

令和 元年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20443

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた歯科用重金属における遅延型アレルギー反応の病態解明

研究課題名(英文) Establishment and pathomechanism clarifiant in metal allergy cross-reaction mouse model

研究代表者

重松 宏昭 (Shigematsu, Hiroaki)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：80737198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：金属アレルギーは掌蹠膿疱症などの難治性の合併症を引き起こすことにより、患者のQOLを著しく妨げており、早期の病態解明や診断法の確立が望まれている。本研究では、金属アレルギー交差反応マウスモデルを作製し、原因となるT細胞の受容体を詳細に解析し、金属アレルギー交差反応の病態解明を行うことを目的とした。本研究の結果、ヒト金属アレルギー交差反応の病態に類似したマウスモデルを作製することができた。また、原因となるT細胞の受容体の遺伝子情報を解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属アレルギー患者は増加傾向にあり、難治性の合併症も引き起こし患者のQOLを妨げている。金属アレルギーの詳細な病態については、動物モデルが存在していなかったため、不明な点が多い。本研究では、ヒト金属アレルギーの病態に類似したマウスモデルを作製することに成功し、T細胞の受容体解析では、原因となる遺伝子情報の解析に成功することができた。本研究の成果は、新規診断・治療体系の確立の基盤となり、この分野の研究が加速されることが考えられる。本研究で得られた金属アレルギー交差反応に関わるT細胞の遺伝子情報が、科学的根拠に基づいた安全な歯科医療の確立に寄与することが予想される。

研究成果の概要(英文)：Metal allergy significantly deteriorates patients' QOL by causing intractable complications, such as palmoplantar pustulosis, and it has been awaited that metal allergy is pathologically understood and diagnostic methods are established. In this study, the metal allergy mouse model was employed for the detailed analysis of TCR in T cells which involved in the cross-reactivity among different metals, in order to elucidate antigen-specific immune responses of T cells involved in the development of allergy to dental materials composed of various metals. This study demonstrated the successful establishment of the metal allergy cross-reaction mouse model with appropriate pathology. In addition, we observed that allergen specific T cells used a specific TCR repertoire in metal allergy cross-reaction mouse model.

研究分野：口腔外科学

キーワード：金属アレルギー 交差反応 マウスモデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

金属アレルギーは、T細胞によって引き起こされる遅延型アレルギー反応であるが、適切な動物モデルが存在していなかったため、時系列的な病態が不明であり、病態発症メカニズムについては不明な点が多いとされてきた。近年、ピアスなどの金属装飾品をつける人口の増加や、歯科における補綴・インプラント治療などの医療技術の発展による金属曝露の機会の増大に伴って、患者数は増加傾向にあると言われている。また、掌蹠膿疱症などの難治性の合併症を引き起こすことにより、患者のQOLを著しく妨げており、早期の病態解明や診断法の確立が望まれている。

これまでに研究代表者は、ヒトの金属アレルギーの病態に類似したマウスモデルの確立に成功しており、アレルギー発症や病態形成に関わる抗原特異的なT細胞を論文報告している。歯科用金属として最も頻度の高いパラジウム(以下Pd)、金属アレルギーの原因として最も頻度の高いニッケル(以下Ni)、職業性金属アレルギーとして最も頻度の高いクロム(以下Cr)の3種類の金属溶液を用いてマウス足底部にアレルギーを発症させ、ヒト金属アレルギーと類似した病態作製(表皮の海綿状浮腫やT細胞浸潤)や、局所炎症巣に浸潤しているT細胞に対してT cell receptor (TCR) レパトア解析を行い、金属アレルギー発症にNKT細胞や金属特異的T細胞が深く関与していることを解明してきた。

これまで金属アレルギーの診断はパッチテストが主とされているが、単一の金属溶液のみならず複数の金属溶液に陽性反応を示すいわゆる交差反応が起こることが多く必ずしも臨床症状を反映していないことが多い。

この交差反応をマウスで行っている実験の報告はあるがいずれも腫脹の評価のみであり、アレルギーの主体であるT細胞の詳細な解析を行っている報告はない。そこで、研究代表者が製作した金属アレルギーモデルマウスを用いて異種金属間での交差反応に関与するT細胞のTCRを詳細に解析することで、複数の金属から成る歯科用金属材料のアレルギー発症に関与するT細胞の抗原特異的な免疫応答の解明が出来るのではないかとこの着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が製作した金属アレルギーマウスモデルを用いて、歯科用金属による遅延型アレルギー反応に関与するT細胞の動態を明らかにすることを目的とする。具体的には、マウスモデルに感作相と誘導相で異なる金属溶液を注射し、マウス足底部にアレルギーを発症させ、腫脹の経時的変化を観察するとともに、アレルギー交差反応を惹起するT細胞浸潤を病理学的に検索する。さらに、T細胞受容体のレパトア解析を行い、病態形成に関わるT細胞を明らかにしていく。歯科金属アレルギー交差反応の発症・病態形成のメカニズム解明に迫り、将来的には新たな診断・治療体系の確立を目指すものとする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 金属アレルギー交差反応マウスモデルの製作

BALB/c 5匹の膝窩リンパ節周囲に金属溶液(CrCl<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub>, or NiCl<sub>2</sub>)+LPS溶液を注射することで感作を行った。感作を2回行った後、足底部に感作した金属とは異なる金属溶液を皮内注射し誘導を3回行った。対照として、感作および誘導時に生理食塩水を足蹠に皮内注射したBALB/c 5匹を用いた。誘導3回終了後、足底部への誘導後1・3・7日目の腫脹を測定した。

#### (2) 病理学的ならびに免疫組織学的検討

採取した足底部サンプルを通常に従ってパラフィン包埋し、厚さ4mmの連続切片を作成する。HE染色を行い、上皮の組織破壊像の有無を確認する。さらに、T細胞浸潤を確認するため、CD3, CD4, CD8の免疫組織学染色を行った。

#### (3) 定量PCR解析

足底部への注射から7日後の足底部組織からRNAを抽出しcDNAを合成した後、Th1サイトカイン(IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2), Th2サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-6), 各種アポトーシス因子の遺伝子発現量を定量PCR法により解析した。

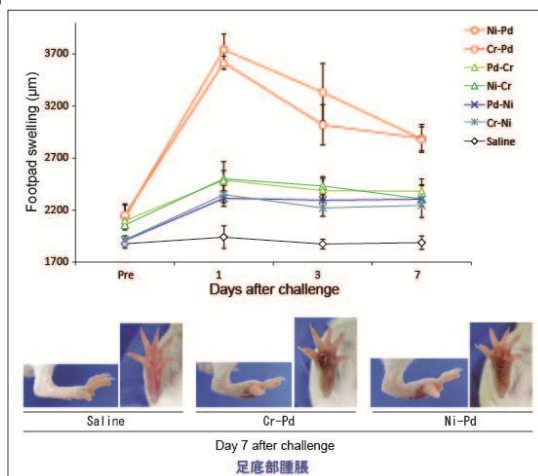
#### (4) TCRレパトア解析

誘導Pd群の足底部組織より抽出したRNAからcDNAを合成し、Adaptor Ligation法を用いてTCR遺伝子を増幅した。次世代シーケンサー(Illumina Miseq paired-end platform)を用いてTCR遺伝子上に存在するV, J遺伝子の発現頻度、およびComplementarity-determining region 3 (CDR3)領域における塩基配列を網羅的に解析した。

## 4. 研究成果

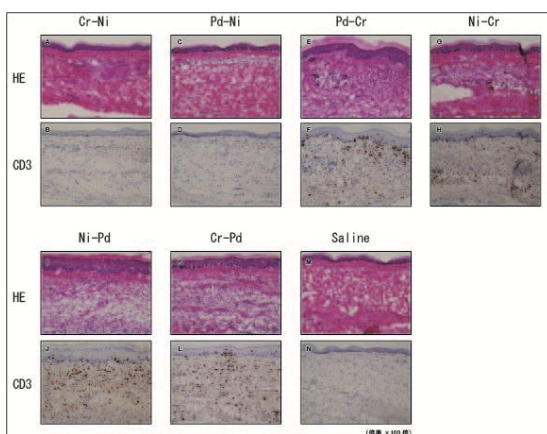
### (1) 金属アレルギー交差反応マウスモデルの製作

全ての群において足底部注射後1日目で腫脹は最大となった。腫脹を強く認めたのは、誘導Pd群であった。誘導Ni群や誘導Cr群の腫脹は、同程度であった。

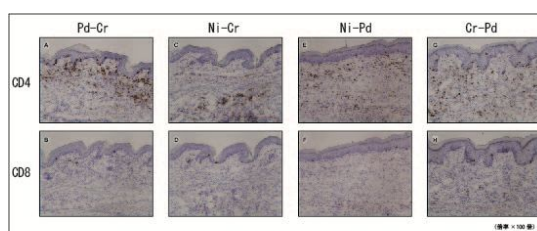


### (2) 病理学的ならびに免疫組織学的検討

誘導Pd群および誘導Cr群において、ケラチノサイトの海綿状浮腫、上皮内および上皮外組織へのCD3陽性T細胞の浸潤を認めた。対照群や誘導Ni群では、上皮内やその周囲へのCD3陽性T細胞の浸潤は認められなかった。CD3陽性T細胞の浸潤を認めた誘導Pd群および誘導Cr群のCD4, CD8の染色を行ったところ、CD4陽性T細胞の浸潤を認めた。一方、CD8陽性T細胞は、殆ど認められなかった。



病理組織学的ならびに免疫組織化学的検素 (CD3)



免疫組織化学的検素 (CD4, CD8)

### (3) 定量PCR解析

誘導Pd群においてTNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, Granzyme A, Granzyme Bの遺伝子発現量は、対照群に比べて有意に上昇していた。また、誘導Cr群においては、Fas, FasLの高発現を認めた。

### (4) TCRレパトア解析

TCRレパトア解析結果では、感作Ni-誘導Pd群および感作Cr-誘導Pd群ともに、Trav8d1-Traj49を有するT細胞が最も多く認められた。また、Trav11d-Traj18を有するNKT細胞も認められた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nakasone Y, Kumagai K, Matsubara R, Shigematsu H, Kitaura K, Suzuki S, Satoh M, Hamada Y, Suzuki R.

Characterization of T cell receptors in a novel murine model of nickel-induced intraoral metal contact allergy.

PLoS One. 2018 Dec 17;13(12):e0209248. doi: 10.1371/journal.pone.0209248. 査読有

Matsubara R, Kumagai K, Shigematsu H, Kitaura K, Nakasone Y, Suzuki S, Hamada Y, Suzuki R. Fexofenadine Suppresses Delayed-Type Hypersensitivity in the Murine Model of Palladium Allergy.

Int J Mol Sci. 2017 Jun 25;18(7). pii: E1357. doi: 10.3390/ijms18071357. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

重松宏昭, 熊谷賢一, 松原陵太, 仲宗根康成, 鈴木隆二, 濱田良樹  
金属アレルギー交差反応マウスモデルの作製と病態解明について  
第63回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 2018年

## 6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：濱田 良樹，鈴木 隆二，熊谷 賢一

ローマ字氏名：Hamada Yoshiki, Suzuki Ryuji, Kumagai Kenichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。