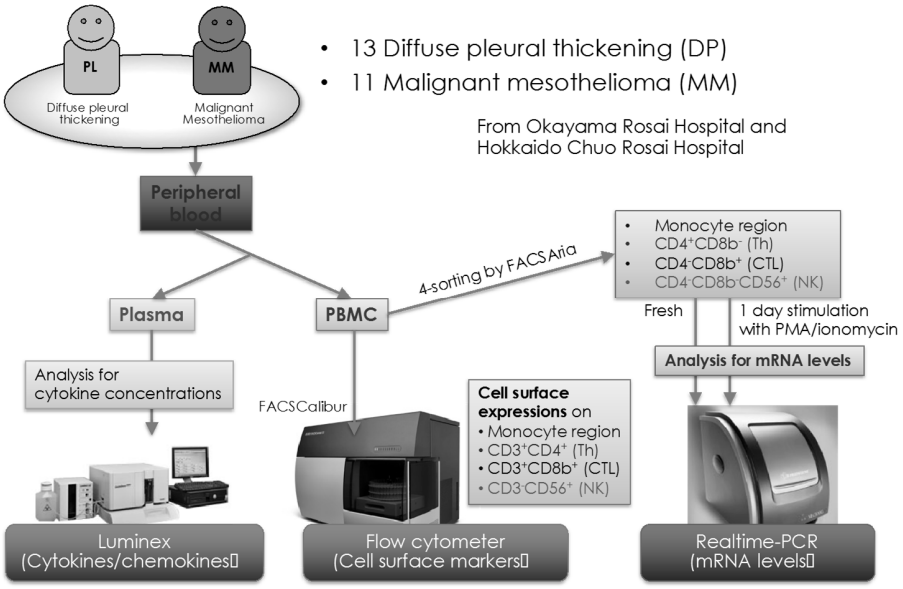
13　包括的免疫機能解析による中皮腫予防診断スコアの構築	西村　泰光

【目的】悪性中皮腫（MM）は石綿曝露により引き起こされ、発症機序の解明が求められている。我々は、石綿曝露による免疫機能影響の解析に取り組み、T・NK 細胞の特徴的機能低下を明らかにしてきた。最近、胸膜プラーク陽性非担癌者と MM の包括的免疫機能解析を行い、MM において制御性 T 細胞（Treg）機能指標と炎症性サイトカイン血中濃度の上昇を明らかにした。そこで、石綿関連良性疾患であるびまん性胸膜肥厚（DP）患者と MM 患者について同様の解析を行い比較した。

【方法】PBMC 中の単球(Mo)・$CD4^+$T(Th)・$CD8^+$T(CTL)・$CD56^+$NK(NK)細胞の細胞表面タンパク質発現量を FACS で解析した。PBMC を前述 4 群にソートし、一部をそのまま、残りを PMA/IM 刺激下で、Mo は刺激せず、1 日培養後、凍結保存した。Milliplex とリアルタイム RT-PCR で血漿中サイトカイン・ケモカイン濃度および凍結細胞中の各種遺伝子 mRNA レベルを測定した。

【結果】DP に比べ、MM では Th 上の GITR, CD69 発現量が高く、CTL 上の CXCR3, CD69 発現量は高値であった。Th 中の RORC、NK 中の c-Rel mRNA レベルは MM で高値であった。他方、DP は Th 中の高い GATA-3、CTL 中の高い PRF1（perforin）mRNA レベルを示した。 CTL の mRNA については granzyme B 量と正相関性を示す perforin 量が MM で有意に低値であった。GATA-3 mRNA 量は細胞表面 CTAL-4、GITR 量と負相関性を、RORC mRNA は細胞表面 GITR と正相関性を示した。以上の結果は、MM と DP は免疫機能状態が大きく異なり、Th および CTL 機能の差異が顕著であることを示す。Th における GATA3 と RORC の両転写因子の発現量変動が関わる Treg 機能亢進および CTL における perforin 産生能減弱に起因する細胞傷害性低下と MM 発症機序との関連が示唆される。

研究全体総覧図



13. 包括的免疫機能解析による中皮腫予防診断スコアの構築

西村　泰光

川崎医科大学 医学部 衛生学

Key words：アスベスト，悪性中皮腫，石綿関連疾患，免疫抑制作用

緒　言

悪性中皮腫（MM）はアスベスト（石綿）の毒性影響により引き起こされていると一般的に説明されている。しかし、約 40 年に及ぶ長い潜伏期間や、石綿曝露者の一部で且つ比較的低濃度曝露者で多いことなどの知見は、石綿曝露と MM の関係がより複雑であることを示唆する［1］。我々は“石綿曝露の免疫機能影響”を提起し、これまでに石綿曝露と MM に関連した幾つかの免疫機能抑制の存在を明らかにしてきた。ヒト末梢血由来細胞または細胞株を用いて石綿曝露による NK 細胞における NKp46 発現低下［2，3］、T ヘルパー細胞における CXCR3 発現と IFN-γ 産生低下［4，5］、細胞傷害性 T 細胞における細胞傷害機能と IFN-γ 産生低下［6，7］、制御性 T 細胞における抑制能亢進をはじめとする特徴的な抗腫瘍免疫機能低下の実態［8，9］、その一部が MM 患者の末梢血細胞においても見られることを確認し、石綿曝露の免疫抑制作用と悪性中皮腫との関わりについて報告している［10］。また最近、これまでの研究成果に基づき、石綿曝露影響と MM に関連する免疫機能変化の包括的理解を目的とし、健常人・石綿曝露非担癌者（胸膜プラーク陽性者；PL）・MM 患者の末梢血を用いて免疫学的特徴を広範に解析し比較した。その結果、石綿曝露影響と考えられる PL と MM に共通する機能低下を捉えると共に、MM では Treg 機能分子である CTLA-4 発現量が Th 細胞上で増加し、MCP-1 など種々の血中炎症性サイトカイン濃度が増加していｚることを確認し、これらの結果の重回帰分析により得た数式で算出される中皮腫スコア（M-score）は MM 患者において明瞭に高値で、ROC 曲線は良好で感度・特異度ともに高値であることを見いだした（特許出願済　出願番号：JP2016062106）。一方、石綿曝露は中皮腫のような悪性疾患だけでなくびまん性胸膜肥厚（DP）などの良性疾患も引き起こすが、両疾患における免疫学的解析を詳細に行われたことはこれまで無く、その理解は石綿曝露後の中皮腫発症機序の解明に寄与すると考えられる。

そこで、本研究では MM 患者と DP 患者の末梢血を用いて免疫機能を包括的に解析し、両疾患背景となる免疫学的特徴の解明を試みた。その結果、MM と DP は免疫機能状態が大きく異なり、Th および CTL 機能の差異が顕著であることを示す。 Th における GATA3 と RORC の両転写因子の発現量変動が関わる Treg 機能亢進および CTL における perforin 産生能減弱に起因する細胞傷害性低下と MM 発症機序との関連が示唆される。

方　法

1. 患者検体の調製

同意の得られた岡山労災病院または北海道中央労災病院の MM 患者（11 名）および DP 患者（13 名)より末梢血の提供を受けた。遠心分離により血漿を採取した後、Ficoll-Hypaque 法により末梢血単核細胞（PBMC）を調製した。一部の検体については PBMC 回収量が少なく、細胞表面タンパク質発現量または遺伝子 mRNA 発現量解析の一方のみとなり、他方についてはデータが欠落した。

2. 細胞表面タンパク質発現量

PBMC の一部を CD3、CD4、CD8、CD56、および各種表面抗原に対する蛍光標識抗体を用いてそれぞれ三重染色し、FSC/SSC で同定される単球（Mo）・$CD3^+CD4^+$リンパ球（Th）・$CD3^+CD8^+$リンパ球（CTL）・$CD3^-CD56^+$ナチュラルキラー細胞（NK）の種々の細胞表面タンパク質発現量を FACS Calibur で解析した。

3. 各細胞集団の分取

PBMC の残りを CD4、CD8、CD56 に対する蛍光標識抗体で三重染色し、FACS Aria を用いて FSC/SSC で同定される単球（Mo）・$CD4^+CD8^-$リンパ球（Th）・$CD4^-CD8^+$リンパ球（CTL）・$CD4^-CD8^-CD56^+$ナチュラルキラー細胞(NK)の 4 群にソートし、一部をそのまま、残りを PMA/IM 刺激下で、Mo は刺激せず、1 日培養後、凍結保存した。

4. リアルタイム RT-PCR

凍結保存した細胞試料より Total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を得て、これを鋳型とし各種遺伝子プライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、gapdh との比較により ΔCq 値を算出し遺伝し mRNA 相対量として比較した。

5. サイトカイン・ケモカイン濃度測定

凍結保存した血漿中の 29 種のサイトカイン・ケモカイン濃度を Milliplex を用いて測定した。

6. 統計解析

群間比較は分散分析で行い、相関性はピアソン相関係数の有意差判定により確認した。統計解析には IBM SPSS Statistics version 22 を用いた。

結果

1. Th 細胞表面タンパク質発現の差異

Th 上の GITR と CTLA-4 発現量（MFI）は正相関性を示し（$R=0.795$、$p<0.01$）、GITR 発現量（MFI）は MM 患者で有意に高値であった。他方、Th や CTL 上 CD69%および CTL 上 CXCR3%は MM で有意に高値であった（図 1）。NK や Mo について MM 患者・DP 患者間で有意な差を示す細胞表面タンパク質発現量は無かった。

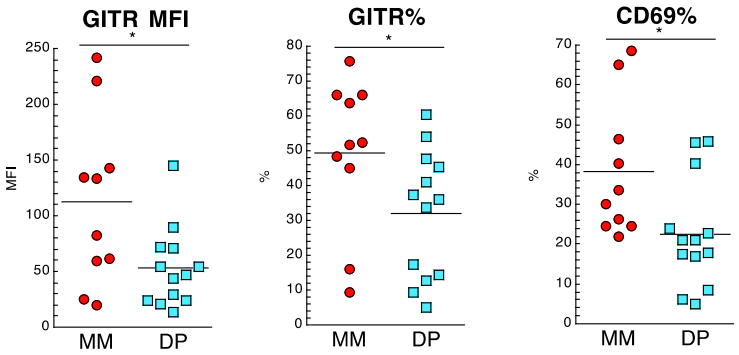


図 1. Th 細胞表面 GITR および CD69 発現の MM および DP 患者間比較

MM 患者または DP 患者より調製した PBMC 中の $CD3^+CD4^+$細胞上 GITR および CD69 発現について測定した平均蛍光強度（MFI）および陽性比率（%）を示す。統計学的有意差を「*」で記す（$*p<0.05$）。

2. Th または CTL における遺伝子 mRNA 発現量の差異

mRNA 相対量の解析では、未刺激 Th 中 GATA-3 発現量は MM で有意に低く、他方で RORC 発現量は高値であった。一方、Foxp3 発現量については MM・DP 間で有意な差が見られなかった。未刺激 CTL の mRNA については granzyme B 量と正相関性（$R=0.518$、$p<0.05$）を示す perforin 量が MM で有意に低値であった（図 2）。NK においては NF-κB 構成成分の遺伝子である c-Rel mRNA 量が MM で有意に高値であった。

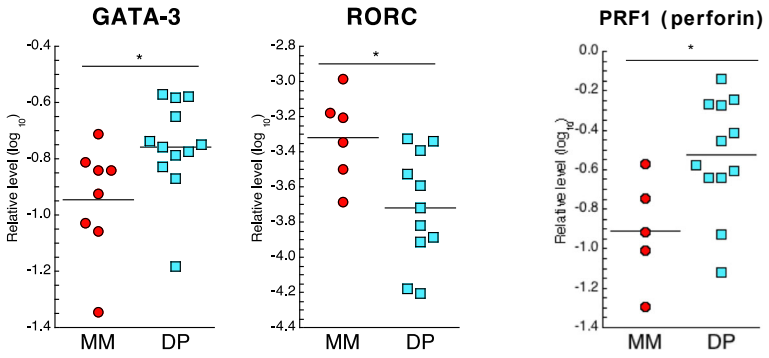


図 2.　Th または CTL における GATA-3、RORC、PRF1 mRNA 相対量の MM および DP 患者間比較
MM 患者または DP 患者の PBMC より分取した Th（左・中）または CTL（右）における GATA-3、RORC、PRF1 mRNA 相対量を示す。統計学的有意差を「*」で記す（*p < 0.05）。

3. Th における転写因子遺伝子発現量と制御性 T 細胞マーカー細胞表面発現量との関連性

Th において Foxp3、T-bet、GATA-3、RORC は転写因子としてそれぞれ Treg、Th1、Th2、Th17 細胞の分化を指示するマスター遺伝子として働く。上述の GITR や CTLA-4 は Treg 細胞において高発現していることが知られていることから、両分子の細胞表面発現量と転写因子 mRNA 発現量との相関を調べた。GATA-3 mRNA 量は細胞表面 CTAL-4、GITR 量（MFI）と負相関性を（R = -0.641、p < 0.01 ; R = -0.735、p < 0.01）、RORC mRNA は細胞表面 GITR（MFI）と正相関性を示した（R = 0.560、p < 0.01）（図 3）。他方、Foxp3 や T-bet 発現量については GITR または CTLA-4 発現量との相関性が見られなかった。

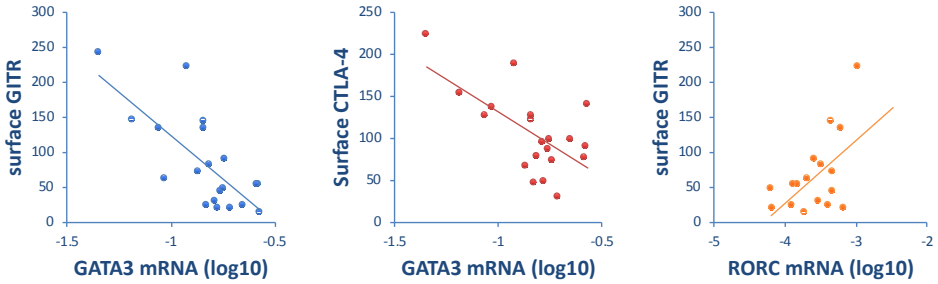


図 3.　Th における転写因子遺伝子発現量と制御性 T 細胞マーカー細胞表面発現量の相関性解析
Th における GATA-3 mRNA 相対量と GITR（左）または CTLA-4 細胞表面発現量（MFI）（中）との負相関性、および RORC mRNA 相対量と GITR 発現量との正相関性を示す。

4. 血漿中サイトカイン・ケモカイン濃度

血漿中の 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、IL17、EGF、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、INF-α2、IFN-γ、IP-10、MCP-1、MIP-1α、MIP-1β、TNF-α、TNF-β、IL-1Ra、VEGF 濃度について調べた。いずれの濃度についても MM 患者と DP 患者の間で有意な差は認められなかった。

考　察

以上の結果は、MM 患者と DP 患者では免疫機能状態が大きくことなり、中でも Th および CTL 機能の差異が顕著で有ることを示す（図 4）。Th における GATA3 と RORC の両転写因子の発現量変動が関わる Treg 機能亢進および CTL における perforin 産生能減弱は石綿曝露によりその発がん性に起因し出現することが予想される異常細胞・形質転換細胞の排除を不十分なものとし、石綿曝露後の MM 発症に関連する可能性がある。他方で、DP において MM と比べて高い perforin 産生能はそれらの排除を適切に実行することに寄与すると予想される。石綿曝露者が被る石綿関連疾患の差異と石綿曝露免疫機能影響の差異との関連が示唆される。

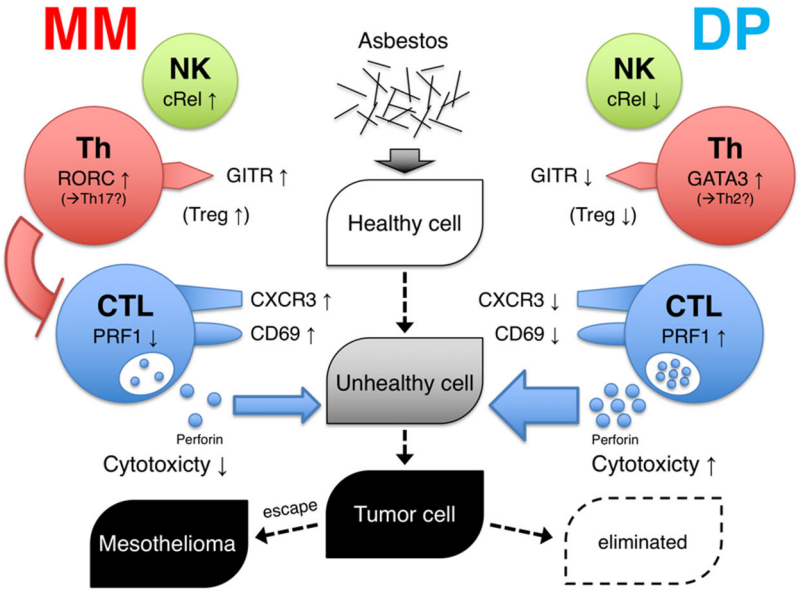


図 4.　要約イラスト：びまん性胸膜肥厚（DP）と悪性中皮腫（MM）の免疫学的特徴
MM においては GITR 高発現で確認され RORC 高発現が関わると考えられる Treg 機能亢進と PRF1 低下が示す CTL 機能低下が見られた。これは石綿曝露により出現する異常細胞の免疫逃避に繋がる。他方、DP においては MM に比べ GITR は低発現であり、PRF1 発現量も高く、異常細胞の適切な排除に寄与していると考えられる。

大共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、川崎医科大学衛生学の大槻剛巳、李順姫、武井直子、吉留敬、松﨑秀紀（現県立広島大学生命環境学部生命科学科）、岡山労災病院の岸本卓巳、北海道中央労災病院の岡本賢三である。心より御礼申し上げる。

文　献

1)　Bohlig H, Otto H. Asbest unt Mesotheliom : Fakten, Fragen, Umweltprobleme. Stuttgart: G. Thieme; 1975.
2)　Nishimura Y, Miura Y, Maeda M, Kumagai N, Murakami S, Hayashi H, et al. Impairment in cytotoxicity and expression of NK cell- activating receptors on human NK cells following exposure to asbestos fibers. Int J Immunopathol Pharmacol. 2009;22(3):579-90. Epub 2009/10/14. doi: 4 [pii]. PubMed PMID: 19822075.
3)　Nishimura Y, Maeda M, Kumagai N, Hayashi H, Miura Y, Otsuki T. Decrease in phosphorylation of ERK following decreased expression of NK cell-activating receptors in human NK cell line exposed to asbestos. Int J Immunopathol Pharmacol. 2009;22(4):879-88. Epub 2010/01/16. doi: 3 [pii]. PubMed PMID: 20074451.

4) Maeda M, Nishimura Y, Hayashi H, Kumagai N, Chen Y, Murakami S, et al. Reduction of CXC chemokine receptor 3 in an in vitro model of continuous exposure to asbestos in a human T-cell line, MT-2. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011;45(3):470-9. Epub 2010/12/15. doi: 10.1165/rcmb.2010-0213OC. PubMed PMID: 21148743.
5) Maeda M, Nishimura Y, Hayashi H, Kumagai N, Chen Y, Murakami S, et al. Decreased CXCR3 Expression in CD4+ T Cells Exposed to Asbestos or Derived from Asbestos-Exposed Patients. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011;45(4):795-803. Epub 2011/03/02. doi: 10.1165/rcmb.2010-0435OC. PubMed PMID: 21357438.
6) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, et al. Functional properties of CD8(+) lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. Journal of immunology research. 2014;2014:10-20. doi: 10.1155/2014/670140. PubMed PMID: 25045719; PubMed Central PMCID: PMC4087265.
7) Kumagai-Takei N, Nishimura Y, Maeda M, Hayashi H, Matsuzaki H, Lee S, et al. 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. 2013;49(1):28-36. Epub 2013/03/02. doi: 10.1165/rcmb.2012-0134OC. PubMed PMID: 23449737.
8) Ying C, Maeda M, Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Hayashi H, Matsuzaki H, et al. Enhancement of regulatory T cell-like suppressive function in MT-2 by long-term and low-dose exposure to asbestos. Toxicology. 2015;338:86-94. doi: 10.1016/j.tox.2015.10.005. PubMed PMID: 26505785.
9) Maeda M, Matsuzaki H, Yamamoto S, Lee S, Kumagai-Takei N, Yoshitome K, et al. Aberrant expression of FoxP3 in a human T cell line possessing regulatory T celllike function and exposed continuously to asbestos fibers. Oncol Rep. 2018;40(2):748-58. Epub 2018/06/15. doi: 10.3892/or.2018.6481. PubMed PMID: 29901207.
10) Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Maeda M, Matsuzaki H, Lee S, Yamamoto S, et al. Suppressive effects of asbestos exposure on the human immune surveillance system. In: Otsuki T DGM, Petrarca C, editor. Allergy and Immunotoxicology in Occuaptional Health. Tokyo: Springer Japan; 2016. p. 1-14.