

化学物質のアレルギー感作性 in vitro 評価法の開発

東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門

善本 隆之

Recently, several in vitro assays to predict the respiratory sensitizing potential of chemicals were developed, because the use of animal models in safety testing of chemicals is significantly limited. However, these alternative methods cannot distinguish chemical respiratory sensitizers and skin sensitizers, although the risk management systems for them are quite different. Therefore, in the present study, we aim at developing a novel in vitro assay, which can discriminate chemical respiratory sensitizers from skin sensitizers by taking advantage of the fundamental differences between their modes of function; development of helper T (Th) 2 immune responses, which is critically important for respiratory sensitization.

We have established a novel 3-dimensional (3D) coculture system using scaffold, which consists of human airway epithelial cell line, immature dendritic cells (DCs) derived from human peripheral blood CD14⁺ monocytes, and human fibroblast cell line. The present results indicate that this DC coculture system can discriminate the respiratory sensitizing potential of chemicals from their skin sensitizing potential by means of more enhanced expression of key costimulatory molecule OX40 ligand, which is important for Th2 differentiation, as a marker in DCs. Moreover, we have also developed a novel DC/T coculture system, which consists of the sensitized DCs and allogenic naive CD4⁺ T cells. In this system, we have great advantage that IL-4 up-regulation can be used as a marker for the prediction of respiratory sensitizing potential. Indeed, our data suggest that selective up-regulation of IL-4 was observed by the stimulation with respiratory sensitizer as compared to that with skin sensitizer.

Taken together, the present results suggest that our 3D coculture systems consisting of epithelial cells, DCs, fibroblast cells, and T cells would be useful for in vitro evaluation of allergenic sensitizing potential of chemicals. We are currently trying to further improve the versatility of these systems by using iPS technology.

1. 緒言

近年、動物実験を用いない3Rsの世界的な潮流により、医薬品や化学物質などの安全性評価に関する in vitro 試験代替法の開発が産業界のみならず社会的にも急務とされている。皮膚感作性試験代替法としては、蛋白質との結合性を評価する DPRA 法、ケラチノサイトのストレス応答を評価する KeratinoSens 法、樹状細胞の活性化を評価する h-CLAT 法などが、最近、OECD のテストガイドラインに採択された(図1)¹⁻³⁾。ところが、これら既存の代替法は、例えば、危機管理体制が大きく異なる呼吸器感作性 [ヘルパー T (Th) 2 反応優位] と皮膚感作性 (混合 Th1/Th2/Th17 反応) の違いを識別できず、現在、これらの感作性の違いを識別可能な方法の開発が望まれている。さらに、これらの代替法は、それぞれ単独では、従来の動物を用いる GPMT 法や LLNA 法などの試験法を代替することは不可能であるとされ¹⁻³⁾、そのため、有害性発現経路(AOP)⁴⁾に基づいた複数の方法の組み合わせ (IATA) によるより厳密な評価が必要とされている⁵⁾。これら既知の代替法は、皮

膚および呼吸器感作性の AOP の Key event (KE) 1~3 に相当する初期の機序を反映した方法であるため、生体内でのアレルギー発症により近い KE4 の T 細胞の活性化や分化誘導を反映した方法の方がより確度が高いと考えられる。ところが、これまでにいくつか検討されているが、未だその方法の確立には至っていない⁶⁾。

最近、我々は、ヒト気道上皮細胞株とヒト末梢血 CD14⁺ 単球由来未成熟樹状細胞 (DC)、ヒト線維芽細胞株の3種類の細胞を、Scaffold (足場材)を用いてそれぞれ3次元培養した後順に重ね、気道上皮組織をより忠実に模倣した生体により近い3次元DC共培養系を開発した(図2)。そこで、本研究では、複数の代表的感作性化学物質を用いて、皮膚と呼吸器の感作性の違いを、これらの作用機序の違いを示す Th2 分化および反応の誘導に係わる分子の発現増強の違いで識別できないか検討した。さらに、この3次元DC共培養系にT細胞も加えた3次元DC/T共培養系の構築の可能性についても検討を行った。

2. 方法

2.1. 細胞株

ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B (CRL-9609) とヒト肺線維芽細胞株 MRC-5 (CCL-171) は、ATCC より購入し、10%FCS を含む MEM 培地で培養した。ヒト健康人末梢血 CD14⁺ 単球は、10%FCS を含む RPMI1640 培地で培養した。



Development of in vitro evaluation system of allergenic sensitizing potential of chemicals

Takayuki Yoshimoto

Department of Immunoregulation, Institute of Medical Science, Tokyo Medical University

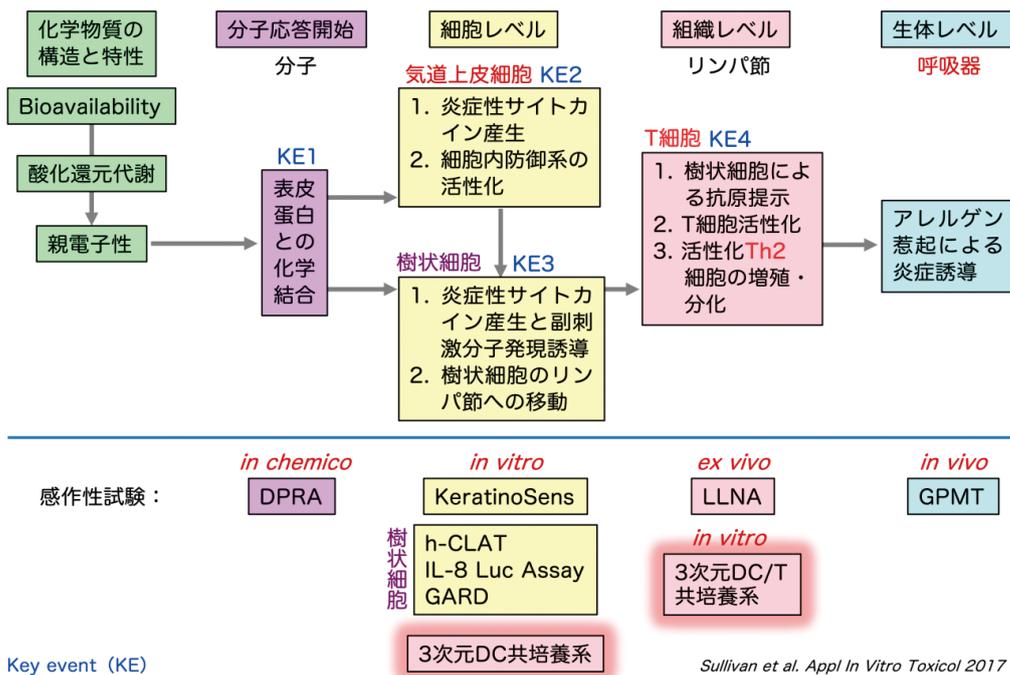


図1 感作性化学物質による呼吸器アレルギー発症までの有害性発現経路(AOP) と、既存の各試験法と本研究で開発中の3次元DC共培養系と3次元DC/T共培養系の位置づけ

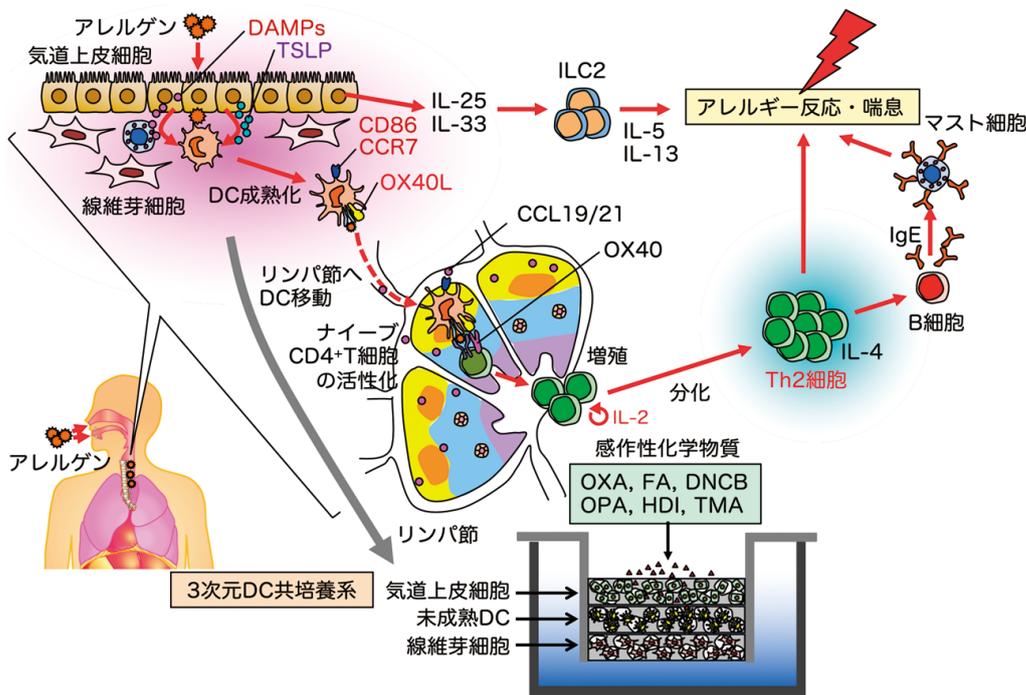


図2 気道上皮組織をより忠実に模倣するため、気道上皮細胞株、末梢血単球CD14⁺単球由来未成熟DC、肺線維芽細胞株を用いてより生体に近い3次元DC共培養系を構築

2.2. 感作性化学物質

3種類ずつの代表的な呼吸器感作性化学物質 {orthophthalaldehyde (OPA), hexamethylene diisocyanate (HDI), trimellitic anhydride(TMA)} と、皮膚感作性化学物質 {oxazolone (OXA), formaldehyde (FA), 2,4-dinitrochlorobenzene

(DNCB)} は、全てSigma-Aldrich社より購入した。始めにDMSOに溶解後、共培養用培地 (MEM培地とRPMI1640培地を1:1に混ぜた培地) で希釈し、至適濃度を検討後使用した。

2.3. Scaffold (図3)

市販のポリスチレン性の多孔質 Scaffold (Reinnervate 社の Alvetex® Scaffold 24 well plate、Alvetex® Scaffold 12 well insert)を用いた。

2.4. ヒト健常人末梢血 CD14⁺単球由来未成熟 DC の調製方法

東京医科大学医学研究倫理委員会の承認(受付番号 3323、課題: アレルゲンの in vitro 感受性評価法の開発)の下、健常人ボランティアの同意の後、末梢血 50ml をヘパリン存在下で採血し、Lympholyte-H (Cedarlane 社)に重層後、比重勾配遠心法により単核球を分離した。その後、抗 CD14 抗体のマикроビーズ (Miltenyi 社)を反応後、AutoMACS Pro で CD14⁺細胞を精製(純度 >99%)した。次に、この CD14⁺単球を GM-CSF (50ng/ml) と IL-4 (10ng/ml) で 6 日間培養後、抗 CD11c 抗体のマикроビーズを反応後、AutoMACS Pro で未成熟 DC を精製(純度 >99%)した。

2.5. ヒト健常人末梢血ナイーブ CD4⁺T 細胞の精製

上述(2.4.)のようにヒト健常人末梢血より分離した単核球から、ヒトナイーブ CD4⁺T 細胞アイソレーションキット (Miltenyi 社)を用いて、ナイーブ CD4⁺T 細胞を精製(純度 >95%)した。

2.6. 3次元DC共培養系の作製(図4)

まず、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B とヒト肺線維芽細胞株 MRC-5 を、 1.5×10^6 個ずつ個別の 12 well insert の Scaffold 内で 3 日間培養した。一方、精製した未成熟 DC を、 $0.7 \sim 1 \times 10^6$ 個 12 well insert の Scaffold 内で 1 日間培養後、無菌的にそれぞれの Scaffold を脱着し、次に、上から順に気道上皮細胞株、未成熟 DC、肺線維芽細胞株とそれぞれの Scaffold を順番に重ねて 1 つの 12 well insert に装着した。次に、始めに DMSO に溶解後、共培養用培地 (MEM 培地 と RPMI1640 培地を 1:1 に混ぜた培地) で希釈した感受性化学物質を 5 μ l ずつ一番上の Scaffold に均等に 6 箇所添加し、そのまま 30 分放置後、共培養培地 2 ml をプレートの方から一番上の Scaffold の所まで静かに加えた。9 時間後には、リアルタイム RT-PCR 解析用のサンプルを回収し、24 時間後には、免疫組織学的解析用のサンプルを回収した。

2.7. 3次元DC/T共培養系の作製(図5)

上述の(2.6.)の3次元DC共培養系で24時間反応後、DCの Scaffold だけを無菌的に取り出し、新しい 24 well plate の底に置き、アロジェニックなナイーブ CD4⁺T 細胞 (1.5×10^6 個)を含む 10%FCS 含有 RPMI1640 培地 50 μ l を加え、2 日後にさらに 100 μ l 同じ培地を加え、4 日後にはさらに 200 μ l 同じ培地を加えて培養した。5 日後に、Scaffold および培養液中の細胞から、リアルタイム RT-PCR 解析用のサンプルを回収した。

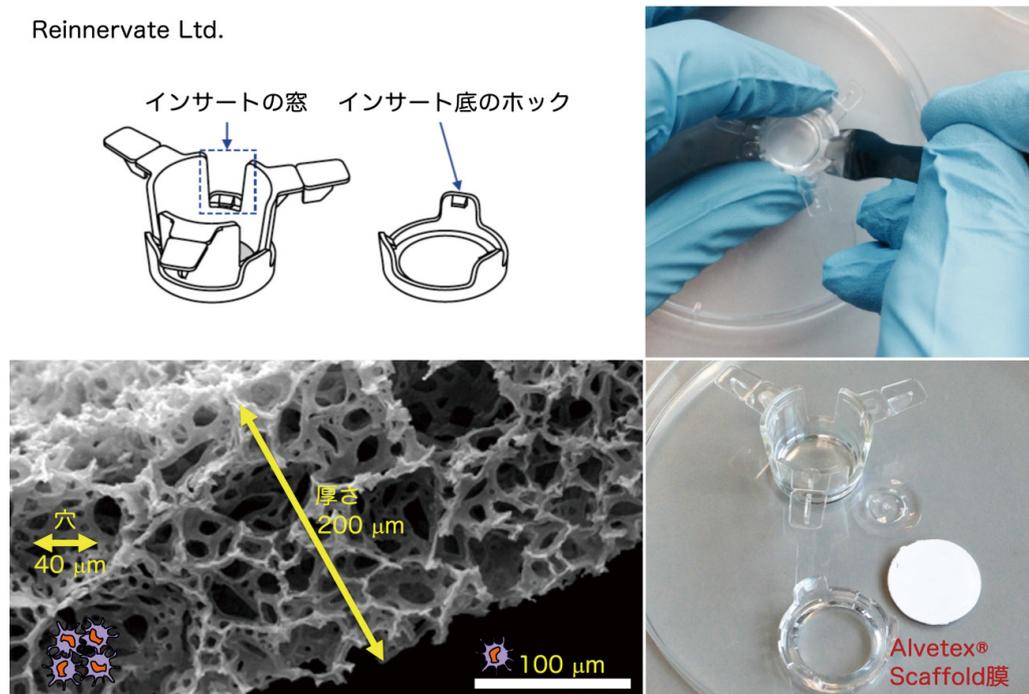


図3 ポリスチレン性の多孔質足場材である Alvetex® Scaffold は、生体内の3次元的な細胞間相互作用を反映し、Scaffold 膜の無菌的脱着が可能

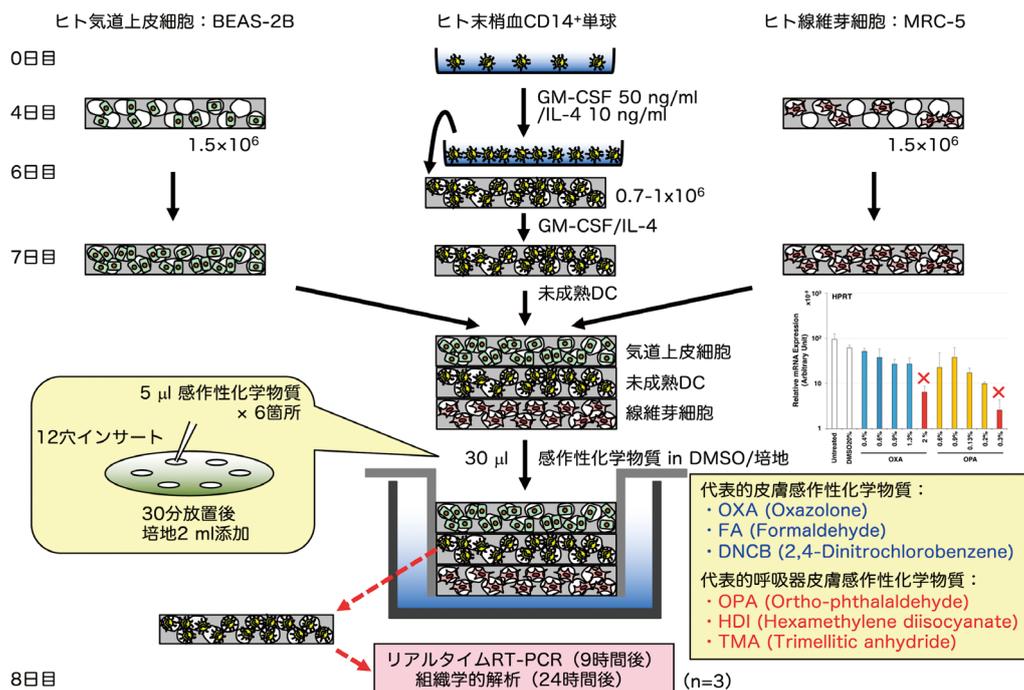


図4 3次元DC共培養系の構築方法：まず、個々の Scaffold で培養後、3つを重ね合わせ、その一番上から、感受性化学物質を添加し30分放置後、培地を加えて培養、解析を行う

2. 8. リアルタイムRT-PCR解析

各 Scaffold および細胞より total RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて調製し、SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific 社) で cDNA を作製し、TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II および Perfect Real Time サポートシステムのプライマーセット (Takara 社) を用いたリアルタイム-RT-PCR で標的分子の mRNA 発現を解析した。

2. 9. 免疫組織学的解析

各 Scaffold を OCT コンパウンドで包埋し液体窒素で凍結した後、10 µm の切片を作製し、ホルマリン固定後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、抗 CD11c 抗体による DC の免疫組織学的染色、Hoechst を用いた核染色を行った。

3. 結果

3. 1. 3次元DC共培養系を用いた呼吸器および皮膚の感受性化学物質の識別

まず、代表的な呼吸器感受性化学物質として OPA、代表的な皮膚感受性化学物質として OXA を用いて、それぞれの濃度を振って、刺激9時間後に RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR により、内部標準であるハウスキーピング遺伝子 Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) の mRNA 発現が、非刺激時の 10 分の 1 以下にならない濃度を決めた (図4)。そして、その濃度を用いて、

刺激24時間後、各 Scaffold の組織切片を作製し、HE染色や抗CD11c抗体、Hoechstなどを用いた免疫組織学的解析により、刺激24時間後も、上の上皮細胞の Scaffold や下の線維芽細胞の Scaffold へ、真ん中の DC の Scaffold 中の DC が移動することは、殆ど見られなかった (data not shown)。そこで、刺激9時間後に、各 Scaffold より RNA を回収し、DC の成熟化や Th2 分化、Th2 反応の誘導に関わる分子 | 副刺激分子で DC の成熟化マーカーでもある CD80 や CD86、MHC クラス II の HLA-DR、ナイーブ T 細胞のリンパ節への遊走に重要なケモカインレセプターで DC 成熟化のマーカーでもある CCR7、接着分子 ICAM-1、上皮細胞から産生され DC 上に OX40L 発現を誘導するサイトカイン TSLP、ナイーブ CD4⁺T 細胞の Th2 分化誘導に重要な副刺激分子 OX40L、炎症性サイトカイン IL-1β や IL-8、抑制性サイトカイン IL-10、Th1 分化に重要なヘテロダイマーサイトカイン IL-12 の 2 つのサブユニット IL-12p35 と IL-12p40、上皮細胞から産生され Th2 反応を増強する自然リンパ球 (ILC2) の分化増殖に重要なサイトカイン IL-25 や IL-33 など | の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR を用いて調べた。その結果、OPA と OXA 刺激により、副刺激分子 CD80 や CD86 の発現増強は両者で同レベルであったが、Th2 分化の誘導に重要な OX40L の発現増強が、OXA に比べ OPA 刺激で有意に高かった (data not shown)。次に、HDI と FA、TMA と DNCB の組み合わせで同様な検討を行ったところ、やはり、調べた上記の

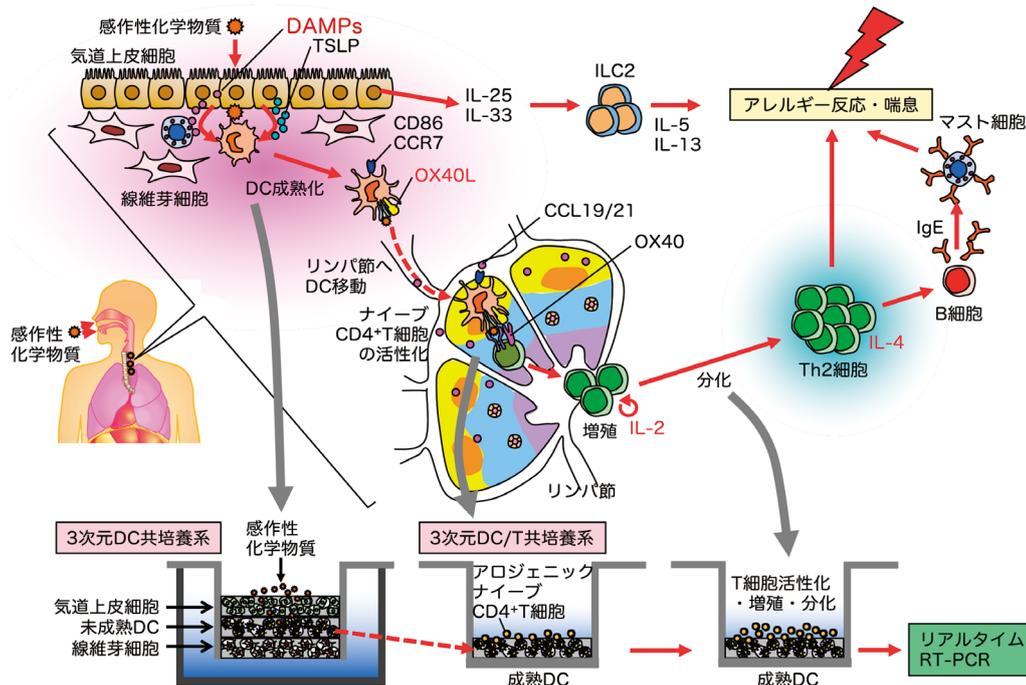


図5 3次元DC共培養系にさらにT細胞も加えた新しい3次元DC/T共培養系を用い、T細胞を指標にした呼吸器と皮膚の感受性化学物質を識別する評価系の構築

分子の中で、CD80やCD86の発現増強は両者で同レベルであったが、FAやDNCB刺激に比べ、HDIやTMA刺激で、OX40Lの発現増強が有意に高かった(data not shown)。

そこで、これら6種類の代表的な呼吸器と皮膚の感受性化学物質の至適濃度を用いて、この3次元DC共培養系でCD86とOX40L発現を調べたところ、非刺激に比べいずれの感受性化学物質刺激でもCD86発現増強は同レベルであったが、OX40L発現増強のレベルが6種類の感受性化学物質が2グループに分かれ、OXAやFA、DNCBの皮膚感受性化学物質の刺激に比べ、OPAやHDI、TMAの呼吸器感受性化学物質の刺激で、有意にOX40L発現増強が強かった(図6)。

以上の結果は、本研究の3次元DC共培養系は、DCでのOX40L発現増強を指標に、呼吸器と皮膚の感受性化学物質の識別が可能である可能性を示している。

3.2. 3次元DC共培養系における上皮細胞の重要性

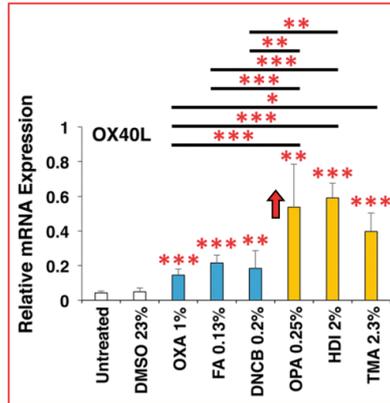
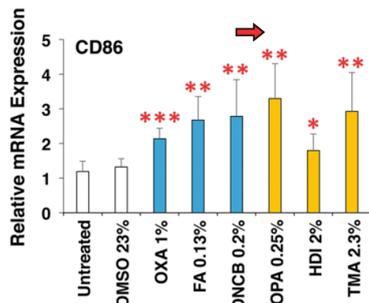
次に、この3次元DC共培養系が有効である理由を調べるため、同じScaffoldを用いたDCだけの3次元DC単独培養系と、OPAとOXAを用いて比較検討した。その結果、3次元DC共培養系では上述と同様に、CD86発現増強は両者で同じレベル発現増強が見られ、OXAに比べOPA刺激でOX40L発現増強がより強く見られたが、3次元DC単独培養系では、CD86発現増強は両者で同じレベル見られたが、OX40L発現増強は、両者で有意な差が見られなかった(図7)。

以上の結果は、本研究の3次元DC共培養系において、呼吸器と皮膚の感受性化学物質の識別に上皮細胞のバリエーション機能や免疫調節機能の重要性を示唆している。

3.3. 3次元DC/T共培養系を用いた呼吸器および皮膚の感受性化学物質の識別

生体内では、気道上皮で抗原に感作されると、その抗原をDCが取り込み、成熟化して、所属リンパ節へ遊走し、そこで初めて抗原特異的なナイーブCD4⁺T細胞を刺激し、増殖とエフェクター細胞への分化が誘導され、獲得免疫系が始動する。即ち、生体内では、抗原を捕らえたDCが所属リンパ節へ移動することは極めて重要である。上述の検討より、本研究の3次元DC共培養系では、感受性化学物質で刺激24時間後には、DCが刺激により他のScaffoldへの遊走が殆ど見られず留まっていたことより、生体内でのDCの移動を再現するため、24時間後、DCのScaffoldだけ取り出し、新しい24well plateの底に入れ、その上からナイーブCD4⁺T細胞を加え、反応させることにした。まず、CD4⁺T細胞としてシンジュニクな細胞を用いたところ、反応が弱かった。そこで、アロジェニックな細胞を用いたところ、いわゆる、アロの混合リンパ球反応(MLR)により、両者を混ぜただけで、T細胞の活性化が見られ、T細胞の活性化マーカーであるCD69やTh1分化のマーカーであるIFN- γ の発現増強が見られた。しかし、そこへ、呼吸器感受性化学物質OPAと皮膚感受性化学物質OXAを加える

リアルタイムRT-PCR



非刺激を1にした相対値とROC曲線解析

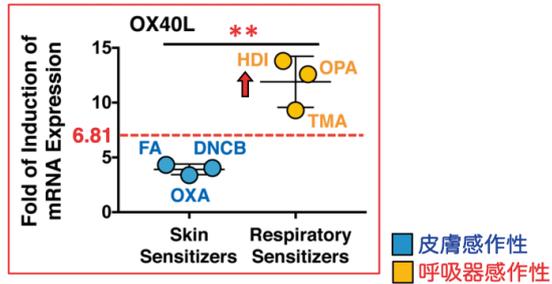
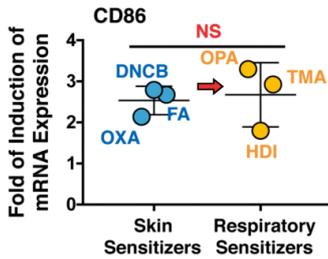


図6 6種類の代表的感作性化学物質刺激で、CD86発現増強は同程度、呼吸器感作性物質でOX40L発現が有意に増加し、OX40L発現増強の違いで2グループに識別可能

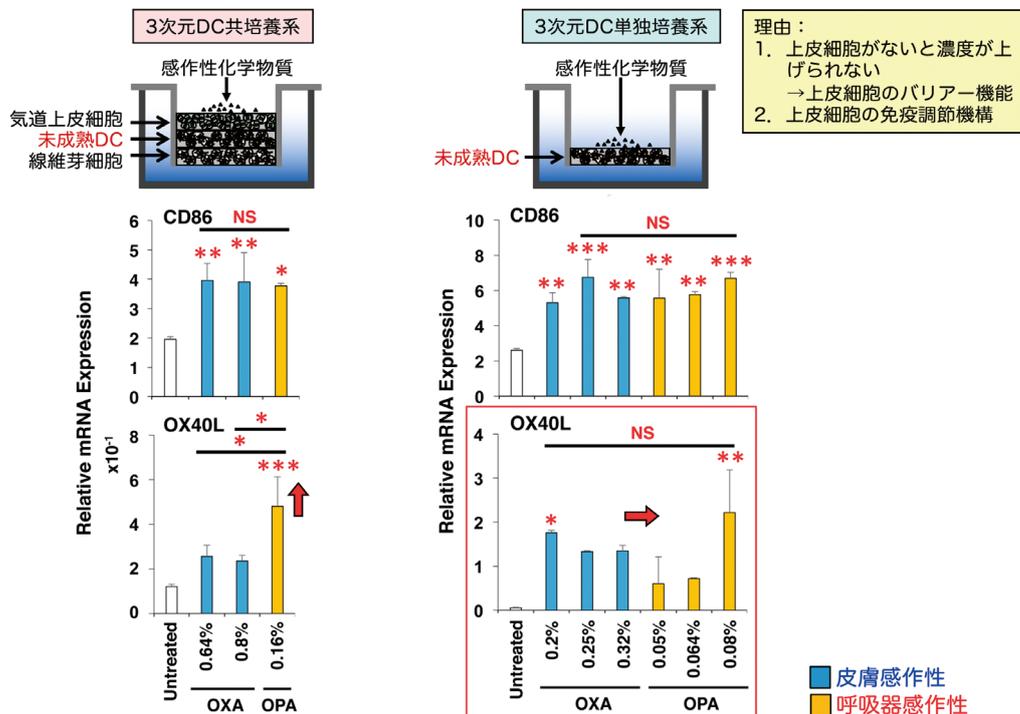


図7 3次元DC共培養系と3次元DC単独培養系を比較すると、選択的OX40L発現増強はDC単独培養系では見られず、上皮細胞のバリアー機能や免疫調節機能が重要

と、OXA刺激に比べOPA刺激によりIFN- γ 発現のさらなる増強と、OPA刺激に比べOXA刺激によりTh2分化マーカーであるIL-4発現のさらなる増強が見られた(図8)。

以上の結果は、本研究の3次元DC/T共培養系は、T細胞でのIL-4発現増強を指標に、呼吸器と皮膚の感作性化学物質の識別が可能である可能性を示唆している。

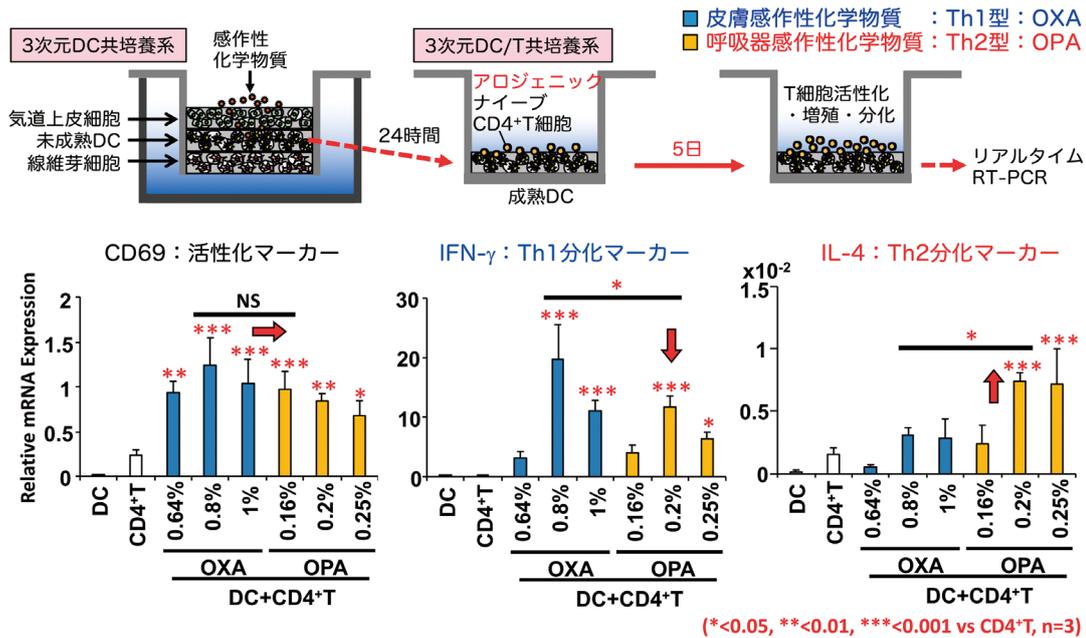


図8 ヒトプライマリー細胞を用いた新しい3次元DC/T共培養系を用い、T細胞でのIL-4発現増強の違いにより呼吸器と皮膚の感受性化学物質の識別が可能

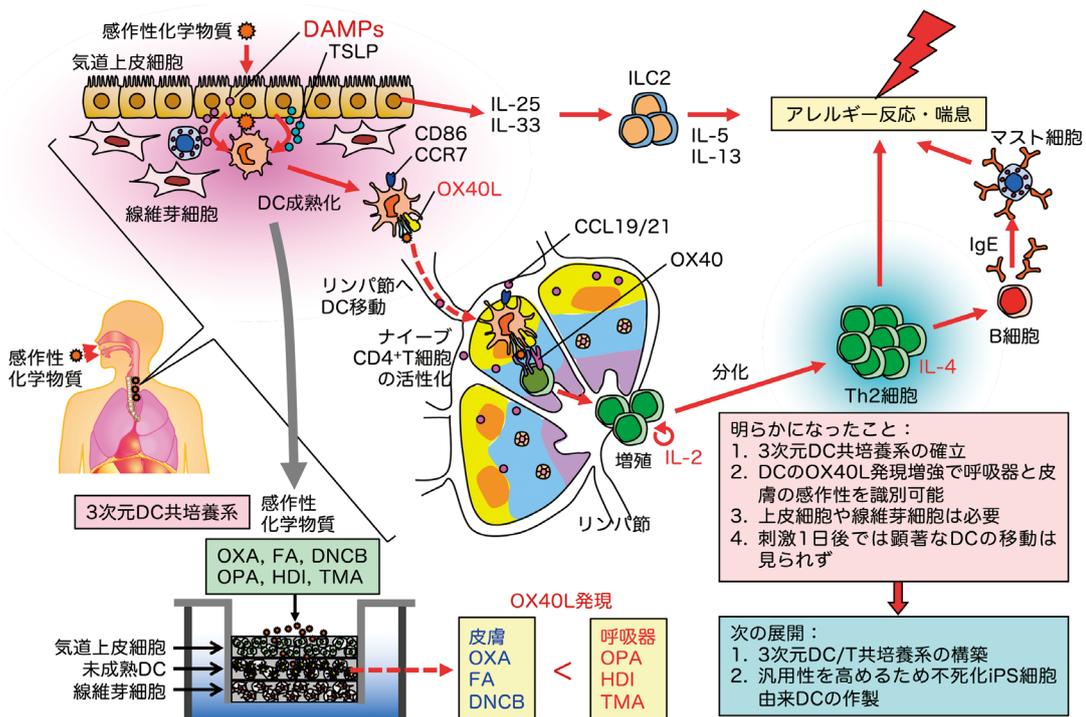


図9 ヒト末梢血単球由来DCを用いた3次元DC共培養系により、DCでのOX40L発現増強の違いにより皮膚と呼吸器の感受性化学物質の識別が可能

4. 考察

現在、さらに、複数の感受性化学物質を用いる検討や、これらの系の汎用性を向上させるため、iPS由来のDCを複数作製し、LPSやOK-432による刺激後の成熟マーカーの発現解析や抗原提示能力などについて比較検討し、3次元

DC共培養系への応用を試みている。さらに、そこへ、T細胞ハイブリドーマや不死化したTh細胞を加えて、同様な結果が得られれば、より有用な評価系になることが期待される。

これまでに、呼吸器と皮膚の感受性化学物質を識別可能な方法として、皮膚感受性評価法のゴールドスタンダードであるマウスを用いたLLNAで刺激開始6日後に所属リンパ

節でのリアルタイムRT-PCR解析する方法が唯一報告されている^{7, 8)}。この系では、皮膚感作性化学物質に比べ呼吸器感作性化学物質の刺激で、Th2分化やTh2反応の誘導に重要なIL-4やIL-4R、IL-10、OX40L、TSLPなどの分子の発現がより増強されることが示された^{7, 8)}。ところが、このような呼吸器と皮膚の感作性化学物質を識別可能なin vitro動物実験代替法は、今のところ開発されていない⁹⁾。

5. 総括

本研究では、気道上皮組織を模倣した気道上皮細胞とDC、肺線維芽細胞から構成される新しい3次元共培養系を構築し、この系を用いて、DCでのTh2分化誘導に重要なOX40L発現増強を指標に、6種類の代表的な感作性化学物質を呼吸器と皮膚の感作性化学物質の2グループに識別可能であることが示された(図9)¹⁰⁾。さらに、この系にアロジェニックなナイーブCD4⁺T細胞を加えた3次元DC/T共培養系では、T細胞でのIL-4発現増強を指標に、呼吸器と皮膚の感作性化学物質の識別が可能である可能性が示唆された。免疫反応は複雑なため、アレルギー感作性の評価には、本研究のような生体内のキーになる反応をより忠実に模倣した3次元共培養系が有効と考えられ、その汎用性を上げるべく現在も検討を続けている。

(引用文献)

- 1) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. (2015).
- 2) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. (2015).
- 3) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test(h-CLAT). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. (2016).
- 4) Sullivan, K. M., Enoch, S. J., Ezendam, J., Sewald, K., Roggen, E. L. & Cochrane, S. An Adverse Outcome Pathway for Sensitization of the Respiratory Tract by Low-Molecular-Weight Chemicals: Building Evidence to Support the Utility of In Vitro and In Silico Methods in a Regulatory Context. *Appl Vitro Toxicol*, 3 (2017).
- 5) OECD Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. (2016).
- 6) van Vliet, E., Kuhn, J., Goebel, C., Martinozzi-Teissier, S., Alepee, N., Ashikaga, T., Blomeke, B., Del Bufalo, A., Cluzel, M., Corsini, E., Delrue, N., Desprez, B., Gellatly, N., Giese, C., Gribaldo, L., Hoffmann, S., Klaric, M., Maillere, B., Naisbitt, D., Pallardy, M., Vocanson, M. & Petersohn, D. State-of-the-art and new options to assess T cell activation by skin sensitizers: Cosmetics Europe Workshop. *ALTEX* 35, 179-192 (2018).
- 7) Adenuga, D., Woolhiser, M. R., Gollapudi, B. B. & Boverhof, D. R. Differential gene expression responses distinguish contact and respiratory sensitizers and nonsensitizing irritants in the local lymph node assay. *Toxicol Sci* 126, 413-425 (2012).
- 8) Cumberbatch, M., Clelland, K., Dearman, R. J. & Kimber, I. Impact of cutaneous IL-10 on resident epidermal Langerhans' cells and the development of polarized immune responses. *J Immunol* 175, 43-50 (2005).
- 9) North, C. M., Ezendam, J., Hotchkiss, J. A., Maier, C., Aoyama, K., Enoch, S., Goetz, A., Graham, C., Kimber, I., Karjalainen, A., Pauluhn, J., Roggen, E. L., Selgrade, M., Tarlo, S. M. & Chen, C. L. Developing a framework for assessing chemical respiratory sensitization: A workshop report. *Regul Toxicol Pharmacol* 80, 295-309 (2016).
- 10) Mizoguchi, I., Ohashi, M., Chiba, Y., Hasegawa, H., Xu, M., Owaki, T. & Yoshimoto, T. Prediction of Chemical Respiratory and Contact Sensitizers by OX40L Expression in Dendritic Cells Using a Novel 3D Coculture System. *Front Immunol* 8, 929 (2017).