

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：26301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462851

研究課題名(和文)免疫担当細胞制御転写因子からみた金属アレルギー構築機序と表面改質効果

研究課題名(英文)The mechanism of metal allergy construction by a transcription factor controlling immunocompetent cells and a surface reforming effect.

研究代表者

玉内 秀一 (TAMAUCHI, HIDEKAZU)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授(移行)

研究者番号：60188414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Th2細胞は、金属アレルギー誘導初期において耳介腫脹反応の亢進に關与していることをこれまでに明らかにした。今回NKT細胞がニッケルアレルギー反応において耳介腫脹反応に対して抑制機能を有することを明らかにした。また、転写抑制因子Gfi-1遺伝子欠損マウスではニッケルアレルギー誘導において、反応が増強されることを明らかにした。組織中サイトカイン産生プロファイルを検討したところ、CD4陽性細胞からIFN- $\gamma$ の産生が著明に高くなっていることが明らかにした。金属アレルギー反応がはh1型免疫反応ばかりでなく、種々の免疫担当細胞の相互關係から病態が形成されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It suggested that the GATA-3 transcription factor is associated with not only the Th2 type immune response but also the differentiation of NKT cells. The Th2 cells find that they are associated with the sthenia of the response in early period of metal allergy. We made clear that NKT cells functioned for an allergy to metal response restrainingly this time. Also, in the allergy to metal instruction study using the Gfi-1 genetic effect mouse, and determined sthenia of the allergic reaction and determined that pro-an in vitro experiment, an IFN- $\gamma$  production was enhanced remarkably. Rather than these, it was suggested that the clinical condition of the allergy to metal was built as well as a Th1 type cells in the mechanism of pathogenesis of the allergy to metal by the reciprocal effects of the 2 type cells and NKT cells.

研究分野：免疫学 アレルギー学

キーワード：ニッケル アレルギー 転写因子 Th1 Th2 NKT細胞

## 1. 研究開始当初の背景

金属アレルギーは、IV型アレルギーを代表とする疾患である。しかし、近年臨床医学的知見からIV型アレルギーを制御するTh1型細胞の関与ばかりでなくTh2型免疫反応の関与も示唆されている。我々は、これらの事実を明らかにするためにTh2型免疫反応制御転写因子GATA-3遺伝子導入トランスジェニックマウスを用いてNiアレルギー誘導モデルマウスを構築し、これまでの検討から金属アレルギー(Ni)の発症初期にTh2型免疫反応が関与していることを明らかにして報告を行ってきた。しかし、GATA-3転写因子はT細胞ばかりでなくNKT細胞の分化にも関与する報告があることから、我々がこれまで得た結果がTh2型免疫のみによるものであることを明らかにできなかったことからNKT細胞欠損マウスやTh1型免疫反応との関わりを明らかにするために転写因子(Grfi1)欠損マウスを用いて検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

我々は、ニッケル(Ni)アレルギー誘導初期にTh2型免疫反応が関与することや表面改質によるアレルギー誘導能評価系を確立し報告した。本研究期間内において、アレルギーを誘導する転写因子の観点から耳介腫脹反応を指標として検討すると共に、Ni-Ti以外の合金における免疫反応能についても同様に検討し、アレルギー誘導低減化表面改質法について検討することとし、生体材料開発の一助とした患者に対するQOLの向上につなげる情報を得る事を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1). トランスジェニック及びノックアウト

**マウス**：当学部施設実験動物施設および愛媛大学医学部実験動物施設内SPFにてGATA3遺伝子導入マウス(GATA3-Tg)、RAG2、Gfi-1及びノックアウト(Ko)マウスはそれぞれのマウスの遺伝子系確認は、生後4週目の各々

のマウスのtailよりgenomic DNAを抽出し、DNA-PCR法にてそれぞれのタイプを確認する。

(2). **抗原・感作及び惹起方法**：感作抗原にTi-Ni(50%)金属ワイヤーを用いる。金属ワイヤーは、1 x 7mmサイズにカットした。

ワイヤーは各マウスをペントバルビタール(80mg/Kg)で麻酔し、背部被毛をバリカンにて剃毛する。剃毛部をイソジン消毒液にて消毒後メスにて部分的に切開し、皮下に移入する。その後、外科用クリップにて切開部を縫合する。

### (3). 抗原再刺激後の経時的耳介腫脹反応の

**測定**：金属ワイヤー移植後より、1ヶ月経過したマウスの左耳介の皮内に10 $\mu$ lの金属溶液(1000ppm)を投与し、経時的に腫脹をdial Thickness gaugeにて測定する。

### (4). 抗原惹起部位のサイトカインプロフィ

**ールの検討**：各々の抗原で惹起された耳介組織を摘出し(惹起後18-24時間及び72時間以降、0.1%Tween20加PBS溶液内で摘出組織をポリトロンで細切しホモジナイズする。液体窒素にて凍結融解をくり返し、さらに超音波にて処理を行い遠心して上清を回収し、サイトカイン産生量(IL-4, IL-5, IL-13, IFN-)をELISAキットにて測定する。

### (5). 耳介腫脹反応を制御する免疫担当細胞の

**機能の検討**：ワイヤーで感作されたGATA3-Tgマウス脾細胞よりマグネットビーズやセルソーターを用いてCD4<sup>+</sup>もしくはCD8<sup>+</sup>T細胞を分離し、**RAG2KOマウス**に静注にて移入し(1 x 10<sup>6</sup>/mouse)、移植翌日から感作金属に対する耳介助腫脹反応の計測、と再刺激48~72時間後の組織内サイトカイン産生量を前記方法にて測定する。また、血清中の抗体価は、測定終了後に採血・分離して血清にてELISA方にて測定する。

### (6). 耳介腫脹部位の病理組織学的検索

：実験より得られた耳介組織を摘出し、H&E、トルイジンブルー染色及び免疫染色により、病体形成に関与する侵出細胞を同定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Ni-Ti 試験片移植マウスの耳介腫脹の経時的变化

Ni-Ti ワイヤ移植 GATA-3 Tg マウスへの抗原再刺激において耳介腫脹の経時的变化は、接種後 3 時間から 6 時間の間に最初のピークを認めた。この反応は対照群である WT マウスにおいても同程度の腫脹反応が観察され、どちらの群もその後反応は減退した。しかし、GATA-3 Tg マウスでは 24 時間以降、WT マウスの約 3 倍の腫脹反応が観察された(図 1a)。144 時間 (6 日) 以降、反応はやや減退するも 336 時間 (14 日) 目から再度腫脹反応が強く観察され 768 時間 (32 日) 間まで持続した。この反応は GATA-3Tg マウスに特異的ではなく、WT マウスにおいても同程度の腫脹反応が同時間継続した。両系統ともマウスの耳介腫脹反応は同様に減退し、抗原再刺激 32 日以降には左右差はほぼ消失した。Ni-Ti 試験片移植両マウスに Ti 水溶液を用いて耳介腫脹反応を経時的に観察したところ、両群のマウスの耳介に腫脹反応は認めなかった(データ示さず)。このことから、Ni-Ti ワイヤ移植マウスにおける耳介腫脹反応は Ni 特異的な反応であった。耳介の腫脹はマウスによってばらつきが多いため、有意差の検討を AUC で比較したところ 0 日から 32 日までの総面積において GATA-3 Tg は対照群である WT と有意差があることが認められた。(図 1b)

##### (2) 試験片移植の有無によるマウスの血中抗体価

血清中 IgE 抗体産生量は、Ni-Ti ワイヤ移植 GATA-3 Tg マウスではワイヤ移植されていない GATA-3 Tg マウスと比較して約 4~5 倍高値であった(図 3A)。また、WT マウスにおいてもワイヤ移植により IgE 抗体産生量に優位差が認められた。しかし、ワイヤ

移植の有無にかかわらず GATA-3 Tg マウスおよび WT マウスの IgG1 と IgG2a 抗体価はどちらも有意差はなかった(データ示さず)。

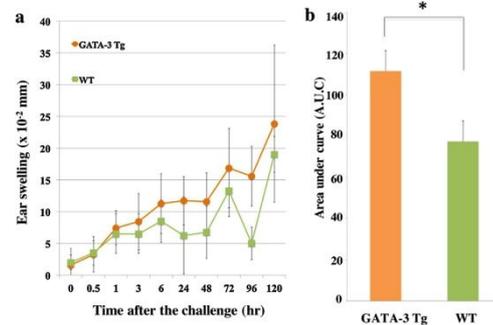


図1. Ni-Ti ワイヤ移植 GATA-3 Tg マウスの Ni に対する耳介腫脹反応

##### (3) NKT 細胞の Ni 誘発接触皮膚炎誘発における役割

NKT 細胞欠損 CD1dKO マウスにプロトコール 1 に従って Ni 感作を行い、Ni 再刺激の際の耳介腫脹反応を経時的に測定した。その結果再刺激後 1 時間目より、WT マウスにおいて CD1dKO マウスの腫脹反応より顕著に腫脹反応が観察された(図 3a 左)。AUC 法にて解析を行ったところ、CD1dKO の腫脹は WT と比較して早期において (48 時間) 約 5 倍増加していた(図 3b 右)。

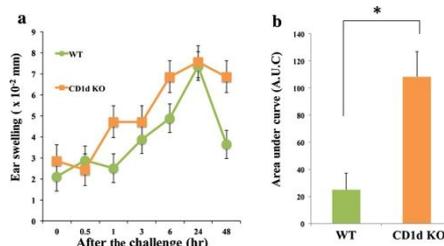


図3. Ni-Ti 試験片移植マウスの Ni に対する耳介腫脹反応(CD1d KO マウスとの比較)

また、Ni-Ti ワイヤ移植 30 日後の WT マウスに、Ni で再刺激すると同時に腹腔に NKT 細胞活性化リガンドである -GC を投与した際の耳介腫脹反応を検討した。その結果、-GC 投与マウスでは耳介腫脹反応がほぼ 100%抑制された(図 4a)。その際の血清中の IL-4 及び IFN- 産生が

亢進していた。

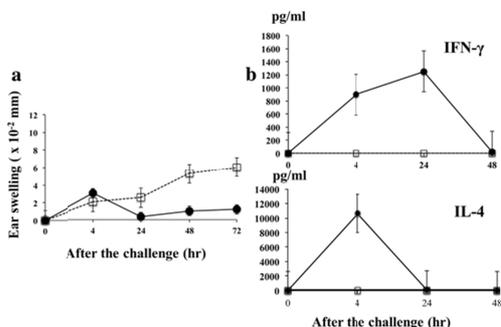


図4. -GalCer 投与による NKT 細胞活性化に伴う耳介腫脹反応とサイトカイン産生の検討

#### (4) CD4 陽性 (CD4<sup>+</sup>) 細胞移植 RAG2KO マウスの耳介腫脹の経時的変化

Ni-Ti ワイヤ移植 GATA-3 Tg マウスもしくは WT マウス脾臓中の CD4<sup>+</sup>細胞を、セルソーターを用いて分離、RAG2KO マウスに移入した。移入 24 時間後に抗原再刺激を行い経時的に耳介腫脹反応を測定した。結果、GATA-3Tg マウスと WT マウスの CD4<sup>+</sup>細胞移植 RAG2KO マウスの耳介腫脹反応は程度の差はあるものの同様の経過を示した。しかし、抗原再刺激 6 時間以降より、GATA-3 Tg マウスからの CD4<sup>+</sup>細胞移植 RAG2KO マウスに WT マウスより強い腫脹反応が観察され、それ以降 96 時間目に WT マウス CD4<sup>+</sup>細胞移入 RAG2KO マウスと比較して約 2~3 倍の強い腫脹が観察された。GATA-3 Tg マウス CD4<sup>+</sup>細胞移入 RAG2KO マウスにおいては、192 時間以降も強い耳介腫脹反応が観察されたが、WT マウス CD4<sup>+</sup>細胞移植 RAG2KO マウスの耳介腫脹反応は減退した。

#### (5) 耳介の病理学的観察

炎症部位の病理組織学的観察では、GATA-3 Tg マウスの表皮に強い炎症性の細胞浸潤やマスト細胞の浸潤が観察された。特に表皮の変化は著明で、GATA-3 Tg マウスではネクローシス様反応が観察された。その肥厚に関しても GATA-3 Tg マウスで WT マウスよりも著しいことが確認できた。

考察

本研究により、Ni 誘導接触皮膚炎において、皮膚炎の発症初期において IL-4 産生を基軸にした Th2 型免疫反応のみならず NKT 細胞の関与が示唆された。GATA-3 Tg と WT マウスにおける反応は、誘導初期 24 時間から計測 792 時間 (33 日) 目まで同じ傾向を示した。反応パターンは、120 時間 (5 日)、384 時間 (16 日) そして 720 時間 (30 日) 目にピークをもつ 3 相となった。既に、我々は第 1 相となる反応で IL-4 が、それ以降 (第 2 相) は IFN- $\gamma$  産生が反応の主体であることを報告した。しかし、GATA-3 転写因子は Th2 型免疫細胞の分化や機能のみに関与するばかりでなく NKT 細胞の分化にも関与することが示唆されている。これらのことから NKT 細胞への本実験系を用いて検討をおこなった。

NKT 細胞は、既に報告されているように IL-4 や IFN- $\gamma$  を産生するユニークな免疫担当細胞である。NKT 細胞は、主要組織適合抗原複合体拘束性にペプチドを認識する T 細胞とは異なり、CD1d 拘束性に非ペプチド性であるスフィンゴ/グリセロ糖脂質やリン脂質を抗原として認識することが明らかになっている。NKT 細胞欠損マウスを用いて Ni 誘発接触皮膚炎をプロトコール 1 に従って誘導したところ、誘導初期において WT マウスの耳介腫脹反応と比較して、AUC を検討しても統計学的に有意に腫脹が大きかった。また、NKT 細胞活性化リガンドである -GC 投与においては、耳介腫脹反応がほぼ完全に抑制された。この結果は、NKT 細胞から産生される IL-4、IFN- $\gamma$  などのサイトカインによって腫脹反応が抑制されたと考えられる。GATA-3 Tg の結果から、抗原再刺激後 48 時間で耳介組織内の IL-4 産生が亢進し、このことが耳介腫脹

反応と関連していることが推定される。一方、 $\gamma$ -GC 投与により IFN- $\gamma$  産生のピークが 16 時間とされている。時相的には  $\gamma$ -GC 投与により産生された IFN- $\gamma$  が IL-4 によって惹起される耳介腫脹反応を抑制するのではないかと推測することも可能である。図 6B に見られるように、Ni 及び  $\gamma$ -GC 投与 4 時間目に軽微ながら  $\gamma$ -GC 投与による IL-4 産生の影響を受けている可能性があるが明らかではない。

以上結果から、Ni 誘発接触皮膚炎において誘導初期に Th2 細胞や NKT 細胞が関与し、それら細胞から産生されるサイトカイン特に誘導初期では IL-4 が耳介腫脹反応に関わっていることが示唆された。他の研究グループからも IL-4 の接触皮膚炎への関与が

これまでに報告されており、我々の結果と一致するところが多い。本実験に用いた GATA-3 遺伝子に用いたプロモーターは Ick distal promoter であることから、成熟 T 細胞特異的に制御されていることが考えられ、NKT 細胞に対しても及ぼす影響は少なくないと考えられる。ちなみに GATA-3 は NKT 細胞の分化や機能に重要な役割を果たしていると言う報告もある。さらに、NKT 細胞と T 細胞の相互作用が示唆されていることは、金属アレルギーにおける発症機序を考える上で十分考慮しなければならないと考える。しかし、これまでの我々が報告した Th2 型 T 細胞は腫脹亢進、NKT 細胞は腫脹抑制と相反する機能をしていることが示唆された。したがって、金属アレルギー (Ni) では、免疫反応の時間的経過に伴いそれぞれの機能が異なるタイプの細胞が病態を構築していることが示唆され、これまでの Th1 型免疫反応

を主体とするパラダイムだけでは説明出来ない結果を得た。

近年、Ni アレルギーの発症機序について自然免疫や獲得免疫の観点から考察され報告がなされるようになってきたが、いまだ発症機序については明らかになっていない。ヒト TLR4 は Ni の特異的レセプターとしても機能すると報告されたが、TLR4 は Ni ばかりでなく Co も結合することが明らかになった。しかしながらマウス TLR4 は Ni 結合性がないので、本研究においても Ni がどのように T 細胞や NKT 細胞に認識されるか不明である。重度の Ni アレルギーを惹起したヒト T 細胞クローンは、必ずしも Ni 自体ではなく Ni<sup>2+</sup>に類似した+電荷を有するアミノ酸を含むミメティックペプチドを HLA-DR 拘束性に認識したという報告<sup>23)</sup>がなされているので、Ni に対するアレルギー反応の理解には様々な免疫担当細胞の応答様式や特殊機能が関与しているものと推定される。

Gfi1 転写因子は、Th1 型免疫反応を抑制する転写因子であることから、本実験においてノックアウトマウスを用いた場合、強い耳介腫脹反応が抑制された。本内容については、論文の を、読まれてほしい。

また、表面改質の検討について、Ni-Ti の場合での検討で Ni の溶出を抑制することがアレルギー誘発を抑制することを既に明らかにしている。しかし、生体材料として扱う場合、生体との親和性も重要な問題から材料の表面改質を行い、金属の溶出と細胞との親和性の両方を兼ね備えた方法での改質が重要とされることも明らかになり、現在その検討を進めている段階である。

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 3 件)

Kiyama Koshiro, Miki Masahito, Tamauchi Hidekazu, Morita Msafumi. Change of absorptivity with glycoprotein on the Ti-Ta-Sn alloy by UV irradiation. Material Science and Technology of Japan. 査読あり 54(2), 2017, 80-82.

Okuno Hironori, Satoh Masato, Takeuchi Emiko, Eshima Koji, Terashima Masafumi, Komotori Jun, Habu Sonoko, Tamauchi Hidekazu, Iwabuchi Kazuya. Inhibitory function of NKT cells during early induction phase of nickel allergy. Immunobiology, 査読あり 221(7), 2016, 833-838.  
DOI: 10.1016/j.imbio.2016.01.012

Suzuki Junpei, Maruyama Saho, Tamauchi Hidekazu, Kuwahara Makoto, Horiuchi Mika, Mizuki Maho, Ochi M, Sawasaki T, Zhu Jinfang, Yasukawa Masataka, Yamashita Masakatsu. Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the T helper type 1 programme in activated CD4 T cells. Immunology, 査読あり 147(4), 2016, 476-487.  
DOI: 10.1111/imm.12580

〔学会発表〕(計 4 件)

水木真帆、丸山砂穂、玉内秀一、山下政克、転写制御因子 Gfi-1 ノックアウトマウスを用いた金属アレルギーの発症機序 -Gfi-1 は Th1 細胞分化を負に制御する- 文部科学省 GP/基礎 GP 医学・医療の高度化の基礎を担う基礎研究医の養成、第 15 回医科学研究発表会抄録、2014、

玉内秀一、生体材料とニッケアレルギー、SMA シンポジウム 2014 抄録集、2014、5-7

Maruyama Saho, Mizuki Maho, Kuwahara Makoto, Zhu Jinfang, Tamauchi Hidekazu, Yamashita Masakatsu. Gfi1 negatively regulates murine Nickel allergy through inhibition of Th1 differentiation. The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of The Japanese society for Immunology, Proceeding 43,2017, p178

堀内美香、鈴木淳平、水木真帆、丸山砂穂、玉内秀一、安川正貴、山下政克、転写制御因子 Gfi1 は Th1 細胞分化と Th1 型アレルギーを負に制御する。第 64 回日本アレルギー学会学術集会、抄録集、

64 (3,4) 2015、p573

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉内 秀一 (TAMAUCHI HIDEKAZU)  
愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授  
研究者番号：60188414

(2) 研究分担者

小茂鳥 潤 (KOMOTORI JUN)  
慶応義塾大学・理工学部・教授  
研究者番号：30225586

(3) 連携研究者

山下 政克 (YAMASHITA, KATSUMASA)  
愛媛大学大学院・医学系研究科・教授  
研究者番号：00311605