

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293399

研究課題名(和文) 歯科金属材料における炎症・アレルギーの病態解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of inflammation or allergy in dental metal material

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：金属は、剛性、弾力性、および延性を有するため、金属は、歯科治療中の生体材料の成分として使用されている。歯科治療では、金属はしばしば義歯、インプラントと復元の一部として使用されている。しかし、金属炎症や金属アレルギーの根底にある分子メカニズムはよく理解されていない。本研究では、NK細胞およびNKレセプターに着目して、金属アレルギーおよび炎症の発生の分子機構について研究を進めてきた。我々は、NK活性化受容体であるNKG2Dが、CD8+ T細胞上で発現していること、そしてNKG2Dが金属アレルギーに関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Metal is used as a component of biomaterials in dental care, because metal has stiffness, elasticity, and ductility. In dental care, the metal is frequently used as a part of denture, an implant and restoration. However, the molecular mechanisms underlying metal inflammation and metal allergy have not been understood. In this study, we examined the molecular mechanism of development for metal allergy and inflammation by focusing NK cells and NK receptors. We found that NKG2D, a NK activating receptor, is expressed on CD8+T cells are involved in metal allergy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アレルギー

## 1. 研究開始当初の背景

金属装飾品をつける人の割合の増加ならびに医療の進歩による生体金属材料の利用により、金属アレルギーは増加傾向にある。金属は、材料学的特性からも扱いやすく、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差し歯や銀歯とよばれる補綴治療をはじめとして金属が使用され、患者のQOLを高めてきた。しかしその一方で、金属によるアレルギー性皮膚炎が誘導される場合が報告されてきた。

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。これは、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こと、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ことが理由と考えられる。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、前事業において独創的なアプローチにより、金属アレルギーに対する動物実験モデルを開発している。そこで本研究は、申請者が開発した動物実験モデルを用いて、金属アレルギーについてその発症の分子機構を明らかにし、新規診断・治療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。

この目的を達するために、以下の2点を具体的な目標とした。

(1) 金属アレルギーにおけるNK細胞、NK関連受容体の関与

(2) マーモセットでのNK細胞評価系の確立

## 3. 研究の方法

(1) 金属アレルギーにおけるNK細胞、NK関連受容体の関与

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)を誘導した。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検討した。特に、NK細胞、およびNK細胞関連分子に着目して、その挙動を詳細に検討した。

(2) マーモセットでのNK細胞評価系の確立

マーモセットは、霊長類の実験動物であり、創薬、新規治療法の開発には必要であるものの、実験ツールが整っておらず、NK細胞評価法が存在しない。そこで、マーモセットNK関連遺伝子をクローニングを試みた。マーモセット脾臓細胞から比重遠心法にてリンパ球分画と考えられる細胞を単離して、total RNAを抽出、cDNAライブラリーを通法通り作成した。マーモセットNK活性化受容体NKG2Dのクローニングを行うために、PCRプライマーをヒトNKG2D遺伝子をもとにした塩基配列で構築し、degenerate PCR法にて、cDNAクローニングを行った。

さらに、NKG2D リガンドである ULBP 遺伝子についても、同様の方法でクローニングを行った。

これら遺伝子について、マウス細胞株である BAF/3 細胞に遺伝子導入を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 金属アレルギーにおける NK 細胞、NK 関連受容体の関与

これまで、金属アレルギー動物モデルを用いて、NK 細胞、NK 受容体に着目して研究を進めてきた。我々は、NK 細胞が抗原提示細胞と接触することで、NK 細胞が MHC クラス II を奪い取ること、MHC クラス II を奪い取った NK 細胞は、MHC クラス II を細胞表面に表出し機能することが明らかとなった。そしてその MHC クラス II 陽性 NK 細胞は、免疫機能を抑制的に調節し、アレルギーを抑制する機能をもつことが判明した。

また、マウスモデルによる解析で、金属アレルギーを引き起こした原因 T 細胞を解析したところ、NK 細胞活性化受容体として知られる NKG2D の発現が上昇していることが判明した。この結果を受け、抗 NKG2D 抗体を投与したところ、金属アレルギーが寛解することが明らかになり、NKG2D が金属アレルギーの発症に深くかかわっていることが明らかとなった。NKG2D は、T 細胞では、共刺激分子として働き、NKG2D は、金属アレルギーの新たな治療標的になりうるものと考えられた。

##### (2) マーモセットでの NK 細胞評価系の確立

マーモセットは、霊長類の実験動物であり、ヒト疾患における創薬、新規治療法を考える上では、霊長類における実験結果が必須である。マーモセットは霊長類でありその有用性は一般に認められているものの、免疫学的解析ツールが少ないため、研究が進んでいない。そこでマーモセットリンパ球から、NKG2D 塩基配列のクローニングを行った。また、

NKG2D リガンドである ULBP のクローニングにも成功した。

ULBP 遺伝子を Ba/F3 細胞に遺伝子導入した細胞株を樹立し、マーモセットリンパ球を用いて NK 細胞傷害性試験を行ったところ、測定することができ、マーモセットの NK 細胞傷害評価系を樹立することができた。

#### 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 16 件)

英文論文 全て査読有

Eguchi T, Kumagai K, Kobayashi H, Shigematsu H, Kitaura K, Suzuki S, Horikawa T, Hamada Y, Ogasawara K, Suzuki R. 2013. Accumulation of invariant NKT cells into inflamed skin in a novel murine model of nickel allergy. *Cell Immunol* 284: 163-71

Kobayashi H, Kumagai K, Eguchi T, Shigematsu H, Kitaura K, Kawano M, Horikawa T, Suzuki S, Matsutani T, Ogasawara K, Hamada Y, Suzuki R. 2013. Characterization of T cell receptors of Th1 cells infiltrating inflamed skin of a novel murine model of palladium-induced metal allergy. *PLoS One* 8: e76385 doi: 10.1371/journal.pone.0076385.

Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Amagai R, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K. Activation-induced natural killer cell death following NKG2D-mediated trogocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110 (23) : 9421-9426. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300140110

Tojo G, Fujimura T, Kawano M, Ogasawara K, Kambayashi Y, Furudate S, Mizuashi M, Aiba S. 2013.

Comparison of interleukin-17- producing cells in different clinical types of alopecia areata. *Dermatology* 227: 78-82 doi: 10.1159/000353159.

Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe J, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Hirasawa N, Ogasawara K, Tokura Y. 2013. High frequencies of positive nickel/cobalt patch tests and high sweat nickel concentration in patients with intrinsic atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 72: 240-5. doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.07.009.

Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K 2013 NK-cell fratricide-Dynamic crosstalk between NK and cancer cells *Oncolimmunology* 2:11, e26529  
Shigematsu H, Kumagai K, Kobayashi H, Eguchi T, Kitaura K, Suzuki S, Horikawa T, Matsutani T, Ogasawara K, Hamada Y, Suzuki R. Accumulation of Metal-Specific T Cells in Inflamed Skin in a Novel Murine Model of Chromium-Induced Allergic Contact Dermatitis *PLoS One*. 2014 Jan 20;9(1):e85983. doi: 10.1371/journal.pone.0085983.

Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K NKG2D+ IFN- $\gamma$ + CD8+ T cells are responsible for palladium allergy *PLoS One* 2014 Feb 12;9(2):e86810

Furudate S, Fujimura T, Kambayashi Y, Kawano M, Ogasawara K, Tsukada A, Tamabuchi E, Haga T, Hashimoto A, Aiba S. Successful Treatment of Adult Onset Langerhans Cell Histiocytosis with Bi-weekly Administration of Pegylated Interferon- $\alpha$  *Acta Derm Venereol*. 2014 Feb 4. doi: 10.2340/00015555-1807.

Kusaka T, Nakayama M, Nakamura K, Ishimiya M, Furusawa E, Ogasawara K. Effect of silica particle size on macrophage inflammatory responses. *PLoS One*. 2014 Mar 28;9(3):e92634. doi: 10.1371/journal.pone.0092634.

Watanabe M, Kudo Y, Kawano M, Nakayama M, Nakamura K, Kameda M, Ebara M, Sato T, Nakamura M, Omine K, Suzuki R, Kametani Y and Ogasawara K. NKG2D functions as an activating receptor on natural killer cells in common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Int Immunol* (2014) 26 (11): 597-606 doi:10.1093/intimm/dxu053

日本語論文 査読無

川野光子、武田裕利、中村生、小笠原康悦 免疫学的解析に基づく新たな医療材料開発へのアプローチ まてりあ 53. 153-156, 2014

小笠原康悦 MHC class II dressed NK 細胞による T 細胞の反応抑制 臨床免疫・アレルギー科 61(1):112-118, 2014 科学評論社

川野光子、遠藤実里、佐藤直毅、鈴木隆二、小笠原康悦 金属アレルギー研究：動物モデルによる免疫学的解析 実験医学 vol.31 No.17 137-142 2013 羊土社

小笠原康悦 新たな免疫抑制細胞 炎症と免疫 21(4): 271 -272 2013 先端医学

社

橋元亘, 中村恭平, 遠藤実里, 島田栄理  
遣, 小笠原康悦, 中山勝文, 佐藤直毅,  
樋口繁仁 免疫抑制にはたらくドレス  
NK細胞の発見 炎症と免疫 21(4): 297  
-304 2013 先端医学社

[学会発表](計11件)

小笠原康悦 「マーマセットのNK関連  
分子のクローニング」 第57回 歯科  
基礎医学会 2015年9月12日 (新潟)

小笠原康悦 「がんNK細胞」 歯科  
基礎医学会サテライトシンポジウム「癌  
の分子標的治療から分子標的予防医学  
へ」第56回 歯科基礎医学会 9月25  
日 2014年 (福岡)

古澤慧美、小笠原康悦 「ナノ粒子によ  
るマクロファージ炎症の解析1」 第56  
回 歯科基礎医学会 2014年9月27日  
(福岡)

小笠原康悦、古澤慧美 「ナノ粒子によ  
るマクロファージ炎症の解析2」 第56  
回 歯科基礎医学会 2014年9月27日  
(福岡)

小笠原康悦 「金属アレルギーの動物モ  
デルを用いた免疫学的解析」 日本金属  
学会 特別講演 2014年3月22日 (東  
京)

小笠原康悦、川野光子、佐藤直毅、樋口  
繁仁、鈴木隆二 「動物モデルを用いた  
金属アレルギーの研究」 日本皮膚アレ  
ルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会  
2013年11月29日 12月1日 (金沢)

小笠原康悦、川野光子、中村生、遠藤実  
里、武田裕利、樋口繁仁、鈴木隆二 「金  
属炎症・アレルギーの免疫学的解析」  
日本バイオマテリアル学会東北地域講  
演会 2013年10月7日 (仙台)

小笠原康悦、中村恭平 「ドレス現象に  
よるNK細胞の細胞死機構の発見」日本  
細菌学会東北支部会 2013年8月

30-31日 (仙台)

小笠原康悦、島田栄理遣、遠藤実里  
「NK細胞の誘導性細胞死機構の発見」  
第55回 歯科基礎医学会 2013年9月  
21日 (岡山)

島田栄理遣、遠藤実里、小笠原康悦 「レ  
ニンにより誘導されるNK細胞の免疫応  
答」 第55回 歯科基礎医学会 2013  
年9月21日 (岡山)

遠藤実里、島田栄理遣、小笠原康悦 「金  
属アレルギーにおける金属イオン可視  
化技術の開発」 第55回 歯科基礎医  
学会 2013年9月21日 (岡山)

[図書](計1件)

Kawano M, Takeda Y, Ogasawara K  
(2014) Pathological Analysis of Metal  
allergy to Metallic Materials, Chapter  
13,305-322 *Springer Series in*  
*Biomaterials Science and Engineering*

[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: 30323603

### (2) 研究分担者 平成25年度まで

中山 勝文 (NAKAYAMA, MASAFUMI)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号: 20453582