様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年　　5 月　24 日現在

研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19591466
研究課題名（和文）放射線の CD80 発現増強とアポトーシス制御因子へのプロテオーム解析

研究課題名（英文）Analysis of the CD80 up-regulation by low-dose ionizing radiation.

研究代表者 ： 石川　文雄（ISHIKAWA FUMIO）
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：10130345

研究成果の概要（和文）：
これまでに我々は、B リンフォーマ細胞への放射線照射が、副刺激分子 CD80 発現を促し T 細胞への抗原提供能が増強することを明らかにした。しかし、放射線の CD80 発現誘導機序については不明な点が多い。本研究では、B リンフォーマの他に脾臓中の B 細胞や樹状細胞を用い放射線作用について検討した。その結果、放射線照射によりすべての細胞において選択的な CD80 増強がみられた。この増強作用は核内転写因子 NF-kB 活性化を伴うもので活性化経路は細胞により異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：
We have previously demonstrated irradiation-induced up-regulation of CD80 expression in B lymphoma cells such as A20-HL cells. However, the mechanism of this up-regulation is unknown. In this present study, we investigated whether low-dose exposure of irradiation induces CD80 expression in mouse splenic B cells and bone marrow cells derived dendritic cells (BMDC). Selective CD80 up-regulation not only in splenic B cells but also in BMDCs. The up-regulation of CD80 expression was accompanied with nuclear factor-kB activation (NF-kB). The activation-pathway in splenic B cells was dependent on the generation of reactive oxygen species, while that in A20-HL cells and BMDCs were not.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学
キーワード：放射線、CD80、プロテオーム解析

１．研究開始の背景当初
放射線と免疫との関係については、Gerhartz らがウサギへの放射線照射がジフテリア感染症への抵抗性を増大させることを発見し、これを契機に放射線の免疫能に対する影響が検討されてきた。しかし、その作用を証明するものは少なく不明な点が多い。
２．研究の目的
放射線照射が細胞内シグナル伝達系を活性化し、アポトーシス以外にも様々な生理活性を誘導することが知られている。そこで今回私達は、放射線と蛋白合成阻害剤の CD80 発現増強と放射線抵抗性を示す放射線適応応答の成立機序を明らかし、放射線の細胞分子レベルでの作用メカニズムを明らかにする。
３．研究の方法
本研究は３年間で計画を達成する予定である。初年度は放射線並びに蛋白合成阻害剤 CHX 処理にて CD80 発現増強がみられるマウス B リンフォーマ A20-HL 細胞を用い、CD80 発現経路と放射線抵抗性の獲得機序に関与する分子を特定する。2 年目は対象分子の同定とその発現を RNAi 法で抑えその働きを解析する。3 年目は、放射線抵抗性を担う分子に特異的な阻害剤を検索しその有用性を検討する。研究が当初の計画に反し、B リンフォーマ A20-HL 細胞でのプロテオーム解析で有為な差がみられないことも予想し、DNA マイクロアレイ解析も実施する。
(平成 19 年度)
❶ CD80 発現と放射線抵抗性獲得機構の解析
A) 放射線と CHX 作用に対するプロテオーム解析
1） 細胞への照射には X 線照射装置(MBR-1520R-3,日立製作所) を用いる。
2) 各種シグナル分子特異的阻害剤を用い CD80 誘導に対する抑制の有無から、シグナル伝達系に対する放射線/CHX 作用点のおおまかな絞り込みを行う。
3) 次に細胞からの抽出試料について、２次元電気泳動で個々のタンパク質を分離し
マップを作製する。放射線/CHX 処理したサンプル間で各スポットを比較する。
4) 同じように Western blot 法で抗リン酸化抗体による免疫染色を行い、放射線/CHX 処理したサンプルで有意な増加がみられるスポットを検出する。
5) 有意な変化を示したスポットは LC/MS 質量分析計(LCQ DECA)で測定し、分子の特定や修飾レベルを分析する。
6) 同時に最近整備されてきた２次元電気泳動マップから、直接に蛋白同定が行えるインターネットデータベースサービス(Swiss Institute of Bioinformatics: ExPASy server (http://expasy.nhri.org.tw/ch2d/)を利用し蛋白性状解析を行う。
7) 得られた結果から、放射線と CHX の CD80 発現経路と放射線抵抗性の獲得機序を明らかにする。
(平成 20 年度以降)
❷放射線抵抗性に関与する抗アポトーシス分子の同定とその性状解析
1)プロテオーム解析で 特定された標的分子に対する特異抗体を作製し、免疫沈降法で標的分子を抽出し LC/MS 質量分析計にて性状や会合する分子の有無を解析する。
2) 次に、RNAi 法にて特定された蛋白発現を抑えた細胞を作製し、放射線に対する抵抗性を発現するメカニズムを検討する。尚、以下の全ての遺伝子実験は候補が特定された段階で、東邦大学遺伝子組換え実験安全委員会に申請し許可を得て実験に着手する。
❸放射線抵抗性に関与する分子の発現を制御する核内転写因子の解析を行なう。転写因子の同定と活性化機序の解析
　特定された核内転写因子に対する特異抗体にて免疫沈降を行い、LC/MS 解析にて転写因子の同定と会合する分子の有無から転写因子の活性化機序を分析する。
❹転写因子の同定と活性化機序の解析
　特定された核内転写因子に対する特異抗体にて免疫沈降を行い、LC/MS 解析にて転写因子の同定と会合する分子の有無から転写因子の活性化機序を分析する。
❺ 放射線/蛋白合成阻害剤 CHX 作用に対するマイクロアレイによる解析
1) プロテオーム解析と同様に処理した細胞から mRNA を精製する。
2) 測定には、マウス由来免疫関連遺伝子の cDNA 断片 DNA マイクロアレイ Affymetrix 社(U74A-DNA)または kaken geneqs 社の DNA チップを用いる。
3) 精製したサンプルを cy5 と cy3 で標識して DNA チップに用い、ハイブリダイゼーション、洗浄後、DNA チップはアレイスキャナー(FUJI FILM ,FLA-8000)で測定を行う。遺伝子発現の有意差は、シグナル比が対照に比較して 2 または 0.5 以下とする。
❻定量 RT-PCR 解析

1）検索対象は先の 2 次元電気泳動マップのデータベース解析結果から、その発現増強が推測されるものについて行う。
2) 放射線/CHX 処理後 mRNA 発現が誘導される 1 時間から 6 時間の処理細胞から常法に従い total RNA を抽出する。
3) 目的遺伝子のプライマーを合成し、RT-PCR にて得られた結果を比較対照サンプルとの比を求め相対値として算出する。
4）先のマイクロアレイ解析結果を含め放射線抵抗性に関与する分子を特定する。

尚、実験計画❺と❻についてはプロテオーム解析実験の補足実験計画である。

❼放射線抵抗性を阻害する薬剤検索とその有用性の評価検討
1）阻害剤は、特定された抗アポトーシス分子に特異的なものとその発現を担う転写子に特異的なものを論文検索する。
2）選定された阻害剤を放射線処理アッセ系に添加し、その有効性を検定する。
3) NF-κB 転写因子への影響を調べるために、ルシフェラーゼ活性で評価する NFκB (Reporter stable cell line(Panomics 社)を用い NF-κB 経路に影響する検討する。
4) 以上の結果から、NF-κB 転写因子への影響がみられず放射線抵抗性に特異的な阻害剤を選定する。
5）動物実験にて阻害剤の有用性を評価する。

❽シグナル伝達分子の細胞内動態の解析
1）作製した特異抗体を蛍光標識し、放射線/CHX が誘導する制御分子や会合分子の細胞内での動きを共焦点顕微鏡で解析する。

４．研究成果

A)放射線による CD80 発現増強作用の解析

我々はこれまでにマウス B リンフォーマ細胞への放射線処理が､NF-κB 活性化を介し CD80 分子などの発現を増強することを報告してきた。そこで本研究では放射線の CD80 発現増強機序について検討した。初めに、マウス B リンフォーマ A20-HL 細胞への 100Gy 放射線処理で特異的な CD80 発現増強と OVA323-339 特異的 T 細胞 42-6A への抗原提示活性の増強が観察された(Fig.1)。さらに、放射線処理と未処理の A20-HL 細胞の混合培養にて未処理細胞での CD80 発現が増強されていた(Fig.2)。

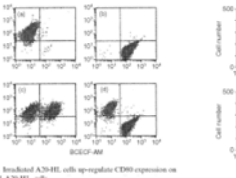


Figure 2. Irradiated A20-HL cells up-regulate CD80 expression on untreated A20-HL cells.

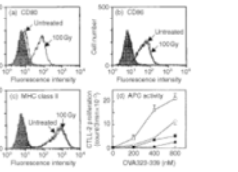


Figure 1. Irradiation-induced up-regulation of CD80 expression on A20-HL cells.

放射線処理細胞から何らかの CD80 発現誘導に繋がるサイトカイン産生が示唆されたことからアレイ解析を行なったところ TNF-α と CD40L 発現が増加していた。そこでその蛋白発現と mRNA 産生を Northern blot にて解析したところその産生増加が認められた(Fig.3)。

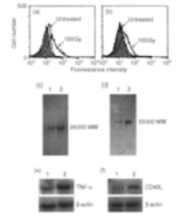


Figure 3. Irradiation induces TNF-α and CD40L expression.

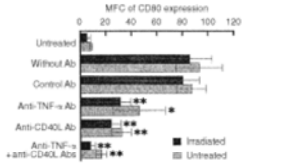
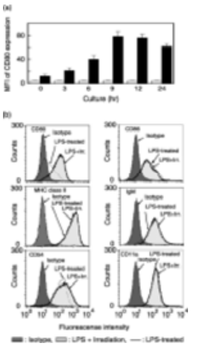
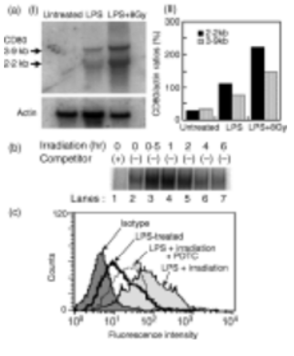


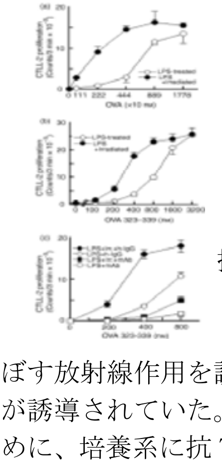
Figure 4. Marked decrease in the irradiation-induced up-regulation of CD80 expression by anti-TNF-α and anti-CD40L mAbs.

そこで共培養での CD80 発現誘導に及ぼす影響を調べるためにそれぞれに特異的な中和抗体添加の影響を調べた。その結果、抗 TNFα 抗体+抗 CD40L 抗体で放射線による CD80 発現増強が抑制された(Fig.4)。

一方、腫瘍細胞のみならず正常細胞への放射線作用を検討するためにマウス脾臓 B 細胞と樹状細胞への影響を検討した。初めに、マウス脾臓細胞から採取した B 細胞を LPS で刺激し 8Gy の放射線を照射したところ、照射 3 時間後から CD80 発現増強がみられた(Fig.5)。CD80 以外には CD86 と CD54 抗原についても増強作用が観察された。

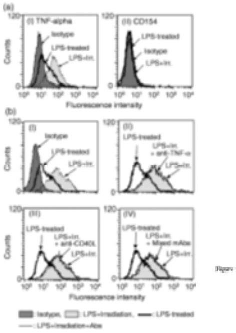






放射線で誘導された CD80 抗原発現は新規の蛋白合成を伴うもので、機能的にも OVA 抗原特異的な T 細胞への抗原提示機能も増強されていた(Fig. 6.,7)。さらに、サイトカイン産生に及ぼす放射線作用を調べたところ TNF-α 産生が誘導されていた。TNF-α の影響を調べるために、培養系に抗 TNFα 抗体を投与でしたと

ころ放射線による CD80 発現が特異的に抑制された (Fig.8)。



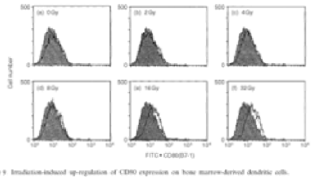


Figure 9 Irradiation-induced up-regulation of CD80 expression on bone marrow-derived dendritic cells.

さらに、マウス骨髄から培養にて得られた樹状細胞への放射線処理でも 2ー32Gy の線量依存性に CD80 発現への増強作用がみられた(Fig.9)。そこで、放射線の CD80 発現増強のシグナル経路を明らかにするために特異的な阻害剤の影響を検討した。その結果、A20-HL 細胞の CD80 発現増強は calcineurin 阻害剤 FK506 により完全に抑制された。これに対し、CD40L と TNFα 産生については部分的に抑制した。Ca2+チャネル阻害剤 nifedipine はCD80発現を完全に抑制したが、CD40L 並びに TNFα 産生には影響がみられなかった(Fig.10)。

同様に、LPS-B 細胞の CD80 発現についても検討したところ、活性酸素消去剤 N-acetyl-L-cysteine(NAC)添加により完全に抑制された。これに対し、A20-HL 並びに樹状細胞の CD80 発現は影響を受けなかった。しかしながら、細胞種は異なっても放射線による CD80 発現増強は、NF-kB 転写因子の阻害剤により完全に抑制された(Fig.11)。

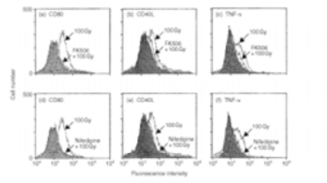


Figure 10 Calcineurin inhibitor, FK506, and calcium channel inhibitor, nifedipine, decreased the irradiation-induced up-regulation of CD80, CD40L, and TNF-α expression.

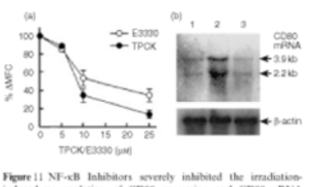


Figure 11 NF-κB Inhibitors severely inhibited the irradiation-induced up-regulation of CD80 expression and CD80 mRNA

B) サイクロヘキシミド(CHX)の CD80 発現増強作用の解析

　ある種の蛋白合成阻害剤や抗癌剤の中には、低濃度条件下で核内転写因子を活性化し分子の発現を高めることが報告されている。蛋白合成過程の翻訳段階を特異的に阻害する CHX が、マウスリンフォーマ A20-HL 細胞の CD80 発現を増強することを発見した。そこで本研究では CHX による CD80 発現増強の作用機序を検討した。初めに、A20-HL を様々な濃度条件で CHX で処理しフローサイトメトリーにて CD80 発現を測定した。その結果、CHX1.25μM で処理した時に CD80 発現が明らかに増強されていた(Fig.12)。ゲルシフトアッセイにて CD80 発現に関与する NF-kB 転写因子を調べたところ、CHX 処理にてその活性が増強されていた(Fig13).　さらに、CHX の

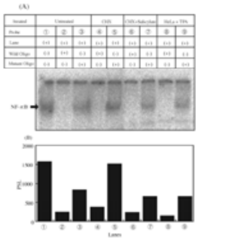


Figure 13. Nuclear extracts from CHX-treated A20-HL cells exhibit increased binding to the NF-kB binding site of CD80 gene. The transfer membrane was subjected auto-radiographic analysis(A), and densitometric analysis(B).

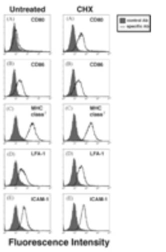
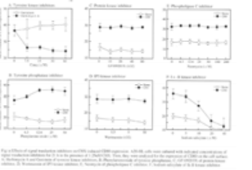


Figure 12 CHX-induced enhancement of CD80 expression on A20-HL cells.

CD80 誘導のシグナル経路を明らかにするために特異的なシグナル伝達系阻害剤添加の影響を検討した。Tyrosine kinase 阻害剤 Genistein は無効果であったが Herbimycin は強力に CD80 発現を抑制した。Protein kinase の GF109203X、Phospholipase C 阻害剤の Neomycin そして IP3 kinase 阻害剤の Wartmanin のいずれも影響がみられなかった。これに対し、tyrosine phosphatase の Pheylasine oxide は濃度依存性に CHX の CD80 発現作用を増強し、IkB kinase 阻害剤の sodium salicylate は抑制した(Fig.14)。Tyrosine kinase 阻害剤への感受性が Genistein はと Herbimycin で異なったことから標的となるチロシンキナーゼを特定するために CHX 処理後のチロシンリン酸化を解析した。Fig.15 にみられるように分子量 53-56KD 前後のチロシンキナーゼが CHX 処理で活性化することが示唆された(Fig.15)。そしてそのリン酸化シグナル系に Ca2+関与が明らかになった。しかし、放射線作用と異なり活性酸素阻害剤には影響がみられなかった (データ未発表)。



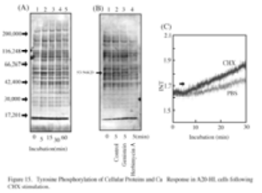


Figure 15. Tyrosine Phosphorylation of Cellular Proteins and Ca Response in A20-HL cells following CHX stimulation.

次に、CHX 作用の標的分子であるチロシンリン酸化シグナル分子のの正体を明らかにするためにアレイ解析をおこなったところ Fyn と Lyn に焦点が絞られる結果が得られた。そこでそれぞれの CHX 処理後のリン酸化パターンを比較したところ、Fyn は緩やかにリン酸化されていた。これに対し、Lyn は刺激 5 分後にはリン酸化がピークに達し、30 分後には脱リン酸化されていた(Fig.16)。B 細胞の Lyn シグナル分子は Raft に多くみられることから CHX 刺激後の Raft 形成をレーザー蛍光顕微鏡にて観察した。Fig.17 にみられるように、CHX 処理にて A20-HL 細胞に多数の raft 形成が検出された。

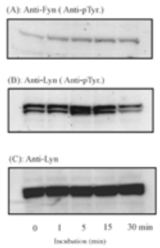


Fig.16 Tyrosine phosphorylation of Fyn and Lyn in CHX-treated A20-HL cells. Cells were treated with 1.25μM CHX for indicated times and detergent solubilizated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Fyn(A) or anti-Lyn(B) antibody, and then stained by immunoblotting with the anti-phosphotyrosine antibody 4G10. (C),Cell lysates were stained by immunoblotting with anti-Lyn antibody.

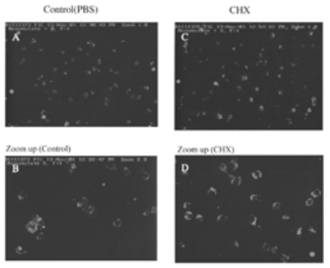


Fig.17 Effect of CHX on membrane lipid raft localization. A20-HL cells were incubated without or with 1.25aM CHX for 10 min, and staind by FITC-cholera toxin. Then, cells were analyzed by Confocal laser microscopy.

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）
〔雑誌論文〕（計 6 件）

1) Kuwabara T, Ishikawa F, Yasuda T, Aritomi K, Nakano H, Tanaka Y, Okada Y, Lipp M, Kakiuchi T.: CCR7 ligands are required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis through generating IL-23-dependent Th17 cells. J Immunol. 183:2513-21,2009.（査読あり）

2) Junko Nakazato, Fumio Ishikawa, Taku Kuwabara, Terutaka Kakiuchi : Inhaled etanol increases antigen-specific IgE production via enhanced Th2 lineage differntiation. J Med Soc Toho 55(2): 10-22, 2008.（査読あり）

3) Shuichi Miyazaki, Fumio Ishikawa, Saburo Matsuo and Keizo Yamaguchi: Effect of Fluoroquinolones on body temperature of mice. J. Antimicrob. Chemother., 62: 1319-1322, 2008.（査読あり）

4) Daisuke Takakura, Michiko Norizuki, Fumio Ishikawa and Tetsuro Sama: Isolation and characterization of the N-linked oligosaccharides in nacrein from Pinctada fucata.Mar Biotechnol. 10:290-6,2008.（査読あり）

5) N. Saito, T. Hatori, N. Murata, Z.-A. Zhang, F. Ishikawa, H. Nonaka, S. Iwabuchi, H. Samejima :A double three-step theory of brain metastasis in mice: the role of the pia mater and matrix metalloproteinases Neuropathology and Applied Neurobiology 33 (3), 288–298. 2007.（査読あり）

6) Miyazaki S, Ishikawa F,Shimizu K, Ubagai T, Edelstein PH, Yamaguchi K,:Gr-1 high polumorphonuclear leukocytes and NK cells act via IL-15 to clear intracellular haemophilus influenzae in experimental murine peritonities and pneumonia. J.Immunol, 179:5407-14, 2007.(査読あり）

〔学会発表〕（計 17 件）

1）Fumio Ishikawa, Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Naomi Yamashita, Terutaka Kakiuch: Acute ethanol inhalation down-regulates IL12 production by dendritic cells and enhances Th2 polarization. 第 39 回日本免疫学会、大阪、2009,12.4.

2) Tanak Y, Kuwabara T, Ishikawa F, Kakiuchi T.: Soluble protein antigen alone efficiently elicits T cell response in mutant mice lacking expression of CCL19 and CCL221 (plt mice). 第 39 回日本免疫学会,大阪,2009,12.2.

3) Kuwabara T, Ishikawa F, Tanaka Y, Kakiuchi T.: CCR7 ligands up-regulate IL-23 through PI3-kinase and NF-kB pathway in dendritic cells, 第 39 回日本免疫学会,大阪, 2009,12.2.

4）石川文雄、桑原卓、田中ゆり子、今井常彦、百瀬弥寿徳、垣内史堂：エタノール処理マウスの樹状細胞はTh2 応答を増強する。第

44 回日本アルコール・薬物医学会、横浜、2009,9.8.

5）石川文雄、桑原卓、田中ゆり子、百瀬弥寿徳、垣内史堂：エタノールは樹状細胞由来からの IL-12 産生能を低下させ Th2 応答を増強する。第 20 回日本生体防御学会、東京、2009,7.26.

6) 土井範子、石川文雄、片桐ゆり子、竹下直樹、森田俊介：LAK療法と分子標的薬剤の併用効果、第81回日本生化学会大会,神戸, 2008,12.9.

7) Fumio Ishikawa, Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Yayoi Okada, Terutaka Kakiuchi: Etanol inhalation enhances OVA-induced airway hyper-sensitivity through Th2-polarizatin and IL-25 production. 第38回日本免疫学会,2008, 京都,12.3.

8）桑原卓、石川文雄，田中ゆり子，岡田弥生、垣内史堂†：CC chemokine receptor 7-ligands are required for development of EAE through generating iL-23-dependent Th17 cells. 第38回日本免疫学会総会・学術集会，京都, 2008, 12.1.

9）田中ゆり子，石川文雄，桑原卓，垣内史堂： CCL19/CCL21 chemokines play a role in initiating immune response in the draining lymph node. 第38回　日本免疫学会総会・学術集会，京都, 2008,12.1.

10）桑原卓,石川文雄、田中ゆり子、垣内史堂：ケモカイン受容体CCR7の動態解析. 第62回東邦医学会学術集会，東京, 2008,10.5.

11）桑原卓，石川文雄，田中ゆり子，岡田弥生，垣内史堂：A role for CCL19 and CCL21 in experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 19 回日本生体防御学会，札幌, 2008, 7.12.

12) 中里純子，石川文雄，桑原卓，垣内史堂，岸田勝：エタノールール摂取によるTh2 細胞への分化促進を介した抗原特異的IgE産生増強. 第 20 回日本アレルギー学会, 東京，2008, 6.12.

13) 石川文雄、関東裕美、岡和之：気道過敏症に対する免疫学的検討、プロジェクト発表、第 131 回東邦医学会例会,東京 ,2008,2,8.

14) Kuwabara T, Ishikawa F, Okada Y,Tanaka Y,Kakiuchi T.: CC-chemokine receptor 7 ligand are required for development of EAE through generating IL-23-dependent Th17 cells, and Keystone resort Colorado; January 2008. Keystone symposia, Chemokines and Chemokine receptors, Keystone, USA, 2008.1.25.

15) 中里　純子, 岸田　勝、四宮範明、石川文雄, 岡田弥生、桑原　卓, 垣内　史堂：エタノールーによる気道過敏反応の増強について．第 61 回東邦医学会 ,東京, 2007, 11.8.

16）Fumio Ishikawa, Taku Kuwabara, Yuriko Tanaka, Yayoi okada, Terutaka Kakiuchi: Ethanol inhalation alters dendritic cell function and induces Th2-polarized immune response. 第 37 回日本免疫学会,東京,2007,11.22.

17) Kuwabara T, Ishikawa F, Okada Y,Tanaka Y,Kakiuchi T.: A role for CCL19 and CCL21 in experimental autoimmune encephalo-myelitis. 13th International Congreess of Immunology　Rio De Janeiro, Brazil, 2007.8.11.

６．研究組織

(1)研究代表者
石川　文雄（ISHIKAWA FUMIO）
東邦大学・医学部・講師
研究者番号：10130345

(2)研究分担者
宮崎　修一（MIYAZAKI SHUICHI）
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：30102314

(3)連携研究者
岡田　弥生（OKADA YAYOI）
東邦大学・医学部・助教
研究者番号：602556758