

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670503

研究課題名(和文)可溶性TCRを用いた薬剤・金属アレルギー抗原の検索

研究課題名(英文)The exploration of cognate antigens, which induce drug or metal allergy by using soluble TCR

研究代表者

荒瀬 規子 (Arase, Noriko)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：30360481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：重症薬疹の一部で特定のHLAアリルとの相関が知られ、細胞性免疫との関連が考えられる。金属アレルギーも自然免疫系及びT細胞の活性化が知られる。しかしこれら低分子物質によるIV型アレルギーの分子機構は未だ解明されていない。私たちはTCR鎖を可溶化し薬剤・金属アレルギーの抗原本体を明らかにしようとした。

まずpeptide抗原特異的T細胞クローンのTCR鎖を可溶性に組み替えた所、この可溶性TCRはpeptide特異的に反応した。次に金属特異的T細胞クローンより可溶性TCRを作成し種々の調整を加え金属への反応を解析したが、抗原特異的反応を示さなかった。可溶性TCR産生系にさらに改良が必要だった。

研究成果の概要(英文)：Recently, association between severe drug eruption and specific HLA allele has been identified, suggesting major role of T cell-immunity. T cell is also involved in metal allergy besides the activation of innate immunity. Whereas molecular mechanism how these small molecules to induce T cell response remains unclear. We considered that we could determine the nature of antigens by using recombinant solubilized T cell receptor. At first, we developed recombinant TCR chains specific for the certain peptide antigen. These TCR chains react specifically to the peptide on antigen presenting cells. Next we established metal specific T cell clones, and confirmed the specificity of them. Thereafter, we established solubilized TCR chains and analyzed the specificity. Unfortunately, these soluble TCR did not react specifically to the metal antigens. From these observations, it was revealed that method to produce soluble TCR for metal antigen need to be further optimized.

研究分野：皮膚科学 免疫学

キーワード：可溶性TCR 金属アレルギー 薬剤アレルギー HLA

1. 研究開始当初の背景

近年重症薬疹のいくつかで、特定の HLA アリルと発症との関連が明らかとなってきた。HLA の重要な機能の一つに抗原提示細胞上の Class I/Class II 分子による T 細胞への抗原提示があることから、薬疹における T 細胞の重要性がさらにクローズアップされたと言える。

一方、金属アレルギーでも自然免疫系の活性化以外に、T 細胞による遅延型過敏反応に関するエビデンスがある。しかしこれら薬剤や金属など低分子物質による IV 型アレルギー発症の分子機構は未だ解明されていない。

2. 研究の目的

私たちは T 細胞抗原レセプター (以下 TCR) 鎖を可溶化 TCR に組み替えることで薬剤・金属アレルギーでの T 細胞の抗原本体を直接明らかにできるのではないかと考えた。本研究により薬剤・金属アレルギーの抗原本体を明らかにし、薬剤・金属アレルギーの分子メカニズムの解明や、治療法開発も期待できると考えた。

3. 研究の方法

peptide 特異的 TCR $\alpha\beta$ 鎖それぞれをクローニングした。それらの TCR $\alpha\beta$ 鎖をリンカーで結合、可溶型のコンストラクトを設計した。細胞を用いてこの可溶型蛋白を作成、精製した。

さらに複数のヒト金属特異的 T 細胞ラインの TCR $\alpha\beta$ 鎖をクローニングした。それらを TCR $\alpha\beta$ 鎖欠損 T cell line に移入し、TCR 特異的な金属反応性 T cell line を樹立した。

次にこれら金属特異的 TCR を peptide 特異的 TCR 同様可溶型コンストラクトに組み替えアッセイに使用した。

4. 研究成果

まず、peptide 特異的 TCR $\alpha\beta$ 鎖可溶型のコンストラクトを作成した結果、この可溶型 linear TCR は peptide 抗原特異的に HLA Class II と抗原に反応することが判明した。

さらに金属や薬剤などの低分子物質に反応する T 細胞が TCR 特異的に反応を起こすか確認する目的で、複数のヒト金属特異的 T 細胞ラインの TCR $\alpha\beta$ 鎖をクローニングした。それらを TCR $\alpha\beta$ 鎖欠損 T cell line に移入し、TCR 特異的な金属反応性 T cell クローンを樹立することに成功した。

これらの金属特異的 TCR クローンは金属特異的な反応を示すことが明らかとなった。

そこで peptide 特異的可溶型 TCR と同様の方法で、金属特異的 T 細胞クローンより可溶型 TCR を作成し抗原提示細胞上の金属への反応を解析した。その結果、金属特異的可溶型 TCR は peptide 特異的可溶型 TCR のような抗原特異的の反応を示さなかった。

以上のことより可溶型 TCR の作成には TCR alpha beta 鎖の種類によりコンストラクトの設計上微妙な調整が必要と考え、種々の調整やコンストラクトの構造の全面的な改変を試みさらに研究を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Tanimura, K., Jin, H., Suenaga, T., Morikami, S., Arase, N., Kishida, K., Hirayasu, K., Kohyama, M., Ebina, Y., Yasuda, S., Horita, T., Takasugi, K., Ohmura, K., Yamamoto, K., Katayama, I., Sasazuki, T., Lanier, L. L., Atsumi, T., Yamada, H. and Arase, H. 2-glycoprotein I / HLA class II complexes are novel autoantigens in antiphospholipid syndrome. *Blood*. 125: 2835-2844, 2015, 査読有 DOI: 10.1182/blood-2014-08-593624.
2. Nishioka M, Tanemura A, Yang L, Tanaka A, Arase N, Katayama I: Possible involvement of CCR4+ CD8+ T cells and elevated plasma CCL22 and CCL17 in patients with rhododendrol-induced leukoderma. *J Dermatol Sci.* 77(3):188-90, 2015, 査読有
3. Arase, N., Arase, H. Cellular misfolded proteins rescued from degradation by MHC class II molecules are possible targets for autoimmune diseases. *J. Biochem.* 158:367-372, 2015, 査読有
4. Jin, H., Arase, N., Hirayasu, K., Kohyama, M., Suenaga, T., Saito, F., Tanimura, K., Matsuoka, S., Ebina, K., Shi, K., Toyama-Sorimachi, N., Yasuda, S., Horita, T., Hiwa, R., Takasugi, K., Ohmura, K., Yoshikawa, H., Saito, T., Atsumi, T., Sasazuki, T., Katayama, I., Lanier, L.L., and Arase, H. Autoantibodies to IgG/HLA-DR complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: 3787-3792. 2014. 査読有

- DOI: 10.1073/pnas.1401105111.
5. Arase, N., Wataya-Kaneda, M., Oiso, N., Arase, H., Katayama, I. CD1a-positive familial cutaneous mastocytosis without germ-line or somatic mutations in c-kit. *Br J Dermatol.* 169:201-204. 2013, 査読有 DOI: 10.1111/bjd.12265.
 6. Jiang, Y., Arase, N., Kohyama, M., Hirayasu, K., Suenaga, T., Jin, H., Matsumoto, M., Shida, K., L. Lanier, L., Saito, T. and Arase, H. Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int. Immunol.* 25:235-246, 2013, 査読有 DOI: 10.1093/intimm/dxs155.
 7. 荒瀬 規子、荒瀬尚、ミスフォールド蛋白質 / 主要組織適合抗原複合体と自己免疫疾患(総説) 日本臨床、第74巻 第2号 359-368, 2016, 査読無
 8. 荒瀬 規子、宮下恵実子、崎元和子、片山一朗、[mast cell が関与する皮膚疾患 皮膚科医にとっての must](Part2.) 肥満細胞：皮膚疾患における役割 (case05) bullous mastocytosis. *Visual Dermatology* 14(1):48-50, 2015, 査読無
 9. 荒瀬 規子、金 暉、荒瀬 尚、自己免疫疾患の新たな発症メカニズム、感染・炎症・免疫、第44巻 2号 67-69, 2014, 査読無
 10. 荒瀬 規子、金 暉、荒瀬 尚、自己免疫疾患の新たな発症メカニズム、細胞工学、第33巻 第7号 762-763, 2014, 査読無
 11. 荒瀬 規子、自己免疫疾患の新たな発症メカニズム、細胞工学、第33巻 第7号 762-763, 2014, 査読無
 12. 荒瀬 規子、村上有香子、高橋 彩、松井佐起、糸井沙織、山岡俊文、遠山知子、田中文、片山一朗、一般病院における手湿疹患者の労働生産性、生活の質、医療費に関する検討、*J Environ Dermatol Cutan Allegol.* 7(2), 87-92, 2013. 査読有
 13. 荒瀬規子、千田聡子、井川 健、片山一朗：乳房針生検部より限局性強皮症を発症した例。皮膚病診療 35(10)、949-952. 2013. 査読有
- [学会発表](計 21 件)
1. 荒瀬 規子、Cellular misfolded proteins complexed with MHC class II molecules are targets for autoimmune diseases, (招待講演) 高知大学(高知) 2015年1月日
 2. Noriko Arase, Kenji Tanimura, Jin Hui, Sumiko Matsuoka, Toshifumi Yamaoka, Megumi Nishioka, Eiji Kiyohara, Mamori Tani, Koichiro Ohmura, Hiroyuki Murota, Hisashi Arase, Ichiro Katayama: Presence of anti-2GP1/HLA-DR complex autoantibodies in the non-APS patients with recurrent limb ulcerations. 日本研究皮膚科学会 第40回学術大会・総会、(岡山)2015年12月11-13日
 3. Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Fumiji Saito, Iwatani Hirotsugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi: Myeloperoxidase/HLA class II complexes are targets for autoantibodies in ANCA-associated vasculitis, 第44回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(札幌) 2015年11月18-20日
 4. Hui Jin, Arase Noriko, Sumiko Matsuoka, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Sasazuki Takehiko, Arase Hisashi: MHC class II molecules expose autoantibody epitopes on autoantigens, 第45回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(札幌) 2015年11月18-20日
 5. Kouyuki Hirayasu, Fumiji Saito, Suenaga Tadahiro, Shida Kyoko, Kyoko Shida, Noriko Arase, Yasuhiko Oikawa Keita, Yamaoka Toshifumi, Hiroyuki Murota, Chibata Hiroji, Hiroki Nagai, Nakamaru, Ichiro Katayama, Hisashi Arase, DIR is an innate immune sensor for microbially cleaved immunoglobulins, 第45回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(札幌) 2015年11月18-20日
 6. Kohyama Masako, Matsuoka Sumiko, Arase Noriko, Arase Hisashi: PILR negatively regulates monocyte infiltration into the skin, 第45回日本免疫学会学術集会、札幌コンベンションセンター(札幌) 2015年11月18-20日
 7. Noriko Arase, Hui Jin, Kenji Tanimura, Toshifumi Yamaoka, Eiji Kiyohara, Koichiro Ohmura, Hiroyuki Murota, Hisashi Arase, Ichiro Katayama: Novel

- autoantibody against the 2GP1/HLA-DR complex in patients with refractory cutaneous ulcerations. 14th International Workshop on Langerhans Cells, Kyoto, Japan 2015 年 11 月 5-8 日
8. 日和良介, 大村浩一郎, 荒瀬規子, 金暉, 平安恒幸, 香山雅子, 末永忠広, 齋藤史路, 岩谷博次, 渥美達也, 寺尾知可史, 三森経世, 荒瀬尚: MPO/HLA class 複合体は顕微鏡的多発血管炎における自己抗体の標的である、第 43 回日本臨床免疫学会総会、神戸国際会議場(兵庫)、2015 年 10 月 22-24 日
 9. 荒瀬 規子、Hui Jin、谷村憲司、山岡俊文、室田浩之、荒瀬尚、片山一朗: ミスフォールドタンパク質-HLA クラス II 複合体と自己免疫疾患-原因不明難治性皮膚潰瘍症例での 2GP1 HLA-DR 複合体抗体の検討- 第 22 回分子皮膚科学フォーラム、(高知) 2015 年 4 月 17-18 日
 10. 荒瀬 規子: ミスフォールド蛋白質-MHC Class II 複合体と自己免疫疾患、第 3 回ケラチノサイトと免疫を勉強する会、(東京) 2015 年 3 月 28 日、
 11. Noriko Arase, Atsushi Tanemura, You Reiri, Megumi Nishioka, Jin Hui, Hisashi Arase, Ichiro Katayama, Inhibition of melanogenesis by HLA class II molecules, 日本研究皮膚科学会 第 39 回年次学術大会・総会、ホテル阪急エキスポパーク(大阪) 2014 年 12 月 12 日
 12. Hiwa Ryosuke, Ohmura Koichiro, Arase Noriko, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Matsuoka Sumiko, Iwatani Hirotugu, Atsumi Tatsuya, Terao Chikashi, Mimori Tsuneyo, Arase Hisashi, 第 43 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館(京都) 2014 年 12 月 12 日
 13. Jin Hui, Arase Noriko, Matsuoka Sumiko, Hirayasu Kouyuki, Kohayama Masako, Suenaga Tadahiro, Nakamaru Yuji, Imatani Yoshinori, Katayama Ichiro, Arase Hisashi, MHC class II-restricted recognition of self-antigen/MHC class II complexes by autoantibodies, 第 43 回日本免疫学会学術集会、国立京都国際会館(京都) 2014 年 12 月 10 日
 14. 荒瀬 規子、村上有香子、高橋彩、松井佐起、越智沙織、山岡俊文、遠山知子、田中文、片山一朗: 一般病院における手湿疹患者の労働生産性、生活の質、医療費に関する検討、日本皮膚アレルギー接触皮膚炎学会、(仙台) 2014 年 11 月 22-24 日
 15. Kouyuki Hirayasu, Fumiji Saito, Hiroki Nagai, Kyoko Shida, Noriko Arase, Yasuhiko Horiguchi, Yuji Nakamaru, Ichiro Katayama, Hisashi Arase, Immune sensing system for bacterially degraded immunoglobulin via activating receptor DIR, 第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良県新公会堂(奈良) 2014 年 9 月 24 日
 16. Jin, H., Arase, N., Hirayasu, K., Kohyama, M., Suenaga, T., Saito, F., Tanimura, K., Matsuoka, S., Ebina, K., Shi, K., Toyama-Sorimachi, N., Yasuda, S., Horita, T., Hiwa, R., Takasugi, K., Ohmura, K., Yoshikawa, H., Saito, T., Atsumi, T., Sasazuki, T., Katayama, I., Lanier, L.L., and Arase, H. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis Specifically Recognize IgG Heavy Chain Complexed with HLA-DR, Which is Strongly Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility. The 15th Annual European Congress of Rheumatology EULAR 2014, Paris(France), Jun. 13th, 2014
 17. 荒瀬規子、種村篤、金暉、揚伶俐、竹岡啓子、西田誠、瀧原圭子、日高洋、岩谷良則、荒瀬尚、片山一朗: 後天性白斑患者における自己抗体出現パターンの検討、第 113 回日本皮膚科学会総会、京都国際会議場(京都) 2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日
 18. 金暉、荒瀬規子、平安恒幸、香山雅子、末永忠広、松岡須美子、齋藤隆、Lewis L. Lanier、荒瀬尚、MHC クラス 分子によって細胞外へ輸送された細胞内ミスフォールド蛋白質が自己抗体の標的分子である、MHC クラス 分子によって細胞外へ輸送された細胞内ミスフォールド蛋白質が自己抗体の標的分子である、第 24 回 Kyoto T cell Conference、京都大学(京都) 2014 年 5 月 17 日
 19. 荒瀬規子: ミスフォールド蛋白質-MHC Class II 複合体と自己免疫疾患 第 2 回ケラチノサイトと免疫を勉強する会(東京) 2014 年 3 月 29 日
 20. Arase N, Tanemura A, Katayama I.: Three cases having both vitiligo and psoriasis, which are associated with autoimmune disease. 9th Asian Dermatological Congress, HongKong, China, 2013 年 7 月 10-13 日

21. 荒瀬規子：ミスフォールドタンパク質 /MHC クラス II 分子複合体と自己免疫疾患-難治性皮膚潰瘍症例での 2GPI HLA-DR 複合体抗体の検討- 高知医療再生機構補助金 専門医養成支援事業皮膚科勉強会(招待講演)、高知大学医学部(高知)2016年1月28日

〔図書〕(計2件)

1. 荒瀬規子、荒瀬尚、医薬ジャーナル社、血液フロンティア、2013、7(39-45)
2. 荒瀬規子、片山一朗、手湿疹治療の現状、WHAT'S NEW in 皮膚科学 2016-2017、52-53, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：自己抗体の検出方法、自己免疫疾患の罹患の可能性を試験する方法、自己抗体の検出試薬および自己免疫疾患用の試験試薬
発明者：荒瀬尚、谷村憲司、金暉、荒瀬規子
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-148833, PCT/JP2014/050796
出願年月日：2013年7月17日
国内外の別：国内、国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp/index.html>
<http://derma.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒瀬 規子 (ARASE, Noriko)
大阪大学・医学研究科・特任研究員
研究者番号：30360481