

201229004A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患等克服研究事業
(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24年度 総括研究報告書

主任研究者 小笠原 康悦

平成25(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
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-----	3
東北大学 加齢医学研究所	
	小笠原 康悦
II. 分担研究報告	
1. 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-----	13
東北大学 加齢医学研究所	
	小笠原 康悦
2. 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-----	17
国立病院機構相模原病院 臨床研究センター	
	鈴木 隆二
3. 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--	
-----	23
東北大学大学院工学研究科	
	大津 浩
4. 金属の溶出評価と金属アレルギーへの進展機構の解析-----	30
東北大学大学院薬学研究科	
	平澤 典保
5. 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その教育-----	34
藤田保健衛生大学医学部皮膚科学	
	松永 佳世子
6. アトピー皮膚炎と金属アレルギー-----	37
浜松医科大学皮膚科学	
	戸倉 新樹
7. 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-----	41
京都大学大学院医学研究科	
	宮地 良樹
III. 班会議プログラム-----	47
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	71
V. 研究成果の刊行物・別刷-----	87

I. 総括研究報告

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)
総括研究報告書

研究課題：金属アレルギーの革新的診断・予防・治療法の開発研究

主任研究者：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

研究要旨

金属アレルギーは T 細胞依存性の疾患と考えられているものの、適切な動物モデルがなかったため、時系列的な病態が不明であり発症機構が良くわかっていない。本研究はこれまで不明であった金属アレルギー発症の分子機構を明らかにし、アレルギーの診断、予防、治療に役立つ理論的基盤の確立を目指すことを目的とし、動物モデルを用いた基盤的研究、疾患患者サンプルを用いた臨床研究、生体材料の金属溶出量の測定と新材料開発という観点から多面的に研究を進めている。当研究班が独自に開発した金属アレルギー動物モデルは、ヒト疾患に酷似しており極めて有用なモデルであることが判明した。本年度は動物モデルによる基盤的研究から、実際に炎症局所に浸潤している T 細胞の定量化により金属感作成立個体でのみ惹起部位に T 細胞が浸潤することに加え、ニッケル (Ni) アレルギーの誘導を行った結果、Ni アレルギーでは Ni によって NKT 細胞が誘導され、組織障害を惹起している可能性が考えられた。工学的観点からの研究では、臨床サンプルである汗、唾液中の金属濃度の測定を ICP-MS により行い、アトピー性皮膚炎患者における金属アレルギーの診断と金属除去食の効果判定に有効であることを示した。臨床的観点からの研究から、接触皮膚炎の炎症の収束に制御性 T 細胞が重要であることを明らかとし、また皮膚に集積する制御性 T 細胞が Helios 陽性であることを明らかにした。臨床現場から、内因性 AD 患者で Ni とコバルトの陽性率が有意に外因性 AD より高く、汗中 Ni 濃度が有意に外因性 AD より高いことから金属アレルギーを有する患者は自己汗含有する金属により AD の皮疹を悪化させている可能性が示唆された。今後多面的かつ総合的に金属アレルギーの病態を追究し、新規診断・治療法を開発していく予定である。

分担研究者

戸倉新樹 浜松医科大学 医学部皮膚科学 教授
松永佳世子 藤田保健衛生大学 医学部皮膚科学 教授
宮地良樹 京都大学 医学研究科 教授
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
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
平澤典保 東北大学大学院薬学研究科 生活習慣病治療薬学分野 教授
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

笹月健彦 国立国際医療センター・名誉総長

中山勝文 東北大学加齢研・生体防御・助教
川野光子 東北大学加齢研・生体防御・助教
園淵和明 東北大学・医・整形外科・大学院生
中村生 東北大学・医・生体防御・大学院生
渡辺真通 東北大学加齢研・生体防御・研究員
成島尚之 東北大学・工・医用材料工学・教授
西屋禎 岡山大学・医歯薬学・薬効解析学・准教授
樋口繁仁 東北大学加齢研・生体防御・非常勤講師
佐藤直毅 東北大学加齢研・生体防御・非常

勤講師

鈴木忍 東北大学加齢研・生体防御・非常勤講師

佐藤睦 東北大学・工・応用量子医工学・技術補佐員

熊谷賢一 国立病院機構相模原病院・研究員

小林 浩 国立病院機構相模原病院・研究員

江口貴紀 国立病院機構相模原病院・研究員

重松宏昭 国立病院機構相模原病院・研究員

尾藤利憲 神戸大学・医・皮膚・講師

鬼頭由紀子 浜松医科大学・皮膚・助教

山口隼人 浜松医科大学・医・皮膚・診療従事者

坂部純一 浜松医科大学・皮膚・特任助教

久保利江子 産業医科大学・医・皮膚・助教

梶島健治 京都大学・医・皮膚・准教授

野村尚史 京都大学・医・皮膚・講師

鈴木加余子 藤田保健衛生大学・医・皮膚・客員准教授

矢上晶子 藤田保健衛生大学・医・皮膚・准教授

鶴田京子 藤田保健衛生大学・医・皮膚・准教授

伊佐見真実子 藤田保健衛生大学・医・皮膚・助教

佐野晶代 藤田保健衛生大学・医・皮膚・助教

田中紅 藤田保健衛生大学・医・皮膚・助教

A. 研究目的

金属アレルギーは、T細胞依存性の疾患と考えられているものの、適切な動物モデルがなかったため、発症の分子機構など不明な点が多い。また、合併症が難治なため、患者のQOLを著しく妨げている。加えて、診断はパッチテストが有効ではあるものの検査による感作リスクは避けられず、金属アレルギーの革新的診断法や治療法の開発が強く望まれている。このように本課題は我が国の政策医療において取り組むべき重要課題である。本研究は金属アレルギー発症の分子機構を多面的解析から追究し、理論基盤に立脚したアレルギーの革新的診断、予防、治療法を開発することを目的とする。我々の研究班は、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、国際的に高い評価を得ている (*Nature* 2007)。本研究目的

を達成するため、

1. 金属アレルギー病因論の追究 (モデル動物からのアプローチ)
 2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立 (疾患からのアプローチ)
 3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究 (材料からのアプローチ)
- を Specific Aim として設定している。

B. 方法

1. 金属アレルギー病因論の追究

- 1) BALB/c マウスまたはパラジウム (Pd) アレルギー誘導マウスの所属リンパ節細胞の養子移入を繰り返したヌードマウスの耳介にパラジウムアレルギーを誘導し、惹起後 24 時間目の耳介組織を用いて切片作成後、抗 CD3 抗体による免疫組織化学染色を行い、Image cytometry により耳介への T 細胞の浸潤を定量解析した。
- 2) Ni アレルギーモデルマウス作製 : Balb/c マウス鼠径部に Ni+LPS を皮内注射し感作を行った後、Ni 足底部に皮内注射し、惹起を行った。感作と誘導の適切な条件を明らかにするために、様々な条件で感作と誘導を行い、足底部腫脹の経時的変化及び、T細胞浸潤の有無を解析した。足底部腫脹は誘導後から 24 時間毎に測定し、T細胞浸潤の有無は、定量 PCR 法にて足底部における CD3 の mRNA の発現量の変化を測定することで評価した。尚、感作、誘導に生理食塩水を用いた個体を対照群とした。
- 3) 足底部に浸潤した T 細胞にどのような T 細胞が限局して集積しているかを明らかにするために、T 細胞の特異性を決定している TCR repertoire を解析し、さらに抗原認識に大きな役割を担っている V ドメインに関して、各サブファミリーの発現頻度を網羅的に解析した。T細胞浸潤が最も多く、ヒト金属アレルギーの病態に類似した感作 2 回、誘導 3 回後 7 日目のマウスの足底部を検体とした。対照群として感作、誘導を生理食塩水でおこなったマウスの脾臓を検体とした。各検体から

Total RNA 抽出後、Adaptor-ligation PCR と Microplate hybridization assay を施行し、各 V ファミリーの蛍光強度を対照群と比較して有意に発現頻度の高いものを検出した。

2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立（疾患からのアプローチ）

- 1) 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(Ag)、インジウム(In)、イリジウム(Ir)を選択した。スタンダードの濃度でパッチテスターを用いて行った。
- 2) チタンのアレルギー試薬の国際的な研究に協力する
- 3) 歯科医師と皮膚科医師の連携WSをさらに拡大する。
- 4) 一般国民向けの金属アレルギーの啓発教育用 Q&A を作成する。

3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究（材料からのアプローチ）

- 1) アトピー患者の汗中のニッケル濃度の測定：金属アレルギーが疑われるアトピー用皮膚炎患者から汗を採取し、その後通常食から金属除去食への変更を指示し、約1ヶ月後再び汗を採取した。得られた汗0.5 mlを硝酸で5 mlとし、汗に含まれる金属イオンを ICP-MS で測定した。なお試料は加古川医療センター皮膚科安達厚子博士より供与された。

C. 結果

1. 金属アレルギー病因論の追究（モデル動物からのアプローチ）

- 1) WT への Pd アレルギー誘導の系および所属リンパ節細胞の移入繰り返しの系の両方で、マウス耳介組織における CD3⁺ T 細胞の割合がコントロール群に比べて有意に高かった。
- 2) Ni アレルギーマウスモデル確立のため

の条件検討を行ったところ、感作2回、誘導3回の条件では足底部の腫脹が他の条件と比較した中で最大であった。また、CD3の発現量を解析したところ感作2回、誘導3回の条件では、対照群と比べて誘導後3日目から有意に上昇し7日目で最大となった。他の条件では対照群と比較して有意な変化は無かった。

- 3) TCR repertoire 解析の結果から、Ni アレルギーにおいては、Va14-1 及び、Vb8-2 の発現頻度が対照群と比較して有意に上昇していた。

2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立（疾患からのアプローチ）

- 1) 内因性 AD と金属アレルギーとの関連：外因性 51 名、内因性 29 例について金属パッチテストを実施した。Ni と Co の陽性率は、外因性に比べ有意に高かった（表1）。Ni、Co、Cr のうちで少なくとも一つ以上反応する率は、内因性 AD では外因性 AD の2倍以上であった。とくに IgE 100 以下の内因性 AD では Ni、Co の陽性率が高かった。
- 2) チタンについては藤田保健衛生大学では金属 PT を施行する際に titanium-IV -oxide 0.1%pet、チタン粉末 20%pet、チタン錯体 0.157%aq を貼布し、平成 24 年 4 月から T.R.U.E. Test のチタン PT の試作品 3 濃度を貼布し、PT を行った。チタン合金のインプラントを挿入する前および一定期間後、あるいは不具合のある症例に対し実施した。
- 3) Visual Dermatology 誌に「最新・歯科と連携して治す皮膚疾患」の特集を組むと同時に、皮膚科医・歯科医連携WS、皮膚科医への皮膚アレルギーセミナーを企画した。
- 4) 一般国民向けの金属 Q&A については、質問事項を設定した。

3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究（材料からのアプローチ）

- 1) 金属アレルギーに基づくアトピー性皮膚炎は汗中の Ni が関与している可能性を示してきた。そこで引き続き、汗中のニッケル濃度を測定した。本患者は金属アレルギーと診断され、金属除去食療法が有効であった例であるが、治療前後で汗中の金属濃度、特に Cr, Co, Ni が顕著に低下しており、皮疹の状態の改善と一致した。
- 2) 藤田保健衛生大学におけるチタン PT について、いずれのチタン試料においても未だにアレルギー反応を認めていない。
- 3) Visual Dermatology 誌に「最新・歯科と連携して治す皮膚疾患」の特集を組み、PT の理論と実際、歯科金属アレルギーの対応、歯科金属からのイオン溶出と測定、金属アレルギーに配慮した歯科用補綴の選択とその問題点、金属アレルギーの免疫学 Up-to-date などを解説することにより、皮膚科と歯科の連携強化に貢献することができた。また、皮膚科医・歯科医連携WS、皮膚科医への皮膚アレルギーセミナーは、平成 23 年度は沖縄、仙台で、平成 24 年度は小倉、千葉で開催した。
- 4) 一般国民向けの金属 Q&A について、現在回答を作成中である。

D. 考察

1. 金属アレルギー病因論の追究（モデル動物からのアプローチ）

- 1) WT への Pd アレルギー誘導および所属リンパ節細胞移入繰り返しの両方で、炎症部位へ浸潤する T 細胞の定量解析が可能である。
- 2) マウスに感作、誘導を繰り返し行うことによって Pd・Ni とともに足底部に T 細胞誘導を認めるアレルギーマウスモデルを確立した。IV型アレルギー反応は、様々な抗原や環境アレルゲンに繰り返し曝露されることによって惹起される疾患である。金属アレルギーマウスモデルの確立には一般的なアレルギー惹起の過程と同じように抗原である金属を繰り返し感作、誘導することが必要であると考えられた。
- 3) Ni によって集積した T 細胞は TCR レパトア解析の結果から NKT 細胞であることが示唆された。

2. 新規診断法と治療法の開発へ向けた理論的基盤の確立（疾患からのアプローチ）

- 1) 内因性 AD の原因としての金属アレルギーの存在が示唆された。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 あるいは自家感作性皮膚炎などで陽性率が高いと言われてきた。元来、汗には高濃度の金属が含まれていることが言われており、それを裏づけている。現在、汗アレルギーの患者に減感作療法を実施しており、これが金属アレルギーの克服に繋がることも期待している。

3. 金属の溶出量の測定と新材料開発の基盤研究（材料からのアプローチ）

- 1) アトピー性皮膚炎患者の汗中のニッケルなどの金属濃度が高値を示し、金属アレルギーに基づく皮疹を示すことがある。今回そのような患者の食事を金属除去食に変更したところ、症状の改善が見られたが、その場合の汗中の金属イオンを測定した結果、特に金属アレルギーの原因金属である Cr, Co, Ni の濃度の低下が確認され、金属除去食の摂取により汗中の金属濃度が低下することが明らかになった。このように汗中の金属イオン濃度の測定は診断等に有効であることが示された。

E. 結論

- 1) 組織へ浸潤する T 細胞の定量解析はこれまで困難であったが、病理切片の免疫組織化学染色を行った病理切片を用いた Image cytometry 解析により可能となった。
- 2) Ni アレルギーでは NKT 細胞が局所炎症巣に誘導され、病態を惹起している可能性が示唆された。
- 3) フィラグリンが正常でバリア機能が保たれている内因性 AD では金属アレルギーが高頻度である。

- 4) 現行のチタンPT 試料を用いた場合、チタン合金のインプラント挿入前後あるいは不具合のある症例に対し陽性を検出していない。
- 5) 歯科医師と皮膚科医師の連携を強化することができた。
- 6) 一般国民向けの金属 Q&A について、現在回答を作成中である。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原著論文

1. Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Underhill DM, Aderem A, Ogasawara K. Inhibitory receptor paired Ig-like receptor B is exploited by *Staphylococcus aureus* for virulence. *J.Immunol.* 189 (12): 5903-5911 (2012)
2. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. *J Immunol Methods.* 2012 Oct 31; 384 (1-2): 81-91
3. Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, Takasaki T, Kalayanarooj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA. T-cell responses to dengue virus in humans. *Trop Med Health.* 2011 Dec; 39(4 Suppl): 45-51
4. Wake M, Hamada Y, Kumagai K, Tanaka N, Ikeda Y, Nakatani Y, Suzuki R, Fukui N. Up-regulation of interleukin-6 and vascular endothelial growth factor-A in the synovial fluid of temporomandibular joints affected by synovial chondromatosis. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Apr 2. [Epub ahead of print]
5. Yamada H, Hamada Y, Fujihara H, Fukami K, Mishima K, Nakaoka K, Kumagai K, Imamura E. Solitary fibrous tumor of the buccal space resected in combination with coronoidectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012 Jul; 114(1): e9-14
6. Kazutoshi Nakaoka, Hiroyuki Yamada, Toshikatsu Horiuchi, Tomoyuki Saito, Go Arai, Kenichi Kumagai, Ko Ito, Yoshiki Hamada. A case of simple bone cyst in the mandible with remarkable tooth resorption. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 2012, in press
7. Minoru Ito, Kenichi Kumagai, Nobuoki Sakai, Yutaka Fukushima, Yoshiki Hamada. Penetrating transoral cranial injury by a chopstick through the jugular foramen: report of a case. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 24, 2, 101-105, 2012
8. Hu WW, Fang Q, Xu ZH, Yan HJ, He P, Zhong K, Fan YY, Yang Y, Zhang XN, Zhang CY, Ohtsu H, Xu TL, Chen Z. Chronic H1-Antihistamine Treatment Increases Seizure Susceptibility After Withdrawal by Impairing Glutamine Synthetase. *CNS Neurosci Ther* 18: 683-90. 2012
9. Matsushita, Ayuko; Seike, Masahiro; Okawa, Haruka; Kadowaki, Yayoi; Ohtsu, Hiroshi. Advantages of histamine H4 receptor antagonist usage with H1 receptor antagonist in murine allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol* 21: 714-5, 2012
10. Aisa Chepkova, Evgenij Yanovsky, Regis Parmentier, Hiroshi Ohtsu, Helmut L. Haas, Jian-Sheng Lin and Olga A. Sergeeva. Histamine Receptor Expression, Hippocampal Plasticity and Ammonia in

- Histidine Decarboxylase Knockout Mice. *Cell Mol Neurobiol* 32:17-25, 2012
11. He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X. The arrhythmogenic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *Mol Med* 18: 1-9. 2012
 12. Fukie Nijjima-Yaoita, Masahiro Tsuchiya, Hiroshi Ohtsu, Kazuhiko Yanai, Shunji Sugawara, Yasuo Endo, and Takeshi Tadano. Roles of Histamine in Exercise-Induced Fatigue: Favouring Endurance and Protecting Against Exhaustion. *Biol Pharm Bull* 35: 91-97. 2012
 13. Ohsawa, Y., Hirasawa, N. The antagonism of histamine H1 and H4 receptors ameliorates chronic allergic dermatitis via anti-pruritic and anti-inflammatory effects in Nc/Nga mice. *Allergy* 67: 1014-1022 (2012)
 14. Satou, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Tanaka, H., Endo, Y., Saito, S., Iwatate, Y., Leonard, W.J., Hirasawa, N. Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 157: 194-201 (2012)
 15. Mizuno, M., Suzuki, T., Hirasawa, N., Nakahata, N. Hetero-oligomerization between adenosine A1 and thromboxane A2 receptors affects cellular signal transduction on stimulation with high and low concentrations of agonists for both receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 677, 5-14 (2012)
 16. Shimauchi T, Yagi H, Sasada K, Kito Y, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: Characterization of malignant T-cell line established from a rare case of CD8⁺ CD56⁺ Sézary syndrome. *Br J Dermatol* (in press).
 17. Shimauchi T, Sasada K, Kito Y, Mori T, Hata M, Fujiyama T, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: CD8⁺ Sezary syndrome with IL-22 production modulated by bacterial sepsis. *Br J Dermatol* (in press).
 18. Fukamizu H, Fujiwara M, Kim T, Matsushita Y, Tokura Y: Development of a Three-Microneedle Device for Hypodermic Drug Delivery and Clinical Application. *Plastic Reconstr Surg* 130 : 451-455, 2012.
 19. Sawada Y, Shimauchi T, Hama K, Yoshioka H, Ohmori S, Yamada S, Tajiri M, Kubo-Kabashima R, Yoshioka M, Sugita K, Yoshiki R, Hino R, Kobayashi M, Izu K, Nakamura M, Tokura Y: Combination of skin-directed therapy and oral etoposide for smoldering adult T-cell leukemia/lymphoma with skin involvement. *Leuk Lymphoma* (in press).
 20. Sawada Y, Nakamura M, Kabashima-Kubo R, Shimauchi T, Kobayashi M, Tokura Y: Defective epidermal innate immunity and resultant superficial dermatophytosis in adult T cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 18: 3772-3779, 2012.
 21. Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe JI, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y: A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: Possible immunological state of the intrinsic type. *J Dermatol Sci.* 67 : 37-43, 2012.
 22. Ohmori S, Hino R, Kobayashi M, Nakamura M, Tokura Y: Inflammatory cytokine expression in the skin lesions of tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Rheumatology* (Oxford) 51: 196-199, 2012.
 23. Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa

- M, Tokura Y: CXCL10 produced from hair follicles induces infiltrates of Th1 and Tc1 cells in the acute phase of alopecia areata followed by sustained accumulation of Tc1 cells in the chronic phase. *J Dermatol Sci* (in press).
24. Kasuya A, Fujiyama T, Shirahama S, Hashizume H, Tokura Y: Decreased expression of homeostatic chemokine receptors in intravascular large B-cell lymphoma. *Eur J Dermatol* 22: 272-3, 2012.
 25. Sugita K, Kabashima K, Tokura Y: Characterization of Peripheral Natural Killer Cells and their Reduction in Drug-induced Hyper-sensitivity Syndrome. *Acta Derm Venereol* 92: 83-84, 2012.
 26. Sugita K, Kabashima K, Sawada Y, Haruyama S, Yoshioka M, Mori T, Ogasawara K, Tokura Y: Blocking of CTLA-4 on lymphocytes improves the sensitivity of lymphocyte transformation test in a patient with nickel allergy. *Eur J Dermatol* 22: 268-269, 2012.
 27. Ohmori S, Hino R, Kobayashi M, Nakamura M, Tokura Y: Inflammatory cytokine expression in the skin lesions of tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Rheumatology* (Oxford) 51: 196-199, 2012.
 28. Ohmori S, Hino R, Nakamura M, Tokura Y: Heparin serves as a natural stimulant of the inflammasome and exacerbates the symptoms of tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Dermatol Sci* 66: 82-4, 2012.
 29. Kasuya A, Moriki M, Tatsuno K, Hirakawa S, Tokura Y: Clearance Efficacy of Autoantibodies in Double Filtration Plasmapheresis for Pemphigus Foliaceus. *Acta Derm Venereol* (in press).
 30. Shimauchi T, Yagi H, Sasada K, Kito Y, Ito T, Hirakawa S, Tokura Y: Characterization of malignant T-cell line established from a rare case of CD8+ CD56+ Sézary syndrome. *Br J Dermatol* (in press).
 31. Hara-Chikuma M, Chikuma S, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3 -mediated hydrogen peroxide uptake. *J Exp Med.*; 209 (10) : 1743-52, 2012
 32. Belsito D, Bickers D, Bruze M, Calow P, Dagli ML, Dekant W, Fryer AD, Greim H, Miyachi Y, Saurat JH, Sipes IG, Api AM. A toxicologic and dermatologic assessment of cyclopentanones and cyclopentenones when used as fragrance ingredients. *Food Chem Toxicol.* 2012 50 Suppl 3: S517-56.
 33. Nakajima S, Igyártó BZ, Honda T, Egawa G, Otsuka A, Hara-Chikuma M, Watanabe N, Ziegler SF, Tomura M, Inaba K, Miyachi Y, Kaplan DH, Kabashima K. Langerhans cells are critical in epicutaneous sensitization with protein antigen via thymic stromal lymphopoietin receptor signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 129 (4), 1048-55, 2012
 34. Nakahigashi K, Doi H, Otsuka A, Hirabayashi T, Murakami M, Urade Y, Tanizaki H, Egawa G, Miyachi Y, Kabashima K. PGD(2) induces eotaxin-3 via PPAR γ from sebocytes: A possible pathogenesis of eosinophilic pustular folliculitis. *J Allergy Clin Immunol.* 129(2):536-43, 2012
 35. Akaza N, Akamatsu H, Takeoka S, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K. Increased hydrophobicity in *Malassezia* species correlates with increased proinflammatory cytokine expression in human keratinocytes. *Med Mycol.* 50 (8): 802-810, 2012

36. Inoue Y, Hasegawa S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, Matsunaga K, Akamatsu H. Bimodal effect of retinoic acid on melanocyte differentiation identified by time-dependent analysis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25(3): 299-311, 2012
37. Suzuki K, Yagami A, Matsunaga K. Allergic contact dermatitis caused by a skin-lightening agent, 5,5'-dipropylbiphenyl-2,2'-diol. *Contact Dermatitis.* 66(1): 51-52, 2012

2) 総説論文、著書

総説論文

1. Hiroshi Ohtsu. Pathophysiologic Role of Histamine; Evidence Clarified by Histidine Decarboxylase Gene Knockout Mice. *Int Arch Allergy Immunol* (minireview) 158 (sppl 1): 2-6, 2012
2. ステロイドの基礎. 平澤典保 ENTONI 139: 1-6 (2012)
3. ステロイド薬の基礎 ?適切な使用のために 平澤典保 小児科 53: 203-210 (2012)
4. McGill N-K, Vyas J, Shimauchi T, Tokura Y, Piguet V: HTLV-1 Associated Infective Dermatitis: Updates on the Pathogenesis. *Exp Dermatol* 21: 815-821, 2012.
5. Sugaya M, Hamada T, Kawai K, Yonekura K, Ohtsuka M, Shimauchi T, Tokura Y, Nozaki K, Izutsu K, Suzuki R, Setoyama M, Nagatani T, Koga H, Tani M, Iwatsuki K. Guidelines for the management of cutaneous lymphomas (2011): A consensus statement by the Japanese Skin Cancer Society - Lymphoma Study Group. *J Dermatol* (in press).
6. Bito T, Sawada Y, Tokura Y: Pathogenesis of cholinergic urticaria in relation to sweating. *Allergol Int* (in press).
7. 鶴田 京子, 松永 佳世子 金属アレルギーと掌蹠膿疱症 *Visual Dermatology* 11巻10号 1052-1054, 2012
8. 鈴木 加余子, 矢上 晶子, 松永 佳世子 新しい検査法と診断法 ジャパニーズスタンダードアレルギーの陽性率 *臨床皮膚科* 66巻5号 64-69, 2012
9. 矢上 晶子, 松永 佳世子 これだけは知っておきたい接触皮膚炎の基礎知識 パッチテストの基本手技と解釈 *医学のあゆみ* 240巻4号 321-326, 2012

3) 書籍

1. W. Bäumer, T. Werfel, R. Seifert, M. Kietzmann, D. Neumann, R. Khanferyan, H. Ohtsu, E. Masini, S.E. Dahlén, B. Dahlén, A. Sydbom, R. Gutzmer. *Histamine H₄ receptor: a novel drug target for immunoregulation and inflammation* Chapter 5. Histamine in atopic disorders (in press)

2. 学会発表

1) 国際学会

1. Hiroyuki Yamada, Kazutoshi Nakaoka, Toshikatsu Horiuchi, Kenichi Kumagai, Tomoko Ikawa, Yuko Shigeta, Mitsuyoshi Iino, Takumi Ogawa, Yoshiki Hamada, CAD-ASSISTED MANDIBULAR RECONSTRUCTION USING CUSTOM-MADE TITANIUM MESH TRAY AND PARTICULATE CANCELLOUS BONE AND MARROW HARVESTED FROM BILATERAL POSTERIOR ILIA XXI Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Dubrovnik, Croatia, 11-15 September 2012
2. Kenichi Kumagai, Hiroshi Kobayashi, Akito Gotoh, Takanori Eguchi, Hiroyuki Yamada, Ryuji Suzuki, Yoshiki Hamada. Synchronous modulation of epidermal growth factor receptor family genes in oral premalignant lesions. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. Santiago, Chile, November 1-4, 2011
3. Yoshiki Hamada, Masahiro Wake, Kenichi Kumagai, Kazutoshi Nakaoka, Hiroyuki

- Yamada, Nakatani Yasunori, Ryuji Suzuki, Naoshi Fukui. Up regulation of IL-6 and VEGF-A in the synovial fluid of temporomandibular joint affected by synovial chondromatosis. 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. Santiago, Chile, November 1-4, 2011
4. Hu WW, Fang Q, Xu ZH, Yan HJ, He P, Zhong K, Fan YY, Yang Y, Zhang XN, Zhang CY, Ohtsu H, Xu TL, Chen Z. Chronic H1-Antihistamine Treatment Increases Seizure Susceptibility After Withdrawal by Impairing Glutamine Synthetase. *CNS Neurosci Ther* 18: 683-90. 2012
 5. Matsushita, Ayuko; Seike, Masahiro; Okawa, Haruka; Kadowaki, Yayoi; Ohtsu, Hiroshi. Advantages of histamine H4 receptor antagonist usage with H1 receptor antagonist in murine allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol* 21: 714-5, 2012
 6. Aisa Chepkova, Evgenij Yanovsky, Regis Parmentier, Hiroshi Ohtsu, Helmut L. Haas, Jian-Sheng Lin and Olga A. Sergeeva. Histamine Receptor Expression, Hippocampal Plasticity and Ammonia in Histidine Decarboxylase Knockout Mice. *Cell Mol Neurobiol* 32:17-25, 2012
 7. He G, Hu J, Li T, Ma X, Meng J, Jia M, Lu J, Ohtsu H, Chen Z, Luo X. The arrhythmic effect of sympathetic histamine in mouse hearts subjected to acute ischemia. *Mol Med* 18: 1-9. 2012
 8. Fuki Nijima-Yaoita, Masahiro Tsuchiya, Hiroshi Ohtsu, Kazuhiko Yanai, Shunji Sugawara, Yasuo Endo, and Takeshi Tadano. Roles of Histamine in Exercise-Induced Fatigue: Favouring Endurance and Protecting Against Exhaustion. *Biol Pharm Bull* 35: 91-97. 2012
 9. Ohtsu H, Sato A, Moriguchi T, Takai J, Yamamoto M. HDC-GFP transgenic mouse (oral presentation) European Histamine Symposium Belfast (Northern Ireland) May 2-5 2012
 10. Ramsey LCB, Crowley M, Hughes Z, Ohtsu H, Araujo ID, State M, Mayes L, Pittenger C. Behavioral and neurochemical analysis of HDC-KO mice, a model of a genetic form of Tourette Syndrome (oral presentation), International Behavioral Neuroscience Society, June 5-10, Hawaii 2012
 11. European Histamine Research Society: COST action: Nov. 18, 2012 Malaga, Spain **Plenary Lecture** The biological activity of histamine clarified using histidine-decarboxylase gene -manipulated mice. ----The power of interaction with Japanese colleagues
 12. Tokura Y: Mechanism of Photo-Allergic Contact Dermatitis from Ketoprofen. 11th Congress of The European Society of Contact Dermatitis (ESCD 2012).2012.6.13. Malmo,Sweden
 13. Tokura Y: Innate immunity of the epidermis toward bacterial and fungal infection : lessons from Th17-dysregulated conditions. The 10th Symposium of the Cutaneous Biology Research Institute, Yonsei University College of Medicine. 2012.9.8. Seoul, Korea
 14. Sugita K, Miyachi Y, Kabashima K. Regulatory T cells suppress basophils-induced IgE-mediated chronic allergic inflammation. 2012 Annual Meeting of the European Society of Dermatological Research. 2012. 9.19-22. Venice, Italy
 15. Natsuaki Y, Miyachi Y, Kabashima K. Dermal dendritic cells initiate the elicitation phase of contact hypersensitivity via immunological synapse formation. 2012 Annual Meeting of the European Society of Dermatological Research. 2012. 9.19-22. Venice, Italy
- 2) 国内学会
- 一般講演
1. Nakayama M, Takeda K, Nakamura K, Ogasawara K. Trogocytosis-mediated generation of regulatory MHCII-dressed NK cells. The 41st Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kobe, Dec., 2012.
 2. Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Sonofuchi K, Nakamura S, Watanabe M, Ogasawara K. Analysis of T cells on development of metal allergy. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology

- Society of Japan, Fukuoka, Dec., 2012
3. 熊谷賢一, 藤井恵介, 北浦一孝, 江口貴紀, 重松宏昭, 岸 悠太, 山田浩之, 川口浩司, 鈴木隆二, 濱田良樹「口腔癌の頸部リンパ節転移における腫瘍免疫応答の解明」第25回日本口腔診断学会・第22回日本口腔内科学会 合同学術大会 2012.9.21-22
 4. 江口貴紀, 小林浩, 熊谷賢一, 重松宏昭, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二「新規金属アレルギーモデルマウスの作製と T 細胞発現解析」第66回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2012.5.17-18 広島国際会議場 (若手優秀ポスター賞受賞)
 5. 小林浩, 江口貴紀, 熊谷賢一, 重松宏昭, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二「新規金属アレルギーモデルマウスにおける網羅的 T 細胞レセプター解析」第66回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2012.5.17-18 広島国際会議場(若手優秀ポスター賞受賞)
 6. 佐藤睦, 大津浩「大腸菌人工染色体(BAC)を用いたヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)レポーターマウスの作製」日本薬理学会(京都) 2012年3月14-16日
 7. 平塚真弘, 田巻佑一郎, 新井富生, 梶村春彦, 平澤典保 薬物代謝酵素群の遺伝子多型と肺がんとの関連性 第33回日本臨床薬理学会学術総会 (2012年11月29日-12月1日, 沖縄)
 8. 岸本祐, 高野貴幸, 浅川三喜, 沖田喜幸, 平澤典保 ニッケル線誘発炎症におけるヒスタミンの役割とヒスチジン脱炭酸酵素の誘導 第16回日本ヒスタミン学会(2012年10月19-20日, 岡山)
 9. 佐藤大樹, 平澤典保 前脂肪細胞におけるHDAC 阻害薬の炎症応答増強作用とその機序に関する研究 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日, 青森)
 10. 高野貴幸, 青島有佑, 田中里奈, 浅川三喜, 上田恭介, 大津浩, 成島尚之, 平澤典保 マウスにおける金属からのニッケルイオン溶出と NHE の関与 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日, 青森)
 11. 新沼優衣, 高橋理充, 斎藤雄大, 塚田智晴, 伊藤雅, 平澤典保, 平塚真弘 31種の CYP2C9 遺伝子多型バリエーション酵素におけるワルファリン 7-水酸化活性の変化 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日, 青森)
 12. 山下紗緒里, 佐藤望未, 平澤典保 マウス表皮ケラチノサイトにおける吉草酸の TSLP 産生誘導作用の解析 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日, 青森)
 13. 山田廉, 林寛人, Siddhartha S. Das, 佐藤大樹, 平澤典保 GLP-1 産生に対する小胞体ストレスの影響 第51回日本薬学会東北支部大会 (2012年10月7日, 青森)
 14. Nakajima S, Miyachi Y, Kabashima K. Role of IL17A for induction of Th2 in murine model of atopic dermatitis. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012. 12.7-9. Okinawa, Japan
 15. Egawa G, Miyachi Y, Kabashima K. Intercellular gap of the keratinocytes is a migratory pathway for Langerhans cells. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012. 12.7-9. Okinawa, Japan
 16. Hanakawa S, Miyachi Y, Kabashima K. Possible role of Treg in the development of atopic dermatitis-like Th2-dominant cutaneous inflammation. Role of IL17A for induction of Th2 in murine model of atopic dermatitis. 日本免疫学会学術集会. 2012. 12.5-7. Kobe, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

II. 分担研究報告

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	
	川野 光子	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	助教
	中山 勝文	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	助教
	中村 生	東北大学大学院医学系研究科	生体防御学分野	大学院生
	渡辺 真通	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	研究員
	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
	上田 恭介	東北大学大学院工学研究科	医用材料工学分野	助教
	井樋 栄二	東北大学大学院医学系研究科	整形外科学分野	教授
	園淵 和明	東北大学大学院医学系研究科	整形外科学分野	大学院生
	西屋 禎	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	薬効解析学分野	准教授
	樋口 繁仁	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	非常勤講師
	佐藤 直毅	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	非常勤講師
	鈴木 忍	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	非常勤講師
	小野 瑞徳	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	
	土橋 明	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	
	高橋 亜希子	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	
	橋本 卓	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	
	遠藤 実里	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	
	石塚 まりこ	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	
	近藤 威	東北大学加齢医学研究所	生体防御学分野	
	高橋 哲	東北大学大学院歯学研究科	顎顔面口腔外科	教授
	橋元 亘	東北大学大学院歯学研究科	顎顔面口腔外科	助教

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、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。マウス耳介組織にパラジウム特異的な金属アレルギーを誘導し、関係する病原性 T 細胞の特徴について追及してきた。また、実際に医療現場等で用いられる生体材料金属について、これまでに開発された合金の長所を生かしつつ、炎症誘導を抑えるような素材開発を見据えた基礎実験を開始した。前年度までに金属アレルギーの誘導に T 細胞が関与することを明らかとしたことから、本年度では、①実際に炎症局所に浸潤している T 細胞の定量化、②金属に反応性を有する T 細胞を *in vitro* で再刺激・評価するための条件検討、③金属ワイヤーを埋入した組織における炎症・線溶系に関与する分子の発現評価を行った。その結果、金属感作成立個体でのみ惹起部位に T 細胞が浸潤すること、金属ワイヤーのニッケル含有量に依存して、ワイヤー埋入部位における炎症・線溶系関与分子の発現が変動することが明らかとなった。

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金属アレルギーに T 細胞が関与することが明らかとなったことから、惹起部位に浸潤する T 細胞の定量を行い、T 細胞の浸潤が感作の成立によるものなのか、金属炎症によるものなのか検討した。②金属特異的な病原性 T 細胞のクローニングや金属アレルギーにおける抗原ペプチドの同定を行うにあたり、*in vitro* における T 細胞解析系の開発が必須であることから、ヒトの末梢血単核球を用いた lymphocytes transfer test (LTT アッセイ) を改変し、マウスのリンパ節細胞を用いたアッセイ系構築に向け条件検討を行った。③現在医療現場で用いられている生体材料金属は、耐摩耗性・耐食性に加え、加工のし易さという観点などからコバルトクロムモリブデン合金 (CCM) が主流である。しかしながら、術後に周辺組織に炎症を呈するケースがあり、より生体適合性の高い金属素材の開発が必要であることから、生体埋入金属からの溶出により炎症の原因と考えられているニッケル (Ni) の含有量を抑えた ultra low Ni-CCM を用い、埋入周辺組織の観察および炎症・線溶系関連分子の発現解析を行った。

B. 方法

- 1) BALB/c マウスまたはパラジウム (Pd) アレルギー誘導マウスの所属リンパ節細胞の養子移入を繰り返したヌードマウスの耳介にパラジウムアレルギーを誘導し、惹起後 24 時間目の耳介組織を用いて切片作成後、抗 CD3 抗体による免疫組織化学染色を行い、Image cytometry により耳介への T 細胞の浸潤を定量解析した。
- 2) Pd+LPS 投与により腹腔浸出性マクロファージ (Pd/LPS-PEC) を回収、接着した細胞のみを抗原提示細胞として用いた。相模原病院で構築した Pd アレルギー

一 改変誘導モデルの系を用いて、C57BL/6 マウスの足蹠部に Pd アレルギーを誘導し、その所属リンパ節である膝窩リンパ節の細胞 (Pd-PLN) をエフェクター細胞として用いた。PLN : PEC = 2 : 1 にて共培養し、0.2 mM PdCl₂ にて 24h 処理後、培養上清を回収し、ELISA にて IL-2 産生を定量・評価した。

- 3) C57BL/6 マウスの背部皮下に各種金属ワイヤー (Ni, CCM, ultra low Ni-CCM, ultra low-Ni CCM+Zr) を埋入し、3 日目に組織を採取、total RNA を抽出後、cDNA を合成し、炎症・線溶系関連分子および GAPDH の発現を real time PCR を用いて評価した。

C. 結果

- 1) WT への Pd アレルギー誘導の系および所属リンパ節細胞の移入繰り返しの系の両方で、マウス耳介組織における CD3⁺ T 細胞の割合がコントロール群に比べて有意に高かった。
- 2) Pd/LPS-PEC と PLN を共培養することで、Pd 再刺激により培養上清中に IL-2 の産生が認められ、Pd-PLN で有意に反応性が高かった (図 1)。
- 3) Ni ワイヤーを埋入した群では、炎症・線溶系関連分子の発現が有意に増加した。ultra low Ni-CCM および CCM ワイヤーを埋入した場合には、炎症・線溶系関連分子の発現はそれほど増加しなかったが、ultra low Ni-CCM における発現量は、CCM に比べて有意差をもって低発現であった (図 2)。

D. 考察

- 1) WT への Pd アレルギー誘導および所属リンパ節細胞移入繰り返しの両方で、炎症部位へ浸潤する T 細胞の定量解析が可能である。
- 2) Pd 投与により回収した PEC を抗原提示細胞として用いることで、*in vivo* で T 細胞が獲得した金属に対する反応性を *in vitro* で再現することができた。
- 3) ワイヤーに含まれる Ni の量 (つまりワイヤーから溶出される Ni の量) に応じて炎症・

線溶系関連分子の発現が誘導される可能性が示唆された。

virulence. *J.Immunol.* 189 (12): 5903-5911 (2012)

E. 結論

- 1) 組織へ浸潤する T 細胞の定量解析はこれまで困難であったが、病理切片の免疫組織化学染色を行った病理切片を用いた Image cytometry 解析により可能となった。
- 2) 金属の投与により得られた抗原提示細胞と金属アレルギー誘導後の所属リンパ節細胞を共培養することで、in vivo における金属反応性を in vitro で評価することが可能となった。
- 3) Ni が含まれる金属ワイヤーを生体に埋入することで、埋入部分において炎症・線溶系関連分子の発現が誘導される。

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. Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Underhill DM, Aderem A, Ogasawara K. Inhibitory receptor paired Ig-like receptor B is exploited by *Staphylococcus aureus* for

2) 総説論文、著書

なし

2. 学会発表

国外学会

なし

国内学会

1. Nakayama M, Takeda K, Nakamura K, Ogasawara K. Trogocytosis-mediated generation of regulatory MHCII-dressed NK cells. The 41st Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kobe, Dec., 2012.
2. Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Sonofuchi K, Nakamura S, Watanabe M, Ogasawara K. Analysis of T cells on development of metal allergy. The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Dec., 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図 1 : In vitro における病原性 T 細胞の反応性の解析

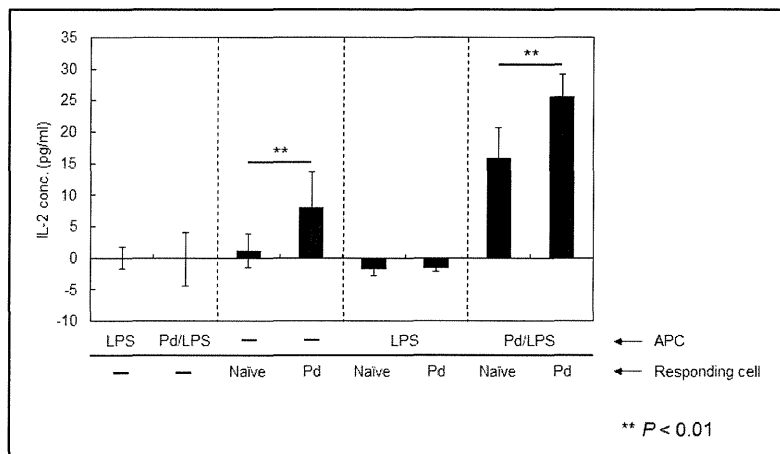
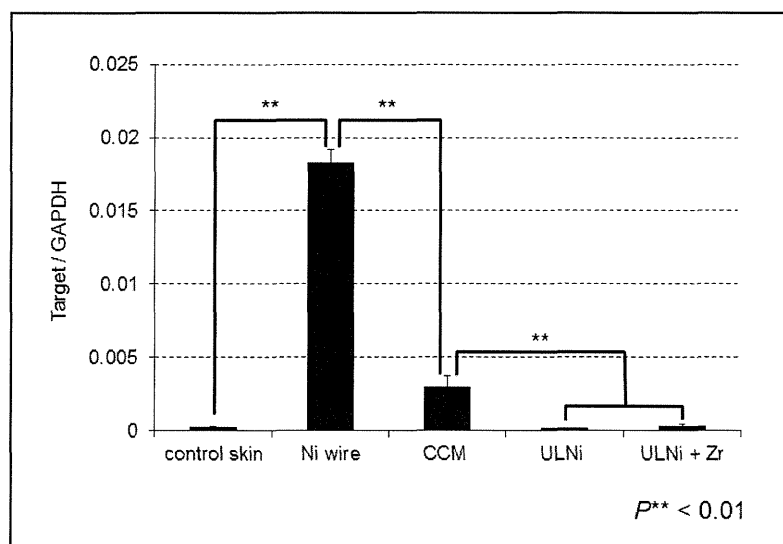


図 2 : 金属ワイヤーの埋入による炎症・線溶系関連分子の発現



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 口腔顎顔面外科学講座 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 口腔顎顔面外科学講座 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 口腔顎顔面外科学講座 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 口腔顎顔面外科学講座 大学院生

研究要旨

金属アレルギーは T 細胞によって引き起こされる遅延型アレルギー反応であるが、その抗原特異性ならびに病態発症メカニズムについては不明な点が多く、ヒトの病態解明に外挿性のある適切なモデル動物の確立が望まれている。前回の報告で、既存の金属アレルギーマウスモデル(Sato N et al, Clin Exp Allergy, 2007)を一部改変し、パラジウム (Pd) を反復曝露させることによって、ヒト金属アレルギーで報告されている上皮内の T 細胞の浸潤や、金属特異的な T 細胞を誘導することを可能とした。本研究では金属をニッケル (Ni) に変えて、Pd アレルギーマウスモデルと同様に Ni を反復曝露させることによって Ni アレルギーマウスモデルを確立し、Ni によって誘導された T 細胞の解析をすることを目的とした。具体的には金属誘導後の時間経過に伴う病理組織学的検討、病変部組織のサイトカインプロファイルの調査および、浸潤した T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) の解析を行った。その結果、複数回の金属曝露から後期 (3 日～7 日) で T 細胞は誘導され、上皮内および上皮下に T 細胞は浸潤しており、その多くは CD4⁻, CD8⁻であった。誘導された T 細胞の TCR は Va14Ja18 ならびに Vb8-2 が特異的に発現頻度の上昇をみとめたことから、誘導された T 細胞は NKT 細胞であることが示唆された。さらに誘導局所は Th1 偏性で各種細胞障害性因子の発現量は優位な上昇を認めた。以上の結果より Ni 金属アレルギーでは Ni によって NKT 細胞が誘導され、組織障害を惹起している可能性が考えられた。

A. 研究目的

金属アレルギーは、歯科用金属や、金属装飾品など、身の回りにある様々な金属が原因となりアレルギー症状を引き起こす疾患として知られている。近年、金属装飾品をつける人口の増加や、補綴治療やインプラント治療などの医療技術の発展による金属曝露

の機会の増大に伴って患者の数は増加している。その一方で、抗原特異性ならびに病態発症メカニズムなど、金属アレルギーには不明な点が多く、ヒトの病態解明に外挿性のある適切なモデル動物の確立が望まれている。前回の報告で、Pd を用いて既存の金属アレルギーマウスモデルを一部改変し、ヒト金属アレルギーに類似した新規金属アレルギー

マウスモデルを確立した。本研究では、金属アレルギーの原因金属として最も頻度の高いNiを用いて、Niとlipopolysaccharide (LPS)による感作、および金属溶液による誘導を繰り返し行うことでNiアレルギーマウスモデルを作製し、病理組織学的検討、TCRレパトア、および各種サイトカインを解析することによって、Niアレルギー発症に関わる特異的なT細胞を明らかにし、Niアレルギーの診断、治療に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

1) Niアレルギーモデルマウス作製

動物 : Balb/c マウス (6週齢、♀)

感作 : 10mM NiCl₂+10 μg/ml LPS を 125 μl ずつ左右の鼠径部に皮内注射。

誘導 : 10mM Ni を 25 μl ずつ左右の足底部に皮内注射。

条件検討 : 感作と誘導の適切な条件を明らかにするために、様々な条件で感作と誘導を行い、足底部腫脹の経時変化及び、T細胞浸潤の有無を解析した。足底部腫脹は誘導後から24時間毎に測定し、T細胞浸潤の有無は、定量PCR法にて足底部におけるCD3のmRNAの発現量の変化を測定することで評価した。尚、感作、誘導に生理食塩水を用いた個体を対照群とした。

2) 病理組織学的解析・免疫組織化学的解析

条件検討によって得られた、CD3の発現量が最も多い感作2回、誘導3回後7日目の足底部を、HE染色による病理組織学的解析ならびに、CD3、CD4、CD8免疫染色による免疫組織化学的解析を行った。

3) TCR repertoire 解析

足底部に浸潤したT細胞にどのようなT細胞が局限して集積しているかを明らかにするために、T細胞の特異性を決定しているTCR repertoireを解析し、さらに抗原認識

に大きな役割を担っているVドメインに関して、各サブファミリーの発現頻度を網羅的に解析した。T細胞浸潤が最も多く、ヒト金属アレルギーの病態に類似した感作2回、誘導3回後7日目のマウスの足底部を検体とした。対照群として感作、誘導を生理食塩水でおこなったマウスの脾臓を検体とした。各検体からTotal RNA抽出後、Adaptor-ligation PCRとMicroplate hybridization assayを施行し、各Vファミリーの蛍光強度を対照群と比較して有意に発現頻度の高いものを検出した。

4) Complementarity determining region 3 (CDR3) 領域におけるシーケンス解析

TCR repertoire解析によって、対照群より発現頻度が有意に高かったVファミリーにおけるCDR3領域を明らかにするために、シーケンス解析を行った。TA-cloning法によりプラスミドにクローニングし、塩基配列を解析することによりCDR3領域シーケンスレベルの発現頻度を解析し、clonotypingを行った。

5) NKT細胞関連分子・各種サイトカインの解析

NKT細胞がどのような経過で誘導され、病態惹起に関与しているかを明らかにするために、NKT細胞関連分子であるVa14Ja18、NKG2D、及びCD161cとNKT細胞が産生するサイトカインであるTh1サイトカイン(IFN-γ、TNF-α、IL-2)、Th2サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-10)及び細胞障害性因子(FasL、perforin、granzymeA、granzymeB)のmRNAの発現量を感作2回、誘導3回後1日目、3日目及び、7日目のマウスの足底部を検体とし、定量PCR法にて解析した。同じ回数感作、誘導を生理食塩水でおこなったマウスの足底部を対照群とした。

C. 研究結果