

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 5 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15238

研究課題名(和文) 鉱物油の免疫学的影響

研究課題名(英文) Immunological effect of mineral oil

研究代表者

黒田 嘉紀 (Kuroda, Yoshiki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50234620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)： 鉱物油の免疫学的影響について、鉱物油を投与したマウスの腹腔細胞、脾臓細胞を使用しT細胞、マクロファージ細胞及びB細胞への影響についてFCMを使用し、細胞表面レセプターについて検討した。T細胞ではCD28、ICOS、CD40L、PD1が増加していた。またマクロファージ及びB細胞についてはCD28、ICOS、CD40LのリガンドであるICOS-L、CD40、PD-L1 PD-L2はいずれも低下していた。これらの結果からT細胞は刺激され、マクロファージ細胞及びB細胞抑制される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： I examined the immunological influence of mineral oil by using mouse. We injected pristine, squalene and laxative (mixture of the mineral oil) to mouse peritoneal cavity. And I evaluated the effect to T cell, Macrophage cell and B cell of mineral oil. We extracted single cells from peritoneal cavity and spleen. We separated the extracted cells to T cells, Macrophage cells and B cells. We evaluated T cell surface receptors (CD28, ICOS, CD40L, PD1). Expression of all surface receptors were increased. Macrophage cell has ICOS-L, CD40, PD-L1, PD-L2 surface receptors. The expressions of all surface receptors were decreased. On the other hand, we evaluated the effect to B cell. B cell has ICOS-L, CD40, PD-L1 surface receptors too. The expression of all surface receptors were also decreased. Pristane, squalene and laxative were same effect to T cell, Macrophage cell and B cell. From these results, mineral oil could stimulate T cell but suppress Macrophage cell and B cell.

研究分野： 公衆衛生

キーワード： 鉱物油 自己抗体 マウス T細胞

1. 研究開始当初の背景

石油からは芳香族炭化水素を代表とする環状炭化水素と潤滑油に代表させる鎖状炭化水素が分離精製、合成される。環状炭化水素は毒性も強く、これまで多くの研究がなされ、物質によっては管理濃度も設定されている。一方鎖状炭化水素の内、飽和炭化水素で炭素数の多い物質は鉱物油として総称され、精製油の毒性はないとされ、潤滑油ばかりでなく、食品、医薬品や化粧品に広く使用されている。従って我々は食品、医薬品、化粧品や排ガスを通して鉱物油に頻繁に暴露されている。

そんな中、1995年鉱物油の1つであるプリスタンがマウスに自己抗体を誘導することを Satoh らが報告(Satoh *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995)し、鉱物油の潜在的危険性(免疫学的影響)が指摘された。研究代表者は Satoh らの研究を参考にして、便秘薬として使用されている鉱物油が自己抗体を誘導することをマウスで報告した(Kuroda *et al.*, Toxicol Sci, 2004)。またワクチンのアジュバントとして使用されている鉱物油(IFA やスクワレン)にも自己抗体誘導能があることも示した(Kuroda *et al.*, Biomed Pharmacother, 2004)。さらに我々は H18-H19 年の科学研究費補助金で、ディーゼル排ガス中の鉱物油の影響について研究した。排ガスをマウスに直接暴露しても自己抗体は誘導されなかったが、排ガスに含まれるヘキサデカン(鉱物油の一種)が自己抗体を誘導することを示した(Kuroda *et al.*, Toxicology, 2006)。これらの研究から鉱物油投与マウスでは自己抗体が誘導されるだけでなく、鉱物油の分子量が小さいほど自己抗体誘導能が高いことを示した。

さらに我々は鉱物油による自己抗体誘導のメカニズムについて研究を進めるために、抗体誘導の責任細胞である T 細胞について

検討した。鉱物油投与マウスでは T 細胞のシグナル伝達経路の CD3 の減少が観察され、CD3 の減少は mRNA 発現が低下することで起こることもわかった。しかしこの CD3 の低下が自己抗体誘導とどのように関係しているかは現時点では不明である。

2. 研究の目的

前述したように鉱物油投与で自己抗体が誘導され、鉱物油投与マウスの T 細胞では CD3 が減少していた。CD3 は T 細胞のシグナル伝達経路の 1 要素であることから、この CD3 の減少は抗原提示細胞から T 細胞への情報伝達を抑制することが推測された。そこで本応募研究課題では、実際に T 細胞、B 細胞、抗原提示細胞がどのような反応をしているか検討した。

3. 研究の方法

1) CD3 の評価

CD3 低下のメカニズムについて検討した。

方法

プリスタン 0.5ml、PBS0.5ml(コントロール)を 3 ヶ月齢 BALB/c マウス腹腔内に投与する。3 ヶ月後脾臓細胞を採取する。

採取した細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR およびリアルタイム PCR にて HRES-1/Rab4 および CD3 の mRNA 量を評価した。

2) T 細胞、マクロファージ細胞および B 細胞の細胞表面レセプターの評価

鉱物油による、T 細胞、マクロファージ細胞および B 細胞の細胞表面レセプターである CD28、ICOS、CD40L、PD1、ICOS-L、CD40、PD-L1、PD-L2 への影響について FCM (Flow cytometry) で評価した。ここでは鉱物油としてプリスタン、スクワレン

及び 3 種類の便秘薬（鉱物油の混合物）を使用した。

方法

プリスタン、スクワレン及び 3 種類の便秘薬（鉱物油の混合物）0.5ml と PBS0.5ml（コントロール）を 3 ヶ月齢 BALB/c マウス腹腔内にそれぞれ投与する。3 ヶ月後腹腔細胞、脾臓細胞を採取する。

上述の細胞からマイクロビーズ法（MACS）を使用して T 細胞、マクロファージ細胞および B 細胞を抽出する。

T 細胞は CD28、ICOS、CD40L、PD1 抗体で染色し、マクロファージ細胞および B 細胞は ICOS-L、CD40、PD-L1、PD-L2 抗体で染色した。

FCM を使用してそれぞれの細胞表面レセプターの発現量を評価した。

4. 研究成果

1) CD3 の評価

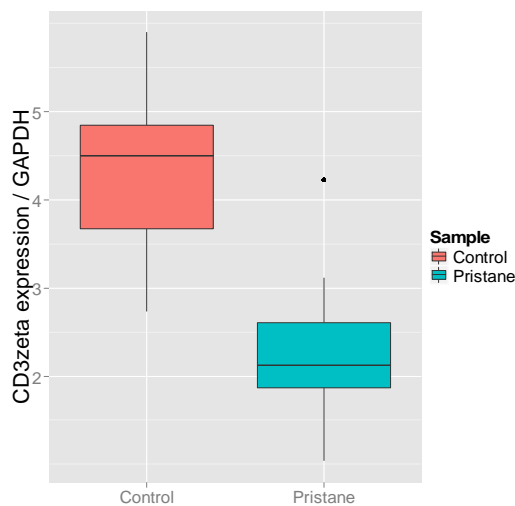


図 1 CD3 の mRNA 量をリアルタイム PCR で評価。プリスタン投与マウスで低下していることがわかった。

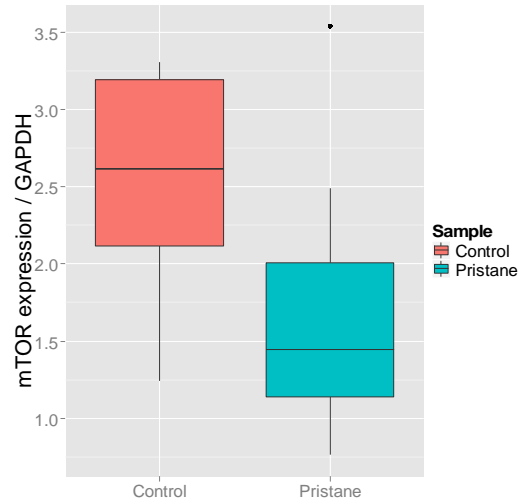


図 2 mTOR の発現量を mRNA で評価した。プリスタン投与マウスで低下していることがわかった。

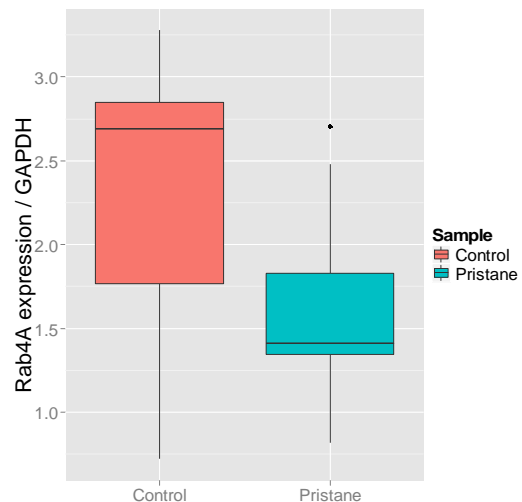


図 3 Rab4A の発現量を mRNA で評価した。プリスタン投与マウスで低下していることがわかった。

以上のことから CD3 の mRNA は低下していた。代謝に関係する mTOR や Rab4A も低下していることがわかった。

2) T 細胞、マクロファージ細胞および B 細胞の細胞表面レセプターの評価
プリスタンに加えて、スクワレン及び 3 種の便秘薬（鉱物油の混合物）を投与し、T

細胞、マクロファージ細胞及び B 細胞への影響について検討した。

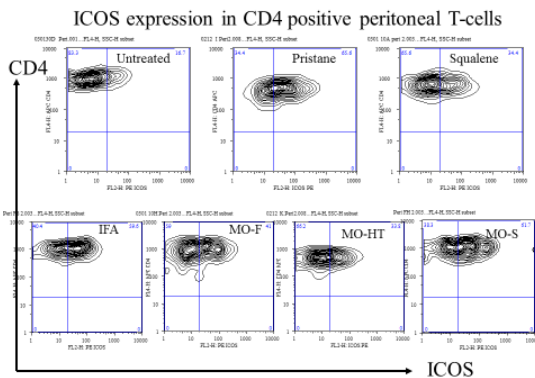


図 4 CD4 陽性 T 細胞について、表面レセプターである ICOS を FCM で評価した結果 (分析例)

Untreated=PBS

Pristane = プリスタン

Squalene = スクワレン

IFA = Incomplete Freund's Adjuvant

MO-F,MO-HT,MO-S は便秘薬 3 種

	CD28		ICOS		CD40L		PD-1	
	腹腔	脾臓	腹腔	脾臓	腹腔	脾臓	腹腔	脾臓
Pristane	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑
Squalene	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑
MO-F	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑
MO-HT	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑
MO-S			↑	↑		↓		

図 5 腹腔細胞および脾臓細胞由来の T 細胞について CD28, ICOS, CD40L, PD-1 の発現量をコントロールと比較した。これらの表面レセプターはおおむね上昇していた。

	ICOS-L		CD40		PD-L1		PD-L2	
	腹腔	脾臓	腹腔	脾臓	腹腔	脾臓	腹腔	脾臓
Pristane	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Squalene	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑
MO-F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
MO-HT	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
MO-S	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

図 6 腹腔細胞および脾臓細胞由来のマクロファージ細胞について ICOS-L, CD40, PD-L1, PD-L2 の発現量をコントロールと比較した。これらの表面レセプターはおおむね低下していた。

	ICOS-L		CD40		PD-L1	
	腹腔	脾臓	腹腔	脾臓	腹腔	脾臓
Pristane	↓	↓	↓	↓		
Squalene			↓	↓	↑	
MO-F			↓	↓	↓	
MO-HT	↓	↓	↓	↓	↓	↓
MO-S			↓	↓	↓	↑

図 7 腹腔細胞および脾臓細胞由来の B 細胞について ICOS-L, CD40, PD-L1 の発現量をコントロールと比較した。これらの表面レセプターはおおむね低下していた。

これまでの研究から鉱物油をマウスに投与すると、自己抗体を誘導することがわかった。また人自己免疫疾患と同様に、T 細胞レセプターの CD3 が減少することも以前の研究で判明した。CD3 の減少は mRNA の減少によっていることが今回の結果からも示された。

自己抗体誘導には T 細胞、マクロファージ細胞および B 細胞が関係することから、我々は自己抗体誘導に関係する T 細胞、マクロファージ細胞、B 細胞が鉱物油の刺激でどのように影響受けるか検討した。

研究ではマウスの腹腔内にプリスタン、スクワレン及び 3 種の便秘薬 (鉱物油の混合物) を投与し、3 ヶ月後に腹腔細胞、脾臓細胞を抽出した。その細胞の中から T 細胞、マクロファージ細胞、B 細胞をマイクロビーズ法によって分離し、各細胞のレセプターである CD28, ICOS, CD40L, PD1, ICOS-L, CD40, PD-L1, PD-L2 について検討した。

CD28, ICOS, CD40L, PD1 は T 細胞の表面に存在するレセプターであり、CD28, ICOS, CD40L は T 細胞に対して抑制的に働き、PD1 は刺激的に作用する。図 5 からわかるように抑制作用を持つ CD28, ICOS, CD40L は増加し、刺激作用を持つ PD1 も上昇していた。またこの傾

向は、プリスタン、スクワレン及び便秘薬でほぼ同様であった。

次にマクロファージ細胞について検討した。マクロファージ細胞は抗原提示細胞であり、T細胞レセプターのCD28、ICOS、CD40LのリガンドであるICOS-L、CD40、PD-L1、PD-L2を有している。ICOS-L、CD40、PD-L1、PD-L2の発現はプリスタン、スクワレン及び便秘薬で低下していた(図6)。同様にB細胞についてもICOS-L、CD40、PD-L1について検討したが、プリスタン、スクワレン及び便秘薬でいずれも低下していた(図7)。

このようにT細胞では抑制系レセプター、刺激系レセプターの発現は上昇している、一方、抗原提示細胞であるマクロファージあるいはB細胞では、T細胞レセプターのリガンドであるレセプター発現は低下していることがわかった。

以上から、鉱物油の投与でT細胞は刺激され、マクロファージ細胞およびB細胞は抑制されている可能性が考えられた。この結果が自己抗体誘導とどのように関係するか今後研究を進めたい。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

黒田 嘉紀 (Kuroda Yoshiki)

宮崎大学・医学部・教授