

# ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会:The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 18 No. 2 (通巻36号) 2013

## 日本免疫毒性学会20周年記念号

20th ANNIVERSARY

### 目次

|   |    |
|---|----|
| 理事長退任にあたって……………                               | 1  |
| 医薬品医療機器総合機構 澤田 純一                             |    |
| 新理事長からのご挨拶……………                               | 2  |
| 旭川医科大学 吉田 貴彦                                  |    |
| 第21回日本免疫毒性学会学術年会のおしらせ<br>(予告1) ……………          | 2  |
| 徳島文理大学薬学部 姫野誠一郎                               |    |
| 日本免疫毒性学会20周年記念シンポジウム報告…                       | 3  |
| 学術・編集委員会 藤巻 秀和                                |    |
| 20周年記念シンポジウム特別寄稿記事                            |    |
| ■ 免疫毒性研究の現状と将来展望……………                         | 3  |
| 医薬品医療機器総合機構 澤田 純一                             |    |
| ■ 環境因子による生体侵襲：<br>慢性炎症に伴う臓器線維化の分子・細胞基盤…       | 6  |
| 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学 松島 綱治                     |    |
| ■ 免疫毒性の臨床評価：過去と現在の戦略……                        | 8  |
| リヨン大学病院、クロード・ベルナル大学<br>Jacques Descotes       |    |
| ■ 免疫毒性の不確実性への対応：<br>免疫調節化合物のためのリスク評価……………     | 10 |
| アメリカ食品医薬品局 Laine Peyton Myers                 |    |
| 第40回日本毒性学会学術年会における<br>日本免疫毒性学会合同シンポジウム報告…………… | 11 |
| 川崎医科大学衛生学 大槻 剛巳                               |    |
| 年会賞……………                                      | 12 |
| 北海道立衛生研究所 小島 弘幸                               |    |
| 学生若手優秀賞……………                                  | 14 |
| 東京慈恵会医科大学環境保健医学講座 木戸 尊将                       |    |
| 世界の免疫毒性研究者へのインタビュー……………                       | 15 |
| ImmunoTox Letter Digest ……………                 | 17 |

### 理事長退任にあたって

澤田 純一

(医薬品医療機器総合機構)

元理事長の大沢基保先生から2008年4月に会務を引き継いで以来、2期6年弱が過ぎ、10月より、吉田貴彦先生に新理事長をお引き受けいただくこととなりました。新しい体制の下、本学会が益々発展することを願っております。

元理事長の大沢先生は、評議員制の導入、学会ホームページの開設と会員メールシステムの確立、将来構想の提案、米国トキシコロジー学会のImmunotoxicology Specialty Section (SOT-ISS) との間の交換派遣の開始等、本学会の活性化に努められました。私が理事長を引き継いだ後も、学会組織の強化、国際化等の方針はそのまま受け継いで参りました。学会の活性化と柔軟な運営に学会会計の安定が必要と考え、会員の皆様のご高配を賜り、やむをえず学会費の値上げをさせていただきました。また、基金会計や学会賞等の創設、業務計画と業務報告の文書化、SOT-ISSとの交流スキームの確立、学会ホームページの拡充等に努めて参りましたが、これらはひとえに担当理事や委員会の皆様のご尽力によるものであります。

本学会の規模は小さいながらも学際的であり、会員間の意見交換や親睦が活発に行われることが一つの特徴ではないかと思っております。その一方で、毎年、学術大会をご担当頂く年会長(大会長)の先生方とそのスタッフの皆様には、大変なご苦勞をおかけしておりますが、すばらしい学術大会を継続して開催することができまして、この場をお借りして感謝申し上げます。

これからの学会の運営を考えるに、若いアクティブな学会員のリクルートと評議員の先生からの積極的なご提言が重要と思われまますので、より一層のご協力をお願いする次第です。

任期中に学会活動への貢献が不十分であった点を反省しておりますが、6年の間、学会運営にご協力頂きました皆様に厚く御礼申し上げます。

新理事長からのご挨拶

吉田 貴彦  
(旭川医科大学)

2013年9月12日の東京代々木で開催されました日本免疫毒性学会第20回学術大会の総会で承認を受けまして、本年10月から日本免疫毒性学会の理事長を仰せつかった、旭川医科大学の吉田貴彦です。ここに書面をお借りして、ご挨拶と抱負などを書かせていただきます。

日本免疫毒性学会は前身の免疫毒性研究会の発足から今年で20回の年会の節目を迎えました。1991年にアメリカ合衆国フロリダ州タンパ市で開催された国際免疫薬理学会において、日本から参加されていた大沢基保先生と、私がその後留学する事になるNIHのブランチである国立環境科学研究所(National Institute of Environmental Health Sciences)で免疫毒性学ラボを担当されていたMike I. Luster博士等と懇談し、大沢先生が米国のSociety of Toxicology (SOT)のImmunotoxicology Specialty Section (ITox-SS)のような組織を日本にも作りたいと熱く語っておられたことが、つい最近の事のように感じられます。その後、日本免疫毒性学会は1994年に最初の研究会が昭和大学講堂で開催されて以来今まで、名倉宏先生、大沢基保先生、澤田純一先生と引き継がれて発展してきました。こうした歴史が築かれつつある本会の理事長をお引き受けするのは、いささか荷が重いのですが、微力ながら本会の発展のために努力致す所存です。

免疫毒性学において研究対象とする免疫系に影響を及ぼす要因(主には化学物質)は多岐にわたることから、本学会員の背景は多様です。また、最近では健康食品、サプリメント、多様な化粧品が用いられるようになり、さらに遺伝子組み換え作物やナノマテリアルといった新たな対象物も増えつつあることから、人々が安全、安心に暮らせるように本学会は多様なニーズに対応していくことが求められています。また、免疫毒性学の研究手段である実験手法はトキシコロジーの国際標準手法に基づいて整備されてきましたが、免疫学や分子生物学の研究手法の急激な発展を受けて、新たな局面に入ったような気がしています。私自身、1980年代の免疫毒性学の始めの頃から研究にかかわって来ましたが、昨今の本学会での発表にふれ、当時にメカニズムが不明であった免疫毒性の現象が解明されるようになり改めて報告されるなど、研究の歴史も繰り返されるとの実感を感じるとともに時の流れの早さを感じています。本学会に属する研究者、特に若い方々が情報交換を密にし、多様な研究手法をもちいることで、社会から期待される成果をあげていただきたいと思います。

第21回日本免疫毒性学会学術年会  
(JSIT2014) (予告1)

日本免疫毒性学会の第21回学術年會を下記の要領で開催いたしますので、ご案内申し上げます。なお、第21回から学術「年会」と名称変更します。

期 日：平成26年9月11日(木)～12日(金)

会 場：徳島文理大学 国際会議場  
徳島市山城町西浜傍示180

テ ー マ：免疫毒性学研究的な新たな一歩

内 容：特別講演1 Marc Pallardy (パリ南大学)  
特別講演2 川村龍吉 (山梨大学医学部)  
教育講演 峯岸克行 (徳島大学疾患プロ  
テオゲノム研究センター)

シンポジウム

「次世代の免疫毒性研究を考える」

試験法ワークショップ

「アレルギーと自己免疫疾患に関する  
新たな試験法開発を目指して」

一般演題(口演・ポスター)を予定

賞 : 年会において優秀な一般演題を発表した会  
員に対し、「年会賞」、並びに「学生若手優  
秀賞」を贈呈します。

発表形式：口頭発表とポスター発表

演題募集期間：平成26年4月21日(月)～  
6月27日(金)(予定)

アクセス：空路：羽田→徳島、福岡→徳島  
(徳島空港～徳島駅 リムジンバス有り)  
高速バス：大阪、神戸、京都、関西空港から  
徳島駅まで直通

鉄道：岡山→高松→徳島

<http://www.bunri-u.ac.jp/about/access/>

年 会 長：姫野誠一郎

徳島文理大学薬学部衛生化学講座・教授

事 務 局：担当 藤代 瞳

徳島文理大学薬学部・衛生化学講座内

第21回日本免疫毒性学会学術年会事務局

TEL：088-602-8460/FAX：088-655-3051

E-mail：jsit2014@ph.bunri-u.ac.jp

URL：http://p.bunri-u.ac.jp/jsit2014/

## 日本免疫毒性学会20周年記念 シンポジウム報告

藤巻 秀和  
(学術・編集委員会)

2013年9月12日(木)、13日(金)に、“免疫毒性学—未来図を探る”をテーマに、第20回日本免疫毒性学会学術大会が坂部貢年会長(東海大学医学部基礎医学系教授)によって東海大学代々木キャンパスで開催されました。その第1日目の午後に第20回記念講演シンポジウムを開催しました。

学術・編集委員会で本学会の学術大会が20回を迎えることを記念して構想を練り、今後の免疫毒性学の方向性を探るために、国内外の著名な研究者を招聘して提言をいただくとの趣旨のもと行われました。

「免疫毒性研究の現状と将来展望」について日本免疫毒性学会理事長、(独)医薬品医療機器総合機構の澤田純一先生に、「環境因子による生体侵襲：慢性炎症に伴う臓器線維化の分子・細胞基盤」について東京大学大学院医学系研究科分子予防医学 教授 松島綱治先生に、「Clinical evaluation of immunotoxicity: Past and Current strategies」についてProf. and Head, Poison Center and Pharmacovigilance Department, Lyon University Hospitals, Lyon, FranceのJacques Descotes先生に、「Addressing Uncertainty in Immunotoxicology: Evaluating Risk for Immunomodulatory Compounds」についてUS Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, USAのLaine Peyton Myers先生の順にご講演をいただきました。前半2講演の座長を藤巻秀和が、後半の2講演とまとめの座長を食品薬品安全センターの大沢基保先生が務められました。

各先生のご講演の詳細につきましては以下に述べられています。

自己免疫疾患や薬物アレルギーの評価法の確立、生体制御システムについての特異的研究、基礎と臨床の橋渡し研究推進のためのパラメーター探索や技術の確立などこれら以外にも多くのご提言をいただき、会員相互の知識の共有化と士気高揚につながることを期待します。

最後に、大沢基保先生に免疫毒性学におけるリスク評価、影響評価指標、今後の臨床医、免疫学者、毒性学者の連携などについて国際的な方向性とを合わせてまとめていただきました。

## 日本免疫毒性学会20周年記念

### 免疫毒性研究の現状と将来展望

澤田 純一  
(医薬品医療機器総合機構)

免疫毒性とは、外来物質(生体異物)の免疫系への有害な影響(adverse effects)であり、免疫抑制、免疫亢進、アレルギー、自己免疫、炎症が含まれるとされている(WHO/IPCS: Guidance for Immunotoxicity Risk Assessment for Chemicals, 2012)。免疫毒性は抗原特異性の観点から抗原非特異的なものと抗原特異的なものに分類することができる。抗原非特異的な免疫毒性には、免疫機能抑制(最も古典的な狭義の免疫毒性)、免疫機能亢進、アレルギー亢進、自己免疫亢進、炎症増悪、偽アレルギー誘起、免疫関連代謝異常が含まれ、抗原(薬物)特異的な(薬物が抗原として惹起する)免疫毒性としては、即時型薬物アレルギー、遅延型薬物アレルギー、薬物特異的な自己免疫等が含まれる。別の観点からの切り分け方としては、意図的又は非意図的な暴露形態、即ち対象物質による分類がある。意図的な使用には、医薬品や医薬部外品等の他に、食品、食品添加物などがあり、非意図的な曝露としては、環境汚染物質、残留農薬、食品汚染物質などがあげられる。歴史的には、免疫毒性研究は、初期には環境化学物質、医薬品、食品、農薬等の生体異物による免疫抑制を主たる対象としていたが、その後はアレルギーや自己免疫も対象に含めてきた。

免疫毒性評価に関する国際的ガイドラインについては、医薬品に関するICH S8ガイドライン(2005年9月にStep 4)が作成された後は、大きな動きがなかったが、昨年、化学物質に関するIPCS/WHOガイダンスが最終化された。S8ガイドラインは低分子医薬品の非意図的な免疫抑制と免疫亢進を主な対象とし、検証的臨床試験に入るまでに必要に応じて行うべき非臨床免疫毒性試験の実施方法に関するものである。一方、上述のIPCS/WHOガイダンスは、環境中に存在する化学物質の既存データに基づくリスク評価を主たる目的としたもので、アレルギー性と自己免疫誘発性も評価対象とし、ヒトにおける疫学的データを重視している。両者の目的と必要とされるリスク管理に応じた相違があるものの、weight-of-evidenceアプローチに基づく評価の原則は共通であり、免疫毒性評価における現在の基本的な考え方を提供している。後者のガイダンスでは、免疫毒性評価の応用例(ケースス

タディ)として、鉛(免疫抑制)、hexachlorobenzene(免疫亢進)、ハロゲン化白金塩(皮膚感作性)、citral(皮膚感作性)、水銀(自己免疫)、trichloroethylene(自己免疫)の6つの化学物質の例が示されており、リスク評価の参考となる。

最近の免疫学の進展に伴い免疫に関与する細胞や機能分子が飛躍的に増えつつある。

MHC class IIによる抗原ペプチド提示を行う細胞には、「プロフェッショナルな抗原提示細胞」と呼ばれる樹状細胞があるが、これには異なる複数の起源のものがあり、抑制的に作用する場合もあることに留意したい。例えば、皮膚のランゲルハンス細胞は造血幹細胞から早期に分化する。通常の樹状細胞前駆細胞とは別に分化するものとして、形質細胞様樹状細胞や、炎症時に末梢血の単球に由来して生じるものも知られている。他に、造血幹細胞に由来しない、リンパ節胚中心の濾胞樹状細胞もB細胞の増殖に重要とされている。

CD4陽性T細胞の分化では、樹状細胞とナイーブT細胞の細胞間相互作用の際、MHC分子とT細胞受容体の相互作用の他に、costimulatory moleculeとそのリガンドの相互作用、さらに第三のシグナルとしてのサイトカインの刺激が必要とされ、ナイーブT細胞はヘルパーT細胞や抑制性T細胞に分化するとされる。従来のTh1とTh2の他に、ヒトでは、Th17、Th9、Th22等の新たなヘルパーT細胞が誘導されることが報告されている。また、制御性T細胞(Treg)が誘導される条件についても詳細な研究が進んでいる。なお、Th17及びTh22のマスター転写因子は、それぞれ、ROR、AhRといわれている。一方、自然免疫的機能を有するT細胞の例としては、iNKT細胞、MAIT細胞(mucosal-associated invariant T cells)等が知られている。免疫毒性研究においては、Th1及びTh2細胞に加えて、Treg細胞が免疫抑制と免疫寛容の観点から、また、Th17細胞が自己免疫を促進する観点から比較的重要な位置を占めるのではないかと予想される。

従来の古典的な表現型を示すM1型マクロファージに加えて、抗炎症作用や障害修復作用をもつM2型マクロファージが、炎症、肥満やがん免疫の領域で、最近注目されている。M2型はさらにサブタイプに分類される場合がある。感染免疫の観点からは、M1型の反応が阻害されると有害な免疫抑制に至ると思われるが、過度の免疫亢進がM2型により適切に制御されない場合には、慢性の炎症、アレルギーや自己免疫の亢進につながるものと予想されている。M1マクロファージにより分泌されるAIM(apoptosis inhibitor of macrophage)については、炎症や

代謝性疾患における役割が注目されている。

病原体等に対する抵抗性を担う分子として、Tol様受容体(TLRs)、RIG-1様受容体、NOD様受容体(NLRs)、dectin-1等の自然免疫に関わる受容体(pattern recognition receptors)も次々に見いだされている。NK細胞受容体とその標的細胞上のリガンドに関する知見も増している。さらに、免疫担当細胞上にある薬理的受容体の他、AhR、PPARs、RARs、RXR、RORs、GR、VDR等の核内受容体(転写調節因子)による免疫系細胞の分化や免疫応答の調節に関しても新たな知見が得られている。最近に至っては、免疫機能の調節に関係するmiRNAやepigeneticな因子の報告も多数ある。

このように、免疫に関与する細胞や機能分子が飛躍的に増えつつあり、免疫毒性のバイオマーカー候補となっているが、リスク評価そのものへ直ちに採用される段階にはまだ至っていない。リスク評価の試験法として使用できるか否かを評価する努力が今後とも必要とされよう。

#### 化学合成医薬品の即時型アレルギー性の予測

まず、即時型の薬物アレルギーについて述べたい。ICH S8の「1.2 背景」で、「現在、医薬品の全身または呼吸器系におけるアレルギー性(抗原性)や薬物特異的な自己免疫を評価する標準的な試験方法はなく、これらを実験する試験は三極のいずれにおいても要求されていない。」と記述されているように、低分子化合物のヒトにおける即時型アレルギー性を予測しうる非臨床試験法は確立されていない。薬物特異的なIgE抗体の産生では、まずTh2-proneな遺伝的及び環境的な背景が薬物アレルギー発症に関与するものと考えられる。次に重要な因子は、薬物の直接的な化学反応性や代謝活性化の有無と考えられる。B細胞エピトープはハプテン化されたタンパク質上のハプテンである場合が多いと想定できるが、ヘルパーT細胞の誘導が必要な場合、T細胞エピトープが、ハプテン化ペプチドであるのか、共有結合しない薬物と自己ペプチドがMHC class IIで同時に提示されたものであるのかが明確にされていない場合が多い。また、効率的な抗体産生には細胞間の相互作用が必要とされ、T細胞と樹状細胞の相互作用では、樹状細胞上のdrug/peptide/MHC class IIをT細胞受容体が認識すると考えられる。しかし、T細胞とB細胞の相互作用の場合、B細胞上のdrug/peptide/MHC class IIが生体内で提示されることを実際に示した報告はない。B細胞と樹状細胞の相互作用が必要な場合、樹状細胞上にnative antigenが提示されると予想されているが、抗原抗体複合体としての提示であるかを含めて、その詳細には不明な点が多い。最終

的には、以上のような点が実際の薬物を用いて明らかにされた上で、即時型のアレルゲン性試験法を開発する必要があると思われる。

不明な点が多く残されているものの、インシリコでの化学反応性や代謝活性化の予測、インビトロでのヒト肝ミクロソームによる代謝活性化、MHC class IIへの薬物の結合、キャリアタンパク質のハプテン化等を指標にする方法が使える可能性は残されている。

### 化学物質による自己免疫誘起の予測

自己免疫の誘起に関係するとされる化合物として、多くの例が知られているものの、自己免疫が発現する臓器は多様であり、その発症機構も単純ではないと推定される。しかし、Pollandら (Chem. Res. Toxicol., 23, 455, 2010) が示したように、化合物の作用から考えて、いくつかのプロトタイプ的な原因を列挙することができる。例えば、化学的反応性の他に、アジュバント様活性、Treg細胞やTh17細胞への影響などが挙げられる。また、オートファジーが自己免疫発症に抑制的に作用しているとの報告もある。

薬物誘起性の自己免疫の分類と発症の原因を考える際に重要な因子としては、感染や患者の背景因子の他に、自己抗原又はneoantigenの同定や組織特異性 (器官特異的か、全身性か)、投薬中止による薬物特異的自己免疫からの回復の有無、自己抗体 (IgG) 又は細胞性免疫 (CD8陽性T細胞による細胞傷害) の関与等が挙げられる。

自己免疫の増悪因子としては、PPARアゴニスト、インターフェロン (type I and II)、Th17細胞、炎症性サイトカイン、活性酸素種等があり、発症抑制因子としては、免疫抑制剤の他に、Treg細胞、抑制性サイトカイン等がある。

化学物質による自己免疫誘起活性を予測する一義的な試験法は現在ない。Murine popliteal lymph node assay (PLNA) や自己免疫発症モデルマウスを用いる方法があるものの不十分であり、新たなバイオマーカーの確立が必要と思われる。しかし、単独の試験で全ての化学物質の自己免疫誘起活性を予測することは困難と思われる。複数の代表的な薬物について、薬物毎に自己免疫発症と亢進の作用機構の解明がさらに進むことが望まれる。

### 腸管免疫毒性

腸管免疫毒性は、外来性物質 (微生物を含め) が腸管及び関連組織の免疫機能を変化させ、有害な影響をもたらすことと定義できる。腸管の主な免疫機能には、IgA抗体の分泌、病原体の侵入の阻止、食物アレルギーの抑

制 (経口免疫寛容の維持)、過剰な炎症の抑制、適切な腸内細菌叢 (共生細菌) の維持等があり、これらの機能の抑制や過剰亢進を腸管免疫毒性と呼ぶことができよう。

腸管免疫系には、全身の免疫系細胞の半分に相当する数の細胞が存在しており、それに関わる細胞群も多様である。腸管上皮細胞の機能としては、TLRsやNLRsを介した自然免疫、IgAトランスサイトーシス、RA産生を行うことが知られているが、クリプト基底層にある杯細胞と呼ばれる上皮細胞はムチン分泌を、パネート細胞はリゾチーム、抗菌ペプチド分泌を行う。パイエル板に存在するM細胞は、抗原トランスサイトーシスにより腸管の抗原を樹状細胞に受け渡す。また、樹状細胞による腸管内の細菌の直接の取込みも知られている。樹状細胞はIgA産生を促進する一方で、免疫寛容にも関与する。粘膜固有層には、他に、上皮間リンパ球 (IELs)、マクロファージ、Th1細胞、Th2細胞、Th17細胞、Treg細胞、自然免疫系リンパ球 (ILCs)、自然免疫系T細胞 (NKT、MAIT)、IgA産生形質細胞、マスト細胞等、多様な免疫系細胞群が存在している。

腸管免疫に影響を及ぼしうる経口暴露物質の例としては、マイコトキシンであるデオキシニバレノールが有名であるが、典型的な毒性影響を示すことが知られている化学物質の例はむしろ少ない。腸内細菌に由来する免疫機能に影響を及ぼす代謝物としては、LPS、ペプチドグリカン、二次胆汁酸、短鎖脂肪酸等がある。また、抗生物質、細胞毒性の強い抗がん剤も腸管免疫に影響を与えうる。現在、腸管の炎症を抑える医薬品やプロバイオティクスの開発が盛んに進められており、注目を集めている。腸管免疫を強めるものとしては、Th17活性を亢進させる薬物が、IBD等の炎症の抑制を目的とするものとしては、多くの候補薬物が報告されている。これらの物質の作用が、有害事象の観点から詳しく検討された例は少なく、腸管免疫毒性の観点から種々の化学物質の毒性を見直す必要があるかもしれない。

現在、血清IgAレベルとパイエル板を含む腸管の組織病理学的検査が腸管免疫毒性に関する試験項目として用いられているが、他には有用性が評価された方法は少ない。今後の検討課題としては、腸管免疫系細胞の免疫化学染色やサイトフローメトリー、腸内細菌叢のメタゲノム解析やメタボローム解析が挙げられるが、さらに新たなバイオマーカーの開発も望まれる。

### 免疫毒性学の将来展望

免疫毒性学的研究の面から比較的遅れていると思われる3つのトピックスについて、それらの課題を述べた。

上述したように、種々のバイオマーカー候補が登場しているものの、リスク評価における有用性の評価が不十分なものが多いのが現状である。バイオマーカーの選択とその有用性の評価が望まれる。インビトロとインシリコのデータを統合したSystems Biology的な予測法の開発も将来用いられる可能性が高いと思っているが、筆者の能力を超えている部分であり、割愛させていただいた。

試験動物の問題としては、基礎研究ではマウスを用いる検討が行われることが多い一方で、一般毒性試験で繁用されるラットにおける情報が不足しているケースが多いように思われる。ヒトへの外挿性の点からラットを用いる試験法の確立が必要な場合があると思われる。

一方、試験系を直接ヒト型化する試みもなされている。ヒト幹細胞より分化した細胞や組織、ヒト遺伝子導入マウス、ヒト免疫系再構築免疫不全マウス等を利用した毒性評価系の構築も試みられている。

新しいタイプのバイオ医薬品、腸管系を標的とする新開発食品、ナノ物質で代表される新開発素材を用いる工業製品や医薬品の健康影響や環境影響の評価が今後の課題とされているが、免疫毒性学の領域でも新たな取組みが必要とされるテーマと思われる。

## 環境因子による生体侵襲： 慢性炎症に伴う臓器線維化の分子・細胞基盤

松島 綱治

(東京大学大学院医学系研究科分子予防医学)

この度は、第20回学術大会シンポジウムにお招きいただきまして大変有り難うございました。環境医学、社会医学的側面のみならず薬理学的観点から生体への免疫毒性を熱心に議論されていることに感銘を覚えました。ここに、私が講演いたしました内容に加筆して臓器線維化の機序について私の考えを記します。

内的・外的環境因子による生体への過剰な持続的侵襲により慢性炎症が永続的に持続、様々な臓器に線維化が起こります。Collagen I (Col I) をはじめとする細胞外基質の蓄積である線維化は、創傷の治癒に観られるように本来重要な生体防御反応ではありますが、過剰な蓄積は重篤な臓器機能不全をもたらします。代表的線維化疾患としては、1) 特発性間質性肺炎 (IIPs)：原因を特定しない間質性肺炎の総称であります。特発性肺線維症 (IPF) は、人口10万人あたり20名程度と推測され、慢性進行性で発症後、50%生存が3年とされる非常に予後不良な疾

患であります。2) 肝硬変：我が国におけるC型肝炎ウイルスとB型肝炎ウイルスの感染者は350万人存在し、肝硬変 (C型肝炎65%、B型肝炎12%、NonB/NonC4.3%、アルコール性肝炎13%) による死亡数は毎年1万5千人に上り、3万数千人が死亡する肝細胞癌の基盤をなします。また、1千万人程度に非アルコール性脂肪肝 (NASH) を認めるとされますが、多くが将来肝炎、肝硬変になり、終には肝臓になる人もいることも明らかとなってきました。3) 腎硬化症：慢性糸球体腎炎による透析導入患者数は減少する一方、糖尿病性腎症が原因の腎線維化による腎不全透析患者は毎年増加し (30万人)、透析医療費は1兆数千億円に達し国民総医療費の4%を占め、医療経済的にも重大な問題となっております。4) 関節リウマチ：推定患者数は70万人で患者の15~30%に間質性肺炎が合併する一方、IIPsの3割に自己免疫疾患が関与すると言われていています。5) 社会医学分野では、シリカやアスベストによる肺線維症などがあります。塵肺症と言え、古くて新しい問題であり、最近の中国大陸からの越境PM2.5+黄砂問題は慢性呼吸器疾患、肺癌との関連で大きな社会的関心事に成っております。このように線維化疾患には重大な難治性の疾患が多々含まれます。それ故、医学的にも、社会的にも線維化機序を解明し、それに立脚した疾患予防・新規治療法を確立することは喫緊の課題であります。

