

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860471

研究課題名(和文) 制御性T細胞の細胞死と増殖およびサイトカイン産生に対するアスベスト曝露の影響

研究課題名(英文) Effect of asbestos on apoptosis, proliferation and cytokine production of regulatory T cells

研究代表者

松崎 秀紀 (Matsuzaki, Hidenori)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80335463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞モデル細胞株MT-2を用いたアスベスト長期曝露影響の検討により、アスベスト長期曝露が転写因子FoxO1とFoxP3の発現を低下させることを見いだした。さらに、アスベスト長期曝露によりFoxO1の標的分子の発現量が減少すること、組換え体FoxP3の発現がMT-2細胞のアスベストへの感受性を高めることを明らかにした。以上の結果から、アスベスト長期曝露はこれらの転写因子の低下を介して、制御性T細胞の機能を変化させることが考えられる。上記の結果はアスベスト曝露影響の新たな側面であり、制御性T細胞と腫瘍免疫に対するアスベスト曝露の影響を解明する重要な手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：We studied effect of long-term exposure to asbestos with MT-2 cells as a regulatory T cell model. It was revealed that long-term exposure to asbestos reduced transcription factors, FoxO1 and FoxP3, in MT-2 cells. Furthermore, FoxO1 target molecules were suppressed by long-term exposure to asbestos. Expression of recombinant FoxP3 enhanced sensitivity to asbestos. These results suggest that exposure to asbestos modifies regulatory T cell function through the inactivation of FoxO1 and FoxP3. These are important to elucidate effect of asbestos on regulatory T cells and tumor immunity.

研究分野：衛生学

キーワード：アスベスト 腫瘍免疫 制御性T細胞 アポトーシス 転写因子

1. 研究開始当初の背景

アスベストは建築資材として幅広く使用されてきたが、肺がんや悪性中皮腫を誘導することから現在では使用が禁止されている。しかしながら、過去の使用歴、あるいは現在の杜撰なビル解体や大震災後の瓦礫処理などの作業により今後もアスベスト曝露に起因する肺がんや悪性中皮腫の患者は増加すると考えられており、アスベストによるがんの発症メカニズムの解明と新たな予防や診断、治療法の開発が望まれている。アスベスト曝露による発がん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が正常細胞の DNA 損傷を引き起こし細胞のがん化を誘導することがよく知られている。これに加えて申請者の所属研究室ではアスベスト曝露が細胞のがん化を誘導するのみならず腫瘍免疫を抑制することでがん細胞の増殖を助長することを提唱している。腫瘍免疫機構では CD4T 細胞や CD8T 細胞、NK/NKT 細胞ががん細胞を攻撃する。一方、制御性 T 細胞は IL-10 や TGF などの抑制性サイトカイン分泌などを介してがん細胞への攻撃を抑制することが知られている。申請者の所属研究室では制御性 T 細胞の性質を保持する培養細胞株 MT-2 を低濃度アスベスト存在下で長期間培養し、アスベスト長期曝露のモデルを樹立している。アスベスト長期曝露細胞は MT-2 親株に対してアポトーシスを誘導する高濃度のアスベストに対する抵抗性を示すとともに、増殖速度の亢進、抑制性サイトカイン (IL-10、TGF) の分泌量の増加などの特徴を示す。これらの結果から、アスベストは制御性 T 細胞に作用し「細胞数の増加」と個々の細胞の「制御性 T 細胞機能の増強」を誘導することが示唆される。

これまでの研究から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いだしている。FoxO1 はアポトーシスや細胞周期進行の調節に関与することが報告されていることから、申請者は shRNA を用いた FoxO1 のノックダウンを実施し、アスベスト曝露によるアポトーシス誘導に FoxO1 が関与することを見いだしていた。一方、FoxP3 は制御性 T 細胞の機能分化に必須の因子として知られている。アスベスト長期曝露細胞では FoxP3 の発現が低下しているにも関わらず抑制性サイトカイン分泌量は増加していることからアスベスト長期曝露細胞は FoxP3 とは独立の分子機構を介して抑制性サイトカイン分泌を調節することが予想された。以上のように、アスベスト長期曝露により制御性 T 細胞の機能を増強する可能性は示されているものの、その基盤となる分子機構についてはほとんど研究が行われていなかった。

2. 研究の目的

制御性 T 細胞は腫瘍免疫の調節に重要な役割を担っている。これまでの解析からアスベ

スト曝露による制御性 T 細胞機能の増強は腫瘍免疫の減弱し、肺がんや悪性中皮腫の成長に密接に関与すると考えられる。本研究では FoxO1 と FoxP3 に着目し、アスベスト長期曝露が制御性 T 細胞のアポトーシスや増殖、抑制性サイトカイン分泌の調節機構に与える影響を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)アスベスト長期曝露 MT-2 細胞および MT-2 親細胞を用いて定量 RT-PCR 法によりアポトーシス調節に関与すると考えられる FoxO1 標的分子群の mRNA 発現量を検討する。

(2)アスベスト長期曝露 MT-2 細胞および MT-2 コントロール細胞を用いて定量 RT-PCR 法やウェスタンブロット法により CDK インヒビターを始めとする各種の細胞周期進行の調節分子の mRNA およびタンパク質発現量を検討する。

(3)FoxP3 発現プラスミドベクターやレトロウイルスベクターを構築し、内在性 FoxP3 の発現の低下している MT-2 アスベスト長期曝露細胞に組換え体 FoxP3 を発現する。FoxP3 発現細胞を用いてアポトーシスやサイトカイン産生の調節における FoxP3 の役割を検討する。

(4)制御性 T 細胞の分化にはマスターレギュレーターである FoxP3 に加えて複数の転写因子やクロマチン制御分子が関与することが報告されている。そこで、アスベスト長期曝露 MT-2 細胞および MT-2 親細胞を用いて定量 RT-PCR 法により制御性 T 細胞分化に関与する遺伝子の mRNA 発現量を解析する。

4. 研究成果

(1)アスベスト長期曝露 MT-2 細胞では親細胞に比べ、FasL、Puma、Bim などのアポトーシス誘導因子の発現量が低下していることを見いだされた。これらの分子はアスベスト誘導アポトーシスのみならず、様々な刺激によるアポトーシス誘導に関与することからアスベスト長期曝露を受けた制御性 T 細胞は各種の生理的アポトーシス誘導刺激に対しても抵抗性を示す可能性が示された。

(2)アスベスト長期曝露細胞では細胞周期進行を抑制する CDK インヒビター p27Kip1 の発現が低下していること、細胞周期進行の促進因子であるサイクリン D2 の発現量が増加していることを見いだされた。従って、アスベスト長期曝露はこれらの分子の転写調節を介して、細胞周期進行を誘導し、細胞数を増加する可能性が示された。

(3)FoxP3 を GFP 融合タンパク質として MT-2 アスベスト長期曝露細胞に発現し、アポトー

シスやサイトカイン産生等の細胞機能の調節における FoxP3 の役割を検討した。その結果、FoxP3 の発現によりアスベスト長期曝露 MT-2 細胞のアポトーシスが誘導されることが見いだされた。なお、転写活性化領域または DNA 結合領域を欠損した変異体 FoxP3 はアポトーシスを誘導しないことから、FoxP3 は標的分子の転写調節を介してアポトーシスを誘導することが示された。そこで、FoxP3 発現細胞に高濃度アスベストの短期曝露を加えたところ、アスベスト曝露によりアポトーシス細胞数は増加した。なお、コントロールベクターを導入したアスベスト長期曝露細胞では同条件のアスベスト曝露ではアポトーシスは誘導されなかった。従って、FoxP3 はアスベスト曝露によるアポトーシスの誘導を担うシグナル伝達分子であることが明らかとなった。以上の結果から、MT-2 アスベスト長期曝露細胞では FoxP3 の発現が低下しているため、高濃度アスベストに対する感受性が低下していることが考えられる。なお、IL-10 と TGF 産生の調節における FoxP3 の役割については現在も解析を継続している。

(4)これまでに、MT-2 アスベスト長期曝露細胞では制御性 T 細胞分化に重要な FoxP3 の発現は低下しているにもかかわらず制御性 T 細胞としての機能が亢進していることを見いだしている。そこで、制御性 T 細胞分化に関与すると考えられている分子群について、定量 RT-PCR 法を用いて mRNA 発現量を検討した。その結果、MT-2 親細胞に比べ、アスベスト長期曝露細胞では転写因子 GATA-1 の発現量が増加していることが見いだされた。GATA-1 は FoxP3 と複合体を形成し、FoxP3 と協調して制御性 T 細胞分化を誘導することが報告されており、アスベスト長期曝露細胞では GATA-1 の発現量の増加により、制御性 T 細胞機能を亢進する可能性がある。

本研究では制御性 T 細胞モデル細胞株 MT-2 を用いて、アスベスト長期曝露により誘導される特徴 1) 高濃度アスベスト抵抗性の獲得 2) サイトカイン産生の亢進の基盤となる分子機構を解明することを目的として、アスベスト長期曝露により発現の低下する FoxO1 と FoxP3 の役割を解析した。その結果、FoxO1 の標的分子として知られる細胞周期調節因子群、アポトーシス誘導因子群の発現量が低下していることが示された。従って、アスベスト長期曝露は FoxO1 の発現低下を介して細胞増殖の亢進とアポトーシスの回避を誘導することが考えられる。一方、FoxP3 は従来、制御性 T 細胞の分化誘導因子として知られていたが、近年の研究によりアポトーシスを誘導することが報告されている。本研究においても、FoxP3 が MT-2 細胞のアポトーシスを誘導することが示されており、FoxP3 の発現低下もアスベスト長期曝露細胞のアスベスト誘導性アポトーシスの回避に関与す

ることが考えられる。これらに加えて、本研究ではアスベスト長期曝露細胞では転写因子 GATA-1 が高発現していることを見いだしており、GATA-1 が FoxP3 の低下を補い、アスベスト長期曝露細胞のサイトカイン産生の増加を誘導する可能性が示された。上記のように本研究によりアスベストが各種の転写因子の発現に作用することが示された。それぞれの転写因子は多様な標的分子の転写調節を担うことから、今後、FoxO1、FoxP3、GATA-1 のシグナル伝達を中心に研究を行うことにより、アスベスト曝露の制御性 T 細胞への作用の詳細と腫瘍免疫への影響が明らかになるとともに、悪性中皮腫や肺がんの新たな予防・診断法の確立につながる知識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 6 件)

1. 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) doi: 10.3892/ijo.2014.2682. 査読有り
2. 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) doi: 10.1155/2014/670140 査読有り
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) doi: 10.1007/s12199-014-0403-9. 査読有り
4. 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) doi: 10.1165/rcmb.2012-01340C.
査読有り

5. 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) doi: 10.1007/s12199-013-0333-y. 査読有り
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) doi:10.1016/j.imbio.2013.04.007. 査読有り

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 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の影響、第85回日本衛生学会学術総会、2015年3月27日 和歌山県民文化会館(和歌山)
2. 松崎 秀紀、李 順姫、前田 恵、武井 直子、西村 泰光、大槻 剛巳、制御性T細胞の調節因子に対するアスベスト長期曝露の影響、第14回分子予防環境医学研究会、2015年2月14日 大阪市立大学医学部(大阪)
3. 松崎 秀紀、李 順姫、前田 恵、武井 直子、西村 泰光、大槻 剛巳 MT-2細胞に対するアスベスト長期曝露の影響 第21回石綿・中皮腫研究会、2014年10月11日 名古屋国際会議場(名古屋)
4. 松崎 秀紀、李 順姫、前田 恵、武井 直子、西村 泰光、大槻 剛巳 ヒトT細胞株 MT-2細胞に対するアスベスト長期曝露の影響、第21回 日本免疫毒性学会学術年会、2014年9月11日 徳島文理大学(徳島)
5. Matsuzaki, H., Lee, S., Maeda, M., Kumagai-takei, N., Nishimura, Y., Otsuki, T. Molecular mechanisms of asbestos-induced apoptosis in MT-2 cells. The 21st The Asian Association

for Occupational Health、2014年
9月2日 ヒルトン福岡シーホーク(福岡)

6. Matsuzaki, H., Lee, S., Maeda, M., Kumagai-takei, N., Nishimura, Y., Otsuki, T. FoxO1 Regulates Apoptosis Induced by Asbestos in the Human T Cell Line MT-2. 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology 2014年3月24日、Phoenix Convention Center, Phoenix (アメリカ合衆国)
7. Matsuzaki, H., Lee, S., Maeda, M., Kumagai-takei, N., Nishimura, Y., Otsuki, T. Molecular basis of asbestos-induced apoptosis in MT-2 cells. 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月13日 幕張メッセ(千葉)
8. Matsuzaki, H., Lee, S., Maeda, M., Kumagai-takei, N., Nishimura, Y., Otsuki, T. Down-regulation of FoxO1 in MT-2 cells induced by long-term exposure to asbestos. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health、2013年10月29日、名古屋国際会議場(名古屋)
9. 松崎 秀紀、李 順姫、前田 恵、武井 直子、西村 泰光、大槻 剛巳 アスベスト長期曝露により発現の低下する FoxO1の役割 第20回日本免疫毒性学会学術集会 2013年9月13日、東海大学代々木キャンパス(東京)

〔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：

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 秀紀 (MATSUZAKI HIDENORI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80335463

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：