

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790411

研究課題名 (和文) アスベスト曝露が引き起こす腫瘍免疫の減衰と悪性中皮腫の発生

研究課題名 (英文) Suppression of antitumor immunity and incidence of malignant mesothelioma induced by exposure to asbestos

研究代表者

前田 恵 (MAEDA MEGUMI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：20434988

研究成果の概要：

HTLV-1 不死化 T 細胞株 MT-2 にアスベスト繊維の一種であるクリソタイルを低濃度長期曝露しクリソタイル耐性を獲得した細胞株を樹立することにより、アスベスト繊維曝露は CD4 陽性 T 細胞の IFN- γ 産生を抑制する一方で、IL-10, TGF- β 1 産生を促進することを示唆した。耐性株では Th1 型の T 細胞に発現しており細胞遊走に関わるケモカインレセプター CXCR3 の発現低下も生じており、アスベスト曝露による抗腫瘍免疫の減衰を推察できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

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，悪性中皮腫，腫瘍免疫，IL-10，TGF- β 1，制御性 T 細胞，CXCR3，IFN- γ

1. 研究開始当初の背景

アスベスト（石綿）繊維は安価で耐久性、保温性、電気絶縁性などの優れた性質を有するため多くの工業製品や建築資材に用いられてきた。しかしながらアスベスト曝露による悪性中皮腫の発症が 2005 年に社会問題となり、その使用は厳しく禁止されることとなった。また、悪性中皮腫は潜伏期間が 30～50 年と長期に渡り、低濃度曝露であっても発症することから、これまでのアスベスト使用量から予想される患者数は増加を続け 2030 年

頃にピークを迎えると懸念されていた。この問題を解決すべく、アスベスト曝露による中皮細胞の発癌機構や、アスベストを取り込んだ肺胞マクロファージから産生される炎症性物質の発癌への関与など様々な研究が行われていたが、免疫担当細胞へのアスベスト曝露と抗腫瘍免疫減衰の関連性は未解明であった。その上、中皮腫の治療としては外科療法、放射線療法、化学療法発症を施されるが、進行が速く予後が悪い疾患のため早期の診断が重要視されており、免疫担当細胞へ

のアスベスト曝露によって発現変動する分子を同定し、新たな診断指標を確立することに期待が持たれた。

2. 研究の目的

アスベスト繊維の骨格構造である珪酸吸入曝露によって生じる珪肺症は全身性エリテマトーデス (SLE) や強皮症などの自己免疫疾患を合併することが知られており、我々はこれに珪酸曝露によって慢性的に活性化された CD4 陽性 T 細胞が介在していることを報告してきた。しかしながら、珪酸金属塩であるアスベスト繊維が免疫系に及ぼす影響は未解明であり、CD4 陽性 T 細胞への曝露は免疫異常を誘発し、腫瘍発生の一因となる抗腫瘍免疫の減衰を低下させる可能性が考えられた。興味深いことに、高濃度のアスベスト曝露はヒト末梢血単核球 (PBMC) や HTLV-1 不死化 T 細胞株 MT-2 (MT-2Org) にアポトーシスを誘導するが、MT-2Org へ使用量の高いアスベスト繊維であるクリソタイルを低濃度長期曝露 (10 µg/ml, 8 ヶ月間以上) するとクリソタイルが誘導するアポトーシスに抵抗性を獲得する。これまでに、このアスベスト耐性株 (MT-2Rst) は Src family kinase を介するシグナル経路が活性化しており、IL-10 産生促進、STAT3 のリン酸化によって抗アポトーシスタンパク質 bcl2 の発現が亢進し、アスベスト耐性を獲得することを見出してきた。そこで本研究では、MT-2 細胞を用い、細胞増殖抑制能を有し T 細胞の活性化や分化を抑制することにより抗腫瘍免疫を減衰させる、もうひとつの抗炎症性サイトカイン TGF-β1 についてアスベスト低濃度長期曝露による産生変化を解析するとともに、アスベスト耐性株の遺伝子発現変動をスクリーニングし、予防医学的に有用なアスベスト曝露あるいは中皮腫発症の前段階を示す指標を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MT-2Org と MT-2Rst の抗炎症性サイトカイン TGF-β1 の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR、産生量を ELISA 法により測定した。TGF-β1 シグナリングに関与する TGF レセプター 2 や smad2, 3, 4 の発現はリアルタイム RT-PCR により解析した。TGF-β1 による MT-2 細胞の増殖抑制は [³H]-チミジンの取り込みにより測定した。

(2) MT-2Rst 細胞の TGF-β1 ノックダウンはレンチウイルスベクターを用いた shRNA により行った。ノックダウンの効果はリアルタイム RT-PCR、ELISA 法により評価した。

(3) 健常人および悪性中皮腫症例の血漿中 IL-10 および TGF-β1 を ELISA 法により測定

した。PBMC 中に占める制御性 T 細胞の割合は CD4, CD25, Foxp3 陽性細胞をフローサイトメトリー (FACS) で検出することにより求めた。

(4) すでに確立した方法を用い、HTLV-1 不死化 T 細胞株 MT-2 にアスベスト繊維の一種であるクリソタイル A あるいは B を 10 µg/ml の濃度で 8 ヶ月間以上低濃度長期曝露し、アポトーシス抵抗性を獲得したアスベスト耐性亜株 MT-2Rst (CA1, CA2, CA3, CB1, CB2, CB3) を 3 株ずつ樹立した。アポトーシス誘導の検出は Annexin-V アッセイにより行った。抗アポトーシスタンパク質 bcl2 の発現はウエスタンブロッティングにより解析した。

(5) アスベスト低濃度長期曝露により発現変動した遺伝子を同定するため DNA マイクロアレイ解析を行った。遺伝子発現が 2 倍以上変動した遺伝子を抽出しクラスター解析を行った。発現変動した遺伝子は Metacore の Pathway 解析、Network 解析に供し、抗腫瘍免疫低下を示唆する遺伝子をスクリーニングした。

(6) MT-2Org と MT-2Rsts の CXCR3 発現をリアルタイム RT-PCR、FACS および免疫組織染色で解析した。IFN-γ 産生は ELISA 法により測定した。

(7) ヒト末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、IL-2 存在化で培養する際に 10, 25, 50 µg/ml のクリソタイルを 1 ヶ月間曝露し CXCR3 の発現を FACS によりモニターした。

4. 研究成果

(1) 抗炎症性サイトカイン TGF-β1 遺伝子発現および産生量は MT-2Rst で有意に高まっていた。TGF レセプター 2 は遺伝子発現が MT-2Rst でやや低下 ($p=0.06$) しており、その下流に存在する smad2, 3, 4 の遺伝子発現は MT-2Rst で有意に低下していた。更に、MT-2Org および MT-2Rst を 0.5, 5, 10 ng/ml の TGF-β1 で処理し、細胞増殖を [³H]-チミジンの取り込みによって測定した結果、MT-2Org の細胞増殖は有意に抑制されたが、MT-2Rst の TGF-β1 による細胞増殖抑制は認められなかった。この結果から、MT-2 細胞はアスベスト低濃度長期曝露によって TGF-β1 産生促進、TGF-β1 への低感受性を誘導し細胞増殖の抑制を受けなくなることが示された。TGF-β1 は腫瘍細胞から産生され、T 細胞や NK 細胞の細胞増殖を抑制し抗腫瘍免疫を減弱させるため、アスベスト低濃度長期曝露によって腫瘍部位に TGF-β1 による細

胞増殖抑制を受けないT細胞が動員されると、腫瘍細胞の増殖や進展を促進すると推測された。

(2) アスベスト低濃度長期曝露による TGF- β 1 産生促進を解明するため、TGF- β 1 遺伝子を標的とした shRNA をレンチウイルスベクターにより MT-2Rst で発現させた。その結果、TGF- β 1 への感受性を検討するために必要となる TGF- β 1 遺伝子発現および産生量が著しく低下した細胞株を得ることが出来た。

(3) 健常人 (n = 8), 悪性中皮腫症例 (n = 8) の血漿中 IL-10 および TGF- β 1 を測定した結果、TGF- β 1 は悪性中皮腫症例で有意に高値であった。TGF- β 1 は CD4 陽性 CD25 陰性 T 細胞から CD4 陽性 CD25 陽性の制御性 T 細胞を誘導することが知られているため、PBMC 中に存在する CD4, CD25, Foxp3 を発現した制御性 T 細胞を FACS により解析したが、健常人と悪性中皮腫症例の間に有意差は認められなかった。血漿中の TGF- β 1 が末梢血中の制御性 T 細胞誘導に直接関与しているとは言えなかったが、制御性 T 細胞のサイトカイン産生や細胞増殖抑制能に影響している可能性も考えられ、今後、制御性 T 細胞の機能について検討していかねばならない。また、制御性 T 細胞は腫瘍に浸潤しやすい性質を有するため、腫瘍部位における制御性 T 細胞の解析も必要となるだろう。

(4) MT-2Org にクリソタイル A あるいは B を 10 μ g/ml で曝露し続け、曝露開始から 8 ヶ月を経過した時点でクリソタイル高濃度短期曝露し、アポトーシス誘導を Annexin-V アッセイで測定した。それぞれ 3 群ずつ曝露しており、CA1-3, CB1-3 いずれについてもクリソタイル高濃度短期曝露によって誘導されるアポトーシスが低下しており、クリソタイル低濃度長期曝露は一樣に MT-2 ヘクリソタイル耐性を与えることが示された。また、これまでの実験結果と同様に抗アポトーシスタンパク質 bcl2 の発現は MT-2Rsts で高まっていた。

(5) MT-2Org と MT-2Rsts の RNA を用いて行ったマイクロアレイ解析の結果、MT-2Org に比べて MT-2Rsts 全てで 2 倍以上有意に発現変動した遺伝子を 162 同定することが出来た。クラスター解析から、MT-2Rsts はクリソタイル低濃度長期曝露によって同じような遺伝子発現変動を示すが、クリソタイル A 曝露群に比べてクリソタイル B 曝露群でより発現変動が大きいことが明らかとなった。クリソタイル A とクリソタイル B は主に SiO₂ と MgO を含んでいるが、その他の成分として

Fe₂O₃ や FeO の含有量がクリソタイル B でやや高く、組成の僅かな違いが MT-2 細胞の遺伝子発現変動に差を与えたと推察された。元来、クロシドライトは鉄の含量が高いためクリソタイルより発癌性が高いと言われており、2 種類のクリソタイルの違いを説明する上でも、クロシドライト耐性株の樹立を行わなくてはならない。Pathway 解析については、抗腫瘍免疫を高める IFN- γ シグナリングの下流に存在する interferon regulatory factor 9 (IRF9), IFN-stimulated gene factor-3 (ISGF3) の遺伝子発現が MT-2Rsts で有意に低下しており、アスベスト低濃度長期曝露によって IFN- γ シグナリングが減弱する可能性が示唆された。また Network 解析についても、MT-2Rsts において IRF9 遺伝子が発現制御に関与しており IFN- γ 依存的に発現誘導する Th1 型のケモカインレセプター CXCR3 の遺伝子発現の著しい低下が検出された。CXCR3 は 7 回膜貫通型タンパク質であり、リガンドとなるケモカインが豊富に存在する腫瘍部位へ IFN- γ 産生細胞を遊走させ抗腫瘍効果を発揮するため、アスベスト曝露による抗腫瘍免疫低下を示すマーカーとして CXCR3 を選択し有用性を検討した。

(6) MT-2Org, MT-2Rsts の CXCR3 遺伝子発現は DNA マイクロアレイの結果と同様であり、MT-2Rsts で有意に発現低下していることが確認できた。FACS 解析、免疫組織染色からも細胞膜上でのタンパク質レベルの CXCR3 発現が MT-2Rsts で著しく低下していることが明らかとなった。また、IFN- γ 産生は CXCR3 発現と相関しており、MT-2Rsts で有意に低下していた。この結果から、遺伝子レベルの推測をタンパク質レベルで確認することが出来た。

(7) 培養細胞で示されたように、アスベスト曝露が CXCR3 発現を低下させることをより強く支持するため、健常人末梢血 CD4 陽性 T 細胞へクリソタイル B 長期曝露を行い CXCR3 発現の FACS による解析を行った。健常人末梢血 CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体により刺激し、IL-2 を含む培地にクリソタイルを 10, 25, 50 μ g/ml で添加し曝露を一ヶ月間続けた。その結果、クリソタイル長期曝露によって CXCR3 発現の低下が認められた。T 細胞へのアスベスト長期曝露は CXCR3 の発現を低下させると推察され、今後 CXCR3 発現の低下した細胞における IFN- γ 産生の測定や、悪性中皮腫症例における PBMC 中の CXCR3 発現を解析することにより、CXCR3 発現をアスベスト曝露による抗腫瘍免疫低下を示すマーカーとして確実なものにできるといえよう。

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)

- ① Megumi Maeda, Yoshie Miura, Yasumitsu Nishimura, Shuko Murakami, Hiroaki Hayashi, Naoko Kumagai, Tamayo Hatayama, Minako Katoh, Naomi Miyahara, Shoko Yamamoto, Kazuya Fukuoka, Takumi Kishimoto, Takashi Nakano and Takemi Otsuki Immunological changes in mesothelioma patients and their experimental detection. *Clinical Medicine: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, **2**, 11-17 (2008) 査読有
- ② Takemi Otsuki, Megumi Maeda, Shuko Murakami, Hiroaki Hayashi, Yoshie Miura, Masayasu Kusaka, Takashi Nakano, Kazuya Fukuoka, Takumi Kishimoto, Fuminori Hyodoh, Ayako Ueki and Yasumitsu Nishimura Immunological effects of silica and asbestos. *Cell Cellular & molecular immunology*, **4**, 261-268 (2007) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① 前田恵, アスベスト曝露が誘導した CD4+CXCR3^{low} T 細胞の IFN- γ 産生について, 第 79 回日本衛生学会総会, 2009 年 3 月 30 日, 北里大学白金キャンパス
- ② 前田恵, アスベスト低濃度長期曝露と HTLV-1 不死化 T 細胞株 MT-2 の T 細胞増殖抑制能について, 第 28 回岡山免疫懇話会, 2009 年 3 月 4 日, 岡山大学第 2 臨床講義室
- ③ 前田恵, アスベスト曝露が誘導するヒト T 細胞ケモカイン受容体 CXCR3 の発現低下, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会), 2008 年 12 月 12 日, 神戸国際会議場
- ④ 前田恵, 悪性中皮腫症例血漿中抗炎症性サイトカインと末梢血制御性 T 細胞の関連性, 第 38 回日本免疫学会学術集会, 2008 年 12 月 2 日, 京都国際会館
- ⑤ Maeda Megumi, Down-regulation of chemokine receptor CXCR3 in peripheral T lymphocytes from patients with asbestos-related disease. *International Mesothelioma Interest Group, Congress 2008*, 9. 25 (2008), De Meervaart Congresscentrum, Amsterdam, Netherlands
- ⑥ 前田恵, アスベスト曝露ヒト CD4+T 細胞におけるケモカインレセプター CXCR3 の発現解析, 第 15 回日本免疫毒性学会学術大会, 2008 年 9 月 11 日, タワーホール船堀
- ⑦ 前田恵, アスベスト曝露によるヒトポリ

クローナル T 細胞株 MT-2 のタンパク質発現への影響, 第 81 回日本産業衛生学会, 2008 年 6 月 27 日, 札幌コンベンションセンター

- ⑧ 前田恵, アスベスト曝露ヒトポリクローナルリンパ球 MT-2 株の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析, 第 78 回日本衛生学会総会, 2008 年 3 月 30 日, 熊本市民会館
- ⑨ 前田恵, ヒトポリクローナルリンパ球 MT-2 株におけるアスベスト曝露関連分子の探索, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007), 2007 年 12 月 13, 14 日, パンフィコ横浜
- ⑩ 前田恵, The production of anti-inflammatory cytokines from an asbestos-induced apoptosis resistant human polyclonal T cell line, 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 2007 年 11 月 22 日, グランドプリンスホテル新高輪
- ⑪ 前田恵, アスベスト曝露ヒトポリクローナル T 細胞株における抗炎症性サイトカイン IL10 および TGF- β 1 の産生誘導, 第 14 回日本免疫毒性学会学術大会, 2007 年 9 月 20 日, 兵庫県民会館 9F 県民ホール
- ⑫ 前田恵, ヒトポリクローナルリンパ球 MT-2 株のアスベスト曝露による遺伝子発現変化, 第 80 回日本産業衛生学会, 2007 年 4 月 26 日, グランキューブ大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 恵 (MAEDA MEGUMI)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20434988