

学位論文題名

Effects of low-dose irradiation on enhancement of immunity by dendritic cells

(低線量の放射線照射が、樹状細胞の免疫効果に与える影響に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

従来、放射線は線量に比例して有害作用が増加すると考えられていた (Linear no threshold model, LNT model)。近年、0.1 Gy 以下のごく低線量の放射線照射は生体に有益に働くことが、疫学的な調査や *in vivo*、*in vitro* の実験系で多数報告されており、Radiation Hormesis 効果と呼ばれる。これは、ごく低線量の放射線照射により、DNA や蛋白合成、DNA 修復などが促進されることによると考えられている。抗腫瘍効果や免疫系に対する効果も報告されている。

樹状細胞 (Dendritic cell, DC) は骨髄の造血幹細胞より分化し、皮膚などの末梢臓器に広く分布している。抗原を貪食した後に活性化され、リンパ臓器へ移動し T 細胞への抗原提示を行う細胞であり、抗原提示の主要な役割を果たすと言われている。これまで DC に対する低線量の放射線効果の報告は認められない。今回我々は、マウスの脾臓由来の DC を用いて、低線量放射線が樹状細胞の抗原提示能に与える影響を検討した。

【対象と方法】

C57BL/6 マウス (B6 マウス, MHC: H-2^b) より脾臓細胞を取り出し、様々な低線量の放射線 (0.02, 0.05, 0.1, 0.5 1.0 Gy, 線量率 1Gy/min) を照射し、RPMI で 48 時間培養した。また、BALB/c マウス (MHC: H-2^d) の脾臓細胞より抗 Thy1.2 抗体をコートした magnetic beads を用いて T 細胞を enrich した。B6 マウスの脾臓細胞を 25Gy の放射線照射にて非働化し、これを stimulator とし、BALB/c マウスから enrich した T 細胞を responder とした allogeneic mixed leukocyte reaction (allogeneic MLR) を行い、T 細胞増殖刺激の評価を行った (Experiment 1a)。次いで、B6 マウスの脾臓細胞に抗 CD11c, CD3, CD19 抗体をコートした magnetic beads を反応させ、CD11c⁺, CD3⁻, CD19⁻ 細胞を enrich した。この DC に同様の低線量放射線照射を施行し、MLR の stimulator として用い、DC の T 細胞増殖刺激能の検討をおこなった (Experiment 1b)。

また、この DC を 48 時間培養し、DC の活性化マーカーである副刺激分子や接着分子 (CD80, CD86, I-A^b, CD1d, ICAM-1, LFA-1) の発現を検討した (Experiment 2)。

次いで、低線量放射線照射後、48 時間 DC を培養した上清中のサイトカイン (IL-12, IL-10) を ELISA 法にて定量を行った (Experiment 3a)。また、同じ培養 DC から RNA を抽出後、Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて IL-12, IL-2, IFN- γ , IL-10 などのサイトカイン産生および chemokine receptor (CCR, CCR6, CCR7) の検討を行った (Experiment 3b)。

【結果】

Experiment 1 : Allogeneic MLR

1a: B6 マウスの全脾臓細胞を stimulator として用いた MLR では 0.02 Gy - 0.1 Gy 照射群において T 細胞の増殖が促進される傾向を認めた。

1b: DC を enrich し、これを stimulator として用いた MLR において、0.05 Gy をピークに、低線量放射線照射群では非照射群、0.5 Gy 以上の照射群と比べて、有意に T 細胞の増殖亢進が認められた ($P < 0.01$)。一方、DC に対する低線量放射線の増殖効果は認められなかった。この結果から、低線量の放射線照射は DC の T 細胞に対する抗原提示能を亢進させると考えられた。

Experiment 2 : Surface marker analysis

低線量放射線照射群と非照射群、0.5 Gy 以上の照射群の間に DC 活性化マーカー分子 (CD80, CD86 など) の発現の差は認められなかった。

Experiment 3 : Cytokine assay

3a: ELISA における検討では、低線量放射線照射群においては、非照射群や 1.0 Gy 以上の照射群と比較して有意に IL-12 の産生亢進が認められた ($P < 0.01$)。一方、IL-10 の有意な産生亢進は認められず、Th1 指向性が示唆された。

3b: RT-PCR では、IL-12 に加え IFN- γ 、IL-2 も同群で mRNA の発現亢進を認めた。ELISA と同様に、IL-10 の産生に差は認められなかった。CCR6, CCR7 においても発現の差は認められなかった。

【考察と結論】

これまで、免疫系に対する様々な Radiation Hormesis 効果が示されてきたが、DC に対する報告は認められなかった。我々の実験において、0.05 Gy の低線量放射線を照射したマウス脾臓由来の DC による、T 細胞の増殖促進効果が示された。これは DC および免疫系に対する Radiation Hormesis 効果と考えられる。次いで、我々は放射線照射による DC 抗原提示能の亢進の機序を検討した。フローサイトメトリーによる、DC の活性化マーカーは低線量照射群と非照射群および 1 Gy 以上の照射群との間に差を認めなかったが、ELISA 法および RT-PCR において IL-12, IFN- γ , IL-2 などのサイトカイン産生は低線量照射群で有意な増加が認められた。Th1 サイトカインである IL-10 の増加は認められず、Th2 指向性が示唆された。DC に対する低線量放射線照射による T 細胞活性化には、DC の細胞数や表面抗原の変化ではなく、これらの Th2 サイトカインの産生増加が関与していると考えられた。

結語：DC に対する低線量放射線照射は、Th2 サイトカインの増加を介して T 細胞増殖刺激を促進すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 白 土 博 樹

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

Effects of low-dose irradiation on enhancement of immunity by dendritic cells

(低線量の放射線照射が、樹状細胞の免疫効果に与える影響に関する研究)

従来、放射線は線量に比例して発がん作用などの有害作用を増加させ、低線量においても同様であると考えられていたが (linear no threshold model)、極低線量の放射線照射は生体に有益に働くと考えられており、radiation hormesis 効果と呼ばれる。その機序としては、極低線量の放射線照射に対する適応反応としての DNA 損傷予防や、DNA 修復促進などによると考えられている。抗腫瘍効果や免疫系に対する効果に関する報告も多く認められ、低線量放射線による宿主免疫能増強で悪性腫瘍の増殖や転移が減少するといわれている。従来の報告の多くは T 細胞への影響を検討したものであり、これまで樹状細胞 (dendritic cell, DC) に対する低線量放射線効果の報告は認められない。申請者は、本研究において低線量放射線が樹状細胞の抗原提示能に与える影響、およびその機序についての検討を行った。

C57BL/6 マウスの脾臓細胞より MACS にて CD11c 陽性細胞 (DC) を選別し、低線量放射線 (0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 Gy, 線量率 1 Gy/min) を照射した細胞を stimulator とし、BALB/c マウスの脾臓由来の T 細胞を responder とした allogeneic mixed leukocyte reaction (MLR) を行い、T 細胞増殖刺激の評価を行ったところ、0.05 Gy をピークに低線量照射群において T 細胞増殖刺激の亢進を認めた。マクロファージや B 細胞などの抗原提示細胞に対して低線量照射を施行したものでは同様の効果は認められなかった。また、低線量照射による DC の直接増殖刺激は認められず、DC の機能亢進に伴うものと考えられた。

DC の活性化マーカーである副刺激分子や接着分子 (CD80、CD86、I-A^b、CD1d、CD40、ICAM-1、LFA-1) の発現を検討したところ、低線量照射群と非照射群および 0.5 Gy 以上の照射群に差は認められず、表面マーカーへの低線量照射の影響は否定的であった。

次いで、ELISA 法にて DC 培養上清中のサイトカイン測定を行ったところ、低線量照射群において IL-12 産生の増加が認められた。また、RT-PCR 法にてサイトカインの mRNA 測定を行ったところ、低線量照射群において IL-12、IFN- γ などの Th1 指向性サイトカイン産生の有意な増加が認められた。IL-10 など Th2 サイトカイン産生は差が認められなかった。また、RT-PCR 法において CCR6、CCR7 など遊走に関わるケモカインレセプターの発現の検討も行ったが、低線量照射群と非照射群、0.5 Gy 以上の照射群との間に差は認められなかった。

DC に対する低線量照射は DC の T 細胞増殖刺激を亢進させるが、その機序としては、DC 表面マーカー分子の変化ではなく、IL-12 や IFN- γ など Th1 サイトカイン産生によるものと考えられた。

本研究で、申請者は radiation hormesis における DC の関わりを初めて明らかにし、低線量放射線照射 DC の抗腫瘍効果誘導における可能性について示唆した。

公開発表にあたって、副査白土博樹教授から *in vivo* 応用のための実験法、実験テーマの選択理由、cell therapy に応用する際の問題点についての質問があった。申請者は担がんマウスに対して *in vivo* で放射線照射を施行し、マウスの DC を評価する方法、または cell therapy として低線量照射を施行した DC を用いる方法を示した。免疫学的に抗腫瘍効果を高めるための DC の基礎データが必要であったこと、低線量の放射線照射により DNA 傷害自体は高まる可能性はあることや、cell therapy に用いるにはデータが不足しており、動物種やストレインの差異を考慮する必要があるとの回答を示した。

次いで、主査小野江和則教授から DC の IL-12 産生を促進する工夫の有無、実験に使用した DC の成熟段階、MLR における DC の細胞数の影響についての質問があった。申請者は IL-12 産生を促進させるために特別な工夫はせず、低線量照射の影響だけを検討したこと、MHC class II 分子の発現、CD80 などの表面マーカーの検討からある程度成熟した DC であると考えられること、非働化前の DC 細胞数に変化がなく、その後の DC に 25 Gy の放射線照射で非働化した後に T 細胞との共培養を行っているため、DC の細胞数の影響は考えられないとの回答をした。

最後に、副査今村雅寛教授より、他の抗原提示細胞では同様の効果は認められず、DC に特異的な現象である理由、DC の subtype、cell therapy に用いる際の培養 DC の回収率、測定した IL-12 の subunit についての質問があった。申請者は DC 特異的である理由是不明であるが、高用量の放射線照射も IL-12 産生に影響するとの報告があり、放射線は DC のサイトカイン産生に影響する可能性が高いと考えられるが、他の抗原提示細胞との違いについては不明であること、表面マーカー、機能から DC subtype は骨髓球系 DC として矛盾しないこと、GM-CSF が cell therapy の際の DC の培養には必要と考えられるが、今回はサイトカインを入れずに培養したものを用いているため回収率は不明であること、ELISA においては IL-12 p75 を、RT-PCR 法では p40 subunit に対する primer を用いて測定しているとの回答をした。

この論文は DC の免疫能に対する低線量放射線照射の影響を明らかにした初めての報告であり、DC による免疫療法などの抗腫瘍効果増強への応用が期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。