

課題番号 23

## 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)

研究費：物件費 40 万円

### [2] 研究経過

近年、高齢化が進むとともに、医工学の進歩により、機能不全に陥った器官の代替や治療のために、生体材料として金属を含む医療機器を体内に埋植する機会が増加している。しかしこの先進医療の問題点として、金属系生体材料からの金属イオンの溶出が生じ、機器の機能不全が生じること、そして、溶出した金属イオンによる炎症反応や金属アレルギー応答の誘発が生じることが指摘されている。したがって、先進医療を推進する上でも、医療材料からの金属溶出の制御機構、ならびに溶出した金属イオンによる炎症誘発機構を明らかにし、その予防ならびに抑制する方法論を確立することは重要である。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、申請者らは金属溶出機構、溶出した金属イオンによる炎症応答について解析している。平成 28 年度の本プロジェクトにおいて、これまで金属イオンによる炎症反応ならびにアレルギー反応に関わる共通分子として、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) を見いだした。すなわち、金属イオンにより COX-2 が誘導され、その結果産生誘導されるプロスタグランジンが金属溶出、炎症反応ならびにアレルギー反応に寄与することを明らかにした。すなわち、ニッケルイオンにより誘発される炎症性細胞の活性化が、さらに金属溶出を増大させ、金属炎症・金属アレルギーを増悪化していくと考えられた。そこで本研究期間では、ニッケルイオンによる細胞活性化の分子機構を明らかにする一環として、ニッケルイオンの細胞内流入機構、並びに細胞内標的蛋白質の解析を行なった。

研究活動状況の概要は以下のとおりである。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。研究打合わせは主として E-mail で行なった。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す 2 つの研究成果を得た。

まず第 1 に、ニッケルイオンの細胞内流入は低濃度の亜鉛イオンにより抑制され、低亜鉛状態ではニッケルに対する応答性が高まること、そして第 2 に、ニッケルイオンの細胞内の新たな標的蛋白質として HSP90 $\beta$  を明らかにした。

#### 1. 亜鉛イオンによるニッケルイオンの流入並びにニッケル炎症の抑制 (成果資料 1)

本研究では、ニッケルイオンによる炎症性細胞の活性化機構について解析し、生理的濃度の亜鉛イオンが抑制的に作用していることを明らかにした。

ニッケルイオンは種々の細胞外蛋白質と結合し、新たな抗原を形成するとともに、ヒトの細胞では TLR4 に直接結合してこれを活性化することも知られている。一方、ニッケルイオンは、炎症性細胞の細胞内に取り込まれ、様々な反応を誘導することも知られているが、その細胞活性化における関与の大きさ、ならびに細胞内取り込み機構についてはほとんど明らかにされていなかった。今回ヒト単球系細胞株 THP-1 において、細胞内に取り込まれたニッケルイオン量を誘導結合プラズマ質量分析計により精密に測定し、インターロイキン-8 (IL-8) の産生を指標として、炎症性細胞の活性化を評価した。その結果、細胞内ニッケル濃度の増加とともに、IL-8 の産生の増加がよく一致することを確認し、ニッケルイオンは細胞内に流入して、細胞の活性化を誘導することを明らかにした。さらに、各種金属イオンの存在下で、ニッケルイオンで THP-1 細胞を刺激したところ、低濃度の亜鉛イオンがニッケルイオンの取り込みと IL-8 の産生をともに抑制することを見出した。さらに、マウス背部皮下にニッケル金属を埋入することにより、溶出したニッケルによる炎症反応を評価したところ、コントロールマウスに比べて、低亜鉛食を与えて低亜鉛状態にしたマウスにおいて強い反応が誘発され、ニッケル溶出も増大することを明らかにした。これらの結果から、生理的

濃度の亜鉛イオンがニッケルイオンによる炎症反応に抑制的に作用していることが示唆された。この発見は、近年、日本人において低亜鉛血症を示す患者が増大していますが、このような人々ではニッケルアレルギーが増悪化しやすいことを示唆するものであり、注意を喚起するものである。

## 2. ニッケルイオンの細胞内新規標的蛋白質の同定と機能 (成果資料2)

本研究では、ニッケルイオンによる IL-8 の産生誘導作用が、ニッケルイオンの細胞内標的分子を探索した。まず、ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞株を、塩化ニッケルあるいは塩化コバルトで刺激した場合の IL-8 産生を比較した所、ニッケルイオンの方が、コバルトイオンの IL-8 産生誘導作用よりも明らかに強いことを見いだした。この産生誘導作用は転写因子 NF- $\kappa$ B の関与は小さく、主として転写因子 HIF-1 $\alpha$  が関与していることを薬理的に明らかにした。ところが、興味あることに、IL-8 産生誘導作用とは異なり、ニッケルイオンの HIF-1 $\alpha$  発現量増加作用はコバルトイオンに比べて非常に弱かった。逆に、HIF-1 $\alpha$  の核内移行、HIF-1 $\alpha$  の転写活性誘導はコバルトイオンよりもニッケルイオンの方が明らかに強いことを見出した。このニッケルイオンとコバルトイオンの作用の違いの分子機構を明らかにするために、ニッケルイオンに選択的に結合する蛋白質をニッケルあるいはコバルトキレートビーズを用いて探索した。その結果、ニッケルイオンに選択的に結合する蛋白質の1つとして HSP90 $\beta$  を同定した。免疫沈降法や免疫染色法等を駆使し、ニッケルイオンは HSP90 $\beta$  と結合して、HIF-1 $\alpha$  と HSP90 $\beta$  の結合を減弱させ、その結果 HIF-1 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  の相互作用が高まり、これらの核内移行、転写活性の発現を増大させることを見出した (図1)。

リコンビナント HSP90 $\beta$  を用いた場合でも、ニッケルイオンに選択的に結合したことから、ニッケルイオンは HSP90 $\beta$  に直接的に結合していることが示唆された。そこで、ニッケルと HSP90 $\beta$  の結合部位を明らかにすることを試みた。ニッケルはヒスチジン残基に親和性が高いことが報告されているため、まず HSP90 $\beta$  のヒスチジン残基をそれぞれアラニン残基に置換した 13 種の HSP90 バリエーションを発現させ、ニッケルに対する結合能を解析したが、いずれの変異体もニッケルに対する結合能は消失しなかった。そこで HSP90 $\beta$  の各 domain を欠失するリコンビナント蛋白質を作製し、各 domain のニッケルに対する結合能を同様に解析した結果、ニッケルは HSP90 $\beta$  の ATP binding domain、dimerization domain 及び middle domain には結合せず、linker domain に結合することが示唆された。しかし、ニッケルイオンとの結合に関与

するアミノ酸を同定するまでには至らなかった。今後、HSP90 $\beta$  にニッケルイオンが結合して、HSP90 $\beta$  の機能がどのように変化するかについても検討する予定である。

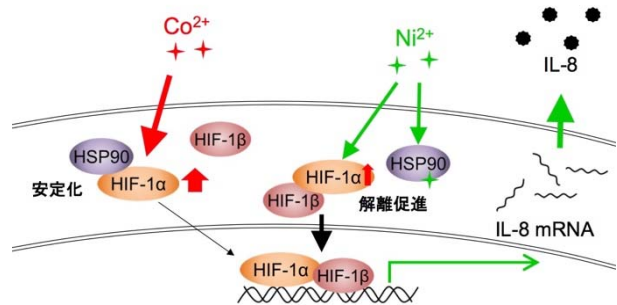


図1 ニッケルイオンの IL-8 産生誘導機構

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究で明らかになった亜鉛による亜鉛イオンによるニッケルイオンの流入並びにニッケル炎症の抑制は、低亜鉛食を与えたマウスによってもみとめられたことから、低亜鉛血症患者において金属炎症、さらには埋植機器からの金属溶出が増大する可能性が示唆され、その注意が必要であることをプレスリリースした。また、ニッケルイオンの細胞内新規標的蛋白質の同定と機能に関する研究成果は、ニッケルにより炎症性細胞活性化の新しい分子機構を提示したもので、細胞生物学、毒性学など多領域に影響を与える成果である。

### [4] 成果資料

(1) Ryo Onodera, Sanki Asakawa, Ryosuke Segawa, Natsumi Mizuno, Kouetsu Ogasawara, Masahiro Hiratsuka, Noriyasu Hirasawa. Zinc ions attenuate Ni ion-induced inflammation. *Scientific Reports* 8: 2911 (2018)

(2) Sanki Asakawa, Ryo Onodera, Yu Kishimoto, Taiki Sato, Ryosuke Segawa, Natsumi Mizuno, Kouetsu Ogasawara, Takahiro Moriya, Masahiro Hiratsuka, Noriyasu Hirasawa. Nickel ions bind to HSP90 $\beta$  and enhance HIF-1 $\alpha$ -mediated IL-8 expression. *Toxicology* 395: 45-53 (2018)

(3) 田代尚之、瀬川良佑、飛田亮三、浅川三喜、水野夏実、平澤典保. 塩化コバルト及び塩化ニッケルによる TSLP 発現抑制機構の解析. 第 56 回日本薬学会東北支部大会 (2017 年 10 月 21 日、青森)

(4) 小野寺亮、浅川三喜、平澤典保. ニッケルによるヒト単球系細胞の活性化機構: Ni<sup>2+</sup>の細胞内流入と Zn<sup>2+</sup>による抑制. 日本生化学会東北支部第 83 回例会 (2017 年 5 月 27 日、仙台)