

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860470

研究課題名(和文)細胞傷害性T細胞(CTL)の機能維持と遊走活性に対する石綿曝露影響の解析

研究課題名(英文)The analysis for maintenance of function and chemokine receptor expression in human cytotoxic T lymphocytes under exposure to asbestos

研究代表者

武井 直子(TAKEI, NAOKO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：石綿曝露による悪性中皮腫の発症を抑制する為の生体防御機構の一つとして、ナイーブCD8+T細胞が細胞傷害性T細胞(CTL)に分化し、分化後CTLが機能を持続して、適切に腫瘍部位へ遊走し、腫瘍細胞を攻撃・殺傷することが重要である。本研究では、石綿添加培地中で混合リンパ球培養法を用いてCTL分化誘導を行ったところ、アロ刺激によるCD8+T細胞中のCXCR3+細胞比率の増加が部分的に抑制された。一方で、ヒトCD8+T細胞株を用いて、石綿長期曝露亜株を作成したところ、granzyme B+、perforin+、及びIFN-gamma+細胞比率への5µg/mlの石綿曝露影響はなかった。

研究成果の概要(英文)：Chrysotile B (CB) asbestos exposure suppressed the induction of CTL during MLR, accompanied by the partial decrease in %CXCR3+ cells in CD8+T cells. We also prepared a sub-line of human CD8+T cells exposed to 5 µg/ml CB and analyzed the effect of CB exposure on CTL. Granzyme B+, perforin+, and IFN-gamma+ cells did not decrease in a sub-line of CD8+T cells exposed CB.

研究分野：衛生学・免疫学

キーワード：石綿 中皮腫 CTL ケモカイン受容体 granzyme B perforin

1. 研究開始当初の背景

石綿曝露による悪性中皮腫や肺癌の発症を抑制するための生体防御機構の一つとして、ナイーブ CD8⁺T 細胞が細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に分化し、分化後の CTL が機能を持続して、適切に腫瘍部位へ遊走し、granzyme B や perforin を放出して腫瘍細胞を攻撃・殺傷することが重要である。我々はこれまでに、石綿曝露によって CTL 分化誘導が抑制されることを報告してきたが、分化後 CTL の機能や遊走活性に関する石綿曝露影響については不明な部分が多い。

2. 研究の目的

分化後 CTL の機能維持と遊走活性に対す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) 添加/非添加培地中で、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 は、CD8, CD3, CD25, CD45RA, CD45RO, granzyme B, CXCR3, CCR7 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・ケモカイン受容体の発現をフローサイトメトリー (FCM) で測定した。ヒト CD8⁺T 細胞の石綿曝露亜株及び対照亜株は、granzyme B, perforin, IFN-gamma 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-gamma の染色には、予め PMA/ionomycin で 4 時間刺激した細胞を用いた。

4. 研究成果

(1) CXCR3(ケモカイン受容体)の発現細胞比率

アロ刺激によって CD8⁺T 細胞のナイーブ CD45RA⁺細胞比率の減少と活性化 CD25⁺細胞比率、エフェクター/メモリー CD45RO⁺細胞比率、granzyme B⁺細胞比率及び CXCR3⁺細胞比率が増加を示した。CB 曝露は、アロ刺激群でみられた CTL 分化を抑制するとともに、アロ

刺激による CD8⁺T 細胞の CXCR3⁺細胞比率の増加を部分的に抑制した。このことは、石綿曝露によって CTL 分化が抑制されるだけでなく、腫瘍部位への遊走活性も部分的に抑制されることを示す。また、本実験方法を用いることにより、FCM で CD8⁺T 細胞中の CXCR3 陽性細胞を分離することができることから、分化後の Effector CTL の機能に及ぼす石綿曝露影響をより詳細に調べることができる。

(2) CD45RA と CCR7 の発現パターンに基づく分化後 CTL 亜集団の分類

CTL 亜集団はケモカイン受容体と CD45RA の発現動態により分類できる。CTL 分化誘導 7 日目の細胞を回収し、回収した細胞を CD8, CD45RA, 及び CCR7 に対する各種蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて 3 種類のメモリー CTL 亜集団 (TEM, TEMRA, TCM) への分類を試みた。分類手法を確立するためには、フローサイトメトリーの測定条件などの改良が必要であることがわかった。或いは、磁気ビーズを用いて、PBMC から CD8⁺T 細胞を予め単離した後に CD45RA と CCR7 に対する蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行う必要性も考えられる。

(3) ヒト CD8⁺T 細胞株を用いた石綿長期曝露亜株の作成

ヒト CD8⁺T 細胞株を 5 µg/ml の CB 添加培地中で 1 カ月間、培養し、石綿曝露亜株を作成した。また、対照として石綿非添加培地中で培養維持したものを対照亜株として実験に用いた。

(4) ヒト CD8⁺T 細胞株の機能に及ぼす石綿長期曝露影響

石綿曝露亜株の granzyme B⁺細胞比率、perforin 細胞比率、IFN-gamma⁺細胞比率はいずれも対照亜株に比べて差はなかった。今後は、より高濃度の石綿曝露亜株の作成・解析

が必要である。

これら(1)-(4)の結果から、5 µg/mlの石綿曝露は、抗原刺激によるCTL分化の抑制だけでなくCD8+T細胞のCXCR3を介した遊走活性を抑制することが示唆された。一方で、ヒトCD8+T細胞株を用いてCTLの機能に及ぼす長期石綿曝露影響を調べるため、我々の先行研究(Kumagai-Takei, et al., Am J Respir Cell Mol Biol, vol 49, p28-36, 2013)でCTL分化誘導に抑制的影響を示した5 µg/mlの濃度の石綿添加培地中で1カ月培養維持したが、この濃度ではCTL機能への石綿長期曝露影響はみられなかった。今後は、より高濃度の石綿曝露亜株を作成し、CTLの機能に及ぼす石綿曝露影響を調べたい。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。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 2 件)

Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Maeda M, Kishimoto T, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki. Functional alteration of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes upon asbestos exposure and in malignant mesothelioma patients. Biomed Research International, 査読有, Vol. 2015, 2015, pp1-9. DOI:10.1155/2015/238431.

Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Matsuzaki H, Lee S, Kishimoto T,

Fukuoka K, Nakano T, Otsuki. Functional properties of CD8+ lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. Journal of Immunology Research, 査読有, Vol.2014,2014, Article ID: 670140 DOI:10.1155/2014/67140.

〔学会発表〕(計 8 件)

Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Yoshitome K, Otsuki T. Effect of IL-2 addition on granzyme B expression and proliferation in CD8+ lymphocytes exposed to asbestos during MLR. The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology. 2016-3-13-2016-3-18. LA (USA)

Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Matsuzaki H, Lee S, Otsuki T. Induction of granzyme B expression in CD8+ lymphocytes exposed to asbestos during MLR by IL-2 addition. 第44回日本免疫学会学術集会, 2015-11-18-2015-11-20 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順姫, 吉留敬, 林宏明, 大槻剛巳. CTL分化・機能に及ぼす石綿曝露影響の解析. 第22回日本免疫毒性学会学術年会. 2015-9-10-2015-9-11 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)

Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Matsuzaki H, Lee S, Hayashi H, Otsuki T. Effect of IL-2 addition on the suppressed induction of human CTL in mixed lymphocyte reactions upon

exposure to asbestos. 31th
International Congress on
Occupational Health,
2015.5.31-2015.6.5, Seoul (Korea)

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 asbestos-exposed
patients with pleural plaque and
malignant mesothelioma. 31th
International Congress on
Occupational Health,
2015.5.31-2015.6.5, Seoul (Korea)

武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順
姫, 吉留敬, 林宏明, 大槻剛巳. CTL 分
化誘導時の石綿曝露による CD8+細胞の
細胞傷害性低下に及ぼす IL-2 の影響 .
第 85 回日本衛生学会学術総会 ,
2015-3-26-2015-3-28, 和歌山県民文化
会館・ホテルアバローム紀の国(和歌山
県・和歌山市)

武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順
姫, 吉留敬, 林宏明, 大槻剛巳. 石綿
曝露による naïve CD8+T 細胞から CTL へ
の分化抑制における IL-2 関与の検討 .
第 14 回分子予防環境医学研究会,
2015-2-13-2015-2-14, 大阪市立大学
(大阪府・大阪市)

武井直子. ケモカインレセプターに注
目したエフェクター/メモリーCTL 機能
に関する石綿関連分子指標の探索 . 第 4
回 川崎医科大学学術集会, 2013-8-3,
川崎医科大学(岡山県・倉敷市)

Kumagai-Takei N, Nishimura Y,
Matsuzaki H, Maeda M, Lee S, Yoshitome
K, Otsuki T. Biological effects of
fibrous and particulate substances,
(Series Title: Current Topics in
Environmental Health and Preventive
Medicine), 2015, pp211-221.

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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
武井 直子 (TAKEI 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:

〔図書〕(計 1 件)