

---

 総 説
 

---

## 珪酸の免疫影響と自己寛容の破綻

李 順 姫<sup>1)</sup> 林 宏 明<sup>1, 2)</sup> 前 田 恵<sup>1, 3)</sup>  
 熊 谷 直 子<sup>1)</sup> 松 崎 秀 紀<sup>1)</sup> 草 加 勝 康<sup>4)</sup>  
 浦 上 更 三<sup>5)</sup> 藤 本 亘<sup>2)</sup> 大 槻 剛 巳<sup>1)</sup>

1) 川崎医科大学衛生学

2) 川崎医科大学皮膚科学

3) 岡山大学大学院自然科学研究科

バイオサイエンス専攻生物機能化学講座

4) 草加病院

5) 日生浦上医院

## Silica-induced alteration of the immune system and dysregulation of autoimmunity

Suni Li<sup>1)</sup> Hiroaki Hayashi<sup>1, 2)</sup> Megumi Maeda<sup>1, 3)</sup> Naoko Kumagai<sup>1)</sup>  
 Hidenori Matsuzaki<sup>1)</sup> Masayasu Kusaka<sup>4)</sup> Kozo Uragami<sup>5)</sup>  
 Wataru Fujimoto<sup>2)</sup> Takemi Otsuki<sup>1)</sup>

1) Department of Hygiene, Kawasaki Medical School

2) Department of Dermatology, Kawasaki Medical School

3) Division of Bioscience, Department of Biofunctional Chemistry,

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

4) Kusaka Hospital

5) Hinase Urakami In

### 要約

珪肺症例は、呼吸障害のみならず、自己免疫異常を呈することが知られている。従来、珪酸のアジュバント効果として理解されていたが、我々は、循環リンパ球に対しても珪酸が何らかの作用を及ぼし、自己寛容が破綻する方向に向かうのではないかと考えて、1) リンパ球の長期の生存に関連する Fas/CD95細胞死受容体や関連する分子、2) 反応性 T 細胞の珪酸粒子による慢性活性化、ならびに3) 珪酸曝露による制御性 T 細胞の機能あるいは量の変化、について、検討してきた。本項では、その概要を紹介するとともに、T ヘルパー17 (Th17) 細胞への影響など、今後の検討課題を提示する。

(臨床環境20:40~53, 2011)

受付: 平成23年6月18日 採用: 平成23年7月1日

別刷請求宛先: 大槻剛巳

〒701-0192 倉敷市松島57 川崎医科大学衛生学

Received: June 18, 2011 Accepted: July 1, 2011

Reprint Requests to Takemi Otsuki, Department of Hygiene, Kawasaki Medical School, 57 Matsushima, Kurashiki, Okayama 701-0192, Japan

## Abstract

It is well known that silicosis patients not only suffer from respiratory disorders, but also from autoimmune dysregulation. Although it has been considered that the silica-induced altered autoimmunity is caused by an adjuvant effect of silica, we have investigated to ensure that silica can act on circulating lymphocytes and cause dysregulation in autoimmunity. Our study focuses on the following: 1) alteration found is Das/CD95 cell death receptor and its related molecules, 2) chronic activation of responder T cells, and 3) changes of function and/or number of regulatory T cells caused by exposure to silica. In this article, we introduce our findings related to these observations and also discuss about issues which should be resolved in the future, such as the effects of silica on T helper 17 (Th17) cells. (Jpn J Clin Ecol 20 : 40~53, 2011)

《Key words》 silicosis, autoimmunity, apoptosis, regulatory T cell

## I. はじめに

珪肺症は、珪酸粒子の慢性曝露に伴う肺線維化を呈する病態で、じん肺症の最も典型的なものである<sup>1~3)</sup>。また社会的にも、最近、トンネル工事等に係わる症例のじん肺救済法の施行が決定するなど<sup>4)</sup>、依然、労働と健康の問題として対応を疎かにできない点も多い。珪肺症例では、呼吸器病態としての合併症で、肺結核、結核性胸膜炎、続発性気管支炎、続発性気管支拡張症、続発性気胸さらに原発性肺がんが知られており、じん肺法上でも合併症として認定され、こういった症例は管理区分として療養することと決められている<sup>5~8)</sup>。しかし、こういった肺病変以外に、珪肺症の合併症として自己免疫疾患が挙げられる。古くから知られる慢性関節リウマチとの合併である Caplan 症候群をはじめ<sup>9,10)</sup>、強皮症<sup>11~15)</sup>や全身性エリテマトーゼス<sup>16,17)</sup>の合併や、近年では、抗好中球細胞質抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody; ANCA) 関連血管炎/腎炎合併<sup>18~20)</sup>の報告などもみられている。従来、珪酸によるアジュバント効果として捉えられており、何らかの組織変化や変性に伴って露出した自己抗原に対して珪酸粒子がアジュバントとして働き、抗原認識をさせると理解されていた<sup>21~26)</sup>。

しかし、我々はアジュバント効果もさることながら、珪酸曝露自体が循環末梢リンパ系に対して何らかの作用を有するのではないかと考えて、種々の実験的検証や、症例検体を用いた検討を行ってきた。例えば、反応性 T 細胞の活性化の状況や、その後に続く細胞死の調節異常、あるいはこういっ

た抗原刺激に伴う活性化を生理的に制御すると考えられる CD4+25+ forkhead box P3 (FoxP3)+ の表現形を示す制御性 T 細胞の質あるいは量の異常などが、珪酸の長期曝露によって生じている可能性である。制御性 T 細胞は、非自己あるいは自己の抗原に対する反応性 T 細胞の活性化を終息させる方向に働くと考えられているが、その機能や量が減弱する時には、継続的は反応性 T 細胞の活性化が生じ、自己寛容の破綻につながると考えられるからである<sup>27~29)</sup>。

近年、Nod-like receptor family, pryin domain containing 3 (NLRP3, Nalp3)-inflammasome の珪酸やアスベスト、さらには尿酸などの結晶成分に対する生体反応の中での役割解析が進み、吸入された珪酸粒子に対する肺胞マクロファージの反応系の詳細が解明されてきた<sup>20~32)</sup>。肺胞マクロファージは、まず最初に、macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)、scavenger receptor (SR)-A I あるいは SR-A II などの細胞膜受容体によって、珪酸を認識する<sup>33~35)</sup>。そして、lysosome に補足し、上記の inflammasome の活性化をもって、pro-caspase 1 を切断して、活性型とする。そして pro-interleukin (IL)-1 $\beta$  が活性型となり、線維性結節を形成するべく線維芽細胞を動員し、また、活性酸素種や活性窒素腫を産生する<sup>36~39)</sup>。これらの結果、肺胞上皮の傷害や線維化が進み、肺胞マクロファージのアポトーシスなども誘導される。こういった反の中では、IL-1 $\beta$ 、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、macrophage inflammatory protein (MIP)-1/2、

monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) や IL-8 などのサイトカイン・ケモカインが、慢性炎症の進行、膠原線維の増殖に関与している<sup>36-39</sup>。肺胞マクロファージから放出された珪酸粒子は、また近くの肺胞マクロファージによって貪食され、同様の生体反応が継続的に生じることとなり、加えて、最終的には領域リンパ節に運ばれていく。こういった一連の反応が反復性に継続することによって局所の線維化などが形成されて行く。

