

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変化の解析より、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

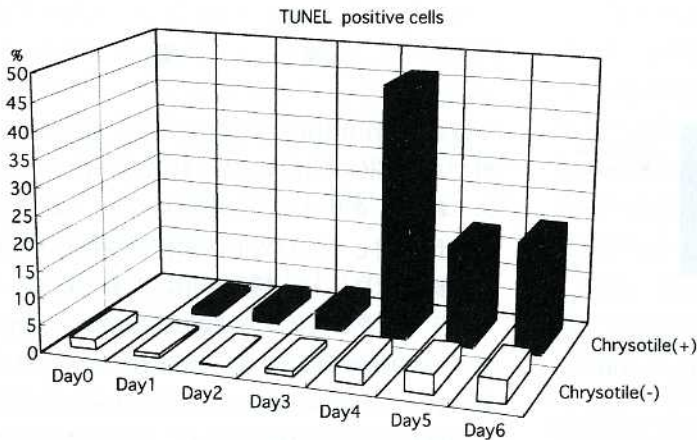


Fig. 3. Induction of apoptosis in PBMC by incubation with chrysotile. Percentage of TUNEL assay positive cells was analysed in PBMC incubated with or without chrysotile for 0 to 6 days.

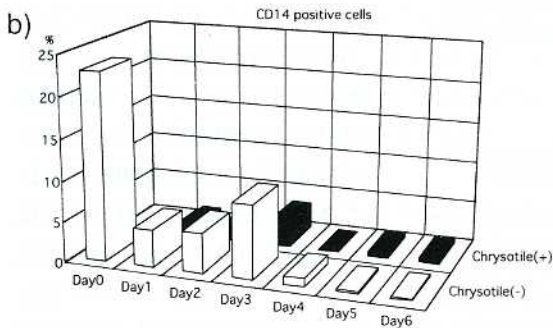
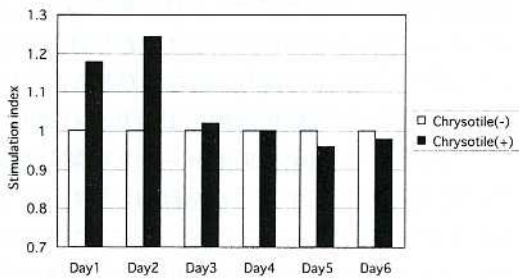


Fig. 4. Modulation of CD3 or CD14 expression by incubation with chrysotile.

(a) Ratio of CD3 positive cells (stimulation index) was analysed in PBMC incubated with or without chrysotile for 1 to 6 days.

(b) Percentage of CD14 positive cells was analysed in PBMC incubated with or without chrysotile 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

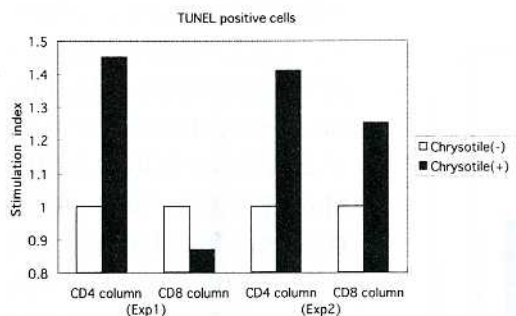


Fig. 5. Induction of apoptosis in CD4 or CD8 positive cells by incubation with chrysolite. CD4 positive cells or CD8 positive cells were collected using CD4 or CD8 column on the day 4 of incubation with or without chrysolite. After that, TUNEL method performed to each cells. Ratio of TUNEL positive cells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

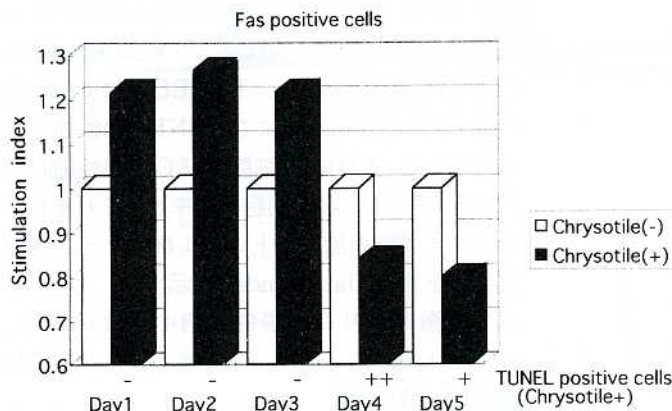


Fig. 6. Modulation of Fas expression by incubation with chrysolite. Ratio of Fas positive cells (stimulation index) was analysed in PBMC incubated with or without chrysolite for 1 to 6 days. On the day 4 of the incubation, when apoptotic cells increased suddenly, a prompt decrease in the cell surface 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。アポトーシスが起ると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