

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871220

研究課題名(和文) 金属アレルギー関連疾患の病態解明ならびに新規診断治療体系の確立

研究課題名(英文) Possible Immune Regulation of Natural Killer T Cells in a Model of Metal Ion-Induced Allergic Contact Dermatitis.

研究代表者

後藤 哲人(Gotoh, Akito)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)・臨床免疫研究室・研究員

研究者番号：50518131

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)：本研究により、マウスを用いたヒト外挿モデルの確立とTCRレパトア解析系の確立に成功した。パラジウム、クロム、ニッケルを用いたマウス金属アレルギーモデルにおいて、ニッケルではNKT細胞が、パラジウムでは特異的T細胞が、クロムでは両方の細胞の関与を明らかにした。さらに、ヒトの口腔内金属アレルギー患者の口腔内組織を用いた病理組織学解析では、正常口腔内粘膜組織との比較で上皮の肥厚と上皮-真皮の結合部位に強いリンパ球浸潤が観察され、IFN $\gamma$ の産生亢進が認められた。また、V $\beta$ 鎖のCDR3領域がインバリアントなT細胞の存在頻度が著明に増加しており、NKT細胞の関与が強く疑われた。

研究成果の概要(英文)：Metal often causes delayed-type hypersensitivity reactions, which are possibly mediated by accumulating T cells in the inflamed skin, called irritant or allergic contact dermatitis. However, accumulating T cells during development of a metal allergy are poorly characterized because a suitable animal model is unavailable. We have previously established novel murine models of metal allergy and found accumulation of both metal-specific T cells and natural killer (NK) T cells in the inflamed skin. In our novel models of metal allergy, skin hypersensitivity responses were induced through repeated sensitizations by administration of metal chloride and lipopolysaccharide into the mouse groin followed by metal chloride challenge in the footpad. These models enabled us to investigate the precise mechanisms of the immune responses of metal allergy in the inflamed skin. We consider the immune regulation of accumulated NK T cells in metal ion-induced allergic contact dermatitis.

研究分野：口腔外科

キーワード：金属アレルギー TCR解析 NKT

### 1. 研究開始当初の背景

口腔領域における金属アレルギー発症患者の病因は不明な点が多い。また、ヒトの皮膚科領域における金属アレルギーとの相同性に関して見解が少なく、治療方針は見出せないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、口腔領域における金属アレルギー(MA)および金属アレルギー関連疾患発症(MSA)患者を対象とした病態解明と、その結果に関する臨床データベースを歯科口腔外科および皮膚科間で連携して構築する。

さらに、金属アレルギーの病因解明を目的に、ヒト金属アレルギーに外挿性を有する動物モデル系の作成を行う。

### 3. 研究の方法

一般的に型アレルギー反応であると言われる金属アレルギーのヒトに外挿性を有するマウスモデルの確立とその病態解析を行う。実際には、三大金属アレルギーの原因であるパラジウム、ニッケル、コバルトを用いたマウスモデルの確立と、その詳細な病態解析を行う。

それと平行してヒト MA 及び MSA 患者から得られた臨床サンプル(血液、組織)を用いて、T 細胞動態と病態成立と形成の関連性を検討する。T 細胞レセプター(TCR)を解析し、本疾患に関連性を示した TCR 遺伝子ライブラリの構築を行う。この結果から MA 及び MSA にかかわる T 細胞の抗原特異性に関する遺伝子ライブラリー構築は、歯科と皮膚科間連携により新規診断治療ガイドラインの策定を目指す。また、抗核抗体および各種サイトカインの検出解析は病態発症メカニズムを明らかにし、将来的に病態形成とその成立に関わる T 細胞を制御する新たな免疫療法の開発シード探索となる。

#### 1) 金属アレルギーモデルマウスの作成:

Balb/c(6週令、雌)の鼠径部への金属溶液 NiCl<sub>2</sub>/PdCl<sub>2</sub>/CrCl<sub>2</sub>/CoCl<sub>2</sub>+LPS 各種混合液の皮内注射で感作し、感作に使用した金属と同じ金属溶液を Footpad に皮内投与することで誘導を行った。対照として、感作条件は同一で誘導時に生理食塩水を Footpad に皮内注射した群を用いた。Footpad の腫脹の経時的变化および T 細胞浸潤の有無を解析した。

#### 2) TCR レパトア解析・CDR3 領域シーケンス解析:

Footpad と脾臓の組織から Total RNA を抽出し、各組織中に存在する T 細胞の TCR レパトア解析を行った。V family における CDR3 領域を明らかにするために、TA-cloning 法によりプラミストにクローニングし塩基配列を決定した。

#### 3) 定量 PCR 法:

RNA 安定化試薬に保存した組織から RNA を抽出し cDNA を合成した後、適切なプライマーを用いて T 細胞関連マーカー

(CD3,CD4,CD8)、Th1 サイトカイン(IFN- $\gamma$ ,TNF- $\alpha$ )、Th2 サイトカイン(IL-4)、細胞障害性サイトカイン(Fas, FasL)の mRNA 発現量の定量を Real-time PCR 法により解析を行った。

#### 4) 病理組織・免疫組織化学的解析

誘導後7日目のFootpadをHE染色による病理組織学的検討を行った。また、免疫組織学的検討として、CD3,CD4,CD8,F4/80を用いた。

### 4. 研究成果

ヒトの金属アレルギー病態と外挿性を有するマウスを用いた金属アレルギーモデル(パラジウム、クロム、ニッケル)の確立を目的に、マウスのFootpadに金属溶液を感作する系を確立し、ヒトの金属アレルギーと類似したマウスモデルの作成に成功した。用いた金属は歯科材料として使用されているパラジウムの他に、クロムとニッケルでも検討を行った。マウスの鼠径部にLPSとエマルジョンにした金属を投与し、投与後2週間後にFootpadの皮内に金属水溶液を投与して経時的に病理学的・免疫学的解析を行った。その結果から、T細胞の関与を明らかにした。獲得免疫の本態であるT細胞受容体(TCR)レパトア解析、各種サイトカイン・ケモカインの定量的発現解析より、NiではNKT細胞のみが浸潤した免疫応答が行われているが、CrではNKT細胞に加えてTCRV 11-1/V 8-2を有する金属特異的T細胞、PdではTCRV 18-1/V 8-2を保有する金属特異的T細胞による獲得免疫応答が観察された。

同様の遅延型アレルギーの病態像を呈する接触性皮膚炎モデルマウスを用いた研究では、NKT細胞は樹状細胞とともに感作および誘導相でT細胞誘導に関わる病態発症に不可欠である、また、CD4陽性メモリーT細胞を誘導することで免疫応答を制御する役割がある事が知られている。

ヒト口腔内金属アレルギー患者を用いた病理学的・免疫学的解析は予備的なデータとして、上皮の肥厚と上皮-真皮結合領域にT細胞の浸潤が確認されており、IFN $\gamma$ の産生亢進とNKT細胞の浸潤が観察されており、この結果は、マウスにおけるパラジウムアレルギーモデルで得られた結果であるNKT細胞の関与を強く示唆する。

以上より、NKT細胞は金属アレルギーの病態発症および免疫応答の制御に関与しており、金属毒性が強くNKT細胞による自然免疫応答では制御困難な場合には、金属特異的なT細胞による獲得免疫機構が挙動している可能性が示された。

