

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：82710

研究種目：若手研究 B

研究期間：2010～2012

課題番号：22791823

研究課題名（和文）網羅的 T 細胞レセプター解析に基づく重金属アレルギー-病態形成機序の解明

研究課題名（英文）Characterization of T cell receptors of Th1 cells infiltrating inflamed skin of a novel murine models of Palladium-induced metal allergy

研究代表者

後藤 哲人 (GOTOU AKITO)

独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）

診断・治療研究室・研究員

研究者番号：50518131

研究成果の概要（和文）：

金属アレルギーは T 細胞によって引き起こされる遅延型アレルギー反応であるが、その抗原特異性ならびに病態発症メカニズムについては不明な点が多く、ヒトの病態解明に外挿性のある適切なモデル動物の確立が望まれている。我々は本研究において、既存の金属アレルギーマウスモデル(Sato N et al, Clin Exp Allergy, 2007)を一部改変し、パラジウム(Pd)とニッケル(Ni) 2 種金属アレルギーのモデルマウスを作製した。具体的には、金属を反復暴露させることによって、ヒト金属アレルギーで報告されている上皮内の T 細胞の浸潤、病変部組織のサイトカインプロファイル、そして浸潤 T 細胞に対する特異性に関する詳細な検討（TCR repertoire 解析・CDR3 size spectratyping 解析・CDR3 アミノ酸配列解析）を可能とした。その結果、病変部組織では Pd・Ni とともに上皮内の T 細胞浸潤を認め、Th1 タイプのサイトカインの亢進を認めた。Pd では TCRAV18-1 の有意な上昇とクローナルな増殖の有意な上昇を認めた。我々が作製したモデルマウスはヒト金属アレルギーと相同性が高いと考えられた。現在までに、モデルマウスを用いて詳細な T 細胞解析を報告したものはほとんど存在せず、我々が作製したモデルマウスは新規性があり、今後アレルギーの診断・治療に寄与することと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Metal allergy is categorized as a delayed-type hypersensitivity reaction, and is characterized by the recruitment of lymphocytes into sites of allergic inflammation. Because of the unavailability of suitable animal models for metal allergy, the role of T cells in the pathogenesis of metal allergy has not been explored. Thus, we developed a novel mouse model for metal allergy associated with infiltration of T cells by multiple injections of palladium(Pd) plus lipopolysaccharide into the footpad. Using this model, we characterized footpad-infiltrating T cells in terms of phenotypic markers, T cell receptor(TCR) repertoires and cytokine expression. CD3+CD4+ T cells accumulated in the allergic footpads 7 days after Pd challenge. The expression levels of CD25, interleukin-2, interferon- and tumor necrosis factor, but not interleukin-4 and interleukin-5, increased in the footpads after challenge, suggesting CD4+ T helper 1 (Th1) cells locally expanded in response to Pd. Infiltrated T cells in the footpads frequently expressed AV18-1 and BV8-2 TCR chains compared with T cells in the lymph nodes and exhibited oligoclonality. TCR clonotyped identified from several Pd-induced mice shared identical or similar CDR3 sequences containing AV18-1, but had diverse sequences in BV8-2. These results suggest that TCR α -chains play a dominant and critical role in antigen specificity of Pd-specific Th1 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫・感染・炎症

1. 研究開始当初の背景

金属アレルギーは、歯科用金属や、金属装飾品など、身の回りにある様々な金属が原因となりアレルギー症状を引き起こす疾患として知られている。近年、金属装飾品をつける人口の増加や、補綴治療やインプラント治療などの医療技術の発展による金属曝露の機会の増大に伴って患者の数は増加している。その一方で、抗原特異性ならびに病態発症メカニズムなど、金属アレルギーには不明な点が多く、ヒトの病態解明に外挿性のある適切なモデル動物の確立が望まれている。

2. 研究の目的

我々は、Pd を用いて既存の金属アレルギーマウスモデルを一部改変し、ヒト金属アレルギーに類似した新規金属アレルギーマウスモデルを確立した。Pd アレルギーモデルマウスにおいて、病理組織学的検討、TCR レパトア、および各種サイトカインを解析することによって、アレルギー発症に関わる特異的なT細胞を明らかにし、アレルギーの診断、治療に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

1) アレルギーモデルマウス作製

動物：Balb/c マウス (6週齢、)

感作：Pd アレルギーモデルマウス：10mM

PdCl₂+10 μg/ml LPS を 125 μl ずつ左右の鼠径部に皮内注射。

誘導：Pd アレルギーモデルマウス：10mM PdCl₂ を 25 μl ずつ左右の足底部に皮内注射。

条件検討：感作と誘導の適切な条件を明らかにするために、様々な条件で感作と誘導を行い、足底部腫脹の経時的変化及び、T細胞浸潤の有無を解析した。足底部腫脹は誘導後から24時間毎に測定し、T細胞浸潤の有無は、定量PCR法にて足底部におけるCD3のmRNAの発現量の変化を測定することで評価した。尚、感作、誘導に生理食塩水を用いた個体を対照群とした。

