

令和 元年 12 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11192

研究課題名(和文) 金属アレルギー動物モデルを用いた予防・診断法の開発研究

研究課題名(英文) Studies on prevention and diagnosis using the animal model of metal allergy

研究代表者

佐藤 直毅 (SATO, NAOKI)

東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師

研究者番号：50625043

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)：金属アレルギーはT細胞が主体のアレルギーと考えられているが、その病態については不明な点が多い。これまで、我々は、金属アレルギー動物モデルを開発し研究を進めてきた。本研究では、この金属アレルギー動物モデルを用いて、金属アレルギーの新たな診断・予防法の開発基盤の確立を目的としている。

パラジウムアレルギーにおいて、ヒスタミンの関与が明らかになり、抗ヒスタミン薬が効果があることが判明した。この成果は、ヒスタミンが診断・治療法を開発するうえでの標的分子の候補の一つとなり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属アレルギーは、その病態がよくわかっておらず、また、パッチテストなど診断法が限られていること、また治療法もステロイドなどの対照療法であることから、新たな診断・予防・治療法の開発が求められてきた。本研究により、パラジウムアレルギーにおいて、ヒスタミンの関与が明らかになり、抗ヒスタミン薬が効果があることが判明した。本研究の学術的意義は、金属アレルギーには抗ヒスタミン薬が治療薬として使える可能性を示したこと、ヒスタミンが診断・治療法を開発するうえでの標的分子の候補の一つとなり得ることを示した点である。

研究成果の概要(英文)：Metal allergy is considered to be mainly T cell dependent diseases, but the pathological condition is unclear. So far, we have developed the animal model of metal allergy. In this study, we would like to establish the development of new diagnostic / preventive methods for metal allergy using the animal model.

We found that histamine was involved in palladium allergy, and the medicine of antihistamine was effective in palladium allergy. These results indicate that histamine is one of the candidate target molecules for developing diagnostics and therapeutics.

研究分野：アレルギー

キーワード：アレルギー ヒスタミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金属アレルギー研究はこれまで患者サンプルを用いて、細胞培養による研究が主流であった。そのため介入研究が行われず、金属アレルギーの発症機序の詳細については未だ不明のままである。金属は、人工生体材料として用いられており、これら金属生体材料は患者の Quality Of Life を満してきた。しかし、ごく一部の患者においては金属アレルギーが発症するなど問題を抱えている。

金属アレルギーは、金属から溶け出した金属イオンが生体内タンパクと結合することにより抗原となっておこる疾患と考えられている。アレルギーの分類においては、IV型アレルギーに分類されており、T細胞が主体の疾患とされている。

しかしながら、前述のように、介入実験が進んでいなかったため金属アレルギーの病態や発症機序はよくわかっていない。

2. 研究の目的

生体金属材料による金属炎症やアレルギーの発症機序はよくわかっていない。そのためには、実験動物を用いた介入実験が必要であり、その結果に基づいた、予防・治療法を開発する必要がある。

したがって本研究では、実験動物を用いた金属アレルギー研究を行い、金属アレルギーの新たな診断・予防・治療法の開発基盤の確立を目的とした。

3. 研究の方法

1) 金属アレルギーの誘導

塩化パラジウム溶液 (10 mM) とアジュバントである LPS (lipopolysaccharide) (10 µg/ml) の混合溶液を野生型マウスの腹腔内に投与して感作を行った。感作は7日空けて2回行った。感作後7日目にマウスの足蹠に塩化パラジウム溶液のみを皮内投与して金属アレルギーを足蹠に惹起した。対照として、足蹠に塩化パラジウム溶液のみを皮内投与したマウス (惹起のみ) を置いた。惹起後、経時的にピーコックダイヤルチェックネスゲージにて足蹠の腫脹を測定した。

さらに、腫脹した足蹠を採取、凍結標本とした後、通法により、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って病理標本とした。

2) ヒスタミン受容体の検出

パラジウムアレルギーを誘導したマウスから、所属リンパ節を採取し、リンパ球を分離した。対照群として、足蹠に塩化パラジウム溶液のみを皮内投与したマウスを置いた。対照群のマウスも同様にリンパ節を採取し、リンパ球を分離した。

それぞれの群のリンパ球から、RNA抽出キット、RNeasy Lipid tissue kit (QIAGEN) を用い total RNA を抽出した。これら、total RNA を基に、定量的 RT-PCR 法にて、ヒスタミン受容体 (H1R) を検出した。

