

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09661

研究課題名(和文) 金属アレルギーにみられる皮膚・粘膜疾患形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) The pathogenesis of metal allergy development in skin and mucous membrane

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：金属抗原で刺激した樹状細胞、T細胞、上皮角化細胞間のネットワークを解析することで、歯科用金属アレルギーにおける皮膚・粘膜病変形成の機序を明らかにすることを目的とした。ニッケルで刺激した上皮角化細胞上ではセマフォリン7Aの発現が有意に増強した。モデルマウス耳介皮膚でもセマフォリン7Aの発現が増強し、セマフォリン7Aの発現を阻害するとアレルギー反応が減弱した。また、アレルギー発症耳介皮膚では炎症細胞浸潤を促すCCL20およびCXCL1の発現増強を認めた。以上の結果から、セマフォリン7Aはニッケルに対するアレルギー反応、特にエフェクター期の反応に不可欠であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属アレルギーは比較的長年にわたり患者を苦しめる免疫疾患であり、近年では認知度も高まっている。それにも関わらず、これまでの研究は症例報告を主体とした疫学研究に偏っており、病態の本質的な解明を試みたものはほとんどない。

本研究では、ニッケルアレルギーモデルマウスを用いて、アレルギー発症機序の端緒となる上皮への金属付着から続いて起こるセマフォリン7Aを主体とした細胞間のネットワークの一部を明らかにした。アレルギー発症の初めの部分を解明し制御することが可能であれば、このネットワークの制御を活かした治療方法の開発に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the mechanism of skin and mucosal lesion formation in dental metal allergy by analyzing the network between dendritic cells, T cells, and keratinocytes stimulated with metal antigens. The expression of semaphorin 7A was significantly enhanced on keratinocytes stimulated with nickel. The expression of semaphorin 7A was also enhanced in the ear skin of model mice, and the allergic reaction was attenuated when the expression of semaphorin 7A was inhibited. In addition, the expression of CCL20 and CXCL1, which promote inflammatory cell infiltration, was enhanced in allergic ear skin.

These results suggest that semaphorin 7A is essential for the allergic reaction to nickel, especially in the effector phase.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯科用金属アレルギー 上皮角化細胞 細胞遊走

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科用金属アレルギーは、金属修復物から溶出した成分が抗原となって発症すると考えられており、時に診療を困難にする疾患である。金属アレルギーの検査方法はパッチテスト、治療方法は原因除去療法が現状である。パッチテストは数日間背中に金属抗原を附着させるため、その間の入浴が制限されることや、金属抗原の附着による症状の増悪、新たな感作などの問題がある。また抗原除去療法は根本的な治療方法ではあるが、代替材料の経済的、強度的な問題や、除去時に症状が再燃する、除去しても症状が消失しない等のトラブルも少なくない。歯科領域にとどまらず、整形外科や心臓血管外科等で発症する金属アレルギーは長年にわたり研究されてきたが、これまでに本質的な病態の解明に迫った研究はほとんどない。

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」は補綴歯科関連 13 施設で実施された大規模アンケート調査で、その中でニッケル (Ni) に対する陽性率の高さが示されている。近年の疫学的調査から、金属アレルギーは扁平苔癬や掌蹠膿疱症などの疾患を併発することが多いことが知られており、平成 24 年度の調査の結果でも、来院時に何らかのアレルギー症状を有していた約 7 割の患者の中で最も多い随伴疾患が扁平苔癬、次いで湿疹や掌蹠膿疱症であった。臨床症状として扁平苔癬が口腔粘膜に生じている場合でも、その部位が必ずしも金属と直接接触していないことは少なくない。また、直に金属に接する部位から離れた粘膜や手足の皮膚に湿疹や炎症病変を生じることは珍しくないが、そのメカニズムについても全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、歯科用金属に対するアレルギー反応過程において、抗原から離れた皮膚や粘膜の炎症が惹起される分子機構を明らかにすることで、歯科用金属アレルギーと、それに関係しているといわれる疾患との免疫学的、病態的関連を明らかにすることを目的とする。

これまでの研究は、ほとんどが歯科用金属アレルギーと口腔扁平苔癬等の疾患との関連を疫学的に指摘するものであり、実験医学的な本研究のアプローチは非常に独創的であると言える。また、皮膚に病変を形成するこの分子メカニズムを明らかにすることで、歯科用金属アレルギーの新たな治療方法の開発に結びつくと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 金属による刺激で、樹状細胞 (Dendritic cells; DC), T 細胞, ケラチノサイト (Keratinocytes; KC) 上のケモカイン発現パターンを解析する

歯科用金属の中でも特に抗原性の高いニッケル (Nickel; Ni) を用いて、マウス骨髄由来 DC, マウス T 細胞, およびマウス KC (細胞株 PAM2.12: NCI, Yupsa 博士より供与済) を刺激する。刺激後に発現するケモカインをスクリーニング的に解析する。

(2) モデルマウスにおけるケモカイン発現パターンの解析

歯科用金属アレルギー発症モデルマウス耳介皮膚に惹起された炎症病変に浸潤している細胞が発現するケモカインを免疫組織化学法で確認する。この実験結果と、これまでに得ている *in vitro* のデータと比較しながら実際の体内でのケモカイン産生パターンを明らかにする。

4. 研究成果

マウス骨髄由来 DC, マウス T 細胞, およびマウス KC 株 Pam2.12 を Ni で刺激して発現する分子を解析したところ、セマフォリン 4D の発現上昇を認めた (図 1)。

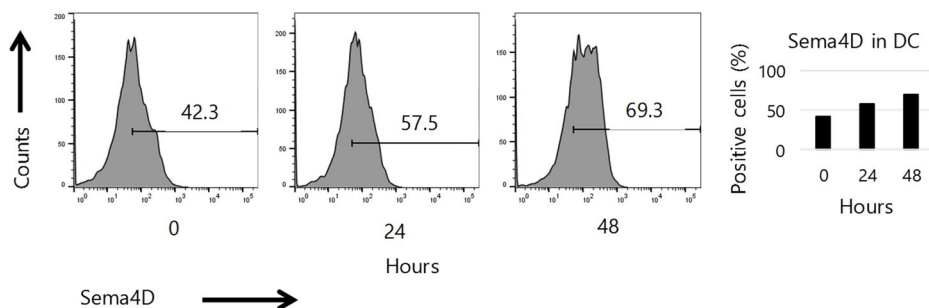


図1. Ni刺激後DC上のSema4Dタンパク発現

また、Pam2.12 上にセマフォリン 7A (Semaphorin 7A; Sema7A) の経時的な発現上昇を認めた (図 2, 3)。

そこで Pam2.12 の Sema7A に着目し Ni で刺激する 48 時間前に siRNA によりその発現を阻害して影響を確認した。Sema7A の発現を阻害された Pam2.12 は Ni 刺激後の TNF- α の産生量に有意な減少を認めた (図 4)。

次に、アレルギーモデルマウス耳介皮膚での Sema7A の動態を観察したところ、アレルギー群耳介皮膚では、特に上皮の外層で Sema7A の発現増強がみられた。アレルギーを惹起させるために Ni を耳介に投与する 6 時間前に Sema7A siRNA を皮下に注入し Sema7A の発現を阻害した上でアレルギーを発症させたところ、Sema7A 発現を阻害した群で有意に耳介腫脹量が減少した (図 5)。

さらにアレルギーの症状を呈している皮膚をリアルタイム PCR 法で解析したところ、CCL20 および CXCL1 の発現増強を認めた。CCL20 はマクロファージ炎症タンパク質で T 細胞や樹状細胞を炎症の場へ遊走させるケモカインである。一方 CXCL1 はマクロファージや上皮細胞が産生し好中球遊走性のケモカインである。

以上の結果から、セマフォリン 7A はニッケルに対するアレルギー反応、特にエフェクター期の反応に不可欠であると考えられる。セマフォリン 7A と 11 インテグリンの相互作用は、多くの皮膚疾患において炎症を促進することから、この相互作用は金属アレルギーの治療標的にもなりうると考えられる。

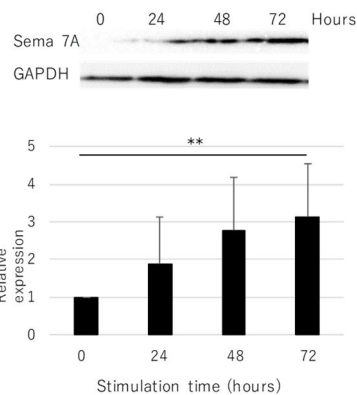


図2. Ni刺激後Pam2.12上のSema7Aタンパク発現

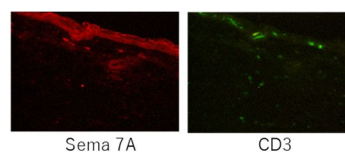


図3. 耳介上皮でのSema7Aタンパク発現

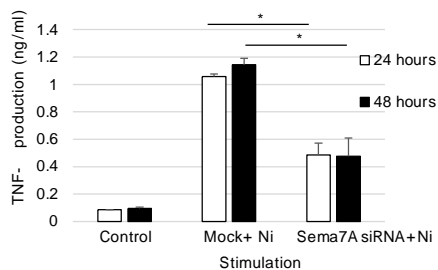


図4. Pam2.12上のSema7A阻害後のTNF- α 産生

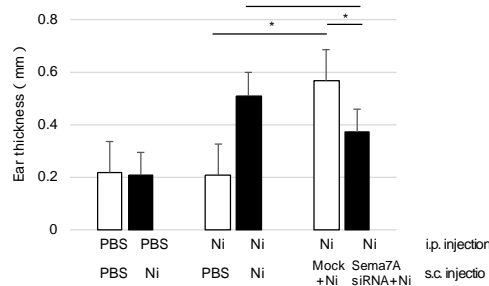


図5. Sema7A阻害後の耳介腫脹反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Norikazu Minami, Megumi Watanabe, Lipei Liu, Mahammad Fadyl Yunizar, Tetsuo Ichikawa	4. 巻 33
2. 論文標題 Effect of Semaphorin7A during the Effector Phase of Nickel Allergy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 8-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20738/johb.33.1_8	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南 憲一, 渡邊 恵, 市川哲雄
2. 発表標題 金属アレルギー惹起相におけるセマフォリン7Aの役割
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会 第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 黎佩、南 憲一、渡邊 恵、市川哲雄
2. 発表標題 ニッケルアレルギーにおけるセマフォリン3A の役割
3. 学会等名 第38 回分子病理研究会淡路シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lipei Liu, Megumi Watanabe
2. 発表標題 The role of Semaphorin 3A in the development of metal allergy
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	後藤 崇晴 (Goto Takaharu) (00581381)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------