

## 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：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791901

研究課題名（和文） 金属アレルギー発症機構における樹状細胞の動態解析

研究課題名（英文） The role of DCs in Ni allergy development in the mouse model

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：これまで我々は Ni アレルギーモデルマウスを作製して樹状細胞を中心に解析してきた。本研究では、MKK6 遺伝子を調節することでアレルギー症状の重篤さをコントロールすることができ、RhoA や Rac1 のような低分子量 G プロテイン発現を調節することで、アレルギー発症部位への細胞の遊走、あるいは炎症箇所から所属リンパ節への細胞遊走をコントロールできる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed Ni allergy symptoms in focus on dendritic cells in the mouse model we produced. In this study, we regulated MKK6 expression and activation to regulate Ni allergy symptoms in our mouse model. In addition, we found activation of RhoA after the stimulation with Ni. From these data, it may be possible to control Ni allergy by regulation of small G-protein in dendritic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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

歯科材料開発の進展と共に生体親和性の高い歯科材料が普及してきたが、健康保険上の兼ね合いにより全ての患者に対しそのような低アレルギー性材料を用いることができないのが現実である。そこで未だ多く用いられているのが金属であるが、歯科治療と金属アレルギー発症の強い因果関係は広く知られるものである。

金属アレルギーについては、補綴領域を中心として平成3年度科学研究費補助金（総合

研究 A)「金属アレルギーの疫学的調査ならびにその口腔内使用金属との関連性について」の調査が行われた。これはパッチテストを用いた実態調査を主としたものであり、また、その後の研究も、口腔内使用金属の採取、分析方法の検討に関するものがほとんどである。今後重要なのは、その発症機構を明らかにし、正確な診断及び治療方法を確立していくことであるが、それに関する実験医学的な研究は国内外共において極めて少ない。

申請者は平成12年より金属アレルギーにお

ける樹状細胞の役割に関する研究を進めており、抗原提示細胞として生体内で強力な活性を持つ樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) が Ni アレルギー発症過程において MAP キナーゼカスケードを介してアレルギー反応を制御していることを明らかにした。(渡邊, 四国歯誌, 第 17 巻, 第 1 号, 2004, 渡邊ら, アレルギー科, 第 15 巻, 第 6 号, 2003, 臨床免疫・アレルギー科, 第 46 巻, 第 3 号, 2006)

イオン化した金属は DC あるいは皮膚および粘膜固有層に局在する DC であるランゲルハンス細胞 (Langerhans Cell: LC) の蛋白に結合し, その結合によって活性化した DC・LC が所属リンパ節へ遊走した後 T 細胞に抗原提示すると考えられている。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。

この遊走過程にはケモカイン・ケモカインレセプターおよびインテグリン等の接着分子が関与していることがこれまでの研究で明らかになっている。例えば抗原刺激により DC が活性化されると DC 上にはケモカインレセプター CCR7 が発現し, 所属リンパ節に発現している CCR7 のリガンド CCL19 および CCL21 に引き寄せられて遊走する。

また G プロテイン RhoA および Rac1 は細胞の遊走や骨格調整に関わる因子として知られており, DC では MAP キナーゼと RhoA がその遊走スピードを調節していることが明らかとなっている。(Riol-Blanco et al, J. Immunology, 2005)

## 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, 特に Ni アレルギー発症過程における DC の活性を p38 MAP キナーゼカスケードおよび RhoA の調節により制御し, DC の遊走を調節することで金属アレルギー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) RhoA, Rac1 発現ベクターの構築

マウス細胞上で発現する RhoA および Rac1 アデノウイルスベクターを作製する。

### (2) 樹状細胞株への遺伝子導入

・over expression 系: アデノウイルスベクターを用いて DC に MKK6 (構築済み), RhoA あるいは Rac1 遺伝子を導入する。

・knock out 系: jet PEI mannose 試薬を用いて DC に MKK6 siRNA (構築済み), pRK5-RhoA-myc, pRK5-Rac1-myc (供与) を導入する。DC への pRK5-RhoA-myc,

pRK5-Rac1-myc 導入が困難である場合, RhoA, Rac1 の binding domain である GFP-RBD, GFP-PBD (供与) を導入する。もしくは RhoA, B, C のインヒビターである C3-Toxin-permeable を用いることも可能である。

上記 2 系にて得られた DC を Ni で刺激し, ケモカイン (CCR7) 発現, サイトカイン産生能 (IL-12, IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) を ELISA 法, RT-PCR 法, フローサイトメトリー, ウェスタンブロット法にて解析する。

さらに RhoA, Rac1 遺伝子改変後の DC における MKK6 の発現状況, また MKK6 遺伝子改変後の DC における RhoA, Rac1 の発現状況を併せて解析し, シグナル間相互作用を検討する。

### (3) DC 遊走能の検討

(2) で得られた DC を用いてトランスウェル上で Ni 刺激に対する migration assay を行う。解析は移動時間および移動細胞個数両面から行う。

### (4) T 細胞の増殖能解析

2) で得られた DC を正常 C57BL/6J 雌マウスより抽出した T 細胞と共培養する。48 時間後, 培養上清に Ni を加え T 細胞を刺激する。72 時間後, T 細胞の増殖反応を  $^3\text{H}$ -thymidine の取り込みにより測定する。また培養上清中の IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  量を ELISA 法にて測定する。

