

令和元年6月18日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08353

研究課題名(和文) 化学物質の代謝活性化を基盤とした皮膚免疫毒性物質探索システムの開発

研究課題名(英文) Development of a screening system for immunotoxic chemicals considering metabolic activation in skin

研究代表者

関本 征史 (SEKIMOTO, Masashi)

麻布大学・生命・環境科学部・准教授

研究者番号：10381732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、皮膚感作性物質による皮膚免疫毒性発現における異物代謝酵素の役割を解析することを目指した。ヒト皮膚角化細胞HaCaTに対して種々レポーター遺伝子を導入し、その有用性を評価した結果、HaCaT-Nrf2-Luc細胞が免疫毒性を反映していることが示された。この細胞を使って皮膚感作性物質による免疫毒性発現における異物代謝酵素の役割を解析したところ、ある種の皮膚感作性物質はHaCaT細胞内に発現しているP450酵素により活性化/解毒され、その免疫毒性が変化することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、皮膚細胞内に発現している異物代謝酵素が化学物質の免疫毒性発現に重要な役割を果たしていることが示された。本研究結果は、より高精度な *iv vitro* 免疫毒性試験(動物を使用しない試験)の確立に繋がる。また、本研究をさらに発展させることにより、異物代謝酵素の遺伝子多型によって起こるであろう免疫毒性反応(アレルギー反応)の個人差を予測・解析する上で新たな知見をもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to analyze the role of xenobiotic metabolizing enzymes in immunotoxic response in skin by skin-sensitizers. As a result of transfecting various reporter genes into human skin keratinocyte HaCaT cells and evaluating its usefulness, it was shown that HaCaT-Nrf2-Luc cells as a useful cell line for analysis of skin immunotoxicity. The role of xenobiotic metabolizing enzymes in immunotoxicity by skin-sensitizers using this cell line were examined. As a result, it was suggested that the immunotoxicity of some skin-sensitizers are changed by activation/detoxification of chemicals by P450 enzymes expressed in HaCaT cells.

研究分野：分子毒性学

キーワード：免疫毒性 皮膚感作性 レポーターアッセイ 異物代謝酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

皮膚は化学物質の曝露を受ける主要組織の一つである。環境化学物質はもちろん、外用薬、化粧品、医薬部外品などの毒性を考える上で、接触性皮膚炎などに代表される皮膚免疫毒性の予測は大きな課題となっている。特に化粧品分野では、EU 域内での動物実験が全面的に禁止されたことから、様々な *in vitro* 感作性試験の開発が精力的に進められてきた。近年開発された代表的な *in vitro* 感作性試験としては、ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞の表面抗原発現を指標とした h-CLAT 法、THP-1 細胞での IL-8 発現を指標とした IL-8 Luc Assay 法などのバイオアッセイ法、あるいはペプチドや SH 基と被検物質の物理的結合性を指標とする DPRA 法や SH 試験法、などがある。これら方法はいずれも優れた方法であるが、*in vivo* 試験とは検出できる化合物が異なることも示されており、より精度の高い *in vitro* 試験の開発が望まれている。

シトクロム P450 (CYP) 酵素をはじめとする異物代謝酵素は、肝臓をはじめ様々な組織において異物の解毒分解に重要な役割を果たすが、時として化合物の代謝活性化を引き起こし、生体に悪影響を及ぼす。*In vivo* では、皮膚や免疫細胞にも多種多様な異物代謝酵素が発現していることが知られ、化学物質の局所における代謝的活性化と免疫疾患との関わりが指摘されている。例えば、ある種の芳香族炭化水素化合物は、CYP 酵素により代謝活性化をうけることで接触性皮膚炎を誘発する。ある種のキノン系化合物は CYP2B 酵素により代謝を受けハプテン（不完全抗原）となり、炎症を誘発する例も示されている。また、カルバマゼピンやエルロチニブによる Stevens-Johnson 症候群（中毒性表皮壊死症）の発症に、肝臓または皮膚 CYP3A 酵素による代謝に関わる可能性が報告されている。これらのことは、化学物質の免疫細胞内または異所（細胞外）での代謝活性化が、免疫細胞の活性化や化学物質のハプテン化、さらには免疫応答を介した種々毒性の発現に重要であることを物語っている。

2. 研究の目的

筆者らはこれまでに、肝 CYP 酵素の誘導について、実験動物あるいは培養細胞を用いた検討を行ってきた。その途次で、化学物質に対する応答性（酵素誘導）は細胞によって異なることや、その誘導性の違いが細胞毒性の発現にも関わる可能性を見いだした。このことから、化学物質の曝露に伴って、免疫担当細胞そのもの、あるいは相互作用する表皮・真皮組織細胞において異物代謝酵素の発現誘導が起こるのであれば、そのことが化学物質による免疫毒性の発現に重要な役割を演じている可能性がある。このような背景から著者は、化学物質の代謝活性化に関わる代謝酵素の同定と、その代謝活性化に伴ったハプテン化、免疫毒性との関わりを統合的に予測できる *in vitro* 実験系が必要と考えた (Fig.1)。

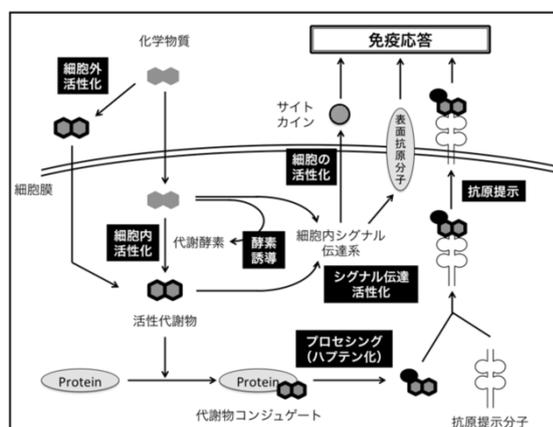


Fig.1 異物代謝とハプテン化の関係

本研究では、化学物質の代謝活性化を基盤とした皮膚免疫毒性物質 *in vitro* 検索系の確立を目的とした。まず、ヒト皮膚およびヒト由来試験細胞株における異物代謝酵素の発現量を確認し、化学物質の代謝活性化の有無を予測した。次に、モデル細胞として選択したヒト角化細胞株 HaCaT において免疫毒性の指標となる種々転写因子の活性化を検出できるレポーター細胞株を樹立した。さらに、このレポーター細胞株を用いて免疫毒性発現における異物代謝酵素の役割について検討した。

3. 研究の方法

1) 試験化合物

2,4-ジニトロクロロベンゼン (DNCEB)、シナミルアルコール (CNA)、オイゲノール (EUG)、イソオイゲノール (IE)、4-アリルアニソール (4-AA)、 α -ナフトフラボン (ANF) およびジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム三水和物 (DDTC) はシグマアルドリッチジャパン合同会社より購入した。硫酸ニッケル六水和物 (NiSO₄)、ベンゾ[a]ピレン (BaP) およびジメチルベンズアントラセン (DMBA) は和光純薬工業より購入した。SKF-525A はフナコシ社より購入した。

2) 試験細胞株および組織

ヒト肝がん細胞株 HepG2、肺がん細胞株 A549、乳がん細胞株 MCF-7、白血病細胞株 THP-1 および Jurkat を使用した。これら細胞株は American Type Culture Collection (ATCC) より分与を受けた。ヒト角化細胞株 HaCaT は Cell Line Service (Germany) より分与を受けた。ヒト肝組織および皮膚組織は HAB 研究機構より分与を受けた。

3) レポータープラスミド

転写因子の活性化を簡便に測定するために、pGL4.32 [luc2P/NF- κ B-RE/Hygro]、pGL4.37

[luc2P/ARE/Hygro]および pGL4.44 [luc2P/AP1RE/Hygro]をプロメガ社より購入して使用した。また、AhR 活性化のモニタリング用には、ヒト CYP1A1 の AhR 結合配列を 3 つ繰り返したものを pGL4.27 ベクターに挿入して作成した pGL4.27-XRE を使用した。

4) 異物代謝酵素遺伝子発現量の測定

ヒト培養細胞株 (HepG2、A549、MCF-7、THP-1、Jurkat および HaCaT) および組織 (皮膚、肝臓) から Sepazol (ナカライ) を用いて総 RNA を単離した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて RNA より cDNA を合成した。さらに、異物代謝酵素遺伝子の発現を TB Green® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ) を用いた定量的 PCR により測定した。

5) 転写因子活性化能の測定

本研究で作成したルシフェラーゼレポーター細胞株を 24 時間前培養した後、無血清培地に転換してさらに 24 時間培養した。さらに、被検化合物処理した。一定時間経過後に細胞を回収し、転写因子の活性化に依存したルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

1) ヒト組織および培養細胞株における異物代謝酵素の発現量の測定

ヒト皮膚組織に存在する異物代謝酵素遺伝子の免疫毒性への寄与を予測するために、ヒト培養細胞株 (HepG2、A549、MCF-7、HaCaT、K562、Jurkat、THP-1) およびヒト肝臓組織、皮膚組織における異物代謝酵素遺伝子発現を定量的 PCR 法により測定した。その結果、皮膚組織では培養細胞株や肝臓に比べて、異物代謝酵素遺伝子 (*CYP1A1*、*CYP1B1*、*CYP2E1* および *CYP3A4*) の発現がいずれも著しく低値を示した。また、培養細胞間での比較では、*CYP1A1* は HepG2 と HaCaT で、*CYP1B1* は HaCaT、A549、MCF7 と THP-1 で、また *CYP2E1* は HaCaT で比較的高く発現していることが明らかとなった。そこで、異物代謝酵素遺伝子が適度に発現している HaCaT 細胞と、免疫毒性試験に繁用されている THP-1 細胞を使用して、以降の実験を行った。

2) 皮膚免疫毒性に関連する転写因子活性化を解析できるモニタリング細胞の樹立

皮膚免疫毒性物質の多くは親電子性を有しており、これが細胞内の Keap1 分子に結合することで転写因子 Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) が活性化される。活性化した Nrf2 は標的遺伝子プロモーター上に存在する antioxidant responsible element (ARE) 配列に結合し、第二相異物代謝酵素遺伝子などの標的分子の発現を誘導する。一方、細胞内での免疫毒性物質の侵入により、AP-1 や NF- κ B といったいわゆる炎症性のシグナル伝達の活性化が起こることも想定される。

そこで、ヒト THP-1 細胞および HaCaT 細胞に対してこれら転写因子の活性化をモニタリングできるレポータープラスミドをトランスフェクションし、抗生物質を含む培地中で 3~4 週間培養することにより、レポーター遺伝子を安定して発現する細胞を選択した。その結果、HaCaT 細胞において、レポータープラスミドが安定に発現した細胞群を得ることができた。

次に、これらレポーター細胞株に対して、間接型 (代謝活性化を必要とする) 免疫毒性物質として知られる BaP を異物代謝酵素を非特異的に阻害する SKF-525A の存在下で処理し、各転写因子の活性化の経時変化を解析した。BaP の処理後 6 時間で AhR、AP-1 および NF- κ B の活性化がみられたが、これらの活性化は P450 阻害による影響を受けなかったことから、BaP そのものによる影響であることが示唆された。一方、Nrf2 活性化は処理後 12~24 時間で認められ、その活性化は SKF-525A 共存下で半減した (Fig.2)。

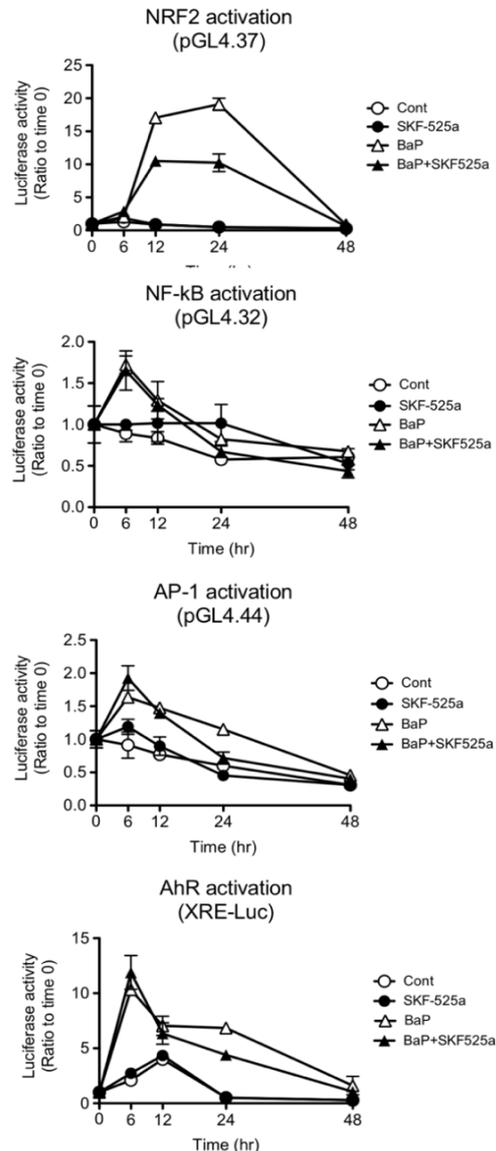


Fig.2 BaP 処理 HaCaT 細胞における各種転写因子の活性化

このことから、BaPはHaCaT細胞内のP450酵素により活性化されることで免疫毒性を示すこと、また、Nrf2活性化を指標として前駆型免疫毒性物質の検出が可能と考えられた。そこで、このHaCaT-pGL4.37（以降HaCaT-Nrf2-Lucとする）を用いて皮膚免疫毒性を評価した。

3) HaCaT-Nrf2-Lucを用いた種々被験物質の皮膚免疫毒性評価

前培養したHaCaT-Nrf2-Luc細胞に対して、NiSO₄、DNCB、CNA、EUG、IE、4-AA、BaPおよびDMBAを6および24時間処理し、その皮膚免疫毒性をNrf2活性化を指標として評価した。その結果、試験したすべての化合物でNrf2の濃度依存的な活性化が認められた。このうち、NiSO₄、BaP、DMBA、CNA、EUG、IEおよび4-AAのいずれの処理によっても、6時間に比べて24時間処理で強いNrf2活性化が認められた。一方、DNCBによる活性化は6時間処理でより強く見られた（Fig.3）。

さらに、P450の非特異的阻害剤であるSKF-525Aの前処理による影響を検討した。DNCBとNiSO₄を除いた6化合物については、6時間処理によるNrf2活性化にSKF-525Aの前処理はほとんど影響を与えなかったが、24時間処理で見られたNrf2活性化に対しては抑制作用を示した。

これらの結果から、多くの皮膚感作性物質の作用発現には細胞内に存在する異物代謝酵素による代謝活性化が重要である可能性が示された。一方、DNCBやNiSO₄は直接型の皮膚免疫毒性物質であること、特にDNCBは代謝されることでその皮膚免疫毒性が減弱することが示唆された。

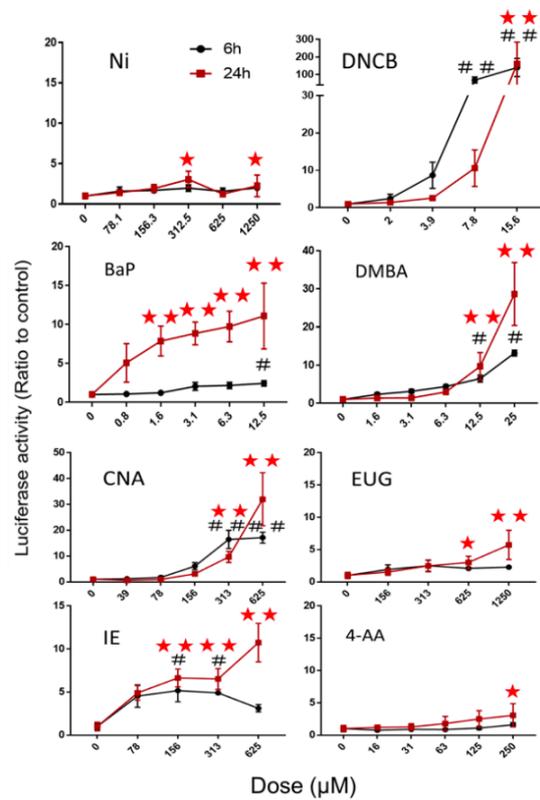


Fig.3 HaCaT-Nrf2-Luc細胞における濃度依存的なNrf2活性化

4) 被験物質の皮膚免疫毒性発現に対する種々阻害剤の影響

定量的PCRの結果より、HaCaT細胞ではCYP1A1やCYP2E1といった異物代謝酵素が比較的高く発現している。そこで、被験物質による免疫毒性発現（Nrf2活性化）におけるこれら異物代謝酵素の関与を明確とするために、CYP1A酵素の選択的阻害剤である α -ナフトフラボン（ANF）あるいはCYP2E1酵素の選択的阻害剤であるジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム（DDTC）の前処理による影響をSKF-525Aと比較した。

SKF-525Aは、DNCBを除いた6化合物（DMBA、BaP、CNA、EUG、IEおよび4-AA）によるNrf2活性化を濃度依存的に阻害した。ANFはEUGとIEによるNrf2活性化に対して抑制作用を示す一方で、DMBAやBaP、4-AAによるNrf2活性化に対しては予想に反して増強作用を示した。また、DDTCはDMBAやBaPによるNrf2活性化をわずかに増強する一方で、EUGによるNrf2活性化を濃度依存的に抑制した（Fig.4）。

これらのことから、CYP1A酵素はEUGやIEを活性代謝物へと変換して免疫毒性発現を増強している一方、DMBAやBaP、4-AAを非活性代謝物へと変換していることが示唆された。また、調べた化合物の中ではEUGを除き、代謝活性化体の産生におけるCYP2E1の寄与は小さいものと思われた。

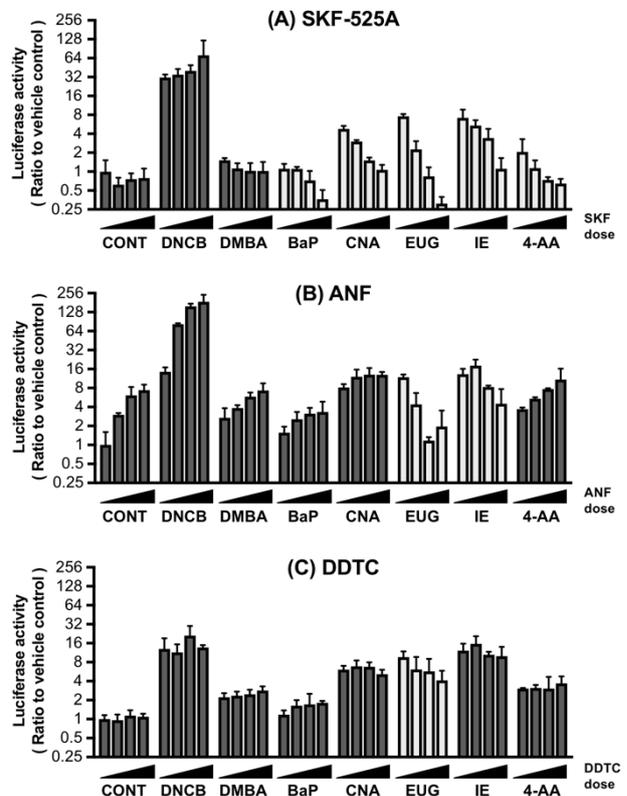


Fig.4 HaCaT-Nrf2-Luc細胞における各種阻害剤の影響

5) HaCaT 細胞と THP-1 細胞の複合培養による皮膚免疫毒性の検出の検討

ここまでの結果から、ある種の皮膚感作性物質は HaCaT 細胞内に発現している P450 酵素により活性化/解毒され、その皮膚感作性が変化することが示唆された。一方、h-CLAT などの免疫毒性試験に繁用される THP-1 細胞ではこれら酵素の発現がほとんどないために、その検出が困難であることが示唆された。このことから、HaCaT などの P450 高発現細胞と THP-1 の共培養によって、免疫毒性をより高感度に評価することが可能と思われた。そこで、HaCaT-Nrf2-Luc 細胞と THP-1 細胞を共培養した条件で DNCB および BaP を処理し、その THP-1 細胞における免疫毒性発現を h-CLAT 法(フローサイトメトリーによる CD54 および CD86 発現解析)により、また、HaCaT-ARE-Luc 細胞における免疫毒性発現をリンフェラーゼアッセイによりそれぞれ解析した。

その結果、被験化合物による THP-1 での免疫毒性は単独培養下/共培養下のいずれによってもほとんど変化しなかったが、HaCaT 細胞での免疫毒性は THP-1 との共培養下で大幅に減弱した。これは、播種した HaCaT 細胞に対する THP-1 細胞の比率が大きく、被験化合物の多くが懸濁されている THP-1 細胞に補足されたために起こったものと考えられる。共培養による免疫毒性試験の開発にはさらなる条件検討が必要であると考えられた。

6) まとめ

本研究では、種々免疫毒性試験の結果の不一致が異物の代謝活性化によるハプテン化の相違によるものと考え、HaCaT 細胞を用いた免疫毒性検出系を構築し、その免疫毒性発現における異物代謝酵素の寄与について P450 分子 (特に CYP1A 酵素、CYP2E1 酵素) を中心に検討した。

その結果、ある種の皮膚感作性物質は HaCaT 細胞内に発現している P450 酵素、特に CYP1A 酵素によって活性化/解毒され、その皮膚感作性が変化することが示された。特に DMBA や BaP については、従来に想定していたものとは異なり、CYP1A 酵素は解毒的に働いている可能性も示唆された。

本研究成果は、*in vivo* での異物代謝を反映した免疫毒性試験の開発を考える上で重要な知見を提供するものと思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- 1) . Sekimoto M, Sumi H, Hosaka T, Umemura T, Nishikawa A, Degawa M. Aryl hydrocarbon receptor activation and CYP1A induction by cooked food-derived carcinogenic heterocyclic amines in human HepG2 cell lines. *Food Chem. Toxicol.*, 97, 256-264 (2016)

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 関本征史、田野辺潤、成瀬理紗、山下夏樹、遠藤治、出川雅邦：高血圧治療薬 Nicardipine による芳香族炭化水素受容体 (AhR) 活性化増強作用. 第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 29~7 月 1 日 (名古屋)
- 2) 小島裕之、小林俊之、吉澤正洋、山下夏樹、遠藤治、出川雅邦、関本征史：ヘテロサイクリックアミン類における AhR 活性化とその種差の解析. フォーラム 2016：衛生薬学・環境トキシコロジー、2016 年 9 月 10~11 日 (東京)
- 3) 関本征史、遠藤治、出川雅邦：CYP1A 酵素誘導・機能に対する発がん性芳香族アミン類の影響. 平成 28 年度内外環境応答・代謝酵素研究会、2016 年 9 月 17~18 日 (静岡)
- 4) 関本征史、杉田和俊、高木敬彦、遠藤治、出川雅邦：AhR リガンドとニカルジピンの複合暴露によるヒト肝 AhR 標的遺伝子誘導:株化細胞を用いた評価系構築の試み. 第 45 回日本環境変異原学会、2016 年 11 月 17~18 日 (つくば)
- 5) 赤城俊介、大竹 佑果、田中廣輝、木村理夢、吉川夕貴、遠藤治、関本征史：THP-1 細胞でのサイトカイン mRNA 発現に及ぼす 3-methylcholanthrene の影響. 日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25~27 日 (仙台)
- 6) 関本征史、山下夏樹、前田晟一朗、遠藤治、出川雅邦：食品中芳香族アミン類によるヒト PXR の活性化. 日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25~27 日 (仙台)
- 7) 隅田健太、関根一貴、遠藤治、関本征史：HaCaT 細胞における Nrf2 活性化を指標とした皮膚感作性評価：異物代謝酵素の阻害による活性変化の検討. フォーラム 2018：衛生薬学・環境トキシコロジー、2018 年 9 月 10~11 日 (佐世保)
- 8) 富田俊維、遠藤治、出川雅邦、関本征史：AhR 活性化に関与する細胞内シグナル分子の探索. フォーラム 2018：衛生薬学・環境トキシコロジー、2018 年 9 月 10~11 日 (佐世保)
- 9) 隅田健太、関根一貴、遠藤治、関本征史：HaCaT 細胞における Nrf2 活性化を指標とした皮膚感作性評価：異物代謝酵素の阻害による活性変化の検討. 第 4 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2018 年 9 月 15 日 (中野)
- 10) 富田俊維、遠藤治、出川雅邦、関本征史：AhR 活性化に関与する細胞内シグナル分子の探索. 第 4 回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、2018 年 9 月 15 日 (中野)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松下まりも
ローマ字氏名：Marimo MATSUSHITA

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。