

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10371

研究課題名(和文)経口免疫寛容による金属アレルギーの新規治療戦略に関する基盤的研究

研究課題名(英文)Basic research on novel therapeutic strategies for metal allergy with oral tolerance

研究代表者

熊谷 賢一(KUMAGAI, Kenichi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10518129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔内での金属アレルギー動物モデルを確立し、口腔内の金属アレルギーに関わるT細胞を中心とした免疫動態を明らかにしていくことを目的とした。また、経口免疫寛容を誘導することで口腔粘膜における金属-細菌叢-生体防御系の関連性の観点から免疫応答制御機構を解明し、金属アレルギーに関する新規診断・治療体系の礎となることを目的とし研究を実施した。本研究では、口腔粘膜においてPd, Cr, Niの金属を用いてアレルギーモデルマウスを作製し、口腔内金属アレルギーの発症に関与する特異的T細胞を同定した。また、交差反応性についても検証を行って学会発表および論文発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内での金属アレルギー動物モデルを作製したことで、金属イオンが耳介部皮膚より経皮的に感作され、口腔内の金属からの溶出された金属イオンと生体内でアレルギー反応を示すことが明らかとなった。さらに口腔内の金属アレルギーには金属交差性も存在しており、とくに自然リンパ球および金属特異的T細胞が病因・病態に深く関与している事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established the first animal model of metal allergy in the oral cavity, and clarified the immunokinetics and changes in oral microflora centered on T cells involved in metal allergy in the oral cavity. In addition, we conducted research with the aim of elucidating the immune response control mechanism from the viewpoint of the relationship between metal-bacterial flora-biological defense system in the oral mucosa by inducing oral immune tolerance, and to become the foundation of a new diagnostic and therapeutic system for metal allergy. In this study, we prepared allergy model mice using Pd, Cr, and Ni metals in the oral mucosa. Specific T cells involved in the development of oral metal allergy were identified, and cross-reactivity was also verified, and conference presentations and papers were presented.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：金属アレルギー T細胞受容体

1. 研究開始当初の背景

金属アレルギーは T 細胞を主体とした遅延型アレルギーとして発症すると考えられているものの、これまでその病態を反映する適切な動物モデルが存在していなかったため、病態発症メカニズムおよび免疫学的機序については不明な点が多い。金属アレルギーの治療法としては、主に原因金属の除去や、ステロイドや抗ヒスタミン薬などによる対処療法のみであり、日常生活や歯科治療において金属に接触する機会が多い患者自身の QOL を著しく妨げているとされている。そのため、金属アレルギーに関わる病態発症のメカニズムを理解し、免疫制御の観点からの新たな診断・治療法を確立することは重要な課題と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では世界に先駆けて口腔内の金属アレルギー動物モデルを確立し、口腔内の金属アレルギーに関わる T 細胞を中心とした免疫動態を明らかにしていくことを目的とした。また、経口免疫寛容を誘導することで口腔粘膜における金属-細菌叢-生体防御系の関連性の観点から免疫応答制御機構を解明し、金属アレルギーに関する新規診断・治療体系の礎となることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 口腔内金属アレルギーモデルマウスの作製(図 1)

BALB/c (6 週齢, 雌) の耳介部へ各種塩化ニッケル・パラジウム・クロム・チタンと LPS 混合溶液の皮内注射で感作し、各種塩化ニッケル・パラジウム・クロム・チタン水溶液単体を頬部の口腔粘膜に皮内注射することで誘導を行った。対照として、感作を行わずに誘導を同一条件下で頬部の口腔粘膜組織に皮内注射した。頬部腫脹の経時変化および皮膚の状態を経過観察した。

使用試薬:

NiCl₂, PdCl₂, CrCl₂: (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan)

LPS: (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

(2) 病理組織・免疫組織化学的解析

誘導後 7 日目の頬粘膜を採取し HE 染色による病理組織学的検索を行った。また、抗原特異的免疫応答の有無を確認するために、T 細胞(CD3)および樹状細胞(F4/80)浸潤の有無を免疫組織化学染色で解析した。

(3) 網羅的 T 細胞受容体解析

作製した口腔内金属アレルギーモデルマウスにおける口腔粘膜組織中の T 細胞の性状解析するために、共同研究者の鈴木らが開発した Adaptor-Ligation-PCR 法を用いた T 細胞受容体(T cell receptor; TCR) レパトア解析を実施した。この TCR レパトア解析法は、全 TCR 遺伝子を同一条件下で増幅し、生体内の発現頻度をそのまま反映させることが可能となる唯一の実験系であり、次世代シーケンサーを用いたパイオインフォマティクスによるデータ処理を加えることによって、TCR 遺伝子クローンの同定を迅速かつ大量に解析することが可能となった。

各種金属アレルギー発症モデルマウスにおいて、口腔粘膜および顎下リンパ節組織から Total RNA を抽出し、各組織中に存在する T 細胞受容体のレパトアを各 TCRV ファミリーの相対存在率、CDR3 領域のシーケンス解析ならびに存在頻度を算出し、TCR 遺伝子発現ライブラリの構築を図ることで金属特異的 T 細胞および自然リンパ球の存在頻度を特定した。

4. 研究成果

(1) 頬粘膜部の腫脹測定結果と誘導後 7 日目の病態写真(図 2)

Ni 感作の金属アレルギーマウスモデル群では、導 7 日目において対照群と比較して頬部に有意な腫脹が認められた。

(2) 病理組織学的ならびに免疫組織化学的検索(図 3)

誘導後 1, 7 日目の金属アレルギーマウスモデルでは、Ni 感作群で頬粘膜の上皮下に CD3 陽性 T 細胞浸潤を認めていた。また、F4/80 陽性樹状細胞は誘導 7 日目においては Pd 感作群でも浸潤を認め、ヒト金属アレルギーに類似した病理組織像を呈していた。病理組織学的にも粘膜上皮の肥厚および海綿状浮腫や基底層の液化変性を認めた。

(2) 各種金属特異的 T 細胞および自然リンパ球の同定

ニッケル・パラジウム・クロム・チタンの 4 種類の各種金属アレルギー発症モデルマウスにおいて、各種金属に特異的な T 細胞受容体を有する T 細胞によって免疫応答が起こっていること

が明らかとなった。とくにニッケルとクロムでは、T細胞受容体に invariant TCR V 14 J 18 を有する NK T細胞が出現し、チタンではNK T細胞に加えて Mucosal associated invariant T (MAIT) というTCRV 19 J 33を発現する自然リンパ球が、各種金属特異的T細胞とともに誘導されていることが明らかとなった。MAIT細胞は自然免疫と獲得免疫の橋渡しをする自然リンパ球として機能すると考えられており、感染防御反応や自己免疫に関与するとされているが、未解明な部分が多く残されている。本金属アレルギーモデルマウスによる研究成果より、金属アレルギー発症機序および免疫寛容において、自然リンパ球が重要な生理機能を担っていることが推察された(図4)。

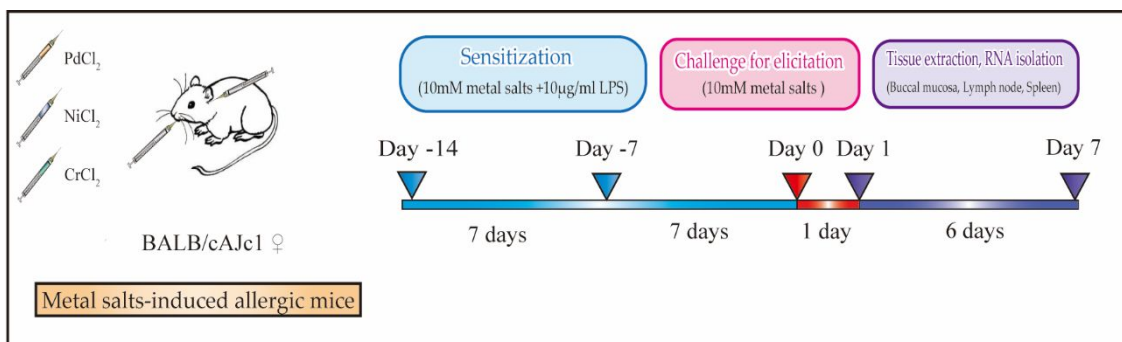


図1：耳介部感作による口腔粘膜における金属アレルギー動物モデルの作製

Sensitization (×1), challenge (×1)

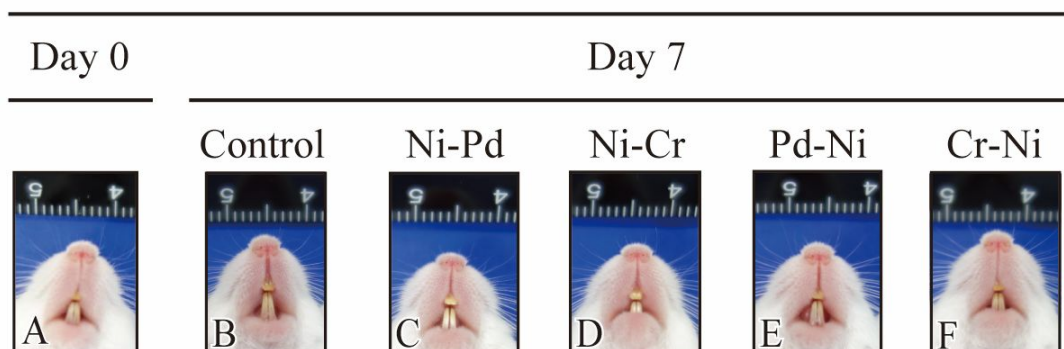


図2：耳介部感作による頬粘膜の腫脹（感作-誘導）

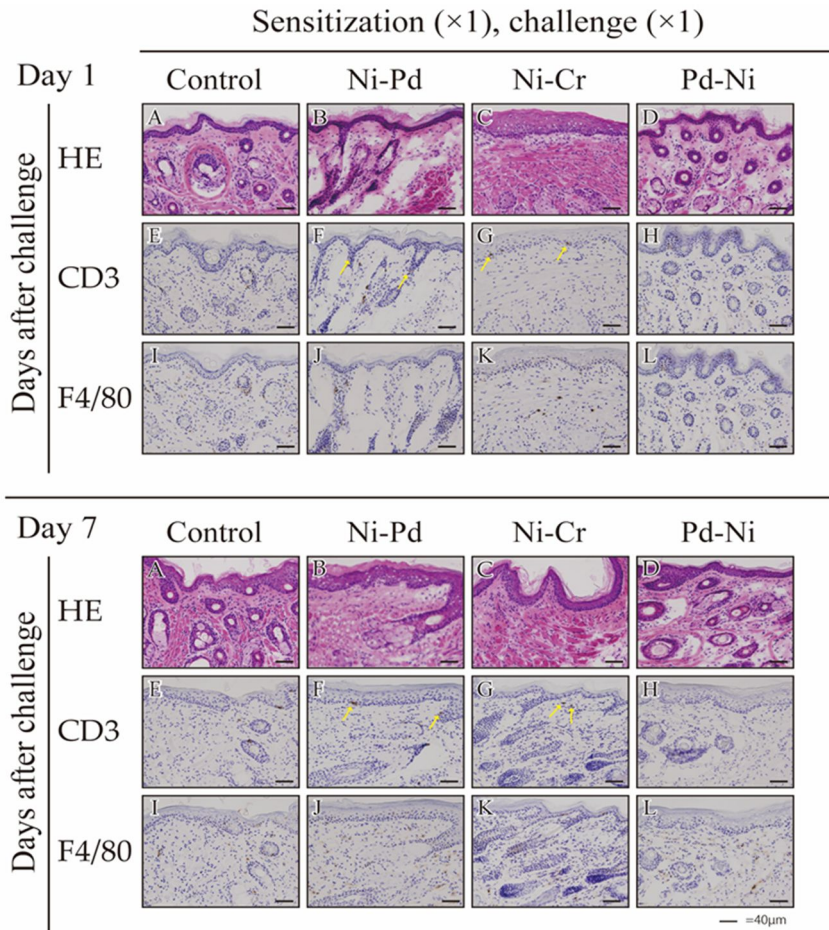


図3：病理組織学的ならびに免疫組織化学的検索

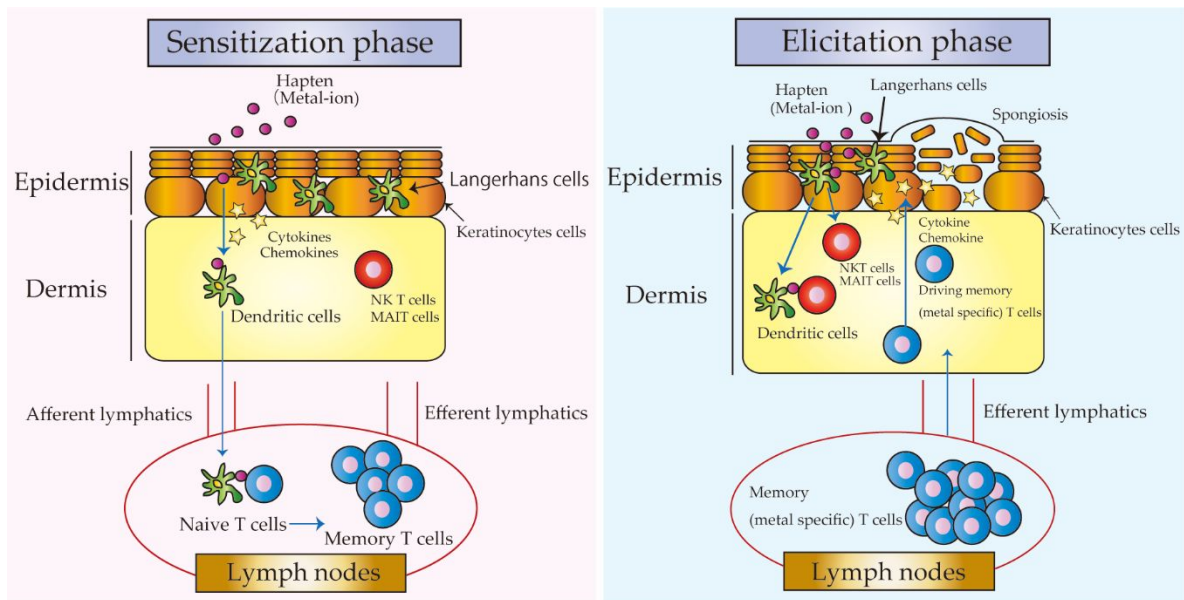


図4：金属アレルギーの発症機序

感作 (Sensitization Phase): 生体内形成された金属-蛋白複合体は、抗原提示細胞に補足され二次（末梢）リンパ器官へ移動し、リンパ節内のナイーブT細胞がその抗原を認識することで、抗原特異的なエフェクターT細胞やメモリーT細胞に分化する。

誘導 (Elicitation Phase): 再度同じ抗原である金属イオンが侵入した際に、その金属イオンを補足した抗原提示細胞を、エフェクターT細胞が認識するとエフェクターT細胞が免疫応答を起こし、炎症性サイトカインを産生することにより浮腫や組織障害を引き起こす。自然リンパ球は金属特異的なエフェクターT細胞とともに炎症局所に集簇しており、免疫制御に関与していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shigematsu Hiroaki, Kumagai Kenichi, Suzuki Motoaki, Eguchi Takanori, Matsubara Ryota, Nakasone Yasunari, Nasu Keisuke, Yoshizawa Takamasa, Ichikawa Haruno, Mori Takahiro, Hamada Yoshiki, Suzuki Ryuji	4. 巻 21
2. 論文標題 Cross-Reactivity of Palladium in a Murine Model of Metal-induced Allergic Contact Dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4061 ~ 4061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21114061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsubara Ryota, Kumagai Kenichi, Nasu Keisuke, Yoshizawa Takamasa, Kitaura Kazutaka, Suzuki Motoaki, Hamada Yoshiki, Suzuki Ryuji	4. 巻 24
2. 論文標題 Cross-Reactivity of Intraoral Allergic Contact Mucositis in the Nickel-Sensitized Ear Model of Metal Allergy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3965 ~ 3965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshizawa Takamasa, Kumagai Kenichi, Matsubara Ryota, Nasu Keisuke, Kitaura Kazutaka, Suzuki Motoaki, Hamada Yoshiki, Suzuki Ryuji	4. 巻 24
2. 論文標題 Characterization of Metal-Specific T-Cells in Inflamed Oral Mucosa in a Novel Murine Model of Chromium-Induced Allergic Contact Dermatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2807 ~ 2807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24032807	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nasu Keisuke, Kumagai Kenichi, Yoshizawa Takamasa, Kitaura Kazutaka, Matsubara Ryota, Suzuki Motoaki, Suzuki Ryuji, Hamada Yoshiki	4. 巻 24
2. 論文標題 Type IVb Hypersensitivity Reaction in the Novel Murine Model of Palladium-Induced Intraoral Allergic Contact Mucositis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3137 ~ 3137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊谷賢一, 松原陵太, 仲宗根康成, 那須啓佑, 吉澤孝昌, 江口貴紀, 森隆弘, 鈴木隆二, 濱田良樹
2. 発表標題 自然リンパ球を介したチタンアレルギー免疫応答の解明
3. 学会等名 第66回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重松宏昭, 熊谷賢一, 江口貴紀, 松原陵太, 仲宗根康成, 那須啓佑, 吉澤孝昌, 馬杉亮彦, 鈴木隆二, 濱田良樹
2. 発表標題 パラジウムアレルギー交差反応マウスモデルにおけるT細胞免疫応答の解明について
3. 学会等名 第66回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松原 陵太, 熊谷 賢一, 仲宗根 康成, 江口 貴紀, 重松 宏昭, 北條 秀樹, 吉澤 孝昌, 今村 栄作, 鈴木 隆二, 濱田 良樹
2. 発表標題 異種金属間における口腔粘膜金属アレルギー交叉反応の免疫学的解析
3. 学会等名 第64回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 那須啓佑, 熊谷賢一, 吉澤孝昌, 松原陵太, 重松宏昭, 北條秀樹, 鈴木隆二, 濱田良樹
2. 発表標題 口腔粘膜に局在するパラジウムアレルギーにおける免疫応答の解明
3. 学会等名 第69回日本口腔科学会 中国・四国地方部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉澤孝昌, 熊谷賢一, 那須啓佑, 松原陵太, 重松宏昭, 北條秀樹, 鈴木隆二, 濱田良樹
2. 発表標題 口腔内クロム誘発型金属アレルギーモデルマウスの確立と病態解明
3. 学会等名 第32回日本口腔内科学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 熊谷 賢一, 松原 陵太, 濱田 良樹, 鈴木 隆二	4. 発行年 2021年
2. 出版社 アレルギーの臨床	5. 総ページ数 5
3. 書名 金属アレルギー発症モデルマウスによる病態解明と新規診断・治療法への可能性	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱田 良樹 (Hamada Yoshiki) (70247336)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	
研究分担者	鈴木 隆二 (Suzuki Ryuji) (70373470)	独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・臨床免疫研究室・室長 (82710)	
研究分担者	重松 宏昭 (Shigematsu Hiroaki) (80737198)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師 (32710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------