

## 生体内金属溶出と金属アレルギーの誘発機構の研究

### [1] 組織

代表者：平澤 典保  
(東北大学大学院薬学研究科)  
対応者：小笠原 康悦  
(東北大学加齢医学研究所)  
分担者：中林 孝和  
(東北大学大学院薬学研究科)

研究費：物件費 35 万円

### [2] 研究経過

中高年者になると、歯の喪失や血管狭窄など加齢に伴う疾患が増加する。近年、その機能回復のために、生体材料として金属を含む医療機器を体内に埋植する治療が進められている。一方、このような金属系生体材料からの金属イオンの溶出は炎症反応や金属アレルギー応答を誘発するなどの問題が指摘されている。そのため、特に工学分野を中心として、金属側に着目した溶出抑制策がとられているが、その対策は未だ十分であるとは言えない。我々は金属溶出における生体と金属の相互作用に着目し、薬学的にこれを防止するための研究を進め、すでに、金属イオンによる初期炎症が、更に金属溶出を増大させる増悪化サイクルの存在を明らかにしている。一方、加齢医学研究所小笠原教授は、金属アレルギーに関わる T 細胞のサブセットの同定など、免疫学的アプローチから金属アレルギーの進展を解析している。そこで、小笠原教授との共同研究により、生体と金属の相互作用による金属溶出から、金属イオンによる炎症・免疫応答の誘発と金属アレルギーへと進展する過程を、マウス個体レベルで解明することを目指す。特に本研究期間では、金属に対する生体の初期応答として金属周囲組織の酸性化機構を解析し、抗炎症薬の効果並びに続く免疫応答との関連性を明確にする。さらに、酸性化ならびに金属溶出を抑制する薬物が金属アレルギー応答を抑制できるかどうかを解析して、金属アレルギーの新たな治療戦略を提言することを目的とする。

### [研究活動状況]

本研究は、薬学研究科並びに加齢医学研究所で実施した。金属濃度の測定、炎症応答の解析、免疫応

答の解析等、情報交換をしながら、研究を推進した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本研究では、ICP-MS による組織中ならびに細胞内の金属イオン濃度の測定を行うことにより、金属イオン溶出機構、その後の炎症・アレルギー反応誘発機構について解析した。

#### 1. ニッケルによる炎症反応とニッケル溶出増大機構の解析

ICR マウス背部皮下にニッケル線を埋入するニッケル線埋入モデルを用いて、ニッケル溶出の制御機構を解析した。ニッケル線を埋入するとニッケルイオンにより COX-2 が誘導されること、その発現細胞は数時間後では線維芽細胞であり、その後浸潤した好中球にも発現することを明らかにした。COX-2 阻害薬投与は白血球浸潤、並びにニッケルの溶出を抑制した。さらに、抗好中球抗体で好中球浸潤数を低下させた場合、また、ライソゾーム阻害薬であるクロロキンを投与した場合にもニッケル溶出は抑制された。一方、COX-2 阻害薬は炎症組織での乳酸産生酵素の増大を抑制すること、*in vitro* の実験系において PGE<sub>2</sub> は線維芽細胞の乳酸産生酵素の発現を増加させて乳酸産生を増大することを見出した。また、ニッケル線埋入により、ヒスタミンの産生が亢進し、このヒスタミンが、好中球浸潤を抑制して、結果的に金属溶出に対して抑制的に作用していることも見出した。これらのことから、ニッケル線周囲に浸潤した好中球からのライソゾーム放出、並びに周囲組織からの乳酸産生増大により、ニッケル線周囲の酸性化が誘導され、これがニッケル溶出を増大させていることが示唆された (図1)。

#### 2. クロムアレルギーモデルにおける COX-2 阻害薬の効果

クロムアレルギーモデルにおいて、アレルギー誘発相における COX-2 阻害薬の効果を検討した。C57BL/6 マウスを CrCl<sub>2</sub>+LPS で 2 回感作し、CrCl<sub>2</sub> を足蹠に注射してアレルギーを誘発した。COX-2 阻害薬は CrCl<sub>2</sub> 惹起による浮腫形成、インターフェロンの産生、T 細胞の浸潤を抑制した。したがって、COX-2 は金属溶出に寄与するだけでなく、アレルギー誘発相においても炎症反応増大に寄

与していることが示唆された。

### 3. ニッケルイオンの起炎作用機序の解析

ニッケルイオン及びコバルトイオンの炎症誘発機構として、ヒトマクロファージ株 THP-1 を用いて解析した。THP-1 を  $\text{NiCl}_2$  存在下でインキュベートすると、濃度依存的に細胞内ニッケル濃度の上昇、IL-8 の産生増大が認められた。ニッケルイオン及びコバルトイオンは、類似の作用機構を持つ金属アレルギー原因金属であるが、THP-1 による IL-8 の産生作用はニッケルの方が著しく強いことを見出した。これらの金属はいずれも転写因子 HIF-1 を安定化させ、タンパク量を増加させる作用を持つことが知られているが、その作用はコバルトイオンの方が明らかに強く、IL-8 の産生増強作用と逆の結果となった。これらのことから、ニッケルイオンはコバルトイオンとは異なる標的分子を持つことが示唆された。さらに、ニッケルイオンの標的分子を網羅的に探索し、HSP90 を見出し、HIF-1 $\alpha$  の活性化に寄与していることを見出した。

また、ニッケル並びにコバルトイオンは、細胞膜上の TLR4 に結合してこれを活性化することも知られているが、THP-1 細胞による IL-8 の産生誘導作用には、細胞内に流入した金属によるシグナルの関与が大きいことが、各種金属イオンを用いた細胞内取り込み競合実験により示唆された。

一方、ニッケルイオンによる炎症反応からアレルギーへの進展機序は不明である。申請者はアレルギー応答の誘発に大きく関与するサイトカインとして thymic stromal lymphopietin (TSLP) に着目した。その一環として、THP-1 細胞において、受容体 mRNA の発現を増大させることを見出した。そのメカニズムについて解析中である。

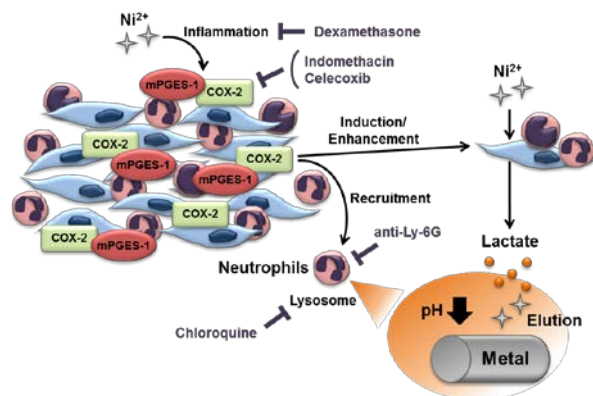


図1 COX-2 を介した炎症反応によるニッケル溶出増大作用機構

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本研究において、抗炎症薬である COX-2 が金属の溶出、金属炎症、そして金属アレルギーに有効であることが明らかになった。また、金属イオンのトランスポーターが炎症細胞からのサイトカイン産生に関わっており、このトランスポーターも金属炎症・アレルギーを抑制のための標的分子になりうることを示した。また、金属炎症からアレルギーへと進展する機序解明に向けて、その鍵となる反応として TSLP 応答の増強がある可能性も得た。本研究は、今後ますます増加する金属を含む医療機器の生体内埋入による金属炎症・アレルギーの予防・治療に薬学的にアプローチしたもので、本成果は、金属アレルギーの新たな治療戦略の構築に寄与することが期待される。

#### [4] 成果資料

- (1) Kishimoto, Y., Asakawa, S., Sato, T., Takano, T., Nakajo, T., Mizuno, N., Segawa, R., Yoshikawa, T., Hiratsuka, M., Yanai, K., Ohtsu, H., Hirasawa, N.: Induced histamine regulates Ni elution from an implanted Ni wire in mice by downregulating neutrophil migration. *Exp. Dermatol.* In press
- (2) Sato, T., Kishimoto, Y., Asakawa, S., Mizuno, N., Hiratsuka, M., Hirasawa, N.: Involvement of COX-2 in nickel elution from a wire implanted subcutaneously in mice. *Toxicology* 363-364 (2016) 37-45.
- (3) 浅川三喜、小野寺亮、岸本祐、清水貴文、仲條嵩久、平澤典保: HSP90 を介した  $\text{Ni}^{2+}$  選択的 IL-8 産生誘導メカニズムの解析 (第 89 回日本生化学会大会、2016 年、9 月、仙台)
- (4) 佐々木悠輔、岸本祐、浅川三喜、水野夏実、平澤典保: ニッケルによる TSLP 受容体発現誘導作用の解析 (第 55 回日本薬学会東北支部大会、2016 年 9 月、郡山)
- (5) 小野寺亮、浅川三喜、平澤典保:  $\text{Ni}^{2+}$  の細胞内取り込み及び IL-8 産生に対する金属イオンの影響について (日本薬学会 131 年会、2017 年 3 月、仙台)