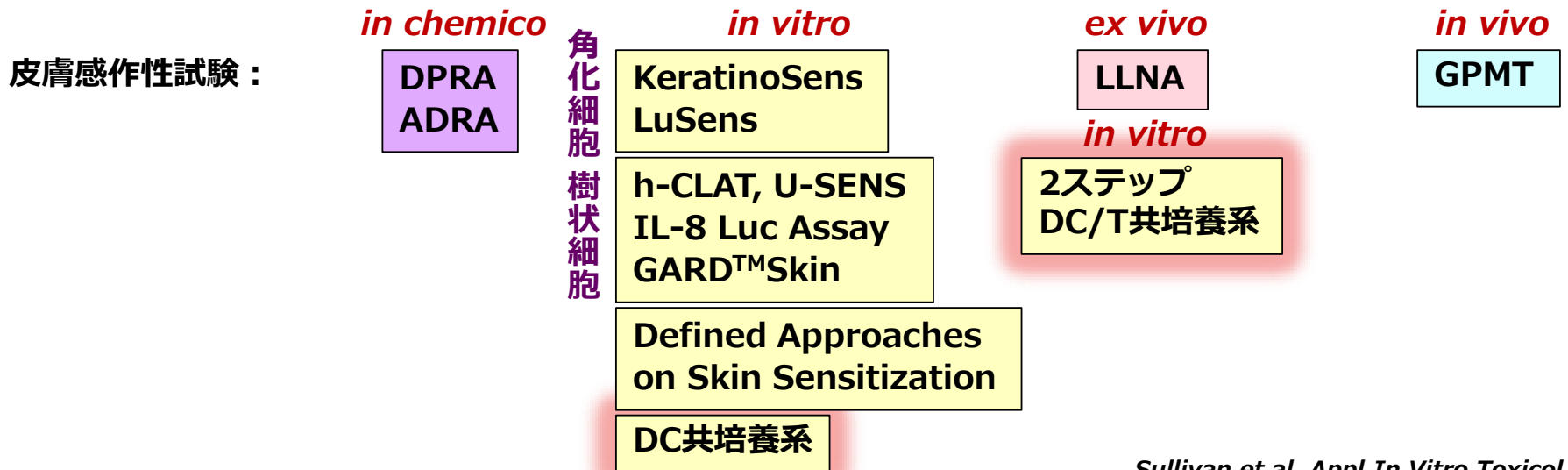
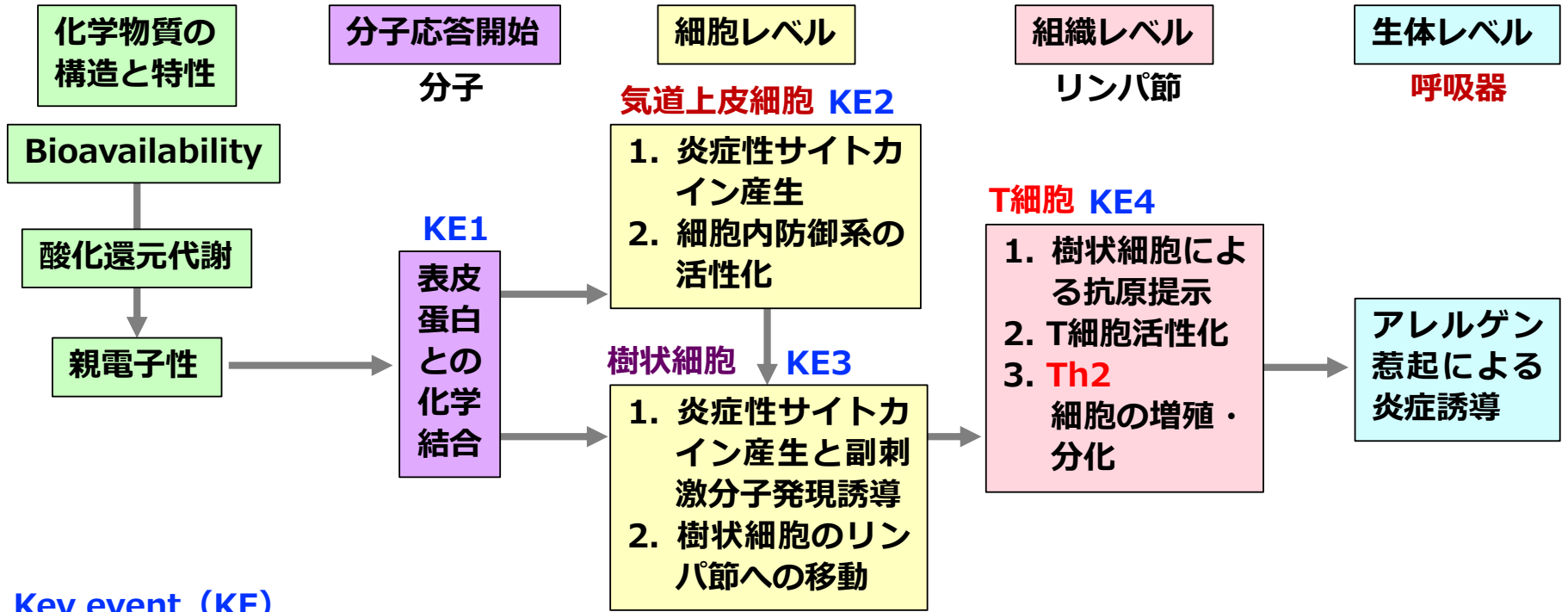


ヒトT細胞の活性化・分化誘導 (Key event 4) を指標に感作性・アレルギー誘発性 を評価する新規代替法の開発

善本 隆之・片平 泰弘・溝口 出

東京医科大学・医学総合研究所・免疫制御研究部門

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と各試験法



アレルギーの分類 : Coombs & Gell分類

アレルギーの型	I型 即時型 (アナフィラキシー型)	II型 細胞傷害型	III型 免疫複合体型 (アルサス型)	VI型 遅延型 (ツベルクリン型)
作用因子	液性免疫(抗体中心) IgE, Th2	液性免疫(抗体中心) IgG, IgM	液性免疫(抗体中心) IgG, IgM (免疫複合体)	細胞性免疫 (リンパ球中心) 感作T細胞 Th1/Th2/Th17
補体関与	-	+	+	-
発生機序	● マスト細胞上のIgE が抗原が架橋し、 マスト細胞 からケミカルメディエーターが放出	● 抗体が自己細胞に結合し、補体活性化やMΦによる貪食誘導し、細胞を傷害	● 免疫複合体 (抗原+抗体)が組織に沈着し、補体の活性化等を介し組織侵害	● 感作T細胞が抗原と反応し、サイトカインを放出し細胞性免疫を惹起
反応時間	15~30分	数分~数時間	4~8時間	24~48時間
主な関連疾患	<ul style="list-style-type: none"> ● 気管支喘息 ● アレルギー性鼻炎 ● アナフィラキシーショック ● アトピー性皮膚炎 ● 食物アレルギー ● じんま疹の一部 ● 薬物アレルギーの一部 	<ul style="list-style-type: none"> ● 自己免疫性溶血性貧血(AIHA) ● 特発性血小板減少性紫斑病(ITP) ● Goodpasture症候群 ● Rh不適合妊娠 ● 慢性甲状腺炎 ● Basedow病 	<ul style="list-style-type: none"> ● 血清病 ● ループス腎炎(SLE) ● 急性糸球体腎炎 ● 過敏性肺(臓)炎 ● アレルギー性気管支肺 ● アスペルギルス症 ● Arthus反応 	<ul style="list-style-type: none"> ● アレルギー性接触皮膚炎 ● 移植片対宿主病(GVHD) ● サルコイドーシス ● パッチテスト ● ツベルクリン反応 ● リンパ球刺激テスト(LST)
	<p>↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">呼吸器感作性</div> 			<p>↓</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;">皮膚感作性</div> 

ハプテンによる感作誘導の作用機序とTh1/Th2/Th17分化誘導

化学物質 = ハプテン

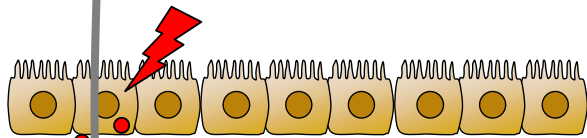
修飾される

- ・ 血清アルブミン
- ・ 細胞質蛋白など

ハプテン

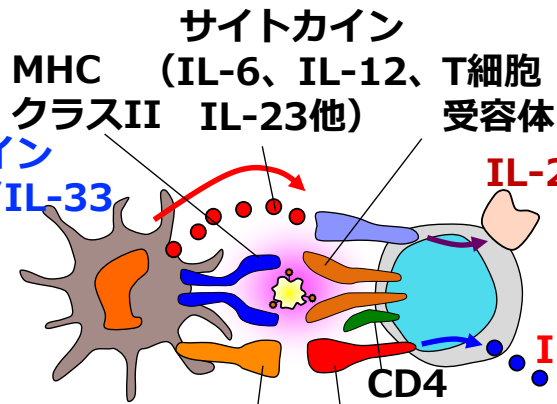
- ・ 免疫原性を欠き、反応原性のみを持ち、特異的抗体と反応はするが、リンパ球の増殖や分化を誘導しない性質をもつ不完全抗原
- ・ ハプテンは高分子のキャリアー蛋白質と結合することにより免疫原性をもつようになる

異物化



DAMPs
炎症性サイトカイン
TSLP/IL-25/IL-33

成熟化
遊走



自然免疫系の
活性化必須

CD86/80
共刺激シグナル

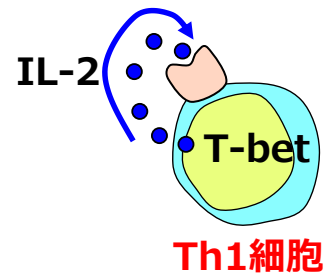
未成熟
樹状細胞

成熟
樹状細胞

ナイーブ
CD4⁺T細胞

炎症局所

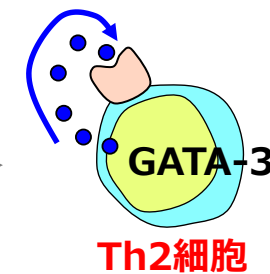
リンパ節



細胞性免疫・CTL
皮膚アレルギー
→ IFN-γ

Th1細胞

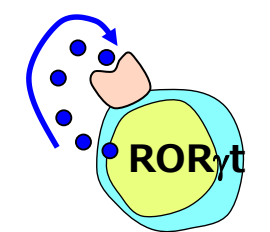
IL-12
IL-4



液性免疫・抗体
呼吸器アレルギー
皮膚アレルギー
IL-4
IL-5
IL-9
IL-13

Th2細胞

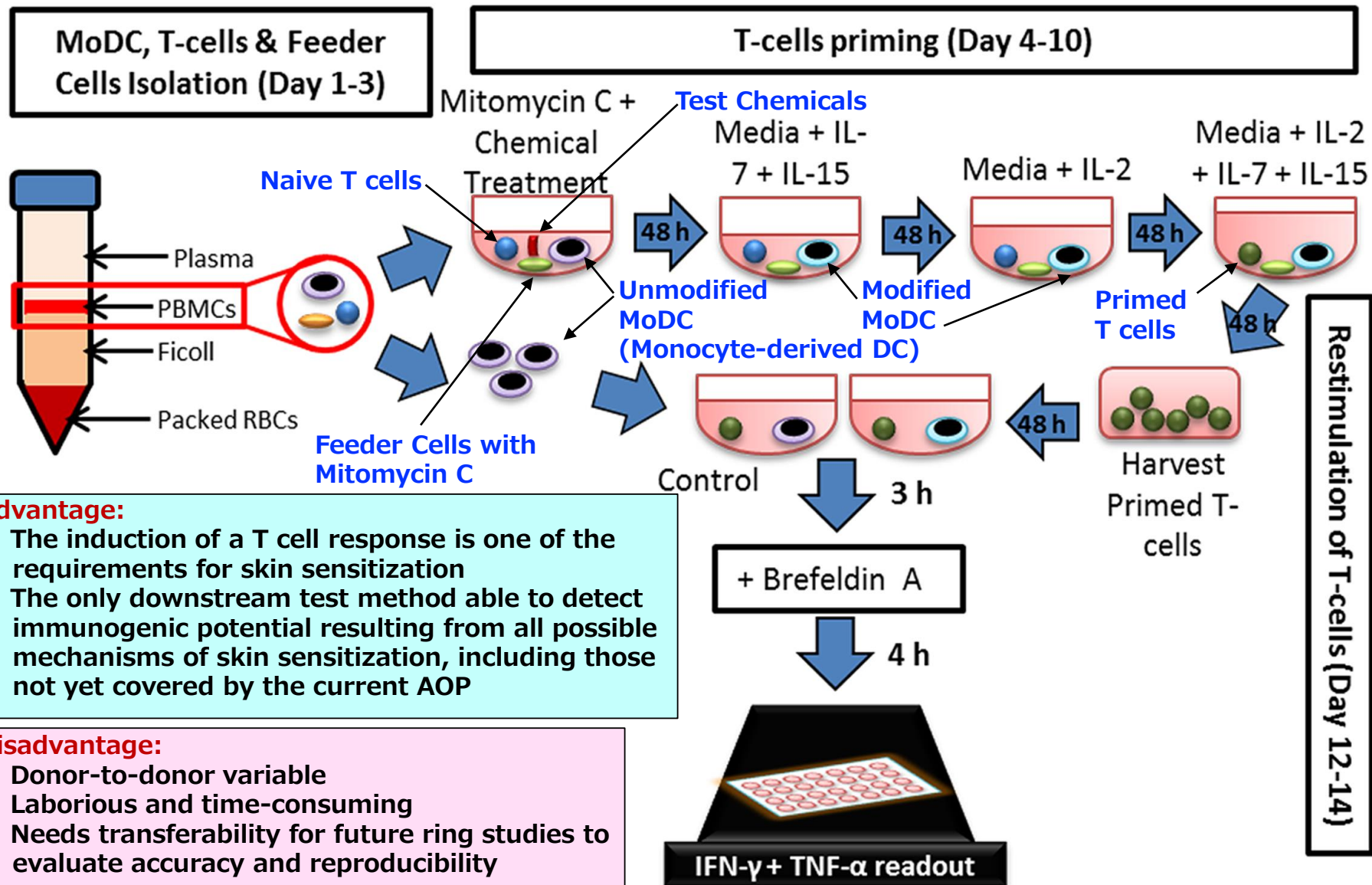
IL-23/
IL-6/
TGF-β



自己免疫・炎症
皮膚アレルギー
IL-17
IL-22

Th17細胞

Human T Cell Priming Assay (hTCPA) : The Current Protocol Still Needs Further Refinement and Simplification



Advantage:

1. The induction of a T cell response is one of the requirements for skin sensitization
2. The only downstream test method able to detect immunogenic potential resulting from all possible mechanisms of skin sensitization, including those not yet covered by the current AOP

Disadvantage:

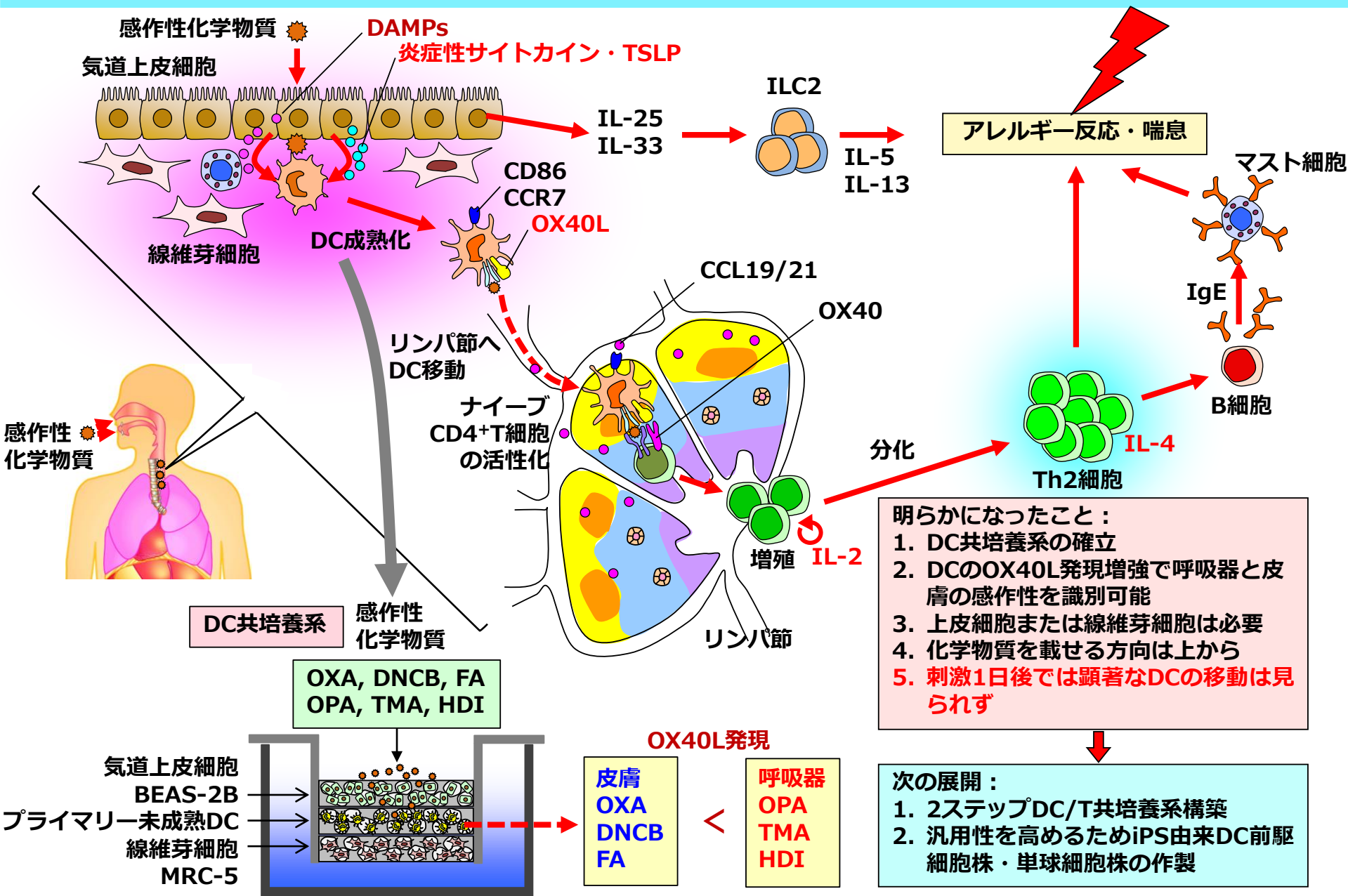
1. Donor-to-donor variable
2. Laborious and time-consuming
3. Needs transferability for future ring studies to evaluate accuracy and reproducibility

→hTCPA still needs further refinement and simplification.

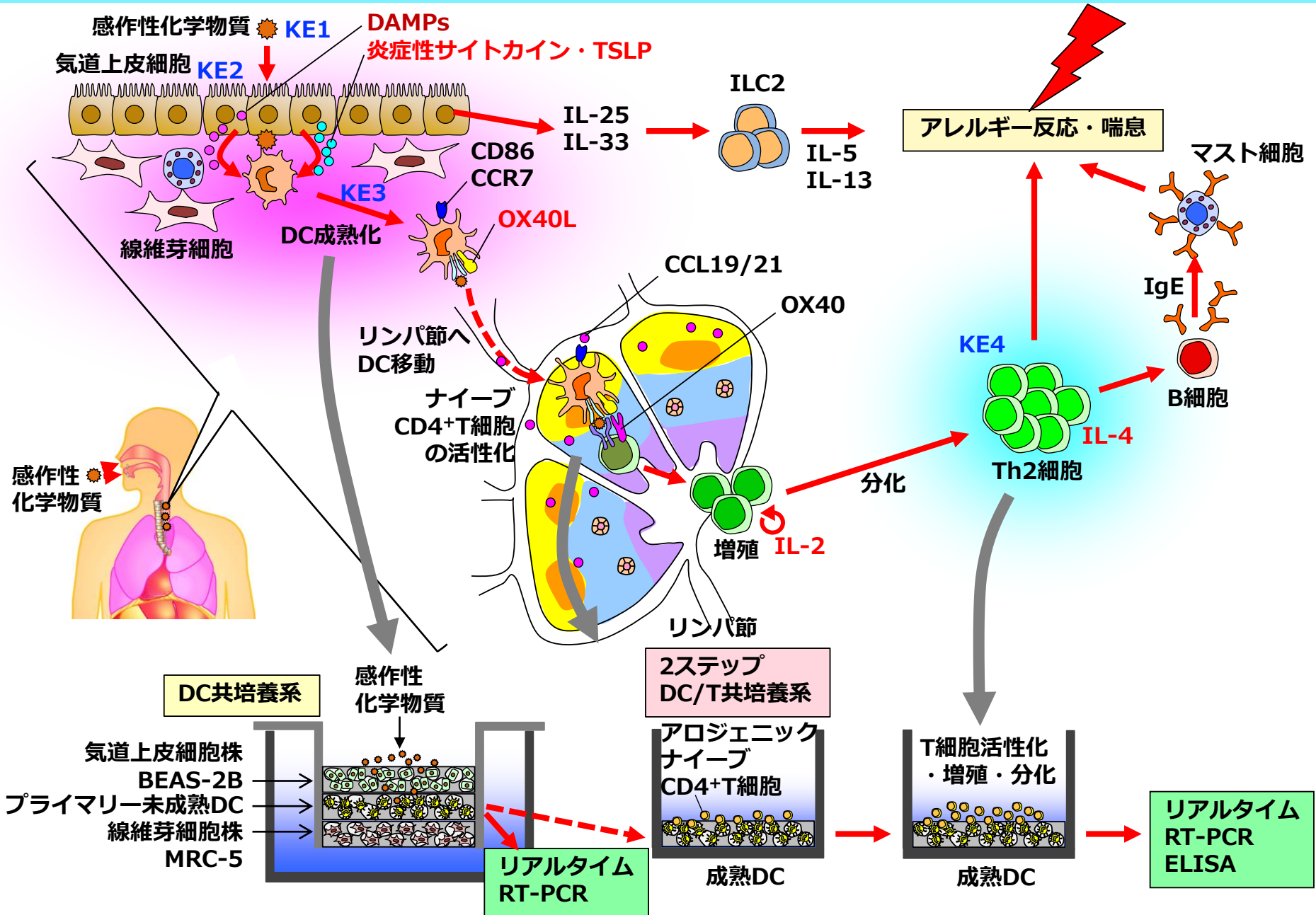
The Cosmetics Europe Skin Tolerance Task Force workshop 2016
van Vliet et al. ALTEX 2018

Richter et al. Toxicol in Vitro 2013
Wong et al. Front Pharmacol. 2015

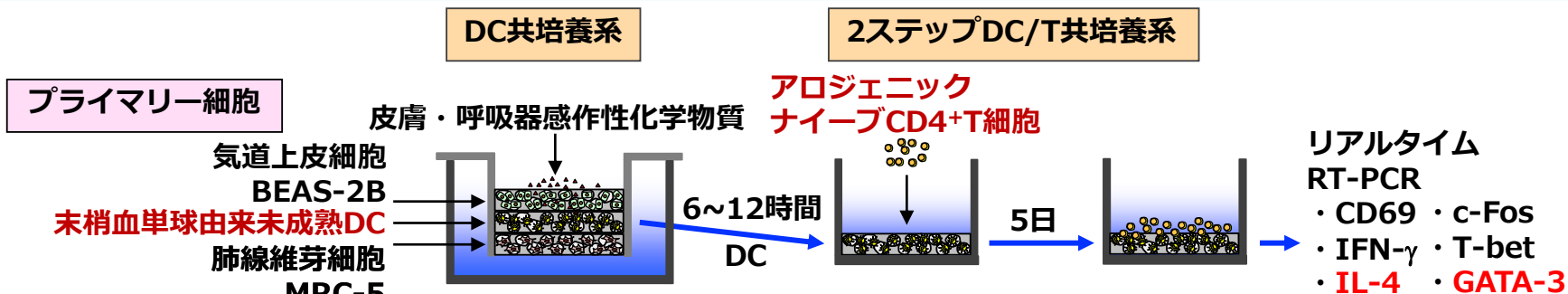
ヒト末梢血単球由来DCを用いたDC共培養系によりDCでのOX40L発現増強の違いにより皮膚と呼吸器の感作性化学物質の識別が可能



感作性化学物質で刺激したDCでCD4⁺T細胞を活性化する 新規2ステップDC/T共培養系の構築

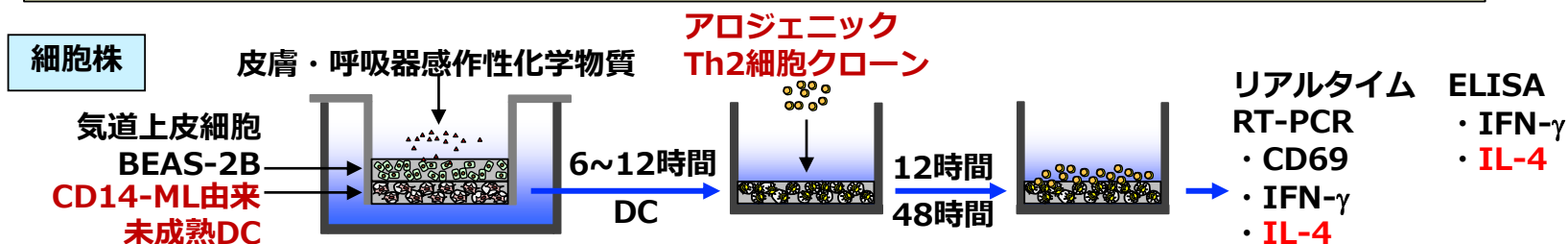


T細胞の活性化であるKey Event 4を指標にした評価系の開発



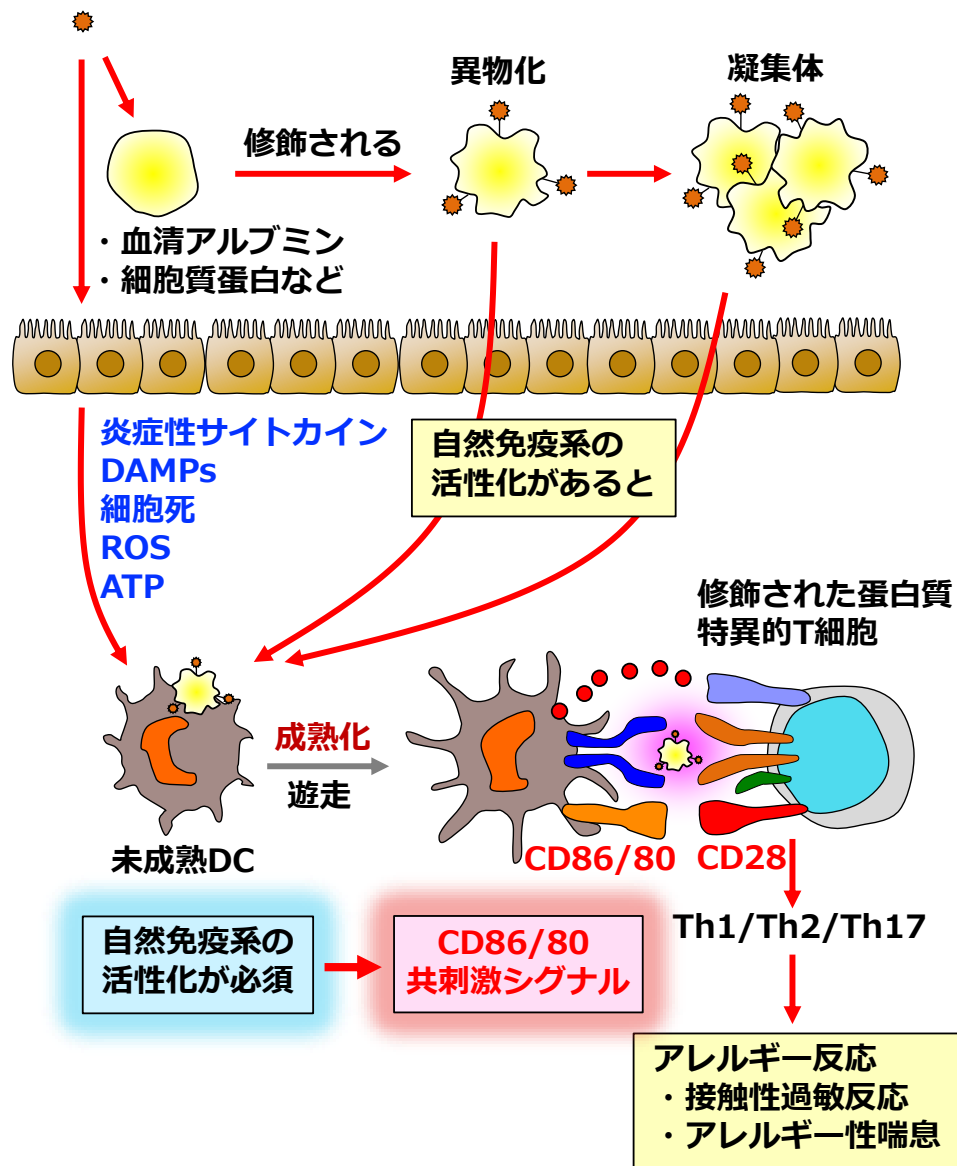
【本2ステップ3次元DC/T共培養系確立のための仮定と特徴】

1. 生体内を模倣した気道上皮細胞と未成熟DC、CD4⁺T細胞の時空間の流れも再現した3次元共培養系
2. 化学物質を加える方向は上皮→DCへと上から加える
3. DCは抗原を捕らえ成熟化するとリンパ節へ移動するので2ステップの系
4. 未成熟DCは、抹消血単球由来DCと株化細胞として単球細胞株CD14-MLを使用
5. 誘導されるアレルギー反応は、ハプテンが結合する蛋白質の種類に依存する割合は低いので、反応性の高いアロ抗原を使用
6. ナーブT細胞が理想だが、メモリーT細胞ではあるがヒトアロ抗原特異的Th2細胞クローンを使用
7. プライマリーのT細胞より、T細胞クローンの方が反応性が高い
8. Th2細胞の究極のマーカ―はTh2分化誘導因子でTh2細胞のエフェクターサイトカインであるIL-4

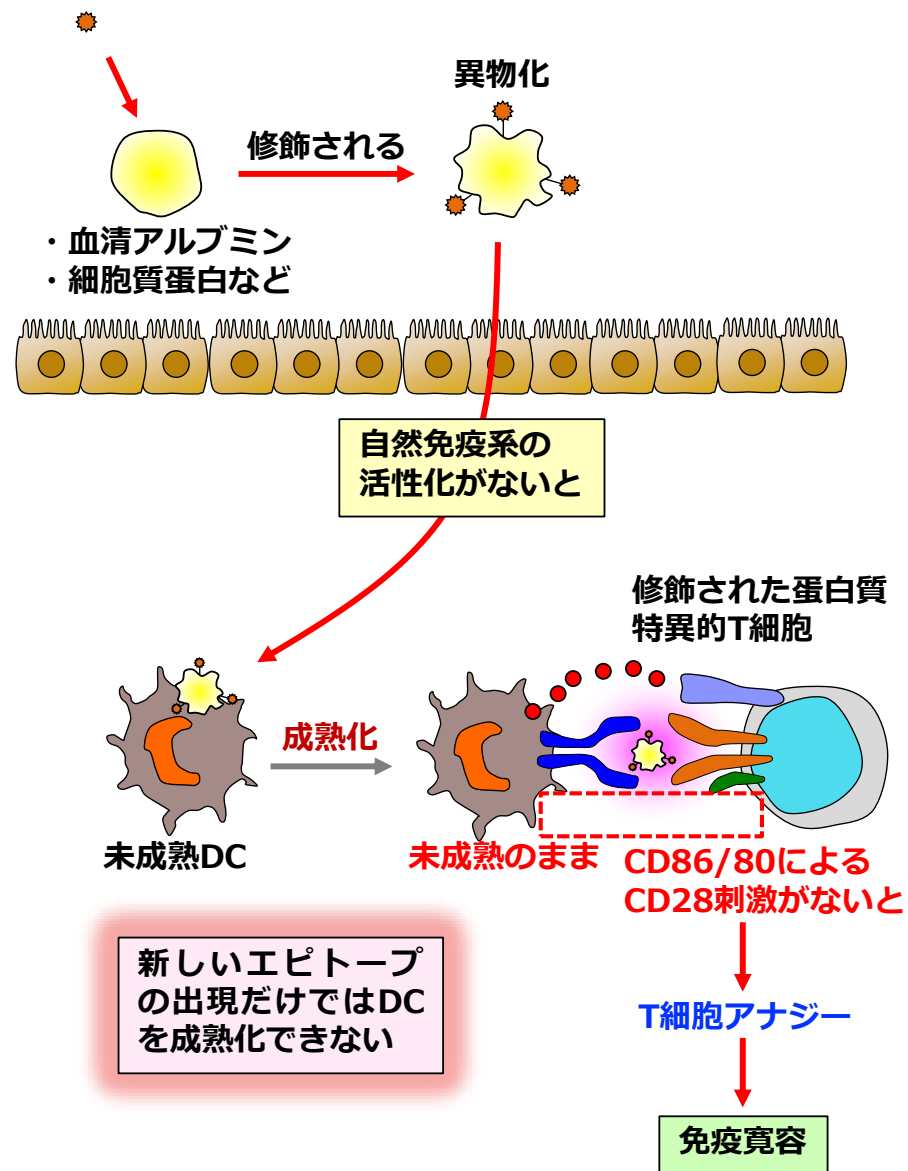


ハプテンの作用機序：感作性は、ハプテンが結合する蛋白質の種類には大きくは依存しないが、自然免疫系の活性化は必須

化学物質 = ハプテン

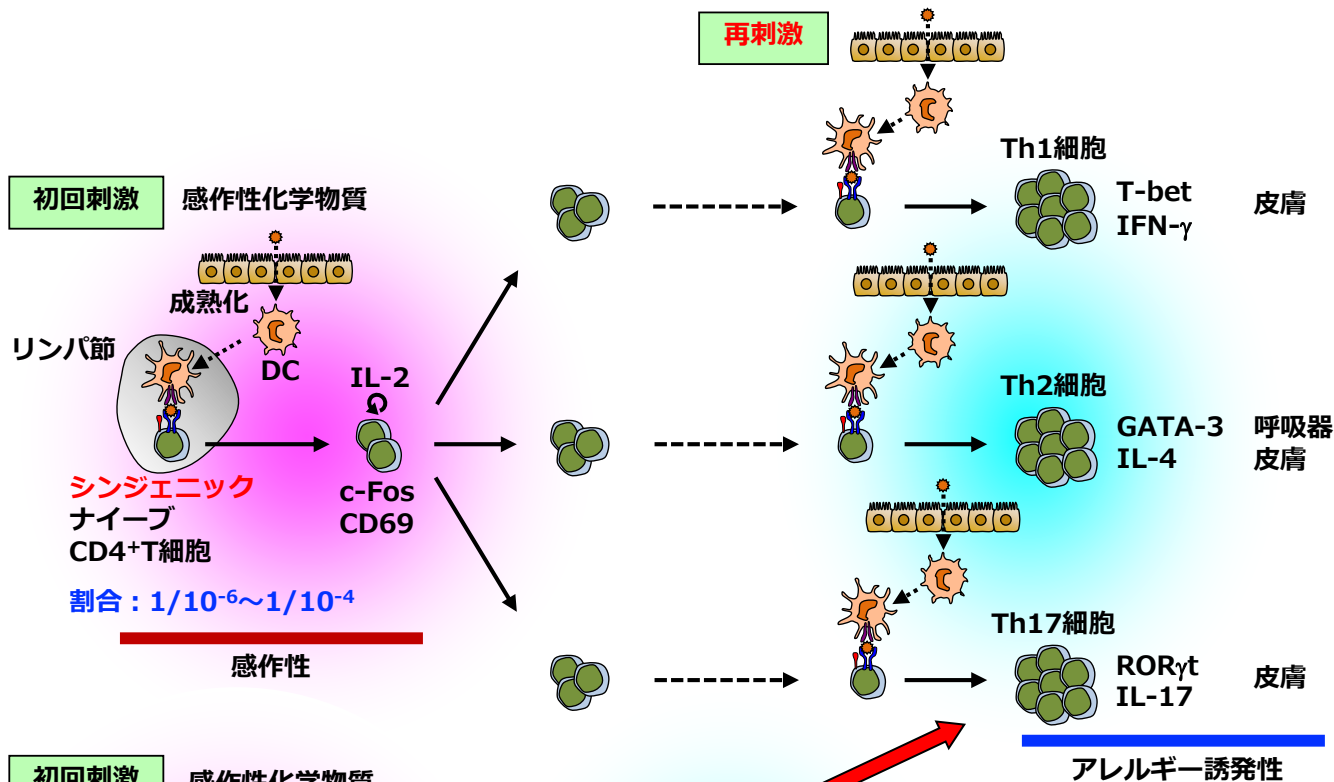


化学物質 = ハプテン

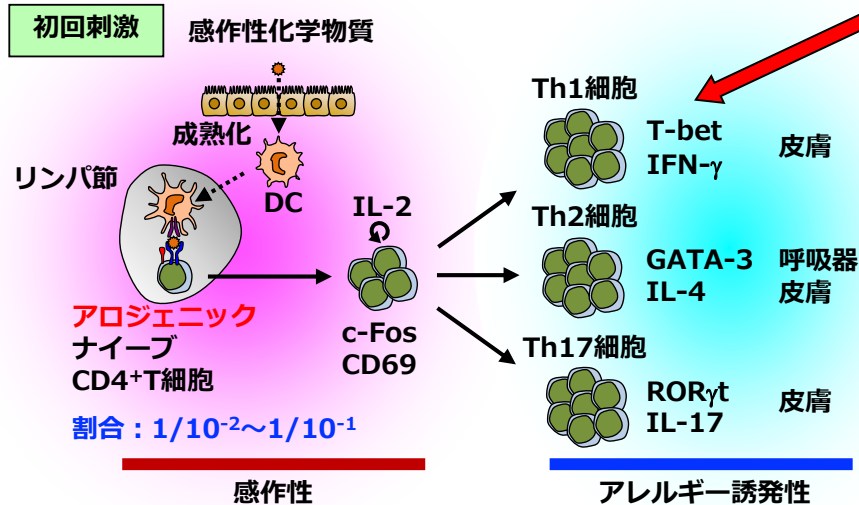


シンジェニック反応とアロジェニック反応： アロジェニック反応は、初回の刺激で末梢血T細胞の~10%が反応するほど強力

シンジェニック反応



アロジェニック反応



Scaffoldを用いたDC共培養系の構築方法

ヒト気道上皮細胞：BEAS-2B

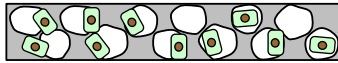
ヒト末梢血CD14+単球

ヒト線維芽細胞：MRC-5

0日目

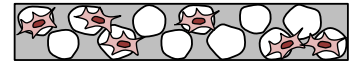
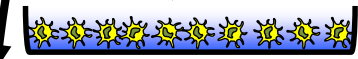


4日目



1.5×10^6

GM-CSF 50 ng/ml
/IL-4 10 ng/ml



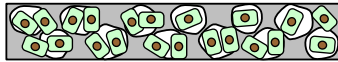
1.5×10^6

6日目



$0.7-1 \times 10^6$

7日目

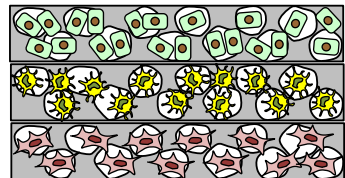


GM-CSF/IL-4

未成熟DC



12穴インサート



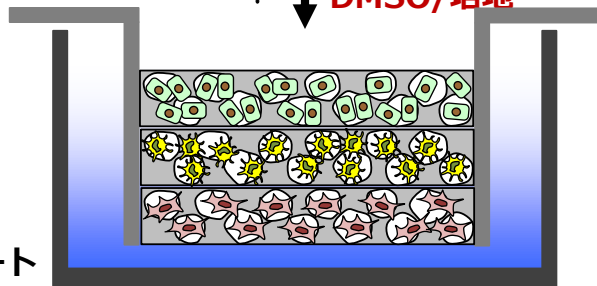
気道上皮細胞

未成熟DC

線維芽細胞

30 μ l 感作性化学物質 in 10~16%
DMSO/培地

12穴プレート



9時間

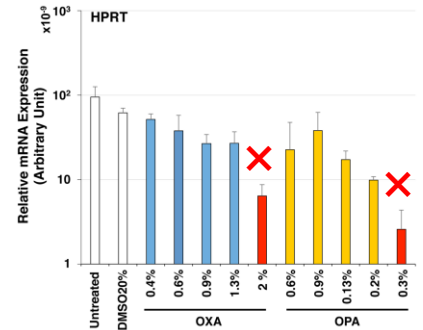
リアルタイムRT-PCR・ELISA (n=3)

5 μ l 感作性化学物質
× 6箇所

12穴インサート



30分放置後
培地2 ml添加



代表的皮膚感作性化学物質：

- OXA (Oxazolone)
- FA (Formaldehyde)
- DNCB (2,4-Dinitrochlorobenzene)

代表的呼吸器皮膚感作性化学物質：

- OPA (o-Phthaldialdehyde)
- HDI (Hexamethylene diisocyanate)
- TMA (Trimellitic anhydride)

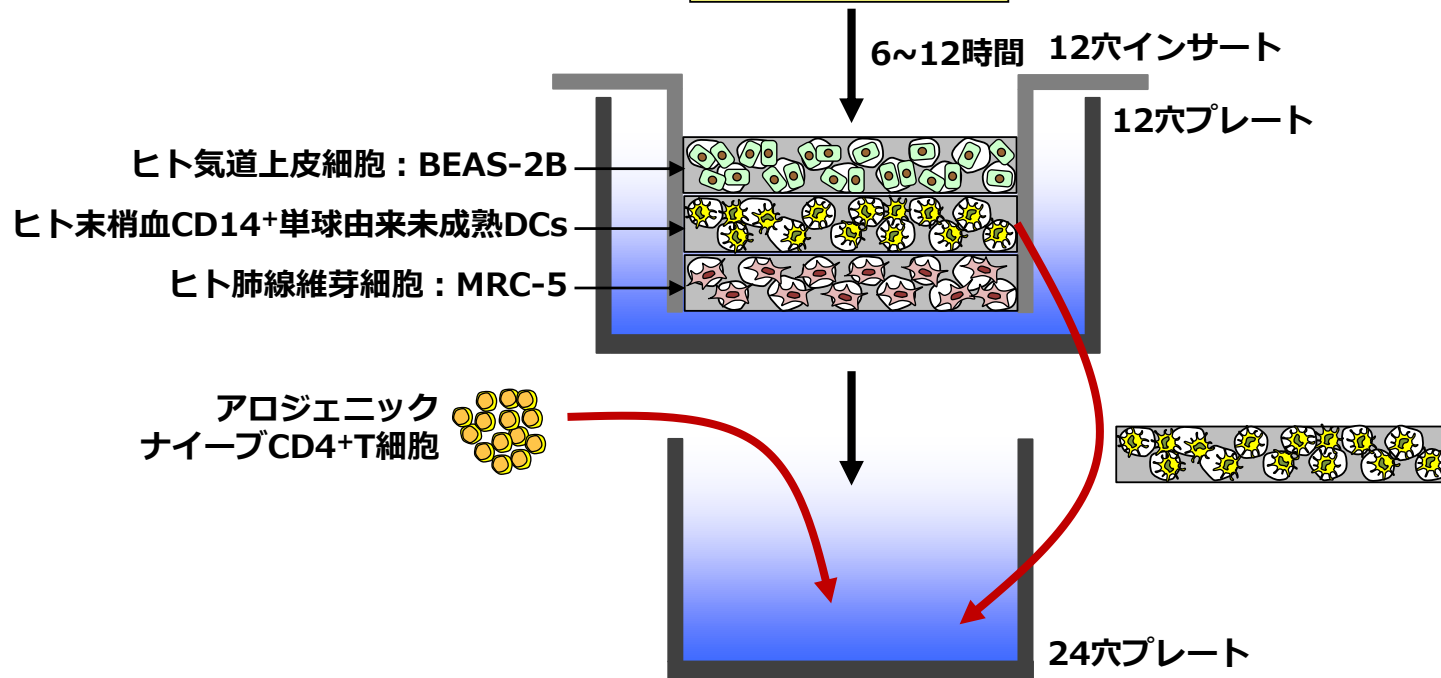
8日目

感作性化学物質で刺激したDCでCD4⁺T細胞を活性化する 新規2ステップDC/T共培養系の構築方法

7日目

3次元DC共培養系

8日目



12日目

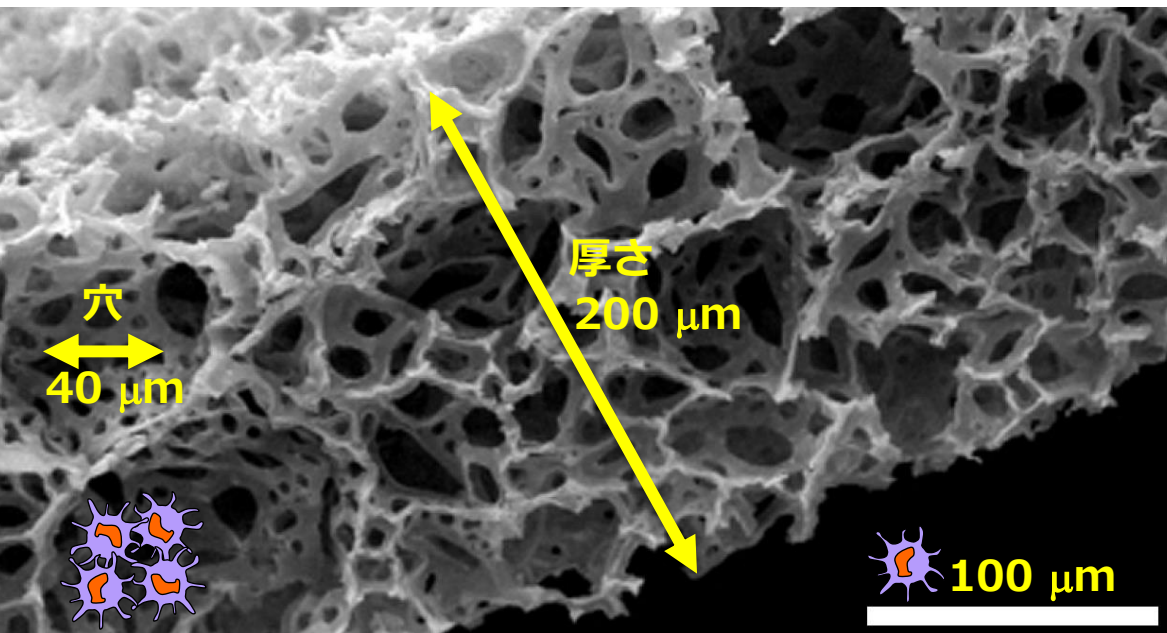
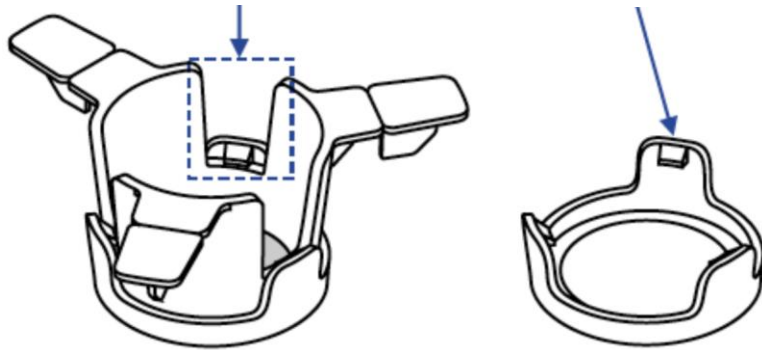
2, 5, 7日

リアルタイムRT-PCR・ELISA (n=3)

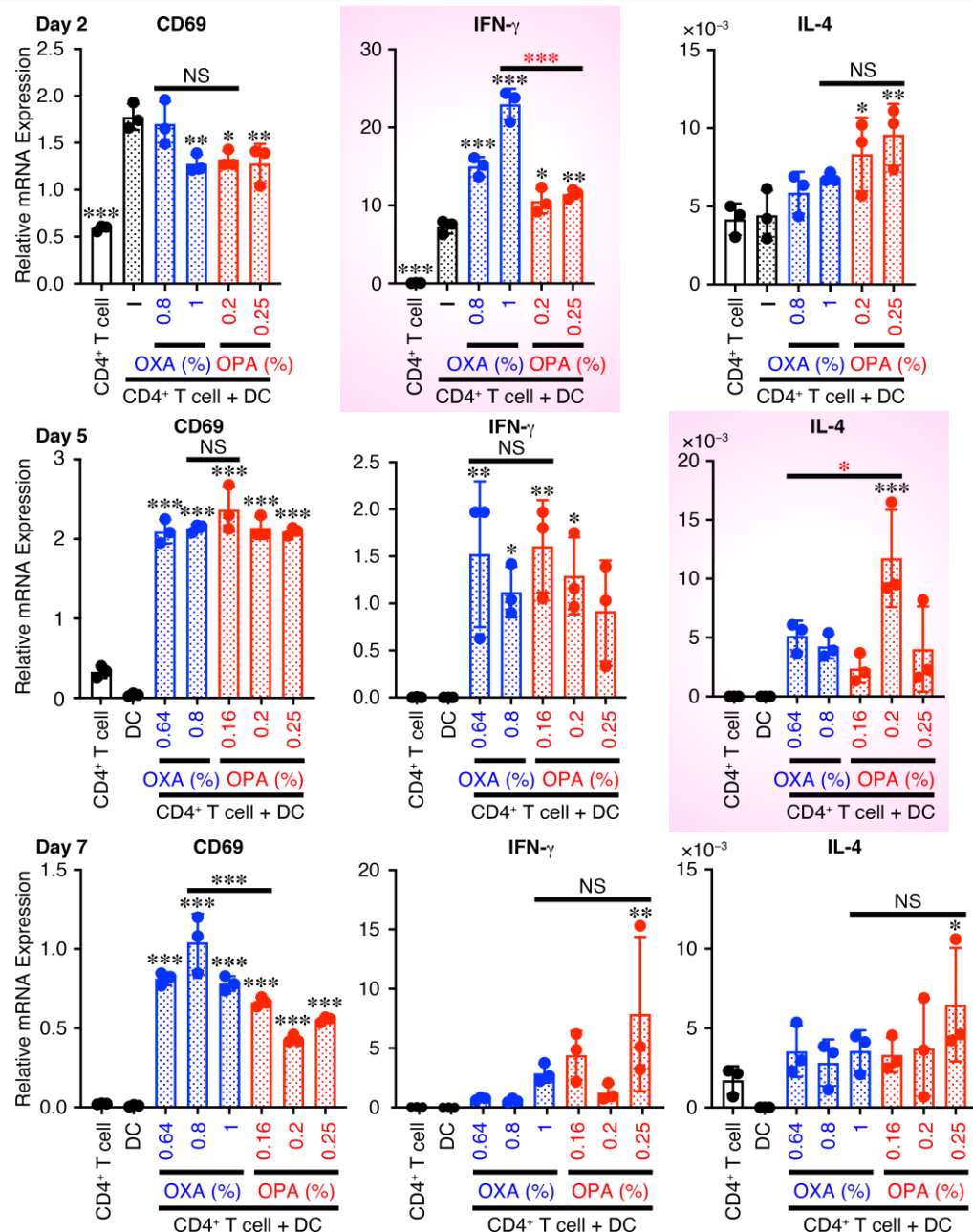
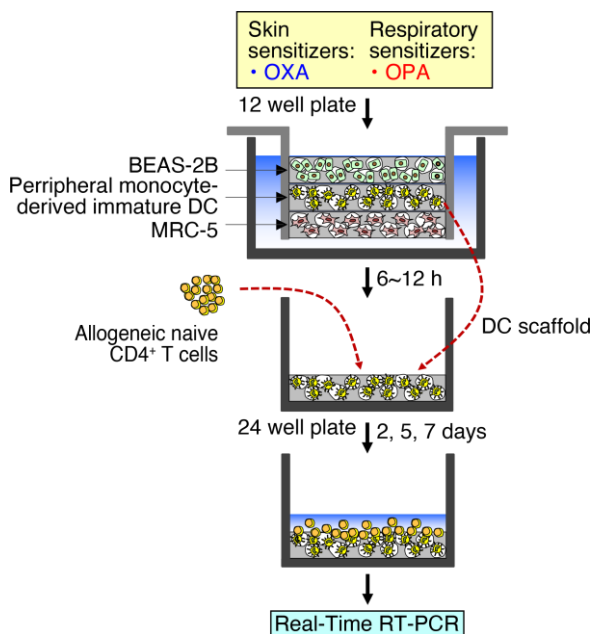
Alvetex® Scaffold (ポリスチレン性の多孔質足場材) : Scaffold膜の無菌的脱着可能 → 生体内の3次元的な細胞間相互作用を反映

Reinnervate Ltd.

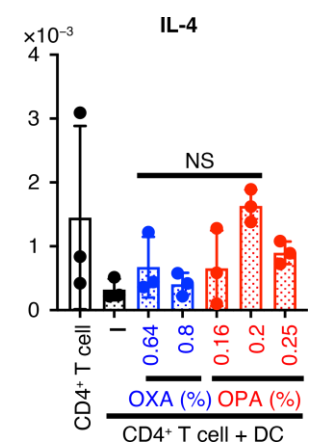
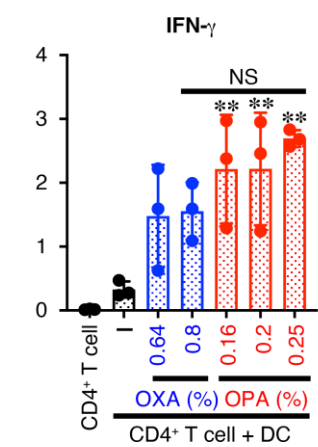
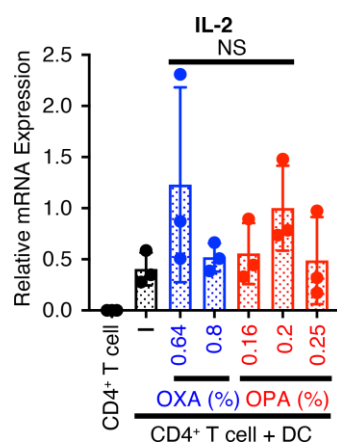
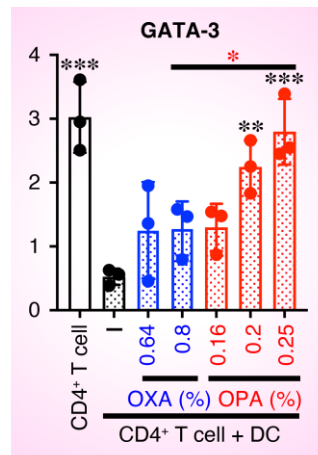
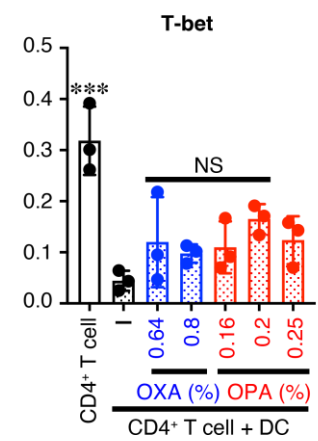
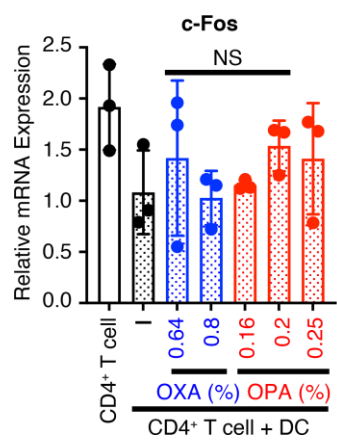
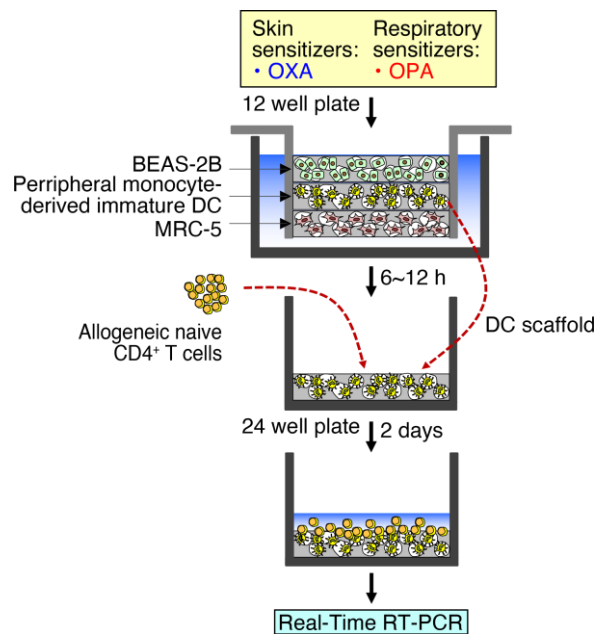
インサートの窓 インサート底のホック



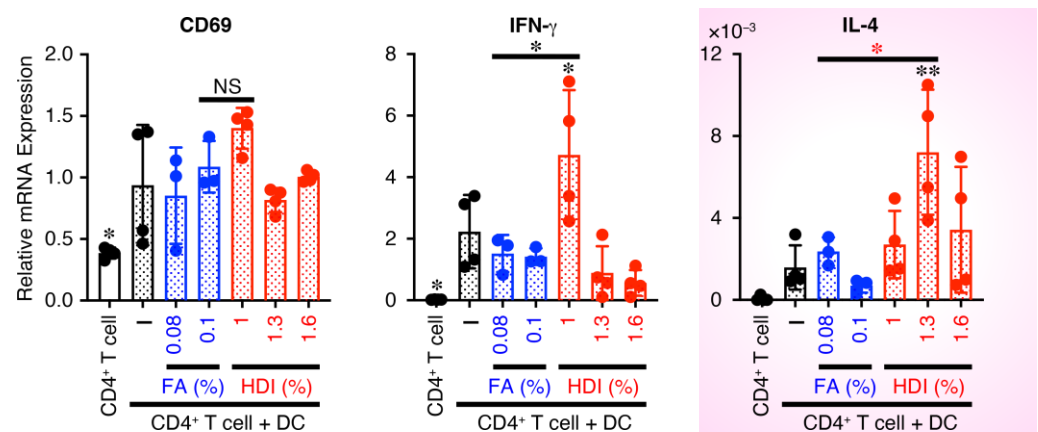
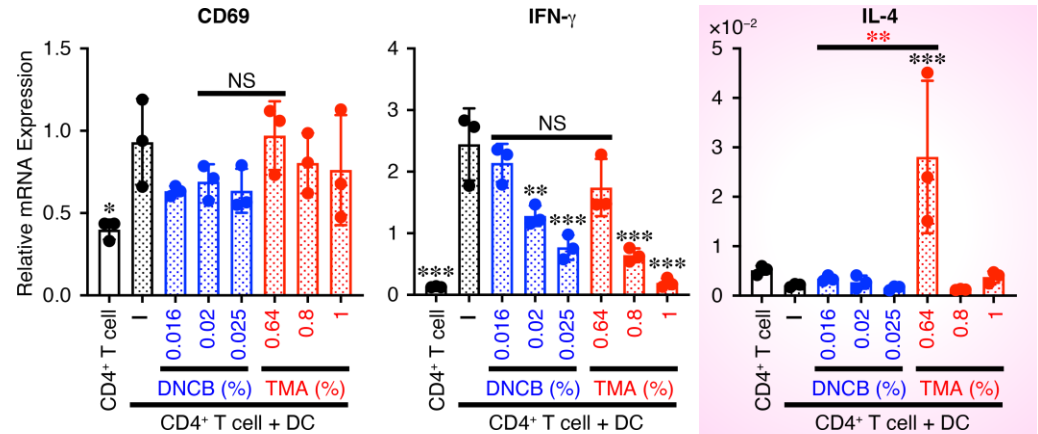
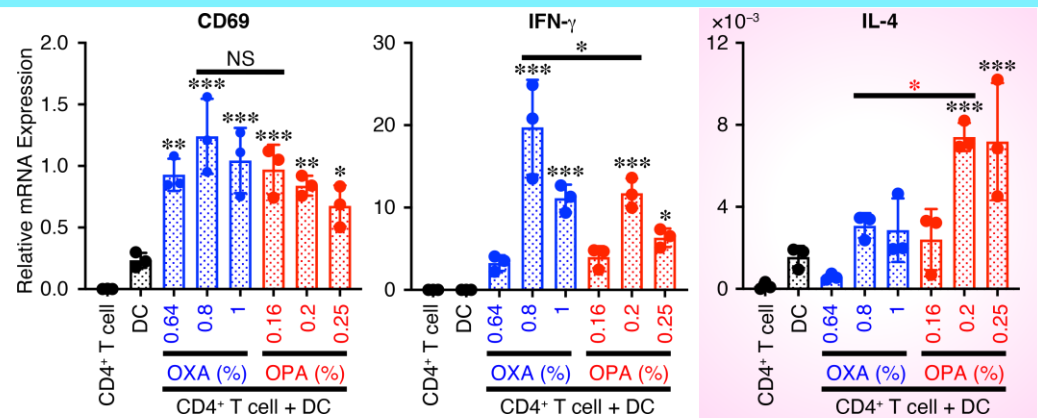
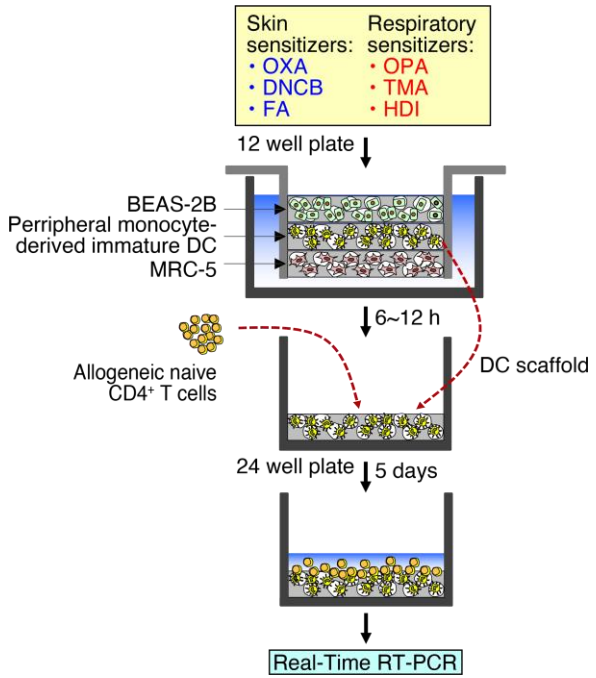
末梢血単球由来未成熟DCを用いた2ステップDC/T共培養系での呼吸気感作性化学物質によるT細胞でのIL-4発現の選択的増強 (Day 2, 5, 7)



末梢血単球由来未成熟DCを用いた2ステップDC/T共培養系での呼吸気感作性化学物質によるT細胞でのGATA-3発現の選択的増強 (Day 2)

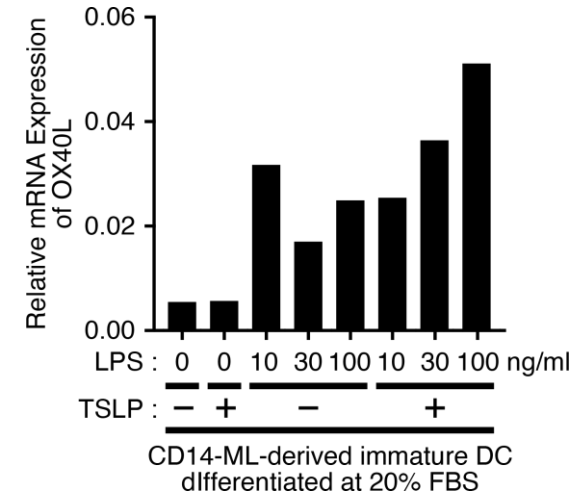
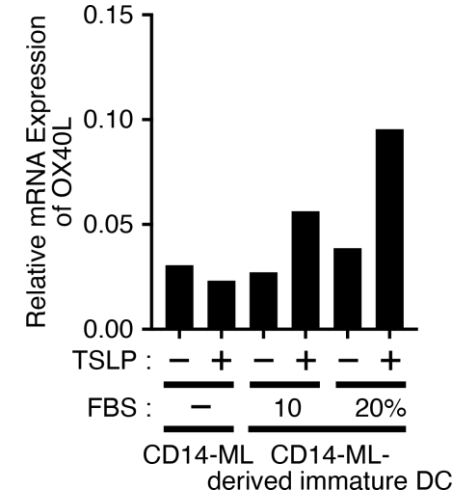
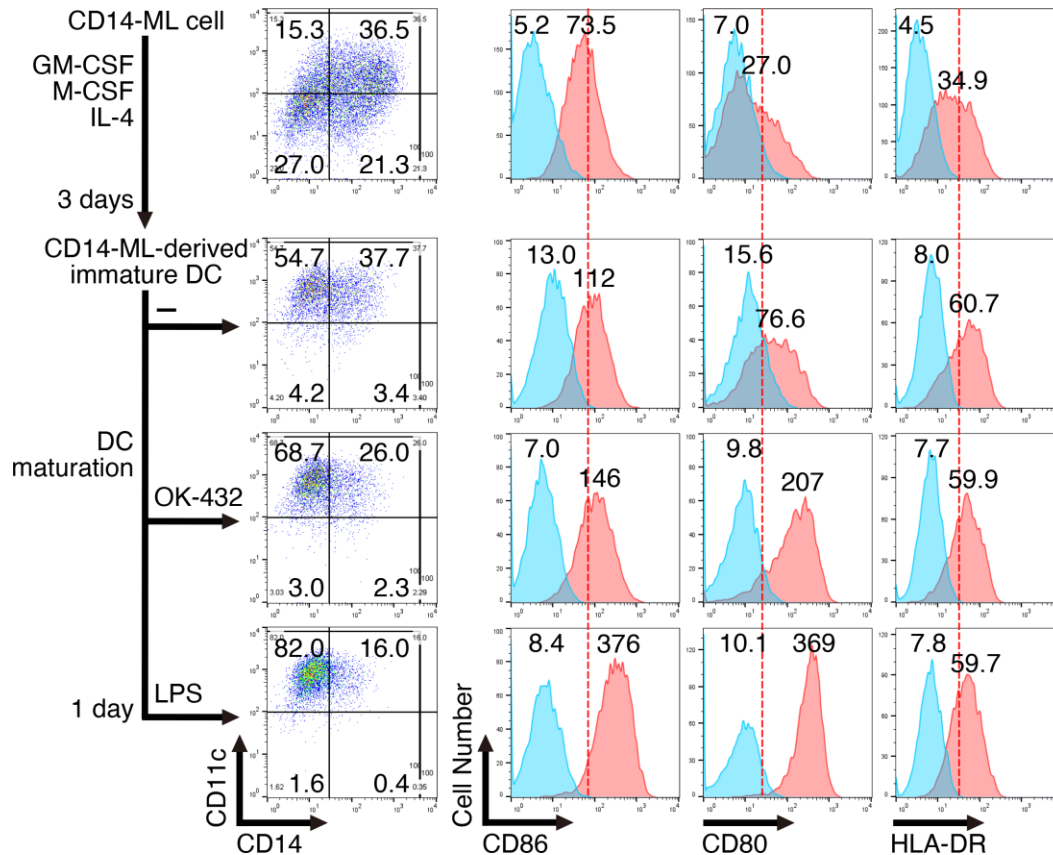
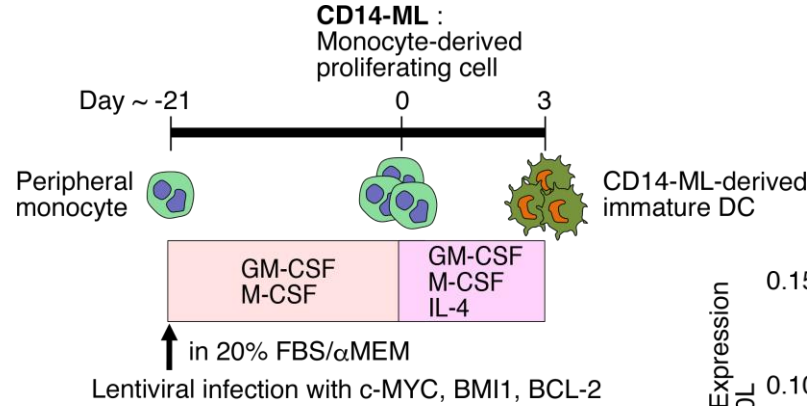


末梢血単球由来未成熟DCを用いた2ステップDC/T共培養系での呼吸気感作性化学物質によるT細胞でのIL-4発現の選択的増強 (Day 5)

