

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11599

研究課題名(和文) 金属アレルギー；感作と発症間に何があるのか？ 特異的遺伝子の同定

研究課題名(英文) Metal allergy; What is the difference between sensitization and onset?
-Identification of specific genes-

研究代表者

細木 真紀 (HOSOKI, Maki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・講師

研究者番号：10228421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：20歳代の金属アレルギー症状のあるボランティア女性2名(以下患者群)と健常者2名(以下健常者群)を対象に、鳥居薬品社製パッチテスト試薬金属とパッチテストトリイを用い、パッチテストを実施した。International contact dermatitis research group基準でパッチテストの判定を行うとともに、パッチテスト前後で末梢血のmicroRNA(以下miRNA)を測定したところ、患者群においていくつかのmiRNAの発現レベルが有意に抑制された。発現抑制されているmiRNAは、INGENUITYによる解析で、炎症性疾患と炎症反応に関連していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属アレルギーは遅延型アレルギーであり、Tリンパ球が関与して発症することが報告されている。診断方法はパッチテストが第一選択であるが、試薬貼付による感作のリスクや複数回受診の必要性等の問題点がある。新しい診断方法として利用を考えているmiRNAは生体内に存在する小さなRNAであり、癌研究においてはmiRNAを利用することによって、1滴の血液で何種類かの癌の診断が可能になり、次世代バイオマーカーとして注目されている。金属アレルギーについても特異的miRNAを同定することによって、新しいバイオマーカーを探索することが可能となり、非侵襲的かつ簡便な診断方法が確立できる。

研究成果の概要(英文)：A patch test was performed on 2 volunteers with metal allergy symptoms (patient group, women aged around 20s) and 2 healthy volunteers (healthy group, women aged around 20s) using a patch test reagent corresponding to the metal in a special plaster was made by Torii Pharmaceutical Co., Ltd. We judged the patch test based on the International Contact Dermatitis research group criteria. Following which, we measured the micro RNA (miRNA) in the peripheral blood before and after the patch test, the expression levels of some miRNAs were significantly suppressed in the patient group. Downregulated miRNAs were revealed to be associated with inflammatory diseases and responses (Analyzed by INGENUITY).

研究分野：歯科補綴学

キーワード：金属アレルギー マイクロRNA パッチテスト

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患の患者数は著しく増加しており、2006年の全国一般住民調査では日本人一般成人の約50%の者にアレルギー性鼻炎やアトピー性皮膚炎など何らかのアレルギー様症状があったと報告されている(厚生労働省 2006)。金属アレルギーは遅延型アレルギーであり、Tリンパ球が関与して発症すると言われているが、随伴する扁平苔癬や掌蹠膿疱症や全身性接触皮膚炎症候群等の重篤な症状の発症メカニズムは未解明である。我々は徳島大学病院歯科用金属アレルギー外来で金属アレルギー患者の検査、診断と治療にあたり、パッチテスト結果や金属アレルギー症状、治療成績等の実態調査を継続して行って来た、アレルギー疾患の増加に伴い、受診患者数も、専門外来開設当初(1987~1990年)と比較して、10倍以上に増加している。

金属アレルギーの診断方法はパッチテストが第一選択であるが、試薬貼付による感作のリスクや複数回受診の必要性等の問題点がある。また、その手技は煩雑で、診断は主観的であるため、新たな診断ツールの確立が望まれている。

一方、本研究者の今までの検討より、感作原因の一つとしてピアスによる皮膚障害があり、皮膚障害(=感作)を起こしたピアスの含有金属元素とパッチテストで陽性を示す金属元素の関係が明らかになっている。感作から掌蹠膿疱症や扁平苔癬や全身接触性皮膚炎症候群などの難治性の症状発症に到る機序は、金属アレルギーに特異的であると考えられるが、いまだ不明である。我々の臨床研究では、金属によるかぶれ等の皮膚障害を起こしてから数年から20年程度の年月を経て扁平苔癬や掌蹠膿疱症や全身性接触皮膚炎等を発症すると考えられることから、発症メカニズムを解明することによって、重篤な症状が出る前の段階で食い止めることが出来れば、非常に有用であると考えられる。近年のピアスの流行を受け、早急に発症メカニズムを解明し、発症を未然に防ぐことが急務であると考えられる。