### 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 4 件)

1. Possible Immune Regulation of Natural Killer T Cells in a Murine Model of Metal Ion-Induced Allergic Contact Dermatitis.  
Kumagai K, Horikawa T, Shigematsu H, Matsubara R, Kitaura K, Eguchi T, Kobayashi H, Nakasone Y, Sato K, Yamada H, Suzuki S, Hamada Y, Suzuki R.  
Int J Mol Sci. 2016 Jan 12;17(1). pii: E87. 査読有
2. Accumulation of metal-specific T cells in inflamed skin in a novel murine model of chromium-induced allergic contact dermatitis.  
Shigematsu H, Kumagai K, Kobayashi H, Eguchi T, Kitaura K, Suzuki S, Horikawa T, Matsutani T, Ogasawara K, Hamada Y, Suzuki R.  
PLoS One. 2014 Jan 20;9(1):e85983. 査読有
3. Characterization of T cell receptors of Th1 cells infiltrating inflamed skin of a novel murine model of palladium-induced metal allergy.  
Kobayashi H, Kumagai K, Eguchi T, Shigematsu H, Kitaura K, Kawano M, Horikawa T, Suzuki S, Matsutani T, Ogasawara K, Hamada Y, Suzuki R.  
PLoS One. 2013 Oct 3;8(10):e76385. 査読有
4. Characterization of T cell receptors of Th1 cells infiltrating inflamed skin of a novel murine model of palladium-induced metal allergy.  
Eguchi T, Kumagai K, Kobayashi H, Shigematsu H, Kitaura K, Suzuki S, Horikawa T, Hamada Y, Ogasawara K, Suzuki R. Cell Immunol. 2013 Jul-Aug;284(1-2):163-71. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

海外 1 件 国内 7 件

1. Metal-specific T cells driven by NK T cells in the murine model of Chromium-induced allergic contact dermatitis  
Kenichi Kumagai, Hiroaki Shigematsu, Hiroshi Kobayashi, Takanori Eguchi, Tomoko Nagaoka, Yukinaga Miyata, Keisuke Fujii, Ryuji Suzuki, and Yoshiki Hamada  
11th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Xi'an, China, 2014.8.22-24

2. 金属アレルギー発症に関わる NKT 細胞による免疫応答について  
熊谷賢一, 重松宏昭, 松原陵太, 江口貴紀, 小林浩, 鈴木隆二, 濱田良樹  
第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2015.5.14-15 大阪
3. 異型上皮を伴う扁平苔癬様病変から生じた下唇扁平上皮癌の 1 例  
熊谷 賢一, 川口浩司, 山田 浩之, 斉藤智之, 大橋 瑞己, 堀江 彰久, 白石 英馨, 岸 晶子, 林 伸和, 濱田 良樹  
第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2015.1.30-31 奈良
4. 新規クロムアレルギー性皮膚炎マウスモデルを用いた炎症局所における金属特異的 T 細胞の集積について  
12. 重松宏昭, 熊谷 賢一, 江口貴紀, 小林浩, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二  
第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2014.5.9 東京
5. 新規ニッケルアレルギーモデルマウスを用いた炎症局所における NKT 細胞の発現について  
13. 熊谷 賢一, 重松宏昭, 江口貴紀, 小林浩, 濱田良樹, 鈴木隆二  
第 41 回日本臨床免疫学会総会 (P3-13) 2013.11.27 下関
6. 新規クロムアレルギーモデルマウス作製と網羅的 T 細胞レセプター解析  
重松宏昭, 熊谷 賢一, 江口貴紀, 小林浩, 濱田良樹, 鈴木隆二  
第 58 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会 (P1-2-1) 2013.10.11 福岡
7. 新規パラジウム金属アレルギーモデルマウスの作製とアレルギー発症因子の発現解析  
熊谷 賢一, 重松宏昭, 江口貴紀, 小林浩, 後藤哲人, 鈴木隆二, 濱田良樹  
第 26 回日本口腔診断学会・第 23 回日本口腔内科学会 (C2-19) 2013.9.14 東京
8. 新規ニッケルアレルギーモデルマウスを用いた炎症局所における NKT 細胞の発現について  
重松宏昭, 江口貴紀, 熊谷 賢一, 小林浩, 後藤哲人, 鈴木隆二, 濱田良樹  
第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2013.5.22 栃木

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

後藤哲人 (GOTOH Akito)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)臨床免疫研究室・研究員  
研究者番号：50518131

##### (2) 研究協力者

鈴木隆二 (SUZUKI Ryuji)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨床研究センター)臨床免疫研究室・室長  
研究者番号：70373470