

- 回日本皮膚科学会東部支部総会 2007. 9. 26. 甲府市
21. 橋爪秀夫 紫外線と免疫 第 108 回日本皮膚科学会総会 4 月 25 日
 22. 橋爪秀夫 腫瘍ペプチドを用いた経皮的免疫療法 第 25 回日本悪性腫瘍学会 5 月 22 日
 23. 橋爪秀夫 重症薬疹の治療 第 21 回日本アレルギー学会春季臨床大会 6 月 5 日
 24. 橋爪秀夫 乾癬患者の QOL とネオオーラル治療 第 60 回日本皮膚科学会中部支部総会 10 月 10 日
 25. 橋爪秀夫 金属による T 細胞反応 日本皮膚アレルギー学会・接触皮膚炎学会 11 月 6 日
 26. 橋爪秀夫 An encounter of mono-myeloid precursors with CD4+ cells in skin initiates herpes virus reactivation in drug-induced hypersensitivity syndrome. 第 34 回日本研究皮膚科学会 12 月 5 日
 27. 栢島健治 「皮膚アレルギーの新しい知見と臨床応用の可能性について 第 38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学術大会 大阪、2008 年 11 月
 28. 栢島健治 「IL-17 と Th2 型免疫応答」シンポジウム 第 38 回 日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学術大会 大阪、2008 年 11 月
 29. 栢島健治「接触皮膚炎と樹状細胞」 第 3 4 6 回 日本皮膚科学会 福岡地方会北九州 2008 年 9 月
 30. 田中里奈、五井嘉明、石原研治、上田恭介、成島尚之、大津浩、大内和雄、平澤典保 生体内における金属からのニッケル溶出の簡易測定法の確立と溶出機序の解析 日本薬学会第 129 年会(京都、2009 年 3 月 26-28 日)

H.知的財産権の出願・登録状況

該当無し

II. 総合分担研究報告

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
総合分担研究報告書

分担課題：マウス金属アレルギーモデルを用いた金属アレルギー特異的 T 細胞解析

分担研究者 小笠原 康悦 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 教授
国立国際医療センター研究所 地域保健医療研究部 特任研究員

研究協力者 笹月 健彦 国立国際医療センター 名誉総長
中山 勝文 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 助教
川野 光子 東北大学加齢医学研究所 加齢生体防御学研究分野 非常勤講師

研究要旨

金属アレルギーは T 細胞依存性の IV 型（遅延型）アレルギー反応であると考えられているが、その分子機構は不明のままである。我々は、当研究班で開発した金属アレルギーマウスモデルを用い、金属暴露と養子移入を繰り返すことで、アレルギー特異的な T 細胞を濃縮し、エフェクター細胞の同定を試みた。また、高濃度の金属を投与した際に見られる炎症と、金属アレルギーを誘導した際に見られる炎症について組織化学的な解析を行い、その違いを明らかにした。移入を繰り返したマウス耳介に金属を投与し、24 時間後のマウス耳介を比較したところ、金属アレルギーを誘導した場合には T 細胞の浸潤が明らかに認められたのに対し、金属による炎症を誘導したマウス耳介においては、好中球の著しい浸潤が認められた。耳介への T 細胞の浸潤をフローサイトメトリーにより解析したところ、金属アレルギー誘導マウスにおいて、CD4+T 細胞および CD8+T 細胞の両方の細胞の浸潤が確認された。さらに IFN- γ がアレルギーの発症に関与するののかについて追究した。IFN- γ ノックアウトマウスに金属アレルギーを誘導したところ、ノックアウトマウスでは明らかに耳介の腫脹が軽減されており、金属アレルギーの発症が抑制された。また、耳介への T 細胞の浸潤をフローサイトメトリーにより解析したところ、IFN- γ ノックアウトマウスでは明らかに T 細胞の割合が低下しており、金属アレルギーの発症段階において IFN- γ の関与が示唆された。

A. 研究目的

金属アレルギーは、我々に身近なアレルギー疾患であり、ピアスなどの装飾品や、歯科医療で用いられるパラジウム(Pd)、銀(Ag)、銅(Cu)、ニッケル(Ni)など多様な金属を含む合金がその原因となる場合が多い。例えば、口腔内ではこれらの金属がイオン化し、口腔細菌、唾液、血液などのタンパクと結合して抗原性を持つのではないかと考えられている。すなわち金属アレルギーは、イオン化した金属に細菌成分などがアジュバントとして働き、アレルギーの発症および増悪に関与している可能性が考えられる。しかしながらその発症

の分子機構は不明である。

金属アレルギーは、遅延型過敏反応とされ T 細胞主体のアレルギー反応とされている。我々は、金属アレルギーマウスモデルを用いて、金属アレルギーの病態、発症における分子の変化を時系列的に解析し、新規診断、予防、治療法の開発を目指すことを目的としている。今年度は、共刺激分子として NKG2D や抗原提示にかかわるプロテアソームがアレルギー発症に関与しているのか、また金属アレルギーの発症により TCR レパトアが変化するのかについて追究した。今回エフェクター細胞としてアレルギー発症部位に浸潤している T 細胞を検出するべく、蛍光免疫染色を

行った。また、IFN- γ KO マウスを用いてパラジウム (Pd) アレルギーの発症について検討した。

B. 方法

1) 金属アレルギーマウスモデル

C57BL/6 マウス、または BALB/c マウスに、10 mM PdCl₂ / 50 μ g/ml LPS x 250 μ l/head i.p.により Pd 感作を行い7~10 日後に 1 mM PdCl₂ を耳介に challenge して金属アレルギーを誘導した。

2) アレルギー特異的な T 細胞の濃縮

上記の方法により金属アレルギーを耳介に誘導した BALB/c マウスの顎下リンパ節を採取し、single cell に調整後、BALB/c nu-nu マウスへ i.v.により移入した。そのマウス耳介に 4~5 回 challenge を行った後、同様に顎下リンパ節を採取・調整し、同様に BALB/c nu-nu マウスへ i.v.により移入した。これを繰り返すことで金属アレルギー特異的な T 細胞の濃縮を行った。

3) 抗 NKG2D 抗体、プロテアソームインヒビターによるアレルギー治療試験

Pd 感作を行ったマウスに、抗 NKG2D 抗体 (clone: CX5) を 100 μ g/head、またはプロテアソームインヒビター MG132 を 100 μ g/head 投与した後、1 mM PdCl₂ を耳介に challenge し、耳介の腫脹の程度を検討した。

4) 蛍光免疫染色

金属アレルギーを誘導後 24 時間のマウスの耳介を採取、未固定のまま freeze block を作製し、クライオスタットにより 10 μ m にて薄切、-80 $^{\circ}$ C に保存した。染色時に冷アセトンにて固定後、blocking を行い、蛍光標識抗体にて染色、DAPI にて counter staining 後、観察を行った。

5) IFN- γ KO マウスを用いた Pd アレルギーの誘導

IFN- γ KO マウス (6 wks) に PdCl₂ / LPS を感作し、7 日後に耳介に PdCl₂ を challenge してアレルギーの誘導を行った。ポジティブコントロールとして C57BL/6 マウスに同様に

感作・challenge を行った。アレルギー誘導後、24 時間ごとに 96 時間まで耳介の腫脹測定を行うと共に、24 時間目の耳介・脾臓・顎下リンパ節を採取し、FACS により解析した。

C. 研究結果

1) アレルギー特異的な T 細胞の濃縮

移入を繰り返したマウスの顎下リンパ節において、TCR β ⁺/CD8⁺ 細胞および NKG2D⁺/CD8⁺細胞が出現することが明らかとなった (図 1)。さらに、移入を繰り返したマウスの顎下リンパ節において金属アレルギーの誘導により TCR V β 8 の割合が WT の BALB/c マウス顎下リンパ節に比べて低く、TCR レパトアが変化していることが判明した (図 2)。

2) 抗 NKG2D 抗体、プロテアソームインヒビターによるアレルギー治療試験

抗 NKG2D 抗体を投与したマウスでは、金属アレルギーの発症が有意に抑制された (図 3)。また、プロテアソームインヒビターの投与によっても、金属アレルギーの発症が有意に抑制できた (図 4)。

3) Pd アレルギーを発症したマウスの耳介切片において、T 細胞の明らかな集積が認められた。これは、フローサイトメトリーの結果と同様であった。また、Pd アレルギーを誘導した際、フローサイトメトリーにて V α 、V β の TCR は検出できたものの定量化までは至らなかった。

4) IFN- γ KO マウスに Pd で感作・誘導を行ったが、耳介の腫脹は認められなかった。

D. 考察

BALB/c nu-nu マウスには $\alpha\beta$ 型 T 細胞が存在しないことから、移入されたマウスに存在する TCR β ⁺/CD8⁺細胞は金属アレルギーを発症した WT BALB/c マウス由来細胞が増殖・分化したものと考えられる。さらに、金属アレルギー炎症が繰り返されるにつれて NKG2D の発現が増強すること、抗 NKG2D 抗体の投与により炎症が軽減されることから、

NKG2D は金属アレルギーの新たな治療標的となりうることが判明した。また、クラス I への抗原提示にはプロテアソームにおける抗原ペプチドの processing が必須であり、プロテアソームインヒビターにより発症を有意に抑制できることから、プロテアソームも治療標的となりうることが判明した。

アレルギーを起こしている耳介の蛍光免疫染色により CD4+T 細胞、CD8+T 細胞の集積が確認されたことから、Pd アレルギーにおいて T 細胞が重要な役割を担っていると考えられる。

IFN- γ KO マウスでは Pd アレルギーが起らないことから、最終的な耳介の腫脹には IFN- γ が関わっていることが考えられる。

E. 評価

1) 達成度について

金属アレルギーの診断、予防、治療に役立つ理論的基盤の確立を目指すことを目的とし、我々は特に、金属アレルギー動物モデルからの病態解明を目指してきた。これまでの成果として、

①金属アレルギー動物モデルの樹立に成功した。

②口腔内や皮膚の常在菌の菌体成分が、TLR を介して金属アレルギーの発症、増悪に関与していることが判明した。

③動物モデルの解析により、金属アレルギーを引き起こす主たる細胞集団が CD8+T 細胞であること、また、金属特異的に反応する T 細胞レパトアを特定することに成功した。

このように、金属アレルギーの診断、予防、治療に役立つ理論的基盤となる成果が得られたことから、当初の目的は充分達成できたと考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

①我々が開発した金属アレルギーマウスモデルは、*Nature* 誌の **News** にとりあげられ、国際的に高い評価を得ており、学術的にハイレベルの成果があがっている。

②動物モデルの解析により、金属アレルギーを引き起こす主たる細胞集団が CD8+T 細胞であること、また、金属特異的に反応する T 細胞レパトアを特定することに成功し、このレパトアを調べることで新たな診断法の開発に道を開き、学術的、社会的意義は大きい。

③細菌成分である TLR リガンドは強いアジュバント効果を示し、低濃度の金属塩においてもアレルギーを誘導することが判明し、学術的に意義深い。

3) 今後の展望について

これまでの研究の成果を基盤に、臨床応用を見据えた開発研究を行う。特に我々は、モデル動物からアプローチし、研究を遂行する。ヒト型動物モデルを用い、金属塩を耳介に接種することにより腫脹を測定することで、パッチテストに替わる非侵襲的革新的診断法としての可能性を追究する。

当研究班が確立した T 細胞レパトア網羅的解析法を発展させ、マーマセットを用いて金属アレルギーモデルを構築し、T 細胞レパトアの網羅的解析を行う。特定した T 細胞受容体を用いた新規金属アレルギーモデル動物を樹立し、金属の交差反応について検討する。また、金属結合ペプチドをランダムペプチドライブラリー法、質量分析法を用いて決定する。*in vitro* 金属感作法を用いて、各種ケミカルインヒビターによりプロテアソームやリソソームの関与を検討し、金属イオンとペプチドの抗原提示される機構を追究する。

研究終了時には、金属アレルギーにかかわる T 細胞集団が特定され、発症の分子機構が判明し、治療標的が明らかとなる。T 細胞レパトア検査法やヒト型動物を用いた金属アレルギー革新的診断法が開発できると考えられる。

4) 研究内容の効率性について

実験技術・試薬等に関して研究代表者・分担者間で積極的に情報交換することにより効率的に研究を遂行できた。

F. 結論

1) 金属アレルギーの発症において

TCR β ⁺/CD8⁺ 細胞が濃縮された。さらに、に NKG2D の発現が誘導されることが明らかとなった。

2) 金属アレルギーの発症に伴い、所属リンパ節に存在する $\alpha\beta$ 型 T 細胞において、TCR レパトアが変化することが判明した。

3) NKG2D 抗体の投与により金属アレルギーの発症を抑制出来ること、プロテアソームインヒビター投与でも発症を有意に抑制できることが判明した。

4) Pd アレルギーでは CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞とも重要である。

5) Pd アレルギーにおいて、アレルギー誘導部位における炎症には、IFN- γ が関与している。

G.研究発表

1) 国内

口頭発表 10 件

原著論文による発表 0 件

それ以外 (レビュー等) の発表 5 件

そのうち主なもの

論文発表

1. 著者: 小笠原康悦

題名: 発症にかかわる免疫異常

掲載誌: 新時代の糖尿病学 (1) 年月: in press

2. 著者: 小笠原康悦

題名: 自然免疫と適応免疫を繋ぐ NK 細胞群

掲載誌: The Frontiers in Medical Sciences

「免疫応答と免疫病態の統合的分子理解に向けて」年月: 2007

3. 著者: 小笠原康悦

題名: NK 細胞の制御シグナルと疾患

掲載誌: 実験医学 Vol 25 頁: 1282-1285 年月: 2007

4. 著者: Lewis L. Lanier (翻訳: 小笠原康悦)

題名: NK 活性化レセプター複合体

掲載誌: 実験医学 Vol 25 頁: 1287-1292 年月: 2007

5. 著者: 石崎和沙、小笠原康悦

題名: NK 細胞活性化レセプター NKG2D の生体内における機能

掲載誌: 実験医学 Vol 25 頁: 1321-1325 年月: 2007

学会発表

1. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Ogasawara K. CD8 α ⁺ CDs use Tim-3 for phagocytosis of dying cells and cross-presentation. The 39th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Osaka, Dec. 2009.

2. Kawano M, Takeda K, Nakayama M, Kumagai K, Kobayashi H, Suzuki R, Ogasawara K. Increased specific T cells in the inflammation are of the metal allergy. The 39th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Osaka, Dec. 2009

3. 浦野奈央子、川野光子、田中和沙、岩崎之克、中村雅典、小笠原康悦「金属アレルギーモデルマウスにおける耳介真皮への T 細胞の浸潤」第 50 回歯科基礎医学会、東京、2008 年 9 月

4. Kawano M, Urano N, Tanaka-Ishizaki K, Ogasawara K. Pathological analysis using molecular cell biological methods of mouse model for metal allergy. The 38th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto, Dec. 2008.

5. Tanaka-Ishizaki K, Kawano M, Urano N, Ogasawara K. RAE-1 is expressed on tumor associated macrophages. The 38th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, Kyoto, Dec. 2008

6. Ogasawara K

「NK 細胞による骨髄移植拒絶の分子機構」(特別講演) 第 1 回血液免疫研究会 東京、2007 年 11 月

7. Ogasawara K

「NK 細胞の認識機構と骨髄移植」(特

別講演) 第 60 回山梨血液研究会 甲
府、2007 年 10 月

8. Ogasawara K
"NKG2D in Autoimmune diabetes"
The first Diabetes Leading-edge
Conference. Shizuoka, Aug 4-5, 2007
9. Tanaka K, Urano N, Ogasawara K. Sp1
regulates NKG2D ligand RAE-1 epsilon
transcription. 37th Annual Meeting of
Japanese Society for Immunology, Tokyo,
2007.
10. Wada H, Ogasawara K, Seino K,
Kawamoto H. Notch signaling promotes
IFN- γ production in NK cell maturation.
37th Annual Meeting of Japanese Society
for Immunology, Tokyo, 2007.

2) 海外

口頭発表 3 件
原著論文による発表 9 件
それ以外 (レビュー等) の発表 1 件
そのうち主なもの
論文発表
原著論文

1. Honda T, Nakajima S, Egawa G, Malissen
B, Ogasawara K, Miyachi Y, Kabashima K.
Compensatory role of Langerhans cells
and Langerin positive dermal dendritic
cells in the sensitization phase of mouse
contact hypersensitivity. *J Allergy Clin
Immunol.* (in press)
2. Mori T, Ishida K, Mukumoto S, Yamada Y,
Imokawa G, Kabashima K, Kobayashi M,
Bito T, Nakamura M, Ogasawara K,
Tokura Y : Comparison of skin barrier
function and sensory nerve electric current
perception threshold between IgE-high
extrinsic and IgE-normal intrinsic types of
atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* (in
press).
3. Kawano M, Han J, Kchouk ME and Isoda
H: Hair growth regulation by the extract of

aromatic plant *Erica multiflora*. *J. Nat.
Med.* 63: 335-339 (2009)

4. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima
Y, Hashiguchi M, Azuma M, Yagita H, and
Okumura K. Tim-3 mediates phagocytosis
of apoptotic cells and the
cross-presentation. *Blood*, 2009, 113,
3821-3830
5. Talorete TPN, Limam A, Kawano M, Ben
Rejed Jenhani A, Ghrabi A, Isoda H.
(2008) Stress response of mammalian cells
incubated with landfill leachate.
Environmental Toxicology and Chemistry.
27: 1084-1092
6. Kawano M, Matsuyama K, Miyamae Y,
Shinmoto H, Kchouk ME, Morio T,
Shigemori H, Isoda H. (2007)
Antimelanogenesis effect of Tunisian herb
Thymelaea hirsuta extract on B16 murine
melanoma cells. *Exp. Dermatol.* 16:
977-984
7. Limam A, Talorete TPN, Ali MB, Kawano
M, Ben Rejed Jenhani A, Abe Y, Ghrabi A,
Isoda H. (2007) Assesment of estrogenic
activity in Tunisian water and wastewater
by the E-Screen assay. *Enviro.l Sci.* 14:
43-52
8. Vilarinho S, Ogasawara K, Nishimura S,
Lanier LL, Baron JL. (2007) Blockade of
NKG2D on NKT cells prevents hepatitis
and the acute immune response to hepatitis
B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
104(46):18187-92.
9. Ishizaki K, Yamada A, Yoh K, Nakano T,
Shimohata H, Maeda A, Fujioka Y, Morito
N, Kawachi Y, Shibuya K, Otsuka F,
Shibuya A, Takahashi S. (2007) Th1 and
type 1 cytotoxic T cells dominate
responses in T-bet overexpression
transgenic mice that develop contact
dermatitis. *J Immunol.* 178(1):605-12.

総説論文、著書

1. 著者 : Anthony L. DeFranco, Richard M. Locksley, Miranda Robertson
題名 : Immunity -The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease
Chapter 8, Specialized Lymphocytes in Early Responses and Homeostasis
出版社 : Oxford University Press
(翻訳 : 小笠原康悦, 監訳 : 笹月健彦)
年月 : in press

学会発表

国外学会

1. Ogasawara K, Ishizaki K, Urano N, Fjiwara N, Sasazuki T. Genomic analysis of RAE-1 genes. HFSP annunal meeeting, Berlin, Germany, 2008.

H.知的財産権の出願・登録状況

該当無し

図 1 : エフェクター細胞の同定

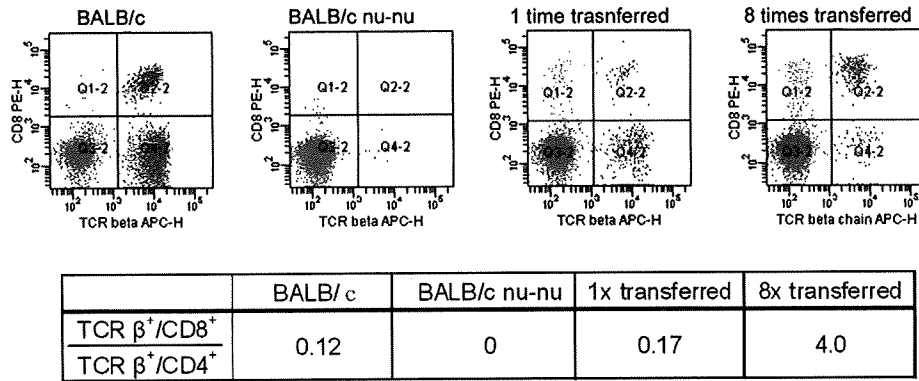


図 2 : 金属アレルギーによる TCR レパトアの変化

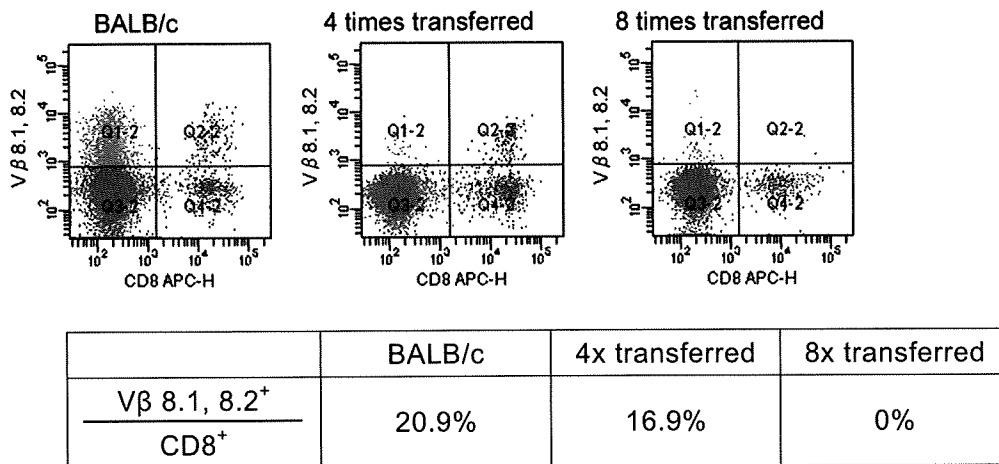


図 3 : 抗 NKG2D 抗体投与による金属アレルギー発症の抑制

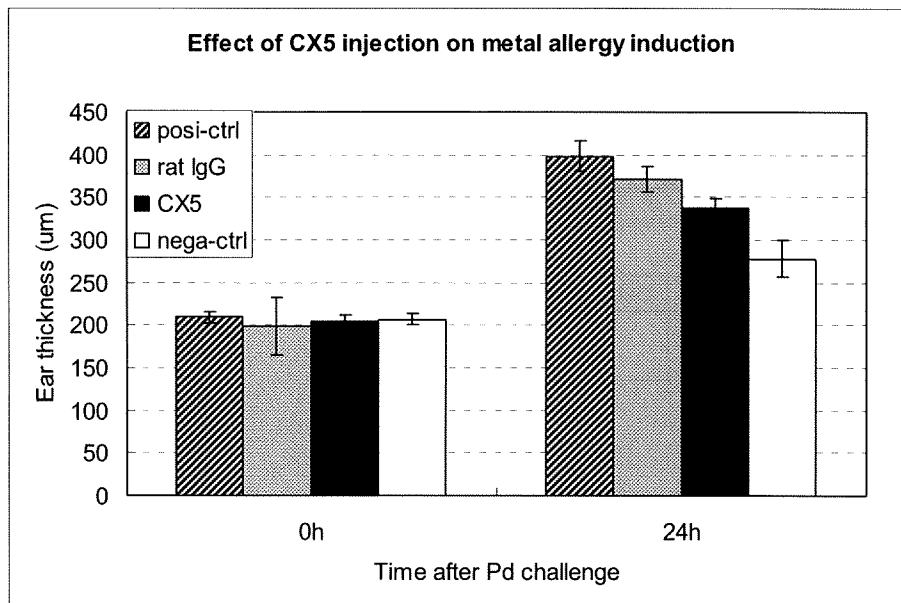
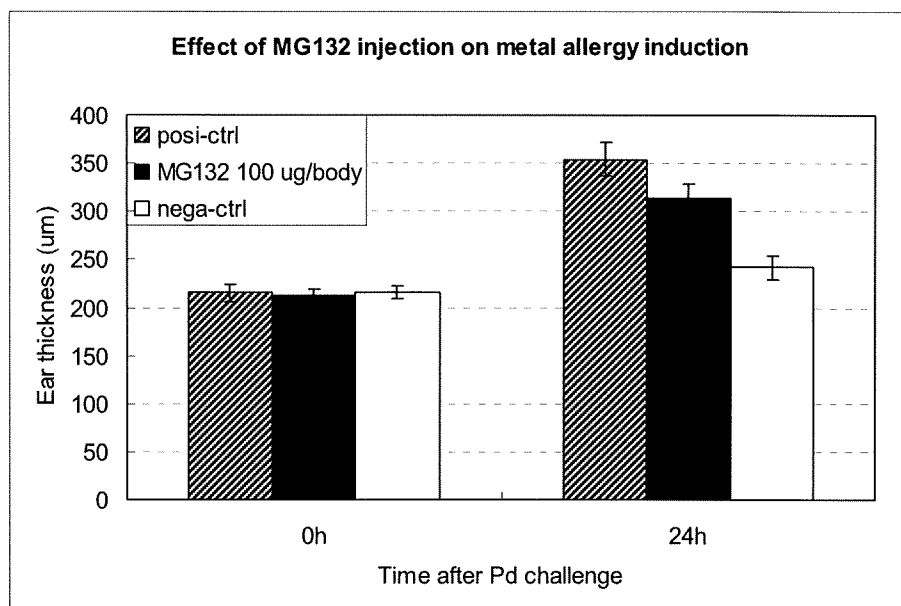


図 4 : プロテアソームインヒビター投与による金属アレルギー発症の抑制



厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
総合分担研究報告書

分担課題：金属アレルギー発症モデルマウスにおける網羅的 T 細胞レセプター解析

分担研究者：鈴木 隆二 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 室長

研究協力者：熊谷 賢一 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

小林 浩 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

江口 貴紀 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 研究員
鶴見大学歯学部 口腔外科学第一講座 大学院生

研究要旨：本研究では金属アレルギーの病因論に基づいた新たな診断および治療法の開発の端緒となることを目的としており、本研究班が作製した金属アレルギー発症モデルマウスを用いてアレルギー反応における獲得免疫機構、即ち病変部に浸潤する T 細胞の動態を検証する。その実験手法として、モデルマウスの病変部および所属リンパ節に浸潤する T 細胞の受容体 (TCR) 網羅的レパトア解析ならびに定量 PCR 法を用いた遺伝子発現の解析を行った。網羅的 TCR レパトア解析の結果より、モデルマウスの炎症局所には、所属リンパ節と同じ TCR V α 遺伝子を持つ effector T 細胞が誘導されていた。また、定量 PCR 法においても金属アレルギー炎症局所において IL-4 および IFN- γ の高発現、Fas 分子を介したアポトーシスが T 細胞によって誘導されており、アレルギー炎症局所で CD8 および Th1 CD4 陽性 T 細胞による細胞障害性遅延型過敏反応が発生していることが明らかになった。本網羅的 TCR レパトア解析を用いることで、これまで困難であった金属アレルギーの発症機序に関わる免疫応答の解明および診断治療体系の開発に大きく貢献する可能性が示唆された。

A. 研究目的

金属アレルギーは、口腔粘膜に直接接触する歯科用金属材料や皮膚に直接接触するピアスや腕時計などの金属製装飾品に含まれる金属が原因となり様々なアレルギー症状を引き起こす疾患として知られているが、生体内の免疫系が修飾された金属抗原をどのように認識して応答しているか不明であり、金属アレルギーの病因論に基づいた診断、治療法の確立が急務とされている。

これまでの基礎的研究により、金属をマウスに多量に投与することで自己免疫疾患を引き起こすことが知られており (Vas J *et al*; J Immunol, 2008)、金属による免疫系の攪乱は

未だ解明されていない。そのため、特異性および交差性を含めた金属に対する生体反応の解明にはモデルマウスを用いた免疫応答の詳細な検討が必要であると考えられる。

本研究では、金属アレルギーが発症した状態での獲得免疫機構、すなわち病変部および所属リンパ節に浸潤する T 細胞の動態に着目し、

「T 細胞の活性化を端緒とした免疫応答が金属アレルギー発症に関与している」という仮説のもとに、本研究班で作製した金属アレルギー発症モデルマウス (Sato N *et al*, Clin Exp Allergy, 2007) の所属リンパ節をヌードマウスに養子移入を繰り返すことで、高効率なエフェクター T 細胞の純化を促し、金属に特異的

に反応しているエフェクターT細胞の動態をT細胞受容体(TCR)の見地から解明していくことを目的とした。

B. 研究方法

1) 金属アレルギーモデルマウスの作製

本研究班で作製した金属アレルギーモデルマウスより所属リンパ節を摘出し、single cellに調整後、BALB/c nu-nuマウスへi.v.により移入した。続いて金属暴露および養子移入を繰り返し、エフェクターT細胞の濃縮が行われた状態で再度耳介部への金属感作を行い、感作24時間後の耳介部、顎下リンパ節、脾臓の各組織を採取した。

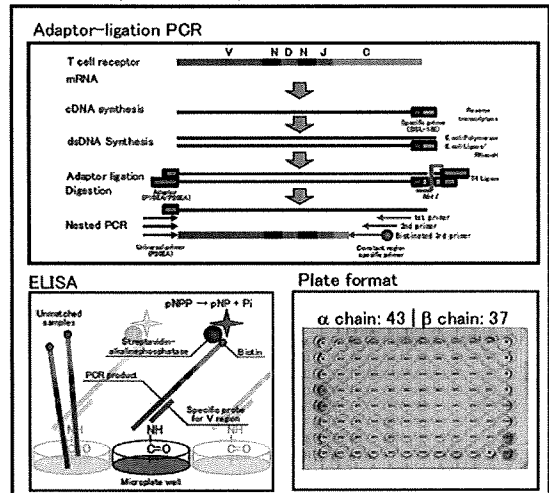
2) TCR遺伝子発現頻度ライブラリーの構築

2-a) TCRレパトア解析:各組織から抽出したtotal RNAをサンプルとして、cDNAを合成した後、adaptorを付加した。次いで消化酵素処理によりadaptor付加cDNAを適当な形にし、adaptorおよびTCR定常領域にそれぞれ相補的なプライマーセットを用いてnested PCRを行った。これにより、全てのTCRをコードする遺伝子を同一条件下で特異的に増幅した。得られたPCR産物を全てのTCRV α ファミリーおよびTCRV β ファミリーにそれぞれ相補的なオリゴDNAを固層化したマイクロプレートに播種してハイブリダイズさせた後、酵素反応を用いて発色させ吸光度の測定を行った。得られた吸光度から各TCRVファミリーの存在率を算出することにより、mRNAレベルにおける各組織浸潤T細胞のTCRVファミリーの偏在性を検討することが可能となる。(図1A)

2-b) T細胞clonalityおよびCDR3シーケンス解析:金属アレルギーモデルマウスにおけるTCRレパトアに偏りが見られた場合には、CDR3 size spectratyping (Matsutani T. *et al*, Hum Immunol, 1997) によりフラグメント解析を行い、T細胞のclonalityを確認する。さらに各TCR遺伝子を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シーケンスレベルの発現頻度の解析を行った。これにより、金属アレルギーの各組織浸潤T細胞におけるTCR遺伝子発現頻度をライブラリーとして構築することが出来る。(図1B)

(A) TCR repertoire analysis



(B) CDR3 size spectratyping

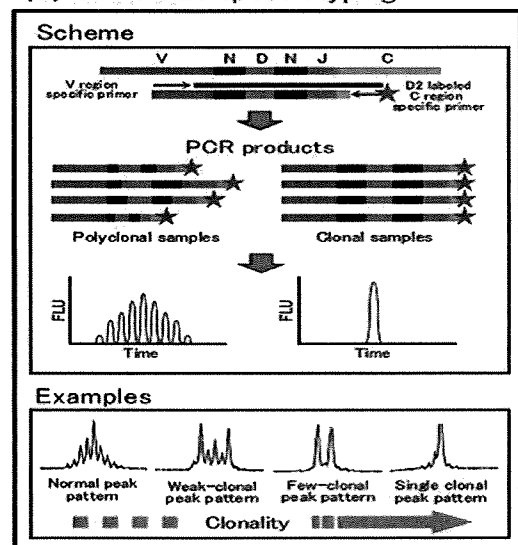


図1. 網羅的TCRレパトア解析系

3) 定量的PCRによるサイトカインの定量

RNA安定化試薬に保存した組織からRNAを抽出しcDNAを合成した後、適切なプライマーを用いてTNF- α 、INF- γ 、IL-4、IL-5などのサイトカインmRNA発現量の定量をreal-time PCR法により実施した。定量評価としては内部標準としてGAPDHを用いて遺伝子発現量の補正を行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験の生命倫理・安全対策に対する取り組みに関しては、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律

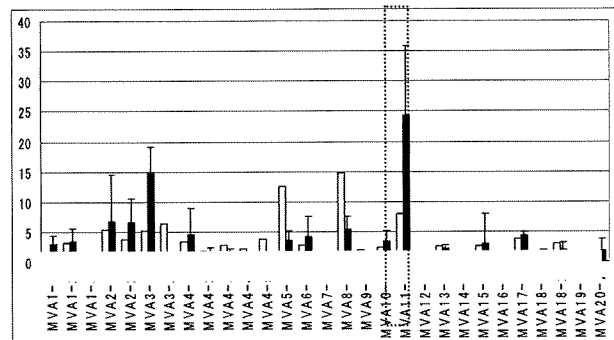
(平成 17 年法律第 68 号)」による「実験動物の使用及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年度環境省告示第 88 号)」及び文部科学省が策定した「研究機関等における動物実験等の実施に関する基準 (平成 18 年 6 月 1 日告示)」に基づき、日本学術会議が作成した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (平成 18 年 6 月 1 日通知)」を踏まえて、国立病院機構 相模原病院臨床研究センターで定めた「動物実験管理運営規定」を遵守して行った。

組換え DNA 実験に関しては、独立行政法人国立病院機構相模原病院においては遺伝子組換え実験計画書を独立行政法人国立病院機構相模原病院遺伝子組換え実験案委員会に提出し、承認を得て、「独立行政法人国立病院機構相模原病院遺伝子組換え実験案全実施規則」に従って実施した。

C. 研究結果

1) TCR レパトア解析

・ TCR V α 鎖については特異的 V α が炎症局所に誘導されていた (図 2) が、V β 鎖に関しては金属特異的な family の高発現は認められなかった。



(a) 耳介部における TCR V α 鎖 レパトア
□ヌードマウス、■移入 24 時間後ヌードマウス

Sample	CDR3 size Spectratyping	Clonal Frequency
24h transferred Lymph Node		9/11 2/11
24h transferred Ear		13/13

(b) 移入 24 時間後ヌードマウスの耳介部および所属リンパ節における CDR3 領域の解析結果

図 2. 耳介部における TCR レパトア解析

(2) 定量 PCR 法による解析

・ T 細胞が存在しないヌードマウスに養子移入を繰り返すことで、アレルギー炎症局所の耳介部に CD3・CD4・CD8 陽性の各 subset の T 細胞が発現してきており、effector T 細胞の誘導が確認された。

・ 移入に伴って移入により炎症局所の耳介部では、IL-4・IFN- γ ともに発現量が増加し Th1 へのシフトが認められること (図 3) から、Th1 の遅延型過敏反応が耳介部で起きていることが明らかになった。

・ 移入後の耳介部で TNF α および Fas の発現が増加しており、炎症局所でのアポトーシスが誘導されていた。

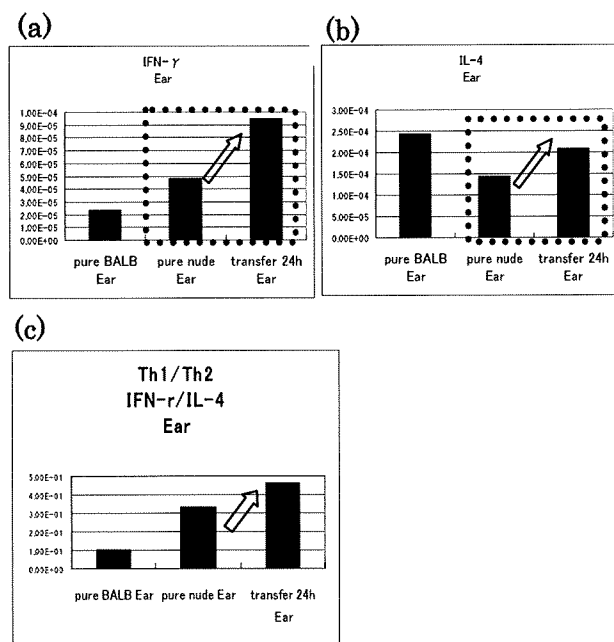


図 3. Balb/c マウス、ヌードマウス、および移入 24 時間後ヌードマウスの耳介部における Th1/Th2 産生サイトカイン発現量

4. 考察

養子移入を繰り返したヌードマウスの耳介部組織中に、所属リンパ節と同じ TCR クローンを持つエフェクターT細胞が認められたことより、金属による感作で特異的なT細胞が耳介部に誘導されていると考えられた。さらに、IL-4およびIFN- γ の高発現、Fas分子を介したアポトーシスがT細胞によって誘導されていることからCD8およびTh1CD4陽性T細胞による細胞障害性遅延型過敏反応が起こっているが明らかになった。

5. 評価

1) 達成度について

本研究結果から、金属アレルギーにおける金属はハプテンとして働いていることが明らかになった。すなわち、本研究目的である金属アレルギーの病態の理論基盤を明らかにした極めて重要な知見であり、目標は充分達成できたと考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

マウスのT細胞レパトアを網羅的に解析できるこのシステムで、金属アレルギーは、金属特異的T細胞が重要なカギを担っていることを明らかにしたことから、学術的意義は極め

7. 研究発表

1) 国内

口頭発表	7件
原著論文による発表	0件
それ以外（レビュー等）の発表	0件

そのうち主なもの

国内学会

川野光子、武田加奈、中山勝文、熊谷賢一、小林浩、鈴木隆二、小笠原康悦

金属アレルギー炎症部位における特異的T細胞の増加

第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）
2009.12.2-4

て大きい。また、T細胞レパトアを解析することで、診断に役立つ可能性もあり、臨床的、社会的意義も大きい。

3) 今後の展望について

T細胞レパトアを網羅的に解析できるシステムを用いて、霊長類での金属アレルギー解析を行い、臨床に直結した開発研究を進める。また、ヒトT細胞レパトアを解析することで、診断に役立つ基盤を構築する。

4) 研究内容の効率性について

代表研究者との緊密な連携のもと、サンプルの相互供与により、効率的に研究成果を挙げることができた。

6. 結論

ヌードマウスへの移入を繰り返すことにより、金属を認識しているエフェクターT細胞が濃縮され、また本研究で用いた網羅的TCRレパトア解析によりT細胞の金属への直接の認識

には特異的TCR V α が関与していると考えられた。本解析法を用いることで、これまで困難であった金属アレルギーの発症機序に関わる免疫応答の解明および診断治療体系の開発に大きく貢献する可能性が示唆された。

藤井克樹、北浦一孝、鈴木さつき、松谷隆治、高崎智彦、伊藤恒敏、倉根一郎、鈴木隆二
コモンマーモセットT細胞受容体 α 鎖および β 鎖配列の網羅的解析
第39回日本免疫学会総会・学術集会（大阪）
2009.12.2-4

熊谷賢一、濱田良樹、後藤哲人、川口浩司、堀江彰久、山田浩之、金井郁代、池谷進、石田璃久磨、瀬戸暁一、鈴木隆二
口腔癌リンパ節転移における網羅的T細胞レセプター解析
第53日本口腔外科学会総会（徳島）
2008.10.20-21

後藤哲人、濱田良樹、熊谷賢一、小早川元博、
亀井和利、齋藤知之、瀬戸皖一、鈴木隆二
口腔扁平苔癬における特異的な TCR レパト
アを有する T 細胞のポリクローナル様増殖
第 53 日本口腔外科学会総会（徳島）
2008.10.20-21

亀井和利、濱田良樹、堀江彰久、後藤哲人、
熊谷賢一、近藤壽郎、瀬戸皖一。
関節突起骨折患者の上関節腔鏡視所見と滑液
中の炎症性サイトカイン量
第 52 回日本口腔外科学会総会（名古屋）
2007.9.29-30

濱田良樹、近藤壽郎、齋藤知之、中岡一敏、
堀江彰久、熊谷賢一、後藤哲人、瀬戸皖一。
慢性顎関節クローズドロックに対する顎関節
有視下洗浄療法の予後に関連する関節鏡視所
見ならびに炎症性サイトカインの検索
第 20 回日本顎関節学会総会・学術大会（仙
台）2007.7.14-15

熊谷賢一、濱田良樹、後藤哲人、齋藤知之、
中岡一敏、堀江彰久、瀬戸皖一。
慢性顎関節クローズドロックに対する顎関節
洗浄療法の治療成績と滑液中における血管内
皮細胞増殖因子（VEGF）含有量の変化との
関連性
第 20 回日本顎関節学会総会・学術大会（仙
台）2007.7.14-15

2) 海外

口頭発表	3 件
原著論文による発表	1 2 件
それ以外（レビュー等）の発表	0 件

そのうち主なもの

論文発表

1) 原著論文

Kumagai K, Hamada Y, A. Holmlund,
Gotoh A, Nakaoka K, Arai Go, Yamane S,
Suzuki R.

The levels of vascular endothelial growth
factor in the synovial fluid correlated with
the severity of arthroscopically observed
synovitis and clinical outcome after
temporomandibular joint irrigation in
patients with chronic closed lock. Oral
Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol
Endod.2009 (in press)

Kitaura K, Kanayama K, Fujii Y, Shiobara
N, Tanaka K, Kurane I, Suzuki S, Itoh T,
Suzuki R.

T cell receptor repertoire in BALB/c mice
varies according to tissue type, sex, age,
and hydrocortisone treatment. Exp Anim.
2009 Apr;58(2):159-68.

Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto
T, Hanamoto Y, Maeda-Tanimura M,
Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y,
Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.

The interaction of monocytes with
rheumatoid synovial cells is a key step in
LIGHT-mediated inflammatory bone
destruction. Immunology. 2009
Sep;128(1Suppl):e315-24.

Gotoh A, Hamada Y, Shiobara N, Kumagai
K, Seto K, Horikawa T, Suzuki R.

Polyclonal expansion of T cells bearing
restricted T cell receptor repertoires in
lesions of oral lichen planus without
hepatitis C virus infection. Clin Exp
Immunol.154(2):192-201 2008

Hamada Y, Holmlund AB, Kondoh T,
Nakaoka K, Sekiya H, Shiobara N, Gotoh A,
Kumagai K, Suzuki R, Seto K.

Severity of arthroscopically observed
pathology and levels of inflammatory
cytokines in the synovial fluid before and
after visually guided temporomandibular

joint irrigation correlated with the clinical outcome in patients with chronic closed lock. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 106 (3): 343-349, 2008.

Tanaka K, Horikawa T, Suzuki S, Kitaura K, Watanabe J, Gotoh A, Shiobara N, Itoh T, Yamane S, Suzuki R, Fukui N, Ochi T. Inhibition of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 reduces the severity of collagen-induced arthritis. *J Rheumatol.* 2008 ;35(12):2316-24.

Ishida S, Yamane S, Ochi T, Nakano S, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Suzuki R. LIGHT induces cell proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via lymphotoxin beta receptor. *J Rheumatol.* 2008 ;35(6):960-8.

Yamane N, Tanaka Y, Ohyabu N, Yamane S, Maekawa K, Ishizaki J, Suzuki R, Itoh T, Kita A, Mitomi H, Mori T, Juji T, Katsuragawa Y, Yamamoto S, Sawabe M, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T. Regional differences in chondrocyte metabolism in osteoarthritis: a detailed analysis by laser capture microdissection. *Arthritis Rheum.* 2008 ;58(1):154-63.

Shiobara N, Suzuki Y, Aoki H, Gotoh A, Fujii Y, Hamada Y, Suzuki S, Fukui N, Kurane I, Itoh T, Suzuki R. Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol.* 2007 ;150(1):13-21.

Matsutani T, Ohmori T, Ogata M, Soga H, Kasahara S, Yoshioka T, Suzuki R, Itoh T.

Takemoto H.

Characterization of novel non-peptide thrombopoietin mimetics, their species specificity and the activation mechanism of the thrombopoietin receptor. *Eur J Pharmacol.* 2008 31;586(1-3):44-51.

Fujii Y, Kitaura K, Nakamichi K, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I.

Accumulation of T-cells with selected T-cell receptors in the brains of Japanese encephalitis virus-infected mice. *Jpn J Infect Dis.* 2008 ;61(1):40-8.

Yamane S, Ishida S, Hanamoto Y, Kumagai K, Masuda R, Tanaka K, Shiobara N, Yamane N, Mori T, Juji T, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.

Proinflammatory role of amphiregulin, an epidermal growth factor family member whose expression is augmented in rheumatoid arthritis patients

Journal of Inflammation 2008 Apr 27;5:5

Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Tanaka N, Hi Comparison of CDR3 length among thymocyte subpopulations: impacts of MHC and BV segment on the CDR3 shortening. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(9):2378-87.

2.学会発表

海外学会

Kumagai K, Hamada Y, Kobayashi H, Gotoh A,

Yamada H, Kawaguchi K, Horie A, Suzuki R.

T Cell Receptor Analysis of Lymph Node Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

AAOMS 91st Annual Meeting and Scientific Session in conjunction with the Canadian Association of Oral and

Maxillofacial Surgeons, Toronto, CANADA
October 15-17 2009

Kamei K, Hamada Y, Horie A, Goto A,
Kumagai K, Kondoh T,
Seto K.

Arthroscopic findings and inflammatory
cytokine levels in the synovial fluid of the
superior joint compartment in patients

with condyle fracture.

AAOMS 89th Annual Meeting and
Scientific Session in conjunction with
JSOMS and KAOMS, Honolulu, USA
October 8-14 2007

8. 知的財産権の出願・登録状況
該当せず。

分担課題：骨髄由来樹状細胞の移入による金属アレルギーの感作成立と TLR シグナリング

分担研究者：西屋 禎 北海道大学大学院医学研究科 生理系薬理学講座 細胞薬理学分野 講師

研究要旨

金属イオンの情報を含む MHC-ペプチド複合体を細胞表面に発現する抗原提示細胞が T 細胞に抗原提示することが金属アレルギー発症の重要なステップとして位置付けられているが、いまだ不明な点が多い。我々の研究班が開発した金属アレルギー発症マウスモデル系では、金属塩と LPS の混合液をマウスの腹腔内に投与することにより、10 日間で金属アレルギーを感作することができる。さらに、我々は *in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来樹状細胞 (DC) をマウスに移入することで、同様に金属アレルギーを感作できることを以前の班会議で報告した。本研究は、*in vitro* で金属塩と LPS を処理した骨髄由来 DC が金属アレルギーを誘発するメカニズムを明らかにすることにより、金属アレルギーの感作機構や金属アレルギーの発症における自然免疫の役割を解明することが目的である。本年度は、金属アレルギーの感作成立における DC 移入の時間的影響、DC の局所移入による感作成立の有無、及び DC 移入により活性化される T 細胞の局在について検討を行った。その結果、従来の金属イオンと LPS の混合液を腹腔内に投与する方法と比較して、金属イオンと LPS を処理した DC を移入した場合には、感作がより早期に成立することがわかった。また、DC の局所移入では、移入した局所に限定的に感作が成立すること、さらに、DC 移入により顎下リンパ節において金属イオンと反応する T 細胞が生じる可能性が示唆された。

A. 研究目的

ニッケルやパラジウムといった金属が引き起こす金属アレルギー発症の分子メカニズムとして、金属イオンの情報を持つ MHC-ペプチド複合体の T 細胞への抗原提示とその活性化が深く関与することが示唆されている。一般的に、T 細胞への抗原提示は、マクロファージや DC、さらには皮下に存在するランゲルハンス細胞といったプロフェッショナル抗原提示細胞により行われ、その際に補助刺激分子 (CD28 と B7 (CD80 および CD86)) が重要な役割を果たしている (図 1)。B7 は抗原提示細胞に発現しており、これらの発現は各種細菌成分の存在下で著しく増大することがわかっている。抗原提示細胞に発現する TLR は各種細菌成分を認識し、自然免疫及び獲得免疫反応を活性化する。このように、TLR を介した抗原提示細胞の活性化が金属アレルギー

の発症に関与することが示唆されるが、金属アレルギーのモデル動物が存在しなかったことから、不明な点が多いのが現状である。本研究は、T 細胞伝達性の金属アレルギーの発症に TLR を介した抗原提示細胞の活性化がどのように関与するのかを我々の研究班が開発した金属アレルギーマウスモデルを用いて検討することを目的としている。

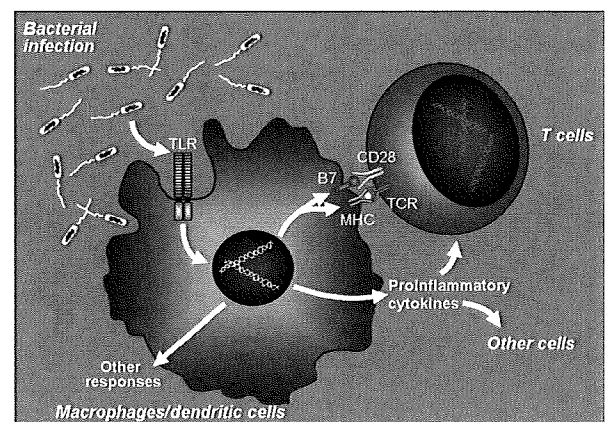


図 1. 細菌感染における抗原提示細胞と T 細胞の相互作用

B 研究方法

1) TLR4 欠損マウス由来樹状細胞 (ScN-BMDC) の調製と TLR キメラ受容体の導入

TLR4 遺伝子座を欠損している C57BL/10ScN マウスから調製した骨髓細胞を 10 ng/ml GM-CSF 存在下で二日間培養した。その細胞に IRES-GFP システムを持つレトロウイルスベクターを用いて TLR キメラ受容体 (TLR4 の細胞外部分と他の TLR の細胞膜及び細胞質部分を結合したキメラ受容体) を導入し、さらに 4 日間 GM-CSF の存在下で培養した。細胞を回収し、CD11c の発現を調べた結果、ほぼ 100% の細胞が CD11c 陽性であった。また、レトロウイルスの感染効率は約 30% であった。

2) TLR キメラ受容体による樹状細胞の活性化

TLR キメラ受容体を発現した ScN-BMDC を TLR キメラ受容体依存的に活性化するために、TLR4 のリガンドである LPS (20 ng/ml) を培養液に加えて 24 時間培養した。細胞を回収した後 phycoerythrin-conjugated-anti-CD80、CD86、及び MHC class II antibody を用いて染色し、フローサイトメーターを用いてそれらの分子の発現レベルを解析した。

3) BMDC の移入による金属アレルギーの発症とその評価

C57BL/6 マウス由来の BMDC を PdCl₂ (0.2 mM)、又は PdCl₂ + LPS (10 ng/ml) で 24 時間処理した。この細胞を培地で 3 回洗浄して PdCl₂ 及び LPS を除去した後、5x10⁵ cells/マウスの量を尾静脈注射により C57BL/6 マウス (7 週齢雌) に移入した。10 日後に誘導 (challenge) として PBS 又は PdCl₂ 溶液 (1 mM) 15 µl をマウスの耳介に皮内注射し、以後耳の腫脹を DIAL THICKNESS GAUGE (PEACOCK OZAKI MFG.CO.,LTD) を用いて 24 時間おきに 3~4 日間測定した。

4) 顎下リンパ節細胞の移入による金属アレ

ルギー発症とその評価

3) で BMDC を移入して 10 日経過したマウスの顎下リンパ節から細胞を回収し、それを 5x10⁵ cells/マウスの量を尾静脈注射により C57BL/6 マウス (7 週齢雌) に移入した。その 24 時間後に PBS 又は PdCl₂ 溶液 (1 mM) 15 µl をマウスの耳介に皮内注射し、以後 3) と同様に耳の腫脹を測定した。

C 研究結果

1) 補助刺激分子の発現を高レベルに増強する TLR の同定

TLR のシグナリングは、TLR の細胞質領域の大部分を占める Toll-interleukin 1 receptor-resistance (TIR) domain により下流に伝達される。従って、各 TLR キメラ受容体を TLR4 のリガンドである LPS で刺激することにより、各 TLR に特異的な細胞応答を解析することができる。各 TLR キメラ受容体を発現させた骨髓由来樹状細胞を LPS で刺激し、CD80、CD86、及び MHC class II 分子の発現レベルを解析することにより、最も高レベルに補助刺激分子の発現を増強する TLR の同定を試みた。その結果、野生型 TLR4 及び TLR4/TLR5 キメラを発現した樹状細胞において補助刺激分子の発現レベルが著しく増大することがわかった (図 2)。一方、TLR4/TLR1、TLR4/TLR2、及び TLR4/TLR6 キメラを発現した樹状細胞では発現レベルの増大は観察されなかった。

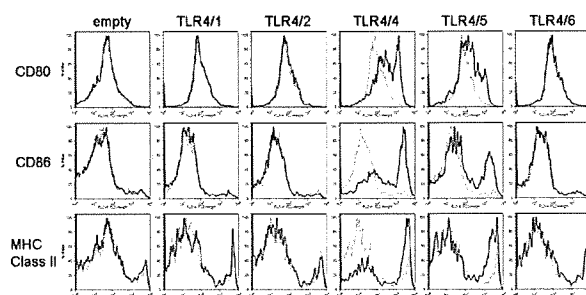


図 2. TLR キメラ受容体を介した補助刺激分子及び MHC class II 分子の発現増強作用. 細点線、無刺激；太実線、LPS 刺激。

2) 金属塩 + LPS 処理 BMDC の移入による金属アレルギーの感作成立の検討

PdCl₂ と LPS で処理した活性化 BMDC の移入

により金属アレルギーの発症が起こるか否かを検討した。その結果、PBS で challenge したマウスにおいて、PBS 処理 BMDC 移入群、PdCl₂ 処理 BMDC 移入群、及び PdCl₂ + LPS 処理 BMDC 移入群の間に優位な腫脹の差は観察されなかった (図 3)。一方、PdCl₂ で challenge したマウスにおいて、PdCl₂ + LPS 処理 BMDC 移入群は、PBS 処理 BMDC 移入群や PdCl₂ 処理 BMDC 移入群と比較して優位な腫脹の増大を示した。PdCl₂ 処理 BMDC 移入群は、PBS 処理 BMDC 移入群と比較して 48 時間以降の腫脹が増大する傾向を示した。なお、皮内注射を行わなかった左耳に関しては、全てのマウスでいかなる腫脹も観察されなかった (データ未提示)。

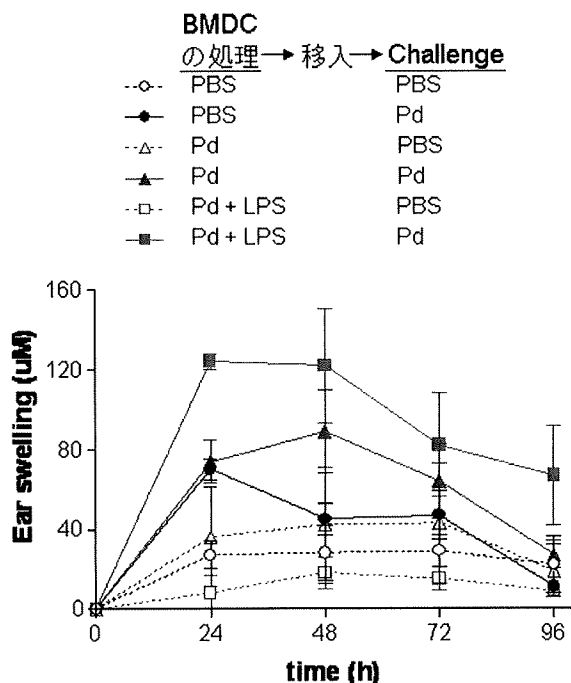


図 3. BMDC の移入による金属アレルギーの感作成立。PdCl₂ と LPS の両方で処理された BMDC を移入することにより、PdCl₂ challenge 後に顕著な耳介の腫脹が観察された。

3) 金属塩 + LPS 処理 BMDC 移入マウスの顎下リンパ節には金属アレルギーの発症に関与する細胞が存在する

移入した活性化 BMDC のリンパ節における働きを検討した。PdCl₂+LPS 処理 BMDC 移入マウスの顎下リンパ節細胞を移入されたマウスは、PBS 処理 BMDC 移入マウスの顎下リン

パ節を移入されたマウスと比較して、優位な耳の腫脹が観察された (図 4)。

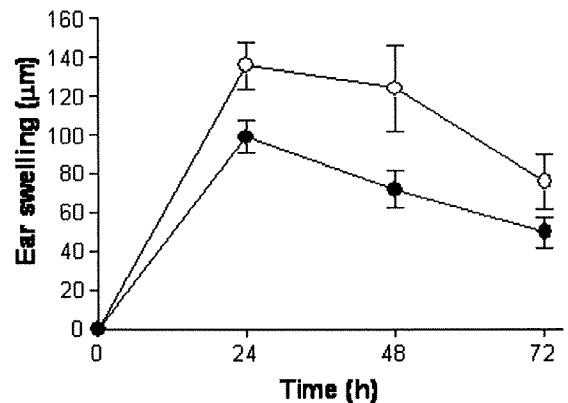


図 4. 顎下リンパ節細胞の移入による金属アレルギーの感作成立。PdCl₂+LPS 処理 BMDC 移入マウスの顎下リンパ節細胞を移入したマウスでは、PdCl₂ challenge 後に優位な耳介の腫脹が観察された。●: PBS 処理 BMDC 移入マウスの顎下リンパ節を移入されたマウス群、○: PdCl₂+LPS 処理 BMDC 移入マウスの顎下リンパ節を移入されたマウス群。

D 考察

TLR ファミリー分子のシグナリングは、細胞質に存在する 4 種類の TIR アダプター分子により下流に伝達される。TIR アダプターはそれぞれ異なるシグナル経路を活性化し、異なる細胞応答を誘導する。今回、TLR4 と TLR5 が CD80、CD86、及び MHC class II 分子の発現を効果的に増強することがわかり、これらのリガンドが金属イオンの情報を持つ MHC-ペプチド複合体の T 細胞への提示を効果的に誘導しうることが示唆された。

BMDC の移入実験において、PdCl₂ + LPS 処理 BMDC 移入群が PBS 処理 BMDC 移入群よりも優位な腫脹の増大を示したことから、in vitro で金属イオンを処理した BMDC を移入することにより感作を成立させることが可能であることが示唆された。また、PdCl₂ 単独では感作成立が不十分であったことから、感作の成立には TLR シグナリングの活性化、すなわち自然免疫反応の活性化が重要であるこ