

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390407

研究課題名(和文) ニッケル(Ni)アレルギー発症に關与するNi結合キャリア分子の同定とその機能

研究課題名(英文) Identification and function of Ni-binding carrier protein that induce Ni allergy

研究代表者

菅原 俊二(Sugawara, Shunji)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10241639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)： 金属イオンはアレルギー性皮膚炎のアレルゲンであり、中でもNiは最も頻度の高いアレルゲンである。金属イオンは、自己のキャリア分子と結合することで抗原化しアレルギーが成立するが、その実体は不明である。

本研究により、LPSを投与したマウス血清(LPS-血清)中から、Niアレルギー誘導する活性分子(Ni結合キャリア分子)を同定した。この分子は、Niイオンと直接結合する特性があり、アレルギー反応誘導に必要な抗原(Ni)量の閾値を低下させた。一方、アレルギー反応の質的变化を誘導しないことが示唆された。この新規分子によるNiアレルギー増強機構についてさらに研究を進めている。

研究成果の概要(英文)： Metal ions are allergens that cause allergic contact dermatitis, and nickel (Ni) has been shown to be the most frequent metal allergens. Metal ions become antigens by binding with self-carrier proteins, but their identity is still unclear.

In this study, we identified an Ni-binding carrier protein that cause Ni allergy form LPS-sensitized murine serum. This protein directly bound to Ni ion and reduced the threshold of Ni concentration that require to induce Ni allergy, whereas it did not alter the quality of allergic reaction. Investigations are still under way to elucidate the mechanism by which this novel protein amplify Ni allergy.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：金属アレルギー ニッケル キャリア分子

1. 研究開始当初の背景

金属イオンはアレルギー性皮膚炎のアレルゲンであり、中でも Ni は最も頻度の高いアレルゲンである。金属アレルギーは、ピアスなどの装飾品をつける人口の増加や、歯科治療における補綴治療やインプラント治療など医療技術の発展による金属暴露の機会の増大に伴って増加しており、その克服は現代社会が直面する課題の一つである。

金属アレルギーは、ヒト末梢血から分離した単核細胞（リンパ球と単球/マクロファージ）を用いた *in vitro* での研究から、T細胞依存性の型過敏症として位置づけられているが、いまだに発症機序は明確ではなく、原因金属の除去しか解決策がないのが現状である。この理由としては、実験動物に金属アレルギーを起こすことは難しく、適切な動物モデルがなく、*in vivo* での研究ができなかったことが大きな一因として考えられる。

金属イオンはアレルゲン（抗原）となりうるが、それ自体は免疫応答を誘導することができない（抗原性+、免疫原性-）。金属イオンは自己のキャリア分子と可逆的配位結合することにより完全抗原となり、金属アレルギーが成立するが、上記の理由から、このキャリア分子の実体は分かってはいなかった。

研究代表者らは、Ni イオンと LPS で感作が成立する背景には、LPS 応答性の宿主細胞が Ni イオンと結合するキャリア分子を産生し、抗原化することによるものではないかとの着想に至り、LPS を投与したマウス血清（LPS-血清）を調整して予備実験を開始した。

その結果、Ni + LPS で感作したマウスに、単体では耳介の腫脹を誘導しない低濃度の Ni (1 nM) を LPS-血清と共にチャレンジすると、アレルギー反応が誘導できた。一方、生理食塩水（生食）投与したマウス血清ではアレルギー反応は誘導できなかった。さらに、LPS-血清中の活性分子が Ni 結合キャリア分子であるという着想から、その精製に Ni アフィニティークロマトグラフィー担体を用いたところ、担体に結合し溶出された画分に活性があることを突き止めた。この結果から、LPS-血清中には Ni 結合キャリア分子が誘導されていることを想定した。

2. 研究の目的

本研究は、この Ni 結合キャリア分子を同定し、その機能を解析する。さらに、この分子をコントロールすることにより新規で効果的な金属アレルギーの予防・治療法を考案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス Ni アレルギーの誘導

感作相：LPS の代わりに組換えキャリア分子と Ni イオンでマウスを感作し、Ni アレルギーが誘導できるかを調べた。

惹起（チャレンジ）相：LPS と Ni イオンで

感作したマウスに組換え Ni 結合キャリア分子と低濃度の Ni イオンと共にチャレンジし、Ni アレルギーが誘導できるかどうかを調べた。

Ni アレルギーはチャレンジ後、継時的にマウス耳介の腫脹をマイクロゲージにて測定し、評価した。

(2) LPS 血清の調整

マウスに LPS (1 µg/ml, 250 µl) を腹腔内投与し、3 時間後に血清を採取し、プールした。コントロールとして、生食を腹腔内投与した血清を用いた。LPS-血清中の Ni アレルギー誘導活性は、血清中への LPS の混入によるものではないこと、血清中の炎症性サイトカイン (IL-1 と TNF-) によるものではないことを確認している。マウスは 6 ~ 8 週令の BALB/c マウス を使用した。

(3) LPS-血清の精製方法

Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製した後、ゲルろ過、質量分析装置などにより精製を進めた。

(4) 親和性の解析

Biacore X100 (ピアコア、GE Healthcare) を用いて、Ni イオンとの Kinetics (結合/解離の速度)、結合量、他の金属イオンとの相互作用について解析した。Ni 結合セファロースを用いたバッチ法も実施した。

(5) フローサイトメトリー

細胞表面抗原や Ni 特異的蛍光色素 (Newport Green) は SLRFortessa セルアナライザーで解析した。

(6) 産生サイトカインの測定

通法に従い、ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) Ni 結合キャリア分子の同定

以下の手順で Ni 結合キャリア分子の同定を行った。

LPS-血清を Ni アフィニティークロマトグラフィーで精製したところ予想通り Ni 結合画分に Ni アレルギー反応の増強作用が認められた。

同画分をゲルろ過でさらに精製し、最終精製（ゲルろ過）画分をタンパク分解酵素によるゲル内消化と質量分析法によりタンパク質を同定した。

同定したタンパク質の遺伝子組換え体による Ni アレルギー反応の増強を検討した。その結果、LPS-血清同様、遺伝子組換えタンパク質は、単独ではアレルギー反応を誘導しない低濃度の Ni チャレンジを増強し、有意な耳介の腫脹を誘導した。

以上の結果は、我々が同定したタンパク質は Ni アレルギー発症に関与する Ni キャリア分子である可能性を強く示唆するものであ

り、その機能について詳細に検討した。

(2) Ni 結合キャリア分子の性状

同定した Ni キャリア分子に Ni を含む金属イオン結合能は報告されておらず、既知の金属イオン結合配列も存在しなかった。そこで、遺伝子組換えタンパク質をサンプルとして、Ni 結合セファロースを用いたパッチ法およびピアコア (SPR 法) を用いた相互作用解析により、Ni イオンとの結合能を解析した。その結果、いずれの方法においても Ni キャリア分子と Ni イオンの直接結合が検出された。これらの結果は、アミノ酸配列および立体構造を含めて既知である Ni キャリア分子の新たな生理活性を示すものであり、タンパク質と Ni (金属) イオンの新たな相互作用様式が示唆された。

Ni 結合キャリア分子は、単独ではアレルギー反応を誘導しない低濃度 Ni によるチャレンジを増強し、有意な耳介の腫脹を誘導することを明らかにした。そこで、低濃度 Ni + Ni キャリア分子によって誘導されたアレルギー反応と、高濃度 Ni 単独により誘導されたアレルギー反応について、病理組織学的手法およびフローサイトメトリー法により比較検討した。その結果、2 群間に有意な差は認められなかった。このことから、Ni キャリア分子はアレルギー反応誘導に必要な抗原 (Ni) 量の閾値を低下させるが、アレルギー反応の質的变化を誘導しないことが示唆された。

金属アレルギー発症には局所 (皮膚など) の非免疫系細胞 (線維芽細胞など) も重要な役割を果たしていることが考えられるため、金属イオンの皮膚線維芽細胞に与える影響についても調べた。その結果、Ni は低酸素誘導因子 (HIF-2) 依存性に一酸化窒素 (NO) を誘導し、IL-1 の共存は NO 誘導をさらに亢進させること、HIF-2 インヒビターはマウス Ni アレルギー (耳介の腫脹) を抑制することを明らかにした。この結果は、局所で Ni により誘導される NO がアレルギー発症に関与していることを示唆している。

(3) Ni 結合キャリア分子による Ni アレルギー増強機構

主要な炎症性サイトカインである IL-1 が Ni アレルギーの発症に重要であることが報告されている。そこで、IL-1 産生に対する Ni キャリア分子の影響を *in vivo* および *in vitro* の両方で解析した。しかしながら、Ni キャリア分子による IL-1 産生の誘導は認められなかった。また、Ni 刺激による樹状細胞の活性化が報告されていることから、骨髄細胞由来樹状細胞の成熟化に対する Ni キャリア分子の影響を検討した。その結果、Ni キャリア分子は樹状細胞の成熟に影響を及ぼさなかった。

Ni キャリア分子が存在することにより Ni 特異的免疫応答が誘導され易くなるのでは

ないかとの仮説の下、Ni 感作マウス由来耳介リンパ節より調整した細胞を Ni 単独もしくは Ni + Ni キャリア分子で刺激培養し、サイトカイン (IFN- および IL-4) 産生能を解析した。しかしながら、いずれの刺激においてもこれらのサイトカイン産生は認められなかった。

Ni キャリア分子により免疫細胞と Ni の結合が促進されるのではないかとの仮説の下、Ni 特異的蛍光色素である Newport Green を用いて、リンパ節細胞と Ni の結合に対する Ni キャリア分子の影響を検討した。まず、Ni 結合性を示すリンパ節細胞について解析した結果、T 細胞では CD44+ CD62L- のエフェクター/メモリー T 細胞が選択的に Ni 結合性を示した。また、抗原提示細胞 (樹状細胞) では B220+ PDCA1+ の plasmacytoid DC が Ni との結合性を示した。

Ni アレルギー病因論におけるこれら Ni 結合性細胞の役割については継続して解析を行っている。

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)

Nagai Y, Shiraishi D, Tanaka Y, Nagasawa Y, Ohwada S, Shimauchi H, Aso H, Endo Y, Sugawara S. Transportation of sublingual antigens across sublingual ductal epithelial cells to the ductal antigen-presenting cells in mice. *Clin. Exp. Allergy* 45: 677-686, 2015. doi: 10.1111/cea.12329. (査読有)

Kuroishi T, Bando K, Endo Y, Sugawara S. Metal allergens induce nitric oxide production by mouse dermal fibroblasts via the hypoxia inducible factor-2 dependent pathway. *Toxicol. Sci.* 135: 119-128, 2013. doi: 10.1093/toxsci/kft142. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.oral-immunology.dent.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅原 俊二 (SUGAWARA, Shunji)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：10241639

(2)研究分担者

黒石 智誠 (KUROISHI, Toshinobu)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：30400261

遠藤 康男 (ENDO, Yasuo)
東北大学・大学院歯学研究科・教育研究支援者
研究者番号：50005039

(3)連携研究者

村本 光二 (MURAMOTO, Koji)
東北大学・大学院生命科学研究科・教授
研究者番号：90157800

(4)研究協力者

金原 正敬 (KINBARA, Masayuki)

坂東 加南 (BANDO, Kanan)