

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17215

研究課題名(和文)パラジウムに反応する特異的T細胞受容体の遺伝子導入細胞株や遺伝子導入マウスの作製

研究課題名(英文)Production of the transgenic cell lines and the transgenic mice with the T cell receptor specific for palladium allergy

研究代表者

武田 裕利 (Takeda, Yuri)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60806339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：金属は医療用生体材料として使用されるが、近年、パラジウム(Pd)金属アレルギー患者が増加傾向にある。しかしながら、金属アレルギー発症機序について未だ不明な点が多く根本的な治療法も確立されていない。そこで申請者は金属に反応する病原性T細胞に着目し、金属アレルギーにおける抗原提示の分子機構を明らかにすることを目的とした。Pdアレルギー特異的なT細胞受容体(TCR)鎖を用いて遺伝子導入細胞株および遺伝子導入マウスを作製することとした。これらを用いて、金属材料安全性試験の確立に役立つことやin vivoでの金属アレルギー発症のメカニズムを解明できると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまでの動物モデルにおける金属安全性試験はクリアしているものの、ヒトでは金属によるアレルギー反応が生じていることもあり、新規に金属アレルギーに対する安全性試験の確率が必要と考えている。そこで申請者は以前パラジウム(Pd)アレルギーに反応するT細胞やT細胞受容体(TCR)鎖を同定した。この病原性TCR鎖の遺伝子導入株・遺伝子導入マウスを作製し、このマウスに金属アレルギーを誘導すると、アレルギー反応が通常の野生型マウスより強く生じていた。つまり、金属に高感受性マウスを用いて、金属アレルギーの発症機序の解明ならびに生体安全試験の確立に役立つものと捉えている。

研究成果の概要(英文)：Metals are used as medical biomaterials, but the number of patients with palladium (Pd) metal allergies has been increasing recently. However, the mechanism of onset of metal allergy is still unknown, and no fundamental treatment method has been established. Therefore, I focused on pathogenic T cells that react with metals, and aimed to clarify the molecular mechanism of antigen presentation in metal allergies. Specifically, I decided to produce transgenic cell lines and transgenic mice using Pd allergy-specific T cell receptor (TCR) chains. I believe that these can be used to help establish metal material safety tests and to elucidate the mechanism of the onset of metal allergies in vivo.

研究分野：免疫学

キーワード：金属アレルギー パラジウム T細胞 T細胞受容体

### 1. 研究開始当初の背景

金属は装飾品、硬貨だけでなく医療現場などあらゆる分野で用いられ、現代社会において欠かせないものであり、それに伴い人々は金属に直接接触する機会が増えてきている。医療現場において、歯科用金属材料や整形外科領域に利用される生体埋入型の医療用金属合金などがあり、これらは直接生体に接することから、生体に害のない金属の開発が求められる。しかし、現在用いられている生体埋入金属が原因で炎症や金属アレルギーが誘導されるとの報告がある。症状として口内炎や口腔扁平苔癬、接触性皮膚炎や手足の水疱などがあり、時には掌蹠膿疱症などの難治性疾患を併発すると報告もある。Pd は強度や硬さ、耐久性などに優れることから、歯科で用いる修復材料として最も利用されており、Pd の依存性は高い。しかし、近年 Pd アレルギー患者数の増加が問題となっている。

金属アレルギーは感作 T 細胞による接触性過敏反応とされている。金属は生体に接触することでイオン化し、生体内に侵入して感作を成立させ、再度同一金属が接触した際に炎症を引き起こすと考えられている。しかし、そのメカニズムについて未だ不明な点が多く、特に抗原提示状況は明らかにされていない。すなわち、「未だ明らかになっていない金属アレルギーにおける抗原提示状況を解き明かすこと」が本課題の学術的問いである。これまで、金属アレルギー発症に関わる免疫細胞や、 $1 \times 10^{18}$  もの多様性のある T 細胞受容体 (TCR) レパートリーの中で金属特異的に反応する TCR レパートリーが特定されていないため、解明することができてなかった。このように金属アレルギーの発症機序について多くが不明であるため、金属アレルギーの根治療法は確立されておらず、ステロイドの投与による炎症の緩和や金属との接触を避ける以外に症状を緩和する方法はなく、現時点では金属アレルギーを効果的・効率的に予防・治療することができない。したがって金属アレルギーの発症機序を解明することが急務である。

### 2. 研究の目的

申請者は Pd に反応する病原性 T 細胞に着目し、金属アレルギーにおける抗原提示の分子機構を明らかにすることを目的とする。本研究を遂行するために、以下 Specific Aim を設定する。

- (1) Pd 特異的 TCR 遺伝子導入細胞株の樹立
- (2) Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスの作製

申請者が所属する研究室では Pd に対する金属アレルギーの病態解析を病原性 T 細胞に着目して行っている。マウスに Pd アレルギーを効率的に誘導する系を構築し、特異的に反応する TCR レパートリーを、次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、その結果  $1 \times 10^{18}$  通り存在する TCR レパートリーの中から Pd に特異的に反応する TCR 鎖を特定した<sup>1)</sup>。さらに Pd アレルギーにおける抗原提示において主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) I 分子から CD8<sup>+</sup>T 細胞への抗原提示が Pd アレルギー発症に必須であり、さらに特異的 TCR 鎖 (TRAV7-2\*02) を発現する CD8<sup>+</sup>T 細胞が Pd アレルギーを誘導することを突き止めた。本研究の独自性は、申請者らが開発したマウスモデルを利用し、申請者らが明らかにした Pd 特異的 TCR をもとに研究を発展させる点にある。具体的には金属アレルギーの病態解明に役立つこと、本研究で得られる TCR 遺伝子導入マウスは、金属高感受性マウスとして金属材料安全性試験の確立に役立つことが挙げられる。

### 3. 研究の方法

Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスの作製

実験方法

- (1) クローニングベクターから Pd 特異的 TCR の塩基配列を取り出す。
- (2) 発現ベクターに Pd 特異的 TCR の塩基配列をライゲーションする。
- (3) Pd 特異的 TCR をインサートした発現ベクターをマウスの受精卵にインジェクションし、Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスを作製する。  
\* T 細胞で、遺伝子導入 TCR が発現するようにするため、CD2 プロモーターを用いて (Dr. Kioussis と MTA 締結、供与済) 作製する。
- (4) Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスの飼育・維持
- (5) この遺伝子導入マウスを用いて Pd アレルギーにおけるサイトカイン産生や T 細胞の活性化の解析を行い、in vivo でより詳細な抗原提示状況を明らかにする。

Pd 特異的 TCR 遺伝子導入細胞株の樹立

実験方法

- (1) Pd 特異的 TCR 鎖の塩基配列を PCR で増幅する。
- (2) GFP などを組込んだベクターに PCR 産物をライゲーションする。

- (3)ライゲーション後の Pd 特異的 TCR の塩基配列をシーケンサーで確認する。
- (4)TCR - -細胞株にウイルスベクターを用いて遺伝子導入する。
- (5)Pd 特異的 TCR 遺伝子導入細胞をセルソーターで回収し、蛍光顕微鏡で確認する。
- (6)この遺伝子導入細胞と Pd 処理した抗原提示細胞を共培養し、サイトカイン産生や T 細胞の活性化、より詳細な抗原提示状況などを *in vitro* で解析する。

#### 4 . 研究成果

##### Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスの作製

申請者が設定した 6 ステップの実験計画のうち 1. クローニングベクターから Pd 特異的 TCR の塩基配列を取り出す、2. 発現ベクターに Pd 特異的 TCR の塩基配列をライゲーションする、3. Pd 特異的 TCR をインサートした発現ベクターをマウスの受精卵にインジェクションし、Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスを作製する。を順当に進め、4. Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスの飼育・維持を行い、実験に利用可能な世代まで交配を続けた。作製した Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスを野生型マウスと同様に Pd アレルギーを誘導させると腫脹が強く、明らかに野生型よりも反応が強く出ていたことを確認した。そこで TCR 鎖を調査するために Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスに Pd アレルギーを誘導させて所属リンパ節の TCR 鎖レパートリー解析を、次世代シーケンサーを用いて調査した。その結果、TRBV5 や TRBV14 が WT に比べて増加することが分かり、TRBV5-01・TRBJ2-3-01、TRBV5-01・TRBJ2-5-01、TRBV14-01・TRBJ2-5-01 が候補に挙がった。

##### Pd 特異的 TCR 遺伝子導入細胞株の樹立について

申請者が設定した 6 ステップの実験計画のうち、1. Pd 特異的 TCR 鎖の塩基配列を PCR で増幅する、2. GFP などを組込んだベクターに PCR 産物をライゲーションする、3. ライゲーション後の Pd 特異的 TCR の塩基配列をシーケンサーで確認する。ベクターを切断・ライゲーションする作業が数回あり、煩雑であったため、最終的な遺伝子導入に使用するベクターを構築するの期間を要したが、3. 正確にライゲーションできていることを確認した。次に Pd 特異的 TCR 遺伝子導入マウスの作製については 5 ステップの実験計画のうち、1. クローニングベクターから Pd 特異的 TCR の塩基配列を取り出す、2. 発現ベクターに Pd 特異的 TCR の塩基配列をライゲーションすることまで進んだ。発現ベクターに組み込む際も数回の切断・ライゲーションと発現ベクターには正確にライゲーションできていることを確認した。TCR - -細胞株にウイルスベクターを用いて遺伝子導入する」という目標に対して、これまでの研究で同定した Pd 特異的 TCR 鎖塩基配列を遺伝子導入し、セルソーターで回収した遺伝子導入細胞を蛍光顕微鏡で確認した。これで、現在 Pd 特異的 TCR 鎖塩基配列の遺伝子導入細胞を作製した。

これらの結果から、特異的 TCR 鎖の候補と特異的 鎖を組み合わせることにより *in vivo*、*in vitro* での応答を調べることにした。TRAV7-2-2 とベータ鎖のライブラリーを T Cell ラインに組み込み、*in vitro* で Pd 処理した樹状細胞株 DC2.4 と共培養させて、24 時間後に CD69 の発現状況をフローサイトメトリーで確認したところ、コントロールと比較して CD69 の発現が上昇していた。このことによって TRAV7-2-02 とベータ鎖の候補がアレルギー発症に重要であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuri Takeda
2. 発表標題 TRAV7-2*02-expressing CD8+ T cells are responsible for Palladium allergy
3. 学会等名 The 57th Congress of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstruction Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武田 裕利
2. 発表標題 金属アレルギー発症における病原性T細胞の同定
3. 学会等名 第63回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------