

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03835

研究課題名(和文) 金属アレルギーの新規診断・治療法の開発基盤研究

研究課題名(英文) Studies on new diagnosis and treatments of 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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：パラジウムアレルギーの発症の分子機構の解明を行った。抗原提示細胞の細胞培養の環境下で、パラジウム溶液を添加すると、抗原提示細胞上のMHC class Iの発現低下と再発現が起こることを発見した。また、MHC class Iの発現低下と発現回復の過程で、抗原ペプチドに変化があり、通常発現しないはずのペプチドに置換されることを見出した。さらに、パラジウムによる抗原ペプチド置換によりアレルギー抗原が発現し、アレルギー性T細胞が活性化されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでパラジウムアレルギーの病因は不明だったため、パラジウムアレルギーの治療は、原因金属の置換や抗炎症薬投与などの対症療法にとどまっていた。本研究での成果をもとに、パラジウムによるMHCクラスIの一過性の細胞内在化を抑制すること、抗原ペプチドの置換を防ぐこと、などで、パラジウムアレルギーの新しい治療法が開発できると期待される。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the molecular mechanism of the onset of palladium allergy. In vitro culture condition, we found that when antigen-presenting cells were added with a palladium solution, MHC class I expression was reduced and re-expressed on the antigen-presenting cells. It was also found that the antigenic peptide was changed in the process of expression reduction and recovery of MHC class I, and was replaced with a peptide that should not be normally expressed. Furthermore, it was clarified that allergic antigens are expressed and allergic T cells are activated by antigen-peptide substitution with palladium.

研究分野：基礎歯学

キーワード：アレルギー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯は自己再生能力がないため、う蝕や歯周病などで歯の保存、修復が必要になると、欠損部分は保存修復治療や補綴治療になることが多い。その場合、金属やレジンなどの生体材料を用いて治療がなされ、患者のQOLを高めてきた。しかしその一方で、金属炎症やアレルギーなどの副作用も報告されている。歯科治療の生体金属材料として、パラジウムが広く用いられている。パラジウムは、材料学的には安定な貴金属であるため、金属アレルギーを引き起こす理由が不明であった。我々は、パラジウムアレルギーの研究を進め、これまで、動物実験モデルを開発し (Sato et al. *Clin Exp Allergy* 2007)、この動物モデルを用いた養子移入の実験により、金属アレルギーがT細胞による疾患であることを証明した (Kawano et al. *Plos One* 2014、Iguchi et al. *Int Immunopharmacol* 2016)。

次に、パラジウムアレルギーの原因となるT細胞受容体を特定するため、独自に開発した遺伝子特異的非バイアス増幅法を用いて、マウス金属アレルギーモデルでパラジウムに反応するT細胞受容体解析を行った。その結果、T細胞受容体鎖、TRAV7-TRAJ22がパラジウムに反応するT細胞受容体であることが明らかとなった (Takeda et al. *Int. J. Mol. Sci* 2017)。

2. 研究の目的

そこで、これまで我々の実験動物を用いた金属アレルギーの研究を発展させて、診断・治療に役立つ金属反応性T細胞受容体を特定しようと考えた。本研究は、我々が開発したT細胞受容体解析技術を用いて、パラジウム反応性T細胞受容体を特定して新規診断・治療法の開発基盤を構築することを目的とした。

この目的を達するために以下、検討した。

T細胞受容体鎖遺伝子導入マウスの作成によるT細胞受容体鎖の特定
抗原提示細胞上のMHCとT細胞受容体との関係の解析

3. 研究の方法

1) 金属特異的T細胞受容体の遺伝子を導入した遺伝子改変マウスの作成

T細胞受容体TRAV7-TRAJ22について、次世代シーケンサーで用いたcDNAライブラリーから、遺伝子クローニングを行った。アクチンプロモーターの下流にTRAV7-TRAJ22遺伝子を組み込んだプラスミドを構築した。マウス受精卵にこの遺伝子をマイクロインジェクションしたのち、子宮内移植をして、遺伝子改変マウスを作成した。この遺伝子改変マウスは、C57BL/6マウスと交配し、TRAV7-TRAJ22遺伝子が発現している仔マウスを得たことから、遺伝子改変マウスの樹立を確認した。マウス末梢血を採取してTRAV7-TRAJ22遺伝子発現を確認後、遺伝子改変マウスとして実験に供与した。

2) パラジウムアレルギー動物モデル

マウスアレルギーモデルを用いて実験に供した (Sato et al. 2007, Iguchi et al. 2016)。マウス腹腔内に塩化パラジウム溶液とリポ多糖溶液を接種したのち、10日後に再度、塩化パラジウム溶液を足蹠に接種することでアレルギーを誘導した。

3) 培養細胞株へのT細胞受容体遺伝子導入

T細胞株 (TG40) を用いて、T細胞受容体鎖として、TRAV7-TRAJ22遺伝子を強制発現させた遺伝子導入細胞株を作成した (TRA7-TG40)。この細胞株に、T細胞受容体鎖遺伝子ライブラリ

ーを組み込んだプラスミドを用いて、遺伝子導入を行った。

4) 抗原提示細胞株の調整

樹状細胞株 DC2.4 を抗原提示細胞株として実験に供試した。また、マウス骨髄細胞を M-CSF 含有培地で培養して抗原提示細胞に分化させた後これを回収して、マウス抗原提示細胞として実験に供試した。

5) 抗体を用いたフローサイトメトリーによる検出

蛍光抗体法により対象となる細胞を染色して、細胞を洗浄後、フローサイトメトリーにて検出を行った。

5) ペプチド解析

DC2.4 細胞を培養して、パラジウム溶液による刺激の有無により群分けして細胞を回収した。回収した細胞を溶解した後、抗 MHC class I 抗体により、免疫沈降を行った。この免疫沈降したサンプルを回収して、質量分析装置にてペプチド解析を行った。

4. 研究成果

1) 金属特異的 T 細胞受容体の遺伝子を導入した遺伝子改変マウス

TRAV7 遺伝子改変マウスと野生型マウスを対象にパラジウムアレルギーを誘導して、足蹠の腫脹を検討した。野生型マウスにおいて、アレルギー誘導後、24 時間をピークに足蹠に腫脹が認められた。約 72 時間後まではっきりとした腫脹が認められ、1 週間後には、腫脹はもとに戻っていた。TRAV7 遺伝子改変マウスにおいては、アレルギー誘導後、24 時間をピークに、野生型同様の腫脹の時間経過をとった。野生型との比較において、TRAV7 遺伝子改変マウスでは、24 時間後の時点で、野生型の足蹠の約 1.5 倍の腫脹を認めた。48 時間後においても、同様に TRAV7 遺伝子改変マウスでは野生型よりも腫脹が大きかった。72 時間後には、野生型マウスと TRAV7 遺伝子改変マウスでの腫脹の差はほとんど認められなくなった。この結果から、TRAV7 遺伝子改変マウスでのパラジウムへの反応性が高くなっていることが判明し、T 細胞受容体 TRAV7 は、アレルギーを引き起こす病原性 T 細胞の受容体の 1 つであることが明らかとなった。

2) T 細胞受容体の特定

病原性 T 細胞の T 細胞受容体の鎖が、TRAV7 であることが明らかになったが、鎖については未だ不明である。そこで、パラジウムアレルギーを誘導した TRAV7 遺伝子改変マウスから、T 細胞を取り出し、T 細胞受容体の鎖を第三世代免疫受容体解析法により解析を行った。しかし、T 細胞受容体の鎖を特定することができなかった。

そこで、T 細胞培養株 TG40 を用いて、T 細胞受容体鎖の特定を試みた。TG40 に、TRAV7 を遺伝子導入した細胞株 (TRAV7-TG40) を作成した。この細胞株に T 細胞受容体鎖の cDNA ライブラリーを組み込んだプラスミドを用いて遺伝子導入を行った (TRBV-TG40)。抗マウス T 細胞受容体抗体は、T 細胞受容体鎖を認識する。また、T 細胞受容体は、鎖、鎖がそろって細胞表面に発現することから、蛍光標識抗マウス T 細胞受容体抗体を用いて、T 細胞受容体の遺伝子導入がきちんと行われているかを検証した。その結果、T 細胞受容体の遺伝子導入はきちんと行われ、鎖、鎖がそろって細胞表面に発現している可能性が高いことが判明した。

TRBV-TG40 細胞群と、DC2.4 を用いた抗原提示細胞とを共培養して、パラジウム溶液の添加で活性化する TRBV-TG40 細胞を検出して、T 細胞受容体鎖の特定を進めた。活性化マーカーとして、CD69 を用いた。TRBV-TG40 細胞群では、パラジウム溶液の添加により、CD69 の発現が上昇する細胞が 2 - 3% 存在することが明らかとなった。そこで、この細胞をフローサイト

メトリー法によるソーティングにより分離して、クローニングを進めた。数回、細胞分離を試みたものの、パラジウムに反応する細胞集団のクローニングは難しく、本研究期間内でのクローニングはできなかった。そのため、T細胞受容体鎖の特定はできなかった。

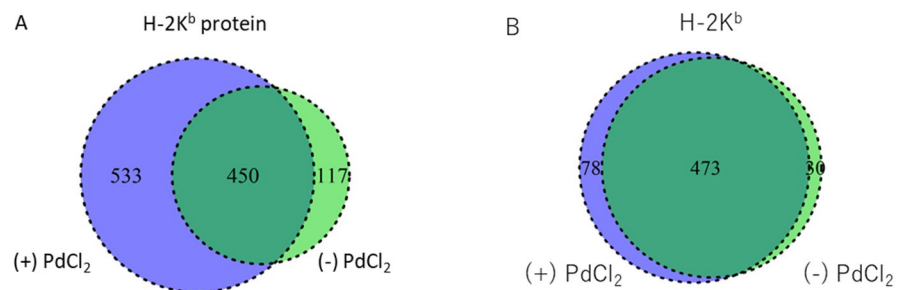
3) MHC との相互作用

これまで、マウス T 細胞と抗原提示細胞との共培養の実験において、パラジウム溶液を添加すると T 細胞の反応が変化することを見出した。この現象を明らかにするために、OVA ペプチドを提示する抗原提示細胞を用意し、OVA ペプチドに反応して増殖する T 細胞である OTIT 細胞を用いて検証を行った。OTIT 細胞は蛍光色素である CFSE 用いて標識して、OVA ペプチドを提示する抗原提示細胞と共培養し、T 細胞の増殖を指標にパラジウム溶液の添加の有無による影響を検討した。その結果、パラジウム溶液の添加により、OTIT 細胞の増殖が減弱することが判明した。さらに、この細胞培養系において、OVA ペプチドと MHC class I を同時に認識するモノクローナル抗体、25D1.16 を用いて、抗原提示細胞を染色したところ、パラジウム溶液の添加により、染色性が低下したことから、OVA ペプチドと MHC class I の発現の低下、あるいは、OVA ペプチドの変化が考えられた。

4) パラジウム溶液添加によるペプチドの変化

パラジウム溶液を加えることにより、ペプチドと MHC の複合体に何らかの変化が起こることが判明したため、まず、MHC の発現の変化を観察した。その結果、抗原提示細胞にパラジウム溶液を加えると MHC class I の発現が一過性に低下することが明らかとなった。この MHC の発現低下は、約 2 時間で MHC に発現は完全ではないものの回復した。

次に、パラジウム溶液を加える前後で MHC + 抗原ペプチドについて、質量分析法によりペプチド解析を行った。その結果、H-2Kb 上のペプチドは、パラジウムを加えると新たに発現するもの



A: 抗原提示細胞のH-2K^b上のペプチドのプロファイル。パラジウム溶液を添加した群 (+PdCl₂)と無添加群(-PdCl₂)の比較。
B: アジ化ナトリウムを添加することにより膜流動性を止めた後の抗原提示細胞のH-2K^b上のペプチドのプロファイル。パラジウム溶液を添加した群 (+PdCl₂)と無添加群(-PdCl₂)の比較。

は 533、パラジウムの添加の有無で変化がないものは 450、パラジウムを加えないときだけに発現するペプチドは 117 であった。

また、MHC の発現低下と再発現により、ペプチドの置き換えが起こっている可能性があるため、抗原提示細胞の膜の流動性を止め、MHC の発現低下と再発現を阻害した場合のペプチドのプロファイルを検討した。膜の流動性を止めることで、H-2Kb 上のペプチドは、パラジウムを加えると新たに発現するものは 78、パラジウムの添加の有無で変化がないものは 473、パラジウムを加えないときだけに発現するペプチドは 10 であった。このことは、MHC の発現低下と再発現により、パラジウムを加えると新たに発現するペプチドが圧倒的に多くなること、膜の流動性の低下により新たに発現するペプチドが減少することから、MHC の発現低下と再発現により、ペプチドの置き換えが起こっていることが明らかとなった。

以上の結果から、パラジウム溶液を加えることにより、抗原提示細胞上の MHC の発現低下と再発現が起こること、MHC が再発現する過程で抗原ペプチドが置き換わること、そのことが、パラジウムアレルギーを引き起こす原因であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 伊藤甲雄、武田裕利、小笠原康悦	4. 巻 27
2. 論文標題 歯科金属アレルギーの予防・診断・治療に向けた疾患特異的T細胞の同定	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 25-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Furukawa Mutsumi, Ito Shun, Suzuki Shunichi, Fuchimoto Daiichiro, Onishi Akira, Niimi Kanae, Usami Katsuki, Wu Guoyao, Bazer Fuller W., Ogasawara Kouetsu, Watanabe Kouichi, Aso Hisashi, Nochi Tomonori	4. 巻 11
2. 論文標題 Organogenesis of Ileal Peyer's Patches Is Initiated Prenatally and Accelerated Postnatally With Comprehensive Proliferation of B Cells in Pigs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.604674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ueda Takatoshi, Sato Naoki, Koizumi Ryusuke, Ueda Kyosuke, Ito Koyu, Ogasawara Kouetsu, Narushima Takayuki	4. 巻 37
2. 論文標題 Formation of carbon-added anatase-rich TiO ₂ layers on titanium and their antibacterial properties in visible light	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials	6. 最初と最後の頁 e37 ~ e46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dental.2020.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ito Koyu, Kanaseki Takayuki, Tokita Serina, Torigoe Toshihiko, Hirasawa Noriyasu, Ogasawara Kouetsu	4. 巻 12
2. 論文標題 Palladium-Induced Temporal Internalization of MHC Class I Contributes to T Cell-Mediated Antigenicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2021.736936	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------