

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791383

研究課題名（和文） 樹状細胞のパターン認識受容体に及ぼす放射線の影響と機構解明

研究課題名（英文） Effects of ionizing radiation on the pattern recognition receptors.

研究代表者

吉野 浩教（YOSHINO HIRONORI）

弘前大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：10583734

研究成果の概要（和文）：樹状細胞は自然免疫と獲得免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞で、免疫システムにおいて重要な役割を担っている。本研究では、この樹状細胞の分化誘導における放射線の影響をパターン認識受容体の応答性に着目し検討を行った。ヒト単球に X 線を照射し、既報のサイトカインの組み合わせにより樹状細胞へ分化誘導を行った後、細菌の細胞壁構成成分であるリポ多糖および炎症性サイトカインで刺激し、細胞表面発現抗原および機能解析を行った。その結果、X 線照射単球由来樹状細胞は非照射対照群と比べて、リポ多糖刺激後における T 細胞を刺激する分子の発現やサイトカイン産生などが著しく低下していた。一方で、炎症性サイトカイン刺激後ではこれら低下は観察されなかったことから、放射線に曝露された前駆細胞由来樹状細胞は炎症性サイトカインに対する応答性は比較的維持しているものの、病原菌に対する応答性が著しく低下することが示唆された。リポ多糖はパターン認識受容体である Toll 様受容体 4 によって認識されるが、X 線照射単球由来樹状細胞の Toll 様受容体 4 の発現は非照射群と同程度であったことから、放射線によってリポ多糖認識後のシグナル伝達経路が影響を受けている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Dendritic cells (DCs) play an essential role in the immune system. This study investigated whether DCs from monocytes exposed to ionizing radiation can adequately respond to pathogen-derived components and proinflammatory cytokines. Human monocytes separated from buffy coats were exposed to x-rays and were then differentiated into DCs. DCs were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) or proinflammatory cytokine mixture (MIX). The DCs from nonirradiated and X-irradiated monocytes showed maturation after LPS and MIX stimulation as confirmed by findings of surface antigen expression. Upon LPS stimulation, however, the expression levels of CD80 and CD83 on the DCs from the X-irradiated monocytes were lower than those of the DCs from the nonirradiated monocytes. Such reductions were not observed upon MIX stimulation. Similarly, an impairment of matrix metalloproteinase-9 and cytokine production was observed in the LPS-stimulated DCs from the X-irradiated monocytes, whereas these impairments were not observed upon MIX stimulation. The ability of DCs to stimulate T cells was lower in the irradiated group compared with the nonirradiated group despite the type of maturation stimulus. Thus, the present results suggest that the influence of X-irradiation on the maturation of DCs depends on the type of maturation stimulus used and that X-irradiation especially impairs the response of DCs to LPS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

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、自然免疫、樹状細胞、パターン認識受容体

### 1. 研究開始当初の背景

放射線治療は外科的手術療法、化学療法とともにがん治療における主要な治療法として行われており、局所治療であるため患者の生活の質が維持できる。しかしながら、照射領域の正常な細胞も傷つけてしまう。また、治療により寛解状態に至ったとしても、再発の可能性もある。そのため、がんの再発予防を含む良好な予後のためには、治療後の免疫力が重要になってくる。

樹状細胞は白血球の一種で、自然免疫と獲得免疫を繋ぐ最も強力な抗原提示細胞である。樹状細胞には貪食能の強い未熟樹状細胞と、菌体成分や炎症性サイトカインなどの刺激を受けT細胞への抗原提示能が強くなった成熟樹状細胞が存在する (Nature 392: 245-252, 1998)。リンパ球や顆粒球及びその前駆細胞は放射線に対して感受性が高い。一方で、樹状細胞の放射線に対する感受性は比較的低いことが報告されているが (Br. J. Cancer 92: 1450-1458, 2005)、その前駆細胞に対する放射線の影響についての詳細は不明である。

こうした背景のもと、研究代表者である吉野浩教は、樹状細胞の前駆細胞の一つであるヒト単球にX線を照射し、樹状細胞への分化誘導を行ったところ、細胞表面発現タンパクの解析よりX線曝露単球からでも未熟及び成熟樹状細胞に分化誘導できる事を報告した (J. Radiat. Res. 49: 292-303, 2008)。しかしながら、X線照射により未熟樹状細胞の貪食能が低下傾向にあること、成熟樹状細胞のT細胞増殖刺激能が低下していることから、X線曝露単球由来樹状細胞は機能的に低下することを明らかにした。その報告では、成熟刺激としては比較的弱い腫瘍壊死因子 $\alpha$ を用いたが、樹状細胞はToll様受容体などのパターン認識受容体を介して、病原体関連分子に強力に応答する。従って、病原体関連分子に対する応答性に及ぼす放射線影響の評価は極めて重要になってくる。

### 2. 研究の目的

樹状細胞などの免疫細胞はパターン認識受容体を介して病原体に普遍的に存在する分子パターンを認識し、免疫反応を誘導する。本研究では、樹状細胞の分化誘導における放射線の影響をパターン認識受容体の応答性の観点から検討を行った。

### 3. 研究の方法

本研究は弘前大学大学院医学研究科の倫

理員会の承認を得て実施した。本申請研究課題を遂行するために使用したヒト単球は、青森県赤十字血液センターから供与して頂いた献血バフィーコートから分離を行った。献血バフィーコートの研究利用に関しては採血時にインフォームドコンセントを行い、同意が得られた場合のみ研究に使用した。

#### (1) ヒト単球の分離

ヒト単球は、献血バフィーコート由来有核細胞から Human Monocyte Enrichment Set-DM キット (BD Biosciences) を用いて分離した。

#### (2) ヒト単球への放射線照射

ヒト単球へのX線照射はX線発生装置 (MBR-1520R、日立メディコ) を使用して行った (線量率は約100 cGy/分)。

#### (3) 樹状細胞への分化誘導

ヒト単球から樹状細胞への分化誘導は、既報のサイトカインの組み合わせ (遺伝子組み換えヒト顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子およびインターロイキン-4) により行った。また、誘導した樹状細胞をリポ多糖または炎症性サイトカイン (遺伝子組み換えヒト腫瘍壊死因子 $\alpha$ 、インターロイキン-1、インターロイキン-6、プロスタグランジン  $E_2$  の組み合わせ: MIX) で刺激し、下記の各種解析を行った。

#### (4) 細胞表面発現抗原の解析

細胞表面発現抗原の解析は、蛍光標識された各種抗体で細胞を染色した後、フローサイトメーター (Epics XL, Beckman Coulter) を用いて解析した。

#### (5) ゼラチンザイモグラフィ

培養上清中の細胞外マトリックス分解酵素 (Matrix Metalloproteinase-9: MMP-9) の活性はゼラチンザイモグラフィにより評価した。

#### (6) 同種リンパ球混合反応

樹状細胞のT細胞刺激能力は、同種CD4+T細胞を用いたリンパ球混合反応により評価した。

#### (7) サイトカイン産生の評価

培養上清中のサイトカイン濃度は、17種類のサイトカインを同時に測定できるBio-Plex human cytokine 17-Plex panel kit (Bio-Rad Laboratories) を使用し、Bio-Plex

protein array system (Bio-Rad Laboratories)を用いて解析を行った。

(8) 細胞内活性酸素種の評価

細胞内の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) は、活性酸素種検出蛍光プローブ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes, Invitrogen Corporation)を用い、フローサイトメーターにて解析を行った。

(9) 単球系細胞株 THP1 細胞の Toll 様受容体発現に及ぼす放射線の影響解析

ヒト急性単球性白血病細胞 THP1 細胞は理研バイオリソースセンターより購入した。THP1 細胞に X 線照射 (1~10 Gy) 照射を行い、細胞表面の Toll 様受容体 2 および 4 の発現をフローサイトメーターにて解析した。また、THP1 細胞をホルポールエステルで 48 時間刺激し、マクロファージ様細胞に分化させた後、X 線照射を行い Toll 様受容体 2 および 4 の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) X 線照射によって樹状細胞のリポ多糖刺激後の細胞表面発現抗原量が低下する

X 線曝露単球から誘導した樹状細胞をリポ多糖または炎症性サイトカインで刺激したところ、非照射群同様、樹状細胞の活性マーカーである CD40 や CD86、また成熟マーカーの CD83 の発現増強が観察された。しかしながら、リポ多糖で刺激した場合は、非照射群と比べて照射群で CD80 および CD83 の発現量が有意に低かった (図 1 上)。一方で、炎症性サイトカイン刺激ではこれら抗原の発現量低下は認められなかった (図 1 下)。

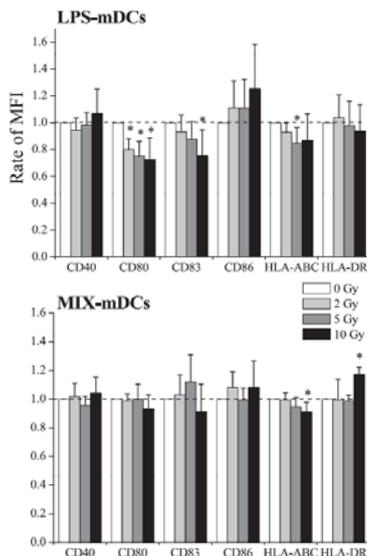


図 1 リポ多糖 (上) または炎症性サイトカイン (下) 刺激後の細胞表面発現抗原量の比較

(2) X 線照射によって樹状細胞のリポ多糖刺激後の MMP-9 産生が低下する

X 線曝露単球から誘導した樹状細胞をリポ多糖または炎症性サイトカインで刺激し、刺激 48 時間後の培養上清中に含まれる MMP-9 を解析したところ、リポ多糖刺激の場合では非照射群と比べて照射群で MMP-9 の活性が低かった (図 2)。一方で、炎症性サイトカイン刺激の場合でも、照射群での MMP-9 活性の低下が観察されたが、その低下の程度はリポ多糖と比べて僅かであった。

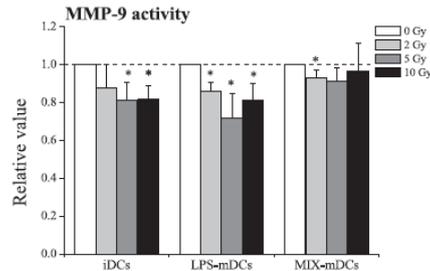


図 2 培養上清中の MMP-9

(3) X 線照射によって樹状細胞の同種 T 細胞刺激能力が低下する

X 線曝露単球から誘導した樹状細胞をリポ多糖または炎症性サイトカインで刺激し、同種 T 細胞刺激能力を比較したところ、リポ多糖および炎症性サイトカインのいずれの刺激においても、非照射群と比べて照射群において T 細胞刺激能力の低下が認められた (図 3)。

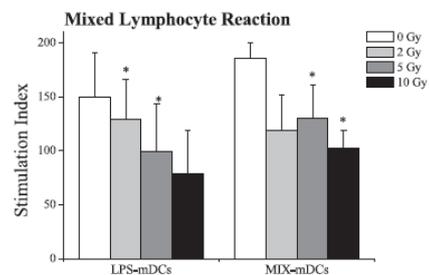


図 3 樹状細胞の同種 T 細胞刺激能力

(4) X 線照射によって樹状細胞のリポ多糖刺激後のサイトカイン産生が低下する

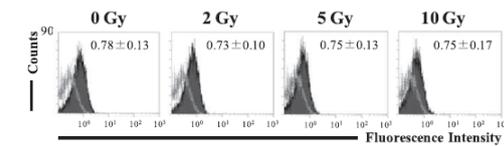
X 線曝露単球から誘導した樹状細胞をリポ多糖または炎症性サイトカインで刺激し、刺激 48 時間後の培養上清中のサイトカイン産生を解析したところ、リポ多糖刺激の場合では腫瘍壊死因子  $\alpha$  やインターロイキン-10 を含む 6 種類のサイトカイン濃度が非照射群と比べて照射群で有意に低下していた。一方、炎症性サイトカイン刺激では、非照射群と照射群の間で 3 種類のサイトカインに有意な差があり、照射群でインターロイキン-17 の産生低下および顆粒球コロニー刺激因子とインターロイキン-7 の産生増加が認められた。

**(5) X線曝露単球由来樹状細胞のリポ多糖に対する応答性の低下の解明**

X線曝露単球由来樹状細胞はリポ多糖に対する応答性が著しく低下していたため、リポ多糖の受容体である Toll 様受容体 4 の発現を解析したが、非照射群と照射群との間に Toll 様受容体 4 の発現の差は認められなかった (図 4[A])。

活性酸素種は Toll 様受容体 4 のリポ多糖認識後のシグナル伝達において重要であるため、リポ多糖刺激後の細胞内活性酸素種量を評価した。リポ多糖 (図 4[B]左) および炎症性サイトカイン (図 4[B]右) 刺激後のいずれにおいても非照射群と比べて照射群で細胞内活性酸素種の低下が認められた。炎症性サイトカイン刺激の場合では、照射群での活性酸素種量は刺激 12 時間後で最低値となったが、24 時間以降では非照射群と同程度まで回復した。一方、リポ多糖に関しては、刺激 12 時間以降から照射群での活性酸素種量が低下し、48 時間後においてもその低下は維持されていた。

[A]



[B]

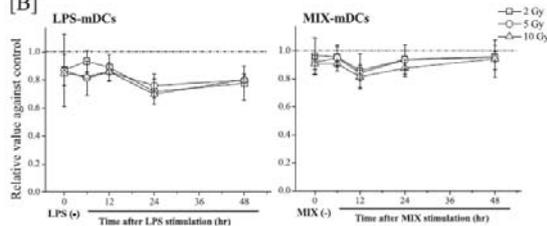


図 4 X線曝露単球由来樹状細胞の Toll 様受容体 4 の発現[A]とリポ多糖または炎症性サイトカイン刺激後の細胞内活性酸素種の変動[B]

**(6) 単球系細胞株の分化におけるパターン認識受容体に及ぼす放射線の影響**

単球系細胞株 THP1 細胞の分化モデルを用いて放射線が Toll 様受容体発現に及ぼす影響を検討した。未分化 THP1 細胞に X 線照射を行い、照射 24、48 時間後の Toll 様受容体 2 および 4 の発現を解析したところ、照射群での発現増強が観察された。一方で、THP1 細胞をホルボールエステル刺激によりマクロファージ様細胞に分化させ、X 線照射を行ったところ、THP1 細胞の結果とは異なり、照射群で Toll 様受容体 2 および 4 の発現が有意に低下した。

**(7) 結論**

X線曝露単球由来樹状細胞は炎症性サイト

カイン刺激に対する応答性は比較的維持している一方で、病原菌関連分子であるリポ多糖に対する応答性が著しく低下していることが明らかとなった。さらに、このリポ多糖に対する応答性の低下は Toll 様受容体 4 の発現が原因でなく、リポ多糖認識後のシグナル伝達が原因であることが示唆された。

また単球系細胞株の分化モデルを用いた実験から、放射線が Toll 様受容体の発現に及ぼす影響は細胞の分化段階に依存することが示された。

**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 4 件)

- ① Yoshino H, Kiminarita T, Matsushita Y, Kashiwakura I: Mitochondrial superoxide production and redox status in human monocytic cells after ionizing irradiation. Radiation Emergency Medicine, 査読有, 印刷中.
- ② Wakasaya T, Yoshino H, Fukushi Y, Yoshizawa A, Kashiwakura I: A liquid crystal-related compound induces cell cycle arrest at the G2/M phase and apoptosis in the A549 human non-small cell lung cancer cell line. International Journal of Oncology, 査読有, 42:1205-1211, 2013.
- ③ Yoshino H, Kiminarita T, Matsushita Y, Kashiwakura I: Response of the Nrf2 protection system in human monocytic cells after ionising irradiation. Radiation Protection Dosimetry, 査読有, 152:104-108, 2012.
- ④ Yoshino H, Kashiwakura I: Impairment of mature dendritic cells derived from X-irradiated human monocytes depends on the type of maturation stimulus used. Radiation Research, 査読有, 178:280-288, 2012.

[学会発表] (計 6 件)

- ① 吉野浩教, 柏倉幾郎. Toll 様受容体に及ぼす放射線の影響, 日本放射線影響学会第 55 回大会, 2012 年 9 月 6-8 日, 仙台.
- ② 若佐谷拓也, 吉野浩教, 吉澤 篤, 柏倉幾郎. 液晶関連化合物の抗腫瘍作用及び放射線増感作用の可能性, 第 50 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会, 2012 年 6 月 30 日, 沖縄県宜野湾市.
- ③ 吉野浩教, 柏倉幾郎. 病原体認識受容体に及ぼす放射線の影響, 第 50 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会, 2012 年 6 月 30 日, 沖縄県宜野湾市.
- ④ Yoshino H, Kiminarita T, Matsushita Y,

Kashiwakura I. Response of the Nrf2 protection system in human monocytic cells after ionizing irradiation. International Symposium on the Natural Radiation Exposures and Low Dose Radiation Epidemiological Studies, 2012年2月29日-3月3日, Hirosaki Japan.

- ⑤ 吉野浩教, 柏倉幾郎. 放射線照射細胞における Nrf2 生体防御システムの関与, 日本放射線影響学会第 54 回大会, 2011 年 11 月 17-19 日, 神戸市.
- ⑥ Yoshino H, Kashiwakura I. The effects of ionizing radiation on pattern recognition receptors. 14th International Congress of Radiation Research, 2011 年 8 月 28 日-9 月 1 日, Warsaw, Poland.

[その他]

ホームページ等

- ① 研究室ホームページ  
<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~kashiwakura/>
- ② 弘前大学 研究者詳細 吉野浩教  
<http://hue2.jm.hirosaki-u.ac.jp/view?l=ja&u=100000291>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉野 浩教 (YOSHINO HIRONORI)  
弘前大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：10583734

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

柏倉 幾郎 (KASHIWAKURA IKUO)  
弘前大学・大学院保健学研究科・教授  
研究者番号：00177370

門前 暁 (MONZEN SATORU)

弘前大学・大学院保健学研究科・助教  
研究者番号：20514136