

ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会: The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 26 No.1 (通巻 51 号) 2021 6 月

— 目次 —

第 28 回日本免疫毒性学会学術年会(予告 2) …1
岡山理科大学 手島 玲子
第 10 回(2020 年度)日本免疫毒性学会学会賞 …3
元中外製薬株式会社 井上 智彰
第 10 回(2020 年度)日本免疫毒性学会奨励賞 …7
千葉大学大学院 青木 重樹
第 10 回(2020 年度)日本免疫毒性学会奨励賞…11
東京慈恵会医科大学 木戸 尊將
シリーズ「免疫毒性研究の若い力」23…………… 14
大阪大学大学院 立花 雅史
黒岩幸雄先生を偲んで ……………… 16
旭川医科大学 吉田 貴彦
ImmunoTox Letter Digest ……………… 19

第 28 回日本免疫毒性学会学術年会 (JSIT2021)(予告 2)

日本免疫毒性学会の第 28 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。多数の皆様のご参加をお待ちしております。詳しくは学術年会ホームページ(<http://www.jsit2021.jp>)をご覧ください。

期 日：2021 年 9 月 6 日(月)～7 日(火)

会 場：Web 開催 (2021 年 6 月 7 日決定)

テ ー マ：自然免疫と獲得免疫のかかわりと
免疫毒性

年 会 長：手島玲子

岡山理科大学獣医学部
食品衛生講座教授

事 務 局：第 28 回日本免疫毒性学会学術年会
事務局

〒794-8555 愛媛県今治市いこいの丘 1-3
岡山理科大学獣医学部食品衛生講座
電話 0898-52-9199, Fax 0898-52-9022

演題・参加登録問い合わせ先：

株式会社 コームラ
〒501-2517 岐阜県岐阜市三輪
ぷりんとぴあ 3
電話 058-229-5858, FAX 058-229-6001
E-mail: 28th-info@jsit2021.jp
大会ホームページ: <http://www.jsit2021.jp>

演題募集締め切り日：

2021 年 7 月 9 日(金)(予定)

事前参加申し込み締め切り日：

2021 年 7 月 23 日(金)(予定)

参 加 費：一般会員：事前登録 7,000 円(当日
9,000 円)

学生会員：事前登録 3,000 円(当日 5,000 円)

非 会 員：事前登録 9,000 円(当日 11,000 円)

その他、新会員、協賛・後援学会会員割引
がありますので詳しくは学術年会ホーム
ページをご覧ください。

<大会の主な内容>

■特別講演

1. 樹状細胞を利用した新しい免疫療法
藤井真一郎先生
(理化学研究所生命医科学研究センター
免疫細胞治療研究チーム)
2. Immunogenicity-related toxicity
Dr. Jeanine Bussiere
(Scientific Executive Director of Toxicology,
Amgen com.)

■シンポジウム

「種々のワクチンの開発状況とその安全性評価について」

1. MicroRNA とワクチン接種時の炎症
押海裕之先生
(熊本大学大学院生命科学研究部免疫学講座
教授)
2. 経鼻ワクチンの安全性
幸義和先生
(株)HanaVax 取締役 最高技術責任者)
3. ヒト化マウスを用いるワクチンの安全性評価法
佐々木永太先生
(国立感染症研究所血液・安全性研究部)

■教育講演

1. 進化から見たアレルギー疾患の意義
(自然リンパ球(ILC-2)の役割も含めて)
松本健治先生
(国立成育医療センター研究所
免疫アレルギー・感染研究部)
2. 新型コロナワクチンについて
吉川泰弘先生
(岡山理科大学獣医学部学部長)

■学会賞受賞講演

ダイオキシンの免疫毒性作用とそのメカニズム
野原恵子先生
(国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター)

■学会奨励賞受賞講演

骨髄由来免疫抑制細胞を介した免疫毒性発現に
関する研究
立花雅史先生
(大阪大学大学院薬学研究科 附属創薬センター
ワクチン・免疫制御学プロジェクト)

■試験法ワークショップ

「*In vitro* 免疫毒性試験法の開発とガイダンス化に
向けて」

1. Multi-ImmunoToxicity Assay とガイダンス化状況
相場節也先生
(東北大学病院皮膚科)
2. 皮膚感作性試験 (ADRA 試験)の開発
藤田正晴先生
(富士フィルム安全性評価センター)
3. 皮膚感作性 -IATA に基づくガイダンス
足利太可雄先生
(国立医薬品食品衛生研究所)

■一般演題(口演、ポスター)

口頭、ポスター両方の発表をうけつけ、学生・若手発表
の部門も従来通り設ける予定です。なお、ポスターは、
web 開催サイトに掲示して配信し、口頭発表はライブ配
信の予定です。

■賞

年会において優秀な一般演題を発表者に対し、年
会賞並びに学生・若手優秀発表賞を贈呈する予定で
す。

第 10 回(2020 年度)日本免疫毒性学会学会賞

医薬品の *in vivo* 免疫毒性を予測するための新規 *in vitro* 評価系の研究

井上智彰 (元中外製薬株式会社)

研究の経緯

筆者は、Roche および中外製薬に在籍中、一貫して医薬品候補化合物の非臨床毒性評価に従事した。製薬企業での研究では、短い期間で毒性評価などの課題に対して結論を出すことが要求され、次々と新たな医薬品候補化合物に特化した研究課題に移っていく。このような中で、様々な化合物の毒性を評価する毎に毒性評価法に関する知見が蓄積し、特に動物福祉の 3Rs などの観点や短期間で多くの化合物の評価にメリットがある *in vitro* 評価系を充実させてきた。特に免疫系に関しては、学術研究においても免疫系細胞の培養系が用いられることが多く、*in vitro* で免疫機能の評価する系もある程度確立していることが他の臓器毒性に比較して有利である。実験動物ではリンパ節や脾臓などの各免疫臓器から細胞を分離して使用してきたが、ヒトでは免疫系初代培養細胞としては末梢血を主に用いてきた。末梢血は、他の臓器の初代培養細胞に比較して採取が非侵襲的で入手が比較的容易である。近年は、ヒト iPS 細胞から分化誘導した免疫系細胞を用いた *in vitro* 評価系の研究に従事した。

免疫毒性評価に用いる細胞

免疫毒性の *in vitro* 評価に用いる細胞の種類とそれらの特徴を Table 1 にまとめた。

Table 1. Application of Cell Culture Systems in Immunotoxicology

Cells	Examples	Culture methods	Cellular functions	Ethics in human cells
Cell lines	THP-1, Jurkat	Simple	Low	IC available
Mature cells isolated from tissues	PBMCs, splenocytes, mast cells	Simple (Some complicated isolation)	High (decline during culture)	IC, anonymization required
Stem cells isolated from tissues	Hematopoietic stem cells, bone marrow cells,	Complicated	Differentiation to functional cells, required	IC, anonymization required
Stem cells isolated from fertilized eggs	Embryonic stem (ES) cells	Complicated differentiation methods	Differentiation to functional cells, required	Highly difficult (fertilized eggs)
Stem cells made from adult cells	Induced pluripotent stem (iPS) cells	Complicated differentiation methods	Differentiation to functional cells, required	IC, anonymization required

細胞株は入手、培養が容易で均一であるが、細胞の機能は初代培養に比較して低く、評価対象の機能が *in vivo* 予測に使えるかどうか検証して使用することが必要である。初代培養細胞はよく用いられるが、細胞によっては分離の難度が高く、ヒトでは個体差を考慮することや倫理的対応が必要である。また、長期間の培養では細胞機能が維持できない場合も多く、機能を維持するための培養様式を工夫する必要がある。幹細胞は免疫系細胞に分化誘導して使用することが考えられる。近年はヒト ES 細胞に加えて倫理的ハードルが低いヒト iPS 細胞から各種免疫系細胞が分化誘導されている。未分化 iPS 細胞は多分化能を保ったまま増殖させることができることから、同じドナーからの細胞を大量に得ることができることがメリットである。分化誘導法は難度が高い場合が多いが、分化誘導法を確立した後は、均一な機能を持った免疫細胞を繰り返し得ることができる。

ヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞を用いた評価系

筆者らは、ヒト iPS 細胞から樹状細胞やマスト細胞の分化誘導について独自の研究で実現し、それらの分化細胞を用いた *in vitro* 免疫毒性評価への応用の可能性について、特許出願や論文発表による情報発信を行った。ヒト iPS 細胞由来樹状細胞では、抗原提示される peptides 配列を HLA タイプ毎に検出する系を確立し、タンパク質の免疫原性の原因となる配列 (T 細胞エピートープ) を特定できることを証明した (PCT WO2016010002A1)。ヒト iPS 細胞由来マスト細胞では、FcεR や CD117 などのマスト細胞マーカーの発現を確認し、IgE レセプターの架橋による活性化および脱顆粒が従来から報告されている組織から分離したマスト細胞と同等以上に敏感に起こることを証明した (J Toxicol Sci, 44(11), 789, 2019)。これらのヒト iPS 細胞由来細胞は、均一な機能を持った細胞が繰り返し試験に供することができる点で、今後継続して試験法開発が期待される。一般的に、ヒト iPS 細胞から分化誘導した細胞の機能は胎児期や新生児の細胞に近い場合が多く、成体の細胞と同等の特定の機能を発現していたとしても、すべての機能が十分に発現していないことが多い。したがって、評価が必要な特定の機能発現が確認された場合は、その機能については *in vitro* 評価系として使用可能であるが、その他の機能についてはそれぞれ発現を確認しなければそれらの評価には使用できない。

In vivo 毒性を予測する in vitro 評価系

In vitro 評価系の目的は、*in vivo* 毒性を予測することであるが、実験動物とヒトの種差を考慮する必要がある。最終的には臨床での安全性を予測する必要があるので、ヒト細胞を用いた *in vitro* 評価系が有用であるが、ヒトでの臨床安全性が判明していない状況では *in vitro* の結果から *in vivo* 毒性の予測性が不明である。低分子医薬品の場合は、実験動物を用いた毒性試験で *in vitro* -*in vivo* 相関を確認し、同等のヒト *in vitro* 評価系を確立する必要がある。しかし、バイオ医薬品などの場合は種特異性が高く、げっ歯類などの実験動物では薬理作用が認められない場合も多い。このような場合は、初めからヒト細胞を用い免疫系細胞への直接作用を *in vitro* 系で確認することになるが、対照医薬品として被験医薬品と類似の作用メカニズムを示す既に市販され

ている医薬品を用い（免疫原性の評価では、薬理作用は異なっても臨床で免疫原性が報告されている医薬品を対照医薬品として用いる）、*in vitro* 系を確立することが考えられる。既存医薬品が無い新規メカニズムによるヒト特異的な医薬品を開発する場合は、既存のヒト細胞を用いた *in vitro* 系のみで評価することは難しく、ヒト *in vivo* 作用を予測できる新規 *in vitro* 評価法を検討する必要がある。今後、*in vivo* 作用を再現できることが証明された臓器や免疫系としての多くの機能を発現した高次の *microphysiological system* などの開発を期待する。

獲得免疫の *in vitro* での再現

獲得免疫を *in vitro* で再現することは *in vivo* に免疫するより難しく、*in vivo* で行われているような抗原提示細胞、T 細胞、B 細胞の細胞間の情報伝達が効率的に行われる培養系と獲得免疫を検出する方法を確立する必要がある。Table 2 に獲得免疫を *in vitro* で構成するために用いる細胞について記載した。末梢血は獲得免疫に必要な細胞を含んでおり採取も容易であるが、末梢血中での細胞増殖を伴う免疫誘導を行うような反応は抑制されている。CD8⁺ T 細胞などの抑制的な細胞を除く方法などが行われているが、それでも免疫反応は弱く、効率的に活性化した細胞を検出する工夫が必要である。リンパ節や脾臓は獲得免疫反応を行う臓器なので、これらの臓器から分離した細胞は *in vitro* で獲得免疫を再現する培養系に向いている。しかしながら、実験動物に限られ、ヒトでは使用できない。将来的には、同一ドナーのヒト iPS 細胞から分化誘導した各免疫担当細胞を用いてリンパ節のような効率的に獲得免疫反応を誘導できる系の開発が待たれるが、現時点では T 細胞の胸腺での自己・非自己の教育など課題は多い。また、リンパ節や脾臓のような *in vivo* に近い効率的な免疫誘導ができる *in vitro* 系の確立を期待する。

Table 2. Selection of Cell Sources for Acquired Immune Responses

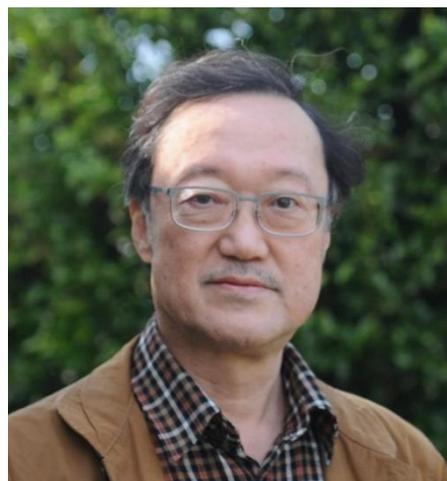
-
- Peripheral blood cells; APCs + T-cells + B-cells (+ Gr.)
 - Easy to obtain, especially in humans
 - Difficult to induce immune reactions
 - Need suppressor cell (CD8⁺) inactivation
 - Need detection of rare reactive cells
 - Splenocytes, LN cells; APCs + T-cells + B-cells
 - Difficult to obtain in humans
 - Possible to induce immune reactions to particles
 - Low immune reactions to soluble factors
 - Antibody response: KLH < SRBC (approx. 1:100)
 - (ImmunoTox Letter 2(2), 1997, Inoue T)
 - Human iPS cell-derived cells; any cell types
 - Separate differentiation in each cell types
 - Immature differentiation methodology
-

まとめ

低分子医薬品の免疫系を含む毒性評価については、基本的には実験動物における *in vivo* 毒性試験を行い、毒性が認められた場合は必要に応じて *in vitro* 系で候補化合物の絞り込みやヒトとの種差を検証する。その場合、評価に使用する *in vitro* 系が *in vivo* 毒性を反映しているかどうか確認しておく必要がある。ヒト特異的に薬理作用を示すバイオ医薬品などの毒性評価では、主にヒト末梢血を用いたヒト *in vitro* 系での評価を行うが、既存の対照医薬品で *in vivo* 毒性を反映しているかどうかを確認しておく必要がある。将来的には、ヒト細胞としてはヒト iPS 細胞から分化誘導した機能を持った細胞、培養様式としては免疫系を含む臓器全体の機能を保持した系を開発する必要がある。

謝辞

中外製薬、Roche (Kamakura, Basel, Nutley, Welwyn, Palo Alto) で共同研究および科学的議論をいただいた方々、Roche における最先端の科学を追求し、ノーベル賞受賞者を多数醸成した社内風土に感謝いたします。



井上智彰先生

第 10 回 (2020 年度) 日本免疫毒性学会奨励賞

HLA 遺伝子導入マウスを用いた特異体質薬物毒性研究

青木重樹 (千葉大学大学院薬学研究院 生物製剤学研究室)

この度は、2020 年度日本免疫毒性学会奨励賞を賜り、ご推薦頂いた大阪大学の吉岡靖雄先生、ならびに選考委員の先生方に心より御礼申し上げます。

私がこの研究を始めたのは 2014 年に入ってからで、データも不十分な中、2016 年の第 23 回学術年会で当研究室の学生 2 名によって発表させていただいたのが、この学会との最初のご縁です。私は 2013 年の 3 月に大学院を修了するまで骨代謝の研究に従事しており、免疫毒性には全くの素人として参加させていただきました。そして、やや無理があったようにも思いますが、発表した学生 2 名に学生・若手優秀発表賞を賜りまして、今さらながら御礼申し上げます。以降毎年参加・発表させていただいており、皆様から貴重なご助言等ありましたおかげで、本奨励賞に至りました。

さて、受賞課題であります「HLA 遺伝子導入マウスを用いた特異体質薬物毒性研究」について簡単に説明させていただきます。医薬品による副作用には、特定の遺伝子・環境の違いによって現れる個人差が存在し、中には死亡例も報告されています。それらの副作用を特異体質薬物毒性 (idiosyncratic drug toxicity; IDT) といい、医薬品の開発段階で見出すことは極めて困難で、市販後に臨床で広く使用されて明らかとなるのが大きな問題です。近年のゲノムワイド関連解析から、IDT の発症とヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) 多型との関連が示唆されてきました。HLA は他の脊椎動物に認められる主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) に相当するもので、非常にバリエーションに富んでおり、免疫的に自己と非自己を区別する分子として機能しています。一方で、特定の HLA は薬物と相互作用することがあり、それが異常な免疫反応を惹起すると考えられています。その最も代表的な例が、HLA-B*57:01 と抗 HIV 薬アバカビルとの関連であり、この多型を保有していることでアバカビルによる過敏症発症のオッズ比が 900 倍以上高まることが示唆されています。その他にも、HLA-B*15:02 と抗てんかん薬カルバマゼピンによるスティーブンスジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syndrome, SJS) /中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrolysis, TEN) や、HLA-B*58:01 と高尿酸血症治療薬アロプリノールによる SJS/TEN も、HLA の関与した重篤な薬物副作用として看過できません。

IDT の発症リスクを考えるうえで、HLA 多型の重要性は認識されていますが、どのようなメカニズムでそれらの副作用が発症するのかは十分に解明されていませんでした。そこで我々は、HLA 依存的な薬物性の免疫応答を評価可能なモデルが存在しないことが問題だと考え、適切な遺伝子導入マウスを作出することでメカニズム解明への突破口を開こうと研究を開始しました。ここでは、研究が進んでいる HLA-B*57:01 とアバカビルの組み合わせに絞って述べます。

HLA 遺伝子導入マウスの作出に際して注意すべきは、単に HLA を導入するだけではマウス体内でその機能が十分に発揮されないことです。HLA-B*57:01 はクラス I タイプの HLA で、 α 鎖と β_2 -microglobulin (β_2m) のヘテロ二量体として発現し、そこに提示されたペプチドは CD8⁺T 細胞が認識します。その α 鎖の一部 (α_3 ドメイン) はマウス CD8⁺T 細胞による認識に重要な領域であり、そこをマウス型に置換することで、マウス体内で HLA が免疫的に機能発揮することが可能となります。つまり、ヒトマウスキメラ型 HLA を導入することがポイントです。さらに、導入した HLA をマウスの細胞表面上で安定的に発現させるために、ヒトの β_2m を導入する必要があります。そこで、キメラ型 HLA とヒトの β_2m を、細胞内のエンドペプチダーゼによって切断されるポリシストロン配列 (2A peptide 配列) でつなぎ、HLA と β_2m タンパク質を等量発現させられるように遺伝子導入ベクターを構築しました。

このキメラ型 HLA 遺伝子導入マウス (以下、HLA-Tg と表します) は、全身で HLA を発現していることが確認でき、早速アバカビルによる免疫応答の再現が可能か検証しました。まず行ったのが、簡便に評価可能な局所リンパ節増殖試験 (Local Lymph Node Assay; LLNA) です。HLA-Tg の右耳に 3 日間連続でアバカビルを曝露し、最終投与の 2 日後にプロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与しました。その 24 時間後に耳介リンパ節を摘出し、未処置の左耳由来のそれと比較したところ、リンパ節の重量やリンパ球中の BrdU 取り込みの割合が有意に上昇していることが明らかとなりました。そのような変化は同腹仔や陰性対照として作出した HLA-B*57:03 の Tg では認められませんでした。さらに、BrdU 取り込みが亢進したリンパ球のサブセットを調べたところ、CD8⁺T 細胞については HLA-B*57:01-Tg でアバカビルの曝露時に有意に上昇していることが認められました。また、それらの CD8⁺T 細胞において、Th1 型サイトカインである IL-2 や IFN- γ の発現が亢進している様子も観察されました。よって、HLA-Tg を用いることで、ヒトで起こる免疫応答の再現ができる可能性が示唆されました。

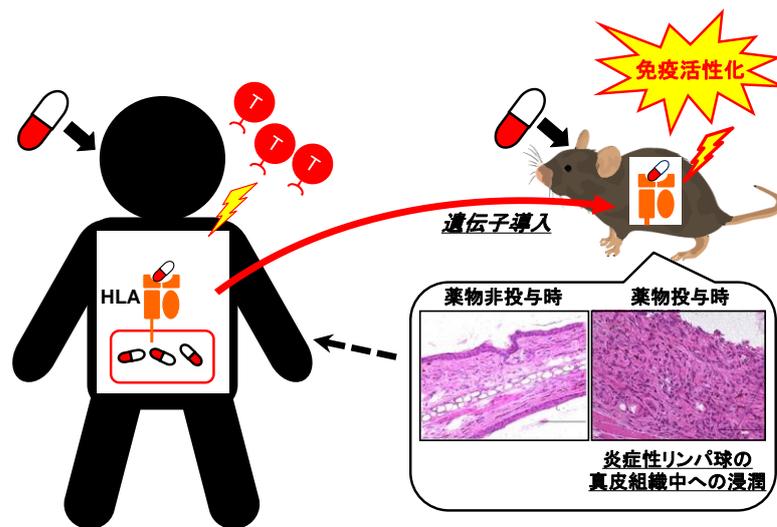


図 HLA 遺伝子導入マウスによる特異体質薬物毒性の再現

HLA を介したアバカビルによる免疫応答に関するマウスモデルは我々が世界に先駆けて報告しましたが、その数ヶ月後に NIH のグループも HLA-B*57:01-Tg モデルを発表し、アバカビルによる CD8⁺T 細胞の活性化に代表される顕著な免疫反応の惹起に成功しています。この研究から我々の作製したモデルの妥当性が担保されましたが、加えて、HLA-Tg を用いた毒性研究が世界的に行われつつあることが伺われます。

次に、特定の HLA 多型を有しているからといって、必ずしも薬物副作用を発症するわけではない点も考慮しなければなりません。実際に、アバカビルによる過敏症の発症頻度は HLA-B*57:01 保有の患者の約半数程度であることが報告されています。つまり、原因となる HLA を有しているにもかかわらず薬物副作用が生じない何かしらの機構があることが示唆されます。我々が構築した HLA-B*57:01-Tg に継続的にアバカビルを経口投与しても、顕著な炎症様症状は認められませんでした（エフェクターメモリー T 細胞の割合は増加していたので、免疫の活性化が起きていたことは確かですが）。そこで着目したのが、抑制性免疫です。副作用を発症する患者ではこの抑制性免疫によるブレーキが正常に機能しなくなることで、免疫の暴走が起こるのではないかと考えました。抑制性免疫には、免疫チェックポイント分子としてはたらく PD-1 や制御性 T 細胞 (T_{reg}) の関与などが考えられます。よって、HLA-Tg において抑制性免疫を排除することで、顕著に薬物毒性が認められることを期待して検討しました。HLA-B*57:01-Tg と PD-1 ノックアウトマウスを掛け合わせ、さらに抗体を用いて T_{reg} を含む CD4⁺ T 細胞の除去を行いました。すると、アバカビルの一週間の経口投与によって発赤を含む顕著な炎症様症状が認められ、リンパ節中の Perforin や Granzyme 陽性の CD8⁺ T 細胞数が大幅に増加していることが明らかとなりました。よって、抑制性免疫が HLA 依存的な薬物毒性発症のブレーキとして機能していることが示唆されました。近年、抗 PD-1 抗体であるペムブロリズマブによる重篤な皮膚反応が報告されたことから、薬物副作用を考えるうえで抑制性免疫も視野に入れることが重要だと考えています。

HLA-Tg を用いることによって、HLA 依存的な薬物反応が認められることが分かりました。またそこから、抑制性免疫といった HLA 以外の要因を考慮する必要性も見出されました。さらなる疑問点として、HLA 依存的な薬物副作用は SJS や TEN に代表されるように、皮膚組織を中心に発症するのはなぜかということが挙げられます。その点について現在、皮膚組織やケラチノサイトを用いた検討を進めており、結果がまとまり次第報告したいと思います。まだ多くの課題が残されていますが、HLA-Tg を用いた毒性評価が可能となったことから、発症機序が浮き彫りになるのもそれほど遠い未来ではないはずであり、その成果が副作用の抑制につながることを期待しています。

最後になりますが、本研究を実施するにあたりご指導を賜りました千葉大学大学院薬学研究院の伊藤晃成先生に深く感謝するとともに、研究を遂行してくださった当研究室学生（卒業生）の皆様にも深く御礼申し上げます。また、本研究内容に対して多くの有益な助言を賜りました第一三共株式会社の研究員の皆様にも心より感謝いたします。また、学会等で貴重なご意見等賜りました日本免疫毒性学会の諸先生方に御礼申し上げますとともに、今後とも指導ご鞭撻を賜りますよう、よろしくお願いいたします。



青木重樹先生

第 10 回 (2020 年度) 日本免疫毒性学会奨励賞

2020 年度日本免疫毒性学会奨励賞を受賞して

木戸尊将 (東京慈恵会医科大学 環境保健医学講座)

この度は、日本免疫毒性学会奨励賞という名誉ある賞を頂き、誠にありがとうございます。審査委員の先生方を始め、関係する皆様に厚く御礼を申し上げます。これからも本学会を通じて、諸先生方にご指導を仰ぎながら、免疫毒性学の発展に貢献できるように努めてまいりたい所存です。

私は北里大学医学部衛生学・公衆衛生学研究室の大学院生の頃に角田正史先生(現・防衛医科大学 教授)に連れられて初めて本学会に参加しました。その後、東京慈恵会医科大学環境保健医学講座の柳澤裕之先生(現・東京慈恵会医科大学 副学長)の下に異動し、9 年間、必須微量元素「亜鉛(Zn)」と免疫機能に関する研究を遂行して参りました。本奨励賞についても「亜鉛欠乏症に起因する免疫機能低下に関する研究」における功績を認めていただきました。

亜鉛は生体に必要不可欠な必須微量元素です。ところが、現代日本人は亜鉛摂取量が不足しており、亜鉛欠乏に起因する免疫異常、特に炎症反応の増強が懸念されます。しかし、炎症反応を増強させる詳細な機序は明らかにされていませんでした。そこで、私はヘルパーT 細胞(Th)とマクロファージサブタイプ(M1 ; 炎症型と M2 ; 抗炎症型)との関係に着目して研究を実施しました。

Experimental I

亜鉛欠乏食を 6 週間摂取させたラットを作製し、二次リンパ器官である脾臓をターゲットに免疫担当細胞の解析を行いました。その結果、M1 マクロファージから産生される炎症性サイトカイン(IL-1 β , TNF- α , IL-6) とケモカイン(MCP-1, MIP-1 α)の発現が増加し、対照的に抗炎症型 M2 マクロファージ数が減少していたことから、亜鉛欠乏では炎症反応を抑制する M2 マクロファージが抑制されることが示唆されました。そこで、M2 マクロファージの分化の要である Th2 細胞に着目して解析しました。その結果、Th2 細胞数および IL-4/IL-13 の mRNA 発現が共に減少し、Th2 細胞の転写因子 GATA-3(Zn フィンガー構造)のタンパクレベルも低下していました。つまり、Th2 細胞数および IL-4/IL-13 が減少することで、M0 マクロファージから M2 マクロファージへの誘導が抑制されることが明らかになりました。

以上をまとめると、亜鉛欠乏食を 6 週間摂取することで、血清中の亜鉛濃度が減少し、Zn フィンガータンパクで Th2 細胞の転写因子 GATA-3 の発現が低下しました。これにより、Th2 細胞数並びに産生される IL-4/IL-13 が低下し、M0 マクロファージは M2 マクロファージへの分化が抑制されました。この結果、細菌感染や活性酸素による炎症を抑制できず、亜鉛欠乏症において炎症反応が生じることが示唆されました。

Experimental II

前述の機序で炎症反応が生じると仮定した場合、その起点は IL-4 の減少と Zn フィンガータンパクの GATA-3 の減少であると考えられます。そこで、亜鉛欠乏ラットに IL-4 投与または亜鉛補給により炎症反応が抑制/改善するかどうかを検討しました。

亜鉛欠乏食と共に IL-4 投与を施したラットでは、M2 マクロファージ、IL-4 mRNA 発現、IL-4/IL-13 陽性細胞の数、炎症性サイトカイン/ケモカインの発現は標準食ラットと同程度であり、M2 マクロファージ数の増加に伴い、炎症性サイトカイン/ケモカインが抑制されました。Th2 細胞の転写因子 GATA-3 のタンパク発現は亜鉛欠乏ラットと同レベルであったことから、IL-4 投与のみでは、血清中亜鉛は低い状態であり、GATA-3 発現は上昇しなかったと考えられました。以上をまとめると、亜鉛欠乏ラットに IL-4 投与を行うことで Th2 細胞(GATA-3)を介さずに、M2 マクロファージ数が増加し、亜鉛欠乏に起因する炎症反応が抑制されたことが示唆されました。

亜鉛欠乏食を 6 週間摂取させた後に標準食で 4 週間飼育したラット(亜鉛補充ラット)では、血清中の亜鉛と銅のバランスが改善し、M2 マクロファージ、IL-4 mRNA 発現、IL-4/IL-13 陽性細胞数、GATA-3 のタンパク発現は標準食ラットと同程度まで改善し、炎症性サイトカイン/ケモカインも減少しました。つまり、亜鉛補充を施すことで血清中亜鉛が回復し、GATA-3 のタンパク発現も増加し、その結果、Th2 細胞数および IL-4 産生に伴い、M2 マクロファージの数が増加したことで、炎症反応が改善することが明らかになりました。

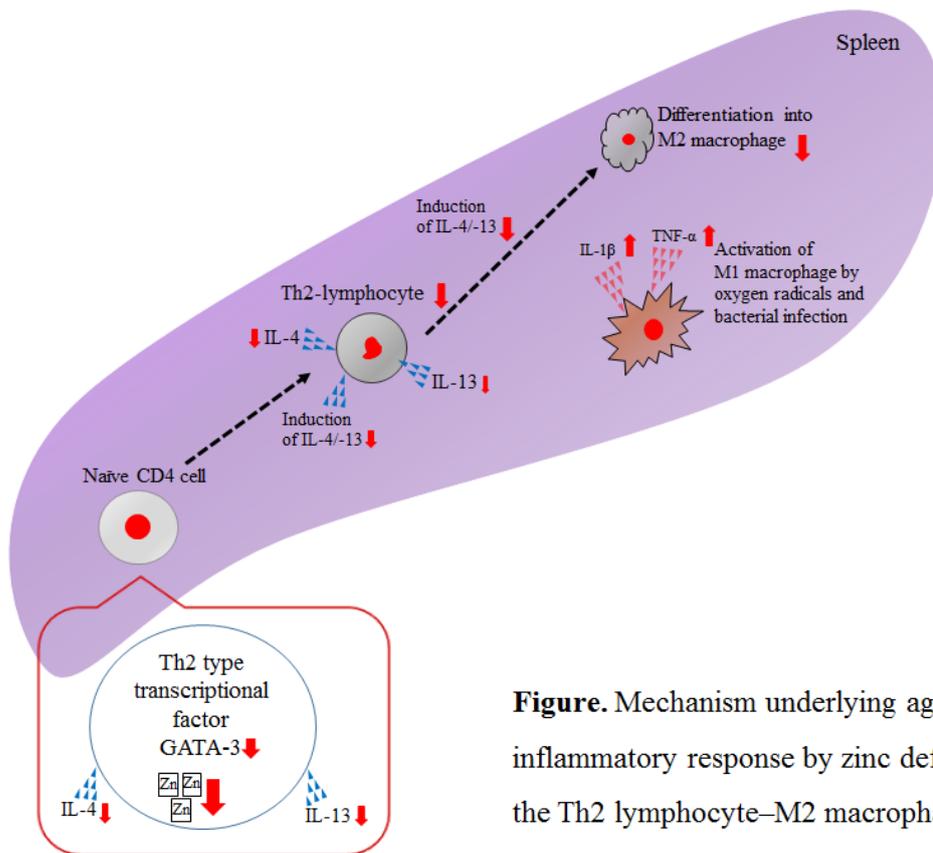


Figure. Mechanism underlying aggravation of inflammatory response by zinc deficiency via the Th2 lymphocyte–M2 macrophage pathway.

以上、簡単ではございますが、受賞研究の概要を紹介いたしました。現在は、「亜鉛欠乏症の胸腺萎縮(脂肪変性)に対する IL-4 投与または亜鉛補充の効果」、「亜鉛欠乏症に起因する腸管免疫機構—バクテリアトランスロケーションに起因した炎症惹起の解明」という新たなテーマに取り組んでおります。本学会で先生方からご助言/ご指摘を頂ける日を楽しみにしております。

最後になりますが、本奨励賞への推薦ならびご指導を賜りました柳澤裕之先生ならびに講座員の皆様にこの場を借りて厚く御礼を申し上げます。



木戸尊将先生

シリーズ「免疫毒性研究の若い力」23

パルミチン酸が骨髄由来免疫抑制細胞に及ぼす免疫毒性作用

立花雅史

(大阪大学大学院薬学研究科 附属創薬センター
ワクチン・免疫制御学プロジェクト)

この度は日本免疫毒性学会 ImmunoTox Letter への執筆の貴重な機会をいただきましたこと、心より感謝申し上げます。私は現在、大阪大学大学院薬学研究科にて骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cell; MDSC) を対象とした免疫毒性学研究を推進しております。出身研究室の先輩である吉岡靖雄先生から第 24 回学術年会 (@十和田) へお誘いいただき、それ以来年会には毎年参加させていただいております。前回のコロナ禍のオンライン学会においても PC ディスプレイ越しに熱気が伝わってくるほど議論が非常に活発な学会で、居心地よく感じております。

私は、2002 年に大阪大学薬学部を卒業し、横浜市立大学および理化学研究所にて研鑽を積み、大阪大学に着任してからは 11 年目になります。この間、様々な研究に従事してきましたが、一貫して免疫学研究を行っており、現在は大阪大学着任後に立ち上げた MDSC 研究に焦点を絞って研究を進めています。本学会へ誘っていただいたのをきっかけに、「担がん生体における免疫毒性」に着目し、「担がん生体において栄養素が毒性を発揮するか否か」を明らかにすべく研究を推進しております。

近年、新たながん治療戦略として免疫抑制反応を阻害する「免疫チェックポイント阻害療法」が、がん治療において劇的な効果を発揮することが報告されてきており、注目を集めています。しかしながら、抗 PD-1 抗体により治療効果が得られる患者は 20%から 30%程度であるとの報告もあり、高額な医療費も問題になっていることから、適切なバイオマーカーの探索や併用療法などの開発が急務となっています。特に、新たな免疫抑制分子の探索は精力的に行われています。中でも、MDSC はがんや炎症病態下で出現する骨髄系細胞で、マウスにおいては CD11b および Gr-1 を共発現し、かつ T 細胞増殖抑制能を有することで定義される不均一な細胞集団です。がん病態においては抗がん免疫応答を抑制していることから、免疫チェックポイント細胞と呼べる細胞と言えます。担がんマウスにおいて、MDSC の除去によりがんの退縮が認められることから、MDSC を標的とした治療法は効果的ながん免疫療法となると期待されています。また、抗 PD-1 抗体に治療抵抗性を示す患者生体内では MDSC が多く存在しているとの報告がなされていることから、MDSC は抗 PD-1 抗体の作用点とは異なるメカニズムにより、がんの増悪化を促進していると言えます。つまり、MDSC を標的とした治療法は、抗 PD-1 抗体の効果をより強力に向上させることが期待されています。

マウス骨髄細胞を GM-CSF で 4 日間培養することで MDSC を分化誘導することができますが、この MDSC 分化誘導系を用いたこれまでの検討により、飽和脂肪酸であるパルミチン酸

(炭素数 16) が抑制性免疫細胞である MDSC への分化を阻害し、免疫活性化細胞である樹状細胞 (Dendritic cell; DC) への分化を促進することを明らかにしました。一方で、別の飽和脂肪酸であるステアリン酸 (炭素数 18) 添加では表面マーカーの発現パターンからは DC への分化促進が認められましたが、免疫抑制能は影響を受けないことが分かりました。また、炭素数 16 の不飽和脂肪酸であるパルミトレイン酸では DC への分化促進効果は認められなかったことから、MDSC/DC 分化制御は「炭素数が 16 の飽和脂肪酸」によって厳密に制御されている可能性が考えられました。以上を踏まえて、生体内においてパルミチン酸による MDSC 分化阻害を再現できれば抗がん免疫応答を活性化できるのではないかと考え、マウスにパルミチン酸を多く含む飼料 (パルミチン酸飼料) を摂食させることで、がんの進展が阻害されるかを検討した結果、パルミチン酸飼料摂食群において、有意にがんの進展が阻害されることを見出しました。さらに、次に、予防的ではなく治療的な摂取として、B16-F10 細胞を移植し、その 1 日後からパルミチン酸の過剰摂取を行いました。加えて、抗 PD-1 抗体の併用による治療効果も検討しました。その結果、パルミチン酸を多く含む飼料の予防的な摂食に比べると効果は弱いものの、治療的摂食によってもがん退縮の傾向が確認されました。さらに、パルミチン酸を多く含む飼料と抗 PD-1 抗体との併用による相加的ながん退縮の傾向が確認されました。以上の結果から、パルミチン酸の過剰摂取と抗 PD-1 抗体との併用療法が有効であることが示されました。MDSC はがんの増悪化を促進する細胞ですが、その MDSC に対してパルミチン酸が毒性を発揮することが明らかになりました。本研究成果は、がん患者の栄養状態の管理が治療効果発現において重要であることを示す知見であると考えられます。さらに、パルミチン酸が MDSC の免疫抑制能を減弱させる分子メカニズムをより詳細に解析することで MDSC をターゲットとした分子標的薬の開発につながる可能性が期待されます。

今後は、環境化学物質等が MDSC に与える影響をも評価していく予定であり、MDSC を軸とした免疫毒性学 연구를展開させていきたいと考えています。今後とも免疫毒性学会の諸先生方におかれましてはご指導ご鞭撻のほど賜りますようお願い申し上げます。



立花雅史先生

訃報

黒岩幸雄 先生（昭和大学名誉教授）

日本免疫毒性学会名誉会員であられる、黒岩幸雄 先生が2021年1月10日に逝去されました。本学会にとりましては巨星を失った思いであり、ここに謹んで哀悼の意を表します。

黒岩先生は、本学会の前身である免疫毒性研究会の設立に大きく寄与され、先生がおられなかったら本学会の今はありません。

本学会の設立、免疫毒性学の振興に貢献された黒岩先生に深く感謝を申し上げ、ここにご冥福をお祈り申し上げます。

日本免疫毒性学会 理事長
中村和市

黒岩幸雄先生を偲んで

1980年代半ばから、トキシコロジーの分野で標的器官という概念が注目され始め、黒岩幸雄先生が学術会議の毒科学研連シンポジウム（1990年）を主催された際に、免疫毒性を取り上げられました。その後、黒岩先生が主催された第19回日本毒科学会学術年会のサテライトシンポジウム（1992年）では「免疫毒性」をテーマとされました。さらに、黒岩先生は1994年10月14日の第1回免疫毒性研究会を初めに初期の3回連続の学術大会の年会長を務めていただき、会場（昭和大学の講義室、上條講堂）も提供していただくなど、まさに免疫毒性研究を促進する触媒の役割を果たしていただきました。こうした本学会に対する御貢献に対し、2003年の第10回学術大会において本学会の初めての名誉会員として黒岩幸雄先生に対する表彰が行われました。

私の個人的なつながりとして、1992年2月23-27日に米国 Seattle にて開催された Society of Toxicology、1992 Annual meeting に黒岩先生が御参加された折に、当時 National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS, North Carolina) の Dr. Luster のラボに留学していた私と香山不二雄先生とで黒岩先生のホテルの部屋にお伺いし、同行されていた方々と共に床に車座に座ってお酒をご一緒させていただきました。安全性評価研究会の佐藤哲夫先生による黒岩先生追悼記事にもありますように豪放磊落で親分肌の先生に触れさせていただいた懐かしい記憶です。学会終了後にしばらくたってから、日本に帰国された黒岩先生から国際便が届き何かしらと思いましたが抗アレルギーの漢方薬（パックされた煎じ薬）でした。懇親した際の話の経緯はよく覚えていませんが、当時4歳だった息子のアレルギーの話が話の発端だったと思います。せっかくなので煎じて息子に飲ませようとしたのですが、どうしても飲まないのが口にしてみましたら、身震いするほどの不味さで服用させることは断念しました。黒岩先生には、この後日談をお話しする機会がありませんでしたが、申し訳ございませんでした。

黒岩先生は、1995年に起こった地下鉄サリン事件の際に、毒性学の専門家としてマスコミに出ておられました。その後、2002年にサリン被害者を救済するために設立されたNPO法人リカバリーサポートセンターの副理事長として、毒性学者としての責任感の篤さから被害者の方々に寄り添われておられました。私共は、黒岩先生がご逝去されたことで、先生にはどのような理由で免疫毒性の研究をバックアップしてくださったのか、具体的にお聞きする機会を逸してしまいましたが、毒性標的としての免疫系と毒物検査のための免疫化学的手法の開発に興味を持たれていたように思われます。私たちは黒岩先生の御期待に沿えるよう努力してまいりたいものです。黒岩先生、天国から御見守りいただけますと幸いです。

吉田貴彦
旭川医科大学社会医学講座

編集後記

この ImmunoTox Letter を会員の皆様をご覧になる頃には、医療従事者および高齢者に続いて一般の方の新型コロナワクチン接種が始まっている頃でしょうか。皆様ご存知のように今回のワクチンは mRNA ワクチンと呼ばれる新しいタイプのワクチンが使用されています。私が初めて mRNA ワクチンにふれたのは 5 年ほど前になります。マウスを使った非臨床試験での高いワクチン効果を目の当たりにして、将来は生ワクチンや不活性化ワクチンに代わって、こういうタイプのワクチンが広がっていくのだろうと感じました。が、まさか 5 年という短い期間で自分が同じタイプのワクチンを受けることになるとは夢にも思いませんでした。

ワクチンを含めた新しい免疫療法が開発されると安全性の評価も重要になってきます。現在の新型コロナのワクチンでも接種後の副反応を疑う事例なども報告されています。手島玲子先生を年会長として開催される第 28 回学術年会では「自然免疫と獲得免疫のかかわりと免疫毒性」をテーマに、ワクチンの安全性評価や新しい免疫療法についての講演が企画されています。6 月時点での日本の感染状況から今年の学会もオンラインになることが決定しましたが、皆様もオンラインでの学会参加に慣れてきていることと思います。タイムリーな話題でもありますので、若い方も含めて是非ご参加下さるようお願いいたします。オンライン上で皆様と学術的な交流ができることを楽しみにしております。

(E・K 記)

編集・発行: 日本免疫毒性学会

編集発行責任者: 中村 和市

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、
中村 亮介、西村 泰光、
姫野誠一郎

原稿送付先: tennenunagi108@gmail.com