## 線維化をもたらす線維芽細胞、筋線維芽細胞の起源に関する論争

1) 1994年Bucalaらによって発見された線維細胞 (fibrocyte) は、骨髄由来細胞 (CD45+CD11b+HLADR+) でありながらCol I, VimentinなどのECMを発現する細胞であり、血液循環を介してケモカイン受容体CXCR4やCCR1/2/5/7などとそれらのリガンド依存性に炎症組織に動員される、と報告されています。しかし、最近では、種々のマウス線維化モデルにて骨髄移植、併体接合を実施する事により線維細胞の臓器線維化への寄与度についてはミニマムである、とする報告が多くみられます。2) 各種動物線維症モデルにて正常上皮細胞が上皮間葉系移行 (EMT) によって筋線維芽細胞に移行し、Col Iの主な産生細胞になる、とする論文が近年多く発表されました。しかし、最近のCell-Lineage Tracingによる厳密な解析によれば炎症組織における上皮のEMTは実証されず、電子顕微鏡像においても基底膜を超える上皮細胞像が観られない、などにより損傷上皮細胞のEMTに関しては疑問が投げかけられています。3) 肝臓研究分野においては、従来から類洞血管周囲細胞pericyteであるVitamin A

貯蔵細胞Stellate Cell (Ito細胞)がCol I産生性線維芽細胞、筋線維芽細胞の主な前駆細胞とされてきました。最近、臓器線維化をもたらす細胞の起源、系列としてCell-Lineage Tracingを実施し、腎臓、脳などの臓器においても血管周囲細胞がCol I産生性線維芽細胞、筋線維芽細胞の主な前駆細胞と認識され、一般化しようとしています。一方、Cell-Lineage Tracingに用いられているNG2、FoxD1などが必ずしも血管周囲細胞特異的でないことにより、反論論文も出ています。現時点では、炎症に伴い、血管周囲の間葉系細胞ならびに常在性線維芽細胞の活性化・分化・移動により臓器線維化が引き起こされる、というのが妥当なところと思われる。

**線維化に関する白血球と炎症介在因子**

慢性炎症部位に浸潤するマクロファージは、一般的には profibroticなM2タイプ (CD206+, chinase-3-like protei-3 (Ym1), resistin-like molecule-a (Relm-a, FIZZ-1), Arginase 1など陽性) にシフトしています。また、浸潤T細胞においても炎症の慢性化に伴いTh1からTh2へのシフトが起こり、Th2サイトカインはケモカイン産生誘導を介して好酸球浸潤を促し、線維化を増悪化させるとされています。一方、NK/NKTのみならず最近注目されているmast cellやTh17, Treg, natural helper細胞などの新たな免疫細胞サブセットの関与については今後の検討が

待たれます。

慢性炎症に伴う上皮細胞の損傷とその修復においては、Wnt/beta-Cateninシグナル経路やBMPsは上皮細胞修復に促進的に働き、筋線維芽細胞の分化・活性化・移動にはTGFβが中心的に関わると言われております。BMPとTGFβは細胞内シグナル伝達において拮抗的關係にあります。Wnt阻害、BMP結合蛋白の阻害が腎臓の線維化を抑制する事が報告されています。この他CTGF、PDGF、AT、LTs、PGs、LPA、S1PなどのGPCRに作用する生理活性物質、Osteopontin、血漿成分factor VII-XaとThrombin、メタロプロテアーゼとそれらの阻害蛋白も臓器線維化に寄与する、という報告があります。

私達の研究紹介：肺線維症マウスモデルにおいて線維芽細胞の増殖より質的変化が重要 (Amer. J. Pathol. 2013 T. Tsukui et al.)

Col1α2-GFPマウスの肺においては、肺胞壁に存在する線維芽細胞と血管周囲の平滑筋細胞がGFPを発現しており、その細胞数の比はおおよそ7：3でした。プレオマイシンにより線維化を誘導すると、GFP陽性細胞がクラスターを作り、I型コラーゲンが豊富に存在する線維化領域を形成していました。しかし、フローサイトメトリーにより肺全体の線維芽細胞数を計測したところ、線維化のピーク時においても細胞数の変動は見られません

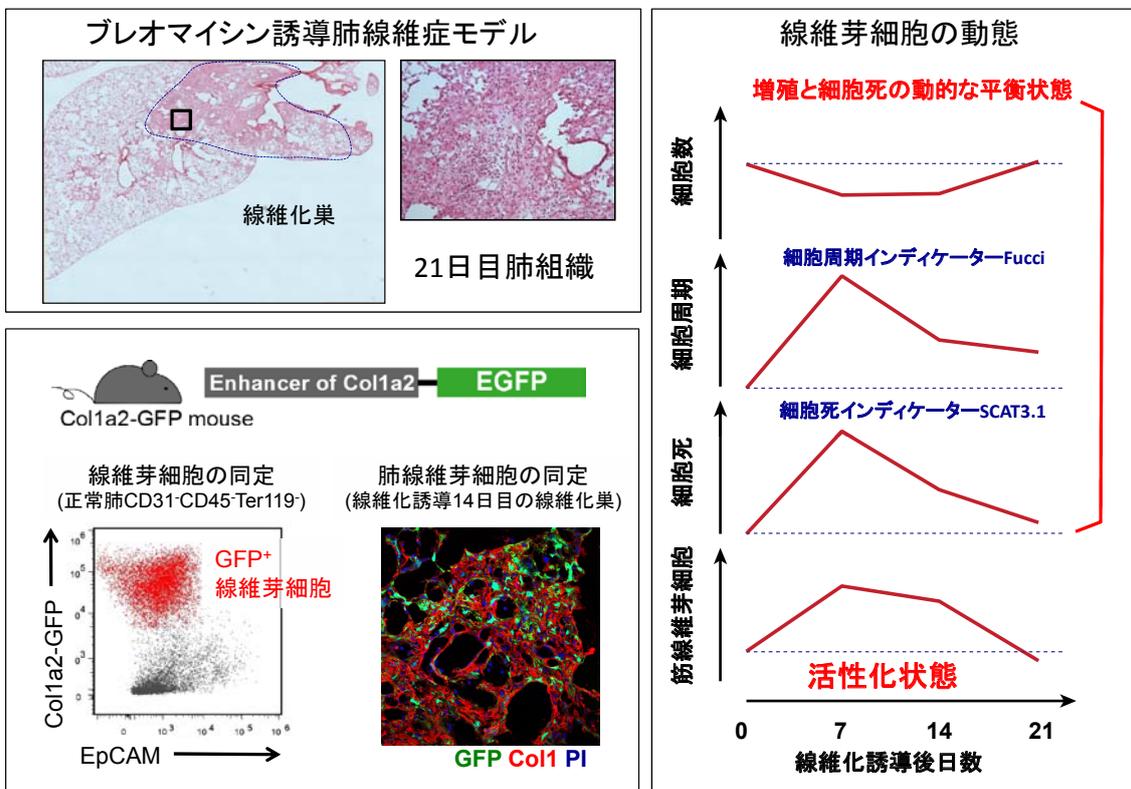


図1 フローサイトメトリーおよびレポーターマウスを用いた定量的な線維芽細胞の動態解析

でした。ブレオマシンの投与後14日目の肺から単離された線維芽細胞は、細胞の大きさの増加、細胞内小器官の発達、筋線維芽細胞のマーカーである $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現亢進が見られました。細胞周期インディケーターFucciマウスや、細胞死インディケーターSCAT3.1マウスを用いて線維芽細胞の細胞増殖や細胞死を調べたところ、いずれもブレオマシンの投与後7日目に最も亢進していました。これらのことから、線維芽細胞はブレオマシンの誘導性肺線維症モデルにおいて細胞増殖と細胞死が同時に亢進した動的平衡状態にあることが示唆されました (図1)。ただし、細胞増殖、細胞死いずれもピーク時において線維芽細胞全体の数%程度であり、線維化領域における線維芽細胞のクラスターは増殖だけでなく細胞移動によっても形成される可能性が示唆されました。

#### 終りに

未だどの細胞サブセット、機能分子を標的としても有効な線維化疾患予防・治療薬は開発されておりません。それは、何より私達は未だ慢性炎症に伴う臓器線維化の細胞・分子基盤を十分理解していないこと、なぜ炎症が慢性化・不可逆的になるのかそれらの機序を理解していないからです。本学会の皆さんとともにこれらの重大な問題の謎解きを行って、社会に貢献できたら幸いです。

### Clinical evaluation of immunotoxicity: past and current strategies

Jacques Descotes

(Poison Center and Pharmacovigilance Department,  
Lyon University Hospitals, and Claude Bernard University,  
Lyon, France (e-mail: descotes@me.com))

#### 1. A brief history of clinical immunotoxicology

The area of immunotoxicology encompasses four categories of immunotoxic effects, namely immunosuppression, immunostimulation, hypersensitivity and autoimmunity, the clinical consequences of which are fairly well established nowadays thanks to major immunotoxic events that occurred during the last 3 decades.

Immunosuppression can result in more frequent and often more severe infections as well as virus-induced neoplasia, such as skin cancers and lymphomas. This

was illustrated by infectious complications reported shortly after the introduction of immunosuppressive drugs in kidney transplant patients (1966), an outbreak of polychlorobiphenyl (PCB)-induced Yusho disease due to accidental rice oil contamination in Japanese inhabitants (1968), polybromobiphenyl (PBB)-exposure of the Michigan rural population via contamination of cattle feed (1973), US FDA warning on infliximab-associated tuberculosis in rheumatoid patients (2001), or the first case reports of progressive multifocal leukoencephalopathy in natalizumab-treated patients (2005).

Adverse effects resulting from immunostimulation include cytokine release-associated clinical manifestations, more frequent autoimmune diseases and hypersensitivity reactions to environmental allergens, and inhibition of cytochrome P450-dependent pathways. Although these adverse effects had been identified as early as 1985, awareness only grew with reports of cytokine release syndromes in muromonab-treated patients (1990) and mainly the “cytokine storm” in human healthy volunteers following injection of TGN1412 (2006). Hypersensitivity-related events include immunological allergic reactions involving specific antibodies or T lymphocytes, and pseudo-allergic reactions due to nonimmune-mediated release of some mediators involved in “true allergy”. Hypersensitivity has been a major cause of market withdrawals, e.g. zomepirac, a NSAID causing anaphylactic shock (1983); Althesin<sup>®</sup>, an iv general anesthetic causing acute pseudo-allergic reactions via complement activation (1984); nomifensine, an antidepressant causing immuno-allergic hemolytic anemias (1992). More recently, cetuximab was reported to induce anaphylactic shock (2008). Auto-immunity can manifest as organ-specific reactions mimicking spontaneous autoimmune diseases (e.g. myasthenia) or systemic reactions bearing many dissimilarities with spontaneous autoimmune diseases (e.g. lupus syndrome vs. SLE). Major immunotoxic events linked to autoimmunity include withdrawal of the  $\beta$ -blocker practolol (1976), the Spanish toxic oil syndrome (1981), fasciitis-eosinophilia due to L-tryptophan (1989), autoimmune thyroiditis in IL-2-treated cancer patients (1991) or the first case reports of red pure cell aplasia in patients treated with recombinant erythropoietin (2002).

## 2. Past strategies for the clinical evaluation of immunotoxicity

Clinical aspects of immunotoxicity have long been overlooked: no review papers on immunotoxicity evaluation during clinical trials have been published prior to 1998. Two major publications deserve particular attention. One of these, *“Immune Function Test Batteries for Use in Environmental Health Field Studies”* by Straight et al (ATSDR, Atlanta, 1984) defined 3 levels of tests recommended to evaluate the effects of environmental immunotoxicants in humans. The first level (basic tests) included serum levels of antinuclear antibodies, C reactive protein, IgG, IgM and IgA, and total proteins, white blood cell count, total lymphocyte and eosinophil counts, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocyte counts. The second level (focused tests) only concerned the follow-up of abnormal basic test results related to immune deficiency (antibody levels to a given antigen, CH50 assay, tetrazolium dye reduction assay, mitogen-induced lymphoproliferation and skin tests), hypersensitivity (total and specific IgE serum levels, leukocyte histamine release assay and skin tests) and autoimmunity (antithyroglobulin, antimitochondrial, anti-phospholipid, and antismooth muscle auto-antibodies and rheumatoid factor). Finally, the third level (research tests) covered all other tests not recommended for use in field studies. Two years before, the subcommittee on immunotoxicology of the US National Research Council Committee on Biologic Markers published a more detailed document on *“Biologic Markers in Immunotoxicology”* (1982). A 3-tier approach was recommended. Tier 1 included markers to be measured in all persons potentially exposed to an immunotoxicant: humoral immunity (serum IgG, IgM, IgA levels, and secondary antibody response to specific antigens, e.g. tetanus or influenza vaccine), cellular immunity (total and differential blood cell counts, lymphocyte surface markers, e.g. CD3, CD4, CD8, CD20, and skin testing with recall antigens, e.g. candida, diphtheria, tetanus), autoimmunity (same autoantibodies as above). Tier 2 was restricted to persons with abnormal results in tier 1 testing: primary antibody response to specific antigens (e.g. KLH), in vitro lymphoproliferation assay (ConA, PHA) and primary DTH response to KLH, extended panel of surface markers (e.g. NK cells, monocytes, and activation markers), and finally serum cytokine levels (e.g. IL-1, IL-2, IL-6). Tier 3

was restricted to persons with abnormal results in tier 2 testing and included, case by case, NK cell activity, extended lymphoproliferation assay (e.g. anti-CD3), in vitro antigen-specific T lymphocyte cytotoxicity assay, immunoglobulin subclass levels and/or antiviral antibody titers. Two major conclusions were presented, which are still largely valid today: *“[tests] for humoral, cellular, and nonspecific immunity [] are not sensitive enough to meaningfully detect modest immunodeficiency in populations of individuals exposed to immunotoxic agents”* and *“because available tests can lack the sensitivity required to detect modest immunodeficiency, a major focus should be on devising more sensitive tests for markers of immune impairment”*.

## 3. Current strategies for the clinical evaluation of immunotoxicity

Clinical immune monitoring can prove to be useful for immunopharmacology purposes (immunomodulation via on- and off-target effects) and immune safety assessment when a safety issue already exists or to evaluate a potential new issue not seen in preclinical studies. Currently, no regulatory opinion or guidance on the clinical monitoring for immune function assessment has yet been published so that each sponsor has to decide whether clinical immune monitoring is indicated based on the interpretation of available information including nonclinical data. One exception is immunogenicity related to therapeutic proteins. Available assays and endpoints to be included in the immune monitoring of a drug candidate are not markedly different from those recommended above. The most commonly used endpoints nowadays include blood cell counts (especially neutrophils, monocytes and lymphocytes), standard clinical chemistry (albumin and proteins, CRP and fibrinogen serum levels), and lymphocyte subset immunophenotyping. Major issues regarding the later assay are the quality and reproducibility of results especially if the analysis is not performed in a central laboratory. The significance of changes in complement (C3, C4, CH50) or immunoglobulin serum levels is debatable, unless very profound changes are observed. Among assays, which tend to be more frequently performed during clinical trials, immunization studies are the leading assays. The immunizing agent is most often a vaccine, either a killed/inactivated vaccine (e.g. tetanus, diphtheria, influenza, or hepatitis A or

B - live vaccines should be avoided) or a T-independent vaccine (pneumococcal polysaccharide vaccine). Neoantigens can also be used such as KLH (with a risk of cross-reactivity in shellfish allergic patients) and PhiX174 bacteriophage. Several critical issues should be considered: is the vaccine approved for clinical use? Will the measured response be a primary vs. boost response? Will controls be healthy or diseased? What is the role of background medication (e.g. methotrexate)? Is a robust and validated antibody assay available? What is the validity of selected endpoints, e.g. protective titers, differences in geometric means or antibody kinetics? Other commonly used assays include delayed-type hypersensitivity (DTH) skin testing to KLH or recall antigens, and lymphocyte function assays, such as antigen specific or mitogen-induced lymphocyte proliferation and cytokine production (e.g. Elispot).

Many questions remain unsolved as regards the clinical relevance of the data generated: is a statistically significant decrease in one given endpoint to be considered an immunotoxicologically relevant finding? Which level of decrease is to be considered relevant? How to deal with inconsistent results across measured endpoints? Obviously, these questions are also pending in the preclinical setting.

#### 4. Conclusion

A number of improvements are urgently needed regarding clinical immune monitoring. There is a lack of adequate standardization for most immune monitoring tests and the aim should be that standardization of immunological endpoints matches that of clinical chemistry. Efforts have also to be paid to correlate changes in selected endpoints with the expected occurrence of clinically significant adverse effects such as infections (i.e. validation). Indeed, monitoring infections during clinical trials to assess the immunosuppressive potential of a drug candidate requires large groups of treated vs. untreated patients. Immunotoxicology can also make significant progresses by tailoring preclinical assays and evaluation strategies to better identify immunotoxicity warnings that can be further assessed during clinical trials (i.e. translational immunotoxicology). Finally, specific immunotoxicity biomarkers are clearly needed to improve the immune safety of drug

candidates. It is important to keep in mind that clinical immunotoxicology is still in its infancy. Nevertheless, there is an obvious need to better address immune safety issues during clinical trials. There are many questions, but only few answers available today...

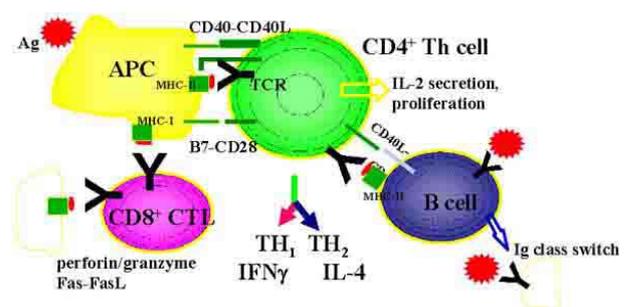
### Addressing Uncertainty in Immunotoxicology: Evaluating Risk for Immunomodulatory Compounds

Laine Peyton Myers

(US Food and Drug Administration)

Immunotoxicology has advanced considerably since its early beginnings in immunosuppression of toxic chemicals. This is evident by the many research areas in immunotoxicology that span the spectrum from immunosuppression to immunostimulation and others that cross both spectra and are simply “immunomodulatory”. Although we have advanced the science of understanding immune systems, our nonclinical models for risk assessment of immunotoxicology of compounds destined for human exposure are only partially successful.

Current regulation regarding immunomodulatory changes for pharmaceuticals relies on an older 2002 FDA Immunotoxicology Guidance (for US products) or the ICH S8 Guidance for products worldwide. The Guidances do cover immunosuppression, immunogenicity/ antigenicity, and hypersensitivity somewhat thoroughly. For immunosuppression, there are many pathways for evaluation that rely both on cellular evaluations (e.g., cell counts, percentage of subtypes) as well as functional effects. The most common assay for evaluating functional effects is the TDAR (T-cell Dependent Antibody Response). There are multiple protocols for the TDAR,



but most utilize KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) or SRBC (Sheep Red Blood Cells) as an antigen with or without drug exposure. The TDAR is relatively good at predicting strongly immunotoxic compounds, but weaker compounds or non-suppressive compounds (e.g., immunomodulatory or immunostimulating) are not usually detected using the TDAR. Immunogenicity is commonly covered by ICH S6 guidance for biologic compounds and is somewhat specific for biologic products. Drug products may cause immunogenicity, but not commonly unless adducts or haptization occurs. Hypersensitivity is commonly assessed using the LLNA (local lymph node assay) in rodents. Similar to the TDAR, it is effective for strongly reactive compounds, but weaker compounds are not readily detectable using this assay.

Although these Guidances do an adequate job discussing immunosuppressive compounds or hypersensitivity, they do not adequately cover immunomodulatory or immunostimulatory compounds. This is not a fault of the Guidances but is the product of the advancement in the science over time.

For example, although we have evidence of multiple products that cause autoimmunity, we do not have an adequate nonclinical model for evaluating autoimmunity prior to administering drugs to humans. This leads to a lapse in safety evaluation due to the lack of an adequate model for testing. Similarly, we know that compounds can stimulate immune responses. For example, the now-famous TGN-1412 only marginal effects in nonclinical models, but caused serious adverse effects clinically. The drug was an IgG4 monoclonal antibody which pan-

activated T-cells. Patients administered the drug had severe cytokine activation and cascade or the widely used “cytokine storm”. In the several years since this clinical effect, marginal success has been made advancing the models to predict these effect nonclinically. However, the Guidances regulating these products has not advanced.

In conclusion, the current Guidances for Immunotoxicology appear to be lagging behind the science. It would be suggested that cooperation between the regulators, industry, and academia identify the current state of the science for assessing immunomodulatory effects and set a plan for updating the current Guidances. Furthermore, research gaps can be identified, further supporting areas for research that could benefit all parties.

## 第40回日本毒性学会学術年会における 日本免疫毒性学会合同シンポジウム報告

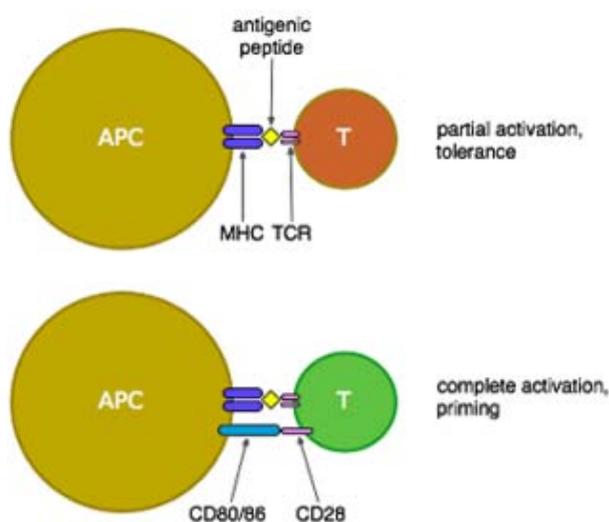
大槻 剛巳

(川崎医科大学衛生学)

2013年、日本免疫毒性学会は数えて20歳になりました(第0回大会ってないですものね、生まれた時が第1回ですから、満年齢でなく「数え」で数えましょう)。それを記念して、2012年の第19回学術大会(ちなみに、21年目からは「学術年会」に統一します(←事務局より))の特別講演として、大沢基保先生による「免疫毒性研究の温故知新—免疫毒性学会の発足経過と20周年への提言」という講演をいただきました。そして、2013年9月12~13日に開催されました記念の(成人式の)第20回学術大会では、記念講演シンポジウムとして「免疫毒性学の今後の発展戦略」と題されたセッションが実施されました。

しかし、実は20歳のお祝いのイベントは、こういった本大会以外の処でも、先行して実施されていたのです。

2013年6月17~19日、幕張メッセでは、第18回日本免疫毒性学会学術大会の年会長も務められた千葉大学の上野光一先生が、第40回日本毒性学会学術年会を開催されていました。そして、19日、水曜日の朝(9~12時)(ちなみに「水曜の朝、午前3時」はサイモン&ガーファングルのデビューアルバムタイトルの「Wednesday morning at five o'clock as the day begins」はBeatlesの「She's leaving home」の歌い出しの歌詞ですが、いえ、9時から…さらに、いえ、その日は強風で京葉線が遅れていたため、実際にシンポジウムが開始されたのは9時



10分くらいでしたが)、シンポジウム11として、第4会場にて「日本免疫毒性学会との合同シンポジウム『免疫毒性の最近の潮流』」が澤田先生と大槻を座長としてスタートしました。

メニューを紹介しましょう(どれもがメインディッシュなのですが)

- ・ナノ粒子の安全使用に向けた検討：  
免疫毒性学の観点から (by 吉岡靖雄、堤康央)
- ・環境汚染物質とアレルギー：  
毒性影響からかく乱影響へ (by 高野裕久)
- ・環境化学物質の免疫細胞に対する分化・増殖かく乱作用の分子機序 (by 野原恵子)
- ・アスベストの免疫毒性学的側面と病態への関与  
(by 大槻剛巳、他5名)
- ・化学物質の免疫毒性リスク評価ガイダンスについて  
(by 手島玲子)

冒頭で、澤田先生による本シンポジウムの主旨が述べられ始めたころには、会場は非常に多くの聴衆に溢れんばかりとなっており、勿論3時間の長丁場でしたので、出入りはあったものの、おそらく延250~300人の聴衆の方が、この合同シンポジウムを楽しんでいただいた様でありました。少なくとも上野会長の耳には、最近、毒性学会では免疫毒性に関連する演題や企画が少なかったのどとても興味深かった、との会員の皆様からの声が届いている様です。2013年度に日本免疫毒性学会から奨励賞を授賞された吉岡先生以外は、日本免疫毒性学会でも理事を務める面々(いえ、高齢とは云いません)によるメニューでしたので、である分だけ、包括的で、示唆に富む内容だったと思っております。

さて、2014年度の第41回日本毒性学会学術年会の年会長も、日本免疫毒性学会でも理事・運営委員・国際化委員長をお務めの中村和市先生で、泥鰌はいつでも柳の下にあってことでもなく、好評を支えに、今度は活気溢れる日本免疫毒性学会の若手による「次世代研究者による改革的免疫毒性研究」のセッションが組まれる様です。

ほら、既に舞台は新しい幕へ! 日本免疫毒性学会、若手のみなさん! 未来はあなたの手の中に!!

## 年 会 賞

### イソフラボン類によるIL-17産生増強作用

小島弘幸<sup>1</sup>、室本竜太<sup>2</sup>、高橋美妃<sup>2</sup>、  
武内伸治<sup>1</sup>、松田 正<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>北海道立衛生研究所、<sup>2</sup>北海道大学大学院薬学研究院・衛生化学)

#### 【目的】

IL-17を特異的に産生するヘルパーT細胞群(Th17)の増殖・分化は、微生物排除などの自然免疫の一躍を担っている一方、乾癬や炎症性腫瘍などの自己免疫疾患に深く関わっている<sup>1,2)</sup>。この細胞分化を制御するマスター遺伝子として、IL-17遺伝子のプロモーター領域に結合することで、この転写活性化を促進するRetinoic acid-related orphan receptors  $\alpha$ と $\gamma$  (ROR $\alpha/\gamma$ ) やSignal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) が報告されている<sup>3,4)</sup>。特にRORは、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子であることから、低分子化学物質と反応するリガンド結合部位を有している。最近の研究<sup>5-7)</sup>では、IL-17遺伝子発現を負に制御するROR $\alpha/\gamma$ インバースアゴニスト活性を有する低分子物質が報告されており、これらは自己免疫疾患モデルマウスを用いた試験で病態形成抑制を示すことから臨床での応用が期待されている。

我々は、身の回りの環境に存在する化学物質がRORを介してTh17細胞分化に影響を与えるか否かを明らかにするため、様々な環境化学物質(農薬、可塑剤、難燃剤など)のROR活性に及ぼす影響を調べてきた。その結果、アゾール系殺菌剤のいくつかはROR $\alpha/\gamma$ インバースアゴニスト活性のあることを見出し、これらがIL-17遺伝子発現を抑制することを報告した<sup>8)</sup>。さらに我々は、様々な植物由来化学物質についても探索を行い、Biochanin Aなどイソフラボン類がROR $\gamma$ アゴニスト活性を有し、IL-17A産生を増強することを見出した。本研究では、イソフラボン類によるIL-17A産生増強の作用機序をROR $\gamma$ とSTAT3活性化の観点から検討した。

#### 【方法】

**試験物質**：イソフラボン類 (Biochanin A [BA], Genistein [GS], Formononetin [FN], Daidzein [DZ]) を含む植物由来化学物質を試験に供した。**ROR $\gamma$ レポーターアッセイ**：ROR $\gamma$ 遺伝子及びレポーター遺伝子を導入したCHO細胞に試験物質を添加し、24時間培養後に産生されたルシフェラーゼの酵素活性を測定した。**IL-17遺伝子発現の解析**：EL4細胞あるいはマウス脾細胞に試験物質を添加培養し、刺激剤 (PMA/ionomycin) 処理によるIL-17

遺伝子発現をRT-PCR法にて測定した。また、ROR $\gamma$ -あるいはSTAT3-targeting shRNA発現ベクターを導入したROR $\gamma$ -knockdown EL4細胞とSTAT3-knockdown EL4細胞を用いた解析も行った。IL-17蛋白産生の測定：C57BL/6マウス脾細胞における化学物質のIL-17産生応答をフローサイトメトリーにより測定した。STAT3活性化の測定：リン酸化STAT3 (Y705) に対する抗体を用いたWestern blot (WB) 法により解析した。ROR $\gamma$ ・SRC-1複合体形成の解析：ROR $\gamma$ 活性化に必須である転写コアクチベーターSRC-1との複合体形成に及ぼす影響をWB法により解析した。マウス投与試験：C57BL/6マウスにBA 100mg/kgを腹腔内投与し、その翌日に脾臓を摘出し、RT-PCR法にてIL-17A遺伝子発現を調べた。

### 【結果】

#### 1. ROR $\gamma$ 活性に及ぼす影響

レポーターアッセイにおいて、イソフラボン類にROR $\gamma$ アゴニスト活性を認めた。その強さはBA=FN>GS>DZであった。

#### 2. IL-17A遺伝子発現及びIL-17A蛋白産生に及ぼす影響

マウス投与試験において、BA投与群でコントロール群に比較して、脾細胞でのIL-17A遺伝子発現の増加を認めた。また、BAを含むイソフラボン類0.1~10 $\mu$ MをPMA/ionomycin処理EL4細胞あるいは脾細胞に暴露したところ、用量依存的にIL-17A遺伝子発現の亢進が認められた。さらに、BA暴露EL4細胞のIL-17A蛋白産生も亢進していることを確認した。

#### 3. ROR $\gamma$ とSRC-1との結合に及ぼす影響

ROR $\gamma$ とコアクチベーターSRC-1との相互作用はBA存在下で増強した。この作用はROR $\gamma$ のAF2欠損型では認められなかった。

#### 4. STAT3チロシンリン酸化に及ぼす影響

マウス脾細胞において、イソフラボン類暴露によりSTAT3蛋白の増減に影響を認めなかったが、リン酸化STAT3の増加を認めた。さらに、BAはSTAT3リン酸化の増強とともに*Rorc*遺伝子発現を増強した。

#### 5. ROR $\gamma$ 及びSTAT3ノックダウン細胞のIL-17A遺伝子発現に及ぼす影響

ROR $\gamma$ -knockdown EL4細胞及びSTAT3-knockdown EL4細胞において、EL4細胞で認められたイソフラボン類によるIL-17A遺伝子発現の増強は認められなかった。

### 【考察】

本研究では、IL-17A産生に対するイソフラボン類の影響を明らかにする目的で実験を行い、イソフラボン類がマウス脾細胞やマウスリンパ腫由来EL4細胞においてIL-17A産生を増強する作用を明らかにした。また、個

体マウスへのBA投与実験で脾臓において*Il17a*遺伝子発現の増強が観察され、新たに樹立したROR $\gamma$ /STAT3恒常的ノックダウンEL4細胞を用いた解析では、BAによるIL-17A産生増強作用はROR $\gamma$ 及びSTAT3の双方を介した機序を有することが明らかとなった。さらに、マウス脾細胞やEL4細胞の培養中にBAを添加することによりSTAT3の転写活性化機能促進に重要な705番目のチロシンリン酸化の増強が認められ、STAT3の転写標的である*Rorc*遺伝子発現が増強された。以上のことから、BAの主な作用のひとつはSTAT3チロシンリン酸化の増強によるSTAT3活性化であり、その結果、活性化STAT3による直接的なIL-17A産生誘導と、*Rorc*遺伝子発現を介した間接的なIL-17A産生誘導の両者が増強したと考えられた。BAで見られたこのような効果は他のイソフラボン類であるGS、FN、DZにおいても同様に認められたことから、このIL-17A産生増強作用はイソフラボン類が共通してもつ作用であることが示唆された。

イソフラボン類のROR $\gamma$ 活性化について、さらに詳細に機序を検討したところ、ROR $\gamma$ へのリガンド結合活性は認められなかった（別の研究データ）。しかしながら、ROR $\gamma$ と結合しそれぞれの転写活性を増強することが報告されている転写コアクチベーターSRC-1に着目し、ROR $\gamma$ との結合に対するBAによる影響を調べたところ、BA添加によって内在性SRC-1とROR $\gamma$ の結合が増強することを認めた。この相互作用はROR $\gamma$ のAF2領域を欠損した場合に認められなかったことから、SRC-1との結合にAF2領域が重要な役割を果たしており、BAがその結合の安定化に寄与している可能性が考えられた。

イソフラボン類は特に大豆製品に多く含まれており、アジア人が日常的に食事を通して摂取している。イソフラボン類には多くの効用が報告され、エストロゲン作用を有することから閉経後の女性に対する保護効果や骨粗鬆症予防効果などが知られている。これまでに、DZがTh1分化を促進しTh2分化を抑制する報告<sup>9)</sup>やFN、DZやEquolがIL-4産生を促進し、IFN- $\gamma$ 産生を抑制することが報告されており<sup>10)</sup>、イソフラボン類のTh1サブセットやTh2サブセットの機能への影響を解析した報告はあるが、Th17やその他のThサブセットの機能に対する報告はなされていなかった。このことから、本研究はイソフラボン類がTh17サブセットの機能を正に制御することを最初に報告した研究と考えられる。このことは、これらのイソフラボン類を用いてROR $\gamma$ やSTAT3の機能を調節することで、IL-17A産生を制御できる可能性のあることを意味している。イソフラボン類は普段の食事から摂取していることや、イソフラボン類を配合したサプリメントや飲

料が多く存在することから、安全性についてはすでに確立されている。IL-17Aは真菌・細菌感染防御を担うことから、後天性免疫不全症候群（AIDS）等の免疫機能が低下した患者に対してイソフラボン類を投与または摂取させることで、症状の改善が期待される。また、IL-17Aは自己免疫疾患増悪化に関与することから、IL-17A産生が病態形成に関連する自己免疫疾患患者に対してイソフラボンの摂取を控えるよう注意喚起することも可能である。このようなイソフラボン類によるTh17細胞調節を可能にするためにも、in vivo評価系での更なる解析が必要と考えられる。

**謝辞**

このたびは第20回日本免疫毒性学会学術大会・年会賞を賜り、年会長の坂部貢先生をはじめ選考委員の諸先生方に厚く御礼申し上げます。我々は、環境化学物質による核内受容体を介した免疫毒性作用をテーマに研究を行っています。近年、様々な化学物質が核内受容体のアゴニストやアンタゴニストとして機能することが報告され、医薬品として臨床応用が期待される反面、これらの受容体を介して多種多様な毒性作用を誘発することも明らかになってきています。しかしながら、免疫系における核内受容体の役割は、Th17細胞系におけるRORやマクロファージ系におけるLXRなどの限られた領域で解明されつつありますが、未解明な部分が多く残されていると思われまます。今後とも皆様のご指導ご鞭撻を仰ぎつつ、核内受容体をKey Wordにした免疫毒性研究に取り組む所存でありますので、何卒よろしくごお願い申し上げます。終わりに臨み、本研究は日本学術振興会・科研費(24590773)の助成により行われたことを記します。

**文献**

- 1) Harrington, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123-1132 (2005).
- 2) Stockinger, B., Veldhoen, M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 281-286 (2007).
- 3) Yang, X. O. et al. TH17 lineage differential is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . *Immunity* 28, 29-39 (2008).
- 4) Zhi, C. et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 8137-8142 (2006)
- 5) Huh, J. R. et al. Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t activity. *Nature* 472, 486-490 (2011).
- 6) Solt, L. A. et al. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* 472, 491-494 (2011).

- 7) Xu, T. et al. Ursolic acid suppresses interleukin-17 (IL-17) production by selectively antagonizing the function of ROR $\gamma$ t protein. *J. Biol. Chem.* 286, 22707-22710 (2011).
- 8) Kojima H. et al. Inhibitory effects of azole-type fungicides on interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 338-345 (2012).
- 9) 戸塚 護：大豆イソフラボンが I 型および II 型ヘルパー T 細胞への分化に及ぼす影響、大豆たん白質研究14, 68-72 (2011)
- 10) Park, J. et al. Formononetin, a phyto-oestrogen, and its metabolites up-regulate interleukin-4 production in activated T cells via increased AP-1 DNA binding activity. *Immunology* 116, 71-81 (2005)

**学生若手優秀賞**

**多層カーボンナノチューブ13週間  
全身吸入曝露における雌雄ラットの  
脾臓中ケモカインによる炎症反応の検討**

木戸 尊将

(東京慈恵会医科大学環境保健医学講座)

この度、第20回日本免疫毒性学会において学生若手優秀賞を賜り、誠に有難う御座います。審査委員の先生方に厚く御礼を申し上げますと共に、これからもこの学会を通じて免疫毒性学の勉強に励みたいと思います。今後とも、ご指導の程よろしくごお願い申し上げます。

受賞を頂きました研究内容致しましては、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の全身曝露に対する免疫毒性的側面からの研究を行いました。MWCNTは様々な用途で使用されており、MWCNTはアスベストと類似する繊維状構造をとり、アスベストと同様の健康影響が懸念されます。アスベストの免疫系を介した毒性影響については本学会の先生方から多く報告がありますが、MWCNTの毒性機序、特に免疫部分についての論文は多くありません。また、ナノ粒子を動物へ曝露する方法も検討しなければなりません。そこで我々は、日本バイオアッセイ研究センターで開発したMWCNT曝露装置（サイクロンエアースープ方式）と全身曝露チャンバーによる曝露を適切なものとして研究を進めています。この全身曝露チャンバーはより作業従事者に近い環境での生体影響を探ることができます (Kasai et al., 2013)。本研究では、ラットにMWCNTを13週間全身曝露して、脾臓中マクロファージ及びTリンパ球から産生されるサイトカイン及びケモカインのmRNA発現を測定し、MWCNTの

吸入曝露による免疫毒性機序を解明するために研究を行いました。

雌雄のF344ラットにMWCNTを0、0.2、1及び5 mg/m<sup>3</sup>の気中濃度で13週間曝露した後、雌雄ラットの脾臓からマクロファージとTリンパ球を抽出し、リアルタイムPCRを用いてマクロファージはIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 、Tリンパ球はIL-2、TGF- $\beta$ <sub>1</sub>のmRNAの発現を測定しました。

結果としてマクロファージについては、雌では、5 mg/m<sup>3</sup>群でIL-1 $\beta$ 及びMIP-1 $\alpha$ のmRNA発現が対照群より有意に高値であり、IL-6及びIL-10でも0.2mg/m<sup>3</sup>と5 mg/m<sup>3</sup>が有意に高くなりました。TNF- $\alpha$ には有意性はみられませんでしたでしたが、対照群よりも高値でした。また、雄のMWCNT曝露群では、有意水準までは達しなかったものの対照群と比べてIL-1 $\beta$ 、IL-6及びTNF- $\alpha$ のmRNA発現が高値でした。脾臓中Tリンパ球のサイトカインのmRNA発現については、雌雄共にIL-2が0.2mg/m<sup>3</sup>以上の曝露群で有意に低値となりました。

以上よりMWCNTの13週間全身曝露によって脾臓中マクロファージにおいて炎症性サイトカインのmRNA発現が増大することが示されました。この曝露群については病理組織学的検査において5 mg/m<sup>3</sup>群において脾臓中にMWCNTが確認されています。このことについては二つのメカニズムを考えております。一つ目は、肺に入ったMWCNTを肺胞マクロファージが取り込み、炎症系サイトカインを産生すると共に、ケモカインMIP-1 $\alpha$ が血行性又はリンパ行性によって脾臓まで運ばれ、脾臓でも炎症系サイトカインを産生した可能性です。もう一つは、肺胞から取り込まれたMWCNTが血管を通じて脾臓まで達し、脾臓のマクロファージが炎症系サイトカインを産生した可能性です。Tリンパ球の結果については、IL-2のmRNA発現が低値であった場合、腫瘍を殺傷するLAK細胞及びNK細胞の誘導作用が低下することが知られておりますので、MWCNT曝露により腫瘍に対する抵抗性が低くなる可能性があります。

以上が本研究の内容でございます。まだ、課題の多い研究ではございますが免疫毒性を介した健康影響を解明するためにも研究に精進していく次第でございます。

最後になりますが、本研究を実施するにあたり、御協力・御助言を下さいました日本バイオアッセイ研究所所長 福島昭治先生、吸入試験室室長 笠井辰也先生をはじめ研究所の多くの先生方に厚く御礼を申しあげると共に、私に知識と技術を授けて下さいました、東京慈恵会医科大学環境保健医学講座 教授 柳澤裕之先生、北里大学医学部衛生学 准教授 角田正史先生に厚く御礼を申し上げます。

### 世界の免疫毒性研究者へのインタビュー第4回 — Real Voices of International Immunotoxicologists —

こちらでは、海外の免疫毒性研究者の本音を聞いてみよう！ということで、学会にご参加ご講演いただいた方々へのインタビューコメントを紹介させて頂いております。今回は、第20回学術大会に於いてご講演頂きましたScott W. Burchiel先生、Jacques Descotes先生、Laine Peyton Myers先生にインタビューさせて頂きました。前回もそうでしたが今回も、本学会の盛況ぶり、日本における免疫毒性研究の活発さに対する驚きの声が聞かれます。私たちは良い環境の中で素晴らしい学会に参加しているのだと再認識させられます。また、仕事の話は勿論のこと、それ以外にも、へえ～な話が有ったり、です。何れもそちらの内容はEnglish版に掲載されておりますので是非ご覧下さい。Don't miss it!!

編集後記

本年9月の第20回日本免疫毒性学会学術大会が盛況の内に終了し、学会は21年目に向けてスタートしました。21と言えば、IL-21（インターロイキン21）というサイトカインが2000年に発見されています。IL-21は、T細胞、B細胞及びNK細胞の活性化、増殖、分化及び生存に多彩な作用を示し、アレルギー疾患や自己免疫疾患との関連性が報告されています。最近では、活性化NKT細胞から産生されるIL-21によりIgE抗体を産生するB細胞にアポトーシスが誘導されることに着目し、NKT細胞リガンド化合物の新規アレルギー治療薬としての可能性を探る研究が行われています。免疫毒性研究におけるIL-21の注目度はまだ低いようですが、今後、化学物質によって惹起される免疫毒性の原因究明の中でIL-21が登場し、免疫毒性研究の発展に繋がることを期待して止みません。

(N.T記)

編集・発行：日本免疫毒性学会  
発行日：平成25年12月

編集発行責任者：吉田 貴彦  
編集委員会：角田 正史、筒井 尚久、  
手島 玲子、野原 恵子、  
藤巻 秀和、新藤 智子、  
西村 泰光、姫野誠一郎  
原稿送付先：keikon@nies.go.jp