

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05028

研究課題名(和文) 金属アレルギーの感作機序の解明とそれに基づく戦略的治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms of sensitization phase to develop effective treatments against metal allergy

研究代表者

市川 哲雄 (ICHIKAWA, Tetsuo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授

研究者番号：90193432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：金属が細胞に及ぼす影響を解析することで、金属アレルギー発症の感作機序を解明することを目的とした。培養樹状細胞(DC)にNiを加えて顕微鏡下で観察すると、DCが直接Niを取り込んでいることが明らかとなった。同様の事象が、上皮シート上でも観察された。Niを取り込んだDCではCD100分子の発現増強を認め、その下流のRhoAの活性化がみられたことから、この経路が樹状細胞の遊走に関与している可能性が考えられた。また、Ni刺激で上皮角化細胞上のPlexinB群発現が増加した。以上より感作機序においてプレキシン-セマフォリンを介した上皮とDCの相互作用が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the mechanisms of sensitization phase of metal allergy development by analyzing the effect of dental metals upon immune cells. We showed dendritic cells (DC) can uptake nickel directly by using fluorescent particles that recognized nickel in vitro and same phenomenon was observed in skin. Expressions of CD100, MAPkinase, and RhoA in DC stimulated with nickel were increased subsequently. This suggested that these cascades might regulate DC's migration after the uptake of Ni. In addition, expression of plexin B1 and plexin B2 were increased in keratinocytes stimulated with nickel. Therefore, interactions between plexin Bs and CD100 may play an important role in development of sensitization and these interactions have a possibility of using for diagnosis or treatment for metal allergy.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯科用金属アレルギー 樹状細胞 上皮角化細胞

1. 研究開始当初の背景

歯科用金属に起因する金属アレルギー（以下、歯科用金属アレルギー）は増加の傾向にあり歯科的な対応が急がれているが、その発症機序は未だ解明されていない上に、アレルゲンとなっている金属が、パッチテストでは特定できないことも問題となっている。歯科用金属アレルギーの診断や歯科的対応を図る上では、本症に関するさらなる臨床知見の集積とともに発症の分子メカニズムを解明が絶対的に必要である。

我々はニッケル（以下 Ni）アレルギーモデルマウスを解析することで p38MAPK/MKK6 を介して樹状細胞（以下 DC）の活性化が Ni アレルギー誘発のために必要であることを示した。さらに、このケラチノサイトによって大量に生産される胸腺間質性リンポポエチン（以下 TSLP）に注目し、Ni アレルギーが上皮および免疫細胞間の TSLP/ TSLPR 媒介相互作用によって惹起され得ることを示した。

臨床疫学調査で常に陽性率の高い金属としてあげられるのは Ni や Pd, Co, Cr, Hg などである。これらの金属の抗原性の高さは、貴金属や歯科用金属として日常生活で接触する機会が高く感作されやすい状況にあることに加えて、イオン化傾向の高さや交差反応を起こしやすいという金属そのものの特性もあると言われているが、それを証明した研究はない。

2. 研究の目的

そこで本研究では Ni 等の金属が高い抗原性を示すメカニズムを免疫学および物理化学の両面から解明することを目的とする。いわゆるアレルギー体質と言われるような生体側の条件に対して個々の生体の特性を調べることは困難であるが、金属そのものの性質・特性に主眼を置き、免疫系を中心に細胞に及ぼす影響を解析することで、金属アレルギー発症の感作機序を進めることができると考える。最終的には、感作機序の基づく診断・治療法開発の可能性を模索し、補綴治療の戦略的治療法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 金属抗原に対する細胞の変化・変性を解析する：金属抗原が直接接触すると考えられる細胞は、主にケラチノサイトと DC（樹状細胞）である。金属で刺激した両細胞の形態変化を観察するために細胞骨格または細胞膜を染色し、金属が細胞の変性を誘導しているかどうかを形態的に観察する。形態に大きな変化が見られる場合は、金属によって変性したタンパクがアレルギーの抗原となる可能性がある。

(2) 樹状細胞の細胞内金属の確認：金属抗原を与えた DC 内での金属の挙動、あるいは細胞の挙動を観察するため、次の実験

を行う。カバースリップ上で培養した DC を金属で 48 時間刺激した後、培養液を良く洗い、固定、樹脂包埋、超薄切して試料を作製する。走査型電子顕微鏡で DC を観察し、細胞内を詳細に解析して、細胞内の金属の有無を確認する。また、同様に刺激して調整した DC をエネルギー分散型蛍光 X 線分析装置で解析し、金属の含有の有無を確認する。

(3) 金属アレルギー発症患者の組織を解析し、アレルギーに特異的な T 細胞を探索する：、徳島大学附属病院においてパッチテストで金属アレルギーと診断された患者の病理組織標本を用いて（徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会承認番号 1698）、アレルギー発症部位に浸潤する細胞をスクリーニング的に染色し、浸潤する T 細胞を順次解析して、アレルギー発症患者の共通点を探る。

4. 研究成果

ニッケル（nickel; Ni）で刺激すると樹状細胞（dendritic cell; DC）が活性化することが報告されているが、その最初の過程において、DC が食作用により直接 Ni を取り込んでいるのか、Ni によって変性した何らかのタンパクを取り込んでいるのかはこれまでに明らかにされていなかった。今年度、我々は Ni を特異的に染色する Newport green で DC を染色することによって、Ni 刺激後の DC を顕微鏡下で観察した。Ni で刺激した後、24 時間後までの DC 内の Ni の動態を経時的に観察したところ、刺激後約 3 時間で DC 内に取り込まれている Ni の量はピークを迎え、その後、徐々に減少し、12 時間後には消失した（図 1）。また、Newport green と DC のマーカーとして MHC Class II で二重染色した後、フローサイトメトリーで動態を解析したところ、同様の結果を得た。この際、Tunel/PI 染色で確認したところ、細胞死は観察されなかった。

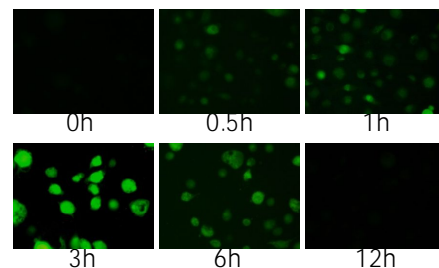


図 1. DC による Ni の取り込み

刺激後の DC の動態をさらに検討するために、Newport green と活性化に関すると考えられるいくつかの分子の二重染色によりフローサイトメーターで解析したところ、Newport green 陽性細胞群で CD100 の発現

が上昇する傾向がみられた(図2)。

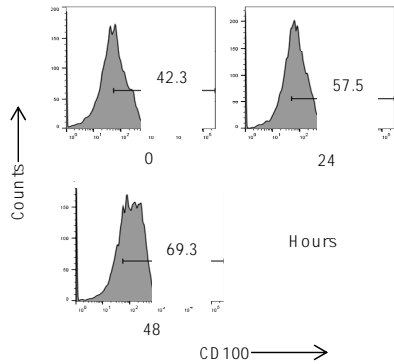


図2. DC上に発現するCD100

一方,上皮を構成する主要な細胞であるケラチノサイト(Keratinocyte; KC)のマウス細胞株 Pam2.12 を Ni で刺激してフローサイトメーターおよびウエスタンブロット法で解析したところ,CD100 と相互作用する PlexinB1 の発現上昇と PlexinB2 の軽度上昇を認めた(図3)。

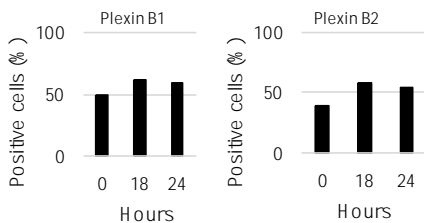


図3. KC上に発現する PlexinB1, PlexinB2

そこで,その下流をさらに検討していくと,DC上でMAPキナーゼ,特にp38の活性化とGタンパク RhoAの活性化を認めた(図4)。

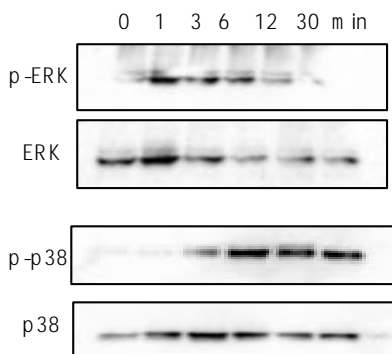


図4. KC上で活性化するMAPキナーゼ

次に Ni を投与したマウスの耳介皮膚から上皮シートを作製し,Newport green で上皮への Ni の取り込みを観察すると, Ni 投与後 6 時間まで上皮下の細胞に Newport

green 陽性細胞を多数認め(図5),その後,陽性細胞は経時的に減少していく様子が観察された.それらの陽性細胞は MHC classII 陽性細胞であり, DC と考えられる.

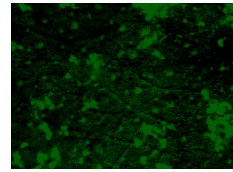


図5. 上皮シート上で確認される DC による Ni の取り込み

金属アレルギー患者の上皮組織を免疫組織化学でスクリーニング的に解析したところ,浸潤するリンパ球は主に T 細胞であり,さらにアレルギーに関係すると考えられる分子で染色すると,リン酸化した p38 陽性細胞の出現がみられ,上記結果と一致するものであった.そのほかにも共通して陽性を示したものは TSLP であった.これは,アトピー患者の上皮で発現が上昇していることが報告されているサイトカインで,金属アレルギー患者の上皮においても同様の結果が示された.すでに我々は in vitro 実験で, Ni で刺激した上皮ケラチノサイト上にこの TSLP の発現上昇を観察しており, in vivo でも同様の結果が得られることが確認された.

<引用文献>

Watanabe, M, Ichikawa T, et al. A Nobel DC Therapy with Manipulation of MKK6 Gene on Nickel Allergy in Mice. PLoS One 2011; e19017

Ashrin, NM, Watanabe, M, Ichikawa T, et al. A Critical Role for Thymic Stromal Lymphopoietin in Nickel-Induced Allergy in Mice. J Immunol. 2014;192, 4025-31

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 2 件)

歯科金属アレルギーの現状と展望
補綴主導の歯科金属アレルギー診療ガイドライン策定
秋葉陽介,渡邊 恵,峯 篤史,池戸泉美,二川浩樹
日補綴会誌 Ann Jpn Prosthodont Soc 8 : 00-00, 2016, 8 巻 (2016) 4 号 p. 327-339
査読有

歯科用金属による金属アレルギーの臨床病態と補綴学的対応に関する多施設調査
細木真紀,田上直美,渡邊恵,市川哲雄,ほか 査読有

日本歯科医学会誌第34巻，42-46, 2015

〔学会発表〕(計 7件)
義歯材料とアレルギー

渡邊 恵
日本義歯ケア学会 第 10 回学術大会
2018

ニッケルで刺激したケラチノサイトと
樹状細胞における Plexin-Semaphorin の動態
解析

南憲一，渡邊 恵，市川哲雄
(公社)日本補綴歯科学会 第 126 回学術
大会 2017

基礎研究から見た金属アレルギー

渡邊 恵
メタルフリー歯科学会 2016

基礎研究から見た金属アレルギーイン
プラント治療前に知っておくべきリスク

渡邊 恵
香川大学インプラント講習会 2016

金属アレルギーの病態

渡邊 恵
(公社)日本補綴歯科学会第 124 回学術大
会 2015

歯科用金属アレルギーと口腔扁平苔癬
組織浸潤細胞の関連

松島京，植村勇太，南憲一，渡邊恵，市川
哲雄

(公社)日本補綴歯科学会平成 27 年度中
国・四国支部学術大会 2015

金属アレルギーの発症と免疫

渡邊 恵
(公社)日本補綴歯科学会関西支部総会・
学術大会 2015

〔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〕
歯科治療における金属アレルギー
市川哲雄，細木真紀，田上直美，志賀博，
渡邊恵
歯界展望 Vol.126, No.5, 2015
891-917

6. 研究組織

(1)研究代表者
市川 哲雄(ICHIKAWA, Tetsuo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：90193432

(2)研究分担者
石丸 直澄(ISGIMARU, Naozumi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：60314879

渡邊 恵(WATANABE, Megumi)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：40380050

水頭 英樹(SUITO, Hideki)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：70732915

南 憲一(MINAMI, Norikazu)
徳島大学・病院・医員
研究者番号：60732914

浜田 賢一(HAMADA, Kenichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号：00301317

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()