

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790679

研究課題名（和文） 細胞傷害性T細胞（CTL）機能解析に基づく石綿中皮腫関連分子指標の探索

研究課題名（英文） Search for markers to monitor an effect of asbestos on CTL functions

研究代表者

武井 直子 (TAKEI NAOKO)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：00509276

研究成果の概要（和文）：石綿曝露による悪性中皮腫や肺癌の発症を抑制するための生体防御機構の一つとして、ナイーブ CD8+T 細胞が細胞傷害性 T 細胞（CTL）に分化し、腫瘍細胞を攻撃・殺傷することが重要である。本研究では、石綿添加培地中で混合リンパ球培養法を用いて CTL 分化誘導を行ったところ、CD8+T 細胞の増殖抑制を認めた。また、混合培養後の CD8+T 細胞あたりの細胞傷害性の低下を見出した。更に、悪性中皮腫患者では CD8+リンパ球の刺激後の細胞傷害性の低下を認めた。これらの成果は、悪性中皮腫発症の早期予防につながる重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We examined the effect of asbestos exposure on functions of CTL. Asbestos exposure showed the suppressed proliferation of CD8+ lymphocytes and the decreased cytotoxicity exerted by CD8+ T cells. Moreover, mesothelioma patients showed the enhanced decrease in the percentage of perforin+ cells of stimulated CD8+ cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：石綿、中皮腫、胸膜プラーク、CTL、CD8

1. 研究開始当初の背景

アスベスト（石綿）曝露は悪性中皮腫や肺癌を引き起こす。石綿の発癌作用はよく知られているが、一方で癌疾患の抑制に働く抗腫瘍免疫機能への石綿曝露影響は不明な部分が多い。抗腫瘍免疫において、腫瘍細胞を特異的に攻撃・殺傷することのできる細胞傷害性 T 細胞（CTL）の役割は重要である。研究代表者はこれまでに、石綿添加培地中でリンパ球混合培養法を用いた CTL 分化誘導を行い、石綿曝露がアロ刺激によるナイーブ CD8+T 細胞から CTL への分化を抑制することを報告してきた。

石綿曝露による CTL 分化抑制機構を明らかにするため、CTL 分化誘導時の CD8+T 細胞の細胞増殖と混合培養後に回収した CD8+T 細胞あたりの細胞傷害性への石綿曝露影響を調べる。また、石綿曝露指標である胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者の CD8+T 細胞機能の解析を行うため、末梢血単核球（PBMC）中の CD8+CD3+細胞比率、単位血液量あたりの CD8+CD3+細胞数、末梢血 CD8+リンパ球の IFN- γ 、granzyme B、perforin 産生能と CD45RA-細胞比率、及び脱顆粒能を測定するために CD8+リンパ球中の CD107a+細胞比率を調べる。

2. 研究の目的

3. 研究の方法

(1) CTLの分化誘導

5 µg/mlの白石綿chrysotile B添加培地中で、PBMCを放射線照射アロPBMCと7日間混合培養した。

(2) 細胞傷害性の評価

培養後のPBMCからCD8+細胞 (Effector) を回収し、蛍光標識アロPBMC (Target) と37°Cで5時間反応させ、propidium iodide (PI) で染色し、フローサイトメトリー (FCM) で標的細胞中のPI陽性死細胞の比率を計測し、CD8+細胞あたりの細胞傷害性を評価した。

(3) CD8+T細胞の細胞増殖能の測定

予めCFSE染色したPBMCを用いて石綿添加培地中で7日間混合培養を行った後、CFSE-CD8+細胞比率をFCMで測定し、アロ刺激によるCD8+T細胞の細胞分裂への石綿曝露影響を調べた。

(4) CD8+リンパ球の機能解析

胸膜プラーク陽性者、悪性中皮腫患者、健康人の血液を採取し、PBMCを単離した。PBMCをCD8, CD3, CD45RA, granzyme B, perforinに対する蛍光標識抗体で染色し、CD8+リンパ球の細胞数、表現型、granzyme B産生能、及びperforin産生能をFCMで調べた。また、一部のPBMCはPMA/ionomycinで刺激した後、CD8, IFN-γ, granzyme B, perforin, CD107aに対する蛍光標識抗体で染色し、CD8+リンパ球のIFN-γ, granzyme B, perforin産生能と脱顆粒能をFCMで調べた。

4. 研究成果

(1) 石綿曝露によるCTL分化抑制機構の解明

- ① 石綿曝露の対照群において、混合培養開始2日及び4日目では、アロ刺激によって増殖した細胞を示すCFSE-CD8+T細胞は検出されなかったが、5日目でわずかに認められ、培養6日から7日目において、アロ刺激によるCFSE-CD8+T細胞の著しい増加を認めた。石綿曝露群では対照群で認められたような培養6日から7日目のCFSE-細胞の著しい増加が抑制された。これらの結果から、石綿曝露によって、アロ刺激によるCD8+T細胞の増殖が抑制されることがわかった。
- ② 対照群では、混合培養7日目のPBMC由来のCD8+細胞がアロPBMCに対する細胞傷害性を示すことがわかった。石綿曝露群では対照群に比べて、混合培養後のPBMC由来のCD8+細胞あたりの細胞傷害性が低下していた。
- ③ 以上の結果から、石綿曝露によるCTL分化抑制機構のうち、CD8+T細胞に注目した石

綿曝露影響の一部を明らかにすることができた。

(2) 石綿曝露指標である胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者におけるCD8+リンパ球の機能解析

① CD3+CD8+細胞の割合と数

PBMC中のCD8+T細胞を示すCD8+CD3+細胞比率は、健康人、胸膜プラーク陽性者、悪性中皮腫患者の3群で有意差はなかった。しかしながら、胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者のCD3+CD8+細胞数は健康人に比べて有意に低かった。

② IFN-γ産生能

CD8+リンパ球中のIFN-γ+細胞比率は健康人、胸膜プラーク陽性者、悪性中皮腫患者の3群で同程度に認められた。

③ 脱顆粒能

脱顆粒の指標であるCD107a+細胞比率は、健康人、胸膜プラーク陽性者、悪性中皮腫患者の3群間で同程度に認められた。

④ Granzyme B産生

刺激前のCD8+リンパ球中のgranzyme B+細胞比率は、健康人、胸膜プラーク陽性者、悪性中皮腫患者の3群で同程度に認められた。刺激後の胸膜プラーク陽性者のgranzyme B+細胞比率は、健康人に比べて高値を示した。

⑤ Perforin産生

胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者の刺激前のCD8+リンパ球中のperforin+細胞比率は、健康人に比べて高値を示した。刺激後の胸膜プラーク陽性者のperforin+細胞比率は健康人に比べて高値を示した。悪性中皮腫患者では、胸膜プラーク陽性者に比べて、刺激後のperforin+細胞比率の著しい減少を認めた。

⑥ CD45RA-細胞比率

胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者では、CD8+リンパ球中のCD45RA-細胞比率が健康人に比べて高値を示した。

- ⑦ 以上の結果から、胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者の石綿曝露者に共通して、刺激前のCD8+リンパ球のperforin+細胞比率の高値とCD45RA-細胞比率の低値が認められ、石綿曝露がCD8+T細胞の機能に影響を及ぼすことを示す。また、⑤の結果が示すように、悪性中皮腫患者のCD8+T細胞では、胸膜プラーク陽性者に比べて刺激後の

perforin+細胞比率が著しく減少することが認められたことから、悪性中皮腫患者では刺激後の細胞傷害性が低下していることを示唆する。

(3) 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 我が国では、現在、石綿の職業曝露から環境曝露への拡大が社会問題となっている。また、国外においては未だ石綿の輸出・輸入や使用が禁止されていない国もある。石綿は細胞毒性を有し、ROS 産生、組織傷害、DNA 傷害を誘導し、これらの過程が発癌作用に関与していることは周知である。石綿の発癌作用がよく知られている一方で、癌疾患の抑制に働く抗腫瘍免疫機能への石綿曝露影響は不明な部分が多い。本研究成果は、抗腫瘍免疫において、腫瘍細胞を特異的に攻撃・殺傷することのできる細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の分化や機能に注目して得られた、国内外初の研究成果である。
- ② 研究代表者はこれまでに、石綿曝露による混合培養後の CD8+T 細胞の数の増加抑制や培養後回収した PBMC あたりの細胞傷害性低下とあわせて、石綿曝露がアロ刺激によるナイーブ CD8+T 細胞から CTL への分化を抑制することを報告してきた。本研究結果によって、アロ刺激による CD8+T 細胞の細胞増殖が石綿曝露によって抑制されることが明らかになり、更には、培養後の PBMC 由来の CD8+T 細胞あたりの細胞傷害性が低下することを明らかにしたことで、石綿曝露による CTL 分化抑制機構の一部を解明することが出来た。
- ③ 本研究では石綿曝露指標である胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者の CD8+リンパ球の機能の差違と共通する特徴を明らかに出来た。このことは、国内外で初めて、石綿曝露が CD8+T 細胞の機能に影響を及ぼすことを示す重要な情報である。また、CTL が腫瘍細胞を攻撃・殺傷する際に、脱顆粒によって、細胞内の granzyme や perforin を分泌することが重要であり、これらの CD8+リンパ球の一連の機能解析によって得られた知見は、石綿被曝露者の分子医学的早期発見に向けて重要な情報を与え、更には、悪性中皮腫予防分子マーカーを導く可能性がある。

(4) 今後の展望

混合リンパ球培養法を用いた CTL 分化誘導には、CD4+T 細胞や樹状細胞などの免疫細胞の関わりが考えられるため、今後はこれらの免

疫細胞の機能における石綿曝露影響についても明らかにし、石綿曝露による CTL 分化抑制機構の解明に取り組む必要がある。

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 2 件)

- (1) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Hiratsuka J, and Otsuki T. Effect of Asbestos Exposure on Differentiation of Cytotoxic T Lymphocytes in Mixed Lymphocyte Reaction of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Am J Respir Cell Mol Biol, 査読有, 2013, 印刷中
- (2) Kumagai-Takei N, Maeda M, Chen Y, Mastuzaki H, Lee S, Nishimura Y, Hiratsuka J, Otsuki T. Asbestos induces reduction of tumor immunity. Clin Devl Immunol, 査読有, 2011, 2011:481439.

[学会発表] (計 9 件)

- (1) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Matsuzaki H, Lee S, Kishimoto T, Fukuoka K, Nakano T, Otsuki T. Difference in functional property of CD8+ lymphocytes between patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. 51th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2013. 3. 11. San Antonio, TX
- (2) 武井直子, 西村泰光, 前田恵, 林宏明, 松崎秀紀, 李順姫, 岸本卓巳, 福岡和也, 中野孝司, 大槻剛巳. CD8+リンパ球に注目した胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者の免疫学的特徴. 第12回 分子予防環境医学研究会, 2013. 2. 1, 筑波
- (3) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Matsuzaki H, Lee S, Otsuki T. IFN- γ production and cytotoxicity of CD8+ lymphocytes in patients with pleural plaque or malignant mesothelioma. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012. 12. 7. 神戸
- (4) 武井直子, 西村泰光, 松崎秀紀, 李順姫, 大槻剛巳. 胸膜プラーク陽性者と悪性中皮腫患者の CD8+リンパ球の機能解析. 第19回日本免疫毒性学会, 2012. 9. 16. 東京

- (5) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, Kishimoto T, Otsuki T. Effects of asbestos exposure on induction of cytotoxic T lymphocytes in mixed lymphocyte reactions and cytotoxic potential of CD8⁺ lymphocytes in asbestos-exposed people. The 30st International Commission on Occupational Health, 2012. 3. 19. Cancun, Mexico
- (6) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Matsuzaki H, Lee S, Kishimoto T, Otsuki T. IFN- γ , granzyme B and perforin-positive cells of CD8⁺ lymphocytes in asbestos-exposed people with pleural plaque. 51th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2012. 3. 13. San Francisco, CA
- (7) 武井直子, 西村泰光, 前田真組, 松崎秀紀, 李順姫, 岸本卓巳, 大槻剛巳. 胸膜プラーク陽性石綿曝露者の末梢血CD8⁺リンパ球の機能評価. 第55回中国四国合同産業衛生学会, 2011. 12. 11. 高知
- (8) Kumagai N, Nishimura Y, Maeda M, Matsuzaki H, Lee S, Otsuki T. IFN- γ production and cytotoxicity of CD8⁺ lymphocytes in asbestos-exposed people with pleural plaque. 第40回日本免疫学会学術集会, 2011. 11. 27. 千葉
- (9) 熊谷直子, 西村泰光, 前田恵, 松崎秀紀, 李順姫, 岸本卓巳, 大槻剛巳. ヒトCTL分化における石綿曝露影響および胸膜プラーク陽性者のCD8⁺Tリンパ球のIFN γ 産生能. がん予防大会 2011 京都, 2011. 6. 21. 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武井 直子 (TAKEI NAOKO)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：00509276