

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09563

研究課題名（和文）ヒト T細胞による口腔癌抑制作用をニュートリゲノミクスにより制御する

研究課題名（英文）Augmenting human gamma delta T cell-based immunotherapy against oral cancer by targeting nutritional genomics

研究代表者

堂前 英資（Domae, Eisuke）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：50454559

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：口腔癌に対する養子免疫療法の開発を目的に、ヒトV_{9V}2T細胞に着目してその可能性を検討した。8種類のヒト口腔癌細胞を用いて細胞障害アッセイを行ったところ、V_{9V}2T細胞によって殺傷されることを確認した。次に細胞傷害活性に栄養条件の及ぼす影響を検討した。培地から脂質を除去した場合、また細胞膜からコレステロールをシクロクロスで取り除くことによって、この細胞傷害活性が上昇することを確認した。これらの条件では、口腔癌細胞のメバロン酸経路の活性化の上昇が確認できた。以上の結果から、V_{9V}2T細胞による口腔癌抑制において脂質を中心とした栄養状態が大きな影響を及ぼす事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療において中心的役割を果たす手術療法や放射線療法は、口腔癌治療においては顔貌や口腔機能に障害を伴うことが多いため、口腔癌の免疫療法の潜在的意義は大きい。本研究ではV_{9V}2T細胞による口腔癌抑制作用を評価し、癌細胞の栄養状態を制御することによる癌免疫を増強させる可能性を探索した。その結果、口腔癌細胞の微小環境から脂質を欠乏させることにより、メバロン酸経路の活性化を介して、V_{9V}2T細胞を効率的に活性化し、癌細胞を効率的に殺傷することを見出した。V_{9V}2T細胞による口腔癌免疫療法開発において、癌細胞の栄養状態の制御が、癌抑制を効果的にする一因であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To develop adopted immunotherapy for oral cancer, we investigated the ability of human V_{9V}2T cells to recognize and kill oral cancer in vitro.

We confirmed eight OSCC cell lines we used expressed BTN3A proteins, key molecules of phospho-antigen sensing by human V_{9V}2T cells. We also confirmed that N-BP pretreated OSCC cell lines activated V_{9V}2T cells and were killed by V_{9V}2T cells.

Next, we examined the effect of nutritional conditions on the cytotoxic activity of V_{9V}2T cells.

The cytotoxic activity was increased when lipids were removed from the culture medium or cholesterol was removed from the cancer cell membrane with cyclodextrin. We also confirmed that, under these conditions, the activity of the mevalonate pathway of oral cancer cells was increased. These results suggest that the nutritional status of lipids has a significant influence on the suppression of oral cancer cells by V_{9V}2T cells.

研究分野：口腔生化学

キーワード：ヒトV_{9V}2T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T細胞は胸腺で T細胞から別れて分化する T細胞で、T細胞受容体の組み合わせにより複数のサブセットが存在する。V 9V 2T細胞はヒトを含む霊長類にのみ存在する T細胞で、マウスなどの一般的なモデル動物には存在しない。V 9V 2T細胞の生理機能は不明な点が多いが、後述のように窒素含有ビスホスホネート (N-BPs) により活性化され、N-BPs を静脈投与された患者の発熱などの急性症状の原因であることがわかっている。また、in vitro では標的細胞に対する高い細胞傷害活性を示し、ウイルス感染細胞や癌細胞を抑制することが知られている。

V 9V 2T細胞が認識する抗原はペプチドではなく、真核生物や原核生物の代謝経路の中間代謝産物として産生される低分子リン酸化合物である。ヒトではメバロン酸経路(コレステロール合成経路)の中間代謝産物であるイソペンテニルピロリン酸 (IPP)がリン酸抗原の代表例である (*Tanaka Y, Nature, 1995*)。細胞内に IPP の蓄積が生じるのは、(1)強いストレス下にある場合や、(2)N-BPs により FPP 合成酵素が阻害されたときなどである。ウイルス感染細胞や癌細胞では、ストレス応答の一つとしてメバロン酸経路を過剰に活性化することがあり、これに伴い細胞内に IPP が蓄積する。また乳癌細胞では変異 p53 によるメバロン酸経路の過剰な活性化が報告されている (*William A, Cell, 2012*)。メバロン酸経路の FPP 合成酵素を阻害する N-BPs は、その上流の中間代謝産物である IPP の細胞内での蓄積を誘導する。この様に細胞の癌化や薬物によって生じた標的細胞内の IPP の蓄積は、V 9V 2T細胞による認識と活性化を誘導し、V 9V 2T細胞による標的細胞の殺傷を引き起こす。

最近、細胞内に蓄積した IPP を V 9V 2T細胞に提示する分子として butyrophilin-3A (BTN3A) が同定され (*Vavassori S, Nat. Immunol, 2013*)、V 9V 2T細胞の活性化機構が解明されたことから、効果的で安全な免疫療法への応用が期待されており、CD8T細胞、NK細胞などに加えて、腫瘍免疫を担う新しい細胞として期待されている。

ニュートリゲノミクスとは、栄養素・代謝物と、遺伝子発現制御との間の相互作用を明らかにする学問領域である。栄養素は細胞内で各種代謝物に変換され、生体構成成分やエネルギー源となるが、同時に、栄養素・代謝物の存在そのものが新たなシグナルとなり、遺伝子発現を介した生体機能調節につながる。

前述のようにリン酸抗原である IPP の癌細胞内での蓄積と提示が V 9V 2T細胞を活性化するが、IPP はコレステロール合成経路の中間代謝産物であり、コレステロール合成経路の ON/OFF によりその細胞内での量が変化する。コレステロールはアセチル CoA から 30 数段階の反応を経て合成されるが、一連の反応を触媒する酵素の遺伝子発現は Sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2) によって制御されている。SREBP-2 は不活性型膜タンパク質として小胞体に存在するが、細胞内のコレステロールの量の減少にともない、ゴルジ体に移行して酵素的に切断され、転写活性領域が遊離する (活性型 SREBP-2)。核へ移行した活性型 SREBP-2 はコレステロール合成経路のほとんどすべての酵素の遺伝子発現を誘導し、de novo コレステロール合成を促進する。逆に細胞のコレステロールが十分な場合は、活性化型 SREBP-2 はすみやかに分解されコレステロール合成が抑制される。したがって、V 9V 2T細胞の抗原である IPP の細胞内での合成量は SREBP-2 の活性化・抑制によって変化し、V 9V 2T細胞の活性化は、N-BPs による FPP 合成酵素阻害を介した IPP の蓄積に加えて、SREBP-2 の活性化に伴う IPP 合成量の増加によっても調節されうると考えられる。

2. 研究の目的

V 9V 2T細胞のリン酸抗原に対する反応の効率化と強力な活性化を誘導するために、ニュートリゲノミクスの観点から新しい V 9V 2T細胞の制御方法を探索・検証し、V 9V 2T細胞による効果的ながん免疫療法へ向けた基礎的知見の収集することが本研究の目的である。すなわち癌細胞の de novo コレステロール合成活性や IPP 量の変化が V 9V 2T細胞の活性化におよぼす影響を検討し、これを制御することによって、V 9V 2T細胞による口腔癌抑制の効率化を目指す。同時に、今後行われる V 9V 2T細胞を用いたがん免疫療法の臨床研究に、癌患者の脂質代謝ステータスへの配慮という視点を付け加えることが可能となる。

3. 研究の方法

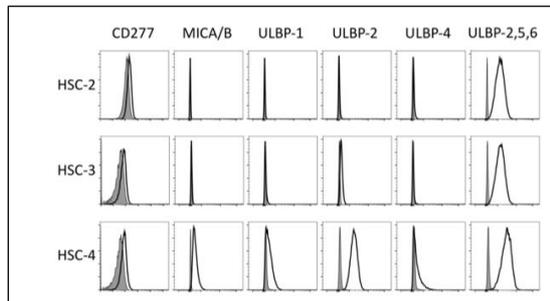
ヒト V 9V 2T細胞は、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を、窒素含有ビスホスホネート (ゾレドロン酸) とインターロイキン (IL)-2 を用いて、10%FBS 添加 RPMI にて 14 日間培養・増幅することにより得た。口腔癌細胞株 (HSC-2、HSC-3、HSC-4、SAS、Ca9-22、HO-1-N-1、KOSC-2 c13-43、SKN-3) は JCRB より入手し、10%FBS 添加 DMEM で培養した。解析の大部分は蛍光標識特異抗体を用いて、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット法にて行った。

口腔癌細胞の環境における脂質の役割を調べるために、コレステロール除去試薬としてシクロデキストリン (HPCD) を用いた。また、培地に添加する血清中の脂質の影響を調べるために、脂質除去処理済み FBS を用いた。

4. 研究成果

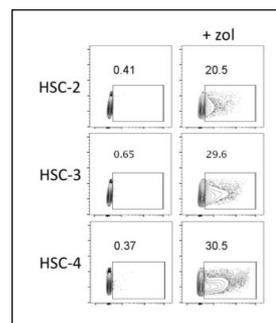
(1) 口腔癌細胞はヒト V 9V 2T 細胞が認識する抗原を発現している。

用いた 8 種類すべての口腔癌細胞で V 9V 2T 細胞に対する抗原提示分子である BTN3A の発現を確認した。また、V 9V 2T 細胞が発現する NK 受容体に対するリガンドの発現を確認した。この結果から、口腔癌細胞は V 9V 2T 細胞の標的となりうるということが明らかとなった (右図: 代表として 3 つの細胞株を示す。FACS で細胞表面抗原を染色・解析した)。



(2) ゴレドロネート処理した口腔癌細胞はヒト V 9V 2T 細胞を活性化させる。

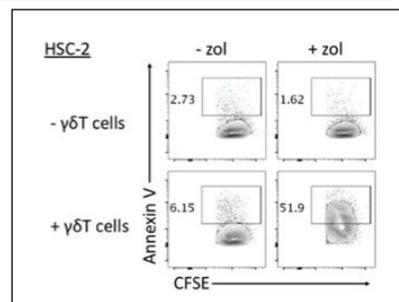
ヒト V 9V 2T 細胞を、ゴレドロネートでオーバーナイト処理した口腔癌細胞と共培養することにより、IFN の発現が誘導されることを、用いた 8 種類すべての口腔癌細胞で確認した。(右図: 代表として 3 つの細胞株を示す。左の列はゴレドロネート未処理の細胞、右はゴレドロネート処理済みの細胞と、ヒト V 9V 2T 細胞を共培養したときの、IFN 発現を細胞内染色を行い FACS にて解析したもの)



(3) ヒト V 9V 2T 細胞はゴレドロネート処理をした口腔癌細胞を殺傷する。

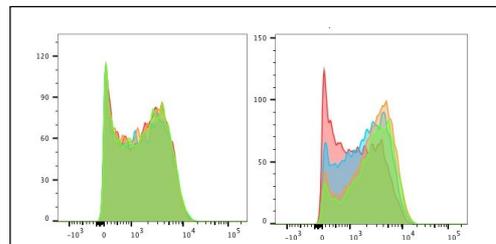
ゴレドロネートでオーバーナイト処理した口腔癌細胞は、ヒト V 9V 2T 細胞によって殺傷されることを、用いた 8 種類すべての細胞株で確認した。

(右図: 代表として 1 つの細胞株のみを示す。Annexin V 陽性細胞を死細胞として FACS で解析した。死細胞の内 CFSE で染色した癌細胞のみを細胞障害された癌細胞として解析した。)



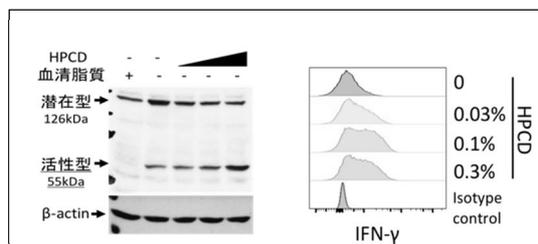
(4) 低脂質環境に置かれた癌細胞は、窒素含有ビスホスホネートによる抗原産生を介したヒト V 9V 2T 細胞の活性化を促進する。

(右図左は通常の 10%FBS 存在下で癌細胞を培養したもので、右は 10%の脂質除去 FBS 存在下で培養したものである。低脂質環境に置かれた場合では、ゴレドロネートの濃度依存的<0.03, 0.1, 0.3μM>にヒト V 9V 2T 細胞の CD69 発現が亢進した。)



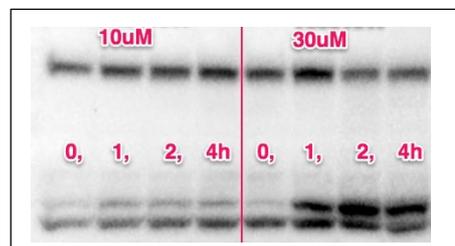
(5) シクロデキストリン (HPCD) でコレステロール量を低下させられた癌細胞は、ゴレドロネート添加によって生じる、ヒト V 9V 2T 細胞の活性化を促進する。

(右図左: SREBP2 の活性化をウエスタンブロットで検討したもの。HPCD の濃度が高くなるとコレステロール除去により SREBP2 の活性化が観察される。右図右: 口腔癌細胞に HPCD を作用させると、ゴレドロネート処理によるヒト V 9V 2T 細胞活性化効率が上昇する。)



(6) 脂質存在下での SREBP2 活性化の誘導

脂質を取り除いた培養環境や HPCD でコレステロールを除去することによって、口腔癌細胞によるヒト V 9V 2T 細胞認識と活性化が促進する事が明らかとなった。次に脂質が存在する環境で SREBP2 の活性化の誘導が可能か否かを検討した。複数の低分子化合物をスクリーニングしたところ、脂質が存在していてもコレステロール合成経路を活性化できる分子を見出すことができた(右図: SREBP2 の活性化)。現在、より効率的に SREBP2 を活性化しヒト V 9V 2T 細胞を効率的に活性化できる、類縁分子の検討を行っている。



以上の結果から、癌細胞の脂質代謝がヒト V 9V 2T 細胞の(ゾレドロネートによる)活性化に大きな影響を及ぼす事実と、それを人工的に誘導する分子が存在することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Domae E, Hirai Y, Ikeo T, Goda S, Tsuji K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Human V 9V 2 T cells show potent antitumor activity against zoledronate-sensitized OSCC cell lines.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J BUON	6. 最初と最後の頁 132-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------