

論文の内容の要旨

論文題目

「低分子による炎症誘導機構に基づいた *in vitro* 皮膚感作性試験法の開発に関する研究」

氏名 齋藤 和智

序論

皮膚感作性とは、分子量 600 未満の低分子量物質により誘導される湿疹性の皮膚反応であり、該物質が複数回皮膚接触することで生じる免疫反応である。皮膚感作性は、一度成立すると該感作性物質の再接触により繰り返し発症・増悪することから、皮膚感作性の有無を精緻に見極めることが健康被害を防ぐうえで極めて重要となる。化学物質が皮膚感作性を有するか否かを判断する方法として、これまで動物を用いた評価が行われてきた。しかし、動物愛護への関心の高まり、あるいは動物実験を行った化粧品の欧州での販売禁止といった法規制の観点から動物を用いない評価法（代替法）の開発が求められている。動物を用いない皮膚感作性評価の達成に向け、感作誘導の鍵となる過程および生体反応である 4 つのキーイベント（1. 経皮吸収、2. タンパク質との結合、3. 角化細胞の応答、4. 樹状細胞の活性化）に着目した代替法がこれまで複数開発され、それらを組み合わせることで皮膚感作性を高精度に予測する試みがなされている。しかしながら、感作誘導のキーイベントは多岐にわたるため、キーイベントごとの代替法開発およびその組み合わせでは、評価時の労力、コスト、時間が多大にかかるという問題点がある。そこで本研究では、複数のキーイベントを網羅可能な再構築ヒト表皮モデル（Reconstructed human Epidermis model : RhE モデル）の応答、および RhE モデルでは網羅できない樹状細胞の活性化、に着目した 2 つの試験法を新たに開発し、感作メカニズムに立脚した簡便かつ高精度な皮膚感作性評価を目指すこととした。

第 1 章 ヒト樹状細胞様 THP-1 細胞の活性酸素種産生を指標とした新規試験法の開発

近年、感作性物質による樹状細胞の活性化に、reactive oxygen species (ROS) が関与することを示唆する報告がなされている。ROS は感作性物質暴露により短時間で起こることが想定されることから、ROS 産生に着目することで、短時間かつ簡便な試験法が構築できる可能性がある。しかしながら、ROS 産生を皮膚感作性試験法に応用した

例は存在しない。そこで、感作性物質の暴露により樹状細胞様に活性化するヒト単球由来株化細胞 THP-1 細胞を用いて、ROS 産生を指標とした新規試験法 (ROS assay) の構築を目指した。THP-1 細胞に代表的感作性物質 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を暴露した際の ROS 産生を、蛍光物質 CM-H₂DCFDA の酸化を指標にフローサイトメーターで測定した結果、DNFB 暴露後 30 分で有意な ROS 産生が起こることが明らかとなった。さらに、ROS 産生に対する培地中の血清の影響を検討した結果、無血清存在下で強い ROS 産生が起こることがわかった。続いて、THP-1 に対し、代表的な感作性および非感作性物質を無血清下で 30 分間暴露した際の ROS 産生を検証した。その結果、感作性物質では無毒性領域 (細胞生存率が 90% 以上) で有意な ROS 産生が確認された一方、非感作性物質では ROS 産生が認められない、もしくは認められても細胞毒性がある濃度域のみであった。以上の知見から、「被験物質を無血清下で 30 分間暴露した際の、無毒性用量域での ROS 産生」を指標に皮膚感作性の有無を予測できるかを、感作性物質 30 品、非感作性物質 20 品を用いて検証した。その結果、感作性物質 30 品中 25 品で 2 倍以上の ROS 産生を認めた一方、非感作性物質では 4 品しか認められなかった。本結果から、動物試験 local lymph node assay (LLNA) に対する感度 (感作性物質を感作性ありと判定できる割合)、特異度 (非感作性物質を感作性なしと判定できる割合) および一致率は、それぞれ 83% (25/30 品)、80% (16/20 品) および 82% (41/50 品) と良好な値を示した。また、ROS assay で偽陰性 (感作性物質でありながら、ROS assay では“感作性なし”と誤判定) となった物質は、培養細胞系での評価が難しいとされる、難水溶性物質および代謝が必要な感作性物質 (pre/pro-haptens) であった。以上のことから ROS assay は、多くの物質の皮膚感作性の有無を、簡便かつ短時間で予測できる試験法として有用と考えられた。

第 2 章 再構成ヒト表皮モデルを用いた皮膚感作性バイオマーカーの探索および新規試験法の開発

皮膚に暴露された感作性物質は、経皮吸収されたのち、皮膚中タンパク質と結合し、表皮角化細胞の応答 (炎症反応、細胞防御) を誘導する。RhE モデルは、正常表皮角化細胞から構築された、ヒト表皮様構造および機能を持つモデルであり、より生体に近い応答を捉えることが可能である。また、RhE モデルは市販されており、皮膚刺激性試験の公定法で用いられるなど汎用性も高い。以上のことから、RhE モデルを用いることで、感作誘導のキーイベントを反映した、汎用性の高い試験法構築が期待された一方、皮膚感作性を評価するためのバイオマーカーの情報が乏しい。そこで本研究では、RhE モデ

ルを用いた新規試験法 (Epidermal Sensitization Assay: EpiSensA) の開発を目指し、まず皮膚感作性マーカー遺伝子の探索を行った。代表的感作性物質である DNFB および oxazolone (OXA)、ならびに非感作性物質である benzalkonium chloride (BKC) をそれぞれ 6 時間 RhE モデルに暴露した際の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、OXA および DNFB でのみ 1.5 倍以上有意に発現亢進する、感作特異的な遺伝子を 142 個見出した。また、142 遺伝子の特徴的機能を gene ontology (GO) 解析で実施した結果、計 34 の GO term が変動遺伝子との関連性が高い機能として見いだされた。さらに、この 34 の GO term に関連する 64 遺伝子から、定常状態での発現量が大きく、かつ感作性物質での変動量が大きい 5 遺伝子 (activating transcription factor 3; ATF3、DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member4; DNAJB4、glutamate-cysteine ligase, modifier subunit; GCLM、Heat shock 70 kDa protein 6; HSPA6 および heat shock 105 kDa/110 kDa protein 1; HSPH1) をマーカー候補として抽出した。続いて、本 5 遺伝子の感作性予測能を確認すべく、代表的感作性物質 12 品および非感作性物質 4 品を暴露した際の、各遺伝子の発現プロファイルを確認した。その結果、ATF3、DNAJB4、GCLM の 3 遺伝子について、感作特異性が高いことが明らかとなった。以上のことから、RhE モデルでの新規感作性マーカーとして、ATF3、DNAJB4、GCLM が有用である可能性が示唆された。

次に見出したマーカー遺伝子と皮膚感作誘導との関連性を把握すべく、感作誘導時の角化細胞応答 (炎症反応および細胞防御) の制御分子として知られる、ATP 受容体 P2X₇ (炎症反応)、および転写因子 Nrf2 (細胞防御) と、各マーカー遺伝子発現との関連性を検証した。その結果、正常ヒト角化細胞に感作性物質 2,4-dinitrochlorobenzene を暴露した際の ATF3 の発現亢進は P2X₇ アンタゴニスト KN-62 処理で、DNAJB4 および GCLM の発現亢進は Nrf2 siRNA 処理で、それぞれ有意に抑制された。このことから各マーカー遺伝子は、皮膚感作誘導に関与する分子により発現制御を受けることが初めて明らかとなり、各マーカー遺伝子と皮膚感作誘導との関与が示された。

最後に、新規感作マーカーとしての 3 遺伝子に、近年、感作誘導との関連性が報告されているケモカイン IL-8 を加えた計 4 遺伝子について、RhE モデルにおける感作性の予測性能を検証した。難水溶性物質や pre/pro-hapten を含む計 72 物質を評価し、4 遺伝子中 1 遺伝子でも陽性となった場合に感作性ありと判定した結果、LLNA に対する感度、特異度、一致率はそれぞれ 94%、78% および 90% となった。本結果は、OECD テストガイドラインとして近年承認された代替法である Direct Peptide Reactivity Assay および

KeratinoSens™ の予測性（69%および 72%）に比べ優れた結果であった。以上のことから、4 遺伝子の発現変動を指標とする新規試験法 EpiSensA は、感作誘導メカニズムに立脚した高精度の試験法として有用と考えられた。

総括

本研究では、感作性物質暴露後早期に ROS 産生が起これ、条件を最適化することで感作特異的な応答を捉えられることを明らかとした。また、RhE モデルにおける感作性マーカーとして、感作誘導期の角化細胞応答に関わる複数の遺伝子を新たに見出し、皮膚感作性を高精度に評価できることを示した。上記研究成果に基づき、感作誘導の 4 つのキーイベントを反映した試験法として、RhE モデルを用いた EpiSensA（キーイベント 1~3 を反映）および ROS assay（キーイベント 4 を反映）を開発することに成功した。さらに、本研究で得られた知見から、EpiSensA および ROS assay の組み合わせによる評価法の有用性を検討した結果、既存の評価システムに比べ、迅速かつ高精度に皮膚感作の有無を予測できる可能性が示された。以上のことから、今後、評価物質数の拡大や試験法の更なる簡便化および評価精度の向上を行うことで、皮膚感作誘導機構を反映した、簡便、高精度かつ迅速な皮膚感作性評価システムの構築が期待される。