三輪聡一： $\alpha_{1A}$ アドレナリン受容体を介して活性化されるCa<sup>2+</sup>シグナリングの分子メカニズム、第81回日本薬理学会年会、横浜、2008年3月16～18日
16. 西屋禎、梶田絵美、堀之内孝広、西本新、三輪聡一：MyD88の細胞局在とシグナル伝達におけるTIRドメインとそれ以外の領域の機能的差異、第128回日本薬学会年会、横浜、2008年3月26～28日

学会発表（国外）

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担課題：金属アレルギーの新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の開発に関する研究

分担研究者：梶島 健治 産業医科大学 医学部 皮膚科 准教授

## 研究要旨

金属アレルギーの原因は歯科金属やピアス・時計などの装飾品など多岐にわたり、臨床症状も、遅延型過敏反応の代表である接触皮膚炎から掌蹠膿疱症など多彩である。またパッチテストは比較的簡便な金属アレルギーのスクリーニング方であるが、検査による感作誘導のリスクや患者のQOLを下げうる。そこで我々は各臨床症状の原因T細胞サブセットの同定を行い、さらに安全かつ患者にとって負担のかからないin vitroでのスクリーニングの系を確立することを目的とする。

### A. 研究目的

金属アレルギーの原因は歯科金属やピアス・時計などの装飾品など多岐にわたり、臨床症状も、遅延型過敏反応の代表である接触皮膚炎から掌蹠膿疱症など多彩である。またパッチテストは比較的簡便な金属アレルギーのスクリーニング法であるが、検査による感作誘導のリスクや3日間入浴できないなど患者のQOLを低下させる。そこで我々は各臨床症状の原因T細胞サブセットの同定を行い、さらに安全かつ患者にとって負担のかからないin vitroでのスクリーニングの系を確立と多彩な臨床反応をin vitroの検査でグループ化し、治療へ応用することを目的とする。

## 金属アレルギーの臨床分類

1. 接触皮膚炎(局所反応)
2. 掌蹠膿疱症(全身性反応)
3. 汗疱型(異汗型)湿疹(全身性反応):汗中の金属濃度が高い?
4. 扁平苔癬(全身性反応)
5. 貨幣状湿疹→自家感作性皮膚炎(全身性反応)
6. 肉芽腫性反応(局所反応:慢性暴露による?)

### B. 方法

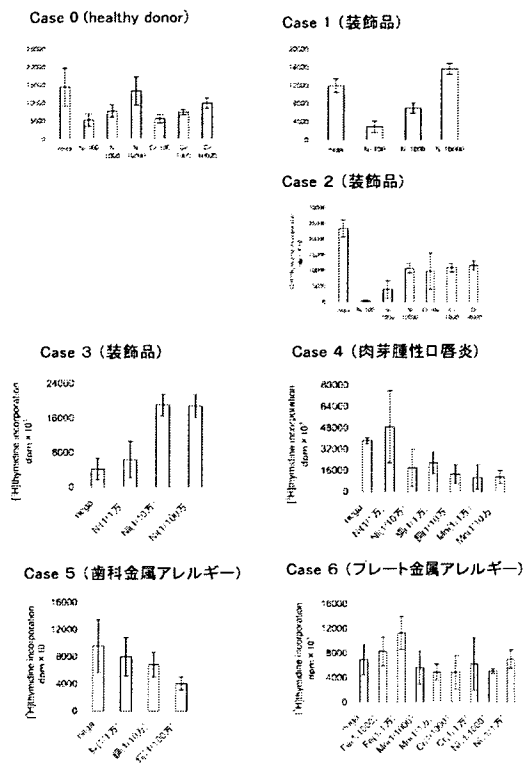
パッチテスト(patch test; PT)で陽性を確認し

た金属アレルギー患者の臨床症状を、接触皮膚炎、肉芽腫、掌蹠膿疱症などの臨床症状別に分類する。患者からのinformed consentを得た上で、各患者の末梢血からficollによりPBMCを分離し、PT陽性の金属(NiSO<sub>4</sub>, NiCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>などを1, 10, 100 μMの濃度にて)と混合培養(1x10<sup>5</sup> cells/well:96穴)し、<sup>3</sup>[H]でラベルしたthymidineを培養4日目に加え、その後24時間における取り込みをセルハーベスターにより測定し、金属の細胞増殖刺激能を評価する(=lymphocyte transformation test; LTT)。