2) 病理組織学的解析・免疫組織化学的解析

条件検討によって得られた、CD3の発現量が最も多い感作2回、誘導3回後7日目の足底部を、HE染色による病理組織学的解析ならびに、CD3、CD4、CD8免疫染色による免疫組織化学的解析を行った。

3) TCR repertoire 解析

足底部に浸潤したT細胞にどのようなT細胞が限局して集積しているかを明らかにするために、T細胞の特異性を決定しているTCR repertoireを解析し、さらに抗原認識に大きな役割を担っているVドメインに関して、各サブファミリーの発現頻度を網羅的に解析した。T細胞浸潤が最も多く、ヒト金属アレルギーの病態に類似した感作2回、誘導3回後7日目のマウスの足底部を検体とした。対照群として感作、誘導を生理食塩水でおこなったマウスの脾臓を検体とした。各検体からTotal RNA抽出後、Adaptor-ligation PCRとMicroplate hybridization assayを施行し、各Vファミリーの蛍光強度を対照群と比較して有意に発現頻度の高いものを検出した。

4) Complementarity determining region 3 (CDR3)領域におけるシーケンス解析

TCR repertoire解析によって、対照群より発現頻度が有意に高かったVファミリーにおけるCDR3領域を明らかにするために、シーケンス解析を行った。TA-cloning法によりプラスミドにクローニングし、塩基配列を解析することによりCDR3領域シーケンスレベルの発現頻度を解析し、clonotypingを行った。

5) 各種サイトカインの解析

炎症部局所であるFootpad (誘導注射後1週間)における以下のサイトカインプロファイルを調査した。

コントロール群はPBS 25μlをFootpadに誘導注射したマウスを用いた。(感作条件は同一)。

- Th1-Type cytokine

- Th2-Type cytokine
- Chemokines
- T cell markers
- NKT cell markers
- Apoptosis factors

4. 研究成果

1) Pd アレルギーモデルマウス作製

感作 2 回誘導 3 回 (2Priming 3Challenge) の条件下において Foot pad の腫脹は最大値を示し、さらに T 細胞マーカー (CD3) の遺伝子発現量はコントロール群に比べて有意な増加を認めた (図 1)。

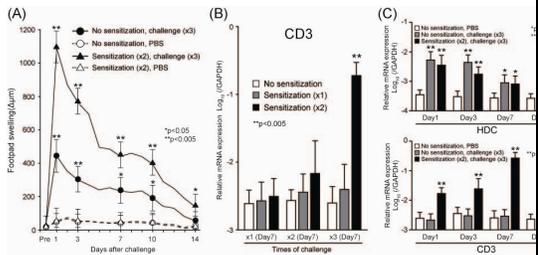


図 1: Foot pad の腫脹と T 細胞遺伝子発現量

2) 病理組織学的解析・免疫組織化学的解析 Pd アレルギーモデルマウス

感作 2 回誘導 3 回 (2Priming 3Challenge) の条件下の誘導注射後 1 週間のマウス Footpad は T 細胞の明らかな上皮内・上皮下浸潤と上皮組織構造の破壊を認めた。また、CD4・CD8 の割合に関しては CD4 の優位な浸潤所見を認めた (図 3)。

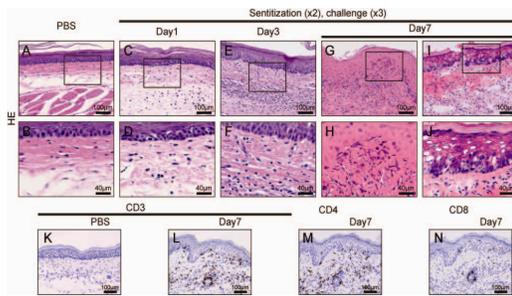


図 2: HE 染色および免疫染色

3) TCR repertoire 解析 Pd アレルギーモデルマウス

TCRAV18-1、BV8-2 が有意に増加していた。(図 3)

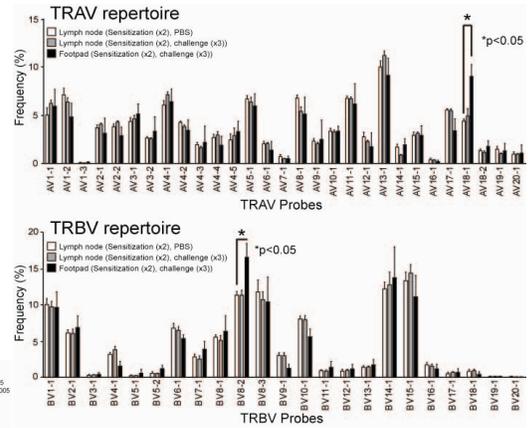


図 3: TCR repertoire 解析

4) Complementarity determining region 3 (CDR3) 領域におけるシーケンス解析 Pd アレルギーモデルマウス

CDR3 アミノ酸配列解析においては、TCRAV18-1 は複数の同一クローンを個体間で認めた。一方、TCRBV8-2 では同一クローンは認められなかった (表 1)。

AV18-1						BV8-2					
Clonal frequency	AV18-1	N	AJ	AJ gene		Clonal frequency	BV8-2	N-D-N	BJ	BJ gene	
#1	12/17	CAT	LYSGGS	NAKFLT	AJ42 ↑	#1	4/17	CAS	GDWAGA	GNTLYGF	BJ.1.3
	3/17	CAP	HNTNN	TGKFLT	AJ27		4/17	CAS	GDWAGA	TGQLYGF	BJ.2.2
	2/17	CAT	DRGGGS	NYKFLT	AJ53		3/17	CAS	GGRDRGR	AEDQGF	BJ.2.1
#2	7/17	CAT	LYSGGS	NAKFLT	AJ42 ↑	#2	2/17	CAS	GGRDRSP3	TEVDFG	BJ.1.1
	5/17	CAT	VTSGG	NYKPTF	AJ06		1/17	CAS	GDADRQ	SNERFG	BJ.1.4
	2/17	CAT	DYSGGS	NAKFLT	AJ42 ↓		1/17	CAS	GGWGG	SQNTLYGF	BJ.2.4
	1/17	CAH	YNTN	TGKFLT	AJ27 ↓		1/17	CAS	GDA	NLYGF	BJ.2.4
	1/17	CAT	ETGG	ADRLTF	AJ45		1/17	CAS	SGOD	ODTQYGF	BJ.2.5
#3	1/17	CAT	DSANYG	NEKIFT	AJ48	#3	7/18	CAS	GEPYWP	SQNTLYGF	BJ.2.4
	6/20	CAH	YNTN	TGKFLT	AJ27 ↓		4/18	CAS	GYRGA	SGNTLYGF	BJ.1.3
	5/20	CAT	LYSGGS	NAKFLT	AJ42 ↑		2/18	CAS	GERTGV	YEQYGF	BJ.2.7
2/20	CAT	GNTN	TGKFLT	AJ27 ↓	1/18		CAS	GR	NLYGF	BJ.1.3	
2/20	CAT	DASGGF	SSALFT	AJ35 ↓	1/18		CAS	GNGGR	NLYGF	BJ.1.3	
1/20	CAT	GGSA	LGRFLH	AJ18 ↓	1/18		CAS	GDRYK	NLYGF	BJ.1.3	
#4	1/20	CAA	NVGD	NSKLIW	AJ38	#4	1/18	CAS	SEGTG	DTQYGF	BJ.2.5
	1/20	CAT	SGGS	NAKFLT	AJ42 ↓		1/18	CAS	GDGLGRR	YEQYGF	BJ.2.7
	8/17	CAT	LYSGGS	NAKFLT	AJ42 ↑		#5	5/17	CAS	DARDWGA	NLYGF
3/17	CAT	LNSGGS	NYKYFV	AJ40 ↓	3/17	CAS		GDWQ	NVAEQGF	BJ.2.1	
2/17	CAT	DASGGF	SSALFT	AJ35 ↓	3/17	CAS		GDARGG	AETLYGF	BJ.2.3	
#5	1/17	CAT	ATSS	GKLFV	AJ16 ↓	#5	2/17	CAS	GEGC	SPLYAF	BJ.1.6
	1/17	CAT	GGSA	LGRFLH	AJ18 ↓		2/17	CAS	GGEQV	EQYGF	BJ.2.7
	1/17	CAH	YNTN	TGKFLT	AJ27 ↓		1/17	CAS	GDGGTSQ	NLYGF	BJ.1.3
	1/17	CAL	SSN	TDKVFV	AJ34		1/17	CAS	GLTDSG	NLYGF	BJ.1.3
	8/20	CAT	LYSGGS	NAKFLT	AJ42 ↑		#5	5/18	CAS	GGAGRRG	EDYGF
5/20	CAH	YNTN	TGKFLT	AJ27 ↓	3/15	CAS		GGGQF	SYNSRYAF	BJ.1.6	
3/20	CAT	FYGGGS	NYKFLT	AJ53	3/15	CAS		GDARVA	YEQYGF	BJ.2.7	
#5	1/20	CAT	GNTN	TGKFLT	AJ27 ↓	#5	2/15	CAS	KRSGG	SDTYGF	BJ.1.2
	1/20	CAT	SGGS	NAKFLT	AJ42 ↓		2/15	CAS	SLLV	NOOTQYGF	BJ.2.5
	1/20	CAT	NTC	YKVFV	AJ49		#5	5/18	CAS	GDVITGD	NTEVFG
1/20	CAT	WYGG	NYKFLT	AJ53	4/18	CAS		GGRDAV	ETLYGF	BJ.2.3	
1/20	CAT	NTC	YKVFV	AJ49	4/18	CAS		GLPE	AETLYGF	BJ.2.3	
						3/18	CAS	GEWAD	QNTLYGF	BJ.2.4	
						1/18	CAS	GA	NERFG	BJ.1.4	
						1/18	CAS	FGG	QPAFLG	BJ.1.5	
						1/18	CAS	GLL	PVLDQGH	BJ.1.7	

表 1: TCRAV18-1 TCRBV8-2 における CDR3 アミノ酸配列解析

5) 各種サイトカインの解析 Pd アレルギーモデルマウス

定量 RT-PCR 解析において、金属アレルギーを誘導されたマウス Footpad (条件: 2Priming 3Challenge、最終誘導注射後 1w) は Th1 タイプのサイトカインの亢進を認めた。さらに CD3、CD8、CD25 (IL-2R)、CD69、Fas の発現レベルがコントロール群に比べて有意に増加した (図 4)。

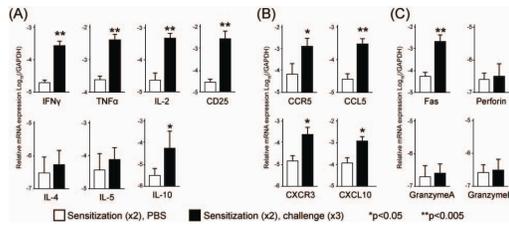


図 7: 誘導注射後 1 週間での Footpad サイトカインプロファイル

マウスに感作、誘導を繰り返し行うことによって Pd・Ni とともに足底部に T 細胞誘導を認めるアレルギーマウスモデルを確立した。型アレルギー反応は、様々な抗原や環境アレルゲンに繰り返し曝露されることによって惹起される疾患である。金属アレルギーマウスモデルの確立には一般的なアレルギー惹起の過程と同じように抗原である金属を繰り返し感作、誘導することが必要であると考えられた。

Pd アレルギーモデルマウスにおいては、TCR レパトア解析の結果から、金属アレルギーモデルマウスの炎症部浸潤 T 細胞が、特定の TCR ファミリーを高度に使用し、抗原特異的であることが考えられた。また個体間で共通して得られた TCR クローンが、複数の V 鎖、V 鎖から構成されたことは、生体が認識しえる金属によって修飾されたエピトープが複数に及ぶことを反映しているものと推測された。さらにクローンレベルの解析において、TCR 鎖が限定的であるのに対して、TCR 鎖が多様である炎症部浸潤 T 細胞の傾向から、金属複合体抗原の認識において TCR 鎖が重要であることが考えられた。興味深いことに、近年、ヒト金属アレルギーにおける T 細胞クローン研究は、特異的 TCR 鎖によるスーパー抗原様の反応が病態形成に寄与する可能性を報告している (J Exp Med 2003 May 19;197(10):1345-53)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kobayashi H, Kumagai k, Gotoh A, Eguchi T, Yamada H, Hamada Y, Suzuki S, Suzuki R. Upregulation of epidermal growth factor receptor 4 in oral leukoplakia. *Int J Oral Sci* 2013, 5(1):14-20.

[学会発表](計 3 件)

江口貴紀, 小林浩, 熊谷賢一, 重松宏昭, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二
新規金属アレルギーモデルマウスの作製と T 細胞発現解析
第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会
2012.5.17-18 広島国際会議場

(若手優秀ポスター賞受賞)

小林浩, 江口貴紀, 熊谷賢一, 重松宏昭, 後藤哲人, 濱田良樹, 鈴木隆二

新規金属アレルギーモデルマウスにおける網羅的 T 細胞レセプター解析

第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会
2012.5.17-18 広島国際会議場

(若手優秀ポスター賞受賞)

Kenichi Kumagai, Hiroshi Kobayashi, Akito Gotoh, Takanori Eguchi, Hiroyuki Yamada, Ryuji Suzuki, Yoshiaki Hamada

Synchronous modulation of epidermal growth factor receptor family genes in oral premalignant lesions

20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery

Santiago, Chile, November 1-4, 2011

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤哲人

研究者番号: 50518131

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号: