

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25年 5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390370

研究課題名（和文） 歯科医療材料における炎症反応の免疫学的解析

研究課題名（英文） Immunological analysis of inflammation by dental materials

研究代表者

小笠原 康悦 (OGASAWARA KOUETSU)

東北大学 加齢医学研究所・教授

研究者番号：30323603

研究成果の概要（和文）：

近年、医療用生体材料の多くが開発され、広く用いられている。金属は加工が容易であり、金属は剛性、弾性、及び延性を有するため、金属は、歯科治療における生体材料の構成成分として用いられる。歯科において、金属はしばしば義歯、インプラントと歯冠修復物の一部として使用される。また、それは、血管ステントおよび医学分野において人工関節の材料としても利用される。しかし、金属は、口腔疾患、炎症及びアレルギー性皮膚炎を引き起こすために、その危険性は、以前から指摘されてきた。近年、医療や歯科技術の向上により、金属材料の使用頻度が高くなっており、また、ネックレス、イヤリングなどの装飾品をつける人が増加しているために、金属によって引き起こされるアレルギー性皮膚炎または炎症の患者が増加している。しかしながら、金属によって引き起こされる疾患の病因はよく理解されていない。

本研究では、実験動物モデルを用いて、金属により引き起こされる遅延型過敏症や炎症に対する新しい診断法を開発することを目指した。また、我々は、金属アレルギーや炎症の開発のための分子機構を探った。

金属アレルギーの診断のためのリンパ球刺激試験において、我々は、CTLA-4を阻害することにより、患者の末梢血を使用することによって感度が向上することを見出した。この方法では、金属アレルギーの診断のためのリンパ球刺激試験の新しい方法を開発することができると考えられた。金属アレルギーマウスモデルでは、ヒト病理に近い金属アレルギーの新たな動物モデルを開発することができた。

研究成果の概要（英文）：

In recent years, a lot of medical biomaterials have been developed and have been widely used. Metal is used as a component of biomaterials in dental treatment, because metal is easy to process and metal has stiffness, elasticity, and ductility. In dentistry, the metal is frequently used as a part of denture, an implant and crown restoration. Also, it is utilized as vascular stents and artificial joint material in medical area. However, since oral disease, inflammation and allergic dermatitis are caused by metal, the risk has been pointed out previously. Recently, patients of allergic dermatitis or inflammation, which are caused by metal are increased, because the frequency of use of metal material by improving medical and dental technology is increased, and people to put the ornaments such as necklaces and earrings are increased. However, the pathogenesis of the disease induced by the metal is not well understood.

In this study, we addressed to develop new diagnostic methods for delayed-type hypersensitivity and inflammation induced by metal using the experimental animal model and we examined the molecular mechanism of development for metal allergy and inflammation.

In lymphocyte stimulation test using the patient's peripheral blood for diagnostic metal allergy, we found that the sensitivity is enhanced by inhibition of CTLA-4. In this method, we may develop new method of lymphocyte stimulation test for diagnostic metal allergy. In a mouse model metal allergy, we were able to develop a new animal model of metal allergy which is closer to the human pathology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：生体材料学、免疫学、口腔細菌学、アレルギー

1. 研究開始当初の背景

医学の進歩によって、多くの医療用生体材料が開発され臨床応用されている。歯科治療においては、金属やレジン、セラミックスなどの材料が多用されている。特に金属は、その物質的特性である剛性、弾性、延性および加工のしやすさから、歯科領域においては義歯材料、歯冠修復材料、そしてインプラント体ならびにその上部構造材料等として、また医科領域においても人工関節材料、血管ステント材料等として頻用されている。しかしその一方では、金属による炎症や口腔疾患、アレルギー性皮膚炎が誘導される場合があり、その危険性は以前から指摘されてきた。

近年、金属による疾患、すなわち炎症やアレルギー性皮膚炎は増加の一途にある。その背景として、歯科を含む医療技術の向上による金属材料の使用頻度の増加、およびピアスやネックレスなど装飾品をつける人の増加が挙げられる。例えば、平成16年度厚生労働省の実態調査によると家庭用品に係る皮膚障害の約半数が金属炎症、アレルギーを含む皮膚炎であるとされている。しかし、金属

による疾患の病態解明は進んでいない。

歴史的に金属炎症やアレルギーの研究は患者血液より分離した感作ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 実験が主流であり、T細胞依存性の免疫疾患として位置づけられているものの未だ実態はよくわかっていない。この理由として、i) マウスは金属への抵抗性が高く、金属炎症やアレルギーを起こしにくいという背景から適当な動物実験モデルがないため。ii) 動物実験によるアレルギーの発症機序の時系列的な解析はなされていないためと考えられる。また、臨床的側面からも国内外においてほとんど研究が進んでおらず、掌蹠膿疱症のような重篤な合併症への対策は全くなされていない。さらに、金属炎症やアレルギーの診断には現行ではパッチテスト法しかなく、患者に苦痛を与えるだけでなく、金属による再感作の危険もあり安全な新規診断法の開発も求められている。

2. 研究の目的

申請者らはこれまで、研究班を組織し金属アレルギー研究を推進してきた（厚生労働省、

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 H19-H21, 代表: 小笠原康悦)。申請者らの研究班で独自に開発した金属アレルギーマウスモデルは、**Nature** 誌の News にとりあげられ国際的に高い評価を得ている (“Infection may trigger metal allergies”, **Nature**, published online news 070430-6, 2007 年)。当該研究分野は申請者らがそのフロンティアであり、既に実験手法も確立されている。

そこで本研究は、医療用材料、特に金属が引き起こす様々な障害、すなわち炎症や遅延型過敏反応について、申請者らが開発した動物実験モデルを用いて、その発症の分子機構を明らかにし新規診断法の開発へ向けた理論的基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

申請者らの開発したマウスモデルを用いて、金属炎症および、金属による遅延型過敏反応(金属アレルギー)を誘導する。これまでの結果から、耳介に皮内投与する金属溶液濃度が高いと炎症が引き起こされることから、金属炎症と遅延型過敏反応との間で応答する免疫細胞集団の違いをフローサイトメトリー法、免疫組織染色法を用いて解析し、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞の局在とそれぞれの細胞が発現する表面抗原、細胞内シグナル伝達分子について詳細に検討する。

さらに、耳介では免疫細胞の浸潤が良く観察できない場合があるので、足蹠に金属溶液を接種し、足蹠で炎症、アレルギーを引き起こすモデルも開発する。実際には、BALB/c マウスに金属溶液を腹腔内投与し感作させた後、金属を耳介、あるいは足蹠に皮内投与して金属アレルギーを誘導する。耳介あるいは足蹠の腫脹を測定し、金属アレルギーの発症を評価する。アレルギーが起こっている耳介や足蹠の組織を採取し、免疫細胞、とくにT細胞の組織内への浸潤を免疫組織染色法を用いて観察する。

金属アレルギーに反応するT細胞を特定するために、マウスモデルで金属アレルギーが明らかに認められた個体の所属リンパ節からリンパ球(T細胞が dominant な集団)を採取し、ヌードマウス(BALB/c nu-nu)へ移入後、金属溶液を耳介へ皮内注射することにより金属アレルギーの誘導を行う。この「リンパ球移入～金属アレルギー誘導」を繰り返すことで、金属アレルギー特異的に増殖・活性化されるT細胞を濃縮し、エフェクター細胞として機能するT細胞を特定する。

また、患者末梢血からリンパ球を比重遠心法により単離し、in vitro にて培養、金属溶液を加え増殖するか否かを検討する(リンパ球刺激試験)。さらに、リンパ球刺激試験の感度を増強させるために、抑制性にはたらくCTLA-4分子を阻害して改良を試みる。

4. 研究成果

パラジウムにより金属アレルギーを誘導したマウスにおいて、耳介および足蹠の腫脹は24時間をピークとし72時間まで継続した。耳介にアレルギーを起こした場合は、1週間後には元の状態に戻っていた。それに対し、足蹠にアレルギーを起こした場合は、1週間後でも優位な腫脹が観察された。病理組織標本を作製し、足蹠のT細胞の浸潤を確認したところ、CD4T細胞、CD8T細胞とも、腫脹した局所に細胞浸潤が認められた。

パラジウムアレルギーを誘導したC57BL/6マウスの耳介腫脹局所においてCD8およびCD4の両T細胞サブセットの浸潤が認められた。所属リンパ節を取り出し、リンパ球を採取し、ヌードマウス(BALB/c nu-nu)へ移入後、金属溶液を耳介へ皮内注射することにより金属アレルギーの誘導を行ったところ、腫脹が認められたことから、我々の作製した金属アレルギー動物モデルはヒトと同様にT細胞依存性の疾患であることが確認された。