定量的 PCR 法については、サイバーグリーンを用いる方法を用い、通法通り、実験を実施した。また、ハウスキーピング遺伝子として GAPDH も測定し、GAPDH の値で H1R の発現量を補正した。

3) パラジウムアレルギーにおける抗ヒスタミン薬の効果

前述のように、パラジウムアレルギーを誘導した。感作日を0日目とすると2回目の感作日は7日目となり、惹起日は14日目となる。

抗ヒスタミン薬は、オロパタジン塩酸塩を用い、投与濃度は、マウス体重当たり 1 mg/kg とし、腹腔内投与を行った。投与日程は、0日目、7日目、13、14、15、16日目に行った。

足蹠の腫脹の測定は、14日目から始め、経時的に72時間 (16日目) まで行った。

4) T細胞に対するヒスタミンの効果

T細胞に対し、ヒスタミンがどのような効果を持つのか、否かを検討するため、まずT細胞を濃縮した。脾臓からリンパ球を採取し、B細胞を BigMag Goat anti-mouse IgG (QIAGEN) を用いて除去した。

これをサンプルとして、anti-CD3 antibody と anti-CD28 antibody が結合したビーズを IL-2 (30 U/ml) とともに3日間培養した。ヒスタミン刺激群には、ヒスタミン (30 µmol/L) を加えて、24時間培養した (培養2日目に添加、培養3日目に測定)。オロパタジン添加群では、培養2日目にヒスタミンを加え、培養3日目にオロパタジン塩酸塩溶液を (300 nmol/L) の濃度で加えて、4時間後に測定した。

T細胞に対するヒスタミンの効果を調べるため、T細胞から産生される IFN- γ を測定した。

上記の培養細胞を回収し、GolgiStop (BD Biosciences) の存在中で PMA と Ionomycin で再刺激を行い、5時間後、再度細胞を回収した。この細胞を蛍光標識した抗 CD8 抗体、抗 CD4 抗体で

表面抗原を染色し、次いで、細胞を固定、および透過処理した。続いて、経口標識した抗 IFN- γ 抗体を用いて染色した。これら細胞を洗浄して、FACS Canto II (BD Biosciences) にて解析を行った。

5) TCR 解析

パラジウムアレルギー誘導群、パラジウムアレルギーを抗ヒスタミン薬で治療した治療群、塩化パラジウム溶液のみを接種した対照群の3群をそれぞれ準備した。

各群の惹起後24時間、72時間の時点で、所属リンパ節、脾臓を回収し、サンプルとした。これらサンプルから、通常通り、total RNAを抽出し、cDNA合成を行った。非バイアス遺伝子増幅法を用いて、バイアスがかけられないようにT細胞受容体のみを増幅し、ライブラリー調整を行った。続いて、次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行った。

これらシーケンスデータについて、TCR解析を行った。

6) パラジウム刺激によるT細胞の活性化

脾臓からリンパ球を採取し、B細胞をBigMag Goat anti-mouse IgG (QIAGEN)を用いて除去してT細胞を濃縮した。これをサンプルとして、IL-2 (30 U/ml) とともに3日間培養した。パラジウム刺激群には、塩化パラジウム溶液を各濃度 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M、添加して、培養した。培養後、細胞を回収し、前述のようにT細胞から産生される IFN- γ をフローサイトメトリ法により検出した。

4. 研究成果

1) 金属アレルギーの誘導

金属として歯科で広く用いられているパラジウムに着目し、パラジウムに対するアレルギーについて解析した。マウスにLPSと塩化パラジウム溶液を接種して2回感作したのち、足蹠にパラジウム溶液を接種してアレルギーを誘導した。24時間後に足蹠の腫脹が最大となり、72時間後も腫脹が認められた。さらに、ヘマトキシリン・エオジン染色による病理標本の解析では、リンパ球の浸潤がみとめられ、ヒト金属アレルギーに極めて類似した像が得られた。これらの結果から、本実験によるマウスの足蹠の腫脹は金属アレルギーであると判断できた。

2) ヒスタミン受容体の検出

パラジウムアレルギーを誘導したマウスから所属リンパ節を回収、リンパ球を分離後、total RNAを抽出し、RT-PCR法によって、ヒスタミン受容体の検出を試みた。

その結果、驚くべきことに、パラジウムアレルギー誘導群では、ヒスタミン受容体であるH1Rが発現誘導されていることが明らかとなった。

金属アレルギーは、T細胞主体のI型アレルギーに分類され、遅延型アレルギーと考えられている。ヒスタミンは、I型アレルギーにおいて、エフェクター分子として作用することが知られている。その機序は、抗原と結合したIgE抗体がマスト細胞に結合することにより、マスト細胞からヒスタミンが産生され、そのヒスタミンが、炎症やアレルギー症状を引き起こすと考えられている。このことから、T細胞にヒスタミン受容体が発現することはあまり想定していなかった。しかし、この結果は、ヒスタミンが、最終のエフェクター分子としてではなく、その上流でリンパ球に作用している可能性を示唆している。

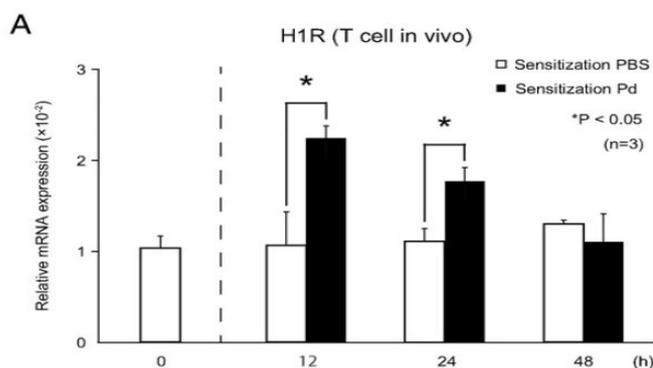


図1 ヒスタミン受容体の検出

3) パラジウムアレルギーにおける抗ヒスタミン薬の効果

パラジウムアレルギー動物モデルを用いて、抗ヒスタミン薬であるオロパタジン塩酸塩を投与

したところ、パラジウムアレルギーの症状である、発赤、腫脹が抑制できることが判明した。ヒスタミンはI型アレルギーに関与することが知られ、これまでIV型アレルギーである金属アレルギーにおいてはヒスタミンの関与は懐疑的であった。しかし本研究により、IV型アレルギーにおいてもヒスタミンが関与していると考えられた。

4) T細胞に対するヒスタミンの効果

ヒスタミンによる炎症性反応の誘導機序など分子生物学的な関与を明らかにしていくため、*in vitro* 培養実験系を用いて、ヒスタミンとT細胞の相互作用を検討した。

in vitro 培養実験系で、T細胞の培養中にヒスタミンを加え24時間培養し、これをヒスタミン刺激群とした。オロパタジン添加群では、培養2日目にヒスタミンを加え、培養3日目にオロパタジン塩酸塩溶液を加えてその効果を測定した。

ヒスタミン刺激群では、T細胞からのIFN- γ 産生が認められた。それに対し、オロパタジン添加群では、T細胞からのIFN- γ 産生が抑えられていることが判明した。この結果は、ヒスタミンがT細胞上のH1Rに作用し、T細胞を活性化していることを意味している。また、オロパタジン塩酸塩は、H1Rを阻害することで、T細胞の活性化を抑制していると考えられた。

このことは、パラジウムアレルギーにおいて、ヒスタミンはT細胞に作用することが明らかとなった。

5) TCR解析

パラジウムアレルギー誘導群、パラジウムアレルギーを抗ヒスタミン薬で治療した治療群、塩化パラジウム溶液のみを接種した対照群の3群を準備して、TCR解析を行った。

パラジウムアレルギー誘導群では、ある特定のTCRの頻度が上昇していることが確認された。さらに、抗ヒスタミン薬であるオロパタジン塩酸塩により治療した群では、アレルギーで上昇したTCRの頻度が、減少していることが判明した。

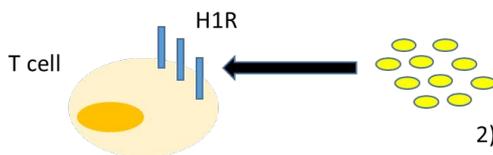
この結果は、パラジウムアレルギー特異的なTCRが存在すること、そして、そのTCRは、抗ヒスタミン薬で減少することから、アレルギーを引き起こす病原性T細胞がもつTCRである可能性を示唆していると考えられた。

6) パラジウム刺激によるT細胞の活性化

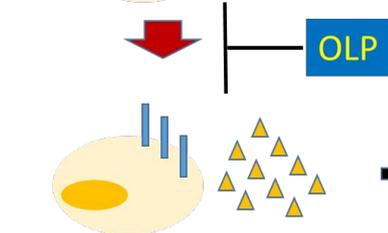
パラジウムを用いた金属アレルギーにおいて、ヒスタミンはT細胞に作用する可能性が判明した。このことを詳細に検討するためには、*in vitro* 細胞培養実験系の確立が必須である。そこで、*in vitro* 細胞培養系に塩化パラジウム溶液を加え、直接的にT細胞の活性化を観察しようと試みた。しかし、塩化パラジウム溶液など金属溶液は、細胞培養系に加えると毒性を示すことが新たにわかり、金属溶液の濃度決定が難しいこと、培養細胞の培養条件が難しいことから、実験期間中には結果を示すことができなかった。

<金属アレルギーの惹起>

1) T細胞上のヒスタミン受容体(H1R)の発現上昇



2) ヒスタミン(主にマスト細胞、好塩基球由来)の結合



3) CD8 T細胞の活性化

4) 炎症増悪化
・炎症性細胞の動員
・抗原提示能の増強



図2 金属アレルギーとヒスタミンの関係

本研究では、パラジウムアレルギーにおいて、ヒスタミンの関与が明らかになり、抗ヒスタミン薬が効果があることが判明した。本研究目的である、金属アレルギーの診断・予防法を開発す

るという点を踏まえると、この成果は、ヒスタミンが診断・予防法を開発するうえでの標的分子の候補の一つとなり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

(英語論文)

1. Takeda Y, Suto Y, Ito K, Hashimoto W, Nishiya T, Ueda K, Narushima T, Takahashi T, Ogasawara K. TRAV7-2*02 expressing CD8⁺ T cells are responsible for Palladium allergy *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1162; doi:10.3390/ijms18061162
2. Kawakami T, Ito K, Matsuda Y, Noda M, Sakurada A, Hoshikawa Y, Okada Y, Ogasawara K. Cytotoxicity of natural killer cells activated through NKG2D contributes to the development of bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic tracheal transplant model. *Am J Transplant.* 2017 Mar 1. doi: 10.1111/ajt.14257.
3. Sonofuchi K, Hagiwara Y, Koizumi Y, Chiba A, Kawano M, Nakayama M, Ogasawara K, Yabe Y, Itoi E. Quantitative in vivo biocompatibility of new ultralow-nickel cobalt-chromium-molybdenum alloys. *J Orthop Res.* 2016 Sep;34(9):1505-13. doi: 10.1002/jor.23150.
4. Iguchi N, Takeda Y, Sato N, Ukichi K, Katakura A, Ueda K, Narushima T, Higuchi S, Ogasawara K. The antihistamine olopatadine regulates T cell activation in palladium allergy *International Immunopharmacology* 2016, 35, 70–76 doi: 10.1016/j.intimp.2016.03.021

(日本語論文)

5. 小笠原康悦 「マウスモデルを用いた歯科金属アレルギーの分子機構」
炎症と免疫 先端医学社 20 - 25 Vol.25-2, 2017年3月
6. 小笠原康悦 「金属と炎症」
炎症と免疫 先端医学社 1 - 3 Vol.25-2, 2017年3月

〔学会発表〕(計 2件)

1. (口頭発表) 武田裕利、須藤佳子、佐藤直毅、樋口繁仁、高橋哲、伊藤甲雄、小笠原康悦
「金属アレルギーを引き起こすT細胞の特定」
第71回 日本細菌学会東北支部総会 仙台、8月3 - 4日、2017年
2. (口頭発表) 伊藤甲雄、秋山なつみ、樋口繁仁、佐藤直毅、小笠原康悦
「パラジウムによる金属アレルギー発症におけるヒスタミンの役割」
第70回 日本細菌学会東北支部会、十和田、8月18日、2016年

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：小笠原 康悦

ローマ字氏名：OGASAWARA, KOUETSU

所属研究機関名：東北大学

部局名：加齢医学研究所

職名：教授

研究者番号(8桁): 30323603

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 伊藤 甲雄

ローマ字氏名: ITO, KOYU