### C. 結果

接触皮膚炎(PT陽性; Ni, 2例あるいはNiとCr, 1例)、肉芽腫性口唇炎(PT陽性; Ni, Cu, Mn, 1例)、歯科金属アレルギー(PT陽性; Cu, 1例)、金属プレート挿入後の蕁麻疹(PT陽性; Fe, Mn, Cr, Ni, 1例)の6症例において金属パッチテスト陽性反応を示した各金属と混合培養した。結果は、Ni, FeによるLTTは著明な陽性を示したが、その他の金属では明らかな陽性を示さなかった。

との関連性を検討し、それに応じた治療選択の指針の基準の作成を今後の課題としたい。



#### D. 考察

パッチテスト陽性の金属に対してLTTアッセイが陽性になる金属とならない金属の2種類あることが示唆された。原因として、optimal doseで金属刺激ができなかった、金属の毒性の方がstimulationよりも強く出た、Tregなどの抑制系のサイトカインが産生されLTT反応がmaskされた、ある種の金属ではPBMC分画ではLTTが誘導されない、などがあげられる。今後も詳細なoptimal doseとtoxicityに関する検討や培養液中のIL-10などの抑制系サイトカインの定量、PBMCに分離せず、whole bloodを用いたLTTアッセイなどを行いたい。

また、金属との混合培養液中のTh1 cytokine (IFN- $\gamma$ , IL-2), Th2 cytokine (IL-4, 5, 13), Th17 cytokine (IL-17, IL-22), T reg cytokine (IL-10, TGF- $\beta$ )などをELISAやflowcytometryによるbeads arrayなどにより評価し、臨床症状とTh1, Th2, Th17との関連を検証し、金属によって誘発される各臨床症状の発症機序に関与するTリンパ球サブセットの同定を行いたい。また、臨床症状とそれに関与するTリンパ球サブセッ

#### E. 結論

金属アレルギーにおけるパッチテスト陽性の患者由来の末梢血において少なくともNi, FeにおいてはLTTアッセイによる検出が可能であることが示された。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Atarashi K, Kabashima K, Akiyama K, Tokura Y. Stimulation of Langerhans cells with ketoprofen plus UVA in murine photocontact dermatitis to ketoprofen. *J Dermatol Sci.* Aug 2007;47(2):151-159.
2. Hino R, Kobayashi M, Mori T, et al. Inhibition of T helper 2 chemokine production by narrowband ultraviolet B in cultured keratinocytes. *Br J Dermatol.* May 2007;156(5):830-837.
3. Kabashima K, Nagamachi M, Honda T, et al. Prostaglandin E2 is required for ultraviolet B-induced skin inflammation via EP2 and EP4 receptors. *Lab Invest.* Jan 2007;87(1):49-55.
4. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, et al. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol.* Oct 2007;171(4):1249-1257.
5. Kabashima K, Sugita K, Shiraishi N, Tamamura H, Fujii N, Tokura Y. CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation. *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 5 2007;361(4):1012-1016.
6. Kobayashi M, Kabashima K, Tokura Y. Inhibitory effects of epinastine on chemokine production and MHC class

