

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790335

研究課題名 (和文)

モデルマウスを用いたアレルギー性皮膚疾患の追究

研究課題名 (英文)

Investigation of allergic skin disease using mouse model

研究代表者

川野 光子 (KAWANO MITSUKO)

東北大学・加齢医学研究所・教育研究支援者

研究者番号：90422203

研究成果の概要 (和文)：

アレルギー性皮膚疾患罹患者数は増大の一途にあり、新規診断法・治療法の開発が急務である。本研究は、金属アレルギーに代表される遅延型過敏反応発症の分子機構について、金属アレルギーモデルマウスを用い、時間軸という因子を含めて包括的に追究することを目的とした。本研究により決定した金属特異的反応性 T 細胞レパトアは、新規診断法の開発に繋がるものであり、金属アレルギー誘導に伴い発現が上昇する共刺激分子・サイトカインは、新たな治療標的と成り得る。

研究成果の概要 (英文)：

Development of newly diagnosis and therapeutics are matter of great urgency, because prevalence of allergic skin disease is increasing explosively. In this research, molecular mechanisms of metal allergy, which is one of delayed-type hypersensitivity, were investigated using mouse model of metal allergy. As a result, specific T cell receptor (TCR) repertoire responsible to metal was identified and up-regulation of co-stimulatory molecule and cytokine was clarified. It is thought that this TCR repertoire and these molecules might be new marker and new therapeutic target of metal allergy, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：免疫学、アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

アレルギー性皮膚疾患の患者数は増大の一途を辿り、特に金属アレルギーの場合には掌蹠膿疱症などの重篤な合併症を引き起こす例も知られている。金属アレルギーの診断法は数十年に渡りパッチテストによるものが主流であり、ス

テロイドの投与がある程度の治療成果を示すことから、発症機序に関する詳細な研究は国内外通してほとんど進んでいない。したがって、根本的な治療方法が示されてこなかった。また、パッチテストによる診断は、患者の皮膚に直接金属溶液をしみこませたシール、金属が錬

りこまれている軟膏を接触させることによりその反応性を評価するものであるが、診断結果が出るまでに 48 時間～72 時間を要する。しかしながら、こうして得られた診断結果には、パッチテストの形状や各メーカーが採用している金属濃度のばらつきなどにより判定が一定とならず、病院により診断がばらつくケースがある。さらに、パッチテストに使用されている金属溶液の濃度も比較的高いことから、それまでアレルギー反応を呈していなかった金属に対して感作が成立し、新たな金属アレルギーを誘導してしまうケースも報告されている。

金属アレルギーは遅延型過敏反応として知られており、T 細胞主体のアレルギー反応とされている。しかしながら、T 細胞の関与を直接的に、かつ特異的に証明した報告はない。これまでの主な金属アレルギー研究は、臨床現場において患者から末梢血単核球を分離し、その細胞群 (T 細胞・B 細胞・NK 細胞の混合サンプル) に各種金属を添加した際に増殖促進が見られた細胞をクローン化し、TCR レパトアを解析するものであった。しかしながら、ヒトの場合は単一の金属にのみ暴露されているという状況は皆無に近く、さまざまな金属に感作されている状況である。言い換えれば、金属特異的な反応を捉えている場合もあれば、金属間の交差反応を捉えている場合も考えられる。その結果、TCR レパトア解析結果は、同一の金属に対するものであってもさまざまなレパトアがピックアップされてきた。こうした背景には、金属アレルギーの動物モデルがこれまで存在しなかったことが挙げられる。金属特異的なアレルギー反応を動物に誘導することが可能となれば、金属ごとに反応する T 細胞レパトアを捉えることが可能となり、金属アレルギー診断のマーカーとして採用できる可能性が大きい。

現在のところ現行のパッチテストによる診断が最善ではあるが、将来的に金属非接触型の新規の診断法の開発が求められている。また、分子細胞生物学的な解析により金属アレルギーの発症機序を明らかにすることで、新規の根治療法の開発も望まれている。

## 2. 研究の目的

マウスに金属アレルギーを誘導することで、金属アレルギーの発症機序を分子細胞生物学的解析により経時的に明らかにすることを目的とした。具体的に

は、これまでに多くの報告がある低分子化合物による接触皮膚炎の誘導方法を改変し、金属特異的なアレルギー反応の誘導法を開発し、この反応に関わる細胞を特定すること、その細胞群を *in vivo* において濃縮することで、金属に特異的に反応する T 細胞レパトアを解析し T 細胞依存性の反応であることを証明すること、その際のエフェクター細胞を同定すること、金属アレルギーの誘導に伴い発現が調節される分子を同定することなどを目的とした。

以上により、金属特異的な T 細胞を同定 = 発症マーカーとして活用する可能性を模索すると同時に、発現変動する分子の同定 = 治療標的の探索までを視野に入れた研究の展開を目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 金属アレルギーの誘導

7-10 週齢の BALB/c マウス (雌) にパラジウム塩 (Pd) とリポ多糖 (LPS) の混合液 (Pd+LPS) を腹腔内注射により投与し感作を行った。10 日後、マウス耳介に Pd 溶液を皮内注射し、アレルギー反応を誘導した。コントロールとして PBS により感作を行い、同様の実験を行った。耳介への金属溶液投与後、24 時間ごとに耳介の腫脹を測定し、アレルギーの誘導を評価した。

### (2) 金属特異的反応性細胞の濃縮

上記で金属アレルギーの誘導が確認された BALB/c マウスから所属リンパ節である顎下リンパ節を採取し、細胞懸濁液を調整後 (Pd-LN)、ヌードマウス (BALB/cA nu-nu, 7-10 週齢、雌) に養子移入を行った。その後、マウス耳介に Pd 溶液を皮内注射し、アレルギー反応を誘導した。コントロールとして、naive な BALB/c マウスの所属リンパ節細胞 (naive-LN) を移入し、同様の実験を行った。耳介への金属溶液投与後、24 時間ごとに耳介の腫脹を測定し、アレルギーの誘導を評価した。

### (3) 所属リンパ節細胞の FACS 解析

Pd-LN 移入マウスおよび naive-LN 移入マウスから顎下リンパ節および耳介を採取し、コラゲナーゼ処理により細胞懸濁液を調整後、蛍光標識された各種モノクローナル抗体 (CD3、CD4、CD8、B220、DX5 など) で染色し、FACS により各種細胞存在比を解析した。

### (4) HE 染色および免疫組織化学染色

金属アレルギー誘導後、24 時間の耳介組織を採取後、すぐに OCT コンパウンドに包埋し、凍結ブロックを作成し

た。クライオスタットを用いて 10  $\mu\text{m}$  に薄切して凍結切片を作成し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  に保存した。切片を氷冷アセトンへ浸漬して固定後、各種染色を行った。

ヘマトキシリンによる核染色後、エオシンにより細胞質を染色を行い、脱水・キシレン透徹後、キシレン系封入剤により標本作製した。

蛍光標識されたモノクローナル抗体により免疫組織化学染色を行った。その後、DAPI により核染色を行い、水溶性封入剤により標本作製し、すぐに蛍光顕微鏡による観察・解析を行った。コントロール実験としては、抗体のアイソタイプコントロールにより染色を行い、以後同様の操作を行った。

#### (5) TCR レパトア解析

耳介への金属溶液投与前後の Pd-LN 移入マウスから脾臓・耳介組織・顎下リンパ節を採取、RNA を抽出後逆転写反応により cDNA を合成した。その後、ビオチン標識を付加しながら PCR により遺伝子を増幅し、改変した ELISA 法を用いて全 TCR レパトアを網羅的に解析・定量した。

#### (6) サイトカイン産生細胞の FACS 解析

Pd-LN 移入マウスの耳介に金属溶液を投与後 15 時間目に顎下リンパ節を採取し、細胞懸濁液を調整後、モノクローシンを投与して ER-Golgi 経路によるタンパク輸送を阻害した。その後、細胞表面マーカーを蛍光標識モノクローナル抗体で染色後、細胞内タンパク質を同様に染色し、FACS によりサイトカイン産生およびその産生細胞について解析した。コントロールとして、金属溶液の代わりに PBS を投与し、以後同様の操作を行った。

#### (7) T 細胞サブセット除去マウスへの金属アレルギー誘導

Pd-LN 移入マウスに金属アレルギーを誘導する際、CD4 または CD8 に対するモノクローナル抗体を投与し、各 T 細胞サブセットを除去した。抗体の投与は 48-72 時間おきに行った。金属溶液投与後、24 時間ごとに耳介の腫脹を測定し、アレルギーの誘導を評価した。コントロール実験として、rat IgG をモノクローナル抗体の代わりに投与し、以後同様の操作を行い、耳介の腫脹を測定した。

#### (8) KO マウスへの金属アレルギー誘導

各種 KO マウス（遺伝的背景は C57BL/6）に Pd+LPS を腹腔内注射して感作を行った。10 日後、耳介に Pd 溶液を皮内注射して Pd アレルギーを誘導し、24 時間ごとに耳介の腫脹を測

定して、アレルギーの誘導を評価した。コントロールとして、C57BL/6 マウスに Pd+LPS (ポジティブコントロール) または PBS (ネガティブコントロール) を用いて感作を行い、以後同様の操作によりアレルギー誘導を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 金属アレルギーの誘導

BALB/c マウスへの金属アレルギー誘導の結果、誘導後 24 時間で耳介の腫脹は最大となり、以後 96 時間目にかけて耳介の腫脹は軽減された。コントロールマウスでは、耳介の腫脹の程度は低く、その差は有意であった。この経時的变化は、遅延型過敏反応の典型的なものといえる。

### (2) Pd-LN 移入マウスへの金属アレルギーの誘導

金属アレルギーが誘導された BALB/c マウスから得た Pd-LN 細胞を移入したヌードマウスに、感作を行わずとも、耳介への金属溶液の投与のみにより耳介の腫脹が誘導された。これは金属に対してメモリー化した T 細胞が移入されたことを意味し、同時に他個体においてもエフェクター細胞として機能する可能性を示唆するものである。耳介の腫脹は 24 時間目にピークを示し、以後 96 時間目にかけて軽減された。コントロールマウスにおいては、耳介の腫脹の程度は低く、その差は有意であった。

### (3) 免疫組織化学染色による浸潤細胞の同定

HE 染色により金属アレルギー誘導後 24 時間目の耳介組織において、リンパ球の浸潤を認めた。免疫組織化学染色によりそのリンパ球が T 細胞であることが判明した。同時に顆粒球の浸潤も確認された。しかしながら、コントロールマウスにおいては、T 細胞の浸潤は見られなかった。以上より、Pd アレルギーの誘導による耳介の腫脹には、T 細胞が関与していることが示唆された。

### (4) 所属リンパ節における T 細胞サブセットの解析

Pd-LN を移入したマウスのリンパ節において、T 細胞サブセットの比率を解析した結果、移入の回数が増えるにしたがってその比率が変化し、特定の T 細胞サブセットが濃縮されていくことが示唆された。

### (5) TCR レパトア解析による T 細胞応答の評価

Pd-LN を移入したマウスにおいて、耳介への金属溶液投与の前後で、TCR レ

パトアに変化が見られた。投与前では、複数のレパトアが存在していたのに対し、投与後に存在するレパトアは数種類に絞られていた。また、投与後の顎下リンパ節と耳介組織において、同一のレパトアのスキューを確認した。これは、所属リンパ節に存在したメモリーT細胞が金属投与部位にエフェクターT細胞として浸潤していることを示し、金属アレルギーの反応において特異的なT細胞応答が関係していることが示唆された。

(6) T細胞サブセットの同定

各T細胞サブセットを除去したところ、明らかに耳介の腫脹が軽減されるサブセットの存在が示された。さらに、そのサブセットのKOマウスに金属アレルギーを誘導した結果、完全に耳介の腫脹がブロックされたことから、Pdアレルギーにおいて機能するT細胞サブセットに偏りがあることが示唆された。また、このサブセットは(4)で同定されたサブセットと同様であったことから、所属リンパ節に存在するメモリーT細胞がアレルギーの発症に関わることをサポートするデータとなった。

(7) サイトカイン産生評価および産生細胞の同定

金属アレルギー誘導後15時間目において、炎症性サイトカインの産生が明らかとなった。コントロールマウスにおいては、その産生は認められなかったことから、金属溶液の投与により産生されたと考えられる。また、サイトカイン産生細胞を解析したところ、これまでの実験で関与が示唆されたT細胞サブセットからの産生が主体であることが明らかとなった。

以上の結果から、金属アレルギーの発症には金属特異的に反応するT細胞が関与しており、その細胞が金属投与部位に浸潤し、炎症性サイトカインを産生することで炎症が誘導されることが示唆された。

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) Mitsuko Kawano. et al. (2009) Hair growth regulation by the extract of aromatic plant *Erica multiflora*. J. Nat. Med. 63: 335-339. 査読有

[学会発表] (計2件)

- (1) Mitsuko Kawano et al. Specific T cells increased by metal allergy. 第14回国際免疫学会議、平成22年8月26日、於神戸国際

会議場

- (2) Mitsuko Kawano et al. Increased specific T cells in the inflammation area of the metal allergy. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、平成21年12月3日、於大阪国際会議場

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/imbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川野 光子 (KAWANO MITSUKO)

東北大学・加齢医学研究所・教育研究支援者

研究者番号: 90422203

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: