

珪酸化合物により活性化されたリンパ球における アポトーシスの誘導について

愛甲 隆昭

著者の所属する教室では、作業関連物質に起因する自己免疫疾患の発症機序について、特に珪酸化合物を中心に解析を行ってきたが、既にその発症機序に珪酸化合物のスーパー抗原作用が関係している事を報告してきている。著者は今回の実験では、珪酸化合物の一つであるクリソタイルにより活性化されたリンパ球におけるアポトーシスの誘導について検討した。まず、ヒト末梢血単核細胞を分離、クリソタイル繊維を添加、培養し、培養後の細胞の形態の観察やTUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) 法によるアポトーシスの定量的解析を単核細胞のサブセットについて行った。その結果、リンパ球、特にクリソタイルにより活性化を受ける CD4陽性細胞にアポトーシスが誘導されている事が証明された。また Fas 陽性細胞におけるアポトーシスの誘導の経時的变化の解析より、このアポトーシス誘導に Fas 分子が関与している可能性が示唆された。これらの結果からアポトーシス誘導が活性化を受けたクローンの除去に働いている可能性が示唆される。

(平成9年4月2日受理)

Induction of Apoptosis in Human Peripheral Blood Lymphocytes with Silicate *in vitro*

Takaaki AIKOH

Several environmental factors have been reported to induce autoimmune diseases ; e.g. progressive systemic sclerosis in patients with silicosis. I have investigated whether the incidence of autoimmune diseases is influenced by silicate, and previously reported the existence of superantigenicity of silicate to human lymphocytes *in vitro*. In this study, using the TUNEL method, we recognized the induction of apoptosis in human lymphocytes with silicate *in vitro*. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated from the heparinized blood of healthy volunteers and cultured with chrysotile. Then the surface markers of PBMC and apoptosis were analyzed flow cytometrically. As a result, I found that CD4⁺ cells especially were activated by chrysotile and induced to apoptosis. Fas molecules seemed to be involved in the induction of apoptosis, because the expression of Fas on the cell surface of lymphocytes decreased according to the incidence of apoptosis. Therefore

it might be speculated that the induction of apoptosis in human peripheral blood lymphocytes after stimulation with silicate plays a role in the elimination of clones, which are excessively activated. (Accepted on April 2, 1997) *Kawasaki Igakkaishi* 23(1) : 19-26, 1997

Key Words ① Apoptosis ② Chrysotile ③ TUNEL
④ Lymphocyte ⑤ Activation

はじめに

環境汚染物質の人体への影響が種々指摘されてきた。その中で作業関連物質で珪酸化合物の一つであるアスベスト繊維への曝露による各種臓器癌(胸膜中皮腫, 肺癌)や自己免疫疾患例えば全身性エリテマトーデス(Systemic lupus erythematosus: SLE)や進行性全身性硬化症(Progressive systemic sclerosis: PSS)の発生率の増加が見られること¹⁾⁻⁵⁾, また珪酸化合物への職業的曝露により珪肺症に罹患した患者群に自己免疫疾患(PSS, SLE)の発症が高率に見られることについて幾多の報告があり, 珪酸化合物の人体, 特に細胞性免疫への影響が示唆されている⁶⁾⁻¹¹⁾。これに対し, 著者の所属する教室では末梢血分離単核細胞に珪酸化合物の一つであるクリソタイル繊維を添加・刺激することにより, ①CD4⁺CD45RA⁺T細胞の選択的な活性化を引き起こすこと¹²⁾, ②Phytohemagglutinin (PHA)を添加することによりPHAによるリンパ球幼若化が減弱すること¹³⁾, ③細胞内Ca⁺⁺濃度の上昇やIL-2の産生が見られること, ④クリソタイル繊維によるリンパ球の活性化はHLAクラスII依存性であり¹⁴⁾, 特定のVβレパトワに関係している可能性が高いこと等を報告してきた^{15), 16)}。これらのことより著者の所属する教室ではクリソタイルがスーパー抗原, すなわちT細胞レセプターを介して個々のクローンの枠を超えてT細胞に活性化のシグナルを与える物質として作用しこれによって起こる多クローン性のリンパ球増殖に伴い, 自己反応性クローンが刺激されることが, 珪肺症患者に多種類の自己抗体が見られ, 更には自己免疫疾患が発症する

原因と考えた¹⁷⁾。また最近, 発生や発癌・自己免疫の発症などにアポトーシスの関連が話題になっており, 抗原刺激によりT細胞が活性化を受けると増殖しすぎた自己反応性クローンを含むリンパ球をフィードバック機構としてアポトーシスによって細胞自ら減少させ, 自己の免疫調節をしていると考えられている¹⁸⁾。スーパー抗原の一つであるstaphylococcal enterotoxin BによるT細胞の刺激によってFas/Fasリガンド系を介するアポトーシスが見られることは既に知られている^{19), 20)}。今回の実験は, クリソタイル繊維によるリンパ球の活性化によりアポトーシスの誘導が起こるかどうか, もし起こるならばどのサブセットに影響を及ぼしているのかを*in vitro*で観察することを目的として行った。

実験材料と方法

末梢血からの単核球分離

珪酸曝露経験の無い健康人から末梢血を採取しFicoll-Hypaque法を用いてリンパ球・単球を含む単核細胞を分離, ペニシリン100μg/ml, ストレプトマイシン100μg/mlを含むRPMI1640+10%Fetal bovine serumに浮遊させた。

CD3, CD14, CD4及びCD8モノクローナル抗体による表面マーカーの解析

採取した単核細胞は1×10⁶ cells/mlで培地に浮遊させ, 最終濃度50μg/mlとなるようにクリソタイル繊維を添加し, 5%CO₂, 95%空気のインキュベーター中にて37°Cで0から5日間培養し遠心洗浄後, ピコエリスリン(PE)-Cy5標識CD3モノクローナル抗体, PE標識CD14 Mo2モノクローナル抗体, PE標識CD4モノクロー

ーナル抗体, PE-Cy5標識 CD8モノクローナル抗体 (全て Coulter Immunotech) を用いて二重染色, または後述する TUNEL 法と三重染色を行い Flow cytometer (FACSsort, Becton-Dickinson) により表面マーカーの発現を測定し, Lysis II (Becton-Dickinson Immunocytometry systems) にて解析を行った. またコントロールとしてクリソタイル無添加群を作製し同様の処理を行った. 実験用クリソタイル繊維は International Union against Cancer (IUC) 標準品を用い, 180°C, 1時間の滅菌処理後実験に使用した.

TUNEL [terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin-nick end labeling] 法によるアポトーシス細胞の測定

無添加コントロール群及びクリソタイル添加群を 0~6 日間培養し遠心洗浄後, 一部はサイトスピンにて標本化し, 残りは細胞懸濁液とし, それぞれ 4%パラフォルムアルデヒド溶液 (PBS 中, pH7.4) で固定し, 浸透化液 (0.1%クエン酸ナトリウム中0.1%TritonX-100) で浸透化し洗浄した後, TUNEL 法に基づく In Situ Cell Detection Kit, Fluorescein (FITC 標識, Boehringer Mannheim) を用いて反応させ, Flow cytometer により測定し, Lysis II にて解析を行い, 同時に細胞の大きさの解析も行った. また, 蛍光顕微鏡による観察を行った. さらに細胞懸濁液の一部は, カラム法 (Cell Enrichment Immunocolumns, Human CD4, CD8, Biotex) にて CD4 及び CD8 陽性細胞のみに分離し, 同様に TUNEL 法にて解析した.

Fas 陽性細胞数の測定

前述の培養細胞浮遊液を遠心洗浄後, FITC 標識抗 Fas モノクローナル抗体 (clone: UB2, MBL) で室温, 30分間インキュベート後 Flow cytometer にて測定・解析した.

結 果

1. クリソタイル繊維添加によるアポトーシス誘導

培養 4 日目のクリソタイル無添加・添加群のサイトスピン標本を TUNEL 法で染色すると, 刺激した培養単核細胞には無添加群に比べ明らかに多数の TUNEL 陽性細胞すなわちアポトーシスを起こした細胞が認められた (Fig. 1). またこの時のフローサイトメトリーによる測定結果は, 横軸を細胞の大きさ, 縦軸を細胞数で示すとクリソタイルを加えたサンプルは左にシフ

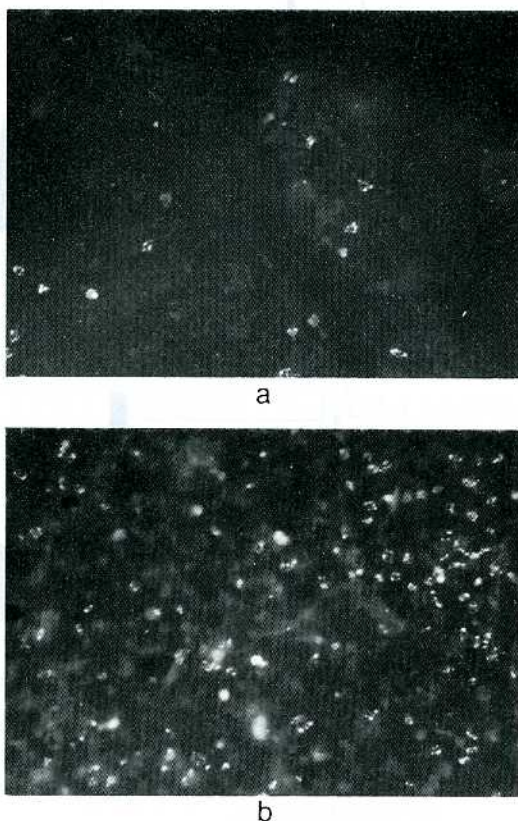


Fig. 1. TUNEL positive cells in PBMC by incubation with chrysotile for 4 days. Among PBMC incubated with chrysotile (b) apoptotic cells could be observed more frequently than in control cells without exposure to chrysotile (a).

(a) (b) FITC fluorescence microscopy. $\times 200$

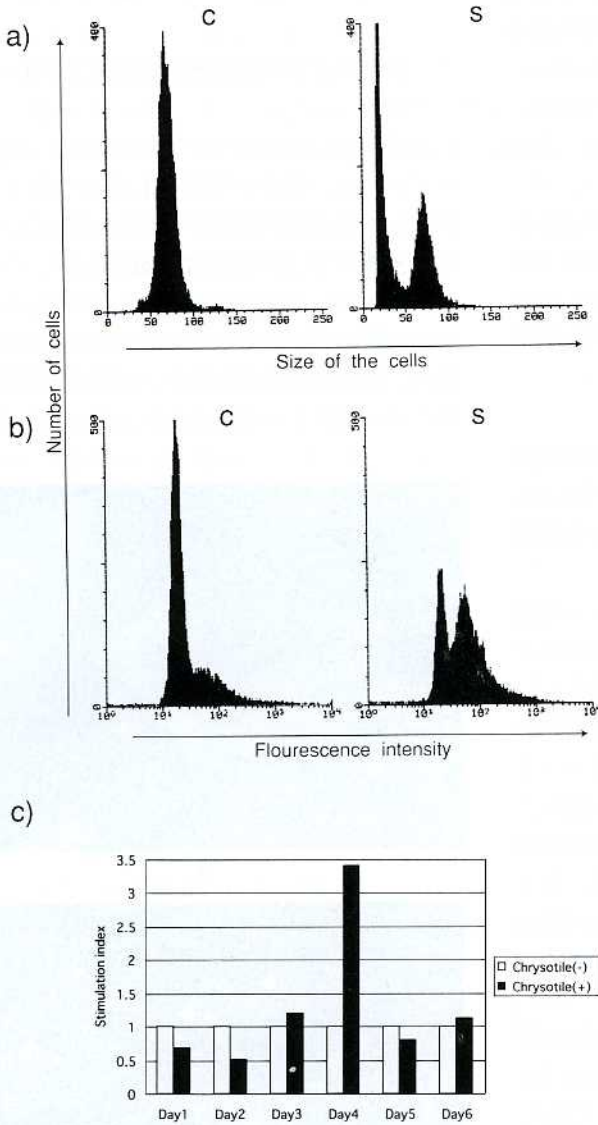


Fig. 2. (a) Cell size analysed flow cytometrically. PBMC were incubated with chrysotile fiber ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) (S), or without exposure to chrysotile as a control (C). Small sized cells increased on the day 4 in the specimens incubated with chrysotile (S), whereas no change in cell size was observed in the control cells (C).

(b) TUNEL assay positive cells analysed flow cytometrically. TUNEL positive cells (FITC) which were shifted to right part was observed on the day 4 of incubation with chrysotile(S).

(c) Ratio of small sized cells (stimulation index) was analysed in PBMC incubated with or without chrysotile for 1 to 6 days.

トした縮小化した細胞数の増加が見られ (Fig. 2a), 横軸に蛍光強度, 縦軸に細胞数で示すと, 右にシフトした蛍光標識されたアポトーシス細胞の増加が見られた (Fig. 2b). また Fig. 2a の縮小化した細胞数の経時的变化を解析するために, クリソタイル無添加コントロール群の横軸 0 から 50 の大きさの細胞数を 1 とし添加群の相対的細胞数を stimulation index で示すと, クリソタイル刺激により培養 4 日目に明らかに縮小化した細胞数の増加が見られ, その数の全体に占める割合は 4 日目には 35% にも達し, TUNEL 陽性細胞の増加に相関しているものと考えた (Fig. 2c). そこでアポトーシス細胞数を経時的に見るために TUNEL 陽性細胞の全体に占める割合をそれぞれの培養日数で解析して見ると, クリソタイルで刺激した培養単核細胞にはコントロールに比べ 4 日目以降でアポトーシスを起こした細胞数の増加が観察された (Fig. 3).

2. クリソタイル繊維添加による CD3, CD14, CD4, CD8 陽性細胞の経時的变化

クリソタイル繊維添加後の T 細胞マーカーである CD3 の発現は, 0 ~ 6 日間の培養日数が進むにつれて徐々に増加傾向を示したが, CD3 陽性細胞の比率を, それぞれクリソタイル無添加コントロール群を 1 とし添加群の値を stimulation index として解析すると, 培養初期にクリソタイルによる刺激を受け T 細胞

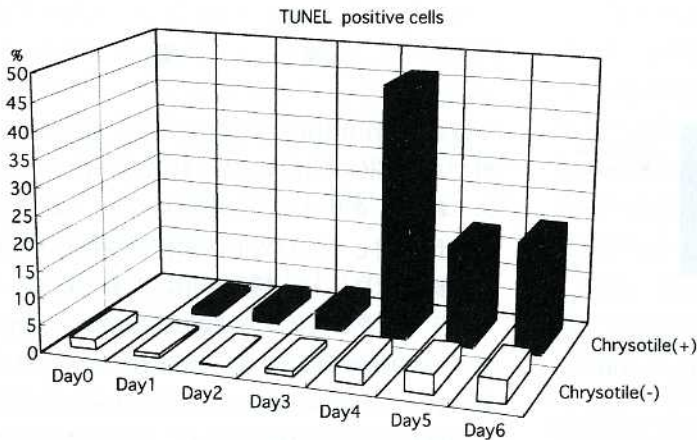


Fig. 3. Induction of apoptosis in PBMC by incubation with chrysothile. Percentage of TUNEL assay positive cells was analysed in PBMC incubated with or without chrysothile for 0 to 6 days.

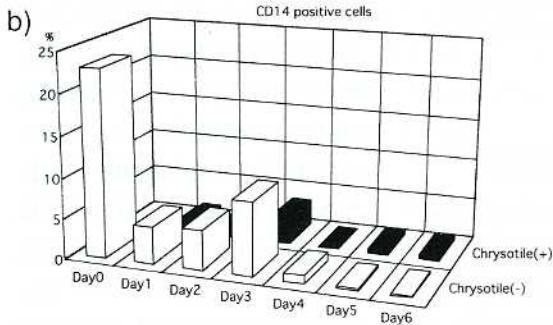
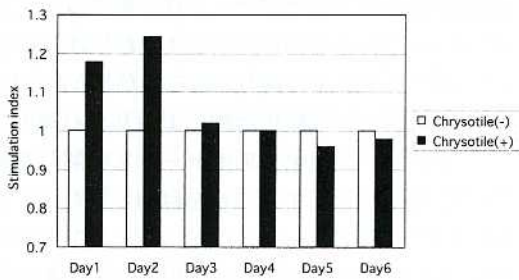


Fig. 4. Modulation of CD3 or CD14 expression by incubation with chrysothile. (a) Ratio of CD3 positive cells (stimulation index) was analysed in PBMC incubated with or without chrysothile for 1 to 6 days. (b) Percentage of CD14 positive cells was analysed in PBMC incubated with or without chrysothile for 0 to 6 days.

が活性化されていることがわかり、これまでの我々の報告に一致する結果が得られた (Fig. 4a). 一方単球及びマクロファージと選択的に反応する CD14 Mo2陽性細胞は、添加・無添加群に関係なく 4 日目以降にはほとんど見られなかった (Fig. 4b). また CD4陽性細胞は培養日数の経過によりわずかながら増加傾向を示し、CD8陽性細胞はわずかに減少傾向を示したが、これらもクリソタイル添加群と無添加群との間に差異は見られなかった (data not shown).

3. クリソタイル繊維添加による CD4及び CD8陽性細胞のアポトーシス誘導

クリソタイル添加及び無添加後 4 日間培養した末梢単核球をカラム法により CD4陽性細胞、CD8陽性細胞に単離し、TUNEL 法にて染色した後 Flow cytometer にて TUNEL 陽性細胞数を解析した. CD4陽性細胞及び CD8陽性細胞に占める TUNEL 陽性細胞の比率を、それぞれクリソタイル無添加コントロール群を 1 とし添加群の値を stimulation index で示すと、クリソタイル刺激により CD4陽性細胞中では exp. 1, exp. 2 ともにアポトーシス細胞の増加がみられた (Fig. 5).

これらのことよりクリソタイル繊維添加により末梢単核細胞の中でリンパ球、特に CD4⁺T 細胞が刺激を受けより多くのアポトーシスを引き起こしていることが示唆された.

4. クリソタイル繊維添加による Fas 陽性細胞の経時的変化

クリソタイル無添加コントロール群及び添加群を 0～5 日間培養し、Fas 陽性細胞数の比率を検討した. クリソタイル無添加コントロール群を 1 とし添加群の値を stimulation index で示すと 3 日目まではクリソタイル添加群に Fas 陽性細胞が多く、4 日目以降には逆にクリソタイ

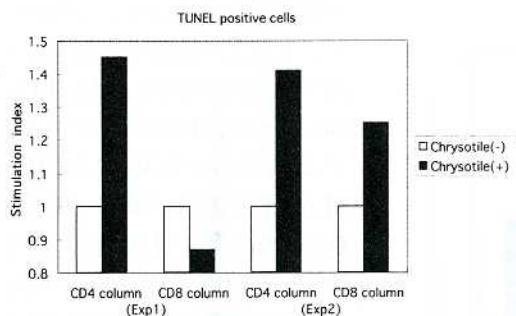


Fig. 5. Induction of apoptosis in CD4 or CD8 positive cells by incubation with chrysothile. CD4 positive cells or CD8 positive cells were collected using CD4 or CD8 column on the day 4 of incubation with or without chrysothile. After that, TUNEL method performed to each cells. Ratio of TUNEL positive cells (stimulation index) was analysed in CD4 positive cells (CD4 column) or CD8 positive cells (CD8 column).

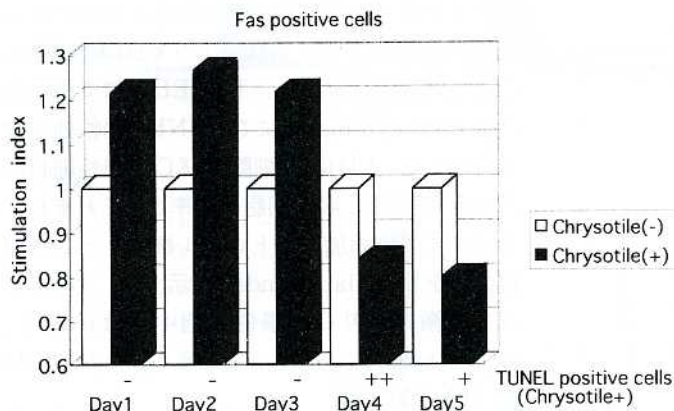


Fig. 6. Modulation of Fas expression by incubation with chrysothile. Ratio of Fas positive cells (stimulation index) was analysed in PBMC incubated with or without chrysothile for 1 to 6 days. On the day 4 of the incubation, when apoptotic cells increased suddenly, a prompt decrease in the cell surface expression of Fas molecule was observed.

ル添加群で Fas 陽性細胞の減少が見られ、TUNEL 陽性細胞の数と逆の相関が見られた (Fig. 6)。

考 察

既に著者の所属する研究室では、職業関連物質であり SiO_2 を骨格を持つ珪酸化合物 (アスベスト繊維、クリソタイル繊維を含む) はヒトリンパ球に対して非特異的の刺激作用を持ち、その作用機序はスーパー抗原作用によると結論している¹⁷⁾。またこれによって起こる多クローン性のリンパ球増殖に伴い、自己反応性クローンが刺激されることが silicosis 患者や asbestosis 患者に多種類の自己抗体が見られ、更には自己免疫疾患が発症する原因ではないかと考察している。今回の実験は果たしてクリソタイル繊維による刺激は末梢単核球にアポトーシスを引き起こすことができるのか、また起こすとすれば末梢単核細胞のうちどのサブセットに影響を与えている

のか、そしてそれには Fas 分子の関与があるのかどうかなど、珪酸化合物によるリンパ球の活性化とアポトーシスの関与を解明することを目的とした。アポトーシスが起こればエンドヌクレアーゼが作用して DNA が切断されるためヌクレオソームの単位での断片化が起こり、この断片化をアガロースゲル電気泳動法などで観察することによってアポトーシスの証明が行われてきた。しかし、この方法では定量化が困難なため、最近定量化も可能で微量のサンプルでも測定可能な TUNEL 法が開発され、我々もこの方法を用いて解析を行った。これは、細胞死

の過程で断片化しつつある DNA の末端に TdT を働かせ、DNA の 3' 末端の水酸基へ標識したヌクレオチドを取り込ませ免疫組織化学の方法で検出することによりアポトーシスを起こしている細胞そのものを可視化する方法である。この結果、スーパー抗原作用を持つと思われる珪

酸化合物の一つであるクリソタイルの刺激により、活性化を受けたリンパ球、特に CD4陽性細胞がアポトーシスを引き起こし、活性化を受けたクローンの除去に働いている可能性が示唆された。また反応3日目までは Fas 陽性細胞が増加しており少なからず Fas 分子が関与している可能性も示唆された。

スーパー抗原などの刺激により T 細胞がポリクローナルに活性化を受けると増殖しすぎたりリンパ球をフィードバック機構としてアポトーシスによって自ら減少させ免疫調節をしていると考えられている¹⁸⁾。この機構には Fas/Fas リガンド系が関与しているものがあり、実際にスーパー抗原作用を持つ staphylococcal enterotoxin B による T 細胞の Fas/Fas リガンド系を介するアポトーシスの誘導が報告されている^{19), 20)}。この Fas/Fas リガンド系を含むアポトーシスの機序に何らかの障害があり細胞除去が出来なくなると、活性化されたクローンの停滞が起こり、その中には自己にとって不利な自己反応性クローンが含まれている可能性があり、それによって免疫調節の破綻が起こって自己免疫を獲得するのではと考えられている。実際にマウスでは Fas 遺伝子の変異をもつ *lpr* マウスや Fas リガンドの変異を持つ *gld* マウスにヒトでいう SLE 様症状の発現が見られ^{21), 22)}、また最近では Human Autoimmune lymphoproliferative syndrome の症例で Fas の変異が同定されたという報告が次々になされ話題を呼んでいる^{23), 24)}。今回の *in vitro* の実験は正常のヒトリンパ球にク

リソタイルによる一過性の刺激を与えたときのアポトーシス誘導を観察したものであるが、silicosis 患者の場合、珪酸化合物の体内沈着によって絶えず反復して刺激を受けているためアポトーシスによるフィードバック機構が働かず、自己免疫を獲得し、種々の自己抗体の発現や、自己免疫疾患を発症するものと考えられる。

現在、*in vivo* で silicosis 患者の Fas/Fas リガンド系の調節分子についても解析中で、silicosis 患者では Fas の発現には差異がないが、可溶性 Fas が有意に高値であることが解っている²⁵⁾。今後更に *in vivo* での解析を進め、*in vitro* の結果と比較・解析することにより、珪酸化合物の自己免疫疾患発症の機序の解明の一助になると思われる。

また今後 *in vitro* では、Fas リガンドや可溶性 Fas、その他 Fas/Fas リガンド系以外のアポトーシスに関連する調節分子なども解析していく必要があると思われる。

稿を終えるにあたり、直接ご指導、御検閲を賜りました川崎医科大学衛生学教室 植木絢子教授に深甚なる謝意を表わすとともに、実験について御助言、御協力いただいた同教室員の皆様方、培養センターの皆様方に厚くお礼申し上げます。また、研究につき多大な御助言を頂きました植木宏明教授(川崎医科大学皮膚科学教室)に深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (No.8-508) の援助によって行われたものである。

文 献

- 1) Turner-Warwick M, Paker WR: Circulating rheumatoid and antinuclear factors in asbestos workers. *BMJ* 3: 492-495, 1970
- 2) Huuskonen MS, Rasanen JA, Karkonen H, Asp S: Asbestos exposure as a cause of immunological stimulation. *Scand J respir Dis* 59: 326-332, 1978
- 3) Becklake MR: Lung structure as a risk factor in adverse pulmonary responses to asbestos exposure. *Am Rev Respir Dis* 128: 385-388, 1983
- 4) Anton-Culver H, Culver BD, Kurosaki T: Immune response in shipyard workers with X ray abnormalities consistent with asbestos exposure. *Br J Ind Med* 45: 464-468, 1988
- 5) Mossman BT, Gee JBL: Asbestos related disease. *N Engl J Med* 320: 1721-1730, 1989

- 6) Schulze E, Herrman K, Mehlhorn J : Die bedeutung der lysosomalen B-Galactosidase fur die diagnose und differentialdiagnose der progressiven sklerodermie und der silikose. *Dermatol Mon Schr* 173 : 513, 1987
- 7) Silicosis and Silicate disease Committee : Diseases associated with exposure to silica and nonfibrous silicate minerals. *Arch Path Lab Med* 112 : 673, 1988
- 8) Haustein UF, Ziegler V, Herrmann K : Silica-induced scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 22 : 444, 1990
- 9) Schulze E, Herrman K, Haustein UF : N-Prokollagen (III) peptide und lysosomale B-Galactosidase bei progressiver sklerodermie und silikose. *Dermatol Mon Schr* 176 : 687, 1990
- 10) Rustin MHA, Bull HA, Ziegler V : Silica-associated systemic sclerosis is clinically, serologically and immunologically indistinguishable from idiopathic systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 123 : 725, 1990
- 11) Yanez Diaz S, Moran M, Unamuno P : Silica and trichroethyleneinduced progressive systemic sclerosis. *Dermatology* 148 : 98, 1992
- 12) Kinugawa K, Ueki A, Yamaguchi M, Watanabe Y, Kawakami Y, Hyodoh F, Tsushima H : Activation of human CD4⁺CD45RA⁺ T cells by chrysotile asbestos in vitro. *Cancer Lett* 66 : 99-106, 1992
- 13) 網川敬吾 : アスベスト (クリソタイル) 繊維によるリンパ球への影響. *川崎医学会誌* 16 : 172-179, 1990
- 14) 渡辺佳樹 : アスベスト繊維曝露による多クローン性リンパ球活性化と MHC Class II との関連. *川崎医学会誌* 20 : 77-84, 1994
- 15) Ueki A, Nakashima M, Kishimoto T, Nakamura J, Kinugawa K, Sakaguchi H : Analysis of the expression of TcR V β repertoires in patients with silicosis. *J Occup Health* 38 : 67-70, 1996
- 16) Ueki A, Yamaguchi M, Ueki H, Watanabe Y, Ohsawa G, Kinugawa K, Kawakami Y, Hyodoh F : Polyclonal human T-cell activation by silicate in vitro. *Immunology* 82 : 332-335, 1994
- 17) 植木 絢子 : 作業関連物質と自己免疫疾患. *産業医学レビュー* 7 : 200-210, 1995
- 18) 西村慶子, 米原 伸 : アポトーシスの分子医学 (橋本嘉幸, 山田 武編), 東京, 羊土社. 1995, pp75-89
- 19) Schultz H, Geiselhart A, Sappeler G, Niethammer D, Hoffmann MK, Dannecker GE : The superantigen *Staphylococcus enterotoxin B* induces a strong and accelerated secondary T-cell response rather than anergy. *Immunology* 87 : 49-54, 1996
- 20) Boshell M, McLeod J, Walker L, Hall N, Patel Y, Sansom D : Effects of antigen presentation on superantigen-induced apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interactions in human T cells. *Immunology* 87 : 586-592, 1996
- 21) Watanabe F, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S : Lymphoproliferative disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356 : 314-317, 1992
- 22) Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI : Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76 : 969-976, 1994
- 23) Galen HF, Fredric JR, Stephen ES, Janet KD, Lindsay AM, Albert YL, Warren S, Michael JL, Jennifer MP : Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81 : 935-946, 1995
- 24) Rieux-Laucat F, Deist FL, Hivroz C, Roberts IAG, Debatin KM, Fischer A, Villartay JP : Mutation in fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268 : 1347-1349, 1995
- 25) Tomokuni A, Aikoh T, Matsuki T, Otsuki T, Kita S, Ueki H, Kusaka M, Kishimoto T, Ueki A : Elevated soluble fas levels in silicosis patients in the absence of clinical features of autoimmune diseases or malignant tumors. 投稿中