- II/CD54 expression in keratinocytes. *J Dermatol Sci.* Feb 2007;45(2):144-146.
7. Nagamachi M, Sakata D, Kabashima K, et al. Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1. *J Exp Med.* Nov 26 2007;204(12):2865-2874.
  8. Nishio D, Izu K, Kabashima K, Tokura Y. T cell populations propagating in the peripheral blood of patients with drug eruptions. *J Dermatol Sci.* Oct 2007;48(1):25-33.
  9. Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, et al. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T-cells in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer.* Dec 15 2007;121(12):2585-2590.
  10. Sugita K, Kabashima K, Atarashi K, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin Exp Immunol.* Jan 2007;147(1):176-183.
  11. Sugita K, Kabashima K, Nakashima D, Tokura Y. Oral allergy syndrome caused by raw fish in a Japanese sushi bar worker. *Contact Dermatitis.* Jun 2007;56(6):369-370.
  12. Sugita K, Kabashima K, Nishio D, Hashimoto T, Tokura Y. Th2 cell fluctuation in association with reciprocal occurrence of bullous pemphigoid and psoriasis vulgaris. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* Apr 2007;21(4):569-570.
  13. Tokura Y, Sugita K, Kabashima K, Ito T, Yagi H. Alopecia universalis associated with impaired interleukin-4 production and low serum IgE level. *J Am Acad Dermatol.* Aug 2007;57(2 Suppl):S22-25.
  14. Tokura Y, Sugita K, Yagi H, Shimauchi T, Kabashima K, Takigawa M. Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma with fatal leukemic outcome in association with CLA and CCR4-negative conversion. *J Am Acad Dermatol.* Nov 2007;57(5 Suppl):S92-96.
  15. Kabashima K, Sugita K, Tokura Y. Increment of circulating plasmacytoid dendritic cells in a patient with Kaposi's varicelliform eruption. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* Feb 2008;22(2):239-241.
  16. Mori T, Kabashima K, Yoshiki R, et al. Cutaneous Hypersensitivities to Hapten Are Controlled by IFN-gamma-Upregulated Keratinocyte Th1 Chemokines and IFN-gamma-Downregulated Langerhans Cell Th2 Chemokines. *J Invest Dermatol.* Jan 31 2008.
  17. Shimauchi T, Sugita K, Nishio D, et al. Alterations of serum Th1 and Th2 chemokines by combination therapy of interferon-gamma and narrowband UVB in patients with mycosis fungoides. *J Dermatol Sci.* Feb 1 2008.
  18. Sugita K, Kabashima K, Nakashima D, Tokura Y. Papuloerythroderma of Ofuji induced by furosemide. *J Am Acad Dermatol.* Feb 2008;58(2 Suppl):S54-55.
  19. Sugita K, Kabashima K, Tokura Y. Fexofenadine downmodulates antigen-presenting ability of murine epidermal Langerhans cells. *J Dermatol Sci.* Jan 2008;49(1):88-91.
  20. Tokura Y, Kobayashi M, Kabashima K. Epidermal chemokines and modulation by antihistamines, antibiotics and antifungals. *Exp Dermatol.* Feb 2008;17(2):81-90.

## 2. 学会発表

## 国外学会

1. Kenji Kabashima Lipid mediators and the skin 1st annual symposium at the Institute of Dermatological Science, Seoul, 2007
2. Kenji Kabashima Mechanism of plasma cell homing and localization. Seoul National University, Seoul, 2007
3. Kenji Kabashima, Kazunari Sugita, Noriko Shiraishi, Tomoko Mori, Ayako Uemura, and Yoshiki Tokura. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration and survival of cutaneous dendritic cells Society for Investigative Dermatology Annual Meeting, Los Angeles, 2007

## 国内学会

4. 梶島健治：皮膚免疫・アレルギー疾患におけるupdate. 福井アレルギー疾患研究会、福井、2007
5. 梶島健治. レジデントフォーラム. 第32回 日本研究皮膚科学会、横浜、2007
6. 梶島健治. 抗菌剤の特性を生かす. 第106回 日本皮膚科学会総会、横浜、2007
7. 梶島健治. 脂質メディエーターと皮膚疾患. 第106回 日本皮膚科学会総会、横浜、2007
8. 梶島健治, 古賀 千律子, 島内 隆寿, 日野 亮介, 戸倉新樹. 接触アレルギー性および光接触アレルギー性の多項目代替法の開発. 第25回 産業医科大学学会、北九州、2007
9. Kenji Kabashima, Kazunari Sugita, Noriko Shiraishi, Tomoko Mori, Ayako Uemura, and Yoshiki Tokura. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration and survival of cutaneous dendritic cells. 第32回 日本研究皮膚科学会、横浜、2007
10. 梶島健治、島内隆寿、大島孝一、戸倉新樹：皮膚原発B細胞性リンパ腫における chemokine receptor 発現の検討、第47回 日本リンパ網内系学会、淡路、2007
11. Kenji Kabashima, Kazunari Sugita, Noriko Shiraishi, Tomoko Mori, Ayako Uemura, and Yoshiki Tokura. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration and survival of cutaneous dendritic cells. 第18回 樹状細胞研究会、淡路、2007
12. 梶島健治、長町美野子、坂田大治、成宮周：Facilitation of Th1 mediated immune response by PGE receptor EP1, 17<sup>th</sup> Kyoto T cell conference、京都、2007
13. 梶島健治：スフィンゴシン1リン酸によるリンパ球トラフィック機序の新たな知見、第28回 日本炎症・再生医学会、東京、2007
14. 梶島健治、坂部純一、山田陽子、戸倉新樹：長島型掌蹠角化症の一例、第22回 角化症研究会、東京、2007
15. 梶島健治、吉木竜太郎、坂部純一、戸倉新樹：pachydermoperistosisにおける DKK-1の役割、第22回 角化症研究会、東京、2007

16. 梶島健治：皮膚免疫・炎症を調節する，  
第59回 日本皮膚科学会西部支部学術  
大会、宮崎、2007

17. 梶島健治、杉田和成、白石紀子、稲葉  
カヨ、戸倉新樹：皮膚樹状細胞におけるC  
XCR4の接触皮膚炎形成における役割，  
第57回 日本アレルギー学会秋期学術  
大会、横浜、2007

18. 梶島健治：樹状細胞の遊走とホメオス  
タシスについて，第三回箱根カンファレン  
ス、箱根、2007

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

### III. 班会議プログラム



厚生労働科学研究費補助金  
免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

金属アレルギーの克服へ向けた効果的診断・予防・  
治療法の開発研究

平成19年度  
第1回 班会議  
抄録集

日時：平成19年5月30日（水）

16：00より

場所：国立国際医療センター 第一会議室（4F）

連絡先：03-3202-7181 Ext 2904, 2897

（小笠原、石崎、浦野）

## プログラム

本研究事業の概要の説明・連絡事項

小笠原康悦（代表研究者）

16:00-16:10

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

## 講演

「マウス金属アレルギーモデルの樹立」

遠藤康男（分担研究者）

16:10-16:25

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

## 研究計画・方向性についての発表

### セッション1. 金属アレルギー発症の分子機構の解明

「マウス金属アレルギー：最近のデータいろいろ」

遠藤康男（分担研究者）

16:25-16:40

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

「金属イオン結合タンパク質の同定とその機能」

菅原俊二（分担研究者）

16:40-16:55

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

「金属アレルギーにおけるNKレセプターの関与の可能性」

小笠原康悦（代表研究者）

16:55-17:10

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

Break

17:10-17:15

## セッション2. 金属アレルギーにおける細菌成分のアジュバント効果

「口腔上皮の自然免疫系と金属アレルギー」

高田春比古 (分担研究者)

17:15-17:30

東北大学大学院歯学研究科・口腔細菌学

「TLRによる抗原提示細胞の活性化と金属アレルギー発症との相関性」

西屋禎 (分担研究者)

17:30-17:45

北海道大学大学院医学研究科・免疫薬理学

## セッション3. 新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の開発

「新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の開発」

椛島健治 (分担研究者)

17:45-18:00

産業医科大学・皮膚科

## 総合討論

18:00-18:30

発表は時間厳守でお願いいたします。目安として、発表時間10分、質疑応答5分、計15分と考えております。スライドはパワーポイントファイルで作成し発表してください。

演題：マウス金属アレルギー：最近のデータいろいろ

演者：遠藤 康男

所属：東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

発表要旨：

マウスに金属アレルギーを起こすいい方法が無かったことで、従来の研究の多くは、感作ヒトリンパ球での*in vitro*実験に頼ってきた。*in vitro* 実験から得られる情報は限られているが、他の接触過敏症の研究結果に準じて、「金属アレルギーもT細胞主役の疾患である」と認識されている。通常のハプテンはパートナータンパクと共有結合による“非可逆的”複合体を形成し、これがプロセッシングとT細胞への抗原提示を経てアレルギーの誘導につながると考えられている。一方、金属（イオン）ハプテンはパートナーとなる生体成分（タンパクと考えられているが、他の成分も関係するかも知れない）と“可逆的”な複合体を形成する。この違いが極めて重要な点であると思われる。金属イオンは、状況に応じて細胞内外でパートナーを変える可能性も否定できないのである。

私たちは、金属（塩化物）とLPSを併用することにより、マウスに容易に金属アレルギーを誘導することに成功した。驚いたことに、マウスでのこの“**metal(+LPS) allergy**”は、**nude**や**SCID**など、T細胞欠損マウスでも発症する。言い過ぎかも知れないが、金属アレルギー発症機序解明の研究は、今ようやくスタートするのではないかと……。モデルの紹介を兼ねて、**Clin Exp Allergy**に最近発表した結果を紹介する。また、**preliminary**ではあるが、今後の研究計画・方向性の参考になるとと思われる本モデルでの以下に関する最近のデータを紹介する。

- ①交差反応
- ②感作時とchallenge時における金属濃度
- ③種々の菌体成分や炎症性物質の効果
- ④脾細胞移入実験
- ⑤耳介における局所感作
- ⑥ヒスタミンの関与

私の当面の研究方針は、金属アレルギーの性質や特徴を正しく理解するため、これらについて詳しく検討することである。