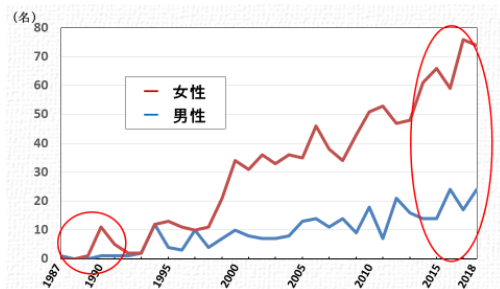


図1. 金属アレルギーの疑いで徳島大学病院歯科用金属アレルギー外来を受診した新患者数の推移

2. 研究の目的

1993年に存在が明らかにされた microRNA (miRNA) は、生体内に存在する17~25塩基長程度の小さなRNAで、遺伝子からタンパク質への翻訳過程を制御することが知られている。近年の研究で、がん等の疾患にもなって患者の血液中で種類や量が変動することが明らかになり、次世代バイオマーカーとして注目されている。

そこで本研究は、末梢血のmiRNA解析を行い、金属アレルギーに関わる特異的遺伝子を同定し、さらに、患者群と健常者群において、パッチテスト前後における末梢血miRNAの動的变化を分析することにより、診断における新たなバイオマーカーを提唱することを目的とした。

3. 研究の方法

健常者群は、アレルギー疾患の既往の無い20代のボランティア女性2名、一方患者群は特定の金属に触れるとアレルギー性皮膚炎を必ず発症する20代のボランティア女性2名である。徳島大学歯科用金属アレルギー外来で行われているパッチテストと同様の術式で28種類の金属元素についてパッチテストを行い、アレルギー症状をおこすアクセサリーを蛍光X線分析装置で元素分析し、陽性金属の確認を行った。

また、パッチテスト前、72時間後、1週間後に末梢血を採取してRNAを抽出し、東レ社製高感度DNAチップ3D-Gene®でmiRNAの分析を行った。

4. 研究成果

(1) パッチテストの結果

パッチテストの結果、健常者群は全ての試薬に陰性であった。一方患者群は複数の金属元素に陽性反応を示した。

蛍光X線分析装置による金属分析の結果、患者群がアレルギー症状を惹起するアクセサリーには、それぞれの患者がパッチテストで陽性を示した金属元素が含有されていた。



図2. パッチテストの結果

(2) 末梢血の miRNA 解析

パッチテスト前、パッチテスト 72 時間後、1 週間後に末梢血を採血し、東レ社製 DNA チップ 3D-Gene® で miRNA を解析した。

検出された miRNA を検証するために、健常者間、患者間で検出された miRNA を比較すると、両群において被験者同士で相関性を示しており、健常者群においては 742 種の miRNA を、患者群においては 591 種の miRNA を再現性良く検出した。

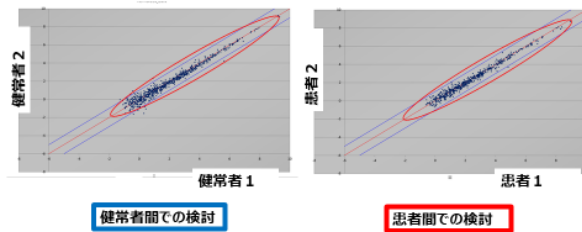


図 3. 検出された miRNA の検討
両群において、被験者間で相関を認めた

miRNA のクラスター解析の結果をヒートマップとして示す。

図 4 は健常者群と患者群の違いである。図の行は各サンプルを、列は各遺伝子を表しており、さらに青色の領域は、その遺伝子が各サンプルにおいて発現量が低いことを、赤色の領域は発現量が高いことを示している。患者群と健常者群間で発現量に有意に差がある遺伝子があり、患者群においてダウンレギュレートされた遺伝子が多く認められた。

図 5 は、パッチテスト前、72 時間後、1 週間後の 3 つのグループ間で遺伝子データを個別に比較した結果である。患者群は健常者群と比較して、パッチテストの 72 時間後、1 週間後に、ダウンレギュレートされた遺伝子が多く認められた。

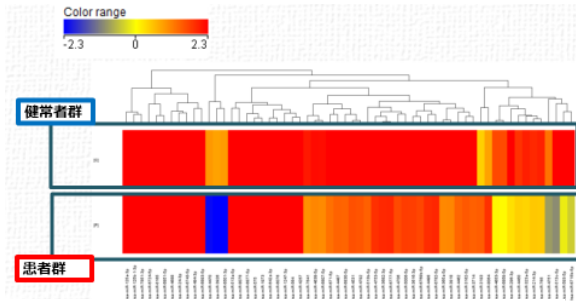


図 4. 健常者群と患者群の比較

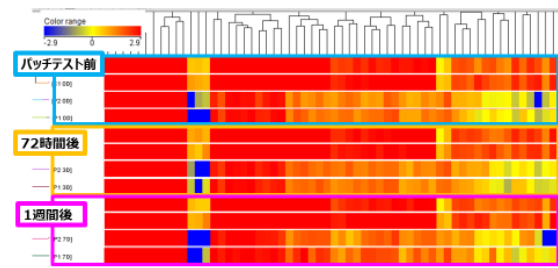


図 5. 時間ごとの健常者群と患者群の比較

(3) ターゲット候補について

これらの比較検討結果より、統計解析 2 倍以上で、有意に変動した遺伝子は、アップレギュレートされた遺伝子が 7 個、ダウンレギュレートされた遺伝子が 25 個認められた。INGENUITY によるパスウェイ解析を行うと、ダウンレギュレートされた遺伝子は、主に炎症性疾患と炎症反応に関連しており、これらの遺伝子はアレルギー性接触皮膚炎のバイオマーカーになる可能性が高いことが示された。一方、アップレギュレートされた遺伝子は、主にガン疾患に関連しており、ダウンレギュレートされた遺伝子がより重要であることが示唆された (図 6)。

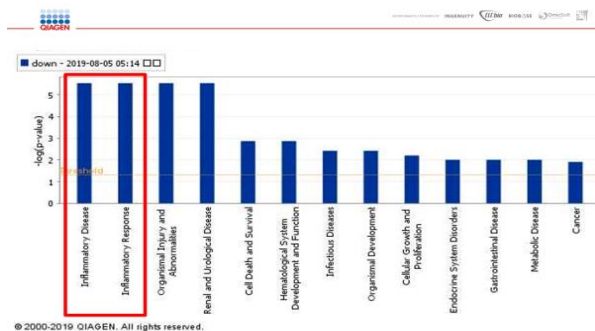
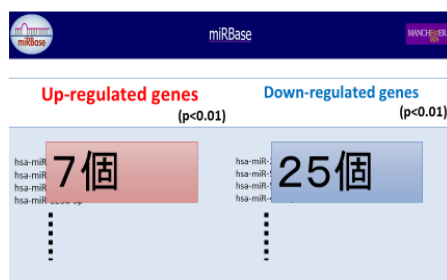


図 6. ターゲット候補について

現在、癌については、NEDO や AMED の支援による大規模な血中 miRNA マーカーの探索が実施されており、大腸癌やリンパ性白血病においては診断に有用な miRNA がバイオマーカーとして利用されるようになってきている。しかしながら、アレルギーに関する血中 miRNA に関する研究はそれほど多くは認められない。

予算的な問題から、大規模探索は難しいが、今後も被験者を厳選し、金属アレルギー患者における検討を行い、診断のためのバイオマーカーを確立したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hosoki Maki, Nishigawa Keisuke, Tajima Toyoko, Ueda Mayu, Matsuka Yoshizo	4. 巻 62
2. 論文標題 Cross-sectional observational study exploring clinical risk of titanium allergy caused by dental implants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 426 ~ 431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yan Huijiao, Afroz Shaista, Dalanon Junhel, Goto Nami, Hosoki Maki, Matsuka Yoshizo	4. 巻 6
2. 論文標題 Metal allergy patient treated by titanium implant denture: A case report with at least 4-year follow-up	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 1972 ~ 1977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/ccr3.1753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 細木真紀	4. 巻 128
2. 論文標題 金属アレルギー：歯科の立場から (歯科金属の関与を中心に)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 399-405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hosoki M, Nishigawa K, Miyamoto Y, Ohe G, Matsuka Y	4. 巻 3
2. 論文標題 Allergic contact dermatitis caused by titanium screws and dental implants	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 213-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpor.2015.12.004,	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 細木真紀	4. 巻 126
2. 論文標題 金属アレルギー：歯科の立場から(歯科金属の関与を中心に)	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 日本皮膚科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 781
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Y. Zhang, 細木真紀, 大島正充, 宮城麻友, 成谷美緒, 松香芳三
2. 発表標題 金属アレルギーに関する特異的遺伝子の検討
3. 学会等名 日本補綴歯科学会関西支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細木真紀, 久保宜明, 松香芳三
2. 発表標題 チタンアレルギーに関する実態調査
3. 学会等名 日本皮膚免疫アレルギー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細木真紀
2. 発表標題 チタンアレルギーの実際と金属アレルギーのリスク評価
3. 学会等名 第9回化粧品開発アカデミックフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細木真紀, 松香芳三
2. 発表標題 大学生における金属アレルギーの実態調査
3. 学会等名 第47回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 倉沢幸平, 細木真紀, 宮城麻友, 成谷美緒, 松香芳三
2. 発表標題 金属アレルギーに関するアンケート調査
3. 学会等名 第51回四国歯学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 細木真紀
2. 発表標題 金属アレルギーUp to date
3. 学会等名 第115回日本皮膚科学会(招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 細木真紀, 松香芳三
2. 発表標題 歯科用インプラントによって引き起こされる金属アレルギーとチタンアレルギーのリスクについて
3. 学会等名 第8回日本メタルフリー歯科学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 細木真紀, 田島登誉子, 久保宣明, 松香芳三
2. 発表標題 歯科用金属アレルギー患者の動向
3. 学会等名 第46回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 細木真紀, 田島登誉子, 上枝麻友, 西川啓介, 成谷美緒, 松香芳三
2. 発表標題 歯科用金属アレルギー患者の動向
3. 学会等名 第23回日本歯科医学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 細木真紀
2. 発表標題 チタンアレルギー-その実態と対処法について-
3. 学会等名 四国歯学会第49回例会(招待講演)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山口泰彦, 関根秀志, 島田 淳, 坪田有史, 吉岡 文, 市川哲雄, 大川周治, 大久保力廣, 小野高裕, 窪木拓男, 越野 寿, 櫻井敏継, 志賀 博, 白井麻衣, 田中昌博, 津賀一弘, 馬場一美, 細木真紀, 水口俊介, 山本真由	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 52
3. 書名 お口のトラブル解決します! 補綴歯科へようこそ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西川 啓介 (NISHIGAWA Keisuke) (10202235)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	井上 美穂 (INOUE Miho) (20271059)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・助教 (16101)	
研究分担者	三好 圭子 (MIYOSHI Keiko) (20304537)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・准教授 (16101)	
研究分担者	宮城 麻友 (MIYAGI Mayu) (20625719)	徳島大学・病院・助教 (16101)	
研究分担者	松香 芳三 (MATSUKA Yoshizo) (90243477)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授 (16101)	
研究分担者	田島 登誉子 (TAJIMA Toyoko) (80335801)	徳島大学・病院・助教 (16101)	