

## 審査の結果の要旨

氏名 齋藤 和智

皮膚感作性とは、低分子量物質が複数回皮膚接触することで生じる免疫応答である。近年、皮膚感作性を有する物質の評価法として、動物愛護への関心あるいは法規制の観点から、動物を用いない代替法の開発が求められている。これまでに、感作誘導の鍵となる4つの生体反応、すなわち①経皮吸収、②タンパク質との結合、③角化細胞の応答、および④樹状細胞の活性化に着目した複数の代替法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、個々の鍵生体反応を模した代替法の組み合わせでは、労力、コスト、時間が多大にかかるという問題点がある。本論文は、4つの鍵生体反応のうち①～③を一度に評価できる再構築ヒト表皮モデル（Reconstructed human Epidermis model：RhEモデル）、および④を評価可能なヒト樹状細胞様 THP-1 細胞に着目し、各々のモデルで皮膚感作性物質に特異的な応答やバイオマーカーを明らかにすることを介して、簡便かつ高精度な皮膚感作性評価手法を新たに構築したものである。

研究背景と目的を述べた序論に続き、第1章では皮膚感作性を有する物質による THP-1 細胞における活性酸素種（ROS）の産生誘導に着目し、皮膚感作性の評価マーカーとしての可能性を検討した。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 産生を解析した結果、DNFB 暴露後 30 分という極めて短時間で有意な ROS 産生が起こることが明らかとなった。続いて、THP-1 細胞に対し、代表的な感作性および非感作性物質各 4 品を暴露した際の ROS 産生を検証した。その結果、感作性物質では無毒性用量域で有意な ROS 産生が確認された一方、非感作性物質では ROS 産生誘導は認められなかった。そこで「被験物質を 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 20 品中 4 品でしか認められないことが明らかとなり、マウス個体を用いた動物試験の結果を 82%（41/50 物質）の一致率という高い精度で予測できることが明らかとなった。以上のことから、THP-1 細胞における ROS 産生が、皮膚感作性の有無を簡便かつ短時間で予測できる

指標として有用であることが示された。

第 2 章ではまず、RhE モデルにおける感作性物質特異的な応答を明らかにすべく、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、それぞれ市販の RhE モデルに 6 時間暴露し、この時の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析した。その結果、対照群の 1.5 倍以上の発現を基準として、OXA および DNFB 添加の両者に共通して有意な発現亢進を認め、BKC で発現亢進が認められなかった、感作性特異的な遺伝子が 142 個新たに見出された。続いて、このうち感作性物質で 5 倍以上発現亢進した 5 遺伝子に着目し、感作性物質 12 品および非感作性物質 4 品を暴露した際の発現プロファイルを確認した。その結果、activating transcription factor (ATF3)、DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member4 (DNAJB4) および glutamate-cysteine ligase, modifier subunit (GCLM) の 3 遺伝子が皮膚感作特異性が高いことが示された。ATF3 の発現亢進は、感作誘導時の角化細胞応答制御分子として知られる ATP 受容体 P2X<sub>7</sub> のアンタゴニスト処理で抑制され、また DNAJB4 および GCLM の発現は転写因子 Nrf2 の siRNA による遺伝子発現阻害により抑制されたことから、これらの因子による発現制御を受けることが明らかとなった。これら新規感作マーカー遺伝子に加え、感作誘導との関与が示唆されるケモカイン IL-8 を加えた計 4 遺伝子について、RhE モデルにおける皮膚感作予測性能を検証した。その結果、動物試験の結果を 90% (65/72 物質) という極めて高い精度で予測できることが明らかとなった。以上のことから、4 遺伝子の発現変動を指標に、RhE モデルを用いて皮膚感作性を高精度に予測できることが明らかとなった。

以上、本論文は、2つの評価系において皮膚感作性を捉える新たな生体応答を明らかにし、その知見を元に迅速かつ高精度な新規皮膚感作性評価法を構築したものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。