

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460825

研究課題名(和文)珪酸粉塵曝露による自己寛容破綻機構の解明

研究課題名(英文)Analysis for the effect of silica particle exposure on immune system

研究代表者

李 順姫 (Lee, Suni)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：70414026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：珪肺症は、珪酸粉塵を慢性的に吸入することで惹起される塵肺である。特筆すべき点として、自己免疫疾患を高頻度で合併する。本研究では珪肺症例における自己免疫疾患合併機構の解明を目標とした。培養系の実験で珪酸曝露により自己免疫疾患発症と密接に関わるTh17細胞の分化・維持に重要なIL-6およびIL-23の発現が誘導されることを見いだした。また、免疫応答の収束を阻害する血漿中DcR3が健常人に比べ珪肺症例で顕著に増加するが、特定の自己抗体とは相関していなかった。血漿DcR3は特定の自己免疫疾患への方向付けではなく、慢性的な免疫動態の活性化を示しており、珪肺症例では免疫反応が亢進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Silicosis patients frequently complicate with autoimmune diseases. Here, we analyzed the effect of silica particles on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in vitro and plasma factors to compare between silicosis patients (Sil) and healthy volunteers (HV). We found IL-6 and IL-23 were increased in culture media after silica particle exposure on PBMC from HV. Both cytokines are essential for polarization and maintain to Th17, critical T cell subset for autoimmune pathogenesis. Dysregulation of apoptosis has been considered to play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases. DcR3 is known as an intrinsic decoy receptor inhibits FasL-induced apoptosis. Although plasma DcR3 and several major autoantibodies were increased in Sil, there are no correlation between DcR3 and the other clinical factors including autoantibodies.

Taken together, silica particles affect directly on PBMC to induce Th17 subset. Plasma DcR3 elevation in Sil indicates abnormal activation of immune system.

研究分野：衛生学

キーワード：粉塵曝露 珪酸 自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

珪肺症では珪酸 (SiO_2) 粉塵を慢性的に吸入することで肺が線維化し、進行すると慢性の呼吸不全をひきおこす。特筆すべき点は、珪肺症患者において多発性硬化症、リウマチ (Caplan 症候群) 強皮症などの自己免疫疾患を高頻度で合併することである (Iannello S, *Clin Rheumatol*, 2002; Steenland K, *Am J Ind Med*, 1995)。興味深いことに、形成外科手術などでシリコン ($[\text{SiO}_2\text{-O-}]_n$) を体内に留置された患者でも同様に自己免疫疾患を起こすケースが報告されている。これらの事実は珪酸と自己免疫疾患発症の相関が高いことを示唆している (Bar-Meir E, *Autoimmunity*, 2003)。

珪酸はアジュバント効果が高いことで知られており、従来、珪肺症患者における自己免疫疾患の併発もこのアジュバント効果によるものであると考えられてきた。しかし、我々は取り込まれた珪酸は、長期にわたり体内に貯留し、循環リンパ球と遭遇・乖離を繰り返すことでアジュバント効果以外の慢性的な作用を免疫細胞に及ぼし、自己寛容の破綻へと誘導すると考えている。

そこで当研究室においてはこれまでに、臨床検体や、培養細胞を用いた実験を行い、珪肺症における自己免疫疾患発症メカニズムの解明を目指して研究を続けている。自己免疫疾患未発症の69珪肺症例を調べたところおよそ10%に、抗トポイソメラーゼI自己抗体の出現が確認された (Ueki A, *Arthritis Rheum.*, 2001)。この自己抗体は、強皮症に特異的で、かつ肺線維症や末梢血管炎などを伴う一群と関連が深いことが報告されている。また、特定のHLAタイプとの関連が高いことが報告されており、珪肺症においてはDQB1*0402の頻度が高いことを見いだした (Ueki A, *J Occup Health*, 2001)。

Fas分子は細胞のアポトーシス受容体として機能する、特にリンパ球ではFasやそのリガンドであるFas ligand (FasL)分子の遺伝子変化や発現調節変化などが免疫反応後不要、或は過剰となった反応性T細胞の終息を担っている。この分子機構の破綻が自己応答性の細胞に起きると、自己免疫疾患の発症などに繋がる。そこで、我々は珪肺症例において、Fas関連分子に変化がおきていないか、検討した。その結果、珪肺症例血清可溶性Fas

は健常人のそれに比べ高く (Tomokuni A, *Clin Exp Immunol.*, 1997) 末梢血単核球レベルで野生型Fasに比べ可溶性Fasの遺伝子発現が有意に高かった (Otsuki T., *Immunology*, 2000)。さらに、珪肺症例末梢血では可溶性Fas以外の選択的スプライシングによるFasL結合ドメインを有する分子が多数発現していることや (Otsuki T., *Immunol Lett.*, 2000) 可溶性Fasと機能が類似するdecoy receptor 3 (DcR3)の遺伝子発現も健常人において珪肺症例よりも著しく高いことを見いだした (Otsuki T., *Clin Exp Immunol.*, 2000)。

加えて、細胞に注目し珪酸の免疫学的影響を検討した結果、珪肺症例では反応性T細胞の活性化と同時に、制御性T細胞 (Treg) の機能的減弱と絶対数が減少することを明らかにした (Wu P, *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2006; Hayashi H, *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2010)。

このように、珪肺症例では自己免疫疾患は未発症ながらも、着実にその免疫動態が反応性の強くなる方向へと傾向していることが判明してきた。

2. 研究の目的

前述のとおり、珪肺症例では、免疫細胞の反応性が高まり、自己免疫疾患を誘導しうる素地が構築されつつある。我々は、先行研究に加え、さらに、珪肺症患者において引き起こされている免疫動態を解析し、珪肺症例における自己免疫疾患合併の予防、また、珪肺症にとどまらず自己免疫疾患全般の予防に繋がる機序の解明を目標としている。

我々は、体内に取り込まれ、排出されず、貯留している珪酸が免疫反応の暴走を引き起こすと考えているが、特に、免疫細胞の極性化 (polarization) に影響を与えることが、T細胞の制動システムを狂わし自己免疫の暴走を引き起こす一因になると考えている。そこで本研究においては珪酸が免疫細胞の細胞極性 (polarity) に与える影響とそのメカニズムを明らかにする。CD4陽性ヘルパーT (Th)細胞は免疫応答時、必要に応じてTh1、Th2、Th17およびTregなどのサブセットに極性化する。各サブセット細胞の活性バランスの維持は正常な免疫応答に必須である。体内に貯留している珪酸は、この免疫細胞の極性

化 (polarization) に影響を与えることで、T 細胞の制動システムを狂わせ自己免疫の暴走を引き起こす一因になると考えている。中でも Th17 細胞は自己免疫疾患発症にも強く寄与していることが知られており、我々は珪酸曝露により極性誘導される候補サブセットとして注目している。

そこで本研究では、珪酸が免疫細胞の細胞極性 (polarity) に与える影響とそのメカニズムを明らかにする。珪肺症患者における自己免疫未発症のステージを、自己免疫疾患発症への過渡期と考えることでヒトの自己免疫疾患への免疫動態の変遷過程を追跡出来ると考えている。

3. 研究の方法

1) 健常人由来免疫細胞への珪酸曝露による細胞極性の検討を行う (*ex vivo* 実験)。末梢血由来免疫細胞に対して珪酸曝露し、T 細胞、樹状細胞、マクロファージなどのサイトカイン分泌、各種免疫活性指標遺伝子の発現を ELISA、CBA (Cytometric Bead Assay)、Luminex、リアルタイム PCR、T 細胞サブセットの割合をフローサイトメトリー (FACS CANTO) で解析する。

2) 珪肺症患者由来血漿に含まれる、抗自己抗体やサイトカインなど血漿成分分析を ELISA 法で測定し、健常人、陽性対象として強皮症患者由来の血漿と比べたとき、どのような免疫動態の変化が引き起こされているか検討する。

4. 研究成果

1) まずは、健常人由来免疫細胞に対して、珪酸を *in vitro* で曝露したときどのような形質の変化、遺伝子発現および液性因子の放出に変化が見られるか検討した。その結果、珪酸添加培地で培養された健常人由来末梢血単核球では、非曝露細胞、或は陰性対象である酸化チタン曝露細胞に比べ細胞増殖が緩慢になる傾向が観察された。細胞周期調節を司る遺伝子発現の変化を調べたところ、数ある細胞周期調節因子の中でも CyclinD の発現が顕著に低下していることが見いだされた。この結果は、酸化チタン曝露群では、見られないことから、珪酸曝露特有の形質変化であり、珪肺症における自己免疫誘導にどのように関わるか今後より詳細な検討が必用であ

る。

2) T 細胞の極性化と関わる因子の変化として、Th17 の分化成熟、維持に必要な IL-6、IL-23 の発現が珪酸曝露群で増える傾向が見られた。この結果は、確かに珪酸曝露は自己免疫疾患の発症、および増悪に寄与する細胞一群である Th17 細胞を助長する環境を作るのに寄与する傾向が有ることを示した。

3) 自己免疫疾患未発症の珪肺症例を自己免疫疾患発症への過渡期と捉えることで、その発症までの過程で起こる血漿成分の変化を探索した。まず、以前、珪肺症由来末梢血単核球でその遺伝子発現が増加していた DcR3 の血漿中の含有量を測定した。その結果、遺伝子の発現増加と同様、血漿中含量も増加していることをつきとめた。この分子は、Fas/FasL のシグナルを阻害することで、自己応答を含む過剰な免疫応答を収束することができない可能性があり、珪肺症例では自己免疫疾患未発症ながらも免疫動態としては無秩序な活性化状態になっている可能性が示唆された。このことから、自己免疫疾患で問題となる抗自己抗体の出現と、この DcR3 の血漿中濃度を比較するため、自己免疫疾患の臨床指標となる各種自己抗体を測定し、相関関係を統計学的に解析した。この珪肺症例における DcR3 の血漿中での増加は、特定の自己免疫疾患への方向づけではなく、慢性的な免疫動態の活性化を示す指標であることを示唆すると考えられる。

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 9 件)

1) 李順姫、前田恵、松崎秀紀、武井直子、山本祥子、幡山圭代、吉留敬、西村泰光、大槻剛巳。ヒト T 細胞株への白石綿・青石綿継続曝露に伴う細胞特製の変化。日本予防医学雑誌 10:119-125, 2016 査読あり

2) Sada N, Lee S, Katsu T, Otsuki T, Inoue T. Targeting LDH enzymes with a stiripentol analog to treat epilepsy. Science, 347:1362-1367, 2015, 査読あり DOI: 10.1126/science.aaa1299

3) Lee S, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Maeda M, Chen Y, Kusaka M, Urakami K, Hayashi H, Fujimoto W, Nishimura Y, Otsuki T. Silica exposure and altered regulation of autoimmunity. *Environ Health Prev Med*, 19:322-329, 2014, 査読あり DOI: 10.1007/s12199-014-0403-9.

4) Maeda M, Chen Y, Hayashi H, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Nishimura Y, Otsuki T. Chronic exposure to asbestos enhances TGF- β 1 production in the human adult T cell leukemia virus-immortalized T cell line MT-2. *Int J Oncol*, 45:2522-2532, 2014, 査読あり DOI: 10.3892/ijo.2014.2682.

5) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Kishimoto T, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T. Functional properties of CD8+ lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. *J Immunol Res* 2014: Article ID 670140, 2014 査読あり <http://dx.doi.org/10.1155/2014/670140>

6) Maeda M, Chen Y, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Hirastauka J-i, Nishimura Y, Kimura Y, Otsuki T. Alteration of cytoskeletal molecules in a human T cell line caused by continuous exposure to chrysotile asbestos. *Immunobiology*. 218:1184-1191, 2013 査読あり DOI: 10.1016/j.imbio.2013.04.007.

7) Nishimura Y, Maeda M, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Wada Y, Nishiike-Wada T, Iguchi H, Otsuki T. Altered functions of alveolar macrophages and NK cells involved in asbestos-related diseases. *Environ Health Prev Med*. 18:198-204, 2013 査読あり DOI: 10.1007/s12199-013-0333-y.

8) Kumagai-takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Hiratsuka J, Otsuki T. Effect of asbestos exposure

on differentiation of cytotoxic T lymphocytes in MLR of human PBMCs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 49:28-36, 2013 査読あり DOI: 10.1165/rcmb.2012-01340C.

9) Matsuzaki H, Lee S, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Miura Y, Chen Y, Maeda M, Yamamoto S, Hatayama T, Nishimura Y, Otsuki T. Exploration of biomarkers for asbestos exposure and occurrence of malignant mesothelioma based on the immunological effects of asbestos. *J Postgenomics: Drug & Biomarker Dev*. 2013 査読あり <http://dx.doi.org/10.4172/2153-0602.S2-001>

〔学会発表〕(計 17 件)

1) Lee S, Nishimura Y, Yamamoto S, Hatayama T, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Hayashi H, Urakami K, Kusaka M, Fujimoto W, Otsuki T. Study for Immunological Importance of Increased Plasma Decoy Receptor 3 Level in Silicosis, The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2016.3/13-18 (New Orleans, Louisiana, USA)

2) 李順姫, 大槻剛巳, 松崎秀紀, 武井直子, 吉留敬, 西村泰光, 草加勝康, 浦上更三. 珪肺症における血清 DcR3 分子の病態における位置付け, 第 59 回中国四国合同産業衛生学会 2015.12/5-6 愛媛大学城北キャンパス南加記念ホール(愛媛県松山市)

3) 大槻剛巳, 李順姫, 武井直子, 松崎秀紀, 吉留敬, 西村泰光, 林宏明, 浦上更三, 草加勝康, 藤本亘. 珪肺症における免疫異常: 血漿 Decoy Receptor 3 の位置付け診断指標の構築. 第 77 回日本血液学会学術集会 2015.10/16-18. ANA クラウンプラザホテル金沢など(石川県金沢市)

4) 李順姫, 西村泰光, 山本祥子, 幡山圭代, 松崎秀紀, 武井直子, 吉留敬, 大槻剛巳. 自己免疫疾患未発症珪肺症例における血漿免疫グロブリンと BAFF 値の解析. 第 22 回日本

免疫毒性学会学術年会 2015.9/10-11. 京都大学百周年時計台記念館国際交流ホール(京都府京都市)

5) 李順姫. 珪肺症患者由来血漿における自己抗体および液性因子の解析. 第6回川崎医科大学学術集会 2015.8/1. 川崎医科大学(岡山県倉敷市)

6) Lee S, Nishimura Y, Yamamoto S, Hatayama T, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Otsuki T. Analysis between blood DcR3 level, autoantibodies and respiratory score in silicosis patients. 31st ICOH (International Congress on Occupational Health) 2015.5/31-6/5, COEX Convention Center (Seoul, Korea)

7) Lee S, Otsuki T. Differences of immunological effects of crystalline silica and asbestos fibers on regulatory T cell (symposium: Immune Responses to Different Classes of Inhaled Particulates: Unique vs. Shared Responses and Mechanisms)(3/24) The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2015.3/22-26, San Diego Convention Center (San Diego, California, USA)

8) 李順姫, 松崎秀紀, 前田恵, 武井直子, 西村泰光, 大槻剛巳. 石綿の低濃度長期曝露がTreg様モデル細胞株 MT-2細胞の細胞増殖に及ぼす影響. 第87回日本産業衛生学会 2014.5.22-24 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

9) 李順姫, 西村泰光, 松崎秀紀, 武井直子, 山本祥子, 幡山圭代, 大槻剛巳. 珪肺症例における血漿中 DcR3 値と各種自己免疫疾患関連因子との相関性の検討. 第84回日本衛生学会学術総会 2014.5.25-27. 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

10) Lee S, Nishimura Y, Yamamoto S, Hatayama T, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, Otsuki T. Analysis of blood DcR3 concentration and its correlation to autoantibodies in silicosis patients. The

21st The Asian Association for Occupational Health 2014.9.2-4. Hilton Fukuoka Sea Halk (福岡県福岡市)

11) 李順姫, 西村泰光, 山本祥子, 幡山圭代, 松崎秀紀, 武井直子, 吉留敬, 大槻剛巳. 自己免疫疾患未発症珪肺症例における血中 DcR3 値と他の自己抗体値や呼吸機能検査値との関連. 第21回日本免疫毒性学会学術年会. 2014.9/11-12. 徳島文理大学・国際会議場(徳島県徳島市)

12) Lee S, Nishimura Y, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Otsuki T. Plasma DcR3 which inhibits Fas-induced apoptosis is increased in silicosis patients who are non-onset autoimmune diseases. The 43rd Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2014 日本免疫学会学術集会)2014.12/10-12. 京都国際会館(京都府京都市)

13) Lee S, Nishimura Y, Yamamoto S, Hatayama T, Matsuzaki H, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Kusaka M, Fujimoto W, Otsuki T. Analysis of blood DcR3 concentration and its correlation to clinical parameters of autoimmune diseases in silicosis patients. The 53rd annual Meeting. Society of Toxicology, 2014.3.23-27. (Poenix Convention Center, Arizona, USA)

14) 李順姫, 西村泰光, 山本祥子, 幡山圭代, 松崎秀紀, 武井直子, 大槻剛巳. 珪肺症例における血漿 DcR3 値と各種自己免疫疾患関連因子との相関性の検討. 第13回分子予防環境医学研究会 2014.1.31-2.01. 和歌山県民文化会館 大会議室(和歌山県和歌山市)

15) Lee S, Matsuzaki H, Maeda M, Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Otsuki T. Continuous exposure of asbestos on Treg model cell line MT-2 affects cell cycle progression and cell survival. 2013 日本免疫学会・学術集会 2013.12.11-13. 幕張メッセ(千葉県千葉市)

16) Lee S, Matsuzaki H, Maeda M,

Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Otsuki T.
Long-term exposure of asbestos affects
cell cycle and cell death in Treg model
cell line MT-2. 6th International
Symposium on Nanotechnology, Occupational
and Environmental Health. 2013.10.28-31,
Nagoya Congress Center (名古屋国際会議場)
(愛知県名古屋市)

17) 李順姫, 松崎秀紀, 武井直子, 西村泰光,
大槻剛巳. 石綿長期曝露制御性T細胞株にお
ける細胞周期制御因子の発現動態の解析.
第20回石綿・中皮腫研究会 2013.9.28. :(公
財)がん研究会がん研究所 吉田講堂(東京
都江東区)

〔図書〕(計 1件)

1) Lee S, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H,
Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Otsuki T.
Chapter 9 Immunostimulation by silica
particles and the development of
autoimmune dysregulation."Immune
Response Activation", book edited by Guy
Huynh Thien Duc, InTech publisher, Croatia
2014

ISBN 980-953-307-1094-2.

DOI: 10.5772/57544, pp 249-265

6. 研究組織

(1)研究代表者 李 順姫

(Lee Suni)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：70414026

(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

(3)研究分担者 西村 泰光

(Nishimura Yasumitsu)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90360271