

ヒト単球性白血病細胞株（THP-1）における  
樹状細胞様の感作性物質応答と  
その作用機構に関する研究

乙第50号

宮澤 正明

ヒト単球性白血病細胞株（THP-1）における  
樹状細胞様の感作性物質応答と  
その作用機構に関する研究

宮澤 正明

# 目次

略語	.....	1
緒言	.....	2
第1編	THP-1細胞における細胞表面抗原及びサイトカインの感作性物質応答	6
第1節	実験の部	7
1.	細胞と培養液	7
2.	被験物質とTHP-1細胞に対する処理方法	7
3.	細胞表面抗原の解析	8
4.	サイトカイン産生量の解析	9
5.	統計学的解析	9
第2節	結果	10
1.	DNCB、NiSO <sub>4</sub> 、SLSによる細胞表面抗原の発現解析	10
2.	DNCB、NiSO <sub>4</sub> 、SLSによるサイトカイン産生量変化	14
3.	細胞表面抗原の発現とサイトカイン産生量の感作性物質応答性	16
第3節	考察	20
第4節	小括	26

第2編	感作性物質による THP-1 細胞活性化の作用機構の解明	27
第1章	THP-1 細胞活性化に及ぼす TNF- $\alpha$ と細胞外 ATP の役割	27
第1節	実験の部	30
1.	細胞と培養液	30
2.	被験物質と THP-1 細胞に対する処理方法	30
3.	細胞表面抗原の解析	31
4.	サイトカイン産生量の解析	32
5.	統計学的解析	32
第2節	結果	33
1.	DNCB、NiSO <sub>4</sub> 及び SLS によるサイトカイン産生と細胞表面抗原発現の経時変化	33
2.	CD86、CD54 及び CD40 の発現増強に及ぼす rhTNF- $\alpha$ の効果	38
3.	CD86、CD54 及び CD40 の発現増強に及ぼす rhIL-8 の効果	40
4.	TNF- $\alpha$ の中和抗体による影響	42
5.	細胞外 ATP が CD86 及び CD54 の発現量へ及ぼす影響	46
6.	suramin が DNCB、NiSO <sub>4</sub> 及び EU による CD86、CD54 の発現へ及ぼす影響	48
第3節	考察	50
第4節	小括	54

第2章	THP-1 細胞活性化に及ぼすシグナル伝達 経路の役割 . . . . .	55
第 1 節	実験の部 . . . . .	56
1.	細胞と培養液 . . . . .	56
2.	p38 MAPK と ERK の Western Blot 解析	56
3.	細胞表面抗原の解析 . . . . .	57
4.	サイトカイン産生量の解析 . . . . .	57
5.	統計学的解析 . . . . .	57
第 2 節	結果 . . . . .	58
1.	DNCB 及び NiSO <sub>4</sub> による p38 MAPK、 ERK のリン酸化と p38 MAPK 及び ERK に対する阻害剤の効果 . . . . .	58
2.	DNCB 及び NiSO <sub>4</sub> による TNF- $\alpha$ の産生 に対する p38 MAPK、ERK の影響 . . . . .	61
3.	p38 MAPK が DNCB 及び NiSO <sub>4</sub> による CD86、CD54 及び CD40 の発現に及ぼす 影響 . . . . .	63
4.	ERK が DNCB 及び NiSO <sub>4</sub> による CD86、 CD54 及び CD40 の発現に及ぼす影響 . . . . .	65
第 3 節	考察 . . . . .	67
第 4 節	小括 . . . . .	70
第 3 編	感作性物質による IL-8 産生の特異性と 発現機構の解明 . . . . .	72

第 1 節	実験の部	73
1.	細胞と培養液	73
2.	被験物質と THP-1 細胞に対する処理方法	73
3.	細胞表面抗原の解析	75
4.	サイトカイン産生量の解析	75
5.	統計学的解析	75
第 2 節	結果	76
1.	感作性物質及び非感作性物質に対する IL-8 の応答性	76
2.	感作性物質による IL-8 の産生における 細胞内シグナル伝達系の影響	78
3.	感作性物質による IL-8 の産生における TNF- $\alpha$ の影響	80
第 3 節	考察	82
第 4 節	小括	85
結論		86
謝辞		94
引用文献		96

## 略語

CD34-DC	CD34+ progenitor cell derived dendritic cell
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNCB	2,4-dinitrochlorobenzene
EU	eugenol
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FA	formaldehyde
HQ	hydroquinone
h-CLAT	human Cell Line Activation Test
HC	hydroxycitronellal
IL-1 $\beta$	interleukin-1 $\beta$
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mo-DC	monocyte-derived dendritic cell
MP	methyl paraben
MFI	mean fluorescence intensity
MHC class II	class II major histocompatibility complex
NiSO <sub>4</sub>	nickel sulfate
PAA	phenylacetaldehyde
PG	propyl gallate
PI	propidium iodide
RFI	relative fluorescence intensity
rhIL-8	recombinant human interleukin-8
rhTNF- $\alpha$	recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$
SLS	sodium lauryl sulfate
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$

## 緒言

化粧品を開発する上で、皮膚に対する安全性を確認することは極めて重要で、中でも皮膚感作性の評価を行うことは、安全な製品を開発する上で欠かせない項目の1つである。皮膚感作性とは遅延性過敏反応の一つで、化学物質の接触により過剰な免疫反応により皮膚にかぶれが起こる現象であり、外来の化学物質や物理的因子などのダメージによる皮膚刺激性のかぶれとは、その発症機構が大きく異なる。従来、化学物質の皮膚感作性評価は、モルモットやマウスなどの動物を用いた試験が行われてきた<sup>1,2)</sup>。一方、動物愛護の観点から動物実験に対する批判の高まりを受け、EUにおいては化粧品指令第7次改正<sup>3)</sup>により、2013年3月までに化粧品開発のための動物実験の禁止が施行されるに至っている。このような社会的背景から、動物実験が不可欠であった化学物質の全ての安全性評価において、動物実験代替法の必要性が明確となっている。これまでにOECDでは、経皮吸収性試験<sup>4)</sup>や局所刺激性を評価する光毒性試験<sup>5)</sup>及び皮膚腐食性試験<sup>6,7)</sup>が、安全性評価における動物実験代替法としてガイドライン化されている。また、皮膚感作性に関しても、動物を用いない試験法に対する関心が高まり、試験法開発に向けた研究が世界的に行われているが、ガイドライン化された試験法はない。この理由として、皮膚刺激性などの局所刺激性に比べ、皮膚感作性は免疫系が関与する全身反応であり、*in vitro*で全ての反応を具現化することが極めて難しいことが挙げられる。よって、動物を用いない皮膚感作性試験を開発するためには、皮膚感作性の毒性発現機構を十分に



理解し、*in vitro* で具現化できる鍵となる反応に着目することが重要である。

感作性物質が皮膚に接触すると、皮膚中のタンパク質やペプチドなどと結合することにより完全抗原となり、表皮中の樹状細胞（ランゲルハンス細胞）によって認識される。その後、ランゲルハンス細胞は活性化し、皮膚から所属リンパ節へ移行し、T細胞に対して抗原情報を提示する。そして、抗原特異的なT細胞が増殖すると、感作が成立する<sup>8,9)</sup>。ここまでの感作誘導反応により、感作性物質の情報は体に記憶される。さらに、再び、皮膚に同じ物質が触れることによって、T細胞が活性化し、紅斑や浮腫といった炎症反応が皮膚に起こる。これら一連の反応は極めて複雑であるが、感作が成立するまでに鍵となるいくつかの反応（経皮吸収性、タンパク結合性、ランゲルハンス細胞の活性化、抗原特異的なT細胞増殖）を個別に*in vitro* で再現する試みがなされている<sup>10)</sup>。この中でもランゲルハンス細胞の活性化では、MHC class II や CD86、CD54 のような共刺激性分子の発現増強<sup>11,12)</sup> や IL-1 $\beta$  のようなサイトカインの産生<sup>13,14)</sup> が認められており、これらの変化に着目した研究が積極的に進められている。一方で、ランゲルハンス細胞は表皮細胞中に1~3%しか存在しないため、表皮細胞からの分離が難しく、また分離後に性質が変化することも知られており、これらがランゲルハンス細胞を用いた研究の課題となっている。そこで、近年、ランゲルハンス細胞の代替として、ヒト末梢血 CD14 陽性細胞<sup>15)</sup> あるいは CD34 陽性造血前駆細胞<sup>16)</sup> から種々のサイトカイン処理により誘導した樹状細胞を使用した検討がなされている。これらの細胞は表現型及び機能上の特性

がランゲルハンス細胞と類似しているだけでなく、*in vitro* 実験において、皮膚感作性物質によりランゲルハンス細胞と同様に、抗原提示に関わる種々の細胞表面抗原の発現やサイトカインの産生が増強することから、生体での反応を *in vitro* で再現できるモデルとして、皮膚感作性の発症機構の研究に用いられている<sup>17-22)</sup>。一方で、このような樹状細胞の活性化を指標にすることで、*in vitro* 皮膚感作性試験法へ応用できる可能性も高まってきている<sup>23)</sup>。しかしながら、安全なヒト血液の供給や用いる細胞の個人差の問題<sup>19,24)</sup> などがあるため、これら細胞を用いた試験法開発には実用面での課題がある。

著者らはそうした問題を克服するために、入手が容易で、性状が安定な、ヒト細胞株である THP-1 細胞 (human monocytic leukemia cell line)<sup>25)</sup> に着目した。これまでに、THP-1 細胞に対していくつかの皮膚感作性物質を曝露すると、抗原提示の際に樹状細胞で認められる細胞表面抗原 (MHC class II, CD86, CD54) の発現上昇や IL-1 $\beta$  の産生増強が報告されている<sup>26,27)</sup>。さらに、THP-1 細胞を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験法 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT) の開発を進め<sup>28,29)</sup>、抗原提示の際に共刺激分子として機能する細胞表面抗原 (CD86 と CD54) の発現変化を指標とすることで、一般化学物質 64 物質の感作性の有無を良好に評価できることを確認した<sup>30)</sup>。一方で、試験法に用いる THP-1 細胞の感作性物質応答やその作用機構は十分に解明されておらず、試験法の実用化に向けての課題となっている。

そこで、本研究では、*in vitro* 皮膚感作性試験法に用いる細胞として THP-1 細胞の有用性を高めるために、THP-1 細胞の感作性物

質応答とその作用機構について解析した。本研究論文の第1編では、感作成立において樹状細胞で認められる種々の細胞表面抗原やサイトカインの発現変化を指標に、THP-1細胞の感作性物質及び非感作性物質に対する応答を調べ、樹状細胞との同等性を検討した。また、第2編では、感作性物質による種々の細胞表面抗原やサイトカインの発現機構に関して、TNF- $\alpha$ のオートクライン作用、細胞外ATPの効果及び、細胞内シグナル伝達系の役割について検討した。さらに、第3編では、THP-1細胞を用いて、樹状細胞において十分に解明されていないIL-8産生の感作性物質特異性や発現機構を検討した。

## 第1編 THP-1細胞における細胞表面抗原及びサイトカインの感作性物質応答<sup>31)</sup>

*in vitro* 実験において、ヒト由来の樹状細胞が感作性物質により活性化し、抗原提示の際に重要な種々の細胞表面抗原やサイトカインの発現が亢進することが報告されている<sup>17-22)</sup>。最近では、これら活性化マーカーを指標とした、*in vitro* 皮膚感作性試験の開発研究がなされている<sup>23)</sup>。しかしながら、血液の安定供給や均一な細胞集団の確保、さらに細胞ドナー間のばらつき等の点<sup>19,24)</sup>から、血液由来の樹状細胞を研究に汎用できる細胞として用いるには課題があるのが現状である。

そこで、本研究では、これら課題を克服することを目的にヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞 (human monocytic leukemia cell line) を用い、THP-1 細胞が感作性物質処理によって樹状細胞様の応答を示すかを検討した。感作性物質による樹状細胞の活性化指標としては、細胞表面抗原の CD86、CD54、CD40、CD83、CD58、CD1a 及び、サイトカインの TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 を用いて、検討した。

## 第1節 実験の部

### 1. 細胞と培養液

THP-1 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入した。THP-1 細胞用の培養液として、25mM HEPES バッファーと L グルタミンを含む RPMI1640 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA) に、10%牛胎児血清 (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) と、0.05mM 2-メルカプトエタノール及び 1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA USA) をそれぞれ添加した培養液を用いた。

### 2. 被験物質と THP-1 細胞に対する処理方法

被験物質は、感作性物質として 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)、nickel sulfate hexahydrate ( $\text{NiSO}_4$ )、hydroquinone (HQ)、propyl gallate (PG)、formaldehyde (FA)、eugenol (EU)、phenylacetaldehyde (PAA)、hydroxycitronellal (HC) を用いた。また、非感作性物質としては、sodium lauryl sulfate (SLS)、methyl paraben (MP)、lactic acid (LA) を用いた。全ての被験物質と、陽性対照として用いたサルモネラアボルタス由来の lipopolysaccharide (LPS) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。 $\text{NiSO}_4$ 、HQ、FA、SLS、LA、LPS は予め生理食塩水に溶解させ、また、DNCB、PG、PAA、EU、HC は dimethylsulfoxide (DMSO; Simga-Aldrich) に溶解させた後に、培養液に添加した。DMSO は培養液中の濃度が最高 0.2%になるように添加した。

THP-1 細胞は 24 ウェルプレートに  $1 \times 10^6$  cells/mL/ウェルにて播

種し、被験物質を添加した後、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で24時間培養した。被験物質の処理濃度は予め細胞毒性試験を行い、24時間後に70~95%の細胞生存率になる3濃度を設定した。各被験物質に対して、実験は少なくとも3回実施した。

### 3. 細胞表面抗原の解析

細胞に化学物質を24時間処理した後、細胞を回収し、0.1% bovine serum albumine 添加 PBS で洗浄した。さらに、Fc レセプターのブロックングとして 0.01% Globlins Cohn Fraction II, III (Sigam-Aldrich) 添加 PBS を10分、4℃条件下で処理した後、抗体染色を行った。細胞表面抗原の解析に用いた FITC 標識モノクローナル抗体を以下に示す; 抗ヒト CD54 (clone; 6.5B5) (DAKO; Glostrup, Denmark)、抗ヒト CD86 (clone; Fun-1)、抗ヒト CD40 (clone; 5C3)、抗ヒト CD83 (clone; HB15e)、抗ヒト CD58 (clone; 1C3)、抗ヒト CD1a (clone; HI149) (以上、BD PharMingen; San Diego, CA)。また、Isotype control として、マウス IgG1 を DAKO より、マウス IgG1, $\kappa$  及びマウス IgG2, $\kappa$  を BD PharMingen よりそれぞれ購入した。抗体染色は遮光、4℃条件で、30分間行った。

細胞表面抗原の発現量測定には FACSCalibur と CellQuest software (Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いた。死細胞を染め分けるため、細胞浮遊液に propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) を最終濃度 0.625  $\mu$ g/mL で添加し、生細胞が 10,000 個になるまで測定した。細胞表面抗原の発現量の評価方法として、平均蛍光強度 (Mean fluorescence intensity (MFI)) を用いた。

#### 4. サイトカイン産生量の解析

細胞に化学物質を 24 時間曝露した後、培養上清を回収し、ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN) を用いて、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 の産生量を測定した。

#### 5. 統計学的解析

解析したマーカーの増強変化を評価するために MFI を用いて、溶媒処理群と化学物質処理群との間の統計学的な有意差を Student's *t*-test により解析した。

## 第2節 結果

### 1. DNCB、NiSO<sub>4</sub>、SLS による細胞表面抗原の発現変化

本研究では、THP-1 細胞に対し、細胞生存率が 70~95%を示す 3 濃度で DNCB、NiSO<sub>4</sub>、SLS を 24 時間処理した後、細胞表面抗原の発現変化を調べた。Fig. 1 には、無処理及び、溶媒の DMSO、DNCB (2.5 µg/mL)、NiSO<sub>4</sub> (85 µg/mL)、SLS (45 µg/mL)、それぞれを処理した際の細胞表面抗原の発現変化を示した。DMSO 処理群は無処理群とほぼ同じ結果だったことから、細胞表面抗原に及ぼす DMSO の影響はほとんどないと考えられた。DNCB (2.5 µg/mL) を処理した細胞では CD58 を除き、全ての細胞表面抗原で発現が増強した。NiSO<sub>4</sub> (85 µg/mL) でも CD86、CD54、CD40、CD83 の発現が増強した。一方で、SLS (45 µg/mL) 処理群では、無処理群と同様に、いずれの細胞表面抗原の変化も起こらなかった。

Fig. 2 には DNCB、NiSO<sub>4</sub>、SLS を 24 時間処理した後の、CD86、CD54、CD40、CD83、CD58、CD1a の MFI の値を示した。Table 1 には統計学的解析の結果をまとめた。その結果、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> では DMSO 及び無処理群それぞれに対して CD86、CD54、CD40、CD83 の発現を有意に増強した。加えて、DNCB では CD1a の発現が増強した。一方、CD58 は DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> において有意な変動は認められなかった。また、SLS ではいずれのマーカーも変化を示さなかった。陽性対照として用いた LPS では、CD1a を除く全てのマーカーの発現が強く誘導された。



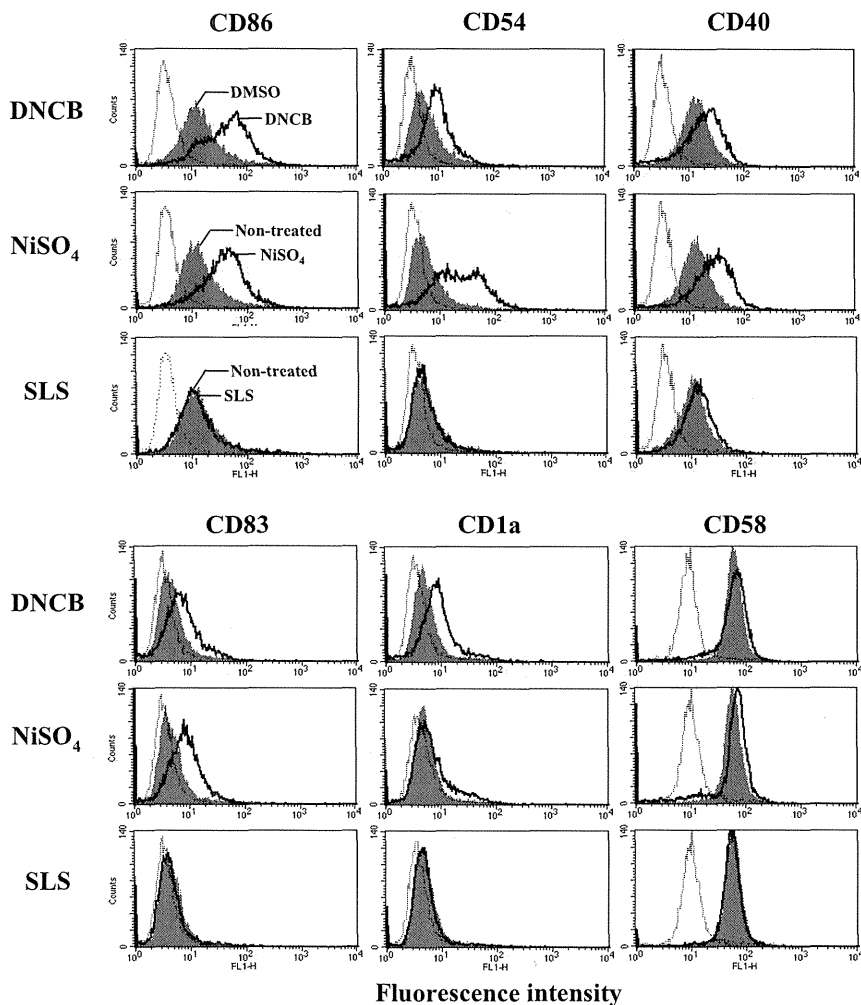


Fig. 1 Phenotypic alterations induced by DMSO (vehicle) , DNCB (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) , NiSO<sub>4</sub> (85  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) , and SLS (45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) . The data shown represent middle concentrations used in the study. These concentrations were selected as representative data that provide the maximum effect. Histograms for each surface marker evaluated in THP-1 cells: Isotype control (dotted line) , vehicle-control (either DMSO or untreated; shaded peak) , and chemical-treated (dark solid line) . Since untreated control and DMSO-treated control gave the same results, untreated and DMSO-treated results were interchanged. These are representative data from three independent experiments. MFI = mean fluorescence intensity.

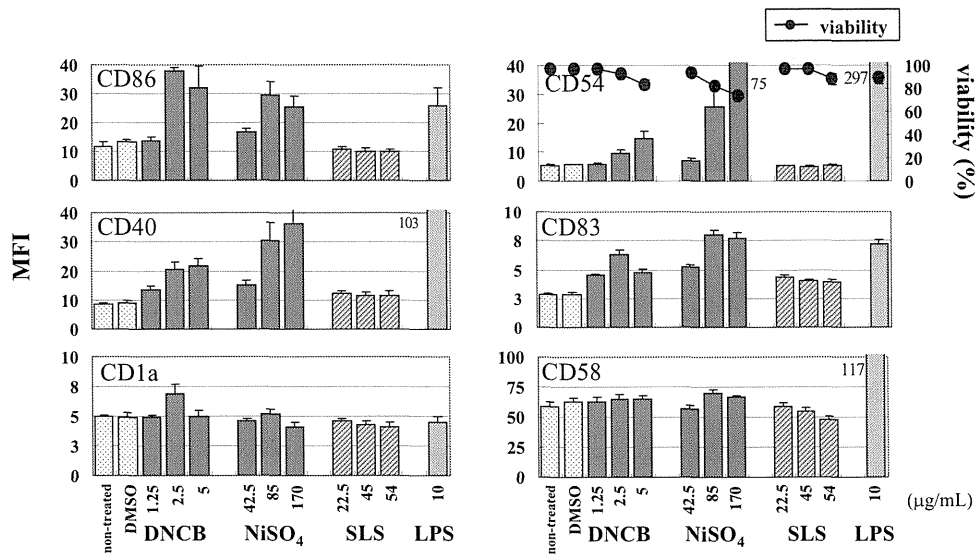


Fig. 2 Alterations of surface phenotypes by DNCB, NiSO<sub>4</sub>, SLS and LPS at the indicated concentrations. The results were expressed as MFI. Mean±S.D. was given for at least three independent experiments. Statistical significance is reported in Table 1.

Table 1 Student's *t*-test was used to establish a statistical significance between MFI values for vehicle control cells and MFI values for chemical treated cells.

	DNCB	NiSO <sub>4</sub>	HQ	PG	FA	PAA	EU	HC	SLS	MP	LA
CD86	**	**	*	‡	*	**	*	**	n.s.	n.s.	n.s.
CD54	**	*	‡	*	‡	**	**	*	n.s.	n.s.	n.s.
CD40	**	**	*	**	*	**	*	**	n.s.	‡	n.s.
CD83	**	**	**	**	*	*	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
TNF- $\alpha$	**	**	*	‡	*	**	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.
IL-8	**	**	*	*	‡	*	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.

Results were obtained from representative concentrations that induced a maximum effect. (\*\* ;  $p < 0.01$ , \* ;  $p < 0.05$ , ‡ ;  $p < 0.1$  compared with control, n.s.; not significant) .

## 2. DNCB、NiSO<sub>4</sub>、SLS によるサイトカイン産生量変化

THP-1 細胞に対し細胞生存率が 70~95%を示す 3 濃度で DNCB、NiSO<sub>4</sub>、SLS を 24 時間処理した後、培養上清を回収し、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 の産生量を測定した。DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> では濃度依存的に、有意に TNF- $\alpha$ と IL-8 の産生量が増加した。IL-6 に関しては、DNCB や SLS では変化が認められないが、170  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NiSO<sub>4</sub> では有意な産生が認められた。検討した 3 つのサイトカインの中で、IL-8 の産生量が最も多く、NiSO<sub>4</sub> では最大 57,000  $\text{pg}/\text{mL}$  以上に達した。一方、SLS ではいずれのサイトカインの産生も認められなかった。陽性対照の LPS では全てのサイトカインで多量の産生が認められた。

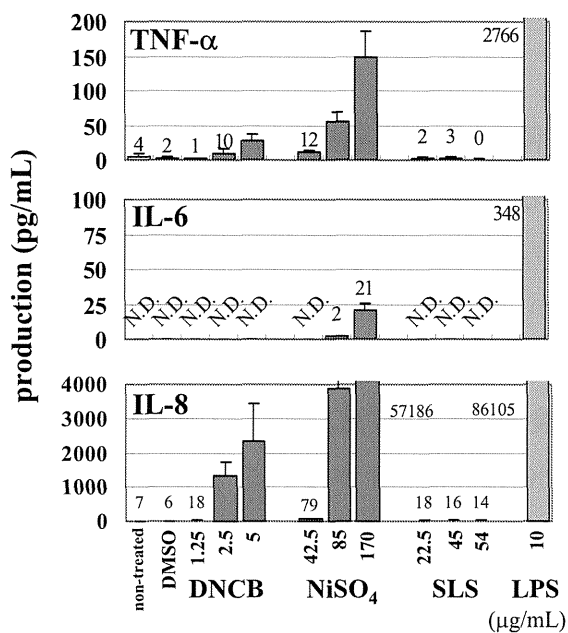


Fig. 3 Changes of cytokine production by DNCB, NiSO<sub>4</sub>, SLS and LPS at the indicated concentrations. The culture supernatant was measured for TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 secretion by ELISA. Mean $\pm$ S.D. was given for at least three independent experiments. Statistical significance is reported in Table 1.

### 3. 細胞表面抗原の発現とサイトカイン産生量の感作性物質応答性

THP-1 細胞は種々の細胞表面抗原の発現やサイトカイン産生量において、感作性物質の DNCB と NiSO<sub>4</sub> に特異的な応答を示した。そこで、このような細胞の活性化がより多くの感作性物質に対しても特異的かどうかを検証するために、CD86、CD54、CD40、CD83 に関して、6 つの感作性物質と 2 つの非感作性物質の影響を調べた。各被験物質の処理濃度は予め細胞毒性試験を行い、24 時間後に 70~95% の細胞生存率になる 3 濃度を設定した。その結果、Fig. 4a-d 及び Table 1 に示すように、PAA と HC は検討した全ての細胞表面抗原において、有意に発現増強した。HQ 及び FA では、CD86、CD40、CD83 において、濃度依存的に有意な発現増強が認められた。また、PG と EU においても、4 つの細胞表面抗原のうち少なくとも 3 つで有意な発現増強が認められた。一方で、非感作性物質の MP 及び LA ではいずれの細胞表面抗原においても発現の変化は認められなかった。CD54 に関しては、全ての感作性物質で、濃度依存的に発現が増強した。CD40 でも全ての感作性物質で有意な発現増強が認められたが、必ずしも濃度依存的ではなかった。感作性物質による CD83 の発現増強は、他の細胞表面抗原に比べて小さいが、EU を除く全ての感作性物質で有意に増強した。

さらに、被験物質を処理した際の培養上清を回収し、TNF- $\alpha$  と IL-8 の産生量を調べた。Fig. 5a, b 及び Table 1 で示すように、FA と HC では濃度依存的に、かつ、有意な TNF- $\alpha$  の産生が認められ、

最高濃度での産生量は他の感作性物質に比べても多かった。PAA もまた TNF- $\alpha$ の産生を強く誘導したが、濃度非依存的であった。HQ では TNF- $\alpha$ の産生量は僅かであるが有意な増強変化が認められた。PG、EU 及び非感作性物質（MP と LA）では TNF- $\alpha$ 産生量は少なかった。また、HQ、PAA、HC は濃度依存的に IL-8 の有意な産生を誘導した。PG は最高濃度でのみ IL-8 の有意な産生が認められた。EU と FA では共に、IL-8 を有意に産生しなかったが、FA で濃度依存的な増強変化が認められた。一方で、MP と LA はどちらも IL-8 産生量を有意に増強しなかった。

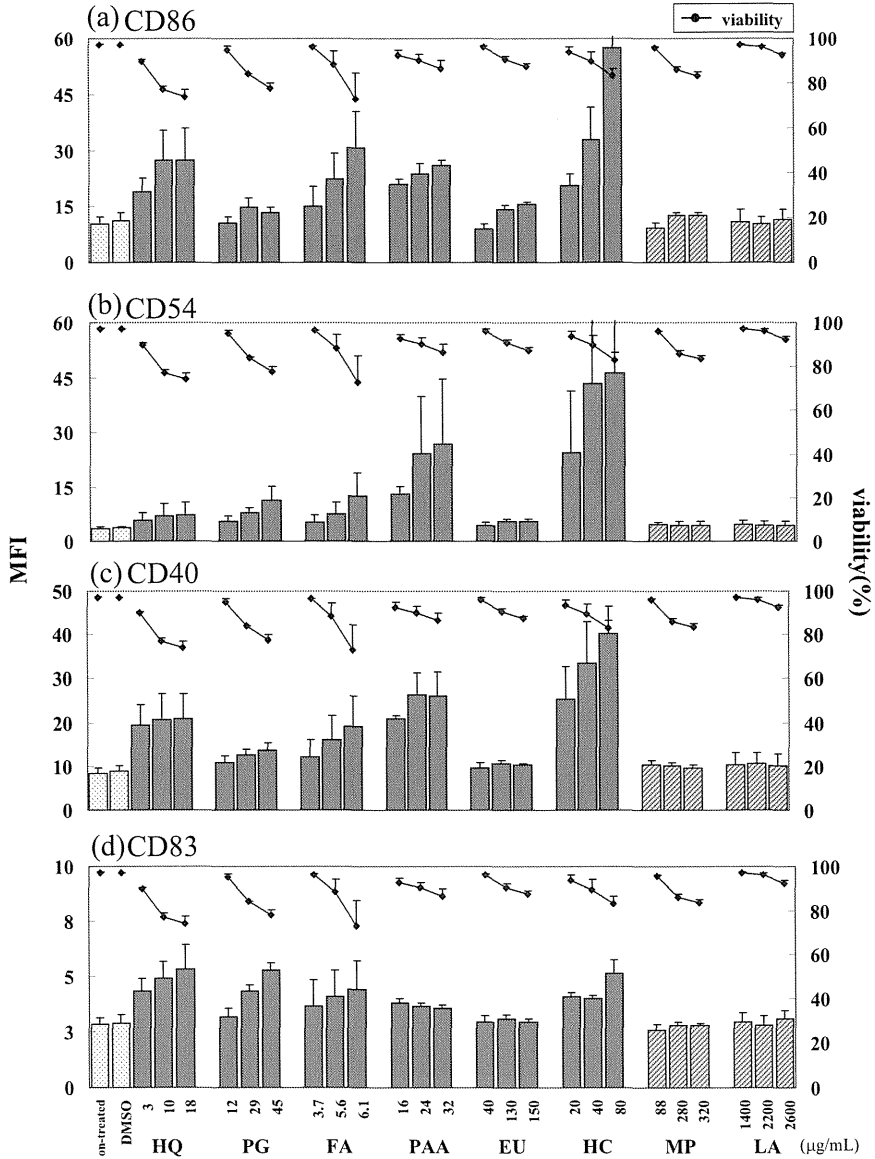


Fig. 4 The effect of six allergens and two non-allergens on expression of (a) CD86, (b) CD54, (c) CD40 and (d) CD83. Cells were treated for 24h at the indicated concentration. Mean±S.D. was given for at least three independent experiments. Statistical significance is reported in Table 1.



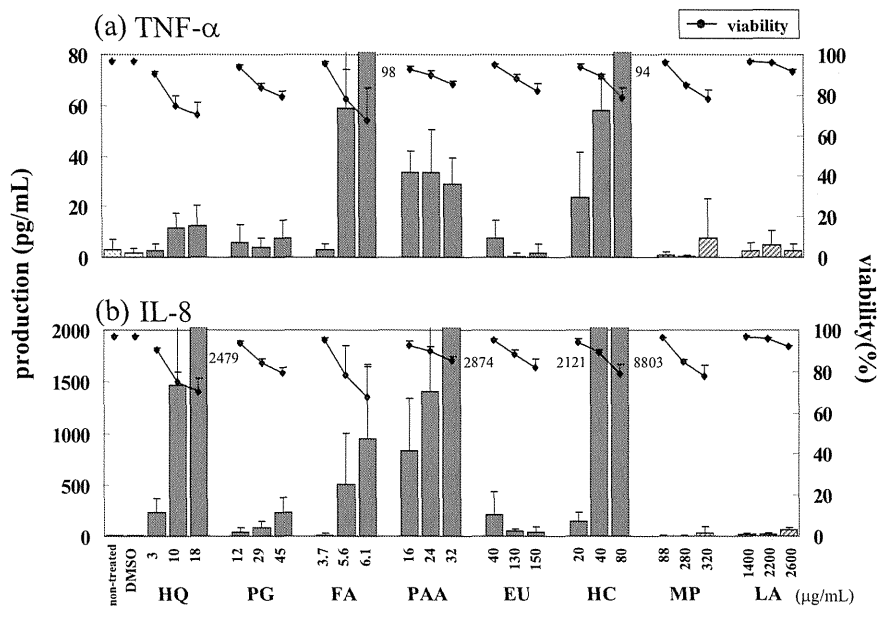


Fig. 5 The effect of six allergens and two non-allergens on production of (a) TNF- $\alpha$  and (b) IL-8. Cells were treated for 24h at the indicated concentration. Mean $\pm$ S.D. was given for at least three independent experiments. Statistical significance is reported in Table 1.

### 第3節 考察

本章では第一に、THP-1細胞において、樹状細胞の活性化に伴い発現増強することが知られている種々の細胞表面抗原の発現やサイトカイン産生量の応答性を、感作性物質の DNCB、NiSO<sub>4</sub> と非感作性物質の SLS に検討した。DNCB、NiSO<sub>4</sub> は共に代表的な感作性物質であり、*in vitro* 実験において、それぞれをヒト血液由来の樹状細胞 (Mo-DC; monocyte derived dendritic cell) あるいは CD34 陽性の樹状細胞 (CD34-DC; CD34+ progenitor cell derived dendritic cell) に曝露すると、様々な細胞表面抗原の発現やサイトカイン産生量を増強させることが報告されている<sup>17-22)</sup>。本研究により、THP-1細胞においても、CD86、CD54、CD40、CD83、TNF- $\alpha$ 、IL-8 が DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> に対して有意な発現増強を誘導することが明らかとなった。一方で、SLS ではいずれのマーカーの変化も認められなかった。そこで、より多くの感作性物質と非感作性物質が細胞へ及ぼす影響を調べることにより、これら活性化マーカーの感作性物質特異性を検討した。その結果、THP-1細胞は様々な感作性物質に対し、CD86、CD54、CD40、CD83の発現を増強し、TNF- $\alpha$ 、IL-8を産生した。一方で、非感作性物質に対しては有意な応答を示さなかった。さらに、これらの変化は、樹状細胞 (Mo-DC 及び CD34-DC) で認められる応答と類似することが確認できた。

CD40は腫瘍壊死因子受容体ファミリー (TNF receptor family) に属する膜タンパクで、B細胞や抗原提示細胞上に発現している<sup>32,33)</sup>。そして、活性化T細胞上のCD40Lによって架橋されると、

B 細胞や抗原提示細胞の活性化を誘導するシグナルが伝達され、CD86 や CD54 の発現増強を促進させる働きを有することが報告されている<sup>34)</sup>。このように、CD40 は樹状細胞による T 細胞活性化に強く関与する分子である。Mo-DC においては、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> を含む、種々の感作性物質による CD40 の発現増強が報告されている<sup>19,22)</sup>。Mo-DC と同様に、THP-1 細胞においては、検討した全ての感作性物質で CD40 は有意に発現増強した。一方で、非感作性物質では増強しなかった。NiSO<sub>4</sub> と HC においては、細胞生存率が 79~94%の範囲で、濃度依存的に CD40 の発現を増強し、特に、最高濃度では無処理細胞に対して MFI の値は 3 倍以上に達した。HC は、動物を用いた皮膚感作性試験で弱感作性であると判定される物質<sup>35)</sup> であるが、THP-1 細胞においては、検討した全てのマーカーで強く発現を誘導した。このことから、HC による THP-1 細胞活性化は、他の感作性物質とは異なったシグナル伝達系を介して誘導されることを示唆するのかもしれない。以上より、THP-1 細胞は感作性物質により CD40 の発現を増強する可能性が高いことが示唆された。

CD83 は樹状細胞系に発現する分子である。皮膚感作の誘導における CD83 の機能はまだ明らかになっていないが、CD83 の発現挙動解析により、抗原提示や細胞間相互作用に重要な役割を果たすことが示唆されている<sup>36)</sup>。THP-1 細胞においては、EU を除く、検討した全ての感作性物質で CD83 が有意に発現増強した。DNCB では 2.5 µg/mL で、CD83 の有意な発現増強が認められた。De Smedt らは、本研究と同様の処理濃度で DNCB、EU を CD34-DC に 24 時間処理しても、CD83 の発現は増強しないことを報告して

いる<sup>37)</sup>。以上より、THP-1細胞におけるCD83は、CD34-DCにおけるCD83に比べて、感作性物質に対する反応性が高い可能性が示唆された。

TNF- $\alpha$ はランゲルハンス細胞の活性化及び遊走に重要な役割を果たすことが知られている<sup>38,39)</sup>。本研究では、PGとEUを除く感作性物質でTNF- $\alpha$ の有意な産生増強が認められた。Mo-DCにおいて、DNCBを含む化学物質14物質がTNF- $\alpha$ の産生量に及ぼす影響を調べた検討では、NiCl<sub>2</sub>とMnCl<sub>2</sub>のみが有意な産生を誘導することが報告されている<sup>40)</sup>。よって、感作性物質に対するTHP-1細胞のTNF- $\alpha$ 応答性は、Mo-DCよりも反応性が高く、THP-1細胞に特徴的な性質の可能性が示唆された。

ケモカインのIL-8は種々の炎症反応に関与することが知られており<sup>41)</sup>、皮膚感作性における役割についてはまだ十分に解明されていない。一方、本研究では、THP-1細胞からのIL-8産生は、検討したほぼ全ての感作性物質で認められた。近年、Mo-DCにおいてもDNCB及びNiCl<sub>2</sub>によってIL-8の産生量が増強することが報告されている<sup>18)</sup>。また、CD34-DCでも、EUでは変化しないものの、DNCB及びNiSO<sub>4</sub>によってIL-8 mRNAレベルが有意に増強することが報告されている<sup>42)</sup>。本研究で検討したTNF- $\alpha$ 及びIL-8は感作性物質処理によって細胞から産生することが示されたが、動物試験による感作性強度の結果とは関連がないように見られた。産生量と感作性物質の感作性強度の関係、また、産生したサイトカインが細胞活性化に及ぼす影響の解明については、さらに検討が必要である。

CD1aはランゲルハンス細胞に発現する分子で、MHC class II

と同様に、T細胞に結合し、脂質抗原を提示することが知られている。また、ランゲルハンス細胞の活性化に伴い、発現が減少することが知られている<sup>43)</sup>。THP-1細胞においては、DNCB（2.5 µg/mL）によりCD1aの発現が増強するものの、NiSO<sub>4</sub>や陽性対照のLPSでさえ、CD1aの発現増強は起きなかった。DNCBまたはNiSO<sub>4</sub>を処理したMo-DCにおいても、CD1aの発現に有意な変化は認められていない<sup>17)</sup>。THP-1細胞において感作性物質がCD1aの発現に及ぼす影響に関しては、さらに検討が必要である。

IL-6は適切なT細胞活性化に必要であることが知られている<sup>44)</sup>。本研究では、THP-1細胞において、NiSO<sub>4</sub>（170 µg/mL）によりIL-6の有意な産生が認められたが、DNCBではいずれの処理濃度でも産生は認められなかった。Mo-DCでも、DNCBでは変化しないものの、NiCl<sub>2</sub>によってIL-6の産生が有意に増強することが報告されている<sup>17)</sup>。また、CD34-DCにおいては、IL-6 mRNAレベルではNiSO<sub>4</sub>でのみ増強が認められるが<sup>42)</sup>、産生量ではDNCB及びNiSO<sub>4</sub>で増強が認められている<sup>37)</sup>。このようにIL-6の感作性物質応答性は、THP-1細胞、Mo-DC、CD34-DCで類似するが、他のマーカーに比べてその反応性は弱いことが示唆された。

CD58はランゲルハンス細胞の活性化に伴い、発現増強することで、強力な抗原提示やT細胞活性化に寄与することが知られている<sup>45)</sup>。本研究では、THP-1細胞において、DNCB及びNiSO<sub>4</sub>による有意な発現増強は認められなかった。これは、他の細胞表面抗原に比べて、CD58のベースの発現が高いことに起因する可能性が考えられた。

本研究では、DNCB と比べて、NiSO<sub>4</sub>による CD54 や CD40 の発現増強、並びに、TNF- $\alpha$ や IL-8 の産生増強は顕著に誘導された。同程度の細胞毒性を誘導する DNCB (5  $\mu$ g/mL) と NiSO<sub>4</sub> (85  $\mu$ g/mL) とを比較すると、検討した活性化マーカーの発現強度はおよそ 2 倍の差があった。Mizuashi らは、Mo-DC を用いた検討から、DNCB と NiCl<sub>2</sub>は、細胞内レドックスのインバランス誘導機構が異なることを報告している<sup>46)</sup>。すなわち、DNCB は還元型グルタチオン (GSH) に直接結合することで、細胞内の GSH/酸化型グルタチオン (GSSG) の比を減少させるのに対し、NiCl<sub>2</sub>では、活性酸素種を生じることにより GSH/GSSG 比を減少させることが示唆されている。このことから、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub>による THP-1 細胞の応答性の違いは、細胞内の異なるシグナル伝達系の存在を示唆しているのかもしれない。

THP-1 細胞は様々な感作性物質に対し、機能的に異なる細胞表面抗原やサイトカインの発現を増強させることが明らかとなった。また、感作性物質による細胞活性化は僅かな細胞毒性 (細胞生存率 70~95%) と関連しているように見られた。一方で、細胞毒性を誘導する処理濃度で非感作性物質を適用しても、THP-1 細胞の活性化は誘導されなかった。この結果は、Hulette らの結果と一致している<sup>47)</sup>。Hulette らは、Mo-DC において、10~15%の細胞毒性が誘導される濃度で感作性物質を処理した際に CD86 の発現増強が認められると報告している。このことから、THP-1 細胞と樹状細胞、いずれにおいても、感作性物質による細胞活性化と細胞毒性との間には、密接な関係があることが示唆された。Manome らは、DNCB や NiCl<sub>2</sub>を含む、いくつかの感作性物質に

よる Mo-DC の細胞死に関して報告している<sup>40)</sup>。それによると、 $\text{NiCl}_2$  は 1mM 以上の濃度で、アポトーシスを起こす細胞が有意に多く、DNCB では検討した全濃度でネクローシスを起こす細胞が有意に多いことを報告している。すなわち、細胞死の状態は化学物質によって大きく異なることが示唆されている。THP-1 細胞における、細胞活性化と細胞毒性との関係については、さらに検討が必要である。

本研究では、THP-1 細胞の活性化が T 細胞への抗原提示に及ぼす影響に関しては明らかになっていないし、今後、解決すべき課題である。抗原提示を担う樹状細胞においては、感作性物質によって CD86 や CD83 の発現が増強することはよく知られている。本研究により、THP-1 細胞においても、樹状細胞の活性化に関わる種々のマーカーの発現が増強することが明らかとなった。これら共通の現象からすると、THP-1 細胞の活性化が T 細胞への抗原提示に対して、何らかの役割を担う可能性はあると考えられる。

## 第4節 小括

THP-1 細胞が皮膚感作性物質により、樹状細胞の活性化を反映する様々な応答を示し、それらを指標にすることで、感作性物質と非感作性物質を判別できることが示された。また、THP-1 細胞は入手が容易で、均一な細胞集団としての特徴から研究に汎用できることに加え、樹状細胞の代替として化学物質の感作性の有無を評価可能な細胞モデルであることが示唆された。



## 第2編 感作性物質による THP-1 細胞活性化の作用機構の解明<sup>48,49)</sup>

### 第1章 THP-1 細胞活性化に及ぼす TNF- $\alpha$ と細胞外 ATP の役割<sup>48)</sup>

皮膚に感作性物質が接触すると、表皮中の樹状細胞（ランゲルハンス細胞）は活性化し、所属リンパ節へ遊走する。さらに、抗原情報を T 細胞へ提示し、抗原特異的な T 細胞の増殖を誘導する。樹状細胞はこの活性化の過程で、種々の細胞表面抗原の発現や炎症性サイトカインの産生を増強することが知られている。最近では、ヒト末梢血 CD14 陽性細胞由来の樹状細胞 (Mo-DC) や CD34 陽性造血前駆細胞 (CD34-DC) が、感作性物質処理により種々の細胞表面抗原やサイトカインの産生を増強することが *in vitro* 実験で明らかとなっている。すなわち、このような樹状細胞の特徴を利用することで、*in vitro* でも化学物質の感作性を評価できる可能性が示唆された。一方で、これら *in vitro* で誘導する樹状細胞は、細胞の安定な供給、均一な細胞集団の確保、ドナー間のばらつき等の課題があり、実用的な試験法の開発はまだ難しいのが現状である。

そこで、こうした課題を克服するために、ヒト由来の細胞株である THP-1 細胞、U937 細胞 (human histiocytic lymphoma cell line)<sup>50,51)</sup>、MUTZ-3 細胞 (human acute myelomonocytic leukemia cell line)<sup>52)</sup> において、樹状細胞の代替としての有用性が検討されている。第1編で示したように、THP-1 細胞では、感作性物質により樹状

細胞の活性化の際に認められる様々な細胞表面抗原やサイトカインの発現が亢進することが明らかとなった。さらに、感作性物質により誘導される CD86 及び CD54 の発現変化を指標とする、*in vitro* 皮膚感作性試験法 (human Cell Line Activation Test; h-CLAT) の開発が進んでおり<sup>28,29)</sup>、これまでに 64 化合物を評価した結果、動物実験とも良好の相関性 (一致率 86%) を示し、有用な試験法である可能性が示唆されている<sup>30)</sup>。

しかしながら、感作性物質による THP-1 細胞活性化の作用機構に関してはよく分かっていない。そこで、炎症や免疫反応の制御において重要な役割を果たす TNF- $\alpha$ 、IL-8 及び ATP が THP-1 細胞活性化の作用機構に及ぼす影響に着目した。

TNF- $\alpha$ は樹状細胞の遊走に関与する<sup>38)</sup>だけでなく、*in vitro* 実験においてマウスの皮膚から高純度に精製したランゲルハンス細胞の CD40 や CD80 の発現を亢進させる働きがある<sup>53)</sup>ことが報告されている。このことから、TNF- $\alpha$ が細胞表面抗原の発現変化に影響する可能性が示唆される。

IL-8 に関しては、種々の炎症反応に関与することはよく知られているが<sup>41)</sup>、皮膚感作性における役割は明らかになっていない。一方で、Mo-DC や THP-1 細胞、U937 細胞において、感作性物質で優位な IL-8 の産生が報告されている<sup>18,31,51)</sup>。

また、ほとんどの細胞の細胞質内に 5~10 mM 貯蔵される ATP に関しては、細胞膜の損傷等によって細胞外へ放出され<sup>54)</sup>、細胞膜上の P2 purinergic レセプターを介して細胞外シグナル分子として作用することが報告されている<sup>55)</sup>。P2 レセプターのサブファミリーには、細胞膜チャンネルとして同定された P2X レセプタ

ー<sup>56)</sup> と、Gタンパクに結合する P2Y レセプター<sup>57)</sup> の2つがある。近年、樹状細胞においては、細胞膜上に P2 レセプターを発現する<sup>58)</sup> ことに加え、細胞外 ATP による P2 レセプターを介した CD86、CD83、CD54 の発現増強が報告されている<sup>59)</sup>。また、THP-1 細胞でも定常的に P2 レセプター mRNA が発現していることや、ATP が細胞外へ放出されていることが報告されている<sup>60)</sup>。

そこで、本研究では、感作性物質による細胞表面抗原の亢進に及ぼす、TNF- $\alpha$ 、IL-8 及び細胞外 ATP の影響を検討した。

## 第1節 実験の部

### 1. 細胞と培養液

細胞、培養液ともに第1編、第1節と同じものを用いた。

### 2. 被験物質と THP-1 細胞に対する処理方法

被験物質は、感作性物質として 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)、nickel sulfate hexahydrate ( $\text{NiSO}_4$ )、formaldehyde (FA)、propyl gallate (PG)、eugenol (EU)、非感作性物質として、sodium lauryl sulfate (SLS) を用いた。全ての化学物質は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。 $\text{NiSO}_4$ 、FA、SLS は予め生理食塩水に溶解させ、また、DNCB、PG、EU は dimethylsulfoxide (DMSO; Simga-Aldrich) に溶解させた後に、培養液に添加した。DMSO は培養液中の濃度が最高 0.2% になるように添加した。

THP-1 細胞は 24 ウェルプレートに  $1 \times 10^6$  cells/mL/ウェルにて播種し、被験物質を添加した後、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  条件下で 24 時間培養した。各被験物質の処理濃度は、24 時間培養後に 70~95% の細胞生存率になる濃度を設定した。DNCB は  $2.5 \mu\text{g/mL}$  と  $5 \mu\text{g/mL}$ 、 $\text{NiSO}_4$  は  $85 \mu\text{g/mL}$  と  $170 \mu\text{g/mL}$ 、FA は  $15 \mu\text{g/mL}$  と  $16.5 \mu\text{g/mL}$ 、PG は  $29 \mu\text{g/mL}$  と  $45 \mu\text{g/mL}$ 、EU は  $130 \mu\text{g/mL}$  と  $150 \mu\text{g/mL}$ 、SLS は  $54 \mu\text{g/mL}$  を、それぞれ設定した。各被験物質に関して、実験は少なくとも 3 回実施した。

また、細胞外の TNF- $\alpha$ 、IL-8 あるいは ATP が THP-1 細胞に及ぼす影響を調べるために、24 ウェルプレートに  $1 \times 10^6$  cells/mL/ウェルにて THP-1 細胞を播種し、 $9.8 \sim 2500 \text{ pg/mL}$  のリコンビナント

human TNF- $\alpha$  (rhTNF- $\alpha$ ; R&D Systems, Abingdon, UK)、80~50000 pg/mL のリコンビナント human IL-8 (rhIL-8; R&D Systems)、あるいは、30  $\mu$ M と 250  $\mu$ M の ATP (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) をそれぞれ添加した後、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。

さらに、TNF- $\alpha$  中和抗体と化学物質の共処理による影響を調べるために、0.625  $\mu$ g/mL 抗 TNF- $\alpha$  抗体 (R&D Systems) を 1 時間、細胞に適用した後に化学物質を 24 時間培養した。また、CD86 及び CD54 の発現増強に P2 レセプターが関与するかを調べるために、P2 レセプターの競合的阻害剤である suramin (Sigma-Aldrich) を 1 時間、細胞に適用した後に化学物質を添加し、24 時間培養した。

### 3. 細胞表面抗原の解析

化学物質を所定の時間、処理した後、細胞を回収し、0.1% bovine serum albumine 添加 PBS で洗浄した。さらに、Fc レセプターのブロックキングとして 0.01% Globlins Cohn Fraction II, III (Sigma-Aldrich) 添加 PBS を 10 分、4°C 条件下で処理した後、抗体染色を行った。細胞表面抗原の解析に用いた FITC 標識モノクローナル抗体を以下に示す；抗ヒト CD54 (clone; 6.5B5) (DAKO)、抗ヒト CD86 (clone; Fun-1)、抗ヒト CD40 (clone; 5C3) (以上、BD PharMingen)。また、Isotype control として、マウス IgG1 を DAKO より、マウス IgG1, $\kappa$  を BD PharMingen よりそれぞれ購入した。抗体染色は遮光、4°C 条件で、30 分間行った。

細胞表面抗原の発現量測定には FACSCalibur と CellQuest

software (Beckton Dickinson) を用いた。死細胞を染め分けるため、細胞浮遊液に propidium iodide (PI; Sigma-Aldrich) を最終濃度 0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で添加し、生細胞が 10,000 個になるまで測定した。細胞表面抗原の発現量の評価方法として、次式で表される相対蛍光強度 (Relative Fluorescence Intensity; RFI) を用いた。

$$\text{RFI (\%)} = \frac{\text{MFI of chemical-treated cells} - \text{MFI of chemical-treated isotype control cells}}{\text{MFI of vehicle control cells} - \text{MFI of vehicle isotype control cells}} \times 100$$

MFI; 平均蛍光強度

#### 4. サイトカイン産生量の解析

細胞に化学物質を 24 時間処理した後、培養上清を回収し、ELISA kit (R&D Systems) を用いて、TNF- $\alpha$ と IL-8 の産生量を側定した。

#### 5. 統計学的解析

解析したマーカーの発現変化を評価するために、統計学的な有意差を Student's *t*-test により解析した。

## 第2節 結果

### 1. DNCB、NiSO<sub>4</sub> 及び SLS によるサイトカイン産生と細胞表面抗原発現の経時変化

本研究では、THP-1 細胞に対し、DNCB (2.5 µg/mL と 5 µg/mL)、NiSO<sub>4</sub> (85 µg/mL と 170 µg/mL)、SLS (54 µg/mL) をそれぞれ適用し、TNF-α 及び IL-8 の産生量、また、CD86、CD54 及び CD40 の発現量の時間変化を、処理開始から 1、3、6、9、12、24 時間後に調べた (Table 2)。無処理細胞の細胞生存率は 24 時間後でも 98% で変化しなかったが、高濃度の DNCB (5 µg/mL) 及び NiSO<sub>4</sub> (170 µg/mL) における細胞生存率の減少は 12~24 時間の間に顕著に起こり、24 時間後には共に 82% 程度であった。DNCB (2.5 µg/mL)、NiSO<sub>4</sub> (85 µg/mL) 及び SLS (54 µg/mL) における細胞生存率もまた、12~24 時間の間に顕著に減少し、24 時間後には、いずれの場合も 91~93% を示した。

DNCB、NiSO<sub>4</sub> 及び SLS による TNF-α と IL-8 の産生量の時間依存性を Fig. 6 に示した。高濃度の DNCB (5 µg/mL) 及び NiSO<sub>4</sub> (170 µg/mL) では、より多量の TNF-α の産生が認められ、6~12 時間で最大に達した。一方で、SLS、無処理群では顕著な変化は認められなかった。また、NiSO<sub>4</sub> による IL-8 の産生は、検討した 2 濃度共に、同じような時間依存的な増加が認められた。すなわち、処理開始 3 時間では急激に産生量が増加し、6 時間後以降は緩やかに増加した。DNCB による IL-8 の産生量では、2 濃度共に、処理開始 6 時間までは急激に産生量が増え、それ以降はプラトウ

な挙動を示した。少なくとも処理開始 3 時間後には、溶媒処理群に対して、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$  と IL-8 の産生量は有意に増加した (Table 3)。非感作性物質の SLS ではいずれの処理時間においても、TNF- $\alpha$  と IL-8 において有意な変化は認められなかった。

さらに、DNCB、NiSO<sub>4</sub> 及び SLS による CD86、CD54、CD40 の発現量の時間依存性を Fig. 6 に示した。DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54、CD40 の発現量の増加は、TNF- $\alpha$  と IL-8 の産生に比べて、より遅れて誘導された。各細胞表面抗原の発現増加は、処理開始 3 時間から 6 時間後に始まり、測定終了の 24 時間後まで継続した。24 時間処理後には、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> により、CD86、CD54、CD40 全ての発現量において、統計学的に有意な増強が認められた (Table 2)。NiSO<sub>4</sub> では 3 時間後以降、CD54 の発現が有意に増加し、また、9 時間後以降、CD40 の発現が有意に増加した。一方で、SLS ではいずれのマーカーにおいても発現の増加は認められなかった。



Table 2 Time dependent effects on cell viability induced by DNCB, NiSO<sub>4</sub>, and SLS.

Chemicals	Tested concentration (µg/mL)	Mean percent viability ± SD (%)					
		1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
non-treated		98±1	98±1	98±1	98±1	98±1	98±1
DNCB	2.5	98±1	97±1	96±1	96±1	95±1	91±1
	5	98±1	96±1	96±1	96±1	95±1	83±1
NiSO <sub>4</sub>	85	98±1	97±1	97±1	96±1	96±2	91±2
	170	98±1	96±1	96±1	95±2	94±2	82±3
SLS	54	98±1	96±1	97±1	96±1	96±1	93±3

Cells were treated with chemicals for 1, 3, 6, 9, 12, and 24 h. After treatment, cell viability was measured by flow cytometry using PI staining. Mean percent viability (±S.D.) was given for at least three independent experiments and is shown for each test concentration for each chemical.

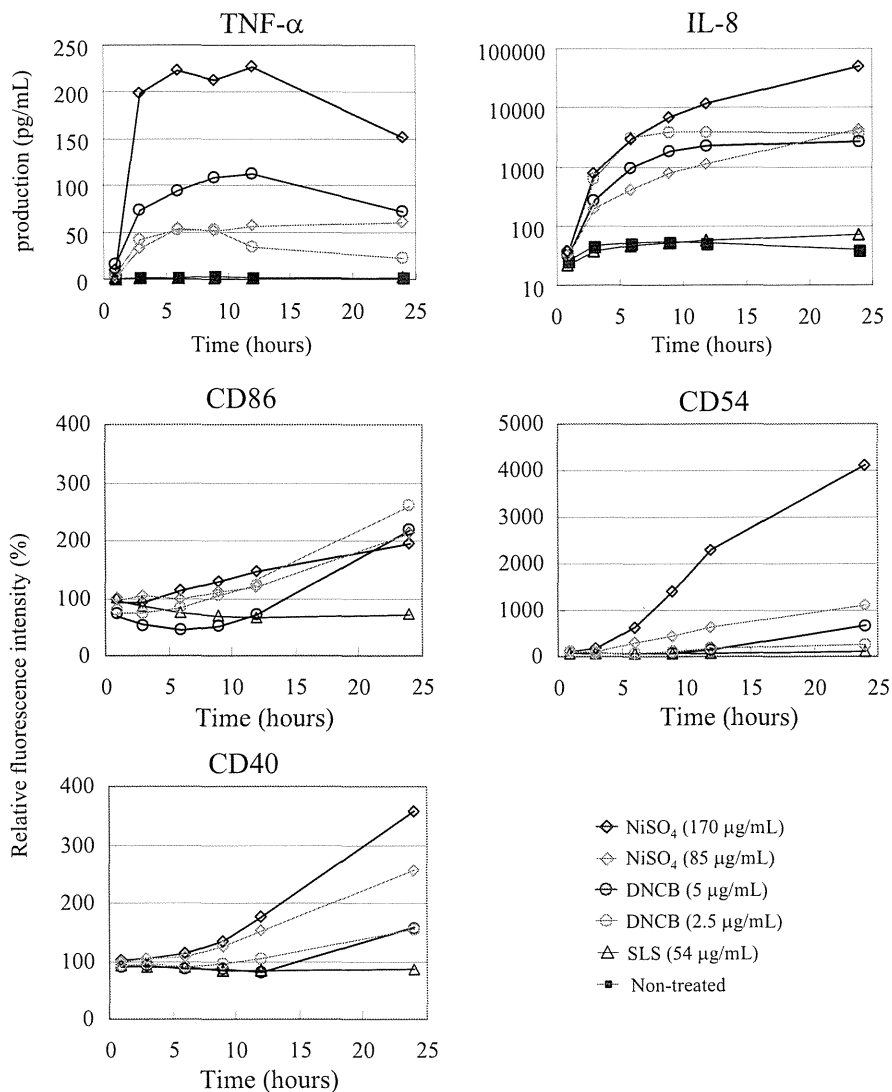


Fig. 6 Time-dependent effects on TNF- $\alpha$ , IL-8, CD54, CD86, and CD40 expression induced by DNCB, NiSO<sub>4</sub>, and SLS. Cells were treated with chemicals for 1, 3, 6, 9, 12, and 24 h. After treatment, the culture supernatant was collected to measure TNF- $\alpha$  and IL-8 secretion by ELISA. The expression of CD86, CD54, and CD40 was measured by flow cytometry and RFIs were calculated. The mean of six independent experiments are shown for each chemical.

Table 3 Statistical analysis of surface cell marker up-regulation induced by DNCB, NiSO<sub>4</sub>, and SLS.

Chemicals	Tested concentration (µg/mL)	P value (TNF-α, n=6)					
		1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
DNCB	2.5	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	5	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
NiSO <sub>4</sub>	85	ns <sup>a</sup>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	170	ns <sup>a</sup>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
SLS	54	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>

Chemicals	Tested concentration (µg/mL)	P value (IL-8, n=6)					
		1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
DNCB	2.5	ns <sup>a</sup>	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05
	5	ns <sup>a</sup>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.01	<0.01
NiSO <sub>4</sub>	85	ns <sup>a</sup>	<0.01	<0.05	<0.05	<0.05	<0.01
	170	ns <sup>a</sup>	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01
SLS	54	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>

Chemicals	Tested concentration (µg/mL)	P value (CD86, n=3)					
		1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
DNCB	2.5	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.01
	5	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.01
NiSO <sub>4</sub>	85	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.05	<0.01
	170	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.01
SLS	54	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>

Chemicals	Tested concentration (µg/mL)	P value (CD54, n=3)					
		1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
DNCB	2.5	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.01	<0.01
	5	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.01
NiSO <sub>4</sub>	85	ns <sup>a</sup>	<0.05	<0.05	<0.01	<0.05	<0.01
	170	ns <sup>a</sup>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
SLS	54	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>

Chemicals	Tested concentration (µg/mL)	P value (CD40, n=3)					
		1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
DNCB	2.5	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.01
	5	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.01
NiSO <sub>4</sub>	85	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.01	<0.05	<0.01
	170	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	<0.05	<0.01	<0.01
SLS	54	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>	ns <sup>a</sup>

*P* values were calculated with a Student's *t*-test in order to evaluate a statistical significance between the relevant vehicle control cells and chemical-treated cells. *P* values were calculated for each time. <sup>a</sup> not significant.

## 2. CD86、CD54 及び CD40 の発現増強に及ぼす rhTNF- $\alpha$ の効果

TNF- $\alpha$  が THP-1 細胞の活性化に関与するかを調べるために、THP-1 細胞に対して 5 濃度の rhTNF- $\alpha$  を 24 時間適用し、CD86、CD54、CD40 の発現増強に及ぼす rhTNF- $\alpha$  の影響を調べた (Fig. 7)。無処理細胞に比べて、rhTNF- $\alpha$  による細胞生存率への影響はなかった。さらに、CD54 に関しては 9.8 pg/mL rhTNF- $\alpha$  から、CD40 に関しては 39.1 pg/mL rhTNF- $\alpha$  から、発現の有意な増強が認められた。CD54 での発現増強の方が、CD40 に比べて、rhTNF- $\alpha$  の影響は強力であった。rhTNF- $\alpha$  による濃度依存的な影響は CD54、CD40 で認められる一方で、CD86 では認められなかった。

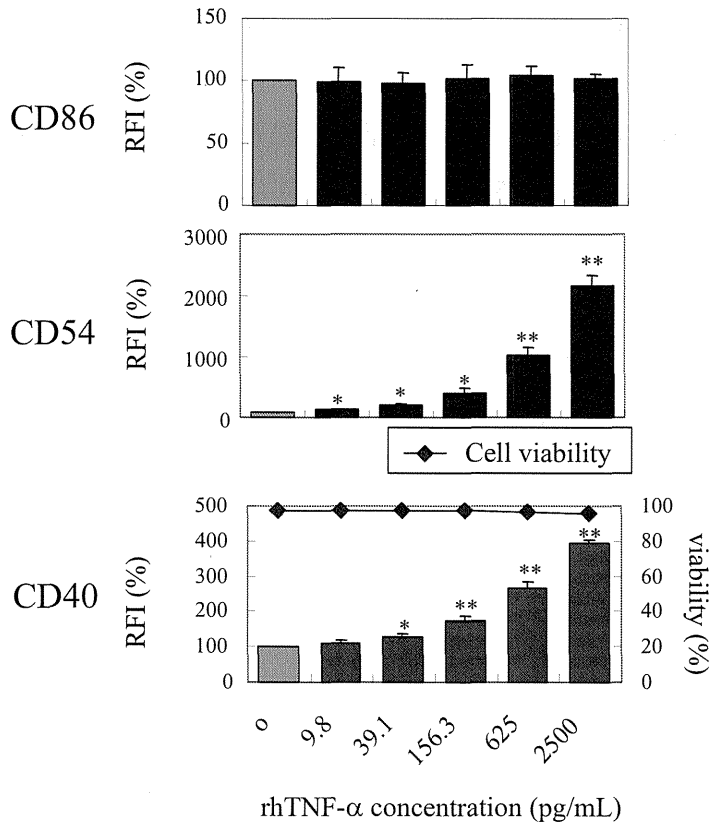


Fig. 7 Effect of rhTNF- $\alpha$  on CD86, CD54, and CD40 expression.

Cells were treated with rhTNF- $\alpha$  alone with five concentrations for 24 h. The line graph represents cell viability. Mean  $\pm$ S.D. of CD86, CD54, and CD40 expression, as indicated by percent RFI increase, for three independent experiments is shown for each concentration of rhTNF- $\alpha$  tested.

### 3. CD86、CD54 及び CD40 の発現増強に及ぼす rhIL-8 の効果

続いて、IL-8 が THP-1 細胞の活性化に及ぼす影響を調べるために、THP-1 細胞に対して 5 濃度の rhIL-8 を適用し、24 時間培養し、CD86、CD54 の発現増強に及ぼす rhIL-8 の影響を調べた (Fig. 8、Table 4)。無処理細胞に比べて、rhIL-8 による細胞生存率への影響はなかった。さらに、rhIL-8 は CD86 の発現量及び TNF- $\alpha$  の産生に対し、全く影響を及ぼさなかった。同様の結果は、CD54 においても確認された (図は示さず)。

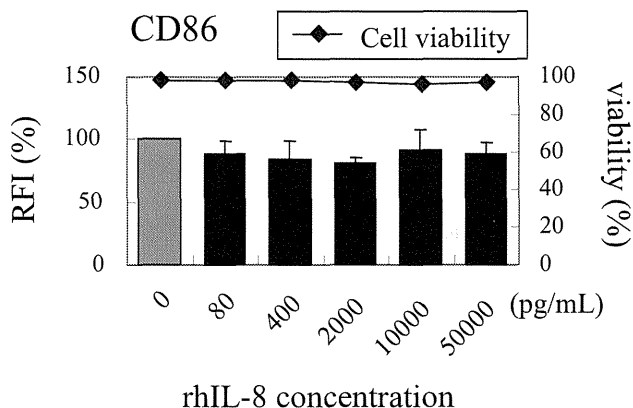


Fig. 8 Effect of rhIL-8 on CD86 expression. Cells were treated with rhIL-8 at five concentrations for 24 h. The line graph represents cell viability. Mean  $\pm$ S.D. of three independent experiments is shown for each concentration of rIL-8.

Table 4 Effect of rhIL-8 on TNF- $\alpha$  production.

rhIL-8 conc. (pg/mL)	TNF- $\alpha$ production (pg/mL)
0	0.8
80	0.7
400	0.9
2000	1.0
10000	1.0
50000	0.9

Cells were treated with rhIL-8 with five concentrations for 24 h. After treatment, the culture supernatant was measured for TNF- $\alpha$  secretion by ELISA.

#### 4. TNF- $\alpha$ の中和抗体による影響

rhTNF- $\alpha$ により CD54 及び CD40 の発現が増強したことから、感作性物質により THP-1 細胞から産生される TNF- $\alpha$ が、CD54 及び CD40 の発現に影響する可能性が示唆された。そこで、本研究では、TNF- $\alpha$ の中和抗体と DNCB あるいは NiSO<sub>4</sub> の共処理による影響を調べた。TNF- $\alpha$ の中和効果を確認するために、ELISA によって TNF- $\alpha$ 産生量を定量した。その結果、Fig. 4 に示したように、TNF- $\alpha$ 抗体によって、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> により産生した TNF- $\alpha$ は完全ではないものの、強力に抑制された。5  $\mu$ g/mL の DNCB ( $P < 0.01$ ) 及び、85  $\mu$ g/mL ( $P < 0.01$ ) と 170  $\mu$ g/mL ( $P < 0.05$ ) の NiSO<sub>4</sub> においてそれぞれ、有意な抑制効果が認められた。さらに、TNF- $\alpha$ の抑制によって、DNCB による CD54 の発現が有意に抑制された。NiSO<sub>4</sub> による CD54 の発現増強も、有意に抑制された。CD54 の発現抑制に加えて、CD40 の発現においても、5  $\mu$ g/mL の DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> の 2 濃度で、有意な発現抑制が認められた。

TNF- $\alpha$ による細胞活性化の効果をさらに検証するために、代表的な感作性物質である FA、PG 及び EU による CD54 の発現量への影響を検討した (Fig. 10)。その結果、FA 及び PG に関しては、TNF- $\alpha$ の顕著な産生が認められ、16.5  $\mu$ g/mL の FA 及び、29  $\mu$ g/mL と 45  $\mu$ g/mL の PG では、溶媒処理群と比べて、統計学的にも有意な増加であった。一方で、EU では TNF- $\alpha$ の産生は認められなかった。CD54 においては、FA、PG 及び EU でいずれも有意な発現増強が認められた。さらに、TNF- $\alpha$ の阻害によって、FA 及び PG による TNF- $\alpha$ の産生と CD54 の発現増強は強く抑制された。EU においては、TNF- $\alpha$ の産生が無処理細胞



と変わらず、ほとんど認められず、また、CD54 の発現増加が抗 TNF- $\alpha$  抗体の影響を受けることもなかった。

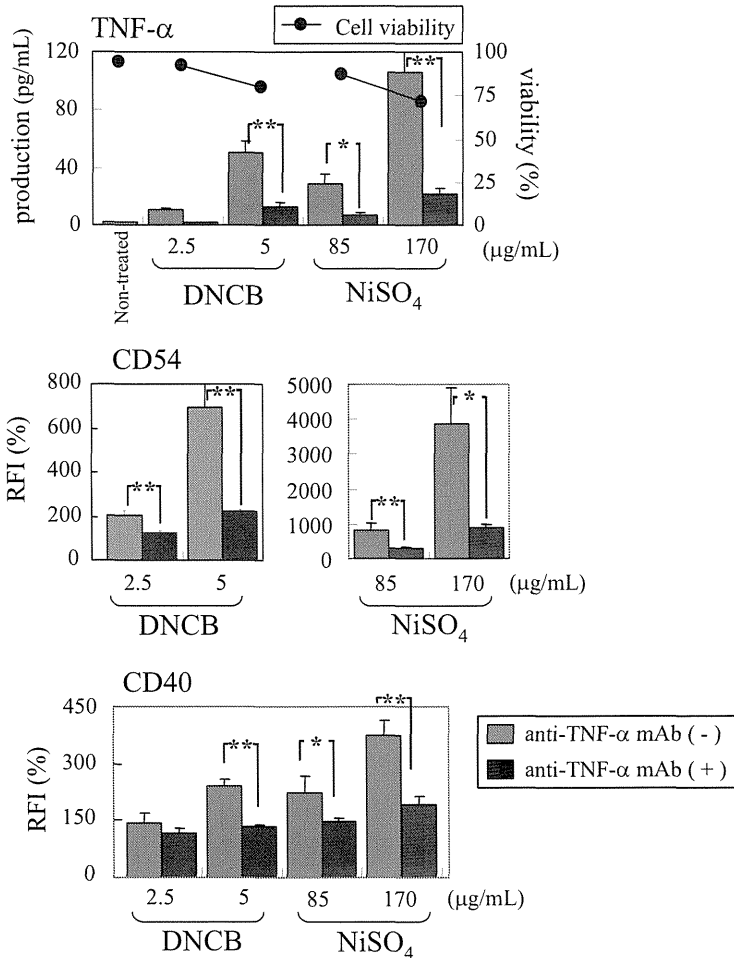


Fig. 9 Neutralization effect of TNF- $\alpha$  bioactivity in THP-1 cells induced with DNCB and NiSO<sub>4</sub>. Cells were pre-treated with and without anti-TNF- $\alpha$  antibody for 1 h and then treated with DNCB and NiSO<sub>4</sub> for 24 h. After culture, cells were analyzed for TNF- $\alpha$  by ELISA and for CD54 and CD40 expression by flow cytometry. Mean  $\pm$  S.D. of TNF- $\alpha$  production and CD54 and CD40 expression for three independent experiments is shown for each chemical. Statistical significance was calculated with a Student's *t*-test (\*\* $P$ <0.01; \* $P$ <0.05) .

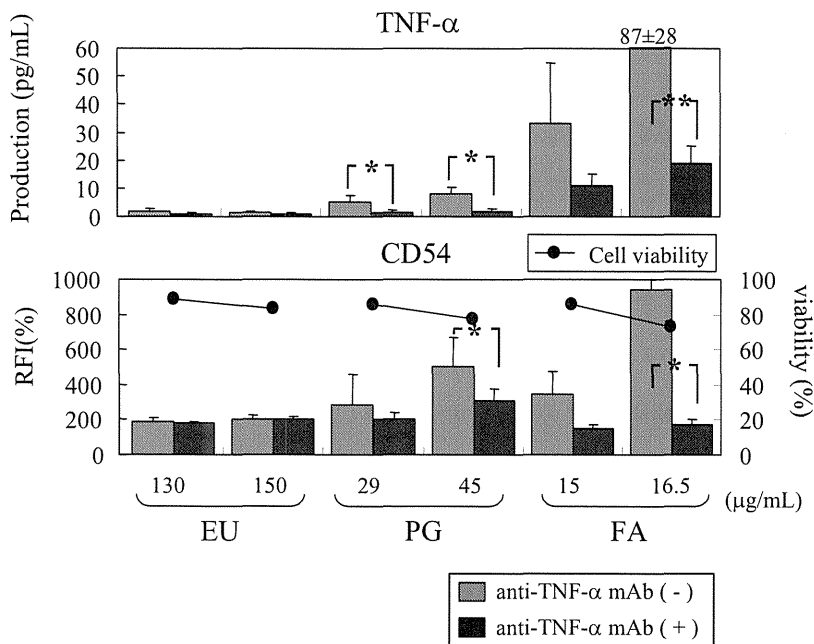


Fig. 10 Neutralization effect of TNF- $\alpha$  bioactivity in THP-1 cells induced by EU, PG, and FA. Cells were pre-treated with and without anti-TNF- $\alpha$  antibody for 1 h and then treated with EU, PG, and FA for 24 h. Mean  $\pm$ S.D. of TNF- $\alpha$  production and CD54 expression for three independent experiments is shown for each chemical. Statistical significance was calculated with a Student's *t*-test (\*\* $P$ <0.01; \* $P$ <0.05).

## 5. 細胞外 ATP が CD86 及び CD54 の発現量へ及ぼす影響

細胞外 ATP が CD86 及び CD54 の発現量へ及ぼす影響を調べるために、THP-1 細胞に対して 30  $\mu$ M あるいは 250  $\mu$ M の ATP を添加し、24 時間培養した。ATP はいずれの処理濃度においても、無処理細胞と比べて、細胞生存率には影響しなかった。Fig. 11 には、ATP を処理した細胞の CD86 及び CD54 の発現量のヒストグラムを示した。その結果、外的な ATP の適用により、CD86 及び CD54 の発現が濃度依存的に増強することが明らかとなった。

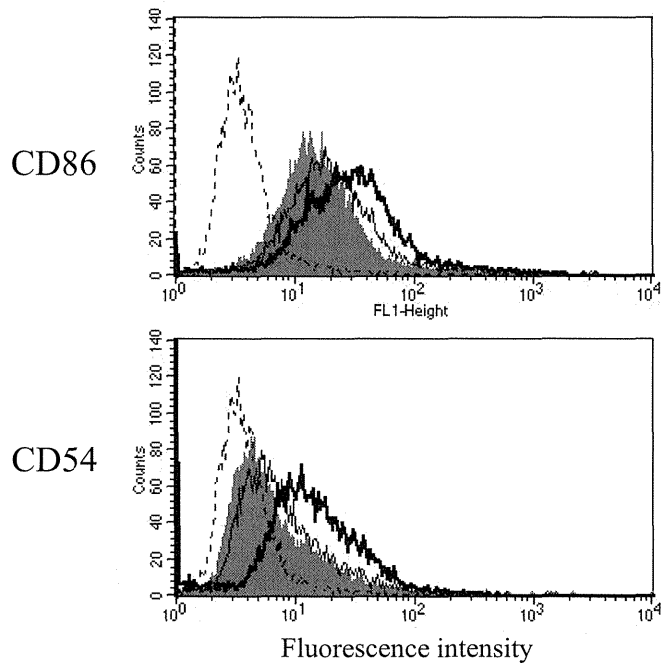


Fig. 11 Effect of extracellular ATP on CD86 and CD54 expression. Cells were treated with ATP for 24 h. CD86 and CD54 expression was analyzed with flow cytometry. The histograms are for isotype control (dotted line), non-treated (shaded peak), 30  $\mu\text{M}$  of ATP-treated (thick solid line), or 250  $\mu\text{M}$  of ATP-treated (dark solid line). These are representative data of three independent experiments.

## 6. suramin が DNCB、NiSO<sub>4</sub> 及び EU による CD86、CD54 の発現へ及ぼす影響

細胞外 ATP により CD86 及び CD54 の発現が増強したことから、感作性物質によって、THP-1 細胞から放出される ATP が、CD86 及び CD54 の発現に影響する可能性が示唆された。そこで、本研究では、P2 レセプターアンタゴニストである suramin と感作性物質の共処理による影響を調べた。細胞に対して 100  $\mu$ M あるいは 200  $\mu$ M の suramin を 1 時間処理後、DNCB、NiSO<sub>4</sub> 及び EU を添加して、24 時間培養した。その結果、suramin の存在下では、NiSO<sub>4</sub> による CD86 及び CD54 の発現が有意に抑制された。また、DNCB では、統計学的な有意差は得られないものの、suramin 処理により、CD86 の発現増強の抑制が認められた。EU においても、suramin によって、CD86 の発現増強が抑制される傾向が認められたが、CD54 の発現増強には影響を与えなかった。

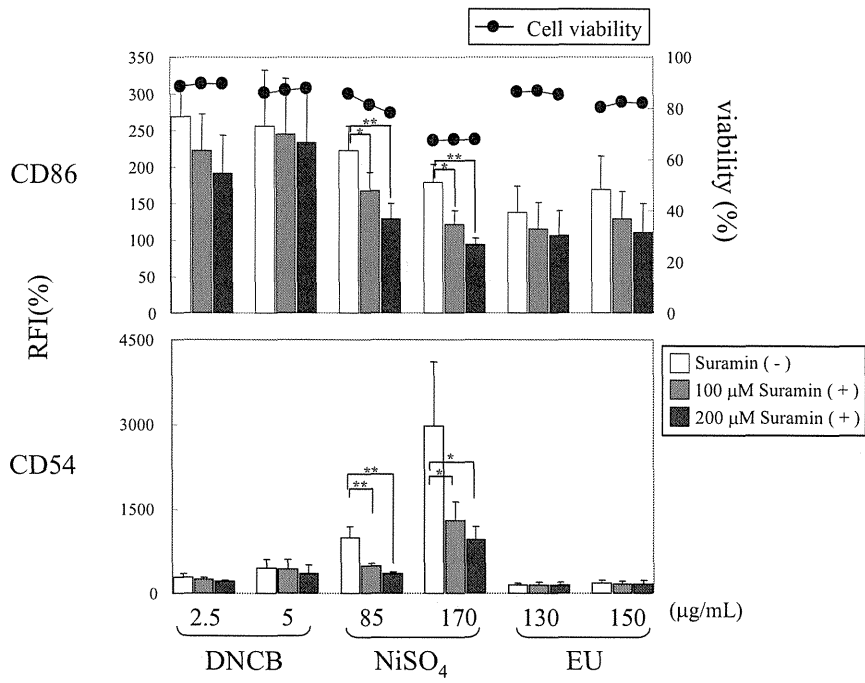


Fig. 12 Effect of suramin on CD86 and CD54 expression induced by DNCB, NiSO<sub>4</sub>, and EU. Cells were pre-cultured with or without P2 receptor antagonist suramin 1 h before treatment with DNCB, NiSO<sub>4</sub>, and EU. Mean ±S.D. of three independent experiments is shown for each chemical. Statistical significance was calculated with a Student's *t*-test (\*\**P*<0.01; \**P*<0.05) .

### 第3節 考察

生体での皮膚感作性発現の初期において、表皮の樹状細胞（ランゲルハンス細胞）の活性化は重要な役割を果たしている。これまでに Mo-DC、CD34-DC に対して、感作性物質を処理すると、*in vitro* においてもランゲルハンス細胞と同様な活性化が起こることが報告されている<sup>17-22)</sup>。前章では、ヒト由来細胞株である THP-1 細胞が、様々な感作性物質によって種々の細胞表面抗原の発現やサイトカインの産生量を増加させ、樹状細胞に類似の応答性を示すことを明らかにした。そこで本章では、感作性物質による THP-1 細胞の活性化の作用機序を解明するために、TNF- $\alpha$ 、IL-8 及び細胞外 ATP の関与について調べた。

その結果、キネティクス解析により、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> により産生される TNF- $\alpha$  や IL-8 が、処理開始 3 時間で有意に増強し、それに続いて CD54、CD86、CD40 の発現が増強することを明らかにした。そこで、TNF- $\alpha$  が細胞活性化に与える影響を調べた結果、rhTNF- $\alpha$  は濃度依存的に CD54 及び CD40 の発現を増強した。さらに、抗 TNF- $\alpha$  抗体より細胞外の TNF- $\alpha$  を中和すると、感作性物質による CD54 及び CD40 の発現増強が顕著に抑制された。このことから、感作性物質により産生する TNF- $\alpha$  がオートクラインに細胞に作用し、CD54 及び CD40 の発現増強に寄与していることが示唆された。

樹状細胞においては、感作性物質による CD54 及び CD40 の発現増強に、TNF- $\alpha$  がオートクラインに作用することはこれまで知られていなかった。しかしながら、最近、CD34-DC において、DNCB による CCR7 の発現増強に TNF- $\alpha$  のオートクライン作用が関与していることが報告されている<sup>61)</sup>。よって、TNF- $\alpha$  を介した細胞表面抗原の発現変



化は THP-1 細胞だけでなく、樹状細胞でも起こり得る作用機構であることが示唆された。

マウスを用いた検討より、TNF- $\alpha$ が樹状細胞の遊走や活性化に重要なことはよく知られている<sup>62)</sup>。また、ヒト皮膚から分離したランゲルハンス細胞を用いて、rhTNF- $\alpha$ の影響を調べた報告では、CD40 及び CD54 の発現増強が認められており、TNF- $\alpha$ がランゲルハンス細胞の活性化に関与することが報告されている<sup>63)</sup>。本研究でも、THP-1 細胞では rhTNF- $\alpha$ により CD40 及び CD54 の発現増強が認められたことから、THP-1 細胞の TNF- $\alpha$ に対する応答性はランゲルハンス細胞と類似していた。一般に、生体において、ランゲルハンス細胞は、炎症刺激により TNF- $\alpha$ を産生するが、一方で、ケラチノサイトも多量の TNF- $\alpha$  や GM-CSF を産生することが報告されている<sup>38)</sup>。よって、皮膚からの LC の分離、精製が不十分だと、コンタミしたケラチノサイト由来のサイトカインの影響を無視できなかった。しかしながら、近年、マウスの表皮から高純度にランゲルハンス細胞を精製し、ケラチノサイトの影響を排除できる条件下では、rhTNF- $\alpha$ により CD40 の発現が顕著に増強するが、CD86 の発現は rhTNF- $\alpha$ の処理濃度、時間に関係なく、変化しないということが Salgado らによって報告されている<sup>53)</sup>。これは、THP-1 細胞において、TNF- $\alpha$ が CD86 発現に関与しないという結果とよく似ていた。TNF- $\alpha$ に対する CD86 の不応答性が THP-1 細胞だけでなく、ランゲルハンス細胞でも起こることが示唆された。

本研究では、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub>による CD54 の顕著な発現増強には、TNF- $\alpha$ が強く関与することが示された。一方で、EU では、TNF- $\alpha$ の産生が無処理群と同様に増加しないにもかかわらず、CD54 の発現増強が認められた。また、抗 TNF- $\alpha$ 抗体によって CD54 の発現に変化が影

響を受けることもなかった。これは、EU に特異的な反応の可能性も考えられるが、CD54 の有意な発現増強に TNF- $\alpha$  が関与しない経路が存在することを示唆しているのかもしれない。近年、Boislève らは、CD34-DC において、NiSO<sub>4</sub> による CCR7 の発現増強が TNF- $\alpha$  を介さず、p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) や c-jun N-terminal kinase (JNK) のリン酸化を活性化して、直接的に誘導されると報告している<sup>61)</sup>。このことから、THP-1 細胞においても、CD54 の発現増強を直接的に誘導するシグナル伝達経路が存在する可能性があるかもしれない。

さらに、TNF- $\alpha$  同様に短時間の感作性物質処理で多量に産生する IL-8 においても、細胞活性化への影響を調べた。DNCB や NiSO<sub>4</sub> により産生する IL-8 よりもはるかに高濃度の rhIL-8 を適用しても、細胞表面抗原の発現や TNF- $\alpha$  の産生量に明らかな変化は認められなかった。このことから、IL-8 は、感作性物質による細胞活性化に伴う結果として産生されるものの、オートクラインに作用して細胞の活性化へ寄与する可能性は低いと考えられた。

また、細胞外 ATP により THP-1 細胞の CD86 及び CD54 の発現が増強することが分かった。また、P2 レセプターアンタゴニストである suramin を用いることで、感作性物質による CD86 と CD54 の発現増強が部分的に抑制されたことから、細胞外 ATP を介した細胞表面抗原の発現増強の可能性が示唆された。ヒト樹状細胞では、P2X 及び P2Y レセプターが発現すること<sup>58)</sup>、さらに、細胞外 ATP によって CD86、CD80、CD54 及び CD83 といった細胞表面抗原の発現が増強すること<sup>59)</sup> が報告されている。また、近年、THP-1 細胞においては、P2 レセプターの発現や細胞内 ATP の僅かな放出が認められている<sup>60)</sup>。ATP は

ほとんどの細胞で細胞質内に 5~10 mM 存在し、細胞膜の傷害により放出されることが示されている<sup>54)</sup>。以上より、細胞外 ATP が感作性物質による細胞活性化に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

前章において、感作性物質による細胞の活性化には若干、細胞毒性が誘導される処理濃度が必要である可能性が考えられた。本章のキネティクス解析においても、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54、CD40 の有意な発現増強は、僅かに細胞生存率が低下する 24 時間処理後に誘導された。しかしながら、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$  と IL-8 の有意な産生は、細胞生存率の低下がない 3 時間から 12 時間の処理の間でも認められた。このことから、少なくとも TNF- $\alpha$  と IL-8 の産生は、細胞生存率の低下に依存せず、細胞毒性とは独立した細胞応答である可能性が示唆された。サイトカイン産生や細胞表面抗原の発現増強を伴う細胞の活性化と、細胞毒性との関係のさらなる理解に向け、今後の研究が期待される。

## 第4節 小活

本章では、感作性物質による THP-1 細胞の活性化の作用機序を解明するために、TNF- $\alpha$ 、IL-8 及び細胞外 ATP の関与について調べた。その結果、感作性物質により早期に産生する TNF- $\alpha$  の産生がオートクラインに細胞に作用し、CD54 及び CD40 の発現増強に寄与することが示唆された。一方で、感作性物質による CD86 の発現増強には、少なくとも TNF- $\alpha$ 、IL-8 は関与せず、細胞外 ATP が部分的に関与する可能性が示唆された。以上より、感作性物質による THP-1 細胞の活性化は TNF- $\alpha$  のオートクライン作用及び細胞外 ATP によって部分的に制御され、樹状細胞における細胞活性化と同様の作用機構を介して誘導されることが示唆された。

## 第2章 THP-1 細胞活性化に及ぼすシグナル伝達経路の役割<sup>49)</sup>

近年、感作性物質による樹状細胞の活性化の作用機構に関して、細胞内シグナル伝達経路、特に mitogen-activated protein kinase (MAPK) の研究がいくつか報告されている。MAPK カスケードは細胞の増殖や分化を制御するシグナルの伝達機構としてよく知られており、MAPK ファミリーには、p38 MAPK、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) が存在する<sup>64,65)</sup>。Arrighi らは、樹状細胞に対し DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> を処理すると p38 MAPK のリン酸化が誘導され、また、p38 MAPK の活性阻害によって、NiSO<sub>4</sub> 処理における CD86 発現増強が抑制されることを報告している<sup>66)</sup>。さらに、Boislève らは、樹状細胞において、DNCB による TNF- $\alpha$  の産生に p38 MAPK の活性化が関与することを報告している<sup>61)</sup>。しかしながら、DNCB や NiSO<sub>4</sub> を処理した際の TNF- $\alpha$  の産生や細胞表面抗原の発現増強におけるシグナル伝達系の役割に関しては十分に明らかになってない。また、樹状細胞の活性化における p38 MAPK に比べ、ERK の役割に関してもほとんど明らかになっていない。それゆえ、本研究では THP-1 細胞において、DNCB と NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$  の産生や種々の細胞表面抗原の発現増強に関して、p38 MAPK と ERK の役割について検討した。

## 第1節 実験の部

### 1. 細胞と培養液

細胞、培養液ともに第1編、第1節と同じものを用いた。

### 2. p38 MAPK と ERK の Western Blot 解析

24 ウェルプレートに  $1 \times 10^6$  cells/mL/ウェルにて THP-1 細胞を播種し、 $5 \mu\text{g/mL}$  DNCB あるいは  $170 \mu\text{g/mL}$   $\text{NiSO}_4$  (共に Sigma-Aldrich) を添加した後、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  条件下で1時間培養した。また、p38 MAPK 及び ERK のリン酸化を阻害する実験では、DNCB 及び  $\text{NiSO}_4$  を添加する前に、p38 MAPK 阻害剤として SB203580 (Calbiochem, La Jolla, USA)、ERK 阻害剤として PD98059 (Calbiochem) を1時間、前培養した。DNCB 及び  $\text{NiSO}_4$  は、それぞれ DMSO、生理食塩水に溶解させた後に、培養液に添加した。DMSO は培養液中の濃度が最高  $0.2\%$  になるように添加した。

その後、細胞ライセートを調製するために、細胞を回収、洗浄した後、SLS サンプルバッファー ( $0.5\text{M}$  Tris-HCl,  $\text{pH}6.8$ 、 $10\%$  Glycerol、 $2\%$  SLS、 $5\%$  2-メルカプトエタノール、 $0.0025\%$  ブロモフェノールブルー) を加え、 $100^\circ\text{C}$ 、5 分間加熱することにより可溶化した。さらに、可溶化液を遠心分離して上清を回収し、細胞ライセートとした。細胞ライセートは  $10\%$  SDS-ポリアクリルアミドゲル (TEFCO, Tokyo, JAPAN) により泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF; Millipore, Bedford, USA) 膜に転写した。PVDF 膜は、phospho-p38 MAPK (Cell Signaling Technology, Danver, USA) 及び phospho-ERK (Cell Signaling) に対する一次抗体 ( $1000$  倍希釈) と一晩、 $4^\circ\text{C}$  でインキュベートした。

一次抗体反応の膜は十分に洗浄し、phospho-p38 MAPK (3000 倍希釈) 及び phospho-ERK (1000 倍希釈) に対する HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と共に、室温で 1 時間インキュベートした。二次抗体反応の膜は ECL solution (Amersham, Zurich, Switzerland) を用いて、化学発光検出を行った。

### 3. 細胞表面抗原の解析

24 ウェルプレートに  $1 \times 10^6$  cells/mL/ウェルにて THP-1 細胞を播種し、5  $\mu$ g/mL DNCB あるいは 170  $\mu$ g/mL NiSO<sub>4</sub> を添加した後、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間、培養した。また、p38 MAPK あるいは ERK が CD86、CD54 及び CD40 の発現に及ぼす影響を調べるために、SB203580 あるいは PD98059 を 1 時間前処理し、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> を 24 時間、培養した。細胞表面抗原の発現解析方法は、第 2 編、第 1 章、第 1 節に示したとおりである。細胞表面抗原の発現量の評価方法として、MFI を用いた。

### 4. サイトカイン産生量の解析

第 2 編、第 1 章、第 1 節に示したとおりである。

### 5. 統計学的解析

第 2 編、第 1 章、第 1 節に示したとおりである。

## 第2節 結果

### 1. DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による p38 MAPK、ERK のリン酸化と p38 MAPK 及び ERK に対する阻害剤の効果

THP-1 細胞に対して、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> を 1 時間処理することによる p38 MAPK、ERK のリン酸化をウェスタンブロットにより解析した。その結果、Fig. 13 及び Fig. 14 に示すように、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> は、DMSO 及び無処理群に比べて p38 MAPK と ERK のリン酸化を強く活性化した。このことから、THP-1 細胞において、p38 MAPK と ERK のシグナル伝達系は存在し、感作性物質により活性化することが示された。さらに、p38 MAPK 及び ERK のリン酸化に関して、p38 MAPK の阻害剤である SB203580 と、ERK の上流因子である MEK の特異的阻害剤である PD98059 の効果を検討した。その結果、阻害剤を前処理することにより、阻害剤濃度依存的に、p38 MAPK 及び ERK のリン酸化が抑制された。



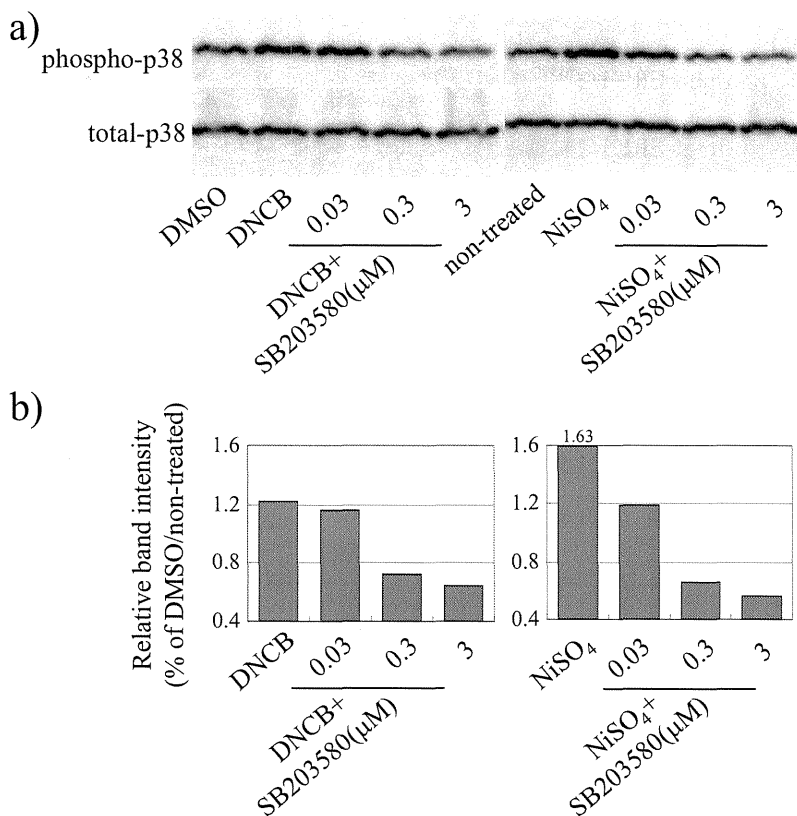


Fig. 13 DNCB- and NiSO<sub>4</sub>-induced phosphorylation of p38 MAPK and dose dependent effect of p38 MAPK inhibitor. Cells were pre-incubated with or without SB203580 or PD98059 at the concentrations indicated for 1 h and followed with DNCB at 5 μg/ml or NiSO<sub>4</sub> at 170 μg/ml for 1 h. (a) After treatment, the phospho-p38 MAPK and total-p38 were analyzed by Western Blot analysis. Similar results were obtained in three different experiments. (b) The relative band intensities of the phosphorylation of p38 MAPK in DNCB- or NiSO<sub>4</sub>-treated cells relatively to DMSO-treated or non-treated cells were determined by densitometric analysis.

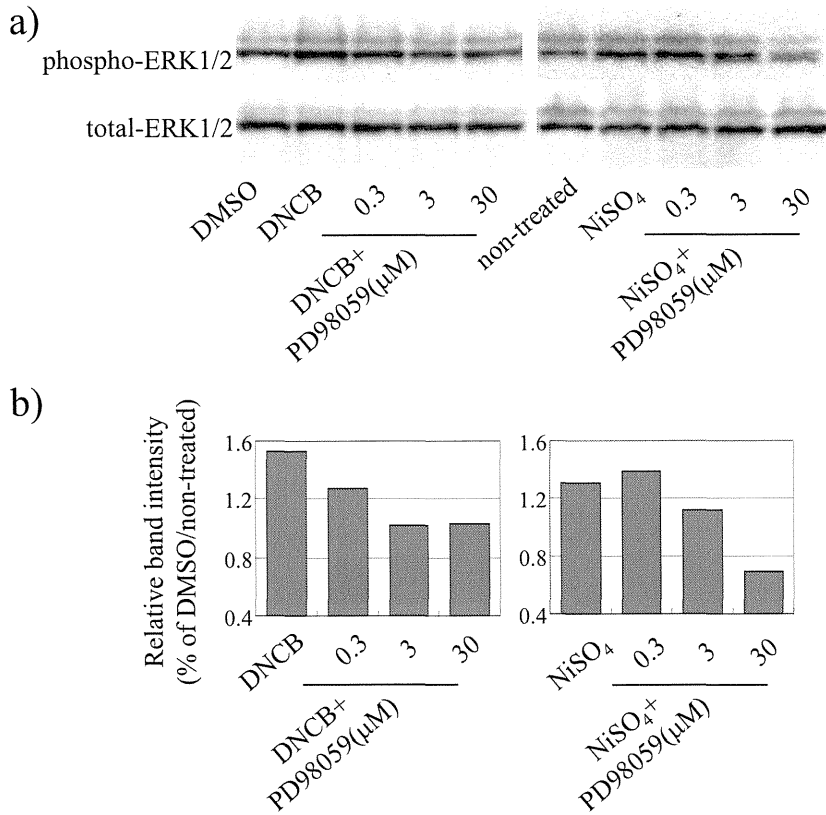


Fig. 14 DNCB- and NiSO<sub>4</sub>-induced phosphorylation of ERK and dose dependent effect of ERK inhibitor. Cells were pre-incubated with or without PD98059 at the concentrations indicated for 1 h and followed with DNCB at 5 μg/ml or NiSO<sub>4</sub> at 170 μg/ml for 1 h. (a) After treatment, the phospho-ERK1/2 and total-ERK1/2 were analyzed by Western Blot analysis. Similar results were obtained in three different experiments. (b) The relative band intensities of the phosphorylation of ERK in DNCB- or NiSO<sub>4</sub>-treated cells relative to DMSO-treated or non-treated cells were determined by densitometric analysis.

## 2. DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$ の産生に対する p38 MAPK、ERK の影響

THP-1 細胞において、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> の 1 時間処理により、p38 MAPK 及び ERK の活性化が認められたことから、続いて、p38 MAPK、ERK が DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> により早期に産生する TNF- $\alpha$  に及ぼす影響を調べた (Fig. 15)。その結果、DNCB ( $P < 0.01$ ) 及び NiSO<sub>4</sub> ( $P < 0.01$ ) では溶媒処理群に対し、TNF- $\alpha$  の有意な産生が認められた。さらに、DNCB で認められる TNF- $\alpha$  の産生は、p38 MAPK の阻害剤である SB203580 の濃度依存的に抑制され、0.3  $\mu$ M 及び 3  $\mu$ M SB203580 では、60 % 以上の抑制効果が認められた。一方で、NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$  の産生では SB203580 の影響はなかった。また、DNCB による TNF- $\alpha$  の産生に対し、ERK カスケードの阻害剤である PD98059 の影響はなかった。しかしながら、PD98059 の濃度依存的に、NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$  の産生が抑制され、また、その抑制効果は 3  $\mu$ M PD98059 で 57 %、30  $\mu$ M PD98059 で 82 % に達した。このことから、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> により早期に産生する TNF- $\alpha$  はそれぞれ、p38 MAPK 及び ERK によって強く制御されていることが示唆された。

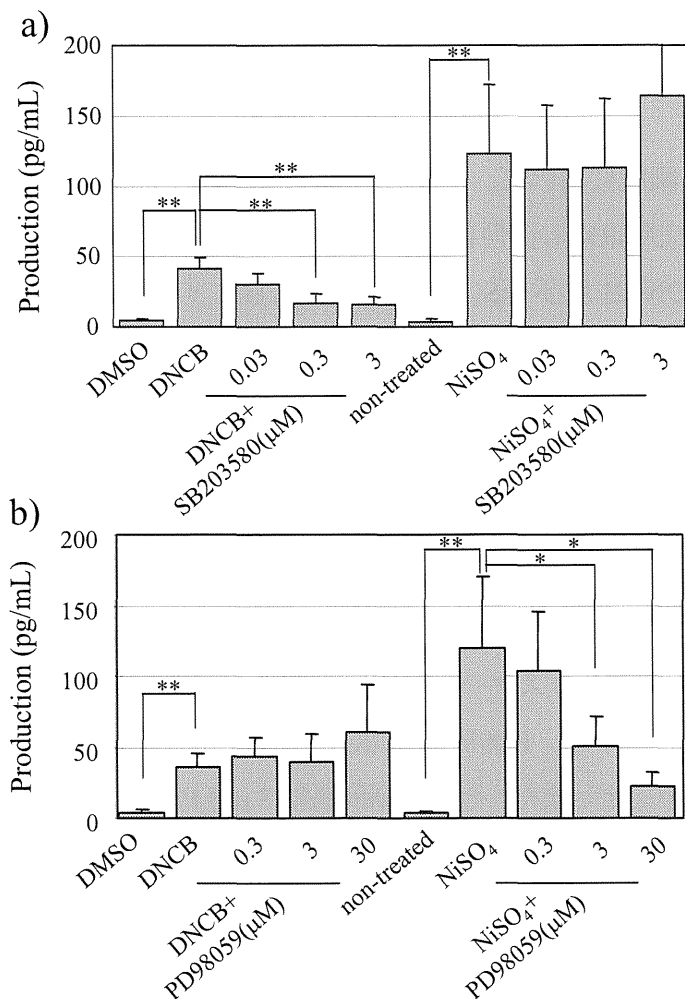


Fig. 15 Implication of p38 MAPK and ERK on TNF- $\alpha$  release induced by DNCB and NiSO<sub>4</sub>. Cells were pre-cultured with or without (a) SB203580 or (b) PD98059 at the concentrations indicated for 1 h and followed with DNCB at 5  $\mu$ g/ml or NiSO<sub>4</sub> at 170  $\mu$ g/ml for 24 h. After treatment, the supernatants were recovered and examined for TNF- $\alpha$  release by ELISA. The results were shown as the Mean $\pm$ S.D. (n=3). Statistical significance for the inhibition effect was calculated by Student's *t*-test (\*\**P*<0.01; \**P*<0.05).

### 3. p38 MAPK が DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54 及び CD40 の発現に及ぼす影響

続いて、SB203580 が DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54 及び CD40 の発現増強に及ぼす影響を調べた (Fig. 16)。その結果、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> いずれにおいても、溶媒対照群に対して、CD86、CD54 及び CD40 の発現の有意な増強が認められた。また、SB203580 を適用したことによる細胞生存率の顕著な変動は、いずれの処理濃度においても認められなかった。さらに、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86 の発現は共に、30 µM SB203580 により、40 %以上の抑制が認められた。一方、CD54 及び CD40 においては、SB203580 の濃度依存的に、ベースの発現が増強する傾向が認められたため、この影響を無視できる濃度範囲 (0.03 µM~3 µM) で検討を行った。その結果、DNCB による CD54 及び CD40 の発現増強は、SB203580 の濃度依存的に抑制されたが、NiSO<sub>4</sub> では抑制効果は認められなかった。

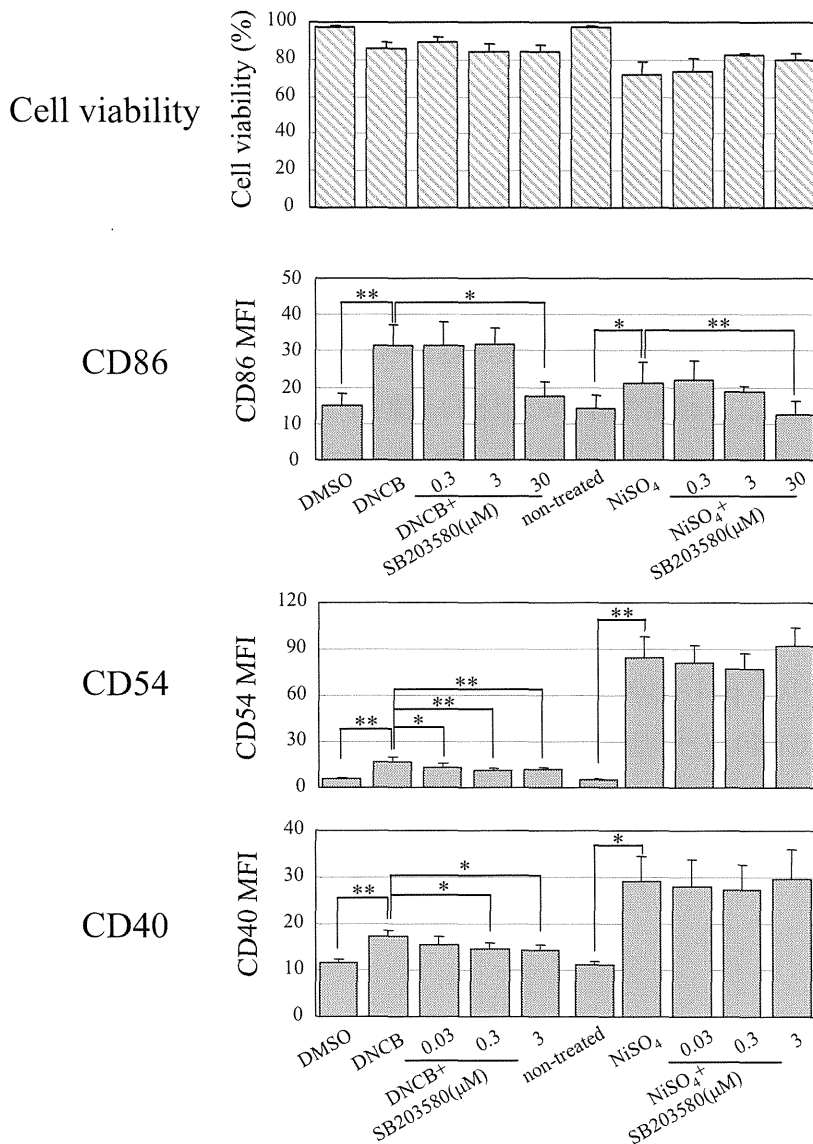


Fig. 16 Implication of p38 MAPK on CD86, CD54, and CD40 expression induced by DNCB and NiSO<sub>4</sub>. Cells were treated with or without SB203580 at the concentrations indicated for 1 h, followed with DNCB or NiSO<sub>4</sub>. In cell viability and CD86, the results of 0.03 μM SB203580 were omitted since they were similar with those of 0.3 μM. The results were shown as the Mean ±S.D. from at least three independent experiments. Statistical significance for the inhibition effect was calculated by Student's *t*-test (\*\**P*<0.01; \**P*<0.05).

#### 4. ERK が DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54 及び CD40 の発現に及ぼす影響

さらに、PD98059 が DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54 及び CD40 の発現増強に及ぼす影響を調べた (Fig. 17)。PD98059 を適用したことによる細胞生存率の顕著な変動は、いずれの処理濃度においても認められなかった。さらに、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54 及び CD40 の発現増強はいずれも、PD98059 の濃度依存的に抑制された。DNCB による CD86、CD54 及び CD40 の発現増強に対する 30  $\mu$ M PD98059 の抑制効果はそれぞれ、40% ( $P<0.01$ )、40% ( $P<0.01$ ) 及び 25% ( $P<0.01$ ) であった。また、NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54 及び CD40 の発現増強に対する 30  $\mu$ M PD98059 の抑制効果はいずれも 36% ( $P<0.01$ ) 以上であった。

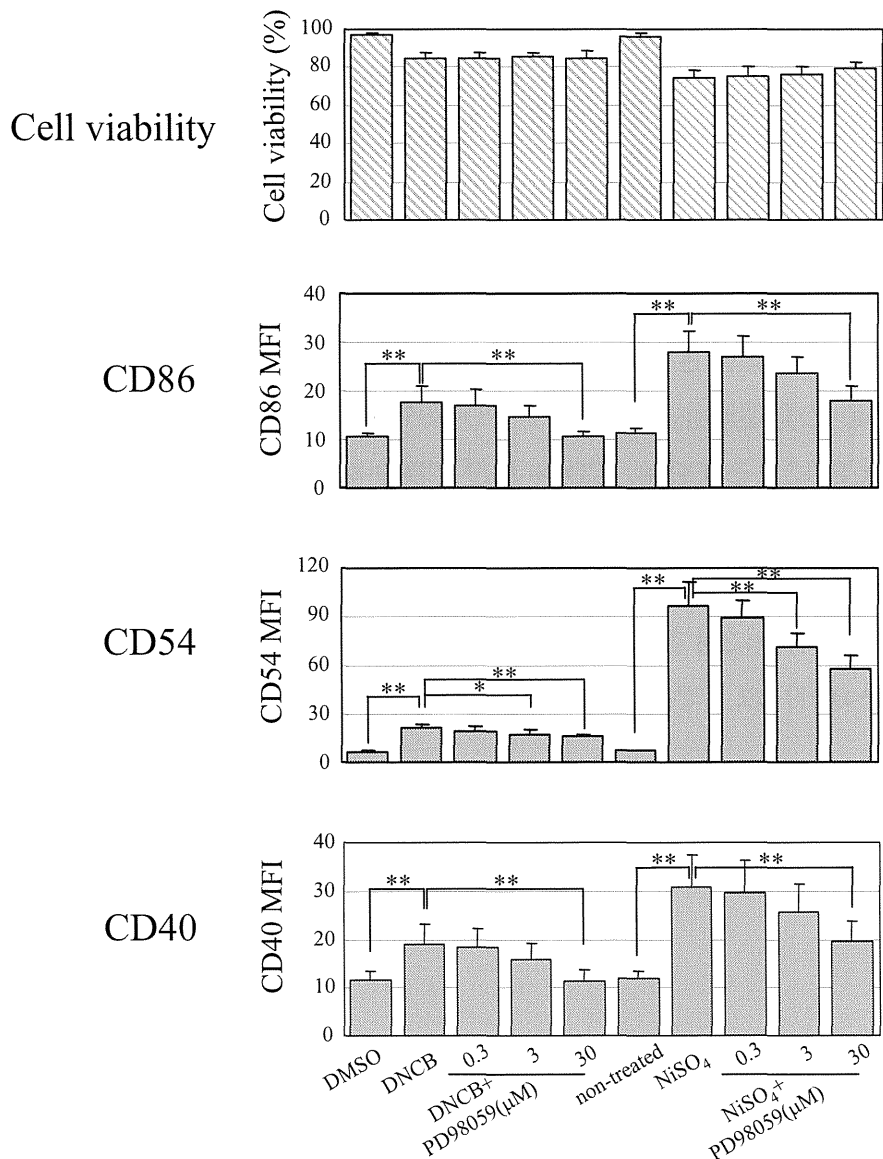


Fig. 17 Implication of ERK on CD86, CD54 and CD40 expression induced by DNCB and NiSO<sub>4</sub>. Cells were treated with or without PD98059 at the concentrations indicated for 1 h, followed with DNCB or NiSO<sub>4</sub>. The results were shown as the Mean  $\pm$  S.D. from at least three independent experiments. Statistical significance for the inhibition effect was calculated by Student's *t*-test (\*\* $P < 0.01$ ; \* $P < 0.05$ ).



### 第3節 考察

本章では、感作性物質による細胞活性化の作用機構の解明を目的に、細胞内シグナル伝達系である MAPK に着目した。MAPK ファミリーには、p38 MAPK、extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) が存在する。一般的に、ERK は細胞増殖や分化、p38 MAPK や JNK はストレス応答やアポトーシスに関与することが知られているが、免疫反応においても多くの重要な役割を果たすことが明らかとなっている<sup>67)</sup>。本研究では p38 MAPK 及び ERK の働きについて検討した。

その結果、5 µg/mL DNCB 及び 170 µg/mL NiSO<sub>4</sub> はいずれも、p38MAPK、ERK のリン酸化を活性化した。さらに、これらのリン酸化が p38 MAPK の阻害剤 SB203580 及び ERK の阻害剤 PD98059 によって、効果的に抑制された。これまでの研究で、THP-1 細胞においては、DNCB (0.5 µg/mL、2.5 µg/mL 及び 5 µg/mL) と NiSO<sub>4</sub> (17 µg/mL、85 µg/mL 及び 170 µg/mL) による p38 MAPK と ERK のリン酸化が濃度依存的に誘導されるのに対し、SLS (45 µg/mL、54 µg/mL) では変化しないことが示されている (図は示さず)<sup>68)</sup>。本章では、さらに、DNCB による TNF-α の産生が SB203580 により選択的に抑制され、同様にして、NiSO<sub>4</sub> による TNF-α の産生が PD98059 により選択的に抑制されることを明らかにした。いずれの場合も、TNF-α の産生の抑制効果は最大で 60% に達し、SB203580 あるいは PD98059 が TNF-α の産生に対して優れた抑制剤であることが示された。

近年、CD34-DC や Mo-DC を用いて同様の検討がなされている。DNCB を処理した CD34-DC においては、p38 MAPK が活性化し、20 µM

SB203580 により TNF- $\alpha$ の産生が抑制した<sup>61)</sup>。また、NiSO<sub>4</sub>を適用した Mo-DC では、TNF- $\alpha$ の産生が 10  $\mu$ M PD98059 により 50 %、抑制されることが報告されている<sup>18)</sup>。本研究及びこれら知見から、感作性物質による TNF- $\alpha$ の産生に p38 MAPK 及び ERK は強く関与するものの、それらの役割は感作性物質によって大きく異なることが示唆された。

さらに、THP-1 細胞において、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub>による CD86 の発現増強に p38 MAPK が関与することが明らかとなった。Mo-DC<sup>18)</sup> や CD34-DC<sup>61)</sup>でも、全く同じことが報告されていることから、THP-1 細胞が Mo-DC や CD34-DC と同様の作用機構で CD86 を発現増強する可能性が示唆された。本研究ではさらに、ERK の活性化阻害により、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub>による CD86 の発現増強が抑制された。この結果と同様に、NiSO<sub>4</sub>を適用した CD34-DC において、CD86 の発現増強が PD98059 により部分的に抑制されることが Boislève らによって報告されている<sup>61)</sup>。このことから、ERK は p38 MAPK と同様に、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub>による CD86 の発現に寄与する可能性が示唆された。一方で、本研究及び Boislève らの結果とは矛盾する結果が、Aiba らによって報告されている。Aiba らは、二人のドナーから Mo-DC をそれぞれ誘導し、NiCl<sub>2</sub> 及び DNCB による細胞活性化の作用機構を調べた結果、ERK が細胞活性化に対し抑制的に働く可能性を示している<sup>18)</sup>。ERK の働きの違いに対し明確な理由を説明することは難しいが、De Smedt らは感作性物質による Mo-DC の細胞表面抗原の発現やサイトカインの産生量は、ドナー間によって全く異なることを報告している<sup>21)</sup>。そのため、Mo-DC における ERK の役割については、より多くのドナーの Mo-DC を用いた検証が必要かもしれない。

DNCB、NiSO<sub>4</sub>による CD54 及び CD40 の発現増強における MAPK

の役割はこれまでに Mo-DC を用いて検討されている。しかしながら、p38 MAPK 阻害剤はいずれの細胞表面抗原の発現増強を抑制しない<sup>18)</sup>。また、ERK 阻害剤も NiSO<sub>4</sub> による CD40 の発現増強に、ほとんど影響しないことが報告されている<sup>66)</sup>。これら検討では、DNCB、NiSO<sub>4</sub> による CD54 及び CD40 の発現が顕著に増強しておらず、さらにドナーを増やして検討する必要があるように考えられる。THP-1 細胞においては、SB203580 存在下で DNCB による CD54 及び CD40 の発現増強が抑制された。一方、PD98059 では、DNCB、NiSO<sub>4</sub> による CD86、CD54 及び CD40 の発現増強が部分的に抑制された。本研究結果は、Mo-DC 及び CD34-DC を含め、CD54 と CD40 の発現増強における ERK の役割を証明した初めての報告である。

MAPK の特異的な阻害剤を用いることにより、細胞活性化は阻害されるものの、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$  の産生や細胞表面抗原の発現増強は完全に抑制されていない。すなわち、p38 MAPK や ERK 以外の他のシグナル伝達系が感作性物質による細胞活性化に関与している可能性も考えられる。Boislève らは、CD34-DC において、もう一つの MAPK カスケードである JNK の阻害剤が、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86 の発現増強を部分的に抑制することを報告している。よって、感作性物質による THP-1 細胞の活性化には、JNK もまた関与している可能性が示唆される。

## 第4節 小活

本章では、感作性物質による THP-1 細胞の活性化の作用機構を解明するために、細胞内シグナル伝達系の役割について調べた (Fig. 18)。その結果、DNCB と NiSO<sub>4</sub> は共に p38 MAPK、ERK をリン酸化するものの、TNF- $\alpha$  及び細胞表面抗原の発現に及ぼす p38 MAPK 及び ERK の役割は化学物質によって大きく異なることが分かった。DNCB は p38 MAPK に対して優位に作用し、TNF- $\alpha$  の産生や細胞表面抗原の発現を最大限に誘導する上で、p38 MAPK が重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$  の産生や細胞表面抗原の発現では、p38 MAPK よりも ERK の方が優位に作用する可能性が示唆された。DNCB と NiSO<sub>4</sub> は共に TNF- $\alpha$  の産生を誘導するが、その産生機構に関しては、DNCB では p38 MAPK を介し、また、NiSO<sub>4</sub> では ERK を介して誘導された。さらに、前章の結果より、産生された TNF- $\alpha$  はオートクラインに細胞に作用して、CD54 及び CD40 の発現増強に寄与した。また、NiSO<sub>4</sub> の場合、CD86 の発現の作用機構は p38 MAPK 及び ERK を介するが、CD54 及び CD40 の発現は ERK のみを介した作用機構であった。このように、感作性物質による TNF- $\alpha$  の産生と細胞表面抗原の発現増強はそれぞれ、異なる細胞内シグナル伝達系を介して起こり、また、化学物質によって活性化の経路が異なることが示唆された。また、感作性物質による樹状細胞活性化の作用機構との同等性が高いことから、THP-1 細胞が樹状細胞の感作性物質応答を再現する有用な細胞モデルであることが示唆された。

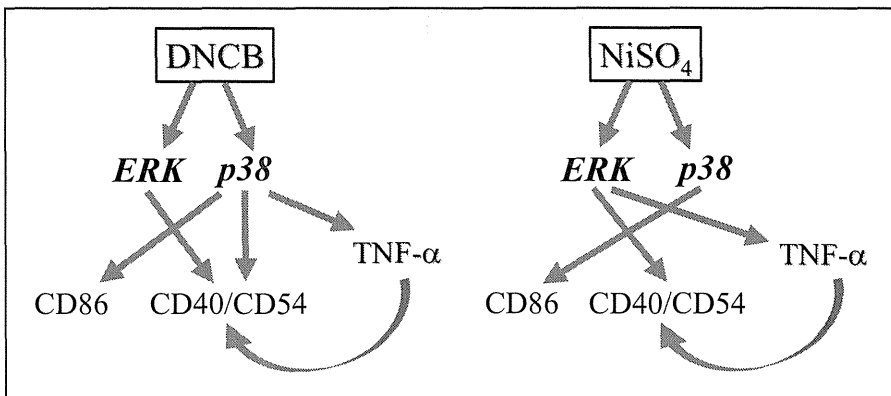


Fig. 18 THP-1 cell activation by DNCB and NiSO<sub>4</sub> is regulated through MAPK signaling pathways and autocrine effect of TNF- $\alpha$ .

### 第3編 感作性物質によるIL-8産生の特異性と発現機構の解明<sup>69)</sup>

第1編において、THP-1細胞が、EUを除く感作性物質7物質でIL-8を顕著に産生することを示した。IL-8は、炎症部位への好中球やTリンパ球の遊走に参与するケモカインとして知られる<sup>41)</sup>。また、ツタウルシに感作されているヒトの皮膚に、ツタウルシ抽出液を適用すると、皮膚中のIL-8の産生増強が認められている<sup>70)</sup>。また、樹状細胞を用いた*in vitro*実験では、いくつかの代表的な感作性物質により、IL-8の産生が報告されている<sup>71)</sup>。しかしながら、樹状細胞が様々な感作性物質に対し、特異的に応答してIL-8を産生するかは十分に検討されていない。また、その産生機構についても不明である。

そこで、本研究では、樹状細胞様の作用機構を介して感作性物質に応答することが明らかとなったTHP-1細胞を用いて、感作性強度が異なる種々の感作性物質、及び非感作性物質からなる、23物質に関して、IL-8の産生量を測定した。それにより、樹状細胞から産生されるIL-8の感作性物質特異性を調べた。さらに、代表的な感作性物質であるDNCB及びNiSO<sub>4</sub>によるIL-8産生における、細胞内シグナル伝達系及び、TNF- $\alpha$ の影響を調べることで、IL-8の産生機構について検討した。

## 第1節 実験の部

### 1. 細胞と培養液

細胞、培養液ともに第1編、第1節と同じものを用いた。

### 2. 被験物質とその調製方法

感作性物質としては、以下の16物質を用いた。1-benzoylacetone (1-BA), 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one/2-methyl-4-isothiazolin-3-one (MCI/MI), DNCB, glutaraldehyde (GA), phthalic anhydride (PA), benzoyl peroxide (BA), ethylenediamine (ED), 2-mercaptobenzothiasole (2-MBT), NiSO<sub>4</sub>, diethyl maleate (DEM), methyl-2-nonynoate (MN), hexylcinnamaldehyde (HCA), citral (CI), eugenol (EU), aniline (AN) and geraniol (GE)。非感作性物質としては、以下の7物質を用いた。1-bromobutane (1-BB), diethyl phthalate (DEP), benzalkonium chloride (BKC), vanillin (VA), 2-hydroxypropyl methacrylate (2-HPM), acetoanisole (AA) and 6-methylcoumarin (6-MC)。これらの物質は、これまでにマウスを用いた皮膚感作性試験での評価が行われており、感作性の有無及びその強度が調べられている (Table 5)<sup>72,73,74</sup>。また、2-HPMを除く、全ての化学物質は Sigma-Aldrich より購入した。2-HPM は Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) より購入した。水溶性の化学物質 (MCI/MI, GA, ED, NiSO<sub>4</sub>, BKC) は生理食塩水に溶解させ、水不溶性の化学物質 (1-BA, DNCB, PA, BA, 2-MBT, DEM, MN, HCA, CI, EU, AN, GE, 1-BB, DEP, VA, 2-HPM, AA, 6-MC) は DMSO に溶解させた後、培養液に添加した。

Table 5 The list of chemicals tested and the value of CV75.

Chemicals	Abbreviation		LLNA Potency category*	CV75 (µg/mL) **
1-Benzoylacetone	1-BA		Extreme	82
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one Solution	MCI/MI		Extreme	140
2,4-Dinitrochlorobenzene	DNCB		Extreme	5
Glutaraldehyde	GA		Strong	11
Benzoyl peroxide	BP		Strong	42
Phthalic anhydride	PA		Strong	ND***
2-Mercaptobenzothiasole	2-MBT	Allergens (16)	Moderate	150
Ethylene diamine	ED		Moderate	273
Methyl-2-nonynoate	MN		Moderate	230
Nickel sulfate	NiSO <sub>4</sub>		Moderate	150
Diethyl maleate	DEM		Moderate	120
Hexylcinnamaldehyde	HCA		Weak	37
Citral	CI		Weak	20
Eugenol	EU		Weak	150
Geraniol	GE		Weak	167
Aniline	AN		Weak	930
1-Bromobutane	1-BB			500
Diethyl phthalate	DEP			600
Benzalkonium chloride	BKC	Non-allergens (7)	Non-sensitizer	3
Vanillin	VA			650
2-hydroxypropyl methacrylate	2-HPM			ND***
Acetoanisole	AA			320
6-methylcoumarin	6-MC			277

\* The potency of skin sensitization was estimated using the animal test (Gerberick *et al.*, 1992, 2005; Kimber *et al.*, 1998). All chemicals were ranked from extreme to non-sensitizer.

\*\* CV75 of each chemical was estimated by flow cytometry.

\*\*\* ND; not decided



### 3. 被験物質の処理濃度の設定

各被験物質に対して細胞毒性試験を行い、24 時間後に細胞生存率が 75 %になると推定される濃度 (CV75; cell viability 75 %) を算出した (Table 5)。そして、CV75 を基準に公比 1.2 で、5 濃度 (1.2 x, 1 x, 1/1.2 x, 1/1.2<sup>2</sup> x, 1/1.2<sup>3</sup> x CV75) を設定した。この濃度設定により、中程度の細胞毒性からほとんど無毒性の範囲となる、およそ 50~95%の細胞生存率の範囲で IL-8 の産生量を測定した。被験物質の最高濃度は、溶媒が DMSO ならば 1 mg/mL、生理食塩水ならば 5 mg/mL を越えない濃度とした。さらに、MAPK 及び TNF- $\alpha$  の阻害実験では、5  $\mu$ g/mL DNCB 及び 5  $\mu$ g/mL NiSO<sub>4</sub> を用いた。

### 4. THP-1 細胞に対する化学物質の処理方法

THP-1 細胞は 24 ウェルプレートに 1x10<sup>6</sup> cells/mL/ウェルにて播種し、5  $\mu$ g/mL DNCB 及び 5  $\mu$ g/mL NiSO<sub>4</sub> を添加した後、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。p38 MAPK あるいは ERK が IL-8 の産生量に及ぼす影響は第 2 編、第 2 章、第 1 節の 3 と同様の方法で調べた。また、細胞外の TNF- $\alpha$  が IL-8 の産生量に及ぼす影響は第 2 編、第 1 章、第 1 節の 2 と同様の方法で調べた。

### 4. サイトカイン産生量の解析

第 2 編、第 1 章、第 1 節に示したとおりである。

### 5. 統計学的解析

第 2 編、第 1 章、第 1 節に示したとおりである。

## 第2節 結果

### 1. 感作性物質及び非感作性物質に対する IL-8 の応答性

異なる感作性強度を有した感作性物質、及び非感作性物質、合わせて23物質をそれぞれ、THP-1細胞に処理しIL-8の産生量を調べた(Fig. 19)。無処理あるいはDMSO処理により産生するIL-8は、それぞれ $47 \pm 21.3$  pg/mL、 $40.8 \pm 22.0$  pg/mLであった。感作性物質16物質中、13物質では濃度依存的、かつ有意なIL-8の産生増強が認められた。さらに、このうち10物質では、無処理あるいはDMSOに対して、10倍以上のIL-8産生増強が認められた。特に、感作性強度がextreme及びstrongの感作性物質では、低い処理濃度でも有意な産生が認められる傾向があった。一方で、細胞生存率は被験物質の濃度依存的に低下した。IL-8の有意な産生増強は、細胞生存率が60~90%となる範囲で顕著に認められた。感作性物質のうち3物質(PA、ED及びGE)では、IL-8の産生量の有意な変化が認められなかった。EDとGEでは細胞生存率の低下が起こるものの、PAでは細胞毒性が誘導されなかった。

非感作性物質においては、BKC、VN、2-HPM、AA及び6-MCで、IL-8の有意な産生は認められなかった。これらの非感作性物質では、多くの感作性物質と同様に、細胞生存率の低下が認められた。一方で、1-BB及びDEPによりIL-8の産生量は顕著に増強した。特に、1-BBでは、多くの感作性物質と同様に、DMSOに対して10倍以上の産生量が認められた。

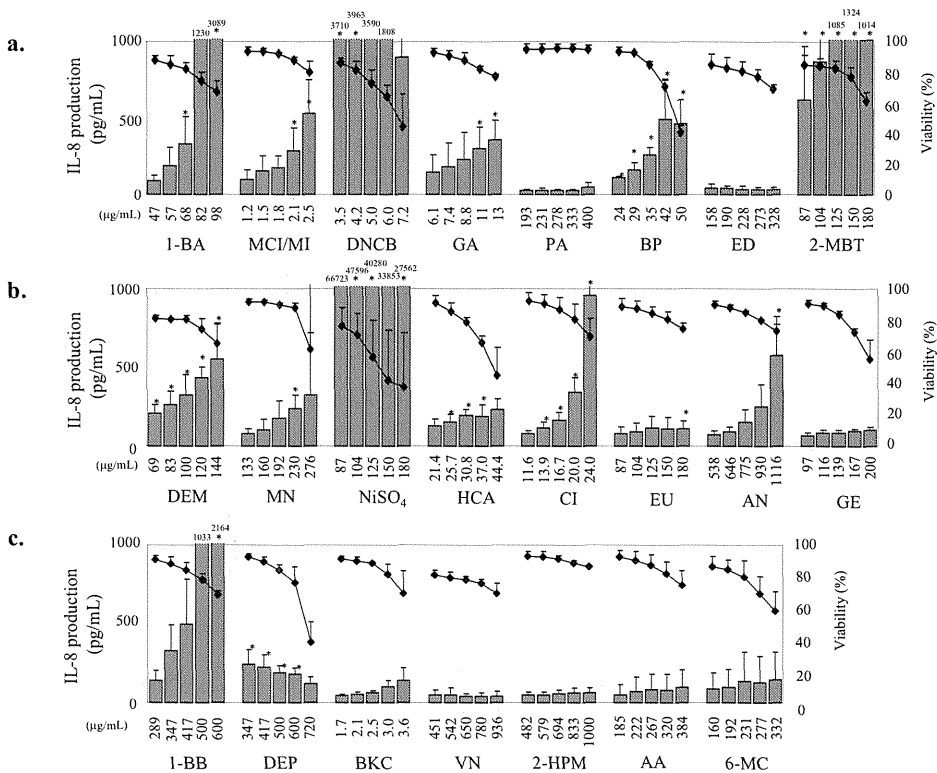


Fig. 19 The alteration of IL-8 production in THP-1 cells exposed to 16 contact allergens (a, b) and 7 non-allergens (c). Each data point represents the mean  $\pm$  S.D. for three independent experiments. Bars indicate extent of IL-8 production and circles provide cell viability. Statistical significance was calculated by Student's t-test (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01).

## 2. 感作性物質による IL-8 の産生における細胞内シグナル伝達系の影響

DNCB 及び  $\text{NiSO}_4$  による IL-8 の産生における細胞内シグナル伝達系の影響を調べるために、ERK 及び p38 MAPK に対する阻害剤の影響を調べた (Fig. 20)。5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNCB 及び 170  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{NiSO}_4$  を 24 時間処理すると細胞生存率はそれぞれ 84%、74%となったが、ERK 阻害剤である PD98059、p38 MAPK 阻害剤である SB203580 を共存させても、細胞生存率への影響はなかった。さらに、DNCB 及び  $\text{NiSO}_4$  による IL-8 の産生量は、PD98059 濃度依存的に、部分的に抑制された。一方、SB203580 を処理すると、DNCB による IL-8 産生量の抑制が認められ、0.3  $\mu\text{M}$  SB203580 では有意に抑制された。しかしながら、 $\text{NiSO}_4$  による IL-8 の産生量は抑制されなかった。

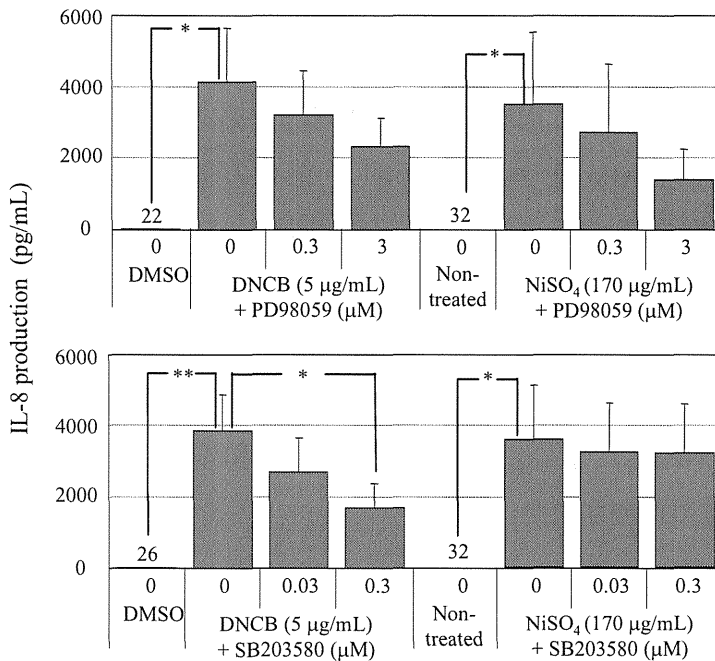


Fig. 20 Involvement of MAPK pathway in IL-8 production induced by DNCB or NiSO<sub>4</sub>. Cells were cultured with SB203580 or PD98059 for 1 h following exposure to DNCB or NiSO<sub>4</sub> for 24h. Mean ± S.D. was given for three independent experiments. Statistical significance was calculated by Student's t-test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

### 3. 感作性物質による IL-8 の産生における TNF- $\alpha$ の影響

TNF- $\alpha$  が IL-8 の産生に影響するかを調べるために、THP-1 細胞に対して 5 濃度の rhTNF- $\alpha$  を 24 時間適用し、IL-8 の産生量増加に及ぼす rhTNF- $\alpha$  の影響を調べた (Fig. 22)。その結果、rhTNF- $\alpha$  は濃度依存的に IL-8 の産生量を増加した。

続いて、5  $\mu\text{g/mL}$  DNCB 及び 170  $\mu\text{g/mL}$  NiSO<sub>4</sub> により産生する TNF- $\alpha$  が IL-8 の産生に影響するかを調べた。その結果、抗 TNF- $\alpha$  抗体により、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> により産生する TNF- $\alpha$  を中和することによって、IL-8 の産生量は抑制された。

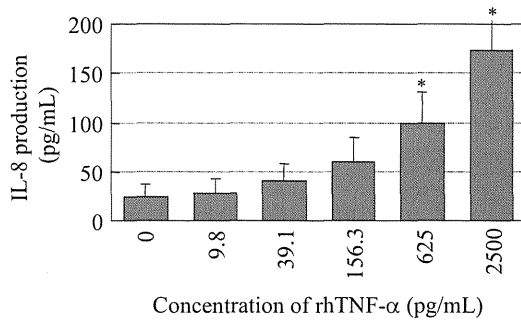


Fig. 21 The effect of IL-8 on the production of rhTNF- $\alpha$  is presented. The culture supernatants were collected and extent of IL-8 production was determined. Mean  $\pm$  S.D. was given for three independent experiments. Statistical significance was calculated by Student's t-test ( $*P<0.05$ ).

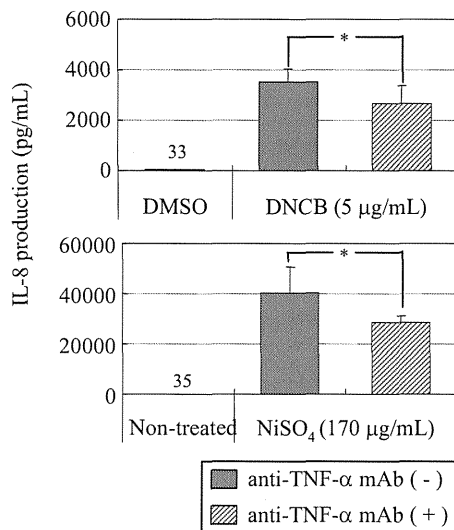


Fig. 22 Neutralization effect of TNF- $\alpha$  activity on IL-8 production induced by DNCB and NiSO<sub>4</sub>. Cells were pre-treated with anti-TNF- $\alpha$  antibody for 1 h followed by exposure to DNCB or NiSO<sub>4</sub> for 24 h. Mean  $\pm$  S.D. was given for three independent experiments for each graph. Statistical significance was calculated by Student's t-test ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ).

### 第3節 考察

これまでに樹状細胞だけでなく、THP-1細胞においても、代表的な感作性物質によって、IL-8の産生増強が起こることが示されている<sup>18,71)</sup>。しかしながら、樹状細胞が様々な感作性物質に対して、特異的にIL-8を産生するかは十分に検討されていない。また、その産生機構についても不明である。

そこで、本章では、樹状細胞様の作用機構を介して感作性物質に応答することが明らかとなったTHP-1細胞を用いて、感作性強度が異なる種々の感作性物質16物質、及び非感作性物質7物質、合わせて23物質に関して、IL-8の産生量を測定した。その結果、PA、ED及びGEを除く感作性物質(13物質)でIL-8の有意な産量の増加が認められた。また、このうち10物質では、溶媒対照に比べて10倍以上の産生増加が認められた。このことから、THP-1細胞におけるIL-8の応答性は感作性物質に特異的な応答である可能性が示唆された。Toebakらは、DNCB、パラフェニレンジアミン、NiSO<sub>4</sub>を含む金属塩等の代表的な感作性物質によって、樹状細胞からIL-8が産生誘導することを報告している<sup>71)</sup>。また、THP-1細胞と同様にヒト細胞株で樹状細胞と類似の感作性物質応答を有することが知られるU937細胞でも、感作性物質13物質、非感作性物質5物質を適用すると、細胞生存率が85~90%の範囲で、感作性物質に優位にIL-8 mRNAの発現レベルの増強が認められている<sup>75)</sup>。以上より、THP-1細胞で認められる、IL-8の感作性物質に特異的な応答は、樹状細胞における応答を反映している可能性が示唆された。

本研究で検討した感作性物質のうち、3つの感作性物質ではIL-8の



産生が認められなかった。PA に関しては、最高処理濃度においても細胞生存率の低下が認められなかった。無処理での細胞生存率が  $95 \pm 2\%$  ( $n=18$ ) なのに対し、PA の最高処理濃度では  $95 \pm 3\%$  ( $n=3$ ) であった。PA の生理食塩水あるいは DMSO に対する溶解性は、本研究で検討した他の化学物質に比べて低かった。そのため、PA の溶解性が低く、細胞に十分に曝露されていないために、IL-8 の産生が誘導されなかった可能性が示唆された。GE が属するモノテルペン類は、空気に曝されると自然酸化し、感作性を有した酸化物が生成する場合があることが知られている。GE に関しても、自然酸化による生成物に感作性があることが報告されている<sup>76)</sup>。よって、本実験条件下では、GE の酸化物が十分に生成されないために、IL-8 の産生が誘導されない可能性が考えられた。ED もまた、モノアミノオキシダーゼによって、感作性を有したジアルデヒドの glyoxal に代謝されることが報告されている<sup>77)</sup>。よって、THP-1 細胞を用いた本実験系では、ED の代謝が適切に誘導されていないために、IL-8 の産生が認められない可能性が考えられた。しかしながら、いずれの場合も、仮説を検証のための更なる検討が必要であろう。

一方、非感作性物質のうち 5 物質では、IL-8 の産生は認められなかった。しかしながら、1-BB 及び DEP の 2 物質では、IL-8 の産生増強が認められた。どちらの物質も、マウスを用いた皮膚感作性試験では感作性はない物質として分類されている<sup>73)</sup>。しかしながら、著者らの検討では、モルモットを用いた皮膚感作性試験法で 1-BB が陽性となる結果を得ている（データは示さず）。加えて、ステインやリジンを含む合成ペプチドを用いて、化学物質とタンパクの結合性を評価する、ペプチド反応性試験において、1-BB は感作性陽性と判定されている

78)。また、DEP においては、強度は弱いものの、感作性陽性であることがヒトデータから結論付けられている<sup>79)</sup>。これら知見から考えて、1-BB 及び DEP はいずれも感作性を有するために、THP-1 細胞において IL-8 の産生を増強させる可能性が考えられる。よって、1-BB 及び DEP で認められた IL-8 の産生は偽陽性ではなく、化学物質本来の感作性を示しているのかもしれない。

感作性の発症において、細胞表面抗原の発現やサイトカインの産生を伴う樹状細胞の活性化は重要である。本章では、この過程における一つの反応として、IL-8 の産生が増強することが示唆された。続いて、代表的な感作性物質である DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による IL-8 産生における、細胞内シグナル伝達系及び、TNF- $\alpha$  の影響を調べることで、IL-8 の産生機構について検討した。その結果、ERK 及び p38 MAPK に対する阻害剤を用いた検討より、DNCB による IL-8 産生には ERK 及び p38 MAPK が部分的に関与した。また、NiSO<sub>4</sub> による IL-8 産生には p38 MAPK は寄与せず、ERK のみが強く関与した。Mo-DC では、DNCB による IL-8 の産生増強に p38 MAPK が寄与することが報告されている<sup>18)</sup>。一方で、ERK が NiCl<sub>2</sub> による IL-8 mRNA の発現に関与していることが明らかとなっている<sup>18)</sup>。このことは、THP-1 細胞及び樹状細胞のいずれにおいても、感作性物質による IL-8 の産生増強が p38 MAPK 及び ERK を介して起こることを示唆している。さらに、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> により産生する TNF- $\alpha$  が、IL-8 の産生に部分的に関与していることが明らかとなった。すなわち、感作性物質による IL-8 の産生は、CD54 及び CD40 の発現増強と同様に、細胞内シグナル伝達系や TNF- $\alpha$  のオートクライン作用によって制御されていることが示唆された。

## 第4節 小活

本章では、樹状細胞様の作用機構を介して感作性物質に応答する THP-1 細胞を用いて、IL-8 産生の感作性物質特異性とその作用機構について検討した。その結果、IL-8 の産生が感作性物質で優位に認められることが明らかとなった。また、感作性物質による IL-8 の産生が、細胞表面抗原の発現機構と同様に、細胞内では p38 MAPK と ERK を介し、細胞外では TNF- $\alpha$  を介して制御されることが明らかとなった。THP-1 による本結果は、樹状細胞における IL-8 産生の作用機構の解明に役立つものと期待される。さらに、樹状細胞の活性化及びその作用機構を理解することによって、皮膚感作性の発症機構の解明に繋げていきたい。

## 結論

化粧品を開発する上で、皮膚に対する安全性の確認をすることは極めて重要で、中でも皮膚感作性の評価を行うことは、安全な製品を開発する上で欠かせない項目の1つである。従来、化学物質の皮膚感作性評価は、モルモットなどの動物を用いた試験が行われてきた。しかしながら、近年、動物愛護の観点から動物実験に対する批判が高まり、EUにおいては化粧品指令第7次改正の施行により、2013年3月までに化粧品開発のための動物を用いた感作性試験が禁止される。こうした状況から、動物を用いない皮膚感作性試験に関する研究が世界的に行われている。生体での感作反応は極めて複雑なため、その全てを *in vitro* で再現することは困難であるが、感作性物質を皮膚に曝露した際に生じる樹状細胞（ランゲルハンス細胞）の変化に着目した検討がいくつか報告されている。その1つとして、ランゲルハンス細胞の代わりにヒト血液から調製された樹状細胞を使用した検討がなされているが、安全なヒト血液の供給や用いる細胞の個人差の問題などから、未だ実用に足る試験法は開発されていない。

著者らはそうした問題を克服することを目的として、血液由来細胞の代わりにヒト細胞株である THP-1 細胞を用いた *in vitro* 皮膚感作性試験法（h-CLAT）の開発を進めている。h-CLAT では、抗原提示の際に補助刺激分子として機能する細胞表面抗原（CD86 と CD54）の発現変化を指標とすることで、一般化学物質 64 物質の感作性の有無を良好に評価できることを確認した。一方で、試験法に用いる THP-1 細胞の感作性物質応答やその作用機構は十分に解明されておらず、樹状細胞と生物学的に同一の機序かを証明することが、試験法の実用化に向け

での課題となっている。

そこで、本研究では、*in vitro* 皮膚感作性試験法に用いる細胞として THP-1 細胞の有用性を高めるために、THP-1 細胞の感作性物質応答とその作用機構について解析した。

## 1. THP-1 細胞における細胞表面抗原及びサイトカインの感作性物質応答

本研究では、THP-1 細胞が感作性物質によって樹状細胞様の応答を示すかを検討した。実験では、樹状細胞の活性化を特徴付ける、細胞表面抗原 (CD86/CD54/CD40/CD83/CD58/CD1a) とサイトカイン (TNF- $\alpha$ /IL-8/IL-6) の発現挙動を検討した。

被験物質は、代表的な感作性物質である DNCB、NiSO<sub>4</sub>、と非感作性物質である SLS を用い、それぞれ細胞生存率が 70~95%となる 3 濃度で細胞に 24 時間処理した。その結果、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> では溶媒の DMSO 及び無処理群それぞれに対して CD86/CD54/CD40/CD83 の発現が有意に増強し、TNF- $\alpha$ /IL-8 の産生も濃度依存的に増強した。加えて、DNCB では CD1a の発現、NiSO<sub>4</sub> では IL-6 の産生が増強した。一方、SLS ではいずれのマーカーも変化を示さなかった。陽性対照として用いた LPS では、CD1a を除く全てのマーカーの発現が強く誘導された。

続いて、DNCB と NiSO<sub>4</sub> に対して顕著な応答を示した CD86/CD54/CD40/CD83 と TNF- $\alpha$ /IL-8 に関して、感作性物質 6 物質 (hydroquinone (HQ)、propyl gallate (PG)、formaldehyde (FA)、eugenol (EU)、phenylacetaldehyde (PAA)、hydroxycitronellal (HC)) と非感作性物質 2 物質 (methyl paraben (MP)、lactic acid (LA)) の影響を

調べ、THP-1 細胞が感作性物質に特異的な応答を示すかについて検討した。その結果、EU を除く、評価した全ての感作性物質で、6 つのマーカーのうち少なくとも 5 つで有意な増強が認められた。EU では CD86、CD54、CD40 の発現が有意に増強した。一方で、非感作性物質では顕著な変化は認められなかった。また、感作性物質による活性化マーカーの発現増強は細胞毒性と関係があるのに対し、同様に細胞毒性が認められる非感作性物質では発現変動が認められなかった。さらに、樹状細胞でも、10~15%の細胞毒性が認められる濃度で感作性物質を処理した際に CD86 の発現増強が報告されている。このことから、感作性物質による細胞の活性化は若干の細胞毒性を起こす濃度で誘導される傾向があり、活性化マーカーの発現と細胞毒性との間には感作性物質に特異的な関係があることが示唆された。

以上より、THP-1 細胞が皮膚感作性物質に対して樹状細胞の活性化を反映する様々な応答を示し、それらを指標にすることで、感作性物質と非感作性物質を判別できることが示された。それゆえ、THP-1 細胞は入手が容易で、均一な細胞集団としての特徴から研究に汎用できることに加え、樹状細胞の代替として化学物質の感作性の有無を評価可能な細胞モデルであることが示唆された。

## 2. 感作性物質による THP-1 細胞活性化の作用機構の解明

### 2-1. THP-1 細胞活性化に及ぼす TNF- $\alpha$ と細胞外 ATP の役割について

これまでの研究から、感作性物質を処理した THP-1 細胞において、樹状細胞の活性化の際に認められる、様々な細胞表面抗原やサイトカインの発現が亢進することが示された。一方で、THP-1 細胞活性化の作用機構に関してはよく分かっていない。そこで、炎症や免疫反応の

制御において重要な役割を果たす TNF- $\alpha$  及び ATP が THP-1 細胞活性化の作用機構に及ぼす影響に着目し、感作性物質による細胞表面抗原の発現亢進に及ぼす、TNF- $\alpha$  と細胞外 ATP の影響を検討した。

まず初めに DNCB、NiSO<sub>4</sub>、SLS を THP-1 細胞に処理し、経時的に細胞生存率、TNF- $\alpha$ 、IL-8、CD86、CD54、CD40 の発現挙動を解析した。無処理細胞の生存率は、処理後 24 時間はほぼ変化せず、98%であった。一方、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> を高濃度処理した細胞の生存率の減少は 12~24 時間の間に顕著に起こり、24 時間後には共に 82%程度であった。また、DNCB と NiSO<sub>4</sub> では処理開始 3 時間後に TNF- $\alpha$  と IL-8 の有意な産生増強が認められ、その後遅れて CD54、CD86、CD40 の発現増強が徐々に誘導された。一方で、SLS ではいずれの時間においても活性化マーカーの発現に顕著な変化は認められなかった。DNCB や NiSO<sub>4</sub> 処理による TNF- $\alpha$  や IL-8 の顕著な産生は、細胞生存率が低下する 24 時間後だけでなく、細胞毒性がほとんど認められない処理時間 (3 時間後~) でも認められた。これにより、感作性物質を 24 時間処理した後のサイトカイン産生と細胞毒性は、それぞれ独立した細胞応答として誘導されている可能性が示唆された。

続いて、TNF- $\alpha$  及び IL-8 が THP-1 細胞活性化に関与するかを調べるために、CD86、CD54、CD40 に対するリコンビナント human TNF- $\alpha$  (rhTNF- $\alpha$ ) 及びリコンビナント human IL-8 (rhIL-8) の影響を調べた。その結果、CD86 では変化は認められないが、CD54、CD40 では rhTNF- $\alpha$  の濃度依存的に発現が有意に亢進した。一方、rhIL-8 はいずれの活性化マーカーにも影響しなかった。そこで、感作性物質により THP-1 細胞から早期に産生される TNF- $\alpha$  の影響を調べるために、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> 処理 1 時間前に抗 TNF- $\alpha$  抗体を添加した。その結果、抗 TNF- $\alpha$

抗体の処理により DNCB、NiSO<sub>4</sub> 共に TNF- $\alpha$  の産生量は有意に抑制された。また、CD54 及び CD40 の発現亢進が有意に抑制された。このことから、感作性物質による CD54 及び CD40 の発現増強には、細胞から早期に産生される TNF- $\alpha$  がオートクラインに強く寄与していることが示唆された。

さらに、CD86 と CD54 に対する細胞外 ATP の影響を調べるために、THP-1 細胞に ATP を 24 時間処理すると、ATP 濃度依存的に CD86、CD54 の発現が増強した。そこで、感作性物質による CD86 及び CD54 の発現に及ぼす細胞外 ATP の影響を調べるために、P2 レセプターアンタゴニストである suramin を 1 時間処理した後に、DNCB、NiSO<sub>4</sub>、EU を適用した。その結果、NiSO<sub>4</sub> による CD86 及び CD54 の発現増強が有意に抑制された。DNCB、EU による CD86 の発現増強においても suramin による抑制傾向が認められた。このことから、細胞外 ATP が感作性物質による細胞活性化に関与する可能性が示唆された。

以上より、感作性物質による THP-1 細胞の活性化は、TNF- $\alpha$  のオートクライン作用及び、細胞外 ATP によって部分的に制御され、樹状細胞における細胞活性化と同様の作用機構を介して誘導されることが示唆された。

## 2-2. THP-1 細胞活性化に及ぼすシグナル伝達系の役割

近年、感作性物質による樹状細胞の活性化に関して、細胞内シグナル伝達機構の研究がいくつか報告されている。しかしながら、DNCB や NiSO<sub>4</sub> を処理した際のサイトカイン産生や CD54 及び CD40 の増強におけるシグナル伝達系の役割に関しては十分に明らかになってない。また、樹状細胞の活性化に関して、p38 MAPK に比べ、ERK の役割は



ほとんど明らかになっていない。それゆえ、本研究では THP-1 細胞において、DNCB と NiSO<sub>4</sub> による TNF- $\alpha$  産生や種々の細胞表面抗原の発現亢進に関して、p38 MAPK と ERK の役割について検討した。

その結果、溶媒処理群に比べて、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による p38 MAPK、ERK のリン酸化が強く誘導された。さらに DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> を処理する 1 時間前に、p38 MAPK 及び ERK pathway のリン酸化阻害剤を添加することで、リン酸化活性の増強が抑制された。そこで、TNF- $\alpha$  への影響を調べると、DNCB により産生する TNF- $\alpha$  が p38 MAPK 阻害剤 (SB203580) でのみ有意に抑制され、一方で NiSO<sub>4</sub> により産生する TNF- $\alpha$  は ERK 阻害剤 (PD98059) でのみ有意に抑制された。すなわち、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> の処理により産生する TNF- $\alpha$  は、それぞれ全く異なるシグナル伝達経路を介して誘導されることが示唆された。さらに、表面抗原の発現増強に及ぼす p38 MAPK と ERK の影響をそれぞれの阻害剤を用いて検討した。その結果、DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD86 の発現増強は共に、SB203580 及び PD98059 で有意に抑制されることから、樹状細胞と同様に p38 MAPK と ERK を介した作用機構により誘導されることが示唆された。さらに、SB203580 は DNCB による CD54 及び CD40 の発現増強を一部抑制するが、NiSO<sub>4</sub> による CD54 及び CD40 の発現には影響しなかった。また、PD98059 は DNCB 及び NiSO<sub>4</sub> による CD54 と CD40 の発現増強を一部抑制した。以上より、DNCB と NiSO<sub>4</sub> は共に p38 MAPK、ERK をリン酸化するが、TNF- $\alpha$  及び細胞表面抗原の発現に及ぼす p38 MAPK 及び ERK の役割は大きく異なることが分かった。またこれは、感作性物質による樹状細胞活性化の作用機構とも同等性が高いことから、THP-1 細胞が樹状細胞の感作性物質応答を再現する有用な細胞モデルであることが示唆された。

### 3. 感作性物質による IL-8 産生の特異性と発現機構の解明

第1章において、THP-1細胞が感作性物質によりIL-8を顕著に産生することを示した。また、樹状細胞では*in vitro*実験において感作性物質によりIL-8の産生が報告されている。IL-8は、炎症部位への好中球やTリンパ球の遊走に関するケモカインとして知られる。しかしながら、樹状細胞から産生されるIL-8の感作性物質特異性や発現機構については十分に解明されていない。そこで本研究では、THP-1細胞を樹状細胞様の細胞モデルとして用い、23物質についてIL-8の産生量を評価した。その結果、感作性物質に関しては、3物質を除く13物質でIL-8の有意な産生が認められた。非感作性物質に関しては、2物質で有意な産生が認められるものの、5物質でIL-8の顕著な産生は示さなかった。このことから、IL-8は感作性物質で優位に産生されることが示唆された。

続いて、IL-8産生の作用機構を調べた結果、p38 MAPK及びERKに対する阻害剤を用いた検討より、DNCBによるIL-8の産生にはp38 MAPK及びERKが部分的に関与するのに対し、NiSO<sub>4</sub>によるIL-8の産生にはp38 MAPKは寄与せず、ERKのみが強く関与することが示唆された。また、DNCBとNiSO<sub>4</sub>共に、産生したTNF- $\alpha$ がIL-8産生に部分的に関与することが示唆された。以上のように、感作性物質によるIL-8産生は、細胞表面抗原の発現機構と同様に、細胞内ではp38 MAPKとERKを介し、細胞外ではTNF- $\alpha$ を介して制御されることが示唆された。THP-1による本結果は、樹状細胞におけるIL-8産生の作用機構の解明に役立つものと期待される。

本研究では、THP-1細胞の感作性物質応答とその作用機構について検

討した結果、THP-1 細胞が樹状細胞で認められる種々の細胞表面抗原やサイトカインに関して感作性物質特異的な応答を示し、樹状細胞の代替として有用なことが示唆された。また、種々の細胞表面抗原やサイトカインの発現が、樹状細胞と同様の作用機構を介して起こることが示唆された。さらに、THP-1 細胞を用いた検討から、感作性物質により樹状細胞から産生される IL-8 の産生機構解明に繋がる知見を得た。以上のことから、THP-1 細胞を用いることで、化学物質の皮膚感作性の有無を良好に判別できるだけでなく、樹状細胞活性化の作用機構を解明できる可能性が示唆された。本研究が感作性物質による樹状細胞の活性化を具現化する *in vitro* 皮膚感作性試験法 (h-CLAT) の開発・確立に向けて、試験法の生物学的機序についての根拠を示す一助となることを期待したい。

皮膚感作の成立には、樹状細胞の活性化だけでなく、化学物質の経皮吸収性やタンパク結合性、及び抗原特異的な T 細胞の増殖など、いくつかの鍵となる反応が関与する。すなわち、皮膚感作性を評価するのに樹状細胞の活性化を再現した *in vitro* 試験法は有用な方法であるが、それだけでは完全ではないかもしれない。今後さらに、いくつかの反応を具現化して、h-CLAT と他の試験法を組み合わせた評価が、ヒトにおける皮膚感作性の予測の向上に繋がるものと考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行し、まとめるにあたって、実に多くの方にお世話になりました。この場を借りて、感謝の意を述べさせて頂きたいと思いません。

本論文の審査に際して貴重な御指導を賜り、御審査頂きました城西大学薬粧品動態制御学講座教授 杉林 堅次先生、日比野 康英先生、小林 順先生に衷心より深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり終始有益な御指導、御助言を賜りました花王(株) 安全性評価研究所 坂口 斉副主席研究員に心から感謝を申し上げます。投稿論文の執筆や数多くの学会発表、日頃の研究内容に渡って、手厚いご指導を頂きました。博士(薬学)の学位論文を執筆することができたのも、坂口さんのご指導ご助言のお陰に他なりません。また、本研究の遂行にあたり、多大なご協力、ご支援を頂いた同研究所 額田 祐子研究員に心から感謝の意を表します。本論文が完成したのも額田さんが一緒に研究を進め、多くの成果を見出して下さったお陰です。深く感謝申し上げます。

また、Top Tox Consulting, Javier Avalos, Ph.D.には、本研究の主論文全てに関して適切な御助言を賜りましたこと、厚くお礼申し上げます。

花王(株) 品質保証本部 品質保証センター 安全管理室 鈴木 尋之室長、安全性評価研究所 西山 直宏室長には、日頃より教育および研究における多くのご助言やご支援を頂きました。深く感謝いたします。そして、同研究所 伊藤 勇一主任研究員、吉田 雪子研究員には、研究の進め方や悩みについて親身になって相談に乗って頂き、様々な面で見守って下さいました。深くお礼申し上げます。また、同

研究所 小坂 七重研究員には、有益なご意見ならびに実験のご協力を頂きましたこと、感謝しております。実際の実験で非常に丁寧かつ正確に補助をして下さった須藤 里実さん、夏梅 和子さんにも大変感謝致します。さらに、安全性評価研究所の皆様にも深く感謝致します。

最後に、論文をまとめるにあたり、これまで私を温かく応援してくれた両親と祖母、そして、明るく励まし続け、時間を与えてくれた妻 智恵子と娘 佑奈に心から謝意を記します。

以上の皆様の助言・支援・協力・励ましに対し、深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Magnusson, B., Kligman, A.M. (1969): The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol.*, 52, 268-276.
- 2) Kimber, I., Mitchell, J.A., Griffin, A.C. (1986): Development of a murine local lymph node assay for the determination of sensitizing potential. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 585-586.
- 3) Directive 2003/15/EC of the european parliament and of the council, February 27, (2003): Official J. European Union, L66, P0026-0035 B.
- 4) OECD, (2004): Test guideline, 428.
- 5) OECD, (2004): Test guideline, 432.
- 6) OECD, (2004): Test guideline, 430.
- 7) OECD, (2004): Test guideline, 431.
- 8) Hart, D.N.J., (1997): Dendritic cells: unique leukocyte population which control the primary immune response. *Blood*, 90, 3245-3287.
- 9) Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.
- 10) Jowsery, I.R., Basketter, D.A., Westmoreland, C., Kimber, I. (2006): A future approach to measuring relative skin sensitising potency: a proposal. *J. Appl. Toxicol.*, 26, 341-350.
- 11) Ozawa, H., Nakagawa, S., Tagami, H., Aiba, S. (1996): Interleukin-1 beta and granulocyte macrophage colony-stimulating factor mediate Langerhans cell maturation differently. *J. Invest. Dermatol.*, 106, 441-445.
- 12) Verrier, A.C., Schmitt, D., Staquet, M.J. (1999): Fragrance and contact

- allergens *in vitro* modulate the HLA-DR and E-cadherin expression on human epidermal Langerhans cells. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 120, 56-62.
- 13) Enk, A.H., Katz, S.I. (1992): Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 1398-1402.
  - 14) Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Kimber, I. (1996): Constitutive and inducible expression of interleukin-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells. *Immunology*, 87, 513-518.
  - 15) Sallusto, F., Lanzavecchio, A. (1994): Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin-4 and down regulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Exp. Med.*, 179, 1109-1118.
  - 16) Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J. 1992): GM-CSF and TNF-  $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*, 360, 258-261.
  - 17) Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., Tagami, H. (1997): Dendritic cells differently responded to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.*, 27, 3031-3038.
  - 18) Aiba, S., Manome, H., Nakagawa, S., Mollah, Z.U., Mizuashi, M., Ohtani, T., Yoshino, Y., Tagami, H. (2003): p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl<sub>2</sub> and DNCB. *J. Invest. Dermatol.*, 120, 390-398.
  - 19) Coutant, K.D., de Fraissinette, A.B., Cordier, A., Ulrich, P. (1999):

Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. *Toxicol. Sci.*, 52, 189-198.

- 20) De Smedt, A.C.A., Van Den Heuvel, R.L., Berneman, Z.N., Schoeters, G.E.R. (2001): Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34+ derived DC by NiCl<sub>2</sub> and SDS. *Toxicol. In Vitro*, 15, 319-325.
- 21) De Smedt, A.C., Van Den Heuvel, R.L., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., Schoeters, G.E., Weber, E., Tuschl, H. (2002): Phenotypic alterations and IL-1 beta production in CD34+ progenitor- and monocyte-derived dendritic cells after exposure to allergens: a comparative analysis. *Arch. Dermatol. Res.*, 294,109-116.
- 22) Staquet, M.J., Sportouch, M., Jacquet, C., Schmitt, D., Guesnet, J., Peguet-Navarro, J. (2004): Moderate skin sensitizers can induce phenotypic changes on in vitro generated dendritic cells. *Toxicol. In Vitro*, 18, 493-500.
- 23) Ryan, C.A., Hulette, B.C., Gerberick, G.F. (2001): Approaches for the development of cell-based *in vitro* methods for contact sensitization. *Toxicol. In Vitro*, 15, 43-45.
- 24) Tuschl, H., Kovac, R., Weber, E. (2000): The expression of surface markers on dendritic cells as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Toxicol. In Vitro*, 14, 541-549.
- 25) Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 26, 171-176.



- 26) Ashikaga, T., Hoya, M., Itagaki, H., Katumura, Y., Aiba, S. (2002): Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers. *Toxicol. in Vitro*, 16, 711-716.
- 27) Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Ito, Y., Okuda, M., Suzuki, H. (2003): Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naïve THP-1 cell line. *Toxicol. in Vitro*, 17, 221-228.
- 28) Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., Toyoda, H. (2006): Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol. in Vitro*, 20, 767-773.
- 29) Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H. (2006): Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. in Vitro*, 20, 767-773.
- 30) Kosaka, N., Ashikaga, T., Sakaguchi, H., Sono, S., Itagaki, H., Nishiyama, N. (2007): Evaluation of the in vitro skin sensitization test; human cell line activation test (h-CLAT) using the modified prediction model. *Abstracts of 6<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences*.
- 31) Miyazawa, M., Ito, Y., Yoshida, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H. (2007): Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. *Toxicol. in Vitro*, 21, 428-437.
- 32) Van Kooten, C., Banchereau, J. (1997): Functions of CD40 on B cells,

- dendritic cells and other cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 330-337.
- 33) Pinchuk, L.M., Klaus, S.J., Magaletti, D.M., Pinchuk, G.V., Norsen, J.P., Clark, E.A. (1996): Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J. Immunol.*, 157, 4363-4370.
- 34) Peguet-Navarro, J., Dalbiez-Gauthier, C., Rattis, F.M., Van Koote, C., Banchereau, J., Schmitt, D., (1995) : Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.*, 155, 4241-4247.
- 35) Basketter, D.A., Scholes, E.W., Kimber, I. (1994): The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test. *Food Chem. Toxicol.*, 32, 543-547.
- 36) Zhou, L.J., Tedder, T.F. (1995): Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.*, 154, 3821-3835.
- 37) De Smedt, A.C., Van Den Heuvel, R.L., Van Tendeloo, V.F., Berneman, Z.N., Schoeters, G.E. (2005): Capacity of CD34+ progenitor-derived dendritic cells to distinguish between sensitizers and irritants. *Toxicol. Lett.*, 156, 377-389.
- 38) Wang, B., Amerio, P., Sauder, D.N. (1999): Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. *J. Leukoc. Biol.*, 66, 33-39.
- 39) Salamero, J., Bausinger, H., Mommaas, A.M., Lipsker, D., Proamer, F., Cazenave, J.P., Goud, B., de la Salle, H., Hanau, D. (2001): CD1a molecules traffic through the early recycling endosomal pathway in human Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*, 116, 401-408.
- 40) Manome, H., Aiba, S. (1999): Simple chemicals can induce maturation

and apoptosis of dendritic cells. *Immunology* 98, 481-490.

- 41) Sebastiani, S., Albanesi, C., De, P.O., Puddu, P., Cavani, A. and Girolomoni, G (2002): The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.*, 293, 552-559.
- 42) Verheyen, G.R., Schoeters, E., Nujiten, J.M., Van Den Heuvel, R.L., Nelissen, I., Witters, H., Van Den Heuvel, R.L., Nelissen, I., Witters, H., Van Tendeloo, V.F.I., Berneman, Z.N., Schoeters, G.E.R. (2005): Cytokine transcript profiling in CD34+-progenitor derived dendritic cells exposed to contact allergens and irritants. *Toxicol. Lett.*, 155, 187-194.
- 43) Salamero, J., Bausinger, H., Mommaas, A.M., Lipsker, D., Proamer, F., Cazenave, J.P., Goud, B., de la Salle, H., Hanau, D. (2001): CD1a molecules traffic through the early recycling endosomal pathway in human Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*, 116, 401-408.
- 44) Hope, J.C., Campbell, F., Hopkins, S.J. (2000): Deficiency of IL-2 or IL-6 reduces lymphocyte proliferation, but only IL-6 deficiency decreases the contact hypersensitivity response. *Eur. J. Immunol.*, 30, 197-203.
- 45) Teunissen, M.B., Rongen, H.A., Bos, J.D. (1994): Function of adhesion molecules lymphocyte function-associated antigen-3 and intercellular adhesion molecule-1 on human epidermal Langerhans cells in antigen-specific T cell activation. *J. Immunol.*, 152, 3400-3409.
- 46) Mizuashi, M., Ohtani, T., Nakagawa, S., Aiba, S. (2005): Redox imbalance induced by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.*, 124, 579-586.
- 47) Hulette, B.C., Ryan, C.A., Gildea, L.A., Gerberick, F. (2005): Relationship of CD86 surface marker expression and cytotoxicity on dendritic cells

- exposed to chemical allergen. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 209, 159-166.
- 48) Miyzawa, M., Ito, Y., Kosaka, N., Nukada, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., Nishiyama, N. (in press): Role of TNF- $\alpha$  and extracellular ATP in THP-1 cell activation following allergen exposure.
- 49) Miyzawa, M., Ito, Y., Kosaka, N., Nukada, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., Nishiyama, N. (in press): Role of MAPK signaling pathway in the activation of dendritic type cell line, THP-1, induced by DNCB and NiSO<sub>4</sub>.
- 50) Ade, N., Martinozzi-Teissier, S., Pallardy, M., Rousset, F. (2006): Activation of U937 cells by contact sensitizers: CD86 expression is independent of Apoptosis. *J. Immunotoxicol.*, 3, 189-197.
- 51) Python, F., Goebel, C., Aeby, P. (2007): Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 220, 113-24.
- 52) Azam, P., Peiffer, J.L., Chamousset, D., Tissier, M.H., Bonnet, P.A., Vian, L., Fabre, I., Ourlin, J.C. (2006): The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 212, 14-23.
- 53) Salgado, C.G., Nakamura, K., Sugaya, M., Tada, Y., Asahina, A., Fukuda, S., Koyama, Y., Irie, S., Tamaki, K. (1999): Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells<sup>1</sup>. *J. Invest. Dermatol.*, 113, 1021-1027.
- 54) Di Virgilio, F., Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Sanz, J.M., dal Susino, M., Mutini, C., Hanau, S., Baricordi, O.R. (1996): Purinoceptor function

in the immune system. *Drug. Dev. Res.*, 39, 319-329.

- 55) Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D. (2001): Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*, 97, 587-600.
- 56) Abbracchio, M.P., Burnstock, G (1994): Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol. Ther.*, 64, 445-475.
- 57) Fredholm, B.B., Abbracchio, M.P., Burnstock, G (1994): Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol. Rev.*, 46, 143-56.
- 58) Ferrari, D., la Sala, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Falzoni, S., Girolomoni, G., Idzko, M., Dichmann, S., Norgauer, J., Di Virgilio, F. (2000): The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB, J.*, 14, 2466-2476.
- 59) La Sala, A., Ferrari, D., Corinti, S., Cavani, A., Di Virgilio, F., Girolomoni, G. (2001): Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J. Immunol.*, 166, 1611-1617.
- 60) Into, T., Fujita, M., Okusawa, T., Hasebe, A., Morita, M., Shibata, K. (2002): Synergic effects of mycoplasmal lipopeptides and extracellular ATP on activation of macrophages. *Infect. Immun.*, 70, 3586-3591.
- 61) Boislève, F., Kerdine-Römer, S., Rougier-Larzat, N., Pallardy, M. (2004): Nickel and DNCB induce CCR7 expression on human dendritic cells through different signalling pathways: role of TNF- $\alpha$  and MAPK. *J. Invest. Dermatol.*, 123, 494-502.
- 62) Cumberbatch, M., Kimber, I. (1995): Tumor necrosis factor- $\alpha$  is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for

- optimal contact sensitization. *Immunol.*, 84, 31-35.
- 63) Berthier-Vergnes, O., Bermond, F., Flacher, V., Massacrier, C., Schmitt, D., Péguet-Navarro, J. (2005): TNF- $\alpha$  enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. *FEBS, Lett.*, 579, 3660-3668.
- 64) Flavell, R.A. (1999): The molecular basis of T cell differentiation. *Immunol. Res.*, 12, 159-168.
- 65) Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H. and Furue, M. (2006): Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J. Dermatol. Sci.*, 42, 1-11.
- 66) Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V. and Hauser, C. (2001): A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the activation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF- $\alpha$ , and contact sensitizers. *J. Immunol.*, 166, 3837-3845.
- 67) Dong, C., Davis, R.J., Flavell, R.A. (2002): MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.*, 20, 55-72.
- 68) Ito, Y., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Kosaka N., Sakaguchi, H., Suzuki, H. (2005): Role of mitogen-activated protein kinase in CD86/CD54 expression induced by contact sensitizers on THP-1 cells. Proceedings of the 19<sup>th</sup> annual meeting of Japanese Society of Alternative to Animal Experiments.
- 69) Nukada, Y., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Sakaguchi, H., Nishiyama, N. (submitted): Production of IL-8 in THP-1 cells following tumor necrosis factor- $\alpha$  production or contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase pathway.

- 70) Griffiths, C.E., Barker, J.N., Kunkel, S. and Nickoloff, B.J. (1991): Modulation of leucocyte adhesion molecules, a T-cell chemotaxin (IL-8) and a regulatory cytokine (TNF-alpha) in allergic contact dermatitis (rhinodermatitis). *Br. J. Dermatol.*, 124, 519-526.
- 71) Toebak, M.J., Pohlmann, P.R., Sampat-Sardjoeppersad, S.C., von Blomberg, B.M.E, Bruynzeel, D.P., Scheper, R.J., Rustemeyer, T. and Gibbs, S. (2006): CXCL8 Secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol. In Vitro*, 20, 117-124.
- 72) Gerberick, G.F., House, R.V., Fletcher, E.R. and Ryan, C.A. (1992): Examination of the local lymph node assay for use in contact sensitization risk assessment. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 19, 438-445.
- 73) Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Schlatter, H., Dearman, R.J., Kimber, I., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2005): Compilation of Historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis.*, 16, 152-202.
- 74) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998): Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 53, 563-579.
- 75) Python, F., Goebel, C. and Aeby, P. (2007): Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 220, 113-124.
- 76) Hagvall, L., Backtorp, C., Svensson, S., Nyman, G, Borje, A. and Karlberg, A.T. (2007): Fragrance compound Geraniol forms contact

allergens air exposure. Identification and quantification of oxidation products and effect on skin sensitization. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 807-814.

- 77) Foussereau, J., Samsoen, M. and Hecht, M.T. (1983): Occupational dermatitis to Ampholyt G in hospital personnel. *Contact Dermatitis.*, 9, 233-234.
- 78) Gerberick, G.F., Vassallo, J.D., Foertsch, L.M., Price, B.B., Chaney, J.G and Lepoittevin. J.P. (2007): Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens; a classification tree model approach. *Toxicol. Sci.*, 97, 417-427.
- 79) NIH Publication. (1999): The murine local lymph node assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds. No. 99-4494.



