

令和元年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05530

研究課題名(和文) 歯科金属アレルギーの免疫化学解析

研究課題名(英文) Immunochemical analysis of dental metal allergy

研究代表者

小笠原 康悦 (OGASAWARA, KOUETSU)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：30323603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：金属アレルギーは、遅延型アレルギーでT細胞依存性の疾患とされているが、その免疫反応機構はよくわかっていない。そこで、本研究は、申請者らが開発した技術を用いて、金属アレルギーの発症にかかわるT細胞の特徴を明らかにする研究を行った。T細胞受容体解析法において、偏りのない遺伝子増幅が非常に重要な役割を担っていることが明らかになった。T細胞受容体解析を行う際には、非バイアス遺伝子増幅法である、シングルチェーンアダプターライゲーションPCR法を用いて行うことが必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、金属アレルギーを対象として、T細胞の特徴をT細胞受容体の観点から研究した。研究の過程で、T細胞受容体解析を行ったところ、現在、企業化もされているアダプターライゲーション法による解析では、不正確である可能性が明らかとなった。本研究の学術的意義は、T細胞受容体解析を行う際には、我々の開発した非バイアス遺伝子増幅法である、シングルチェーンアダプターライゲーションPCR法など、正確な解析法で行う必要があることを示した点である。

研究成果の概要(英文)：Metal allergy is considered to be delayed-type of allergy by T-cell dependent diseases, but its immune mechanism is not well understood.

In this study, we performed to clarify the characteristics of T cells involved in the onset of metal allergy using the our technology. We found that non-biased gene amplification plays a very important role in T cell receptor analysis. Thus, in T cell receptor analysis, it is necessary to use a non-biased gene amplification method, such as a single chain adapter ligation PCR by our technology.

研究分野：口腔免疫学

キーワード：免疫 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

医療において生体医用材料を最も用いているのは歯科治療である。歯科治療においては、補綴用生体材料、インプラント、保存用生体材料など、金属系の多くの医療用生体材料が開発されてきた。それとともに、金属装飾品をつける人の割合の増加という背景もあり、金属炎症・アレルギーは増加傾向にある。実際、申請者らが行った全国調査によると、金属アレルギー患者は増加し今後も増加傾向にあると考えられた。またアレルギーの三大金属はニッケル、コバルト、クロムであることも判明した。前述のように医療において生体金属材料を最も用いているのは歯科であり、金属炎症・アレルギーは、歯科において解決すべき重要な研究課題である。

2. 研究の目的

そこで、本研究は、金属アレルギーの発症にかかわる T 細胞の特徴を明らかにすることを目的とした。

具体的には、申請者らが開発した技術を用いて、アレルギーの原因となる T 細胞を特定するとともに、新規動物・細胞モデルを開発してアレルギーの発症の分子機構を明らかにする。

- 1) 金属特異的 T 細胞受容体 (TCR) の特定およびモデルマウスの樹立
- 2) モデルマウスを用いた、金属アレルギーの病態解明

3. 研究の方法

- 1) 金属特異的 TCR の特定およびモデルマウスの樹立

① cDNA library の調整

T 細胞受容体 (TCR) を特定するために、リンパ球から total RNA を抽出した。Total RNA の抽出には、RNA easy kit (Qxagen 社) を用いて行った。500 ng 程度の total RNA を用意し、Oligo dT プライマー、逆転写酵素 (SuperScript III) を用いて、total RNA から、first strand 合成を行った。引き続き、second strand 合成を行った。second strand 合成には、RNase H, DNA polymerase, DNA Ligase を用いて通法通り合成した。これを cDNA library として、以下の実験に供した。

シングルチェーンアダプターライゲーション PCR

cDNA library にアダプターを付与することで、偏りを少なくする PCR 増幅を行うこととした。通常のアダプターは DNA 2 本鎖からなり、アンチセンス鎖に対しセンス鎖を長くしたアダプターを用意して、DNA をライゲーションすることによりアダプターを付与するものであるが、これを DNA 1 本鎖のアダプターとし、ライゲーションする方法を作成した。

次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析

Roche 社、GS Junior 次世代シーケンサーを用いて、前述の TCR 遺伝子 library を基にシーケンスを行った。GS Junior 次世代シーケンサーは、エマルジョン PCR 法を基本とした方法であり、GS Junior 次世代シーケンサーの説明書に基づいてシーケンスを行った。

また、Illumina 社、Miseq 次世代シーケンサーも用いて解析を行った。Miseq においては、ペアエンドシーケンスを基本とした方法であり、Miseq 次世代シーケンサーの説明書に基づいてシーケンスを行った。

TCR 解析評価

次世代シーケンサーにより得られたシーケンスデータを、IMGT でデータ解析を行い、TCR を決定した。

- 2) モデルマウスを用いた、金属アレルギーの病態解明

TCR の遺伝子導入マウス (TRAV8TCRTg マウス) を用いて、パラジウムアレルギーの発症および病態を検討した。感作として、塩化パラジウム溶液 (10 mM) と LPS (10 µg/ml) をマウス腹腔内投与し、7 日後に、もう一度、感作を行った (塩化パラジウム溶液と LPS をマウス腹腔内投与)。

その 7 日後に、足蹠に塩化パラジウム溶液 (10 mM) を接種、経時的に腫脹を測定した。また、病態の解明には、所属リンパ節と脾臓からリンパ球を採取し、その反応性を検出した。

4. 研究成果

- 1) 金属特異的 T 細胞受容体 (TCR) の特定およびモデルマウスの樹立

① シングルチェーンアダプターライゲーション PCR 法の開発

これまで TCR 解析は、共同研究者に解析を依頼していた。本研究の開始以前の研究では、マウスパラジウムアレルギーモデルにおいて、ELISA 法を基本とした T 細胞受容体解析、およびアダプターライゲーション PCR を用いた次世代シーケンサーによる解析を行った結果、パラジウム特異的 TCR は、鎖が TRAV8 であるとされていた (Kobayashi et al. 2014 Plos One)。そこで、TRAV8 TCR を遺伝子導入したマウスを作成し、本研究に供することとした。

本研究において、パラジウムアレルギーモデルマウスを用いてこれまで依頼していた TCR 解

析を我々自ら再度行うこととした。

まず、TCR は多くの多様性を持つため、生体内での TCR の割合を反映した検出方法が必要となる。そのため、TCR 遺伝子 library 調整においては、TCR 遺伝子 library を偏りなく増幅する必要がある。cDNA library にアダプターを付与することで、偏りを少なくするアダプターライゲーション PCR 法がよいとされているが、これまでの我々の結果から、通常のアダプターライゲーション法により PCR を行っても、アダプター単独で PCR 反応が起こり非特異的な遺伝子増幅が起こってしまうこと、バイアスがかかった遺伝子増幅が起こってしまうことが明らかになっている。そこで、我々はバイアスをかけずに PCR 法によって遺伝子増幅できるシングルチェーンアダプターライゲーション PCR 法の開発を行った。

通常のアダプターは DNA 2 本鎖からなるが、これを、アダプターを DNA の 2 本鎖ではなく、DNA 1 本鎖のアダプターとするように工夫を加えた方法を開発した。この方法では、サイズの異なる TCR 遺伝子をほぼ同じ割合で増幅できることが明らかとなり、非バイアスの遺伝子増幅ができるようになった。

TCR 解析

シングルチェーンアダプターライゲーション PCR 法を用いて、パラジウムアレルギーモデルマウスの TCR 解析をしたところ、従来報告されていた TRAV8 ではなく、別の TCR が反応していることが明らかとなった。また、養子移入したパラジウムアレルギーマウスモデルにおいても、パラジウム反応性 TCR は、TRAV8 ではなく、別の TCR であることが明らかとなった。すなわち、パラジウム特異的 TCR は TRAV8 ではない可能性が高まった。このことは、アダプターライゲーション法では、非バイアス遺伝子増幅が達成されず、不正確な遺伝子増幅であったこと、そのために TCR 解析もまた不正確であったことを意味する。現在、アダプターライゲーション法を技術基盤とした TCR 解析企業も存在するが、TCR 解析、特に TCR 遺伝子 library 調整法の良し悪しによって結果が大きく変わることが明らかとなった。また、図 1 に示すようにアダプターライゲーション PCR 法では、バイアスのかかった遺伝子増幅でかつ非特異的は遺伝子も増幅されてしまい、結果的に TCR シークエンス成功率が 10% 程度しかないことが判明した。それに対し、シングルチェーンアダプターライゲーション PCR 法での TCR シークエンス成功率の 90% となり、シングルチェーンアダプターライゲーション PCR 法は、現時点で考えられる増幅法の中で最良の方法であること、アダプターライゲーション PCR 法では不正確な結果であった可能性が示唆された。

TCR解析法の改良

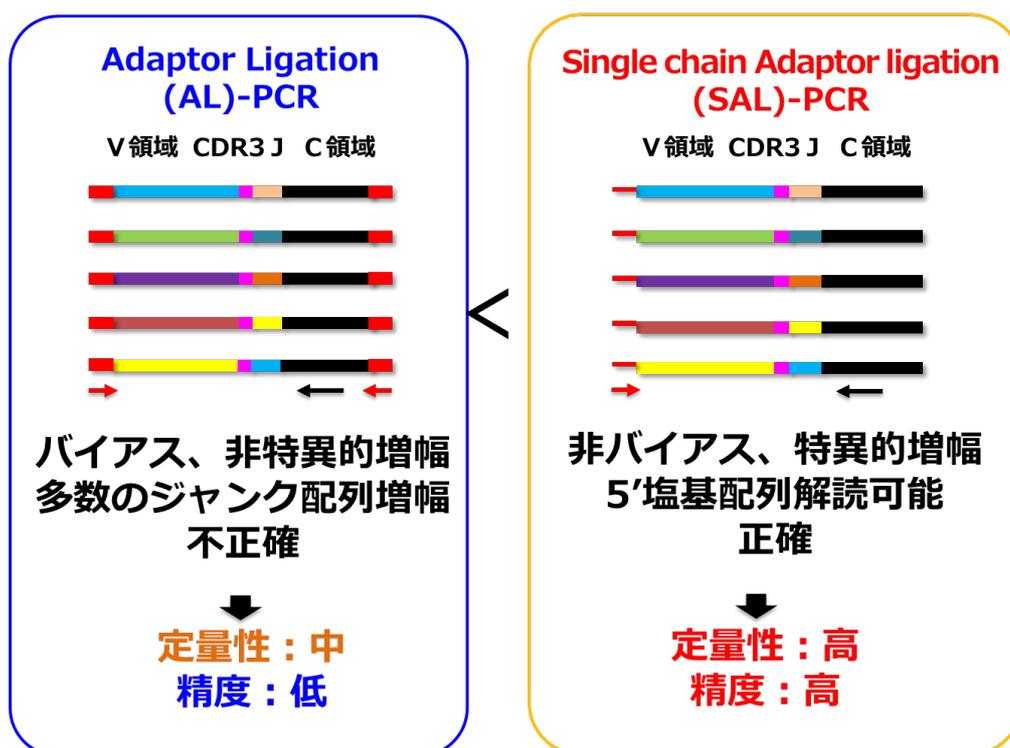


図 1 シングルチェーンアダプターライゲーション PCR 法の概要

2) モデルマウスを用いた、金属アレルギーの病態解明

これまでの報告から、TRAV8 がパラジウムに特異的に反応する TCR であるため、TRAV8 を遺伝子導入したマウス (TRAV8tg マウス) を用いて、金属アレルギーの病態の解明を試みた。

モデルマウスに塩化パラジウム溶液を接種してアレルギーを誘導する方法を用いて実験したところ、TRAV8tg マウスは、野生型マウスと同様の腫脹が認められた。我々の仮説では、TRAV8tg マウスは、全ての TCR が TRAV8 であるため、パラジウム反応性 TCR のみになっていることで、パラジウムにより反応性が高いと予測していた。それに反して、TRAV8tg マウスは、パラジウムアレルギーを誘導しても野生型と変わらない結果であった。このことは、TRAV8 が、パラジウム反応性 TCR、パラジウム特異的 TCR ではなかった可能性が考えられた。

前述の TCR 遺伝子解析法において、TCR 遺伝子 library 調整が非常に重要な役割を担っていることが判明している。アダプターライゲーション法による cDNA library 調整では、非特異的な遺伝子増幅が起こってしまうこと、バイアスがかかった遺伝子増幅が起こってしまうことにより、真の TCR 遺伝子が解析できていない可能性が考えられた。TRAV8 のこの結果は、TCR 解析を行う際には、非バイアス遺伝子増幅法である、シングルチェーンアダプターライゲーション PCR 法が最適であり、この方法を用いて TCR 遺伝子 library 調整を行うことが必要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- 1 . Onodera, R, Asakawa, S, Segawa, R, Mizuno, N, Ogasawara, K, Hiratsuka, M, Hirasawa, N. Zinc ions have a potential to attenuate both Ni ion uptake and Ni ion-induced inflammation **Scientific Reports** Volume 8, Issue 1, 1 December 2018, Article number 2911
- 2 . Asakawa, S, Onodera, R, Kasai, K, Kishimoto, Y, Sato, T, Segawa, R, Mizuno, N, Ogasawara, K, Moriya, T, Hiratsuka, M, Hirasawa, N. Nickel ions bind to HSP90 β and enhance HIF-1 α -mediated IL-8 expression **Toxicology** Volume 395, 15 February 2018, Pages 45-53
- 3 . 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
- 4 . Gokcekaya O, Ueda K, Ogasawara K, Kanetaka H, Narushima T: In vitro evaluation of Ag-containing calcium phosphates: Effectiveness of Ag-incorporated β -tricalcium phosphate. **Materials Science Engineering C** 2017
- 5 . 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.
- 6 . 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.
- 7 . 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
- 8 . 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 11 - 16 Vol.25-2, 2017 年 3 月

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 動物モデルを用いたパラジウムアレルギー発症の分子機構
関智水、佐藤直毅、樋口繁仁、小笠原康悦
第 60 回 歯科基礎医学会学術大会 2018 年
2. 金属アレルギーを引き起こす T 細胞の特定
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
第 71 回 日本細菌学会東北支部総会 2017 年
3. Antibacterial property of visible-light active TiO₂ layers formed on Ti-Au alloys by thermal oxidation
Takatoshi Ueda, Shota Sado, Kyosuke Ueda, Koyu Ito, Kouetsu Ogasawara, Takayuki Mokudai, Hiroyasu Kanetaka, Yoshimi Niwano, Takayuki Narushima

〔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

なし。

(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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。