

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

分担課題：マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギー特異的 T 細胞解析

分担研究者 小笠原 康悦 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 教授

研究協力者 笹月 健彦 国立国際医療センター 名誉総長
中山 勝文 東北大学加齢医学研究所 生体防御学分野 助教
川野 光子 東北大学加齢医学研究所 生体防御学分野 研究員

研究要旨

金属アレルギーは T 細胞依存性の IV 型（遅延型）アレルギー反応であると考えられているが、その分子機構は不明のままである。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、金属暴露と養子移入を繰り返すことで、アレルギー特異的な T 細胞を濃縮し、エフェクター細胞の同定を試みた。抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体を投与し、各 T 細胞サブセットを除去して、マウス耳介にパラジウム (Pd) アレルギーの誘導を試みたところ、両群にて耳介の腫脹の軽減が観察されたことから、Pd アレルギーの発症には、両 T 細胞サブセットが関与すると考えられた。遺伝子改変マウスを用いて Pd アレルギー誘導を試みた。β2m KO マウスおよび IFN-γ KO マウスでは、Pd アレルギーの発症は認められなかった。また、WT マウスまたは IFN-γ KO マウスから得た骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を Pd + LPS にて処理し、WT マウスまたは IFN-γ KO マウスに移入して、Pd を耳介に投与したところ、IFN-γ KO マウスに移入した群でのみ耳介の腫脹が軽減された。これらのことから、炎症最終相において IFN-γ が重要であることが示唆された。さらに我々は、よりヒトの臨床像に近いモデルの構築を目指し、金属ワイヤーの埋入による金属アレルギーの誘導も試みている。

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。我々は、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。①これまでに金属アレルギー発症マウス (BALB/c) の所属リンパ節細胞をヌードマウスへ養子移入を繰り返すと CD8 T 細胞が濃縮されたことから、今回遺伝子改変マウス等を用いてエフェクター相における CD8 T 細胞およびエフェクター分子の病理的役割について解析した。②Pd ワイヤーの埋入により感作を成立させ、よりヒトの臨床像に近いモデルを構築できるかどうか検討した。

B. 方法

- 1) C57BL/6 (WT) マウスにパラジウム (Pd) を用いて感作 (10 mM PdCl₂ / 10 μg/ml LPS, 250 μl/head, i.p.)・惹起 (1 mM PdCl₂, 20 μl/ear x 2/head) を行い、その病理像を解析した。次に C57BL/6 マウスに抗マウス CD4 抗体 (GK1.5) あるいは抗マウス CD8 抗体 (53-6.7) を投与することにより各々の T 細胞サブセットを除去し Pd アレルギーを誘導した。さらに MHC class I および CD8 T 細胞を機能的に欠損している β2m 欠損マウスおよび IFN-γ 欠損マウスについても Pd アレルギーを誘導し、これら分子の病理的役割について検討した。
- 2) WT マウスまたは IFN-γ KO マウスの骨髄細胞を骨髄由来樹状細胞 (BMDC) に分化させた後、*in vitro* で PdCl₂ + LPS にて 24 時間処理した。これらの細胞を洗浄後、WT マウスまたは IFN-γ KO マウスに 5 x

10⁵ cells/headにて静脈注射により移入し、7日後にマウス耳介にPdCl₂を皮内注射し、以後その腫脹を測定した。

3) Pd ワイヤ埋入による Pd アレルギー誘導条件の検討

C57BL/6 マウスの背部皮下にPdワイヤー(φ1 mm x 5 mm)をLPS (1 μg/head) +/-にて埋入し、10-20 日後にマウス耳介にPd溶液の皮内注射によりアレルギーを誘導できるか否か検討した。

C. 結果

- 1) Pd アレルギーを誘導した C57BL/6 マウスの耳介腫脹局所において CD8 および CD4 の両 T 細胞サブセットの浸潤が認められた。抗 CD4 抗体あるいは抗 CD8 抗体を各々投与した両群で耳介の腫脹が軽減された(図1)。β2m 欠損マウス(図2)および IFN-γ欠損マウス(図3)で耳介の腫脹が認められなかった。
- 2) WTマウスのBMDCをIFN-γ KOマウスに移入した群では、耳介の腫脹が軽減された。一方、IFN-γ KOマウスのBMDCをWTマウスに移入した群では、耳介の腫脹が観察された(図4)。
- 3) Pdワイヤーを20日間埋入した場合でも、Pd 溶液投与による明確な耳介の腫脹は観察されなかった(図5)。

D. 考察

- 1) 病理解析および T 細胞サブセット除去実験結果から、Pd アレルギー発症には CD4 および CD8 の両 T 細胞サブセットが関与すると考えられた。また β2m 欠損マウスおよび IFN-γ欠損マウスにおいて耳介の腫脹は観察されなかったことから、Pd アレルギーの発症には IFN-γが重要であることが示唆された。
- 2) IFN-γ KOマウスのBMDCをWTに移入した群では耳介の腫脹が観察され、WTマウスのBMDCをIFN-γ KOマウスに移入した群では耳介の腫脹が軽減されたことから、マウスへのPdアレルギー誘導においては、IFN-γは炎症最終相に関与することが示唆された。
- 3) Pdワイヤーを20日間埋入した場合でも、

耳介に金属アレルギーを誘導できなかったことから、再検討が必要である。

E. 結論

- 1) C57BL/6 マウスを用いたPdアレルギーの炎症最終相においては IFN-γが重要である。
- 2) Pd ワイヤ埋入を背部皮下に埋入して金属アレルギーを誘導するには、更なる条件検討が必要である。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1)原著論文

100. Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S : Regulation of inducible nitric oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. *J. Biol. Chem.* in press.
101. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K. 2010. Compensatory role of Langerhans cells and langerin-positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of murine contact hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 125: 1154-6 e2
102. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y. Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2010, 162: 83-90

2)総説論文、著書

なし

2.学会発表

国外学会

38. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Ogasawara K. CD8 α^+ CDs use Tim-3 for phagocytosis of dying cells and cross-presentation. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 2010.
39. Kawano M, Nakayama M, Ogasawara K. Specific T cells increased by metal

allergy. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug. 2010.

国内学会

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

図1 : CD4 T細胞およびCD8 T細胞サブセット除去によるPdアレルギーの誘導

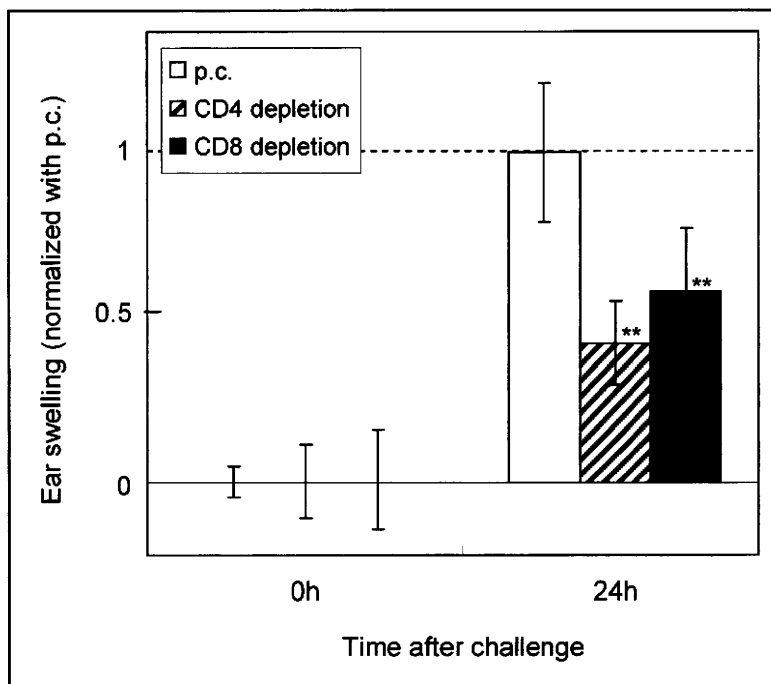


図2 : $\beta 2m$ KO マウスにおけるPdアレルギーの誘導

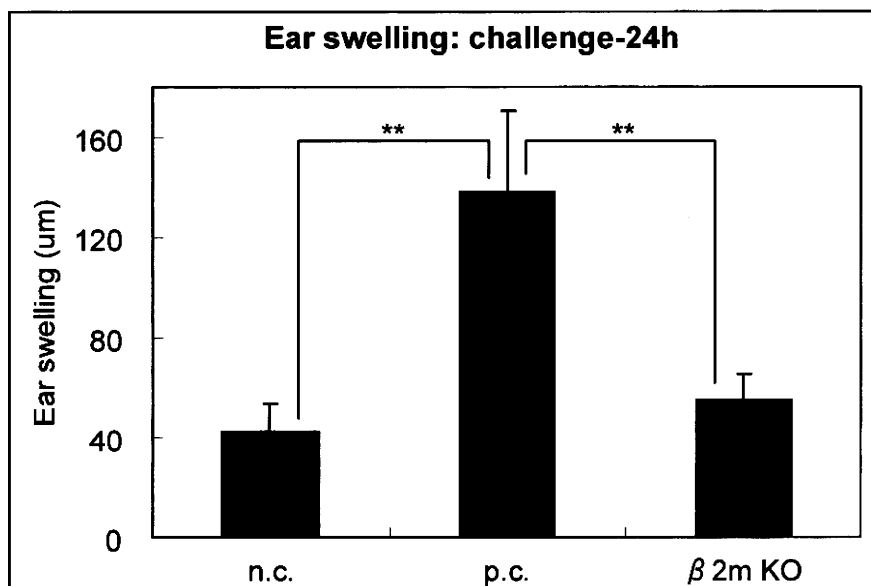


図3 : IFN- γ KO マウスにおける Pd アレルギーの誘導

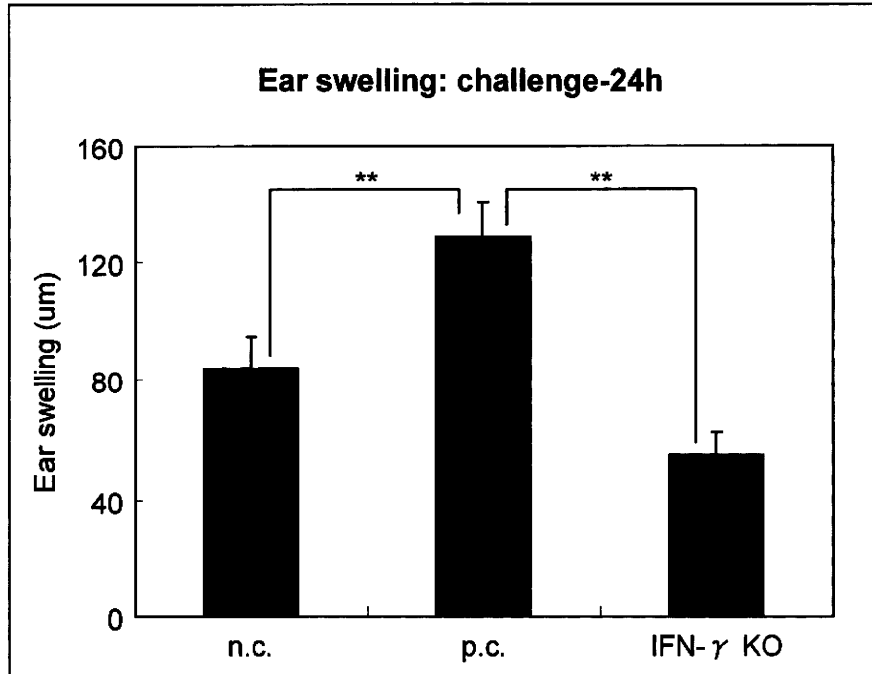


図4 : BMDC 移入による Pd アレルギー誘導

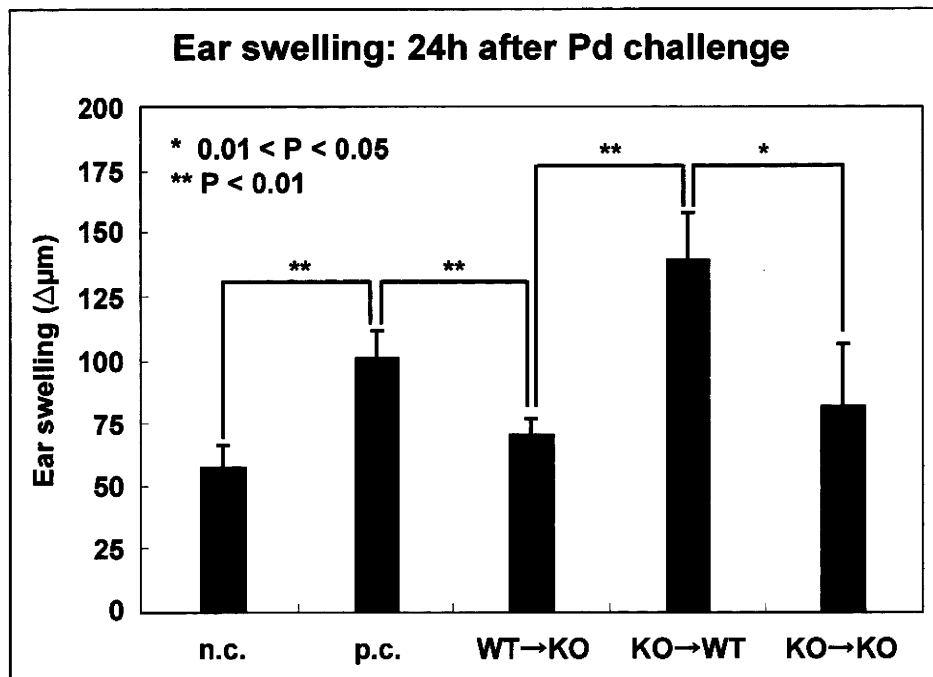
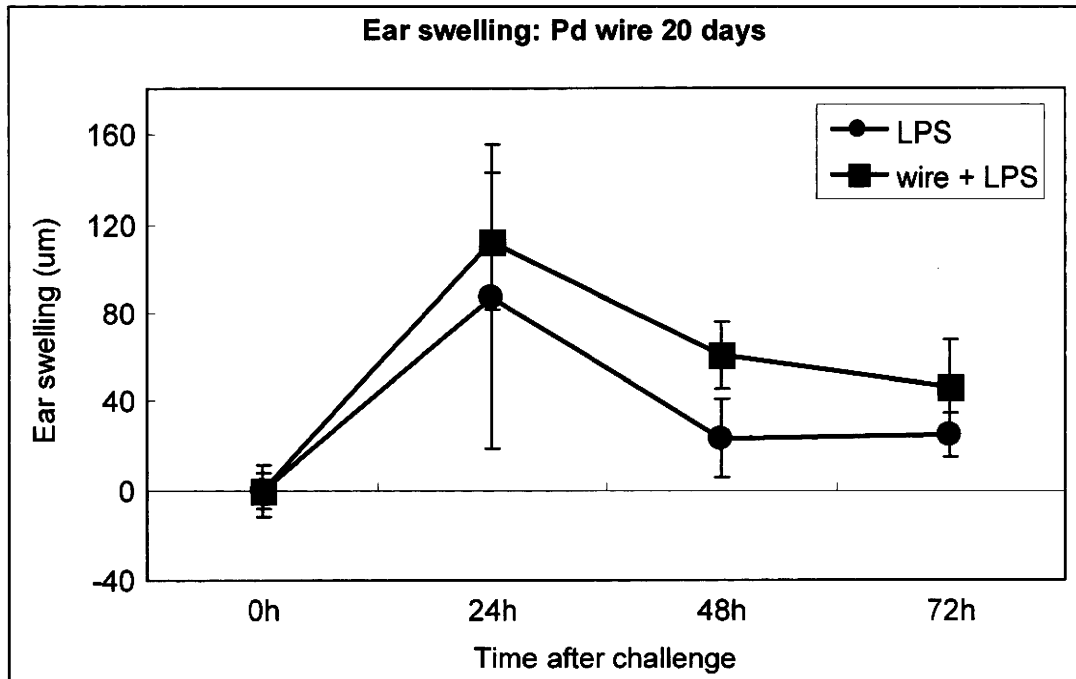


