

演題：金属イオン結合タンパク質の同定とその機能

演者：菅原 俊二

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：

目的

金属アレルギーはT細胞主体の細胞性免疫反応によって惹起されるが、ニッケルイオンなどの金属イオンがどのようにしてMHCクラスIIと伴にTCRに抗原提示されるかについてはいまだ不明な点が多い。これまで、1) APCによる自己タンパク質のプロセッシング依存性に金属イオンが提示されるという報告や、2) 自己タンパク質は金属イオンのシャトルとして機能し、金属イオン自体がMHC/TCRと架橋構造を構築し、T細胞を活性化するなどの報告がある。また、我々は、マウスモデルにおいて複数の金属イオンで交叉反応を確認しているが、そのメカニズムは不明のままである。このような背景から、我々は金属イオンと結合する自己タンパク質がいかなる機能を発揮するかを明らかにするために、マウスモデルにおける金属イオン結合タンパク質の同定を行い、その機能を解析する。

研究計画

1. 金属イオン結合タンパク質の同定

ニッケルイオンとLPSで感作したマウス血清を試料とする。また、本マウスモデルがTNPなどのハプテンと交叉反応を起こすかについて確認し、以下の手順で金属イオン結合タンパク質を同定する。

1) 硫酸にて血清アルブミンを除去する。

2) (1) Ni-nitrilotriacetic acid (NTA)-agarose beads (Qiagen)に4℃、1時間反応させ、250 mM imidazole (Sigma)で溶出、2次元電気泳動で確認

(2) ハプテン結合ビーズを準備し、同様にタンパク質を精製する。

3) LC-MASにてタンパク質を同定

(東北大学大学院薬学研究科 寺崎 哲也教授と共同)

4) Asp-Ala-His-Lys残基を含むタンパク質を絞り込む

2. 金属イオン結合タンパク質の機能

同定したタンパク質の抗原提示能について検討する。

・感作マウスからT細胞とマクロファージを分離・精製する。

・MMC処理したマクロファージとT細胞の培養系に金属イオンと同定タンパク質を加え、³H]TdRの取込みを指標に、T細胞活性化の程度を評価する。

※その他、必要に応じて研究計画を立案し、遂行する。

演題：金属アレルギーにおけるNKレセプターの関与の可能性

演者：小笠原 康悦

所属：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

発表要旨：

目的

遠藤らは、これまで観察が困難であった金属アレルギー動物モデルを作製することに成功した。このモデルにおいて、T細胞の無いヌードマウスでも金属アレルギーが発症することを報告している。また、T細胞欠損マウスにおいても接触性皮膚炎が発症しNK細胞が重要であるとの報告もある。そこで、我々は金属アレルギーにおいて、NK細胞、NKレセプターの関与の可能性を追究することを目的とし、研究を遂行する。

研究計画

NK細胞は、活性化レセプターと抑制性レセプターのシグナルのバランスによって機能が発現される。NKG2Dは、NK細胞の主たる活性化レセプターであり、全てのNK細胞、活性化T細胞、NKT細胞に発現していることが知られている。また、そのリガンドは正常組織ではサイレントであり発現が認められないが、感染や放射線などのストレスによって誘導されることが知られている。そこで、以下の実験を行い金属アレルギーにおけるNKレセプターの関与の可能性を追究する。1) 金属アレルギーマウスモデルを用いて、発症の前後にNKG2Dおよびそのリガンドの発現を定量的PCR法を用いて検出し、評価する。2) 発症後の細胞の浸潤を病理標本を作製して、抗NKG2D抗体、抗CD8抗体などを用いて浸潤細胞を検出する。3) 金属アレルギーマウスモデルに抗NKG2D抗体を投与し発症が抑制されるか検討する。4) NKG2Dリガンド強制発現マウスを用いて、金属アレルギーが発症するか否かを検討する。

演題：口腔上皮の自然免疫系と金属アレルギー

演者：高田春比古

所属：東北大学大学院歯学研究科・口腔微生物学分野

発表要旨：

研究の背景と目的

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分子を発現しているが、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、4種のペプチドグリカン認識蛋白(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。

この度、本研究の代表者である小笠原康悦博士の協力を得て、口腔上皮細胞におけるNK活性化レセプターのリガンドであるMICA/B発現を検討したところ、各種TLR、NOD1ならびにNOD2刺激によってMICA/B mRNA発現が著しく亢進するとの知見を得た。金属イオン存在下では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。これらの知見を併せ考えて、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。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可能性がある。以上の結果、金属イオンと微生物に晒された口腔上皮はNK細胞の傷害を受け易くなる。」

研究計画

上記の作業仮説を実証すべく次の実験を実施する。1)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活性化リガンド発現増強の更なる証明。2) 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。3)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。4)1)~3)の組み合わせ、さらには活性化レセプターを有するNK以外の細胞の関与の可能性を含めて、口腔上皮細胞傷害の検討。なお、今年度は1)に重点をおいて研究を進める予定である。

演題：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相関性

演者：西屋 禎

所属：北海道大学大学院医学研究科・細胞薬理学

発表要旨：

目的

抗原提示細胞による金属結合蛋白由来ペプチドのT細胞への抗原提示が金属アレルギー発症に深く関与することが示唆されているが、TLRを介した抗原提示細胞の活性化と金属アレルギーの発症との関連性は明確ではない。そこで、(1) 抗原提示細胞において補助刺激分子およびMHC class II分子の発現を最も高レベルに誘導するTLRの同定、(2) 金属アレルギーの発症とTLRによる抗原提示細胞の活性化との相関性の解析、の二点を目的とした研究を行う。

研究計画

TLR4の細胞外ドメインと他のTLR (TLR1~9) の細胞膜および細胞質ドメインから成るTLR4/TLRキメラ受容体は、各TLRの細胞局在やシグナリング特性を反映し、かつ同一のリガンド(LPS)により活性化されうる。また、その発現量は抗TLR4/MD-2抗体により定量することが可能である。従って、TLR4/TLRキメラ受容体を用いて各TLRのシグナリングおよびそれにより発現される生理機能を定量的に比較することが可能である。そこで、TLR4欠損マウスから調製したマクロファージまたは樹状細胞にTLR4/TLRキメラ受容体をレトロウイルスを用いて発現させ、LPSで刺激した際の補助刺激分子およびMHC class II分子の発現レベルを解析する。続いて、遠藤らが開発した金属アレルギーモデルマウスを用いて、各TLRリガンド処理による金属アレルギーの発症の程度を測定し、TLRによる抗原提示細胞の活性化の程度と比較・検討する。

演題：新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の開発

演者：椛島 健治

所属：産業医科大学・皮膚科

発表要旨：

目的：

金属アレルギーのメカニズムを臨床症状とin vitro培養の観点から検証することを目的とし、研究の遂行を図る。

実験方法：

パッチテストで陽性を確認した金属アレルギー患者の臨床症状を、湿疹反応、浮腫性紅斑、肉芽腫、掌蹠膿疱症に分類しそれら患者の末梢血のリンパ球分画、特にCD4、CD8細胞におけるTh1、Th2のケモカイン受容体であるCXCR3、CCR5とCCR4の発現をフローサイトメトリーにより解析し、臨床症状との相関を検討する。

また、分離したリンパ球を各金属と混合培養し、細胞増殖および培養液中のサイトカインの産生（IFN- γ 、IL-12、IL-17、IL-10）を評価し、臨床症状との関連を検証する。

以上の結果から、パッチテストに替わる新規診断法を開発と、診断法としての有用性の可能性について検討する。

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2回 班会議
抄録集

日時：平成19年11月9日（金）

15：30より

場所：国立国際医療センター研究所 中会議室（B1F）

連絡先：03-3202-7181 Ext 2904, 2897

（小笠原、田中、浦野、岩崎）

プログラム

開会の挨拶 研究代表者 小笠原康悦 15:30-15:35

本年度の研究成果発表

セッション1. 金属アレルギー発症の分子機構の解明

「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」

菅原俊二 (分担研究者) 15:35-15:55

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

「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」

遠藤康男 (分担研究者) 16:00-16:20

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

「金属アレルギーマウスモデルにおけるヒスタミンの作用機序について
(ヒスタミン産生細胞可視化マウスの作製)」

大津 浩 (協力研究者) 16:25-16:45

東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学

「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) 16:50-17:10

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

「口腔上皮細胞の自然免疫系と金属アレルギー」

高田春比古 (分担研究者) 17:15-17:35

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について」

西屋禎 (分担研究者) 17:40-18:00

北海道大学大学院医学研究科・細胞薬理学

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確立

「新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の開発」

栴島健治 (分担研究者) 18:05-18:25

産業医科大学・皮膚科

総合討論

18:25-18:45

本研究事業の連絡事項

小笠原康悦 (研究代表者) 18:45-19:00

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

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15分、質疑応答5分、計20分と考えております(演題の間に5分の余裕はありますが、時間厳守でお願いいたします)。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：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

演者：菅原 俊二

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：

目的

金属アレルギー発症には、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、抗原提示のメカニズムについてはいまだ解明されていないのが現状である。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、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分子の溝に收容されている自己ペプチドを同定することを目的として、自己ペプチドの精製を試みた。

方法

1. BALB/cマウス（メス4W、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。
2. 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分子と收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。
3. 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。
4. 精製した試料を、逆相HPLCカラムにて分析した。

結果

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。

考察

10月までの研究期間内では上記の結果を得るまでにとどまったが、予定した計画どおり、自己抗原ペプチドを精製できることが判明した。今後、精製の精度とスケールを上げ、非感作マウスの試料も調整する。今年度中にLC/MS/MS分析により、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できるものとする。

参考資料

PNAS 100 (9): 5330-5335, 2003

演題：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

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

[背景・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感作ヒトリンパ球を用いた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、その詳細は明確ではない。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細胞欠損のヌ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の性質を明らかにすることを目的として、(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。[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添加または無添加) を耳介に注射 (20 µl) して、以後その腫脹を測定した。[結果] (a) 1 mM Ni と1 µg/ml LPS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、この炎症が起こらない低い濃度 (他の金属よりも低い濃度) 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。[考察] (i) 種々の金属がNi感作マウスで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は、金属が違ってもしっか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”の探索も必要と思われる。(ii) Elicitationでの最小Ni濃度が +LPSで 1×10^{-12} Mの低濃度になることは、感染や細菌成分が金属アレルギーの重要な促進因子になることを示唆する。今後、他の関連物質 (TLR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 である (Sato et al. 上記論文)。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。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と思われる。

演題：金属アレルギーマウスモデルにおけるヒスタミンの作用機序について
(ヒスタミン産生細胞可視化マウスの作製)

演者：大津 浩

所属：東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学

発表要旨：

HDC (L-Histidine Decarboxylase; ヒスチジン脱炭酸酵素) は生体内における唯一のヒスタミン合成酵素である。私たちはマウスHDC遺伝子をクローン化し、2001年に遺伝子ノックアウトマウスを作製した(**FEBS Lett 2001**)。その後このマウスと野生型のマウスにいくつかのアレルギー関連疾患モデルを作り出し、両者を比較することによって、ヒスタミンの作用を次のように明らかにした。1) 慢性皮膚炎症(**J Exp Med 2002**)の実験では、木綿糸を背部皮膚に植え込み肉芽腫を作製したが、この疾患においてヒスタミンはH2受容体を介してVEGFを誘導し肉芽腫を作り上げる。2) 気管支喘息モデル(**Am J Respir Crit Care Med 2003**)では、ヒスタミンは気道への好酸球の遊走を促すものの、気道過敏性にはあまり影響しないこと。3) 全身性アナフィラキシー反応(**J Allergy Clin Immunol 2002**)においてヒスタミンは血圧降下には影響しないものの、体温降下や呼吸パターンの変化に必要でありこと。4) 接触性皮膚炎(**Exp Derm 2005**)における痒みの発現にはヒスタミンが必要であること。5) 金属アレルギー疾患モデル(**Clin Exp Allergy 2007**)においてヒスタミンは耳介の腫脹反応に重要であること。アレルギー反応におけるヒスタミン産生細胞として考えられる細胞は産生量の程度の差はあれ、肥満細胞、マクロファージ、好中球、リンパ球などであり疾患ごとに責任細胞が違う。例えば1)の慢性皮膚炎症や5)の金属アレルギーの実験系ではマクロファージ由来のヒスタミンが病態の形成に重要であり、3)の全身性アナフィラキシー反応には肥満細胞由来のヒスタミンが重要である。このようにヒスタミン産生細胞も疾患ごとにその役割を変えることから、ヒスタミン産生細胞の同定がヒスタミンの作用を考える上で一つの重要な因子となる。現在までのヒスタミン産生細胞の同定は免疫組織染色や*in situ hybridization*法など手間と時間がかかり、時には技術的な問題によって成功しない場合も多かった。そこで私たちは簡便に、理想的には生きてまま産生細胞の観察するために、マウスHDC遺伝子プロモーター領域約1.1kbと蛍光色素遺伝子であるZsGreen1.1と繋いだプラスミッドを用意して、受精卵にマイクロインジェクションしてHDC遺伝子の転写量を推測するべくトランスジェニックマウスを作製した。このプラスミッドをマウス肥満細胞株であるP815細胞に遺伝子導入し、恒久的細胞株を用意すると蛍光を発し、HDCの誘導試薬であるPMA(Phorbol Myristate Acetate)とDexamethasone で刺激すると更に蛍光強度が強くなることを確認している。従ってこのプラスミッドを用いたトランスジェニックマウスはHDC誘導細胞を生体内で同定するためには的確であると考えられる。現在24系統のトランスジェニックマウスを作製し東北大学動物実験施設で検疫中である。今後HDC発現細胞のみ特異的に強く蛍光発光した系統を維持系統とし、実験に供するつもりである。

演題：金属アレルギーにおけるNKレセプターの関与の可能性

演者：小笠原 康悦

所属：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

発表要旨：

目的

遠藤らはT細胞の無いヌードマウスでも金属アレルギーが発症することを報告している。また、T細胞欠損マウスにおいても接触性皮膚炎が発症しNK細胞が重要であるとの報告もある。そこで、我々は金属アレルギーにおいて、NK細胞、NKレセプターの関与の可能性を追究することを目的とし、研究をおこなった。

方法

1) 金属アレルギーマウスモデルを用いて、発症の前後にNKG2Dおよびそのリガンドの発現を定量的PCR法を用いて検出する。2) 発症後の細胞の浸潤を病理標本を作成して、抗NKG2D抗体、抗CD8抗体などを用いて浸潤細胞を検出する。3) 金属アレルギーマウスモデルに抗NKG2D抗体を投与し発症が抑制されるか検討する。4) NKG2Dリガンド強制発現マウスを用いて、金属アレルギーが発症するか否かを検討する。

結果

金属アレルギーモデルとしてNi, Pdを用い、発症の前後にNKG2DリガンドであるRAE-1の発現を定量的PCR法を用いて検出したところ、発症に伴ってRAE-1の発現が誘導されることが判明した。また、耳介に複数回、金属をchallengeしたところ、耳介の腫脹が増強することも明らかとなった。面白いことに、NKG2Dリガンド強制発現マウスを用いて、金属アレルギーを誘導したところ、耳介の腫脹の程度が低いというpreliminaryな結果も得られている。

金属の種類に関しては、PdはNiよりも耳介の腫脹が強く、強い炎症がおこっていることが示唆された。現在、発症後の細胞浸潤を調べるため、病理標本を作成中である。また、NKG2Dの関与を追究するため、抗NKG2D抗体を精製中である。

考察

金属アレルギーの発症に伴ってRAE-1の発現が誘導されることから、NKG2Dが発症にかかわっている可能性が示唆された。耳介に複数回、金属をchallengeしたところ、耳介の腫脹が増強することから、メモリー型細胞の関与が考えられる。また、ヒトの場合既に金属アレルギーが複数回発症してから来院する可能性が高いので、ヒトへの臨床応用を考慮すると、本研究モデルは非常に有用である。今後、病理標本により発症後の細胞浸潤を明らかにするとともに、抗NKG2D抗体による金属アレルギーの発症の阻止、RAE-1 siRNAを用いた発症の阻止に向けた研究を遂行する予定である。

演題：口腔上皮細胞の自然免疫系と金属アレルギー

演者：上原亜希子、高田春比古

所属：東北大学大学院歯学研究科・口腔微生物学分野

発表要旨：

研究の背景と目的

口腔上皮の自然免疫系に関して研究を進めてきた結果、口腔上皮細胞は各種Toll-like receptor (TLR)やNOD1/2分子を発現しているが、対応するリガンドで刺激しても炎症性サイトカインを産生しない。他方、同じ条件下で、ペプチドグリカン認識蛋白等の抗菌因子産生は明確に増強される。この知見は恒常的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。一方、歯科治療用合金として使用されるNi, Co, Cr等の金属イオン存在下では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。そこで次の様な作業仮説「TLR系およびNOD系を介する刺激は口腔上皮細胞のNK活性化リガンド発現を増強する。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、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」を実証すべく下記の研究に着手した。

材料と方法

各種TLR系ならびにNOD系リガンド（TLR2リガンドのマイコプラズマ型合成リポペプチド、TLR3リガンドのpoly I:C、TLR4リガンドの合成リピドA、TLR7リガンドの一本鎖RNA、TLR9リガンドの細菌型CpG DNA、NOD1リガンドのFK156、NOD2リガンドのムラミルジペプチド）による口腔上皮系細胞株HSC-2の各種NK活性化リガンド（NKG2Dリガンド）発現増強を、リアルタイムPCR法（遺伝子）、フローサイトメトリーおよび免疫蛍光染色法（タンパク）で検討した。

結果

各種TLR系ならびにNOD系リガンド刺激による口腔上皮細胞のNK活性化リガンドのULBP-2, ULBP-3およびMICA/Bの発現は明瞭に増強された。一方、ULBP-1に関しては、増強作用は認められなかった。

考察

10月までの研究期間内では上記の結果を得るにとどまったが、さらに

- 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て、上記作業仮説を実証したいと考えている。

演題：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相関性について

演者：西屋 禎

所属：北海道大学大学院医学研究科・細胞薬理学

発表要旨：

目的

抗原提示細胞による金属結合蛋白由来ペプチドのT細胞への抗原提示が金属アレルギー発症に深く関与することが示唆されているが、TLRを介した抗原提示細胞の活性化と金属アレルギーの発症との関連性は明確ではない。これを明らかにするために、今回、抗原提示細胞において補助刺激分子及びMHC class II分子の発現を最も高レベルに誘導するTLRの同定と金属イオンがこれらの分子の発現レベルに与える影響について検討した。

実験方法

TLR4遺伝子座を欠損したC57BL/10ScNマウスの骨髄由来樹状細胞 (ScN-BMDC) にレトロウイルスを用いてTLRキメラ (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もの) を発現させた。この細胞をTLR4のリガンドであるLPS (20 ng/ml) で24時間刺激した後、フローサイトメーターを用いて補助刺激分子及びMHC class II分子の発現レベルを解析した。また、C57BL/6マウスの骨髄由来樹状細胞 (B6 BMDC) を金属イオン (Ni^{2+} または Pd^{2+}) とLPSで24時間処理し、同様の実験を行った。

結果・考察

骨髄由来樹状細胞のCD80、CD86、及びMHC class II分子の発現レベルは、TLR4及びTLR4/TLR5キメラを発現したScN-BMDCにおいて著しく増大した。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。これらの結果から、TLR4とTLR5のリガンドが金属イオン-タンパク複合体の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、金属イオンの効果について検討した結果、まず Ni^{2+} および Pd^{2+} はどちらも0.5 mM以上の濃度でB6 BMDCに対して細胞毒性を示すことがわかった。細胞毒性を示さない0.25 mMの濃度において検討した結果、金属イオン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、また金属イオンは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。以上の結果から、金属イオン自体は、抗原提示に関与する分子の発現レベルの調節には関与しないことが示唆された。

演題：新規診断法と治療法の開発に向けた理論的基盤の開発

演者：椛島 健治

所属：産業医科大学・皮膚科

発表要旨：

研究の背景と目的：

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。そこで我々は各臨床症状の原因T細胞の同定を行い、さらに、T細胞のcharacterizeを行う。これらの実験を介して金属アレルギーのメカニズムの解明に取り組み、さらに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

研究計画：

パッチテストで陽性を確認した金属アレルギー患者の臨床症状を、湿疹反応、浮腫性紅斑、肉芽腫、掌蹠膿疱症に分類しそれら患者の末梢血のリンパ球分画、特にCD4, CD8細胞におけるTh1, Th2のケモカイン受容体であるCXCR3, CCR5とCCR4の発現をフローサイトメトリーにより解析し、臨床症状との相関を検討する。

また、分離したリンパ球を各金属と混合培養し、細胞増殖および培養液中のサイトカインの産生 (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17, IL-10) を評価し、臨床症状とTh1, Th2, Th17との関連を検証する。

以上の結果から、パッチテストに替わる新規診断法を開発と、診断法としての有用性の可能性について検討する。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年	掲載
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	*
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	*
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	*
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	*
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	*
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	*

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	*
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	*
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	*
Vilarinho S, Ogasawara K, Nishimura S, Lanier LL, Baron JL.	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	2007	*
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.	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	2007	*
Ogasawara K	NK activating receptor in autoimmune diabetes	Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology	2(1)	39-45	2008	*
小笠原康悦	発症にかかわる免疫異常	新時代の糖尿病学 (1)		in press		

小笠原康悦	NK細胞の制御シグナルと疾患	実験医学	25	1282-1285	2007	*
Lewis L. Lanier (翻訳：小笠原康悦)	NK活性化レセプター複合体	実験医学	25	1287-1292	2007	*
石崎和沙、小笠原康悦	NK細胞活性化レセプター-NKG2Dの生体内における機能	実験医学	25	1321-1325	2007	*
Uehara, A., and H. Takada	Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts.	J. Dent. Res.	86	249-254	2007	*
Uehara, A., Y. Fujimoto, K. Fukase, and H. Takada.	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	2007	*
Uehara, A., A. Iwashiro, T. Sato, S. Yokota, and H. Takada.	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	2007	*

Tohno, M., W. Ueda, Y. Azuma, T. Shimazu, S. Katoh, J.M. Wang, H. Aso, H. Takada, Y. Kawai, T. Saito, and H. Kitazawa.	Molecular cloning and functional characterization of porcine nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2).	Mol. Immunol.	45	194-203	2008	*
Tohno, M., T. Shimazu, H. Aso, A. Uehara, H. Takada, A. Kawasaki, Y. Fujimoto, K. Fukase, T. Saito, and H. Kitazawa.	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	2008	*
Uehara, A., M. Naito, T. Imamura, J. Potempa, J. Travis, K. Nakayama, and H. Takada.	Dual regulation of interleukin-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	J. Med. Microbiol.	57	500-507	2008	*
Uehara, A., Imamura, J. Potempa, J. Travis, and T. Takada.	Gingipains from <i>Porphyromonas gingivalis</i> 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	2008	*
Uehara, A., and H. Takada	Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells.	J. Dent. Res.		in press	2008	