

# ダイオキシンの免疫機能抑制作用とその標的細胞

野原 恵子

独立行政法人 国立環境研究所

初めにこの会を開催するにあたり、いろいろとお世話になった皆様方に御礼を申し上げたいと思います。私はダイオキシンによって誘導される免疫毒性の標的細胞ということで、お話をさせていただきます。

ダイオキシン類とは、ご存知のように polychlorinated dibenzodioxin と dibenzofuran の誘導体、そして先程、ドクター・ヴァン・ロバレンからお話がありましたように、PCB の中でもコプラナ PCB 類が、ダイオキシン様化合物といわれるわけです。特にこの中で毒性が高いのが、2,3,7,8-TCDD、いわゆるダイオキシンといわれる化合物です。ここでは単に TCDD とすることにします。

TCDD の作用のメカニズムとしては、エストロゲンとクロストークをするということで、内分泌攪乱物質の一つとされています。が、それよりさらによく研究されて、はっきりしているメカニズムとしては、arylhydrocarbon receptor、Ah リセプター (AhR) を活性化して直接、細胞に影響を与えることがわかっております。そのようにして直接、細胞の機能を変えることによって、また免疫系の場合でしたら、先程のドクター・ベゼドフスキーのお話がありましたように、immune-endocrine や immune-neuro-interaction によって、endocrine system を間接的に disrupt するような作用をも持つことになるのだと思います。

この AhR の働き方について、もう少し簡単にご説明いたします。ダイオキシン、TCDD は細胞内に入りますと、AhR と結合して、それによって AhR は活性化されて核に送られます。核に送られた AhR は、ARNT というもう一つの転写因子とヘテロダイマーを作り、遺伝子の中にあります、XRE という特別の配列に結合します。

これが結合しますと、この XRE という配列を、その遺伝子の転写調節領域に持つ遺伝子の発現が起こったり、ときにはその発現抑制が起こったりします。特にあとで出てきますのでご記憶いただきたいのですが、CYP1A1 という薬物代謝酵素の遺伝子は、ダイオキシンに非常にセンシティブに反応して誘導が起こる遺伝子です。

最近では研究が進み、AhR によって誘導される遺伝子とか、影響を受けるタンパクがこのようにいろいろ見つかってきております。ところが、問題はこれらが毒性とどのように関係するかがよくわかっていないことです。いろいろな毒性があるわけですが、どの細胞で、この中のどんなパスウェイが働くことによって、その毒性が発現するのか。その辺のリンケージがわかっておりません。

健康影響を分子レベルで明らかにしたい場合、最近では toxicogenomics の手法もよく使われていますが、そこで、パスウェイをきちんと書けるようにするためには、標的細胞を明らかにすることが重要になります。特に免疫反応の場合には、その誘導や維持にいろいろな細胞が関与していて、中にはお互いに抑制しあうものもあるので、例えば活性化に関与する遺伝子があがっていたとしても、それがどの細胞で上がっているかによって、免疫反応全体として促進になる場合と抑制になる場合が起こってきます。そこで変化が起こっている細胞が何であるかを明らかにすることが重要になります。

TCDD の免疫系の影響にはどういうものがあるかといいますと、今日は何回か出てきていますが、胸腺を萎縮させることが非常によく知られております。それから、重要な機能である抗体産生を抑制するとか、細胞障害性 T 細胞の活性を抑制することも知られております。

今日は私たちが研究をしている胸腺の萎縮と抗体産生の抑制を中心にお話をさせていただきます。まず胸腺萎縮ですが、簡単に胸腺がどこにあるか、どんな位置で、どういう役割をしているかを話しますと、体の中にバクテリアやトキシンのようなものが来たとき、免疫系は例えばマクロファージとか、B 細胞が抗体産生細胞に分化して、こういうものを排除するように働きます。ところが、実際にはこれらが働くためには、いろいろな細胞からのヘルプが必要です。特にこの中で、CD4T 細胞と CD8T 細胞は、免疫系全体を統御する司令塔のような役割で、非常に重要な細胞です。胸腺というのは、borne marrow から来たプリカーサー T 細胞 (precursor T-Cell) が胸腺に入って、CD4 とか CD8 に分化していくところで、非常に重要な器官です。この中の出来事をもう少し見てみたいと思います。

ここが胸腺ですが、胸腺に入ってきたプリカーサーT細胞は、特にこのCD4/CD8という表面抗原で、分化段階をこのように分けることができます。最も immature な CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>ダブルネガティブ細胞の段階から、非常に増殖を盛んに行い、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブ細胞となり、ここでもまたさらに増殖が起こります。ところが、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>ダブルポジティブ細胞の大部分のものはアポトーシスで死に、ちょうどいい機能を持ったものが、CD4<sup>+</sup>シングルポジティブ、または CD8<sup>+</sup>シングルポジティブ細胞として成熟して、末梢に出ていって、T細胞として働きます。

このCD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>ダブルポジティブ細胞は、胸腺の中で80%以上のメジャーのポピュレーションですので、胸腺萎縮は大体この細胞が減ることによって起こり、結果として胸腺萎縮になります。このような胸腺に対して、TCDDはどうやって胸腺萎縮を起こすかに関して、現在のところは議論があります。1つは、ダブルネガティブ細胞でアポトーシスを起こすことを、広島大学の菅野先生のグループが言っています。ほかにはダブルポジティブ細胞のところで、p27kip1をインデュースして、cell cycle arrestを起こすとか、ここでアポトーシスを起こすというグループもあります。このようなことから、ダブルポジティブ細胞が減って、主に胸腺萎縮が見られるといわれていますが、決着はついておりません。

それからもう1つ、TCDDの特徴として、CD4/8を比べたときに、CD8T細胞の比率を増加させることがわかっています。これに関しては、私たちが最近やった仕事ですが、マップキナーゼ (mitogen-activated protein kinase) をTCDDが一過的に活性化して、CD8T細胞を増やすのだという結果を報告していますが、詳細なメカニズムは今後の検討が必要です。

こういういくつかのメカニズムが提唱されていますが、さらに、ではTCDDは直接胸腺細胞、すなわちT細胞プリカーサーの方に働くのか。それから先程、ドクター・ヴァン・ロバレンが言われたように、stromal (基質)の方に作用をして、その結果として、胸腺細胞の分化を阻害するものではないか。そこについても、まだ議論が分かれております。

あとでお話ししますが、私達はあるトランスジェニック・マウスを作り、その結果、この胸腺細胞の方にTCDDが働いて、胸腺萎縮が起こるのであろうと考えております。胸腺に対するTCDDの影響は、今のようなことが現状です。

次に、抗体産生に対するTCDDの影響についてお話しします。これはまた簡単な絵ですが、先程の絵を少しモディファイして、抗体産生細胞ができるまでを示しています。B細胞が抗原刺激を受けて、このように分化していくわけです。そのときにはT細胞からのヘルプも必ず必要で、CD4T細胞がやはり抗原刺激を受けて、Th2細胞に分化して、ここからヘルプがあることが不可欠です。これまでの論文では、TCDDがこの抗体産生を抑えると言われていましたが、主に研究されていたのは、このshort-lived antibody forming cell (短寿命抗体産生細胞)からの、IgMを中心にした抗体産生に対する影響について見られておりました。

一方、B細胞が脾臓などの免疫臓器で非常に増殖して、germinal center (胚中心)を形成して、ここでセレクションが起こって、より affinity の強い抗体産生をするような細胞ができてきて、抗体産生が起こる。これはより長期の免疫機能に非常に重要な細胞で、long-lived antibody forming cell (長寿命抗体産生細胞)といいますが、こちらに対する影響はあまり調べられておりませんでしたので、最近、私たちはこちらに対してのダイオキシンの影響を検討しました。なお、こちらの、今まで調べられてきたshort-lived AFCに対するTCDDの影響は、主に最近提唱されていることでは、この最後の抗体を産生する段階で、TCDDがそれに働く。例えばIgMのエンハンサー領域にTCDDがAhRを介して作用し、ここの産生を抑えると言われていましたが、私たちはこちらの長寿命抗体産生細胞の分化にどのような影響があるのかを調べてみました。

これは私たちの行った実験のプロトコルで、卵白アルブミンというよく使われる抗原でマウスを免疫して、同時にTCDDを投与するという系で、それ以降の免疫反応を経時的に追ってみました。これはその免疫した卵白アルブミンに対するshort-lived AFCから出るIgMの産生、それからそのあとに起こってくるIgG1の産生に関して調べたものです。そうすると、私たちの系でもTCDDは、抗体産生をこのように抑制していることを確認しました。

次に、ではこの抗体を産生する細胞ができる脾臓では、細胞数の変化がどのようになっているかを見てみました。これはトータルの細胞数ですが、抗体産生が起こると平行して、脾臓でも細胞数の増加が起

こります。脾臓細胞の大部分は T 細胞と B 細胞ですが、このように増加が起こります。一方、ダイオキシンを曝露しておきますと、これは抑制され、細胞自体が増えなくなっていることがわかりました。

これは long-lived AFC ができるとき、脾臓の中に germinal center (胚中心) という、B 細胞がたくさん増えているところできて、ここでちょうど具合がいい B 細胞がセレクションされるところです。ダイオキシン曝露の群では、この germinal center が十分にできないことが明らかになりました。すなわち、抗体産生に対してダイオキシンは一番最後で効くのではなくて、途中で細胞の分化を阻害していることがわかりました。

では、その B 細胞が増えないために、もしかしたら T 細胞の方からのヘルプがないのではないかということで、サイトカインを指標にしてそれらを調べたのが、この結果です。これは脾臓から脾臓細胞を調製して、同じ数の細胞を、コントロールと TCDD 曝露群についてそれぞれ培養して、もう一回、卵白アルブミンで再刺激をして十分にサイトカインを出させ、そのサイトカインを ELISA 法で調べております。

この IL-2 は T 細胞から出て、T 細胞の活性化自身に働きますが、コントロールでは IL-2 は二相性の動きが見えます。免疫 1 日後に 1 回かなり出ていて、それから下がる。それからまた上がる。これは細胞が分化してきて、違うタイプの T セルから出てきていると考えられます。ここにダイオキシン曝露をしますと、この最初の上がりやが早く落ちてしまって、十分に上がり続けずに落ちてしまうことがわかりました。

IL-4 は、やはり T 細胞自身と B 細胞の分化にも関係するサイトカインですが、これに関しては TCDD 曝露で、かなり抑制が見えることがわかりました。

IL-5 と IL-6 は、T 細胞が出して B 細胞の分化・増殖に関係するサイトカインですが、これも非常に TCDD 曝露群では、抑制されていることがわかりました。

私たちが今回、実験に使った TCDD は、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と少し高めでしたので、用量を振って、どのぐらいからこういう効果が見られるのかを、IL-5 の産生を指標にして調べてみました。そうしますと、最低用量の 0.2  $\mu\text{g}$  から低下傾向が見え、有意差は 1 マイクロ以上ですが、5 匹の動物でこのようにきれいに下がります。動物を増やしたら、たぶんこの辺から、もしくはもう少し低いところからも、こういう抑制が検出できるのではないかと考えております。

そのような検討結果から私たちが考えていることは、TCDD が抗体産生を抑制するのですが、それはまず、T 細胞が活性化して増えて分化する、ここを抑えるのではないかということ仮定しております。その結果として、T 細胞からの B 細胞へのヘルプが十分に行かなくなる。その結果、こういったところの分化も行かなくなって、抗体産生が十分にできなくなるのではないかと。そういうことで、これまでの結果から、免疫抑制の主なターゲットが T 細胞ではないかという仮説を立てています。

このことをさらに調べるために、次に恒常的活性化型 AhR (constitutive active AhR, CA-AhR) というものを、T 細胞特異的に発現させたトランスジェニック・マウスを作りました。

もう 1 つは、細胞レベルで、遺伝子レベルの変化などを研究したいと思い、この CA-AhR を transfect した T 細胞、セルラインを作りました。T 細胞はプライマリーでは AhR がありますが、これまで調べられた細胞株になったものでは、すべて AhR がなくなっているのです。それで、ここで transfection して、もう 1 回再構成をして、いろいろな遺伝子の動きを見るような系を作りました。

CA-AhR とはどのようなものかということ、これがワイルドタイプの AhR です。ここには ARNT との dimerization domain とか、DNA にくっつく領域とか、それから ligand-binding、TCDD がくっつく領域とか、transactivation、遺伝子発現を活性化する領域などがあります。この ligand-binding domain をなるべく小さく切り取った mutant を作りますと、これは ligand にくっつかなくてもそのまま活性化されて常時、核に送られ、しかも ARNT と結合して、遺伝子発現を誘導することができます。これは筑波大学の藤井先生、三村先生からご供与いただきました。

この CA-AhR を使い、まずこれを Jurkat T 細胞株に入れたものを作って、どのようなフェノタイプが現れるかを検討しました。ここでは CA-AhR に、検出を簡単にするために GFP をつないでいます。それから、GFP だけを Jurkat T 細胞に transfection したものと比較して、細胞の増殖がどのように変化するかを調べてみました。

これは transfection をして2日後に、GFP ポジティブの transfection ができている細胞をファクスバンデージという機械で選別し、それを同じ数だけまいて培養しています。すると、2日、4日で、GFP だけを transfection したものでは、通常の Jurkat T 細胞と同じように増殖していくのですが、CA-AhR が入っていると、これが増殖しません。すなわち、T 細胞では AhR が活性化すると、細胞増殖が抑制されることが示されました。

では、次にどうしてこれが抑制するのかということで、cell cycle arrest なのか、アポトーシスなのかということ調べてみました。

まず、これはセルサイクルを調べたものです。これが元の Jurkat のセルサイクル・パターンですが、GFP だけを入れた場合には、変化は起こりません。一方、CA-AhR-GFP を transfection したものでは、G1 期が増えて、S 期が減ってきます。ということは、CA-AhR では G1 arrest を起こすらしいということがわかりました。

次にアポトーシスですが、これはアポトーシスを起こしている細胞をアネキシン V で調べたものです。transfection 2 日後、4 日後の結果ですが、GFP の方はアポトーティックな細胞は 10% 程度で増えませんが、CA-AhR を transfection した方では 24%、26% と、こちらに比べてアポトーティックな細胞が増加しております。ということから、AhR の活性化は Jurkat T 細胞において、cell cycle arrest とアポトーシスの両方を誘導するというのが、現在、私たちの考えている結果です。

次に、トランスジェニック・マウスのお話をさせていただきます。これは先程の CA-AhR を、T 細胞特異的に働く VA2 というプロモーターで、T 細胞にだけ発現させるような系を使いました。ここでやはり transfection できた細胞、遺伝子が入った細胞を簡単に検出するために、GFP も一緒にインジェクションしております。それで、これも同じプロモーターでインジェクションしておりますので、こういう場合には CA-AhR と GFP は、通常は同じ細胞に発現するようなマウスができます。それで、これを通常の方法で受精卵にインジェクションして、トランスジェニック・マウスを作りました。現在、これを C57BL/6 にバッククロスしていますが、今日は第二世代 F2 のヘテロについての結果をお示しします。

これができました AhR トランスジェニック・マウスの 1 ラインについて、A ラインと言っていますが、その第二世代 AF2 のトランスジェニック・ヘテロのマウスのいろいろな臓器で、遺伝子発現を調べた結果です。インジェクションした CA-AhR がどこに出ているかを見ますと、確かに胸腺と脾臓にこのように出ていることを確認しました。ほかはほとんど出ていませんが、lung にも一部出るようです。このようなマウスになりました。

次に、確かにこの CA-AhR が働いていることを確かめるために、CYP1A1 の誘導も見てみました。ワイルドタイプでは胸腺と脾臓で出ていないのに対して、トランスジェニックではこれがきちんと発現が認められ、予定しておりましたように、T 細胞で AhR が活性化したようなトランスジェニック・マウスを作ることができました。

このようなマウスでフェノタイプを調べてみました。そうしますと、AF2 のワイルドタイプとトランスジェニックで、体重や脾臓の重量には変化がありませんが、胸腺がトランスジェニック・マウスでは小さくなっていることが確認されました。それから胸腺の細胞数も減少しております。

次に胸腺の細胞のポピュレーションを DN (ダブルネガティブ)、DP (ダブルポジティブ)、CD4+、CD8+ について調べてみますと、やはりダイオキシン曝露で見られますように、CD8+ の増加がこのマウスでも認められました。ダブルポジティブが減るといっても TCDD 曝露と同じフェノタイプです。それから、ダブルネガティブが増えるのは、ダブルポジティブが減った結果ですが、ダイオキシン曝露したのと同じようなフェノタイプが胸腺に見られるようなマウスを作ることができました。

今のマウスの結果から私たちが考えているのは、胸腺では、stromal 細胞の AhR よりも、胸腺の方の AhR が活性化することによって、胸腺の変化が起こることを結論しました。

今までの結果をまとめると、トランスジェニック・マウスの結果から、TCDD は胸腺細胞の方に影響を与えて、これの増殖を抑制する。もう 1 つは Jurkat セルラインの仕事から、TCDD は T 細胞の活性化・増殖を抑えるのではないかと示唆されているわけです。

あとはまだやっていませんので、今日はお話しできませんが、トランスジェニック・マウスで免疫をすることによって、そのT細胞の方の AhR が活性化していたら、その以下の免疫抑制が本当に見られるかどうか。ここのところは今後、確認したいと思います。

このようにしてターゲットを絞ったうえで、toxicogenomics の方法などを使って、この細胞の中ではターゲット・遺伝は何か、ターゲットの分子、タンパクは何か。こういうことを今後明らかにしていきたいと思います。

これは共同研究者です。特にトランスジェニック・マウスの作成や、恒常的活性化型 AhR のご供与は、筑波大のグループにご協力をいただきました。

## 質疑応答

質問：先生は Ah レセプターに対して非常にきれいな研究をなさって、感激しました。

TCDD 濃度が大体 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  からと。実際には Ah レセプターは、いろいろなものが結合すると思いますが、野生生物でも人でも結構ですから、実際に環境中に存在するいろいろな汚染物質で、Ah レセプターへの影響、Ah レセプターを介した影響がどの程度あるとお考えでしょうか。

野原：とても難しいご質問だと思いますが、例えば人の場合も、人の血球などで CYP1A1 の誘導を調べると、検出は大変難しいです。また環境中にあるものだけではなくて、タバコを吸うとかいろいろなファクターも入ってきてしまいます。ですから、環境汚染物質としての AhR バインディングのリガンドからの影響がどのくらいと分けるのは、今のところ大変難しいのではないかと考えております。例えば事故の場合や、先程ドクター・ヴァン・ロバレンが示されたように、非常に汚染が進んでいるところなど特別な状況でしたら、CYP の誘導が見えるということもあると思います。が、実際に環境中に今ある程度のものが、どれぐらい影響に寄与しているかを申し上げるのは難しいと思います。

ただ、現在の私たちの体の中にあるダイオキシン量は数  $\text{ng}/\text{kg}$  ぐらいです。先程、示した 0.2  $\mu\text{g}$  は、200  $\text{ng}$  ですから、それは私たちの体にあるものの何十倍ぐらいの量です。たぶん、それよりももっと低いところから影響が出ると思いますので、私たちが今、蓄積しているものの何倍か、10 倍かぐらいのものが入れれば、今のような影響が出ることになると思います。あまりはっきりとお答えしなくて申し訳ありません。

ヴァン・ロバレン：では、私からも質問させてください。先生は非常に明快に言明なさいました。もちろん、その基礎になった先生の結果は非常に明確であり、胸腺細胞や T 細胞がダイオキシンと直接的に相互作用するという事は、先生ご自身の結果からして、真実であることは疑いないと思います。

しかし、先生の結果は基質細胞について何も述べていません。胸腺細胞への直接的な作用が発見されたからといって、それ以外の同様に真実かもしれない事柄が否定されるわけではありません。基質細胞上の Ah 受容体の密度がとても高いということと、この基質細胞の最終分化は形態学的にきわめて容易に判別できるということ

からして、TCDD と PCB 類が基質細胞を通じて作用を及ぼしているという考えも正しいと私は思います。

したがって、ある道筋とそれとは別の道筋のどちらかをとらなければならない理由があるとは私は思いません。それらのことは同時に進行するのではないかと思います。また胸腺の退縮が、実際に先生が述べられた作用の結果として起きることもあるでしょう。しかし、基質細胞に依存している部分もあるのかもしれませんが。正直申し上げて、環が完全に閉じたとはまだ思えませんし、現時点でそのどちらかを棄却できるのかも、私にはよく分かりません。先生はどうお考えですか？

野原：おっしゃることの一部は同意できます。確かに、これら AhR が基質細胞に影響を与えていて、胸腺細胞の増殖を減少させている可能性も除外できません。

しかし、そのことに関する論文がこれまでに 2 本あることを申し上げておきます。ひとつは Esser 博士による FTOC の系を用いた論文で、胸腺萎縮の原因においては TCDD 毒性の標的は基質細胞のみであり、基質細胞のみがきわめて重要な標的であることが示されました。しかしもうひとつの、米国の Silverstone 博士の研究では、AhR ノックアウトマウスの造血細胞を用いたキメラマウスモデルが用いられました。彼らは、AhR をノックアウトした系および野生型リンパ球の系によるキメラマウスを作成し、胸腺萎縮の原因になっているのは造血系細胞のみであることを示しました。

両者の結果からして、私は、標的細胞もしくは主要標的細胞が存在するのは間違いないと思います。そこで彼らの結果に基づき、どちらが真の主要標的細胞なのかを我々は明らかにしようとしたのです。

ヴァン・ロバレン：彼らの結果はそれらが標的であることは示していますが、まだそのことが完全に確定されているわけではないと私は思います。主要標的細胞について先生がおやりになったのは単に、研究してそのことを確定し、最初に引き起こされることを観察しただけです。それが問題解決の手がかりにはなるでしょう。キメラ動物が作成されたことで、重要な情報が得られています。*in vitro* で正常な前胸腺細胞と一緒に培養した基質細胞を PCB 類や TCDD 類に曝露させると、その作用を維持する能力を失うことを示した、Greenly の研究についても当然、認識しておく必要があると、申し上げておきます。

野原：今回私たちはこの種のトランスジェニックマウスを作成しました。私たちの実験系では、胸腺細胞は標的のひとつであり、その中で、胸腺萎縮を引き起こす原因となる遺伝子を見つけようとしたわけですが、基質細胞に活性型 AhR を持つトランスジェニックマウスといったような別の実験系を用いれば、胸腺萎縮の原因となるその他の遺伝子を同定できるかもしれません。

ヴァン・ロバレン：それがまさしく私の言いたかったことです。全体像を描くためには両方の可能性に対処する必要があります。

ほかにご質問はありませんか。なければ、大変有難うございました。