

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間： 2008～2009  
 課題番号： 20890270  
 研究課題名（和文） 細胞傷害性 T 細胞の分化・機能に及ぼす石綿曝露影響についての研究  
 研究課題名（英文） The analysis for differentiation and function of human cytotoxic T lymphocytes under exposure to asbestos  
 研究代表者  
 熊谷 直子（KUMAGAI NAOKO）  
 川崎医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：00509276

研究成果の概要（和文）：腫瘍細胞を特異的に殺傷することのできる CD8<sup>+</sup>細胞傷害性 T 細胞（CTL）へのアスベスト（石綿）曝露影響を調べた。石綿曝露によってアロ抗原特異的な CD8<sup>+</sup>細胞の割合と細胞数の増加、細胞傷害性、細胞内 granzyme B/IFN- $\gamma$ の産生がいずれも抑制された。また、CD8<sup>+</sup>細胞中のナイーブ CD45RA<sup>+</sup>細胞比率の減少とエフェクター/メモリー CD45RO<sup>+</sup>細胞比率と活性化 CD25<sup>+</sup>細胞比率の増加がいずれも抑制された。これらの結果から、石綿曝露によって CTL の分化が抑制されることが示唆された。また、石綿曝露によって、CTL 分化を促進するサイトカイン、IFN- $\gamma$ と TNF- $\alpha$ 、及び抑制作用をもつ IL-10 の産生量がいずれも抑制されることを見出した。本研究課題より得られる知見は石綿被曝露者の分子医学的早期発見に向けて重要な情報を与えるものである。

研究成果の概要（英文）： The effect of asbestos-exposure on CTL was investigated. Exposure to CB suppressed an increase in CD8<sup>+</sup> cell-number, cytotoxicity, increases in intracellular granzyme B and IFN- $\gamma$  levels, and differentiation from naïve cells to CTL. CB-exposure suppressed the productions of IL-10, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$ , but not IL-2. These results deny the possible contribution of IL-10, representative suppressive cytokine, to the suppressed induction of CTL, and indicate the potential of asbestos to inhibit the induction of CTL with decreases in IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , representative promoting cytokines. These suggest that inhaled asbestos might promote the generation of tumor disease by suppression of tumor-immunity.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：細胞傷害性 T 細胞、石綿、悪性中皮腫、IFN- $\gamma$ 、Granzyme B

## 1. 研究開始当初の背景

アスベスト（石綿）曝露は悪性中皮腫や肺癌を引き起こす。石綿の発癌作用はよく知られているが、一方で癌疾患の抑制に働く抗腫瘍免疫機能への石綿曝露影響は不明な部分が多い。抗腫瘍免疫において、腫瘍細胞を特異的に殺傷することのできる細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の役割は重要である。CTL は、腫瘍抗原を認識したナイーブ CD8<sup>+</sup>T 細胞から分化することが知られている。これまで CTL への石綿曝露影響については明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

ヒト CTL の分化・機能における石綿曝露影響を調べる。

## 3. 研究の方法

5 µg/ml の白石綿 chrysotile B (CB) 又は青石綿 crocidolite (CR) 添加培地中で、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。培養後の PBMC (Effector) は、蛍光標識アロ PBMC (Target) と 37°C で 5 時間反応させ、propidium iodide (PI) で染色し、FCM で標的細胞中の PI 陽性死細胞の比率を計測し、細胞傷害性を評価した。また、CD8, CD3, CD45RA, CD45RO, Granzyme B, IFN-γ に対する蛍光標識抗体で染色し、CD8<sup>+</sup>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。培養上清中サイトカイン (IL-10, IFN-γ, TNF-α, IL-2) 量は、FCM で測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞傷害性

アロ PBMC と混合培養した PBMC は、E/T 比に依存した有意な細胞傷害性を示した。混合培養時の CB 曝露は、アロ PBMC への細胞傷害性を有意に低下させた。一方、CR 曝露群では、細胞傷害性の低下は見られなかった。

### (2) CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合と細胞数

CB 曝露によって、アロ PBMC 刺激による PBMC 中の CD8<sup>+</sup>T 細胞の割合と細胞数の増加が抑制された。

### (3) CD8<sup>+</sup>T 細胞上分化指標

アロ PBMC 刺激によって、CD8<sup>+</sup>T 細胞中の CD45RA<sup>+</sup> ナイーヴ細比率が減少し、また CD45RO<sup>+</sup> エフェクター/メモリー細胞比率と活性化 CD25<sup>+</sup>細胞比率が増加したが、いずれも CB 曝露によって抑制された。

### (4) CD8<sup>+</sup>T 細胞の機能分子

アロ刺激によって誘導された CD8<sup>+</sup>T 細胞内 granzyme B 産生及び IFN-γ 産生は、CB 曝露により有意に抑制された。

### (5) サイトカインの産生量

IL-2, IFN-γ, TNF-α は CTL 分化に対して促進作用をもち、IL-10 は抑制作用をもつことが知られている。IL-10 と IFN-γ は、アロ PBMC 刺激で産生量が増加したが、IL-2 と TNF-α は一定量を示した。石綿曝露で IL-10, IFN-γ, TNF-α の産生量は抑制されたが、IL-2 に関しては有意差がなかった。

これら (1)-(4) の結果は、石綿曝露が CTL 分化を抑制することを示唆する。また、(5) の結果から、IL-10 が CTL 分化に抑制的影響を与えることを否定し、IFN-γ と TNF-α 産生量の減少が CTL 分化抑制に伴ってみとめられることを明らかにした。吸入された石綿が CTL 分化への抑制的影響を介して腫瘍疾患発症を促進することが示唆される。

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。抗腫瘍免疫を担う CTL については、中皮腫への免疫療法に関する多くの知見が存在するものの CTL 自体への石綿曝露影響について調べた研究内容は国内外を問わず皆無に等しく、分子免疫学的な解析は全くなされていない。CD8<sup>+</sup>T 細胞は末梢血より容易に採取・試験出来ることから、本研究課題より得られる知見は石綿被曝露者の分子医学的早期発見に向けて重要な情報を与え、更には、悪性中皮腫予防分子マーカーを導く可能性がある。

## 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 10 件)

- ① Nishimura Y, Miura Y, Maeda M, Kumagai N, Murakami S, Hayashi H, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T. Impairment in cytotoxicity and expression of NK-cell activating receptors on human NK cells following exposure to asbestos fibers. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 査読有, Vol. 22, No. 3, 2009, pp. 579-590
- ② Nishimura Y, Maeda M, Kumagai N, Hayashi H, Miura Y, Otsuki T. Decrease in phosphorylation of ERK following decreased expression of NK-cell activating receptors in human NK cell line exposed to asbestos. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 査読有, Vol. 22, No. 4, 2009, pp. 879-888
- ③ Murakami S, Nishimura Y, Maeda M, Kumagai N, Hayashi H, Chen Y, Kusaka K, Kishimoto T, Otsuki t. Cytokine

- alteration and speculated immunological pathophysiology in silicosis and asbestos-related diseases. Environ Health Prev Med, 査読有, Vol.14, No.4, 2009, pp216-222
- ④ Hayashi H, Nishimura Y, Maeda M, Murakami S, Kumagai N, Chen Y, Kusaka M, Uragami K, Fujimoto W, Otsuki T. Is soluble CD40 ligand an indicator of immunopathological disturbance in silicosis patients? Kawasaki Med J, 査読有, Vol. 35, No.2, 2009, pp129-138
- ⑤ Hayashi, H, Maeda, M, Murakami, S, Kumagai, N, Chen, Y, Hatayama, T, Katoh, M, Miyahara, N, Yamamoto, S, Yoshida, Y, Nishimura, Y, Kusaka, M, Fujimoto, W, Otsuki, T. Soluble interleukin-2 receptor as an indicator of immunological disturbance found in silicosis patients. Int J Immunopathol Pharmacol, 査読有, Vol.22, No.1, 2009, pp53-62
- ⑥ 熊谷直子, 西村泰光, 前田恵, 村上周子, 林宏明, 陳瑩, 平野靖史郎, 大槻剛巳. 新しい環境中物質, 繊維・粒子状物質による生体影響へのアプローチ—シンポジウム「日本臨床環境医学の近未来」によせて. 臨床環境医学, 査読有, Vol.17, 2008, pp83-94
- ⑦ Maeda M, Miura Y, Nishimura Y, Murakami S, Hayashi H, Kumagai N, Hatayama T, Katoh M, Miyahara N, Yamamoto S, Fukuoka K, Kishimoto T, Nakano T. Immunological changes in mesothelioma patients and their experimental detection. Clin Med: Circ Resp Pulm Med, 査読有, Vol.2, 2008, pp11-17
- ⑧ 西村泰光, 前田 恵, 村上周子, 熊谷直子, 林 宏明, 大槻 剛巳. アスベスト関連疾患の発症機構—悪性中脾腫を中心として—. Surgery Frontier, 査読無, Vol.15, No.2, 2008, pp8-13
- ⑨ 林 宏明, 三浦由恵, 村上周子, 熊谷直子, 西村泰光, 草加勝康, 大槻剛巳. 珪肺症例CD4+CD25+分画における活性化T細胞の混入と制御性T細胞の早期細胞死の可能性. 日本職業・環境アレルギー誌, 査読有, Vol.15, No.2, 2008, pp43-50
- ⑩ Miura Y, Ishibashi T, Tatsukawa T, Maeda M, Murakami S, Nisimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Chen Y, Hyodo Y, Hatta E, Kojima S, Fujii M, Morimoto K, Otsuki T. Lifestyle and T-helper 1 and 2 related cytokines in healthy volunteers. KAWASAKI MED J, 査読有, Vol.34, No.3, 2008, pp171-177
- [学会発表] (計 6件)
- ① Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Otsuki T. Suppressive effects of asbestos-exposure on the differentiation into human cytotoxic T lymphocytes. 49<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2010.3.10, Salt Lake City, Utah
- ② Kumagai N, Nishimura Y, maeda M, Hayashi H, Otsuki T. ヒト CTL 分化誘導に関わるサイトカイン産生能に対する石綿曝露影響の解析. Analysis for effect of asbestos-exposure on production of cytokines related with differentiation into human CTL. 第39回日本免疫学会学術大会, 2009.12.4. 大阪国際会議場
- ③ 熊谷直子, 西村泰光, 前田恵, 林宏明, 大槻剛巳. 石綿曝露による CTL 分化抑制に関わるサイトカイン産生について. 第16回日本免疫毒性学会学術大会 2009.8.28. 旭川市民文化会館
- ④ 熊谷直子, 西村泰光, 前田 恵, 村上周子, 林 宏明, 陳 瑩, 大槻 剛巳. 石綿曝露によるヒト細胞傷害性T細胞分化の抑制. 第79回日本衛生学会学術総会, 2009.3.30. 北里大学白金キャンパス
- ⑤ Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M, Murakami S, Hayashi H, Chen Y, Otsuki Takemi. The analysis for function of human cytotoxic T lymphocytes induced under exposure to asbestos. 第38回日本免疫学会総会・学術集会, 2008.12.1. 国立京都国際会館
- ⑥ 熊谷直子, 西村泰光, 前田 恵, 村上周子, 林 宏明, Chen Ying, 大槻 剛巳. ヒト細胞傷害性T細胞の機能に及ぼす石綿曝露の影響. 第15回 日本免疫毒性学会学術大会, 2008.9.12. タワーホール船堀

〔図書〕（計1件）

Otsuki T, Maeda M, Miura Y, Hayashi H, Murakami S, Kumagai N, Nishimura Y. Immunological effects of Asbestos. In Asbestos: Risks, Environment and Impact., Eds: Antonio Soto and Gael Salazar, Nova Science Publishers, Inc. 2009, pp185-193

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 直子 (KUMAGAI NAOKO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509276

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：