図 5 : Pd ワイヤ埋入による Pd アレルギーの誘導



厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

分担課題：金属アレルギー発症モデルマウスにおける網羅的 T 細胞レセプター解析

分担研究者：鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 診断治療研究室 室長

研究協力者：熊谷 賢一 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 助教

小林 浩 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

江口 貴紀 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

重松 宏昭 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

研究要旨：金属アレルギーは T 細胞依存性の IV 型（遅延型）アレルギー反応であるとされている。しかしながら、その詳細な細胞分子学的機構は未だ不明のままである。

本研究は金属(PdCl₂)に対するアレルギー反応の病態解明を目的としている。

前回、我々は金属アレルギーに特異的な T 細胞を同定するため、所属リンパ節をヌードマウスに繰り返し養子移入することで、高効率に純化されたエフェクター T 細胞を保有するマウスを用いて TCR レパトア解析を施行した。その結果、炎症部局所（耳介部）とその所属リンパ節に特異的 T 細胞サブファミリー存在していることを明らかにした。

今回は本病態像をより正確に把握するため、金属アレルギーモデルマウス(Sato N et al, Clin Exp Allergy, 2007)を一部改変したマウスを用いて、定量的 PCR・病理学的解析・TCR レパトア解析の多面的角度から病変部浸潤 T 細胞の経時的動態変化及び病変部組織の経時変化を調査した。結果、病変部局所で特異的 T 細胞サブファミリーは経時的にその割合頻度が著しく変化しており、TCRAV18-1・3-2 は組織破壊像と平行に上昇するが、TCRAV11-1・1-2 は低下傾向を示すなど、いくつかのサブファミリーが複合的に病態形成へ関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究は金属(PdCl₂)に対するアレルギー反応の病態解明を目的としている。

前回、主任研究者である小笠原らより提供された、高効率に純化されたエフェクター T 細胞を保有するマウス（所属リンパ節をヌードマウスに繰り返し養子移入することで金属特異的 T 細胞を濃縮させた）が特異的 T 細胞ファミリー（TCRAV11-1）を持つことを明らかにした。

今回、病態像をより正確に把握するため、

金属アレルギーモデルマウスを一部改変したマウスを用いて、定量的 PCR・病理学的解析・TCR レパトア解析による多面的角度から病変部に浸潤している T 細胞動態及び病変部組織変化を経時的に調査した。

B. 研究方法

1) 改変金属アレルギーモデルマウスの作製
Balb/c マウス（6週齢、♀）に金属・LPS 混合溶液を鼠径部への皮内注射する事で感作し、金属溶液単体を足蹠に皮内注射し誘

導された腫脹を測定した。感作・誘導の回数は条件検討を行い、足蹠の腫脹を測定し最大値を示す感作・誘導回数を調べた。また、その条件下での局所への T 細胞浸潤の有無を定量的 PCR にて確認した。

2) 定量的 PCR による病変部局所での経時的サイトカインプロファイルの調査

足蹠および膝下リンパ節における T 細胞マーカーおよびサイトカインプロファイルの経時的変化を定量的 PCR 法にて解析した。

3) 病理学的解析

Control (PBS 注射)・金属溶液注射後 24 h・72 h・1w のマウス足蹠で HE 染色を行い、経時的組織変化の有無を調べた。

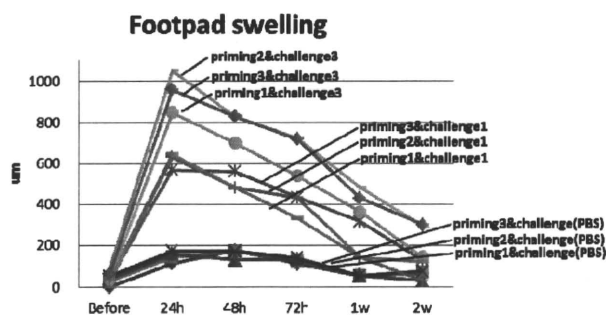
4) TCR レパトア解析による金属アレルギー特異的 T 細胞動態の解析

control マウス群と各時間での実験群マウス (誘導注射後 24h, 72h, 1w) における T 細胞の経時的動態変化を調査した。

C. 研究結果

(1) 改変金属アレルギーモデルマウスの作製
 様々な感作・誘導条件を検討した結果、感作 2 回誘導 3 回の条件下で足蹠の腫脹は最大値を示した。また、誘導後の足蹠の腫脹は 24 時間でピークに達し、1W 後でも有意な腫脹が観察された。(図 1a, b)

これらの結果より、感作 2 回・誘導 3 回を実験群マウスの固定条件とした (control 群：感作法は同様だが誘導時 PBS を使用)。



(図 1a)

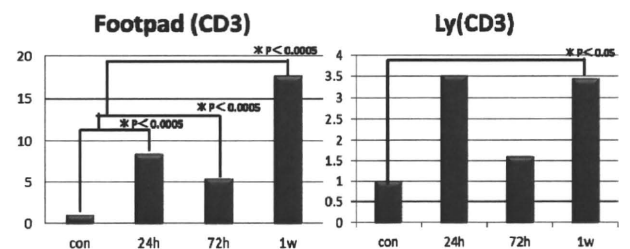
また、実験群では誘導注射後 24 h・72 h・1w の時点でマウスより組織を摘出し以降の遺伝子解析・病理組織のサンプルとした。



(図 1b)

(2) 定量 PCR 法による解析

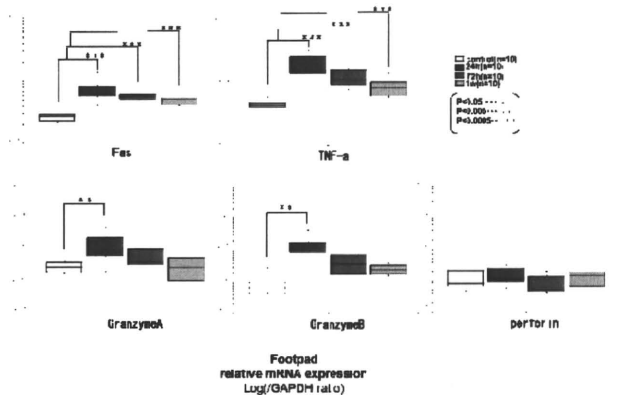
Control 群に対し実験群では足蹠および膝下リンパ節に 24 h と 1w で T 細胞マーカーの上昇を認めた。(図 2a, b)



(図 2a)

(図 2b)

アポトーシス関連因子も同様に優位な上昇を認めた。(図 3)

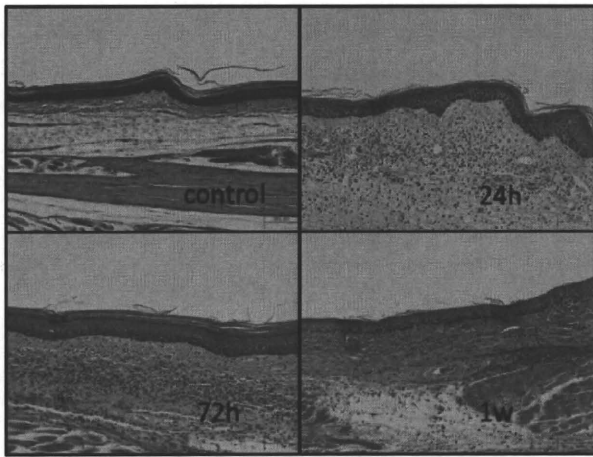


(図 3)

(3) 病理学的解析

実験群 (誘導注射後 24h, 72h, 1w) では Control 群と比較して病変部局所へ明らかな細胞浸潤が認められた。

また誘導注射後の病変部で組織変化が経時的に観察された。(図4)

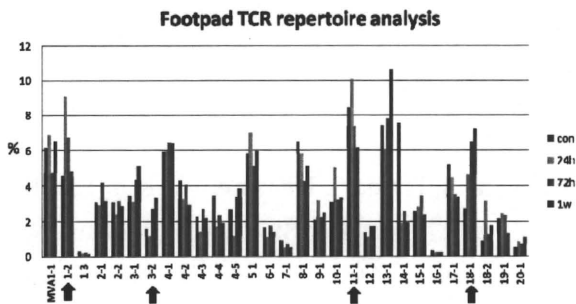


(図4)

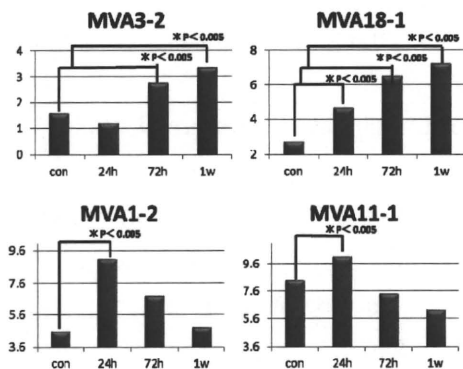
(4) TCR レパトア解析

TCR レパトア解析では時間経過すると共に TCRAV18-1、3-2 が上昇し、一方で TCRAV11-1・1-2 が低下する傾向を認めた。

(図5a, b)



(図5a)



(図5b)

D. 考察

(1) 金属アレルギーは抗原金属に長期間反復暴露されることで惹起されるという点に留意し、我々はマウスへ抗原金属を反復感作・誘導を行

うこととした。その結果、この改変モデルマウスでは病変部局所において長期間にわたる T 細胞浸潤とアポトーシス誘導因子の上昇が認められ、病理組織像も時間経過すると共に明らかな組織破壊を伴った。ゆえに我々は金属アレルギーの臨床病理学的な病態と近似した状態を呈するモデルマウスを作製することに成功したと考える。

(2) この改変モデルマウスを用いた TCR レパトア解析の結果より、時間経過と共に出現する組織破壊像と平行に上昇する T 細胞の特異的サブファミリー (TCRAV18-1、3-2) が存在する一方で低下する特異的サブファミリー (TCRAV11-1・1-2) が存在している事が明らかとなった。よってこれらの特異的サブファミリーが金属アレルギーの病態形成に何らかの重要な役割を担っている可能性が示唆された。

E. 結論

我々が経時的な変化に留意して行った今回の実験結果により、一般的に T 細胞主体の疾患と定義されている金属アレルギーにおいて、その病態形成に主体的に働く T 細胞のサブファミリーが経時的に変化している可能性が明らかとなった。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

Kumagai K, Hamada Y, A. Holmlund, Gotoh A, Nakaoka K, Arai Go, Yamane S, Suzuki R.

The levels of vascular endothelial growth factor in the synovial fluid correlated with the severity of arthroscopically observed synovitis and clinical outcome after temporomandibular joint irrigation in patients with chronic closed lock. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.2009 (in press)

Kitaura K, Kanayama K, Fujii Y, Shiobara N, Tanaka K, Kurane I, Suzuki S, Itoh T, Suzuki R. T cell receptor repertoire in BALB/c mice varies according to tissue type, sex, age, and hydrocortisone treatment. *Exp Anim*. 2009 Apr;58(2):159-68.

Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology*. 2009 Sep;128(1Suppl):e315-24.

Gotoh A, Hamada Y, Shiobara N, Kumagai K, Seto K, Horikawa T, Suzuki R. Polyclonal expansion of T cells bearing restricted T cell receptor repertoires in lesions of oral lichen planus without hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*.154(2):192-201 2008

Hamada Y, Holmlund AB, Kondoh T, Nakaoka K, Sekiya H, Shiobara N, Gotoh A, Kumagai K, Suzuki R, Seto K. Severity of arthroscopically observed pathology and levels of inflammatory cytokines in the synovial fluid before and after visually guided temporomandibular joint irrigation correlated with the clinical outcome in patients with chronic closed lock. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*.106 (3): 343-349, 2008.

Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T. Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis. *J Rheumatol*. 2008 ;35(12):2316-24.

Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor. *J Rheumatol*. 2008 ;35(6):960-8.

Yamane N, Tanaka Y, Ohyabu N, Yamane S, Maekawa K, Ishizaki J, Suzuki R, Itoh T, Takemoto H. Characterization of novel non-peptide thrombopoietin mimetics, their species specificity and the activation mechanism of the thrombopoietin receptor. *Eur J Pharmacol*. 2008 31;586(1-3):44-51.

Fujii Y, Kitaura K, Nakamichi K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. Accumulation of T-cells with selected T-cell receptors in the brains of Japanese encephalitis virus-infected mice. *Jpn J Infect Dis*. 2008 ;61(1):40-8.

Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R. Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients *Journal of Inflammation* 2008 Apr 27;5:5

Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hikita A, Mitomi H, Mori T, Juji T, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T. Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum*. 2008 ;58(1):154-63.

Shiobara N, Suzuki Y, Aoki H, Gotoh A, Fujii Y, Hamada Y, Suzuki S, Fukui N, Kurane I, Itoh T, Suzuki R.

Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. Clin Exp Immunol. 2007 ;150(1):13-21.

Matsutani T, Ohmori T, Ogata M, Soga H, Kasahara S, Yoshioka T, Suzuki R. Itoh T. Comparison of CDR3 length among thymocyte subpopulations: impacts of MHC and BV segment on the CDR3 shortening. Mol Immunol. 2007 Mar;44(9):2378-87.

2.学会発表

国内学会

川野光子、武田加奈、中山勝文、熊谷賢一、小林浩、鈴木隆二、小笠原康悦
金属アレルギー炎症部位における特異的 T 細胞の増加
第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）
2009.12.2-4

藤井克樹、北浦一孝、鈴木さつき、松谷隆治、高崎智彦、伊藤恒敏、倉根一郎、鈴木隆二
コモンマーモセット T 細胞受容体 α 鎖および β 鎖配列の網羅的解析
第 39 回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）
2009.12.2-4

熊谷賢一、濱田良樹、後藤哲人、川口浩司、堀江彰久、山田浩之、金井郁代、池谷進、石田璃久磨、瀬戸皖一、鈴木隆二
口腔癌リンパ節転移における網羅的 T 細胞レセプター解析
第 53 日本口腔外科学会総会（徳島）
2008.10.20-21

後藤哲人、濱田良樹、熊谷賢一、小早川元博、亀井和利、齋藤知之、瀬戸皖一、鈴木隆二
口腔扁平苔癬における特異的な TCR レパト

アを有する T 細胞のポリクローナル様増殖
第 53 日本口腔外科学会総会（徳島）
2008.10.20-21

亀井和利、濱田良樹、堀江彰久、後藤哲人、熊谷賢一、近藤壽郎、瀬戸皖一。
関節突起骨折患者の上関節腔鏡視所見と滑液中の炎症性サイトカイン量
第 52 回日本口腔外科学会総会（名古屋）
2007.9.29-30

濱田良樹、近藤壽郎、齋藤知之、中岡一敏、堀江彰久、熊谷賢一、後藤哲人、瀬戸皖一。
慢性顎関節クローズドロックに対する顎関節有視下洗浄療法の予後に関連する顎関節鏡視所見ならびに炎症性サイトカインの検索
第 20 回日本顎関節学会総会・学術大会（仙台）
2007.7.14-15

熊谷賢一、濱田良樹、後藤哲人、齋藤知之、中岡一敏、堀江彰久、瀬戸皖一。
慢性顎関節クローズドロックに対する顎関節洗浄療法の治療成績と滑液中における血管内皮細胞増殖因子（VEGF）含有量の変化との関連性
第 20 回日本顎関節学会総会・学術大会（仙台）
2007.7.14-15

海外学会

Kumagai K., Hamada Y, Kobayashi H, Gotoh A, Yamada H, Kawaguchi K, Horie A, Suzuki R.
T Cell Receptor Analysis of Lymph Node Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
AAOMS 91st Annual Meeting and Scientific Session in conjunction with the Canadian Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Toronto, CANADA October 15-17 2009

Kamei K, Hamada Y, Horie A, Goto A, Kumagai K., Kondoh T, Seto K.
Arthroscopic findings and inflammatory cytokine

levels in the synovial fluid of the superior joint compartment in patients with condyle fracture.
AAOMS 89th Annual Meeting and Scientific Session in conjunction with JSOMS and KAOMS, Honolulu, USA October 8-14 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当せず。

分担課題：DC 移入型金属アレルギーマウスモデルを用いた金属アレルギー発症機構の解析

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

金属イオンの情報を含む MHC-ペプチド複合体を細胞表面に発現する抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示をすることが金属アレルギー発症の重要なステップとして位置付けられているが、いまだ不明な点が多い。我々の研究班が開発した金属アレルギー発症マウスモデル系では、金属塩と LPS の混合液をマウスの腹腔内に投与することにより、10 日間で金属アレルギーを感作することができる。本分担研究者はこの方法を応用し、金属塩と LPS で処理した骨髄由来樹状細胞 (DC) をマウスに移入することにより、金属アレルギーを感作する動物実験モデル (DC 移入型金属アレルギーマウスモデル) を確立した。本研究は、*in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来 DC が金属アレルギーを誘発するメカニズムを明らかにすることにより、金属アレルギーの感作機構や金属アレルギーの交差反応の分子機構を解明することが目的である。本年度は、DC 移入型金属アレルギーマウスモデルとプロテアソーム阻害剤 (MG-132) を用いて、金属アレルギーの発症における DC の MHC class I を介した抗原提示の重要性を検討した。また、DC に処理した金属と異なる金属でマウスを challenge することにより、金属アレルギーの交差反応における樹状細胞の役割を検討した。その結果、金属塩+LPS 処理 DC 移入による金属アレルギーの発症には、DC 内でのプロテアソームを介した蛋白質分解が関与すること、またパラジウムとニッケルの交差反応において、Pd+LPS 処理 DC の移入では Pd と Ni の交差反応が起こるが、Ni+LPS 処理 DC の移入では Pd と Ni の交差反応は起こらないことがわかった。

A. 研究目的

ニッケル (Ni) やパラジウム (Pd) 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、金属イオンの情報を持つ MHC-ペプチド複合体の 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。一般的に、T 細胞への抗原提示は、マクロファージや DC、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が担う。抗原提示細胞の活性化が金属アレルギーの発症に関与することが示唆されているが、その分子機構や金属アレルギーの交差反応のメカニズムについては、金属アレルギーのモデル動物が存在しなかったことから不明な点が多い。我々の研究

班が開発した金属アレルギー発症マウスモデル系では、金属塩と LPS (TLR4 リガンド) の混合液をマウスの腹腔内に投与することにより、金属アレルギーを感作することができることを示した。さらに、本分担研究者は *in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来樹状細胞 (DC) をマウスに移入することで、同様に金属アレルギーを感作することができるモデル (DC 移入型金属アレルギーマウスモデル) を確立した (図 1)。本研究は、このマウスモデルを用いて、金属アレルギーの感作機構、及び金属アレルギーの交差反応の分子機構の解明を試みた。

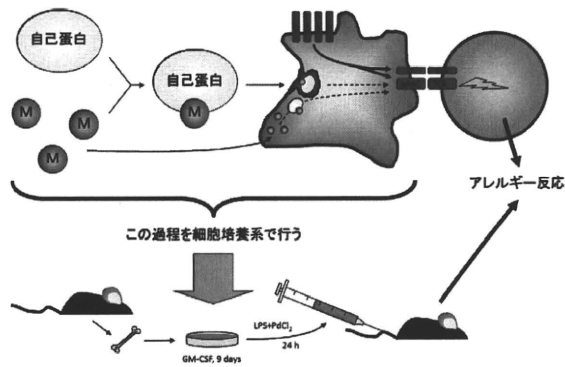


図 1. 金属塩+LPS 処理 DC の移入による金属アレルギーの感作法。

B. 研究方法

1) 骨髄由来樹状細胞 (DC) の調製

C57BL/6 マウス (7~8 週齢雌) の骨髄から細胞を回収し、赤血球除去後に残った細胞を 10 ng/ml GM-CSF 存在下で 9 日間培養した。この細胞を回収し、CD11c の発現を調べたところ、ほぼ 100% の細胞が CD11c 陽性であった。また、20 ng/ml LPS 24 時間処理により、CD80、CD86、MHC class II などの分子の発現が増大することを確認した。

2) DC の移入による金属アレルギー発症とその評価

1 で調製した DC を PdCl₂ (0.2 mM) + LPS (20 ng/ml) または NiCl₂ (0.1 mM) + LPS で 24 時間処理した (対照の DC には PBS を処理した)。なお、MG-132 (0.1 および 0.5 μM) は、金属+LPS 処理と同時に行った。これらの細胞を培地で 3 回洗浄して PdCl₂、NiCl₂、及び LPS を除去した後、5x10⁵ cells/マウスの量を尾静脈注射により C57BL/6 マウス (7 週齢雌) に移入した。10 日後に誘導 (challenge) として PdCl₂ 溶液 (0.5 mM) 15 μl または NiCl₂ 溶液 (1 mM) 15 μl をマウスの耳介に皮内注射し、その 24 時間後に耳の腫脹を DIAL THICKNESS GAUGE (PEACOCK OZAKI MFG. CO., LTD) を用いて測定した。

C. 研究結果

1) 金属アレルギーの発症における DC の MHC class I を介した抗原提示の関与について

DC は MHC class I および MHC class II を介して T 細胞に抗原を提示する。MHC class I によって提示される抗原ペプチドは、ユビキチン・プロテアソーム蛋白質分解系により生成される。そこで、金属アレルギーの発症に MHC class I による抗原提示がどの程度関与するのかをプロテアソームの阻害剤である MG-132 を用いて検討した。その結果、PdCl₂ + LPS で処理した DC を移入したマウスでは、PdCl₂ の challenge により耳の腫脹が増大したが、MG-132 を同時に処理した DC を移入したマウスでは、耳の腫脹はほとんど観察されなかった (図 2)。この結果から、金属アレルギーの発症には DC の MHC class I を介した抗原提示が関与することが示唆された。

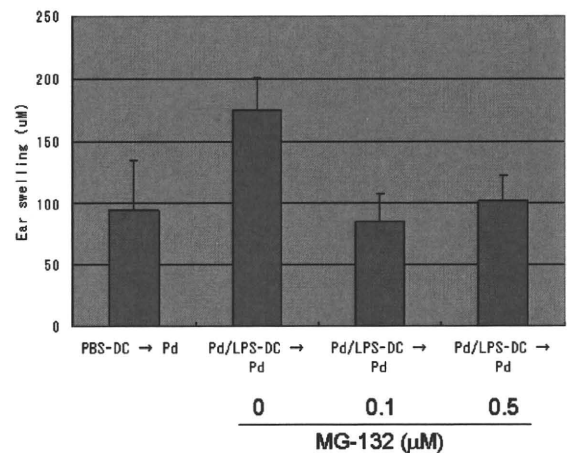


図 2. PdCl₂+LPS 処理 DC の移入による金属アレルギーの発症におけるプロテアソームを介した蛋白質分解系の関与。

2) 金属アレルギーの交差反応における DC の役割についての検討

金属アレルギーは異なる金属間で交差反応を起こすことが広く知られているが、そのメカニズムは不明な点が多い。そこで、金属アレルギーの交差反応における DC の関与について検討した。PdCl₂+LPS で処理した DC を移入したマウスを NiCl₂ で challenge したところ、NiCl₂+LPS で処理した DC を移入したマウスを NiCl₂ で challenge したときに惹起された腫脹と同程度の耳の腫脹が観察され

た (図 3)。

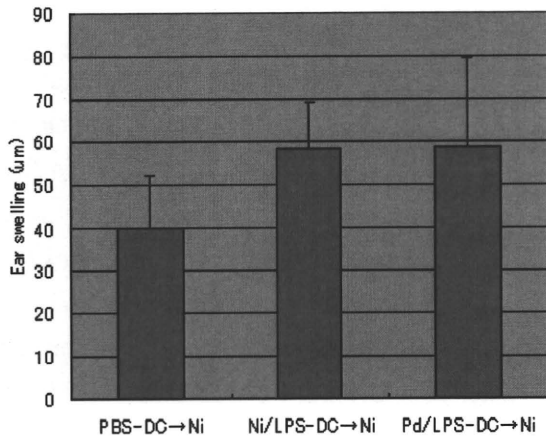


図 3. PdCl₂+LPS 処理 DC を移入したマウスの NiCl₂ による金属アレルギーの誘導。

これとは対照的に、NiCl₂+LPS で処理した DC を移入したマウスを PdCl₂ で challenge した場合には、PdCl₂+LPS 処理 DC を移入したマウスを PdCl₂ で challenge した際に惹起されるような耳の腫脹は観察されなかった (図 4)。これらの結果から、金属アレルギーの交差反応には DC が関与するが、二つの金属間において感作と誘導の順番によって交差反応の出方に影響が出ることが示唆された。

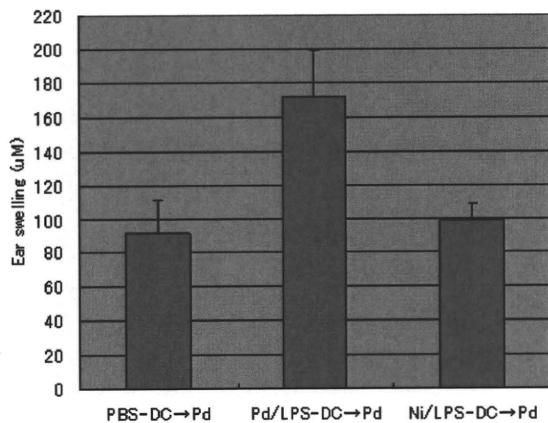


図 4. NiCl₂+LPS 処理 DC を移入したマウスの PdCl₂ による金属アレルギーの誘導。

D. 考察

プロテアソーム阻害剤を用いた実験から、樹状細胞内のプロテアソームを介した蛋白質分解により金属アレルギーを引き起こす抗原

ペプチドが産生されることが示唆された。しかしながら、プロテアソーム阻害剤は IκBα の分解を抑制し、これにより NF-κB の活性化が阻害されることがわかっている。LPS による NF-κB の活性化は CD80/CD86 及び MHC 分子の upregulation に関与するため、プロテアソーム阻害剤により CD80/CD86 や MHC 分子の upregulation が抑制されたことにより金属アレルギー反応が減弱した可能性も考えられる。したがって、今後β2 ミクログロブリンノックアウトマウスの骨髄由来 DC を用いた解析などを通じて、金属アレルギーの発症における DC の MHC class I pathway を介した抗原提示の重要性について、より詳細に検討する必要がある。

また、Pd と Ni 間の交差反応に関して、PdCl₂+LPS 処理 DC の移入では、Ni と反応する T 細胞が生成されるが、NiCl₂+LPS 処理 DC の移入では、Pd と反応する T 細胞は生成されることが示唆された。腹腔内に NiCl₂+LPS を投与して金属アレルギーを感作させる方法では、Pd、Ag、Co などの金属でアレルギー反応が誘導されることが示されている。今後 DC 移入モデルと腹腔内投与モデルにおける交差反応の違いを比較検討し、交差反応における DC の役割をさらに追究する必要がある。

E. 結論

1. 金属塩+LPS 処理 DC 移入による金属アレルギーの発症には、DC 内でのプロテアソームを介した蛋白質分解が関与する。
2. Pd と Ni の交差反応に関して、Pd+LPS 処理 DC の移入では Pd と Ni の交差反応が起こるが、Ni+LPS 処理 DC の移入では Pd と Ni の交差反応は起こらない。

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. Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita

E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S : Regulation of inducible nitric oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. **J. Biol. Chem.** in press.

2. Uehara T, Nishiya T : Screening systems for the identification of S-nitrosylated proteins. **Nitric Oxide** in press.
3. Higa T, Horinouchi T, Aoyagi H, Asano H, Nishiya T, Nishimoto A, Muramatsu I, Miwa S : Endothelin type B receptor-induced sustained Ca^{2+} influx involves $G_{q/11}$ /phospholipase C-independent, p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of Na^+/H^+ exchanger. **J. Pharmacol. Sci.** 113, 276-280, 2010.

2)総説論文

該当なし。

2.学会発表

国際学会

1. Nishiya T, Maekawa S, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S : The lifetime of iNOS is regulated by the SPRY domain-containing SOCS box protein family linking iNOS to the elongin BC-Cul5-Brx2 E3 ubiquitin ligase complex. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (NO2010), Kyoto, Japan, June 14-18, 2010.
2. Horinouchi T, Higa T, Aoyagi H, Asano H, Nishiya T, Nishimoto A, Miwa S : Molecular mechanism of ETAR-operated Ca^{2+} entry via TRPC channels and visualization of homo- and heteromeric TRPC3/6 interaction in living cells using BiFC, 16th World Congress on Basic and Clinical

Pharmacology, Copenhagen, Denmark, July 17-23, 2010.

3. Nishiya T, Maekawa S, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S : The SPRY domain-containing SOCS box protein family regulates the lifetime of iNOS by linking iNOS with elongin BC-Cul5-Rbx2 E3 ubiquitin ligase complex. The 14th International Congress of Immunology (ICI2010), Kobe, Japan, August 22-27, 2010.

国内学会

1. 堀之内孝広、比嘉綱己、青柳裕之、鈴木裕之、西屋禎、西本新、三輪聡一 : cAMP/PKA 系によるエンドセリン A 型受容体作動性 TRPC6 チャンネルの抑制性機能制御、第 61 回日本薬理学会北部会、札幌 2010 年 9 月 10 日。
2. 西屋禎、前川聡、松本一馬、藤室雅弘、小笠原康悦、上原孝、三輪聡一 : Elongin B/C、Cul5、Rbx2、及び SPRY domain-containing SOCS box protein (SSB) により構成される E3 ユビキチンリガーゼ複合体 (ECS-SSB) は誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の分解制御システムである、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月 7~10 日。
3. 西屋禎、前川聡、松本一馬、堀之内孝広、藤室雅弘、小笠原康悦、上原孝、三輪聡一 : iNOS regulation by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins (SPSBs) in macrophages、第 84 回日本薬理学会年会、横浜、2011 年 3 月 22~24 日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

分担課題：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

分担研究者：大津 浩 東北大学大学院工学研究科 応用量子医工学分野 教授
研究協力者：成島 尚之 東北大学大学院工学研究科 医用材料工学分野 教授

研究要旨

1) 金属アレルギー発症の最初のステップとして、金属のイオン化による溶出がある。溶出した金属の濃度を定量的に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。そこで、ICP-MS 法を用いて生体中に溶出したイオン化金属の量について検討した。マウスを用いた金属皮下埋入モデルにおいて、炎症所見が明らかになる前に、Pd, Ag, Au などの貴金属も皮膚に溶出していることが判明した。さらに実際に臨床検体を測定するための予備実験として血清中の金属も測定しうることを確認した。2) また、アレルギー発症の際にヒスタミンが産生されるため、ヒスタミンの産生細胞をモニターするためにその合成酵素の BAC (bacterial artificial chromosome) を使ったレポーター動物を作製している。トランスジェニック用の構築は終えて、受精卵に打ち込み 9 匹のマウスが出生し、うち 2 匹が陽性と出ている。今後、1) 臨床サンプルである汗、血液、尿、唾液などを集め臨床的に良く使われる金属そのものでイオン化について測定し、2) BAC を用いたレポーターマウスの金属皮下埋入モデルを作製し、ヒスタミン産生細胞の病理学的な解析を進める。

A. 研究目的

1. 金属アレルギーは汗、唾液などの体液によってイオン化した金属が体内に取り込まれることによって開始する。取り込まれた金属は体内のたんぱく質と結合後、生体が感作され、再び同じ金属が体内に入ってタンパク質と結合すると皮膚や粘膜を破壊することが金属アレルギーの発症機構と考えられている。従って、溶出した金属を定量的に測定できるシステムがあると早期診断や重症度、治療効果、予後の判定などに大いに役立つ。このため工学的な生体内金属測定機器開発を進めていこうと考えている。

2. ヒスタミンは金属アレルギーの症状を悪化させる生体内物質であることが現在まで私たちのグループを初めとして明らかにされている。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り、金属

による炎症反応においてその遺伝子の発現が誘導されることが示されている。この遺伝子の発現制御を模倣すべく蛍光蛋白遺伝子を発現するようにトランスジェニック動物を作製し、その動物に金属アレルギーを引き起こし、蛍光発光を観察することにより、ヒスタミンの産生細胞が金属アレルギー病態において、どの段階でどの場所に存在するかについて研究する。

B. 方法

1) 金属ワイヤーのマウスへの植え込み実験

C57BL/6 マウス (雄性、6 wks) の背部皮下に金属ワイヤー (直径 0.8 mm、長さ 5 mm) を埋入し、72 時間後、ケタラール麻酔下頸動脈切断により全血を採血し致死させた。ワイヤーを中心として直径 15 mm の皮膚組織をセラミック製のハサミおよびピンセットを用

いて採取、重量を測定し、ドラフト内で皮膚サンプルに 69 %硝酸 3 mL を加えて、80°C で約 20 分間インキュベートした。その後、氷上で 30 %過酸化水素水 0.3 mL を加えて突沸に気を付けながら約 10 分間かけて加温し、皮膚サンプルを完全に溶解した。これを MilliQ 水で全量 10 mL とし、ICP-MS により金属濃度を測定した。血清中の金属濃度は、0.1 ml の血清に 69 %硝酸 3 mL を加え、以下同様に測定した。

この際、血漿成分の漏出や組織の壊死などがおきるので、エバンスブルーによる血漿成分漏出反応の程度や、組織に対する毒性の程度を同時に観察する。

2) 溶出金属イオン測定法

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS 法) (誘導結合質量分光法)

放電を利用する溶液試料の質量分析法。高感度で多くの元素を同時定量ができるため現在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きわめて高感度(数 pg/g)であり、今回の植え込み実験に使用した。

3) レポーター動物の作製

以前プラスミッドを用いたトランスジェニックマウスを作製していたが、組織特異的な発現を再現できないため現在 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。この目的のために BAC との相同組換えを起こすように、蛍光色素遺伝子が入った HDC 遺伝子の BAC 遺伝子も構築完了し、マウスの受精卵に注入し、個体を発生させ PCR による遺伝子解析を行った。

また、トランスジェニックフィッシュの構築も、プラスミッドを使った実験では組織特異性が見えなかったため、BAC によるレポーターを作製し受精卵に注入している。

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。正常のマウス皮膚からは、Na, K, Ca, P, Mg, Zn, Fe, Mn が検出されたほか、Ti, Ni は微量ながら検出された。Pd, Co, Cr や Ni については正常皮膚での含量が低いため埋め込んだ金属からの溶出は測定可能であることが確認された。今回、実用金属である NiTi (形状記憶合金)、SUS316L (ステンレス)、Ag-Pd (銀パラ)などを植え込んだ結果、NiTi からは Ti が、SUS316L からは Ni や Mo が、Ag-Pd からは Pd, Ag, Au, Cu が溶出してくることが判明した。

2. 埋入周囲組織における金属濃度と血清中金属濃度との比較

ニッケルワイヤーを埋入して3日後では、組織中のニッケル濃度は 4000ppb (4000 ng/g tissue)と著しく増加した。このときニッケルワイヤー周囲組織では強い炎症反応が生じていた。このとき血清中のニッケル濃度も増大し、ワイヤー周囲組織の 8~10 分 1 の濃度を示した。(図 1)

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。そこで方針を転換し、現在 BAC を用いたレポーター遺伝子の構築を終え受精卵に注入した。今回のレポーター遺伝子の構築方法は図 2 の通りである。その後構築された BAC construct を受精卵に注入し、それぞれの受精卵から発生した 9 個体の尾を PCR を用いて genotyping した結果、2 個体 (No. 569, 572) が positive であった (図 3, 図 4)。

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がフィッシュは躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった。そこで、ゼブラフィッシュに関しても BAC を用いた construct を完成し、ゼブラフィッシュ受精卵に注入してスクリーニングを開始している。

D. 考察

1. 溶出金属イオンの測定法の開発

生体内のしばしば用いられるステンレス鋼である SUS316L を植え込んだ周囲に Ni や Mo 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金属イオンの溶出があることが明らかになった。炎症反応が組織学的に明らかでなくても既に金属溶出が起きており、特に今まで臨床的には問題ないと思われる「安全」な合金でも溶出反応があることから、生体内で金属の溶出を正確に評価することによって、金属アレルギー発症のメカニズムの研究や発症の予防に役立たせようと考えている。臨床的に明らかな症状が出現する前に未然に防ぐことが重要である。

2. 埋入周囲組織における金属濃度と血清中金属濃度との比較

ニッケルワイヤーを埋入することにより、その周囲組織だけでなく血清中のニッケル濃度が増大し、全身的にニッケルが分布していることが示唆された。この結果は局所において炎症反応が誘発するほどニッケルが溶出している場合には、血清中のニッケル濃度を測定することにより類推することが可能であることを示唆している。すなわち、金属製医用材料を用いた医療機器を体内に設置したときに生じた炎症反応が、金属イオンに基づくものであるかどうかは血清中の金属を測定すれば診断できると考えられる。今回は、より明確な結果を得るために、99.9%以上の純ニッ

ケルを用いたが、今後、ニッケル含量並びに溶出が低い医用材料についても同様の解析を行なっていく予定である。また実際の医用材料によって生体内に溶出している可能性のある金属についてその濃度を測定できる可能性も示唆している。

2. HDC promoter-reporter 動物の作製

BAC を用いた新しいレポーターマウス作製は最終段階まで進んでいる。このマウスを用いた金属植え込み実験によって、ヒスタミン産生細胞が病態のどの時期に出現し、どのような種類の細胞であるかについて考察を深めることが出来るようになる。

また、ゼブラフィッシュにおいても BAC を用いたレポーターフィッシュの作製を進めている。

E. 結論

金属の溶出は局所の炎症が起きうる種類の金属ばかりではなく、従来「安全」と言われる金属にも溶出反応が起きていることが判明した。本実験系は金属アレルギーにおける安全な評価系であり、金属医用材料に関しても重要な生体内評価系となると考えられる。生体反応が起きるより早期に溶出金属を測定できることは、今後の金属アレルギーの臨床にとって大いに役立つ。現在臨床検体を使った測定を進め始めている。

レポーターマウスやレポーターフィッシュの作製は最終段階まで来ており、完成されたのちに、動物に金属アレルギーを発症させればどの時期にヒスタミン産生細胞が活性化しているのかが判明し、抗ヒスタミン剤の投与方法について工夫できるようになると考えている。

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. Ke-Yong Wang, Akihide Tanimoto, Xin Guo, Sohsuke Yamada, Shohei Shimajiri, Yoshitaka Murata, Yan Ding, Masato Tsutsui, Seiya Kato, Teruo Watanabe, Hiroshi Ohtsu, Ken-Ichi Hirano, Kimitoshi Kohno, and Yasuyuki Sasaguri. Histamine deficiency decreases atherosclerosis and inflammatory response in ApoE-KO mice independently on serum cholesterol level. **Arterioscler Thromb Vasc Biol in press**
2. Fan YY, Hu WW, Dai HB, Zhang JX, Zhang LY, He P, Shen Y, Ohtsu H, Wei EQ, Chen Z. Activation of the central histaminergic system is involved in hypoxia-induced stroke tolerance in adult mice. **J Cereb Blood Flow Metab.** 305-14, 2011
3. Gong YX, Shou WT, Feng B, Zhang WP, Wang HJ, Ohtsu H, Chen Z. Ameliorating effect of histamine on impairment of cued fear extinction induced by morphine withdrawal in histidine decarboxylase gene knockout mice. **Acta Pharmacol Sin** 31, 1431-1437, 2010
4. Shen Y, He P, Fan YY, Zhang JX, Yan HJ, Hu WW, Ohtsu H, Chen Z. Carnosine protects against permanent cerebral ischemia in histidine decarboxylase knock-out mice through reducing glutamate excitotoxicity. **Free Radic Biol Med.** 48, 727-735, 2010
5. Noriyasu Hirasawa, Yoshiaki Goi, Rina Tanaka, Kenji Ishihara, Hiroshi Ohtsu, Kazuo Ohuchi. Involvement of prostaglandins and histamine in nickel wire-induced acute inflammation in mice. **J Biomed Mater Res A** 95, 1306-1311, 2010
6. Masahiro Seike, Kanako Furuya, Momoyo Ohmura, Kumiko Watanabe, Hiroshi Ohtsu. Histamine H4 receptor

antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. **Allergy** 65, 319-326, 2010

2)書籍

著書：Robin L. Thurmond(編者), **Histamine in inflammation Series: Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 709 1st Edition, 2011, XVIII, 144 p. ISBN: 978-1-4419-8055-7** (タイトル), Landes Bioscience (出版社) Austen Texas, A chapter "Histamine synthesis and lessons learned from histidine decarboxylase deficient mice." written by Hiroshi Ohtsu in press (ページはまだ不詳) (2011) **April 28** 出版予定

2.学会発表

1. 東北大工 大津 浩

「W1-1 生体内イオン化金属の定量と金属アレルギーにおけるヒスタミンの役割」

第60回日本アレルギー学会秋季学術大会(招待講演)

ワークショップ1 金属アレルギーの発症メカニズムと対策

座長 山内 広平、高橋 一夫

東京国際フォーラム 2010年11月25~27日

(発表 25日)

2. 東北大工(院生)青島有佑, 東北大工 上

田恭介, 大津浩, 成島尚之,

東北大加齢研 小笠原康悦, 東北大薬 平澤典保

「金属系材料のマウス皮下における腐食挙動」

日本金属学会 第147回大会(2010年秋期)

北海道大学 2010年9月25~27日(発表 26日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし