

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 年度～ 2012 年度

課題番号：23890106

研究課題名（和文） T 細胞共刺激因子 B7. 2 による抗腫瘍細胞障害性 T 細胞の誘導増強機構の解析

研究課題名（英文） An analysis of the enhancement mechanism of antitumor cytotoxic T cells by B7.2

研究代表者

平岡 慎一郎（HIRAOKA SHINICHIRO）

大阪大学大学院・歯学研究科・助教

研究者番号：70615616

研究成果の概要（和文）：担癌状態にしたマウスの脾細胞を、B7. 2 とともに培養したところ、一部の腫瘍系は高率に細胞障害性 T 細胞（CTL）を誘導出来た。免疫寛容を誘導すると考えられる CTLA-4 の効果を打ち消してもあまり誘導には影響しなかった。これにより我々の実験系では、B7. 2 による CD28 への刺激が CTL 誘導への主な経路であると思われた。また我々は抗腫瘍 CTL の更なる増強を目指し、免疫を賦活する栄養剤を投与することによる増強効果についても検討をすすめているところである。

研究成果の概要（英文）：We cultured spleen cells and B7.2 of the cancer bearing mouse. As a result, we were able to induce CTL in a high ratio in a certain tumor. However, CTLA-4 was not associated with an induction mechanism of the CTL. It was suggested that stimulation to CD28 by B7. 2 was a main pathway to CTL induction in our study. Also, we investigate the enhancement effect with the immunostimulation nutrient for enhancement of antitumor CTL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、外科系歯学

キーワード：腫瘍免疫、細胞障害性 T 細胞、

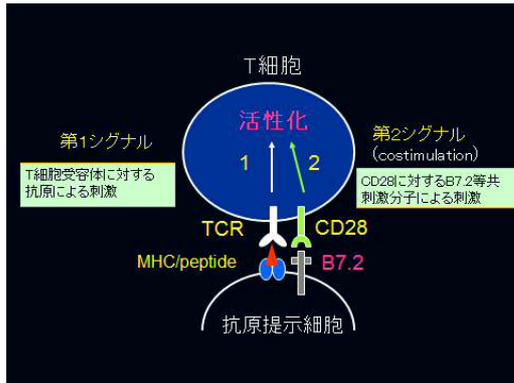
1. 研究開始当初の背景

口腔悪性腫瘍の治療法として、手術療法、化学療法、放射線療法があるが、第 4 の治療として、抗腫瘍免疫療法が注目されている。しかしながら癌細胞の巧妙な免疫回避機構により、既存の治療と比して高い治療成績を残せていないのが現状である。

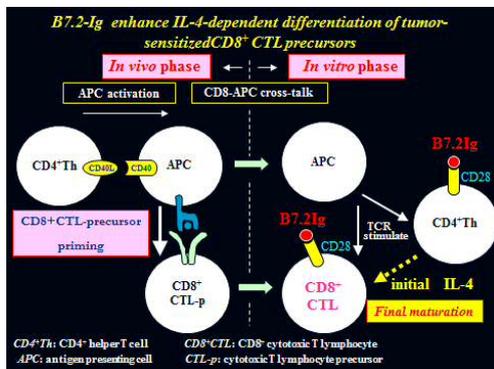
CD8+細胞傷害性 T 細胞（以下 CTL）は癌細胞を攻撃する主要なエフェクター細胞で

ある。T 細胞の活性化には、T 細胞抗原受容体（TCR）に抗原が結合することによって伝達される第一シグナルと共刺激シグナルが必要である。B7.2 は T 細胞に恒常的に発現している CD28 と結合し、共刺激シグナルを発現させる蛋白である。これらの二つの刺激によって、種々のサイトカイン産生や癌細胞への細胞障害活性などの T 細胞の様々なエフェクター機能が增强されることが知られて

いる。



申請者らは以前に、B7.2-免疫グロブリン融合タンパク (以下 B7.2) を担癌マウスへ投与することにより IL-4 依存性かつ、CD8+CTL による腫瘍拒絶が誘導されることを見いだした¹⁾。さらに担癌状態あるいは腫瘍細胞によって免疫したマウス由来の脾細胞を *in vitro* で培養したところ、抗腫瘍 CTL はほとんど誘導されなかったが、培養中に B7.2-Ig を添加すると著明に CTL が誘導増強された。B7.2-Ig 存在下であっても、非腫瘍感作脾細胞からは CTL の誘導を認めなかったため、CTL 誘導増強効果の発現には、*in vivo* で腫瘍抗原に感作された CD8+CTL 前駆細胞が必要であり、その誘導においても IL-4 が必要であることを報告している。



2. 研究の目的

本研究は、T 細胞共刺激因子 B7.2-Ig による抗腫瘍 CTL の誘導増強機構をさらに解析し、口腔癌に対する抗腫瘍免疫療法の臨床応用につながるような、抗腫瘍免疫応答の誘導メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

研究は、*in vivo* でマウス白血病細胞 (LSTRA) を接種し担癌状態にしたマウスの脾臓から、脾細胞全画分を *in vitro* で B7.2 および IL-4 刺激の存在下で培養し CTL を誘導。回収した CTL と腫瘍細胞を共培養し、CTL 細胞障

害テスト (DNA fragmentation assay) を実施し、腫瘍細胞に対する細胞障害活性を確認することが出来たが、IL-12 刺激によって CTL を誘導し、B7.2 刺激によって誘導された CTL と活性が異なるのか否か明確になっていないため、さらに検討し解析する。

また、B7.2 は、CD28 と結合することにより、T 細胞を活性化させるが、一方、同じく B7.2 と結合することにより免疫寛容を誘発すると考えられる、CTLA-4 の役割についても検討する。

・ 担癌マウスの作製

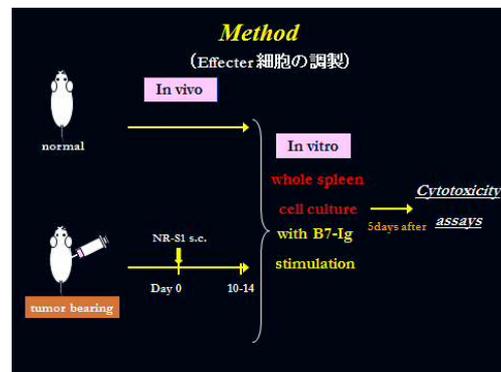
担癌マウスは、NR-S1 細胞を、CH/He マウス背部皮下に接種 (2×10⁶/マウス) し作製し、作成する。

・ 脾細胞から CTL の培養

脾細胞全画分あるいは調整した細胞集団 (5×10⁶) を予め B7.2 を 10 μg/well コーティングした 24 穴プレートで 10% FCS、2-mercaptoethanol を含む 2ml の RPMI 1640 培養液中、37°C、5% CO₂ の条件下にて 1~5 日間培養し CTL を作成する。

・ 細胞傷害活性の検出

抗腫瘍性細胞傷害活性の測定は DNA fragmentation assay にて行う。標的細胞 (2×10⁶) を 200kBq [3H] thymidine 含有の 10ml 培養液で一晩培養し、その培養細胞 (1×10⁴) と種々の細胞数のエフェクター細胞を平底 96 穴プレートで 6 時間共存させ培養する。その後、マイクロプレートハーベスターにて細胞をフィルターに回収し DNA fragmentation をシンチレーションカウンターで計測する。



4. 研究成果

in vivo でマウス扁平上皮癌細胞 (NR-S1) または免疫原性の非常に強いマウス白血病細胞 (LSTRA) を接種し担癌状態にしたマウスの脾臓から、脾細胞全画分を *in vitro* で B7.2 の存在下で培養し細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導を試みたところ、CTL 細胞障害テスト (DNA fragmentation assay) において、LSTRA に対しては高率に CTL を誘導することが証明出来た。一方 NR-S1 においては、CTL の誘導が充分に行えなかった。一因としては白血病

細胞に比して扁平上皮癌細胞の免疫原性が低いことが考えられた。同じく B7.2 と結合することにより免疫寛容を誘発すると考えられる CTLA-4 に対して、それを無効化するために抗 CTLA-4 抗体を添加し、CTL の誘導増強を試みたが、本実験系では CTL の誘導増強は認めなかった。これにより本系では B7.2 による CD28 への刺激が CTL 誘導への主経路であると強く示唆された。また本系において CTL の更なる増強を目指し、免疫を賦活する栄養剤を投与することによる増強効果についても検討をすすめているところである。

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 Yasunari Morimoto, Suguru Hamada, Takafumi Ogura, Hirokazu Nakahara, Akifumi Enomoto, Takayuki Uchihashi, Shin-ichiro Hiraoka, Mikihiko Kogo, A case of malignant melanoma discovered as a result of metastatic disease of the temporomandibular joint. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 査読あり、Volume 25, Issue 1 (2013) 74-78
- ② Shin-ichiro Hiraoka, Makoto Adachi, New Strategies for Perioperative Nutrition Control for Patients with Locally Advanced Oral Cancer. *Dentistry*, 査読あり、2,(2012) e109
- ③ 浜口 裕弘, 松岡 裕大, 磯村 恵美子, 永谷 俊介, 占部 一彦, 川寄 康大, 西野 仁, 平岡 慎一郎, 鏡内 肇, 大阪大学歯学会雑誌、査読あり、56 巻 2 号、(2012) 119-122
- ④ 平岡 慎一郎, 伊藤 章, 木全 正彰, 森本 泰成, 古郷 幹彦, 北村 龍二, 下顎打撲を契機に発症した急性化膿性顎関節炎の 1 例. *日本口腔外科学会雑誌*、査読あり、57 巻 11 号 (2011) 596-600

[学会発表] (計8件)

- ① 平岡 慎一郎, 伊藤 章, 田中 徳昭, 相川 友直, 大倉 正也, 古郷 幹彦, 口腔癌術後患者に対する EPA と Probiotics 強化栄養剤併用投与の効果について 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会, 学術大会 2013 年 1 月 24 日, 東京都千代田区

- ② 伊藤 章, 平岡 慎一郎, 田中 徳昭, 相川 友直, 大倉 正也, 当科 35 年にわたる扁平上皮癌の臨床的検討 第 31 回日本口腔腫瘍学会総会, 学術大会, 2013 年 1 月 24 日, 東京都千代田区
- ③ 小橋 寛薫, 向井 隆雄, 田中 徳昭, 原田 丈司, 平岡 慎一郎, 大倉 正也, 古郷 幹彦, 長期経過をたどった石灰化を伴う硬口蓋粘表皮癌の 1 例, 第 36 回日本頭頸部癌学会学術集会 2012 年 6 月 7 日, 島根県松江市
- ④ 平岡 慎一郎, 伊藤 章, 山西 整, 大倉 正也, 古郷 幹彦, 北村 龍二, 糖尿病・慢性関節リウマチ罹患、頬粘膜癌患者に対する PGA シート+フィブリン糊スプレーによる創面被覆法の使用経験 第 30 回日本口腔腫瘍学会総会, 学術大会 2012 年 1 月 26 日 埼玉県さいたま市、
- ⑤ 川寄 康大, 松岡 裕大, 西野 仁, 平岡 慎一郎, 磯村 恵美子, 浜口 裕弘, 下顎骨に発生した紡錘細胞癌の 1 例 第 56 回日本口腔外科学会総会、学術大会 2011 年 10 月 23 日 大阪府大阪市
- ⑥ 伊藤 章, 大西 淑美, 松岡 裕大, 木全 正彰, 平岡 慎一郎, 北村 龍二, 関西労災病院における BRONJ の治療と予防の試み 第 56 回日本口腔外科学会総会、学術大会 2011 年 10 月 23 日 大阪府大阪市
- ⑦ 平岡 慎一郎, 伊藤 章, 岸野万伸, 古郷 幹彦, 北村 龍二, 顔貌に変形をきたした鼻口蓋管嚢胞の 1 例 第 56 回日本口腔外科学会総会、学術大会 2011 年 10 月 22 日 大阪府大阪市
- ⑧ 平岡 慎一郎, 伊藤 章, 大倉 正也, 古郷 幹彦, 北村 龍二, 舌に生じた紡錘細胞癌の 1 例 第 35 回日本頭頸部癌学会学術集会 2011 年 6 月 9 日 愛知

県名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 慎一郎 (HIRAOKA SHINICHIRO)

大阪大学大学院・歯学研究科・助教

研究者番号：70615616