

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10038

研究課題名（和文）末梢血miRNA発現解析による金属アレルギー疾患の新規診断バイオマーカーの確立

研究課題名（英文）Establishment of the new diagnosis biomarkers for metal allergy by analyzing peripheral blood miRNA expression

研究代表者

細木 真紀（HOSOKI, Maki）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・講師

研究者番号：10228421

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、同意の得られた健常ボランティアおよび歯科用金属アレルギー外来受診患者の協力を得て行った。

microRNA解析については、パッチテスト前・パッチテスト72時間後・1週間後に、末梢血を採取してRNAを抽出した。microRNA解析は検出感度に優れた高感度DNAチップ（3D-Gen, 東レ, 東京）を使用し遂行し、診断・治療のバイオマーカー候補となるmicroRNAを検討した。また、歯科用金属アレルギー患者の動向を検討するために、歯科用金属アレルギー外来を受診した患者の、年齢・性別・症状・パッチテスト結果・陽性金属元素の種類・アレルギー症状などをデータベース化し、疫学的検討も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網羅的なmicroRNA解析の手法は、癌研究に多用されており、金属アレルギーについては、このような研究は少ない、研究を展開することにより、他の研究との関連も得られると考える。

研究成果の概要（英文）：The study was conducted with the cooperation of healthy volunteers and outpatients with dental metal allergy who gave informed consent.

Peripheral blood samples were collected before, 72 hours after, and 1 week after the patch test for microRNA analysis. MicroRNA analysis was performed using a high-sensitivity DNA chip (3D-Gen, Toray Industries, Tokyo, Japan) with excellent detection sensitivity, and microRNAs that could be candidate biomarkers for diagnosis and treatment were investigated. In addition, to explore the trends of patients with dental metal allergy, we compiled a database of age, sex, symptoms, patch test results, positive metal element types, and allergic symptoms of patients who visited outpatient dental metal allergy clinics, and conducted an epidemiologic study.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：金属アレルギー マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性接触皮膚炎は、皮膚が様々なアレルゲン（植物、化学物質、金属製品など）に曝露されることによって引き起こされる病態である。日本ではアレルギー疾患の患者数が増加しており、約 50%の成人がアレルギー性症状を持つと報告されている（厚生労働省, 2006）。花粉症などでよく知られたアレルギー性鼻炎は即時型アレルギー（Ⅰ型）だが、アレルギー性接触皮膚炎は遅延型アレルギー（Ⅳ型）に分類される炎症性疾患であり、金属アレルギーもその一種である。遅延型の金属アレルギーは T リンパ球が関与し、掌蹠膿疱症や全身性接触皮膚炎症候群などの重篤な症状を引き起こすことがあるが、その具体的な発症メカニズムは未だに解明されていない。金属アレルギーの診断方法も、パッチテストが一般的であるが、この方法には感作リスクや複数回の診察が必要という問題がある。また、リンパ球刺激試験（Lymphocyte stimulation test, DLST）などの血液検査もあるが、偽陽性の問題があるため、さらなる改善が求められている。このような背景から、新しい診断法の開発が急務となっており、生物学的マーカーの探索も注目されている。

一方、microRNA (miRNA) は、生体内で遺伝子のタンパク質への翻訳を制御する重要な役割を果たしており、近年、血液やエクソソーム中の miRNA についても、疾患の種類や病態等によって、発現する miRNA の種類や発現量が変化することが明らかになってきている。生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになり、リアルタイムで生体の変化を推測できるため、様々な疾患の新たなバイオマーカーとしての可能性が高まっている。

そこで、本研究では先行研究で、miRNA が金属アレルギーの診断における新たなバイオマーカーとして利用できる可能性を探ることを目的として、金属アレルギーの症状を持つ 20 代女性ボランティア(以下患者群) 2 名と健康な同年代女性ボランティア(以下健常者群) 2 名を対象に、パッチテスト前後の末梢血中 miRNA を分析した。その結果、患者群でいくつかの miRNA が有意に抑制されることが確認された(図1 赤丸で囲む部分)

さらにクラスター解析により、これらの miRNA が炎症反応や症状発現に関連していることも示唆された。

しかしながら、miRNA の発現量は様々な要因によって変化するため、この結果のみでバイオマーカーを確立するのは難しく、被験者数を増やして、患者や健常者を対象に同様の研究を行い、リアルタイム PCR などの手法で結果を確認することが必要と考えられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、性別や年齢を厳選し、本研究の主旨を十分に理解した健常者ボランティアおよび金属アレルギー外来患者を対象に、パッチテスト前後の末梢血 miRNA の経時的な変化を測定、検討することを目的とした。さらに、特異的な遺伝子を同定し、同定された miRNA を PCR 等の方法で確認した後、金属アレルギー診断の新規バイオマーカー

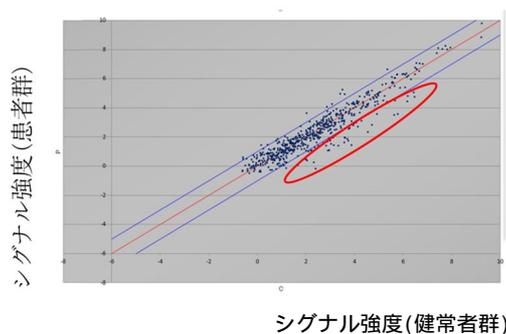


図1. 患者群と健常者群の miRNA 発現量の比較

グラフ中の直線ラインより、上部はアップレギュレートしている、下部はダウンレギュレートしている microRNA . 複数の miRNA が、患者群において健常者群よりダウンレギュレートされていた。(楕円で囲む部分)

としての潜在性を検討することも目的の一部である。

3. 研究の方法

被験者は 20 代の女性（平均年齢 24 歳，年齢範囲 22～28 歳），金属アレルギーと診断された女性（以下，患者群 (Patient group)）3 名と金属アレルギーの既往歴がなく，他の疾患も持たない女性（以下，健常者群 (Control group)）3 名である。徳島大学の歯科用金属アレルギー外来で，金属元素に対するパッチテストを実施し，陽性反応を確認した。

パッチテスト前，72 時間後，および 1 週間後に末梢血を採取し，RNA を抽出した。全 RNA の品質と量は測光法（Nanodrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA）および Agilent Bioanalyzer 2100（Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA）で確認した。得られた RNA を miRNA アレイチップ（3D-Gene, 東レ, 東京, 日本）で解析し，チップ上で得られた蛍光シグナルを 3D-Gene Extraction ソフトウェア（3D-Gene）を使用して解析した。発現に差異が認められた miRNA については，miRNA の発現レベルを検証するために，TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit（Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA）を使用し，real-time quantitative polymerase chain reaction（以下 qRT-PCR）試験を実施し，結果を検討するため，Ingenuity pathway analysis，Gene Ontology analysis，および KEGG pathway enrichment analysis を行った。

なお，この研究プロトコルは，ヘルシンキ宣言に従い実施され，徳島大学病院の研究倫理委員会（番号 1036）の承認を得ている。

4. 研究成果

パッチテストの結果を示す。健常者群には陽性の兆候は見られなかったが，患者群には，ニッケル・コバルトに陽性の兆候が見られた（表 1，図 2）

表 1 被験者の内訳（n=6） Control group : C Patient group : P

Subjects	Gender	Age	Race
C1	F	22	Asian
C2	F	26	Asian
C3	F	28	Asian
P1	F	23	Asian
P2	F	23	Asian
P3	F	24	Asian



図 2 パッチテストの結果例

RNA 抽出および品質管理後、マイクロアレイ解析に基づいて包括的な miRNA プロファイルを生じた。全体として 571 種類の miRNA が発現され、63 種類の miRNA が特異的に発現された (図 3a)。健常者群では、どの時点でも miRNA の有意な差は見られなかった (図 3b)。一方、患者群では 0 日と 3 日、また 3 日と 7 日の間で miRNA の差は見られなかったが、0 日と 7 日目の間で 20 種の miRNA が有意に減少した (図 3c)。これは、パッチテスト後 7 日目が誘発反応中の血中での重要な時間点である可能性を示唆している。また、末梢血白血球からの miRNA プロファイルは、皮膚の局所的な miRNA 変化よりも全身的な成分を表している可能性があると考えられた。

異なる時点でのマイクロアレイデータに対して Ingenuity パスウェイ解析を行った結果、患者群で 7 日目にダウンレギュレートされた miRNA は主に炎症性疾患および炎症反応に関連していた。これはダウンレギュレートされた miRNA が金属アレルギーとの間に関連性がある可能性を支持している。20 種類の中から Ingenuity Pathway Analysis に基づいて選ばれた 5 種類のダウンレギュレートされた miRNA (hsa-let-7d-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-150-5p) を TargetScanHuman 7.2 データベースで検討すると、Th1 および Th2 細胞パスウェイに関係する可能性が高いことが明らかになった (図 4)。

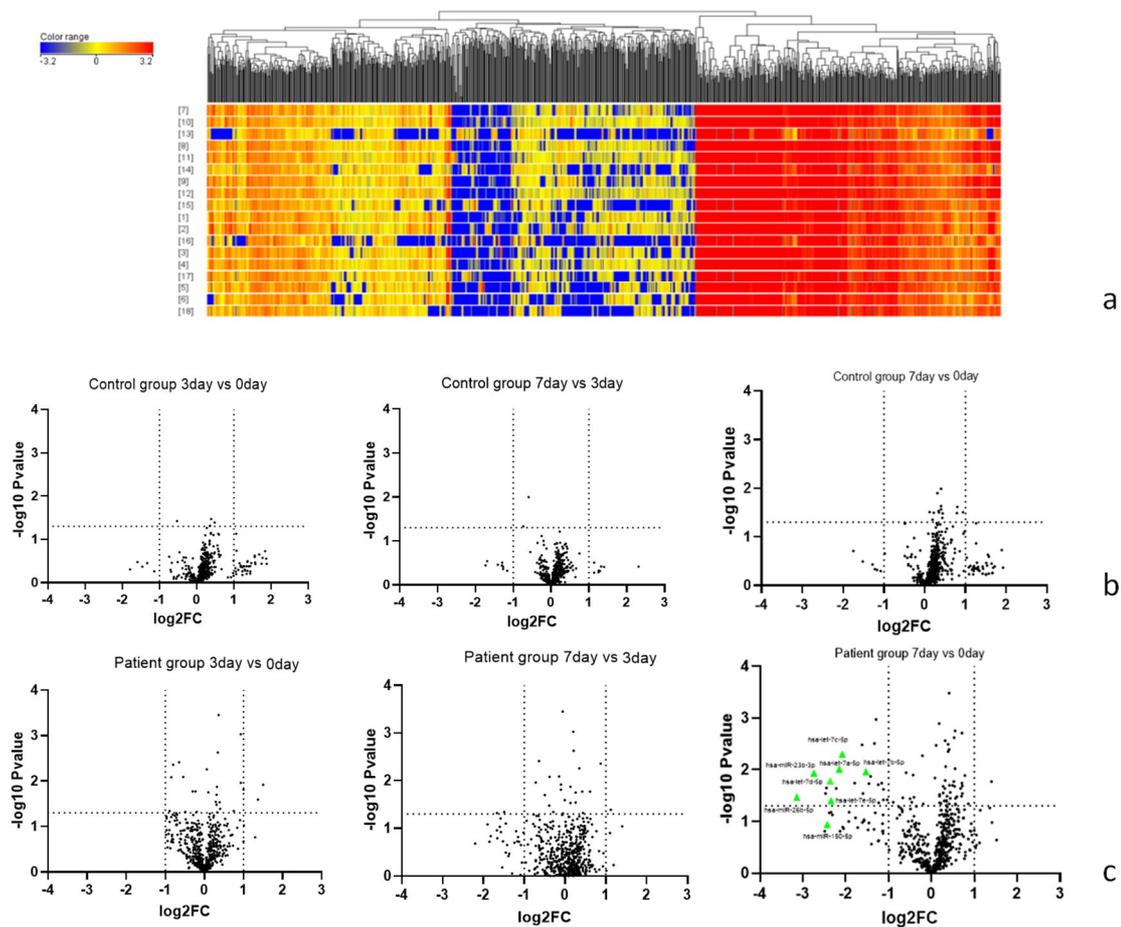


図3 マイクロアレイ分析

- (a) 3つの異なる時点(0日, 3日, 7日)で発現した miRNA のヒートマップ
- (b) 3日と0日, 7日と3日, および7日と0日の間の健常者群の変化を示す Volcano plot
- (c) 3日と0日, 7日と3日, 7日と0日の間の患者群の変化を示す Volcano plot

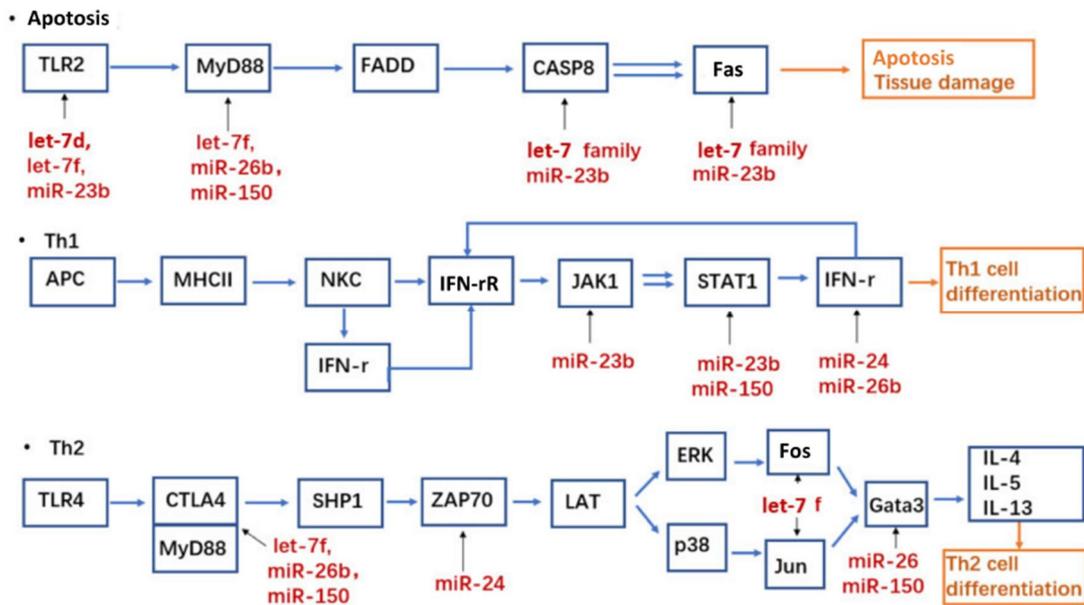


図4 TargetScanHuman

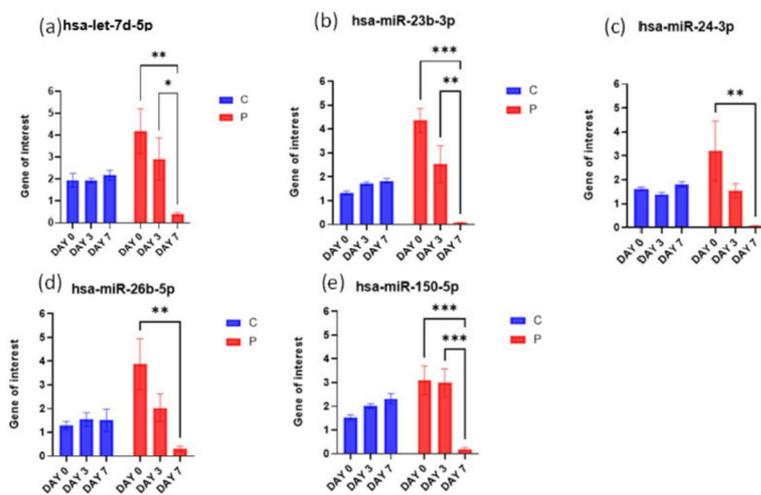


図5 qRT-PCRの結果

末梢白血球における let-7d-5p、miR-23b-3p、miR-24-3p、miR-26b-5p および miR-150-5p の発現を健康者群 (n=3) と患者群 (n=3) 内で比較した。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001 (両側 t 検定)

さらに qRT-PCR で検証したところ、let-7d-5p、miR-23b-3p、miR-24-3p、miR-26b-5p および miR-150-5p は患者群で有意にダウンレギュレートされており、新規アレルギーマーカー候補になり得ると考えられた (図5)。

多因子疾患においては、遺伝学的な解析を含めた網羅的な解析が、きわめて有利であることがこれまでの研究から明らかになってきている。アレルギー疾患においては、型アレルギーに関する研究が多く、型アレルギーについてのこのような報告は国際的にも少ない。早急に被験者数を増やし、検証を行う必要があると考えられたが、複数回の採血を伴う検査は患者にとって簡便とは言い難いことが改めて認識された、今後は検体についても検討し、検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhang Yuehui, Maki Hosoki, Masamitsu Oshima, Toyoko Tajima, Mayu Miyagi, Swarnalakshmi Raman, Resmi Raju, Yoshizo Matsuka	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of microRNA Signatures in Peripheral Blood of Young Women as Potential Biomarkers for Metal Allergy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 -277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines11020277	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 -
1. 著者名 Maki Hosoki, Yoshifumi Okamoto, Toyoko Tajima, Mayu Miyagi, Yoshiaki Kubo, Maiko Sogawa, Resmi Raju, Shaista Afroz, Yoshizo Matsuka	4. 巻 3
2. 論文標題 Risk of an Immediate-Type Allergy to Minocycline Hydrochloride Ointment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Operative Dentistry, Endodontology and Periodontology	6. 最初と最後の頁 152-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 細木 真紀	4. 巻 92
2. 論文標題 歯科と金属アレルギー -ピアスによる金属アレルギー-発症リスクについて-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 金属	6. 最初と最後の頁 934-943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 黒厚子 璃佳, 細木 真紀, 杉本 明日菜, 岩本 勉	4. 巻 59
2. 論文標題 金管楽器マウスピースによる金属アレルギーが原因と考えられた口腔粘膜炎の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児歯科学雑誌	6. 最初と最後の頁 26-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11411/jspd.59.1_26	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 秋葉 陽介, 細木 真紀, 原田 章生, 高岡 由梨那, 渡邊 恵	4. 巻 14
2. 論文標題 歯科金属アレルギー患者への対応 検査、診断、治療方針と他科連携	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本補綴歯科学会誌	6. 最初と最後の頁 250-258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2186/ajps.14.250	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 細木 真紀, 田島 登誉子, 宮城 麻友, 井上 美穂, 仁木 真理子, 久保 宜明, 松香 芳三
2. 発表標題 金属アレルギー患者におけるピアスによる皮膚障害の臨床的検討
3. 学会等名 日本アレルギー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細木 真紀, 田島 登誉子, 宮城 麻友, 仁木 真理子, 久保 宜明, 松香 芳三
2. 発表標題 掌蹠膿疱症における金属アレルギーと菌性感染症について
3. 学会等名 日本皮膚免疫アレルギー学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細木 真紀, 田島 登誉子, 宮城 麻友, 井上 美穂, 久保 宜明, 松香 芳三
2. 発表標題 装飾品に対するニッケル表示の標準化をめざした取り組みについて
3. 学会等名 日本皮膚免疫アレルギー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田島 登誉子, 細木 真紀, 井上 美穂, 小澤 彩, 新開 瑞希, 宮城 麻友, 成谷 美緒, 大島 正充, 杉尾 隆夫, 山本 伊一郎, 松香 芳三
2. 発表標題 徳島大学病院における歯科用金属アレルギー患者の臨床統計学的検討
3. 学会等名 日本補綴歯科学会誌
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新開 瑞希, 細木 真紀, 鈴木 善貴, 田島 登誉子, 井上 美穂, 小澤 彩, 吉原 靖智, 大島 正充, 織田 英正, 本田 常晴, 松香 芳三
2. 発表標題 レジニアレルギーのリスクと歯科治療における対応
3. 学会等名 日本補綴歯科学会誌
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張 コ工輝, 細木真紀, 大島正充, 井上美穂, 田島登誉子, 小澤 彩, 新開瑞希, 宮城麻友, 成谷美緒, 松香芳三
2. 発表標題 金属アレルギー患者群と健常者群における特異的マイクロRNAの同定
3. 学会等名 日本補綴歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細木 真紀, Yuehui Zhang, 田島 登誉子, 井上 美穂, 井上 正久, 大島 正充, 宮城 麻友, 松香 芳三
2. 発表標題 モデルマウスによるチタンアレルギーの検討
3. 学会等名 日本歯科医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細木真紀
2. 発表標題 チタンアレルギーは存在するのか？
3. 学会等名 日本皮膚免疫アレルギー学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋葉 陽介, 細木 真紀, 原田 章生, 高岡 由梨那, 渡邊 恵
2. 発表標題 歯科金属アレルギー患者への対応 検査、診断、治療方針と他科連携
3. 学会等名 日本補綴歯科学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新開 瑞希, 細木 真紀, 鈴木 善貴, 小澤 彩, 吉原 靖智, 安村 博, 宮本 裕司, 福田 政司, 郡 元治, 大塩 恭仁, 鈴木 温, 松香 芳三
2. 発表標題 金属アレルギーに併発してホルムアルデヒドおよびレジナルアレルギーが疑われた症例
3. 学会等名 日本補綴歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細木真紀
2. 発表標題 対応に困る接触皮膚炎: その診断と対策 チタンアレルギーは存在するのか
3. 学会等名 日本皮膚免疫アレルギー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細木 真紀, 張 ヨ工輝, 井上 美穂, 井上 正久, 松香 芳三
2. 発表標題 チタンアレルギーモデルマウスの作製と免疫担当細胞の病理組織学的検討
3. 学会等名 日本皮膚免疫アレルギー学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	大島 正充 (OSHIMA Masamitsu) (00548307)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	井上 美穂 (INOUE Miho) (20271059)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	三好 圭子 (MIYOSHI Keiko) (20304537)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	松香 芳三 (MATSUKA Yoshizo) (90243477)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

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
---------	---------