総　説

アスベスト曝露と細胞傷害性顆粒

武井直子　西村泰光　松﨑秀紀　李　順姫　吉留　敬
幡山圭代　山本祥子　池田美穂　大槻剛巳

川崎医科大学衛生学

Asbestos exposure and cytotoxic granules

Naoko Kumagai-Takei, Yasumitsu Nishimura, Hidenori Matsuzaki, Suni Lee, Kei Yoshitome, Tamayo Hatayama, Shoko Yamamoto, Miho Ikeda, Takemi Otsuki

Department of Hygiene, Kawasaki Medical School

要約

アスベスト曝露は肺がんや悪性中皮腫を惹起し、そこにはアスベストのいくつかの発がん機序が関連している。さらに、アスベストは免疫担当細胞に作用し、抗腫瘍免疫が減弱することが判明した。これは曝露症例における発がんの素地を形成すると思われる。ヘルパーT細胞や制御性T細胞においてもアスベスト曝露が抗腫瘍免疫の減弱に至るとの結果が得られた。さらにアスベスト曝露は、特に腫瘍免疫の中でがん細胞を攻撃・殺傷する上で重要なナチュラルキラー細胞や細胞傷害性T細胞において、細胞質内の細胞傷害性顆粒に含まれる実行分子であるパーフォリンやグランザイムの発現や産生、放出の減弱を惹起することが明らかとなった。アスベストの免疫担当細胞への作用から、曝露や発がんのスクリーニングデバイスの構築、あるいはその回復を惹起する化学予防的なアプローチも今後重要になってくる。

（臨床環境 26：31－37，2017）

《キーワード》アスベスト、パーフォリン、グランザイム、ナチュラルキラー細胞、細胞傷害性T細胞細胞

Abstract

Exposure to asbestos causes lung cancer and malignant mesothelioma, in which several carcinogenic mechanisms of asbestos are associated. In addition, it was found that asbestos acts on immunocompetent cells and antitumor immunity is attenuated. This is likely to form the basis of carcinogenesis in exposed cases. Examination of asbestos in helper T cells and regulatory T cells resulted in attenuation of antitumor immunity. Especially in natural killer (NK) cells and cytotoxic T lymphocytes (CTL) important for attacking and killing cancer cells in tumor immunity, exposure to asbestos caused reduction of

受付：平成29年３月３日　採用：平成29年３月30日
別刷請求宛先：大槻　剛巳
川崎医科大学衛生学
〒701-0192　倉敷市松島577

expression, production as well as release of cytotoxic granules such as perforin and granzymes which utilized on cancer cell killing by NKcells and CTL . From the action of asbestos to immunocompetent cells, the construction of screening devices for asbestos exposure and carcinogenesis as well as chemo-preventive approaches that cause or their recovery are also important in the future.

(Jpn J Clin Ecol 26 : 31－37, 2017)

《**Key words**》asbestos, perforin, granzyme, natural killer cell, cytotoxic T lymphocyte

はじめに

アスベスト曝露は、従来、アスベスト取扱い作業現場における曝露の問題として主に労働衛生の観点で述べられていた[1-3]。しかし「クボタ・ショック」と呼ばれる2005年夏に、尼崎市の大手機器メーカー・クボタの旧神崎工場の周辺住民が、本邦ではアスベスト曝露のみが原因と考えられる悪性中皮腫を発症したとの報道によって、社会的に問題になってきたことにより、環境曝露としての側面がクローズアップされるようになった[4]。さらに、阪神淡路大震災の瓦礫処理に携わった明石市の職員が、約10年後に本症を発症し、労災認定されたことなども明らかになった[5]。労働衛生としてのアスベスト取扱い作業者によるアスベスト起因疾患の発症、さらに、こういった作業者がユニフォームや作業器具を自宅に持ち帰ることにより付着した繊維によって家族内で発症してきた（家庭内曝露）ケースに加えて[6]、取扱い工場の近隣に居住歴を有する人々における発症[7]、昨今では、アスベスト含有の建築物解体作業員、震災等の瓦礫処理作業員など多くのハイリスクグループが明らかになり[8]、2030年までに10万人前後のアスベストによる悪性中皮腫の発症などが懸念されている[9-11]。

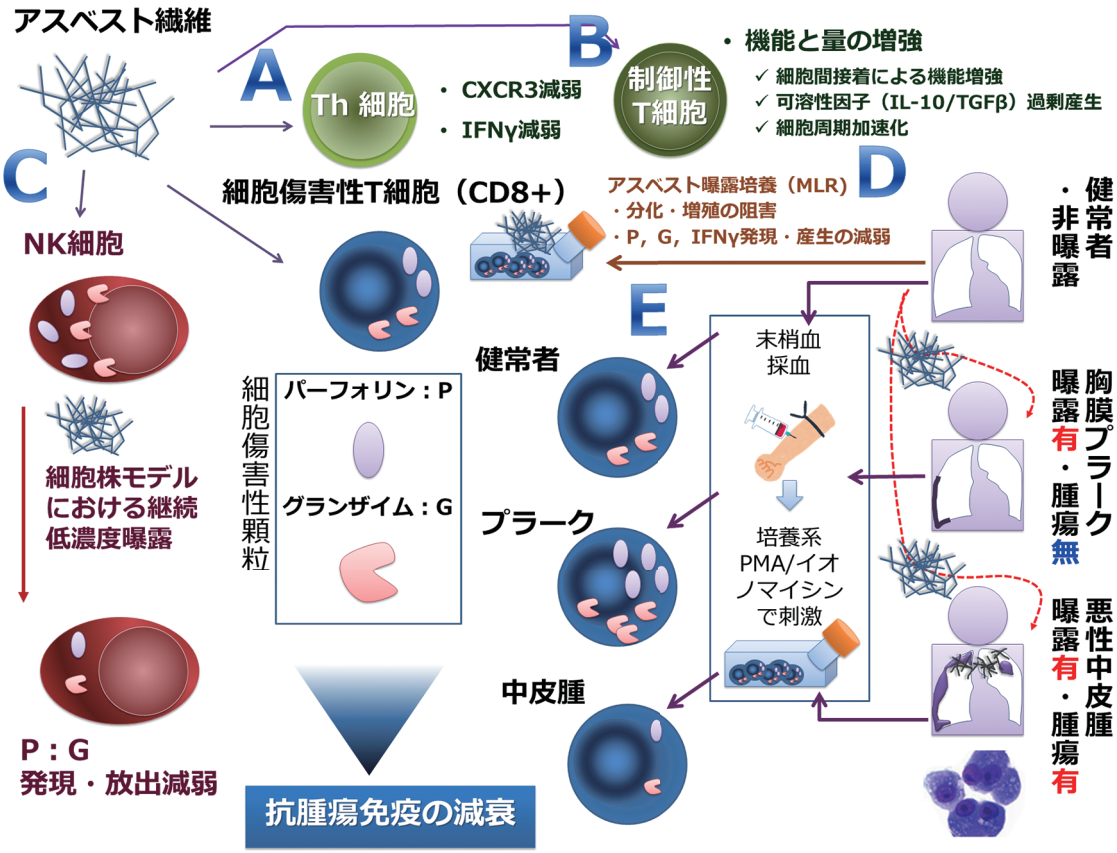
アスベストによる発がん（悪性中皮腫のみならず肺がんの発症もあり、また国際がん研究機関［International Agency for Research on Cancer: IARC］の発がんリスク分類では、卵巣がんや咽頭喉頭がんのリスクを検出している[12]）のメカニズムとしては、特に角閃石族に含まれる鉄による活性酸素種の産生、ならびに吸入されたアスベスト繊維を処理しようとする肺胞マクロファージがアスベスト繊維の物理学的特性（長さや硬さなど）により処理しきれず、いわゆる「不満マクロファージ：Frustrated macrophage」となって活性酸素種を産生すること、肺胞上皮細胞など周辺の種々の細胞が繊維を取り込む性質を有しているため、分裂期の細胞などの染色体に直接的な損傷をもたらすこと、さらにアスベスト繊維が種々の物質を吸着する性質を持っており、吸入された他の発がん物質（喫煙や大気汚染などの）が集積することなどが考えられている[13-15]。

これらの直接的な発がん機序に加えて、我々はアスベスト繊維が種々の免疫担当細胞に作用して、抗腫瘍免疫を減衰させるのではないかという仮説に基いて検討を進めてきた[16,17]。図１に、ヒト免疫担当細胞の細胞株や、アスベスト曝露症例の末梢血検体による検討の結果を総括して提示する。

本稿ではこれらの中で、T 細胞に対する作用について概略を紹介した上で、特に細胞傷害性顆粒（パーフォリンやグランザイム）を有し、がん細胞を殺傷することで抗腫瘍免疫の主体を担うナチュラルキラー（Natural Killer; NK）細胞や、CD８陽性細胞傷害性T細胞（Cytotoxic T Lymphocyte: CTL）におけるアスベスト曝露とこれらの顆粒の変化について、これまでの知見を紹介する。

１．アスベスト曝露とヘルパー T 細胞

図１A には、ヘルパー T 細胞（Helper T cell: Th）に対するアスベスト曝露の影響を示す。ヒト T 細胞株 MT- 2 を用いて、実験的な一過性高濃度曝露ではなく、実際の曝露者と同様の低濃度長期継続曝露を実験的に施行し、一過性高濃度曝露によってもたらされるアポトーシスに抵抗性を有する亜株を樹立し[18]、その細胞生物学的な特性を検



A：ヘルパー T（Th）細胞への影響では腫瘍免疫に関連する分子の発現減弱が認められた。B：制御性 T 細胞への影響では、その機能と数の増強が観察された。C：NK 細胞への影響の中で、特に細胞傷害性顆粒に着目すると継続低濃度曝露を実施した細胞株モデルで、細胞傷害性顆粒の中のタンパク質の発現や放出の減弱が認められた。D：細胞傷害性 T 細胞における混合リンパ球培養法の結果から、アスベスト曝露によってその分化・増殖が阻害され、細胞傷害性顆粒内のパーフォリンやグランザイム、さらに IFNγ の発現や産生の減弱が観察された。E：細胞傷害性 T 細胞を、健常者およびアスベスト曝露症例である胸膜プラークおよび悪性中皮腫症例の末梢血から採血し、PMA/イオノマイシンによる刺激の前後でパーフォリンやグランザイムの変化を観察すると、プラーク症例では刺激前で健常人群より高値を示し、刺激後から刺激前の各症例での差の値の比較でもプラーク群は高値であった。一方、中皮腫群は、特に刺激後から刺激前の各症例での差の値の比較で、他の 2 群に比して低値を示した。これらの結果は、総じてアスベスト曝露が抗腫瘍免疫の減衰を惹起することを示唆している。

図1　アスベスト繊維の免疫担当細胞への影響

討すると抗腫瘍免疫に関連するケモカイン受容体の一つである C-X-C chemokine receptor type 3（CXCR 3）の細胞膜表面での発現減弱と、培養系で刺激した時に抗腫瘍免疫に関連する interferon（IFN）γ の産生減弱が認められた[19,20]。これらの所見は、アスベスト曝露のある胸膜プラーク症例（こういった症例では中皮腫などの発がんは認められず、またいわゆる前がん状態と異なり、プラーク形成は単なるアスベスト曝露の指標でしかない。すなわちプラークの有無に関わらずアスベスト起因性の発がんが生じる）、また悪性中皮腫症例（これも本邦では、職歴や曝露歴が不詳であってもアスベスト曝露が原因と考えられている。症例が気付いていない少量の曝露でも生じる可能性がある）においても CXCR 3 の発現減弱や、症例から採血した T 細胞における実験的刺激後の IFNγ の発現減弱が確認された。これらの結果は、アスベスト曝露者における T 細胞関連の抗

腫瘍免疫の減弱を示唆した（図１A）。

2. アスベスト曝露と制御性 T 細胞

制御性 T 細胞は、反応性 T 細胞の抗原刺激後の増殖や種々のサイトカイン産生を抑制的に制御する生理的機能を有するヘルパー T 細胞の亜群で、細胞間接着や代表的な可溶性因子（interleukin（IL）-10と transforming growth factor（TGF）β）によりこの機能を提示する。制御性 T 細胞の数や機能が減弱すれば、外的内的な抗原に対する過剰な反応がもたらされて、アレルギーや自己免疫疾患となり、反対に数の増加や機能増強が生じると、例えば、腫瘍を認識し攻撃する T 細胞の反応が抑制されることで、抗腫瘍免疫の減弱となる[21,22]。

上記で紹介したMT-２細胞は制御性T細胞機能も有していることが報告されているので[23]、アスベスト非曝露の親株と低濃度継続曝露亜株を用いて制御性 T 細胞機能を検討したところ、健常人からの末梢血新鮮 CD４陽性反応性 T 細胞と放射線照射後の MT-２細胞の親株と亜株を混合培養し、細胞表面に表出し細胞間接着によって制御性T細胞機能を誘導する実験系においても機能亢進を示し、また培養上清中には IL-10と TGFβ の過剰産生が認められ、これらも低濃度継続曝露亜株における制御性T細胞機能亢進の一部を担っていることが判明した[24,25]。さらに、アスベスト長期曝露亜株では細胞周期の加速化因子の発現増強とブレーキ役の遺伝子の発現減弱が生じていることが判明した[26,27]。これは亜株で特異的に減弱している転写因子 Forkhead box protein O１（FoxO１）によって制御されている種々の細胞周期制御分子（FoxO１は細胞周期を加速化するサイクリンなどを負に制御し、細胞周期のブレーキ役である cyclin dependent kinase-inhibitor（CDK-I）の多くを正に制御することによって、その回転を抑制するように機能することが知られている）が、FoxO１の減弱によって制御されている結果と考えられた。そして細胞周期は非曝露親株に比して、加速化されている結果であった。これらの結果は、アスベスト曝露が制御性 T 細胞の機能のみならず数も増強することを示唆しており（図１B）、それは抗腫瘍免疫としては減弱の方向となる。

3. アスベスト曝露と NK 細胞の細胞傷害性顆粒

NK 細胞は、抗腫瘍免疫の主体をなし、T 細胞のように事前の感作がなくてもがん細胞やウイルス感染細胞を認識して、殺細胞作用を発揮する。その際に、NK 細胞の細胞質内顆粒に含まれるパーフォリンやグランザイムなどのタンパク質が中心的な役割を担う。パーフォリンは傷害する細胞に近接して放出され、細胞膜に孔を開けてグランザイムや関連分子が中に入れるようにする。グランザイムはセリンプロテアーゼで、標的となるがん細胞やウイルス感染細胞の細胞質でアポトーシスを誘導する[28,29]。

アスベスト曝露と NK 活性あるいはこれらの細胞傷害性顆粒について、我々はヒト NK 細胞株への培養での長期曝露、健常人から採取された末梢血 NK 細胞への比較的短期（４週間前後）の活性化を誘導する実験系での曝露さらにアスベスト曝露症例である胸膜プラークや悪性中皮腫症例の末梢血の NK 細胞での観察によって、アスベスト曝露によって NK 細胞活性（殺細胞効果）が減弱することを明らかにした。さらに、その際に、NK 細胞膜表面に表出する活性化受容体（例えば、２B４、NKG２D そして NKp46）の発現が減弱することを見出した。２B４や NKG２D は細胞株モデルでの検討で、減弱を示したし、NKp46の膜表面発現度は、健常人も含めた実際の検体で、それぞれの NK 活性と有意な逆相関を示しアスベスト曝露と NK 細胞活性との関連を示す重要な因子であることが判明した[30]。

さらに、細胞株モデルでの細胞傷害顆粒の放出の解析では、アスベスト長期曝露亜株で、これらの顆粒放出が減じており、そのことで殺細胞効果が弱まっていると考えられた。なお、アスベスト曝露亜株では、種々のシグナル伝達系の中でも Mitogen-activated Protein Kinase（MAPK）系の Extracellular Signal-regulated Kinase（ERK）

のリン酸化が減弱しており、アスベスト曝露は、細胞膜表面から内部のシグナル伝達系の不調和を介して、細胞傷害性顆粒の発現や放出の減弱に至ると考えられた（図１C）[31]。

4．アスベスト曝露と CTL の細胞傷害性顆粒

naïve CD８陽性細胞は、腫瘍抗原を認識し、種々の免疫細胞やサイトカインの修飾を受けて分化・増殖を起こし CTL となる。また　分化した CTL は、NK 細胞と同様に細胞質内の細胞傷害性顆粒の中にパーフォリンやグランザイムを蓄え、NK 細胞とは異なって標的細胞の major histocompatibility complex（MHC）クラスⅠ分子を捉えて、これらのタンパク質を放出して攻撃、殺傷する[32-34]。

混合リンパ球培養法（mixed lymphocyte reaction: MLR）における CTL 分化誘導実験系にアスベストを添加すると、アスベストは、アロ抗原刺激による CD８陽性細胞の数の増加、アロ抗原特異的細胞傷害性、関連分子である IFNγ やグランザイムの細胞内発現を抑制することが明らかになった[35]。この時に、CD８陽性細胞の膜表面分子指標の解析では、アスベスト曝露は、naïve CD８陽性細胞から effector/memory CD８陽性細胞への分化の抑制を惹起し、その増殖もまた抑制した（図１D）[35]。なお、こういった実験系の中では、IL-２はアスベスト添加の有無で上清への産生量は差がなかったが、IL-２は T 細胞の増殖には不可欠でもあり、微小環境での迅速な IL-２の消費が、アスベスト曝露時の増殖抑制、すなわち相対的な IL-２産生不足を表している可能性を考えて、上記の実験系に過剰な IL-２を添加する実験を試みた[36]。その結果、膜表面分子で観察した分化の抑制やアスベスト添加によって抑制された細胞増殖を回復させるには至らなかったが、細胞傷害性やグランザイムＢ陽性の細胞比率の部分的な回復を示した[36]。

これらの結果を受けてアスベスト曝露症例の CD８陽性細胞におけるグランザイムやパーフォリンの状態を検討した（図１E）。まず健常者、胸膜プラーク症例および悪性中皮腫症例における末梢血の CD８陽性 CD３陽性細胞の比率は有意差はなかった。ただし、曝露症例の２群の方が低い傾向は認められた[37]。

さらに末梢血を実験系で Phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）とイオノマイシン（細胞間のカルシウムイオン濃度を上げ、PMA とともに免疫担当細胞からのサイトカイン産生を亢進させる）で刺激し、細胞傷害サイトカインとしての IFNγ の陽性細胞比率を検察したが、これは３群で差がなかった[37]。

しかし、グランザイムについては、刺激前では差がなかったにもかかわらず、刺激後では胸膜プラーク症例で健常人より陽性細胞比率が高まった。同じく検体の個々の症例の刺激後から刺激前の発現度合いの差を３群で比較しても、プラーク群では、他の２群より高値となった[37]。

加えて、パーフォリンについては、刺激前（すなわち採血後）のパーフォリン陽性細胞比率は健常者群が他の２群のアスベスト曝露症例群より低かった（健常者の場合、採取した CD８陽性細胞は naïve なままであることを示唆している）が、刺激後のパーフォリン陽性細胞比率を検討すると、まず、プラーク群では健常者群より高値であった。このことは、グランザイムの結果とともに、プラーク（アスベスト曝露はあるが、発がんはない症例。また、臨床家の意見によってはプラーク形成が認められる方が、中皮腫などの発症率が低い印象があるとの意見もある）症例では、こと CTL に関しては細胞傷害性が高く保たれていることを示唆する所見であった。一方、中皮腫症例では、刺激によってパーフォリン陽性細胞比率が著しく減少した。これは既に発がんに至った症例では、継続的ななんらかの刺激によって末梢血循環中の CD８陽性細胞の若干の活性化は生じているものの、機能的には不全であることを示唆していた。なお、中皮腫症例での刺激後のパーフォリン陽性細胞比率の低下は、脱顆粒の亢進ではない実験結果（CD107a の細胞比率によって推察可能）も同時に得たので、発がんが生じた際に認められる CTL の機能不全について、更なる検

討が必要である可能性が認められた[37]。

いずれにしても、アスベスト曝露がCTLへの分化を抑制する上に、特にアスベスト起因性の発がんが生じた症例では、CTL機能自体も減弱されていることが明らかとなった。

おわりに

アスベスト曝露は本邦においても、また世界保健機関（World Health Organization; WHO）がアスベスト曝露の撲滅を目指すことを宣言したように[38]、国際的にも健康障害として重要な問題である。冒頭で記したアスベスト繊維自体の発がん作用に加えて、本稿で記した免疫担当細胞の抗腫瘍免疫の減弱もまた、その発がんの背景として重要ではないかと考えている。特にNK細胞においてもCTLにおいても細胞傷害性顆粒の動態が減弱していることも、曝露症例の抗腫瘍免疫の中で重要な位置を占めている。

現在、こういった免疫学的指標を用いて、アスベスト曝露者の曝露の評価や発がんの一次スクリーニング法の開発を目指して検討を加えているとともに、生理活性物質や食品成分などによるアスベストによって減弱させられ抗腫瘍免疫を回復させる化学予防的な観点での検討を進めており、こうした研究を通して社会に貢献しようと努力していることを記して、稿を終えることとする。

文献

1） 亀井敏昭，石川雄一, 三浦溥太郎，井内康輝，森永謙二：アスベストと中皮腫．東京，篠原出版新社．2007
2） 労働者健康福祉機構：アスベスト関連疾患日常診療ガイド　アスベスト関連疾患を見逃さないために．増補改訂版．東京，労働調査会．2006
3） 名取雄司：石綿関連疾患と補償制度．呼吸器内科 24：496-502, 2013
4） 片岡明彦：アスベスト問題の転換点　クボタショックの経験．水俣学研究 6：49-64, 2015
5） 加藤正文：アスベスト禍の衝撃 史上最悪の産業災害．現代の理論デジタル 第3号 2014. http://gendainoriron.jp/vol.03/rostrum/ro03.php（2017.3.3.）
6） 小菅千恵：2次被害家庭内曝露遺族の取り組み．社会労働衛生 4：38-44, 2006
7） 熊谷信二，車谷典男：石綿の近隣曝露と中皮腫罹患リスク．産業衛生学雑誌 49：77-88, 2007
8） 中野孝司：悪性中皮腫罹患ハイリスク群の検診と診療．成人病と生活習慣病 37：1255-1259, 2007
9） 森永謙二：疫学からみた石綿関連疾患　過去，現在，未来．肺癌 49：39-47, 2009
10） Myojin T, Azuma K, et al：Ind Health 50：197-204, 2012
11） Murayama T, Takahashi K, et al：Estimation of future mortality from pleural malignant mesothelioma in Japan based on an age-cohort model. Am J Ind Med 49：1-7, 2006
12） IARC（International Agency for Research on Cancer）：IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Arsenic, metals, fibres and dusts. 100C. Lyon, France. IARC publication. 2012
13） 豊國伸哉：鉄を視点とするアスベスト発がんの解明と予防・診断・治療への応用の可能性．肺癌 49：362-367, 2009
14） Huang SX, Jaurand MC, et al：Role of mutagenicity in asbestos fiber-induced carcinogenicity and other diseases. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 14：179-245, 2011
15） Toyokuni S：Mechanisms of asbestos-induced carcinogenesis. Nagoya J Med Sci 1：1-10, 2009
16） Meada M, NishimuraY, et al：Dysregulation of the immune system caused by silica and asbestos. J Immunotoxicol 7：268-278, 2010
17） Otsuki T, Maeda M, et al：Immunological effects of silica and asbestos. Cell Mol Immunol 4：261-268, 2007
18） Miura Y, Nishimura Y, et al：Involvement of IL-10 and Bcl-2 in resistance against an asbestos-induced apoptosis of T cells. Apoptosis 11：1825-1835, 2006
19） Meada M, Nishimura Y, 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 45：470-479, 2011
20） Maeda M, Nishimura Y, et al：Decreased CXCR3 expression in CD4+ T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients. Am J Respir Cell Mol Biol 45：795-803, 2011
21） 坂口志文：CD25+CD4+ 制御性T細胞．医学のあゆみ 13：1000, 2002
22） 高橋武司，坂口志文：制御性T細胞の分化と機能．

実験医学 16：2169-2173, 2003
23）Hamano R, Wu X, et al：Characterization of MT-2 cells as a human regulatory T cell-like cell line. Cell Mol Immunol 12：780-782, 2015
24）Ying C, Maeda M, et al：Enhancement of regulatory T cell-like suppressive function in MT-2 by long-term and low-dose exposure to asbestos. Toxicology 338：86-94, 2015
25）Maeda M, Chen Y, et al：Chronic exposure to asbestos enhances TGF-β1 production in the human adult T cell leukemia virus-immortalized T cell line MT-2. Int J Oncol 45：2522-2532, 2014
26）Matsuzaki H, Lee S, et al：FoxO1 regulates apoptosis induced by asbestos in the MT-2 human T-cell line. J Immunotoxicol 13：620-627, 2016
27）Lee S, Matsuzaki H, et al：Accelerated cell cycle progression of human regulatory T cell-like cell line caused by continuous exposure to asbestos fibers. Int J Oncol 50：66-74, 2017
28）狩野庄吾：がんと NK 細胞．臨床免疫 12：826-832, 1980
29）押味和夫：NK 細胞　基礎から臨床へ．東京，金原出版．1993
30）Nishimura Y, Miura Y, 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 22：579-590, 2009
31）Nishimura Y, Maeda M, et al：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 22：879-888, 2009
32）水落利明：アロ抗原特異的キラー T 細胞の生成経路の多様性 :CD4+ および CD8+ ヘルパー T 細胞と IL-2の役割．臨床免疫 20：881-889, 1988
33）高山 大：細胞傷害性 T 細胞（CTL）による細胞傷害機構．組織培養 16：70-74, 1990
34）田村慎一：MHC 拘束性の細胞傷害性 T 細胞．I 日本臨床 48巻増刊 臨床免疫（上）：557-561, 1990
35）Kumagai-Takei N, Nishimura Y, 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 49：28-36, 2013
36）Kumagai-Takei N, Nishimura Y, et al：The Suppressed Induction of Human Mature Cytotoxic T Lymphocytes Caused by Asbestos Is Not due to Interleukin-2 Insufficiency. J Immunol Res. 2016; 2016: 7484872. http://dx.doi.org/10.1155/2016/7484872
37）Kumagai-Takei N, Nishimura Y, et al：Functional properties of CD8 (+) lymphocytes in patients with pleural plaque and malignant mesothelioma. J Immunol Res. 2014;2014:670140. doi: 10.1155/2014/670140.
38）WHO：fact sheet, Asbestos: elimination of asbestos-related diseases. Updated June 2016 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs343/en/(2017.3.3)