

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790352

研究課題名（和文）

金属アレルギー特異的 T 細胞と抗原の特定

研究課題名（英文）

Identification of T lymphocytes and antigens involved in metal allergy

研究代表者

川野 光子（KAWANO MITSUKO）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：90422203

研究成果の概要（和文）：

金属アレルギーは接触性皮膚炎の一つとして分類され、遅延型過敏反応と考えられている。近年の医療技術の進歩により生体材料として金属が多用され、それに伴い金属アレルギーの罹患者数は年々増加している。金属アレルギーの発症機序は不明な点が多く、ステロイドによる炎症緩和以外に治療法はなく、根治療は現時点では困難である。金属アレルギーと従来から報告されている接触性皮膚炎との違いについて分子レベルでの詳細な解析はなされていない。その理由としては、金属アレルギーにおける抗原提示細胞や T 細胞、抗原ペプチドの同定が金属種ごとに包括的に進められていないことが挙げられる。そこで本研究では金属アレルギーの予防および診断に関する理論的基盤の確立を目指し、金属アレルギーの原因となる抗原と T 細胞受容体を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要（英文）：

Metal allergy is classified as contact hypersensitivity, which is known as delayed type hypersensitivity. Whereas use of metals as biomaterials is increasing depending on progression of medical technology, patients of metal allergy are also increasing. Mechanisms of metal allergy are under investigation, because identification of antigen presenting cells, effector T cells and antigen peptides of metal allergy have not been carried out comprehensively. Therefore, treatment of metal allergy is only alleviation of inflammation by administration of steroid. In this study, identification of T cell receptor and antigen peptide of metal allergy was focused for development of theoretical basis about prevention and diagnosis for metal allergy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：金属アレルギー、遅延型過敏反応、T 細胞受容体レパトア

## 1. 研究開始当初の背景

金属アレルギーは年々増大の一途を辿っており、掌蹠膿疱症などの重篤な合併症を併発するケースも少なくない。医療技術の進歩により、生体材料としてステント、インプラントなどの埋入金属、補綴治療が多用されているが、アレルギーや炎症などの原因となっ

た場合、簡単に取り外すことは出来ず、患者の時間的・身体的・経済的負担が大きい。また、金属アレルギーの発症機序は未だ不明であり、早急な対策が求められている。金属アレルギーの診断法は、数十年に渡りパッチテストが広く用いられており、各金属に対する反応性の有無をダイレクトに捉えられると

いう利点がある。一方で、数十年間パッチテストの方法は見直されておらず、パッチテストにより新たな金属に対して感作が成立し発症する症例や、パッチテスト試薬の製造元により反応性が異なること、さらには受診する医療機関により判定基準が曖昧でありバラつきが多い等の問題点も指摘されている。このため、より安全で確実な新規診断法の開発が求められている。

そこで本研究では金属アレルギーの予防および診断に関する理論的基盤の確立を目指し、金属アレルギーの原因となる抗原ペプチドおよびその材料となる生体内タンパク質とエフェクターとなるT細胞をT細胞受容体レパトアレベルで明らかにすることを目的とした。本目的を達成するためには、金属アレルギーの発症機序について時系列を追って解析することが必要である。しかしながら、これまで適切な動物モデルが存在せず、世界的にもヒト患者サンプルを用いた *in vitro* 研究が主流であり、時系列的解析は不可能であった。これまでの主な金属アレルギー研究は、臨床現場において患者から末梢血単核球を分離し、その細胞群 (T細胞・B細胞・NK細胞の混合サンプル) に各種金属を添加した際に増殖促進が見られた細胞をクローン化し、TCR レパトアを解析するものであった。しかしながら、ヒトの場合は単一の金属にのみ暴露されているという状況は皆無に近く、さまざまな金属に感作されている状況が予想される。言い換えれば、金属特異的な反応を捉えている場合もある一方で、金属間の交差反応を捉えている可能性を否定できない。そのため、TCR レパトア解析結果は、同一の金属に対するものであってもさまざまなレパトアがピックアップされてきた。こうした背景には、金属アレルギーに対する適切な動物モデルがこれまで存在しなかったことが挙げられる。金属特異的なアレルギー反応を動物に誘導することが可能となれば、時系列を追って金属アレルギーの病態を解析することが可能となり、金属アレルギーの予防および診断に関する理論的基盤の確立への貢献が期待できる。

## 2. 研究の目的

これまで金属アレルギーの研究は、患者の採血サンプルから末梢血単核球を分離し、金属溶液を添加した際に増殖の見られるT細胞を単離し、T細胞受容体レパトアを解析することが主であった。しかしながら、既に発症している患者の細胞を使用することは、ダイレクトな反応を捉えられるという利点がある一方で、発症段階を経時的に解析することが不可能であること、ヒトは生活する上で複数の金属に曝されており、金属特異的な反応

を見ることは不可能であること等、問題点も残されていた。この背景には、上述の通り、金属アレルギーに対する適切なモデル動物が開発されてこなかったことが挙げられる。そこで金属アレルギーを効率的に発症するモデルマウスの構築を試みた。金属アレルギーの発症状況は、口腔内や皮膚における金属感作が起発地点と予想され、金属が細菌と共存する環境と言える。したがって、細菌構成成分をアジュバントとして使用することで、生体における感作状況と近い環境を再現し、金属アレルギー発症の効率化を目指した。その結果、金属のみによる感作では、惹起時の炎症応答がほとんど見られないのに対し、細菌成分と金属溶液の混合液で感作を行った場合には、同じ濃度の金属溶液による惹起において効率的に炎症応答を誘導することができた。このような独創的観点から金属アレルギー発症モデルマウスの開発に成功し、金属アレルギーの発症機序について時系列を追って解析することが可能となった。申請者はこれまでに、金属アレルギーによりT細胞受容体レパトアに変化が見られること、マウスの系統により反応性が異なることなど、*in vivo*, *in vitro*, *in silico* において重要な知見を得ており、実験手法は既に確立していた。本研究では、このマウスモデルを応用し、金属アレルギーの発症に特異的に関与するエフェクターT細胞をT細胞受容体レパトアレベルで網羅的に解析すると同時に、抗原ペプチド探索のための実験系の確立を行い、金属アレルギーの抗原提示の詳細を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) BALB/c マウス (7-10 週齢、♀) にパラジウム (Pd) アレルギーを誘導した。Pd と lipopolysaccharide (LPS) の混合液を 1 匹あたり 250  $\mu$ l 腹腔内投与し、10 日後に Pd 溶液 20  $\mu$ l をマウス耳介に皮内注射し Pd アレルギーを惹起した。Pd アレルギー誘導後、その所属リンパ節細胞をヌードマウス (BALB/c nu-nu, 7-10 週齢、♀) に養子移入 ( $1 \times 10^6$  cells/head, *i.v.*) した後、Pd 溶液 20  $\mu$ l をマウス耳介に皮内注射し惹起した。ヌードマウスへの移入・惹起を繰り返し、エフェクターT細胞の濃縮を行った。この移入繰り返しマウスを用いて Pd にて惹起後 24 時間目に所属リンパ節およびアレルギー誘導部位 (耳介) を採取、RNA を抽出後、Adaptor-ligation PCR と Microplate hybridization assay を施行した。これにより、T細胞受容体  $\alpha$  鎖および  $\beta$  鎖の V ファミリーレパトアについて、網羅的かつ定量的に解析した。対照群と比較して蛍

光強度が有意に高いレパトアを検出した。

- (2). Pd アレルギー特異的 T 細胞受容体レパトア解析の結果を元に、スーパーコンピュータを用いて、MHC class I あるいは II との結合エネルギー状態を計算し、in silico における三次元立体構造解析を行った。結合エネルギーを指標に、より安定に免疫シナプスを形成する MHC の予測を行った。
- (3). C57BL/6 マウス (7-10 週齢、♀) に金属溶液を腹腔内投与し、腹腔浸出性マクロファージ (Pd-PEC) を回収・培養後、接着した細胞のみを抗原提示細胞として用いた。一方、C57BL/6 マウス (7-10 週齢、♀) 足蹠に Pd アレルギーを誘導し、その所属リンパ節である膝窩リンパ節の細胞 (Pd-LN) をエフェクター細胞として用いた。コントロールとしては、naive マウスから得た PEC と LN を用いた。Pd-LN を Pd-PEC と共培養し、金属にて 24 時間処理後、培養上清を回収し、ELISA にてサイトカイン産生を定量・評価した。
- (4). (3) により in vitro において金属特異的な免疫応答を構築し、更なる解析が可能となったことから、金属アレルギーにおける抗原ペプチドの探索を行った。C57BL/6 マウス (7-10 週齢、♀) マウスの各種臓器からタンパク質を抽出後、Pd カラムまたはニッケル (Ni) カラムに供し、Pd 結合性または Ni 結合性のタンパク質を得た。これらのタンパク質を(3) のアッセイ系に供し、特異的なサイトカイン産生が見られるか否か検討した。

#### 4. 研究成果

- (1). Pd アレルギーの誘導に特異的に関わる T 細胞受容体レパトアを解析した結果、所属リンパ節とアレルギー誘導部位の両方で同じレパトアの skew が確認された。その頻度は、理論値として  $5 \times 100,000,000,000,000,000$  通りの多様性を持つ T 細胞を数種類にまで絞り込み、V $\alpha$  鎖を決定した。これにより、本研究で用いた金属アレルギー誘導モデルおよび effector T 細胞濃縮の系が、金属特異的な反応を誘導しているものと考えられた。また、V $\beta$  鎖についての解析を現在行っている。さらにアレルギー誘導後、炎症部位に浸潤する T 細胞がどのように変化するか経時的な解析を進めており、炎症誘導時に関与する T 細胞と炎症収束

時に関与する T 細胞をレパトアレベルで決定したい。

- (2). Pd アレルギー惹起後 24 時間目に見られた特異的 T 細胞受容体レパトア V $\alpha$  鎖の情報をもとに in silico 解析を行った結果、結合エネルギーの計算値から、候補 MHC を決定した。今後、V $\beta$  鎖の情報も得ることで、より精度の高い予測が可能となり、抗原ペプチドのアンカー部分の予測が可能となる事から、V $\beta$  鎖の解析を進めている。
- (3). 金属誘導性の PEC を抗原提示細胞として Pd-LN と共培養することで、金属特異的な免疫反応をサイトカイン産生として in vitro で誘導することができた。一方、naive-PEC を用いた場合には、同濃度・同時間の金属処理にも関わらず、サイトカイン産生は見られなかったことから、抗原提示細胞を予め金属と接触させることにより、in vitro において金属特異的な反応を誘導可能であることが示唆された。この反応系を用いることで T 細胞増殖の指標となるサイトカイン産生の定量も可能であり、金属アレルギーを誘導したマウスの所属リンパ節細胞をエフェクター細胞として用いた場合にのみ IL-2 の産生が検出された。
- (4). (3) で構築された in vitro のアッセイ系を用い、抗原ペプチドの探索に応用した。SDS-PAGE により、Pd 結合性タンパク質画分と Ni 結合性タンパク質画分とに明らかにサイズの異なるタンパク質が含まれることが確認された。これは、金属特異的に反応するタンパク質が異なることを示唆する。したがって、Pd-PEC と Pd-LN との共培養系に肝臓および脾臓から得られた Pd 結合性タンパク質画分または Ni 結合性タンパク質画分を添加し、サイトカイン産生を評価した。その結果、特異的と考えられるサイトカイン産生は得られなかった。これは、金属結合性のタンパク質が存在するにも関わらず、抗原提示細胞においてプロセッシングを受けず、抗原ペプチドとして機能していないことを示唆する。これらのことから、抗原ペプチドの探索において、①他の組織に存在する金属結合性のタンパク質をターゲットとする、②金属結合性ではないタンパク質の中から金属添加時に編成するタンパク質をターゲットとする、③金属投与により変性するペプチドをターゲットとする、等を検討する必要がある。現在は他の組織から抽出された金属結合性タンパク質の解

析を行っている。

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2件)

総説

- (1). 川野光子、小笠原康悦 金属アレルギーの免疫学 Up-to date. *Visual Dermatology*. 10: 1208-1212. 2011. 査読無

原著論文

- (1). Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. Natural Killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4+ T cells. *PNAS*. 108: 18360-18365. 2011. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- (1). 川野光子、中山勝文、青島有佑、園淵和明、中村生、渡邊真通、小笠原康悦 Analysis of T cells on development of metal allergy. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月13日 福岡
- (2). 川野光子、熊谷賢一、小林浩、中山勝文、鈴木隆二、小笠原康悦 Investigation of metal allergy using mouse model. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月28日 幕張メッセ

〔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

川野光子 (KAWANO MITSUKO)  
東北大学・加齢医学研究所・助教  
研究者番号：90422203

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：