さらに、患者末梢血からリンパ球を比重遠心

法により単離し、in vitro にて培養、金属溶液を加え、リンパ球刺激試験を行った。CTLA-4 を阻害することにより、リンパ球刺激試験の感度が増強し、新たな金属アレルギーの診断法になりうる可能性が考えられた。

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 10 件) 全て査読有

1. Nakayama M, Kurokawa K, Nakamura K, Lee BL, Sekimizu K, Kubagawa H, Hiramatsu K, Yagita H, Okumura K, Takai T, Underhill DM, Aderem A, Ogasawara K. Inhibitory receptor PIR-B is exploited by *Staphylococcus aureus* for virulence.: *J Immunol* (2012) 189:5903-5911. doi: 10.4049/jimmunol.1201940
2. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay.: *Journal of Immunological Methods* (2012) 384:81-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.07.012>
3. Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe, J, Sigita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y. A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: Possible immunological state of the intrinsic type.: *J Dermatol Sci* (2012) 67: 37-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2012.04.004>
4. Sugita K, Kabashima K, Sawada Y, Haruyama S, Yoshioka M, Mori T, Kobayashi M, Ogasawara K, Tokura Y. Blocking of CTLA-4 on lymphocytes improves the sensitivity of lymphocyte transformation tests in a patient with nickel allergy.: *Eur J Dermatol* (2012) Mar-Apr; 22(2):268-269. doi:10.1684/ejd.2012.1641
5. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. (2011) NK-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4⁺ T cells. : *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 (45):18360-18365. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1110584108
6. Matsutani T, Fujii Y, Kitaura K, Suzuki S, Tsuruta Y, Takasaki T, Ogasawara K, Nishimoto N, Kurane I, Suzuki R. (2011) Increased positive selection pressure within the complementarity determining regions of the T-cell receptor β gene in New World monkeys.: *American J. Primatology* 73(10):1082-92. DOI 10.1002/ajp.20976
7. Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S. (2011) Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS

- box-containing proteins. : *J Biol Chem*. 286(11):9009-19. DOI 10.1074/jbc.M110.190678
8. Champsaur M, Beilke JN, Ogasawara K, Koszinowski UH, Jonjic S, Lanier LL. (2010) Intact NKG2D-independent function of NK cells chronically stimulated with the NKG2D ligand Rae-1. : *J Immunol*. 185(1):157-65. doi:10.4049/jimmunol.1000397
9. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Ogasawara K, Malissen B, Miyachi Y, Kabashima K. (2010) Compensatory role of Langerhans cells and langerin-positive dermal dendritic cells in the sensitization phase of murine contact hypersensitivity.: *J Allergy Clin Immunol* 125(5):1154-1156. e2. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.005
10. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y, Imokawa G, Kabashima K, Bito T, Nakamura M, Ogasawara K, Tokura Y. (2010) Comparison of skin barrier function and sensory nerve electric current perception threshold between IgE-high extrinsic and IgE-normal intrinsic types of atopic dermatitis.: *Br J Dermatol* 162(1):83-90. DOI 10.1111/j.1365-2133.2009.09440.x

[学会発表] (計3件)

1. Ogasawara K (特別講演) 「NK細胞の生物学」 第59回 東北歯学会 仙台 2011年6月10日
2. Ogasawara K (特別講演) 「NK細胞の生物学」 昭和歯学会セミナー 東京

2010年10月21日

3. Ogasawara K, Suzuki R (特別講演) 「マウス金属アレルギーモデルを用いた免疫学的解析」 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 東京、2010年11月25日

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/imbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 康悦 (OGASAWARA KOUETSU)
 東北大学・加齢医学研究所・教授
 研究者番号: 3 0 3 2 3 6 0 3

(2) 研究分担者

佐々木 啓一 (SASAKI KEIICHI)
 東北大学・歯学研究科・教授
 研究者番号: 3 0 1 7 8 6 4 4

研究分担者

中山 勝文 (NAKAYAMA MASAFUMI)
 東北大学・加齢医学研究所・助教
 研究者番号: 2 0 4 5 3 5 8 2