

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11161

研究課題名(和文) 金属アレルギー発症過程における樹状細胞遊走因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of migration factor expressed in dendritic cells during metal allergy development

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：金属アレルギー発症過程において、樹状細胞と上皮角化細胞上に発現する細胞遊走関連因子を解析することで、金属アレルギー発症過程における細胞間の相互作用を明らかにすることを目的とした。樹状細胞、上皮角化細胞上ともにNiで刺激すると、上皮角化細胞上ではTSLP、樹状細胞上ではTSLPRの発現が上昇した。TSLPR siRNAをマウス耳介皮下に注入してNiアレルギーを惹起させると、アレルギー反応は減弱し、TSLP-TSLPRが金属アレルギー発症に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the interactions between dendritic cells and keratinocytes during the development of metal allergy. We focused on the interactions of TSLP in keratinocytes and TSLPR in dendritic cells. Expressions of both TSLP and TSLPR in cells stimulated with nickel were increased subsequently. Significant decrease of ear swellings was observed in mice which were injected with TSLPR siRNA in ear skin before the injection of nickel. Therefore, interactions between TSLP in keratinocytes and TSLPR in dendritic cells may play an important role in development of metal allergy 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 細胞遊走

## 1. 研究開始当初の背景

金属アレルギーは、その認知度の上昇とともに患者数が増加しており、特に日常的に金属を用いる補綴領域では避けることができない疾患である。研究代表者が参加した平成 24 年度日本歯科医学会プロジェクト研究「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」では補綴歯科関連 13 施設でアンケートとパッチテストを用いた実態調査が行われ、金属アレルギーにおける臨床の現状と問題点が示された。その中で、歯科用金属として用いられる頻度の高いパラジウムやニッケル(Ni)に対する陽性率が特に高く、早急な対応が必要であることが示唆されたものの、本質的な病態解明に至る研究はきわめて少ない。

これまでに我々は Ni アレルギーモデルマウスを用いて、アレルギー発症時の KC の動態を解析した結果、Ni の刺激により KC が胸腺間質性リンポポイエチン

(TSLP)を大量に産生し、DC 上の MKK6 を活性化することで Ni アレルギー発症に関与していることを明らかにした。

金属アレルギーを発症する過程で、DC は金属抗原の刺激情報を得た後、所属リンパ節に遊走し、T 細胞に抗原提示する。DC の所属リンパ節への遊走は、外来抗原に対する免疫獲得の最も重要な初期プロセスの 1 つであり、所属リンパ節において T 細胞に抗原提示することで T 細胞による細胞性免疫が誘導される。近年、ヒトの細胞を用いた実験で、DC の遊走に関わる細胞骨格の再構築に TSLP が直接関与しているという非常に興味深い結果が示された。これはあくまでも *in vitro* に限局された実験結果であるが、この結果と我々の研究結果を併せると、金属アレルギー発症過程において、KC で大量に産生される TSLP が DC の局所リンパ節への遊走を直接誘導している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、金属アレルギー発症過程において、KC が産生する TSLP と DC 上の TSLP 受容体 (TSLPR) の細胞間相互作用を詳細に解析することで DC の遊走への TSLP の影響を検討し、この経路を調節することで金属アレルギーの発症そのものを制御することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) TSLP による DC 遊走能の変化を検討  
細胞遊走能の変化は、トランスウェルを用いたケモタキシスアッセイにより検討する。

TSLP を与えて DC を 24 時間培養した後、PBS で洗浄して DC を回収する。トランスウェルの上段に DC を播種し、TSLP の残っていない状態での DC の遊走を観察する。6

時間後に下段のチャンバーに移動した DC の数を測定し、DC の遊走能への影響を検討する。

次に、(1)で作製した TSLPR ベクターを jet PEI mannose 試薬を用いて DC に導入し、上記同様の実験を行い、遊走能が増強するかどうかを観察する。

DC の遊走が TSLP/TSLPR によって増強すれば、TSLP の影響をさらに強く裏付けるために 1)で構築した siRNA を DC に導入して上記実験を行い、TSLP/TSLPR を阻害した細胞で DC の遊走が減弱することを証明する。

(2) TSLP による DC の細胞骨格の変化を観察する

細胞運動には細胞骨格のダイナミックな変化が必ず伴う。

細胞骨格制御の中心的な役割を担うのは低分子量 G タンパク質であるが、その中でも RhoA, Rac1, Cdc42 が時間的、三次元的に協調して働くことにより細胞が移動(遊走)することが知られている。

そこで、TSLP を加えた培養 DC 上でのこれらの分子の細胞内局在の状態を顕微鏡下で観察する。また、ウエスタンブロット法で RhoA, Rac1, Cdc42 の活性化状態を解析する。さらに(2)の実験同様、TSLP/TSLPR 発現を増強、あるいは減弱した状態で、これらの G タンパク質の活性化状態を時間的側面から解析し、TSLP/TSLPR シグナルが細胞骨格の変化と細胞移動の速度に与える影響を検討する。

(3) アレルギー発症マウスでの DC の動態を観察する

以下の実験は、すべてあらかじめ Ni で感作しておいた正常 C57BL/6J マウスを用いて行う。

蛍光色素 (FITC) で標識し、TSLPR を正負それぞれに遺伝子改変した DC をマウス耳介皮下に投与する。その後、耳介に Ni を塗布してアレルギーを惹起させ、所属リンパ節へ移動した DC の割合をフローサイトメーターで解析する。TSLPR の増減に伴い遊走する DC の割合も増減すると予想される。

さらに TSLP siRNA を局所投与して KC 上の TSLP 発現を阻害した後、DC の所属リンパ節への移動を同様に観察する。

## 4. 研究成果

マウスケラチノサイト株 Pam2.12 およびヒトケラチノサイト株 HaCaT をニッケル (Nickel; Ni) で刺激して 24 時間後の TSLP 発現を観察すると、どちらの細胞株も TSLP の発現増強を認めた。そこで Pam2.12 に TSLP siRNA を導入して TSLP の発現を減弱した後、Ni で刺激すると、MAP キナーゼの中でも特に p38 の発現の減弱を認めた。

樹状細胞 (dendritic cells; DC) を Ni で刺激すると TSLPR の発現が増強し、p38 およ

び G プロテイン RhoA の発現増強を認めた (図 1)。

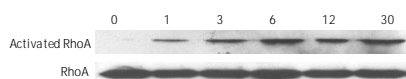


図 1. 樹状細胞上に発現する RhoA

そこでケモタキシスアッセイにより, TSLP を加えて培養した DC の Ni 刺激に対する遊走能の変化を観察したところ, アッセイ開始から 6 時間から 12 時間の間に, Ni 刺激群において遊走した DC 数の増加を認めた (図 2)。

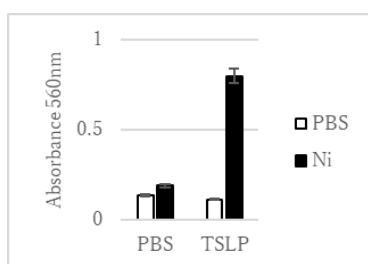


図 2. 遊走した樹状細胞

いくつかの金属を染色する蛍光色素 Newportgreen は Ni も染色することで知られているが, TSLP を加えてから Ni で刺激した DC を Newportgreen で染色した後, マウス皮下に投与して, 24 時間後の頸部リンパ節に含まれる細胞を観察したところ, FITC (Newportgreen) ポジティブの細胞を認めた (図 3)。

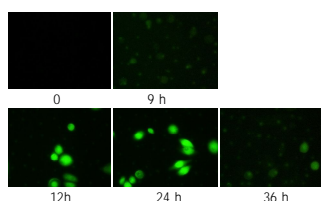


図 3. 遊走した Newportgreen 陽性細胞

次に DC に TSLPR siRNA の導入を試みたが, 導入効率が悪かったため, TSLPR siRNA をマウス皮下に注入する in vivo 実験で検討することにした。

TSLP siRNA をすでに Ni で感作しているマウス耳介皮下に投与し, 3 日後, アジュバントと共に Ni を耳介皮下に投与してアレルギーを誘導したところ, 耳介皮膚の腫脹は有意に減弱した (図 4)。同様に, TSLPR siRNA を耳介皮下に投与した後にアレルギーを誘導したところ, 皮膚の腫脹はわずかに減弱する傾向がみられた。

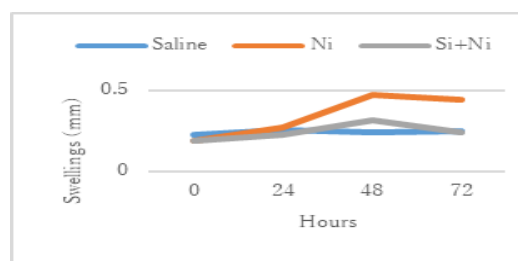


図 4. 耳介腫脹反応

in vitro, in vivo の結果を合わせると, ケラチノサイト上の TSLP と DC 上の TSLPR の相互作用が Ni アレルギーの惹起において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

#### < 引用文献 >

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

The human cytokine TSLP triggers a cell-autonomous dendritic cell migration in confined environments. Fernandez MI, et.al. Blood. 2011

#### 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 9 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

The effect of ELF pulsed magnetic fields on osteoblast differentiation via MAP kinase pathways

Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa,

International College of Prosthodontist 2017

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

Magnetic Fields Enhanced Osteoblast Differentiation via ERK Pathways  
Megumi Watanabe, Tetsuo Ichikawa,  
International College of Prosthodontist 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

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

〔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

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

### (2)研究分担者

後藤 崇晴 (GOTO, Takaharu)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号: 00581381

### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

### (4)研究協力者

石丸 直澄 (ISHIMARU, Naozumi)  
HAVRAN, WL  
KNAUS, UG