

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20574

研究課題名(和文) V<sub>9V</sub> 2T細胞を用いた口腔癌の新規免疫細胞療法の開発研究課題名(英文) Evaluation of anti-tumor activity of V<sub>gamma9Vdelta2</sub> T cells against human OSCCs.

研究代表者

辻 要 (TSUJI, Kaname)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80632083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：V<sub>9V</sub> 2 T細胞はヒト末梢血の主要な T細胞でリン酸抗原を特異的に認識する。このV<sub>9V</sub> 2 T細胞は複数種類のがん細胞を殺傷することが知られているが、口腔癌を抑制するか否かは不明である。本研究では、口腔癌細胞がV<sub>9V</sub> 2 Tによって特異的に認識されることが明らかとなった。またゾレドロンートを作用させた口腔癌細胞はV<sub>9V</sub> 2 Tによるサイトカイン産生を誘導することが明らかとなった。更にゾレドロンートを作用させた口腔癌細胞はV<sub>9V</sub> 2 T細胞によって効率的に殺傷されることが明らかとなった。以上の結果からV<sub>9V</sub> 2 T細胞を用いた免疫療法が口腔癌治療に適用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：V<sub>9V</sub> 2 T cells, the major subset of the human peripheral blood T-cell, respond to microbial infection and stressed cells through the recognition of phosphoantigens. V<sub>9V</sub> 2 T cells kill a broad range of tumors, including breast cancers, colon carcinomas, lymphomas, melanomas, myelomas, and prostate cancers. However, there has not been an examination of whether V<sub>9V</sub> 2 T cells would target oral carcinomas. We demonstrated that oral carcinoma cell lines were recognized by V<sub>9V</sub> 2 T cells via specific ligand/ receptor interactions. Zoledronate-treated oral carcinomas triggered cytokine production of V<sub>9V</sub> 2 T cells. In addition, co-culturing zoledronate treated oral carcinomas and V<sub>9V</sub> 2 T cells resulted in effective tumor cell lysis. Our findings could contribute to the development of novel immunotherapy for oral carcinomas.

研究分野：口腔外科学

キーワード：V<sub>9V</sub> 2T細胞 口腔癌

### 1. 研究開始当初の背景

わが国の口腔・咽頭癌の全悪性腫瘍に占める割合は約 2%であり、早期癌の場合は手術単独療法、放射線単独療法が、進行癌では手術・放射線・化学療法を用いた三者併用療法が標準治療となる。しかしながら、治療の中心となる手術療法や放射線療法による口腔機能障害や審美障害による QOL の低下は克服すべき課題であり、より患者負担の少ない治療法の必要性は依然として高い。口腔癌を含む頭頸部癌の多くは終末動脈血行支配を受けており、選択的動脈内投与により細胞傷害活性を持つ細胞を効率的に癌組織に送り込むことが可能であるため、免疫療法を適応できる可能性が高い。

T 細胞は末梢血 T 細胞の 2-5% 程度を占める細胞で、その中でも V 9V 2T 細胞が主な T 細胞サブセットである。V 9V 2T 細胞は高い細胞傷害活性とサイトカイン産生能を示し、さらに貪食能・抗原提示能を有する。V 9V 2T 細胞の特異抗原はメバロン酸経路の中間代謝産物である Isopentenyl Pyrophosphate (IPP) であり、メバロン酸経路が過剰に活性化した癌細胞内に蓄積することが知られている。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、V 9V 2T 細胞活性化の分子機構が解明されたことから、効果的で安全な免疫細胞療法への応用が期待されている。

### 2. 研究の目的

口腔癌に対する免疫細胞療法の有効性を確かめる基礎研究を行う。対象とする細胞はヒト V 9V 2T 細胞で、その理由は、(1) 高い細胞傷害活性を持ち、(2) 抗腫瘍作用のあるサイトカインを産生し、(3) 多くの癌細胞に有効であり、(4) 抗癌剤の併用により細胞傷害効率が上昇することが知られており、また (5) GMP グレードの医薬品のみで増殖させることができトランスレーショナルリサーチに有利であること、などである。

口腔癌に対する V 9V 2T 細胞の有効性を明らかにし、他の治療法を補う免疫細胞療法開発のための基礎的知見を得ることが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

ヒト口腔癌細胞株は SAS, Ca9-22, HSC-4, HO-1-N-1, HSC-2, HSC-3, KOSC-2, KON, SCC-4, SKN-3 をもちいた。

ヒト口腔癌細胞の NKG2D Ligands (MICA, MICB, ULBP1-6) と CD277 の発現をフローサイトメトリーで解析した。

ヒト末梢血単核細胞を IL-2 と zoledronate 存在下で 2 週間培養し、V 9V 2T 細胞を増幅させ、V 9V 2T 細胞が 94% 以上を占める

細胞集団を得た。これを ex vivo-expanded V 9V 2T 細胞として実験にもちいた。

zoledronate 存在下で 18 時間培養したヒト口腔癌細胞を、V 9V 2T 細胞と 4 時間共培養し、V 9V 2T 細胞の活性化を誘導した。

Zoledronate 処理をした口腔癌細胞と共培養した V 9V 2T 細胞を固定・膜透過処理をし、細胞内のインターフェロンの有無をフローサイトメトリーで評価した。

また、V 9V 2T 細胞と共培養した口腔癌細胞を蛍光標識 Annexin V で染色し、フローサイトメトリーで細胞死の誘導を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 口腔癌細胞は NKG2D ligands と V 9V 2T 細胞受容体のリガンドである CD277 を発現する。

図 1 に示すように実験に用いたすべての口腔癌細胞は 1 種類以上の NKG2D Ligand を発現していた。また抗原提示分子である CD277 もすべての口腔癌細胞で発現が認められた。

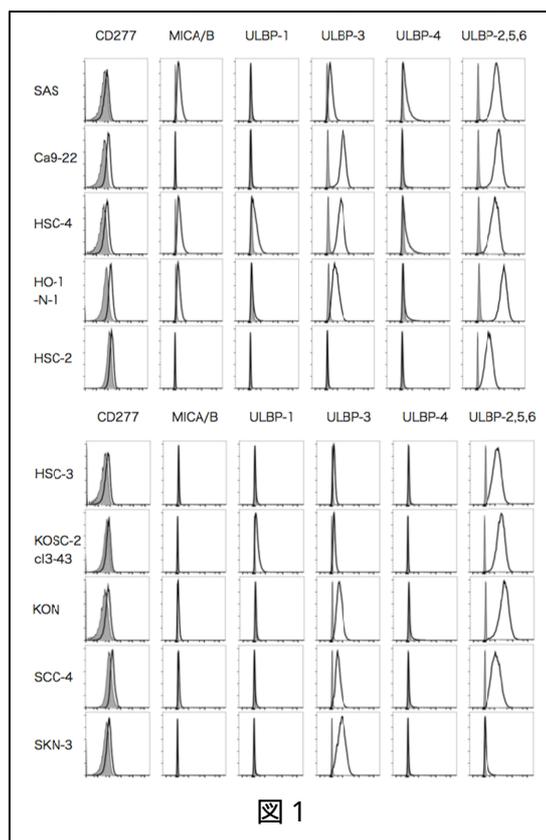
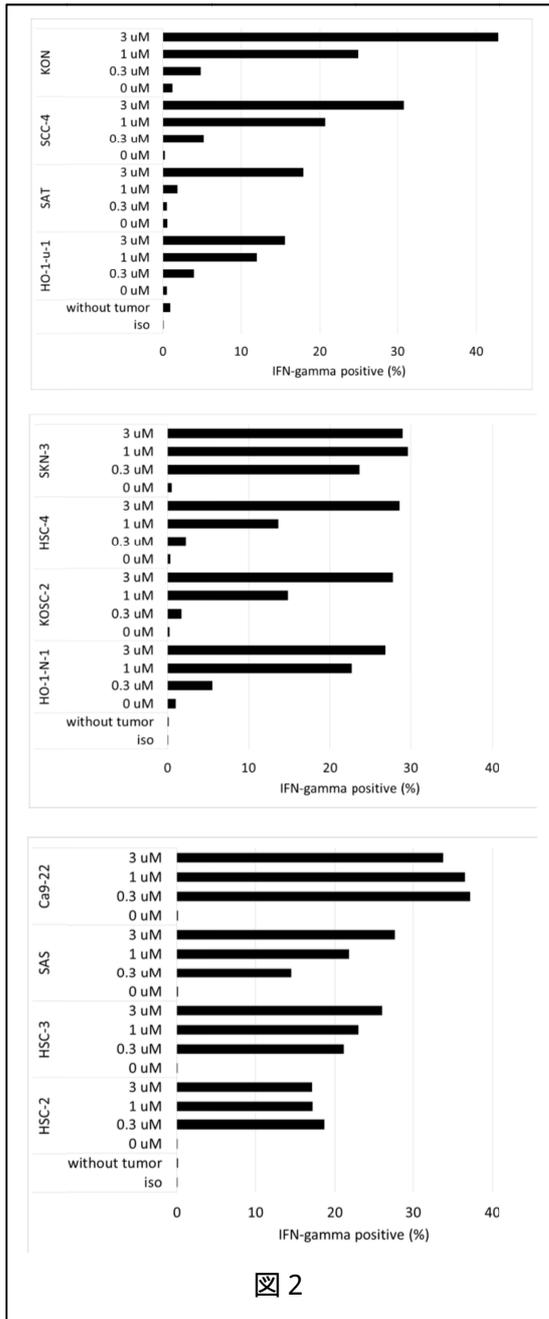


図 1

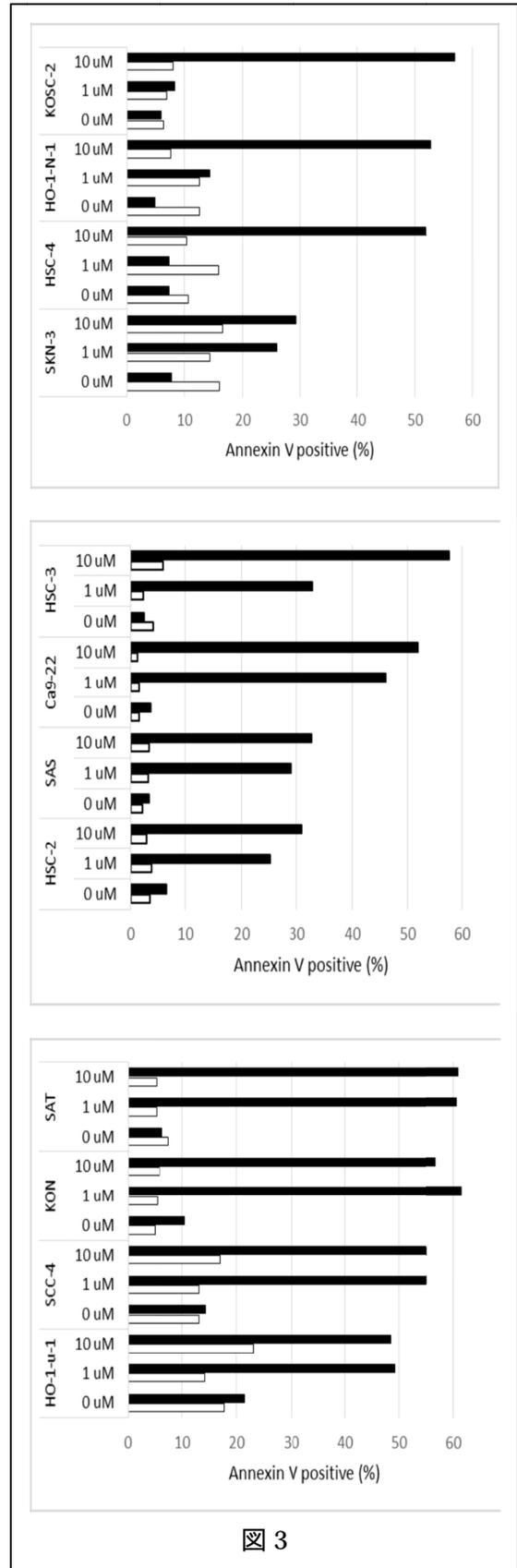
**(2) zoledronate 処理された口腔癌細胞は V 9V 2T 細胞によるインターフェロン 産生を誘導する。**

図2に示すように zoledronate 処理された口腔癌細胞と共培養した V 9V 2T 細胞はインターフェロン を産生した。また、この活性化は zoledronate の濃度に依存していた。



**(3) zoledronate 処理された口腔癌細胞は V 9V 2T 細胞によって殺傷される。**

図3に示すように、V 9V 2T 細胞による口腔癌細胞傷害活性は、zoledronate 非処理群では見られなかったが、zoledronate 処理群では濃度依存的に誘導された。



以上の結果から、窒素含有ビスホスホネート処理された口腔癌細胞は、リン酸抗原をCD277を介してV 9V 2T細胞に提示し、活性化を誘導し、また活性化V 9V 2T細胞によって殺傷されることが明らかとなった。

口腔癌のV 9V 2T細胞による免疫療法の基礎的知見として上記の結果をもとに、論文を作成し、近い内に公表する予定である。

#### 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 2 件)

Domae E, Tsuji K, Hirai Y, Yoshikawa Y, Kamada A, Morita S, Goda S, Ikeo T. Synergistic effect of IL-2, IL-12 and IL-18 on the activation of ex vivo-expanded human V 9V 2 T cells Journal of Osaka Dental University 52(1):51-57, 2018 査読有

Domae E, Tsuji K, Hirai Y, Yoshikawa Y, Kamada A, Morita S, Goda S, Ikeo T IL-15, but not IL-2, induces proliferative activity of human ex vivo expanded V 9V 2 T cells. Journal of Oral Tissue Engineering 15(3):143-148, 2017 査読有

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 要 (TSUJI, Kaname)

大阪歯科大学、歯学部、助教

研究者番号：80632083