

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390178

研究課題名（和文） アスベスト発癌に影響する免疫動態の解明

研究課題名（英文） Anaylisis of immunological alterations affecting asbestos-induced carcinogenesis

研究代表者

大槻剛巳（OTSUKI TAKEMI）

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：40160551

研究成果の概要（和文）：2005年のクボタショック以来アスベスト曝露による悪性腫瘍の発生が問題となっているが、アスベスト曝露の免疫影響が腫瘍発生の素地を形成する可能性を考え検討してきた。その結果、実験系での免疫担当細胞（細胞株や健常人からの新鮮採取細胞）へのアスベスト曝露によって腫瘍免疫の減衰を示唆する所見が得られてきた。今後はその動態を改善することによって予防的分子標的を同定するなどに応用したい。

研究成果の概要（英文）：Since so-called “Kubota-Shock” in 2005, the issue regarding carcinogenesis among the patients exposed to asbestos has been medical and social problem. The aim of this project is to elucidate whether or not asbestos exposure affect on human immune system to tend to induce carcinogenesis. As the results, most of our findings indicate immune alteration caused by asbestos exposure using human cell lines and freshly isolated immune cells proceed to reducing tumor immunity. To find molecular preventive targets regarding immunological effects of asbestos should be performed in the future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：衛生学，環境免疫学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：アスベスト，珪酸，免疫担当細胞，腫瘍免疫，発癌

1. 研究開始当初の背景

2005年のクボタショック以来アスベスト問題とアスベストによって惹起される悪性中皮腫や肺癌の問題は、医学医療のみならず社会的にも大きな問題となった。種々の問題の中で、健康障害については、どのような病気か、あるいは予後がどうなのかといった問題があり国民の不安は非常に強かった。またアスベスト取扱工場の作業員や家族を含めて近隣住民も健診にて発症の早期発見を試みるという現状であるが、それは画像診断に

委ねられている。

一方アスベストは珪酸（シリカ）をコアとして Fe, Mg などが付いた金属塩である。（図4）。そして珪酸曝露者である珪肺症では自己免疫疾患の合併も多く、これは珪酸がヒトの免疫系に影響をもたらすことを示している。

我々は近年抗原に対する反応の制御に関わる制御性T細胞について珪肺症にてその機能や量の喪失が起こっていることを報告してきた。金属塩であるアスベストもコアの珪酸の様に免疫影響があるとすれば合併症か

ら考察して腫瘍免疫の減衰に至る可能性がある。そして細胞株 (MT-2) を用いた短期高濃度曝露では細胞のアポトーシスが誘導されること、さらに低濃度長期曝露を行うとアポトーシスに抵抗性を示すようになることを捉えてきていた。

2. 研究の目的

本研究では、アスベスト曝露が腫瘍免疫の減衰を惹起し、悪性中皮腫や肺癌の発症あるいはその後の加速度的進展に関連することを明らかにするために、その基盤となる免疫担当細胞へのアスベストの影響を観察する。

3. 研究の方法

- 1) 研究開始時に既に樹立している HTLV-1 不死化ヒト T 細胞株のクリソタイル長期低濃度曝露株を用いて、腫瘍免疫に関連する CXCR3 (ケモカイン受容体) 発現とインターフェロン γ 産生との関連、量の増大や機能亢進によって腫瘍免疫を抑制する制御性 T 細胞としての機能を観察する。
- 2) 最も汎用されていたクリソタイルに加えて発癌性が最も高いとされるクロシドライト長期曝露株の樹立とその観察を行う。
- 3) 物質対照としての珪酸曝露について制御性 T 細胞機能減弱について健康人ならびに珪肺症例で検討する。

4. 研究成果

- 1) 課題開始時のクリソタイル長期曝露亜株は 1 株のみであったので普遍的な所見を得ることを目的に他に 5 株を樹立、それらの遺伝子発現プロファイル (図 1) からケモカイン受容体 CXCR3 の発現低下がクリソタイル曝露の影響であることが判明した。

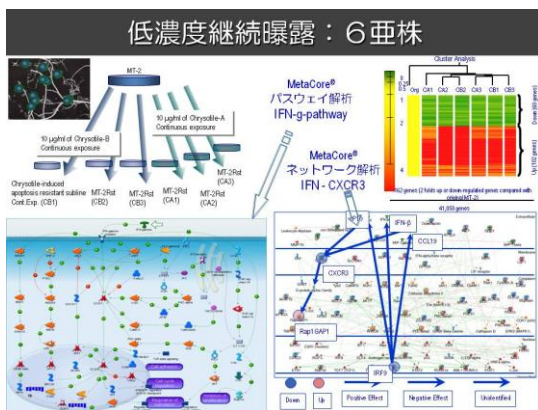


図 1

この結果は、アスベスト曝露症例である胸膜プラーク陽性者や悪性中皮腫症例でも確認された (図 2, 3)。CXCR3 発現細胞は腫瘍免疫に重要なインターフェロン γ 産生とも密接に関連しており、アスベスト曝露者にお

いては採取新鮮 T 細胞を実験的に刺激する時に IFN γ 産生の障害も認められた。

アスベスト曝露症例における CXCR3 発現

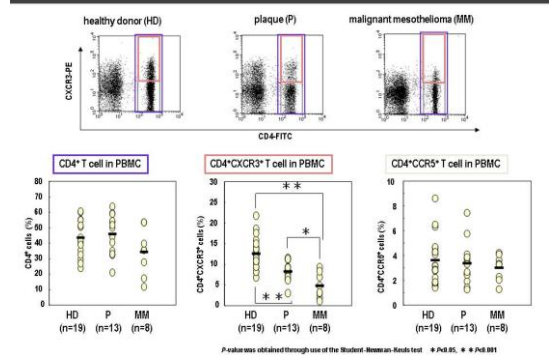


図 2

アスベスト曝露と CXCR3/IFN- γ 経路

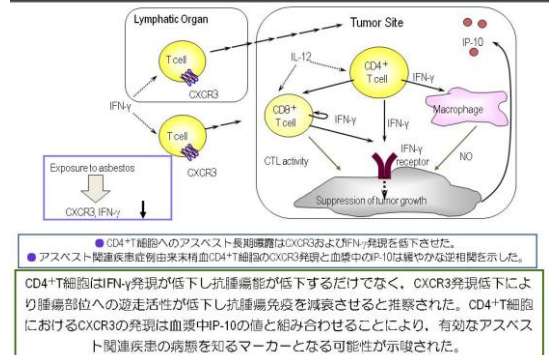


図 3

- 2) 長期曝露株の制御性 T 細胞機能については、アスベスト曝露亜株にてその増強が観察された (図 4)。

アスベスト長期曝露では、腫瘍免疫減衰を惹起する可能性のある制御性 T 細胞の機能が増強する。

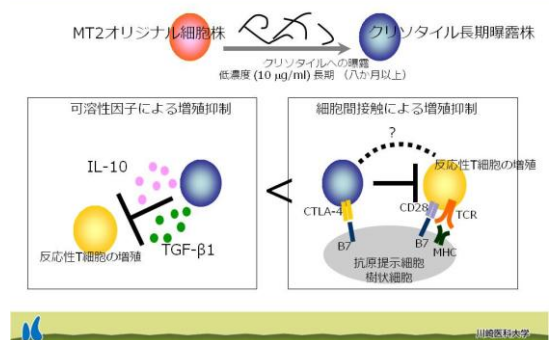


図 4

これには制御性 T 細胞が機能を発揮する時に必要な細胞間接着の面でも機能亢進があると共に、可溶性因子として重要なインターロイキン 10 (IL-10) とトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 1) の産生亢進も伴っていることが分かった。更にこの TGF- β 1 の産生亢進について詳細を検討するとクリソタイル長期曝露を受けた細胞は自ら産生する TGF- β 1 に不応性となり TGF β による増殖

抑制にも抵抗性を示し、受容体からのシグナル伝達経路の活性化と共に、周囲の腫瘍免疫担当細胞の抑制を惹起する可能性が示唆された（図5）。

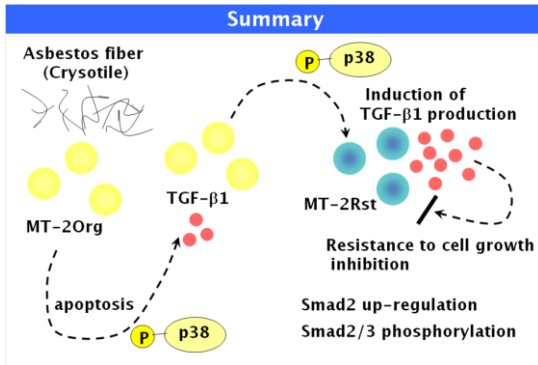


図 5

3) 最も汎用されているクリソタイトの影響を観察することの重要性と共に、使用量は少ないものの鉄の含有と物理的性状によって発癌性はクリソタイトの500倍とも云われるクロシドライトの免疫担当細胞への影響の観察も重要であり、長期低濃度曝露株を樹立した。その結果、濃度比較ではクリソタイトより若干高濃度を必要とするものの、クリソタイト同様に高濃度一過性曝露ではアポトーシスが誘導され、また長期曝露株ではアポトーシス抵抗性の獲得やサイトカイン産生などクリソタイト長期曝露亜株と同様の所見が得られた。しかし、遺伝子発現プロファイルの観察では、可也異なった様相を示している（図7）ので、今後の検討課題とし繊維による免疫担当細胞への影響の違いを検討したい。

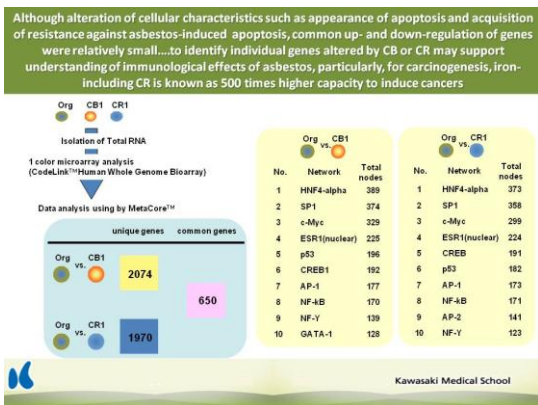


図 6

4) NK 細胞について機能発現に関わるNKp46 活性化受容体の発現低下が重要で、それによってアスベスト曝露者の腫瘍免疫能の指標にも出来る可能性が示唆された（図8）。

5) 物質対照としての珪酸曝露では珪酸曝露が持続的に T 細胞を活性化するとともに、制御性 T 細胞の CD95/Fas 細胞死受容体の高発現を惹起して早期の喪失を促し、その結果制

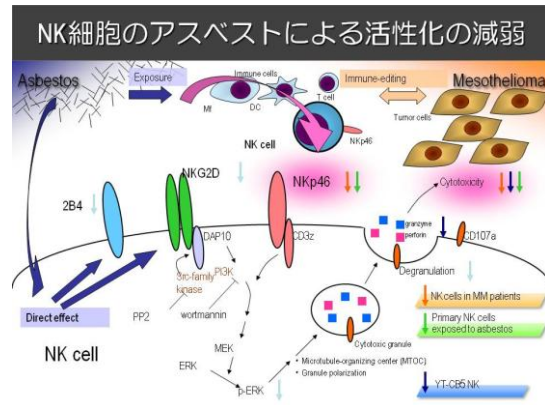


図 7

御性 T 細胞の量の喪失を惹起すると考えられた（図8）。

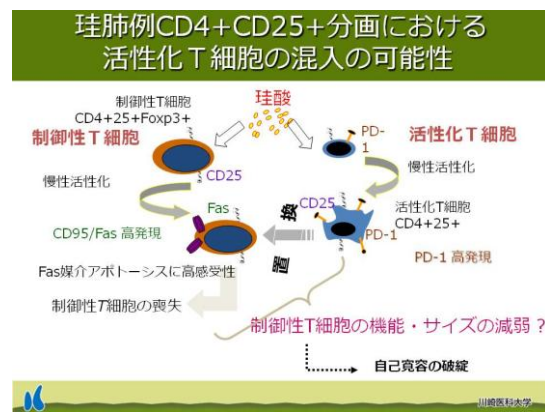


図 8

今後症例での検討を深めるとともに CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞などへの影響を観察、これらの所見を早期診断指標へ応用することや、腫瘍免疫回復による予防へとつなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

[1] Maeda M, Nishimura Y, Hayashi H, Kumagai N, Chen Y, Murakami S, Miura Y, Hiratsuka J, Kishimoto T, Otsuki T. Decreased CXCR3 expression in CD4+ T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients. *Am J Resp Cell Mol Biol* (in press) (査読有)

[2] Maeda M, Nishimura Y, Hayashi H, Kumagai N, Chen Y, Murakami S, Miura Y, Hiratsuka J, Kishimoto T, Otsuki T. Reduction of CXCR3 in an in vitro model of continuous asbestos exposure on a human T-cell line, MT-2. *Am J Resp Cell Mol Biol* (in press) (査読有)

[3] Otsuki T, Hayashi H, Nishimura Y, Hyodo F, Maeda M, Kumagai N, Miura Y, Kusaka M, Urakami K. Dysregulation of autoimmunity caused by silica exposure and alteration of Fas-mediated apoptosis

in T lymphocytes derived from silicosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24(1).(S) (in press) (査読有)

[4] Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Fukuoka K, nakano T, Miura Y, Hiratsuka J, Otsuki T. Suppressive effect of asbestos on cytotoxicity of human NK cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24(1).(S) (in press) (査読有)

[5] Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Hatayama T, Katoh M, Miyahara N, Yamamoto S, Otsuki T. Dysregulation of the Immune System Caused by Silica and Asbestos. *J Immunotoxicol* 7(4):268-278, 2010(査読有)

[6] Hayashi H, Miura Y, Maeda M, Murakami S, Kumagai N, Nishimura Y, Kusaka M, Uragami K, Fujimoto W, Otsuki T. Reductive alteration of the regulatory function of the CD4+CD25+ T cell fraction in silicosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23(4): 1099-1109, 2010(査読有)

[7] Hayashi H. Peripheral regulatory T cell from silicosis patients is susceptible to CD95-mediated apoptosis. *Kawasaki Med J* 36(1): 13-21, 2010(査読有)

[8] 熊谷直子, 西村泰光, 前田恵, 林 宏明, 大槻剛巳. 珪酸・アスベストの免疫影響 (ミニ特集: 繊維・粒子状物質研究会 (仙台). 日本衛生学会誌 2010.64(4).93-499. (査読有)

[9] 林宏明, 西村泰光, 前田恵, 熊谷直子, 村上周子, 三浦由恵, 草加勝康, 浦上更三, 大槻剛巳. 珪肺症例における自己免疫異常の検出—血清可溶性インターロイキン2受容体と可溶性 CD40 リガンドの濃度の意義—日本職業・災害医学会会誌 58(2):45-51, 2010(査読有)

[10] 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* 2009 Jul-Sep;22(3):579-90. (査読有)

[11] 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* 2009 Oct-Dec;22(4):879-88.. (査読有)

[12] 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* 2009 Jan-Mar;22(1):53-62. (査読有)

[13] 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* 35(2): 129-138, 2009(査読有)

[14] 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* 14(4): 216-222, 2009(査読有)

[学会発表] (計 149 件)

(うち国際学会のみ記載)

● *The 50th Anniversary Annual Meeting of Society of Toxicology (U.S.A.). 2011.3.7-10. Walter E. Washington Convention Center, Washington D.C. U.S.A.*

[1] Otsuki T, Maeda M, Kumagai N, Miyahara N, Katoh M, Yamamoto S, hatayama T, Nishimura Y. Continuous and low-dose exposure to asbestos enhances TGF-β1 production in a human adult T cell leukemia virus-immortalized T cell line, MT-2.

[2] Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Otsuki T. Asbestos exposure causes decrease in production of cytokines related to Nk cell activation.

[3] Maeda M, Chen Y, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Miura Y, Otsuki T. Enhanced suppressive function on regulatory T cell-like cell line, MT-2, by continuous exposure to asbestos.

[4] Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Otsuki T. Effect of asbestos exposure on production of cytokines, apoptosis, and cell proliferation related with differentiation of human CTL.

● *14th International Congress of Immunology 2010.8.23-27 Kobe International Exhibition Hall*

[5] Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, fukuoka K, Nakano T, Kishimoto T, Otsuki T. Decreased cytotoxicity of human NK cells with low expression of NK cell-activating receptors upon exposure to asbestos, related with malignant mesothelioma.

[6] Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M,

Hayashi H, Otsuki T. Decreased induction of human CTL upon exposure to asbestos fibers,

[7] Hayashi H, Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Miura Y, Otsuki T. Reduced alteration of the regulatory function of CD4+25+ T cell fraction in silicosis patients.

[8] Otsuki T, Miura Y, Maeda M, Kumagai N, Hayashi H, Nishimura Y. Alteration of cellular characteristics of HTLV-1 immortalized human T cell line, MT-2, by continuous long-term exposure to asbestos, chrysotile and crocidolite.

[9] Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Miura Y, Kishimoto T, Otsuki T. Relevance of chemokine receptor CXCR3 in asbestos-related diseases.

● *The 10th International Congress of the iMiG (International Mesothelioma Interest Group) 2010.8.30-9.02. Kyoto International Conference Center*

[10] Otsuki T, Maeda M, Miura Y, Kumagai N, Hayashi H, Yamamoto S, Nishimura Y. The effects of continuous long-term exposure to asbestos, chrysotile and crocidolite on HTLV-1 immortalized human T cell line, MT-2.

[11] Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Kishimoto T, Otsuki T. Decrease in NKp46 in NK cells upon exposure to asbestos, a possible marker to monitor anti-tumor immunity.

[12] Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Miura Y, Otsuki T. Human MT-2 cell line displays enhanced suppressive function by chronic exposure to asbestos.

[13] Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Kishimoto T, Otsuki T. Suppressing effects of asbestos-exposure on the differentiation of human cytotoxic T lymphocytes, accompanied with decrease in IFN- γ and TNF- α .

● *The 21st Japan China Korea Joint Conference on Occupational Health. 2010.6.10-12. Tochigi-ken Sogo Bunka Center, Utsunomiya, JAPAN*

[14] Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Kishimoto T, Otsuki T. Decreased Cytotoxicity of NK Cells with Low NKp46 Caused by Exposure to Asbestos, Observed in Patients with Mesothelioma.

[15] Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Otsuki T. Exposure to Asbestos Suppressed the Differentiation of Human

Cytotoxic T Lymphocytes.

[16] Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Miura Y, Kishimoto T, Otsuki T. Application of CXCR3 expression in CD4+ T cells to the diagnosis of asbestos-related diseases.

● *ISOEAID'10 in KYOTO (International symposium on Occupational and Environmental Allergy and Immune Diseases 2010 in KYOTO (Local Organizer: Otsuki T) 2010.4.7-9. KYODAI-KAIKAN (Kyoto, Japan)*

[17] Otsuki T, Maeda M, Miura Y, Hayashi H, Kumagai N, Fukuoka K, Nakano T, Kishimoto T, Kusaka M, Urugami K, Nishimura Y. Immunological effects of silica and asbestos.

[18] Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Fukuoka K, Nakano T, Kishimoto T, Otsuki T. Suppressing effect of asbestos on cytotoxicity of human NK cells.

[19] Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Miura Y, Kishimoto T, Otsuki T. Analysis of immune index in asbestos-related disease.

[20] Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Otsuki T. Differentiation into human cytotoxic T lymphocytes are suppressed under exposure to asbestos.

● *The Society of Toxicology (SOT) The 49th Annual Meeting in Salt Lake City, Utah, March 7-11, 2010.*

[21] Otsuki T, Maeda M, Kumagai N, Hayashi H, Nishimura Y. Effects of asbestos on T-lymphocytes and NK cells in the development of tumor immunity.

[22] Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Kishimoto Y, Otsuki T. Asbestos-exposure causes suppressed expression of NKp46 with low cytotoxicity in NK cells, related with malignant mesothelioma.

[23] Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Miura Y, Kishimoto T, Otsuki T. Functional analysis of human CD4+ T cells with decreased CXCR3 expression by long-term, low-dose exposure to asbestos.

[24] Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Otsuki T. Suppressing effects of asbestos-exposure on the differentiation into human cytotoxic T lymphocytes

● *第2回日中石綿シンポジウム, New Century Zhejiang Resort Hangzhou, Hangzhou, China 2009.4.17-18.*

[25] Nishimura Y, Maeda M, Kumagai N, Murakami S, Hayashi H, Kishimoto T,

Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T. Suppressive effect of asbestos-exposure on cytotoxicity of human NK cells, and the possibility of NKp46 as a marker to monitor immune status in people exposed to asbestos.

● *The 48th Society of Toxicology (USA) 2009.3/15-19. Baltimore Convention Center in Baltimore, Maryland*

[26] Otsuki T, Maeda M, Murakami S, Miura Y, Kumagai N, Chen Y, Hayashi H, Nakano T, Fukuoka K, Kishimoto T, Nishimura Y. Immunotoxicological effects of asbestos on human T cells.

● *Inetrnational Mesothelioma Interest Group. Congress 2008. Amsterdam. 2008.9.25-27.*

[27] Otsuki T, Maeda M, Murakami S, Hayashi H, Kumagai N, Miura Y, Ying C, Kuribayashi K, Fukuoka K, Kishimoto T, Nakano T, Nishimura Y. Immunological changes in mesothelioma patients and their experimental detection.

[28] Nishimura Y, Maeda M, Murakami S, Hayashi H, Miura Y, fukuoka K, Nakano T, Otsuki T. Impairment in cytotoxicity and expression of NK-cell activating receptors on human NK cells caused by exposure to asbestos fibers.

[29] Maeda M, Nishimura Y, Murakami S, Kumagai N, Hayashi H, Ying C, Miura Y, Nakano T, Kishimoto T, Otsuki T. Down-regulation of chemokine receptor CXCR3 in peripheral T lymphocytes from patients with asbestos-related disease.

● *AAI (Asian Asebestos Initiative) International Conference in Kitakyushu, Japan. 2008.10.1-3.*

[30] Otsuki T. Keynote Speach (3). Achivement of Research Project "Comprehensive approach on asbestos-related diseases (sponsored by SCFPST)" and immunological effects of asbestos.

[図書] (計 7 件)

[1] Kumagai N, Hayashi H, Maeda M, Miura Y, Nishimura Y, Fujimoto W, Otsuki T. Immunological effects of silica and related dysregulation of autoimmunity. Autoimmune Disorder / Book 1, ISBN: 978-953-308-70-9, Inech Open Access Publisher (in press)

[2] Hayashi H, Nishimura Y, Hyodo F, Maeda M, Kumagai N, Miura Y, Kusaka M, Uragami K, Otsuki T. Dysregulation of Autoimmunity Caused by Silica Exposure:

Fas-Mediated Apoptosis in T Lymphocytes Derived from Silicosis Patients. IN. Autoimmune Disorders: Symptoms, Diagnosis and Treatment. Editors: Maria E. Petro ISBN: 978-1-61761-698-3. Nova Science Publishers, Inc.. Hauppauge, NY, p293-301

[3] 前田恵. アスベスト曝露が誘導するヒト T 細胞の TGF- β 産生促進と制御性 T 細胞の関連性. In 平成 20 年度両備てい園記念財団研究所製金による研究報告書. 生物学に関する試験論叢 第 25 集, pp135-144, 2010

[4] 西村泰光, 大槻剛巳, 前田恵, 熊谷直子. アスベスト-シス, シリコーシス. In 分子予防環境医. 松島綱治. 本の泉社 東京, pp691-702

[5] 大槻剛巳, 西村泰光, 前田恵, 三浦由恵, 熊谷直子, 林宏明. アスベストの免疫影響. In 住居医学 (IV). 筏義人, 吉田修 (編著). 米田出版 千葉県市川市. 2010 年 8 月 5 日初版. pp93-113.

[6] 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, ISBN 978-1-60692-053-4, © 2009 Nova Science Publishers, Inc. 2009, pp185-193

[7] 林宏明, 西村泰光, 前田恵, 大槻剛巳. アスベスト-シス. In 炎症・再生医学事典. 編: 松島綱治, 西脇徹. pp 269-271. 朝倉書店, 東京, 2009 (ISBN978-4-254-30099-4 C3547)

[その他]

川崎医科大学衛生学教室 HP に研究概要を紹介 <http://www.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大槻 剛巳 (OTSUKI TAKEMI)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40160551

(2) 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
前田 恵 (MAEDA MEGUMI)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号: 2043988
熊谷 直子 (KUMAGAI NAOKO)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00509276
村上 周子 (MURAKAMI SHUKO)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50454848