

依 頼 論 文

◆特集：臨床イノベーションのための若手研究者の挑戦：治療，検査法の新たな展開

皮膚免疫機構を利用した金属アレルギー検査方法開発へのアプローチ

渡邊 恵

Development of the new method of metal allergy testing

Megumi Watanabe, DDS, PhD

抄 録

金属アレルギーは歯科治療を困難にする疾患のひとつである。特に補綴領域では、修復材料として日常的に金属を用いるため、金属アレルギー患者への対応が避けられない。

我々は、これまでにニッケルアレルギー発症モデルマウスを開発し、分子細胞学的、病理学的なアプローチで病態解析を行い、ニッケルアレルギー発症部位の上皮下に存在する樹状細胞上で、MAP キナーゼ経路、特に MKK6/p38 経路に活性化がみられることと、この経路の活性化を制御するとアレルギーの病態自体も制御できることを見出した。

和文キーワード

金属アレルギー，ニッケル，免疫

I. はじめに

金属アレルギーは遅延型アレルギー反応の一種であり、複雑な免疫機構を介して発症する疾患である。歯科用金属が発症原因になることも多く、日常的に金属を用いる補綴歯科治療では、患者が金属アレルギーであることが、その治療プロセスを複雑にすることもある。

歯科用金属アレルギーに対する診断方法にはパッチテストが用いられることが多く、治療方法は原因金属を除去してアレルゲンを含まない材料に置き換えることが主体である。これらは患者の肉体的、精神的、経済的な負担を伴うため、より簡便な診断、治療方法の開発が求められているが、これまで金属アレルギーに関わる病態を詳細に解析した研究が非常に少なかった。

貴金属や歯科用合金として日常用いられている金属の中でも、特にニッケル (Nickel ; Ni) は強力なアレルゲンの一つである。Ni に対するアレルギー反応において、リンパ球の一種である T 細胞と、強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (Dendritic cells ; DC) による免疫反応が発症機構に関わっていると考えられており、ヒトやマウスでは、Ni 特異的な T 細胞の免疫反応がアレルギー発症に重要な役割を果たしているという報告がある¹⁻³⁾ が、実際の発症メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

そこで我々は、金属アレルギーに対する新たな診断方

法を開発することを最終目標として、Ni アレルギーモデルマウスを作製して免疫学的なアプローチを中心に病態の解析を試みた。

II. Ni アレルギーの分子病態解析

1. 金属アレルギーモデルマウスの開発

6-8 週齢 C57BL/6J 雌マウスに Ni 溶液を 2 回投与する方法でアレルギーを惹起させた^{4,5)}。発症したアレルギー反応を観察したところ、我々が作製したモデルマウスではコントロール群と比較して耳介皮膚に発赤と腫脹がみられ (図 1)，このモデルは Ni に対するアレルギーを発症していると考えられた。

2. Ni アレルギーモデルマウス耳介皮下に浸潤する細胞の同定

アレルギー発症マウスの耳介皮膚を免疫組織化学により観察すると、浸潤細胞の主体は T 細胞であることが明らかとなった (図 2a)。さらにフローサイトメーターで浸潤している細胞のフェノタイプを観察した結果、アレルギー発症群では CD4⁺ T 細胞と CD11c⁺ DC の有意な増加を認め、CD8⁺ T 細胞浸潤量には差がみられなかった (図 2b)。

そこで Ni を投与していない正常マウスより抽出した T 細胞と DC を Ni で刺激した後、それぞれをナイーブな

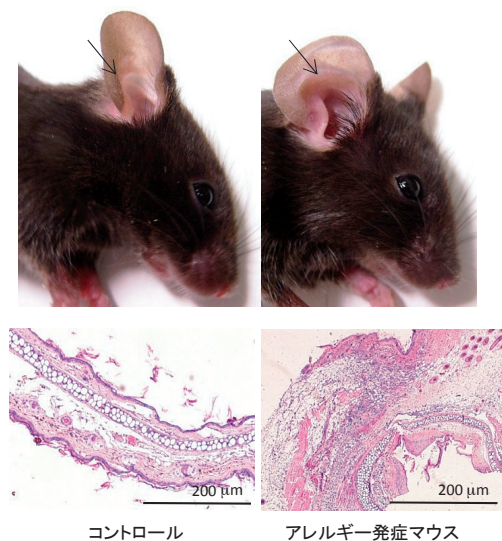


図 1 Mouse ear swelling test in Ni-allergy model
Ni アレルギー発症マウス耳介腫脹反応
Ni アレルギー発症マウス(右)では著明な耳介の発赤、腫脹が認められた。

マウス体内に移入して耳介皮膚にアレルギーを誘発したところ、どちらの細胞を移入したマウスでもアレルギーを発症することが確認できた(データ省略)。すなわち、Ni が体内で抗原として取り扱われる際に、T 細胞と DC が関与していることが強く示唆された。

3. DC 上に発現するシグナル伝達物質の解析

多くのシグナル伝達経路の中でも MAP キナーゼが上皮に存在する DC の免疫反応時の活性化に重要な役割を果たしており⁶⁾、特にヒトのアレルギー反応では、MKK6/p38 経路が特異的に活性化していることが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。そこで我々は、この MKK6/p38 経路に着目し、Ni アレルギー発症時のモデルマウス耳介皮膚での動態を解析した。マウス骨髄より分化誘導した DC に Ni で刺激を加えた後抽出したタンパクをウェスタンブロット法で解析したところ、Ni アレルギー発症マウスでは MKK6 と p38 が活性化していることが明らかとなった(図 3)。

in vitro で確認した MKK6 の活性化が実際のマウス体内でもみられる現象であるか否かを検討するために、Ni アレルギーを発症しているモデルマウス耳介皮膚から上皮シートを作製し、上皮に存在する DC 上の MKK6 の活性化を観察した。アレルギー発症マウス上皮では DC 上の MKK6 に活性化を認めたが、刺激を加えていないコントロール群では活性化がみられなかった(図 4)。*In vitro*, *in vivo* 両方で同様の結果が得られたことから、この MKK6 の活性化がアレルギー発症に何らかの役割を果たしていると考えられた。

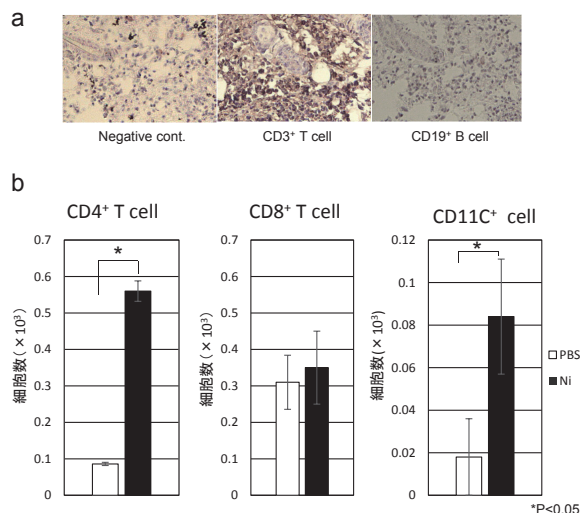


図 2 Cell infiltrations in the skin tissue

Ni アレルギー発症マウス耳介皮下に浸潤する細胞
a: 免疫染色すると、浸潤する細胞の主体は T 細胞であった。
b: FACS でさらに解析した結果、CD4⁺ T 細胞と CD11C⁺ DC の有意な浸潤を認めた。

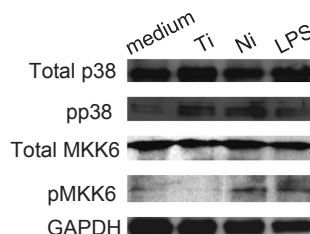


図 3 MAP kinase expressions in BMDCs stimulated with Ni
培養 DC 上に発現する MAP キナーゼの解析
Ni で刺激した DC 上には MKK6/p38 の活性化を認めた。

4. MKK6 による Ni アレルギー発症の調節

そこで我々は、siRNA を用いてマウス局所での MKK6 発現を抑制し、Ni に対するアレルギー反応がどのように変化するのか検討した。siRNA をマウス耳介皮下に事前投与して MKK6 発現を抑制した後、モデルマウス作製方法と同様にアレルギーを誘導した結果、MKK6 siRNA 投与群では、コントロール群と比較して有意に耳介腫脹量が減少した(図 5)。また、逆に DC 上の MKK6 の発現を増強した DC をマウスに移入するとアレルギー症状が増強され(データ省略)、アレルギー症状を調節することに成功した。以上の結果より、DC 上に発現する MKK6 の活性化がマウスのアレルギー発症に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

III. おわりに

近年、オーダーメイド型医療の一環として、マイクロアレイ等を用いた患者個々の個性に合わせた治療法の研究開発が進んでいる。補綴分野においても、補綴治療を全身の中の補綴という観点からとらえて、新たな検査方

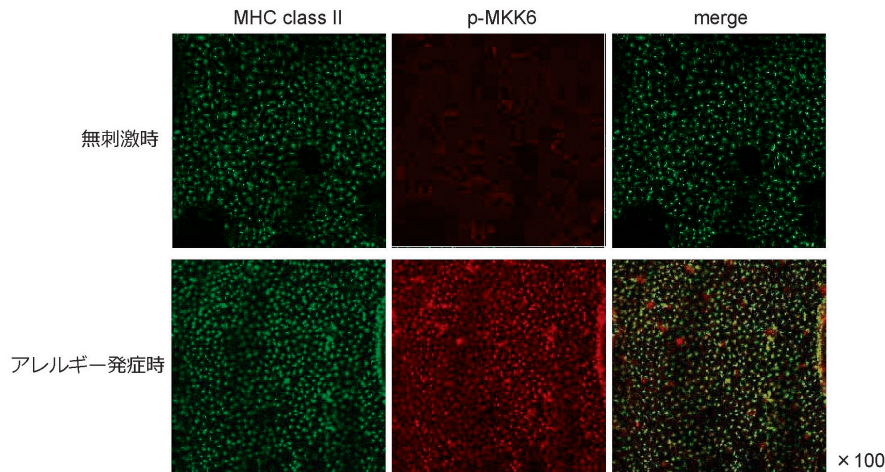


図4 Phosphorylation of MKK6 in DC in the skin tissue
マウス耳介上皮に存在する DC 上での MKK6 の活性化
Ni アレルギー発症時には、DC 上で MKK6 が活性化することが明らかとなった。

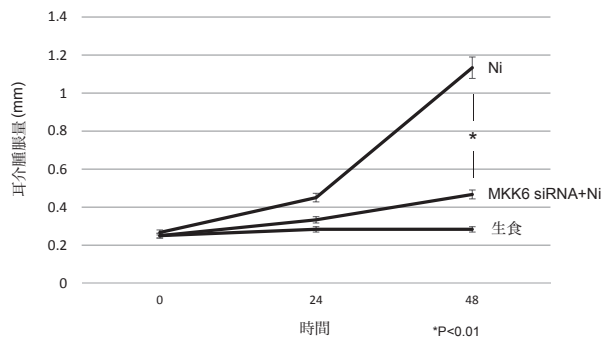


図5 Regulation of Ni-allergy symptoms by MKK6 siRNA
siRNA による Ni アレルギー症状の調節
MKK6 siRNA 投与群では、Ni アレルギー反応の減弱を認めた。

法の開発、あるいは補綴前のリスク因子判定方法の開発等により、オーダーメイド型医療に参入できる可能性があると考えられる。

本研究結果を応用するためには、我々が見いだした DC 上で活性化される MKK6 を利用した新たな検査方法に応用できるよう、歯科用金属材料に対する生体反応を免疫学的にさらに検証する必要がある。

文 献

- 1) Sinigaglia F, Scheidegger D, Garotta G, Scheper R, Pletscher M, Lanzavecchia A. Isolation and characterization of Ni-specific T cell clones from patients with Ni-contact dermatitis. *J Immunol* 1958; 135: 3929-3932.
- 2) Kapsenberg ML, Wierenga EA, Stiekema FE, Tiggeleman AM, Bos JD. Th1 lymphokine production profiles of nickel-specific CD4⁺T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals. *J Invest Dermatol* 1992; 98: 59-63.
- 3) Moed H, Boorsma DM, Stoof TJ, von Blomberg BM, Bruynzeel DP, Scheper RJ, et al. Nickel-responding

T cells are CD4⁺ CLA⁺ CD45RO⁺ and express chemokine receptors CXCR3, CCR4 and CCR10. *Br J Dermatol* 2004; 151: 32-41.

- 4) Artik S, von Vultee C, Gleichmann E, Schwarz T, Griem P. Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states. *J Immunol* 1999; 163: 1143-1152.
- 5) Watanabe M, Ishimaru N, Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Ichikawa T, et al. A novel DC therapy with manipulation of MKK6 gene on nickel allergy in mice. *PLoS One* 2011; 6: e19017.
- 6) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
- 7) Boisleve F, Kerdine-Romer S, Pallardy M. Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha. *Toxicology* 2005; 206: 233-244.
- 8) Jorgl A, Platzer B, Taschner S, Heinz LX, Hoher B, Reisner PM, et al. Human Langerhans-cell activation triggered in vitro by conditionally expressed MKK6 is counterregulated by the downstream effector RelB. *Blood* 2007; 109: 185-193.
- 9) Miyazawa M, Ito Y, Kosaka N, Nukada Y, Sakaguchi H, Suzuki H, et al. Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO₄. *J Toxicol Sci* 2008; 33: 51-59.
- 10) Trompezinski S, Migdal C, Tailhardat M, Le Varlet B, Courtellemont P, Haftek M, et al. Characterization of early events involved in human dendritic cell maturation induced by sensitizers: cross talk between MAPK signalling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 230: 397-406

著者連絡先：渡邊 恵

〒770-8504 徳島市蔵本町 3-18-15
Tel: 088-633-7347 (内線 蔵本 5267)
Fax: 088-633-7461
E-mail: megwat@tokushima-u.ac.jp