

厚生労働科学研究費補助金

化学リスク研究事業

多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 相場 節也

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発-----	4
相場 節也	
(資料) 1. Multi-Immuno Tox Assay バリデーシヨンプロトコール	
平成24年11月13日ver. 001.1J	
2. Data sheet for MITA #2H4 Ver. 002.1	
II. 分担研究報告	
1. 免疫毒性に関する国際動向調査 -----	50
小島 肇	
2. 化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析, 精度管理 -----	57
近江谷 克裕	
3. 化学物質のMulti-ImmunoTox assayによる解析 -----	63
山影 康次	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	

厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）

総括分担研究報告書

多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発

研究代表者 相場 節也

東北大学病院皮膚科

研究要旨

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価することのできるルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した(Multi-Immuno Tox Assay ; MITA)。この系ではT細胞におけるIL-2とIFN- γ 転写、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8転写に至るシグナル伝達経路への薬剤の影響を評価することができる。種々の免疫抑制剤を評価したところ、その評価はすでに報告されている薬剤のT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する免疫学的効果と一致していた。以上より、この系がT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する免疫抑制効果を簡便に評価することができ、様々な薬剤の未知の免疫学的効果を検出しその作用機序をあきらかにするための新しいhigh-throughput手法となりうるということが明らかとなった。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

小島 肇・国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部・室長

近江谷 克裕・産業技術総合研究所・バイオメディカル部門・部門

山影 康次・食品薬品安全センター秦野研究所代替法試験部・部長

A. 研究目的

環境汚染物質、食物添加物、薬剤に属する化学物質の多くは免疫系を標的とし、その結果、アレルギー、自己免疫疾患、発癌その他人体の健康に悪影響を及ぼしうる。したがって、免疫系機能におけるそれら外因性化学物質の毒性効果として定義される免疫毒性は、公衆衛生行政にとっても重要な課題となっている。現在、化学物質の免疫毒

性の評価は種々の動物実験に依っており、免疫抑制と刺激性を評価するいくつかのアッセイ法が提案されている。しかし、動物実験には費用面、倫理面の問題、また結果をヒトに反映できるかという問題が存在する。したがって、実験動物の使用を減らすために代替実験法を促進、評価し、可能であれば動物試験に置き換えることがヨーロッパの政策となっている。

2003年にEuropean Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)により開催されたワークショップで、最新のin vitro免疫毒性評価系が報告された。regular 28-day general toxicity testsで有用な情報が得られていたため、このワークショップでは段階状の取り組みが提案された。つまり、免疫毒性のプレスクリーニングは骨髄抑制の評価から開始する。骨髄を損傷または破壊する物質は免疫毒性効果を持つと考えられる。骨髄毒性を持たない物質についてはhuman whole-blood cytokine

release assay (HWBCRA), lymphocyte proliferation assay, mixed lymphocyte reaction, natural killer cell assay, T cell-dependent antibody response, dendritic cell maturation, fluorescent cell chip などのさまざまな方法で免疫毒性を検証された。しかし、これらのなかで正式なプレバリデーションが行われたのは HWBCRA のみである。

Langezaal らにより報告された HWBCRA の原理は human whole-blood method for pyrogen testing に基づいている。その方法はヒトの全血を lipopolysaccharide (LPS) または staphylococcal enterotoxin B (SEB) で刺激し、単球細胞が産生する IL-1 β 、Th2 リンパ球が産生する IL-4 を測定するものである。Langezaal らはヒト全血を 40 時間、免疫毒性物質または非免疫毒性物質で処理したのうち LPS または SEB で刺激し上清中のそれぞれ IL-1 β 、IL-4 を定量し、免疫毒性力価を評価するため IC50 (50%抑制する濃度)、SC₄ (4 倍刺激される濃度) を算出した。ECVAM ワークショップではこの方法の利点として、①ヒトと動物との種差を考慮しなくてこと、②ヒトの初代細胞を使用していること、③手技が簡便であること、④費用がかからず、短時間でできることを挙げている。個人間の白血球数と刺激への反応の違いが HWBCRA における重大な懸念となっている。凍結保存されたヒト全血を使用することによりこの問題は解決するものの、この方法は数多くの化学物質を評価する high-throughput アッセイには向かないものである。

本研究では、化学物質の免疫毒性を評価する high-throughput スクリーニングシステムを確立するため、IL-2、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-8 プロモーターに誘導されるルシフェラーゼ遺伝子を導入した 3 つの安定レポーター細胞株を樹立した。#2H4 細胞は IL-2 プロモーターに制御された SLG ルシフェラーゼ遺伝子 (緑色に発色)、IFN- γ プロモーターに制御された SLO ルシフェラーゼ遺伝子 (橙色に発色)、G3PDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子 (赤色に発色) を Jurkat T 細胞株に導入したものである。THP-G1 β 細胞は IL-1 β プロモーターに制御された SLG ルシフェラーゼ遺伝子、G3PDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子を THP-1 単球細胞株に導入したものであり、THP-G8 細胞は IL-8 プロモーターに制御された SLO ルシフェラーゼ遺伝子、G3PDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子を THP-1 単球細胞株に導入したものである。(図 1) 次に 3 つのよく知られている免疫抑制剤である dexamethasone (Dex), cyclosporine A (CyA), Tacrolimus (Tac) が phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と ionomyin (Io) の混

合物(PMA/Io)に刺激された#2H4 細胞、または lipopolysaccharide (LPS)に刺激された THP-G1 β 細胞、THP-G8 細胞のルシフェラーゼ活性に与える影響を調べた。また、同様に刺激された Jurkat 細胞、または THP-1 細胞における mRNA の発現と比較した。さらにこれらの免疫抑制薬存在下に PMA/Io または LPS で刺激したヒト全血細胞における mRNA の発現とも比較した。さらに種々の免疫抑制薬、免疫調製薬、または既知の免疫調製作用を持たない薬剤で 3 種のレポーター細胞を刺激し、免疫毒性のスクリーニングシステムの評価を行った。

B. 研究方法

試薬

Water-soluble Dexamethasone (Dex), Cyclosporin A (CyA), Tacrolimus (TAC), Rapamycin, Cyclophosphamide, Azathioprine, Mycophenolic acid, Mizoribine, Leflunomide, Methotrexate, 4-Aminophenyl sulfone, Sulfasalazine, Colchicine, Chloroquine, Minocycline, Nicotinamide, Acetaminophen, Digoxin, Warfarin, Cimetidine, Levamisol, Isoniazid, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Ionomycin(Io), Lipopolysaccharides from E. coli 026:B6 (LPS) は Sigma-Aldrich から購入した。Deoxyspergualin は医薬品卸業から購入した。

Jurkat T細胞由来#2H4細胞におけるIL-2, IFN- γ , G3PDHプロモーターアッセイおよびTHP-1 単球細胞由来THP-G1 β 細胞、THP-G8細胞におけるIL-1 β , IL-8, G3PDHプロモーターアッセイ

ヒト T リンパ芽球性白血病由来細胞株である Jurkat 細胞株とヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1(ATCC) は Antibiotic-Antimycotic (Invitrogen), 10% ウシ胎児血清 (Biological Industries) を加えた RPMI-1640 (Gibco) にて 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下で培養した。IL-2 プロモーターに制御された SLG ルシフェラーゼ遺伝子 (緑色に発色)、IFN- γ プロモーターに制御された SLO ルシフェラーゼ遺伝子 (橙色に発色)、G3PDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子 (赤色に発色) は SuperFect (Qiagen) を用い Jurkat 細胞に導入し、#2H4 細胞を樹立した。IL-1 β プロモーターに制御された SLG ルシフェラーゼ遺伝子、G3PDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子を Nucleofector II (Amaxa) を用い THP-1 細胞に導入し THP-G1 β 細胞を樹立し、IL-8 プロモーターに制御された SLO ルシフェラーゼ遺伝子、G3PDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子を同様に THP-1 細胞に導入し THP-G8 細胞を樹立した。1 ウェル当たり 2 \times 10⁵ 個の #2H4 細胞

または1ウェル当たり 5×10^4 個のTHP-G1 β 細胞、またはTHP-G8細胞を黒色の96-wellプレート(Greiner bio-one)にまき、薬剤を加え、37°C、5%CO₂下で1時間培養した。つづいて#2H4細胞については25nM PMAと1 μ M I α の混合物(PMA/I α)、THP-G1 β 細胞、THP-G8細胞については100 ng/ml LPSで刺激し37°C、5%CO₂下で6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応の基質であるルシフェリンの混合剤であるTripluc luciferase assay reagent (TOYOBO)を混合し、室温で10分振盪させたのちマルチプレート対応型ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。SLG、SLO、SLRルシフェラーゼは共通の基質の存在により同時に発光するが、2枚の光学的フィルターにより分離し、各ルシフェラーゼの発光量を検出した。(SLG-luciferase activity (SLG-LA)、SLO-luciferase activity (SLO-LA)、SLR-luciferase activity (SLR-LA))細胞数の違い、または各種の刺激後の生存率の違いを勘案しSLG-LA、SLO-LAをSLR-LAで除することによりそれぞれnormalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA)、normalized SLO-luciferase activity(nSLO-LA)を算出した。以下のように%suppression抑制率を計算した。

$$\%suppression = \frac{\text{薬剤存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA}}{\text{薬剤非存在下でのnSLG-LAまたはnSLO-LA}} \times 100$$

Whole blood cytokine release assay (WBCRA)

Whole blood cytokine release assayはThurm and Halseyによるプロトコールにのっとって行った。6人の健常人から全血の採血を行った(ノボヘパリン17.1IU/血液ml, 持田製薬)10mlのWBを20mlのRPMI1640培地(Gibco)で希釈し1サンプルあたり2mlずつ分注した。これを1 μ g/ml Dex、10 μ g/ml CyAまたは10ng/ml TACで前処理し、37°Cで1時間培養した。その後、1 μ M PMAと25nM ionomycinの混合物(PMA/I α)または100 ng/ml LPSで刺激し37°Cで6時間培養した。QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen)を用いて含まれる赤血球を溶血しTotal RNAを抽出した。

Jurkat細胞、THP-1細胞におけるmRNA発現

3×10^6 細胞のJurkat細胞またはTHP-1細胞を薬剤で1時間前処理し、その後、それぞれPMA/I α または100 ng/ml LPSで刺激し37°Cで6時間培養した。Isogen (Nippon gene)を用いてtotal RNAを抽出した。

定量的 RT-PCR

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) (Takara Bio Inc)を用いてtotal RNAから相補的DNA(cDNA)を合成した。Mx3000p QPCR System (Stratagene)を用いて定

量 RT-PCRを行った。プライマーについて、それぞれの遺伝子情報はGenBankより入手し、Primer Express 1.0 (Applied Biosystems)を用いて設計、SIGMA GENOSYSにて合成した。cDNA 10ng、フォワードおよびリバースプライマー 400nM、TaqMan probe 60nM、ROX 30nM、Brilliant II Fast QPCR Master Mix (Stratagene)を含む反応液を、95°Cで2分間反応させたのち、95°C、5秒間、60°C、20秒間の反応を45サイクル行った。恒常的に発現するG3PDHをコントロール遺伝子とし、 $\Delta\Delta Ct$ 法で各遺伝子発現の解析を行った。

(倫理面への配慮)

健常人からの採血に際しては、研究内容、採血における危険性、得られた検査結果により本人の人権が損なわれることのないこと、得られた検査結果は、守秘され、個人のプライバシーを侵害する可能性がないこと、研究に協力することに同意した後も、いつでも自由に辞退できること、この研究によって生じる知的財産権は被験者には帰属しないことについて説明し、本人より同意書を取得している。

C. 研究結果

3つのレポーター細胞株である#2H4、THP-G1 β 、THP-G8は刺激によりSLG-LAやSLO-LAの上昇が認められる。

はじめに#2H4細胞を、PMA/I α 、THP-G1 β 細胞、THP-G8細胞をLPSで刺激し、時間をおいてSLG-LA、SLO-LA、SLR-LAを測定した。PMA/I α 刺激により、それぞれIL-2プロモーター活性、IFN- γ プロモーター活性に相当する#2H4細胞のSLG-LAとSLO-LAは4時間後より有意な上昇が認められた。一方、G3PDHプロモーター活性に相当するSLR-LAは抑制が認められた。同様に、LPS刺激により、IL-1 β プロモーター活性に相当するTHP-G1 β 細胞のSLG-LA、IL-8プロモーター活性に相当するTHP-G8細胞のSLO-LAは2時間後より有意な上昇が認められた。両細胞ともに、SLR-LAには変化が認められなかった。図2に#2H4細胞のnSLG-LAとnSLO-LA、THP-G1 β 細胞のnSLG-LA、THP-G8細胞のnSLO-LAについて刺激後の時間経過を追ったものも示した。どの細胞株においてもnSLG-LAやnSLO-LAの変化はSLG-LAやSLO-LAの変化に比べより顕著に傾向を示した。つまりPMA/I α 刺激後5時間から12時間にかけて#2H4細胞のnSLG-LAとnSLO-LA両方の有意かつ時間依存性の上昇が認められた。一方、LPS刺激後4時間から24時間にかけてTHP-G1 β 細胞のnSLG-LAの有意かつ時間依存性の上昇が認められ、LPS刺激後4時間から24時間に

かけてTHP-G8細胞のnSLO-LAの有意な上昇が認められ、その最大の誘導は5時間後に見られた。

PMA/Io刺激された#2H4細胞とLPS刺激されたTHP-G1 β 細胞またはTHP-G8細胞について1ウェル当たりの播種細胞数がSLG-LA、SLO-LA、SLR-LAに及ぼす影響を検討した。これらの細胞株を1ウェル当たり 0.5×10^4 から 1.6×10^6 細胞で播種し、刺激後6時間に測定した。SLG-LA、SLO-LA、SLR-LAの値は1ウェル当たり 1.25×10^4 から 2×10^5 細胞の範囲ではLPS刺激に関わりなく細胞数依存的に増加した。したがって、以後の実験では、1ウェル当たりTHP-G8細胞 5×10^4 細胞で刺激を行った。

レポーター活性に対する3種の免疫抑制剤の効果はJurkat細胞、THP-1細胞でのmRNA発現に対する効果と相関する。

次にPMA/IoまたはLPSで刺激された3つのレポーター細胞のnSLG-LAまたはnSLO-LAに対する3種類のよく知られた免疫抑制剤であるDex、CyA、Tacの効果が、同様に刺激されたそれぞれの由来細胞であるJurkat細胞またはTHP-1細胞におけるmRNAの発現へのそれらの薬剤の効果と相関するかどうかを検討した。Dex、CyA、Tacの存在下または非存在下に#2H4細胞をPMA/Ioで刺激した際、DexはnSLG-LAのみを有意に抑制した。一方、CyAとTacはnSLG-LAとnSLO-LAの両方を抑制した。

(図3) DexはnSLO-LAを抑制するものの、nSLO-LAを減少させる濃度は300 $\mu\text{g/ml}$ 以上であり、抑制の程度も弱いものであった。Dex、CyA、Tacの存在下または非存在下にTHP-G1 β 細胞をLPSで刺激した際、DexはnSLG-LAを有意に抑制したが、CyAやTacは抑制しなかった。同様に、Dex、CyA、Tacの存在下または非存在下にTHP-G8細胞をLPSで刺激した際、DexのみがnSLG-LAを有意に抑制した。一方、Dex、CyA、Tacの存在下または非存在下にJurkat細胞をPMA/Ioで刺激し、IL-2とIFN- γ のmRNA発現を調べた際、DexはIL-2のmRNA発現のみを抑制した。(図4) CyAとTacはともにIL-2とIFN- γ のmRNA発現を抑制した。3剤の存在下または非存在下にTHP-1細胞をLPSで刺激した際、DexのみがIL-1 β とIL-8のmRNA発現を有意に抑制し、CyAやTacでは抑制されなかった。これらの結果は、3つのレポーター細胞から得られる抑制形態が、Jurkat細胞またはTHP-1細胞で発現されるmRNAの定量的RT-PCR分析により得られる抑制形態とよく相関することを示している。

レポーター活性に対する3種の免疫抑制剤の効果は、PMA/IoまたはLPSで刺激されたwhole bloodの

mRNA発現に対する効果と相関する。

健康人からwhole blood(WB)をヘパリン採血した。RPMI1640で3倍希釈し、2mlずつ分注、これを1 $\mu\text{g/ml}$ Dex、10 $\mu\text{g/ml}$ CyAまたは10ng/ml TACで前処理し、37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間培養した。その後、PMA/IoまたはLPSで刺激し37 $^{\circ}\text{C}$ で6時間培養した。RNAを分離し、定量的RT-PCR分析で解析した。遺伝子発現はG3PDH発現で標準化した。各個人についてそれぞれの薬剤による%suppressionをプロットした。%suppressionは薬剤存在下の標準化されたmRNA発現 \div 薬剤非存在下の標準化されたmRNA発現 $\times 100$ を算出した。

WBをPMA/Ioで刺激し、IL-2とIFN- γ のmRNA発現を調べた際、DexはIL-2とIFN- γ のmRNA発現を中程度抑制した。(図5) CyAとTacはともにIL-2とIFN- γ のmRNA発現をほぼ完全に抑制した。また3剤の存在下または非存在下にWBをLPSで刺激した際、DexのみがIL-1 β とIL-8のmRNA発現を抑制し、CyAやTacでは抑制されずCyAではむしろ増強が認められた。これらの結果は、3つのレポーター細胞から得られる抑制形態が、PMA/IoまたはLPSで刺激されたWBのmRNAの定量的RT-PCR分析により得られる抑制形態を反映することを示している。また、原法であるhuman whole-blood cytokine release assay (HWBCRA)では24時間培養しELISAによるサイトカイン量の測定をおこなっているが、本研究では高効率化を考慮し6時間培養ののち定量的RT-PCR分析でサイトカイン量を測定する方法へ変更した。結果はELISAでおこなった報告と同様の結果がえられ、WBCRAの評価時間の短縮化と少数検体への対応が可能となった。

MITAにより解析した免疫抑制剤(プリンまたはピリミジン合成阻害剤)の効果(図6)

これらの結果を踏まえ、他の免疫抑制または調整剤をMITAにて解析した。プリン合成阻害剤であるAzathioprineやMethotrexateはT細胞や単球のサイトカインプロモーター活性には影響しなかった。一方、ピリミジン合成阻害剤であるLeflunomideはT細胞や単球のサイトカインプロモーター活性ともに有意に抑制した。

MITAにより解析した免疫調整剤の効果(図7)

SulfasalazineはT細胞や単球のサイトカインプロモーター活性ともに抑制した。ChloroquineはT細胞サイトカインプロモーター活性のみを抑制した。

MITAにより解析した免疫調節作用の知られていない薬剤の効果(図8)

WarfarinやCimetidineはT細胞や単球のサイトカインプロモーター活性には影響しなかった。一方、

AcetaminophenはT細胞や単球両方のサイトカインプロモーター活性を有意に上昇させた。

各薬剤の効果の評価方法

薬物が投与された際、胆汁などでは薬物濃度が最高血中濃度Cmax($\mu\text{g/ml}$)よりも高くなることが知られている。生体内でT細胞やマクロファージが暴露しうる最高の薬物濃度をCmaxの5倍の濃度(5x Cmax)と想定し、各薬剤の5x Cmax以下の薬物濃度での%suppressionおよび5x Cmaxを超える薬物濃度での%suppressionを算出し表にまとめた。(図9) %suppressionが60%未満および%suppressionが180%以上(プロモーター活性が上昇するもの)のセルはそれぞれ青色、オレンジ色で示した。5x Cmax以下の薬物濃度でDexはIL-1 β とIL-8のプロモーター活性を抑制し、CyAとTacはIL-2とIFN- γ のプロモーター活性を抑制し、LefはIL-2とIL-1 β のプロモーター活性を抑制した。免疫調製剤に関しては、5x Cmax以下の薬物濃度でSulfasalazineはIFN- γ 、IL-1 β 、IL-8のプロモーター活性を抑制し、NicotinamideはIL-1 β とIL-8のプロモーター活性を抑制した。一方、colchicineはIL-1 β プロモーター活性を上昇させた。免疫調節作用の知られていない薬剤についてはどの薬剤もT細胞、単球のサイトカインプロモーター活性に影響を与えなかった。

D. 考察

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価することのできるルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した(Multi-Immuno Tox Assay ; MITA)。この系ではT細胞におけるIL-2とIFN- γ 転写、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8転写に至るシグナル伝達経路への薬剤の影響を評価することができる。種々の免疫抑制剤を評価したところ、その評価はすでに報告されている薬剤のT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する免疫学的効果と一致していた。この系はT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する免疫抑制効果を簡便に評価することができ、様々な薬剤の未知の免疫学的効果を検出しその作用機序をあきらかにするための新しいhigh-throughput手法となるものとなる。

E. 結論

1. MITAを用いた免疫毒性評価妥当性の検討

免疫抑制剤11種類、炎症性疾患治療薬(免疫調節性薬剤)6種類、免疫系への影響が無い薬剤6種類をMITAにより評価した。評価に際しては、各薬剤について、最高血中濃度(Cmax)の100倍濃度から3倍希釈による11段階希釈系列を作成し評価した。

その結果、Cmaxの濃度でDEXによるIL-1 β 、IL-8、CyA、TACによるIL-2、IFN- γ 転写活性抑制作用を検出できた。さらに、Sulfasalazine、Nicotinamideの免疫抑制作用も確認できたが、Leflunomideを除いては、代謝拮抗作用を介する免疫抑制剤の効果は検出できなかった。

2. mRNA定量による免疫毒性評価とMITAとの相関

T細胞におけるIL-2、IFN- γ mRNA、単球におけるIL-1 β 、IL-8 mRNA発現とMITAとの極めて良好な相関関係が確認できた。

3. WBCRAとMITAとの相関に関して

まず、その欠点であるサイトカインの蛋白定量をmRNA定量に変更する検討を行った。その結果、6時間の反応時間で回収されたRNAを用いた定量的RT-PCRにより原法と同等の結果が得られ、WBCRAの評価時間の短縮化と少数検体への対応が可能となった。レポーター活性に対する3種の免疫抑制剤の効果は、PMA/IoまたはLPSで刺激されたWBのmRNA発現に対する効果と相関した。

F. 健康危険情報

健康人における採血において問題は生じなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

Yutaka Kimura, Yoshihiro Ohmiya, Setsuya Aiba Multicolor luciferase reporter gene assay system for IL-1 β , 2, 8 and IFN- γ presents a novel tool to evaluate immunological effects of drugs and their efficacy European Society for Dermatological Research, Venice, Italy (2012.9)

木村裕 シンポジウム1【皮膚科学の最前線：免疫が介する皮膚疾患を解く】接触皮膚炎を解く、第76回日本皮膚科学会東部支部学術大会、札幌(2012.9)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特願2010-151362; PCT/JP2011/65090

図1 Multi-ImmunoTox Assay (MITA)

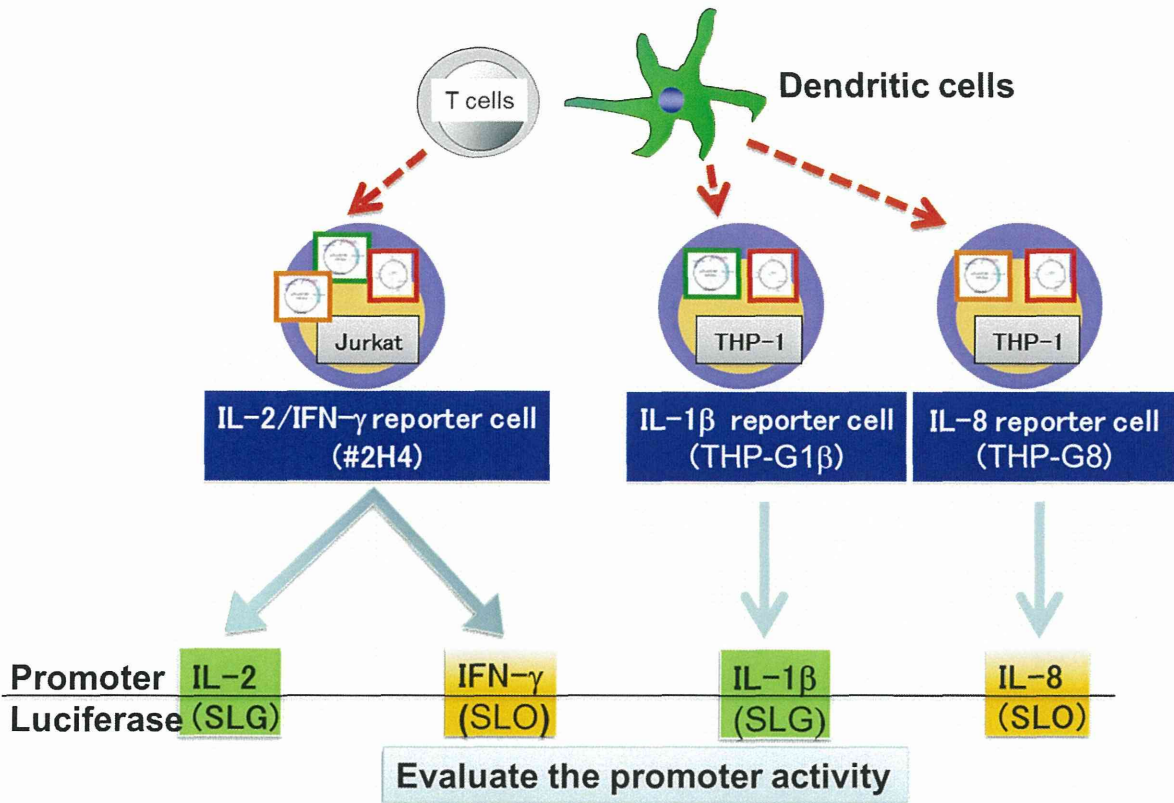


図2 #2H4細胞(左)、THP-G1β細胞(中)、THP-G8細胞(右)の刺激後の時間経過

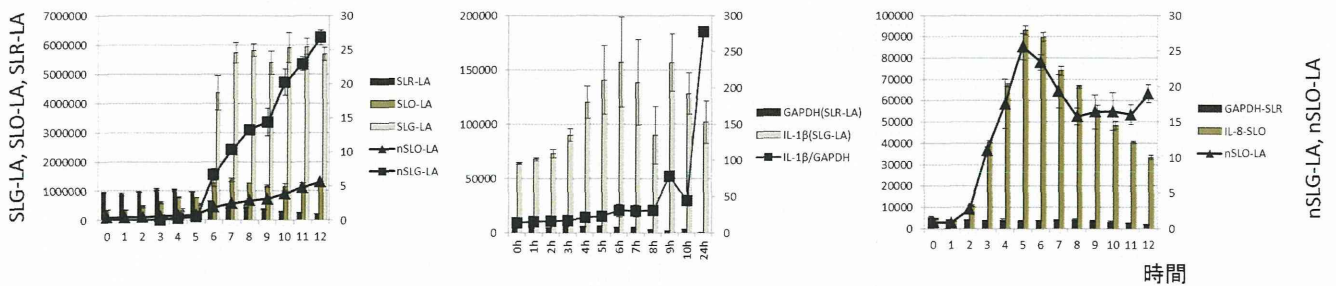


図3 免疫抑制剤(Dex, CyA, Tac)による Jurkat および THP-1 細胞のサイトカイン遺伝子発現制御(MITA)

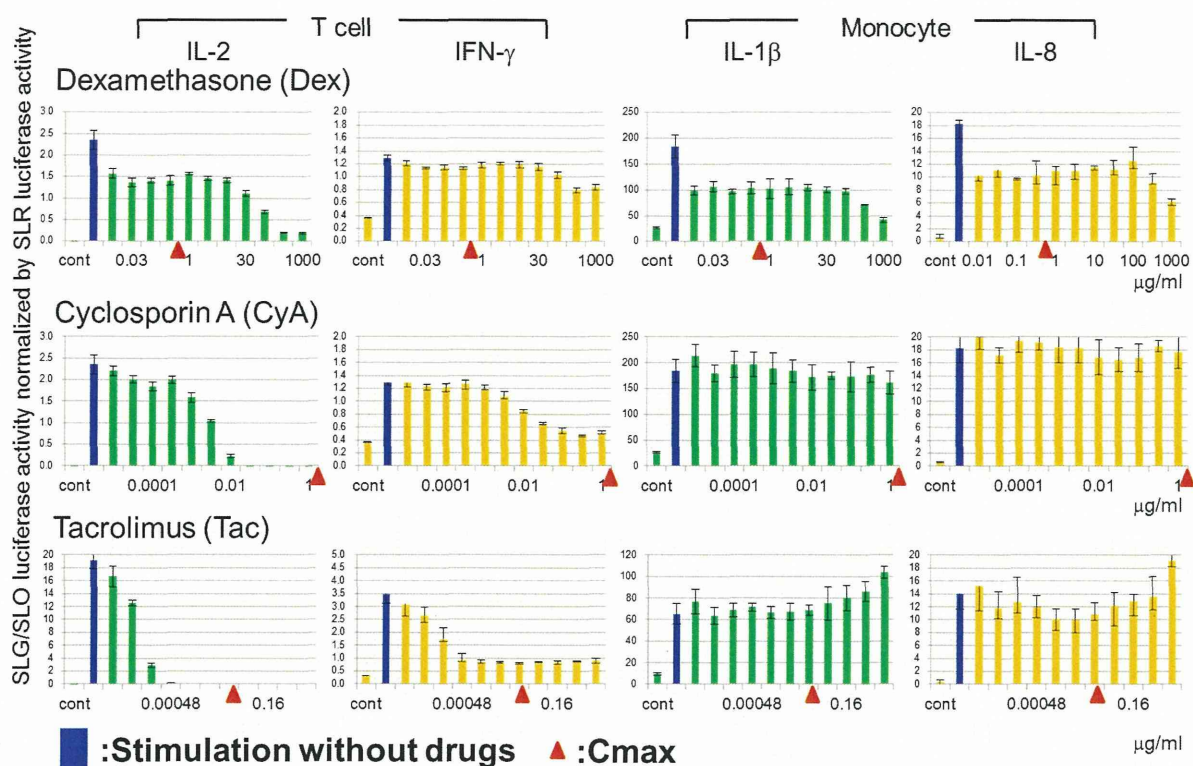


図4 免疫抑制剤(Dex, CyA, Tac)による Jurkat および THP-1 細胞の サイトカイン遺伝子発現制御(quantitative real-time PCR : Q-PCR)

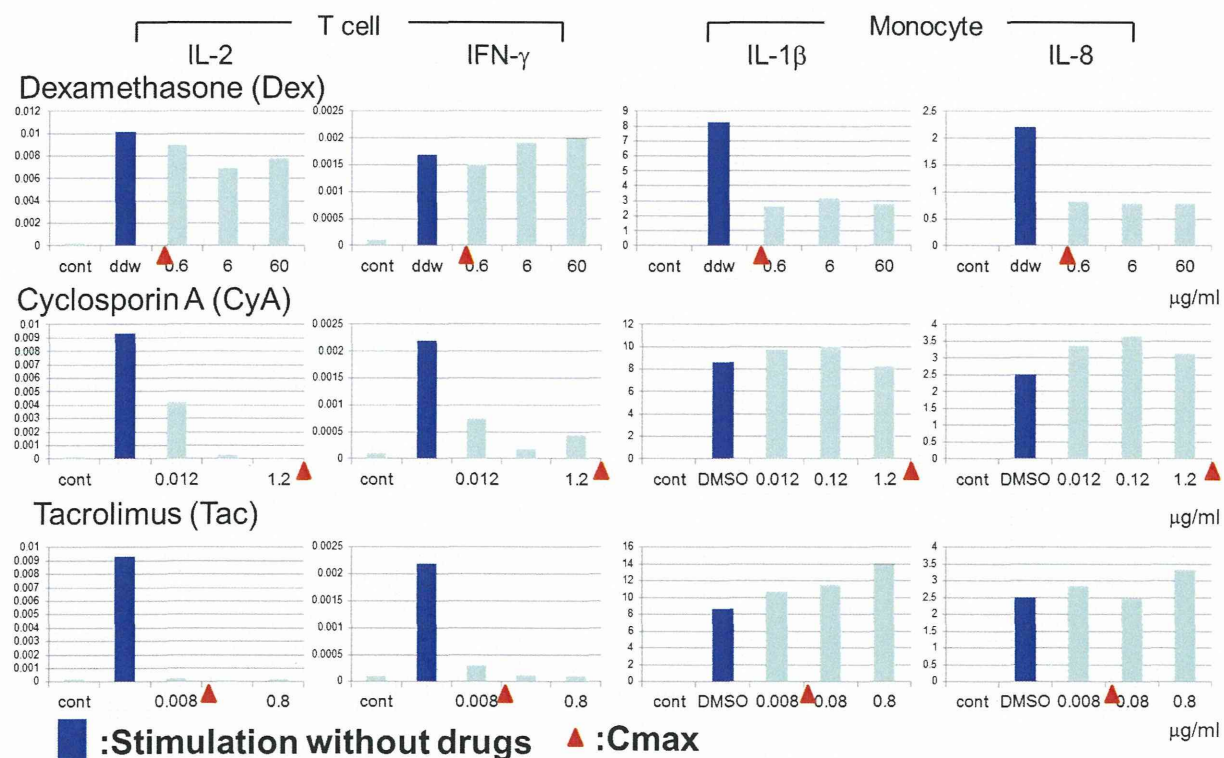


図5 Whole blood cytokine release assayの結果

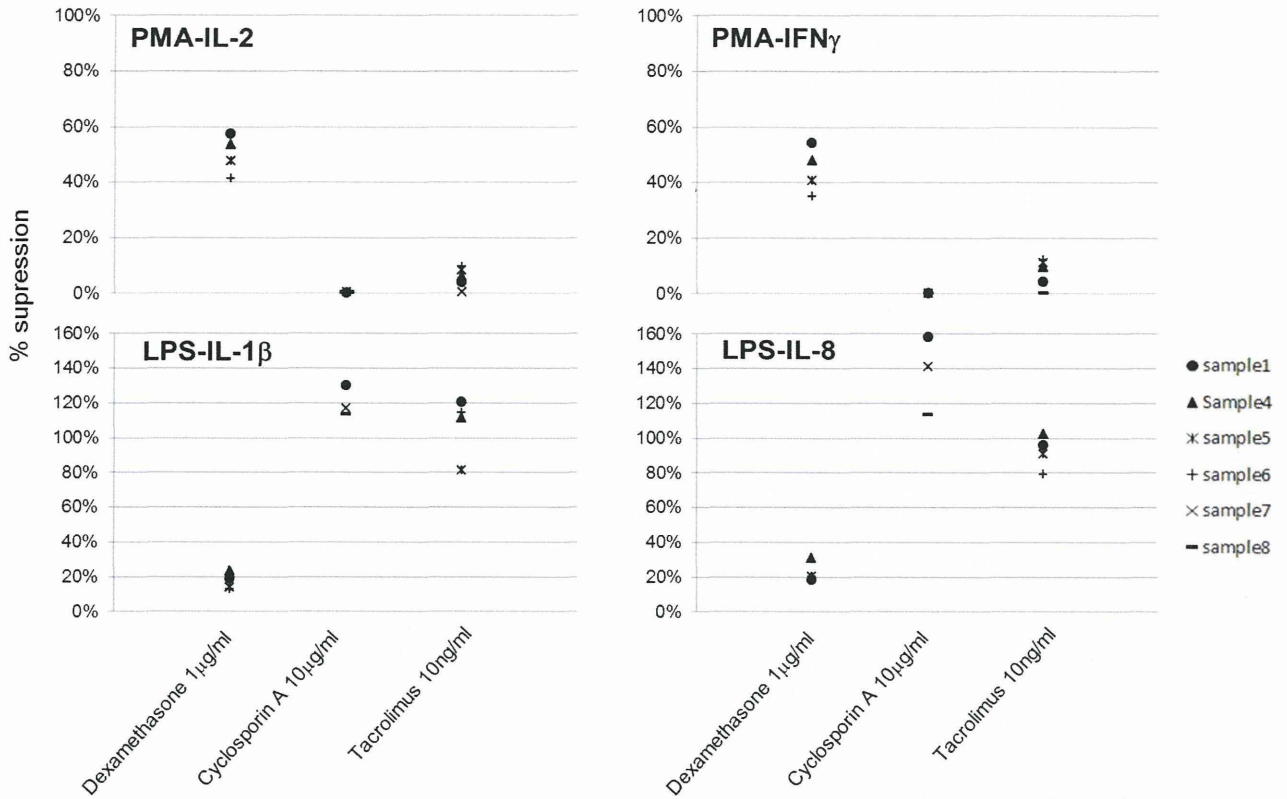


図6 MITAにより解析した免疫抑制剤(プリンまたはピリミジン合成阻害剤)の効果

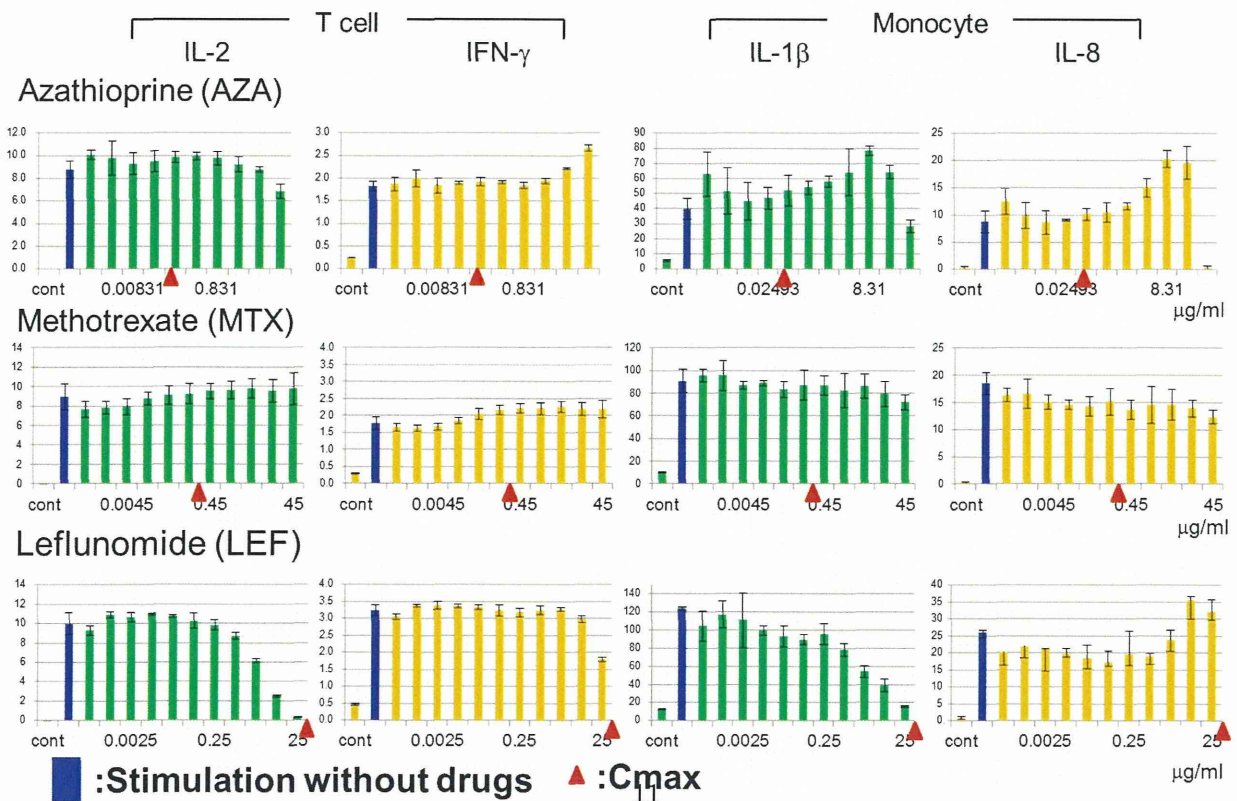


図7 MITAにより解析した免疫調製剤の効果

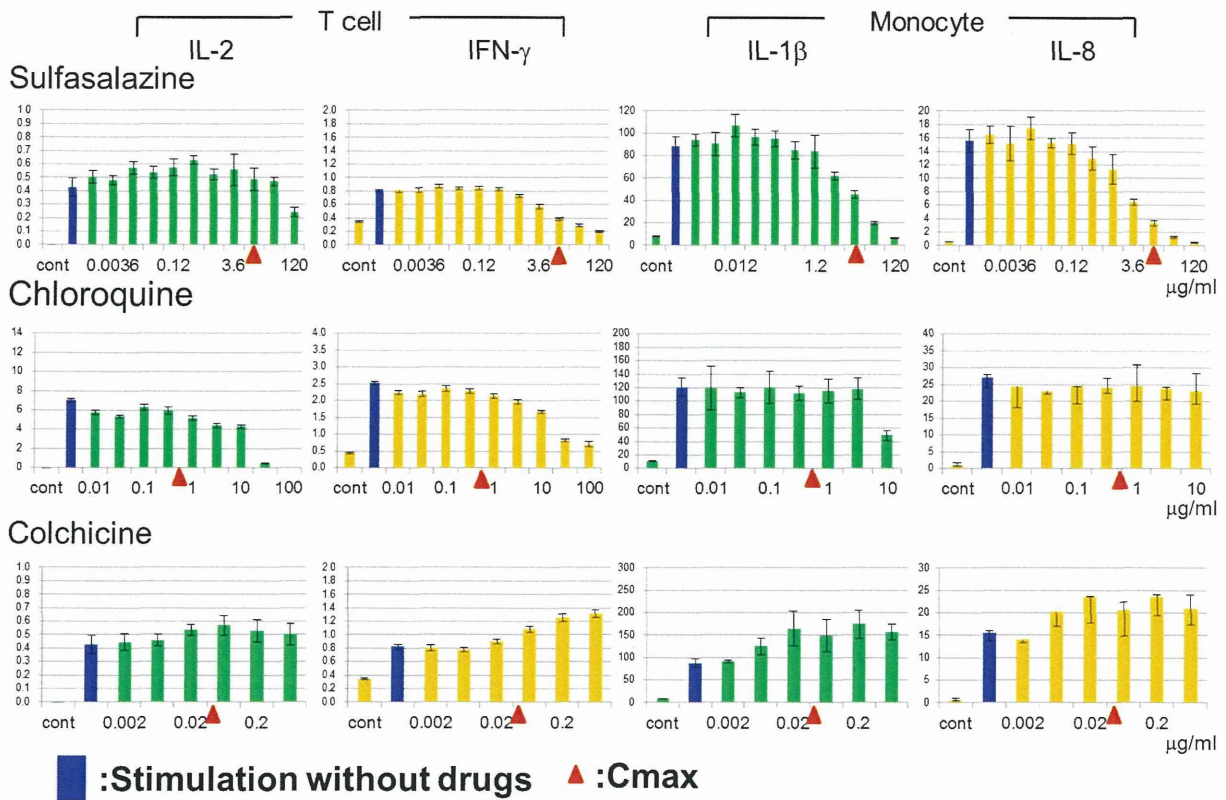


図8 MITAにより解析した免疫調節作用の知られていない薬剤の効果

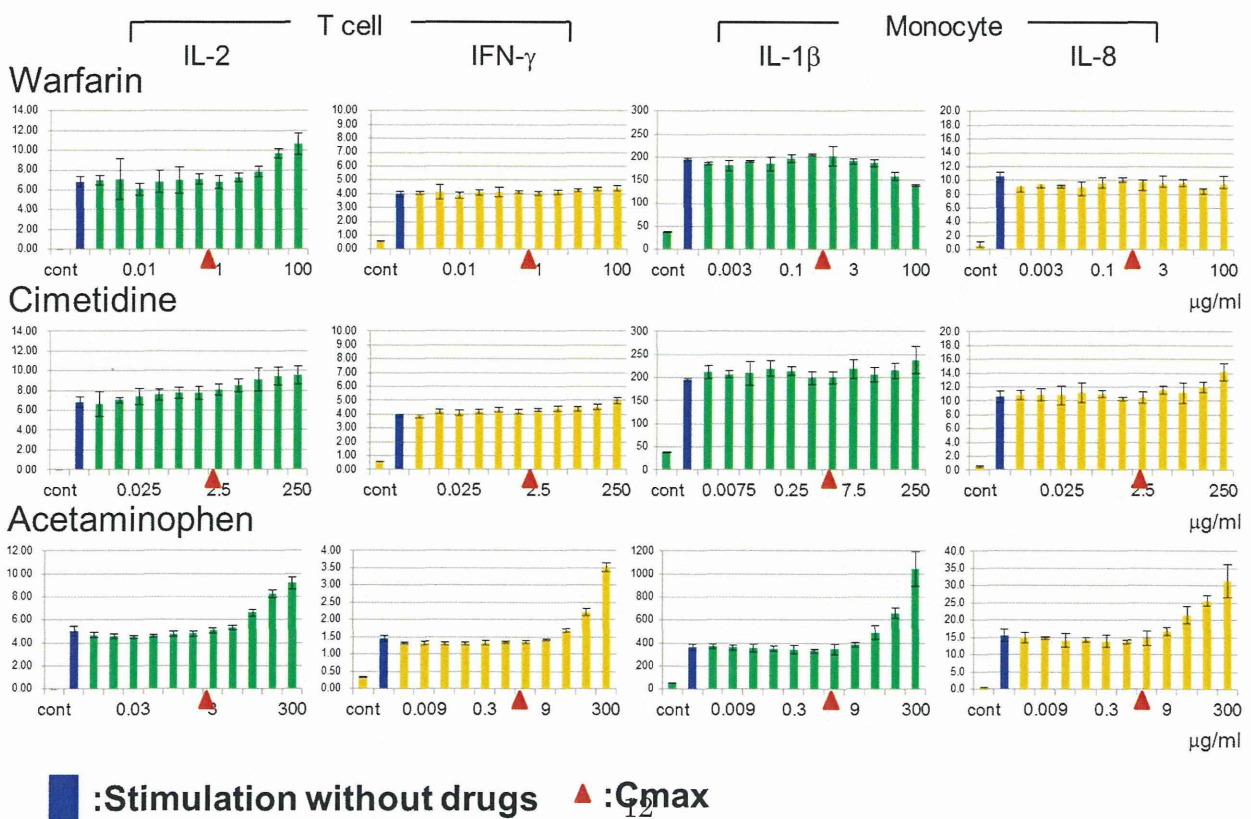


図9 MITAの結果まとめ
(1回目の% suppression / 2回目の% suppression)

作用機序		Cmax	IL-2		IFN-γ		IL-1β		IL-8	
			<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax
免疫抑制剤										
1) 遺伝子発現調節	Dexamethasone	50-500ng/ml	62/82	8/17	83/105	47/89	50/35	10/10	58/34	31/30
2) キナーゼ、ファスファターゼ阻害薬	Cyclosporin A	3μg/ml	9/0	-/-	12/17	-/-	118/82	-/-	114/61	-/-
	Tacrolimus (FK506)	20ng/ml	1/0	1/0	23/16	23/16	131/121	131/169	53/71	53/137
	Rapamycin	89.1ng/ml	133/165	133/165	167/89	167/89	107/184	158/184	74/143	130/143
3) アルキル化剤	Cyclophosphamide	20μg/ml	119/94	119/113	124/116	149/176	128/73	128/176	128/72	131/242
4) プリン合成阻害	Azathioprine	73.7ng/ml	92/115	81/78	127/109	135/146	117/157	117/196	109/142	90/224
	Mycophenolic acid	25μg/ml	133/251	-/-	164/270	-/-	133/463	-/-	189/489	-/-
	Mizoribine	380ng/ml	106/114	129/142	107/116	116/121	105/162	128/312	88/140	129/295
5) ピリミジン合成阻害	Leflunomide	41.5μg/ml	25/1	3/-	91/62	48/-	23/11	3/-	66/193	66/-
6) 核酸合成阻害	Methotrexate	320ng/ml	116/86	118/86	119/130	119/133	138/90	138/77	158/74	158/66
7) Unknown	Deoxyspergualin (Gusperimus)	5μg/ml	107/87	110/76	104/104	105/106	109/67	109/67	113/65	113/65

作用機序		Cmax	IL-2		IFN-γ		IL-1β		IL-8	
			<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax	<=5 x Cmax	> 5 x Cmax
免疫調節剤										
	Dapsone	2μg/ml	81/118	16/13	118/106	63/80	104/71	25/40	92/76	49/44
	Sulfasalazine	12.19μg/ml	147/83	57/55	0/7	0/5	15/25	0/11	5/4	0/1
	Colchicine	5.64ng/ml	126/120	133/221	117/146	203/837	196/450	207/659	154/155	154/432
	Chloroquine	553ng/ml	74/77	0/0	82/80	13/13	92/73	35/0	85/66	85/0
	Minocycline	2μg/ml	61/87	17/1	76/82	31/12	84/81	71/33	81/84	81/30
	Nicotinamide	268μg/ml	146/81	201/192	116/86	126/234	2/80	1/0	9/67	2/0
免疫調節作用の報告のない薬剤										
	Acetaminophen	2.6μg/ml	105/116	182/380	86/106	285/375	107/127	318/485	107/134	205/589
	Digoxin	2.3ng/ml	89/107	6/1	91/108	27/27	115/80	611/80	110/74	186/74
	Warfarin	685ng/ml	106/127	156/166	104/122	110/134	93/76	71/76	85/63	82/63
	Cimetidine	2.3μg/ml	125/122	139/155	112/116	125/139	112/69	122/69	109/62	134/62
	Levamisol	119ng/ml	77/113	20/13	91/106	75/82	106/91	33/32	91/109	53/28
	Isoniazid	8μg/ml	84/92	29/34	92/111	92/136	116/80	122/42	107/71	64/42

資料 1.

Multi-Immuno Tox Assay バリデーションプロトコール

平成 24 年 11 月 13 日 ver. 001.1J

目次

1. はじめに.....	4
2. 材料及び試薬調整方法.....	5
2-1 使用する細胞.....	5
2-2 使用する試薬及び調整方法.....	5
2-2-1 使用試薬.....	5
2-2-2 消耗品.....	6
2-2-3 測定機器.....	6
2-2-4 準備するもの.....	6
2-2-5 培地作製方法.....	7
2-2-6 細胞賦活試薬の調製方法（#2H4 用）.....	8
2-2-7 細胞賦活試薬の調製方法（149-14 用）.....	8
3. 実験方法.....	10
3-1 細胞培養方法.....	10
3-1-1 細胞蘇生.....	10
3-1-2 選択抗生剤での培養開始.....	10
3-1-3 通常の継代培養.....	10
4. 細胞液の調製方法.....	11
5. 被験物質の調整方法.....	13
5-1 水溶性被験物質の調製.....	13
5-1-1 試薬の配置（水溶性被験物質）.....	13
5-1-2 段階希釈（水溶性被験物質）.....	13
5-1-3 2段階希釈（水溶性被験物質）.....	13
5-1-4 細胞への添加（水溶性被験物質）.....	14
5-2 DMSO 溶性被験物質の調製.....	17

5-2-1	試薬の配置 (DMSO 溶性被験物質)	17
5-2-2	段階希釈 (DMSO 溶性被験物質)	17
5-2-3	B 培地での希釈 (DMSO 溶性被験物質)	17
5-2-4	2 段階希釈 (DMSO 溶性被験物質)	18
5-2-5	細胞への添加 (DMSO 溶性被験物質)	18
6	細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の調整、#2H4 細胞への添加	21
6-1	準備	21
6-2	100 μ M PMA の調整方法	21
6-3	Control 液及び x10 PMA/ionomycin 溶液の調整	21
6-4	細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の細胞への添加	21
7	細胞賦活試薬 (LPS) の調整、149-14 細胞への添加	23
7-1	準備	23
7-2	5 μ g/ml PMA の調整方法	23
7-3	細胞賦活試薬 (LPS) の 149-14 細胞への添加	23
8	シグナルアッセイ (6 時間後)	25
9	データ解析	25
10.	変更履歴	27
11.	付記 : THP-G8 細胞を使う際の変更点	28

1. はじめに

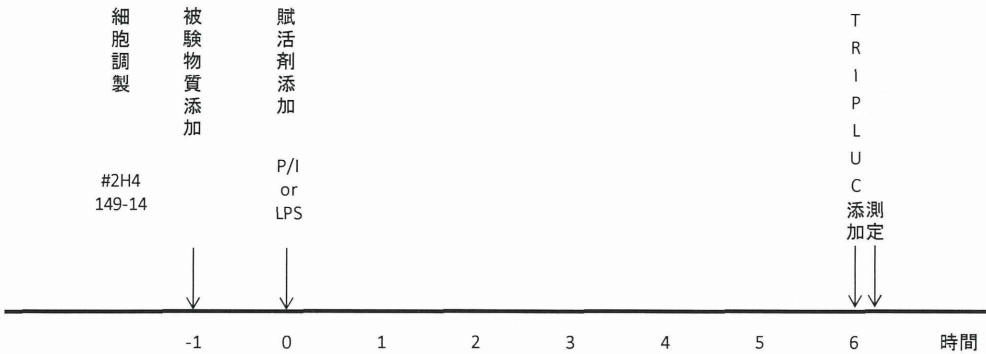
本 Protocol は IL2-SLG、IFN γ -SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (#2H4) および IL-1 β -SLG、IL8-SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (149-14)を利用した化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法について記載した。

図1 アッセイの概要

アッセイデザイン(1プレートあたり2被験物質を施行)

cont	0.001x Cmax	0.003x Cmax	0.01xCmax	0.03xCmax	0.1xCmax	0.3xCmax	1xCmax	3xCmax	10xCmax	30xCmax	100xCmax
被験物質A(1/3希釈、11段階、n=4)											
P/I or LPS only	0.001x Cmax	0.003x Cmax	0.01xCmax	0.03xCmax	0.1xCmax	0.3xCmax	1xCmax	3xCmax	10xCmax	30xCmax	100xCmax
被験物質B(1/3希釈、11段階、n=4)											

P/I or LPS



2. 材料及び試薬調整方法

2-1 使用する細胞

- Jurkat 3 色発光細胞株 #2H4 (IL2-SLG、IFN γ -SLO、G3PDH-SLR)
American Type Culture Collection より供与されたヒト T リンパ細胞株である Jurkat に、IL-2 プロモーター、IFN γ プロモーター、G3PDH プロモーターの下流にそれぞれ SLG ルシフェラーゼ遺伝子、SLO ルシフェラーゼ遺伝子、SLR ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ 2 つのベクターを導入した安定細胞株を東洋紡績株式会社、敦賀バイオ研究所にて樹立した。
(Saito R. et al. Nickel differentially regulates NFAT and NF- κ B activation in T cell signaling *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254, 245-255, 2011)
- THP-1 由来 3 色発光細胞株 149-14 (IL-1 β -SLG、IL8-SLO、G3PDH-SLR)
American Type Culture Collection より供与されたヒトマクロファージ様細胞株である THP-1 に、IL-1 β プロモーター、IL-8 プロモーター、G3PDH プロモーターの下流にそれぞれ SLG ルシフェラーゼ遺伝子、SLO ルシフェラーゼ遺伝子、SLR ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ 2 つのベクターを導入した安定細胞株を東北大学医学部皮膚科学教室にて樹立した。

2-2 使用する試薬及び調整方法

2-2-1 使用試薬

▼培地関連試薬

- RPMI-1640 (GIBCO Cat#11875-093, 500ml)
- FBS (Biological Industries Cat#04-001-1E Lot:715004)
- 抗菌剤 Antibiotic-Antimycotic (GIBCO Cat#15240-062)
- 選択抗生物質 G418 (ナカライテスク Cat#16513-84)
HygromycinB (Invitrogen Cat#10687-010)
Puromycin (InvivoGen Cat#ant-pr-1)

▼刺激物質関連試薬

- Ionomycin (Sigma Cat#I0634)
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Cat#P8139)
- Ethanol (Wako Cat#057-00456)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Cat#D5879)
- Distilled water (GIBCO Cat#10977-015)
- Lipopolysaccharides from E. coli 026:B6 (LPS) (Sigma Cat#L8274)

▼ルシフェラーゼアッセイ関連試薬

- ・ Tripluc[®] Luciferase assay reagent (TOYOBO Cat#MRA-301)

2-2-2 消耗品

- ・ T-75 Flask Tissue Culture Treated (例：BD Falcon Cat#35-3136)
- ・ 96 well µclear black plate (例：Greiner bio-one Cat#655090)
Luciferase assay 測定用プレート
- ・ 96 well clear plate
U 底、試験化学物質および PMA/ionomycin、LPS 分注用
- ・ 96 well Assay Block, 2ml (例：Costar Cat#3960)
- ・ リザーバー
- ・ 滅菌ピペット

2-2-3 測定機器

- ・ 測定装置：2枚の光学フィルタが搭載できるマルチプレート対応型ルミノメータ（ATTO 社製 Phelios AB-2350、PerkinElmer 社製 ARVO、Berthold 社製 Tristar LB941 など）。
- ・ 光学フィルタ：560 nm ロングパスフィルタ、600 nm ロングパスフィルタまたは 600~700 nm バンドパスフィルタなど。（以下それぞれ Filter 1, Filter 2 と表記）
- ・ 測定時間：1~5 秒/ウェルの任意の測定時間を設定

2-2-4 準備するもの

- ・ ピペットマン
- ・ 8 チャンネル or 12 チャンネルピペットマン (20~100 µl, 0.5~10 µl 対応)
- ・ シェーカー (96 well plate を攪拌できるもの)
- ・ 恒温槽 (37 °C)
- ・ セルカウントするもの...血球計算盤、トリパンプルー、数取器 (計数器)、セルカウンターなど

2-2-5 培地作製方法

以下の培地を下記の通り混合して作製する。

1) A 培地(#2H4, 149-14 用: 通常の細胞維持に使用する培地 (500 ml 作製, 冷蔵保管)

0.15 µg/ml Puromycin+200 µg/ml Hygromycin+300 µg/ml G418

+10% FBS+1×Antibiotic-Antimycotic

試薬名	メーカー	濃度	培地中の 終濃度	必要量
RPMI-1640	GIBCO #11875-093	-	-	440 ml
FBS (非働化済)	Biological Industries Cat#04-001-1E Lot:715004	-	10%	50 ml
Antibiotic-Antimycotic	GIBCO #15240-062	100×	1×	5 ml
Puromycin	InvivoGen # ant-pr-1	10 mg/ml	0.15 µg/ml	7.5 µl
Hygromycin	Invitrogen #10687-010	50 mg/ml	200 µg/ml	2 ml
G418	ナカライテスク #16513-84	50mg/ml	300 µg/ml	3 ml

<注意点> Puromycin の添加量を厳守する。

2) B 培地: ルシフェラーゼアッセイ時に使用する培地 (30 ml 作製, 冷蔵保管)

試薬名	メーカー	濃度	培地中の 終濃度	必要量
RPMI-1640	GIBCO #11875-093	-	-	27 ml
FBS (非働化済)	Biological Industries Cat#04-001-1E Lot:715004	-	10%	3 ml

3) C 培地: 細胞蘇生時に使用する培地 (30 ml 作製, 冷蔵保管)

試薬名	メーカー	濃度	培地中の 終濃度	必要量
RPMI-1640	GIBCO #11875-093	-	-	26.7 ml
FBS (非働化済)	Biological Industries Cat#04-001-1E Lot:715004	-	10%	3 ml
Antibiotic-Antimycotic	GIBCO #15240-062	100×	1×	0.3 ml

2-2-6 細胞賦活試薬の調製方法 (#2H4 用)

* PMA: 細胞賦活化に使用

試薬名	メーカー	ストック濃度	使用時希釈濃度	終濃度
PMA	Sigma #P8139	1 mM	10 μ M	1 μ M
DMSO	Sigma #D5789			

<作製方法>

PMA 1 mg を溶媒 DMSO 1338.5 μ l に溶解し、0.2 μ m のシリンジフィルタ (Millipore; Millex syringe-driven filter unit cat#SLLG013SL) でフィルタ滅菌する。

<保存方法>

- 10~30 μ l/tube 程度に分注し、冷凍保存。
- 小分注したものは1回融解で使い捨てすること。

* Ionomycin: 細胞賦活化に使用

試薬名	メーカー	ストック濃度	使用時希釈濃度	終濃度
Ionomycin	Sigma # I0634	1 mM	250 nM	25 nM
Ethanol	Wako #057-00456			

<作製方法>

Ionomycin 1 mg を溶媒 Ethanol 1621 μ l に溶解し、0.2 μ m のシリンジフィルタ (Millipore; Millex syringe-driven filter unit cat#SLLG013SL) でフィルタ滅菌する。

<保存方法>

- 10~30 μ l/tube 程度に分注し、冷凍保存。
- 小分注したものは1回融解で使い捨てすること。

2-2-7 細胞賦活試薬の調製方法 (149-14 用)

* Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 026:B6 (LPS)

試薬名	メーカー	ストック濃度	使用時希釈濃度	最終濃度
LPS	Sigma Cat#L8274	1 mg/ml	5 μ g/ml	100 ng/ml
Distilled water	GIBCO Cat#10977-015			

<作製方法>

LPS 5 mg を Distilled water に溶解し 5 ml とする。0.2 μ m のシリンジフィルタでフィルタ滅菌する。

<保存方法>

- 5~30 μ l/tube 程度に分注し、冷凍保存。
- 小分注したものは1回融解で使い捨てすること。

<使用方法>