

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 4月1日現在

機関番号：32660
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2010
課題番号：20591506
研究課題名（和文） 低線量 γ 線照射による制御性T細胞の誘導と自己免疫疾患の改善
研究課題名（英文） Gamma-ray-induced regulatory T cells and attenuation of autoimmune diseases

研究代表者

小島 周二 (KOJIMA SHUJI)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：90119579

研究成果の概要（和文）：種々の自己免疫疾患モデルにおいて小線量 γ 線全身照射により前炎症性サイトカインおよび自己抗体産生能の低下、また細胞障害性T細胞の減少が認められ、本病態の改善が明らかとなった。一方、何れのモデルでも制御性T細胞（Treg）の誘導が見られ、自己免疫病態改善への関与が示唆された。近年、自己免疫疾患に対してTreg遺伝子を移入させる治療法が注目されていることから、今後、難治性自己免疫疾患治療の1つの選択肢として小線量放射線療法が検討される必要もでてくると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Whole-body small doses of gamma-ray irradiation suppressed the productivity of pro-inflammatory cytokines and autoantibody, and the ratio of cytotoxic T cells in a few animal models, indicating that attenuation of autoimmune diseases. While, the ratio of Treg cells was significantly induced in all models, suggesting involvement of regulatory T cells in the attenuation by the irradiation. Recently, gene therapy of transcription of *Treg* gene against autoimmune diseases has been greatly noticed. The radiation therapy with a small-dose could be considered to be one of the promising ways for incurable autoimmune diseases in a near future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬

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：自己免疫疾患、小線量放射線、制御性 T 細胞、改善

1. 研究開始当初の背景

大線量域の放射線は生体にとって有害な作用を及ぼすことは周知の通りである。一方、小線量域の放射線に関しては、必ずしも有害作用のみではなく、有益な生物学的現象が近年数多く報告されようになった。その一つとして、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス (SLE) 様モデルマウス (MRL-*lpr/lpr*) において小線量放射線照射による病態改善および寿命延長効果を小島は明らかにした。さらに、この機構を解明するため、SLEでみられる異常T細胞の機能、自己抗体産生、制御性T細胞に注目し検討を行った。その結果、小線量 γ 線照射により異常T細胞の増殖能およびIL-6の産生量が正常化することを確認し、これらの変化が病態改善へ寄与すること示唆している。また、他のT細胞の増殖活性化を強力に抑制するT細胞集団であり、SLEをはじめとする種々の自己免疫疾患抑制において近年注目されている制御性T (T_{reg} ; $CD4^+CD25^+Foxp3^+$) 細胞の割合増加を予備実験で確認し、病態改善に重要な役割を果たすことを示唆した。

2. 研究の目的

制御性T細胞の誘導を介した小線量放射線照射による自己免疫疾患の病態改善効果を確認し、自己免疫疾患をはじめとする各種難治性免疫関連疾患治療へ用いることを提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 異常T細胞 ($CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$) の性

状および機能解析

① 異常T細胞発現の経時変化と小線量 γ 線照射による影響

MRL-*lpr/lpr*マウス (5-30週齢) から脾臓中の細胞を調製し、PE標識抗CD3抗体、FITC標識抗B220抗体、PE-Cy5標識抗CD4抗体およびAPC標識抗CD8抗体を用いて標識後、フローサイトメーターを用いて異常T細胞 ($CD3^+CD4^-CD8^-B220^+$) の発現増加時期および低線量放射線 (線源： ^{137}Cs , γ 線量：0.5 Gy) による影響について検討する。

② 異常T細胞の機能解析および制御性T細胞 ($CD4^+Cd25^+Foxp3^+$) の測定

T細胞受容体 (TCR) の発現変化、B細胞活性化に関与するCD40Lの発現、B220以外のB細胞膜抗原 (CD19、CD38、CD40、IgM) の発現について検討する。分離した異常T細胞にFITC標識抗体 (CD3、CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、CD40L、B220、CD19、CD38、CD40およびIgMに対する抗体) を添加しフローサイトメーターにより発現を解析する。

③ 低線量 γ 線照射後の制御性T細胞

(T_{reg} , $CD4^+CD25^+Foxp3^+$)/IL-17割合の測定

0.5 Gy の γ 線 (^{137}Cs 0.96Gy/min) 全身照射後、脾臓を摘出、脾細胞を調製する。PE標識抗CD3抗体、PE-Cy5標識抗CD4抗体、FITC標識抗IL-17抗体で染色し、フローサイトメーターを用いてIL-17産生細胞の割合を測定する。また、PE-Cy5標識抗CD4抗体、FITC標識抗IL-17抗体、PE標識抗Foxp3抗体で染色によって $T_{reg}/Th17$ 割合変化

を検討する。

④ 細胞活性化サイトカインであるインターロイキン4, 5, 6 (IL-4, 5, 6) 産生の測定

正常T細胞 (CD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞) および異常T細胞 (CD3⁺CD4⁻CD8⁻B220⁺) の培養上清中のIL-4, 5, 6の含量をELISA法により測定し、異常T細胞のIL-4, 5, 6産生能を測定する。

(2) II型コラーゲン誘発関節炎モデル (CIA) での小線量放射線照射による Treg 細胞分化誘導機構の解析

① 小線量放射線による Treg/Th17 割合変化の影響

DBA/1J マウスにウシII型コラーゲンをCFAとのエマルジョンとして皮下投与することでCIAモデルを作成する。0.5Gy γ 線 (¹³⁷Cs 0.96Gy/min) は感作3日前より週1回全身照射、計5回照射した後、脾臓を出す。脾細胞を調製後、PE標識抗CD3抗体、PE-Cy5標識抗CD4抗体、FITC標識抗IL-17抗体で染色、フローサイトメーターを用いてIL-17産生細胞の割合を測定する。また、PE-Cy5標識抗CD4抗体、FITC標識抗IL-17抗体、PE標識抗Foxp3抗体で染色によってT_{reg}/Th17割合変化を検討する。

② T_{reg}細胞、Th17細胞分化に関与するサイトカインの測定

CIAモデルマウスより調製した脾細胞培養上清中のサイトカイン量をELISAにより測定し、照射群においてIL-6、IL-17の減少及びIL-2の増加を検討する。

(3) 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)に対する小線量放射線照射の影響

① EAEに対する低線量放射線照射の病態改善効果の検討

SJL/Jマウスにミエリン塩基性タンパ

ク(MBP)をCFAとのエマルジョンとして皮下投与することでEAEモデルを作成、0.5Gy γ 線 (¹³⁷Cs 0.96 Gy/min) は感作3日前より週1回全身照射する。病態の重症度は病態スコアを算出(0:無症状 1:尾の麻痺 2:片後肢の麻痺 3:両後肢の麻痺 4:全肢の麻痺 5:瀕死)することで評価する。

② EAEに対する低線量放射線照射の影響

EAEモデルより精製した脾細胞を用い、リンパ球表現型及びT_{reg}/Th17割合をフローサイトメーターで解析、産生サイトカイン量をELISA法にて測定する。また、自己抗体の指標として脊髄破碎液での抗体量をELISA法にて測定する。

(4) MKP-1、p38 MAPK発現解析

マウスマクロファージ様 (RAW264.7) 細胞を用いて、MAPK phosphatase-1 (MKP-1及びその下流に存在する活性型 p38MA の発現量を Western Blot 法にて測定、また産生TNF- α 量をELISA法にて測定する。

・ (5) Treg/Th17細胞の放射線感受性測定

TregおよびTh17細胞に対する放射線の直接的な影響を; 検討するため、以下の実験を行う。C57BL/6マウスより脾細胞を精製後、磁気ビーズおよび磁気カラムを用いてナイーブ CD4⁺ T細胞を分離し、*in vitro*においてTregまたはTh17分化条件で培養することでそれぞれの細胞種に分化させる。その後、 γ 線 (0~5 Gy) を照射し、細胞傷害度の指標としてLDH活性の測定、フローサイトメトリーで解析する。

(6) 低線量放射線照射による Treg の誘導時間及び持続時間の検討

最適な照射時間を検討するため、未処置のマウスに小線量 (0.5 Gy) の γ 線を照射し、一定時間後に Treg 割合を測定、Treg が誘導時間および誘導持続期間を明らかにする。

4. 研究成果

(1) SLE 病態発現異常 T 細胞の機能解析と関節リュウマチでの放射線照射による制御性 T (Treg) 細胞の誘導

異常 T 細胞の γ 線に対する致死感受性検討すると、予想に反し、その感受性は正常 T 細胞より低いことが、また細胞増殖能は正常 T 細胞と比較して顕著に高い細胞増殖能を有していたが、 γ 線照射群から調製した異常 T 細胞ではほぼ正常 T 細胞の増殖能を示した。

制御性 T 細胞は胸腺で産生され、他の T 細胞の増殖を抑制することで SLE や I 型糖尿病等の自己免疫モデルマウスへの本 T 細胞の移入による病態の改善効果が既に報告されていることから、本研究でも、 γ 線照射による異常 T 細胞の正常化をこの制御性 T 細胞と関係付け検討したところ、MRL-*lpr/lpr* マウスに γ 線照射することにより、この制御性 T 細胞が誘導されることが明らかとなった。さらに、IV型アレルギーである関節リュウマチモデルマウスで放射線照射と本病態の改善を検討したところ、同様な結果を得ることができた。

以上の結果より、MRL-*lpr/lpr* マウスに対する低線量 γ 線の病態改善効果は異常 T 細胞の低下によること、そしてこの現象が制御性 T 細胞の誘導によりもたらされることが示唆された。さらに、他の自己免疫疾患 (関節リュウ

マチ) モデルマウスでも γ 線照射による制御性 T 細胞の誘導と疾患の改善を確認し、低線量の放射線を種々のヒト自己免疫疾患の治療/改善に用いる可能性が示唆された。

(2) CIA および EAE に対する小線量放射線照射の改善効果

CIA および EAE に対し、いずれも小線量 (0.5 Gy) の全身照射は発症率、病態スコア等を改善、また TNF- α 、IL-6 等の炎症性サイトカインの上昇を抑制した。さらに、照射群に於いては、有意な Treg 細胞の増加を認めた。さらに、これまでの低線量 γ 線照射の各疾患モデルの病態改善メカニズム解明を目的とし、病態発症に関与する感作 T 細胞による組織傷害 (遅延型過敏症反応 ; DTH)、および抗体産生に対する低線量 γ 線の影響を検討した。その結果、DTH モデルマウスにおいては、重症度の軽減、病態形成に関与するサイトカイン (IFN- γ 、TNF- α 、IL-6) の産生抑制、Treg の割合増加を認め、DTH の抑制が各疾患モデルの病態改善に寄与する可能性が示唆された。

一方、オボアルブミン (OVA) により感作したマウスに低線量 γ 線を照射したところ、現在までに、IgG 抗体および IgE 抗体の産生が感作後長時間持続することが明らかとなり、低線量 γ 線照射により B 細胞活性はむしろ活性化が持続することが示された。そのため、各疾患モデルにおける自己抗体産生の低下には、 γ 線の直接作用ではなく、Treg のような間接的に抗体産生を抑制する機構の関与が示唆

された。

(3) Treg 細胞の放射線感受性の検討

いずれのモデルにおいても小線量 γ 線照射によ Treg の割合増加が認められたことから、この割合増加メカニズムを検討した。はじめに、Treg が放射線に対して抵抗性を示すことによる相対的増加が考えられたことから、Treg の放射線感受性を検討した。この結果、本細胞の感受性は他の CD4⁺ T 細胞と変わらないことを明らかになった。

(4) MKP-1 発現を介した炎症性サイトカイン産生抑制機構

小線量 γ 線照射による抗炎症作用の分子機構を明らかとするため、マクロファージ (RAW264.7) を用いて p38 MAPK 活性化を介した TNF- α 産生に対する γ 線照射の影響について検討を行った。

その結果、照射 15 分後に ERK1/2 および p38 MAPK のリン酸化 (活性化) が 0.5 Gy 照射によって減少することが示され、照射による MKP-1 の発現上昇の関与が示唆された。そこで MKP-1 の発現を検討した結果、照射 15 分後に MKP-1 の発現上昇が認められ、p38 MAPK および ERK1/2 の脱リン酸化は MKP-1 増加によってもたらされている可能性が強く示唆された。また、この MKP-1 の増加は 0.5 Gy 以上で生じることが示された。MKP-1 発現量増加は照射後 15 分に一過性に生じるため、たんぱく質発現上昇に数時間かかる転写・翻訳過程の亢進によるものとは考えにくい。実際に照射後の MKP-1 mRNA 発現変動を検討した結果、15 分以内の発現増加は認められなかった。一方、MKP-1

の発現はユビキチンを介したプロテアソーム系によっても調節されている。そのため、照射による MKP-1 発現増加は mRNA 転写活性増加ではなく、プロテアソーム系の一過性な機能低下を介したものである可能性が示唆された。

これらの結果より、0.5 Gy γ 線照射により MKP-1 発現増加を介した p38 MAPK 活性化抑制効果が示唆された。

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 11 件)

- ① H. Nakastukasa, M. Tsukimoto, A. Tokunaga, S. Kojima. Repeated gamma-ray irradiation attenuates collagen-induced arthritis via up-regulation of regulatory T cells, but not by damaging lymphocytes directly. *Radiat. Res.*, (査読有), **2010, 174, 313-324**.
- ② M. Tsukimoto, T. Homma, Y. Mutou, S. Kojima. 0.5 Gy γ -ray irradiation suppresses production of TNF- α through up-regulation of MKP-1 in mouse macrophage RAW264.7 cells, *Radiat. Res.*, (査読有), **2009, 171, 219-224**.
- ③ M. Tsukimoto, H. Nakatsukasa, K. Sugawara, K. Yamashita, S. Kojima. Repeated 0.5 Gy γ -irradiation attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis with up-regulation of regulatory T cells and suppression of IL-17 production by Th17 cells. *Radiat. Res.*, (査読有), **2008, 170, 429-436**.
- ④ H. Nakatsukasa, M. Tsukimoto, Y. Ohshima, F. Tago, A. Masada, S. Kojima. Suppressing effect of low-dose gamma-ray irradiation on collagen-induced arthritis. *J. Radiat. Res.*, (査読有), **2008, 49, 381-389**.

- ⑤ F. Tago, M. Tsukimoto, H. Nakatsukasa, S. Kojima. Repeated 0.5 Gy gamma-ray irradiation attenuates autoimmune disease in MRL-lpr/lpr mice with suppression of CD3+CD4-CD8-B220+ T-Cell proliferation and with up-regulation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. Radiat. Res., (査読有), **2008, 169, 59-66.**

[学会発表] (計 20 件)

- ① 小島周二、低線量放射線に対する生体の適応応答と疾患治療への応用の可能性、臨床ホルミシス研究会、東京、2009、6月
- ② 小島周二、小線量放射線照射によるがん治療の可能性、CTCセミナー、千葉、2009、12月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.tus.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 周二 (KOJIMA SHUJI)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 90119579

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :