

ImmunoTox Letter


日本免疫毒性学会: The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 21 No.2(通巻 42 号) 2016.12 月

— 目次 —

第 24 回日本免疫毒性学会学術年会(予告 1) …1	北里大学 中村和司
第 23 回日本免疫毒性学会学術年会報告 ……2	産業医科大学 森本泰夫
第 5 回(2015 年度)日本免疫毒性学会奨励賞 … 3	大阪大学免疫学フロンティア研究センター 黒田悦史
第 23 回学術年会年会賞 ……5	産業医科大学 吉田安宏 他
第 23 回学術年会学生・若手優秀発表賞 ……8	千葉大学大学院 薄田健史 千葉大学大学院 藤森惣太
新評議員より …… 10	国立医薬品食品衛生研究所 石井明子 田辺三菱製薬株式会社 坂入鉄也
試験法ワークショップ: 有害性転帰経路(AOP)と免疫毒性 ……11	試験法委員会
ImmunoTox Letter Digest ……15	

第 24 回日本免疫毒性学会学術年会 (JSIT2017)(予告 1)

日本免疫毒性学会の第 24 回学術年会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。

期 日 : 2017 年 9 月 4 日(月)~5 日(火)
会 場 : 北里大学獣医学部 B 棟 1 階講義室
アクセス : 北里大学 十和田キャンパス 
〒034-8628
青森県十和田市東二十三番町 35-1

テ — マ: 『「免疫亢進」と「免疫抑制」の新たな考え方』
アレルギーや自己免疫は、果たして「免疫亢進」によって引き起こされているのでしょうか。生理的に「免疫抑制」が起きているときに、それを抑制する免疫毒性とは一体どのようなものなのでしょうか。今までの免疫毒性の考え方を少し見直してみませんか。免疫毒性学の近未来を提示します。

内 容 : 会長基調講演、特別講演、教育講演、シンポジウム、ワークショップ(試験法)、一般演題(口演・ポスター)、ランチョンセミナー(チャールス・リバー、エンヴィーゴ)を予定しています。

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・若手優秀発表賞(28 歳以下)」を授与する予定です。

発表形式 : 口演・ポスターを予定しています。

懇 親 会 : 小さな十和田の街で、若い先生方に免疫毒性学の未来を語ってもらいます。

演題募集期間: 2017 年 4 月 24 日(月)~ 6 月 30 日(金)

年 会 長 : 中村和司

北里大学獣医学部獣医学科毒性学研究室

事 務 局 : 担当 鎌田 亮

第 24 回日本免疫毒性学会学術年会事務局

北里大学獣医学部獣医学科毒性学研究室

〒034-8628

青森県十和田市東二十三番町 35-1

TEL: / FAX: 0176-24-9419

Email: secretariat@jsit2017.jp

ホームページ: <http://jsit2017.jp/>

第 23 回日本免疫毒性学会学術年会報告

森本 泰夫
産業医科大学

皆様、このたびは、台風の直撃にもかかわらず、第 23 回日本免疫毒性学会学術年会のご参加いただきありがとうございます。無事、成功裏に終了し、皆様のご協力 心から御礼申し上げます。簡単に報告させていただきます。平成 28 年 9 月 5 日(月)から 7 日(水)にかけて北九州市の国際会議場で開催しました。なお、過去 22 回開催されておりますが、今回が初めての九州開催でした。学術年会のテーマは、“社会に実践する免疫毒性学”としました。従来のテーマのように新たな研究分野の開拓とは異なり、実社会での有用性に根差したテーマを選びました。

まず、年會に先立って 9 月 5 日に市民公開講座を行うことを企画しました。公開講座のテーマは、低炭素社会の実現に向けた試みとして、「工業用ナノ材料の有害性評価手法の開発」としました。これは、経済産業省のプロジェクトとして行われており、幅広い特性により様々な用途に使用されることが期待されている工業用ナノ材料の有害性評価として比較的簡易に行えるスクリーニング検査手法として気管内注入法が有用であることを報告しました。この試験法は、社会において実践性を有する試験であることが示唆されました。

また、シンポジウムのテーマも本学会テーマに即した、「社会還元や社会実践を目指した微細粒子の生体影響評価等の研究」としました。医薬基盤・健康・栄養研究所の水口賢司先生から「データベース、バイオインフォマティクスから呼吸器疾患へ」、川崎医科大学の西村泰光先生から「アスベスト曝露と悪性中皮腫に関わる免疫学的特徴の解析とスクリーニングデバイスの開発」、大阪大学の黒田悦史先生から「微細粒子による肺の炎症とアレルギー」、産業医科大学の和泉弘人先生から「工業用ナノ材料の有害性スクリーニング法の開発：気管内注入試験」と題したタイトルで講演し、これらの研究成果がどのように社会還元するか、または社会還元につながるかも提示していただきました。

特別講演では、Burlson Research Technologies, Inc. の Dr. Victor J. Johnson が「Inhaled Nanoparticles: Consequences of Exposure and Approaches for Hazard

Identification」と題したタイトルで、吸入性ナノ粒子の免疫毒性モデル、有害性特定のアプローチなどを講演しました。カーボンナノチューブや金属ナノ粒子を用いた吸入ばく露試験や気管内注入試験を行い、肺や脾臓における免疫毒性の報告を自験例を中心に講演しました。

教育講演に関しては、産業医科大学第 1 内科 齋藤和義先生から「膠原病における免疫抑制剤の副作用(易感染性・腫瘍形成)とその機序」、産業医科大学呼吸器内科 矢寺和博先生から「薬剤性肺障害とその機序」について実臨床での課題などを中心に、産業医科大学成人老年看護学 佐藤実先生から「アジュバンドによる自己免疫」について動物モデルや臨床報告など講演されました。

試験法ワークショップに関しては、あすか製薬株式会社の久田茂先生のご尽力で「有害性転帰経路(AOP)と免疫毒性」を企画し、国立医薬品食品衛生研究所の小島肇先生、東北大学皮膚科学分野の木村裕先生、第一三共株式会社の伊藤志保先生、アステラス製薬株式会社の串間清司先生から AOP の概念、事例、作成の留意点などの講演をし、AOP を免疫毒性の視点でどのように展開するかを示していただきました。

学会賞は、残留農薬研究所 試験事業部の小坂忠司先生が受賞し、「農薬の免疫毒性作用」というタイトルで講演しました。有機塩素系やリン酸系農薬が、次世代への影響を及ぼすこと、呼吸器アレルギーモデルやアトピー性皮膚炎モデルを介してアレルギー反応の増悪化をみだし、農薬の様々な免疫への影響が示唆されました。奨励賞は、北海道立衛生研究所生活科学部の小島弘幸先生が受賞し、「環境化学物質による核内受容体を介した免疫毒性作用」というタイトルで、IL-17 の制御に係わる核内受容体の関与を講演しました。

口頭発表、ポスター発表も活発な質疑応答があり、大いに盛り上がりました。口頭発表は、10 演題、学生・若手発表 2 演題、ポスター発表 14 演題でした。この学生・若手発表の 2 演題は、口頭とポスターの両方で発表し、学生・若手優秀発表賞の選考、それ以外の発表から年会賞を選考しました。年会賞は、産業医科大学医学部免疫学・寄生虫学の吉田安宏先生、学生・若手優秀発表賞は、千葉大学大学院薬学研究

院 生物製剤学研究室の薄田健史さん、藤森惣太さんが受賞しました。

今回は会員からのリクエストであった市民公開講座の開催と無料の無線 LAN (FreeWi-Fi) の使用にも対応させていただきました。特に無料の無線 LAN に関して、ご利用している会員が多く見受けられました。

懇親会は、6 日夜に近隣のレストランで行い、洋食を中心にバラエティのある料理を用意させていただきました。会場では、会話も弾み、楽しんでいただけたのではないかと感じております。また、学会参加者の懇親会参加率が非常に高いことにも驚きました。

3 日間、特に大きな問題も生じること無く、比較的順調に進行したことに安堵しております。これも、関連する法人、企業、個人の方々、そしてご参加いただいた多くの方々のご支援・ご協力の賜であります。この紙面をかりてお借りして、厚く御礼申し上げます。さらに、今後の学会及び学術年会の進展を祈念して私のお礼の言葉に代えさせていただきます。



第 5 回(2015 年度)日本免疫毒性学会奨励賞

免疫毒性研究とアジュバント研究の クロストーク

黒田 悦史

大阪大学免疫学フロンティア研究センター
ワクチン学研究室



黒田 悦史先生

この度、第 5 回日本免疫毒性学会奨励賞を賜り、大変光栄に存じます。学会員としてまだ年月が浅い私を推薦してくださり、選考していただきました諸先生方ならびに関係各位に心より御礼申し上げます。

私が免疫毒性学会に初めて参加させていただきましたのは、第 17 回(2010 年)の藤巻先生が年会長をお務めになられた学術大会からであります。初めて参加でありましたが、私にとっては免疫毒性学会の奥深さを感じた刺激的な大会でありました。またその大会にて、初めての参加にもかかわらず年会長賞を賜りました。その時の発表テーマが「粒子状化学物質による自然免疫の活性化と II 型免疫反応の誘導」でした。今回の受賞は「粒子状物質により誘導される免疫応答とその誘導機構の解析 -免疫毒性とアジュバント活性-」という内容であり、お気付きのとおり私は微細粒子による免疫応答に深い興味を持ち研究を行っております。私が粒子に対する免疫応答に興味を持ったきっかけが、2008 年に相次いで報告されたアルミニウム塩(アラム)、シリカ、アスベストなどの微細粒子(繊維)状物質によるインフラマソームの活性化の論文です。これまで多くの報告から微細粒子が免疫系を活性化することが明らかにされていましたが、そのメカニズムについては不明な点が多く残されていました。私たちは普段は意識していませんが、微細粒子に対する免疫応答は我々の生活に密に関係しております。免疫毒性の分野では、大気中のディーゼル粒子、黄砂、PM2.5 などが免疫系を刺激し、アレルギー性炎症を誘導することが示唆されております。またシリカや

アスベストが肺の免疫系を介して炎症を惹起することも知られております。さらに医薬品の分野でも微細粒子は注目されており、古くからワクチンアジュバントとして使用されているアラムは免疫系を刺激し抗体産生を促進することが明らかにされております。最近では微細粒子を用いた DDS 技術による免疫応答の誘導も注目されています。このように我々の身近に存在するにもかかわらず、微細粒子による免疫学的メカニズムが明らかにされていないことは驚きであります。またアラムに関しては医療の分野で長い間使われていながら、免疫学者ですらそのメカニズムを理解していないということで、「Immunologist's Dirty Little Secret」と揶揄されております。このような背景から私は微細粒子による免疫活性化メカニズムを明らかにしてみたいと考えるようになりました。

微細粒子の研究を始めた時私は産業医科大学に在籍しており、そこでナノ粒子の生体影響を研究しておられる森本泰夫教授と共同研究を行いご指導いただきました。これまでの報告から、アラムやシリカのような微細粒子をマクロファージや樹状細胞が貪食することによりインフラマソームが活性化され、IL-1 β が誘導されることが報告されておりましたので、私も微細粒子を貪食するマクロファージに注目し、研究を行いました。微細粒子によってマクロファージから誘導される液性因子に関して調べておりましたところ、インフラマソームの活性化とは異なる経路で脂質メディエーターの一つであるプロスタグランジン E2 (PGE2) が誘導されることを見出しました。さらに、アラムやシリカをアジュバントとして抗原とともにマウスに投与(免疫)すると抗原特異的な IgE が誘導されてきますが、PGE2 合成酵素である PTGES 欠損マウスでは抗原特異的な IgE の低下が認められました。この結果から微細粒子による IgE の誘導には PGE2 が関与すると考えられました。さらに共同研究を行っていた大阪大学の石井健教授のグループからアラムにより一過的に細胞死が引き起こされること、さらに細胞死によって遊離した DNA がアジュバント活性に重要であることが報告されました。その後我々も微細粒子と PGE2 産生に細胞死が関するかを検討したところ、PGE2 が細胞死によって誘導されることを認めました。これらの結果は微細粒子による免疫活性化の根本に細胞死が関与していることを示唆しています。幸運にも、共同研究を行っていた大阪大学の石井健

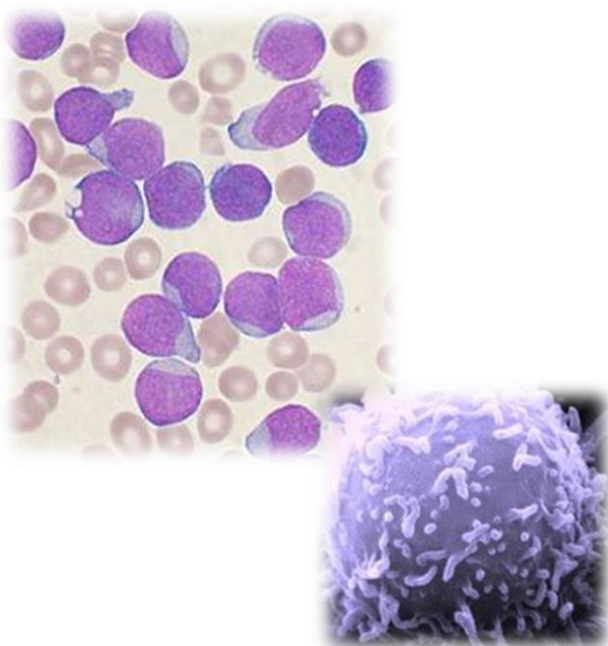
教授にお声をかけていただき、2012 年から現在の大阪大学免疫学フロンティア研究センターにて、微細粒子と細胞死、さらにはアジュバント活性やアレルギー性炎症のメカニズムをより深く研究できるようになりました。

大阪大学に異動して、次に私が行ったことは投与経路の検討でした。免疫学においてはアジュバント研究の多くは、アジュバント(微細粒子)を皮下や腹腔内へ投与する実験系でありました。しかしながら免疫毒性学会の先生方と交流を深めるうちに、微細粒子の気管や肺への影響を見る必要があることがわかりました。またワクチンアジュバントの分野でも経鼻のワクチンが注目されていたこともあり、微細粒子の肺への影響を中心に解析を始めました。当初は皮下や腹腔と似たようなメカニズムで免疫応答が惹起されると浅はかに考えておりました。しかしながら皮下や腹腔内投与では免疫応答が低下するような遺伝子欠損マウスを用いても肺での免疫応答には全く影響せず、一方で皮下や腹腔内投与では影響が見られないような遺伝子欠損マウスで肺の免疫応答が低下するという結果が得られました。もちろん組織によって生体応答が異なることは当然ではありますが、ここまで大きく違うことに驚くとともに、気管や肺の免疫に非常に興味が出てきました。さらなる解析の結果、肺マクロファージが他の組織マクロファージと機能が大きく異なること、微細粒子を貪食した肺マクロファージ由来の死細胞因子 (Damage-Associated Molecular Patterns: DAMPs) が肺において三次リンパ節の一種である誘導性気管支関連リンパ組織 (inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: iBALT) を誘導することなどを認め、微細粒子の肺への投与により、非常にユニークな肺特異的な免疫応答が誘導されることが明らかになりました。このように、微細粒子に対する肺での免疫応答が他の組織と大きく異なることがわかりましたが、やはり免疫応答のトリガーは細胞死であり、細胞死を誘導しない粒子を投与しても肺での免疫応答は認められませんでした。

同時期に私たちは新規のワクチンアジュバント候補物質として β シクロデキストリンを見出しました。このアジュバントは皮下投与や経鼻投与においてインフルエンザワクチンのアジュバントとして有効であることを認めています。そのメカニズムを解析したところ、アラムと同様に接種部位に一過的な細胞

胞死を誘導し DAMPs を遊離することがアジュバント活性に重要であることを認めております。βシクロデキストリンはすでに医薬品の添加物として用いられており、安全性の高い物質であると考えられております。しかしながらアジュバント活性には一過的な細胞傷害活性が必要とされます。医薬品という観点から細胞傷害活性は忌み嫌われる傾向があると思われませんが、アラムやβシクロデキストリンのような DAMPs 誘導型のアジュバント(私たちは DAMPing アジュバントと呼んでいます)に関しては細胞傷害が重要であり、現在ではアジュバント研究の一つの大きな流れを作っています。これまで悪いものとされていた細胞死や細胞傷害活性をアジュバント開発という観点から見つめ直し、掘り起こすことにより、アジュバント開発の新展開が見られるかもしれません。

最後になりますが、微細粒子の研究においてご指導いただきました産業医科大学の森本泰夫先生、現在の研究室においてアジュバント研究のノウハウをご指導いただきました石井健先生、ならびに免疫毒性学会の諸先生方に御礼申し上げますとともに、引き続きご指導ご鞭撻を賜りますよう、宜しくお願い申し上げます。



第 23 回学術年会年会賞

LPS を多く含む都市由来 PM10 による免疫反応の抑制

吉田 安宏¹、宋 媛¹、市瀬 孝道²

¹産業医科大学・医・免疫学・寄生虫学

²大分県立看護科学大学



吉田 安宏先生

【背景・目的】

環境汚染物質による大気汚染が、日本をはじめ多くのアジアの国で深刻化している。中国では大都市部の死亡原因における 32%が PM2.5 に関連していると報告されている(Fang D., et al. *Sci Total Environ.* 2016;569-570:1545)。私どものグループは、越境汚染物質である黄砂(PM10 の一つ)や PM2.5 の生体影響について動物モデルを解析し、アレルギー誘導の肺における好酸球増加を増悪させること(Ren Y. et al, *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2014;10:30)、またその増悪機構には自然免疫に重要な細胞表面上受容体 TLR2 /TLR4 が関与していること(He M et al., *Toxicol Appl Pharmacol.* 2016;296:61)などを報告してきた。しかしながら肺以外の臓器への影響も報告されており(Robert D. B et al. *Circulation.* 2010;121:2331)、実際、私どものグループでも脾臓において黄砂が転写因子 NF-κB の活性化を介した亜急性の免疫反応修飾を引き起こし、それは肺の炎症とは時間的に遅延した時点で起こること(Song Y. et al, *Environ Toxicol.* 2015;30:549)を証明している。こういった背景の下、このような汚染物質誘導による炎症反応において黄砂に含まれる粒子成分とそれに付着している物質が、どのような役割分担をしているのか、という課題に直面した。そこで本研究課題である粒子と付着成分の代表として LPS に着目し、それぞれの作用を検討した。

【方法】

[生体影響評価] マウス(雄、6 週齢)は BALB/c マウスを使用し、黄砂(PM10)100 μ g を生理食塩水に懸濁したものを 100 μ L、2週間おきに4回気管内投与し、最終投与24時間後にマウスから脾臓細胞を調製した。投与する粒子は2種類で、一つは2011年5月に北九州市に飛来した黄砂(ASD)を、もう一つは2013年11月に中国瀋陽市で収集した都市由来PM10(urPM10)を準備した。また urPM10 を360度30分加熱し、付着物を取り除いた H-PM10 を準備した。Cell viability assay system により細胞内 ATP レベル量を測定することで増殖反応を評価した。また脾臓細胞を *in vitro* で培養し、細胞分裂誘起物質である LPS、ConA 刺激に対する反応性を調べた。その際、影響を及ぼしている成分の探索のため、LPS の中和物質であるポリミキシン B の同時投与を行い同様な評価を行った。

[細胞内イベントへの影響評価] 細胞内イベントへの影響評価として細胞内タンパク質である転写因子に着目し、転写因子、特に NF- κ B (構成成分の一つである p65 に着目)の活性化をウエスタンブロット法により評価した。粒子を気管内投与したマウスから調製した脾臓細胞の細胞溶解液を調製し、試料とした。

【結果】

1) 日本飛来黄砂(ASD)と都市由来 PM10(urPM10)に含まれる LPS 量はそれぞれ 0.0614 ng/mg PM と 0.3260 ng/mg PM であり、都市由来に多くの LPS が含まれていた。2) ASD を投与されたマウス由来脾臓細胞は、対照群に比べマイトジェン(ConA、LPS)に対する反応性が亢進していた。一方、urPM10 を投与したマウス由来脾臓細胞のマイトジェンに対する反応は、対照群に比べ有意に低いものであった(図1 A)。

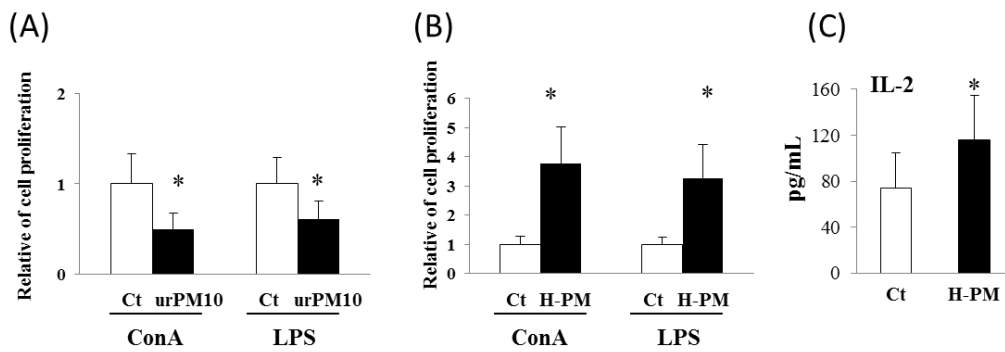


図1 粒子に付着している成分が細胞抑制効果に関与している

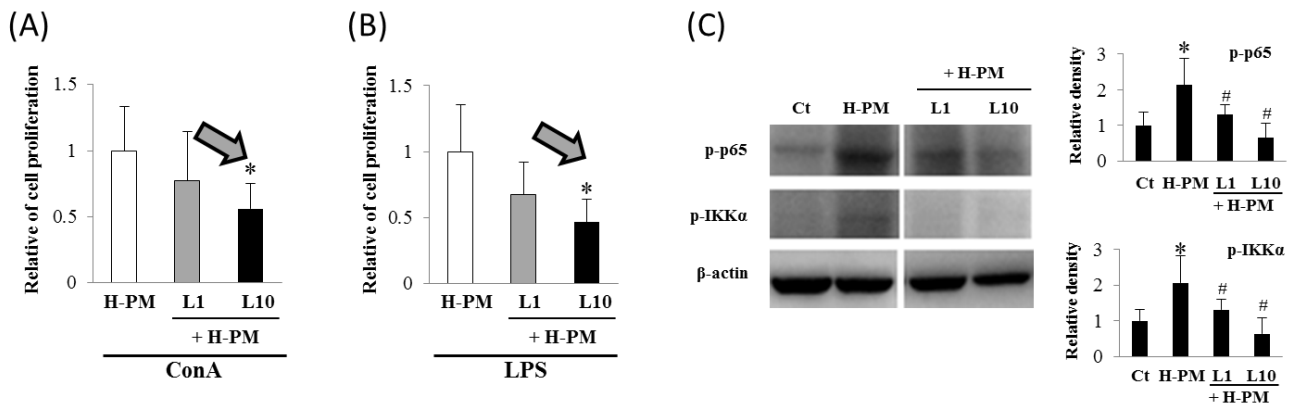


図2 LPSの同時投与によりH-PMで誘導される活性化が抑制された

付着成分を加熱により取り除いた H-PM10 は ASD で観察されたような細胞活性化が認められ (図 1B)、サイトカイン (IL-2、TNF- α 、MDC) 産生の亢進も認められた (図 1C)。3) 菌体成分 LPS を中和するポリミキシン B を同時投与した場合、urPM10 の細胞抑制効果を回復する傾向が認められた。4) H-PM10 により誘導される細胞活性化能は微量の LPS の同時投与により抑制され (図 2A)、抑制性サイトカインである IL-10 の産生も認められた。5) ポリミキシン B と urPM10 を同時投与されたマウスから調製した脾臓細胞では、活性化 NF- κ B (p65) のレベル、およびそのキナーゼである IKK α の活性化レベルが亢進していた (図 2B)。6) p65 の上流分子 MyD88 の KO マウスを用いた同様の実験では、urPM10 による抑制効果は認められなかった。以上から、都市部で収集された LPS を多く含む PM10 による抑制効果には LPS の関与が疑われ、NF- κ B パスウェイはその効果と連動していることが示唆された。

【考察】

本研究では、環境汚染物質の免疫系への影響を粒子とその付着成分の一つである LPS に分けて、リンパ器官である脾臓でのイベントに着目し解析した。収集地の違う粒子による細胞影響の違いも示唆されており、まずは LPS 含量の違う PM10 を準備し比較検討を行った。飛来黄砂に関しては LPS を含むものの、その量は非常に微量である。しかしながら生体内に侵入してきた際、その量は自然免疫を活性化させるに足るものなのかもしれないことが示唆された (これは *in vitro* でその量的背景を再現するのは中々難しいものと思われる)。予想されたように、H-PM では飛来黄砂と同様な脾臓細胞の活性化能を回復していた。このことは、粒子自身も生体に対し影響を持ち、それは抑制的ではなく活性化させる傾向があることが示唆された。しかしながらこれは PM10 で観察されたイベントで、PM2.5 の粒子自身では抑制効果を脾臓細胞にもたらすことを我々は観察している。すなわち、粒子サイズの違いにより生体へのバランスをプラスとマイナスに振り分ける可能性があることが考えられるわけである。黄砂が PM2.5 に比べ、喘息アレルギーを増悪させること、加えて PM2.5 は慢性炎症に伴う免疫抑制を誘導する場合もあることを鑑みると、不思議な現象ではないようだ。LPS の同時投与 (今回の投与量

が絶対値として高いのか低いのかは議論の余地があるのだが) により、粒子誘導の活性化を抑制させたことは、IL-10 の産生上昇を伴ったエンドトキシントレランスの様相を想起させる。LPS の関与の観点から、これらのイベントが MyD88 依存的であったことは当然の結果であったと言えるかもしれない。この後に続けて行っていた我々の研究で、さらに黄砂の活性化機構は TLR4-MyD88 システムであることが証明された (Song et al., FEBS letters, in press)。特に CD4 陽性細胞でこの現象が顕著であったことを考え合わせると、粒子の食食から引き起こされる一連のイベントが獲得免疫系に最終的には繋がっていることは非常に興味深い。今後は他の付着物質の影響と粒子サイズの違いによる炎症誘導機構の差異に関して更なる研鑽を重ねていきたい。

【謝辞】

この度は、第 23 回日本免疫毒性学会学術年会において過大な年会賞を賜り、大変光栄に思っております。本年会では‘社会貢献’というキーワードを掲げ私も担当大学としてその趣旨を鑑みながら、発表課題を選定いたしました。私共の研究室では、近年社会問題となっていた越境汚染物質の生体影響を動物モデルを用い、特に汚染物質が肺に取り込まれた以降のイベントに興味を持ち、解析してきました。得られた結果は環境基準設定に多に参考になる資料として、社会貢献できたのではないかと自負しています。その中で、アカデミアにおいてもこの取り組みが評価されたことは研究者としても非常に喜ばしく、年会長の森本泰夫先生をはじめ選考委員の先生方に心より感謝申し上げます。まだまだ未解明部分が多々残されている環境汚染物質の生体影響に関して、研究室員一同がこの賞に恥じない今後の研究生活を約束してくれるものと思っております。末筆ではございますが、免疫毒性学研究および日本免疫毒性学会のますますの発展をお祈りしつつ、我々も貢献できるよう努力していく所存でございますので、今後とも本学会の先生方のご指導ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

第 23 回学術年会学生・若手優秀発表賞

キメラ型 HLA 遺伝子導入マウスを用いた
免疫の関与する特異体質薬物毒性評価モデル
の構築

薄田 健史

千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室



薄田 健史さん

この度、第 23 回日本免疫毒性学会学術年会において、栄誉ある若手優秀賞に選出されたこと、大変光栄に存じます。選考委員の先生方に、心より御礼を申し上げます。

私が所属している生物薬剤学研究室では、医薬品やその候補化合物の体内動態と有害作用について研究をしております。研究室配属当初は、薬物性肝障害のメカニズム解明やスクリーニング法に関する研究がトレンドとなっており、「免疫」というワードは一言たりも出てこないような雰囲気だったと記憶しております。私自身も、学部 3 年次から修士時代を経て博士課程 1 年次までは「薬物性肝障害リスク薬物を網羅的に判定可能な *in vitro* 毒性試験系の構築」という研究課題が与えられ、薬物とトランスポーターの相互作用に伴う毒性発症メカニズムの解明や、より高精度な毒性発症予測法の構築に関する研究に従事しておりました。そんな中、転機が訪れたのが博士課程 2 年次に進級する年の 1 月 1 週目、上述の研究内容が国際学術誌にアクセプトされ、「さて次は何をしよう？」と思索していた時期でした。私は本学博士課程教育リーディングプログラムである「免疫システム調節治療学推進リーダー養成プログラム」に博士課程 1 年次から所属していた縁もあって、「免疫」が関与する特異体質薬物毒性について興味を湧いておりました。そして幸運なことに、今回発表した研究課題に従事する機会をいただくことができました。

上記の経緯の通り、免疫学に足を踏み入れてからまだ 1

年足らずの新参者でしたので、今回が初めての免疫関連の学術学会への参加となりました。どのような質疑応答が展開されるか全く予想できずに戸惑うことがばかりでしたが、有益な御指導・御助言を多くの先生方より賜うことができ、今後の研究の進行に関する方向性を見定めることができる有意義な機会となりました。恐縮ながらもこのような栄えある賞をいただくことができ、益々研鑽しなければと身が引き締まる思いです。

それでは拙文ながら、受賞を頂きました研究内容に関しましてご紹介させていただきます。

本研究は、マウス体内で機能しうるヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子を導入したマウス(キメラ型 HLA トランスジェニック(Tg)マウス)を作出し、薬物と HLA 遺伝子との相互作用により免疫応答が惹起され発症する特異体質薬物毒性を評価可能か検証したものです。これまで、特異体質薬物毒性の発症リスクに HLA 多型が関係することはゲノムワイド関連解析より示唆されていましたが、特定の薬物・組織で毒性が発現する詳細なメカニズムについては未だ不明でありました。そこで本研究では、抗 HIV 薬であるアバカビルと HLA-B*57:01 遺伝子との相互作用により免疫応答が惹起され発症する「特異体質性のアバカビル過敏症(皮膚毒性)」に焦点を当て、作出した Tg マウスにアバカビルを曝露した後の免疫応答を評価しました。その結果、HLA-B*57:01 遺伝子を導入した Tg マウスにおいて、アバカビルの曝露によってリンパ節重量の増加やリンパ球の増殖といった免疫反応の亢進が認められました。その一方で、リッターメイト野生型マウスや HLA-B*57:03 遺伝子(2 アミノ酸のみ異なる陰性対照)を導入した Tg マウスにおいては、アバカビルの曝露による免疫応答は認められませんでした。これらの結果から、特異体質薬物毒性の評価において、本研究で用いたキメラ型 HLA 導入 Tg マウスが有用となることが示唆されました。

本評価モデルマウスは、特異体質薬物毒性を前向きに再現できることから、詳細な発症メカニズムの解明に応用可能となることが特徴です。さらに、導入したキメラ型 HLA タンパク質がマウス全身に発現していると示唆されたことから、組織特異的な毒性発現の原因の究明にも繋がりと期待しています。HLA の関与する特異体質毒性に関する研究は端緒につ

いたばかりであります。本研究が種々の HLA 多型分子における特異体質毒性評価に応用する上での試金石となれるよう、今後もより一層研究に励みたいと思います。

最後に本研究を遂行するにあたり、終始御懇切なる御指導・御鞭撻賜りました当研究室の伊藤晃成 教授、青木重樹 助教、ならびに御協力いただいた藤森惣太さん、向後晃太郎さんをはじめとした学生の皆様にこの場を借りて深く御礼申し上げます。

第 23 回学術年会学生・若手優秀発表賞

HLA 遺伝子導入マウス由来ケラチノサイトを用いた特異体質薬物毒性メカニズムの解析

藤森 惣太

千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室



藤森 惣太さん

この度、第 23 回日本免疫毒性学会学術大会において学生若手優秀賞を賜り、誠に有難うございます。審査委員の先生方に心より御礼申し上げますと共に、日頃よりご指導いただいております諸先生方にこの場をお借りして御礼申し上げます。拙文ではございますが、受賞を頂きました研究の内容に関しましてご紹介させていただきます。

医薬品の安全性を考えるうえで、販売後に発覚することの多い特異体質薬物毒性の前臨床における予測は、医薬品の研究開発における重要な課題であるといえます。近年ゲノムワイド解析の発達により、ある種の特異体質薬物毒性の発症とヒト白血球抗原(HLA)の遺伝子多型との関連が数多く報告され、先達の先生方の研究により HLA による薬物抗原の提示が毒性発症の原因となることが解明されました。しかし、この種の毒性の発症リスクを適切に評価できる系は存在してい

ないのが現状です。私は、評価系が確立されない理由として、この種の毒性の詳細なメカニズムが不明である点が挙げられると考えました。

「特定多型 HLA を発現した抗原提示細胞と T 細胞を原因薬物存在下で共培養すると、薬物抗原特異的な T 細胞応答が生じる」という現象は過去に多く示されており、これが毒性の直接的なメカニズムとなります。しかし、この応答は全身性で生じうる一方、特定多型 HLA の関与する特異体質薬物毒性は組織特異的に発症することが知られております。そこで私は、「発症組織における特異的な原因薬物への応答が、組織特異的な T 細胞応答ひいては組織特異的な毒性を生じさせる」という仮説の元、研究を進めることといたしました。

私が研究対象とする HLA-B*57:01 多型がリスク因子となるアバカビル薬剤性過敏症は皮膚症状が多く報告されております。皮膚表皮の組織構成細胞であるケラチノサイトは免疫応答能が高く、皮膚免疫に強く関与することから、このケラチノサイトのアバカビルに対する応答が皮膚選択的な T 細胞応答を惹起するのではないか、という仮説を立てました。その上で、当研究室で作製した HLA-B*57:01 トランスジェニックマウス(B*57:01-Tg)及び、アバカビル抗原を提示しない多型である HLA-B*57:03 トランスジェニックマウス(B*57:03-Tg)由来のケラチノサイトを初代培養し、アバカビルに対する免疫応答を評価しました。

アバカビルの曝露により B*57:01-Tg 由来ケラチノサイト(B*57:01 KC)特異的に活性化マーカー(KRT16)及び、IFN- γ 、IL-1 β 等のサイトカインの mRNA の発現上昇が確認されました。また、この細胞において HLA 多型特異的に HLA-B*57:01 の細胞膜発現量の上昇が確認され、さらに、この応答はアバカビルと同様の逆転写阻害型の抗 HIV 薬のジドブジンにおいては確認されなかったことから、B*57:01 KC において HLA 多型特異的な免疫応答が生じたことが示唆されました。

これらの応答が組織内で生じた場合、樹状細胞を中心とする免疫担当細胞の機能を亢進させる可能性は大いにあると考えられます。今後は *in vitro* におけるケラチノサイトと樹状細胞の共培養実験や *in vivo* 実験を通し、これら細胞のインタラクションを解析する予定であります。また、組織構成細胞の

薬物に対する HLA 多型特異的な免疫応答は、過去にあまり例のない現象であるため、メカニズムを明らかにしたいと考えております。

私は修士課程一年の身であり、本学会での発表が初めての口頭発表でありましたが、このような身に余る賞を賜り、大変光栄に存じます。今回の受賞を機に、医薬品の安全な使用に少しでも貢献できるよう、より一層精進し研究に取り込んでゆく所存でございます。最後になりますが、本研究に取り組むにあたり、ご指導頂いております、伊藤晃成教授、関根秀一講師、青木重樹助教、そして本学会においてご指導いただいた諸先生方に厚く御礼を申しあげると共に、今後ともご指導・ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

新評議員より 評議員就任にあたって

石井 明子
国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部



石井 明子先生

このたび日本免疫毒性学会の評議員を拝命いたしました国立医薬品食品衛生研究所の石井明子と申します。ご推薦頂きました先生方、ならびにご承認頂きました理事及び会員の先生方に厚く御礼申し上げますとともに、本紙面をお借り致しまして、皆様にご挨拶申し上げます。

私は、京都大学大学院薬学研究科修士課程を修了後、3年間の製薬企業での勤務を経て、国立医薬品食品衛生研究所に入所いたしました。国立医薬品食品衛生研究所では、生物薬品部に所属し、一貫してバイオ医薬品の品質・安全性評価に関する研究を行っており、現在は、バイオ医薬品の中でも抗体医薬品を主な研究対象としております。

国立医薬品食品衛生研究所は、本学会の設立や医薬品の免疫毒性試験に関する ICH S8 ガイドライン策定に関わられた旧機能生化学部の澤田純一先生や手島玲子先生が活躍されていた研究所であり、現在も、本学会の理事を務めておられる斎藤嘉朗先生、評議員の中村亮介先生らにより、免疫毒性に関する研究が精力的に行われている環境にあります。私が所属しております生物薬品部は、これまで品質に関する研究が中心でしたが、最近では、ヒト細胞を用いた *in vitro* 評価系の開発や、生体試料中薬物濃度分析法、免疫原性評価法に関する研究等、非臨床・臨床に関する課題にも研究対象を広げております。

バイオ医薬品は、有効成分が高分子であるため、免疫原性がしばしば問題となります。欧州では、過去に、遺伝子組換えエリスロポエチンの製剤処方変更に際して中和抗体出現による重篤な有害事象の発生を経験していること、米国では、規制当局やアカデミアにおいて、タンパク質凝集体と免疫原性に関する関心が高いこと等から、バイオ医薬品の免疫原性に関する研究が盛んです。EMA 及び FDA では、免疫原性評価に関するガイドライン/ガイダンスの策定・改訂がなされており、最新の科学的知見を取り入れた規制環境整備が進んでいます。一方、日本では、国内企業により開発されたバイオ医薬品が少ないことや、幸いにも免疫原性が大きくクローズアップされるような有害事象を経験していないこともあり、バイオ医薬品の免疫原性に関する研究や規制環境整備は、欧米に比べて遅れている状況にあると思います。

バイオ医薬品の開発、承認審査、適正使用に際して、免疫原性の予測・評価は、極めて重要な課題であり、日本でのバイオ医薬品開発が推進されている近年の状況からも、抗薬物抗体評価法の開発と標準化、ならびに免疫原性に関わる品質及び臨床的リスク因子の特定とリスク低減策の構築について、より一層、注力していく必要があると考えております。また、サイトカイン放出症候群等の有害事象の機序解明や評価系構築も重要な課題です。これらの研究と学術年会での発表を通じた情報発信を中心に、微力ではございますが、本学会の発展に少しでも貢献できるよう努力して参りますので、今後ともご指導ご鞭撻賜りますようお願い申し上げます。

新評議員より
評議員就任にあたって

坂入 鉄也
田辺三菱製薬株式会社
創薬本部 安全性研究所



坂入 鉄也先生

このたび日本免疫毒性学会の評議員を拝命いたしました田辺三菱製薬株式会社の坂入鉄也と申します。様々な方面でご活躍されている先生方が集う本学会で評議員を務めさせていただくことは、非常に光栄であり、また、身の引き締まる思いがいたします。拝命に当たり、ご推薦、ご承認を賜りました先生方に厚く御礼申し上げるとともに、本紙面をお借りして皆様にご挨拶させていただきたく存じます。

私は、学生時代、東京大学農学部の獣医病理学研究室にお世話になって以来、現在に至るまで、病理学を基礎とした研究に携わってまいりました。博士論文のテーマとして、マウス肝芽腫の生物学的特性とその由来に関する研究に取り組み、病理学的、免疫組織化学的、分子生物学的手法を用いて、本腫瘍が未分化な細胞に由来する可能性を示してきました。その一方で、勤務先では、非臨床安全性研究に関わる業務として、免疫毒性評価に携わる機会に恵まれ、免疫毒性試験の病理評価や試験責任者業務、免疫毒性評価プランの策定などを担当しながら現在に至っております。毒性試験において、病理検査は免疫系への影響を捉える入口であると同時に、免疫組織化学的手法と組み合わせることで、その標的細胞や毒性発現機序を推定しうる重要なツールであり、免疫毒性評価とは切り離せないものですが、開発候補化合物によって引き起こされる様々な病態を目の当たりにし、それだけでは明らかにできない部分が多いと痛感しております。免疫毒性評価に携わる者として、飛躍的な発展をみせる免疫学に関する知識を貪欲に蓄積し、それを基に免疫毒性研究を進展させる必要があると改めて認識しているところです。

免疫毒性学に直接的に関わる研究業績が乏しく、まだまだ浅学の身である私にとって、非常にハードルの高い課題ですが、研究分野として裾野が広く、興味が尽きない領域ですので、取り組み甲斐があるとも感じております。これからも自分の専門性を生かしつつ、免疫毒性分野の研究の深化に努め、微力ながら、本学会並びに免疫毒性学の発展に尽力をいたす所存でございます。今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。

試験法ワークショップ：
有害性転帰経路(AOP)と免疫毒性

試験法委員会

【はじめに】

JaCVAM(日本動物実験代替法評価センター)からの依頼を受けて、試験法委員会内に企業所属の若手学会員を中心としてAOP(Adverse Outcome Pathway)検討小委員会を設けて、免疫毒性のAOPを開発している。そこで、本年度の学術年会における試験法ワークショップでは、AOPの概念及び免疫毒性AOPについて紹介した。

【AOPの概念とOECDによるAOPプロジェクト】

小島肇先生(国立医薬品食品衛生研究所)によりご講演いただいた。

【AOPの概念】

AOP(Adverse Outcome Pathway)は、日本語では有害性発現経路と呼ばれており、標的分子への作用(Molecular Initiating Event, MIE)から有害事象(Adverse Outcome, AO)の発現に至る経路を、生体の各階層レベルにおけるKey Event(KE)のつながりとして示したものである。KEは、現在の知見に基づき、分子レベル、細胞レベル、組織レベル、臓器レベル、個体レベル、種レベル(環境毒性の場合)のそれぞれの階層において重要な事象を抽出し、KE間の関連性(KE relationship、KER:機序、確かさ、種差の有無を含む)やKE

の測定法及びその妥当性に関する情報を付加したものである。

化学物質は複数の毒性標的分子に作用することが多い。加えて、一群の化学物質により誘発される有害事象に係る AOP は関連する複数の MIE を含む AOP の集合となる。各々の AOP に共通の KE が存在すれば、それ以降の経路は集約され、さらに別の AOP が共通の KE を介して結合してネットワークを形成するケースも想定される。

【OECD AOP プロジェクト】

OECD では、AOP の事例を集積してデータベースを構築し、最終的に行政判断に適用することを目的とした AOP プロ

ジェクトが進行している。AOP の事例は、AOP Wiki (https://aopwiki.org/wiki/index.php/Main_Page) を介して蓄積されており、2016 年 11 月現在で、167 の AOP が登録されている。AOP 開発を通じて、有害事象に関する KE が明確化されることにより、これらのリスクを予測する新たな in silico、in chemico、in vitro 試験法の開発につながることを期待される。さらに、得られた AOP による知見を総合して一般化することにより、有害性リスク予測の総合的アプローチである IATA (Integrated approaches to testing and assessment) を開発し、これらを行政的判断に利用することが OECD による AOP 開発の最終目的となっている。

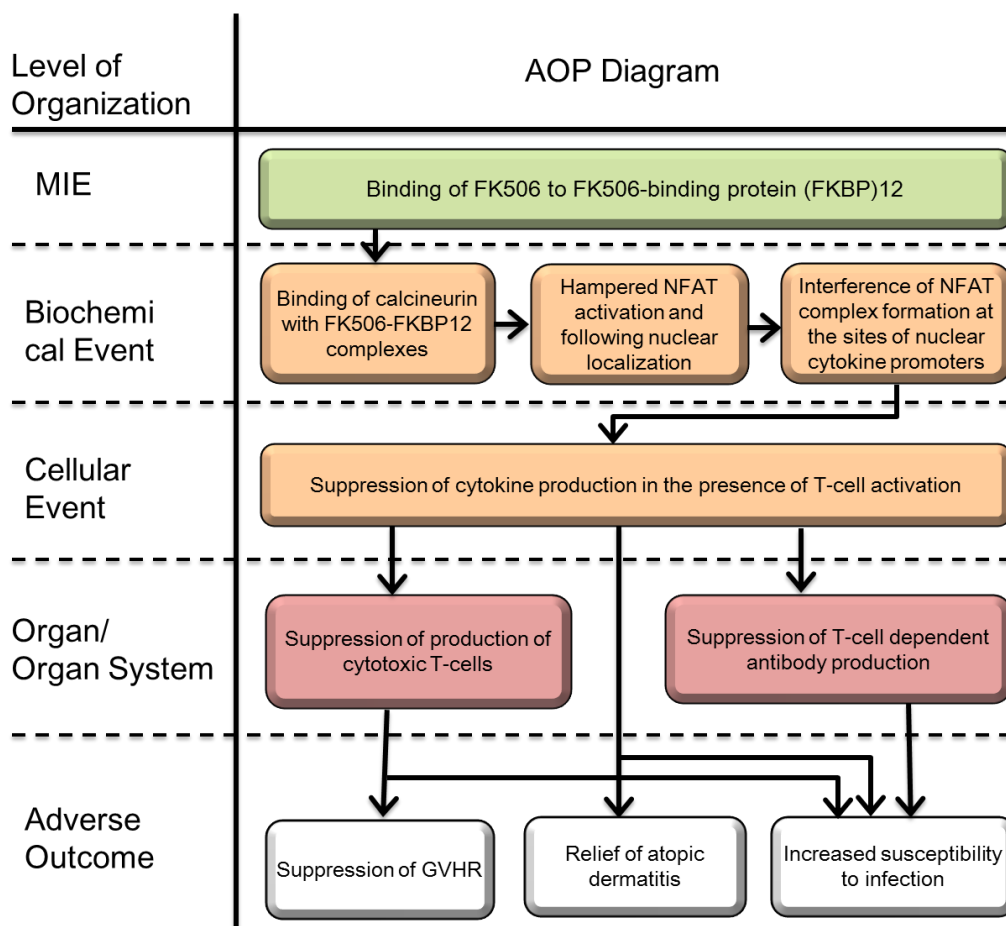


図1 FKBP12-FK506 複合体形成による免疫抑制に関する AOP

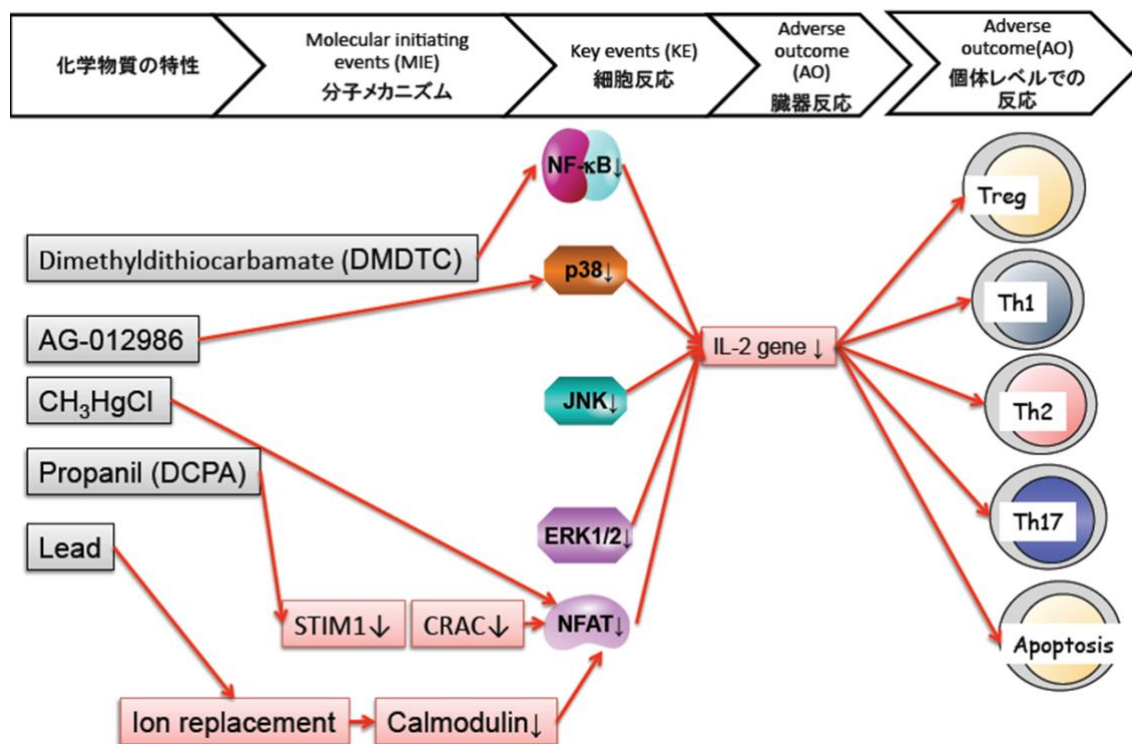


図2 IL-2 転写活性抑制を key event とする T 細胞分化異常誘導に関する AOP

【免疫毒性 AOP】

FKBP12-FK506 複合体形成による免疫抑制に関する AOP

AOP 検討小委員会の成果として、同委員の伊藤志保先生及び串間清司先生から紹介された。

AOP 検討小委員会では、免疫毒性(抑制)の AOP を作成するに当たり、作用機序の異なる数種の免疫抑制物質について AOP 事例を作成し、これらを総合して免疫抑制に関する AOP や IATA を作成することとした。最初の AOP 事例として、カルシニューリン阻害剤である FK506 (タクロリムス) が関わる免疫抑制を選択し、有害性の有無を問わず免疫抑制事象を AO として調査した。具体的には、いくつかの新しい総説論文から FK506 の免疫抑制に関する知見(事象)を網羅的に収集し、これらの事象から、各階層における KE を抽出して KER を評価した。

その結果、多くの免疫担当細胞に FK506 が関与する様々な事象がみられたが、MIE (FK506-binding protein12 (FKBP12) と FK506 の結合) から AO の誘発に至る連続した経路は、T 細胞におけるカルシニューリン抑制とそれに続く転

写因子 NFAT の核内移行阻害によるサイトカイン(Th1 及び Th2 タイプ) 産生抑制を含む経路のみであり、AO として GVHR の抑制、アトピー性皮膚炎の軽減、及び感染抵抗性減弱(易感染性)が挙げられた(図1)。

今後は、OECD による内部レビュー及び外部レビューを経て、本 AOP 事例を更新・確定するとともに、今回の経験に基づいて、他の機序による免疫抑制の AOP 事例を作成してゆく。

IL-2 転写活性抑制を key event とする T 細胞分化異常誘導に関する AOP

木村 裕先生(東北大学大学院医学系研究科皮膚科学分野)から、相場節也先生のグループにより、OECD AOP プロジェクトに提案されている IL-2 転写活性抑制を KE とする T 細胞分化異常誘導に関する AOP についてご紹介いただいた。

本 AOP は、免疫毒性に関する in vitro 試験系である、Multi-immuno Tox Assay (MITA) における、IL-2 転写因子活性測定の根拠とするために開発された。AOP 開発において

は、① dimethyldithiocarbamate(DMDTC)、② AG-012986 (pan-CDK inhibitor)、③ メチル水銀 (CH₃HgCl)、④ Propanil(3,4-dichloropropionanilide)、及び⑤ 鉛について、IL-2 遺伝子発現に及ぼす影響を調査した。その結果、それぞれが IL-2 遺伝子の複数の転写因子を特異的に抑制することにより、IL-2 遺伝子発現を抑制して、各 T 細胞サブセット (Treg, Th1, Th2, Th17) に影響することや apoptosis を誘発する AOP が提案された(図2)。

終わりに

AOP 検討小委員会は、さらに免疫抑制剤による AOP 事例の作成を継続し、最終的には免疫毒性の IATA を目標とし、企業に限らず幅広い分野の若い先生方を中心に実現したい。AOP 作成に興味を持たれた学会員の方は是非ご一報いただくようお願いする。

編集後記

免疫毒性学会学術年会が初の九州進出を果たし、本号にもご寄稿いただいたように試験法委員会には AOP 検討小委員会、学会には将来構想委員会(仮称)が立ち上がり、ますます日本免疫毒性学会の活動は活発になっていると感じます。ImmunoTox Letter 編集委員会も小島 弘幸先生、坂入 鉄也先生に加わっていただきまして、新しい体制でスタートいたしました。先生方のお力をお借りして、より良い紙面を作っていきたいと思えます。

ImmunoTox Letter に関する会員の皆様のご希望やご意見をお寄せいただけますようお願いいたします。2017 年もどうぞよろしくお願いいたします。

(S・T 記)

編集・発行: 日本免疫毒性学会

編集発行責任者: 吉田 貴彦

編集委員会: 黒田 悦史、小島 弘幸、

坂入 鉄也、新藤 智子、

角田 正史、手島 玲子、

西村 泰光、野原 恵子、

姫野誠一郎

原稿送付先: shindo.t@fdsc.co.jp