

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791323

研究課題名(和文) マウスモデルにおける低用量放射線および樹状細胞を用いた放射線免疫療法の確立

研究課題名(英文) Immunoenhancing effect by low dose radiation exposure in combination of the dendritic cells

研究代表者

河合 辰哉 (Kawai, Tatsuya)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70597822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウスモデルを用い、低線量の放射線被曝が免疫系に及ぼす影響を検索した。結果、50mGy～200mGyの単回全身被曝ではマウスリンパ系細胞(CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、NK/NKT細胞および制御性T細胞)の集団には明らかな変化をきたさなかった。次に、比較的長期連続被曝モデルとして25mGyの10日間連続照射マウスを用い、Ovalbumin抗原で免疫を行うと、被曝群で抗原特異的CD8陽性細胞集団の増加が認められた。このことから、低線量の長期被曝によりマウスの特異的細胞免疫が増強する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of low dose X ray irradiation on the immune system by using mouse models. There were no significant difference in population of the lymphocytes; CD4+ T cells, CD8+ T cells, NK/NKT cells, and regulatory T cells by a single total body irradiation between 50 mGy and 200 mGy compared to the control group. On the other hand, an increase in antigen-specific CD8+ T cells was observed in continuous radiation exposed model mice (25 mGy x 10 days) immunized by ovalbumin. In conclusion, it was suggested that long term, low dose systemic radiation exposure might enhance specific cellular immunity.

研究分野：放射線医学

キーワード：低用量放射線 免疫療法

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの多くの臨床あるいは実験データから、腫瘍排除に宿主免疫が大きな役割を果たしていることがわかっている。これまでの実験で示された低用量放射線の抗腫瘍効果¹⁾について、免疫学的側面よりそのメカニズムの一端を明らかにしたく、低線量被曝がマウス細胞性免疫に及ぼす影響について解析を行うために実験を計画した。

文献 1) Effect of low-dose total-body irradiation on transplantability of tumor cells in syngeneic mice.

Ito M, Shibamoto Y, Ayakawa S, Tomita N, Sugie C, Ogino H., J Radiat Res (Tokyo). 2008 Mar;49(2):197-201.

2. 研究の目的

CD8 陽性 T 細胞は、MHC クラス 分子とペプチド断片の複合体を認識し、がん細胞やウイルス感染細胞などの標的細胞を直接攻撃することから Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) と呼ばれている。これらの特異的 T 細胞をフローサイトメトリ (FCM) により検出し、その population 解析を行うことにより、細胞性免疫の評価を行うことが可能である。本実験では条件を変えた低用量放射線の照射後にモデル抗原としての Ovalbumin (OVA) ペプチドによる免疫を行い、蛍光標識 MHC Tetramer を用いた FCM 解析を行った。使用する Tetramer は蛍光標識された OVA 抗原特異的 Class II-MHC であり、OVA 特異的 CD8 細胞表面上の TCR-OVA 抗原複合体に特異的に結合する。

3. 研究の方法

使用動物、試薬、機材

- ・マウス：C57BL/6 マウス 8 週齢
- ・放射線照射装置：X 線照射装置；中部メディカル
- ・OVA peptide：H-2Kb OVA Peptide SIINFEKL (MBL)
- ・Helper peptide：I-Ab/I-Ad OVA helper Peptide ISQAVHAAHAEINEAGR (MBL)
- ・Adjuvant：Incomplete Freund's adjuvant (Sigma)

(1) X 線照射プロトコール

Group (n=3 / group)	OVA immunization	Irradiation
A	-	-
B	-	+
C	+	-
D	+	+

(2) 免疫方法 (マウス 1 匹あたり)

Emulsion: OVA peptide 60ug + Helper peptide

120ug / dissolved in PBS 60ul
+ Freund's incomplete adjuvant
60ul

単回：尾根皮下 100ul (day 0)

(3) FCM 解析 (BD FACS Canto II)

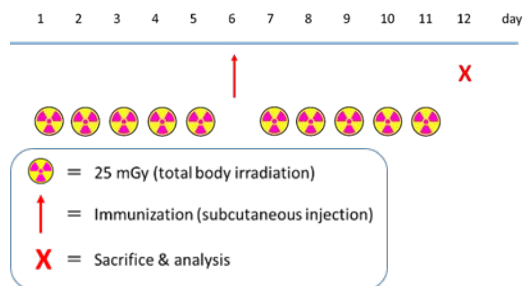
標識

1. H-2Kb OVA Tetramer-SIINFEKL (PE conjugated)
2. H-2Kb beta-galactosidase Tetramer (PE conjugated) as a negative control
3. Anti-mouse CD8 (clone KT15) (FITC conjugated)
4. Anti mouse B220 (APC conjugated)
5. Anti mouse CD45 (Pac Blue conjugated)
6. (7-AAD)

検体

免疫後 Day7 マウス Splenocyte 1x10⁶ 個使用。

(4) 照射プロトコール



Total dose : 25 mGy x 10 = 250 mGy

(5) 評価項目

FCM 解析：死細胞除去，リンパ球ゲート，B リンパ球除去後，OVA Tetramer+/CD8+ 集団 (CTL) の解析を行う

帰無仮説を

「マウス脾細胞における OVA peptide 特異的 CTL は照射の有無，あるいは照射線量により有意差はない」

として，低線量全身照射が免疫系に及ぼす影響を定量した。

4. 研究成果

(1) 結果 1 OVA 特異的 CTL (CD8 陽性 T 細胞) の変化

フローサイトメトリーを用い，図 1 のゲーティングで抗原 (OVA) 特異的 CD8 陽性 T 細胞，いわゆるエフェクター T 細胞の集団の変化を観察した。結果，有意とまではいえないが，低線量照射群にて脾臓中の抗原特異的エフェクター T 細胞の増加が示唆された (図 2)。

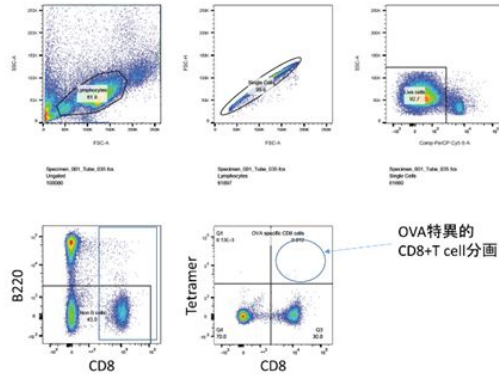


図1 フローサイトメトリーにおける OVA 特異的 CD8+ T 細胞分画の Gating strategy

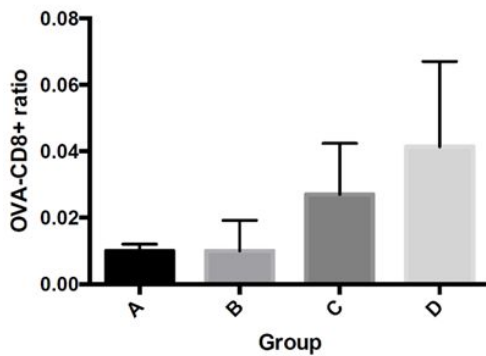


図2 各群における OVA 特異的 CD8+ T 細胞の変化

(2) 結果2 リンパ球集団の変化

同様にフローサイトメトリーを用い、図3のゲーティングを用いリンパ球の集団を評価した。NK, NKT を含め多くのリンパ球集団に変化は見られなかったが、評価した範囲では唯一、ナイーブ CD4 陽性細胞集団が照射群にて低下が認められた。

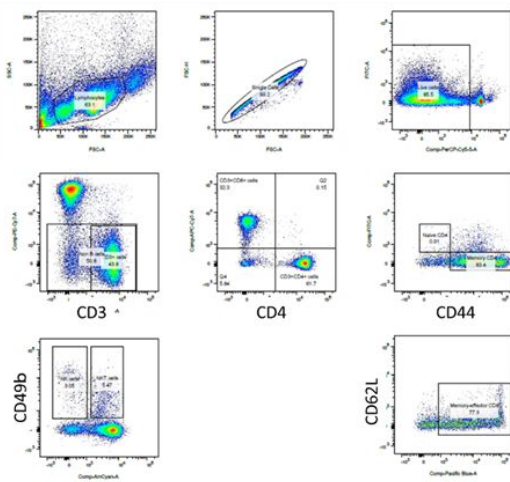


図3 フローサイトメトリーにおけるリンパ球各集団の Gating strategy

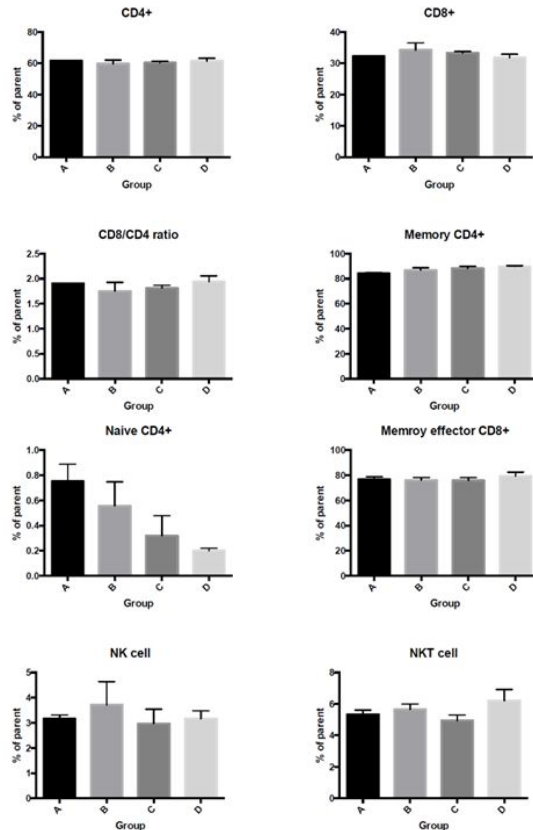


図4 各群におけるリンパ系細胞集団の変化

(3) 考察・結論

今回の実験では、OVA を使用して低線量照射が細胞性免疫に有用な影響を与えるかどうかを検討した。今回の照射プロトコルで、コントロールと比較してエフェクターT 細胞全体に有意な差は見られなかったが、OVA 抗原特異的 CD8+細胞については、その数そのものが少なかったものの、軽度の上昇が疑われた。一方、OVA 免疫+照射併用群で Naive CD4 の有意な減少がみられたが、その意義は不明である。その他のリンパ球集団については、NK, NKT を含め有意差は認められなかった。今後の課題としては、照射線量、回数、照射プロトコルを検討するとともに、さらに若い週齢(4 週齢~)より継続的に放射線照射することにより、さらに大きな変化が期待される。このために、持続的に低線量照射が行える放射性物質を含有する特殊なシートを利用することも考えられる。

本研究の結果は低線量放射線照射が抗原特異的細胞性免疫を増強させる可能性を支持するものと考えられる。これは以前の我々の研究における、低線量被曝の腫瘍生着効果の抑制について、理論的根拠のひとつとなりうるものである。

今後は、期間中に遂行できなかった、適切に誘導させた樹状細胞を併用し、全身および腫瘍内微小環境中での免疫担当細胞の分布や機能を詳細に検討することにより、低用量放

放射線を用いた免疫療法の確立を目指したい。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

河合辰哉, 芝本雄太

マウス免疫系における低用量放射線の影響

-Preliminary study-

第18回国際癌治療増感研究会

平成24年6月9日(土)

大阪大学(大阪府吹田市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

河合 辰哉 (Kawai, Tatsuya)

名古屋市立大学・医学研究科・助教

研究者番号: 70597822