

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390518

研究課題名（和文） 金属アレルギーの発症機序の解析と補綴治療学的戦略

研究課題名（英文） The analysis of Ni allergy development and the therapeutic strategy in prosthodontics

研究代表者

市川 哲雄（TETSUO ICHIKAWA）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90193432

研究成果の概要（和文）：我々が作製したモデルマウスに発症するニッケルアレルギーを解析した。アレルギー発症皮下に浸潤する細胞の主体は CD3 陽性細胞（T 細胞）、CD11c/MHC classII 陽性細胞（樹状細胞）であることが明らかとなった。金属アレルギーモデルにおける免疫細胞のシグナル伝達機構を解析したところ、in vivo, in vitro 双方の樹状細胞上に p38/MKK6 の活性化を認めた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed Ni allergy symptoms in the mouse model which we produced. The major populations of infiltrated immune cells around the allergic region in skin were CD3 positive cells (T cells) and CD11c/MHC classII positive cells (dendritic cells). p38/MKK6 pathway in dendritic cells was activated by Ni stimulation both in vivo and in vitro.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：金属アレルギー，樹状細胞，MAP キナーゼ，ニッケル

1. 研究開始当初の背景

パッチテスト検査法の普及と共に、金属アレルギーの臨床的な研究は進んでいるが、病因論については、一般的なアレルギー反応の解釈しかされていない。なぜ抗原性が無くハプテンとして作用する金属がアレルギー反応を誘起しているのかは現在の所全く不明である。特に歯科用金属は、常時口腔内に存在して咬合や咀嚼により機械的に微量に破碎されており、ピアスなどの金属装飾品が原因となる金属アレルギーの発症メカニズム

との相違も考えられる。また、多量に存在する口腔微生物による修飾の可能性、ハプテンとしての金属イオンはといった口腔内や消化管のどんなタンパク質と結合するののかも知られていない。アレルギーを診断するために有用とされているパッチテストは経皮的に行われることが一般的であるが、対象金属イオンは皮膚表面のタンパク質と結合し、炎症反応を惹起することから口腔内の状況と相違している可能性もある。

申請者はこれまでにニッケル金属に対する

アレルギー反応を解析するために、マウスを用いたニッケルアレルギーモデルを確立し、ニッケル金属による樹状細胞の活性化機構を解析してきた。ニッケル金属そのもので樹状細胞の活性化、抗原提示能が亢進することを明らかにした。この結果から、ニッケルに対する特殊な免疫反応性が金属アレルギー発症の機序に関係していることが示唆された。しかし、未だ金属と結合する抗原タンパクに関しては明らかにされていない。金属特異的免疫反応、結合しうる免疫現性抗原の役割、免疫細胞の活性化機構、アレルギー発症など金属アレルギーで不明のままの重要な免疫学的分子機序を解明することが急務と考える。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究内容をさらに発展させ、金属アレルギーの疾患モデルを用い、金属アレルギー反応における免疫細胞の動態を免疫学的手法で解析する。樹状細胞やT細胞などの免疫細胞における金属に対する反応性を *in vivo* 及び *in vitro* で詳細に検討する。また、免疫細胞の金属からのシグナル分子の動態を生化学的手法により検討し、金属アレルギーの分子メカニズムを解明する。さらに、口腔内で金属イオンと結合しうるタンパク抗原を同定し、金属アレルギーにおける実際の免疫原を突き止める。

3. 研究の方法

(1) 歯科金属アレルギーモデルの確立
皮膚を介した金属アレルギーモデルはすでに知られているが、口腔粘膜を介した金属アレルギーモデルは確立されていない。そこで、マウスを用いた皮膚金属アレルギーモデルを応用し口腔粘膜に金属を感作させることによる疾患モデルを確立する。用いる金属は歯科材料中でアレルギーが出易いとされるニッケル (nickel: Ni) を中心に使用する。新たな金属アレルギーモデルの病態を詳細に検討する。

(2) 金属アレルギーモデルにおける免疫細胞のシグナル伝達機構

金属複合体を処理した樹状細胞の動態を明らかにするために、骨髄細胞から IL-4, GM-CSF などを用いて樹状細胞に分化させ、*in vitro* で各種金属を添加することによる IL-12 や IFN γ などのサイトカインの産生を ELISA にて、活性化状態を示す各種表面抗原 (MHC ClassII, CD80, CD86, CD40, ICAM-1 など) をフローサイトメーターにて検討し、金属に樹状細胞を活性化する因子 (TNFファミリー分子) の添加を組み合わせシグナル分子群に関し遺伝子解析を含めた分子生物学的手法にて検討することにより

金属と樹状細胞の活性化機構の分子機序を明らかにする。

また、T細胞やB細胞、NK細胞などに関しても *in vitro* の実験系を用い金属刺激によるシグナル分子の動きを詳細に検討することにより、金属が免疫細胞に与える詳細な影響を解明する。

(3) 口腔粘膜における金属の動態

本モデルにおける感作部位からの金属の取り込まれ方と粘膜内に分布する樹状細胞を中心とする免疫細胞の動態をいくつかの活性化マーカー、シグナル分子を用い、共焦点レーザー顕微鏡解析にて明らかにする。金属の初期感作からアレルギー反応が誘導するまでの詳細な分子メカニズムを検討する。また、皮膚を介した金属アレルギー反応との相違点を模索する。

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜下で感作するため、エーテル麻酔下でマウスの口蓋および頬粘膜に 26 ゲージの注射針で Ni とアジュバンドの混合液を投与したが、全量投与が非常に困難であった。そのため、マウスに与える飲用水中に 10 nmol/ml の NiCl₂ を加えて感作とし、通法に従って耳介皮下に Ni を投与してアレルギーを惹起させた。

しかしながら、腹腔内に Ni を投与する方法と比較してアレルギー反応は著しく弱く、ほぼ発症しなかった。

そこで、皮膚感作金属アレルギーモデルの免疫細胞のシグナル伝達機構を解析した。

Ni アレルギーモデルマウス耳介皮下に浸潤している細胞の主体は CD3 陽性細胞であった (図 1, 2)。

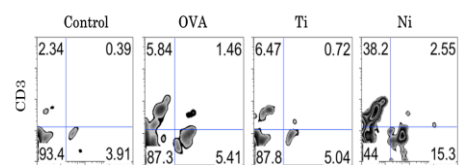


図 1. 浸潤細胞分画

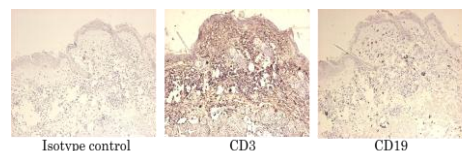


図 2. 耳介皮膚免疫組織科学

また、浸潤細胞には CD11c/MHC classII 陽性細胞の集団も認められた (図 3)。

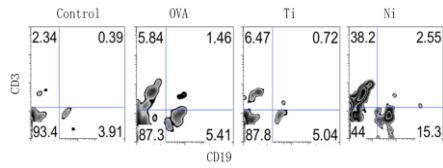


図 3. 浸潤細胞分画

(2) 骨髓細胞から分化誘導した DC を用いて, Ni の刺激に対するサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した. その結果, Ni に対して IL-12 および IFN- γ の産生の有意な増強を認めた (図 4).

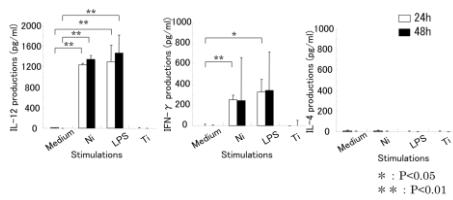


図 4. Ni に対する DC のサイトカイン産生量

また, 同様の実験を T 細胞を用いて行ったところ, Ni 刺激に対して IL-2, IFN- γ の産生の有意な増強を認めた (図 5).

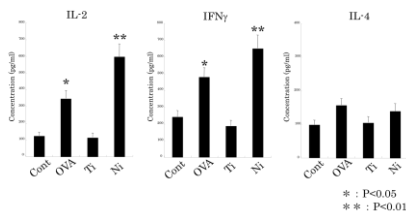


図 5. Ni に対する T 細胞のサイトカイン産生量

Ni で刺激した DC 上には, MAP キナーゼカスケードの中でも p38/MKK6 経路の活性化を認めた (図 6).

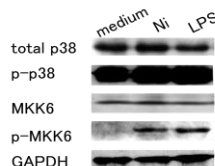


図 6. Ni に対する DC 上に発現する MAP キナーゼの活性化

(3) 口腔粘膜から Ni で感作することが困難であったため, 皮下における金属と免疫細胞の動態を上記 MAP キナーゼの活性化により解析した.

その結果, アレルギーを発症している皮下の DC 上には MKK6 の著しい活性化を認めた (図 7).

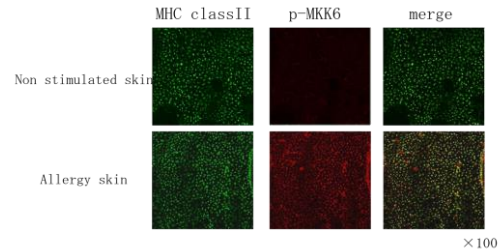


図 7. Ni に対する耳介皮下 DC 上に発現する MAP キナーゼの活性化

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Megumi Watanabe, Naozumi Ishimaru, Meinar Nur Ashrin, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Tetsuo Ichikawa, and Yoshio Hayashi, A novel DC therapy with manipulation of MKK6 gene on nickel allergy in mice, *PLoS ONE*, 査読有, 2011, 6(4)E19017 doi:10.1371/journal.pone.0019017

[学会発表] (計 10 件)

- ① Megumi Watanabe, The Role of MKK6/p38 Signal Cascade in Dendritic Cells in Mickle Allergy Mouse Model, *Kalimantan Symposia*, 平成23年12月11日, バリクパパン (インドネシア)
- ② 渡邊 恵, インプラント材料とアレルギー, 第 41 回公益社団法人日本口腔インプラント学会・学術大会, 平成 23 年 9 月 15 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ③ Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa, I Extremely LowFrequency Pulsed Magnetic Fields Accelerate Osteoblast Differentiation, *ICP 14th Biennial Meeting*, 平成 23 年 9 月 10 日, ハワイ (米国)
- ④ Meinar Nur Asrin, Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa et al.

Analysis of Molecular Mechanism for Pathogenesis of Nickel Allergy, (社) 日本補綴歯科学会第 120 回記念学術大会, 平成 23 年 5 月 20 日, 広島国際会議場(広島市)

- ⑤ Meinar Nur Asrin, Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa et al. Analysis of Molecular Mechanism for Pathogenesis of Metal Allergy, International Joint Symposium on Oral Science, 平成 22 年 12 月 17 日, クタ (インドネシア)
- ⑥ Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa, Extremely Low Frequency Pulsed Magnetic Fields Accelerate Osteoblast Differentiation, European Academy of Osseointegration, 平成 22 年 10 月 7 日, グラスゴー (英国)
- ⑦ 渡邊 恵, ニッケルアレルギーモデルマウス樹状細胞におけるシグナル伝達の解析, 第 2 回「口腔環境制御研究」カテゴリー集會, 平成 22 年 2 月 10 日, 長崎大学 (長崎市)
- ⑧ 渡邊 恵, ニッケルアレルギーモデルマウス樹状細胞におけるシグナル伝達の解析, 口腔から QOL 向上を目指す連携研究ミニシンポジウム, 平成 21 年 10 月 16 日, 徳島大学 (徳島市)
- ⑨ Watanabe, M, Ichikawa, T. MKK6/p38 Signal Transduction Cascades Regulate Nickel Allergy in the Model Mouse, International College of Prosthodontics, 平成 21 年 9 月 10 日, ケープタウン (南アフリカ)
- ⑩ 渡邊 恵, 市川哲雄, ニッケルアレルギーモデルマウス樹状細胞におけるシグナル伝達の解析, (社) 日本補綴歯科学会第 118 回学術大会, 平成 21 年 6 月 6 日, 京都国際会議場 (京都市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

市川 哲雄 (ICHIKAWA TETSUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：90193432

(2)研究分担者

石丸 直澄 (ISHIMARU NAOZUMI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：60314879
(H21, H22 年→H23 連携研究者)

渡邊 恵 (WATANABE MEGUMI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教
研究者番号：40380050

柏原 稔也 (KASHIWABARA TOSHIYA)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：90274232