

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10003

研究課題名（和文）セマフォリンを用いた歯科金属アレルギーの病態制御

研究課題名（英文）Regulation of dental metal allergy symptoms by semaphorins

研究代表者

渡邊 恵（WATANABE, Megumi）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：40380050

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ニッケル（Ni）アレルギー誘発マウス耳介皮膚組織およびNiCl₂刺激マウスケラチノサイトにおいて、Sema3Aの発現が上昇することを明らかにした。さらに、Sema3AはケラチノサイトにおけるTNF- α の産生とMAPキナーゼの活性化を制御していた。ケラチノサイトのSema3Aを特異的に欠失させると、樹状細胞やT細胞等の免疫細胞の浸潤には影響しなかったが、浮腫と耳介腫脹量が減弱した。この結果は、Sema3Aが金属アレルギーの症状を増強することを示しており、Sema3Aが金属アレルギーの予防と治療のための潜在的なターゲットとなる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属アレルギーは本質的な病態解明が進んでおらず、発症メカニズムには不明な点が多く残されている。本研究により、金属アレルギーの症状の発現にセマフォリン3Aが関与していることが明らかとなった。アトピー等のアレルギー皮膚炎では、セマフォリン3Aの発現増強が症状の減弱に関与していることが知られており、今回の実験結果と逆の様相を示している。これはセマフォリン3Aが金属アレルギー特有の動きをしており、それ故に金属アレルギー治療のターゲットになる可能性を示している。有効な治療方法を開発する上で、本研究の意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that Sema3A expression was upregulated in nickel (Ni)-allergy-induced mouse ear skin tissue and in NiCl₂-stimulated mouse keratinocytes. Furthermore, Sema3A regulated TNF- α production and MAP kinase activation in keratinocytes. Specific deletion of Sema3A in keratinocytes by conditional knock out in keratinocytes did not affect the infiltration of immune cells such as dendritic cells and T cells, however attenuated edema and ear swelling. These results indicate that Sema3A potentiates the symptoms of metal allergy and should be explored as a potential target for prevention and treatment of metal allergy.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：金属アレルギー ケラチノサイト セマフォリン

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脱金属が進む歯科においても、口腔内に残る金属修復物やセメントの成分などにより発症する歯科金属アレルギーは未だに治療を困難にする疾患である。歯科金属アレルギーの発症メカニズムには不明な点が多く、治療方法は金属修復物の除去から進歩していない。また、病態形成の最初の過程である金属抗原と皮膚・粘膜の免疫反応について詳細に検討した研究も非常に少ない。

研究代表者はニッケル (nickel; Ni) アレルギー発症マウスモデルを構築し、樹状細胞と T 細胞の相互作用が歯科金属アレルギーの発症の鍵であることを明らかにした。この免疫反応は、上皮下に浸潤した金属抗原を樹状細胞が認識することから始まるが、その起点となる上皮表層への金属の付着と、金属が上皮内を通過して上皮下へ浸潤していく過程には未だ不明な点が多く、その解明に取り組んだ研究はほとんどない。

セマフォリンは神経系の軸索誘導因子として 1990 年代に発見された膜関連、あるいは分泌型のタンパク質群で、近年、多発性硬化症や関節リウマチといった自己免疫疾患や、アトピー性皮膚炎や乾癬といった皮膚疾患にかかわることが明らかとなってきている。その中でセマフォリン 3A (Sema3A) によって樹状細胞のリンパ管内への移動を制御されることが知られており、アトピー性皮膚炎や自己免疫疾患の治療ターゲットとして注目されている。金属アレルギーも皮膚を病態の主座とする疾患であり、また、先述のように樹状細胞が重要な役割を果たしていることが明らかであることから、金属アレルギーの発症や病態形成にも Sema3A が関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

歯科金属アレルギー発症を誘導する細胞間ネットワークを、特に上皮に着目して詳細に解析することを目的とする。また、その分子機構を金属アレルギー治療に対して応用する可能性を探る。

上皮は免疫における最初のバリアであり、この物理的なバリアを突破した抗原に対して、より複雑な免疫機序で対応する。金属が付着した直後から免疫ネットワークが連綿と作動していくプロセスには明らかにされていない点が多い。

本研究では、金属アレルギー発症モデルマウスを作製できる研究室の利点を活かし、*in vivo*、*in vitro* 双方から金属アレルギー初期の病態形成への特に Sema3A の関与を明らかにする。その上で、Sema3A の発現を調節することで病態そのものを調節することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞に発現する Sema3A を解析する

マウスケラチノサイト細胞株 Pam2.12 を 250 μ M NiCl₂ で 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間刺激した。発現する Sema3A およびサイトカイン、ケモカインを定量的 PCR およびウエスタンブロットで解析した。続いて INTERFERin (Polyplus transfection, Illkirch, France) を用いて 50nM の Sema3A siRNA をトランスフェクトすることによって、Pam2.12 上の Sema3A の発現を阻害した。

(2) 金属アレルギー発症時の皮膚での Sema3A の動態を観察する

25 μ l の 1mM NiCl₂ と 25 μ l の IFA をマウスに腹腔内注射して感作した。2週間後、10 μ l の 0.2mM NiCl₂ と 10 μ l の CFA を耳介皮膚に皮内注射した。コントロールとして、CFA を含む PBS を投与した。48 時間後に DTH 反応を観察し、マウスの耳の厚さを測定してアレルギー反応を確認した。

チオシアン酸アンモニウムを使って耳介皮膚から上皮シートを作り、免疫蛍光染色で Sema3A の動態を観察した。また、フローサイトメトリーでアレルギー耳介皮膚組織に浸潤した細胞を解析した。

(3) コンディショナルノックアウトマウスを作製し、Sema3A を皮膚で特異的に欠失させたマウスでの金属アレルギーの病態を観察する

Cre/loxP システムでコンディショナルノックアウトマウスを作製した。C57BL/6J 雌マウスは株式会社チャールズリバー研究所から購入した。K5-cre52 マウス (STOCK-Tg (K5-Cre) Jt) は熊本大学 CARD R-BASE より入手した。Sema3A^{f1/f1} マウス (ICR. Cg-Sema3a^{<tm1.2Tyag>/TyagRbrc}, RBCO1106) は、理研 BRC から提供された。Sema3A^{f1/f1} コンディショナルマウスを K5-Cre マウスと交配し、Sema3A cKO マウスを作製した。対照動物として、同じ遺伝的背景系統の野生型マウスを用いた。使用したマウスはすべて 6~8 週齢であった。すべての実験は、徳島大学動物実験委員会 (No. T2019-51) および遺伝子組換え実験安全管理委員会 (No. 30-46) の承認を得て実施した。

Ni アレルギーは、(2)の方法に従い誘導し、耳介皮膚および全身の解析を行った。

4. 研究成果

(1) NiCl₂ 刺激によりケラチノサイトで Sema3A の発現が上昇した

NiCl₂ で刺激したケラチノサイトでは、コントロール (0 時間時点) の発現と比較すると有意差はなかったものの、経時的に Sema3A の mRNA 発現が上昇した。Sema3A タンパク質の発現も上昇し、刺激後 12 時間でピークに達した。NiCl₂ 刺激 72 時間後には、Pam2.12 の培養液中の Sema3A タンパク質レベルは有意に増加した。Sema3A 抗体によるケラチノサイトの染色では、細胞質全体を満たす明るい陽性の細胞質分泌顆粒が認められた。これらの陽性顆粒は、対照群と比較して刺激後 24 時間、48 時間、72 時間でより強く発現していることが観察された。BZ-X800 Analyzer ソフトウェアを用いた定量分析では、Sema3A 陽性面積は 24 時間および 48 時間群で対照群より有意に大きかった。さらに、Propidium Iodide を用いて NiCl₂ 刺激後の Pam2.12 細胞の生存率をフローサイトメトリーで観察したところ、細胞生存率はこの濃度の Ni では影響を受けなかったことから、Sema3A 産生の増加が細胞死によるものである可能性は排除された。

次に、Pam2.12 細胞に Sema3A siRNA をトランスフェクトした。NiCl₂ 刺激がない場合、ケラチノサイトが産生する TNF- α 量はグループ間で有意差を示さなかったが、NiCl₂ で刺激すると、非刺激群よりも高い TNF- α 発現を示した。Sema3A 発現阻害群では、NiCl₂ 刺激 24 時間後および 48 時間後に TNF- α の発現が有意に抑制された。なお、TNF- α の発現阻害効果は、SiRNA トランスフェクション後 48 時間で回復するようであった。また、Sema3A 発現阻害群では、刺激後 24 時間で p38 の活性化が対照群と比べて有意に抑制された。この効果に関しては、刺激後 48 時間で回復したようであった。これらの結果は、Sema3A がケラチノサイトにおける p38 キナーゼの活性化と TNF- α の発現を通じて、Ni アレルギーの引き金となったり、Ni アレルギーのプロセスを制御したりする役割を果たしている可能性を示唆している。

(2) Sema3A の発現は Ni アレルギーモデルマウス耳介皮膚で増強した

生体内での Sema3A の発現を調べるために、マウスに Ni アレルギーを誘導した。48 時間の Ni 再チャレンジ後、アレルギー誘発群では、耳介皮膚の激しい腫脹と発赤を特徴とする遅延型過敏症 (DTH) 反応が確認された。ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色では、アレルギー誘発耳組織の厚みの増加と浸潤細胞の増加が認められた。耳の厚さは、NiCl₂ 注射後 24、48、72 時間で、対照群と比較して有意に増加した。Sema3A の発現は主に表皮層に存在し、対照群よりも強く発現していた。BZ-X800 Analyzer ソフトウェアを用いた定量分析では、Ni 刺激群の Sema3A 陽性面積が対照群よりも有意に大きいことが示された。同様に、Ni アレルギー群では対照群よりも有意に強い Sema3A タンパク質の発現が認められた。皮膚の炎症に関連する炎症性サイトカインおよびケモカインについても調べたところ、Ni アレルギー誘発マウス耳介皮膚では、TNF- α 、IL-1 β 、L-23、CXCL1 および CCL20 mRNA の発現上昇が認められた。Sema3A の発現は Ni アレルギー誘発マウス耳介皮膚で対照群よりも強く亢進していたことから、Sema3A は Ni アレルギーの発症と正の相関があると推測される。

(3) ケラチノサイトにおける Sema3A 特異的欠失は Ni アレルギーの症状を減弱した

Sema3A cKO マウスでは対照群に比べて Ni アレルギーの発症が緩和されていた。Ni 惹起 24 時間後、対照マウスの耳の厚さは Ni アレルギー誘発後の耳の組織の厚さに比べて有意に増加したが、Sema3A cKO マウスの耳の厚さは Ni アレルギー誘発後にわずかに増加しただけで、対照群で観察された程度ではなかった。48 時間後、コントロールマウスの耳は赤く腫れたままであったが、Sema3A cKO マウスの耳では発赤が残っているものの、耳介の腫脹は治まっていた。

Sema3A cKO マウスの Ni アレルギー誘発耳介皮膚の H&E 染色では、炎症細胞の浸潤が観察されたが、浮腫はコントロールマウスよりも軽度であった。ケラチノサイトにおける Sema3A 欠失に関連する遺伝子、サイトカイン、およびケモカインを決定するために、TNF- α 、IL-1 β 、IL-23 および CXCL1 の発現レベルを調べたところ、これらの遺伝子の発現は、Ni アレルギーを発症した対照群の耳介皮膚では亢進していたが、Sema3A cKO 群では有意に抑制されていた。CCL20 の発現亢進は、Sema3A の欠失では影響を受けなかった。さらに、Ni アレルギー関連抗炎症性サイトカインの mRNA 発現を検証したところ、Ni アレルギー誘発 Sema3A cKO マウス耳組織では、IL-6、IL-10 および IL-13 の発現レベルが対照群よりも有意に高いことが示された。

(4) ケラチノサイトにおける Sema3A 特異的欠失はアレルギー部位への細胞浸潤を増加させた

フローサイトメトリーにより、Sema3A cKO マウスにおける Ni アレルギー発症中の免疫細胞プロファイルの変化を調べた。CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞の数は、Ni アレルギー誘発 Sema3A cKO マウスの耳では、Ni アレルギー誘発 Sema3A f1 マウスの耳と比較して増加していた。しかし、アレルギー群における CD4⁺ /CD8⁺ T 細胞比は、2 群間で差は認められなかった。浸潤するマクロファージ数は Ni アレルギー誘発 Sema3A cKO マウスおよび Sema3A f1 マウスで増加した。しかし、アレルギー群とコントロール群のマクロファージ数の比は、2 種類のマウス間で差がなかった。同様に、Ni アレルギー誘発 Sema3A cKO 群では、Ni アレルギー誘発 Sema3A f1 群に比べて DC 数が増加したが、コントロール群に対するアレルギー群の DC 数の比率は、2 種類のマウス間で差は認められなかった。ケラチノサイトにおける Sema3A 特異的欠失は免疫細胞浸潤の亢進を引き起こしたが、CD4⁺/CD8⁺ T 細胞数の比率およびマクロファージ数あるいは DC 数の比率がアレルギー群/対照群で変化しなかったことから、ケラチノサイトにおける Sema3A の欠失は

Ni アレルギーの発症に有意な影響を与えないことが示された。

以上の結果をまとめると、Sema3A は p38 MAP キナーゼの活性化と TNF- α の産生を介して Ni アレルギーの発症を促進することが明らかとなった。また、ケラチノサイトにおける Sema3A 発現を阻害すると、免疫細胞の浸潤には影響しないが、浮腫や耳介腫脹を軽減し、Th1 応答を阻害することで Ni アレルギーの症状が緩和された。この研究結果は、金属除去以外の治療法を構築する上で、Sema3A が有効なターゲットとなる可能性を示唆している。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lipei Liu, Megumi Watanabe, Norikazu Minami, Mohammad Fadyl Yunizar, Tetsuo Ichikawa	4. 巻 34
2. 論文標題 Dendritic Cells Directly Recognize Nickel Ions as an Antigen during the Development of Nickel Allergy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 40 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20738/johb.34.2_40	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 Lipei Liu, Megumi Watanabe, Norikazu Minami, Mohammad Fadyl Yunizar, Tetsuo Ichikawa	4. 巻 5
2. 論文標題 Semaphorin 3A: A potential target for prevention and treatment of nickel allergy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03641-0	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 Yunizar Mohammad Fadyl, Watanabe Megumi, Liu Lipei, Minami Norikazu, Ichikawa Tetsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Metal Allergy Mediates the Development of Oral Lichen Planus via TSLP-TSLPR Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 519 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11030519	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 Watanabe Megumi, Liu Lipei, Ichikawa Tetsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Are Allergy-Induced Implant Failures Actually Hypersensitivity Reactions to Titanium? A Literature Review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dentistry Journal	6. 最初と最後の頁 263 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dj11110263	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 劉 黎佩, 渡邊 恵, 南 憲一, Mohammad Fadyl Yunizar, 市川哲雄
2. 発表標題 金属アレルギー発症過程におけるセマフォリン3Aの役割
3. 学会等名 公社) 日本補綴歯科学会第131回学術大会 (Web開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lipei Liu, Megumi Watanabe, Mohammad Fadyl Yunizar, Tetsuo Ichikawa
2. 発表標題 Semaphorin3A Promotes the Development of Nickel Allergy
3. 学会等名 International College of Prosthodontics, 19th Biennial Meeting (virtual meeting) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lipei Liu, Megumi Watanabe, Mohammad Fadyl Yunizar, Tetsuo Ichikawa
2. 発表標題 Semaphorin3A: A novel potential target for prevention and treatment of nickel allergy
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会 (ハイブリッド開催)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mohammad Fadyl Yunizar, Megumi Watanabe, Lipei Liu, Tetsuo Ichikawa
2. 発表標題 The Pathogenesis of Oral Lichen Planus Related to Metal Allergy Reaction
3. 学会等名 International College of Prosthodontics, 19th Biennial Meeting (virtual meeting) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Megumi Watanabe
2. 発表標題 Biological reaction to magnetic fields
3. 学会等名 SYMPOSIUM OF DIGITAL & MAGNET DENTISTRY (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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

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