

平成30年 5月30日現在

機関番号：25406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08788

研究課題名(和文) 制御性T細胞に対する短期および長期アスベスト曝露の影響

研究課題名(英文) Effect of short-term and long-term exposure of asbestos on regulatory T cells

研究代表者

松崎 秀紀 (Matsuzaki, Hidenori)

県立広島大学・生命環境学部・助教

研究者番号：80335463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アスベストは肺がんや悪性中皮腫を引き起こすことが知られている。我々はアスベスト曝露が腫瘍免疫応答を低下させることを提唱しており、本研究では腫瘍免疫応答を抑制する制御性T細胞モデルMT-2に対するアスベスト曝露の影響を検討した。その結果、アスベスト短期高濃度曝露がミトコンドリアの機能を阻害するとともに、活性酸素を介してDNA損傷を引き起こし、MT-2細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、長期曝露が上流転写因子やDNAメチル化とは独立のメカニズムを介して転写因子FoxP3の発現を低下させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Asbestos is known to cause lung cancer and malignant mesothelioma. We are proposing that asbestos inhibit tumor immune responses. In this study, we studied effect of exposure of asbestos on MT-2 as a regulatory T cell model. It was revealed that short-term exposure with high-dose asbestos induces mitochondrial dysfunction and DNA damage, and that long-term exposure of low-dose asbestos reduces transcription factor FoxP3 expression through the mechanisms independent of upstream transcription factors and DNA methylation.

研究分野：衛生学

キーワード：アスベスト 腫瘍免疫 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

アスベストは建築資材などに利用されてきたが、悪性中皮腫や肺がんを引き起こすことが明らかとなり現在では使用が禁止されている。しかしながら、アスベストを使用した既存の建物の解体や震災後の瓦礫処理などにより今後もアスベスト曝露によるがん患者数は増加すると考えられている。アスベスト曝露によるがん発症のメカニズムとしては、アスベストにより発生する活性酸素種が DNA 損傷を引き起こすことが知られているが、我々はこれに加えてアスベスト曝露が腫瘍免疫を低下させることによりがんの成長する体内環境を形成することを提唱している。腫瘍免疫システムには様々な細胞が関与することが知られており、CD8T 細胞や NK/NKT 細胞は体内で発生するがん細胞を攻撃する。一方、制御性 T 細胞は免疫応答の抑制を司り、過剰な免疫応答を抑制することで免疫機構の恒常性を維持する細胞として知られているが、腫瘍免疫においてはがん細胞への攻撃を抑制し、がんの発症を促進すると考えられている。我々は制御性 T 細胞に対するアスベスト曝露の影響を検討するため、制御性 T 細胞に由来する不死化細胞株 MT-2 を用いて、高濃度短期 (1-2 日) および低濃度長期のアスベスト曝露 (8 ヶ月以上) の影響を検討した。その結果、高濃度短期曝露は MT-2 細胞のアポトーシス誘導すること、低濃度長期曝露は IL-10 や TGFβ などの抑制性サイトカインの産生を増加させるとともに、高濃度短期曝露への抵抗性を付与することを明らかにした。そこで、アスベスト低濃度長期曝露による細胞の性質の変化の詳細を明らかにするため、各種の遺伝子発現を検討したところ、アスベスト長期曝露によりフォークヘッド転写因子 FoxO1 と FoxP3 の発現量が低下することを見出した。FoxO1 と FoxP3 は制御性 T 細胞分化の調節やアポトーシスを誘導することが報告されていることから、FoxO1 と FoxP3 の高発現やノックダウンを用いて MT-2 細胞のアポトーシス誘導過程におけるこれらの転写因子の役割を検討したところ、両転写因子がアスベスト高濃度短期曝露によるアポトーシス誘導を担うことを示す結果を得ている。しかしながら、免疫細胞におけるアスベスト高濃度短期曝露によるアポトーシスの誘導経路に関する詳細な情報は少なく、これらの転写因子の発現低下がアスベスト抵抗性をもたらす具体的な作用点は明らかになっておらず、また、アスベスト低濃度長期曝露が遺伝子発現を変化させる仕組みについても不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

これまでの研究から我々はアスベスト長期曝露が FoxP3 や FoxO1 などの転写因子の発現低下を介して制御性 T 細胞の性質を変化させ、アスベスト短期曝露によるアポトーシ

スを回避させることを見出している。これらの結果はアスベスト曝露を受けた生体内で制御性 T 細胞機能が亢進し、腫瘍免疫を低下させる可能性を示しており、アスベスト長期曝露が制御性 T 細胞に与える影響の解明は、アスベスト曝露に起因するがんの発症の予防や診断、新たな治療法の開発への重要な手がかりとなることが期待される。しかしながら、アスベスト短期曝露が細胞のアポトーシスを誘導する仕組みやアスベスト長期曝露が FoxP3 を始めとする各種の遺伝子発現を変化させるメカニズムについてはほとんど明らかにはなっていない。即ち、これまでのアスベスト短期曝露の影響の解析は主に上皮細胞株や中皮細胞株を用いて行われており、アスベストが免疫細胞のアポトーシスを誘導するメカニズムの詳細な研究はほとんど行われていない。また、FoxP3 は制御性 T 細胞のマスターレギュレーターとして免疫学の基礎研究において注目されており、その発現調節機構に関する多くの研究が行われているものの、アスベストを始めとする環境因子による発現調節機構の研究はほぼ皆無である。そこで、本研究ではアスベスト高濃度短期曝露が免疫担当細胞のアポトーシスを誘導する経路を詳細に検討するとともに、アスベスト低濃度長期曝露による FoxP3 の発現低下のメカニズムを解析し、制御性 T 細胞に対するアスベストの短期および長期曝露の影響を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) アスベスト短期曝露によるアポトーシス誘導経路の解析

これまでに中皮細胞株や上皮細胞株を用いてアスベスト曝露によるアポトーシスを誘導経路の研究が行われている。これらの細胞ではアスベスト曝露はミトコンドリア機能を低下させるとともに活性酸素を産生し、DNA 損傷や小胞体ストレスなど様々なアポトーシス誘導経路を活性化することが報告されている。そこで、中皮細胞株や上皮細胞株を用いて得られた情報を参考に MT-2 細胞におけるアポトーシス誘導経路を以下の方法で解析した。

ミトコンドリア活性の検討

ミトコンドリア活性に依存してミトコンドリア内に移行し、赤色の蛍光を発する蛍光指示薬 JC1 を用いて MT-2 細胞を染色し、フローサイトメトリーを用いてミトコンドリア活性の低下した細胞の割合を解析した。

DNA 損傷機構の解析

DNA 損傷はその損傷の種類により特異的なシグナル伝達を誘導することが知られている。そこで、ヒストン H2AX を始めとする DNA 損傷のシグナル伝達分子に対する抗体を用いてイムノプロット解析を実施し、アスベスト曝露による DNA 損傷の有無とそのシグナル伝達経路を検討した。

小胞体ストレスの解析

小胞体ストレスは正常なフォールディングを受けなかった異常な構造をもつタンパク質が小胞体内に蓄積されることにより誘導される。そこで、小胞体分子シャペロン Bip を始めとする各種の小胞体ストレスのシグナル伝達分子に対する抗体を用いたイムノプロット解析を行い、アスベスト曝露による小胞体ストレス誘導の有無を検討した。

(2) FoxP3 発現調節機構の解析

FoxP3 の発現調節機構に関する様々な成果が報告されており、FoxP3 の発現制御には各種の転写因子の作用と FoxP3 プロモーター・エンハンサー領域の DNA メチル化修飾が重要であることが知られている。そこで、以下の方法によりアスベスト長期曝露による FoxP3 発現低下の分子機構を解析した。

レポーターアッセイによる上流転写因子の解析

MT-2 細胞よりゲノム DNA より FoxP3 の転写調節を担うプロモーター領域とエンハンサー領域を PCR 法により増幅し、ルシフェラーゼ cDNA の上流に挿入した FoxP3 レポータープラスミドを作成した。本プラスミドを MT-2 親細胞とアスベスト長期曝露細胞に導入し、アスベスト長期曝露による FoxP3 発現低下をもたらす転写調節領域を検討した。

DNA メチル化の解析

MT-2 親細胞とアスベスト長期曝露細胞から精製したゲノム DNA をバイサルフェート処理したのち、PCR によりメチル化修飾を受ける可能性のある領域を増幅し、プラスミドベクターにクローニングした。得られた複数のクローンの DNA 配列を解析し、両領域の DNA メチル化レベルを比較した。

4. 研究成果

ミトコンドリア活性への影響

ミトコンドリア活性指示薬 JC-1 を用いて、アスベストの一種であるクリソタイル曝露が MT-2 細胞のミトコンドリア機能に与える影響を解析した。その結果、クリソタイルの濃度依存的にミトコンドリア活性の低下した細胞数が増加し、アスベスト曝露が免疫細胞においてもミトコンドリア機能を低下させることが明らかになった。さらに、他のアスベスト種の作用も検討したところ、クリソタイルと同様にクロシドライトも MT-2 細胞のミトコンドリア活性を低下させることが示された。

DNA 損傷の検討

DNA 損傷には二本鎖 DNA 切断を始めとする様々な損傷の形式が知られており、様々な損傷形式に共通する反応としてはヒストン H2AX や p53 がリン酸化を受けることが知られている。そこで、MT-2 細胞にクリソタイルを加えた後、イムノプロットにより H2AX のリン酸化修飾を検討した。その結果、クリソタイルの濃度依存的に H2AX のリン酸化が亢進した。さらに、他のアスベスト種

についても検討したところ、クロシドライトによっても H2AX のリン酸化は誘導されたことから、アスベスト曝露が MT-2 細胞の DNA 損傷を誘導することが明らかになった。そこで、アスベスト曝露による DNA 損傷の形式を検討するため、二本鎖 DNA 切断によりリン酸化を受けるタンパク質リン酸化酵素 Chk2 と一本鎖切断により誘導される Chk1 のリン酸化特異抗体を用いたイムノプロットを行った。その結果、アスベスト曝露により Chk2 のリン酸化が誘導されることが見出された。なお、Chk1 のリン酸化は検出されなかった。アスベスト曝露は MT-2 細胞に二本鎖 DNA 切断を引き起こすことが明らかになった。

小胞体ストレス応答の検討

MT-2 細胞にアスベスト曝露を加え、小胞体ストレスにより発現が誘導されることが知られている Bip と PDI の発現をイムノプロットにより検討した。その結果、アスベスト曝露はこれらのタンパク質の発現を誘導せず、アスベスト曝露は上皮細胞株とは異なり MT-2 細胞では小胞体ストレスを誘導しないことが示された。

FoxP3 レポーターを用いた上流転写因子の解析

FoxP3 の発現には NFAT や FoxO1 などの各種の転写因子が FoxP3 のプロモーター領域やエンハンサー領域に作用することが重要であることが報告されている。そこで、上記の DNA 領域をルシフェラーゼレポータープラスミドに導入した FoxP3 レポータープラスミドを作成し、MT-2 親細胞とアスベスト長期曝露細胞にトランスフェクションした。発現したルシフェラーゼ活性を測定したところ両細胞間に顕著な違いは観察されなかったことから、アスベスト長期曝露による FoxP3 の発現低下にはこれらの領域に結合する転写因子の作用は関与しないことが示唆された。

DNA メチル化解析

FoxP3 の発現調節に関与することが報告されているプロモーター領域とエンハンサー領域の DNA メチル化レベルをバイサルフェート・シークエンス法により比較した。その結果、MT-2 親細胞とアスベスト長期曝露細胞の両方でプロモーター領域はほとんど DNA メチル化を受けていないのに対し、エンハンサー領域は高度にメチル化を受けていることが明らかになった。しかしながら、親細胞とアスベスト長期曝露細胞間でこれらの領域のメチル化レベルに顕著な違いは観察されず、アスベスト長期曝露による発現低下にこれらの領域の DNA メチル化は関与しないことが示された。

以上の結果から、アスベスト曝露は MT-2 細胞では主にミトコンドリアの傷害と DNA 損傷を誘導し、小胞体ストレスは誘導しないことが示された。これらの結果に加えて、これまでに我々はアスベスト曝露が MT-2 細胞

内のミトコンドリアからの Cytochrome C の放出と活性酸素の産生を引き起こすことを報告しており、今回得られた結果とあわせて、MT-2 細胞ではアスベスト短期曝露は主にミトコンドリアの機能低下と活性酸素による DNA 損傷を介して細胞のアポトーシスを誘導することが示唆された。従ってアスベスト長期曝露細胞における FoxP3 や FoxO1 の発現低下は、ミトコンドリア機能低下や DNA 損傷のシグナル伝達経路に作用し、高濃度アスベストへの抵抗性をもたらすことが考えられる。一方、アスベスト長期曝露影響のひとつである FoxP3 の発現低下のメカニズムの解析から、アスベスト長期曝露は FoxP3 プロモーター・エンハンサー領域へ作用する転写因子群や DNA メチル化には影響を与えず、これらの発現調節機構とは独立の機構を介して FoxP3 の発現を低下させることが示された。FoxP3 の発現調節には上流転写因子の作用や DNA メチル化に加えて、遺伝子領域のヒストンのアセチル化やメチル化修飾が関与することが報告されていることから、アスベスト長期曝露による FoxP3 の発現低下にはヒストンの修飾反応が関与する可能性が示された。今後、本研究の成果に基づき、ミトコンドリア機能低下や DNA 損傷を起点とするアポトーシス誘導機構の詳細と FoxP3 や FoxO1 の役割の検討、FoxP3 を始めとするアスベスト低濃度長期曝露の影響を受ける遺伝子の発現調節機構の解析を実施することにより、腫瘍免疫に対するアスベスト曝露の影響が明らかになり、アスベスト曝露ががんを引き起こすメカニズムの解明や新たながん予防や診断法、治療法の開発につながる重要な情報が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

Matsuzaki, H., Kumagai-Takei, N., Lee, S., Maeda, M., Sada, N., Hatayama, T., Yamamoto, S., Ikeda, M., Yoshitome, K., Min, Y., Nishimura, Y., Otsuki, T., Search for biomarkers of asbestos exposure and asbestos-induced cancers in investigations of the immunological effects of asbestos, *Environ. Health Prev. Med.* 9, 2017, ID: 53, doi:10.1186/s12199-017-0661-4, 査読あり

Lee, S., Hayashi, H., Kumagai-Takei, N., Matsuzaki, H., Yoshitome, K., Nishimura, Y., Urugami, K., Kusaka, M., Yamamoto, S., Ikeda, M., Hatayama, T., Fujimoto, W., Otsuki, T., Clinical evaluation of CENP-B and Scf-70 autoantibodies in silicosis patients, *Exp. Ther. Med.* 13, 2017, 2616-2622, doi:10.3892/etm.2017.4331, 査読あり

Maeda, M., Chen, Y., Lee, S., Kumagai-Takei, N., Yoshitome, K., Matsuzaki, H., Yamamoto, S., Hatayama, T., Ikeda, M., Nishimura, Y., Otsuki, T., Induction of IL-17 production from human peripheral blood CD4+ cells by asbestos exposure, *Int. J. Oncol.* 50, 2017, 2024-2032, doi:10.3892/ijo.2017.3991, 査読あり

Maki, Y., Nishimura, Y., Toyooka, S., Soh, J., Tsukuda, K., Shien, K., Furukawa, M., Muraoka, T., Ueno, T., Tanaka, N., Yamamoto, H., Asano, H., Maeda, M., Kumagai-Takei, N., Lee, S., Matsuzaki, H., Otsuki, T., Miyoshi, S., The proliferative effects of asbestos-exposed peripheral blood mononuclear cells on mesothelial cells, *Oncol. Lett.* 11, 2016, 3308-3316, doi:10.3892/ol.2016.4412, 査読あり

Otsuki, T., Matsuzaki, H., Lee, S., Kumagai-Takei, N., Yamamoto, S., Hatayama, T., Yoshitome, K., Nishimura, Y., Environmental factors and human health: fibrous and particulate substance-induced immunological disorders and construction of a health-promoting living environment, *Environ. Health Prev. Med.* 21, 2016, 71-81, doi:10.1007/s12199-015-0499-6, 査読あり

Matsuzaki, H., Lee, S., Maeda, M., Kumagai-Takei, N., Nishimura, Y., Otsuki, T., FoxO1 regulates apoptosis induced by asbestos in the MT-2 human T-cell line, *J. Immunotoxicol.* 13, 2016, 620-627, doi:10.3109/1547691X.2016.1143539, 査読あり

Lee, S., Okamoto, H., Yamamoto, S., Hatayama, T., Matsuzaki, H., Kumagai-Takei, N., Yoshitome, K., Nishimura, Y., Sato, T., Kirita, Y., Fujii, Y., Otsuki, T., Biological Effects of Cloth Containing Specific Ore Powder in Patients with Pollen Allergy, *Biomed. Environ. Sci.* 29, 2016, 563-573, doi:10.3967/bes2016.075, 査読あり

Kumagai-Takei, N., Nishimura, Y., Matsuzaki, H., Lee, S., Yoshitome, K., Hayashi, H., Otsuki, T., The Suppressed Induction of Human Mature Cytotoxic T Lymphocytes Caused by Asbestos Is Not due to Interleukin-2 Insufficiency, *J. Immunol. Res.* 2016, 2016, ID:7484872, doi:10.1155/2016/7484872, 査読あり

Otsuki, T., Matsuzaki, H., Lee, S., Kumagai-Takei, N., Yamamoto, S., Hatayama, T., Yoshitome, K., Nishimura, Y., Environmental factors and human health: fibrous and particulate substance-induced immunological disorders and construction of a health-promoting living environment, *Environ. Health Prev. Med.* 21, 2015,

71-81,
doi:10.1007/s12199-015-0499-6(2016), 査読あり

Nishimura, Y., Kumagai-Takei, N., Matsuzaki, H., Lee, S., Maeda, M., Kishimoto, T., Fukuoka, K., Nakano, T., Otsuki, T., Functional alteration of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes upon asbestos exposure and in malignant mesothelioma patients, Biomed. Res. Int. Special Issue "Cancer Immunol Immunother" BioMed Research International 2015, 2015, Article ID 238431, doi:10.1155/2015/238431, 査読あり

Nishimura, Y., Takahashi, K., Masae, A., Kotani, M., Ami, K., Maeda, M., Shirahama, T., Lee, S., Matsuzaki, H., Kumagai-Takei, N., Yoshitome, K., Otsuki, T., Exposure to negatively-charged particle dominant air-conditions on human lymphocytes in vitro activates immunological responses, Immunobiology, 220, 2015, 1359-1368, doi:10.1016/j.imbio.2015.07.006, 査読あり

Nishimura, Y., Takahashi, K., Mase, A., Kotani, M., Ami, K., Maeda, M., Shirahama, T., Lee, S., Matsuzaki, H., Kumagai-Takei, N., Yoshitome, K., Otsuki, T., Enhancement of NK Cell Cytotoxicity Induced by Long-Term Living in Negatively Charged-Particle Dominant Indoor Air-Conditions, PlosOne 10, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0132373, 査読あり

Ying, C., Maeda, M., Nishimura, Y., Kumagai-Takei, N., Hayashi, H., Matsuzaki, H., Lee, S., Yoshitome, K., Yamamoto, S., Hatayama, T., Otsuki, T., Enhancement of regulatory T cell-like suppressive function in MT-2 by long-term and low-dose exposure to asbestos, Toxicology 338, 2015, 86-94, doi:10.1016/j.tox.2015.10.005, 査読あり

〔学会発表〕(計 4件)

松崎秀紀, 李順姫, 前田恵, 武井直子, 西村泰光, 吉留敬, 大槻剛巳, MT-2細胞に対する短期および長期のアスベスト曝露の影響の研究, 第 87 回日本衛生学会学術総会, 2017 年

Matsuzaki, H., Lee, S., Maeda, M., Kumagai-Takei, N., Yoshitome, K., Nishimura, Y., Otsuki, T., Effect of Short-Term and Long-Term Exposure of Asbestos on Human T Cell Line MT-2, The 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2017 年

松崎秀紀, 李順姫, 前田恵, 武井直子, 西村泰光, 大槻剛巳, 転写因子 FoxP3 と GATA1 に対するアスベスト長期曝露影響の解析, 第 86 回日本衛生学会学術総会,

2016 年

Matsuzaki, H., Lee, S., Maeda, M., Kumagai-Takei, N., Yoshitome, K., Nishimura, Y., Otsuki, T., The Role of Transcription Factor FoxP3 in the Asbestos-Induced Apoptosis in MT-2 Cells., The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2016 年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 秀紀 (MATSUZAKI, Hidenori)
県立広島大学・生命環境学部・助教
研究者番号: 80335463

(2) 研究分担者

大槻 剛巳 (OTSUKI, Takemi)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40160551

李 順姫 (Lee, Suni)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70414026

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()