こういった詳細が判明してきたとはいえ、珪酸曝露症例に生じる自己免疫の調節異常について十分に理解されている訳ではない。そこで我々は以下の点について検討を加えてきた。

- 1) リンパ球の長期の生存に関連する Fas/CD95 細胞死受容体や関連する分子
- 2) 反応性 T 細胞の珪酸粒子による慢性活性化
- 3) 珪酸曝露による制御性 T 細胞の機能あるいは量の変化

本稿では、こういった観点からの我々の検討結果を総括し、珪酸曝露が惹起する自己寛容の破綻について考察を加える。なお、本稿で記す健常人や珪肺症症例の検体を用いた研究は、川崎医科大学、草加病院ならびに日生浦上医院の倫理委員会の承認をうけて実施され、文書による同意を得た症例からのみ検体は採取された。すべての症例は、岡山県備前市の耐火煉瓦工場の作業員で、草加病院と日生浦上医院で経過観察されている。作業員たちが取り扱った土、泥、砂、コンクリートといったものに含まれる珪酸成分は40~60%含有と考えられ、珪肺症の診断は、「国際労働機関」(International Labour Organization; ILO) の2000年のガイドライン<sup>40</sup>に従って診断されている。また、自己免疫異常の症状(皮膚硬化、レイノー減少、顔面の紅斑あるいは関節痛など)やがんが診断されている症例は居なかった。

## II. 珪肺症における細胞死受容体 Fas/CD95 と関連する分子の異常

Fas/CD95分子の発見によって、リンパ球の細胞死・アポトーシスやそのシグナル伝達系の理解

が進んできた<sup>41-43</sup>。特に、Fas やそのリガンドの Fas ligand (FasL) の異常は、例えば、動物モデルでは、それぞれの突然変異を有する動物では、リンパ球のアポトーシスの欠如によって、それぞれが自己免疫疾患発症の系統として知られるし(*lpr* マウス; *fas* の突然変異、*gld* マウス; *fas ligand* の突然変異)<sup>44-46</sup>、ヒトでは小児に autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) が生じてくる<sup>47-50</sup>。Fas 分子の細胞内ドメインに含まれる signal-transducing death domain は、Fas-associated protein with death domain (FADD) と pro-caspase 8 を動員してきて活性型の death-inducing signaling complex (DISC) を形成する<sup>51,52</sup>。そして、活性化された caspase 8 はその後の caspase cascade の進行を誘導し、抑制分子である ICAD/DFF45 が乖離した CAD/CPAN/DFF40 分子によって、DNA の断片化が誘導され、細胞はアポトーシスに陥る<sup>53,54</sup>。

典型的な *fas* 遺伝子の選択的スプライシングの変異体は、可溶性 Fas として知られている、この変異体は膜貫通領域の63bp を欠損しており、可溶性 Fas は細胞から分泌され、更にリガンド結合領域は正常であることから、細胞外で Fas ligand と結合することによって、細胞膜上の Fas 分子の Fas ligand との結合を阻害する<sup>41-43</sup>。そのためこういったリンパ球は長期生存すると考えられ、そういった中に自己認識クローンが含まれると自己免疫疾患の惹起につながると考えられている。自己免疫疾患症例の血清中で可溶性 Fas が高値を示す報告も十分認められている<sup>55-57</sup>。

我々は珪肺症例の検体を用いて、以下のような Fas 分子やその関連分子の検討結果を得てきた。

- 珪肺症例における低い機能的な (Fas 媒介アポトーシスを誘導可能な) 抗 Fas 自己抗体 (ならびに、抗 caspase 8 自己抗体や topoisomerase I 自己抗体) の検出<sup>58-62</sup>。
- 珪肺症例血清中の高可溶性 Fas 濃度 (しかるに可溶性 Fas ligand 濃度は健常人と差が無い)<sup>63,64</sup>。
- フローサイトメトリーで検討した末梢血リンパ

球の膜 Fas の陽性細胞比率には差が無いものの、平均蛍光強度は健常人に比し珪肺症由来リンパ球で低い<sup>64, 65)</sup>。

- ・この弱い膜 Fas 発現リンパ球は、野生型 Fas ではなく可溶性 Fas の遺伝子を優位に発現、可溶性 Fas 以外の細胞膜上での Fas と Fas ligand の結合を阻害する decoy receptor 3 (DcR3) や、その他同様の機能と考えられるスプライシングの変異体の珪肺症例末梢血での高い遺伝子発現<sup>67, 68)</sup>。
- ・細胞内 Fas 媒介アポトーシスの生理的な抑制分子 (I-Flice, Sentrin, Survivin および ICAD) の遺伝子発現レベルの末梢循環リンパ球での減弱<sup>69, 70)</sup>。

Fas や Fas ligand の突然変異は、珪肺症例では認められなかったものの、これらの所見から我々

は、図 1 に示すように珪肺症における T リンパ球の 2 つの亜分画を想定している。T 細胞-iは、機能的な抗 Fas 自己抗体などによって Fas 媒介アポトーシスが活性化されており、生理的な抑制性遺伝子も減弱している。この分画はアポトーシスにて死滅しては、骨髄からの動員が繰り返されている群と考えられる。一方、T 細胞-iiは、可溶性 Fas や DcR3、その他のスプライシング・バリエーションを産生し、Fas 媒介アポトーシスが生じない一群であり、通常以上に長期生存することが想定される細胞群である。そしてこの中には、自己認識クローンが含まれると想定される<sup>71, 72)</sup>。このことによって、珪肺症例では、自己抗原に対する反応が、次第に高まって行き、症状を発するようになるのではないかと考えられる。

しかし、こういった検討だけでは、珪酸曝露が、

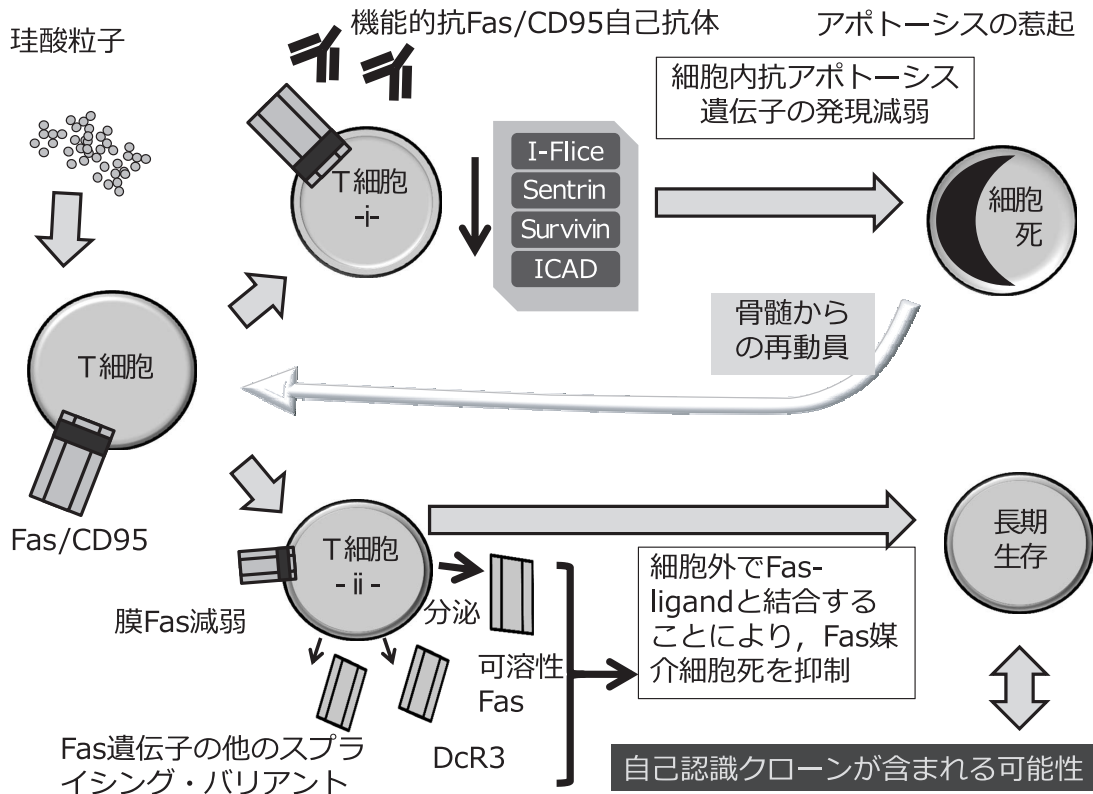


図 1 珪肺症例で認められた末梢血リンパ球の Fas および Fas 関連分子の異常の模式図。

2 つの亜群 (T 細胞-i および -ii-) がこのような症例には存在し、T 細胞-i は珪酸曝露に伴ってアポトーシスに陥り骨髄からの再動員が繰り返されている亜群、そして、T 細胞-ii は、自己が産生する Fas 媒介アポトーシスに対する抑制分子によって細胞死を免れ長期生存し、おそらく自己認識クローンを含むと考えられる亜群。



反応性 T 細胞を慢性的に活性化しているのかどうかは不明であり、その点にも着目して検討を進めた。

### Ⅲ. 珪酸による反応性 T 細胞の慢性活性化

まず初めに、*in vitro*での反応性 T 細胞に対する珪酸曝露を検討した。健常人末梢血単核球を、phytohaemagglutinin (PHA) によって刺激することを陽性対照として、珪酸粒子曝露 (25あるいは50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を10日間実施した<sup>73)</sup>。その結果、早期活性化指標としての CD69膜発現 (ならびに遺伝子発現) でモニターすると、PHA 曝露の場合には1~3日で終息する反応性 T 細胞の活性化が生じ、珪酸曝露では、5日目程度から10日目まで緩やかに増加する活性化が認められた (図2-A) (ちなみにアスベスト繊維であるクリソタイルではこの活性化は観察されなかった)<sup>73)</sup>。この実験系の中では、珪酸粒子を貪食した細胞との共培養が、CD69発現の半分程度に寄与していることも判明した。これらの結果は、NLRP3 inflammasome の重要性もまた示唆していると思われる。珪肺症例の反応性 T 細胞が、肺循環や関連する領域リンパ節 (そこには肺泡マクロファージによって処理されたのちに珪酸粒子が蓄積されている) などで、珪酸粒子と邂逅すると考えると、こういった反応性 T 細胞は、慢性的に、かつ反復的に曝露されると想定される。その場合には、循環末梢血反応性 T 細胞の慢性的な活性化が生じている可能性がある。

活性化反応性 T 細胞の膜表面のマーカーとしては CD25が考えられるが、制御性 T 細胞が CD4+25+の表面形質を有していることより、珪肺症のごとく、制御性 T 細胞や活性化反応性 T 細胞の量の変化などを想定している場合には、CD25発現量では詳細は病態は理解できない。そこで、CD69ならびに programmed cell death 1 (PD-1) 遺伝子の発現を、フローサイトメトリーで回収された健常人と珪肺症の CD4+25-分画、ならびに CD4+25+分画で、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) にて

解析した<sup>74)</sup>。その結果、図2-B にしめすように珪肺症の CD4+25-分画は、健常人のそれと比して、CD69の発現が高まっていた<sup>74)</sup>。さらに、図2-C に示すように、PD-1発現はどちらの分画でも健常人に比し、珪肺症で高まっていた。これらの結果は、珪肺症の反応性 T 細胞が、慢性反復的な活性化を受けており、長期生存している可能性を示唆した。CD69発現は、活性化の早期に限られているため、図2-B での両群の CD25+分画では、発現が低いことも、この推論とは合致していると考えられる。加えて、PD-1発現は、CD25+分画でも CD25-分画でも健常人より珪肺症由来 T 細胞で発現が高まっていたことは、珪肺症例の末梢血 CD4+25+という分画には、通常の制御性 T 細胞のみならず、慢性的に活性化を受けている反応性 T 細胞も混入している可能性が示唆された。

他の反応性 T 細胞の活性化指標として、血清中の可溶性 IL-2受容体 (sIL-2R) の測定を行い、珪肺症例と健常人、さらには強皮症症例と比較検討した。なぜならば、sIL-2R は T 細胞系の悪性腫瘍 (T 細胞由来あるいはより未熟なリンパ系幹細胞由来の白血病) や、自己免疫疾患、炎症性疾患の際に高値となることが知られているからである<sup>75~78)</sup>。この IL-2受容体は、CD25/IL-2R $\alpha$ 、CD122/IL-2R $\beta$  ならびに CD132/IL-2R $\gamma$  の三量体である<sup>79)</sup>。そして、sIL-2R は自然に生じる可溶性の IL-2R $\alpha$  である。この解析に先だて、血清中の抗核抗体を測定した。測定に用いたキットは、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-based MESACUP ANA TEST (MBL 社、名古屋) であり、これは RNP、SS-A/Ro、SS-B/La、Scl-70、Jo-1そして ribosomal P などのリコンビナント蛋白や、実験系で産生された U1 RA や CENP-B、そして抽出された抗原 (Sm, SS-A/Ro, Scl-70, Histone そして DNA) などを複合的に有するキットである。図2-D で示すように血清抗核抗体価は、強皮症で最も高く、次いで珪肺症、健常人の順であり、群間比較でも有意な差を呈する他、健常人、珪肺症、強皮症の順で、1、2、3と仮に免疫病態スケールを数値化すると、有意な正の相関が認められた。

同様の解析を血清 sIL-2R で実施すると群間の有意差が明白であったのは、強皮症と健常人の間であったが、相関は有意な正の相関を示した<sup>80)</sup> (図 2-E)。これらの結果は、ここで調査した症例が明らかな自己免疫に関連する症状を呈していないにも関わらず、自己寛容の破綻への方向性が珪肺症例で生じている可能性が示唆されるし、sIL-2R 値は、珪肺症例での免疫異常の検出指標としての位置付けも考えることが想定される。珪肺症例の慢性活性化を受けた反応性 T 細胞が、この sIL-2R を産生しているのかどうかなど、今後も詳細を検討していかなければならない。

#### IV. 珪酸による制御性 T 細胞の慢性活性化

上記のように珪肺症の反応性 T 細胞は慢性的な活性化を受けている。それでは制御性 T 細胞はどうであろうか？ CD4+25+制御性 T 細胞は、自己あるいは非自己抗原と反応する T 細胞の活性化を終息する方向へ調節して自己寛容の維持を担う役割を有している<sup>27~29)</sup>。その機能の減弱や数の喪失は、非自己抗原のみならず、自己抗原による反応性 T 細胞への刺激とそれに伴う活性化を長期に持続させてしまうことにつながると考えられる。制御性 T 細胞は FoxP3 転写因子を発現しており、この遺伝子異常は、げっ歯類やヒトにおいて自己免疫や炎症性疾患を惹起することも知ら

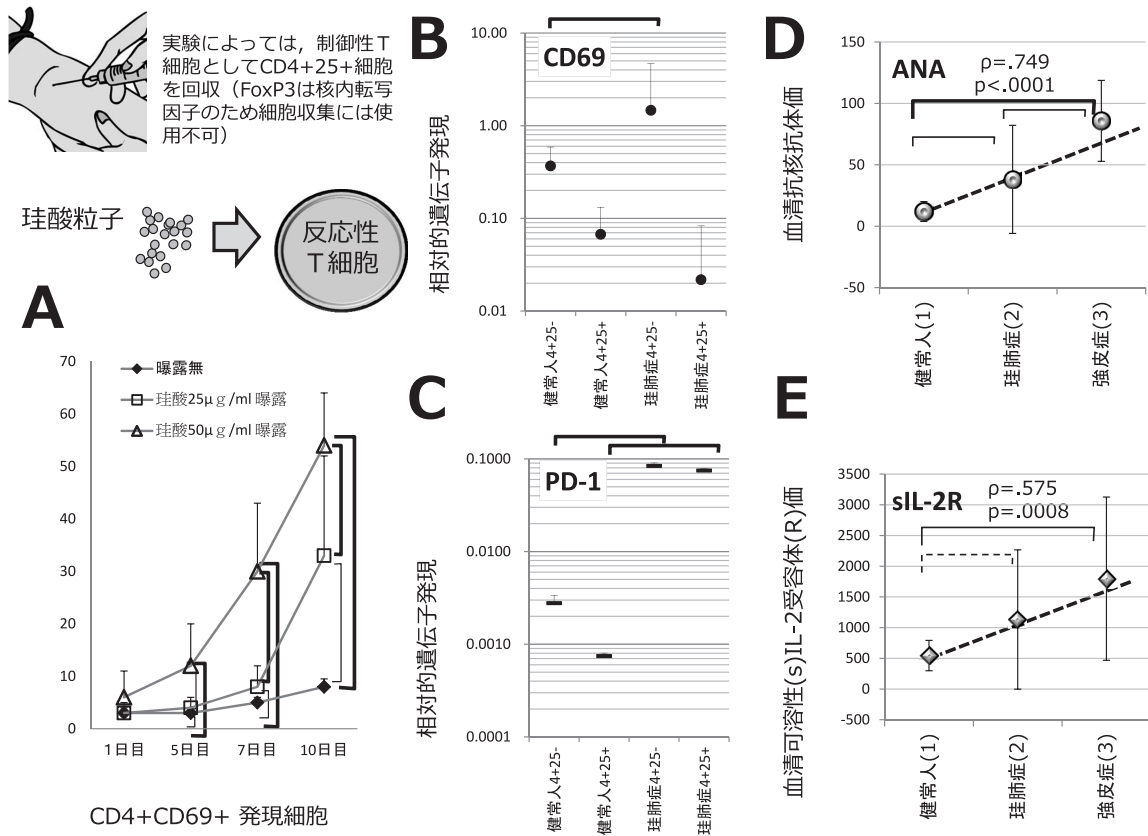


図 2 珪酸曝露と反応性 T 細胞の慢性活性化。

太い実線は有意差  $p < 0.001$ 、細い実線は有意差  $p < 0.05$  そして点線は有意差  $0.05 < P < 0.1$  を示す。[A] 健常人の末梢血リンパ球を珪酸に曝露 (25 あるいは  $50 \mu\text{g/ml}$ ) し共培養 (10 日) した時のフローサイトメトリー出解析した CD69 の発現度と対照との比較。[B] と [C] 健常人および珪肺症例の末梢血 CD4+25- ならびに CD4+25+ 分画の CD69 および PD-1 遺伝子発現の比較。[D] と [E] 血清抗核抗体価と可溶性 IL-2 受容体価。また健常人・珪肺症・強皮症をそれぞれ 1・2・3 と番号を振り、免疫病態の進行度合いと仮定して、それぞれとの相関を検討した。

れている。ヒトの自己免疫疾患では、多発性硬化症<sup>81)</sup>、慢性関節リウマチ<sup>82)</sup>、全身性エリテマトーゼス<sup>83)</sup>あるいは尋常性天疱瘡<sup>84)</sup>などで、その機能低下や数の減少が報告されている。こういった細胞分子レベルでの所見は、CD4+25+FoxP3+制御性 T 細胞が正常な免疫機構の維持や、自己寛容の破綻の防御に非常に重要な役割を有していることを示している。

CD25分子は、既に触れたように、制御性 T 細胞のみならず、抗原で活性化された反応性 T 細胞などでも発現される。そのため FoxP3発現が制御性 T 細胞の同定に用いられるが、その他 CD127<sup>85, 86)</sup>や PD-1<sup>87, 88)</sup>も CD25+となった活性化反応性 T 細胞と制御性 T 細胞の区別のために用いられる。

前述したように、珪肺症末梢血 CD4+25+分画では PD-1発現が高まっていた (図2-C)。さらに珪肺症の慢性活性化を受けた反応性 T 細胞は、末梢 CD4+25+分画に混入してきている可能性が考えられた。

そこでまず珪肺症例の末梢血 CD4+25+分画をフローサイトメトリーで回収し (FoxP3は核内転写因子なので、この指標では回収後に生物学的な検討に用いられないため CD4+25+を指標に収集する以外にはない)、その制御性 T 細胞機能を検討した。図3-A に示すように、CD4+25+分画の混合リンパ球培養法による制御機能は、特に、反応性 T 細胞と 1 : ¼ および 1 : ½ で制御性 T 細胞を共培養した場合に、珪肺症由来の末梢血を用いた場合のそれが、健常人に比して、有意に減弱していることが判明した<sup>89)</sup>。これは真の (FoxP3陽性の) 意味での制御性 T 細胞が、珪肺症例の CD45+25+分画から失われている可能性を示唆する所見であった。この可能性を検討するために、健常人ならびに珪肺症例から CD4+25-あるいは CD4+25+分画を収集し、FoxP3ならびに制御性 T 細胞が細胞間接触にて抑制機能を発揮するために重要な因子である cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) の遺伝子発現を検討した。その結果、図3-B および C に示すように、健常人で CD4+25+分画有意に高発現をしている両遺伝

子であるが、珪肺症ではその CD25+分画の優位性が消失し、両分画で類似の発現度合を示すのみであった<sup>89)</sup>。これらの結果から、珪肺症例の CD4+25+分画には慢性活性化反応性 T 細胞の混入が生じていることが想定され、図3-D に示すように、珪肺症例で CD4+25+分画の比率は健常人より高いものの、FoxP3での比較は差が認められず、CD4+25+のうち、FoxP3+の細胞群が、珪肺症例の末梢血では多い結果も得られた。

ただし、それだけでは末梢血 CD4+25+分画の制御機能の減弱を十分には説明し切らず、制御性 T 細胞自体の消長についての検討が必要と感じられた。よって、Fas/CD95細胞死受容体に、改めて着目した。それは、反応性 T 細胞が活性化を受けると CD25を表出するように、制御性 T 細胞では CD95を活性化に伴って表出するという報告などがあるからである。それによって制御性 T 細胞は反応性 T 細胞に比し、より Fas 媒介アポトーシスに感受性が高まる。よって、健常人と珪肺症例の末梢血を用いて、CD4+FoxP3+分画の Fas 発現の蛍光強度平均を調べてみると、有意に珪肺症由来制御性 T 細胞が、健常人由来に比して、高度の Fas 発現を示すことが分かった<sup>74)</sup> (図4-E)。さらに、末梢血中の CD4+FoxP3+Fas+分画の比率は、これも有意に珪肺症例で高かった (図4-F)。これらの結果により珪肺症例では制御性 T 細胞も、長期慢性の珪酸曝露によって、慢性活性化を受け、Fas/CD95の高発現が惹起され、早期の喪失に至っている可能性が示唆された。

## V. 珪酸が惹起する珪肺症例での末梢血 CD4+25+分画の機能異常

ここまで示してきた結果や、従来の報告を合わせて考慮すると、珪肺症の末梢血 CD4+25+分画は、慢性的な珪酸曝露に伴う反応性 T 細胞および制御性 T 細胞への慢性活性化によって、それぞれが CD25あるいは CD95/Fas を高発現するようになり、その結果、慢性活性化を受けた反応性 T 細胞は CD4+25+分画に混入、さらに慢性活性化を受けた制御性 T 細胞は早期の喪失に至って行くことになる (図4)。その結果、分画として

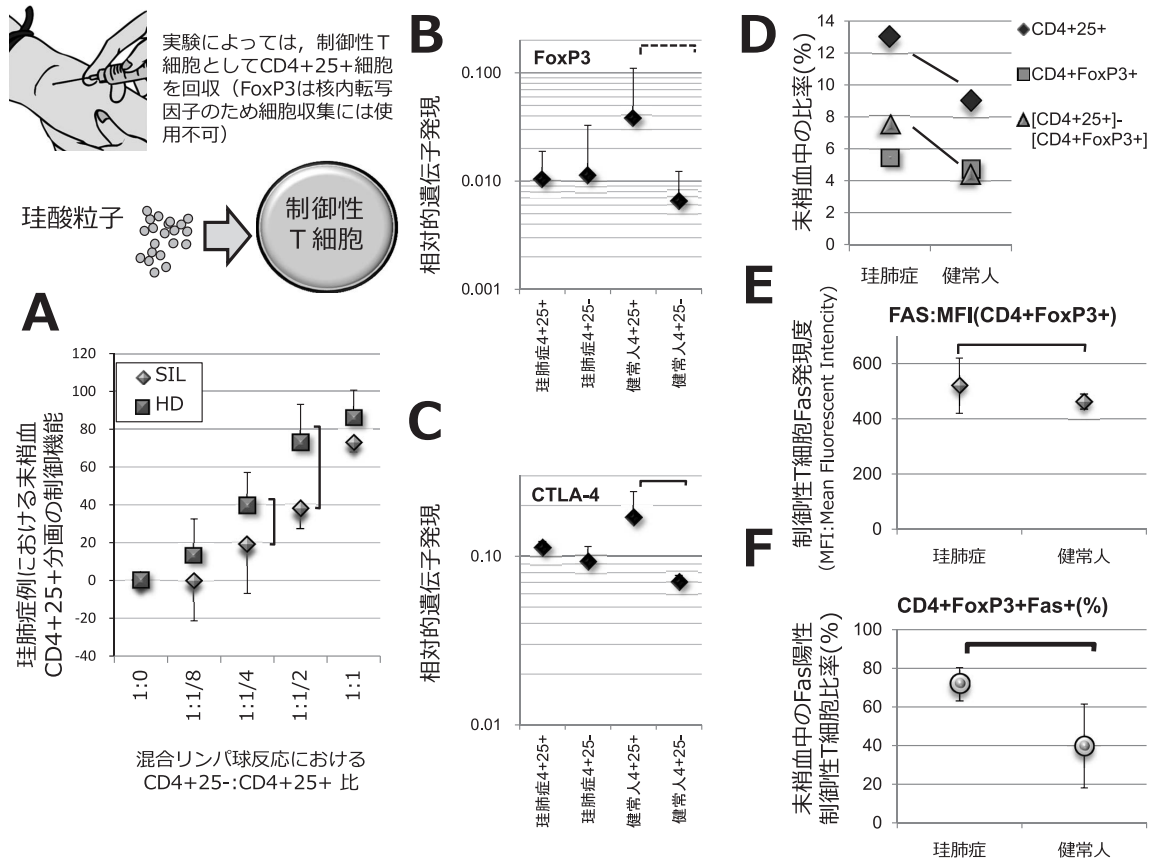


図3 珪酸曝露と制御性T細胞の慢性活性化。

太い実線は有意差 $<0.01$ 、細い実線は有意差 $p<0.05$ および点線は有意差 $0.05<P<0.1$ を示す。[A] 珪肺症ならびに健康人から得られたCD4+25-細胞を放射線照射をしたアロ末梢血単核球と共に培養する際に、自己CD4+25+細胞を0、 $1/8$ 、 $1/4$ 、 $1/2$ および1の割合で共培養する。その結果反応性T細胞のアロ抗原刺激による活性化は抑制される。その抑制率を縦軸に示す。[B] および[C] 健康人および珪肺症例からのCD4+25-分画ならびにCD4+25+分画のFoxP3およびCTLA-4の遺伝子発現の比較。両遺伝子とも、健康人では、CD4+25+>CD4+25-が保たれているが、珪肺症では失われている。[D] 健康人ならびに珪肺症の末梢血CD4+25+、CD4+FoxP3+および前者から後者を引いた値の比較。[E] および[F] 健康人および珪肺症例のCD4+FoxP3+分画のFas分子の平均蛍光強度の比較ならびに末梢血中Fas陽性制御性T細胞の比率の比較。

の制御性T細胞機能の減弱が生じ、自己認識が過剰となり、自己寛容の破綻が生じてくると考えられる<sup>90)</sup>。

今後も解決すべき点は多い。例えば、珪酸の金属塩であるアスベストの曝露者に生じる合併症は、悪性胸膜中皮腫や肺癌のような悪性腫瘍である<sup>91,92)</sup>。悪性腫瘍の発症を制御性T細胞の機能などから考えた場合には、その機能の増強や数の増加、とくに腫瘍組織周囲での数の増加は、腫瘍免疫担当細胞の機能を弱めることによって、腫瘍発育に促進的に働くことが知られている<sup>93-96)</sup>。勿論

物理的な性状も、珪酸とアスベストでは異なるが、制御性T細胞を中心に据えて考えると、珪酸では機能や数の減弱、アスベストではその亢進という方向性を取るのではないかと考えられ、詳細な検討も必要であろうと思っている。

さらに近年Th17細胞というヘルパーT細胞の一亜群が同定され、自己免疫の発症に深く関与することが示唆されている。また制御性T細胞との相互作用も知られるようになってきている。Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ は制御性T細胞への極性を決定するのみならず、



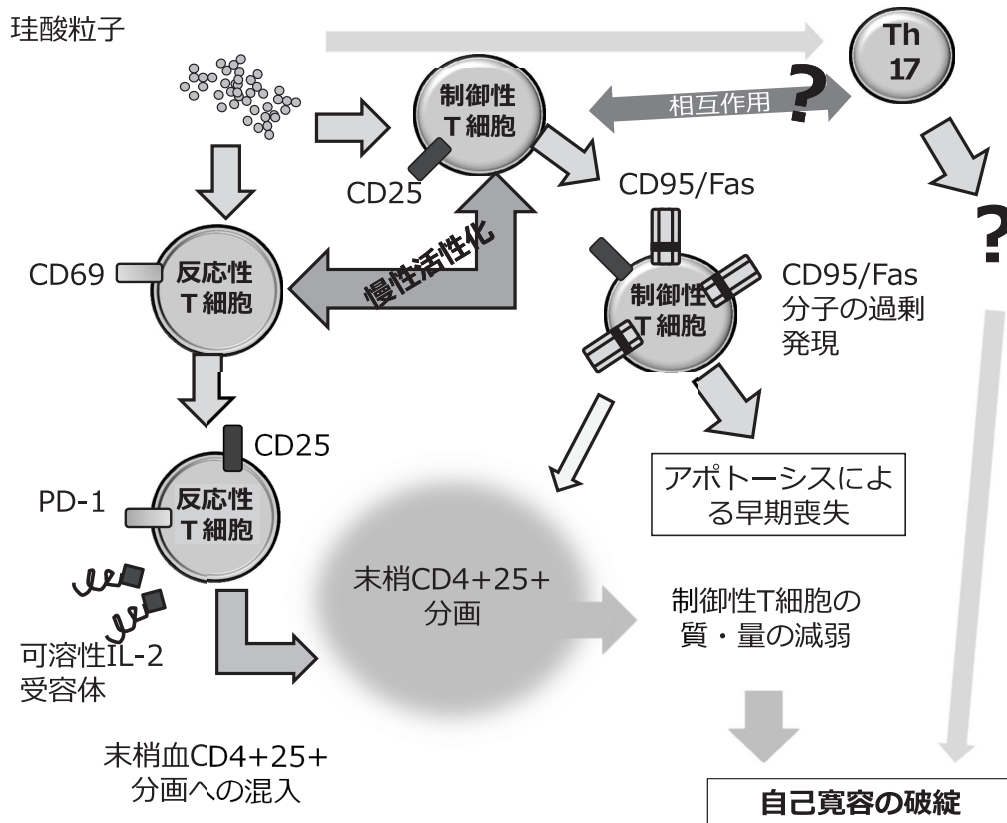


図4 珪酸曝露が惹起する自己寛容の破綻に関する機序の模式。

IL-6との協調作業によってTh17細胞への分化も誘導する<sup>97-102)</sup>。また制御性T細胞とTh17細胞との相互移行の可能性なども論じられており、上記の珪酸曝露とアスベスト曝露の、制御性T細胞を中心に据えた視点は、裏返せば、Th17細胞を中心に据えることでも、興味深い観点が生まれ、珪酸曝露では、その数などの増強が生じ、反対に、アスベスト曝露では減弱が生じて来ているのかも知れない。Th17細胞の発癌への関与に関して、いくつかの報告も認められるようになったが、今後、珪肺症におけるTh17細胞の役割は機能などについて、検討を深めることが必要にならうと考えられる。

このような解析を進めることによって、珪肺症例における免疫病態の理解や、臨床的な管理のみならず、現状でも原因不明で治療などでも難渋する自己免疫疾患の病態の理解に、反映できる所見を得て行きたいと考える。

#### 謝辞

本稿に示してきた川崎医科大学衛生学での検討結果については、植木絢子前教授をはじめ、我々の教室に在籍していた兵藤文則前講師、高田晶子先生、三浦由恵先生、村上周子先生などの努力とともに、幡山圭代、山本祥子、坂口治子、加藤美奈子、宮原直織美各氏の技術的サポートによって得られたものであり深く感謝いたします。加えて成果の一部は平成18年度科学技術振興調整費「アスベスト関連疾患への総括的取り組み」(代表：大槻剛巳)、日本学術振興会科学研究費補助金(18390186、19689153、19790431、20890270、203801178、22700933および22790550)、武田科学振興財団、日本衛生学会若手研究活性化基金、川崎医科大学プロジェクト研究費(18-209T、18-403、18-601、19-205、19-506、19-407M、19-603T、20-412I、20-210O、20-109N、20-402O、20-410I、21-401、21-107、22-B1、22-A5および22-A29)、川崎医学・医療福祉学振興会ならびに両備てい園記念財団による研究助成によって援助を受けました。改めて深く感謝いたします。

## 文献

- 1) Hoffman HM, Wanderer AA: Inflammatory and IL-1 $\beta$ -mediated disorders. *Curr Allergy Asthma Rep* 10: 229-235, 2010
- 2) Madl AK, Donovan EP, *et al.*: State-of-the-science review of the occupational health hazards of crystalline silica in abrasive blasting operations and related requirements for respiratory protection. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 11: 548-608, 2008
- 3) Rimal B, Greenberg AK, *et al.*: Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding. *Curr Opin Pulm Med* 11: 169-173, 2005
- 4) <http://www.asahi.com/national/update/0615/TKY201106150654.html> (朝日新聞 Web版: 2011年6月16日1時31分)
- 5) Brown T: Silica exposure, smoking, silicosis and lung cancer – complex interactions. *Occup Med (Lond)* 59: 89-95, 2009
- 6) Rees D, Murray J: Silica, silicosis and tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 11: 474-484, 2007
- 7) Cohen R, Velho V: Update on respiratory disease from coal mine and silica dust. *Clin Chest Med* 23: 811-826, 2002
- 8) Silica, Some Silicates, Coal Dust and para-Aramid Fibrils. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs, Vol 68. IARC publisher, 1997
- 9) Caplan A: Rheumatoid disease and pneumoconiosis (Caplan's syndrome). *Proc R Soc Med* 52: 1111-1113, 1959
- 10) Caplan A, Payne RB, *et al.*: A broader concept of Caplan's syndrome related to rheumatoid factors. *Thorax* 17: 205-212, 1962
- 11) Sluis-Cremer GK, Hessel PA, *et al.*: Silica, silicosis, and progressive systemic sclerosis. *Br J Ind Med* 42: 838-843, 1985
- 12) Barnadas MA, Tuneu A, *et al.*: Impotence in silicosis-associated scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 15: 1294-1296, 1986
- 13) Cowie RL: Silica-dust-exposed mine workers with scleroderma (systemic sclerosis). *Chest* 92: 260-262, 1987
- 14) Haustein UF, Ziegler V, *et al.*: Silica-induced scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 22: 444-448, 1990
- 15) Haustein UF, Andereg U: Silica induced scleroderma – clinical and experimental aspects. *J Rheumatol* 25: 1917-1926, 1998
- 16) Yamazaki S, Yoshiike F, *et al.*: Silica-associated systemic lupus erythematosus in an elderly man. *Intern Med* 46: 1867-1871, 2007
- 17) Bartsch P, Salmon J, *et al.*: Asbestosis and systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 61: 28-31, 1980
- 18) Tervaert JW, Stegeman CA, *et al.*: Silicon exposure and vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 10: 12-17, 1998
- 19) Mulloy KB: Silica exposure and systemic vasculitis. *Environ Health Perspect* 111: 1933-1938, 2003
- 20) Bartůnková J, Pelclová D, *et al.*: Exposure to silica and risk of ANCA-associated vasculitis. *Am J Ind Med* 49: 569-576, 2006
- 21) Uber CL, McReynolds RA: Immunotoxicology of silica. *Crit Rev Toxicol* 10: 303-319, 1982
- 22) Steenland K, Goldsmith DF. Silica exposure and autoimmune diseases. *Am J Ind Med* 28: 603-608, 1995
- 23) Shanklin DR, Smalley DL: The immunopathology of siliconosis. History, clinical presentation, and relation to silicosis and the chemistry of silicon and silicone. *Immunol Res* 18: 125-173, 1998
- 24) Parks CG, Conrad K, *et al.*: Occupational exposure to crystalline silica and

- autoimmune disease. *Environ Health Perspect* 107S5: 793-802, 1999
- 25) Davis GS, Holmes CE, *et al.*: Lymphocytes, lymphokines, and silicosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20S1: 53-65, 2001
- 26) Cooper GS, Gilbert KM, *et al.*: Recent advances and opportunities in research on lupus: environmental influences and mechanisms of disease. *Environ Health Perspect* 116: 695-702, 2008
- 27) Baecher-Allan C, Viglietta V, *et al.*: Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol* 16: 89-98, 2004
- 28) Schwartz RH: Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 6: 327-330, 2005
- 29) Bluestone JA, Tang Q: How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 17: 638-642, 2005
- 30) Dostert C, Pétrilli V, *et al.*: Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320: 674-677, 2008
- 31) Cassel SL, Eisenbarth SC, *et al.*: The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105: 9035-9040. 2008
- 32) Hornung V, Bauernfeind F, *et al.*: Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9: 847-856, 2008
- 33) Brown JM, Swindle EJ K, *et al.*: Silica-directed mast cell activation is enhanced by scavenger receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 43-52, 2007
- 34) Hamilton RF Jr, Thakur SA, *et al.*: MARCO mediates silica uptake and toxicity in alveolar macrophages from C57BL/6 mice. *J Biol Chem* 281: 34218-34226, 2006
- 35) Thakur SA, Beamer CA, *et al.*: Critical role of MARCO in crystalline silica-induced pulmonary inflammation. *Toxicol Sci* 108: 462-471, 2009
- 36) Barrett EG, Johnston C, *et al.*: Silica-induced chemokine expression in alveolar type II cells is mediated by TNF-alpha-induced oxidant stress. *Am J Physiol* 276: L979-988, 1999
- 37) Hubbard AK, Thibodeau M, *et al.*: Cellular and molecular mechanisms regulating silica-induced adhesion molecule expression in mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20S1: 45-51, 2001
- 38) Porter DW, Millecchia L, *et al.*: Enhanced nitric oxide and reactive oxygen species production and damage after inhalation of silica. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L485-493, 2002
- 39) Hamilton RF Jr, Thakur SA, *et al.*: Silica binding and toxicity in alveolar macrophages. *Free Radic Biol Med* 44: 1246-1258, 2008
- 40) International Classification of Radiographs of Pneumoconioses Revised Edition 2000, The Complete Set of Radiographs + Guidelines for the use of the ILO, ILO (International Labour Organization) publisher, 2004
- 41) Nagata S, Golstein P: The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995
- 42) Nagata S: Fas-mediated apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 406: 119-124, 1996
- 43) Matiba B, Mariani SM, *et al.*: The CD95 system and the death of a lymphocyte. *Semin Immunol* 9: 59-68, 1997
- 44) Rudin CM, Van Dongen J, *et al.*: Apoptotic signaling in lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 3: 35-40, 1996
- 45) Eguchi K: Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 40: 275-284, 2001

- 46) Yonehara S: Death receptor Fas and autoimmune disease: from the original generation to therapeutic application of agonistic anti-Fas monoclonal antibody. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 393-402, 2002
- 47) Mountz JD, Edwards CK 3<sup>rd</sup>: Murine models of autoimmunity: T-cell and B-cell defects. *Curr Opin Rheumatol* 4: 612-620, 1992
- 48) Steinberg AD: MRL-lpr/lpr disease: theories meet Fas. *Semin Immunol* 6: 55-69, 1994
- 49) Nagata S, Suda T: Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 16: 39-43, 1995
- 50) Nagata S: Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet* 43: 2-8, 1998
- 51) Curtin JF, Cotter TG: Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 15: 983-992, 2003
- 52) Yu JW, Shi Y: FLIP and the death effector domain family. *Oncogene*. 27: 6216-627, 2008
- 53) Sakahira H, Enari M, *et al.*: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391: 96-99, 1998
- 54) Sabol SL, Li R, *et al.*: Inhibition of apoptosis-associated DNA fragmentation activity in nonapoptotic cells: the role of DNA fragmentation factor-45 (DFF45/ICAD). *Biochem Biophys Res Commun* 253: 151-158, 1998
- 55) Cheng J, Zhou T, *et al.*: Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263: 1759-17562, 1994
- 56) Knipping E, Krammer PH, *et al.*: Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38: 1735-1737, 1995
- 57) Tokano Y, Miyake S, *et al.*: Soluble Fas molecule in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 16: 261-265, 1996
- 58) Ueki A, Isozaki Y, *et al.*: Is the anti-topoisomerase I autoantibody response associated with a distinct amino acid sequence in the HLA-DQbeta1 domain? *Arthritis Rheum* 44: 491-492, 2001
- 59) Ueki H, Kohda M, *et al.*: Antidesmoglein autoantibodies in silicosis patients with no bullous diseases. *Dermatology* 202: 16-21, 2001
- 60) Ueki A, Isozaki Y, *et al.*: Intramolecular epitope spreading among anti-caspase-8 autoantibodies in patients with silicosis, systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus, as well as in healthy individuals. *Clin Exp Immunol* 129: 556-561, 2002
- 61) Takata-Tomokuni A, Ueki A, *et al.*: Detection, epitope-mapping and function of anti-Fas autoantibody in patients with silicosis. *Immunology* 116: 21-29, 2005
- 62) 高田一友国晶子、植木絢子、他：珪肺症例で認められた抗 Fas 自己抗体の機能解析. *臨床環境医学* 13: 102-109, 2004
- 63) Tomokuni A, Aikoh T, *et al.*: Elevated soluble Fas/APO-1 (CD95) levels in silicosis patients without clinical symptoms of autoimmune diseases or malignant tumours. *Clin Exp Immunol* 110: 303-309, 1997
- 64) Tomokuni A, Otsuki T, *et al.*: Serum levels of soluble Fas ligand in patients with silicosis. *Clin Exp Immunol* 118: 441-444, 1999



- 65) Otsuki T, Miura Y, *et al.*: Alterations of Fas and Fas-related molecules in patients with silicosis. *Exp Biol Med* (Maywood) 231: 522-533, 2006
- 66) 大槻剛巳、高田晶子、他：珪肺症例 T 細胞における膜 Fas 発現. *臨床環境医学* 14: 119-127, 2005
- 67) Otsuki T, Tomokuni A, *et al.*: Over-expression of the decoy receptor 3 (DcR3) gene in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from silicosis patients. *Clin Exp Immunol* 119: 323-327, 2000
- 68) Otsuki T, Sakaguchi H, *et al.*: Detection of alternatively spliced variant messages of Fas gene and mutational screening of Fas and Fas ligand coding regions in peripheral blood mononuclear cells derived from silicosis patients. *Immunol Lett* 72: 137-143, 2000
- 69) Otsuki T, Tomokuni A, *et al.*: Reduced expression of the inhibitory genes for Fas-mediated apoptosis in silicosis patients. *J Occup Health* 42: 163-168, 2000
- 70) Guo Z-Q, Otsuki T, *et al.*: Reduced expression of survivin gene in PBMC from silicosis patients. *Kwasaki Med J* 27: 75-81, 2001
- 71) Otsuki T, Maeda M, *et al.*: Immunological effects of silica and asbestos. *Cell Mol Immunol* 4: 261-268, 2007
- 72) Murakami S, Nishimura Y, *et al.*: Cytokine alteration and speculated immunological pathophysiology in silicosis and asbestos-related diseases. *Environ Health Prev Med* 14: 216-222, 2009
- 73) Wu P, Hyodoh F, *et al.*: Induction of CD69 antigen expression in peripheral blood mononuclear cells on exposure to silica, but not by asbestos/chrysotile-A. *Immunol Lett* 98: 145-152, 2005
- 74) Hayashi H, Miura Y, *et al.*: Reductive alteration of the regulatory function of the CD4+CD25+ T cell fraction in silicosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 23: 1099-1109, 2010
- 75) Rubin LA, Nelson DL: The soluble interleukin-2 receptor: biology, function, and clinical application. *Ann Intern Med* 113: 619-627, 1990
- 76) Pizzolo G: The soluble interleukin-2 receptor as a new biological marker in diseases. *Allergol Immunopathol (Madr)* 19: 176-180, 1991
- 77) Zerler B: The soluble interleukin-2 receptor as a marker for human neoplasia and immune status. *Cancer Cells* 3: 471-479, 1991
- 78) Carlson IH: New markers in serum for lymphocyte activation for predicting allograft rejection. Neopterin and soluble interleukin-2 receptor. *Clin Lab Med* 12: 99-111, 1992
- 79) Nelson BH, Willerford DM: Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70: 1-81, 1998
- 80) Hayashi H, Maeda M, *et al.*: Soluble interleukin-2 receptor as an indicator of immunological disturbance found in silicosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22: 53-62, 2009
- 81) O'Connor RA, Anderton SM: Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 193: 1-11, 2008
- 82) Toh ML, Miossec P: The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol* 19: 284-288, 2007
- 83) Mudd PA, Teague BN, *et al.*: Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 64: 211-218, 2006
- 84) Yokoyama T, Amagai M: Immune dysregulation of pemphigus in humans and mice. *J Dermatol* 37: 205-213, 2010

- 85) Liu W, Putnam AL, *et al.*: CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203: 1701-1711, 2006
- 86) Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, *et al.*: Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 319: 41-52, 2007
- 87) Saresella M, Marventano I, *et al.*: CD4+CD25+FoxP3+PD1- regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. *FASEB J* 22: 3500-3508, 2008
- 88) Wang W, Lau R: PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells. *Int Immunol* 21: 1065-77, 2009
- 89) Wu P, Miura Y, *et al.*: Reduced function of CD4+25+ regulatory T cell fraction in silicosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19: 357-368, 2006
- 90) Maeda M, Nishimura Y, *et al.*: Dysregulation of the immune system caused by silica and asbestos. *J Immunotoxicol* 7: 268-278, 2010
- 91) Toyokuni S: Mechanisms of asbestos-induced carcinogenesis. *Nagoya J Med Sci* 71: 1-10, 2009
- 92) Greillier L, Astoul P: Mesothelioma and asbestos-related pleural diseases. *Respiration* 76: 1-15, 2008
- 93) Miura Y, Nishimura Y, *et al.*: Immunological alterations found in mesothelioma patients and their experimental evidences. *Environ Health Prev Med* 13: 55-59, 2008
- 94) Chattopadhyay S, Chakraborty NG, *et al.*: Regulatory T cells and tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 54: 1153-1161, 2005
- 95) Kretschmer K, Apostolou I, *et al.*: Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* 212: 163-169, 2006
- 96) Danese S, Rutella S: The Janus face of CD4+CD25+ regulatory T cells in cancer and autoimmunity. *Curr Med Chem* 14: 649-666,
- 97) Harrington LE, Mangan PR, *et al.*: Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 18: 349-356, 2006
- 98) Afzali B, Lombardi G, *et al.*: The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 148: 32-46, 2007
- 99) Stockinger B, Veldhoen M, *et al.*: Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 19: 353-361, 2007
- 100) Jin D, Zhang L, *et al.*: The inflammatory Th 17 subset in immunity against self and non-self antigens. *Autoimmunity* 41: 154-162, 2008
- 101) Louten J, Boniface K, *et al.*: Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 123: 1004-1011, 2009
- 102) Awasthi A, Kuchroo VK: Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol* 21: 489-498, 2009