

「知りたい」から始まった 接触皮膚炎研究

相場 節也

松田会松田病院皮膚科長／東北大学名誉教授

皮膚科入局のきっかけ

一生の選択を決めたそもそものきっかけは、故清寺眞教授の臨床講義であった。いま思うと私が学生時代の教授はどなたも威厳があり、俗ないい方をすれば偉そうな先生たちだった。しかしその中でも清寺教授には独特の風格が備わっていた。いまでいうphysician scientistを文字通り実践してこられた先生であった。入院患者を供覧しながらの臨床講義とすでにそのころ世界的権威であったメラニン産生メカニズムの基礎研究の話には心を動かされ、この先生のようにになりたいと思い皮膚科学を専攻することになった。

比較的早くから基礎研究をさせていただいた。私が最初にいただいたテーマは表皮細胞の培養で、3T3細胞を用いた培養方法の確立であった。その当時は、あまり性能のよくないクリーンベンチが1台あっただけの研究室であったが、コンタミと格闘しながらなんとか表皮細胞を培養できるようになった。

モノクローナル抗体の作成

表皮細胞は培養できるようになったが、それ以上研究を発展できなかったため、病床の清寺教授にお会いして東北大学薬学部橋本嘉幸教授の研究室への内地留学のお願いをした。清寺教授はその場で橋本教授に電話をかけてくださって留学が決定した。橋本研では、益子高助手に弟子入りし、表皮細胞に対するモノクローナル抗体作成に着手した。幸い表皮細胞を培養していたころに、余った分層植皮片から表皮細胞浮遊液を作成する技術を確認していたので、それらを免疫原としてすぐにヒト表皮細胞に対するモノクローナル抗体を産生するmyelomaクローンを多数樹立

できた。樹立したmyelomaが作る培養上清を皮膚の凍結切片にかけて蛍光抗体を行い、それを蛍光顕微鏡で眺めたときの感動はいまでも鮮明に記憶している。作成したモノクローナル抗体は皮膚のさまざまな構成成分をものに見事に染め分けていた。それは1983年に『Journal of Investigative Dermatology』に掲載された¹⁾。この仕事は、研究皮膚科の分野ではモノクローナル抗体を用いた研究の先駆けとなる仕事で、論文執筆時引用する論文がまだなかった。

ランゲルハンス細胞(LC)との出会い

モノクローナル抗体の仕事が一段落ついたころ、皮膚科教室の小幡正明助手からLCのIa抗原による蛍光抗体染色の方法を教えていただいた。蛍光色素で染まった表皮シートの中に均等に分布するLCを観察したときには、やはりその美しさに感動した。そこで、マウス接触皮膚炎モデルでLCの変化を観察したところ、接触皮膚炎惹起12時間後からIa抗体で蛍光染色されたLCがIa抗原量を増大させ巨大化してみえることを見出した。ただそのときは、IFN- γ の作用で表皮細胞がIa抗原を発現することが明らかとなった時期で、それからの類推で私がみつけた現象もIFN- γ の作用かと考えていた。そこで、実は感作の成立していないマウス皮膚にハプテンを塗布しても同様の現象を認めていたが、とくにそれには触れずに論文にした²⁾。

National Cancer Instituteに留学して

1989年に米国National Cancer Institute, Dermatology BranchのStephen I. Katz先生の研究室に留学する機会を得た(図1)。留学して最初にいわれたテーマは、



図1 出会いから23年後のS. I. Katz先生。仙台開催の第116回日本皮膚科学会総会の記念講演終了後

LCを用いてマウス白血病細胞特異的T細胞クローンを作成することであったが成功しなかった。

そこでこっそり隠れて行っていた日本からの持ち込み研究であるハプテンによる樹状細胞活性化の仕事をKatz先生に話し、研究を正式に行いたい旨を伝えた。すでに隠れ実験で、日本で温めていた未感作マウスにハプテンを塗布してもLCが活性化するという現象をflow cytometryで確認していたが、当然Katz先生にはすぐには信じてもらえなかった。ただKatz先生はまったく無視するのではなく、彼の友人で化粧品会社の安全性部門を担当していたGerberick博士に依頼してくださったおかげで、動物実験で確認済みのハプテンと非感作性物質をそれぞれ10個程度送っていただいた。それらをブラインドでマウス耳介皮膚に塗布してLCの活性化作用の有無を検討したところ、100%の精度で感作性物質のみがLCを活性化した。その結果をKatz先生にみていただき、私の研究結果を初めて信じてもらえ正式に研究室で研究が行えるようになった。その成果³⁾は、その後の私の研究の方向性を決定した。

この発見にはいくつか重要な知見が含まれていたが、同時にいくつかの未解明の課題も明らかになった。1)分子量がたかだか500以下のハプテンという化学物質がLCを活性化する。2)LCがどのような機

序で感作性物質(ハプテン)と非感作性物質を識別できるのか? 3)ハプテンによるLCの活性化が、LC単独でおきる現象か、表皮細胞などの他細胞の協力が必要なのか? 4)この現象を上手く利用してハプテンを簡単に同定する手法が開発できないか? これらの残された課題は日本に帰ってから引き継ぐことになった。

日本に帰国してから

1) 皮膚のstromal cellの解析

米国からの帰国後は、教室の中川聡助教と胸腺に存在するthymic nurse cellと類似した機能を有するstromal cellの同定と機能解析を行った。マウス皮膚からLCを研究する目的で表皮細胞浮遊液を作成し、それを数日培養するとLCは成熟しクラスターを形成し浮遊細胞となるが、シャーレの底をみると角化細胞と線維芽細胞様の細胞が付着していた。その付着細胞を培養し続けると数カ月にわたり培養できる表皮細胞とは異なるやや大型の多角形の細胞が樹立できた。これがthymic nurse cellに極めて類似した性格を有していたためstromal cellと名づけた。まずstromal cellとリンパ球とを混合培養するとリンパ球がstromal cellの下に潜り込むpseudo-emperipoiesisという現象が観察できた。またこれらの細胞はIL-7を産生した⁴⁾。さ

らにこのstromal cellは皮膚に存在する $\gamma\delta$ T細胞をIL-2の存在下に増殖させることができた⁵⁾。またこの手法によりこれまで十分な細胞数を得るのが困難であった $\gamma\delta$ T細胞を大量に培養できるようになり、皮膚にはE-cadherinを発現した $V\gamma 5+\gamma\delta$ T細胞とE-cadherinを発現しない $V\gamma 5-\gamma\delta$ T細胞の2群が存在することも明らかになった⁶⁾。

2) CD34抗原

研究室で線維芽細胞の一種ともいえるstromal cellの研究を行っているとき、Brian Nickoloffらにより真皮の線維芽細胞にCD34陽性と陰性の亜集団が存在し、真皮内でその分布が異なっていることが報告された。そこで皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫を抗CD34抗体で染色してみることにした。この両疾患の組織学的鑑別はいまでも抗CD34抗体の染色結果がわからないと自信がもてないが、当時は世界中の皮膚科医が診断に困っていた。そこで隆起性皮膚線維肉腫、皮膚線維腫、MFH、線維肉腫、肥厚性癬痕、ケロイドなどを集めて染色したところ、見事に隆起性皮膚線維肉腫のみが陽性となった。これを1992年に『Br J Dermatol』に報告し⁷⁾、世界で初めての論文報告となった。

隆起性皮膚線維肉腫の陰性コントロールとしてさまざまな線維芽細胞増殖疾患のCD34発現を検討している中で、肥厚性癬痕、強皮症で逆にCD34陽性細胞が消失することを見出した⁸⁾。さらに膠原線維合成に関連する酵素との染色の対比で、CD34の発現と膠原線維の合成が逆相関することを見出した⁹⁾。

3) ヒト単球由来樹状細胞を用いた感作メカニズムの解析

ハプテン塗布によりLCが活性化するという現象は、帰国後しばらく進展がなかったが、ヒト末梢血単球から樹状細胞を培養する方法が報告され、次のステップに進めることができた。まず単球由来樹状細胞を培養し、種々のハプテンや非感作性物質を加えたところ、*in vivo*同様に樹状細胞は単独でハプテン特異的に活性化しCD54, CD80, CD86, HLA-DR分子の発現を増強し、IL-1 β , IL-6, TNF- α の産生を増加した^{10,11)}。この結果から、ハプテンが直接作用して樹状細胞を活性化することが明らかとなり、同時にこの

方法を用いてハプテンの試験管内評価法開発の道が開けた。その後、馬目英明先生、照沼篤先生、水芦政人先生の研究によりハプテンによる樹状細胞の活性化が、ハプテンによるチオール基修飾、細胞内レドックスの変化と、それに引き続くp38 MAPKの活性化というpathwayによりひきおこされることも明らかにした^{12,13)}。さらに水芦先生と加賀谷早織先生が、ハプテン処理後に樹状細胞表面のチオール基の減少も明らかにした¹⁴⁾。また大浪薫先生は、ハプテンによる感作過程において表皮細胞からATPが放出されること、またそのメカニズムを明らかにした¹⁵⁾。

4) 資生堂との共同研究

われわれが試験管内皮膚感作性試験法の基礎を確立したころ、資生堂では将来を予測して動物実験を用いない皮膚感作性試験法の開発に興味をもっていた。そこで資生堂の足利太可雄研究員、板垣宏博士らと共同で、ハプテン刺激により培養樹状細胞同様にヒト単球由来培養細胞株THP-1細胞にCD54, CD86分子の発現増強がおこることを報告し、THP-1細胞を用いた皮膚感作性試験法であるhuman Cell Line Activation Test (h-CLAT)を開発した¹⁶⁾。

5) Multi-ImmunoTox assayの開発

教授就任後まもなく、NEDO新規プロジェクト「高機能簡易型有害性評価手法の開発」(チームリーダー：一般財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 田中憲穂博士)に加えていただいた。具体的な研究テーマは免疫毒性予測試験法の開発で、環境中に溢れている化学物質がわれわれの免疫系に及ぼす毒性(免疫毒性)を動物を用いず、なるべく簡易に評価するシステムを開発することであった。

4年間の研究期間中に化学物質の免疫毒性多項目評価システム(Multi-ImmunoTox assay : MITA)を構築し国内外の特許を取得した。このシステムは、INF- γ , IL-2, G3PDHプロモーター活性を定量できるJurkat細胞由来3色発光細胞(2H4), IL-8, G3PDHプロモーター活性を定量できるTHP-1細胞由来2色発光細胞(THP-G8), IL-1 β , G3PDHプロモーター活性を定量できるTHP-1細胞由来2色発光細胞(THP-G1b)から構成される。まずそれらを組み合わせることで、環境汚染物質を含む化学物質の自然免疫、獲得免疫に対

する影響を総合的に評価できることを報告した^{17~20)}。またTHP-G8細胞を用いる感作性試験法 IL-8 Luc assayは、2017年に経済開発協力機構 (OECD) が定める国際的試験法に承認された (OECD TG442E) (図2)^{21~24)}。MITAに関する研究は、木村裕助教が中心となり、齋藤るみ子研究員、沼田郁子先生、高橋愛先生、高橋隼也助教、藤村千尋研究員の多大なる協力のもとに行われた。

6) 海綿状態のメカニズムとその意義

上記以外にも多くの医局員、大学院生と皮膚免疫の研究を行った(図3)。またその過程で、海外の研究者との交流も深めた(図4)。その中で、われわれは、カネボウ化粧品の研究者と共同研究を進め、ヒアルロン酸に注目して海綿状態形成のメカニズムを解析した。その結果、IFN- γ 、IL-4、IL-13の作用により表皮細胞が発現するヒアルロン酸合成酵素3 (HAS3)



図2 パリのOECD本部におけるIL-8 Luc assayのtest guideline承認に向けての会議の休憩時間に記念撮影

による表皮細胞間のヒアルロン酸蓄積と表皮細胞のE-cadherin発現減弱により海綿状態が生じることを報告した²⁵⁾。



図3 国際研究皮膚科学会(IID 2018)における医局員, 大学院生, 医学部学生との記念撮影



図4 韓国研究皮膚科学会におけるヨンセイ大学と東北大学皮膚科との交流

7) 東日本大震災

教授就任後7年目にあたる2011年(平成23年)3月11日に地震が発生した。周知のごとく沿岸部での津波による人的、物的被害は甚大なものであった。数分で地震の揺れはおさまリ、私たちの研究室のある建物

は倒壊を免れたが、研究室機材は散乱し、水漏れがすぐにおこるような有様で、建物の中にいた全員がただちに屋外退去した。幸いにも医局員、スタッフ、患者さんは誰一人怪我をしなかったが、後に各部屋を検証すると複数の医局員の机・椅子の上に本箱が倒れか



図5 震災数日後、皮膚科外来の片づけが一段落したときの記念撮影



図6 日本皮膚科学会被災地診療支援のメンバー

かっており、もしその場に人がいたら軽症ではすまなかったと思われた(図5)。その後、皮膚科スタッフは、まず被災地での皮膚科医療の需要調査のため直接被災地に視察に赴き、市・町全域の医療・行政システムが崩壊した広域災害の実態を目の当たりにし、地元の医療システムが復興するまでの出張診療支援が必須であると感じた。当初、東北大学の皮膚科医だけで開始した被災地皮膚科巡回診療であったが、やがて日本皮膚科学会の支援を得て全国から参集した皮膚科医総勢40名とともに8週間にわたって被災地での皮膚科診療にあたった(図6)。

おわりに

東北大学医学部皮膚科に入局してから、41年近く皮膚科医、研究者、教育者として歩んできた。この年月は、私に多くの貴重な出会いと経験を与えてくれ、私の人生を有意義なものにしてくれた。私を支えてくれた皆様、ともに働いてくれた皆様、また東北大学に心から感謝したい。

〈文献〉

- 1) Aiba S, et al : J Invest Dermatol 81 : 498, 1983
- 2) Aiba S, Tagami S : Br J Dermatol 111 : 285, 1984
- 3) Aiba S, Katz SI : J Immunol 145 : 2791, 1990
- 4) Aiba S, et al : J Invest Dermatol 103 : 162, 1994
- 5) Aiba S, et al : Eur J Immunol 23 : 1705, 1993
- 6) Aiba S, et al : J Invest Dermatol 105 : 379, 1995
- 7) Aiba S, et al : Br J Dermatol 127 : 79, 1992
- 8) Tanaka M, et al : Arch Dermatol 130 : 1393, 1994
- 9) Aiba S, et al : J Cutan Pathol 24 : 65, 1997
- 10) Aiba S, et al : Eur J Immunol 27 : 3031, 1997
- 11) Aiba S, et al : Immunology 98 : 481, 1999
- 12) Aiba S, et al : J Invest Dermatol 120 : 390, 2003
- 13) Mizuashi M, et al : J Invest Dermatol 124 : 579, 2005
- 14) Kagatani S, et al : J Invest Dermatol 130 : 175, 2010
- 15) Onami K, et al : J Invest Dermatol 134 : 1951, 2014
- 16) Ashikaga T, et al : Toxicol in Vitro 16 : 711, 2002
- 17) Tsujita-Inoue K, et al : Toxicol in Vitro 28 : 626, 2014
- 18) Watanabe M, et al : J Asthma 51 : 595, 2014
- 19) Watanabe M, et al : J Med Invest 62 : 145, 2015
- 20) Kimura Y, et al : Arch Toxicol 92 : 2043, 2018
- 21) Takahashi T, et al : Toxicol Sci 124 : 359, 2011
- 22) Kimura Y, et al : Toxicol in Vitro 29 : 1816, 2015
- 23) Kimura Y, et al : J Toxicol Sci 43 : 741, 2018
- 24) Kimura Y, et al : Arch Toxicol 95 : 749, 2020
- 25) Ohtani T, et al : J Invest Dermatol 129 : 1412, 2009