

- Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y : Topical Cholecystokinin Depresses Itch-Associated Scratching Behavior in Mice. *J Invest Dermatol*. 2010. (in press)
12. Fukamachi S, Bito T, Shiraishi N, Kobayashi M, Kabashima K, Nakamura M, Tokura Y : Modulation of semaphorin 3A expression by calcium concentration and histamine in human keratinocytes and fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2010. (in press)
 13. Bito T, Izu K, Tokura Y : Evaluation of toxicity and Stat3 activation induced by hydrogen peroxide exposure to the skin in healthy individuals. *J Dermatol Sci*.58(2) : 157-9, 2010.
 14. Bito T, Sumita N, Masaki T, Shirakawa T, Ueda M, Yoshiki R, Tokura Y, Nishigori C. Ultraviolet light induces Stat3 activation in human keratinocytes and fibroblasts through reactive oxygen species and DNA damage. *Exp Dermatol*. 19(7) : 654-60, 2010.
 15. Bito T, Sumita N, Ashida M, Budiyo A, Ueda M, Ichihashi M, Tokura Y, Nishigori C : Inhibition of epidermal growth factor receptor and PI3K/Akt signaling suppresses cell proliferation and survival through regulation of Stat3 activation in human cutaneous squamous cell carcinoma. *J Skin Cancer* (in press).
 16. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Matsuoka H, Kubo A, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K : Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssimus* extract. *Am J Pathol* 176 : 2385-2393, 2010.
 17. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K : Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* 120 : 883-893, 2010.
 18. Nakamura M, Tokura Y : Superficial angiomyxoma on the scrotum of a child. *Ped Dermatol* (in press)
 19. Nakamura M, Tokura Y : Congenital onychodysplasia of the index finger in a child with meconium aspiration syndrome. *Int J Dermatol* (in press)
 20. Nakamura M, Sugita K, Tokura Y : A novel missense mutation in the *TRPS1* gene in a case of trichorhinophalangeal syndrome type I (TRPS1) with fish-like malodour. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24 : 358-359, 2010.
 21. Nakamura M, Tokura Y : A novel missense mutation in tumour necrosis factor receptor superfamily 1A (TNFRSF1A) gene found in tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS) with high serum interleukin (IL)-22. *Eur J Dermatol* 20 : 508-509, 2010.
 22. Nakamura M, Tokura Y : Multiple pilomatricomas in association with 21-hydroxylase deficiency. *Ped Dermatol* 27 : 417, 2010.
 23. Nakamura M, Fukamachi S, Tokura Y : Acute onset disseminated superficial porokeratosis associated with exacerbation of diabetes mellitus due to development of anti-insulin antibodies. *Dermatoendocrinol* 2 : 17-18, 2010.
 24. Nakamura M, Tokura Y : Systemic cholesterol embolization syndrome in a patient positive for anti-cardiolipin antibody. *Dermatoendocrinol* (in press)
 25. Nakamura M, Tokura Y : Methylmalonic

- aciduria presenting with recurrent multiple molluscum contagiosum lesions. *Dermatoendocrinol* (in press)
26. Nakamura M, Sugita K, Tokura Y : Expression of Snail1 in the vimentin-expressing squamous cell carcinoma mimicking atypical fibroxanthoma : possible involvement of an epithelial-mesenchymal transition. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 24 : 1365-1366, 2010.
 27. Kobayashi M, Tokura Y : Downmodulatory effects of cetirizine and levocetirizine on cytokine/chemokine production and CD54 expression in keratinocytes. *J Dermatol.* (in press).
 28. Yoshiki R, Nakamura M, Tokura Y : Drug eruption induced by IL-6 receptor inhibitor tocilizumab. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 24 : 495-6, 2010. Epub 2009 Sep 14.
 29. Kabashima R, Hino R, Bito T, Kabashima K, Nakamura M, Ohyama B, Hashimoto T, Tokura Y : Epidermolysis bullosa acquisita associated with psoriasis. *Acta Derm Venereol* 90 : 314-316, 2010.
 30. Kabashima R, Sugita K, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Tokura Y. Increased circulating Th17 frequencies and serum IL-22 levels in patients with acute generalized exanthematous pustulosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (in press)
 31. Sawada Y, Bito T, Kabashima R, Yoshiki R, Hino R, Nakamura M, Shiraishi M, Tokura Y : Ectopic extramammary Paget's disease : case report and literature review. *Acta Derm Venereol* 90 : 502-505, 2010.
 32. Sawada Y, Yoshiki R, Kawakami C, Fukamachi S, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y : Valsartan-induced drug eruption followed by CD30+ pseudolymphomatous eruption. *Acta Derm Venereol* 90 : 521-522, 2010.
 33. Sawada Y, Sugita K, Kabashima R, Hino R, Nakamura M, Koga C, Tokura Y : CD8+ CD56+ mycosis fungoides with an indolent clinical behaviour : case report and literature review. *Acta Derm Venereol* 90 : 525-526, 2010.
 34. Sawada Y, Bito T, Kawakami C, Shimauchi T, Nakamura M, Tokura Y : Erosive pustular dermatosis of the scalp and leg associated with myasthenia gravis : A possible pathogenetic role for neutrophil-stimulating cytokines and chemokines. *Acta derm Venereol* 90 : 652-653, 2010.
 35. Sawada Y, Nakamura M, Bito T, Haruyama S, Kabashima R, Sugita K, Kobayashi M, Tokura Y : Chondrodermatitis of the auricle in patients with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol* (in press)
 36. Sawada Y, Bito T, Kabashima R, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y : Epileptic seizures and cholinergic urticaria with generalized hypohidrosis or anhidrosis. *Eur J Dermatol* (in press)
 37. Sawada Y, Mori T, Nakashima D, Nakamura M, Tokura Y : Necrobiosis lipoidica of the scrotum. *Eur J Dermatol* (in press)
 38. Sawada Y, Nakamura M, Tokura Y : Multiple fixed drug eruption caused by pazufloxacin. *Acta Derm Venereol* (in press)
 39. Ohmori S, Sugita K, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Tokura Y : Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia occurring on the penis. *Eur J Dermatol* 20 : 545-546, 2010.
 40. Fueki H, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y : Acquired poikiloderma associated with primary biliary cirrhosis. *Eur J Dermatol* (in press)

41. Fukamachi S, Kimura T, Kobayashi M, Hino R, Nakamura M, Tokura Y : Palmar pseudolymphoma associated with herpes simplex infection. *J Cutan Pathol* 37 : 808-811, 2010.
42. Fukamachi S, Sugita K, Nakamura M, Tokura Y : Cutaneous pseudolymphoma due to benidipine hydrochloride with massive infiltration of eosinophils. *J Dermatol*. 2010 (in press)
43. Abe S, Kabashima K, Moriyama T, Tokura Y : Food-dependent anaphylaxis with serum IgE immunoreactive to dairy products containing high-molecular-weight proteins. *J Dermatol Sci* 57 : 137-40, 2010.
44. Haruyama S, Sugita K, Kawakami C, Nakamura M, Tokura Y : Development of a Prominent Granulomatous Eruption after Interferon- γ Therapy in a Patient with Mycosis Fungoides. *Acta Derm Venereol* 90 : 190-191, 2010.
45. Haruyama S, Sugita K, Kawakami C, Nakamura M, Tokura Y : Spinal cord compression presumably due to metastasized cutaneous squamous cell carcinoma to the thoracic spine. *J UOEH* 32 : 155-159, 2010.
46. Yoshizawa M, Sugita K, Haruyama S, Yoshiki R, Hino R, Bito T, Nakamura M, Tokura Y : Schwannomatosis presenting with large subcutaneous and retroperitoneal tumours : report of a case and review of the literature. *Clin Exp Dermatol* (in press).
47. Koga C, Sugita K, Kabashima K, Matsuoka H, Nakamura M, Tokura Y : High responses of peripheral lymphocytes to mosquito salivary gland extracts in patients with Wells' syndrome. *J Am Acad Dermatol* 63 : 160-161, 2010.
48. Ine K, Kabashima K, Koga C, Kobayashi M, Tokura Y : Eruptive generalized granuloma annulare presenting with numerous micropapules. *Int J Dermatol* 49 : 104-105, 2010.
49. Bito T, Kabashima R, Sugita K, Tokura Y : Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia on the leg successfully treated with Th2 cytokine inhibitor suplatast tonsilate. *J Dermatol* 2010. (in press)
50. Bito T, Kawakami C, Shimajiri S, Tokura Y. Generalized eruptive xanthoma with prominent deposition of naked chylomicrons : evidence for chylomicrons as the origin of urate-like crystals. *J Cutan Pathol* 37 : 1161-3, 2010.
51. Tanizaki H, Matsumura Y, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K : A case of suppurative granuloma induced by insulin injection. *Acta Derm Venereol* 90 : 541-542, 2010.
52. Nakamizo S, Kurosawa M, Sawada Y, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K : A case of cholinergic urticaria associated with acquired generalized hypohidrosis and reduced acetylcholine receptors : cause and effect?". *Clin Exp Dermatol* (in press)
53. Park K, Mori M, Nakamura M, Tokura Y : Increased expression of mRNAs for IL-4, IL-17, IL-22 and IL-31 in skin lesions of subacute and chronic forms of prurigo. *Eur J Dermatol* (in press).
54. Komune N, Hara T, Tamae A, Izu K, Tokura Y, Joe AK, Masuda M : A case of laryngeal carcinoma in a young adult with dyskeratosis congenita. *Int J Clin Oncol* (in press).
55. Nishitani N, Bito T, Ikeda T, Tokura Y, Nishigori C : Complete remission of metastatic malignant melanoma after surgery in association with development of systemic vitiligo. *J Dermatol* 37 : 770-772, 2010.

2) 総説論文

9. Tokura Y : Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 58 : 1-7, 2010.
10. Nakamura M, Tokura Y : Pathogenesis of alopecia areata : why does alopecia areata develop in a round pattern? *Exp Dermatol* (in press).
11. Honda T, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K : Prostanoid receptors as possible targets for anti-allergic drugs : Recent advances in prostanoids on allergy and immunology. *Current Drug Targets* (in press).

2.学会発表

国外学会

1. Tokura Y : Psoriasis and Th17-mediated skin diseases. Shanghai Immunodermatology Forum. Shanghai, 2010.
2. Tokura Y : Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. 35th Annual Meeting of Japanese Society of Dermatology, Wakayama, 2010.
3. Tokura Y: The type of skin eruptions is an independent prognostic indicator for adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). 5th International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphomas. 2011.1.15. Berlin.
4. Nakamura M, Kimura H, Tokura Y : Increased expression of activation-induced cytidine deaminase in chronic active Epstein-Barr virus infection leads to neoplastic development. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, 2010.
5. Nakamura M, Tokura Y : Epithelial-mesenchymal transition in skin fibrosis and tumor formation. The 40th European Society of Dermatology Research Annual Meeting, Budapest, 2010.

6. Nakamura M, Tabata Y, Tokura Y : Controlled delivery of T-box21 (T-bet) small interfering RNA (siRNA) using cationized gelatin ameliorates autoimmune alopecia (alopecia areata) in a C3H/HeJ mouse model. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.
7. Nakamura M, Tokura Y : New approach for a hair follicle regeneration using mouse induced pluripotent stem cells. The 6th World Congress of Hair Research, Cairns, 2010.
8. Kobayashi M, Sakabe J, Nakamura M, Tokura Y : Spicular form titanium dioxide induces IL-1 alpha /beta production of keratinocytes. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, 2010.
9. Mori T, Kabashima K, Kuroda E, Sakabe J, Fukamachi S, Kobayashi M, Nakajima S, Nakano K, Tanaka Y, Yamashita S, Tokura Y : Inhibition of immediate and late-phase cutaneous reactions by blockade of D1-like dopamine receptors. 14th International Congress of immunology, Kobe, 2010.
10. Mori T, Park K, Nakamura M, Tokura Y : Increased expression of mRNAs for IL-4, IL-17, IL-22 and IL-31 in skin lesions of subacute and chronic forms of prurigo : The First Eastern Asia Dermatology Congress, Fukuoka, 2010.
11. Mori T, Kabashima K, Sakabe JI, Kuroda E, Fukamachi S, Kobayashi M, Nakajima S, Nakamura M, Tokura Y : Inhibition of immediate and late-phase cutaneous reactions by blockade of D1-like dopamine receptors. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama,

2010.

12. Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Tokura Y : Local UVB-induced immunosuppression is mediated by IL-10 producing and OX40L-positive mature Langerhans cells. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.
13. Sugita K, Tohyama M, Watanabe H, Iijima M, Hashimoto K, Miyachi Y, Tokura Y, Kabashima K : A novel role of the distribution of plasmacytoid dendritic cells for HHV-6 reactivation in drug-induced hypersensitivity syndrome. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, 2010.
14. Kabashima R, Nakamura M, Sakabe J, Fukamachi S, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Nomura Y, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y : The intrinsic type of atopic dermatitis shows normal barrier function, lack of filaggrin mutations, high percentage of Th1 cells, and high frequency of metal allergy compared to the extrinsic type. The 70th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Atlanta, 2010.
15. Kabashima R, Nakamura M, Sakabe J, Fukamachi S, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Nomura Y, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y : Barrier function-based immunological differences between extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, 2010.
16. Sawada Y, Hino R, Hama K, Nakamura M, Tokura Y : Classification of skin manifestations of adult T-cell

leukemia/lymphoma (ATLL) useful for staging and predictive for prognosis. Society for Investigative Dermatology, Atlanta, 2010.

17. Sawada Y, Hino R, Hama K, Nakamura M, Tokura Y. Classification of skin manifestations of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) useful for staging and predictive for prognosis. Annual meeting Cutaneous Lymphoma Foundation/International Society for Cutaneous Cell Lymphoma Symposium. Atlanta, 2010.

18. Sawada Y, Hino R, Hama K, Nakamura M, Tokura Y. Classification of skin manifestations of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) useful for staging and predictive for prognosis. American Dermato-Epidemiology Network Annual meeting, Atlanta, 2010.

19. Sawada Y, Hino R, Hama K, Nakamura M, Tokura Y. Classification of skin manifestations of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) useful for staging and predictive for prognosis. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, 2010.

20. Ohmori S, Hino R, Nakamura M, Tokura Y : Heparin serves as a natural stimulant of inflammasome and exacerbates the symptoms of TRAPS. The 40th Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, Helsinki, 2010.

21. Ohmori S, Sugita K, Sawada Y, Hino R, Nakamura M, Tokura Y : Angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia occurring on the penis : case report and literature review. The First Eastern Asia Dermatology Congress, Fukuoka, 2010.

22. Ohmori S, Hino R, Nakamura M, Tokura Y : Study on heparin as a natural stimulant of inflammasome. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, 2010.
23. Sakabe J, Kuroda E, Tokura Y : PI3-kinase pathway regulates antigen-induced type2 cytokine production from basophils. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.
24. Sakabe J, Kuroda E, Nakamura M, Tokura Y : The mandatory role of PI3-kinase pathway in IL-4 and IL-13 production by basophils stimulated with IgE and antigen. 40th European Society of Dermatological Research (ESDR) Meeting, Helsinki, 2010.
25. Sakabe J, Kuroda E, Nakamura M, Tokura Y : The role of basophil-derived

Th2 cytokines in super late phase reaction in vivo. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Wakayama, 2010.

26. Bito T, Kabashima R, Fukamachi S, Yoshiki R, Hino R, Mori T, Nishigori C, Tokura Y : Association of autologous sweat allergy and metal allergy with the intrinsic type of atopic dermatitis. SID Annual Meeting, Atlanta, 2010.

27. Bito T, Kabashima R, Hino R, Mori T, Horikawa T, Hirasawa N, Tokura Y, Nishigori C : Analysis of autologous sweat in atopic dermatitis patients with sweat allergy and/or metal allergy. The First Eastern Asia Dermatology Congress (EADC), Fukuoka, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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 京都大学医学研究科 准教授

研究協力者 加藤 真弓 京都大学医学研究科 助教

大塚 篤司 京都大学医学研究科 助教

研究要旨

金属アレルギーは皮膚免疫反応の代表的疾患であり、接触皮膚炎の一つの表現型である。この接触皮膚炎発症には、皮膚樹状細胞が重要な役割を果たすことが示唆されている。一方、皮膚肥満細胞は接触皮膚炎発症において樹状細胞との相互作用が示唆されているがその詳細なメカニズムは明らかとされていない。

そこで、金属アレルギーの成立や寛容における樹状細胞および肥満細胞の役割、相互作用を検証することを本研究の目的とする。今回我々は、肥満細胞特異的欠損マウスを用いる事により、肥満細胞が樹状細胞の機能を亢進させ、接触皮膚炎の成立に重要な役割を果たしている事を示した。このような機序は金属アレルギーの成立過程においても同様であることが期待される。これまで注目されていなかった樹状細胞、あるいはその機能を調整する肥満細胞の役割を介して、金属アレルギー発症の予防や治療応用を図り、金属アレルギーに苦しむ患者の苦痛の軽減に寄与したい。

A. 研究目的

金属アレルギーは皮膚免疫反応の代表的疾患であり、接触皮膚炎の一つの表現型である。この接触皮膚炎発症には、皮膚樹状細胞が重要な役割を果たす。一方、皮膚肥満細胞は接触皮膚炎発症において樹状細胞との相互作用が示唆されているがその詳細なメカニズムは明らかとされていない。そこで、金属アレルギーの成立や寛容における樹状細胞および肥満細胞の役割、相互作用を検証することを本研究の目的とする。

B. 方法

皮膚肥満細胞を特異的に除去させるマウスモデルを確立し、このマウスにおいて、ハプテンを用いた接触過敏反応を誘導させ、接触皮膚炎形成における肥満細胞の役割および樹状細胞に与える影響を検証する。

C. 研究結果

肥満細胞欠損マウスにおいてハプテンを用いた接触皮膚炎を誘導したところ耳介腫脹は有意に減弱していることが明らかとなった(図1)。更に、接触皮膚炎感作相のみ肥満細胞を除去したモデルにおいて耳介腫脹は減弱し、このモデルに骨髄由来肥満細胞を再供給することで減弱が相殺された(図2)。肥満細胞除去時においては、皮膚ランゲルハンス細胞および真皮樹状細胞の遊走能、成熟度は有意に減弱していた(図3)。In vitroの実験では、骨髄より誘導した樹状細胞および肥満細胞を共培養することで、樹状細胞の成熟度は増強され、この相互作用にはICAM1-LFA1を介した細胞接着および肥満細胞が産生する膜型TNF α が必要であった。

D. 考察

皮膚肥満細胞は皮膚の樹状細胞の遊走・成熟を促進することにより、接触皮膚炎の成立

に深く関与していることが示唆された。更に接触皮膚炎感作時には真皮内で肥満細胞と樹状細胞が接触を介した相互作用が重要であることが明らかとなった。

E. 結論

金属アレルギーを代表とする接触皮膚炎反応の成立において、肥満細胞による樹状細胞の遊走・成熟促進が重要な役割を果たす。また、今回は、感作源としてハプテンを用いたが、金属アレルギーの成立においても同様の機序が作用していることが示唆される。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. 2010. Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. *J Immunol* 184: 2729-35
2. 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
3. Nakahigashi K, Kabashima K, Ikoma A, Verkman AS, Miyachi Y, Hara-Chikuma M. 2010 (in press). Upregulation of Aquaporin-3 Is Involved in Keratinocyte Proliferation and Epidermal Hyperplasia. *J Invest Dermatol*
4. Honda T, Otsuka A, Tanizaki H, Minegaki Y, Nagao K, Waldmann H, Tomura M, Hori S, Miyachi Y, Kabashima K. 2010 (in press). Enhanced murine contact hypersensitivity by depletion of endogenous regulatory T cells in

the sensitization phase. *J Dermatol Sci*

5. Yoshiki R, Kabashima K, Sakabe J, Sugita K, Bito T, Nakamura M, Malissen B, Tokura Y. 2010. The mandatory role of IL-10-producing and OX40 ligand-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. *J Immunol* 184: 5670-7
6. Tomura M, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O, Kabashima K. 2010. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest* 120: 883-93
7. Tanizaki H, Egawa G, Inaba K, Honda T, Nakajima S, Moniaga CS, Otsuka A, Ishizaki T, Tomura M, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Okada T, Kabashima K. 2010. Rho-mDia1 pathway is required for adhesion, migration, and T-cell stimulation in dendritic cells. *Blood* 116: 5875-84
8. Sugita K, Kabashima K, Yoshiki R, Ikenouchi-Sugita A, Tsutsui M, Nakamura J, Yanagihara N, Tokura Y. 2010. Inducible nitric oxide synthase downmodulates contact hypersensitivity by suppressing dendritic cell migration and survival. *J Invest Dermatol* 130: 464-71
9. Sugita K, Kabashima K, Sakabe J, Yoshiki R, Tanizaki H, Tokura Y. 2010. FTY720 regulates bone marrow egress of eosinophils and modulates late-phase skin reaction in mice. *Am J Pathol* 177: 1881-7
10. Nakajima S, Honda T, Sakata D, Egawa G, Tanizaki H, Otsuka A, Moniaga CS, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K. 2010. Prostaglandin I2-IP signaling promotes Th1 differentiation in a mouse model of contact hypersensitivity. *J Immunol* 184: 5595-603
11. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M,

- Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y. 2010. 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* 162: 83-90
12. Moniaga CS, Egawa G, Kawasaki H, Hara-Chikuma M, Honda T, Tanizaki H, Nakajima S, Otsuka A, Matsuoka H, Kubo A, Sakabe J, Tokura Y, Miyachi Y, Amagai M, Kabashima K. 2010. Flaky tail mouse denotes human atopic dermatitis in the steady state and by topical application with *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. *Am J Pathol* 176: 2385-93
13. Moniaga CS, Egawa G, Doi H, Miyachi Y, Kabashima K. 2010. Histamine modulates the responsiveness of keratinocytes to IL-17 and TNF-alpha through the H1-receptor. *J Dermatol Sci* 61: 79-81
14. Kambe N, Longley BJ, Miyachi Y, Kabashima K. 2010. KIT Masters Mast Cells in Kids, Too. *J Invest Dermatol* 130: 648-50
15. Honda T, Tokura Y, Miyachi Y, Kabashima K. 2010. Prostanoid receptors as possible targets for anti-allergic drugs: recent advances in prostanoids on allergy and immunology. *Curr Drug Targets* 11: 1605-13
16. Honda T, Miyachi Y, Kabashima K. 2010. The role of regulatory T cells in contact hypersensitivity. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 4: 85-9
- 学会発表
1. K Kabashima. Role of T cell subsets in the development of atopic dermatitis. LIAI Immunology Symposium, Tokyo, Dec. 2010
2. K Kabashima. Helper T cell subsets in atopic eczema. New Trends in Allergy VII and 6th Georg Rajka Symposium. In Munich, Germany, July 2010
3. K Kabashima. Recent advances in the mechanism of contact dermatitis. The 28th Annual meeting of the Korean Society for Contact Dermatitis and Skin. Seoul, Korea, June 2010
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

図1

接触皮膚炎反応は、BasTRECK Tg マウスにジフテリア毒素を投与して肥満細胞を除去することにより耳介腫脹、組織学的所見ともに減弱した

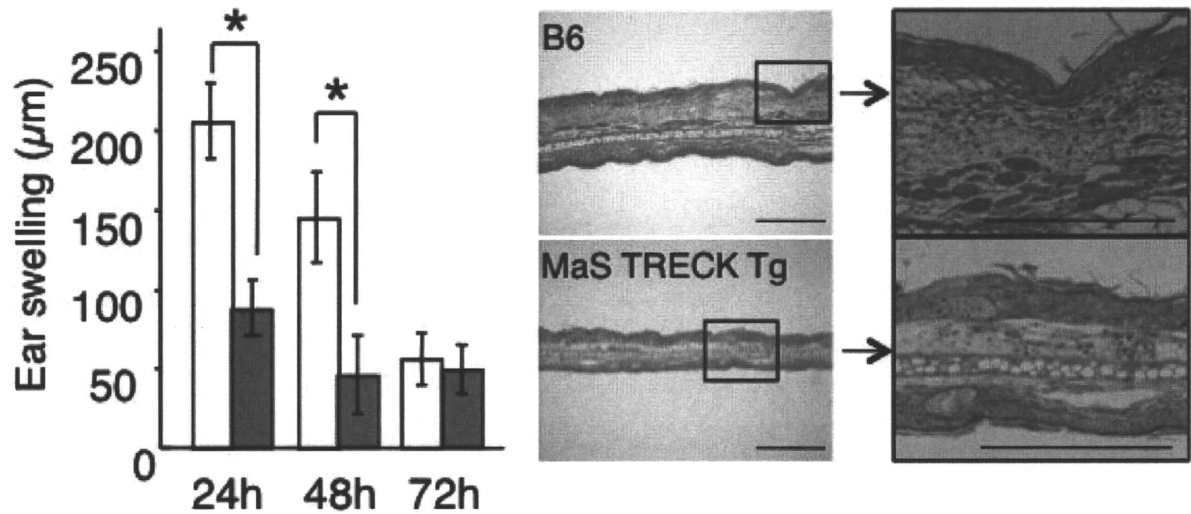


図2

Mas TRECK マウスにおいてジフテリア毒素を投与することにより肥満細胞を欠損させると接触皮膚炎反応は減弱した。しかし、骨髄由来肥満細胞 (BMDC) を加える事により、接触皮膚炎反応は元のレベルに回復した。以上より、肥満細胞が接触皮膚炎の成立に重要な役割を果たしている事を示唆する。

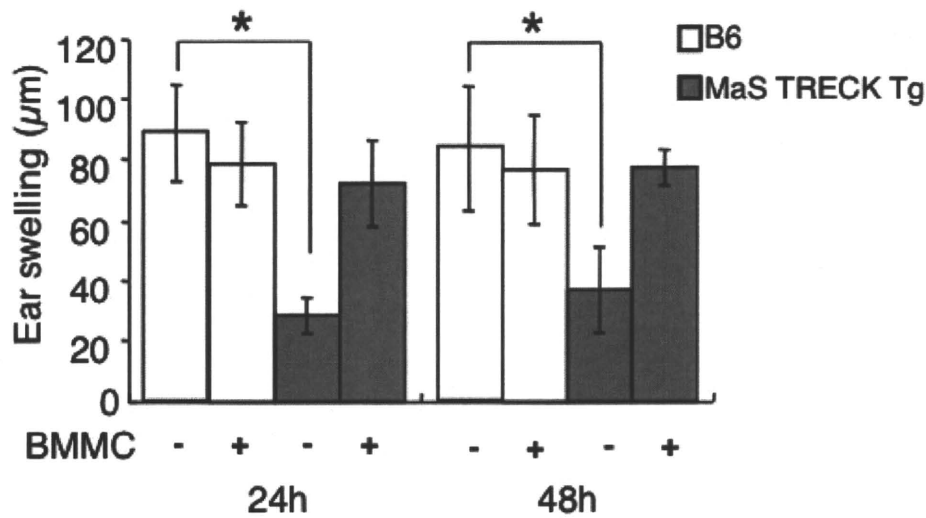
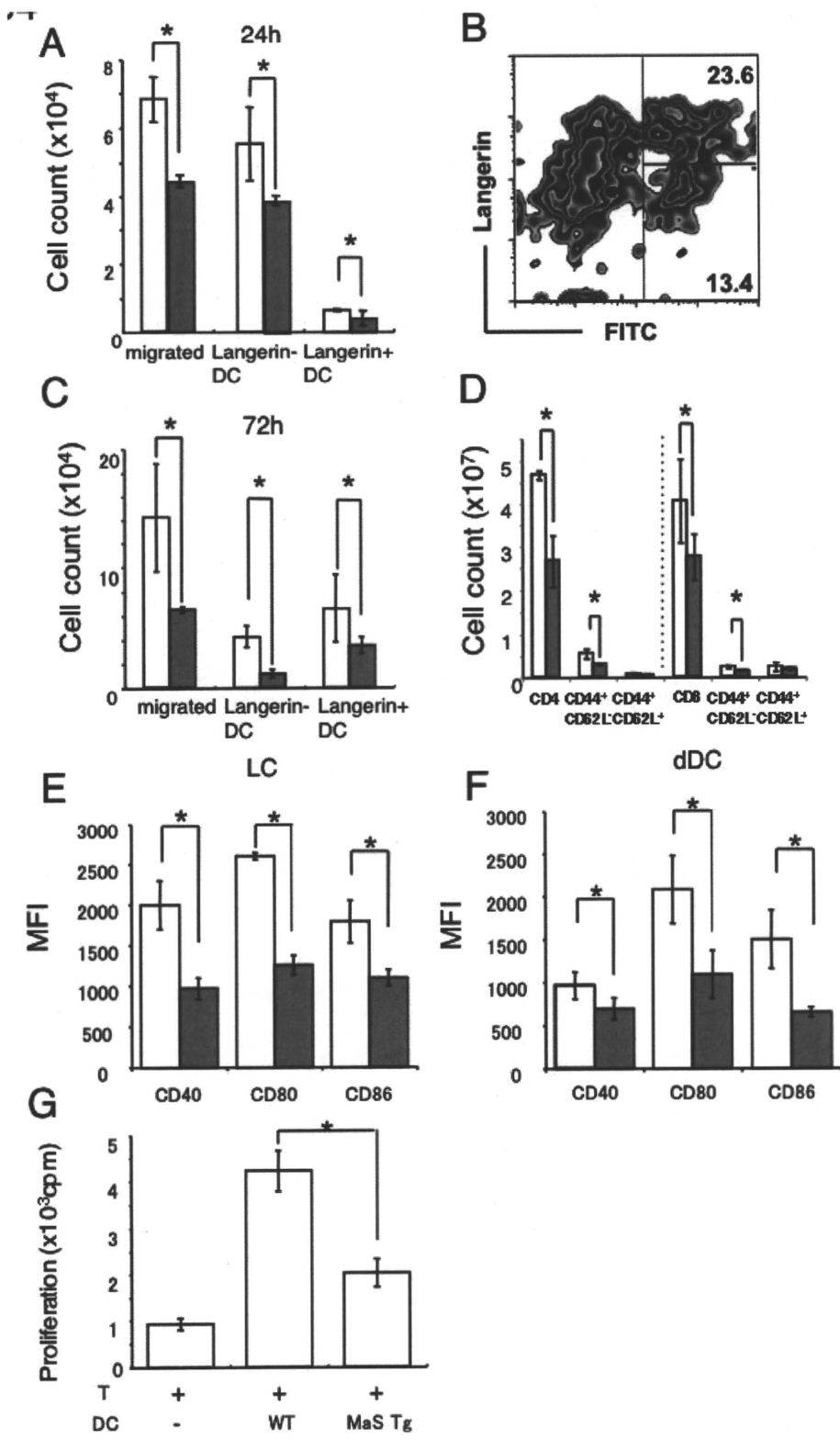


図3

肥満細胞を除くことにより、ハプテン皮膚塗布後の所属リンパ節への皮膚ランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞の遊走 (A, B, C)、所属リンパ節におけるメモリー・エフェクターT細胞数 (D)、樹状細胞の co-stimulatory molecule の発現 (E, F) が減弱した。さらに、肥満細胞を除去したマウス由来の樹状細胞はT細胞の活性化能が減弱していた (G)。



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等予防・治療研究事業

金属アレルギーの革新的診断・予防・
治療法の開発研究

平成22年度
第1回 班会議
抄録集

日時：平成22年5月21日（金）

場所：東北大学東京分室 会議室 A

連絡先（班会議前日まで）： 022-717-8579

（小笠原、中山、川野）

プログラム

開会、本研究事業の概要 研究代表者 小笠原康悦 13:30-13:40

東北大学加齢医学研究所・生体防御学

前年度までの研究成果および本年度の研究計画の発表

セッション1.

「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」

西屋 禎 (分担研究者) 13:45-14:05

北海道大学大学院医学研究科・細胞薬理学

「マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギーの病態解析」

川野 光子 (代理・研究代表者 小笠原康悦) 14:10-14:30

東北大学加齢医学研究所・生体防御学

「金属アレルギー反応に関わる特異的T細胞の存在と意義」

鈴木 隆二 (分担研究者) 14:35-14:55

国立病院機構相模原病院・臨床研究センター

本研究事業の連絡事項 (協力研究者は退出)

小笠原康悦 (研究代表者) 15:00-15:15

東北大学加齢医学研究所・生体防御学

Break 15:15-15:30

セッション2.

「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

「金属の溶出評価と金属アレルギーへの進展機構の解析」
平澤 典保 (分担研究者) 15:55-16:15

東北大学大学院薬学研究科・生活習慣病治療薬学分野

Break 16:15-16:30

セッション3.

「金属パッチテストを用いた金属アレルギー診断方法確立と *in vitro* 検査の有用性検討」
松永 佳世子 (分担研究者) 16:30-16:50

藤田保健衛生大学・医学部・皮膚科

「ヒト金属アレルギーの成立に関わるT細胞規定因子の探索」
秦 まき (代理:橋爪秀夫) 16:55-17:15

浜松医科大学・医学部・皮膚科

「アトピー性皮膚炎と金属アレルギー」
椛島利江子 (代理:戸倉新樹) 17:20-17:40

産業医科大学・皮膚科

Break 17:40-17:55

「金属アレルギー成立における皮膚樹状細胞の役割の解明」
椛島 健治 17:55-18:15

京都大学・医学研究科・皮膚科

総合討論

18:15-18:30

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。

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 細胞薬理学分野 講師

A. 研究目的

金属アレルギーは T 細胞性の遅延型過敏反応であることが示唆されているが、有用な動物実験モデルが存在しなかったことから、その分子機構は不明な点が多い。掌蹠膿疱症に代表されるように、金属アレルギーは、必ずしも金属に暴露された部位にのみアレルギーが発症するわけではなく、手や足の平といった金属暴露部分から遠く離れた部位に発症することがある。この原因の解明や予防・治療法の確立には、金属イオンの情報を持つ抗原提示細胞がどのように活性化され、どこで T 細胞を活性化し、活性化 T 細胞がどこに移動するのかを分子レベルで明らかにすることが不可欠である。我々は、金属塩と LPS で処理した骨髄由来樹状細胞を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) を確立している。そこで、このマウスモデルを用いて、金属イオンの情報を持つ抗原提示細胞の体内動態と T 細胞活性化の時空間的解析を行うことにより、金属アレルギー発症における自然免疫の役割や、金属暴露部位とアレルギー発症部位の相違性の原因を究明する。

B. 方法

1. DC 移入型金属アレルギーマウスモデル: B6 マウスの骨髄細胞を GM-CSF (10 ng/ml) で 7 日間処理し、骨髄由来 DC を得る。この細胞を PdCl₂ (0.2 mM) + LPS (20 ng/ml) で 24 時間処理する (対照の DC には PBS を処理する)。これらの DC を良く洗浄したのち、B6 マウス (7~8 週齢) に尾静脈注射により移入する (5x10⁵ 個/マウス)。10 日後に 1 mM PdCl₂ 溶液 15 μl をマウスの耳介に皮内注射し、以後耳の腫脹を 24 時間おきに 3~4 日間測定する。
2. 金属イオン+LPS 処理 DC を用いた感作 T 細胞の検出法: 1 の方法に従って調製した DC を、金属アレルギーを発症したマウスのリンパ節から精製した T 細胞と混合培養する。その過程で、[3H] thymidine を加え、その取り込み量を測定する。
3. 金属塩+LPS 処理 DC により活性化される T 細胞の局在の検討方法: PdCl₂+ LPS で 24 時間処理した骨髄由来 DC をマウスに尾静脈注射により移入し、その 10 日後に各種リンパ節を採取し、T cell isolation kit (ミルテニー社) を用いて T 細胞を精製する。精製した T 細胞を非感作マウスに尾静脈注射により移入し、24 時間後に 1 mM PdCl₂ 溶液 15 μl をマウスの耳介に皮内注射して、以後その腫脹を測定する。

C. 結果

D. 考察

E. 結論

F. 今後の方針

1. 金属塩+LPS 処理 DC で感作し、金属アレルギーを発症したマウスのリンパ節に存在する T 細胞が金属塩+LPS 処理 DC に特異的に反応するかどうかを検討する。
2. 金属塩+LPS 処理 DC により、どのリンパ節に存在する T 細胞が活性化されるのかを検討する。
3. 2 の実験に関連して、金属塩+LPS 処理 DC の移入法の違い (尾静脈注射 vs 局所皮内注射) による活性化 T 細胞の局在の違いを検討する。また、いくつかのサブタイプに分けた T 細胞を移入することにより、金属アレルギーの発症に関与する T 細胞のサブタイプを同定する。
4. これまで主に Pd による反応を見ていたが、Pd 以外の金属についても同様の解析を行う。
5. 各種金属イオンの交差反応を、DC 移入型金属アレルギーマウスモデルを用いて検討する。
6. LPS 以外で金属アレルギーを感作しやすい成分を同定する。

マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギーの病態解析

分担研究者	小笠原 康悦	東北大学加齢医学研究所・生体防御学分野	教授
研究協力者	川野 光子	東北大学加齢医学研究所・生体防御学分野	博士研究員
	笹月 健彦	国立国際医療センター	名誉総長
	田村 裕	千葉大学大学院医学研究院・生命情報科学	准教授
	菅波 晃子	千葉大学大学院医学研究院・生命情報科学	特任研究員
	中山 勝文	東北大学加齢医学研究所・生体防御学分野	助教
	青島 有佑	東北大学大学院工学研究科・医用材料工学分野	

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これまでの結果から IFN- γ が金属アレルギーの発症に関与することが示唆されたことから、IFN- γ がアレルギー発症のどのステップに関与しているのかを確認するべく、実験を行った。②ヒトにおける発症を考えた場合、歯科金属などの生体埋入金属による感作が考えられる。その場合に引き起こされる炎症 (=バリア機能の崩壊) を様々な金属について簡便に捉えることを目的とし、金属ワイヤーをマウスの背部皮下に埋めこみ、炎症の程度を内視鏡により観察した。③金属アレルギー発症マウスの所属リンパ節細胞を繰り返し移入することで、*in vivo* において effector 細胞の濃縮を試み、相模原病院鈴木先生との共同研究により、V α レパトアについての情報が得られた。この情報を下に、TCR α chain および MHC class I および class II のアミノ酸配列情報からスーパーコンピュータを用いた三次元立体構築を行い、エネルギー的に安定な状態を比較した。

B. 方法

- 4) IFN- γ KO マウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いた Pd アレルギーの誘導
C57BL/6 (WT) マウスまたは IFN- γ KO マウスの骨髄細胞を 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 (9 週齢・♀) に 5 x 10⁵ cells/head にて尾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 24 時間おきに 3 日間測定した。
- 5) 内視鏡を用いた埋入金属による炎症の観察
BALB/c マウスの背部に ϕ 0.8 - 1.0 mm x 5.0 mm の金属ワイヤー (SUS304 または Ni) を埋め込み、2 日または 10 日後に、金属ワイヤー埋入部に内視鏡プローブを挿入し、炎症を観察した。
- 6) 相模原病院でのレパトア解析結果から、最有力候補である V α 11-1 の配列と MHC class I (H-2D^d, H-2L^d) および II (I-E α , I-A α) のアミノ酸配列をもとに三次元立体構築を試み、安定状態を比較した。

C. 結果

- 4) 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。
- 5) SUS304 ワイヤーを用いた場合には、10 日間の埋入後においても炎症は観察されなかったが、Ni ワイヤーの場合には、2 日間の埋入により著しい炎症が観察された。
- 6) V α 11-1 は MHC class II と interaction する際に、エネルギー状態がより安定になることが計算上示唆された。

D. 考察

- 4) 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、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 IFN- γ は炎症相に関与することが示唆された。
- 5) SUS304 ワイヤーは Cr による耐食性が高いことから、含有される Ni イオンの溶出が軽減されていること

が予想され、そのため炎症が起こるには至らなかったが、Ni ワイヤーの場合には、耐食性を示す他の金属が存在しないため、溶出も容易に起こり、そのために炎症が著しく誘導されたと考えられる。

- 6) 三次元立体構築計算処理により、TCR V α 11-1 は MHC class II と interaction する方が MHC class I より安定な状態となると計算され、effector 細胞は CD4 T 細胞である可能性が示唆された。また、TCR V β および MHC class I および II のアミノ酸配列情報により抗原ペプチドのアンカー部分の予測が可能となる。

E. 結論

- 3) 金属アレルギーにおいて IFN- γ は炎症相に関与する。
- 4) 金属による炎症誘導度について、内視鏡を用いた観察により、複数回に渡り同一個体での皮膚 reverse side の観察が可能であり、炎症を引き起こしにくい金属合金の選定に有用である。
- 5) 三次元立体構築の結果、TCR V α 11-1 は MHC class II との interaction により安定であることが示唆された。

F. 今後の方針

- (ア) Pd アレルギーマウスの所属リンパ節細胞を繰り返し移入したヌードマウスの所属リンパ節細胞を用いて、相模原病院での TCR レパトア解析結果を指標にすると同時に Pd に反応する T cell hybridoma を作製・クローニングし、CD4 と CD8 のどちらが effector として機能しているか検討する。
- (イ) 上記 1 に関連して、MHC class I および CD8 T 細胞を発現していない β 2M KO マウスおよび MHC class II KO マウスを用いて Pd アレルギーを誘導し、Pd アレルギーの発症に関与する MHC および T 細胞サブセットを検討する。
- (ウ) 抗原ペプチドを決定するべく、Pd アレルギー誘導マウスまたは Pd + LPS 処理 BMDC からペプチドを採取・精製・濃縮し、得られたペプチドフラクションを WT マウスに感作させることで、Pd アレルギーを誘導できるか否かを検討する。誘導が出来た場合には、そのペプチドフラクションを nano LC/MS/MS にかけて、アミノ酸配列を決定する。
- (エ) C57BL/6 マウスを用いて Pd アレルギーを発症させ、RAG KO マウスへの繰り返し移入を行い、マウス strain の違いにより Pd に反応する TCR レパトアが異なるかどうかを検討する。
- (オ) 金属ワイヤーを埋入することで感作を成立させ、金属溶液を耳介に投与することで金属アレルギーを誘導することが出来るかどうか検討する。

金属アレルギー反応に関わる特異的 T 細胞の存在と意義

分担研究者：鈴木隆二

独) 国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・室長

研究協力者：熊谷賢一

独) 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第一講座・助教

：小林浩・江口貴紀

独) 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第一講座・大学院

研究要旨： 本研究は金属(Pd,Ni,Co)に対する病的生体反応の病態解明を目的として、我々の保有する TCR レパトア解析法により本反応の特異性の有無を検討する。金属アレルギーの病因と病態形成に如何なる生体反応が関与しているか未だに不明な点が多い。最近、ヒトに概想可能な金属アレルギー病態モデル動物の確立が報告された。我々は、報告されたモデル系をより安定した系に一部改変し、T 細胞を中心とした免疫応答の解析を行った。

A 研究目的： 今後行う各種金属における TCR レパトア解析のために、高効率に金属アレルギーを発症させるモデルマウスを作製し、その T 細胞浸潤の程度を病理組織及び遺伝子発現レベルより確認した。またその特異性解析においては TCR レパトア解析を行った。

B 方法： 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。マウスの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変化を、定量的 PCR 法を用いて解析した。また膝下リンパ節においては TCR レパトア解析により惹起された反応に対する特異性を調査した。

C 結果： 感作 2 回誘導 3 回時において足蹠の腫脹は最大値を示した。本感作・誘導条件下のマウスは定量的 PCR 解析にて足蹠および膝下リンパ節ともに著しい T 細胞マーカー(CD3,CD4,CD8)と各種サイトカインの上昇を認めた。また、TCR レパトアにおいては特異的 family(V α 1-2,11-1,17-1 ; V β 6-1,8-2,9-1,16-1,18-1)の Skew を確認した。

D 考察： 今回の感作・誘導条件は足蹠の腫脹を指標にし、明確な金属により惹起される反応性の観察を可能にした。単回の感作・誘導条件下での足蹠の腫脹は観察されるが、何ら細胞性免疫の関与 (CD4,CD8) を示唆する結果が得られなかった。アレルギーを発症させるには複数回による繰り返しの金属暴露が必要である事が示唆され、単回の金属暴露では炎症部局所に特異的細胞浸潤を誘導することは困難であると考えられる。また、TCR レパトア解析結果から V α 11-1 に Skew を認めていることより、前回主任研究者が作成したモデルマウスは、*in vivo* 移入を繰り返す事により高効率に Effector を純化した可能性が高く、このファミリーが金属アレルギーに強く関与している可能性が示唆される。

E 今後の方針： TCR レパトア解析によって認められた各 family において CDR3 size spectratyping 法とシーケンス解析により抗原特異性をクローンレベルで解析する。

また、今回の感作・誘導条件を基に各種金属における T 細胞動態と特異性を詳細に検証する予定である。