

ImmunoTox Letter

日本免疫毒性学会: The Japanese Society of Immunotoxicology Vol. 27 No.1 (通巻 53 号) 2022 6 月

— 目次 —

第 29 回日本免疫毒性学会学術年会(予告 2) …1
北海道医療大学 小島 弘幸
第 11 回(2021 年度)日本免疫毒性学会学会賞 …3
国立環境研究所 野原 恵子
第 11 回(2021 年度)日本免疫毒性学会奨励賞 …9
大阪大学大学院 立花 雅史
シリーズ「免疫毒性研究の若い力」25 …… 12
アステラス製薬株式会社 田中 海里
Short talks on the shoulders of giants …… 15
東北大学大学院 黒石 智誠
ImmunoTox Letter Digest …… 19

第 29 回日本免疫毒性学会学術年会 (JSIT2022) (予告 2)

日本免疫毒性学会の第 29 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.jsit2022.jp>)をご覧ください。

期 日：2022 年 9 月 12 日(月)～13 日(火)

会 場：ACU 札幌 (アスティ 45, 16 階)
〒060-0004 札幌市中央区北 4 条西 5 丁目
アスティ 45, 16F

アクセス：空路 新千歳空港から JR で札幌駅下車
(約 35 分)、または、直行便バスで札幌駅前下車(約 60 分)、JR 札幌駅南口から
徒歩 5 分(詳細は ACU 札幌ホームページ
<https://www.acu-h.jp/sapporo/> をご覧ください)

テ — マ：免疫毒性と疾患—新たな軌跡を描く

年 会 長：小島弘幸
北海道医療大学薬学部
衛生薬学講座・教授

事 務 局：第 29 回日本免疫毒性学会学術年会
事務局
〒061-0293 石狩郡当別町金沢 1757 番地
北海道医療大学薬学部衛生薬学講座
(環境衛生学)
電話 0133-23-1376、Fax 0133-23-1669
E-mail: jsit2022@ml.hoku-iryo-u.ac.jp

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: jsit2022@kohmura.co.jp

演題募集締め切り日：
2022 年 7 月 8 日(金) (予定)

事前参加申し込み締め切り日：
2022 年 7 月 22 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. 腸内細菌による免疫恒常性維持とその破綻
金井隆典先生（慶応義塾大学医学部消化器内科・教授）
2. Protecting public health from per- and polyfluoroalkyl substances: Focus on immunotoxicity.
Dr. Jamie C. DeWitt (Professor, Department of Pharmacology & Toxicology, East Carolina University)

■シンポジウム「環境・免疫・疾患」

1. 妊娠期無機ヒ素曝露による多世代影響とエピジェネティック修飾変化
鈴木武博先生（国立環境研究所 環境リスク・健康領域病態分子解析研究室）
2. 環境中微粒子がもたらす炎症性疾患とその制御
武村直紀先生（大阪大学大学院薬学研究科 生体応答制御学分野）
3. 寄生虫感染による自己免疫疾患の抑制メカニズム～衛生仮説の科学的証明へ向けて～
下川周子先生（国立感染症研究所 寄生動物部）
4. がん病態が増悪する免疫チェックポイント阻害剤に対するアナフィラキシー：マウスモデルの解析から
畠山浩人先生（千葉大学大学院薬学研究院 薬物学研究室）
5. 抗体薬物複合体の非標的細胞における毒性に関する研究
青山道彦先生（国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部）
6. バイオ医薬品の免疫毒性におけるFc受容体の関与
伊藤俊輔先生（中外製薬株式会社 安全性研究部）

■教育講演

1. ワクチンの有効性と安全性の考え方：疫学の視点から
福島若葉先生（大阪公立大学大学院医学研究科 公衆衛生学・教授）
2. がんはどこまで防げるのか？
浅香正博先生（北海道医療大学・学長）

■学会賞受賞講演

ヒ素曝露による健康被害における免疫機能の攪乱
姫野誠一郎先生（昭和大学薬学部社会健康薬学講座）

■学会奨励賞受賞講演

1. バイオ医薬品開発におけるヒト安全性予測向上を目指した非臨床免疫毒性・免疫原性研究
久保千代美先生（中外製薬株式会社）
2. mRNA 安定性制御機構を介する免疫毒性の研究
室本竜太先生（北海道大学大学院薬学研究院 衛生化学研究室）

■試験法ワークショップ

「医薬品分子様式の多様化から見えてきた免疫毒性評価の課題」

1. 新日本科学におけるカンクイザルを用いた *In Vivo* 免疫毒性試験の現状
高橋義博先生（株式会社新日本科学）
2. 抗体医薬の *in vitro* cytokine release assay による評価の課題と考察
伊藤志保先生（第一三共株式会社）
3. 抗体医薬の免疫毒性評価の課題
久保千代美先生（中外製薬株式会社）
4. 核酸・遺伝子治療薬の免疫毒性評価の課題
松村匠悟先生（アステラス製薬株式会社）
5. 総合討論

■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。

■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 11 回(2021 年度)日本免疫毒性学会学会賞

ダイオキシン類の免疫毒性作用とそのメカニズム

野原恵子 (国立環境研究所環境リスク・健康領域 客員研究員)

この度は日本免疫毒性学会の学会賞を受賞させていただき、大変に光栄に存じます。選考にかかわって下さいました先生方に感謝申し上げます。また、これまでご指導いただきました先生方、ともに研究を進めてくださった皆様、そして本会でともに活動をさせてくださった会員の先生がたに感謝申し上げます。

私の本会との出会いは、1996 年頃、職場の先輩である藤巻秀和先生に誘っていただき、発足間もない日本免疫毒性研究会の年会に参加したことでした。藤巻先生にはマウスリンパ球の調製法などの免疫実験も一からご教示いただきました。その後、本会の編集委員長を長くつとめられた藤巻先生のもと、2005 年から編集委員会に加えていただき、2012 年から委員長を務めさせていただきました。その時にこのニュースレターの誌面の刷新として著者の顔写真を加えることをはじめましたが、編集を担当してくださった新藤智子先生が予想より大きく顔写真を入れてくださったために、よりインパクトのある誌面になったと思っています。

2004 年頃からは、中村和生先生が New York University の Mitch Cohen 先生と絆をふかめ、本学会と米国毒性学会 SOT の免疫毒性部会 (ITSS) の交流の基礎を作られました。このような流れがあったことから、2009 年のシンポジウム・ワークショップ提案を募集するという SOT から全会員へのメールを私は自分に来たものと勘違いをして、Oregon State University の Dr Nancy Kerkvliet と ”Transcriptional changes in immune cells in toxicology: Transcription factors, signal transduction and epigenetics” というセッションを提案しました。その後提案は SOT ITSS のプログラム委員会でシンポジウム案のトップで推薦をされ、本委員会で採択されました。このシンポジウムを SOT 年会で行ったあとの ITSS のレセプションで、大槻剛巳先生が日本免疫毒性学会が提案するシンポジウムは今後も続けまじょうとプッシュされ、今日まで続く SOT 年会でのシンポジウム交流につながっています。当時大槻先生は、吉田貴彦学会長の女房役?として貢献され、運営委員会では配布資料の束をスーツケースにつめて時には夜行列車で上京されたり、このニュースレターも HP に見やすく掲載していただいたりとお世話になりました。

ダイオキシン類の免疫毒性作用とそのメカニズムの研究

さて今回賞をいただきました研究は、1999 年当時国立環境研究所の領域長であった遠山千春先生が JSPS CREST プログラム 「内分泌かく乱物質」の中で実施されたプロジェクトで開始したものです。ダイオキシンの毒性の一つとして、胸腺委縮や抗体産生抑制などの免疫毒性が古くから知られていましたが、直接のターゲットとなる免疫細胞に関しての論争があり、私たちのグループはダイオキシンの標的細胞やさらに分子経路の同定を目指して研究を行いました。

1) ダイオキシンは Arylhydrocarbon receptor (AhR) を活性化して毒性を発現する

ダイオキシン (2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin, TCDD、図 1) および類似の構造をもつダイオキシン類は、細胞質に存在する Arylhydrocarbon receptor (AhR) という転写因子と極めて特異性高く相互作用することによってその毒性を発揮することが明らかにされています。

ダイオキシンは体内に入ると細胞膜を通過し、AhR と親和性高く結合します。その結果 AhR の構造が変化して AhR は核膜を通過して核に移行し、核では ARNT という転写因子と結合します。この二量体は DNA 中の XRE (Xenobiotic responsible element) という配列に親和性をもって結合し、転写に必要な因子をリクルートしてその下流にある遺伝子の転写を誘導します (図2、A)。このようにダイオキシンによって通常は発現していない遺伝子の転写がおこることが代表的な毒性発現経路として考えられています。

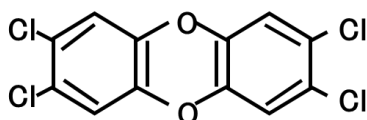


図 1. ダイオキシン (2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin, TCDD) の構造

2) ダイオキシンによる胸腺委縮を誘導するのはストローマ細胞の AhR か胸腺細胞の AhR か？

ダイオキシン曝露をうけたマウスでは、胸腺細胞が減少し胸腺委縮がおこること、および CD4 single positive 細胞に対する CD8 single positive 細胞の比率が大きくなることが知られています。これらの反応は AhR ノックアウトマウスではダイオキシンを曝露してもおこらないことから、AhR 依存的事であることが示されています。また標的となる細胞に関しては、キメラマウスや胎仔胸腺器官培養の実験から、ストローマ細胞が変化することによって胸腺細胞が減少するという説と胸腺細胞 (未成熟 T 細胞) が直接影響をうけるという相反する結果が報告をされました。

より直接的な証明はマウス個体の胸腺細胞のみ、またはストローマ細胞のみの曝露の影響を調べることでありますが、マウスにダイオキシンを曝露するとすべての AhR が活性化してしまいます。そこで私たちは、リガンド (ダイオキシン) がなくても恒常的に核移行して ARNT と二量体を形成し遺伝子発現を誘導できる恒常的活性化型 AhR (constitutively active AhR, CA-AhR) 遺伝子を利用し (図 2、B、C)、これを CD2 プロモーターで T 細胞系列のみに発現させた T 細胞特異的 CA-AhR トランスジェニック (Tg) マウスを作成しました。すなわち、T 細胞の AhR のみがリガンド非存在下で活性化しているマウスを作成しました。

このマウスでは胸腺細胞が減少し、CD4 single positive 細胞に対する CD8 single positive 細胞の比率が増加しており、ダイオキシン曝露と同様の変化が観察されました。すなわち、胸腺細胞の AhR の活性化のみで胸腺委縮が起こることがクリアに示されました¹⁾。

