

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 21 年度 ～ 平成 22 年度

課題番号：21790638

研究課題名(和文) 担癌生体におけるナイーブ T 細胞の分化とその制御に関する研究

研究課題名(英文) Study of the differentiation and the regulation of naïve T cell in tumor-bearing host

研究代表者

石川 剛 (ISHIKAWA TAKESHI)

京都府立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90372846

研究成果の概要(和文)：

本研究では、TGF-beta などの免疫抑制サイトカインが存在する担癌生体において、移入したナイーブ T 細胞が、免疫抑制的な働きをする制御性 T 細胞(Treg)に分化しないかを検討したが、そのような環境下でもナイーブ T 細胞移入後、Treg の増加は認めなかった。また、温熱療法の併用によりナイーブ T 細胞療法の抗腫瘍効果は増強されることを in vivo マウスモデルで確認した。ナイーブ T 細胞の有効な拡大培養法については、さらに検討の必要があり今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：

We examined changes in the phenotype of lymphocyte in mice which were treated with naïve T cells adoptive transfer. Although immunosuppressive cytokines such as TGF-beta, which could induce regulatory T cells (Treg), are thought to be abundant in tumor-bearing mice, we did not find the increase of Treg population in tumor-bearing mice treated with naïve T cells adoptive transfer. Additionally, we found that combination of hyperthermia enhanced anti-tumor activity of naïve T cell adoptive transfer therapy in mice model. An effective culture procedure to obtain the naïve T cells cannot be established yet, and it is future task.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：がん免疫療法、ナイーブ T 細胞、制御性 T 細胞(Treg)、温熱療法

1. 研究開始当初の背景

がんに対する免疫療法は、手術・放射線療法・化学療法に並ぶ第 4 の治療法として期待されている。がん免疫療法の 1 つである養子

免疫療法において、移入する細胞としてナイーブ T 細胞のような未分化な細胞の方が、分化した細胞より in vivo における抗腫瘍効果が高いことが報告されている。その理由とし

て、ナイーブT細胞は IL-2 産生能が高いことから高い増殖能・生存能を有すること、リンパ節へのホーミング分子である CCR7 を高率に発現しており、これによりがんの所属リンパ節へ多くが集積し、そこで抗原提示細胞からの抗原刺激を受ける可能性が高いこと、などが考えられている。しかし、ナイーブT細胞を移入した際、それらの担癌生体内での動態・分化についての詳細な検討はこれまで行われていない。

また、温熱療法が免疫系に及ぼす影響として、NK細胞の傷害活性の上昇や Heat shock protein の誘導による抗原提示能促進などの効果が報告されており、われわれも温熱処理によりがん細胞表面からの MHC クラス I の発現が亢進することや、腫瘍組織において TGF- β 、IL-10 などの免疫抑制サイトカインの産生が減少することを見いだしている。温熱療法は、がん免疫療法において有利な作用を多く有しており、温熱療法とナイーブT細胞療法との併用療法は相乗効果が期待される。

2. 研究の目的

(1) 担癌マウスモデルを用いて、ナイーブ T 細胞による細胞移入療法を行い、担癌生体内のような免疫逃避機構が成立した環境下でのナイーブT細胞の分化の状態を、脾臓を用いてウェスタンブロット法、フローサイトメーターにて評価する。

(2) ナイーブT細胞療法に温熱治療を併用し、その相乗効果を評価する。

(3) 多数のナイーブT細胞を獲得するための in vitro での効率的な拡大培養法の方法について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) ナイーブT細胞療法の効果と担癌生体内での動態・分化についての検討

8週齢の雄性BALB/cマウスの背部に大腸がん細胞株 colon26 (2×10^5 cells)を尾静脈より投与し(day0)、肺転移モデルを作成した。day1およびday4にナイーブT細胞を 1×10^7 cells 腹腔内投与した。ナイーブT細胞はマウス脾細胞よりマグネットビーズを用いて採取した。まず、CD3抗体を用いてT cellを採取し、次にCD62L抗体を用いてCD62L-positive T cellを採取し、これをナイーブT細胞とした。Day13において、肺転移結節数を計測した。また、脾臓におけるGATA-3、T-bet、Foxp3をウェスタンブロット法にて、脾臓における制御性Tリンパ球をフローサイトメーターにて評価した。

(2) ナイーブT細胞療法と温熱療法の併用効果に関する検討

C57/B6マウスの背部にB16マウスメラノーマ細胞を皮下移植し(Day0)、Day3, 4に41度・1時間の全身加温およびDay6, 10にナイーブT細胞(CD62L陽性Tリンパ球, 4×10^7 cells/

匹)を尾静脈より投与し、温熱療法単独群、温熱療法+CD62L陰性細胞投与群と皮下腫瘍径を比較検討した。さらに、脾臓におけるTreg比率をフローサイトメーターにて検討した。

(3) ヒトPBMCを用いた有効なナイーブT細胞拡大培養法確立のための検討

健康ボランティアよりPBMCを分離し、従来のリンパ球拡大培養法で用いるOKT-3, IL-2にレトロネクチン(CH296)を加えた方法と、さらにIL-15, IL-21等のサイトカインおよび抗CTLA-4(CD152)抗体を用いた培養法を比較検討し、拡大培養率およびナイーブT細胞含有率の向上が図れないかを検討した。PBMCを 1×10^5 cells/ml に調整し、OKT-3とレトロネクチンを固相化したプレート上で培養を開始した(図1)。各試薬の濃度は、IL-2 200U/ml, IL-15 50ng/ml, IL-21 50ng/ml, 抗CTLA-4抗体 10 μ g/mlで刺激を行った。

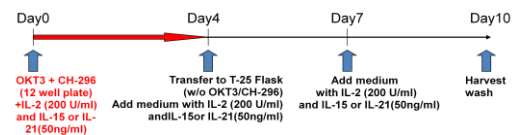


図1. ナイーブT細胞の拡大培養プロトコル

4. 研究成果

(1) ナイーブT細胞療法の効果

Day13における肺転移結節数は、ナイーブT細胞投与群で有意に減少した(図2)

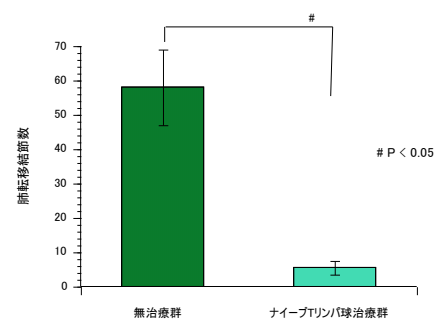


図2. 肺転移結節数

(2) ナイーブT細胞療法のTリンパ球分化における影響

ナイーブT細胞移入により、脾臓におけるTh2細胞分化におけるマスター転写因子であるGATA-3の発現は低下した。一方、Th1細胞分化を制御するT-bet、Treg細胞分化を制御するFoxp3の発現は変化がなかった(図3)。

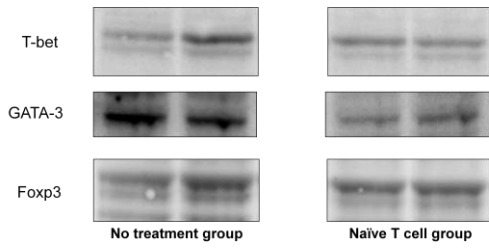


図 3. 脾臓ウエスタン・ブロッティング

脾臓のフローサイトメーターでの検討においても、脾内の Treg 比率は無治療群とナイーブ T 細胞治療群で差は認めなかった(図 4)。

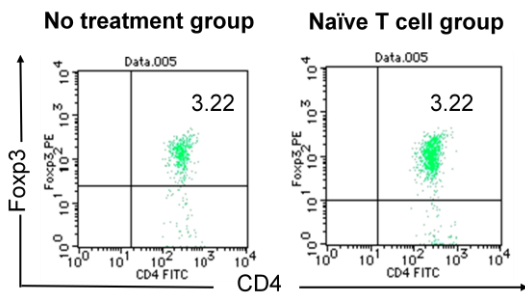


図 4. 脾細胞における Treg 比率

(3) ナイーブ T 細胞療法の温熱療法との併用効果と脾臓における Treg 比率への影響

腫瘍移植後 Day17 における皮下腫瘍径は、ナイーブ T 細胞 (CD62L 陽性細胞) 療法+温熱療法併用群で、温熱療法単独群、CD62L 陰性細胞療法+温熱療法併用群に比し、有意に低値であった (図 5)。

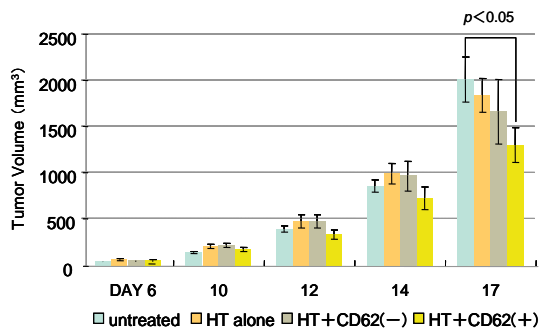


図 5. ナイーブ T 細胞療法+温熱併用療法の効果

脾臓における Treg 比率は治療群で無治療群に比し低値を示した。担癌マウスにナイーブ T 細胞投与を行っても、Treg の増加は認め

なかった (図 6)。

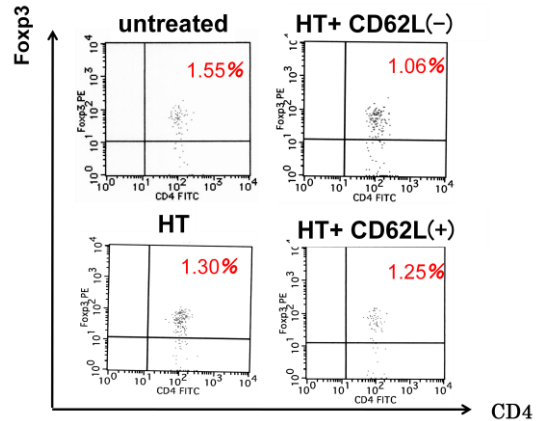


図 6. ナイーブ T 細胞療法の温熱療法との併用効果と脾臓における Treg 比率への影響

(4) IL-15, IL-21, 抗 CTLA-4 抗体を用いたナイーブ T 細胞の拡大培養法

IL-21 には、リンパ球拡大培養率を増強する作用は認めなかった。IL-15 および抗 CTLA-4 抗体は、OKT-3+IL-2+レトロネクチンに追加刺激することで、リンパ球拡大培養率をそれぞれ 1.46 倍、1.30 倍増強する作用を有していた (図 7)。培養 10 日目のナイーブ T 細胞含有率については、IL-15 および抗 CTLA-4 抗体の追加によっても、明かなナイーブ T 細胞含有率の上昇は認めなかった (図 8)。ナイーブ T 細胞の採取量は、OKT-3+IL-2+レトロネクチン群を 1 とすると、IL-15 追加刺激群で 1.34、抗 CTLA4 抗体群で 1.41 であった (図 9)。今後、ナイーブ T 細胞含有率を高める拡大培養法の確立が必要である。

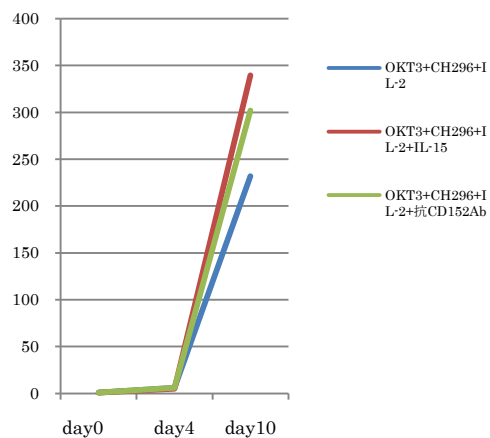


図 7. リンパ球拡大培養 (各群 day0 のリンパ球数を 1 として拡大培養率を表示)

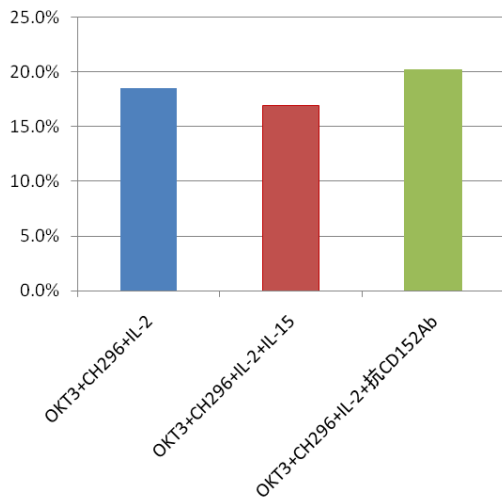


図 8. 拡大培養後のナイーブ T 細胞含有率

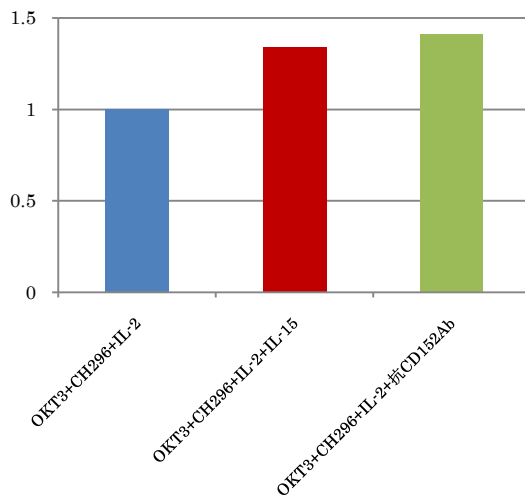


図 9. 拡大培養後のナイーブ T 細胞採取量 (OKT3+CH296+IL-2 刺激群を 1 として、各群をそれに対する比で表示)

(5)まとめ

本研究により、免疫逃避機構が成立していると考えられるような担癌生体において、ナイーブ T 細胞療法を行っても、生体内で Treg が増加することはないことが確かめられた。また、ナイーブ T 細胞移入療法の抗腫瘍効果は、温熱療法を併用することで増強されることがマウス担癌モデルで確認できた。これらの結果は、ナイーブ T 細胞の臨床応用を考える上で重要な知見であると考えられる。

また、ナイーブ T 細胞の拡大培養の検討では、IL-15 および抗 CTLA-4 抗体を OKT-3+IL-2+レトロネクチン刺激に追加することで、拡大培養率が向上したが、拡大培養後のナイーブ T 細胞比率の増加は認めなかった。ナイーブ T 細胞療法の確立のためには、より有効な拡大培養法の開発が望まれ、今後

さらなる検討が必要である。

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 1 件)

① Ishikawa T, Kokura S (以下 13 名省略) Adoptive cellular therapy enhances the helper T cell response and reduces the number of regulatory T cells, EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE, 2(4); 737 – 743, 2011 査読有

[学会発表] (計 16 件)

① Ishikawa T, Adoptive T Cell Therapy Shifts the Secretion Ability of Cytokines to Th1 and Decreases the Number of Tregs in Patients with Cancer. 第 101 回米国がん学会, 2010. 4. 19, 米国 ワシントン

② Matsumoto T, Kokura S, Ishikawa T, Hyperthermia enhances the anti-tumor activity of adoptive transfer of naïve T cells. 第 101 回米国がん学会, 2010. 4. 19, 米国 ワシントン

③ Ishikawa T, Impact of adoptive T cell therapy on the cytokines production and the number of Treg in peripheral blood of patients with cancer. 第 9 回アジア臨床腫瘍会議, 2010. 8. 26, 岐阜

④ Matsumoto T, Kokura S, Ishikawa T, The effect of ACT on the population of regulatory T cells in the mouse colorectal cancer transplant model. 第 69 回日本癌学会学術総会, 2010. 9. 24. 大阪

⑤ Matsumoto T, Kokura S, Ishikawa T, Examination about the efficacy of the adoptive immunotherapy using the naïve T cell in the mouse colorectal cancer transplant model 第 101 回米国がん学会, 2009. 4. 19, 米国 デンバー

⑥ 石川 剛, 活性化リンパ球療法は末梢血サイトカイン産生能を Th1 へシフトし末梢血 Treg 数を減少させる 第 22 回日本バイオセラピー学会, 2009. 11. 26, 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 剛 (ISHIKAWA TAKESHI)

京都府立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90372846

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし