

Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (誘導結合プラズマ発光分光法) 放電を利用する溶液試料の発光分析法。高感度で多くの元素を同時定量ができるため急速に発展普及している。ICP 放電で生じたイオンを質量分析計と結合させた ICP-MS 法も開発され、きわめて高感度(数 pg/g)である。ICP-AES 高温でプラズマとなったアルゴンガスによって試料溶液が噴霧器から噴霧され出てきた元素を炎色反応のようにとらえる方法であり感度は数 ng/g 程度である。

3) 金属表面の分析

SEM-EDX (Scanning electron microscopy /energy dispersed X-ray analysis)

金属を植え込んだ実験系ではマウスの生体反応を起こした Ni wire のみが黒く変色していた。走査型電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分光法を用いて Ni wire および Ni plate の表面の組成について分析した。

XRD (X-ray diffraction) 法による解析
金属の表面の相を X 線回折にて解析する。X 線を材料の表面に入射させ、回折された X 線を観測すると固体の結晶構造を分析する。その結果表面の酸化状態を検討した。

4) レポーター動物の作製

HDC promoter 1.0kb+pZsGreen1.1 を構築し、トランスジェニックマウスを作製した。ヒスタミン産生細胞特異的な発現が得られなかったため、現在 BAC を利用したトランスジェニックマウスの作製に移行している。またトランスジェニックフィッシュも作製する予定である。

C. 研究結果

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

マウスの背部皮下に種々の金属を植え込み炎症反応を惹起させると、ニッケルに特異的に血漿成分の漏出や組織の壊死などがおきる。周辺組織中のニッケル濃度を Newport Green を用いた蛍光法と ICP-AES 法で測定した(図1)。その結果、Newport Green による測定では特異性がなかったニッケルと亜鉛を ICP-AES 法では分けて測定することができることがわかった。測定

感度はほぼ同程度であった。また、エバンスブルーによる血漿の漏出反応と溶出した Ni イオンは時間的な経過が一致していた(図2)。

2. 金属表面の分析

SEM-EDX (Scanning electron microscopy /energy dispersed X-ray analysis) による解析

マウスに埋め込んだ Ni plate は黒く変色している部分と金属本来の部分が同時に存在した(図3)。変色のある部分 a を EDX 法にて分析すると、Ni のピークを検出するものの、その他に C、N、O、Cl、Na、P、S、K などの元素も存在し、生体内成分が付着あるいは浸潤していることがわかった。

XRD (X-ray diffraction) 法による解析
X 線回折法にて Ni plate の表面における Ni の化合状態の分析をおこなった結果、黒く変色していた部分も、金属の光沢のあった部分と同様に Ni の酸化物など化合物としての性質はなかった。

3. レポーター動物の作製について

トランスジェニックマウス

HDC promoter+ZsGreen1.1 マウスは肥満細胞が発光するものの、その発光強度は弱く、非特異的な部位における発光も見られるため、金属アレルギー反応において使用に耐ええるものであるかどうかには疑問がある。現在 BAC を用いた遺伝子導入について実験を開始した。

トランスジェニックフィッシュ

緑色の蛍光はゼブラフィッシュの場合、色素細胞の自家発光と重なってしまい、特異的な発光と非常に区別しにくいことがわかった。そのため、赤色の蛍光である mCherry という遺伝子を HDC promoter に繋いだプラスミッドをトランスジェニックしたフィッシュを作製した。このフィッシュでは脳の深部まで見えるものの、躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった。現在は、コンストラクト内に Negative Enhancer がある可能性を考えて、全長 300bp 程度の短いプ

ロモーターによってコントロールされるレポーター遺伝子をもつトランスジェニックフィッシュを作製中である。

D. 考察

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

Ni wire を使った系では、今まで行われている Newport Green を用いた蛍光色素を用いた解析でも Ni の量を定量することが可能であると思われる。今回、生体内のしばしば用いられるステンレス鋼である SUS316 を植え込んだ周囲に Ni の溶出が測定され、臨床的には問題がないと考えられているステンレス鋼からも Ni の溶出があることが明らかになった。このことは、臨床的に問題となってくる Ni の溶出には閾値があるか、あるいは、臨床的には問題にならない程度でも組織において反応している可能性があると考えられる。したがって、動物体内でのニッケルの溶出を正確に評価する必要性が確認された。

今後、生体にしばしば用いられる金属を対象に、感度のより高い測定法を見つけ、どのような金属がイオン化しにくいかについて検討を進めていきたいと考えている。

2. HDC promoter-reporter 動物の作製

マウスにおいては、ZsGreen1.1 の発光の特異性に問題があり、プロモーター内にすべての制御領域がはいっているかどうか問題がある。今後、マウスでは BAC を用いたレポーターマウスの作成を、フィッシュにおいては考えられる negative enhancer 部位を除いたレポーターフィッシュの作製を目指す。

E. 結論

Ni の金属アレルギーに対して、組織内で Ni イオンの量を測定することが可能になっている。また、金属表面の性状変化についても、2種類の方法で解析できる。

HDC promoter によるレポーター動物の作製は非特異的な発光を示していたため、方法を変えて再度作製を開始している。

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. Musio S, Pedotti P, Mantegazza R, Ohtsu H, Boon L, Steinman L, Galli SJ, Pedotti R. Anaphylaxis to a self-peptide in the absence of mast cells or histamine. **Lab Invest** in press

2. Brabant C, Alleva L, Grisar T, Quertemont E, Lakaye B, Ohtsu H, Lin J-S, Jatlow P, Picciotto M, Tirelli E. The H₃ inverse agonist thioperamide potentiates cocaine-induced locomotion: role of the histaminergic system and potential pharmacokinetic effects **Psychopharmacology** in press

3. Shiohara M, Shigemura T, Suzuki T, Tanaka M, Morii E, Ohtsu H, Shibahara S, Koike K. MITF-CM, a newly identified isoform of microphthalmia-associated transcription factor, is expressed in cultured mast cells. **Int J Lab Hematol** in press

4. Leite-de-Moraes MC, Diem S, Michel ML, Ohtsu H, Thurmond RL, Schneider E, Dy M. Histamine receptor H₄ Activation Positively Regulates *in vivo* IL-4 and IFN- γ Production by invariant natural killer T cells. **J Immunol** 182, 1233-1236, 2009

5. Andou A, Hisamatsu H, Okamoto S, Chinen H, Kamada N, Kobayashi T, Hashimoto M, Okutsu T, Shimbo K, Takeda T, Matsumoto H, Sato A, Ohtsu H, Suzuki M, Hibi T. Dietary histidine ameliorates murine colitis by inhibition of pro-inflammatory cytokine production from macrophages. **Gastroenterol** 136, 567-574, 2009

6. Yamauchi K, Piao HM, Nakadate T,

Shikanai T, Nakamura Y, Ito H, Mouri T, Kobayashi H, Maesawa C, Sawai T, Ohtsu H, Inoue H. Enhanced Goblet Cell Hyperplasia in HDC Knockout Mice with Allergic Airway Inflammation. **Allergology International** 58, 125-134, 2009

7. Yamauchi K, Piao HM, Nakadate T, Shikanai T, Nakamura Y, Niisato M, Ito H, Mouri T, Kobayashi H, Maesawa C, Sawai T, Ohtsu H, Inoue H. Progress in allergy signal research on mast cells: the role of histamine in goblet cell hyperplasia in allergic airway inflammation - a study using the hdc knockout mouse. **J Pharmacol Sci** 106, 354-360, 2008

8. Beghdadi W, Porcherie A, Dubayle D, Peronet R, Khun H, Huerre M, Watanabe T, Ohtsu H, Louis J, Mécheri S. Histidine decarboxylase deficiency is associated with significant protection against severe malaria in mice. **J Exp Med** 205, 395-408, 2008

2) 総説論文

1. Ohtsu H. The role of histamine in immunological and cardiovascular disease, and the transporting system of histamine in the cell. **J Pharmacol Sci (Review)** 106, 347-353, 2008

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

図1 : Ni wire を植え込んだマウスの植え込み周囲の皮膚からのサンプル中における Ni ion の濃度
ICP-AES 法と New Port Green を使った蛍光法を用いた時の検出値の比較

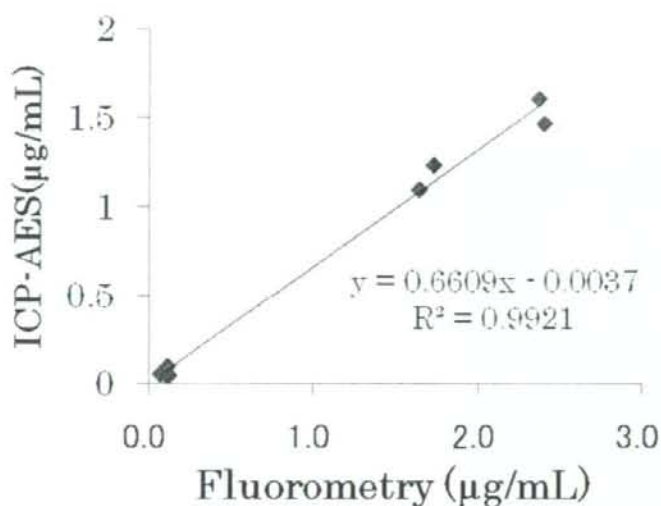


図2 : Ni wire を植え込んだマウスの植え込み周囲の Ni イオンの濃度とエバンスブルーの組織内濃度
植え込み後の周囲組織内における Ni の濃度の経時変化(A)と組織内への血漿成分の漏出反応をエバンスブルーを静脈内注射して測定した結果(B)

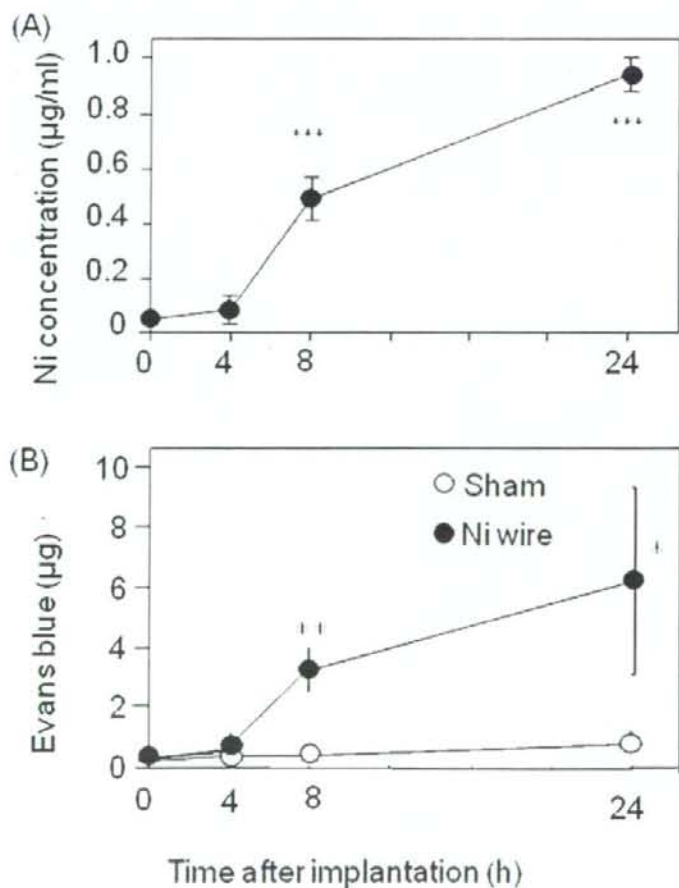


図3 Ni板のSEM-EDXによる解析

Niプレートについて、黒くなった部分(a)と金属光沢を残している部分(b)の表面性状をSEM-EDX法にて解析した。

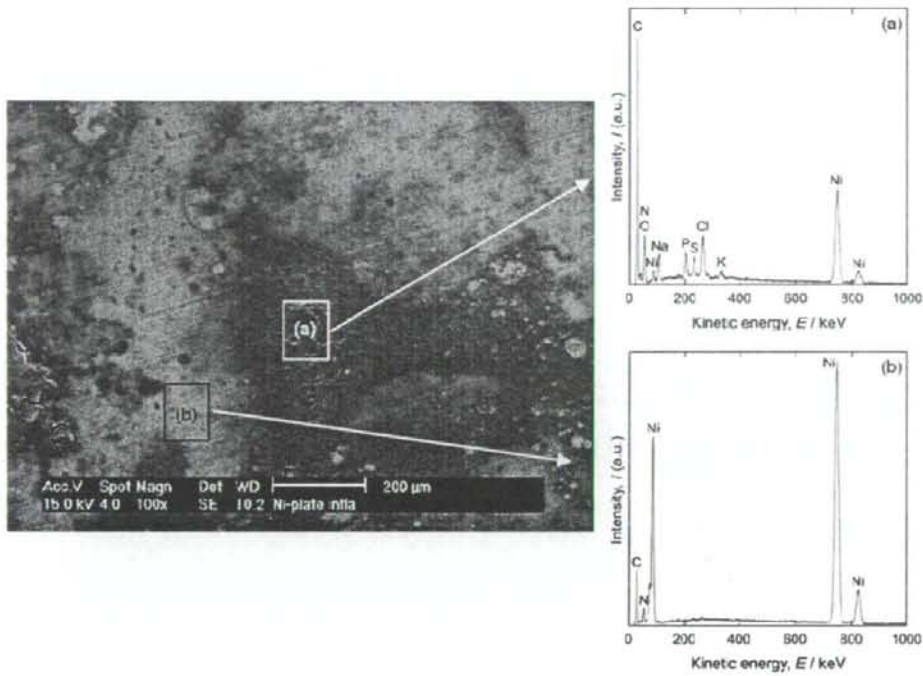
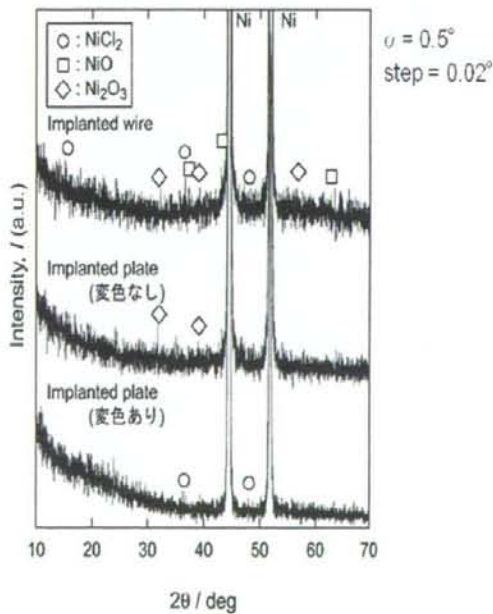


図4 Ni板のXRDによる解析

上段から、植え込み前のNiプレート的一部分、植え込んだもののNiプレートに変色を認めなかった部分、変色を認めた部分、それぞれのXRD解析を示している。

XRD (μ -2 θ)



III. 班會議プログラム

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20年度
第1回 班会議
抄録集

日時：平成20年5月23日（金）

14：30より

場所：北海道大学医学部1F 第3会議室

連絡先：（小笠原、西屋、川野、田中、浦野）

プログラム

開会の挨拶 研究代表者 小笠原康悦 14:30-14:35

前年度の研究成果発表および本年度の研究計画

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) 14:40-15:00

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

「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」

遠藤康男 (分担研究者) 15:05-15:25

東北大学大学院歯学研究科・口腔分子制御学

「金属アレルギーの新しい診断技術開発に向けた工学的アプローチと HDC レポーター動物の作製」

大津 浩 (分担研究者) 15:30-15:50

東北大学大学院工学研究科・応用量子医工学

「マウス金属アレルギーモデルの病理解析」

小笠原康悦 (代表・分担研究者) 15:55-16:15

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 16:15-16:25

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

－自然免疫刺激によるNK活性化レセプター誘導－

高田春比古 (分担研究者) 16:25-16:45

東北大学大学院歯学研究科・口腔細菌学

「TLR 依存のおよび非依存的抗原提示細胞の活性化と金属アレルギー発症との関連」

西屋禎 (分担研究者) 16:50-17:10

北海道大学大学院医学研究科・細胞薬理学

Break 17:10-17:15

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

「アトピー皮膚炎における金属アレルギーの関与とTh17細胞による増強」

戸倉新樹 (分担研究者) 17:15-17:35

産業医科大学・皮膚科

「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」

栢島健治 (分担研究者) 17:40-18:00

京都大学・医学研究科・皮膚科

総合討論 18:00-18:20

本研究事業の連絡事項

小笠原康悦 (研究代表者) 18:20-18:30

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

懇親会は19時より

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：

A. 研究目的

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 分子の溝に収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。

B. 方法

1. BALB/c マウス (メス 4W、n = 100) 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。コントロールとして非感作マウス (n = 100) を使用した。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。
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。

C. 結果

ニッケル感作マウスから精製したサンプルで 33 のピークが得られた。コントロールマウスから精製したサンプルでも同じようなパターンのピークが得られた。

D. 考察

① 昨年の予備実験と比較して、精製精度が格段に向上した。② 逆相 HPLC カラムの結果だけでは、コントロールとの差が判別しにくいいため、ペプチド分析や MS/MS での解析が必要である。

E. 結論

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ペプチドを同定するという最終目標の達成に近づいた。

F. 今後の方針

今回精製したサンプルをペプチド分析や MS/MS での解析を行う予定である。

参考資料 PNAS 100 (9): 5330-5335, 2003

演題：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

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：

A. 研究目的

私達は種々の経路で金属に感作され、Ni に対する陽性頻度は特に高い。金属 allergy の適切な動物モデルがなかったが、私達は Ni と LPS をマウスに併用投与すると容易に allergy が成立することを報告した (Sato ら 2007)。金属 allergy は T 細胞必須と言われているが、私達の Ni(+LPS)-allergy は T 細胞欠損マウスでも発症する。LPS など菌体成分は TLRs を介する IL-1 様シグナル経路により作用を発揮する。事実、Ni(+LPS)-allergy は TLR4 変異や IL-1 欠損マウスでは微弱であった (Sato ら 2007)。今回は Ni 感作過程での LPS 以外の微生物成分および他の炎症性物質の効果を調べた。

B. 方法

以下の物質と NiCl₂ との混合液を BALB/c マウスに腹腔注射し、10 日後 NiCl₂ 溶液を耳介に皮内注射し腫脹を測定した。口腔グラム陰性菌 *P. intermedia* の LPS, TLR2-ligand の Pam₃Cys-SKKKK, 真菌 *S. cerevisiae* の mannan, muramyl dipeptide (MDP, ペプチドグリカンの成分), 合成 2 重鎖 RNA polyIpolyC, グラム陽性菌 *P. acnes* (加熱死菌), concanavalin A (植物由来 T 細胞刺激物質), 炎症性化学物質 (骨吸収抑制薬 bisphosphonates) の alendronate および zoledronate。

C. 結果

上記物質はいずれも Ni-allergy 促進活性を示した。*P. intermedia* LPS は C3H/HeJ マウス (TLR4 変異) でもこの活性を示したが、TLR2-KO マウスでは、その効果は弱かった。

D. 考察と結論

以上の結果は種々の TLRs の ligands が Ni アレルギーのアジュバントになり、また Concanavalin A や化学物質の alendronate や zoledronate による炎症反応も Ni アレルギーのアジュバントになり得ることを示唆する。したがって、微生物環境 (感染) や炎症の有無が金属アレルギー発症の要因として極めて重要であると思われる。

E. 今後の方針

意外なことに、*P. intermedia* LPS のアジュバント活性は TLR4 に依存せず、TLR2 に依存することが示唆された。この結果は、*P. intermedia* LPS 標品に含まれる LPS 以外の物質が強いアジュバント活性を持つ可能性を示唆している。この物質の同定は興味ある今後の課題であるが、まずは、上記の内容で論文にしたい。

演題：金属アレルギーの新しい診断技術開発に向けた工学的アプローチと HDC レポーター動物の作製

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：

A. 研究目的

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

金属アレルギーが発症するメカニズムとして、金属がイオン化して溶出すると考えられるため、溶出した金属が測定できるシステムがあると診断や重症度および治療効果、予後の判定などに大いに役立つ。実際には臨床の場で測定できるテスターなどの開発が重要であると考えられるが未だ開発されてはいない。工学的な機器開発の現状と問題点について検討する。

2. HDC promoter (1kb)-ZsGreen1.1 トランスジェニックフィッシュの作製

ゼブラフィッシュは個体サイズが小さく(成魚約 4cm)、卵生で多産であり(数十~数百卵/day)、胚発生が早く(受精後 1 日で脊椎動物の基本構造を獲得)、胚発生中はほぼ透明なため観察しやすく、低コストで飼育可(マウス比)、全ゲノム配列も完了しており、マウスにない利点を数多く持っている。レポーターマウスの作製と同時にレポーターフィッシュの作製を目指す。

B. 方法

1. 溶出金属イオンの測定法

1. PIXE (particle induced x-ray emission) 法

原子に陽子線をかけることによって、放出してくる特異的な X 線を解析して、金属を特異的に検出する方法。感度は 1-10mg/g ぐらいである。比較的試料の量が少なくても測定できる。但し、陽子線を発生させるために加速器を稼働させるため、大がかりとなる。

2. ICP-mass 法

inductively coupled plasma (誘導結合高周波プラズマ) 放電を利用する溶液試料の発光分析法。高感度で多くの元素を同時定量ができるので急速に発展普及した。ICP 放電で生じたイオンを質量分析計と結合させた ICP-MS 法も開発され、きわめて高感度である。ICP-mass 法の感度は 10pg/g 程度まで下げられる。

2. フィッシュの作製

HDC promoter 1.0kb+pZsGreen1.1 を構築し、フィッシュ受精卵に注入し、蛍光を観察する。

F. 今後の方針

1. 金属アレルギーの新しい診断技術開発に向けた工学的アプローチに関して分担研究者と相談をして、必要な技術開発の的を絞る。それとともに、工学部内における研究開発動向を探り、開発技術をいち早く利用できるように人的連関を広くし、強くする。

2. 共同研究にてフィンランドのヘルシンキでフィッシュを作製中である。現在いくつかのラインが確保され評価中であり、近日中に利用可能となる。ただし、Fish の場合免疫系がまだ発生学的に原始的であり、ヒトの金属アレルギーと異なる点も多い。

演題：マウス金属アレルギーモデルの病理解析

演者：川野光子、浦野奈央子、田中（石崎）和沙、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：

A. 研究目的

金属アレルギーは、遅延型過敏反応とされT細胞主体のアレルギー反応とされている。これまで、適当な動物モデルがなかったことにより、金属アレルギー研究は感作ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 実験が主流であった。我々は、当研究班で開発した金属アレルギーマウスモデルを用いて、金属アレルギーの病態、発症における分子の変化を時系列的に解析し、新規診断、予防、治療法の開発を目指すことを目的としている。本班会議では、金属アレルギーマウスモデルを用いて、アレルギー発症部位に細胞の浸潤を認めたのでこれを中心に報告したい。

B. 方法

1. 病理組織標本について

金属にて感作した C57BL/6 マウスの耳介に金属の皮内投与によりアレルギーを誘導した。耳介を採取し凍結切片を作成後、蛍光色素標識抗体にて染色、蛍光顕微鏡 (Tissue FAXS[®] PLUS, tissuegnostics) にて検出した。

2. ヌードマウスへの移入について

Balb/c マウスに金属を感作・アレルギー誘導後、顎下リンパ節および脾臓から T 細胞を精製し、ヌードマウスへ移入した。その後ヌードマウスの耳介へ金属を皮内投与し、耳介の腫脹を測定した。

C. 結果

金属アレルギーマウスの耳介では、炎症局所で T 細胞の浸潤が認められた。アレルギーを発症した WT マウス所属リンパ節より細胞を採取しヌードマウスに移入後、金属で challenge したところ耳介の腫脹を認めた。

D. 考察

T 細胞が炎症局所に浸潤していることから、炎症部位あるいは所属リンパ節において T 細胞が増殖、活性化している可能性が高い。また、所属リンパ節より採取した T 細胞を養子移入することで、アレルギーを発症することから、メモリー型細胞が所属リンパ節に存在することが判明した。

E. 結論

金属アレルギーの発症において T 細胞が、炎症局所に浸潤していることが明らかとなった。マウスモデルにおいて、アレルギーの発症は耳介の腫脹が主たる兆候であるが、これは浮腫である可能性が高いことが、病理標本から明らかとなった。

F. 今後の方針

T 細胞が炎症局所に浸潤していることから、炎症部位あるいは所属リンパ節において T 細胞が増殖、活性化している可能性が高い。そこで、T 細胞の共刺激分子のリガンドを標的とした si RNA を用いた knockdown により、炎症を抑制できるか、治療への応用が可能か否かを追究する。また、所属リンパ節より採取した T 細胞を養子移入し、金属で感作することを繰り返すことにより、金属アレルギー特異的 T 細胞クローンを樹立したいと考えている。

演題：口腔上皮細胞の自然免疫系と金属アレルギー
—自然免疫刺激によるNK活性化レセプター誘導—

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

口腔上皮細胞は微生物をパターン認識する各種 Toll-like receptor (TLR)系分子および NOD1/2 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。これまで、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等の発現が遺伝子レベルならびに蛋白レベルで増強されることを明らかにした。今回は、MICA/B発現の経時変化を検討した。

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FSL-1、TLR3リガンドのpoly I:C、TLR4リガンドの合成リポドA、TLR7リガンドのPoly U、TLR9リガンドの細菌型CpG DNA、NOD1リガンドのFK156ならびにFK565、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MICA/B発現をフローサイトメトリー法で経時的に検討した。

結果と考察

MICA/B発現はいずれのリガンド刺激でも明瞭に増強し、増強効果は調べた限りの刺激時間(12、24ならびに48時間)で同程度に認められた。この知見は、自然免疫系の刺激を受けた口腔上皮細胞は持続的にNK活性化レセプターを高レベルに発現することを示唆している。

結論

自然免疫系の刺激を受けた口腔上皮細胞に高レベルのNK活性化レセプターが持続的に発現することを示唆する成績を得て、作業仮説の重要部分を実証した。

今後の方針

最近我々は、別の研究で、口腔上皮に対してTLR系とNOD系の相乗作用、あるいは自然免疫系とPAR (protease-activated receptor)系とのcross-talkを証明している。今後、作業仮説の標的細胞である口腔上皮細胞とNK細胞を始めとするeffector候補細胞でもこのような活性化機序の可能性を検討して、作業仮説の更なる実証に務めたいと考えている。

演題：TLR 依存のおよび非依存的抗原提示細胞の活性化と金属アレルギー発症との関連

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：

A. 研究目的

抗原提示細胞の活性化は、T細胞を介した金属アレルギーの発症に深く関与することが示唆されている。抗原提示細胞の活性化には、TLR 依存的な経路と非依存的な経路が存在することが最近明らかにされつつある。特に、plasmid DNA を用いた DNA ワクチンの研究において、TLR9 KO マウス由来樹状細胞が補助刺激分子の発現増強を伴わずに T 細胞の priming や clonal expansion を誘導することが注目されている。そこで本研究は、どのような経路を介して抗原提示細胞が T 細胞を活性化して金属アレルギーの発症を引き起こすのかを明らかにすることを目的とする。

B. 方法

TLR4 遺伝子座を欠損した C57BL/10ScN マウスの骨髄細胞を 10 ng/ml GM-CSF を含む RPMI 培地で 2 日間培養した後に、TLR キメラを発現するレトロウイルスを感染させて、さらに 4 日間培養した細胞中の TLR キメラを発現する細胞の割合を FACS で測定した。また、C57BL/6 マウスから同様の方法により調製した骨髄由来樹状細胞を各濃度の金属塩溶液 (Ni または Pd) で 24 時間処理した後、細胞の形態を微分干渉顕微鏡を用いて観察した。また、その細胞死を 7-AAD または DAPI 染色により同定した。

C. 結果

前年度の実験で、TLR4 と TLR5 が顕著に樹状細胞の補助刺激分子や MHC class II 分子の発現増強を誘導したことから、これらの TLR を介して活性化された樹状細胞が金属アレルギーを引き起こすか否かを検討するための実験系の構築を試みた。その結果、1) 骨髄由来樹状細胞にレトロウイルスを用いて高効率に TLR キメラを導入する方法を確立した、2) Metal を骨髄由来樹状細胞に直接作用させると、Ni では 0.4 mM から、Pd では 0.3 mM から DAPI 陽性細胞が出現することがわかった、3) Metal 処理により細胞の形態や接着性が変化することがわかった。

D. 考察

Ni と Pd では、Pd の方が細胞毒性が高いことが示唆された。また、Ni は細胞接着性を減弱するが、Pd は細胞接着性を増大することから、樹状細胞上の接着分子のレベルが Metal 処理により変化することが示唆された。

E. 結論

細胞移入実験を行うための TLR キメラを発現する骨髄由来樹状細胞の調製法を確立した。しかしながら、移入実験に適する樹状細胞の metal 処理条件をさらに検討する必要がある。

F. 今後の方針

1. 樹状細胞の metal 処理条件および dish からの回収条件を詳細に検討する。2. Plasmid DNA をアジュバントに用いた場合に金属アレルギーが誘導されるかを金属アレルギーモデルマウス系で検討する。

演題:アトピー皮膚炎における金属アレルギーの関与とTh17細胞による増強

演者:戸倉 新樹

所属:産業医科大学医学部皮膚科学

発表要旨:

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎(AD)は均一の集団ではなく、大きくは外因性(extrinsic)ADと内因性(intrinsic)ADに分けられる(図1)。外因性ADは外来蛋白アレルゲンが原因とされ、IgEが高値であり、内因性ADはIgEが正常である。両者間での根本的な差違が何であるかは必ずしも明確ではなかったが、最近のAD研究の進歩はこの2分別法に新たな光を当てようとしている。

皮膚バリア異常とアレルギー反応の先行性は無いと思われていたが^{1,2)}、2006年にAD患者にはフィラグリン遺伝子の変異があるという報告がなされ³⁾、20%以上の日本人ADでもフィラグリンの遺伝子変異をもつという⁴⁾。つまり外因性ADではフィラグリンを典型とするバリア異常があって、アレルゲンが皮膚を通過しやすくなり、アレルギーが起こり、IgEは高値となる。

一方、IgE値が正常を示すADの成因はアレルゲンの通過性亢進によるものではなく、内因性ADと呼ばれてきた。内因性ADの病態は明確に判っていないが、AD患者には金属アレルギーが多いという古くからの観察とともに^{5,6)}、金属が原因の一重要因子と目されている。加えて内因性ADではかゆみのメカニズムの異常、すなわちかゆみ過敏があるとも考えられる。かゆみ機構には、ヒスタミン、トリプターゼ、サブスタンスP、神経成長因子(NGF)、神経反撥因子、IL-31等々多くの分子が関わっている。内因性ADにおいて、金属アレルギーと恐らくそれが関わるかゆみ過敏が重要な病態因子となっている。

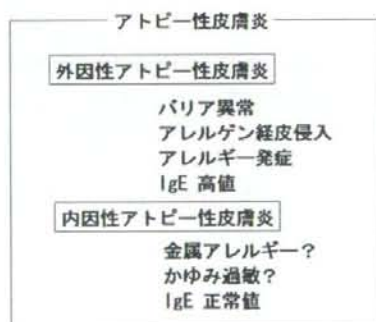


図1. 2つのタイプのアトピー性皮膚炎

最近我々は、ADの免疫学的機序に関連する重要な知見を見出した。Th17細胞はAD症状のamplifierとなることである。Th17細胞はIL-23などに誘導され、IL-17、IL-22を産生する。Th17細胞は皮膚科領域ではまず乾癬において注目されたが⁷⁾、ADにおいても重要である。我々が調べた結果では、Th17細胞はADの急性期病変では慢性期の3倍以上浸潤し、末梢血では病勢に応じてその割合が高まる⁸⁾。IL-17は皮膚での炎症の起爆剤的な存在である。もし金属アレルギーが内因性ADの原因的要素

素であるならば、金属による遅延型反応の amplifier として Th17 細胞が関わっている可能性がある。

本課題では内因性 AD における金属アレルギーの関与を、Th17 を介在細胞と看做して解析したい。そのカスケードは、1) 金属は樹状細胞やケラチノサイトが介助し Th17 細胞を活性化し、2) 樹状細胞やケラチノサイト自身も金属によって活性化されサイトカイン・ケモカインを産生し¹⁰⁾、3) Th17 細胞は産生する IL-17 や IL-22 によりケラチノサイトを刺激し、サイトカイン・増殖因子・かゆみ関連物質の産生を亢進させ、4) 樹状細胞よりの Th2 ケモカイン、ケラチノサイトよりの Th1 ケモカイン、かゆみ関連物質等が AD を増悪させる。本研究の目的は、1) AD 特に内因性 AD 患者では外因性 AD と比較して金属アレルギーが高頻度か、2) そうした患者において原因金属は Th17 細胞を活性化させるかである。

B. 方法

研究の概要は以下の2点である。1) 内因性 AD 患者では外因性 AD と比較して金属アレルギーが高頻度か、2) そうした患者において原因金属は Th17 細胞を活性化させるか、またそのカスケードはどうなっているか、を研究する。研究項目は、下記のように5つのカテゴリーに分かれる。

1) AD 重症度項目

SCORAD, VAS, 好酸球数, LDH, sE-selectin, sIL-2R

2) 外因性と内因性の分別項目

IgE, TEWL, water holding capacity

3) 金属アレルギー検査項目

金属パッチテスト, 金属に対するリンパ球幼弱化反応

4) Th1, Th2, Th17 項目

細胞内サイトカイン FACS, 培養上清サイトカイン測定

5) かゆみ関連項目

VAS, SP

本研究について産業医科大学倫理委員会の承認を得た後、産業医科大学病院皮膚科を受診した患者につき、インフォームド・コンセントを得る。

AD 患者の背景因子以下の項目につき各 AD 患者の背景を調べる。

1. 皮膚症状, かゆみ

AD の重症度は severity scoring system for atopic dermatitis (SCORAD) で評価する。かゆみの強さは visual analogue scale (VAS) で測定する。皮疹の性状については、特に内因性 AD では痒疹 (prurigo) タイプが多いとの仮定に基づき痒疹の有無と程度を記載する。

2. 一般血液検査

総 IgE (RIST), ヤケヒョウヒダニ RAST, 白血球数, 好酸球数, LDH, 可溶性(s)E-selectin, sIL-2R を測定する。IgE RIST と RAST は外因性と内因性の AD を分ける指標とする。好酸球数, LDH, sE-selectin, sIL-2R は検査値上の重症度の指標とする。

3. 金属パッチテスト

ニッケル(Ni), コバルト(Co), 六価クロム(Cr), マンガン(Mn), 亜鉛(Zn), 金(Au), 鉄(Fe), スズ(Sn), 水銀

(Hg)、銅(Cu)、白金(Pt)、アルミニウム(Al)、銀(Cu)、インジウム(In)、イリジウム(Ir)を選択した。トリイのパッチテスト試薬により、スタンダードの濃度でパッチテスターを用いて行う。

4. 皮膚生理学的検査

角層のバリア機能を transepidermal water loss (TEWL), Water holding capacity (impedance)を用いて行う。外因性 AD ではこれらの機能の低下がある。

5. 末梢血リンパ球免疫検査

Ficoll 比重遠心法にて患者末梢血単核球 (PBMC) を得て、以下の測定を行う。

1) リンパ球サブセット

CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD20, CD25, CD56, CD45R0, CD45RA, HLA-DR, CXCR3, CCR4, Foxp3 陽性細胞の割合(%)をそれぞれの標識モノクローナル抗体で3重染色した後にフローサイトメトリにて解析する。Foxp3 は細胞内染色を用いる。特に、CXCR3+CD4+細胞:Th1, CCR4+CD4+細胞:Th2, CD4+CD25+Foxp3+細胞:regulatory T 細胞, について検討する。

2) Th1, Th2, Th17 細胞割合

細胞内サイトカイン染色を、IFN- γ , IL-4, IL-17 に対する抗体を用いて行う。PBMC を phorbol ester (PMA) と Ca ionophore で刺激したのち、CD3 あるいは CD8 の表面染色と上記3種それぞれの細胞内サイトカイン染色を行い、フローサイトメトリ解析する。この刺激により CD4 発現は減弱するため、IFN- γ +CD8-:Th1 細胞, IL-4+CD8-:Th2 細胞, IL-17+CD8-:Th17 細胞, としてそれぞれの割合を測定する。

3) 金属に対するリンパ球幼弱反応

金属パッチテスト陽性患者に対して、PBMC (2×10^5 /well) を 96 穴プレートで金属を希釈系列添加で 3 日間培養し、培養の最後 12 時間に ^3H -チミジン ($1 \mu\text{Ci}/\text{well}$) を添加する。細胞をハーベスト後、液体シンチレーションカウンターにて ^3H -チンジンの取り込みを測定する。

4) 金属に対する T 細胞反応の転写レベル解析

Th1:T-bet/STAT4, Th2:GATA3/STAT6, Treg:Foxp3, Th17:ROR γ t, それぞれの転写因子活性を real-time PCR で検討する。

5) ダニ抗原に対するリンパ球幼弱反応

上記 3)と同様の方法で希釈系列でのダニ抗原に対するリンパ球の反応性を検討する。

金属、ダニに反応する T 細胞のサイトカイン産生

金属パッチテストあるいはダニ抗原陽性患者に対して、PBMC を金属あるいはダニ抗原添加で 24 穴プレートで 5 日間培養した後、培養上清中のサイトカイン(IFN- γ , IL-4, IL-17, TNF- α)を CBA あるいは ELISA にて測定する。

6) かゆみ関連物質

神経ペプチドの代表としてサブスタンス P(SP)の血中濃度を測定する。SP については末梢知覚神経である C 線維が産生し、その受容体である NK1 を肥満細胞やケラチノサイトが表出していることから、AD のかゆみに重要とされる。なお SP を正しく測定するために、この分解酵素を不活化した方法を取り入れて行う。Neurotrophin の代表的なものに nerve growth factor (NGF) があるが、血中での測定が低値であ

るため、BDNFを測定することにする。

C. 結果

Th17細胞は、ADの重症度に応じてAD患者末梢血リンパ球中での割合が高かった。AD患者全体では乾癬に比べTh17細胞割合は少ないが、重症ADにおいては乾癬患者に比べ有意差無く高値であった。皮膚浸潤細胞でのIL-17産生細胞の割合は、ADの急性病変において慢性病変より高かった。

金属に関する研究は進行中である。

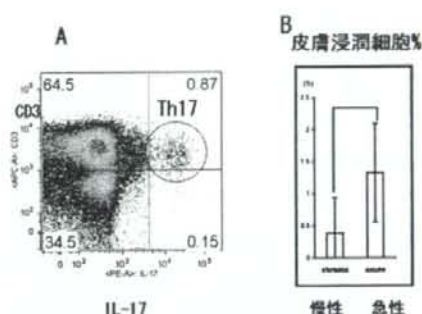


図2. Th17はAD患者の末梢血で増加し (A)、急性のAD皮膚病変で増加 (B)

D. 考察

期待される研究成果は以下である。

第1に、外因性ADと内因性ADを判別する方法の確立である。外因性ADは「角層バリア機能の破綻による外来抗原に対する反応亢進」、内因性ADは「バリア異常に基づかないかゆみの亢進」というのが基本的概念である。これを数字に還元するために、IgEの他に、角層機能(TEWL、water holding capacity)が有用な分別方法になり、さらにはかゆみ関連の測定項目(SP)が補助以上の診断項目になれば、大きな成果が得られる。

第2に、内因性ADの原因としての金属アレルギーである。古くから、Ni、Cr、Coはアレルギーを起こす3大金属と言われており、その他 Sn、Mn、Zn、HgなどもADあるいは自家感受性皮膚炎などで陽性率が高いと言われてきた。ADでの高陽性率が、内因性AD患者での貢献であるかは、現在まで知られていない。そうであるならば内因性ADの原因として金属アレルギーが形を変えて浮上する可能性があり、大きな研究成果となろう。

第3に、ADとTh17細胞の関連である。皮膚科領域ではTh17細胞は乾癬においてまず注目された。しかし我々はTh17細胞の多寡によりADの重症度が決定されることを発表している。¹⁷ Th17細胞の関与がさらに、金属アレルギーと結びついていけば、内因性ADにおけるTh17細胞の重要性を明らかにすることができる。

現在まで、AD の研究を以上のように統括的に行うことは、必ずしもされてこなかった。本研究は新しい基礎・臨床研究を融合的に取り入れたものであり、成果が期待できる。

E. 結論

内因性 AD の原因・病態は明確において金属アレルギーが原因の一重要因子である可能性がある。加えてかゆみ過敏があると考えられる。

AD は Th2 病といわれる。しかしそれだけでは病態を説明できない。全身の免疫状態が Th2 に変調しているのは確かとしても、皮膚炎形成には Th1 サイトカインとくにインターフェロン- γ (IFN- γ) の存在なくしては成立するのが困難だからである。病原性 T 細胞は、IFN- γ のソースであるべきこと、Th2 細胞の性格をもつことを満足させねばならない。あるいは Th1・Th2 両者を統合して促進させる T 細胞、例えば Th17 細胞を病態に参加させることが必要となる。

AD は遅発型反応 (late phase reaction) と遅延型反応 (delayed-type reaction) の間を揺れ動く疾患と捉えることができる (図4)。遅発型反応は、臨床的には浮腫性紅斑であって好酸球と Th2 細胞が媒介する。一方、遅延型反応は湿疹を形成し Th1 細胞と Tc1 細胞が媒介する。もし Th17 細胞は遅発型から遅延型に変わるところで、機能を発揮するかもしれない。IFN- γ はケラチノサイトの Th1 ケモカイン産生を増強させるが、Langerhans 細胞(LC)の Th2 ケモカイン産生は減弱させる⁹⁾。すなわち Th17 細胞の設定する環境下で、IFN- γ は Th1 ケモカインの産生を促し AD の慢性病変としての遅延型反応を先導することを示唆する。

以上の知見を踏まえると、AD における金属アレルギーの関与について次のような作業仮説が成り立つ。金属は樹状細胞やケラチノサイトを介して Th17 細胞を活性化する。この際、樹状細胞もケラチノサイト自身も金属によって活性化される。Th17 細胞は産生する IL-17 や IL-22 によりケラチノサイトを刺激し、サイトカイン・増殖因子・かゆみ関連物質の産生を亢進させる。樹状細胞よりの Th2 ケモカイン (CCL17, CCL22)、ケラチノサイトよりの Th1 ケモカイン (CXCL10, CXCL9, CXCL11) が、AD を悪化させる。さらに、かゆみ関連物質等がケラチノサイトから放出され、さらなる病状悪化を導くことが発想される。

F. 今後の方針

以上の全体計画に基づき、主に金属アレルギー関連の研究項目について上記計画に則り研究を遂行する。

参考文献

- 1) Nishijima T, Tokura Y, Imokawa G, et al: Altered permeability and disordered cutaneous immunoregulatory function in mice with acute barrier disruption. *J Invest Dermatol* 1997; 109: 175-182.
- 2) Hatano Y, Terashi H, Arakawa S, Katagiri K: Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis.