

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700933

研究課題名（和文） T細胞CXCR3発現の悪性中皮腫早期診断・予防マーカーとしての有用性

研究課題名（英文） Application of CXCR3 expression in T cells for early diagnostics and prevention of malignant mesothelioma

研究代表者

前田 恵（MAEDA MEGUMI）

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：20434988

研究成果の概要（和文）：アスベスト起因性胸膜プラークおよび悪性中皮腫症例の末梢 CD4<sup>+</sup>T 細胞はケモカインレセプターCXCR3 発現が健康人に比べて有意に低下しており，IFN- $\gamma$  発現は悪性中皮腫症例のみで有意に低下していることを見出した。実験的にヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞へのアスベスト慢性曝露は CXCR3 と IFN- $\gamma$  発現誘導を阻害する一方で，IL-17 発現を高めることを示し，免疫担当細胞へのアスベスト曝露は抗腫瘍免疫機能の減弱に加えて，腫瘍の増殖促進に関与する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：The expression of CXCR3 in peripheral CD4<sup>+</sup>T cells was decreased in asbestos-related patients with pleural plaque and malignant mesothelioma, and IFN- $\gamma$  expression was impaired in only patients with malignant mesothelioma. Additionally, *in vitro* study showed that IL-17 expression was enhanced while CXCR3 and IFN- $\gamma$  expression were suppressed by chronic exposure of CD4<sup>+</sup>T cells to asbestos. These results suggested that chronic exposure to asbestos might induce impairment of antitumor immune function and promotion of tumor proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腫瘍学，がん疫学・予防

キーワード：アスベスト，悪性中皮腫，胸膜プラーク，抗腫瘍免疫，ケモカインレセプター，サイトカイン

1. 研究開始当初の背景  
アスベスト慢性曝露による悪性中皮腫は 30

～50 年という長期潜伏期間を経て発症し，また，その予後が非常に悪いという理由で早期

診断が重要な鍵となっている。これまでにアスベスト繊維の一種であるクリソタイルが HTLV-1 不死化 T 細胞株 MT-2 や末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞への慢性曝露により、活性化 T 細胞や Th1 型 T 細胞に発現しているケモカインレセプター CXCR3 の細胞膜における発現と IFN- $\gamma$  産生を低下させることを見出し、更に、末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞における CXCR3 の細胞膜における発現は、健常人 (HD) に比べてアスベスト起因性胸膜プラーク症例 (PP) と悪性中皮腫症例 (MM) で有意に低いことを明らかにした。つまり、末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞における CXCR3 発現は、予防医学的に、抗腫瘍免疫機能の減衰を示す早期免疫診断指標となる可能性が示唆され、アスベスト曝露によって生じた CXCR3 発現低下 T 細胞の免疫機能評価による有用性の実証が必要となった。

## 2. 研究の目的

(1) アスベスト曝露後の免疫指標として CXCR3 の有用性を確認するため、HD, PP, MM の末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞について、抗腫瘍免疫を活性化する IFN- $\gamma$  の遺伝子発現と産生量を測定し、CXCR3 発現低下と抗腫瘍免疫機能の関連性について解析を行った。

(2) 腫瘍の増殖に関与しており治療標的として注目されている Th17 細胞から産生される炎症性サイトカイン IL-17 について、*in vitro* で石綿慢性曝露した CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 細胞の IL-17 発現を解析し、CXCR3 および IFN- $\gamma$  発現の関連性について検討することを目的とした。

(3) CXCR3 発現低下による細胞遊走活性変化を TAXIScan により測定することを目的とした。

(4) アスベスト曝露が樹状細胞の分化に与える影響を解析し、樹状細胞を介した CD4<sup>+</sup> T 細胞の CXCR3 発現変化を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) HD, PP, MM の末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、培養 5 日目の IFN- $\gamma$  遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR で解析し、培養上清の IFN- $\gamma$  を CBA 法で測定した。得られた結果は末梢血 CD4<sup>+</sup> T 細胞における CXCR3 発現との相関解析に供した。

(2) 健常人由来の末梢血単核球細胞からセルソーター (FACS Aria) によって CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 細胞を分取した。細胞は、抗 CD3/CD28 抗体で刺激し IL-2 存在化で増殖させ、白石綿存在・非存在化で培養した。曝露 4 週間後に白石綿を除去した細胞は、フローサイトメーターによる細胞膜の CXCR3 発現解析、IL-17 と IFN- $\gamma$  の細胞内発現解析、リアルタイム RT-PCR による ROR $\gamma$ t と T-bet の発現解析に供した。

(3) CD4<sup>+</sup> T 細胞を分取し、抗 CD3/CD28 抗体で刺激後、培養 3 日目の CXCL9, CXCL10, CXCL11 に対する遊走活性の TAXIScan による測定系の構築を行った。

(4) 末梢血 CD14<sup>+</sup>単球を IL-4 と GM-CSF により未成熟樹状細胞を分化させる際に、白石綿曝露を 5, 10  $\mu$ g/ml で行い、CD80, CD86, HLA-DR の発現をフローサイトメーターで解析した。CD4<sup>+</sup> T 細胞は、抗 CD3 抗体と白石綿曝露した樹状細胞を用いて刺激し、培養 7 日目にチミジンの取り込みにより細胞増殖を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) MM における IFN- $\gamma$  遺伝子発現は HD, PP に比べて有意に低下していたが, 培養上清中の IFN- $\gamma$  値に有意差は認められなかった。CD4<sup>+</sup> T 細胞の細胞膜 CXCR3 発現と培養 5 日目の IFN- $\gamma$  遺伝子発現の相関性は, 有意差はなかったが, HD は緩やかな正の相関性を示し, 予想と反して PP は逆相関を示した。また, MM はいずれの発現も低いため相関性を示さなかった。本研究結果から CXCR3 発現低下とは異なり, CD4<sup>+</sup> T 細胞の IFN- $\gamma$  産生能の減弱はアスベスト曝露と中皮腫の存在により誘導されることが示唆され, 腫瘍を持たない PP では IFN- $\gamma$  産生能が維持されているため抗腫瘍免疫機能がある程度保たれていると推察された。まとめると, アスベスト曝露は CXCR3 発現低下により正常な細胞遊走活性の破綻と, 腫瘍発生による IFN- $\gamma$  産生能の低下により抗腫瘍免疫機能を減衰させると考えられた。

(2) CD4<sup>+</sup> T 細胞と CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 細胞の CXCR3 発現は, CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 細胞に比べると低いが, 抗 CD3/CD28 抗体刺激により高まり, 白石綿曝露により低下した。一方, CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 細胞の CXCR3 発現は石綿曝露で変化しなかった。IFN- $\gamma$  発現は, 白石綿曝露により全ての細胞において阻害された。IL-17 発現は, 白石綿曝露により全ての細胞において高まっており, 中でも CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 細胞において発現の高い細胞が顕著に認められた。また, 抗 CD3/CD28 抗体刺激した CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>T 細胞は, 白石綿曝露によって Th1 細胞の転写因子である T-bet 発現が阻害される一方で, Th17 細胞の転写因子である ROR $\gamma$ t の発現が高められており, 白石綿曝露による IFN- $\gamma$  産生阻害,

IL-17 産生促進したサイトカイン産生変化の結果と一致していた。これらの結果から, 中皮腫症例の末梢 CD4<sup>+</sup> T 細胞の CXCR3 発現低下は石綿曝露による CXCR3 発現誘導の阻害と, CXCR3 発現細胞の減少により生じており, 石綿曝露は Th1 型の CXCR3 発現誘導と IFN- $\gamma$  産生を阻害することで抗腫瘍免疫機能の減弱を引き起こし, IL-17 を産生する ROR $\gamma$ t 陽性細胞を誘導することで腫瘍の増殖を促す可能性が示唆された。

(3) 抗 CD3/28 抗体刺激した CD4<sup>+</sup> T 細胞は, 4  $\mu$ m chip, 1% FCS を含むアッセイ培地を用いた条件で  $1 \times 10^{-5}$  M の CXCL10 に対して走化性を示した。CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup> T 細胞の遊走活性は測定中である。

(4) 未分化樹状細胞は白石綿曝露により CD80 の発現低下と CD86 と HLA-DR の発現上昇を示した。また, CD4<sup>+</sup> T 細胞の増殖は白石綿曝露した樹状細胞を使用することで高まった。CD4<sup>+</sup> T 細胞の CXCR3 発現に与える影響は解析中である。

#### 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 8 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<sup>+</sup> T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **45**, 795-803 (2011) 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 CXC chemokine receptor 3 in an *in vitro* model of continuous exposure to asbestos in a human T-cell line, MT-2. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, **45**, 470-479 (2011) 査読有

③ Maeda M, Nishimura Y, Kumagai N, Hayashi H, Hatayama T, Katoh M, Miyahara N, Yamamoto S, Hirastuka J, Otsuki T. Dysregulation of the immune system caused by silica and asbestos. *J Immunotoxicol.*, **7**, 268-278 (2010) 査読有

[学会発表] (計22件)

① 前田 恵, アスベスト曝露モデル T細胞の免疫機能変化と悪性中皮腫, 第82回日本衛生学会学術総会 日本衛生学会研究活性化基金 平成22年度 若手プロジェクト研究企画セッション (招待講演), 平成24年3月26日, 京都大学吉田キャンパス

② 前田 恵, 白石綿慢性曝露は *in vitro* でヒト末梢 CD4 陽性 T細胞の IL-17 産生を誘導する, 第18回日本免疫毒性学術大会, 平成23年9月9日, 千葉大学けやき会館

③ 前田 恵, アスベスト曝露モデル T細胞による悪性中皮腫の免疫診断指標確立に向けて, 第339回医学研究の基礎を語り合う集い (招待講演), 平成23年9月7日, 東京慈恵会医科大学

④ 前田 恵, アスベスト曝露による中皮腫発症を免疫学的観点から考える, 日本農芸化学会中四国支部 第4回 農芸化学の未来開拓セミナー (招待講演), 平成23年5月21日, 岡山大学 津島キャンパス

⑤ Megumi Maeda, Enhanced suppressive function on regulatory T cell-like cell line, MT-2, by continuous exposure to asbestos, Society of Toxicology's 50th Annual Meeting, March 7<sup>th</sup>, 2011, Walter E.

Washington Convention Center  
(Washington, DC)

⑥ 前田 恵, CXCR3 発現と IFN- $\gamma$  産生を指標としたアスベスト関連疾患の抗腫瘍免疫機能予測, 第51回日本肺癌学会, 平成22年11月3日, 広島国際会議場

⑦ Megumi Maeda, Down-regulation of CXCR3 in CD4+ T cells exposed to asbestos and peripheral CD4+ T cells in patients with malignant mesothelioma, 文科省科研費「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」平成22年度 がん若手研究者ワークショップ, 平成22年9月2日, アートランドホテル蓼科

⑧ Megumi Maeda, Relevance of chemokine receptor CXCR3 in asbestos-related diseases, 14th International Congress of Immunology, 2010年8月23日, 神戸ポートピアホテル神戸国際展示場

⑨ Megumi Maeda, Application of CXCR3 expression in CD4+ T cells to the diagnosis of asbestos-related diseases., The 21st Japan China Korea Joint Conference on Occupational Health., 平成22年6月25日, 栃木県総合文化センター

⑩ Megumi Maeda, Analysis of immune index in asbestos-related disease., International symposium on Occupational and Environmental Allergy and Immune Diseases 2010, 平成22年4月8日京大会館

[図書] (計6件)

① Nishimura Yasumitsu, Maeda Megumi et al., InTech Open Access Publisher, Chapter title: Effect of asbestos on anti-tumor immunity and immunological alteration in patients with mesothelioma.

In Malignant Mesothelioma (2012) in press

② 西村 泰光, 前田 恵, 他, 本の泉社,  
分子予防環境医学 「アスベストosis, シ  
リコーシス」 (2010) 12 ページ

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 恵 (MAEDA MEGUMI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：20434988

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし