

正常マウスに存在する放射線抵抗性CD4⁺ T細胞 -Bergonie-Tribondeau法則の検証を付して-

槇殿 玲子¹⁾ 伊藤 彰²⁾

1) 久留米大学医学部免疫学教室 2) エスアールエル八王子研究所細胞免疫部門

Radioresistant CD4⁺ T cells in Normal, Unprimed Mice: With verification of the Bergonie-Tribondeau law

Reiko Makidono¹⁾ and Akira Ito²⁾,

This is the first report on radioresistant CD4⁺ T cells found in normal, unprimed mice. After sublethal whole body irradiation, regular CD4⁺ as well as primitive NK1.1⁺ CD4⁺ T cells were enriched in the spleen. Since it has been well established that virgin T and B cells are highly radiosensitive, these cells were once assumed to be a unique lymphocyte population for which radiosensitivity does not follow the general law of radiation sensitivity for mammalian cells (Bergonie-Tribondeau law). These cells exhibited higher proliferative response to accessory cells than the non-irradiated control cells in the syngeneic mixed leukocyte reaction (SMLR). This indicated that virgin CD4⁺ T cells sensitized to, and readily respond to self-MHC class II molecules are radioresistant, and that their radioresistance, as activated cells, is consistent with the Bergonie-Tribondeau law.

Research Code No. : 503.9

Key words : CD4⁺ T cells, NK1.1⁺ T cells, Bergonie-Tribondeau law

Received Jun. 19, 1997; revision accepted Aug. 29, 1997

1) Department of Immunology, Kurume University School of Medicine

2) Department of Cellular Immunology, SRL Inc., Tokyo

はじめに

放射線生物学的に未分化な細胞は放射線感受性が高く、分化した細胞は感受性が低いことが知られている(所謂 Bergonie-Tribondeau Gesetz)¹⁾。これはリンパ球(T細胞, B細胞)についても確認されており, 外来抗原との接触(免疫)によって分化したこの機能細胞は放射線抵抗性である。一方抗原未感作の成熟リンパ球(virgin lymphocytes)は身体を構成する細胞の中でも最も放射線感受性が高く, *in vivo*照射によるD₃₇は1 Gy以下である。この関連より今まで非免疫正常動物には放射線抵抗性リンパ球は存在しないと考えられて来たが, 著者はそれが存在していることを見い出だし²⁾。今回この細胞群は同じ成熟T細胞の中でも, より分化した細胞の範疇に入るものなので, それらが放射線抵抗性であることはBergonie-Tribondeau法則に矛盾しないことを明らかにした。

材料ならびに方法

1) マウス: C3H/HeJ, AKR/J, C57BL/6, Balb/cの各4週齢雌マウス(SPF)を使用した。非放射では一群3-6頭, 照射では一群12-18頭とした。

2) 放射線照射: マウスを照射ケージの個室内に配置し, 医療用ライナック装置(東芝LMR-15型)で全身照射した(10MV X線, 1 Gy/min)。一部の実験では⁶⁰Co発生装置(RCR-120)を使用した。

3) 細胞表面抗原の解析(Flow cytometry): 脾細胞を以下のFluorescein (FITC), Biotin (Bio)あるいはPhycoerythrin (PE)標識モノクローナル抗体を組み合わせで染色した。それらはanti-NK1.1-Bio, anti-L3T4-PE (anti-CD4), anti-Lyt 2-Bio (anti-CD8), Avidin-FITCである。染色細胞の解析には, Becton Dickinson社製Flow cytometer [FACScan]を使用した。

4) 同系白血球混合培養(SMLC): 細胞培養にはRPMI-1640培養液(MAB社)(10%牛胎児血清, 5 × 10⁻⁵M 2-Mercaptoethanol, 50 μg/ml Streptomycin, 50U/ml Penicillinを添加)を使用した。照射及び非照射マウス脾の浮遊細胞よ

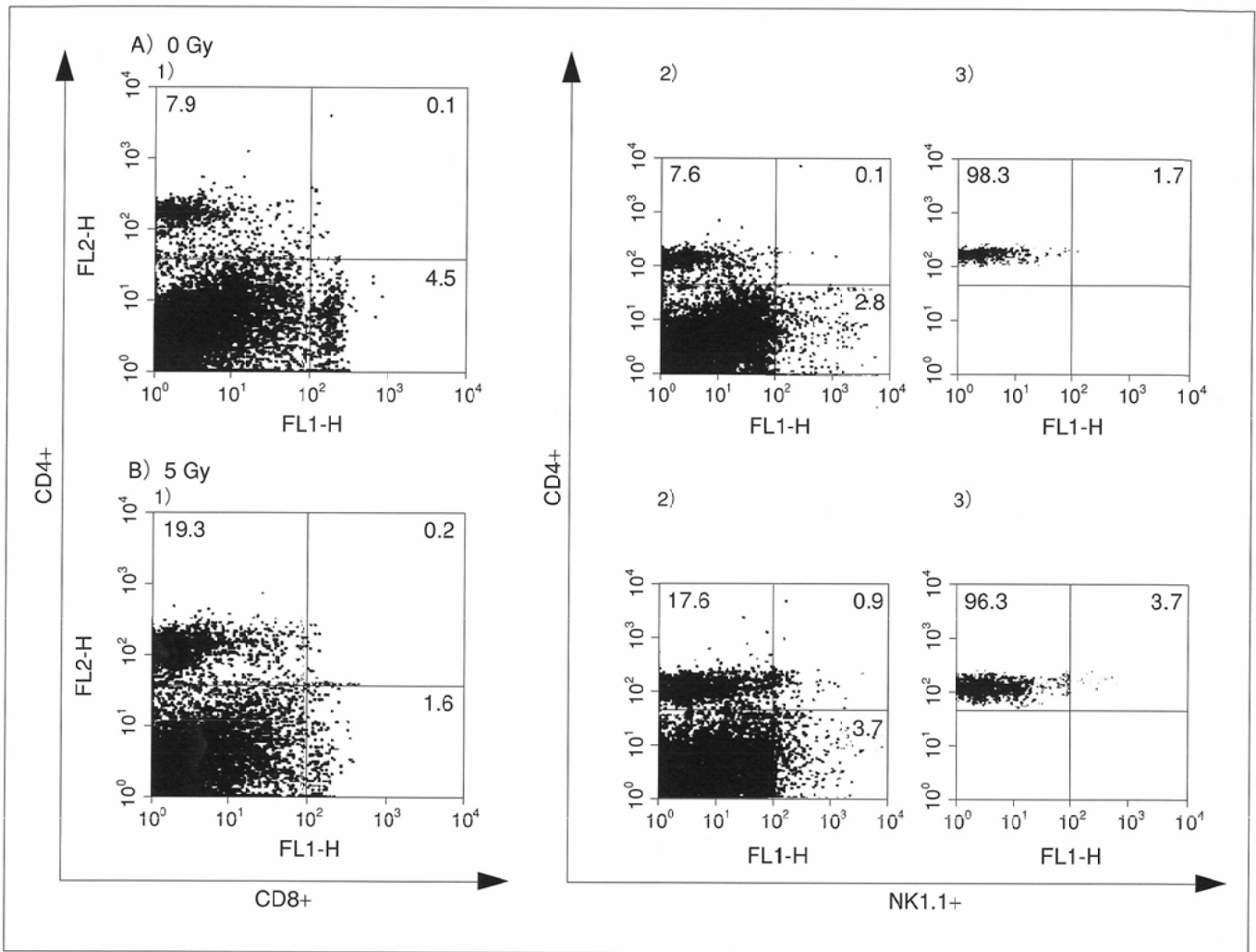


Fig.1 Flow cytometric analysis of splenic lymphocytes from (A) non-irradiated and (B) 5Gy-irradiated mice. Immunofluorescence of CD4 and CD8 [1], or CD4 and NK1.1 [2] and 3)] were analysed within a lymphocyte gate, and percentage of NK1.1+ cells among the CD4+ T cells were analysed by further setting a CD4+ lymphocyte gate[3]. Percentage of T cell subsets is presented on each quadrant of the dotplots. Results are representative of three experiments.

り抗CD4抗体(同上)を使用してpanning法によりCD4+ 細胞分離した³⁾。これをMMC(Mitomycin Kyowa S, 25 μ g/ml)で37°C, 30min処理した同系脾細胞と5日間培養し, 細胞増殖を³H]TdRの取り込みにより調べた。

5)有意差検定: Student-t testによった。

結 果

1. 非免疫正常マウスのリンパ球の放射線感受性

全身半致死線量(5 Gy)照射後脾のリンパ球数が最も減少する24時間目に, 正常C57BL/6マウス脾のリンパ球亜細胞を細胞表面抗原により調べた(Fig.1)。CD4+ T細胞の比率は全身照射によって有意に上昇した。一方CD8+細胞は比率が有意に低下し, CD4+ T細胞よりも放射線感受性が高いことが示された。別系列の分化を辿るNK1+CD4+ T細胞の比率も照射により上昇した。したがって, いずれの分化を辿る

CD4+ T細胞にも放射線抵抗性細胞が存在することが示された。

2. 非免疫正常マウスに存在する放射線抵抗性CD4+ T細胞の自己抗原反応性

Bergonie-Tribondeau法則を肯定し, また放射線抵抗性獲得のメカニズムを考察するとき⁴⁾, この細胞群は何らかの自己抗原に感作(活性化)されている可能性が考えられた。そこで非照射と照射動物の脾の, CD4+ T細胞の自己反応性をSMLRで調べた(Table 1)。いずれの系統マウスについても, 非照射動物のCD4+ T細胞に比べて5Gy照射動物のCD4+ T細胞は, 同系脾細胞に対してより強い増殖を示した(C3H/He p < 0.001, AKR/J p < 0.01, C57BL/6 p < 0.001, Balb/c p < 0.05)。SMLRは自己のMHC class II抗原に対する反応性と考えられているので, 結果は放射線抵抗性細胞群に自己のMHC class II抗原に反応する細胞の頻度が高いことを示唆した。

Table 1 Enhanced response of splenic radioresistant CD4+ T cells from sublethally irradiated normal, unprimed mice in the syngeneic mixed lymphocyte reaction (SMLR)

Dose of irradiation	responder cells		stimulator cells	
		(-)	(+)	
0 Gy	C3H/He	3577 ± 258 (cpm)	7512 ± 648 (cpm)	
	AKR/J	2056 ± 406	5551 ± 789	
	C57BL/6	1900 ± 165	7100 ± 1940	
	Balb/c	2531 ± 219	9365 ± 710	
5 Gy	C3H/He	2229 ± 322	16718 ± 658	
	AKR/J	1666 ± 244	9663 ± 490	
	C57BL/6	2005 ± 261	20451 ± 1651	
	Balb/c	1448 ± 157	12742 ± 1407	

1×10^5 responding splenic CD4+ T cells and 2×10^5 mitomycin C-treated unfractionated spleen cells as stimulators were cultured for 5 days. Cultures were pulsed with [3 H]-TdR for the last 8 hrs of culture. Each value represents the mean $\pm$ SD of triplicate cultures.

考 察

この研究によって初めて、非免疫正常マウスに自己反応性の特性を持つ、放射線抵抗性リンパ球(CD4+ T細胞)が存在することが明かにされた。(文献2, およびFig.1). 同じ特性の細胞はいずれの系統マウスでも検出された(Table 1, および未発表データ). CD4+細胞は不均一な細胞群であり、通常分化を辿るCD4+ T細胞(TcR $\alpha\beta$ + CD3^{bright})と、胸腺外でも分化し得るprimitive T細胞に属するCD4+ T細胞がある。後者にはその一部に前者にないNK1+抗原が発現している(今回これをその検出に使用した)⁵⁾. primitive T細胞(TcR $\alpha\beta$ + CD3^{int}あるいはTcR $\gamma\delta$ + CD3^{int})は、正常マウスの骨髄・胸腺・肝臓に比較的多いが、脾臓・リンパ節には少ない。

リンパ球の放射線抵抗性獲得のメカニズムは、bcl-2関連遺伝子により説明される⁴⁾. 細胞の活性化に伴い発現するこの遺伝子は、その細胞を放射線によるapoptosisから救助する。したがって、正常非免疫動物で検出される放射線抵抗性リンパ球は、照射に近い時点で活性化されている細胞群

であると解釈される。

自己MHC class II反応性のCD4+ T細胞は、腫瘍免疫反応も含めて各種免疫反応の調節性細胞として機能する可能性が示唆されている。primitive T細胞の機能や認識抗原はまだ十分に解明されていないが、これらはMHC類似のCD1あるいはそれと結合した自己抗原ペプチドあるいはリピッドを認識することが示唆されている⁶⁾. そしてその分化した細胞は、ヘルパーT細胞として機能し得ることが報告されている。いずれのCD4+ T細胞群にも放射性抵抗性細胞が存在することが示された(Fig.1). 今回の研究結果は、正常動物に存在する自己反応性T細胞を解析する、新たな手掛かりを与えるものとしても重要と考えられる。

放射線照射に協力いただいた東京女子医科大学放射線医学教室 大川智彦教授、国立国際医療センター放射線診療部 藤井恭一博士、並びに久留米大学医学部放射線医学教室諸氏に謝意を表します。この研究の一部は石橋財団の研究助成によることを付記します。

文 献

- 1) Bergonie J, Tribondeau L: Interpretation de quelques resultats de la radiotherapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. Compt Rend Acad Sci 143: 983-985, 1906
- 2) Makidono R, Kameyama A, and Yokoyama M: Autoreactive as well as antigen specific L3T4+ T cells are enriched by sublethal irradiation. Proc Jpn Soc Immunol 21 (Abstract): 166, 1991
- 3) 加藤和則: リンパ球系細胞の分離・分取法—表面活性化フラスコを用いた分離法—. Medical Immunol 25: 237-241, 1993
- 4) Conroy LA, and Alexander DR: The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis. Leukemia 10: 1422-1435, 1996
- 5) MacDonald HR: NK1.1+ T cell receptor - α/β + cells: New clues to their origin, specificity, and function. J Exp Med 182: 633-638, 1995
- 6) Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, et al: CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. Science 268: 863-865, 1995