

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24614017

研究課題名(和文)放射線照射による消化管樹状細胞の活性化と卵白アルブミン特異的アレルギー反応の誘導

研究課題名(英文)Activation of dendritic cells and induction of ovalbumin-specific allergic responses by irradiation

研究代表者

若林 あや子 (Wakabayashi, Ayako)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30328851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの小腸上皮細胞はX線感受性が高いが、小腸樹状細胞(DC)はX線耐性であり10Gyの照射により共刺激分子CD80の発現が増強した。マウス小腸上皮器官培養に10-30GyのX線照射した時、上清中に細胞損傷関連分子であるHMGB1が放出され、このHMGB1を小腸DCにin vitroで加えると共刺激分子CD80とCD86の発現が増加した。以上より、放射線照射により損傷した腸上皮細胞からHMGB1のような細胞損傷関連分子が放出され、小腸のDCが活性化することが示された。放射線照射による小腸DCの活性化は過剰な免疫反応を誘導し、食物アレルギー反応の発症や進行に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have observed that dendritic cells (DCs) of the murine intestine were resistance to X-ray irradiation and expression of costimulatory molecule, CD80 on intestinal DCs was enhanced by 10 Gy irradiation although intestinal epithelial cells were sensitive to X-ray irradiation. Then, damage-associated molecular pattern molecule (DAMP) such as HMGB1 was released into culture supernatants when mouse intestinal epithelial cells by organ culture were irradiated with 10-30 Gy. Furthermore, expression of CD80 and CD86 on intestinal DCs was enhanced after addition of HMGB1 in vitro. Thus, we have shown that DAMP such as HMGB1 is released from intestinal epithelial cells damaged by irradiation and intestinal DCs are activated by the released HMGB1. Gut DCs activated by irradiation seem to induce allergic responses and contribute to induction and progression of food allergies.

研究分野：免疫学

キーワード：食物アレルギー 放射線 樹状細胞 消化管

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射性物質に汚染された食品の摂取によって、小児甲状腺がんなどが引き起こされる可能性は既に指摘されているが、チェルノブイリ原子力発電所事故後、ベラルーシにおいては、小児甲状腺がん、白血病などと共に、アレルギー疾患の患者も著しく増加したことが報告された(参考1:Yabloukov AV et al.)。1995年から2001年までのベラルーシにおいて、0.77~0.81 mSvの放射線高度汚染地域、または0.02~0.03 mSvの低度汚染地域に、居住していた小児(平均年齢10歳の男女)のアレルギー発症率は、3年間で著しく増加し、高度汚染地域では2.0倍に、低度汚染地域では11.6倍になった(参考2:Arinichin AN et al.)。また、ベラルーシにおける放射性ストロンチウム, Sr-90に高度に汚染されている地域の小児の牛乳アレルギーの発症率は、汚染が少ない地域に比べて、2.5倍多かった(参考3:Bandazhevsky YI et al.)。これらの報告から、放射線は食物アレルギーの誘導や進行に関与する可能性が考えられる。

(2) 申請者はこれまで、腸内の細菌外毒素(参考4:Wakabayashi A et al.、参考5:若林あや子)や飲水中残留塩素(参考6:若林あや子)およびアルミニウム(参考7:Wakabayashi A et al.、参考8:若林あや子)が、卵白アルブミン(OVA)特異的な免疫反応を亢進させることを報告してきた。加えてこれらの免疫賦活物質を動物に経口投与した場合、小腸粘膜における樹状細胞が著しく活性化し、小腸粘膜と全身における免疫反応が誘導されることを明らかにした(参考9:若林あや子他)。小腸粘膜の樹状細胞樹状細胞の活性化は、食物アレルギーの誘導に深く関与する可能性がある。

(3) 一方、以前より我々の研究室では、X線のような放射線を細胞に照射すると、細胞抗原が放出され、樹状細胞のような抗原提示細胞がその抗原を取り込んで著しく抗原提示能を増強させることを報告してきた(参考10:Fujimoto C et al.)。また最近、放射線照射によって樹状細胞などの抗原提示細胞は活性化され、試験管内でT細胞を活性化することが報告された(参考11:Huang J et al.)。しかし、放射線が小腸粘膜の樹状細胞にどのような影響を与えるのか、その際、食物抗原特異的な免疫応答を亢進させるのか、については未だ明らかではない。本研究において、放射線が小腸粘膜の樹状細胞を活性化し、食物抗原に対する過剰な免疫反応を誘導し、食物アレルギーの発症や進行に関与するのかが明らかになりたい。

2. 研究の目的

(1) チェルノブイリ原子力発電所事故によって放射性物質に汚染された地域では、牛乳アレルギーなどアレルギー疾患の発症率が増加したことが報告されている。申請者らはこれまで、食物アレルギーの誘導や進行には、様々な免疫賦活物質による小腸粘膜の樹状細胞の活性化が大きく関与していることを示してきた。そうした中最近、放射線照射は樹状細胞を活性化し、T細胞免疫反応を誘導することが報告された。これらのことから、放射線は小腸粘膜の樹状細胞を活性化させ、食物抗原に対する過剰な免疫反応を誘導し、食物アレルギーの発症や進行に関与する可能性が考えられる。放射線の食物アレルギーへの関与を明らかにすることが本研究の目的である。

(2) 透過性が高い線やX線は、体の内外から細胞に影響を与える可能性がある。特に、骨髓造血細胞、小腸上皮細胞、小児期の甲状腺細胞といった、細胞分裂の周期の短い細胞ほど放射線の影響を受け、障害されやすい。一方、細胞分裂が遅い樹状細胞については、微量の放射線照射によって活性化されることが報告されている。つまり、生体の消化管が放射線に内外から曝露された場合、腸管上皮細胞は障害され、食物抗原が侵入しやすくなると共に、樹状細胞の活性化が起こる可能性がある。消化管において食物抗原を取り込んだ後に活性化した樹状細胞は、T細胞を活性化し、ひき続きB細胞の活性化と抗体産生も引き起こし、様々なアレルギー反応を引き起こす可能性が考えられる。しかし、このような放射線が消化管の各細胞に影響を与え、食物アレルギーを誘導・促進する可能性については、これまで検討・研究がされてこなかった。本研究において細胞・動物実験により、放射線が消化管の細胞に与える影響と食物アレルギーへの関与のメカニズムを明らかにすることは、非常に重要な意義がある。

(3) 一方、福島第一原子力発電所事故後のアレルギー発症率を調査し、事故以前のデータと比較した場合、発症率の増加がみられる可能性は否定できない。本研究で放射線が食物アレルギーの発症や進行に関与するのかが明らかになり、そのメカニズムを探究することは、今後の食物アレルギーの予防と治療の方策を立てるための大切な基礎となるであろう。

3. 研究の方法

(1) 細胞・動物実験

マウス

実験には、6週齢のC57BL/6雌性マウスを用いた。マウスは、日本医科大学動物実験施設において、特定病原体を含まない(Specific pathogen free: SPF)環境下で

飼育した。

小腸由来細胞への放射線照射

C57BL/6 マウスから小腸および腸間膜リンパ節を摘出し、小腸粘膜固有層と腸間膜リンパ節の細胞を各々分離・精製した。これらの細胞に0、100、1000、または10,000radのX線を照射し、5% CO₂、37℃で1日培養した。

蛍光標識抗体による細胞染色とフローサイトメトリー

死細胞をヨウ化プロピジウムで染色にて検出し、生細胞を樹状細胞マーカーであるCD11cと、活性化マーカーである共刺激分子CD40、CD80、CD86に対する蛍光抗体で染色し、フローサイトメトリーによって解析した。

クリプト-絨毛類器官培養と放射線照射

Satoらの報告(参考12:Sato M. et al.)に従い、マウスの小腸のクリプトから腸幹細胞を採取し、マトリゲル中において3次元培養し、上皮細胞のみから成るクリプト-絨毛類器官を構築した。この培養器官に、10、30、または100GyのX線を照射し、1日後の培養上清中のHigh Mobility Group Box 1 (HMGB1)濃度をELISA法で測定した。

樹状細胞へのHMGB1添加

HMGB1をマウス腸管膜リンパ節の樹状細胞にin vitroで加え、1日培養後の共刺激分子CD80、CD86の発現の変化をフローサイトメトリーによって観察した。

(2) 調査研究

アレルギーに関する調査

対象者は東京都および近郊に在住の20歳代女性であった。調査内容を説明の上、調査協力に同意が得られた52名において、質問調査を行った。対象者には、アレルギーの既往歴、どんなアレルギー疾患にかかったことがあるか、または現在かかっているか、医師の診断の有無などの記入を依頼した。また、福島第一原子力発電所事故時とその後の居住地と、事故後のアレルギーの発症や悪化などについて質問調査を行った。

4. 研究成果

(1) 小腸由来細胞へのX線照射による小腸樹状細胞の活性化

はじめに、マウスから採取した腸間膜リンパ節 (MLN) と小腸粘膜固有層 (LP) の細胞に0、1、10、または100GyのX線を照射して1日培養した後の生細胞について観察した。その結果、MLN細胞、LP細胞ともに、照射rad数が増えるに従って、総細胞数と生細胞率が減少したが、生細胞におけるCD11c陽性樹状細胞の割合は有意に増加した(図1)。つま

り、樹状細胞は放射線照射耐性があることが明らかに示された。また、10GyでX線照射した時、MLNのCD11c陽性樹状細胞におけるCD80の発現の増加が観察された(図2)。このような共刺激分子の発現増加は、1Gyまたは100Gy照射のMLN樹状細胞や、LP樹状細胞ではみられなかった。

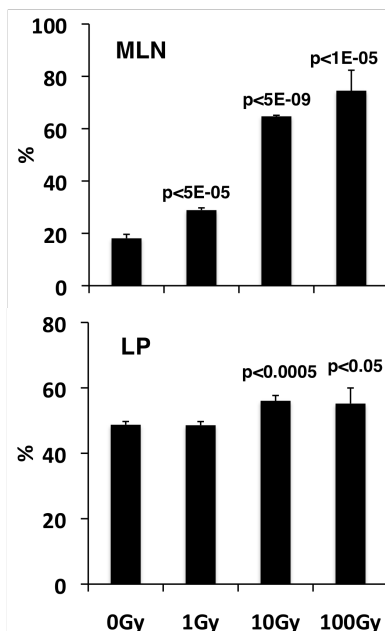


図1 . X線照射によるCD11c陽性樹状細胞の割合の変化

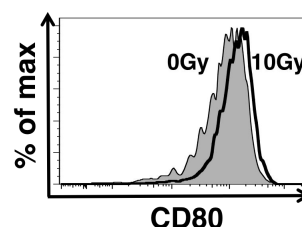


図2 . X線照射によるMLN CD11c陽性樹状細胞における共刺激分子の発現増強

一方、マウスから小腸粘膜固有層樹状細胞を採取する過程において、小腸上皮細胞を分離・精製した場合、生細胞率は著しく低く、その後のX線照射の程度にかかわらず、1日培養後にはほぼ全ての上皮細胞が生きていなかった。これは、樹状細胞に比べて、上皮細胞が物理的刺激などにより著しく損傷しやすいことを示している。

以上より、マウスの小腸粘膜および腸管膜リンパ節における樹状細胞は、腸管の他の細胞に比べて、物理的刺激や放射線照射に耐性が著しく高いことが示唆された。さらに、腸管膜リンパ節の樹状細胞に10Gy程度の弱い放射線を照射した場合、共刺激分子CD80の発現が増加することより、その後のT細胞の活性化を導く可能性が考えられる。

(2) クリプト-絨毛類器官培養へのX線照射による細胞損傷関連分子の放出

マウス小腸の上皮細胞は放射線感受性が高く、照射によって死滅しやすいこと、および上皮細胞のみを他の細胞の混入なしで分離・採取することは、技術的に困難であることより、マウスの小腸幹細胞を採取して3次元培養し、上皮細胞のみから成るクリプト-絨毛類器官を構築した。この上皮器官をX線照射した時、損傷関連分子パターンの一つであるHMGB1が放出されるか否か、また、放出されたHMGB1が樹状細胞の活性化に与える影響を検討した。

マウスのクリプト-絨毛類器官培養に、10、30、または100GyのX線を照射し、1日後の培養上清中のHMGB1濃度をELISA法で測定した。そうしたところ、照射X線量が30Gyの時に最も著しく、次に10Gyの時に、上清中HMGB1濃度の有意な増加が観察された(図3)。しかし、100Gy照射ではHMGB1放出量の増加は認められなかった。

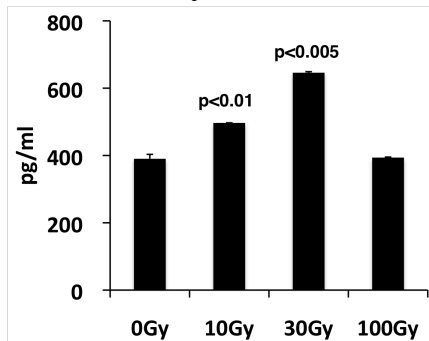


図3 . X線照射によるクリプト-絨毛類器官からのHMGB1放出

(3) 細胞損傷関連分子HMGB1による樹状細胞活性化

最後に、HMGB1をマウス腸管膜リンパ節の樹状細胞にin vitroで加え、1日培養後の共刺激分子の発現の変化を観察した。その結果、CD11c陽性樹状細胞のCD80、CD86の発現が顕著に増加した(図4)。

これらの結果より、X線のような放射線を照射した場合、照射に感受性の高い上皮細胞からHMGB1のような細胞損傷関連分子が放出され、それら分子によってDCが活性化することが示された。食物抗原を取り込んだDCの活性化はTh2反応などのアレルギー反応を惹起することが考えられる。従って消化管粘膜組織における放射線照射は、食物抗原に対する過剰な免疫反応を誘導する可能性が示唆された。

(4) 調査研究

東京都および近郊に在住の20歳代女性を対象に質問調査を行い、2011年3月の福島第一原子力発電所事故前後のアレルギーの

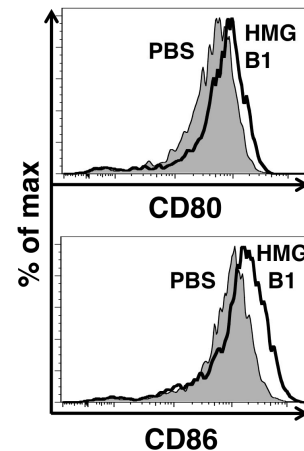


図4 . HMGB1添加によるMLN CD11c陽性樹状細胞における共刺激分子の発現増強

発症率や重症度について調査したところ、研究期間終了時点では事故発生前後の有意な差はみられなかった。しかし動物実験の結果を踏まえると、放射線照射は生体の様々な細胞に影響を与える可能性があることから、今後長期的に追跡していく必要があると考える。

<参考>

- 1 : Yablokov AV et al. Annals of the New York Academy of Sciences 1181: 1-349, 2009
- 2 : Arinchin AN et al. Recent Research Activities about the Chernobyl Accident in Belarus, Ukraine and Russia: 231-240, 2002
- 3 : Bandazhevsky YI et al. Actual Problems of Immunology and Allergy: 111-112, 1995
- 4 : Wakabayashi A et al. The Journal of Immunology 180: 4000-4010, 2008.
- 5 : 若林あや子、腸内の細菌外毒素が卵白アルブミン特異的免疫反応に与える影響：毒素と食物アレルギー、平成14-15年度科学研究費補助金若手研究(B)
- 6 : 若林あや子、飲水中残留塩素による卵白アルブミン特異的免疫反応の誘導：塩素と食物アレルギー、平成18-20年度科学研究費補助金若手研究(B)
- 7 : Wakabayashi A et al. Immunology 119: 167-177, 2006.
- 8 : 若林あや子、アルミニウム含有食品添加物の摂取による卵白アルブミン特異的なアレルギー反応の誘導、平成21-23年度科学研究費補助金基盤研究(C)
- 9 : 若林あや子他、抗原経口投与後の小腸上皮間樹状細胞におけるDEC-205分子と共刺激分子の増加と粘膜CTLの誘導への関与、日本免疫学会、2008.
- 10 : Fujimoto C et al. Biomedical Research 24: 115-124, 2003
- 11 : Huang J et al. Journal of Immunotherapy 34: 327-335, 2011
- 12 : Sato T et al. Nature 459: 262-265, 2009

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4件)

若林あや子、高橋秀実：腸管上皮内リンパ球の細胞傷害性T細胞への分化。臨床免疫・アレルギー科，査読無。62(1)：17-24，2014(7月)

若林あや子、高橋秀実：コレラトキシンによる樹状細胞における経口抗原のクロスプレゼンテーション増強効果。臨床免疫・アレルギー科，査読無。61(3)：322-320，2014(3月)

若林あや子、高橋秀実：CD8⁺CD103⁺樹状細胞の機能とDEC-205。臨床免疫・アレルギー科，査読無。61(2)：124-130，2014(2月)

Harimoto, H., Shimizu, M., Nakagawa, Y., Nakatsuka, K., Wakabayashi, A., Sakamoto, C., and Takahashi, H.: Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor-infiltrating tolerogenic dendritic cells. Immunol. Cell Biol., 査読有。91(9)：545-555，2013.

[学会発表](計11件)

Wakabayashi, A., Otsuka, Y., Ishi, K., Takahashi H.: Enhancement of costimulatory molecule-expression on mucosal DCs by treatment with cholera toxin in vitro. 第43回日本免疫学会学術集会，2014年12月10-12日(京都)

Wakabayashi, A., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Murakami, R., Date, T., Takahashi, H.: Enhancement of OVA-specific IgG and IgE production and expression of costimulatory molecules on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes by oral administration of OVA plus potassium alum. 第42回日本免疫学会学術集会，2013年12月(幕張)

Harimoto, H., Shimizu, M., Nakagawa, Y., Takaku, S., Wakabayashi, A., Takahashi H.: Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor infiltrating tolerogenic dendritic cells expressing down-modulated costimulating molecules. 第42回日本免疫学会学術集会，2013年12月(幕張)

若林あや子、中川洋子、清水真澄、野呂瀬義彦、高橋秀実：みょうばんとOVAの経口投与による消化管樹状細胞の活性化および特異的IgG・IgE産生の亢進。第63回日本アレ

ルギー学会秋期学術大会、2013年11月(東京)

村上亮介、中川洋子、清水真澄、根岸靖幸、若林あや子、大久保公裕、高橋秀実：アレルギー性鼻炎マウスモデルにおける樹状細胞特異的33D1抗体投与の影響。第63回日本アレルギー学会秋期学術大会、2013年11月(東京)

Negishi, Y., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Matsushashi, T., Ichikawa, T., Takeshita, T., and Takahashi, H. Fetal loss induced by depletion of innate 33D1⁺DC subset in mice. The 15th International Congress of Immunology. August 2013 (Milan)

Murakami, R., Nakagawa Y., Wakabayashi, A., Kumagai, Y., Ohkubo, K., and Takahashi, H. Effect of depletion of 33D⁺ dendritic cells on allergic airway sensitization in mouse model. The 15th International Congress of Immunology. August 2013 (Milan)

Kogo, H., Harimoto, H., Shimizu, M., Date, T., Nakagawa, Y., Nakatsuka, K., Wakabayashi, A., Sakamoto, C., Uchida, E., Takahashi H.: Inactivation of tumor-specific CD8⁺ CTLs by tumor-infiltrating lymphocytes by tumor-infiltrating immunosuppressive tolerogenic dendritic cells. 15th International Congress of Immunology. August 22-27, 2013 (Milan)

Negishi, Y., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Ichikawa, T., Takeshita, T., and Takahashi, H. Depletion of 33D1⁺DC subset will induce fetal loss in pregnant mice though IL-12 secretion. The 33th American Society of Reproductive Immunology. May 2013 (Hamburg).

Wakabayashi, A., Nakagawa, Y., Shimizu, M., Takahashi, H. CD8⁺CD103⁺ dendritic cells in the mesenteric lymph-nodes cross-present exogenous antigens captured through DEC-205 receptor when they are orally administered with cholera toxin. 第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月5-7日(神戸)

Negishi, Y., Wakabayashi, A., Shimizu, M., Ichikawa, T., Takeshita, T., Takahashi, H. Maternal immune balance maintained by innate DC subsets appears to regulate pregnancy in mice. 第41回日

本免疫学会学術集会、2012年12月5-7日(神戸)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 あや子 (WAKABAYASHI AYAKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：30328851

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し