

## 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 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22790550

研究課題名（和文）アスベスト曝露に起因する NK 細胞機能抑制の解明に基づく悪性中皮腫予防指標の構築

研究課題名（英文）Investigation of immunological parameters related with malignant mesothelioma, based on study of asbestos-caused impairment in cytotoxicity of NK cells

研究代表者

西村 泰光（NISHIMURA YASUMITSU）

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90360271

研究成果の概要（和文）：

石綿曝露下 PBMC 培養時には単球系細胞由来 IL-12 と Th 細胞由来 IFN- $\gamma$ 、IL-17A の産生量が低く、NKp46 低下に関わることが明らかとなった。血中サイトカイン濃度変化の重回帰分析により求められる予測式が示す値は、悪性中皮腫患者の 6/7 において健常人・胸膜プラーク陽性者よりも高値となることが分かり、中皮腫診断指標となる可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

The *in vitro* study showed that asbestos exposure caused the decreases in production of IL-12 by monocyte-lineage cells and IFN- $\gamma$  and IL-17A by Th cells, related with low NKp46 on NK cells. The six-seventh patients with mesothelioma showed a higher value of the formula, calculated from multiple linear regression analysis of cytokine levels in blood, than healthy or pleural plaque-positive people, suggesting that such formula might be a new marker for mesothelioma.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
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：社会医学・衛生学

キーワード：産業衛生

## 1. 研究開始当初の背景

石綿曝露による抗腫瘍免疫減弱の可能性を探り、石綿曝露と中皮腫に関わる T 細胞や NK 細胞の機能低下を報告してきた。NK 細胞は、石綿曝露条件および悪性中皮腫（MM）患者において細胞傷害性と活性化受容体 NKp46 発現量の低下を示す。これらは、悪性中皮腫の背景因子としての石綿曝露による抗腫瘍免疫減弱の存在を示唆する。

## 2. 研究の目的

そこで、石綿曝露下 NK 細胞機能低下の機序解明を進めると共に、血漿中サイトカイン濃度の解析を行い、免疫パラメーターを用いた中皮腫診断指標の構築を試みた。

## 3. 研究の方法

単離 NK 細胞を孔径 0.2  $\mu$ m 膜のカルチャ

一インサートを用いてインサート内で PBMC と IL-2 添加培地で共培養した。PBMC を白石綿 chrysotile B (CB) 5µg/ml を加え培養し、上清中の各種サイトカイン濃度とフローサイトメトリー (FCM) でソートした細胞集団のサイトカイン mRNA レベルを、CBA または Luminex および Realtime PCR を用いて測定した。また、IL-12, TNF-α, IFN-γ, IL-17A に対する中和抗体を添加し、7 日後の NK 細胞上 NKp46 レベルを FCM で測定した。健常人 (HV) 8 名・胸膜プラーク (PL) 陽性者 25 名・MM 患者 7 名の血漿中 Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN-α2, IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, TNF-α, TNF-β の濃度を Luminex により測定し、分散分析および重回帰分析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

- ① 単離 NK 細胞では、膜を介して PBMC と共培養した時、培養後 NKp46 発現量が共培養により増加し、PBMC 側への CB 曝露により増加は抑制されることが確認された。
- ② そこで、PBMC 培養時のサイトカイン濃度を測定したところ、CB 曝露下 PBMC 培養時には、IL-12, TNF-α, IFN-γ, IL-17A 濃度が低下していることが分かった。
- ③ 培養中の PBMC を単球系細胞, Th 細胞, Tc 細胞, NK 細胞にソートし、蒸気サイトカイン mRNA レベルを測定したところ、IL-12p40 と TNF-α および IFN-γ と IL-17A の mRNA レベルは CB 曝露下培養下の単球・マクロファージ系細胞および Th 細胞でそれぞれ低下していることが分かった。
- ④ IL-12, IFN-γ, IL-17A に対する中和抗体の添加は培養後の NK 細胞上 NKp46 量を一部低下させることが分かった。
- ⑤ MM 群または PL 群において、血中 IL-12, IFN-γ, IL-17A 濃度の低下は見られなかった。しかし、MM 群では HV 群と比べ Eotaxin が有意に低く、MCP-1, IL-8, TNF-α が有意に高く、また PL 群と比べ G-CSF が有意に高いことが分かった。また、PL 群または PL・MM 両群をまとめた石綿曝露群は HV 群に比べ有意に高い IP-10 値を示すことが分かった。
- ⑥ 血中サイトカイン濃度の重回帰分析の結果は、MCP-1, Eotaxin, TNF-α 濃度の変化が MM と関係が強いこと示し、予測式より求められる値は MM 患者の 6/7 において HV 群・PL 群の最高値よりも高値を示すことが分かった。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

- ① 石綿曝露による NK 細胞機能低下について、NK 細胞活性化受容体発現量や NK 細胞機能に関連するサイトカイン産生量の変化にまで及ぶ詳細な解析を行った研究内容は、国内外を問わず皆無である。したがって、本研究成果は、石綿曝露による悪性中皮腫発症において関わる免疫機能低下に関する、特に NK 細胞機能とこれに関わるサイトカイン産生変化について、新たな知見を提供するものであり、中皮腫発症機構解明に寄与する物であると考えられる。
- ② また血中サイトカイン濃度の重回帰分析により導かれた予測式で求められる値は、MM 患者と健常人・PL 陽性者を良好に区別し、NKp46 発現量に加え、石綿曝露者の抗腫瘍免疫機能の把握および悪性中皮腫の早期発見・予防に寄与するパラメーターとなる可能性が示唆される。

##### (3) 今後の展望

- ① 石綿曝露下 PBMC 培養時に見られたサイトカイン濃度の変化は MM 患者および PL 陽性者の血中サイトカイン濃度には見られなかった。このことは、石綿曝露によるサイトカイン産生能変化および NK 細胞機能低下が全身性でなく、より局所的に起きていることを示唆する。生体における石綿曝露による NK 細胞機能低下関する機序解明をより進めるためには、MM 患者と非石綿関連疾患の胸水中サイトカイン濃度の測定・比較などを行い、より局所における免疫動態を調べることが必要と考えられ、その成果は石綿曝露による抗腫瘍免疫機能影響についての重要な知見を与えると推察される。
- ② MM 患者および PL 陽性者において特徴的な血中サイトカイン濃度の変化が見られたことは、免疫担当細胞における各種免疫関連遺伝子の発現量に様々な差違が起きていることを示唆する。今後は、MM 患者および PL 陽性者の PBMC よりソートした各免疫担当細胞 (単球・Th 細胞・Tc 細胞・NK 細胞など) の mRNA レベルの解析や、各細胞によるサイトカイン産生能の測定を行い、石綿曝露および悪性中皮腫に関連する免疫動態についてより詳細に把握することが重要であると思われ、それらによる知見は中皮腫発症機序に重要な示唆を与えると共に、新たな中皮腫診断指標の同定に寄与するものと推察される。

#### 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 10 件)

- 1) Meada M, Yamamoto S, Chen Y, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Hatayama T, Miyahara N, Katoh M, Hiratsuka J-i, Nishimura Y, Otsuki T. Resistance to asbestos-induced apoptosis with continuous exposure to crocidolite on a human T cell, *Sci Tot Environ* (in press). 査読有り
- 2) Matsuzaki H, Maeda M, Lee S, Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Yamamoto S, Hatayama T, Kojima Y, Tabata R, Kishimoto T, Hiratsuka J, Otauki T. Asbestos-induced cellular and molecular alteration of immunocompetent cells and the relationship with chronic inflammation and carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol Volume 2012* (2012), Article ID 492608, doi:10.1155/2012/492608. 査読有り
- 3) Kumagai N, Maeda M, Chen Y, Mastuzaki H, Lee S, Nishimura Y, Hiratsuka J, Otsuki T. Asbestos induces reduction of tumor immunity. *Clin Devl Immunol* 2011;2011:481439. Epub 2011 Oct 4. 査読有り
- 4) 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* 2011 Oct;45(4):795-803. Epub 2011 Feb 25. 査読有り
- 5) 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* 2011 Sep;45(3):470-9. Epub 2010 Dec 10. 査読有り
- 6) 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 Immunopath Pharmacol* 2011 Jan-Mar;24(1 Suppl):5S-10S. 査読有り
- 7) 大槻剛巳, 中野孝司, 長谷川誠紀, 岡田守人, 辻村亨, 関戸好孝, 豊國伸哉, 西本寛, 福岡和也, 田中文啓, 熊谷直子,

前田恵, 松崎秀紀, 李順姫, 西村泰光. 科学技術振興調整費「アスベスト関連疾患への総括的取り組み」班研究: 成果報告—班研究の概要と登録事業, 中皮腫細胞特性ならびにアスベストの免疫影響について—. *日本衛生学雑誌* 66(3): 543-552, 2011 査読有り

- 8) 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 査読有り
- 9) 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. 査読有り
- 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 査読有り

〔学会発表〕 (計 24 件)

- 1) 西村泰光. 奨励賞受賞講演. アスベスト関連疾患に関わる肺胞マクロファージとNK細胞の機能変化. 第82回日本衛生学会学術総会. 2012. 3. 24-26. 京都大学吉田キャンパス (百周年時計台記念館・吉田南構内4号館)
- 2) Nishimura Y. Suppressive effect of exposure to asbestos on cytotoxicity of human NK cells. Special Session 001. ICOH (International Commission on Occupational Health) 30th ICOH. 2012. 3. 18-23. Cancun Center, Convention & exhibition, Cancun Mexico.
- 3) Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Otsuki T. Asbestos exposure causes decrease in production of cytokines related to NK cell activation. 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.
- 4) 西村泰光, 武井直子, 前田恵, 松崎秀紀, 李順姫, 岸本卓巳, 大槻剛巳. NK細胞機能と血漿中サイトカイン濃度解

- 析に基づく中皮腫診断指標構築の試み. 第 11 回分子予防環境医学研究会. 2012. 1. 17-28. 倉敷市民会館 2 階大会議室
- 5) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 松崎秀紀, 李順姫, 岸本卓巳, 大槻剛巳. 血漿中サイトカイン濃度解析による悪性中皮腫予防指標構築の試行. 第 55 回中国四国合同日本産業衛生学会. 2011. 12. 10-11. 高知市総合あんしんセンター
  - 6) Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Lee S, Matsuzaki H, Otsuki T. Low NKp46 on NK cells partially caused by decreased productions of IL12, IFN- $\gamma$  and IL-17A in the culture of PBMCs upon exposure to asbestos 石綿曝露下 PBMC 培養時の NK 細胞上 NKp46 発現量低下の一部は IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17A 産生量低下により引き起こされる. 日本免疫学会総会・学術集会. 2011. 11. 27-29. 幕張メッセ
  - 7) 西村泰光, 熊谷直子, 松崎秀紀, 李順姫, 岸本卓巳, 大槻剛巳. 悪性中皮腫および石綿曝露に関連する血漿サイトカイン動態の解析. 第 18 回石綿・中皮腫研究会. 2011. 10. 8. 長崎大学医学部ポンベ会館
  - 8) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 松崎秀紀, 李順姫, 大槻剛巳. 石綿曝露下 RBMC 培養時の IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-17A 産生量低下と NK 細胞上 NKp46 発現量低下との関わり. 第 18 回日本免疫毒性学会. 2011. 9. 8-9. 千葉大学けやき会館
  - 9) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 松崎秀紀, 李順姫, 岸本卓巳, 大槻剛巳. 石綿曝露時 NK 細胞機能の解析結果に基づく中皮腫予防に向けた抗腫瘍免疫機能評価の試行. がん予防大会 2011 京都 (第 18 回日本がん予防学会, 第 34 回日本がん疫学・分子疫学研究会) 2011. 6. 20-21. 京都府立医科大学図書館ホール
  - 10) Nishimura Y, Kumagai N, maeda M, Mastuzaki H, Lee S, Otsuki T. Decreased productions of IL-12, IFN- $\gamma$  and IL-17A relevant to low NKp46 on NK cells in the culture of PBMCs upon exposure to asbestos IJSICR-MMCB2011 (The 76th Japanese Society of Interferon & Cytokine Research, The 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2011. 第 76 回日本インターフェロン・サイトカイン学会. 第 19 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム. 合同開催 国際会議, 2011. 5. 25-27. ANA Gate Hiotel Osaka, Japan
  - 11) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 大槻剛巳. 石綿曝露下の PBMC 由来 IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A 濃度低下と NK 細胞上 NKp46 発現低下との関わり. 第 84 回日本産業衛生学会. 2011. 5. 18-20. シーサイドホテル芝弥生, ニューピアホール, ホテルアジュール竹芝, 東京都立産業貿易センター浜松町館
  - 12) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 大槻剛巳. 石綿曝露時 NK 傷害性低下に関わるサイトカイン産生プロファイルの解析. 日本衛生学会誌 66 (2), 421, 2011. 3. 25-28. 第 81 回日本衛生学会学術総会
  - 13) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 林宏明, 大槻剛巳. NK 細胞障害性低下に関連した石綿曝露下 PBMC 培養時サイトカイン産生プロファイルの変化. 2010. 11. 3-4. 第 51 回日本肺癌学会. 広島国際会議場・ANA クラウンプラザホテル広島
  - 14) 西村泰光, 前田恵, 熊谷直子, 大槻剛巳. 石綿曝露下の NK 細胞機能低下に介在する作用機上の解析. 第 17 回石綿・中皮腫研究会. 2010. 10. 16. 埼玉医科大学川越ビル大会議室 (埼玉)
  - 15) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 林宏明, 大槻剛巳. 石綿曝露時 NK 細胞上 NKp46 低下に関連するサイトカイン産生の変化および単球系細胞の減少. 第 17 回日本免疫毒性学会学術大会. 2010. 9. 9-10. 独立行政法人国立環境研究所大山記念ホール
  - 16) 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. The 10th International Congress of the iMiG (International Mesothelioma Interest Group) 2010. 8. 30-9. 02 (9. 02). Kyoto International Conference Center
  - 17) 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. 14th International Congress of Immunology 2010. 8. 23-27 (8/23) Kobe International Exhibition Hall
  - 18) 西村泰光. アスベスト曝露影響を測る免疫関連遺伝子の同定, 新規診断法開発への試行. バイオアカデミックフォーラム/バイオテクノロジー国際会議/国際バイオエキスポ. 2010. 6. 30-7. 02. 東京ビッグサイト
  - 19) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 林宏明,

- 大槻剛巳. アスベスト曝露下NK細胞機能低下に関わるサイトカイン産生量の変化. 2010. 6. 25-26. 第75回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会. 北九州国際会議場
- 20) 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. The 21st Japan China Korea Joint Conference on Occupational Health. 2010. 6. 10-12. Tochigi-ken Sogo Bunka Center, Utsunomiya, JAPAN
- 21) 西村泰光, 熊谷直子, 前田恵, 林宏明, 岸本卓巳, 大槻剛巳. 石綿曝露によるNK細胞上NKp46発現量低下における非リンパ系細胞の関わり. 2010. 5. 26-28. 第83回日本産業衛生学会. フェニックスプラザ(福井市), 福井県国際交流会館
- 22) 西村泰光. 熊谷直子, 前田恵, 林宏明, 大槻剛巳. 石綿曝露によるNK細胞上NKp46発現量低下におけるサイトカインの関与. 第80回日本衛生学会学術総会. 2010. 5. 10-11. 仙台国際センター
- 23) Nishimura Y, Kumagai N, Maeda M, Hayashi H, Fukuoka K, Nakano T, Kishimoto T, Otsuki T. Suppressive effect of asbestos on cytotoxicity of human NK cells. 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)
- 24) 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. The Society of Toxicology (SOT) Annual Meeting in Salt Lake City, Utah, March 7-11, 2010.

[図書] (計3件)

- 1) 山村真弘, 西村泰光. FACSによる検出法 1 細胞膜の抗原性 *in* 実験医学別冊 現象を見抜き検出できる! 細胞死実験プロトコール (ISBN:9784758101813). 刀祢重信, 小路武彦(編). 羊土社, 東京. 2011. pp132-136.
- 2) 西村泰光, 大槻剛巳, 前田恵, 熊谷直子.

アスベストーシス, シリコーシス. In 分子予防環境医. 松島綱治. 本の泉社, 東京, ISBN978-4-7807-0901-7, pp691-702, 2010

- 3) 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.

[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:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
西村 泰光 (NISHIMURA YASUMITSU)  
川崎医科大学・衛生学・准教授  
研究者番号: 90360271

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: