

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24148

研究課題名（和文）コレステロール代謝の修飾によるCD8+T細胞の抗腫瘍活性の増強効果の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of enhancing antitumor activity of CD8 + T cells by modifying cholesterol metabolism

研究代表者

三島 健史（Mishima, Takefumi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・専門研究員

研究者番号：70848473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：成分の明らかな無血清培養系を用いて様々なコレステロール合成阻害剤を添加し誘導したLAK細胞の細胞障害活性を放射性クロム遊離試験で評価し、各LAK細胞における免疫チェックポイント分子（PD-1遺伝子）発現を定量PCR法で検討した。LAK細胞の細胞障害活性の誘導にはLAK細胞のコレステロール量が関与していること、さらに細胞の疲弊マーカーであるPD-1分子発現機序についてコレステロール代謝が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、高い細胞障害活性を有するLAK細胞を誘導するためには、LAK細胞のコレステロール量が重要であることが示唆された。さらに、がん免疫療法においてPD-1などの免疫疲弊分子の発現には免疫細胞の細胞膜コレステロールが重要な役割を担っていることが考えられ、今後、免疫細胞のコレステロール代謝制御による免疫療法の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The cytotoxic activity of LAK cells induced by adding various cholesterol synthesis inhibitors using a serum-free culture system was evaluated by a radioactive chromium release test, and PD-1 gene expression of each LAK cell was evaluated by quantitative PCR. It was suggested that the amount of cholesterol in LAK cells is involved in the induction of cytotoxic activity of LAK cells, and that cholesterol metabolism is involved in the mechanism of PD-1 molecule expression.

研究分野：外科系歯学

キーワード：免疫治療 LAK細胞 ステロール代謝 免疫チェックポイント分子 PD-1 Zoledronic Acid 顎骨壊死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究室では、基礎栄養培地に添加するホルモンや増殖因子について癌細胞に対する Lymphokine-activated killer (LAK)細胞の細胞障害活性の誘導を指標に検討し、常に高い細胞障害活性を有する LAK 細胞を誘導可能な無血清培地 (RD4F)を開発した。また、同培地を用いて誘導した LAK 細胞を用いて口腔癌患者に対する細胞治療を行い、従来の治療と併用することにより全生存率を向上させることを報告してきた。さらに、細胞増殖にとって必須であり無血清培養を行う上で不可欠と考えられていたインスリンが LAK 細胞の細胞障害活性の誘導を抑制することを明らかにした。そこで代表研究者は、インスリンの細胞障害活性の誘導抑制作用は、LAK 細胞(特に CD8+T 細胞)のコレステロール代謝を修飾することによって制御されているという仮説をたてた。そしてそれを証明するために、無血清培養系を用いて各種コレステロール合成阻害剤(Lovastatin, Zoledronic acid, AY9944, Triparanol)の CD8+T 細胞の細胞障害活性の誘導ならびに免疫チェックポイント分子の発現に及ぼす影響について検討した。

2. 研究の目的

本研究において、CD8+T 細胞のコレステロール代謝が細胞障害活性の誘導に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。血清添加培地を用いて CD8+T 細胞を培養した場合、血清中に含まれるさまざまな脂質の影響を排除することが不可能であるが、申請者の所属する研究室では、成分の明らかな無血清培養系を用いて CD8+T 細胞の誘導ができるため、CD8+T 細胞の脂質代謝が細胞障害活性の誘導に及ぼす影響について詳細に検討することが可能であった。

3. 研究の方法

(1) 健康人ボランティアから採血した末梢血より Ficoll-Conray 比重遠心法にて末梢血リンパ球 (PBL) を分離し、当科で開発した無血清培地 RD4F と免疫活性化物質 IL-2 及びインスリンや各コレステロール合成阻害剤(Lovastatin, Zoledronic acid, AY9944, Triparanol)を添加し培養した(図1)。培養6日目に LAK 細胞を回収し、Cell Sorter にて CD8+T 細胞を分取し、 $[^{51}\text{Cr}]$ 遊離試験にて細胞障害活性試験を行い、インスリンならびに各コレステロール合成阻害剤の CD8+T 細胞の細胞障害活性の誘導に及ぼす影響について検討した。

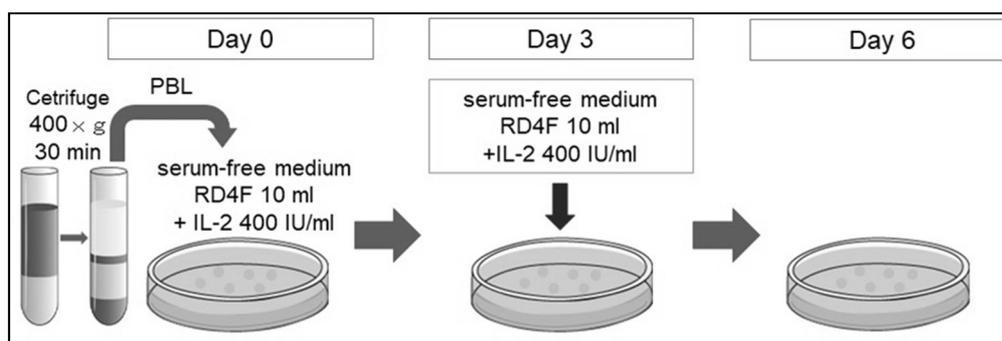
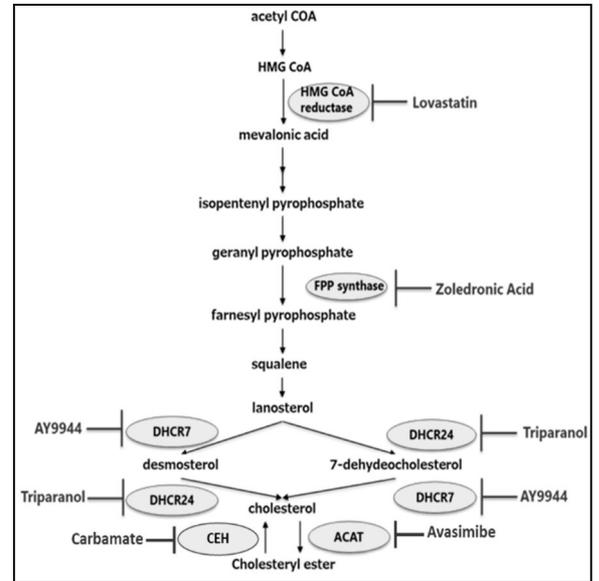


図 1. CD8+T 細胞の培養スケジュール

実験 1 で誘導した CD8+T 細胞における各コレステロール合成阻害剤(Lovastatin, Zoledronic acid, AY9944, Triparanol)の免疫チェックポイント分子 PD-1 遺伝子発現に及ぼす影響を定量 PCR 法にて検討した。(図 2)

図 2. コレステロール合成経路と阻害剤



4. 研究成果

Lovastatin を 0、0.5、1、2 μM の濃度で添加し LAK 細胞を誘導した結果、Lovastatin は LAK 細胞の A431 細胞に対する細胞障害活性の誘導 7654321 を E : T ratio 5、10、20 において濃度依存的に抑制し、Lovastatin 2 μM では有意差を認めた(図 3A)。また、Lovastatin は Control と比較し PD-1 遺伝子発現を亢進し、Lovastatin 0.5 μM 、2 μM で有意差を認めた(図 4A)。

Zoledronic acid を 0、1、5、10、20、30 μM の濃度で添加し LAK 細胞を誘導した結果、Zoledronic acid は LAK 細胞の A431 細胞に対する細胞障害活性の誘導を Zoledronic acid 1、5 μM の低濃度で亢進したが、それ以上の高濃度の Zoledronic acid は LAK 細胞の A431 細胞に対する細胞障害活性の誘導を抑制し、E : T ratio 20 において Zoledronic acid 5、20、30 μM で有意差を認めた(図 3B)。また、Zoledronic acid は Control と比較し PD-1 遺伝子発現を 1-5 μM で抑制し、10 μM 以上で亢進した。Zoledronic acid 30 μM で有意差を認めた(図 4B)。

AY9944 を 0、0.5、1、2 μM の濃度で添加し LAK 細胞を誘導した結果、AY9944 は LAK 細胞の A431 細胞に対する細胞障害活性の誘導を E : T ratio 10、20 において、すべての濃度で有意に抑制した(図 3C)。また、AY9944 は Control と比較し PD-1 遺伝子発現を濃度依存的に亢進し、AY9944 0.5、1、2 μM で有意差を認めた(図 4C)。

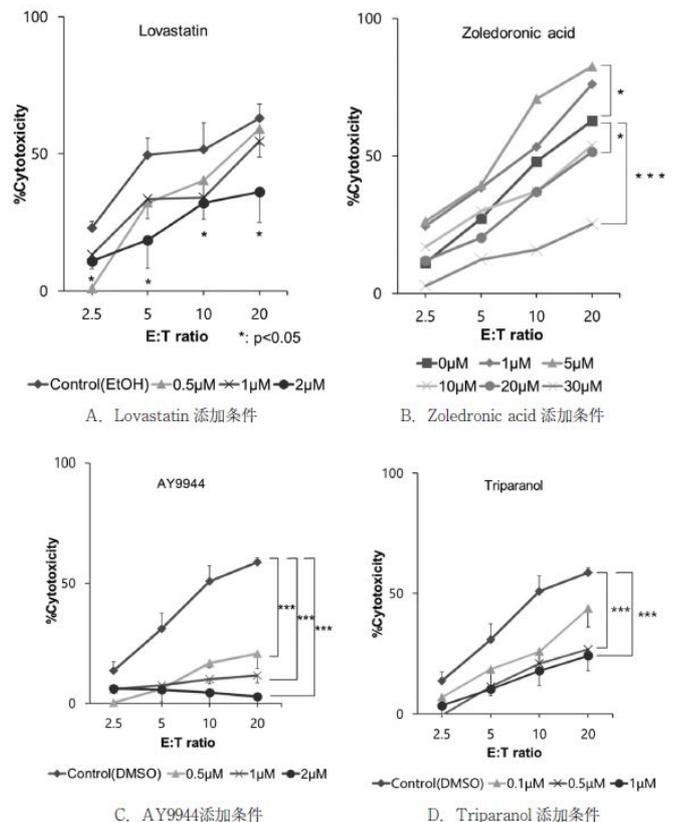


図 3 LAK 細胞の細胞障害活性の誘導に及ぼすコレステロール合成阻害剤の影響

Triparanol を 0、0.5、1、2 μM の濃度で添加し LAK 細胞を誘導した結果、Triparanol は LAK 細胞の A431 細胞に対する細胞障害活性の誘導を E : T ratio 20 において、Triparanol 0.5、1 μM で有意に抑制した (図 3D)。また、Triparanol は Control と比較し PD-1 遺伝子発現を亢進し、Triparanol 0.1、0.5、1 μM で有意差を認めた (図 4D)。

本研究により、高い細胞障害活性を有する LAK 細胞を誘導するためには、LAK 細胞のコレステロール量が重要であることが示唆された。さらに、がん免疫療法において PD-1 などの免疫疲弊分子の発現には、免疫細胞の細胞膜コレステロールが重要な役割を担っていることが考えられ、今後、免疫細胞のコレステロール代謝制御による免疫療法の有用性が示唆された。

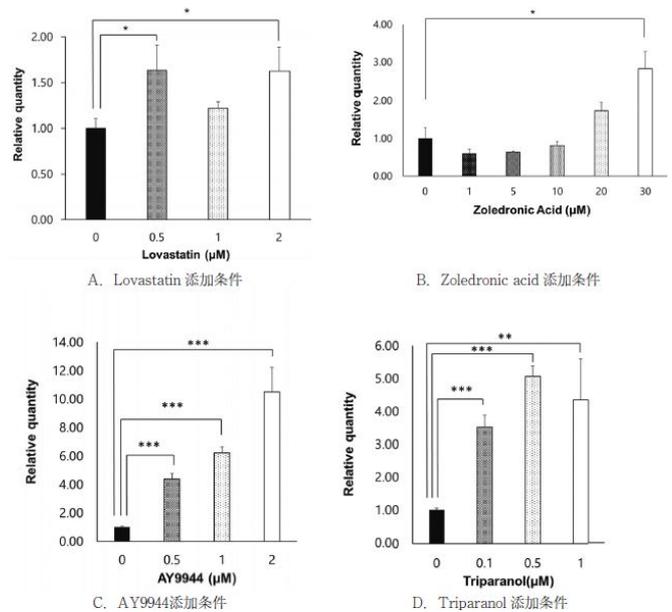


図 4 コレステロール合成阻害剤による LAK 細胞の PD-1 遺伝子発現に及ぼす影響

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 0件）

1. 著者名 三島健史	4. 巻 第 29 巻 2 号
2. 論文標題 無血清培養系を用いたLymphokine-activated killer cellの細胞障害活性の誘導におけるインスリン及びコレステロールの機能解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 口腔組織培養学会誌	6. 最初と最後の頁 1-12 頁
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三島健史, 谷亮治, 松井健作, 内迫香織, 濱田充子, 虎谷茂昭, 岡本哲治
2. 発表標題 Lymphokine-activated killer細胞の細胞障害活性の誘導に及ぼすコレステロール合成阻害剤の影響（口演）
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三島健史, 谷亮治, 松井健作, 内迫香織, 濱田充子, 虎谷茂昭, 岡本哲治
2. 発表標題 Lymphokine-activated killer 細胞の細胞障害活性の誘導に及ぼすコレステロール合成阻害剤の影響
3. 学会等名 第18回中四国口腔癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三島健史, 谷亮治, 松井健作, 内迫香織, 濱田充子, 虎谷茂昭, 岡本哲治
2. 発表標題 Lymphokine-activated killer 細胞の細胞障害活性の誘導におけるインスリン及びコレステロールの機能解析
3. 学会等名 第56回口腔組織培養学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内迫香織, 濱田充子, 三島健史, 松井健作, 谷亮治, 虎谷茂昭, 岡本哲治
2. 発表標題 無血清培養系を用いた扁平上皮癌細胞の放射線耐性獲得機構の細胞内分泌学的機能解析
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔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