

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11329

研究課題名(和文)チタンアレルギーの病態機序および生体反応に関わる免疫学的研究

研究課題名(英文)Immunological analysis of pathogenesis and immune response in titanium allergy

研究代表者

濱田 良樹 (HAMADA, Yoshiki)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70247336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：チタンは科学的根拠に基づいた安全性が確立された金属として歯科領域や整形外科領域で広く使用されている。しかしながら、チタンアレルギー反応に対する特異的 T 細胞の同定、誘導機構や T 細胞による抗原認識機構などの詳細は全く不明であり、さらには金属が如何なる生体内蛋白と関係して抗原性を有するのか解明すべきことが多い。本チタンアレルギーモデルマウスにおける解析により、NK T細胞およびMAIT細胞による自然リンパ球がチタンアレルギーの病態発症および免疫制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Titanium alloy has long been regarded as a biocompatible material, and is widely used for implants in medicine and dentistry. Titanium is thought to be a potential cause of metal allergy, however, accumulating T cells during development of titanium allergy have been poorly characterized because basic research based on a suitable animal model has not been performed. This study aimed to investigate the skewing of the T-cell receptor repertoire and cytokine profiles of accumulated T cells in inflamed skin during titanium allergy. Characterization of the TCR repertoire revealed the presence of the TRAV10/TRAJ18 clonotype, indicative of natural killer T cells, and TRAV1/TRAJ33, associated with mucosal-associated invariant T (MAIT) cells in the inflamed skin of both the irritant and allergic mice models. Thus our murine model of titanium-induced hypersensitivity shows that NKT cells and MAIT cells participate in titanium allergy.

研究分野：口腔外科

キーワード：チタンアレルギー TCR T細胞受容体 NK T細胞 MAIT細胞

### 1. 研究開始当初の背景

チタンはオッセオインテグレーションという性質を有することから、科学的根拠に基づいた安全性が確立された金属として歯科領域や整形外科領域で広く使用されている。しかし、生体内での骨接合を阻害するチタンアレルギー反応の報告が散見されるようになり、その免疫学的な解明が急務とされている。しかしながら、チタンアレルギー反応に対する特異的 T 細胞の同定、誘導機構や T 細胞による抗原認識機構などの詳細は全く不明であり、さらには金属が如何なる生体内蛋白と関係して抗原性を有するのか解明すべきことが多い。申請者は IV 型アレルギー反応の中核を担い、チタンアレルギー発症に直接関与する T 細胞の特異性と免疫学的病態の解明が急務と考え、本研究の立案に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では世界に先駆けてチタンアレルギー動物モデルを確立し、チタンアレルギーに関わる T 細胞受容体遺伝子(TCR)による獲得免疫機構に主眼を置いた研究を行う。これらのマウス TCR 遺伝子発現解析情報は、チタンアレルギー発症に関与する T 細胞の抗原特異性遺伝子ライブラリ構築を可能とし、パッチテストに代替する新たな診断体系の確立を目的とした。

### 3. 研究の方法

遅延型アレルギー性皮膚炎(ACD)マウスモデルとして、BALB/c (6 週齢,雌) 5 匹の鼠径部に TiCl<sub>3</sub>・LPS 混合溶液を注射することで感作し、足底部への TiCl<sub>3</sub> 溶液の皮内注射で誘導を行った。刺激性皮膚炎(ICD)マウスモデルとして、感作をせずに足底部への TiCl<sub>3</sub> 溶液の皮内注射を行った BALB/c 5 匹を用い、足底部への注射から 1, 3, 7 日後の腫脹を測定した。TCR レパトア解析：誘導後 7 日目の ICD および ACD マウス足底部に存在する T 細胞の TCR レパトアならびに CDR3 領域について次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

### 4. 研究成果

ACD 群では誘導後 7 日目で足趾部の腫脹は最大となり、CD3 陽性 T 細胞は浮腫や海綿状変化を伴った上皮基底層周囲への浸潤が最大となった(図 1-4)。一方、ICD 群では誘導後 7 日目にかけて少量の T 細胞浸潤が認められたが、対照群では認められなかった(図 1-4)。TCR 解析により誘導後 7 日目では ICD, ACD 群の各個体ともに TCR VA14Ja18/VB8-2 を有する NK T 細胞が各種抗原特異的 T 細胞を伴って検出された。さらに、チタンアレルギーマウスの炎症局所に

高頻度で特異的な TCR Va 遺伝子を有する自然リンパ球である NK T 細胞および MAIT 細胞が検出された(図 5)。

NK T 細胞および MAIT 細胞は自然リンパ球として知られており、自然免疫細胞と獲得免疫細胞の中間的性質を持ち、クローン増殖を介さずに迅速にエフェクター機能を発揮し、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを担うユニークな細胞として様々な免疫応答に関与している。

本チタンアレルギーモデルマウスにおける解析により、NK T 細胞および MAIT 細胞による自然リンパ球がチタンアレルギーの病態発症および免疫制御に関与している可能性が示唆された。

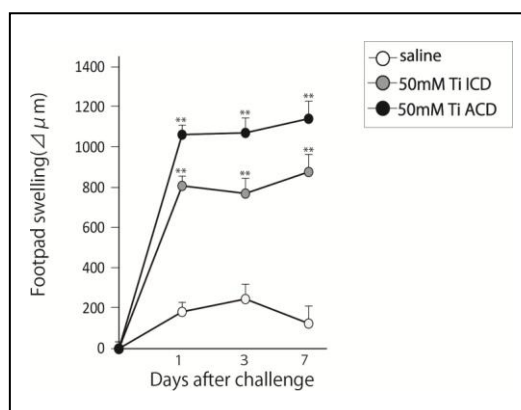


図 1：足底部の腫脹の変化

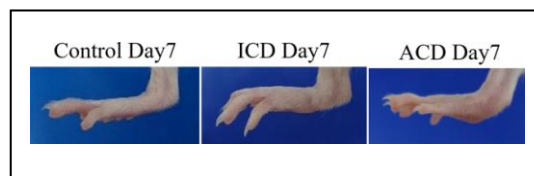


図 2：誘導後 1 週間での足底部の腫脹

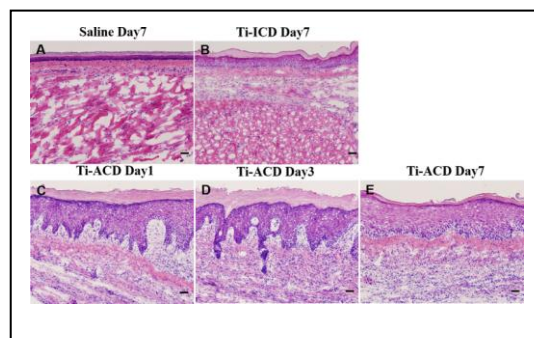


図 3：誘導後 1 週間での足底部の H E 染色

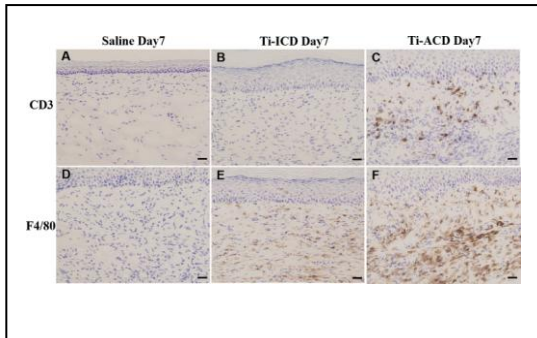


図 4: 誘導後 1 週間での足底部の免疫染色結果 (CD3・F4/8)

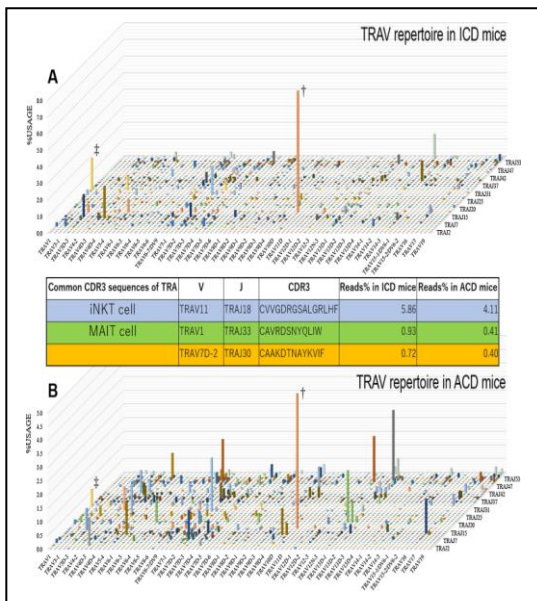


図 5: 誘導後 1 週間での足底部組織中の TCR VA 解析結果

## 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 2 件)

- ① Possible involvement of invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in a murine model of titanium allergy  
 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 査読有 1-9 2018  
 doi.org/10.1016/j.ajoms.2017.08.001  
Kenichi Kumagai, Ryota Matsubara, Yasunari Nakasone, Hiroaki Shigematsu, Kazutaka Kitaura, Satsuki Suzuki, Yoshiki Hamada, and Ryuji Suzuki

- ② Possible Immune Regulation of Natural Killer T Cells in a Murine Model of Metal Ion-Induced Allergic Contact Dermatitis.  
 International journal of molecular science 査読有 2016, 17, 87  
 doi: 10.3390/ijms17010087.

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.

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 熊谷賢一, 松原陵太, 重松宏昭, 仲宗根康成, 鈴木隆二, 濱田良樹  
 チタンアレルギー発症に関与する T 細胞の解明について  
 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2017 年

- ② 仲宗根康成, 熊谷賢一, 松原陵太, 重松宏昭, 鈴木隆二, 濱田良樹  
 口腔粘膜におけるニッケルアレルギーモデルマウスの確立と病態解明  
 第 62 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 2017 年

- ③ 松原陵太, 熊谷賢一, 重松宏昭, 仲宗根康成, 江口貴紀, 鈴木隆二, 濱田良樹  
 Pd アレルギーモデルマウスにおけるフェクソフェナジンの免疫応答抑制効果について  
 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2017 年

- ④ 熊谷賢一, 松原陵太, 重松宏昭, 仲宗根康成, 江口貴紀, 鈴木隆二, 濱田良樹  
 チタンアレルギーモデルマウスの作製と遅延型アレルギー免疫応答の解明について  
 第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2016 年

- ⑤ 松原陵太, 熊谷賢一, 仲宗根康成, 重松宏昭, 鈴木隆二, 濱田良樹  
 パラジウムアレルギーモデルマウスにおける抗ヒスタミン薬投与による免疫応答抑制効果  
 第 61 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 2016 年

- ⑥ 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  
 金属アレルギー発症に関わる NK T 細胞による免疫応答について  
 第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2015 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

濱田 良樹 (HAMADA, Yoshiki)  
 鶴見大学・歯学部・教授  
 研究者番号: 70247336

(2) 研究分担者

熊谷 賢一 (KUMAGAI, Kenichi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号: 10518129

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