

令和元年12月12日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11103

研究課題名(和文) 金属アレルギーの原因となるT細胞の特定

研究課題名(英文) Identification of T cells responsible for metal allergy

研究代表者

樋口 繁仁 (HIGUCHI, Shigehito)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：10291262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯の保存修復には、人工修復材料が用いられている。特に金属は、これらの人工修復材料の中では突出して利用されており、患者のQOLの向上に役立ってきた。しかし、一部の患者においては、金属アレルギーなど、炎症性免疫反応が問題となっている。そこで、本研究は、金属アレルギーの原因となるT細胞を特定することを目的とした。本研究により、金属に反応するT細胞受容体を遺伝子クローニングすることができ、金属特異的T細胞受容体遺伝子の特定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、金属アレルギーは、T細胞が関与するアレルギーと考えられてきたが、その実態は明らかになっていなかった。本研究では、金属アレルギーモデルマウスにおいて、金属に反応する特異的T細胞が存在することを明らかにし、その金属反応性T細胞受容体の遺伝子を得ることができた。すなわち、本研究の学術的意義は、金属アレルギーにはT細胞が関与すること、金属に反応するT細胞受容体の遺伝子が存在することを証明した点である。

研究成果の概要(英文)：Artificial restorative materials are used for treatment of teeth. In particular, metals are prominently used in these artificial restorative materials, and these have been useful for improving the QOL of patients. However, some patients have inflammatory immune reactions such as metal allergies. Therefore, we examined to identify T cells that cause metal allergy. In this study, we succeeded in identifying metal-specific T cell receptor genes by gene-cloning T cell receptors that respond to metals

研究分野：保存修復学

キーワード：T細胞 アレルギー

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

1. 研究開始当初の背景

歯は自己修復能力が極めて低いため、人工修復材料により保存修復される。金属やレジン、セラミックスなどは、歯の人工修復材料として用いられている。特に、金属は、これらの人工修復材料の中では突出して利用されており、患者のQOLの向上に役立ってきた。しかし、一部の患者においては、金属アレルギーなど、炎症性免疫反応が問題となっている。

これまでの研究から、金属アレルギーは金属イオンが生体内タンパクと結合することにより抗原となっておこるIV型アレルギーとして位置づけられているものの、その分子機構はわかっていない。金属はそのままでは疾患を引き起こさず、溶出してイオンとなり、その金属イオンが生体内タンパク質と結合することで抗原となり、悪さをするT細胞がこの抗原を認識して疾患を引き起こすと考えられている。しかしながら、この病気の原因となるT細胞についてはよくわかっていない。

2. 研究の目的

したがって本研究は、金属アレルギーの原因となるT細胞を特定すること、すなわち、悪さをするT細胞の特定を目的とした。

3. 研究の方法

1) マウスを用いた金属アレルギーの誘導

マウスに、塩化パラジウム溶液(10 mM)とLPS溶液(10 µg/ml)の混合溶液を腹腔内に接種する。これを感作とし、7日後に、再度、塩化パラジウム溶液とLPS溶液の混合溶液を腹腔内に接種する。感作を2回行ったのち、7日後にマウスの足蹠に塩化パラジウム溶液のみを皮内投与して金属アレルギーを誘導した。

対照群には、マウスの足蹠に塩化パラジウム溶液のみを皮内投与した群とした。

2) 養子移入による金属アレルギーマウスモデル

① リンパ球の養子移入

パラジウムにより誘導した金属アレルギーモデルマウスを用いて、アレルギーを発症させた後、そのマウスの所属リンパ節より、リンパ球を採取した。これらリンパ球を、T細胞が存在しないヌードマウスに静脈内注射により養子移入する。その後、パラジウム溶液を、養子移入されたヌードマウスの耳介、あるいは足蹠に接種して、アレルギーを誘導した。

抗原提示細胞の養子移入(図1)

抗原提示細胞を調製するため、マウス大腿骨より骨髓細胞を採取する。採取した骨髓細胞をsingle cellにして、培養する。培養液には、M-CSFを含むCMG14-12培養上清を10%添加して培養し抗原提示細胞へ分化させた。培養7日目にこれら細胞を抗原提示細胞として回収し、新たに0.2 mMの塩化パラジウム溶液、および10 ng/mlのLPSを加え、さらに24時間培養した。対照群として、塩化パラジウムを加えず、10 ng/mlのLPSのみを加えたものを用意した。

培養8日目に、これら抗原提示細胞を回収後2回洗浄した。この抗原提示細胞をレシピエントマウス(C57BL/6)に静脈内注射により、養子移入した。この養子移入は、金属アレルギーモデルマウスにおいては感作に相当する。

養子移入して7日後に、レシピエントマウスの耳介、あるいは足蹠に接種して、アレルギーを誘導した。

図1 抗原提示細胞の養子移入



3) T細胞受容体解析

T細胞受容体解析は、サンプルをRNAシーケンスにより網羅的に解析する方法で行った。具体的には、パラジウムアレルギーを誘導したマウスの所属リンパ節などから抽出したtotal RNAをサンプルとする。このtotal RNAを通常法にて、cDNAライブラリー合成を行う。このcDNAライブラリーを鋳型とする。

このcDNAライブラリーを鋳型とし、T細胞受容体特異的非バイアス遺伝子増幅法により、T細胞受容体遺伝子をバイアスをかけずに、かつ網羅的に選択し増幅する。

この増幅した産物を用いて、次世代シーケンサーMiSeq(イリミナ社)を用いて、全シーケンスを行った。

これらシークエンスデータを用いて、引き続き T 細胞受容体解析を行った。

4) T 細胞受容体遺伝子クローニング

T 細胞受容体遺伝子クローニングは、T 細胞受容体の V 領域と C 領域に PCR プライマーを設計することで、まずは、V 領域特異的な遺伝子をクローニングした。いくつかの候補遺伝子について、個別にキャピラリーシークエンスを行い、J 領域が目的のものである遺伝子を選び出した。しかし、CDR3 領域は変異に富むため、選び出した遺伝子が目的の CDR3 配列ではなかった。そこで、CDR3 領域のみ、ミュータジェネシスキット (タカラバイオ社) を用いて、遺伝子変異を加えることで、目的の遺伝子をクローニングした。

4. 研究成果

1) 金属アレルギーマウスモデル

歯科金属でよく用いられているパラジウムを用いて、マウスに金属アレルギーを誘導することとした。塩化パラジウム溶液を用いて、LPS とともに腹腔内注射することで感作を行い、耳介または、足蹠に塩化パラジウム溶液を接種して惹起することで金属アレルギーが誘導できた。この金属アレルギー疾患モデルを基に研究を展開した。

2) 養子移入による金属アレルギーマウスモデル

① リンパ球の養子移入

本研究の目的は、金属アレルギーの原因となる T 細胞を特定することである。しかし、T 細胞受容体は、 10×18 乗通りもの多様性をもつため、金属アレルギーの原因となる T 細胞の特定は容易ではない。

そこで、疾患の原因となる T 細胞を特定するために、まずある程度の絞り込みを行うこととした。この絞り込みのためには、*in vivo* マウスモデルを用いて行うことが効率的であると考えた。

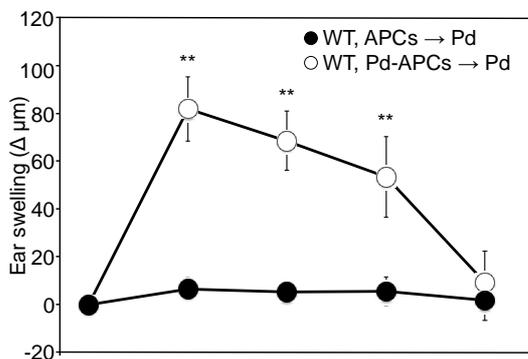
パラジウムアレルギー誘導後、悪さをする (病原性と考えられる) T 細胞が、所属リンパ節に存在すると考えられることから、所属リンパ節リンパ球を採取し、遺伝的背景が同じで、T 細胞が存在しない免疫不全マウス (ヌードマウス) に養子移入した。養子移入したレシピエントマウスは、パラジウムアレルギーを発症することから、病原性 T 細胞が、きちんと移入されていることが判明した。この養子移入を複数回繰り返すことにより、病原性 T 細胞の濃縮を行った。

抗原提示細胞の養子移入 (図 1)

前述のように、リンパ球の養子移入により、金属アレルギーが発症するならば、抗原提示細胞の養子移入であっても、金属アレルギーが発症するはずである。また、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) が、金属アレルギーの発症にどのようにかかわっているかを調べるためには種々の MHC 遺伝子の変異マウスを用いて研究する必要がある。そこで、抗原提示細胞の養子移入により、金属アレルギーが発症するか、否かについて検討した。

抗原提示細胞の養子移入によっても、パラジウムアレルギーが発症することが明らかとなった (図 2)。

図 2 抗原提示細胞の養子移入によるパラジウムアレルギーの発症



3) TCR 解析

絞り込みに成功した T 細胞集団から、T 細胞受容体の決定を行った。次世代シークエンサーを用いて、T 細胞受容体の塩基配列を網羅的にシークエンスして、それらの大量の塩基配列から、T 細胞受容体を選び出し、かつ T 細胞受容体の V 鎖-D 鎖-J 鎖をアライメントを行った。このアライメントした結果をもとに頻度分析を行い、金属アレルギー特異的 T 細胞を特定した。

これまで、多くの疾患では T 細胞受容体は β 鎖がその特徴を決定していることから、β 鎖に着目した。金属アレルギー動物モデルからリンパ球を採取して、total RNA, cDNA 合成後、T

細胞受容体を PCR 法にて増幅して、T 細胞受容体解析を行ったところ、特異的 T 細胞受容体の候補が見つかった。

4) TCR クローニング

T 細胞受容体の候補はいくつか見つけることができたものの、その T 細胞受容体がパラジウムアレルギーの原因であることの証明には、遺伝子クローニングが必須である。そこで、まず、V 領域から C 領域までの T 細胞受容体の候補遺伝子をいったんクローニングして、その後、変異の多い CDR3 領域のみをミュータジェネシスキットを用いて、遺伝子変異を加えることで、目的の遺伝子をクローニングした。

本研究事業において、金属反応性 T 細胞受容体として、TCR 鎖を特定することが出来た。また、その TCR 鎖の遺伝子クローニングができるようになった。特に、TCR 鎖の中で変異に富み、クローニングが難しかった CDR3 領域もクローニングできるようになり、TCR 遺伝子を特定できた。

また、野生型マウスを用いた時は、金属アレルギーを誘導しても、金属特異的 TCR の鎖、鎖を解析し決定するのは容易ではなかったが、TCR 鎖の遺伝子導入マウスを用いることで、TCR 鎖の解析が容易になった。その結果、パラジウムアレルギーにおいて、ある特定の TCR 鎖が反応していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Takeda Y, Suto Y, Ito K, Hashimoto W, Nishiya T, Ueda K, Narushima T, Takahashi T, Ogasawara K. TRAV7-2*02 expressing CD8⁺T cells are responsible for Palladium allergy *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 1162; doi:10.3390/ijms18061162
2. Kawakami T, Ito K, Matsuda Y, Noda M, Sakurada A, Hoshikawa Y, Okada Y, Ogasawara K. Cytotoxicity of natural killer cells activated through NKG2D contributes to the development of bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic tracheal transplant model. *Am J Transplant.* 2017 Mar 1. doi: 10.1111/ajt.14257.
3. 小笠原康悦 「マウスモデルを用いた歯科金属アレルギーの分子機構」 炎症と免疫 先端医学社 20 - 25 Vol.25-2, 2017 年 3 月
4. 小笠原康悦 「金属と炎症」炎症と免疫 先端医学社 1 - 3 Vol.25-2, 2017 年 3 月
5. Sonofuchi K, Hagiwara Y, Koizumi Y, Chiba A, Kawano M, Nakayama M, Ogasawara K, Yabe Y, Itoi E. Quantitative in vivo biocompatibility of new ultralow-nickel cobalt-chromium-molybdenum alloys. *J Orthop Res.* 2016 Sep;34(9):1505-13. doi: 10.1002/jor.23150.
6. Iguchi N, Takeda Y, Sato N, Ukichi K, Katakura A, Ueda K, Narushima T, Higuchi S, Ogasawara K. The antihistamine olopatadine regulates T cell activation in palladium allergy *Int. Immunopharmacol.* 2016 35 70-76. doi:10.1016/j.intimp.2016.03.021

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 武田裕利、須藤佳子、佐藤直毅、樋口繁仁、高橋哲、伊藤甲雄、小笠原康悦
「金属アレルギーを引き起こす T 細胞の特定」
第 71 回 日本細菌学会東北支部総会 仙台、8 月 3 - 4 日、2017 年
2. 伊藤甲雄、秋山なつみ、樋口繁仁、佐藤直毅、小笠原康悦
「パラジウムによる金属アレルギー発症におけるヒスタミンの役割」
第 70 回 日本細菌学会東北支部会、十和田、8 月 18 日、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小笠原 康悦

ローマ字氏名：OGASAWARA, KOUETSU

所属研究機関名：東北大学

部局名：加齢医学研究所

職名：教授

研究者番号（8 桁）：30323603

(2)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 甲雄

ローマ字氏名：ITO, KOYU

研究協力者氏名：武田 裕利

ローマ字氏名：TAKEDA, YURI