

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310048

研究課題名(和文)慢性ヒ素中毒における免疫機能障害の関与に関する研究

研究課題名(英文)A study on the involvement of immune dysfunction in chronic arsenic poisoning

研究代表者

角 大悟 (Sumi, Daigo)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：30400683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素中毒により障害を受けることが予想される感染免疫、腫瘍免疫に焦点を当て免疫毒性学的研究を行った。NK-92細胞を用いた検討では、細胞障害活性が亜ヒ酸曝露により減少すること、その機序として、攻撃因子の発現抑制、および抑制性受容体の発現亢進を見出した。Jurkat細胞を用いて検討したところ、化学刺激によるIL-8およびTNF- $\alpha$ の増加に対して、亜ヒ酸はIL-8産生を上昇させる一方で、TNF- $\alpha$ 産生を抑制した。ヒ素汚染地域住民の血液中の27種のサイトカインを測定したところ、ヒ素汚染の状況に伴って多くのサイトカインの上昇が検出された一方で、減少するサイトカインも検出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined immune toxicological studies showing whether chronic arsenic exposure affects infection and tumor immunity. Exposure of NK-92 cells (human NK cells) to arsenite reduced cytotoxic activity against human leukemia K562 cell. The mechanism underlying the suppression of cytotoxic activity by arsenite were down-regulation of expression of attack factors such as granzyme B, and up-regulation of inhibitory receptors such as KIR2DL3. When it was investigated using Jurkat cells (human T cell) with an increase in IL-8 and TNF- $\alpha$  by chemical stimuli, arsenite stimulated IL-8 production, while inhibited TNF- $\alpha$  production. In addition, it was measured 27 cytokines in blood samples taken from residents in arsenic contaminated areas in Bangladesh. While the number of cytokines in accordance with the state of the arsenic contamination were increased, decreasing cytokines were also detected.

研究分野：分子毒性学

キーワード：ヒ素化合物 免疫毒性 ナチュラルキラー細胞

## 1. 研究開始当初の背景

インドやバングラデシュなどの東アジア地域では高濃度のヒ素化合物を含む地下水を飲料水として使用していることから、慢性ヒ素中毒が発生している。慢性ヒ素中毒によって肝臓、肺、皮膚などの多臓器に癌を発生させることや、糖尿病に代表される代謝系疾患、また高血圧や動脈硬化などの循環器疾患など広範囲の臓器に障害を与える。現在までに慢性ヒ素中毒によるこれらの疾患の発症機序についての報告はなされているが、生体の防御機能の中核を担う免疫機能がヒ素化合物により障害を受けているかについての詳細な報告は少ない。

ヒトは環境に存在する感染(抗原)に対し、多彩な免疫応答システムによって防御されている(感染免疫)。免疫機能は自然免疫と獲得免疫に分けられるが、これらのシステムは密接に関係している。自然免疫に属する樹状細胞は抗原の情報を獲得免疫系に属するヘルパーT細胞に提示する。マクロファージは異物の貪食を行うことで一酸化窒素(NO)などの活性物質を放出する。NK細胞は感染した細胞を特異的な受容体を介して殺傷する。一方、獲得免疫は自然免疫に応答し発動するシステムであり、ヘルパーT細胞は樹状細胞により活性化される。その活性化は樹状細胞から受け取るサイトカインにより異なり、IFN- $\gamma$ やIL-12を受け取った場合、ヘルパーT細胞はTh1細胞に分化し、IFN- $\gamma$ やIL-2を放出することで、キラーT細胞やナチュラルキラー(NK)細胞を活性化する。一方で、Th2に分化したT細胞はIL-4, IL-5, IL-13のサイトカインを放出することで、好酸球、好塩基球、肥満細胞を介して寄生虫に対して生体防御反応を引き起こすとともに、アレルギー反応を惹起する。また、免疫は生体外異物に対してだけでなく、癌細胞に対しても働くことが明らかとなっている(腫瘍免疫)。癌細胞が産生する抗原(腫瘍特異抗原, TSA)の情報を樹状細胞がヘルパーT細胞に提示することで、癌細胞へのキラー活性を上昇させる。また自然免疫に関わるNK細胞やマクロファージなども腫瘍免疫に関与し、癌細胞の成長を抑制している。

このように生体防御に関わる感染および腫瘍免疫システムの機能異常が生体に重大な疾患を誘発することは明白であるが、ヒ素による易感染性、多臓器における腫瘍形成と免疫機能との関係について系統的に解析した研究はほとんどない。

## 2. 研究の目的

「ヒ素化合物によって生体の防御機能である免疫応答機能に障害を与えるのではないか」と仮説を立て、様々な免疫応答機能の中でも慢性ヒ素中毒により障害を受けることが予想される感染免疫および腫瘍免疫に焦

点を当て、系統的な研究(培養細胞 初代培養細胞 実験動物 ヒトサンプル)を進める。ヒ素化合物を曝露した培養細胞、免疫担当細胞(*in vitro, ex vivo*)および長期的にヒ素化合物を投与したマウスから採取した免疫担当細胞(*in vivo*)の各免疫機能がヒ素化合物により影響を受けるかについて検討する。また、バングラデシュ Rajshahi 大学の Hussain 博士との共同研究で得られたバングラデシュヒ素汚染地域住民の血液サンプル中のサイトカイン量を測定し、慢性ヒ素中毒患者における免疫機能障害について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞: ヒトナチュラルキラーNK-92細胞, ヒトT細胞由来 Jurkat細胞, マウスNK細胞 (Miltenyi Biotech社のMagnetを使用し, C57Bl6Jマウス脾臓から採取), ヒト慢性白血病K562細胞, マウス白血病YAC-1細胞を使用した。

(2) NK細胞の細胞障害性: 亜ヒ酸に曝露したNK細胞とあらかじめFITCで染色しておいたヒト慢性白血病K562あるいはマウス白血病YAC-1細胞を1:1, 2:1, 3:1の割合で混合し, 4時間後に死んだ細胞を染色することができる7-AADを加えた。混合されている溶液をフローサイトメトリーで展開し, 緑色(FITC)に染色されているK562, YAC-1細胞のうち, 赤色(7-AAD)に染色されている割合を定量した。

(3) mRNA量: SYBR Greenを使用したReal-time PCRで測定した。

(4) プライマーアレイ: TaKaRa社のヒトnatural killer cell mediated cytotoxicityにある88種のプライマーを使用し, Real-time PCRで測定した。

(5) サイトカイン量: 培養後の培地を回収し, FlowcytomixおよびBio-plexおよびELISAを用いて測定した。

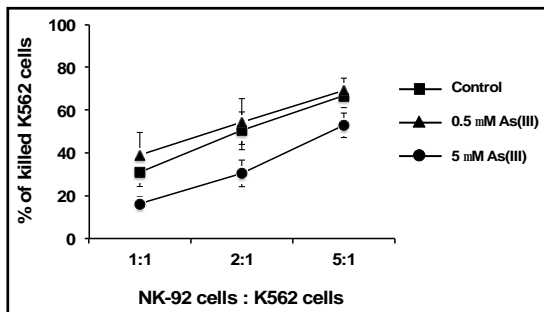
(6) 慢性ヒ素地域住民サンプル: バングラデシュヒ素汚染の度合いが異なる3地域(Very mild, Moderatory affected, Severely affected)の住民の血液サンプルを用い, サイトカインについて, 血液中の濃度をBioplexで測定した。また, ヒ素曝露との関連性を調べるために, 各住民の爪および髪の毛のヒ素濃度をICP-MSで測定した。

## 4. 研究成果

(1) NK-92細胞を使用した結果

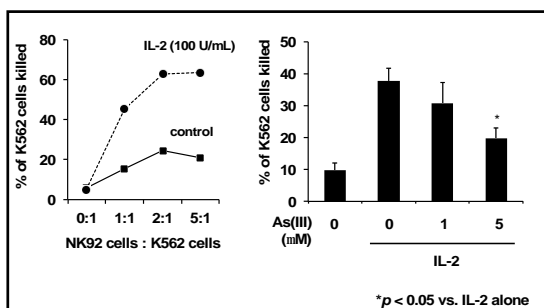
亜ヒ酸曝露がNK細胞の細胞障害性に影響を与えるかについて検討を行った。亜ヒ酸0.5, 5  $\mu$ Mに24時間曝されたNK-92細胞の細

細胞障害性について K562 細胞を使用して検討したところ、5  $\mu\text{M}$  の亜ヒ酸に曝された NK-92 細胞では有意に細胞障害性が抑制された。



上記の結果を受けて、5  $\mu\text{M}$  の亜ヒ酸に曝された NK-92 細胞における mRNA の変動を網羅的に解析するために、TaKaRa 社の Primer Array (ヒト natural killer cell mediated cytotoxicity) を使用した。NK 細胞による細胞障害性に関わる 88 種類の mRNA 量をコントロールあるいは 5  $\mu\text{M}$  の亜ヒ酸に曝された NK-92 細胞で比較検討したところ、5 種類の遺伝子が亜ヒ酸による発現量が 2 倍以上上昇しているのがわかり、一方で 15 種類の遺伝子が亜ヒ酸による 1/2 以下に減少していることが明らかとなった。亜ヒ酸により上昇している遺伝子群のなかで抑制性受容体の KIR2DL3 が検出されたので、さらに、Real-time PCR で検証したところ、亜ヒ酸 0.5, 5  $\mu\text{M}$  となるにつれ発現量が上昇していた。現在、その機序について検討を進めている。一方、亜ヒ酸により減少している遺伝子群のなかで、がん細胞に対する攻撃因子である fas Ligand, GranzymeB について Real-time PCR で検証したところ、亜ヒ酸 0.5, 5  $\mu\text{M}$  となるにつれ発現量が減少していた。さらに、活性化受容体である FCGR3A, KLRC3 の発現量についても亜ヒ酸による減少を見出した。

一方、本 NK-92 細胞は細胞の生育のために IL-2 を必要としている。そこで IL-2 依存的な反応に対する亜ヒ酸の影響を調べるために、NK-92 細胞を IL-2 フリーの状態に 12 時間培養し、その後 IL-2 を加えることで検討を進めた。下記の図に示すように IL-2 添加により NK-92 細胞の細胞障害性は著しく上昇した。このような条件下で亜ヒ酸を曝露したところ、5  $\mu\text{M}$  の亜ヒ酸曝露により IL-2 依存的に活性化された細胞障害性は抑制された。

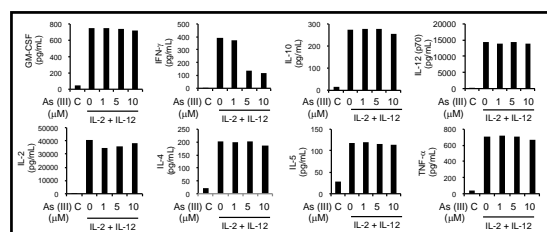


亜ヒ酸による細胞障害性に対する抑制作用を明らかにするために、攻撃因子である GranzymeB に着目し検討したところ、IL-2 によって mRNA 量は 3 倍に上昇していたが、5  $\mu\text{M}$  の亜ヒ酸の共存によりその上昇は抑制された。さらに、NK 細胞に IL-2 を添加することで種々のサイトカインが産生することが明らかとなっている。そこで、NK-92 細胞に上記条件下で IL-2 を添加したところ、IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-6, TNF- $\beta$  のサイトカインが培地中に遊離することが明らかとなった。これらの産生に対する亜ヒ酸の影響を検討したところ、5  $\mu\text{M}$  の亜ヒ酸の共存により IL-10, IL-6, TNF- $\beta$  の産生が抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、亜ヒ酸は NK-92 細胞の標的細胞に対する細胞障害性を低下させることが明らかとなり、その機序として、NK-92 細胞の攻撃あるいは抑制に関わる因子、さらにはサイトカイン産生を変動させるという事が明らかとなった。

## (2) マウス NK 細胞を使用した結果

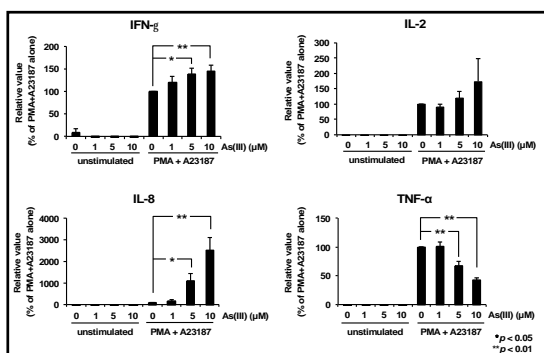
C57Bl6J マウスに毎日 1, 5 mg/kg 体重の亜ヒ酸を腹腔内に投与し 7 日後に解剖後、Miltenyi Biotech 社の試薬を使用して脾臓から NK 細胞を採取した。生理食塩水を投与したマウスから採取した NK 細胞と比較すると、亜ヒ酸を投与されたマウスからの NK 細胞の細胞障害性に変化はなかった。亜ヒ酸投与後の脾細胞内のヒ素濃度を測定したところ、投与濃度依存的に脾細胞内にヒ素が蓄積されていることが明らかとなった。そこで、慢性的なヒ素曝露による NK 細胞への影響を検討するために、50, 100 ppm の亜ヒ酸を 3, 6 ヶ月間飲水投与した。上記のように NK 細胞を採取し、細胞障害性を検討したところ、亜ヒ酸による NK 細胞の細胞障害性に変化はなかった。

一方、*ex vivo* の系における亜ヒ酸の影響を検討するために、脾臓から採取した NK 細胞に亜ヒ酸を曝露した。マウス NK 細胞からのサイトカイン産生に対して亜ヒ酸が影響を与えるかについて検討するために、マウス NK 細胞に IL-2 および IL-12 を添加した。Bio-plex を用いて IL-2 および IL-12 を添加した NK 細胞からのサイトカインを検出したところ、GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-2, IL-4, IL-5, TNF- $\alpha$  の産生が著しく亢進した。これらのサイトカイン産生に対する亜ヒ酸の影響を検討したところ、IFN- $\gamma$  の産生のみ亜ヒ酸濃度依存的に抑制された。



### (3) Jurkat 細胞を使用した結果

T 細胞から産生されるサイトカイン産生に対する亜ヒ酸の影響を検討するために、ひと T 細胞由来 Jurkat 細胞をホルボールエステル (PMA) およびカルシウムイオノフォア A23187 で刺激した 12 時間後の培地中に分泌される 11 種のサイトカインを測定したところ、IL-2、IL-8 および TNF- $\alpha$  の増加を検出した。これらの Jurkat 細胞のサイトカイン分泌能に対する亜ヒ酸の影響を検討したところ、亜ヒ酸は PMA+A23187 による IL-2 産生に対しては影響を与えず、IL-8 に関しては上昇させる一方で、TNF- $\alpha$  産生を亜ヒ酸は抑制した。一方、コンカナバリン A (ConA) を刺激剤とした場合の亜ヒ酸曝露の影響を検討したところ、ConA 刺激によりこれらサイトカインすべてが上昇したが、亜ヒ酸による影響は見られなかった。次にこれらサイトカイン mRNA 発現に対する亜ヒ酸の影響を調べたところ、PMA+A23187 により IL-8 および TNF- $\alpha$  mRNA 量は顕著に上昇し、さらに亜ヒ酸に曝露された Jurkat 細胞では IL-8 mRNA は有意に増加する一方で、TNF- $\alpha$  mRNA は有意に減少した。



IL-8 は癌細胞の増殖を亢進させる、また腫瘍の血管新生を誘発すること等が報告されており、慢性ヒ素中毒による発癌との関係があるのではないかと考え、亜ヒ酸曝露による IL-8 産生上昇に関するシグナル経路を検討した。ERK および p38MAPK の阻害剤で処理したところ、どちらの阻害剤の処理によっても IL-8 産生は抑制された。そこで、ERK および p38MAPK のリン酸化に対する亜ヒ酸の影響について検討を進めたところ、PMA+A23187 により ERK、p38MAPK ともにリン酸化が亢進したが、亜ヒ酸は ERK のリン酸化には影響を与えず p38MAPK のリン酸化のみ増強させた。これらの結果から、亜ヒ酸による IL-8 産生増強作用に p38MAPK が関与している事が明らかとなった。

### (4) ヒ素汚染地域住民のサンプルを使用した結果

バングラデシュ Rajshahi 大学の Hussain 博士との共同研究で得られたバングラデシュヒ素汚染地域住民の血液サンプル (Control, Very mild, Moderately affected, Severely affected) 中のサイトカイン量を測定した。サ

イトカイン測定には、Bio-Rad 社の Group 1 に搭載されているサイトカイン (27 種: Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF) について Bioplex を使用し測定した。その結果、control 地域住民の血液と比較してヒ素汚染地域住民の血液には多くのサイトカイン量が上昇していることが明らかとなった。一方でヒ素汚染状況がひどくなるにつれ、減少するサイトカインも検出された。

### 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 4 件)

1. Sumi, D., Tsurumoto M., Yoshino Y., Inoue M., Yokobori, T., Kuwano, H., and Himeno, S. High accumulation of arsenic in the esophagus after exposure to arsenite. *Arch. Toxicol.* 2014 in press
2. Sumi, D., Abe, K., and Himeno, S. Arsenite retards the cardiac differentiation of rat cardiac myoblast H9c2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436:175-179, 2013
3. Sumi, D., Shimizu, Y., and Himeno, S. Involvement of Nrf2 activation in the upregulation of S100A9 by exposure to inorganic arsenite. *Int. J. Mol. Med.* 31: 259-264, 2013
4. Sumi, D., and Himeno, S. Role of Arsenic (+3 Oxidation State) Methyltransferase in Arsenic Metabolism and Toxicity. *Biol. Pharm. Bull.* 35: 1870-1875, 2012

(学会発表)(計 15 件)

1. 角大悟, 小川智子, 原田久美, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸によるナチュラルキラー細胞の細胞障害性抑制機構の解明. 第 4 回メタロミクス研究フォーラム, 2014 年 11 月, 東京
2. 角大悟, 小川智子, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸は NK 細胞の細胞障害性を減弱させる. 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会, 2014 年 9 月, 徳島
3. 角大悟, 原田久美, 姫野誠一郎: IL-2 による NK 細胞活性化に対する亜ヒ酸の影響. 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会, 2014 年 9 月, 徳島
4. 角大悟, 山近杏奈, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸は Jurkat 細胞の IL-8 産生を亢進させる. 第 21 回日本免疫毒性学会学術年会, 2014 年 9 月, 徳島

5. Daigo Sumi, Seiichiro Himeno: Effects of arsenic on immunological functions, X. ISTERH (International Conference Trace Elements Research on Health and Diseases), 2013 年 11 月, 東京
6. 角大悟, 津山博匡, 原田久美, 山近杏奈, 小川智子, 姫野誠一郎: ヒ素化合物による免疫担当細胞の機能障害, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月, 横浜
7. 小川智子, 津山博匡, 原田久美, 角大悟, 姫野誠一郎: ナチュラルキラー細胞の機能に対する亜ヒ酸の影響. 日本薬学会第 133 年会 2013 年 3 月, 横浜
8. 角大悟, 津山博匡, 原田久美, 小川智子, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸によるナチュラルキラー細胞の機能障害. 第 12 回分子予防環境医学研究会, 2013 年 2 月, つくば
9. 角大悟, 阿部和沙, 姫野誠一郎: ラット H9c2 細胞の心筋分化に対する亜ヒ酸の影響. 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2012 年 10 月, 名古屋
10. 角大悟, 岡田 秀太, 與儀邦子, 宮高透喜, 姫野誠一郎: ATP シグナル伝達に対する亜ヒ酸の影響. 第 19 回日本免疫毒性学会学術大会, 2012 年 9 月, 東京
11. 山近杏奈, 角大悟, 姫野誠一郎: Jurkat 細胞が産生するサイトカインに対する亜ヒ酸の影響. 第三回メタロミクスフォーラム 2012 年 8 月, 東京
12. 原田久美, 小川智子, 角大悟, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸曝露による NK 細胞活性化に対する影響. 第三回メタロミクスフォーラム 2012 年 8 月, 東京
13. 角大悟, 原田久美, 小川智子, 姫野誠一郎: 亜ヒ酸の NK 細胞活性化に対する免疫毒性作用. 第 39 回日本毒性学会学術年会 2012 年 7 月, 仙台
14. Daigo Sumi, Yuri Shimizu, Seiichiro Himeno: Reduction of the degranulation in rat RBL-2H3 mast cells by chronic exposure to arsenite via impairment of store-operated  $Ca^{2+}$  entry. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology July, 2012, Sendai
15. 小川智子, 原田久美, 角大悟, 津山博匡, 姫野誠一郎: IL-2 による NK 細胞活性化に対する亜ヒ酸の影響. 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月, 北海道

〔その他〕

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab10/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角 大悟 (SUMI, Daigo)

徳島文理大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 30400683

### (3) 連携研究者

姫野誠一郎 (HIMENO, Seiichiro)  
徳島文理大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20181117

赤木正明 (AKAGI, Masaaki)  
徳島文理大学・薬学部・教授  
研究者番号: 90093658