

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ケモカインを始めとする炎症性サイトカインと癌の病態に関して
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学医学部・教授・中本安成
研究分担者	所属・職名・氏名	福井大学医学部・大学院生・内藤達志
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	複数の抗がん剤で癌組織への白血球浸潤・免疫反応の増強が認められることが報告されている。しかし、その分子・細胞レベルでの機構についてはいまだ不明な点が多い。本研究では腫瘍を皮下接種したマウスに抗がん剤を投与し、腫瘍部位に誘導される白血球や産生されるケモカインの同定と機能解析を行うことによって、最終的に抗がん剤による免疫賦活化過程に重要な役割を果たしている機構やケモカインを標的とした治療法の開発を目指す。	
【研究内容・成果】	方法 1) マウス肝癌細胞株 BNL 1ME A. 7R. 1 (BNL) を野生型マウスならびにヌードマウスの皮下に注射し、腫瘍を形成した時点で 150 mg/kg のシクロホスファミド (CTX) を腹腔内に単回投与し、腫瘍容量を観察した。 2) 抗 CD4 抗体あるいは CD8 抗体を投与した野生型マウスに同様の処置を行い、腫瘍容量を観察した。 3) CTX 投与 3 日目のマウス腫瘍組織に関して浸潤したリンパ球をフローサイトメトリー (FCM) で同定する。また、リアルタイム PCR で Perforin と Granzyme B の発現を検討した。さらに免疫蛍光法で抗 CD4、抗 Granzyme B 抗体で陽性となる CD4 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CD4⁺CTL) を確認した。 4) 担癌マウス (CD45. 2⁺) に CTX を投与し、翌日に CFSE で標識したマウス脾細胞 (CD45. 1⁺) を尾静脈より移入した。経時的にレシピエントマウスの腫瘍と所属リンパ節を採取し、腫瘍および所属リンパ節での CFSE 標識リンパ球の増殖および浸潤リンパ球表面の細胞傷害顆粒膜蛋白 CD107a の発現状況を FCM で解析した。 5) CTX 投与後、マウス腫瘍組織を採取し、リアルタイム PCR 法を用いて発現が亢進していたケモカインを同定した。 6) 5) で同定したケモカインに対する受容体のノックアウト (KO) マウスを用いて、1) と同様の観察を行った。 7) 受容体 KO マウス由来脾細胞を 4) と同様に、野生型マウスに移入し、腫瘍内に浸潤する脾細胞数を検討した。 成果 1) 野生型マウスで形成された BNL 腫瘍は CTX の単回投与で消失したのに対し、ヌードマウス群では消失せず、再増大した。抗 CD4 抗体を投与し、CD4 陽性細胞を減少させた野生型マウスでは、Nude マウス群同様に CTX 投与後に腫瘍が再増大した。腫瘍が消失した野生型マウスに、BNL を再接種しても生着せず、特異的免疫の成立を認めた。 2) CTX 投与後、リアルタイム PCR で腫瘍内での Perforin と Granzyme B の発現の上昇を確認した。さらに、腫瘍内で Granzyme B 陽性 CD4⁺CTL の存在を、免疫組織染色法ならびに FCM 法で確認した。 3) 脾細胞の養子移入後 3 日目にマウスの腫瘍内で CD107a 陽性 CD4 陽性細胞 (CD4⁺CTL) を認めた。経時的観察により CD4⁺CTL はリンパ節での抗原提示や腫瘍内での増殖を介さずに、腫瘍内へ浸潤していることが確認できた。 4) CTX 投与により腫瘍内で CCL3・CCL4 の発現上昇を認めた。 5) CCR5KO マウスでは野生型マウスに比べ有意に腫瘍再増大が早かった。さらに CCR5KO マウス由来脾細胞を養子移入すると野生型脾細胞に対して有意に腫瘍内への浸潤が少なかった。 上記の結果より、CTX による抗腫瘍効果に CD4⁺CTL への関与、さらに CD4⁺CTL の腫瘍浸潤メカニズムに CCL3・4-CCR5 軸が関与していることが示唆された。これにより CCR5 を標的とした新たな治療戦略の基盤的知見が得られた。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) High-dose cyclophosphamide induces specific tumor immunity with concomitant recruitment of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells into tumor sites. Tatsushi Naito, Tomohisa Baba, Kazuyoshi Takeda, Soichiro Sasaki, Yasunari Nakamoto, and Naofumi Mukaida. Cancer Letters (in submission). 2) 放射線療法が著効した Helicobacter pylori 除菌治療抵抗性直腸 MALT リンパ腫の 1 例, 内藤 達志ほか, 雑誌 ENDOSCOPIC FORUM for digestive disease 2014, 30(2)131-136	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	【学会発表】 1) Cytotoxic CD4+ cells play a crucial role in cyclophosphamide-mediated cytotoxicity without antigen priming. 内藤達志、馬場智久、中本安成、向田直史 第 73 回日本癌学会総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日 2) Cytotoxic CD4+ Cells Play a Pivotal Role in Cyclophosphamide-Mediated Cytotoxicity against Hepatoma without Antigen Priming. Tatsushi Naito, Tomohisa Baba, Naofumi Mukaida, Yasunari Nakamoto AASLD The Liver Meeting 2014(ボストン) 2014 年 11 月 8 日 3) 抗癌化学療法における CD4 陽性細胞傷害性 T リンパ球による自然免疫反応の検討. 内藤達志、根本朋幸、松田秀岳、大谷昌弘、須藤弘之、中本安成 第 50 回日本肝臓学会総会(東京) 2014 年 5 月 29 日 【その他特筆事項】 なし
--	--