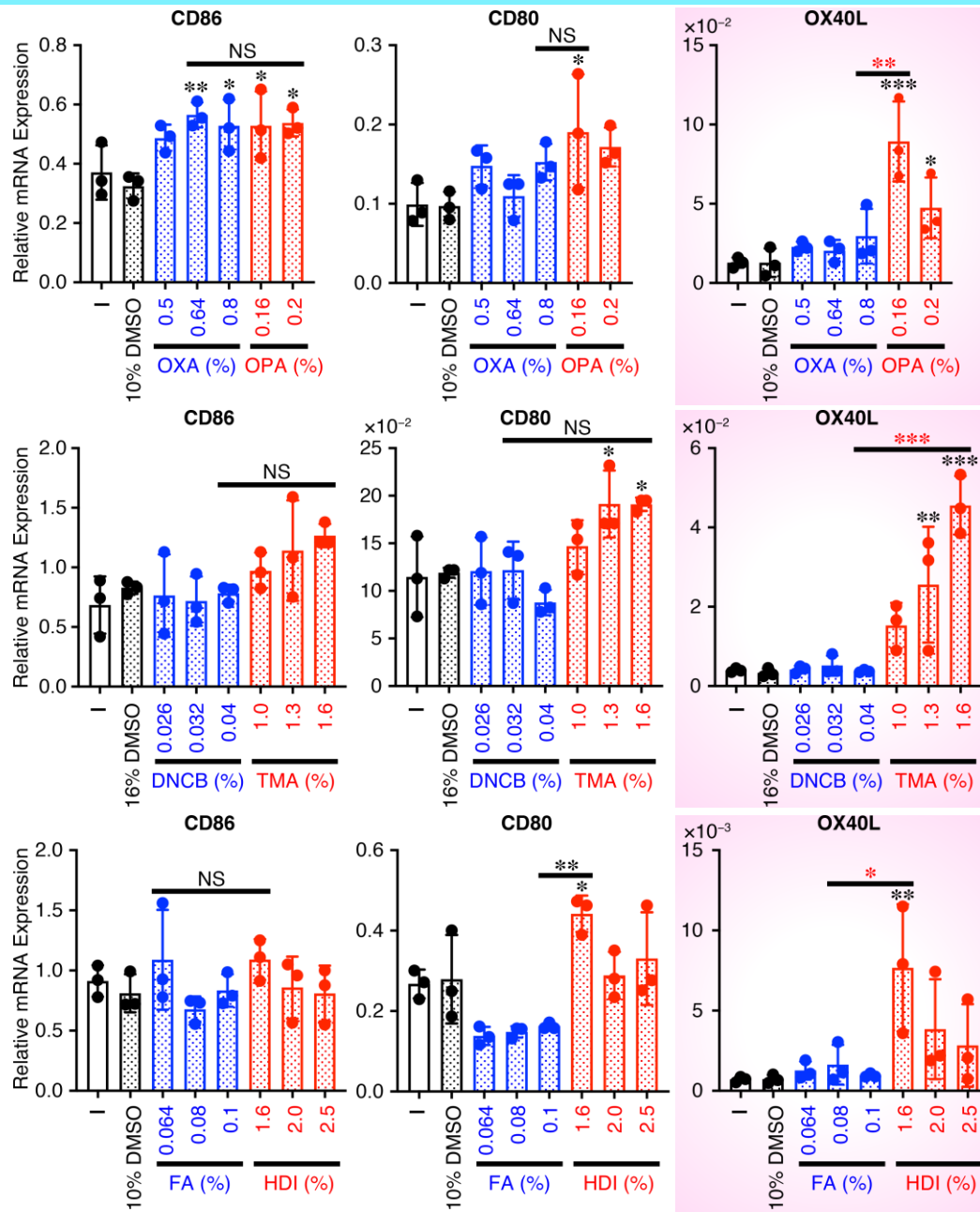
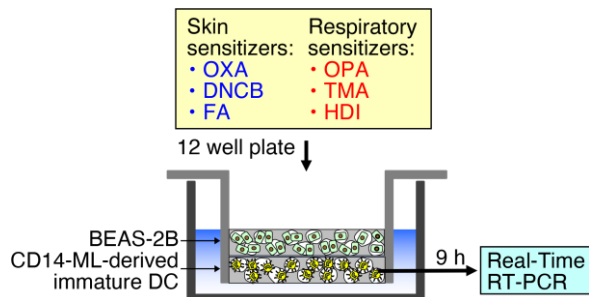


CD14-ML : ヒト単球に細胞周期や生存に関わる遺伝子 (c-MYC, BMI1, BCL-2) を導入した増殖性のヒト単球細胞株 (by 熊本大学・千住先生/西村先生・MiCAN)

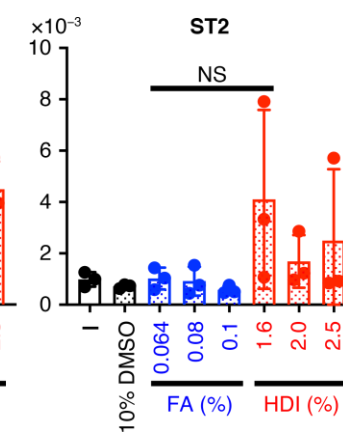
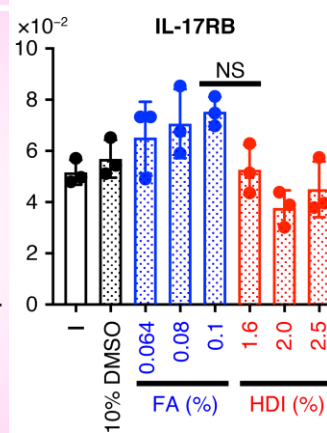
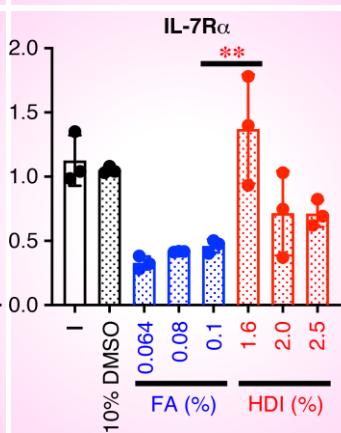
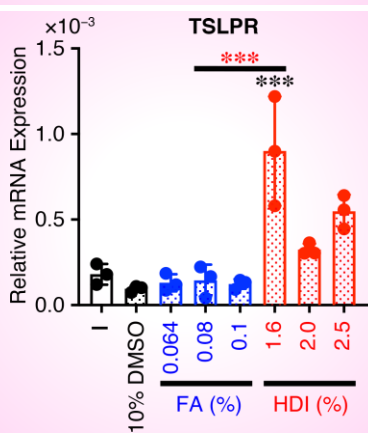
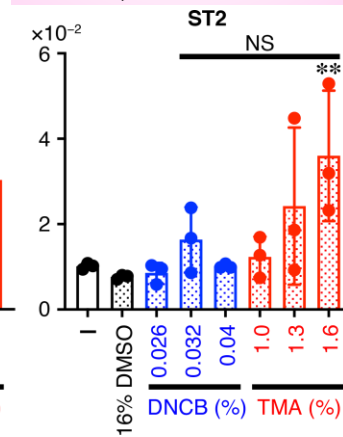
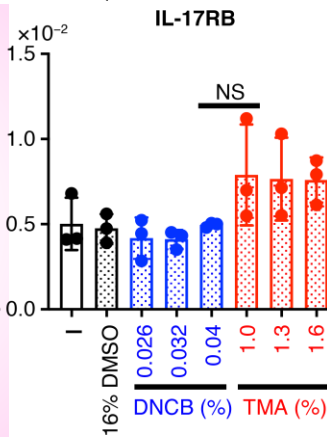
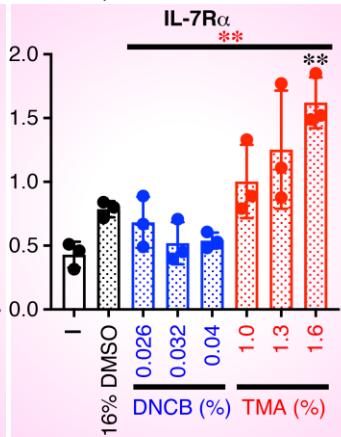
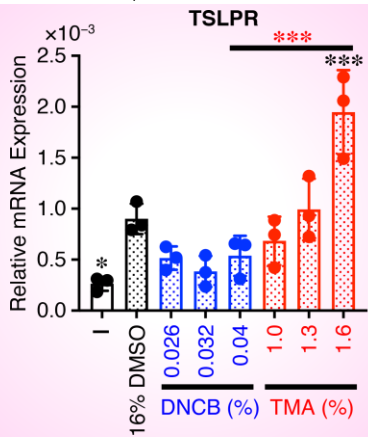
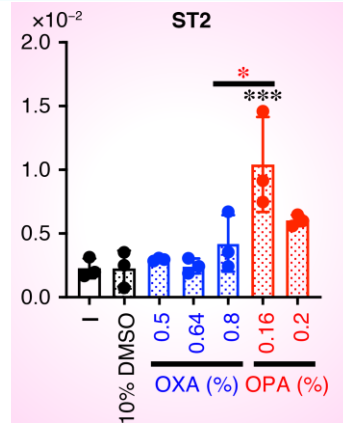
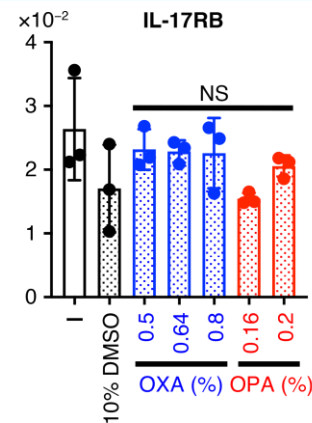
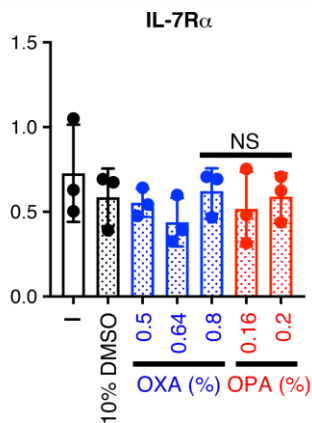
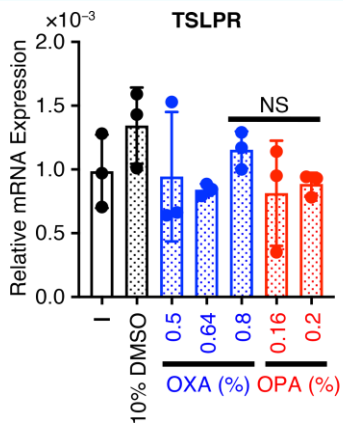
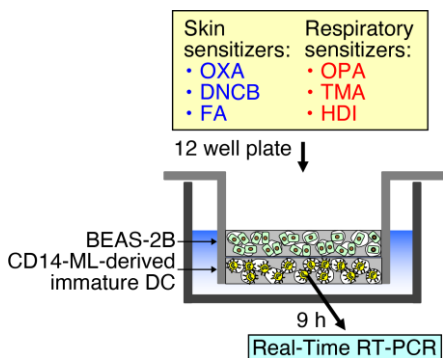
CD14-MLの作製方法 :
 熊本大学千住先生らの方法
Haruta et al. Human Immunol. 2013
Imamura et al. PLoS One 2016



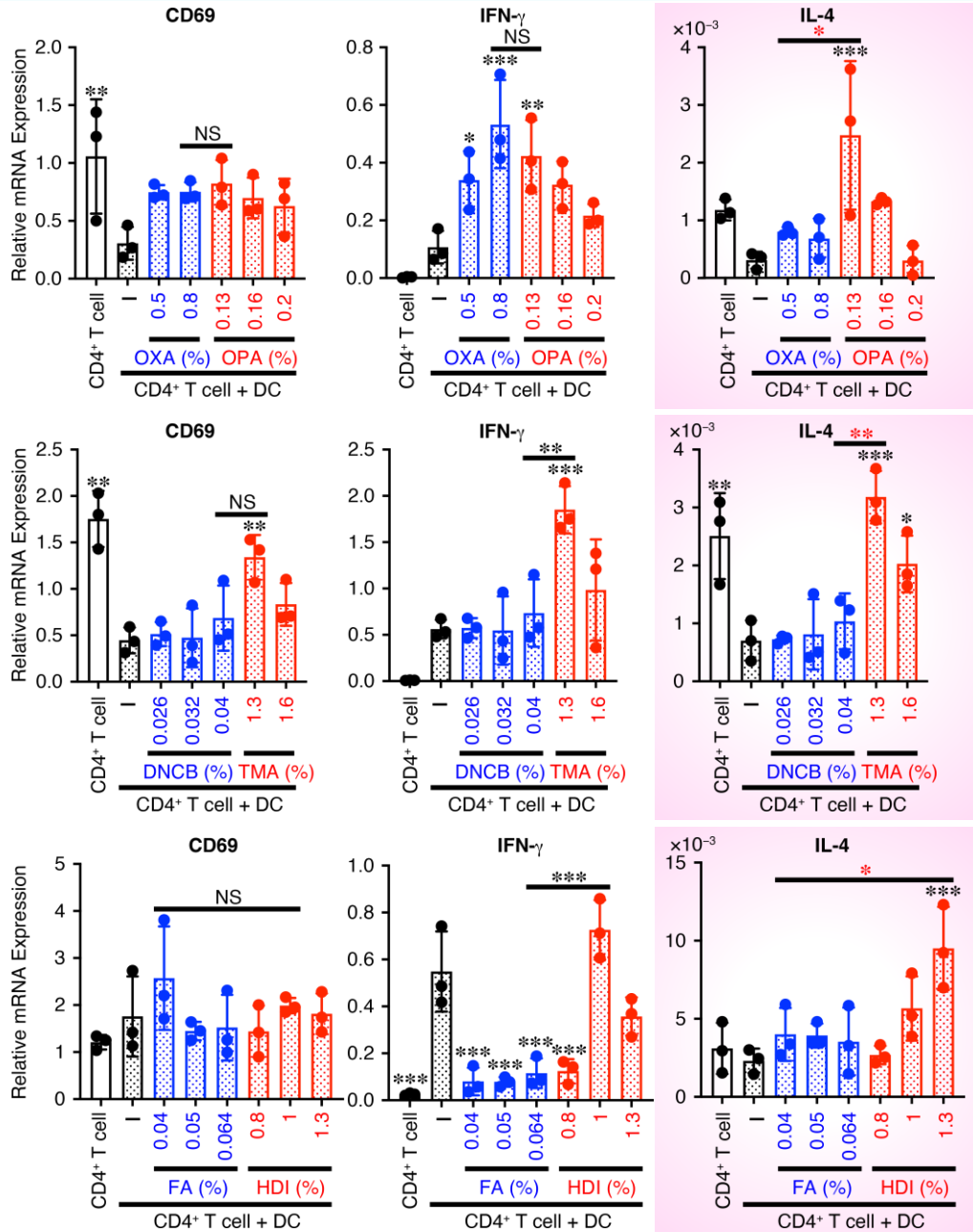
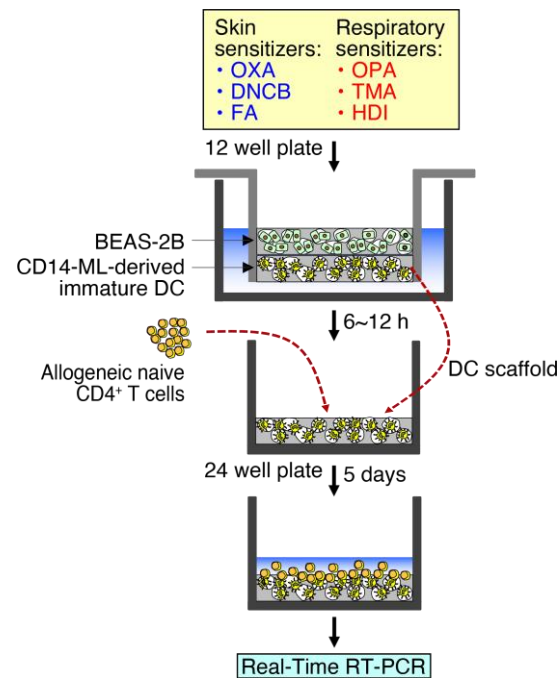
CD14-ML由来未成熟DCを用いたDC共培養系での呼吸器感作性化学物質によるDCでのOX40L発現の選択的増強



CD14-ML由来未成熟DCを用いたDC共培養系での呼吸器感作性化学物質によるDCでのTh2分化誘導関連分子の発現の選択的増強

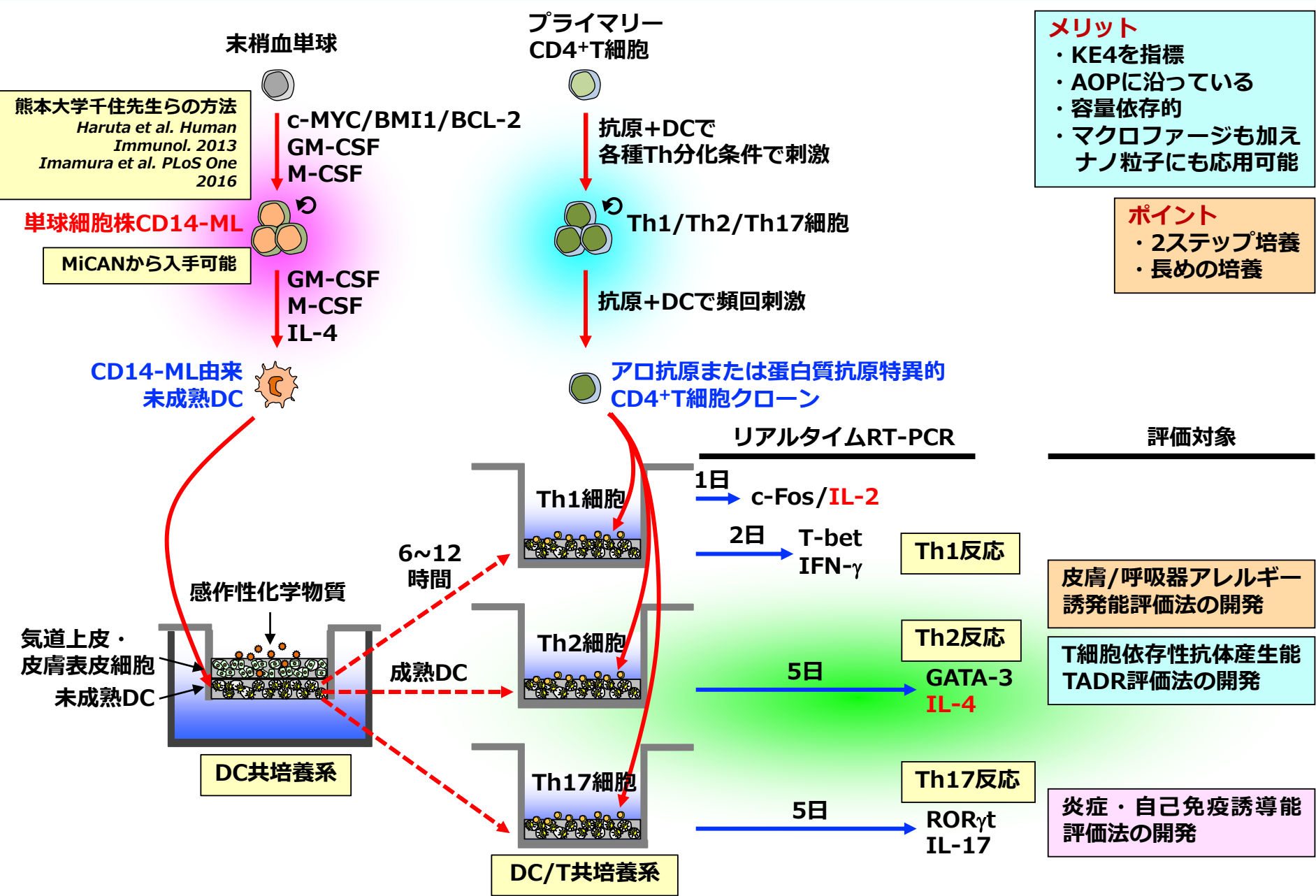


CD14-ML由来未成熟DCを用いた2ステップDC/T共培養系での呼吸気感作性化学物質によるT細胞でのIL-4発現の選択的増強



新規2ステップDC/T共培養系による

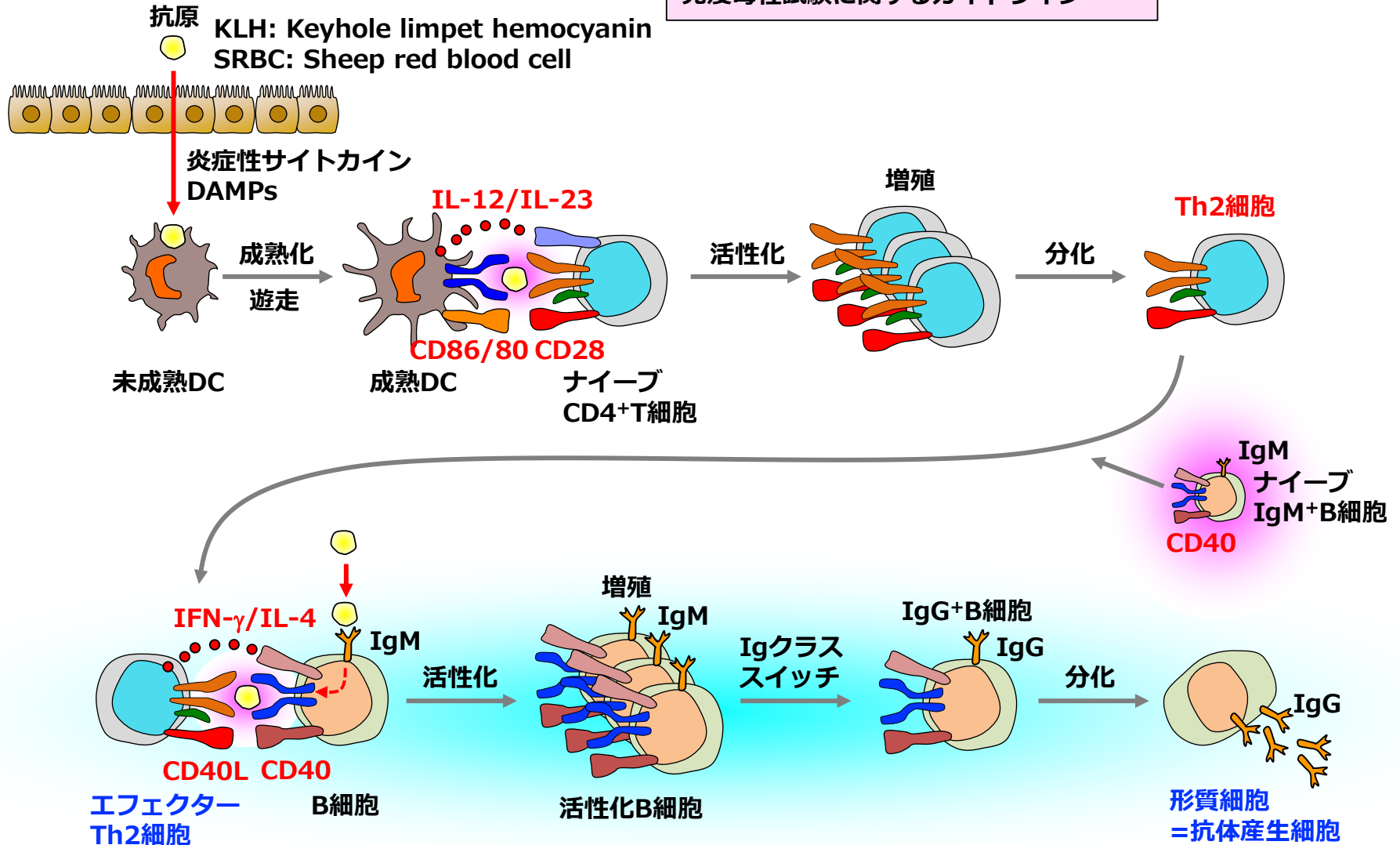
Key Event 4のT細胞を指標にした簡便なアレルギー感作性の評価系の確立



T細胞依存性抗体産生 (TDAR: T-Dependent Antibody Response)

TDAR : 免疫毒性試験のゴールドスタンダード

平成18年厚生労働省医薬品開発における
免疫毒性試験に関するガイドライン



TDARのin vitroの共培養系の評価系
は未だ開発されていない

形質細胞に分化可能な
B細胞株の作製が必要