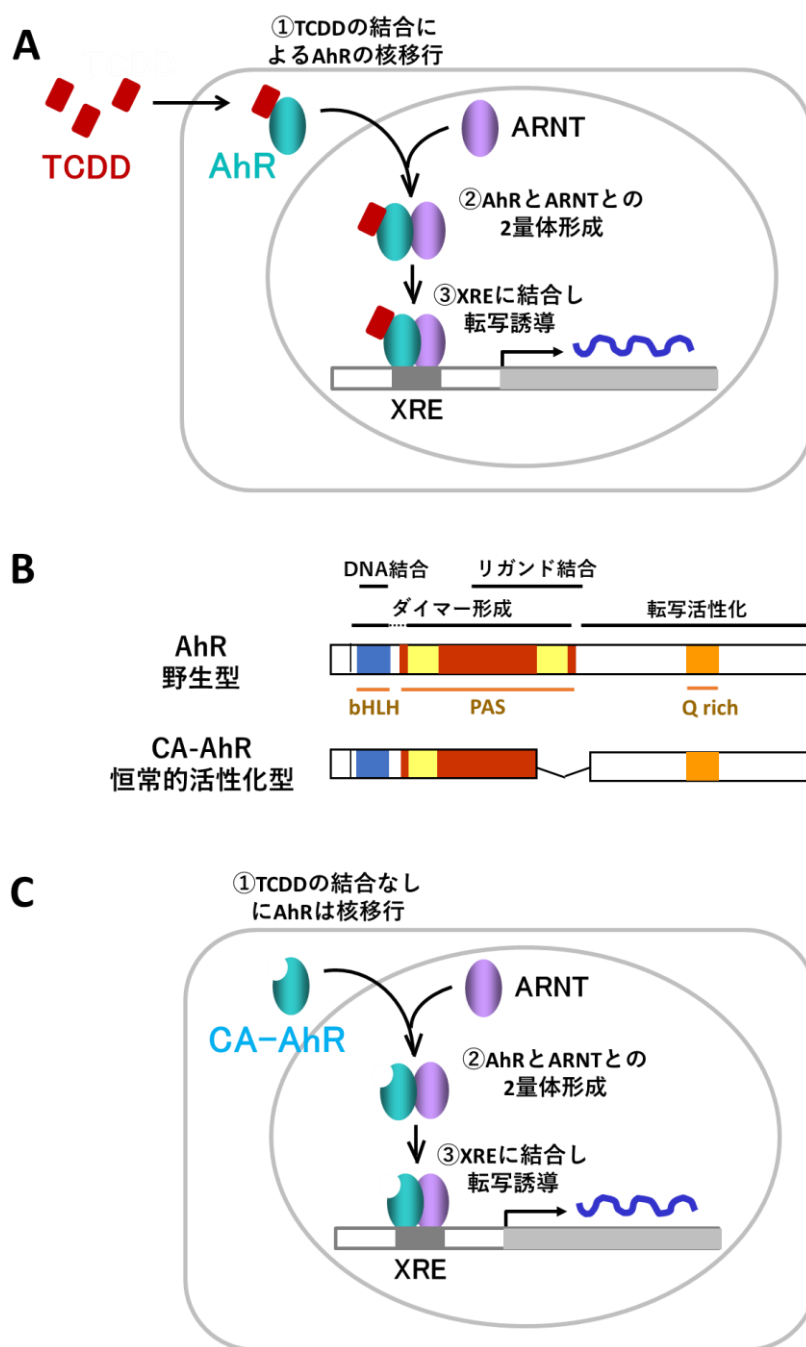


図2. 恒常的活性化型 AhR (CA-AhR) の主な作用メカニズム

A) 細胞質に存在する AhR は、ダイオキシンと結合すると核移行し、ARNT と 2 量体を形成する。この 2 量体が遺伝子上流の XRE 配列に結合すると転写を誘導する。B) AhR (野生型) および CA-AhR の模式図。C) CA-AhR はリガンド非存在下で核移行して ARNT と 2 量体を形成し、XRE 結合依存的に転写を誘導する。

3) 胸腺細胞の AhR 活性化の下流で胸腺委縮を誘導する分子の探索

ダイオキシン曝露による AhR 活性化で胸腺委縮がおこる原因として胸腺細胞のアポトーシスと細胞周期抑制による増殖停止が示唆されていました。しかし、実際にどのような分子が関与するかはまだ明らかにされていません。胸腺では死細胞のクリアランスが早く、特に細胞死の原因の究明を難しくしています。私たちは T 細胞の AhR 活性化によってどのような現象が起こるかを細胞株をもちいて検討しました。T 細胞株として有名な Jurkat T 細胞は AhR を欠損しています。この細胞に上述の CA-AhR を発現させた結果、アポトーシスと細胞周期抑制の両方が起こることが観察され、それぞれに関連する遺伝子の発現増加が検出されました²⁾。

これらの遺伝子の中にアポトーシスに関与する Fas が含まれていました。Fas/Fas ligand (FasL) 経路の活性化については、ダイオキシンによる胸腺委縮の原因とする報告がすでにありました。そこで、それぞれ Fas と FasL の機能的欠損マウスである Fas_{lpr} マウスおよび Fas_{gld} マウスと T 細胞特異的 CA-AhR Tg マウスを交配し、Fas または FasL 経路が欠損すると胸腺委縮がみられなくなるかどうかを調べました。結果は、T 細胞に CA-AhR が発現していれば Fas/FasL シグナル経路が欠損していても胸腺委縮がおこることが観察され、Fas/FasL の関与は示されませんでした³⁾。なおこの研究では原因遺伝子は特定できませんでしたが、その他の候補遺伝子について同様の交配実験を行うことによって、胸腺委縮の原因となる分子を特定できる可能性があると思います。

4) ダイオキシンの抗体産生抑制作用とそのメカニズム

より有効な免疫応答を獲得する上で、活性化した B 細胞が胚中心で分化・増殖し高親和性抗体を産生する能力を得ることが重要です。ダイオキシンが IgM 抗体の産生を抑制することは古くから知られていましたが、獲得免疫への作用はわかっていませんでした。

私たちはマウスに卵白アルブミン (OVA) を免疫する実験系を用いて、ダイオキシンが脾臓の胚中心 B 細胞の増殖を抑制し、高親和性抗体産生細胞数と高親和性 IgG1 抗体量を減少させるということを明らかにしました⁴⁾。またアトピー性皮膚炎モデルである Nc/Nga マウスに OVA で免疫をする実験系では、ダイオキシン曝露によって総 IgE および OVA 特異的 IgE が抑制されることも観察されました⁵⁾。

現在は抗体反応において中心的役割を果たすのは濾胞性 T (T_{fh}) 細胞であることがわかっていますが、私たちがこの研究を行っていた 2000 年代初期は Th2 細胞がその役割を担うと考えられていました。そこで私たちは、抗体産生細胞をヘルプする Th2 細胞の機能へのダイオキシンの作用を調べるという観点で IL-4、IL-5、IL-6 の産生量を調べました。その結果、ダイオキシン曝露は OVA に対する一次免疫反応においても二次免疫反応においても脾臓細胞からのこれらサイトカインの産生を抑制することがわかりました^{6),7)}。この結果から、当時はダイオキシンが Th2 細胞の機能を抑制することによって抗体産生を抑制するかと考えていましたが、抗体細胞の抑制に関しては T_{fh} 細胞が産生する IL-4 が抑制されることを観察していた可能性もあるかもしれません。

また、OVA に対する一次および二次免疫反応においてダイオキシン曝露が脾臓細胞からの IFN- γ 産生を増強することも観察されました^{5),6)}。IFN- γ は Th1 細胞や Tfh 細胞でも産生されるサイトカインであり、各ヘルパー T 細胞サブセットへの影響はより詳細な検討が必要と考えられます。

さらに上述した T 細胞特異的 CA-AhR Tg マウスを用いた実験では、T 細胞のみの AhR の活性化によって OVA 免疫後の脾臓細胞の増殖が抑制され、IFN- γ 産生は増加することが示されました。一方で、IL-4 などの Th2 タイプのサイトカイン産生や IgM, IgG1 は抑制されませんでした⁸⁾。これらの結果から、ダイオキシン曝露では T 細胞の AhR の活性化以外の反応も、T 細胞のサイトカイン産生や抗体産生の抑制に関与する可能性が考えられました。

以上、私たちが行った免疫毒性研究の一部の仕事をご紹介させていただきました。久しぶりに当時の仕事を見直して、それぞれがなかなかの力作であると感じ、皆で熱く研究していたことを懐かしく思い出しました。一緒に研究を進めてくださった皆様に改めて感謝いたします。

当時 AhR は内在性リガンドが不明のオーファンレセプターといわれており、私たちはダイオキシン毒性のキープレーヤーという観点で研究をスタートしました。その後、いろいろな AhR の内在性リガンドが報告されるようになり、2005 年以降になると AhR が Treg 細胞や Th17 細胞の分化、またマクロファージにおける自然免疫の制御などに関与することが報告され、AhR 研究は免疫制御における基礎的な課題になったと感じています。私たちはダイオキシンの毒性を研究していたのですが、2000 年代の後半には、論文のレビュアーから、なぜリガンドとしてダイオキシンを使うのか、というコメントをもらったこともありました。

AhR は、そのアフィニティーはダイオキシンと比較してかなり弱いものの、いろいろな化学物質と結合します。一方、AhR は免疫系やその他の生体反応において、まだ見つかっていない重要な役割があると思います。環境因子による AhR の活性化がどのように生体に影響を及ぼすのかはまだ今後の課題です。本学会や世界の研究者による一層の研究の発展を楽しみにしています。

引用文献

- 1) Nohara K et al. J Immunol 174, 2770, 2005.
- 2) Ito T et al. J Biol Chem 279, 25205, 2004.
- 3) Nagai H et al. Int Immunopharmacol 6, 279, 2006.
- 4) Inouye K et al. Toxicol Sci 74, 315, 2003.
- 5) Fujimaki H et al. Toxicol Sci 66, 117, 2002.
- 6) Nohara K et al. Toxicology 172, 49, 2002.
- 7) Ito T et al. Toxicol Sci 70, 46, 2002.
- 8) Nohara et al. Int Immunol 21, 769, 2009.



野原恵子先生（前列中央）

2021年9月7日、COVID-19のためオンラインで受賞講演をさせていただき、その後研究室でお祝いしていただきました。

第 11 回 (2021 年度) 日本免疫毒性学会奨励賞

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 (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)

この度の名誉ある 2021 年度日本免疫毒性学会奨励賞受賞に際しまして、選考委員の先生方、ならびにご推薦いただいた大阪大学の吉岡靖雄先生に心より感謝申し上げます。

第 24 回学術年会に参加させていただいてから、年会には毎年参加させていただいております。これまでに学生 2 名も連れて参加させていただき、第 27 回学術年会では学生・若手優秀発表賞を頂戴しましたこと、遅ればせながら当時の選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。また、これまでの発表に関しまして、有意義なご意見・ご質問をしてくださった先生方にも心より感謝申し上げます。

私は現在、骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cell; MDSC) に焦点を絞って研究を進めています。MDSC はがんや炎症病態下で出現する骨髄系細胞で、生体が傷害された際に出現するという免疫毒性学的観点から非常に興味深い細胞であると考えております。「担がん生体において栄養素が毒性を発揮するか否か」について研究を推進しておりますが、本稿では G-CSF に関する研究についてご紹介させていただきます。

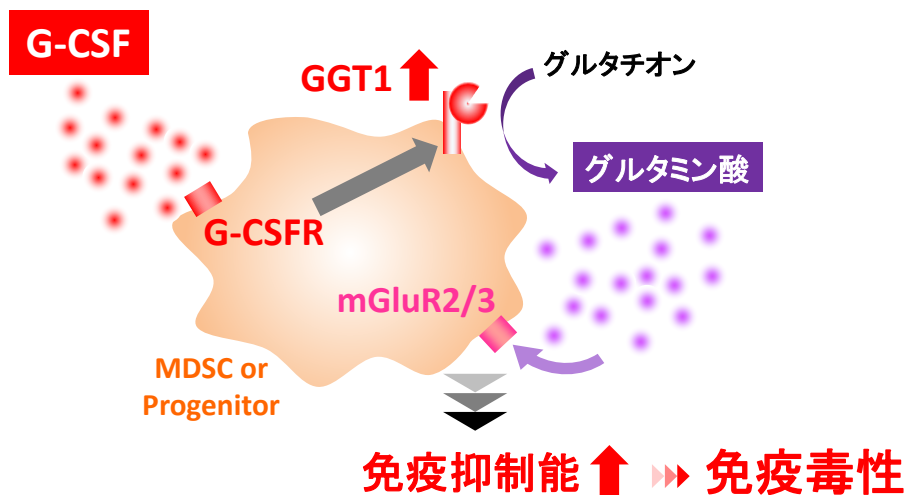
免疫抑制反応を阻害する「免疫チェックポイント阻害療法」はがんの標準治療になりつつありますが、その治療効果が得られる患者は限定的であり、高額な医療費も問題になっていることから、適切なバイオマーカーの探索や併用療法などの開発が急務となっています。MDSC はマウスにおいては CD11b および Gr-1 を共発現し、かつ T 細胞増殖抑制能を有することで定義される細胞で、がん病態においては抗がん免疫応答を抑制します。また、免疫チェックポイント阻害療法に治療抵抗性を示す患者生体内では MDSC が多く存在しているとの報告がなされていることから、MDSC は免疫チェックポイント阻害療法の作用点とは異な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。これらのことから、MDSC を標的とすることで免疫チェックポイント阻害療法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。さて、G-CSF はがん化学療法に伴う主要な副反応である発熱性好中球減少症の予防・治療薬として用いられている一方で、担がん生体において MDSC の増加や腫瘍転移の促進などの作用を有することも報告されており、MDSC を介した免疫毒性が示唆されています。このような背景から、我々は G-CSF が直接的に MDSC に与える影響の解明に取り組みました。

始めに、MDSC を分化誘導系において G-CSF 添加の影響を検討したところ、MDSC サブセットの一つである単球様 MDSC が増加することが示されました。さらに、G-CSF の作用により MDSC の T 細胞増殖抑制能を増強することも明らかとなりました。そのメカニズムを明らかにするために RNA-seq 解析を実施し、G-CSF により発現が変動する約 200 遺伝子を同定しました。

その中で G-CSF により発現上昇する上位 20 遺伝子について、がん患者のゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム情報が包括されている TCGA (The Cancer Genome Atlas) を参照し、発現量が 4 種以上のがんの悪性度と正に相関している遺伝子を 5 個まで絞り込みました。その中でも、細胞外グルタチオンの加水分解を担う唯一の酵素である γ -glutamyltransferase 1 (*Ggt1*) は G-CSF により変動するパスウェイに含まれる遺伝子であったことから、*Ggt1* に着目することとしました。

MDSC 分化誘導系において、G-CSF と共に GGT 阻害剤である GGsTop を添加しても単球様 MDSC が増加していたことから、G-CSF による単球様 MDSC の分化あるいは増殖は GGT1 非依存的であることが明らかになりました。一方で、G-CSF による MDSC の T 細胞増殖抑制能の増強は GGsTop により打ち消されたことから、GGT1 依存的であると考えられました。T 細胞増殖抑制能の増強に寄与する因子を同定するため、MDSC の主な免疫抑制分子である Arginase や iNOS の発現量、ROS の産生量について検討しましたが、T 細胞増殖抑制能の結果と一致しなかったことから、別の因子の関与が考えられました。そこで、GGT1 がグルタチオンを分解することでグルタミン酸が生成されることを鑑み、細胞外グルタミン酸量を測定したところ、G-CSF 添加により増加し GGsTop 単独あるいは共添加群では増加していませんでした。我々は過去に、グルタミン酸が MDSC の T 細胞増殖抑制能を増強することを見出しており (第 24 回学術年会にて発表済み。 *Biol Pharm Bull*, 2018)、グルタミン酸が G-CSF による MDSC の T 細胞増殖抑制能増強に重要であると考えられました。

最後に、発熱性好中球減少症モデルマウスを用いて G-CSF と GGT1 の重要性を明らかにすることとしました。本モデルで化学療法剤として用いているシクロホスファミドはがんの進展を強く阻害することができますが、G-CSF 投与によりがんの進展が有意に亢進されました。興味深いことに、G-CSF 投与によるがんの進展増強を GGsTop 投与により打ち消すことができました。また、GGsTop 投与によって体重減少が認められなかったことから、大きな毒性もないことが明らかになりました。



以上のことから、G-CSF は GGT1 依存的に細胞外グルタミン酸量を増加させ、MDSC の T 細胞増殖抑制能を増強させることが明らかになりました。また一方で、G-CSF は GGT1 非依存的に MDSC の分化あるいは増殖を促進することも明らかになりました。さらに、がん化学療法に伴う発熱性好中球減少症に対する G-CSF の薬理効果を損なうことなく、MDSC を介した免疫毒性のみを阻害できる可能性を示したと考えております。(Front Pharmacol, 2022)

今回、広く臨床で用いられている G-CSF の毒性を明らかにすることができ、少しは本学会に貢献できたのではないかと考えております。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研究を展開させていきたいと考えています。何かと不安定な世界情勢ではありますが、免疫毒性学会の諸先生方の益々のご多幸とご活躍をお祈り申し上げます。また、今後ともご指導ご鞭撻のほど賜りますようお願い申し上げます。最後に、本受賞課題に関し多大なるご協力をいただいた全ての方々に、この場をお借りして感謝申し上げます。



立花雅史先生

シリーズ「免疫毒性研究の若い力」25

Establishment of antisense screening method for innate immune activation via TLR9

TLR9 を介した自然免疫活性化能に対するアンチセンススクリーニング試験法の構築

田中海里 (アステラス製薬株式会社)

この度は日本免疫毒性学会 ImmunoTox Letter への執筆の機会をいただきましたこと、心より感謝申し上げます。第 28 回日本免疫毒性学会学術年会では、ポスター投稿並びに学生・若手セッションに参加致しました。ウェブ開催のため現地で顔を合わせてお話しする機会は持てませんでしたが、バーチャルのポスター会場ではメッセージのやり取りを通して情報交換させていただき、セッション当日にも直接先生方からご質問やご助言を賜りました。重ねて、お礼申し上げます。免疫毒性学の研究者としてまだまだ浅学の身ではございますが、この機会をお借りして私の研究をご紹介します。

私は 2017 年に岐阜大学を卒業後、アステラス製薬株式会社に入社し、入社後から免疫毒性学を学び始めました。弊社を含め製薬企業各社は、低分子や抗体医薬をはじめ、核酸医薬、遺伝子治療、細胞医療といった様々な創薬モダリティでの創薬研究に挑戦しております。製薬企業の安全性研究員として、このような新規の創薬モダリティに対して安全性への懸念の先読みを行い、モダリティの特性に応じた安全性評価の戦略や新たな評価系の構築を検討することが求められていると考えます。今回は、アンチセンス核酸医薬品に焦点を当て、構造的特徴や生体での認識機構を踏まえた潜在的な安全性への懸念点について考え、これを早期にスクリーニング可能とする試験法を構築したのでご紹介させていただきます。

核酸医薬品は、天然型の核酸あるいは化学修飾を施された核酸が十数から数十塩基連結して構成されております。構造や機能から様々なタイプ、例えばアンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA、デコイ核酸、CpG オリゴ等、に分類されます。アンチセンスは一本鎖の DNA 又は RNA から成りますが、一本鎖 DNA の塩基配列中に非メチル化 CpG が含まれると、樹状細胞といった免疫細胞内に取り込まれた後、細胞内エンドソームに発現する Toll-like receptor 9 (以下、TLR9) によって認識され、サイトカイン産生を誘導することが知られています。この性質は、アンチセンス創薬においてクラスエフェクトとして患者様にとって望ましくない免疫反応を誘導してしまう潜在的なリスクであると考えられます。核酸医薬品の安全性評価に関しては、標準的には ICH S6 ガイドラインに準拠して非臨床安全性評価を進めることが求められております。しかし我々の危惧する自然免疫反応に関しては種差があり、一般的に核酸によるサイトカイン産生については、サルはヒトより感受性が低いことが知られています。このため、サルを用いた一般毒性試験の中であってもサイトカイン産生のリスクを評価することは不十分と考えられます。このような背景に加え、創薬開発の現場では候補配列に CpG 配列が含まれてしまうケースがある

ことから、種差の影響が少なく、自然免疫活性化能の低い候補配列を選択可能とするようなスループット性が高い *in vitro* スクリーニング試験法の構築を目指しました。

ツールとして利用したのは、ヒト TLR9 遺伝子と NF- κ B 誘導性レポーター遺伝子を安定的に強制発現させた HEK-Blue™ hTLR9 Cells (InvivoGen 社) というレポーター細胞株 (以下、hTLR9 細胞株と記載) です。hTLR9 細胞株は、TLR9 がリガンドを認識してシグナル伝達し、NF- κ B 経路を経て分泌型胚性アルカリホスファターゼ (以下、SEAP と記載) を細胞外に産生します。上清中の SEAP の量を比色法で定量することで簡便に TLR9 活性を評価することができます。対照細胞株である HEK-Blue™ Null1 Cells (InvivoGen 社) と併せて使用し、まずは TLR9 特異的な反応の検知が可能であるかを確認し、次に最適な試験条件を検討致しました。様々な CpG オリゴを用いて 0.01-10 μ M まで 7 濃度で評価し EC50 及び各評価濃度における S/N 比 (Blank に対する吸光度比) を算出しました。その結果、hTLR9 細胞と CpG オリゴの組合せにおいてのみ濃度依存的に NF- κ B レポーター活性が見られ、hTLR9 細胞は TLR9 特異的かつ濃度依存的なレポーター活性が検知可能であることを確認しました。また、最適な細胞播種濃度とインキュベーション時間に関して、複数の CpG Class の最大反応が吸光値 1.8 以下の範囲で観察可能であり、且つ Blank well の吸光値が最小を示す条件を設定しました。本試験系には標準品がなく、試験実施の際の試験結果を許容する基準がありませんでした。そこで、CpG Class B の CpG オリゴをコントロール核酸と設定し、独立した 4 回の試験を行い、得られた吸光値を基にコントロール核酸の Acceptance criteria となる吸光値範囲 0.65-1.30 を設定しました。

試験条件の最適化の後、CpG Class A、B 及び C の CpG オリゴを用いて、CpG Class による反応性の違いを比較しました。その結果、Class B オリゴによって最も強くレポーター活性が検出され、次いで Class C、Class A という順番を示しました。これは hTLR9 細胞株が TLR9-NF- κ B 経路のレポーター細胞であることに矛盾の無い結果であり、TLR9-NF- κ B 経路の活性化の強さを指標として、アンチセンスの自然免疫活性化能の順位をつけることができると考えられました。これらの結果について再現性を確認するため、Class A、B 及び C の CpG オリゴを用いて、バリデーション試験を実施しました。hTLR9 細胞の解凍から吸光度測定までの一連の試験を独立して 5 回実施したところ、全ての試験は Acceptance criteria を達成し、レポーター活性化の強さに基づく順位も常に一致しました。

ここまでの結果を踏まえ、本試験法はヒトの TLR9-NF- κ B 経路に起因する自然免疫活性化能を簡便に定量でき、複数の候補配列における相対評価に用いることでより免疫原性の低い候補品の選定に繋がると考えています。そしてこのような評価を組み入れることで、ヒトでの安全性への懸念を低減した核酸医薬品の創出に貢献できると考えております。

今後は、ヒト PBMC や全血を用いたサイトカインアッセイ法との相違点について整理し、自社アンチセンス化合物を用いて本試験系の特性を明らかにしながら、自然免疫を軸とした免疫毒性学を研究を展開させていきたいと考えています。上記の研究に取り組むに当たり、多くのご助言を頂いた大村功研究室長、串間清司研究員、松村匠悟研究員に厚くお礼を申し上げますと共に、最後までお読み頂いた皆様へ重ねて感謝申し上げます。今後とも免疫毒性学会の諸先生方へ於

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。

Disclosure of conflict of interest : この研究はアステラス製薬株式会社にサポートされています。



田中海里先生

Short talks on the shoulders of giants

唾液腺関連リンパ組織

黒石智誠

(東北大学大学院歯学研究科口腔分子制御学分野)

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東北大学大学院歯学研究科口腔分子制御学分野の黒石智誠と申します。ご推薦、ご承認を賜りました先生方に厚く御礼を申し上げますとともに、本紙面をお借りして皆様にご挨拶申し上げます。

私は北里大学大学院衛生学研究科修士課程を修了した後、生物系特定産業推進機構の出資事業であった(株)ティーセル研究所で乳房炎(乳牛乳腺への細菌感染による炎症性疾患)の研究に従事し、その成果をもって博士号を取得しました。その後、2004年より現所属となり、「金属アレルギー」と「口腔粘膜の免疫機構」を主な研究テーマとしております。

今回、編集委員会の先生方より「黒石先生が免疫に関してちょっと気にされている事を是非とも伺ってみたい」(原文ママ)と仰せつかりました。そこで、最近、大学院生を指導しながら気になっていることを書き連ねてみたいと思います。雑文ではございますが、日々の研究の息抜き、茶飲み話代わりにご一読下されれば幸いです。

消化管や呼吸器に代表される粘膜組織は常に外界と接しており、生体防御の第一線として、外来抗原や微生物と相対しています。私が所属する歯学部の主戦場である口腔もまた粘膜組織です。粘膜組織の生体防御機構としての「粘膜免疫システム」は全身のそれとは大きく異なる特徴を有しています。

粘膜免疫システムにおいて最も重要な液成因子が分泌型IgAです。粘膜固有層の形質細胞が2分子のIgAとJ(joining)鎖からなる二量体IgAを産生します。この二量体IgAが粘膜上皮細胞の基底膜側に発現しているpolymeric Ig receptor (pIgR)に結合し、transcytosisにより粘膜面へと運搬され、pIgRの一部(分泌鎖、secretory component)とともに分泌型IgAとして分泌されます。腸管分泌液や外分泌液(唾液やミルクなど)には分泌型IgAが高濃度に含まれます。唾液の場合、IgG濃度が14 µg/mLであるのに対し、IgA濃度は190 µg/mLであり、その差は約13倍です。

それでは、このIgA産生形質細胞はどこから来たのでしょうか。粘膜免疫システムは、特異免疫応答が誘導される誘導組織、並びに、その特異免疫応答が実際に機能する実効組織から構成されます。誘導組織の実体は粘膜関連リンパ組織(mucosa-associated lymphoid tissue、MALT)であり、腸管関連リンパ組織(gut-associated lymphoid tissue、GALT)、鼻咽頭関連リンパ組織(nasopharynx-associated lymphoid tissue、NALT)、気管支関連リンパ組織(bronchus-associated lymphoid tissue、BALT)などがあります。最も研究が進んでいる典型例が、GALTの一つである小腸パイエル板と小腸粘膜固有層の関係ではないでしょうか。パイエル板では上皮のM細胞

を介して抗原を取り込み、それに対して特異的な B 細胞が IgA⁺細胞へと分化します。この IgA⁺細胞が腸管粘膜固有層へと遊走し、IgA 産生形質細胞へと最終分化します。腸管粘膜固有層で産生された分泌型 IgA は、腸管粘膜の感染防御はもちろんのこと、腸内細菌叢の形成にも重要な役割を担っています。

粘膜免疫を理解する上で、もう一つ重要なキーワードが共通粘膜免疫機構 (common mucosal immune system) です。ある粘膜組織で誘導された特異免疫応答が別の粘膜組織でも機能すること、例えば、NALT で誘導された IgA⁺細胞が腸管粘膜で IgA 産生形質細胞へ分化することを指します。経鼻ワクチンにより BALF (気管支・肺粘膜) に加え糞便中 (腸管粘膜) の IgA 特異抗体価が上昇することは共通粘膜免疫機構で説明できます。近年、乳腺の IgA 産生形質細胞はパイエル板に由来し、分娩後、急速に乳腺に集積することが報告されました。母乳 (ミルク) の第一義的な役割は新生児 (仔) の健全な発育の促進です。GALT で誘導された IgA が、乳腺から母乳を経て、新生児 (仔) の腸管粘膜で機能することはとてもリーズナブルに思えます。

そこで、唾液中の分泌型 IgA です。口腔粘膜の生体防御を主目的とするのであれば、唾液中の分泌型 IgA は口腔由来の抗原や微生物に対して特異性を示すべきと考えられます。粘膜免疫システムに則って考えた場合、IgA 産生形質細胞が存在し分泌型 IgA が産生される唾液腺は実効組織です。では、誘導組織はどこなのでしょう。これまでに、定常 (非炎症) 状態の口腔粘膜にパイエル板やリンパ濾胞の様な構造は確認されていません。経鼻ワクチンにより唾液中に特異的分泌型 IgA を誘導できることから、NALT が唾液腺に対する誘導組織の一つと考えられています。しかし、この NALT が少々厄介な曲者です。NALT は鼻腔内に存在し、マウスやラットなどのげっ歯類でのみ観察されます。ヒトの場合、口腔の奥 (喉の入り口) に存在する、咽頭扁桃、口蓋扁桃、舌扁桃からなるワルダイエル咽頭輪が NALT に相当すると考えられています。気道、呼吸器への入り口と考えた場合、NALT とワルダイエル咽頭輪が対応するのは理解できます。しかし、唾液腺・口腔粘膜の誘導組織と考えると疑問が生じます。ワルダイエル咽頭輪の場合、口腔内で唾液にも接しており、解剖学的な距離も唾液腺に近いことから、そうなのかなとも思えます。しかし、鼻腔内の NALT では唾液が直接接触することもなく、唾液腺の誘導組織とは考えにくい気がします。マウスとヒトでは生物種が異なるためといってしまうまでもありますが、少々腑に落ちないのが正直な感想です。

では、共通粘膜免疫機構の考えに則り、他の MALT で誘導された IgA⁺細胞が唾液腺に遊走して来たのでしょうか。例えば GALT に由来するとした場合、唾液中の分泌型 IgA は腸内細菌に対して特異性を有することになります。口腔内の主要な常在細菌である *Streptococcus* 属や *Actinomyces* 属は腸内細菌叢からも検出されます。分泌型 IgA の polyreactivity や cross-species reactivity、さらに、糖鎖を介した noncanonical binding などにより、腸内細菌に対して誘導された分泌型 IgA が口腔細菌と交差反応することは考えられます。他の粘膜組織で誘導された IgA であっても、唾液中・口腔内で十分な機能を発揮することは可能かもしれません。それでは、唾液腺・口腔粘膜は専用の誘導組織を持たないのでしょうか。そうであるならば、科学的・学

術的ではありませんが、一抹の寂しさを感じてしまいます (少年時代に赤い彗星の洗礼を受けた世代としては、〇〇専用で心躍ります)。

口腔は消化管や呼吸器の入り口です。唾液は非侵襲的に採取でき、アクセスの容易な研究対象といえます。しかしながら、口腔粘膜の免疫研究はあまり目立っていないのが現状です。唾液腺関連リンパ組織 (salivary gland-associated lymphoid tissue、SGALT?) や口腔関連リンパ組織 (oral cavity-associated lymphoid tissue、OCALT?) なるものが存在するのか、NALT やワルダイエル咽頭輪がそれに該当するのか、いずれ明らかにされることと思います。私自身がそこに関与できるかは分かりませんが、歯学部で籍を置く免疫学の研究者として、免疫学のメインストリームとまではいかなくとも、「オッ!!」と思わせる成果を示したいと思いながら奮闘する毎日です。

参考文献

粘膜免疫/IgA に関するレビュー

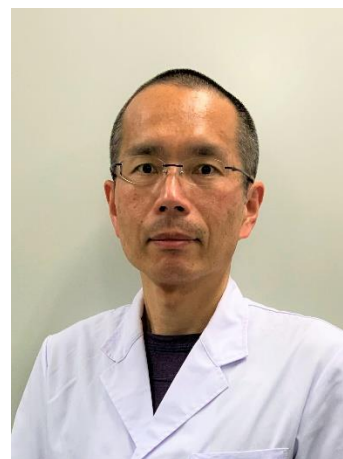
Huus, K.E., et al. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21: 514-525.

Pabst, O. et al. *Mucosal. Immunol.* 2020; 13: 12-21.

乳腺の IgA 産生形質細胞について

Niimi, K., et al. *Mucosal Immunol.* 2018; 11: 643-653.

Usami, K., et al. *Cell Reports* 2021; 36, 109655.



黒石智誠先生

編集後記

2019 年末に中国で始まった COVID-19 も、世界に広がり早 2 年半。この間、多くのイベントが中止、延期、あるいはオンライン開催を余儀なくされた。本学会も例に漏れず、第 27 回および第 28 回学術年会はやむを得ずオンライン開催となったことは記憶に新しい。この間、オンラインにはオンラインの良さがあることを学んだが、これはもちろん裏を返せば対面には対面の良さがあるということである。対面の良さとはたとえば、日中ならふとした立ち話から思わぬ研究上のヒントを得たときの充実感であり、夜ならば酔いつぶれた仲間をホテルに置き去りにして残ったメンバーでさらに飲み続けるときの連帯感であり、朝ならば前夜酔いつぶれたメンバーが二日酔いの青い顔でやっどこさ会場に現れた姿を見つけたときの安心感と「また来年もやろう」という期待感であったりする。

本誌冒頭に予告されている通り、今年の第 29 回学術年会は「免疫毒性と疾患—新たな軌跡を描く」をテーマに、小島年会長の下、札幌にて開催される。3 年ぶりに対面での年会在復活することを、いろいろな意味で大変よろこばしく思っている。感染の再拡大に十分注意することは言うまでもないが、久々に戻ってきた対面の良さを味わい尽くしたいと思う。しかし腑に落ちないのは、今年度、日本毒性学会も日本薬学会も本学会と同じく札幌で年会在を開く予定であるということだ。これらの学会をハシゴする諸兄諸姉も多いことと思うが、年に 3 回も札幌を訪れることになるわけである。すすきのや狸小路商店街関係者の陰謀論が疑われるが、各季節の旬の食材が楽しめるのであれば、これもまた対面の良さなのであろう。

(R・N 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