

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890196

研究課題名(和文) がん免疫治療のサロゲートマーカーの確立、並びに効果増強手段としての温熱療法の検討

研究課題名(英文) Establishment of the surrogate marker of cancer immunotherapy and the study of hyperthermia as the method of increased efficacy

研究代表者

岡山 哲也 (Okayama, Tetsuya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30636535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：がん免疫治療のサロゲートマーカーとして末梢全血IFN γ 産生能を検討した。免疫治療を行った担癌マウス末梢全血をPHA刺激しIFN γ 産生能を検討したが、治療群で上昇したが、上昇は僅かであり、別法での検討を要した。

次にConAにて刺激した所、刺激時間や濃度に比例してIFN γ 産生上昇を認めたとしたが、検出濃度が低かったため、ConA濃度を上げての検討も行ったが、若干の上昇は認めたとしたが、マーカーとしての使用は困難と思われた。次にIFN γ のmRNAでの検討を行い、24時間刺激にて優位に上昇を認め、測定手法を確立した。

当初は引き続き免疫細胞を培養し治療を行う予定であったが、これらの検討は今後行う事となった。

研究成果の概要(英文)：We investigated IFN γ production in the peripheral whole blood as surrogate marker for cancer immunotherapy. We investigated IFN γ production by stimulating with PHA in tumor-bearing mice that was subjected to immunotherapy. IFN γ production was increased in treatment group, but the increase of IFN γ production was slight, so it was required to consider alternative methods.

Next, we stimulated the peripheral whole blood with ConA, IFN γ production increased in proportion to the concentration and stimulation time, but because detected production concentration was low, we examined increasing ConA concentrations. The result was IFN γ production increased slightly, but we thought it was difficult to use this method as a marker. Then we examined mRNA in IFN γ , in 24 hours stimulation, mRNA in IFN γ was increased predominantly, so we have established a measurement technique.

At first, we planned to be cultured immune cells and treated with immune cells, these studies was decided to do next.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学一般(含心身医学)

キーワード：癌免疫療法 サロゲートマーカー IFN γ

1. 研究開始当初の背景

がんに対するがん免疫療法の問題点として、免疫治療介入における抗腫瘍効果を反映する適切なマーカーが存在しない事、また免疫療法を行う際の抗腫瘍効果増強の方法論が確立されていない事である。

申請者らの以前の検討にて、免疫治療を行うことによる効果判定のマーカーとして、末梢全血でのIFN産生能が、全生存期間と相関する可能性を示唆するデータを得た。

また、申請者らは以前からがん治療として温熱療法を積極的に行っているが、近年温熱療法が腫瘍免疫に有利な作用を及ぼすことが判明してきた。

2. 研究の目的

がんに対する免疫療法の問題点に対し、末梢血のIFN産生能が、各種免疫療法の効果判定のサロゲートマーカーとなりうるかどうかの基礎的検討、また加えて、効果増強の方法論に対し、各種免疫療法に対して、温熱療法を加えることで、免疫療法の効果増強がされ得るかどうかの基礎的検討を目的とした。

3. 研究の方法

本研究の方法として、初めにサロゲートマーカーとしての、末梢全血でのIFN産生能を非担癌マウスにて検討し、末梢全血のIFN産生能を測定する適切な刺激試薬の判別、刺激濃度、刺激時間を検討し、その後担がんマウスモデルにおけるIFN産生能を測定し、再現性を検討する予定を立てた。さらにマウス脾臓より、ナイーブT細胞や高純度NK細胞を培養する方法を確立し、これらの細胞を担癌マウスモデルに投与することでの、抗腫瘍効果の検討をすると同時に末梢血のIFN産生能などを測定し、サロゲートマーカーについての検討、加えて、担がんマウスモデルにおける、自家ワクチン接種による末梢血のIFN産生能などについての検討を行う予定を立てた。

サロゲートマーカーとしての、マウス末梢全血のIFN産生能を、まず担癌マウスに対して、コントロール群、非ナイーブリンパ球投与群、ナイーブリンパ球投与群にて末梢血を採取し、ヒトでの検討を踏まえて、PHAにて刺激を行い、IFN産生能を検討した。PHA濃度については、他の研究者の検討から、PHA濃度を推定し、検討を行った(25 µg/ml)。IFN産生能は、治療群で上昇を認めしたが、ヒトでの場合のように、今後抗腫瘍効果のマーカーとして使用できる程の上昇は認めず、また感度もELISAにての推奨感度下限であったため、方法を変えての検討が必要となった。

そこで、共同研究者らと再度、刺激薬剤について検討を行い、ConA(Concavalin A)を使用し、再度検討を行った。

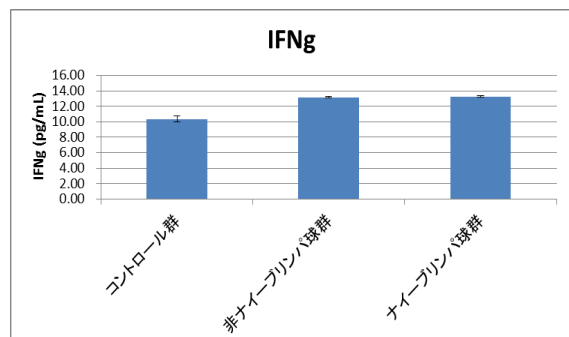
当初、ヒトでの場合と同様にIFN産生能については、ELISAにての検討を予定し、実際に、マウス末梢全血に対してConA刺激を行い、ELISAにてIFNの産生能を検討したところ、刺激時間や刺激濃度に比例して、IFNの産生上昇を認めたが、検出濃度は、ELISAでの推奨濃度以下であったため、更に濃度を上げての検討も行ったが、若干の上昇は認められたものの、PHAでの刺激の場合と同様に、今後の抗腫瘍効果のサロゲートマーカーとしての使用は困難と思われたため、再度議論を行い、IFN産生について、末梢全血でのmRNAを測定する方法を行うこととした。

mRNAでの検討にて、24時間刺激において、それ以前の時間に比べて、優位にIFNのmRNA発現の上昇を認めた。ConAの濃度については、低濃度での刺激が最も上昇を認め、高濃度では、メカニズムは不明であるが、更なる上昇は認めなかった。上昇の程度も、今後の抗腫瘍効果検討に対して使用できる程の上昇を認めたため、mRNAでの測定を、今後の検討手法とすることとした。

当初、これらの検討に引き続き、マウス脾臓より、ナイーブリンパ球やNK細胞培養を行う予定としていたが、前述のIFN測定についての検討に時間を要し、さらに研究協力をしている他のグループにて培養法の再検討が行われ、現在も検討を行っているため、以降に予定していた担癌マウスに対しての、ナイーブリンパ球やNK細胞による治療介入の検討は今後の検討課題となった。

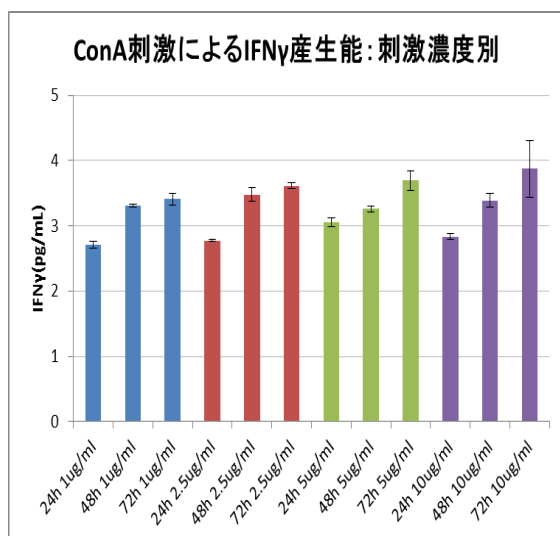
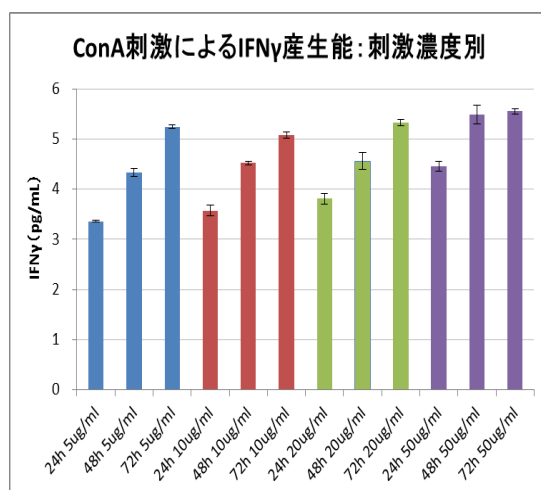
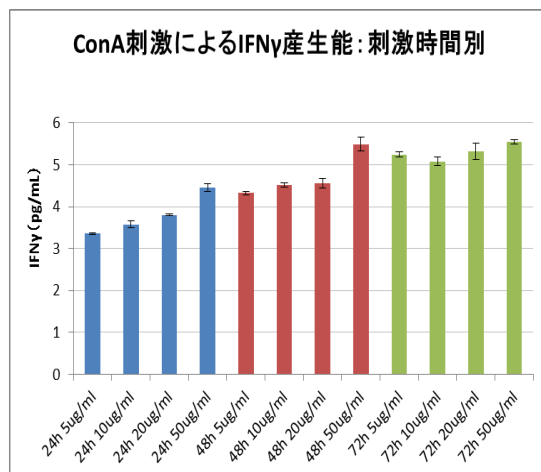
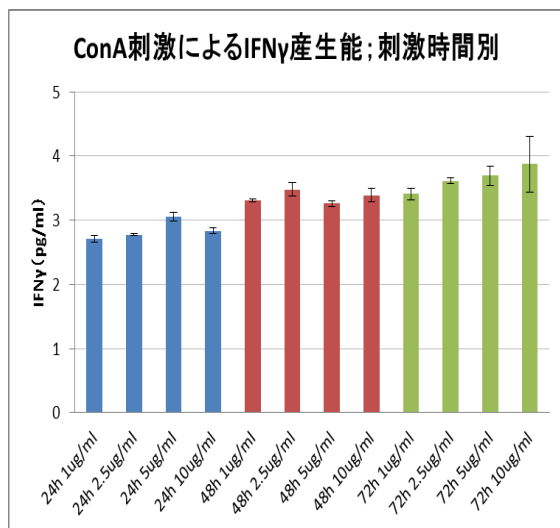
4. 研究成果

担癌マウスに対して、コントロール群、非ナイーブリンパ球治療群、ナイーブリンパ球治療群における末梢全血にてのIFN産生能の検討を行った。この検討では、ヒトの場合と同様に末梢全血をPHAにより刺激した。結果は、下記グラフに示すように、治療群にてコントロール群に比べ上昇を認めしたが、引き続きの抗腫瘍効果のマーカーとして使用できる程は上昇せず、また、ELISAの実測値も推奨感度下限であった。



上記の結果を踏まえ、刺激薬剤について再検討を行い、ConA (Concanavalin A) を使用し、再度検討を行った。

当初、ヒトでの場合と同様にIFN 産生能については、ELISAにての検討を予定し、実際に、マウス末梢全血に対してConA刺激を行い、ELISAにてIFN の産生能を検討したところ、刺激時間や刺激濃度に比例して、IFN の産生上昇を認めましたが、検出濃度は、ELISAでの推奨濃度以下であり、今後の抗腫瘍効果の検討にての使用は困難と思われた。

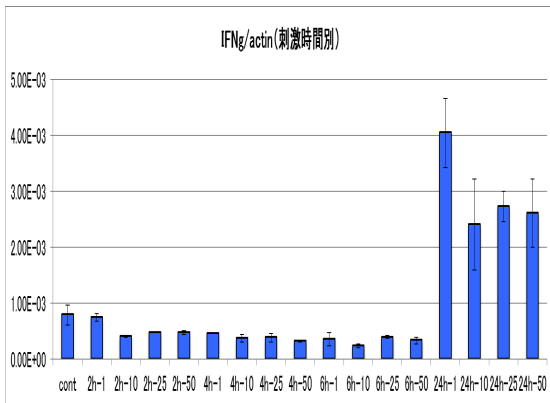
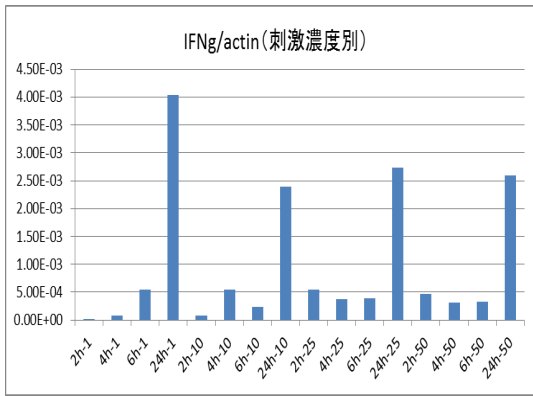


測定方法について、再度検討を行い、IFN 産生について、ELISAでの検討は、マウスにおいては、抗腫瘍効果の検討に使用することは困難と思われたため、共同研究者らとの協議を行い、末梢全血でのIFN の mRNA を測定する方法に変更して行うこととした。

mRNAでの検討にて、24時間刺激において、それ以前の時間に比べて、優位にIFN の mRNA 発現の上昇を認めた。

ConAの濃度については、低濃度での刺激が最も上昇を認め、高濃度では、メカニズムは不明であるが、更なる上昇は認めなかった。上昇の程度も、今後の抗腫瘍効果検討に対して使用できる程の上昇を認めたため、mRNAでの測定を、今後の検討手法とすることとした。

更にConAの濃度を上げての検討も行ったが、若干の上昇は認めたものの、PHAでの刺激の場合と同様に、今後の抗腫瘍効果のサロゲートマーカーとしての使用は困難と思われる結果であった。



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)
 該当無し

6. 研究組織
 (1)研究代表者
 岡山 哲也 (Tetsuya Okayama)

研究者番号 : 30636535