### (5) アレルギー発症マウス全身検索

MKK6, RhoA, Rac1 遺伝子改変 DC をそれぞれ 48 時間 Ni で刺激した後, 正常 C57BL/6J 雌マウス腹腔に投与して感作する。2 週間後, Ni を耳介皮下に投与し, 48 時間後に耳介腫脹反応を測定してアレルギー発症の有無, 増悪あるいは軽減の有無を検討する。MKK6 強発現 DC 投与群ではアレルギー反応の増悪, MKK6 発現抑制 DC 投与群ではアレルギー反応の軽減がみられるはずであるが, RhoA および Rac1 強発現群でもアレルギー反応が増強することが予想される。また, MKK6・RhoA, MKK6・Rac1 の co-transfection 群では症状のさらなる増悪, あるいは短時間でのアレルギー発症が期待される。実験に用いられた全てのマウスは免疫組織学あるいは蛍光抗体法等を用いて光学顕微鏡下で病理組織学的に観察する。(設備現有) また所属リンパ節(頸部)細胞および脾細胞におけるケモカイン発現, 炎症性サイトカイン発現パターンを ELISA 法, RT-PCR 法, フローサイトメトリー, 免疫組織学, あるはウェスタンブロット法にて検索し, MKK6, RhoA, Rac1 遺伝子改変の影響を検討する。(設備現有)

#### 4. 研究成果

(1) *In vitro* で Ni を添加した DC 上に発現する RhoA の活性化をウェスタンブロット法と ELISA 法で検討した。

その結果、DC 上では Ni 添加後 3~6 分で RhoA の活性化が最大値を示した。

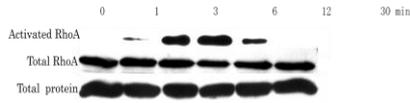


図 1. RhoA の活性化

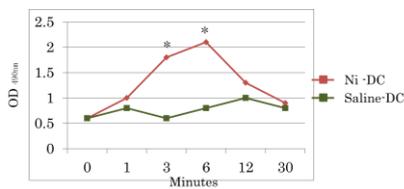


図 2. RhoA の活性化

(2) MKK6 遺伝子導入した DC を Ni で刺激した後、C57Bl6 雌マウス腹腔に移入してアレルギーを発症させた。

耳介腫脹量を測定したところ、MKK6 今日発現群で有意な耳介腫脹量を認めた (図 3)。

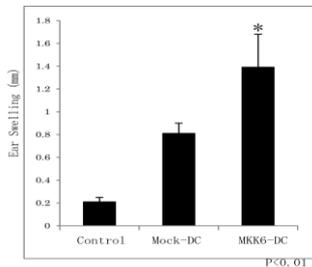


図 3. 耳介腫脹量

同マウスの耳介組織標本を作製し、病理組織学的に検討したところ、MKK6 遺伝子導入群では上皮下の炎症反応が強く、コントロール群と比較して浮腫、リンパ球浸潤、毛細血管の増生を認めた (図 4)

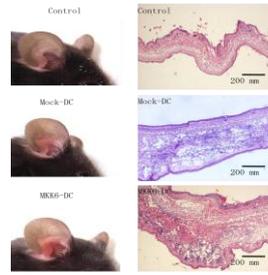


図 4. 耳介マクロ写真と組織標本写真

(3) 次に MKK6 遺伝子発現を抑制する条件下で同様の実験を行った。その結果、MKK6 遺伝子ノックアウト群では耳介腫脹量が有意に減少した (図 5)。

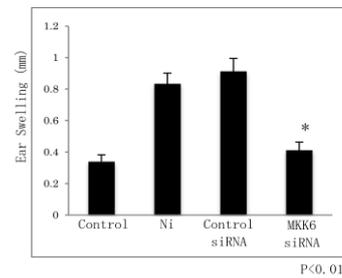


図 5. 耳介腫脹量

また、同マウスの耳介組織標本を観察したところ、コントロール群と比較して上皮下の炎症反応が著しく改善されていた (図 6)。

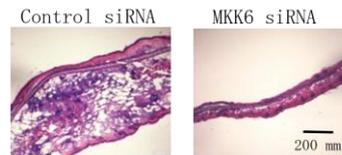


図 6. 耳介組織標本写真

(3) Ni 刺激後の細胞遊走に関わると考えられる因子を検討したところ、Ni で刺激した DC 上では Integrin の発現が増強していることが明らかとなった (図 7)。

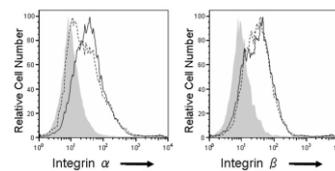


図 7. 耳介組織標本写真

## 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 8 件)

- ① Megumi Watanabe, The Role of MKK6/p38 Signal Cascade in Dendritic Cells in Mice Allergy Mouse Model, Kalimantan Symposia, 平成23年12月11日, バリクバパン (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, Extremely Low Frequency Pulsed Magnetic Fields Accelerate Osteoblast Differentiation, ICP 14th Biennial Meeting, 平成23年9月10日, ハワイ (米国)
- ④ Megumi Watanabe, 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)
- ⑤ 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」カテゴリー集会, 平成22年2月10日, 長崎大学 (長崎市)
- ⑥ 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)
- ⑦ Watanabe, M., 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)

- 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, (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 (京都府)

[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

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