

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 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890237

研究課題名（和文） アスベストによる制御性 T 細胞の機能増強の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of up-regulation of regulatory T cells induced by asbestos

研究代表者

松崎 秀紀 (MATSUZAKI HIDENORI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80335463

研究成果の概要(和文)：我々はアスベスト曝露が免疫担当細胞に与える影響を研究している。これまでに制御性 T 細胞のモデル細胞株である MT-2 を低濃度アスベスト存在下で長期培養したアスベスト長期曝露細胞株を樹立しており、本細胞株はアポトーシスを誘導する高濃度アスベストに対して抵抗性を示すこと、高い TGFβ や IL-10 産生能を有することを報告している。本研究では制御性 T 細胞の分化に関与する転写因子群 FoxP3、NFAT、FoxO1 に着目し、アスベスト曝露により誘導されるアポトーシスの回避と制御性 T 細胞機能の増強の仕組みを検討した。その結果、アスベスト長期曝露により FoxP3 と FoxO1 の発現が低下すること、FoxO1 がアスベスト曝露によるアポトーシス誘導に関与することを見いだした。これら結果はアスベスト長期曝露が制御性 T 細胞の機能を増強する分子機構を明らかにするうえで重要である。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that MT-2 cells, model of regulatory T cells, showed resistance to high concentration of asbestos and up-regulation of IL-10 and TGFβ production after long-term exposure to low concentration of asbestos. In this study, we analyzed the involvement of transcription factors, FoxP3, NFAT and FoxO1, in change of functions of MT-2 cells induced by asbestos. It was revealed that long-term exposure to asbestos reduced expression of FoxP3 and FoxO1, and FoxO1 regulated apoptosis induced by asbestos. These results are important for elucidating the mechanism of up-regulation of regulatory T cell induced by asbestos.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：衛生学

科研費の分科・細目：医歯薬学・衛生学

キーワード：アスベスト、がん、腫瘍免疫、制御性 T 細胞、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

アスベストは建築資材として広く使用されてきたが、悪性中皮腫や肺がんを引き起こ

すことが明らかとなり現在では使用は禁止されている。しかしながら、過去の使用歴や大震災後の瓦礫の処理などにより今後もア

スベスト曝露に起因するがんの患者数は増加すると予測されており、アスベスト曝露による発がんメカニズムの解明とがんの予防法の確立が望まれている。アスベストによる発がんの機構としては、アスベスト曝露により生じる活性酸素が DNA に損傷を与えることが広く知られているが、申請者の所属グループではこれに加えてアスベスト曝露が腫瘍免疫を抑制することを提唱している。これまでに、腫瘍免疫を抑制する作用をもつ制御性 T 細胞のモデル細胞株 MT-2 を用いた解析を行い、低濃度アスベスト存在下で長期培養した MT-2 細胞はアポトーシスを誘導する高濃度のアスベスト曝露に対して抵抗性の示すこと、TGFβ や IL-10 などの抑制性サイトカイン産生量が増加することを見いだしていた。即ち、低濃度アスベストの継続曝露はアポトーシスの低下による制御性 T 細胞数の増加とサイトカイン産生の亢進を介して、腫瘍免疫を抑制することが考えられている。一方、制御性 T 細胞の機能分化には転写因子 FoxP3 が必須であることが明らかにされており、さらに FoxP3 は上流転写因子 NFAT、FoxO1 により誘導を受けることが報告されていた。アスベスト長期曝露により誘導される MT-2 の細胞機能の変化にはこれらの転写因子群が関与することが予想されたが、アスベスト曝露がこれらの転写因子群に与える影響に関する研究はほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では制御性 T 細胞の調節に関わることが知られている転写因子群 (FoxP3、NFAT、FoxO1) に着目し、低濃度アスベスト曝露がこれらの転写因子に与える影響を中心として、低濃度アスベストの長期曝露により誘導される MT-2 細胞の機能を増強するメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では制御性 T 細胞のモデルとして MT-2 細胞を用いて以下の検討を行った。

① MT-2 親細胞より樹立したアスベスト長期曝露細胞株と MT-2 親細胞を用いて、FoxP3、NFAT、FoxO1 の mRNA およびタンパク質発現量の比較、リン酸化をはじめとする翻訳後修飾の解析を行った。

② アスベスト長期曝露細胞株と MT-2 親細胞内での各転写因子の転写誘導活性をレポーター遺伝子または内在性標的遺伝子の発現量を指標として検討した。

③ 上記の解析によりアスベスト曝露の影響を受けることが見いだされた転写因子に関して、分子生物学的手法を用いて細胞機能との関連を解析した。

4. 研究成果

① FoxP3、NFAT、FoxO1 の発現量の解析

MT-2 親細胞およびアスベスト長期曝露細胞より total RNA を抽出し、FoxP3、NFAT および FoxO1 の発現量を定量 RT-PCR 法により検討したところ、アスベスト長期曝露細胞内では FoxO1 と FoxP3 の発現量が低下していることが明らかとなった。また、FoxO1 についてはウェスタンブロット法によりタンパク質発現量も減少していることが確認された。なお、NFAT は mRNA およびタンパク質の発現量に両細胞間での差は見いだされなかった。また、FoxO1 の各種リン酸化部位に対するリン酸化特異抗体を用いて FoxO1 のリン酸化修飾を検討したが両細胞間での顕著な違いは観察されなかった。

② FoxO1 の転写活性の解析

上記の結果に基づき、FoxO1 の転写活性を内在性ターゲット遺伝子の発現量により測定した。MT-2 親細胞およびアスベスト長期曝露細胞より total RNA を調整し、各種 FoxO1 標的分子の特異的プライマーを用いた定量 RT-PCR を行った。その結果、FoxO1 により発現が抑制されることが知られている細胞周期進行の促進因子 CyclinD2 の発現上昇、FoxO1 により発現が誘導されることが知られているアポトーシス誘導因子 Bim や細胞周期進行の抑制因子 Gadd45 の発現量が減少していることが見いだされた。

③ 分子生物学的手法を用いた解析

FoxO1 を発現するレトロウイルスをアスベスト長期曝露細胞に感染した FoxO1 発現回復細胞株、FoxO1 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを MT-2 親細胞に感染した FoxO1 発現低下細胞株をそれぞれ樹立した。これらの FoxO1 発現調節細胞にアスベスト曝露を加え、アポトーシス細胞数を測定したところ FoxO1 の発現低下によりアポトーシス細胞数が低下したことから、アスベスト曝露によるアポトーシス誘導に FoxO1 が関与することが示された。一方、FoxO1 の発現量の低下していたアスベスト長期曝露細胞の FoxO1 の発現量を回復してもアポトーシス細胞数の増加は観察されなかった。

以上の結果から、低濃度アスベストの長期曝露が MT-2 細胞の FoxO1 や FoxP3 の発現を低下させることが明らかとなった。FoxO1 はストレスにより活性化を受け、アポトーシスや細胞周期進行の停止を誘導することが報告されている。本研究においても shRNA を用いた FoxO1 の発現抑制は高濃度アスベスト曝露によるアポトーシスの低下を引き起こすことから、高濃度アスベスト曝露によるアポトーシスの誘導に FoxO1 が関与することが示された。一方、アスベスト長期曝露細胞に FoxO1 を高発現するだけではアスベストに対する反応は回復しないことから、アスベスト

長期曝露細胞のアポトーシスの回避には FoxO1 の発現低下だけでなく他のメカニズムが関与することが考えられる。我々の研究グループではこれまでにアスベスト長期曝露細胞ではアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現量が増加することを見いだしている。これらの結果から、アスベスト長期曝露細胞では FoxO1 の発現低下や Bcl2 の発現上昇など複数の機構によりアポトーシスを回避していることが考えられる。一方、アスベスト長期曝露細胞はサイトカイン産生量の増加など制御性 T 細胞としての機能が亢進しているものの、本研究により FoxP3 の発現は低下していることが示された。これまで制御性 T 細胞の分化には FoxP3 が必須と考えられてきたが、アスベスト長期曝露細胞では FoxP3 とは独立のメカニズムにより細胞機能を調節していることが考えられる。制御性 T 細胞の制御は免疫学の基礎研究においても重要な研究課題であり、さらにアスベスト曝露による制御性 T 細胞の機能増強のメカニズムに関する詳細な研究が必要である。

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., Chen, Y., Kumagai-Takei, N., Hayashi, H., Matsuzaki, H., Lee, S., Hiratsuka, J., Nishimura, Y., Kimura, Y., Otsuki T. Alteration of cytoskeletal molecules in a human T cell line caused by continuous exposure to chrysotile asbestos. *Immunobiology*, in press (2013)
DOI:10.1016/j.imbio.2013.04.007. 査読あり
2. Kumagai-Takei, N., Nishimura, Y., Maeda, M., Hayashi, H., Matsuzaki, H., Lee, S., Hiratsuka, J., Otsuki, T. Effect of Asbestos Exposure on Differentiation of Cytotoxic T Lymphocytes in MLR of Human PBMCs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* in press (2013) 査読あり
3. Nishimura, Y., Maeda, M., Kumagai-Takei, N., Lee, S., Matsuzaki, H., Wada, Y., Nishiike-Wada, T., Iguchi, H., Otsuki, T. Altered functions of alveolar macrophages and NK cells involved in asbestos-related diseases. *Environ. Health Prev. Med.* 18 (3), 198-204 (2013)
DOI:10.1007/s12199-013-0333-y 査読あり
4. Maeda, M., Yamamoto, S., Chen, Y., Kumagai-Takei, N., Hayashi, H., Matsuzaki, H., Lee, S., Hatayama, T., Miyahara, N., Katoh, M., Hiratsuka, J., Nishimura, Y., Otsuki, T. Resistance to asbestos-induced apoptosis with continuous exposure to crocidolite on a human T cell. *Sci. Total Environ.* 429, 174-182 (2012) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.043. 査読あり
5. 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., Otsuki, T. Asbestos-induced cellular and molecular alteration of immunocompetent cells and their relationship with chronic inflammation and carcinogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:492608 (2012) DOI:10.1155/2012/492608. 査読あり
6. Lee, S., Hayashi, H., Maeda, M., Chen, Y., Matsuzaki, H., Takei-Kumagai, N., Nishimura, Y., Fujimoto, W., Otsuki, T. Environmental factors producing autoimmune dysregulation--chronic activation of T cells caused by silica exposure. *Immunobiology.* 217(7), 43-48(2012) DOI: 10.1016/j.imbio.2011.12.009. 査読あり
7. Fujiwara, T., Fukao, A., Sasano, Y., Matsuzaki, H., Kikkawa, U., Imataka, H., Inoue, K., Endo, S., Sonenberg, N., Thoma, C., Sakamoto, H. Functional and direct interaction between the RNA binding protein HuD and active Akt1. *Nucleic Acids Res.* 40(5), 1944-1953(2012) DOI: 10.1093/nar/gkr979 査読有り
8. Kumagai-Takei, N., Maeda, M., Chen, Y., Matsuzaki, H., Lee, S., Nishimura, Y., Hiratsuka, J., Otsuki, T. Asbestos induces reduction of tumor immunity. *Clin. Dev. Immunol.* 2011:481439 (2011) DOI: 10.1155/2011/481439. 査読あり

[学会発表] (計 42 件)

1. 松崎秀紀・MT-2 細胞のアポトーシス制御における FoxO1 の役割・第 83 回日本衛生学会学術総会・平成 25 年 3 月 24-26 日・金沢大学
2. Matsuzaki, H. ・ THE ROLE OF TRANSCRIPTION FACTOR FOXO1 IN ASBESTOS-INDUCED APOPTOSIS OF MT-2 CELLS ・ 52nd Annual Meeting of the

Society of Toxicology ・平成 25 年 3 月
11-14 日 ・Henry B. Gonzalez Convention
Center (米国)

3. 松崎秀紀・フォークヘッド転写因子 FoxO1
を介した MT-2 細胞のアポトーシス調節
機構の解析・第 12 回分子予防環境医学研
究会・平成 25 年 2 月 1-2 日・つくばサイ
エンス・インフォメーションセンター
4. Matsuzaki, H. ・ The role of forkhead
transcription factor FoxO1 in
regulation of MT-2 cells ・第 41 回日本
免疫学会学術総会 ・平成 24 年 12 月 5-7
日 ・神戸国際会議場
5. 松崎秀紀 ・アスベスト長期曝露により誘
導される MT-2 細胞の機能変化のメカニ
ズムの解析 ・第 19 回免疫毒性学会 ・平
成 24 年 9 月 15-16 日 ・東京慈恵会医科学
大学
6. 松崎秀紀 ・アスベスト曝露によるフォ
ークヘッド転写因子 FoxO1 の機能調節 ・第
82 回日本衛生学会学術総会 ・平成 24 年
3 月 24-26 日 ・京都大学
7. Matsuzaki, H. ・Effect of Asbestos on
Transcription Factor Foxo1 ・ 30th
international Congress on
Occupational Health ・平成 24 年 3 月
18-23 日 ・Cancun Center(メキシコ)
8. Matsuzaki, H. ・Effect of asbestos on
forkhead transcription factors FoxO1
in MT-2 Cells. ・51st Annual Meeting of
the Society of Toxicology ・平成 24 年
3 月 11-15 日 ・Moscone Center (米国)
9. 松崎秀紀・フォークヘッド転写因子 FoxO1
に対するアスベスト曝露の影響・第 18 回
日本免疫毒性学会学術大会 ・平成 23 年 9
月 8-9 日 ・千葉大学

他 33 件

[図書] (計 0 件)

[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
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/hygiene/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 秀紀 (MATSUZAKI HIDENORI)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：80335463

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし