

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09114

研究課題名(和文)石綿曝露下におけるCTL免疫応答の抑制機序の解明

研究課題名(英文)Analysis for mechanism involved in the suppressed immune response of CTL under exposure to asbestos

研究代表者

武井 直子 (TAKEI, NAOKO)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00509276

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)：石綿曝露は悪性中皮腫を引き起こす。癌疾患の抑制に働く抗腫瘍免疫において細胞傷害性T細胞(CTL)が癌細胞を攻撃する為には、ナイーブCD8陽性T細胞が増殖を繰り返しながら癌細胞を攻撃できるCTLになる(CTLに分化する)ことが重要である。これまでに石綿曝露がCD8+T細胞の増殖低下を伴いCTL分化を抑制することを報告している。本研究の主な研究成果は、石綿曝露によるCTL分化の抑制はサイトカインIL-15の欠乏によるものではないが、IL-15添加は石綿曝露によるCTL機能低下を改善すること、及び石綿長期曝露実験によって悪性中皮腫患者のCD8+T細胞機能の低下と石綿曝露との関連を見出したことである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、石綿曝露による癌疾患の発症に対する医学的基盤情報としても重要である。我が国では、現在、石綿の職業曝露から環境曝露への拡大が社会問題となっている。悪性中皮腫は予後が悪く、また、診断は容易ではないが、CD8+T細胞は末梢血より容易に採取・試験出来ることから、本研究は悪性中皮腫発症の早期予防にむけての各種CTL機能に基づく検査法の確立及び治療方法の構築にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：IL-15 insufficiency is not the main cause for the suppressed induction of CTLs by asbestos exposure, although they suggest a potential for the improvement of such suppressed CTL functions. The long-term cultures of the human CD8+ T cell line with exposure to asbestos showed decreased intracellular levels of perforin and production of IFN- γ . These characteristics represented functional alterations, similar to that of peripheral blood CD8+ T cells in patients with mesothelioma.

研究分野：衛生学・免疫学

キーワード：石綿 中皮腫 CTL IL-15

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

石綿曝露は悪性中皮腫を引き起こす。癌疾患の抑制に働く抗腫瘍免疫において細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が癌細胞を攻撃する為には、ナイーブ CD8 陽性 T 細胞が増殖を繰り返しながら癌細胞を攻撃できる CTL になる (CTL に分化する) ことが重要である。我々はこれまでに石綿曝露が CD8+T 細胞の増殖低下を伴い CTL 分化を抑制すること及び刺激後の悪性中皮腫患者 CD8+リンパ球の機能低下を報告しているが、石綿曝露による CTL 機能抑制機序については未だ不明な点が多い。また、悪性中皮腫患者で見られる CD8+リンパ球の機能低下が石綿曝露によるものであるかどうかを判断するための研究が必要である。

2. 研究の目的

石綿曝露による CTL の免疫応答抑制機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) IL-15の産生量の測定およびIL-15の添加実験

石綿添加培地中でCTLの分化誘導を行うため、5 µg/mlの白石綿添加/非添加培地中、ヒト末梢血単核球 (PBMC) を放射線照射アロPBMCと7日間混合培養した。培養2, 4, 7日目の培養上清中のIL-15産生量はELISAで測定した。IL-15の添加実験を行うため、同様に石綿添加培地中でCTLの分化誘導を行い、IL-15は培養開始2日目の白石綿添加培地中に終濃度1 ng/mlを添加した。培養後のPBMCは、CD8, CD3, CD25, CD45RA, CD45R0, granzyme Bに対する蛍光標識抗体で染色し、CD8+T細胞の分化指標・機能分子の発現をフローサイトメトリー (FCM) で測定した。

(2)細胞増殖の有無の判別とグランザイム産生能の測定

5 µg/mlの白石綿添加/非添加培地中、予めCFSE標識したヒト末梢血単核球 (PBMC) を放射線照射アロPBMCと7日間混合培養した。培養開始2日目の白石綿添加培地中に終濃度1 ng/ml のIL-15 あるいは終濃度10 µg/mlの抗4-1BB抗体を添加した。培養後回収したPBMCは、CD8とgranzyme Bに対する蛍光標識抗体で染色し、CD8+T細胞のgranzyme B産生と細胞増殖の有無をFCMで測定した。

(3)長期石綿曝露CD8+T細胞の機能解析

EBT-8を30µg/mlの白石綿添加培地中で1カ月間培養維持し、石綿曝露亜株を作製した。また、石綿非添加培地で培養維持した対照亜株を用意した。各亜株の機能解析は、細胞をgranzyme B, perforin, IFN-γに対する各種蛍光標識抗体で染色し、各機能分子についてFCMで測定した。細胞内のIFN-γの染色には、予めPMA/ionomycinで4時間刺激した細胞を用いた。flow cytometry 及びELISAを用いた。また、脱顆粒能及びIFN-γの産生量を測定には抗CD3抗体刺激でそれぞれ2時間あるいは48時間刺激した細胞を用いた。脱顆粒能の測定には、抗CD107抗体とFCMを用いた。IFN-γ産生量の測定には、ELISAを用いた。

4 . 研究成果

(1)石綿曝露下におけるCTL分化誘導時のIL-15の産生量

培養2, 4, 7日目の石綿添加/非添加培地中において、IL-15の産生量は検出限界以下であった。

(2)石綿曝露によるCTL分化抑制におよぼすIL-15添加の影響

IL-15の添加はCD25, CD45RA, CD45RO発現量が示すCTL分化への石綿曝露影響を回復しなかったが、CD8+T細胞の細胞数とgranzyme B+ 細胞比率の増加抑制については、部分的な回復を示した。

(3)CD8+T細胞のGranzyme B産生と細胞増殖能におよぼすIL-15添加の影響

IL-15添加による石綿曝露下granzyme B+細胞比率減少の回復がCD8+T細胞増殖の回復を伴うかどうかを調べた。IL-15添加は石綿曝露による増殖CD8+T細胞 (CFSE^{low} 細胞) 低下を部分的に回復した。また、IL-15添加は、増殖 (CFSE^{low})・未増殖 (CFSE^{high}) CD8+T細胞のいずれにおいてもgranzyme B+細胞比率を回復することがわかった。

(4)長期石綿曝露CD8+T細胞の機能解析

30 µg/mlの長期石綿曝露はgranzyme B産生能に影響を及ぼさなかったが、perforin+細胞比率を著しく抑制した。また、抗CD3抗体を用いた刺激によるCD107a+細胞比率の増加は石綿曝露亜株と対照亜株の間で差は認められなかったが、IFN- γ の分泌量は長期石綿曝露によって抑制された。

(5)石綿曝露によるCTL分化抑制における補助刺激分子の役割

IL-15の添加実験を行ったところ、石綿曝露下CTL分化抑制時のCTL機能が一部改善するという当初予想していなかった結果が得られた。そこで、石綿曝露下CTL免疫応答の抑制を改善する分子が他にないかどうか探索するため、CTL分化誘導や分化後CTLの生存・成熟・機能維持に重要であることが知られている補助刺激シグナルに注目した。本研究では抗4-1BB抗体を用いて補助刺激シグナルを誘導し、石綿曝露下CTL分化抑制の改善への影響をgranzyme Bレベルと細胞増殖能に注目して検討した。抗4-1BB抗体の添加実験では、石綿曝露によるCD8+T細胞の細胞増殖低下の回復はみられなかった。また、CD8+T細胞増殖の有無に関わらずgranzyme B+細胞比率の回復もみられなかった。

これら(1)-(5)の研究成果から、IL-15添加によって部分的な細胞増殖の回復がみられたものの、CTL分化抑制は回復しなかったことから、石綿曝露による細胞増殖低下を伴うCTL分化抑制は主としてIL-15の産生欠乏に起因しないことを示す。一方で、granzyme B産生能の回復は、石綿曝露のCTL機能抑制作用が補償できる可能性を示唆する。また、長期石綿曝露によってCD8+T細胞のperforinレベル及びIFN- γ 分泌量が抑制されることが示されたことから、悪性中皮腫患者で認められたCD8+リンパ球の機能不全と石綿曝露影響との関連が示唆される。今後、抗4-1BB抗体の添加実験については添加条件を工夫したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kumagai-Takei Naoko, Yamamoto Shoko, Lee Suni, Maeda Megumi, Masuzzaki Hidenori, Sada Nagisa, Yu Min, Yoshitome Kei, Nishimura Yasumitsu, Otsuki Takemi	4. 巻 19
2. 論文標題 Inflammatory Alteration of Human T Cells Exposed Continuously to Asbestos	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 504 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19020504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kumagai-Takei Naoko, Nishimura Yasumitsu, Matsuzaki Hidenori, Lee Suni, Yoshitome Kei, Otsuki Takemi	4. 巻 2018
2. 論文標題 Decrease in Intracellular Perforin Levels and IFN- Production in Human CD8+ T Cell Line following Long-Term Exposure to Asbestos Fibers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Immunology Research	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/4391731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順姫, 吉留敬, 幡山圭代, 山本祥子, 池田美穂, 大槻剛巳.	4. 巻 26
2. 論文標題 アスベスト曝露と細胞傷害性顆粒.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床環境医学 26(1): 31-37, 2017	6. 最初と最後の頁 31-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kumagai-Takei N, Yamamoto S, Lee S, Maeda M, Matsuzaki H, Sada N, Yu M, Yoshitome K, Nishimura Y, Otsuki T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Inflammatory alteration of human T cells exposed continuously to asbestos.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19020504	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T.	4. 巻 2016
2. 論文標題 The suppressed induction of human mature cytotoxic T lymphocytes caused by asbestos is not due to Interleukin-2 insufficiency.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Immunology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2016/7484872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 武井直子、西村泰光、李順姫、吉留敬、伊藤達男、大槻剛巳。
2. 発表標題 石綿曝露下CTL分化抑制時の補助刺激分子の役割
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Otsuki T.
2. 発表標題 IL-15-induced recovery of suppressed proliferation and granzyme B level of CTL upon exposure to asbestos during MLR
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武井直子、西村泰光、松崎秀紀、李順姫、吉留敬、大槻剛巳
2. 発表標題 ヒト CD8+T 細胞株を用いて作成した石綿曝露亜株の機能解析
3. 学会等名 第25回 石綿・中皮腫研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武井直子、西村泰光、松崎秀紀、李順姫、吉留敬、大槻剛巳
2. 発表標題 石綿曝露下CTL分化抑制時の細胞増殖と granzyme B産生に対するIL-15の影響
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武井直子、西村泰光、松崎秀紀、李順姫、吉留敬、大槻剛巳 .
2. 発表標題 長期石綿曝露によるヒトCD8T細胞の機能変化 .
3. 学会等名 第24回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Otsuki T.
2. 発表標題 The analysis for function of human CD8+T cell line with and without long-term exposure to asbestos fibers.
3. 学会等名 第46回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T.
2. 発表標題 The functional analysis of human CD8+ T cell line with long-term exposure to chrysotile asbestos fibers
3. 学会等名 The 57thAnnual Meeting of the Society of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順姬, 吉留敬, 大槻剛巳.
2. 発表標題 石綿曝露によるCTL分化抑制時のIL-15添加の影響.
3. 学会等名 第86回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順姬, 吉留敬, 大槻剛巳.
2. 発表標題 石綿曝露下 CTL 分化抑制時の CD8+T 細胞に及ぼす IL-15 添加の影響.
3. 学会等名 第23回日本免疫毒性学会学術年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Otsuki T.
2. 発表標題 Differential effects of IL-2 and IL-15 on the suppressed induction of CTL upon exposure to asbestos.
3. 学会等名 第45回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T.
2. 発表標題 Differential effects of IL-2 and IL-15 addition on numbers and granzyme B level in CD8+ lymphocytes exposed to asbestos during MLR.
3. 学会等名 The 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順姫, 吉留敬, 大槻剛巳.
2. 発表標題 長期石棉曝露がヒトCD8+T細胞亜株の機能に与える影響.
3. 学会等名 第87回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Maeda M, Sada N, Yu M, Yoshitome K, Nishimura Y, Otsuki T.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Japan	5. 総ページ数 in press
3. 書名 Reduction of anti-tumor immunity caused by asbestos exposure. In: Allergy and Immunotoxicology in Occupational Health - The Next Step	

1. 著者名 Kumagai-Takei N, Lee S, Yoshitome K, Sada N, Nishimura Y, Otsuki T.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 IntechOpen Limited	5. 総ページ数 17
3. 書名 Immune alteration caused by fibrous and particulate environmental substances. In: Environmental Factors affecting Human Health.	

1. 著者名 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Yamamoto S, Ikeda M, Hatayama T, Maeda M, Otsuki T.	4. 発行年 2017年
2. 出版社 NOVA Science Publishers, Inc.	5. 総ページ数 15 (107-121)
3. 書名 Alteration of perforin status caused by asbestos exposure in CTL and NK cells. In. "Advances in Medicine and Biology.	

1. 著者名 Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Yamamoto S, Hatayama T, Maeda M, Otsuki T.	4. 発行年 2016年
2. 出版社 NOVA Scientific Publishers, Inc.	5. 総ページ数 18 (45-62)
3. 書名 Reduction of anti-tumor immunity caused by asbestos exposure. In. Asbestos: Risk Assessment, Health Implications and Impacts on the Environment.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

川崎医科大学衛生学オリジナルホームページ 業績紹介 https://m.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/151116_BIBLIO.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大槻 剛巳 (OTSUKI TAKEMI) (40160551)	川崎医科大学・医学部・教授 (35303)	
研究分担者	西村 泰光 (NISHIMURA YASUMITSU) (90360271)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	