

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11497

研究課題名(和文) ニッケルイオン結合性樹状細胞によるニッケルアレルギー誘導メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms by which Ni-binding dendritic cells induce Ni allergy

研究代表者

黒石 智誠 (Kuroishi, Toshinobu)

東北大学・歯学研究科・講師

研究者番号：30400261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：金属アレルギーは細胞性免疫依存性のIV型アレルギーに分類され、ニッケル(Ni)は抗原性検査における陽性率の高さなどから最も重要視されている。本研究では、金属イオン蛍光プローブを用いてマウス樹状細胞のNiイオン結合能を解析した。その結果、皮膚所属および顎下リンパ節の遊走性樹状細胞において高いNi結合能が認められた。さらに、皮膚所属リンパ節由来樹状細胞をNi存在下で培養した後、Ni感作マウスの耳介皮下へ移入することにより、Niアレルギー性炎症が誘導された。以上の結果から、皮膚所属リンパ節の遊走性樹状細胞はNi結合能を示し、Niアレルギーの惹起能を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、金属アレルギーに対する対処法としては原因金属の曝露を回避すること以外に確立されていない。しかしながら、日用品から医療器具に至るまで、多種多様な金属製品に囲まれている現在社会において、この対処法を完遂することは困難であり、金属アレルギー患者のQOLを低下させることにもつながる。本研究で明らかしたNi結合性樹状細胞は、金属アレルギーの発症メカニズムの解明において重要な知見であり、より根本的な治療法・対処法のターゲットにもなり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Metal allergies have been classified as Th1-dependent type-IV allergies. The most frequent metal allergen is nickel (Ni). In this study, we analyzed the Ni-binding ability of DCs using the fluorescent metal indicator. Classical DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs were detected in the draining LNs. cDCs were further classified into MHC class II hi CD11c int migratory cDCs and MHC class II int CD11c hi resident cDCs. The Ni-binding ability of the migratory cDCs was significantly higher in skin-draining and submandibular LNs than mesenteric LNs. On the other hand, the Ni-binding ability of the resident cDCs was significantly lower than that of the migratory cDCs, but no significant differences were detected between LNs. Moreover, subcutaneous injection of Ni-treated DCs purified from the skin-draining LNs induced Ni-allergic inflammation in Ni-sensitized mice. These results demonstrate that migratory cDCs in the skin-draining LNs have Ni-binding capability and elicit Ni allergy.

研究分野：免疫学

キーワード：金属アレルギー 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金属イオンは、生体内に侵入すると金属アレルギーを引き起こす。様々な抗原金属の内、ニッケル(Ni)は抗原性検査における陽性率の高さなどから最も重要視されている。金属アレルギーはT細胞依存型のIV型アレルギーに分類されるが、詳細な発症メカニズムは明らかとなっておらず、抗原金属の除去以外に有効な対処法が無いのが現状である。

局所でアレルゲンを取り込んだ樹状細胞(dendritic cell, DC)は所属リンパ節へと遊走する。DCによって抗原を提示されたナイーブT細胞はエフェクター/メモリーT細胞へと分化し、アレルゲン特異的な免疫応答が誘導される(感作相)。その後、アレルゲンに再び曝露されると、特異的なエフェクター/メモリーT細胞が活性化されアレルギー性反応が誘導される(惹起相)。

研究代表者の所属する研究室では、マウスモデルを用いて金属アレルギー病態形成機構の解明に取り組んでおり、グラム陰性菌の菌体成分であるリポポリサッカライド(LPS)をアジュバントとする金属アレルギーマウスモデルを世界に先駆けて報告した(*Clin. Exp. Allergy* 2007; 37: 743-751.)。LPSのレセプターはToll-like receptor 4 (TLR4)であるが、ヒトTLR4はNiイオンにより活性化されNiアレルギー発症に関与することが報告されている(*Nat. Immunol.* 2010; 11: 814-819.)。一方、マウスTLR4はNiイオンと結合しないことが明らかにされている。この報告はLPSをアジュバントとする我々のマウスモデルの有用性を支持すると考える。さらに、他の菌体成分も金属アレルギーのアジュバントとなり得ることも報告し、常在菌を含めた微生物感染が金属アレルギーの病態形成に重要であることを明らかにしてきた。

また、生体内に侵入した金属イオンは何らかの自己タンパク質に結合すると考えられているが、研究代表者らは新規Ni結合タンパク質としてC-X-Cモチーフケモカインの1種であるCXCL4を同定し、CXCL4がNiアレルギーの惹起相および感作相を増強することを見出した(*Clin. Exp. Allergy* 2017; 47: 1069-1078.)。

しかしながら、金属アレルギー病態形成における本質的な疑問、つまり、「金属抗原がどのように抗原提示細胞に認識され金属特異的T細胞が活性化されるのか?」については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

上述した背景のもと、研究代表者らは「金属イオンと結合性を示す細胞が金属イオン特異的免疫応答の誘導に関与する」との仮説に至った。

本研究では、主要な抗原提示細胞であるDCのNi結合性を明らかにすることを目的とした。具体的には、1)マウスリンパ組織中DCにおけるNi結合能、2)Ni結合性DCのサブタイプ、3)Niイオン刺激によるサイトカイン産生能の変化、および4)Ni結合性DCによるNiアレルギー性炎症誘導能を解析した。

3. 研究の方法

(1) Ni 結合能の解析

マウス各組織から調整した細胞懸濁液をNiイオン存在下で培養した後、Niイオン特異的蛍光プローブであるNewport Green (NPG)と反応させた。その後、蛍光色素標識抗体で細胞を染色し、フローサイトメトリーにより各細胞株のNi結合能を解析した。Ni結合能は以下の様に計算したMFIで示した。 $MFI = (Ni \text{ 反応細胞における NPG の平均蛍光強度}) - (Ni \text{ 非反応細胞における NPG の平均蛍光強度})$

(2) サイトカイン mRNA 発現量の解析

マウス各組織から調整した細胞懸濁液をNiイオン存在下で一定時間培養した。その後、定法に従い総RNAを抽出し、cDNAを合成した。各サイトカインmRNA発現量は定量RT-PCR法で解析し、アクトチンmRNA発現量を内部コントロールとするCT法により算出した。

(3) Ni アレルギーマウスモデル

マウスにNi溶液(アジュバントとして大腸菌由来LPSを含む)を腹腔内投与し、Ni感作を行った。マウスリンパ節より精製したDC画分をNiと反応させNi-DCとした。コントロールとして、Niを含まないPBSと反応させたPBS-DCを調整した。Ni感作マウスの耳介にNi-DCもしくはPBS-DCを皮内接種し、Niアレルギー性炎症の指標として、耳介の腫脹を経時的に測定した。

4. 研究成果

(1) マウスリンパ節由来 DC における Ni 結合能

皮膚所属リンパ節、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、腸骨リンパ節および脾臓中のDCについてNi結合能を解析した。リンパ節中のDCはMHC class II^{hi}CD11c^{int}の遊走性DCおよびMHC class II^{int}CD11c^{hi}の常在性DCに分類された。ここで遊走性DCとは末梢組織で抗原を取り込み所属リンパ節へと遊走してきたDCであり、常在性DCとはリンパ組織中に常在するDCのことである。

脾臓中には MHC class II^{int}CD11c^{hi} の常在性 DC のみが検出された。さらに、遊走性 DC は XCR1⁺cDC1、XCR1⁺EpCAM⁺CD11b⁺cDC2、XCR1⁺EpCAM⁺CD11b⁻ double negative (DN) cDC および XCR1⁺EpCAM⁺ランゲルハンス細胞 (LC) に分類された。常在性 DC は XCR1⁺cDC1 および XCR1⁺EpCAM⁺CD11b⁺cDC2 に分類された。皮膚所属および顎下リンパ節中の遊走性 DC は、腸間膜および腸骨リンパ節中遊走性 DC に比べて有意に高い Ni 結合能を示した。これに対し、いずれのリンパ節および脾臓においても、常在性 DC の Ni 結合能は遊走性 DC に比べ低値であった (図 1)。

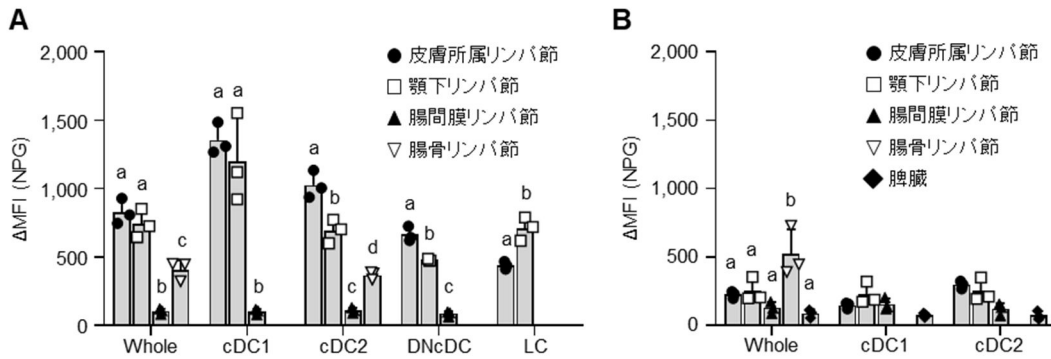


図 1 . 各リンパ節および脾臓中における遊走性 DC (A) および常在性 DC (B) の Ni 結合能 .

(2) Ni 刺激 DC における IL-1 発現の増強

皮膚所属リンパ節および腸間膜リンパ節から DC 画分を精製し、Ni 刺激に対する応答性を解析した。その結果、皮膚所属リンパ節および腸間膜リンパ節由来 DC のいずれにおいても、Ni アレルギー発症に必須である IL-1 の発現が mRNA およびタンパク質レベルのいずれにおいても、Ni 刺激により増強された (図 2)。

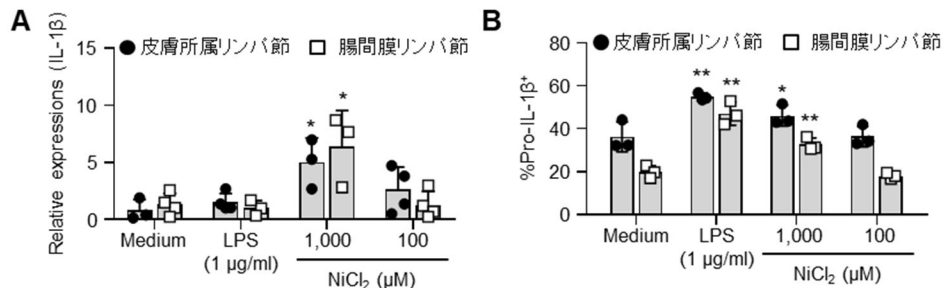


図 2 . Ni 刺激 DC における IL-1 発現の増強 . (A) IL-1 mRNA 発現量の解析、(B) フローサイトメトリーによる細胞内 IL-1 の解析 .

(3) Ni-DC による Ni アレルギー性炎症の惹起

Ni 結合性 DC による Ni アレルギーの誘導を解析した。皮膚所属リンパ節および腸間膜リンパ節から DC 画分を精製し、in vitro で Ni と反応させ Ni-DC を調整した。コントロールとして PBS と反応させた PBS-DC を調整した。この Ni-DC および PBS-DC を Ni 感作マウスの耳介に皮内接種したところ、皮膚所属リンパ節由来 Ni-DC を接種した場合でのみ、Ni アレルギー性炎症 (耳介の腫脹) が誘導された。これに対し、腸間膜リンパ節由来 Ni-DC および PBS-DC を接種した場合では Ni アレルギー性炎症は誘導されなかった (図 3) 。その一方、Ni-DC に Ni アレルギー感作能は認められなかった。

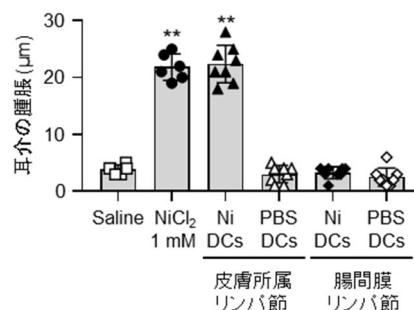


図 3 . 皮膚所属リンパ節由来 Ni-DC による Ni アレルギー性炎症の惹起

以上の結果から、皮膚所属リンパ節の遊走性 DC は高い Ni 結合能を示し、Ni アレルギー性炎症の惹起能を有することが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kuroishi, T., Bando, K., **Tanaka, Y.**, Shishido, K., Kinbara, M., Ogawa, T., Muramoto, K., Endo, Y., **Sugawara, S.** CXCL4 is a novel nickel-binding protein and augments nickel allergy. *Clinical & Experimental Allergy* **47**: 1069-1078, 2017. Doi: 10.1111/cea.12926. 査読有 .

Bando, K., **Tanaka, Y.**, **Kuroishi, T.**, Sasaki, K., Takano-Yamamoto, T., **Sugawara, S.**, Endo, Y. Mouse model of hydroquinone hypersensitivity via innate and acquired immunity, and its promotion by combined reagents. *Journal of Investigative Dermatology* **137**: 1082-1093, 2017. Doi: 10.1016/j.jid.2016.12.018. 査読有 .

〔学会発表〕(計11件)

Kuroishi, T., **Sugawara, S.** Ni-binding capabilities of migratory cDCs in skin-draining lymph nodes. 第47回日本免疫学会学術集会、2018年12月11日、福岡国際会議場(福岡市).

黒石智誠. 金属イオンに対する免疫応答と金属アレルギー発症 .メタルバイオサイエンス研究会 2018 シンポジウム 2「金属の生体影響に関する新たな研究アプローチ」, 2018年11月16日、仙台市戦災復興記念館(仙台市).

Kuroishi, T. Regulation of immunological and inflammatory functions by biotin. 2018年11月3日, International Symposium on Nutrition and Human Health, Hilton Hotel (米国テキサス州 College Station).

黒石智誠, **菅原俊二**. 皮膚所属リンパ節の遊走性 cDC は Ni 結合能を示し Ni アレルギーを惹起する . 第60回歯科基礎医学会、2018年9月7日、九州大学病院キャンパス百年講堂(福岡市).

陸 路, **黒石智誠**, **菅原俊二**. マウス唾液腺における組織マクロファージの解析 . 第60回歯科基礎医学会、2018年9月7日、九州大学病院キャンパス百年講堂(福岡市).

宍戸 香, **黒石智誠**, **菅原俊二**. P2 受容体アゴニストと IL-1 の共刺激はヒト口腔上皮細胞における IL-6 産生を相乗的に増強する . 2018年9月7日、九州大学病院キャンパス百年講堂(福岡市).

Lu, L., **Tanaka, Y.**, **Kuroishi, T.**, Ishii, N., Sasano, T., **Sugawara, S.** Identification and characterization of salivary gland antigen-presenting cells and memory resident T cells. 2018年1月14日, International Symposium for Multimodal Research and Education in IOHS-Liaison 2017, 東北大学歯学部(仙台市).

黒石智誠, **菅原俊二**. CXCL4 は新規ニッケル結合タンパク質であり, ニッケルアレルギーを増強する . 2017年12月1日, 第72回東北大学歯学会東北大学歯学部(仙台市).

宍戸 香, **黒石智誠**, **菅原俊二**. 細胞外 purine nucleotide 刺激はヒト口腔上皮細胞における炎症性サイトカイン産生を増強する . 2017年9月17日, 第59回歯科基礎医学会, 松本歯科大学キャンパス(松本市).

秋山なつみ, 桃北萌子, 宍戸 香, **黒石智誠**, **菅原俊二**. 舌下免疫療法による食物アレルギー予防効果の解析 . 2017年9月17日, 第59回歯科基礎医学会, 松本歯科大学キャンパス(松本市).

黒石智誠, **田中志典**, 遠藤康男, **菅原俊二**. CXCL4 は新規 Ni 結合タンパク質であり Ni アレルギーを増強する . 2016年8月25日, 第58回歯科基礎医学会, 札幌コンベンションセンター(札幌市).

〔その他〕

黒石智誠, 菅原俊二. CXCL4 は新規ニッケル結合蛋白質であり, ニッケルアレルギーを増強する. 臨床免疫・アレルギー科 **68**: 508-514, 2017.

黒石智誠. CXCL4 は新規 Ni 結合性タンパク質であり Ni アレルギーの惹起相を増強する (受賞報告). 東北大学歯学会雑誌 **34・35**: 81, 2016.

東北大学プレスリリース (2017年5月1日付)
http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20170501_01web.pdf

東北大学広報誌「まなびの杜」2017冬号
<http://www.bureau.tohoku.ac.jp/manabi/manabi82/manabi82.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 菅原 俊二

ローマ字氏名: SUGAWARA, Shunji

所属研究機関名: 東北大学

部局名: 大学院歯学研究科

職名: 教授

研究者番号 (8桁): 10241639

(2) 連携研究者

連携研究者氏名: 田中 志典

ローマ字氏名: TANAKA, Yukinori