

別紙様式 3

京都ヘルスサイエンス総合研究センター共同研究に係る研究成果
(ホームページ用)

グループ名	発症・治癒機構解明研究グループ		
	(所属)	(職名)	(氏名)
グループ長	京都府立医科大学 大学院医学研究科 泌尿器外科学	教授	浮村 理
研究組織の体制	京都府立医科大学 京都府立医科大学 京都府立医科大学 京都薬科大学 京都工芸繊維大学 京都府立大学	教授 学内講師 客員講師 教授 准教授 講師	浮村 理 藤原 敦子 上田 崇 芦原 英司 小堀 哲生 和田 小依里
研究の名称	Cryoablation 法により放出された前立腺がん細胞成分による免疫賦活作用の検討		
研究のキーワード (注1)	がん凍結療法、がん免疫療法、Cryoablation、 $\gamma\delta$ T 細胞		
研究の概要 (注2)	<p>Cryoablation (凍結療法) による免疫賦活作用に着目し、前立腺がん細胞をCryoablation することで放出される$\gamma\delta$T 細胞機能制御因子や、抗腫瘍効果へ与える影響について検討し、その機能制御分子の探索をおこなう。また食物成分や成分化合物による$\gamma\delta$T 細胞の活性化についても探索をおこなう。</p>		

<p>研究の背景</p>	<p>現在転移性前立腺がんに対する治療法は、内分泌療法中心となっているのが現状である。さらに、一部の転移性前立腺がんは予後不良な去勢抵抗性(内分泌療法抵抗性)前立腺がん(CRPC)となるため、近年CRPCに対する新たな治療戦略が次々に考察されてきた。しかし、いずれも抗腫瘍効果は十分とは言えず、一部の治療には致死的な有害事象が出現する危険性も問題とされている。これらのことから、転移性前立腺がんに対するより安全で確実な治療法の開発は急務の課題であると考えられる。これらの背景の中で、近年前立腺がんに対する免疫療法が注目されており、研究代表者のCryoablation技術と共同研究者である芦原の$\gamma\delta T$細胞研究の経験を活かし、転移性前立腺がんに対するCryoablationの免疫賦活作用と$\gamma\delta T$細胞の抗腫瘍免疫効果の可能性に注目し、本共同研究の構想に至った。</p>									
<p>研究手法</p>	<p>前立腺がん細胞を液体窒素で凍結・解凍を繰り返し、遠心して得られる前立腺がん細胞成分を含む培養上清を用いて、以下を検討する。 ①$\gamma\delta T$細胞の増幅率 ②抗腫瘍効果 ③機能制御分子の探索</p>									
<p>研究の進捗状況と成果</p>	<p>【1】ヒト末梢血からの$\gamma\delta T$細胞培養方法の確立 健康人末梢血を密度勾配遠心法にて末梢血単核球を分取、ゾレドロン酸(ZOL)処置ののちIL-2存在下で11日間培養することでリンパ球の約90%まで$\gamma\delta T$細胞を分化させることができ、以下の研究へ$\gamma\delta T$細胞を使用することが可能になった。</p> <p>【2】ヒト前立腺がん細胞株に対する$\gamma\delta T$細胞の抗腫瘍効果の検討 CFSEでラベルしたヒト前立腺がん細胞株であるLNCaPおよびPC3細胞を$\gamma\delta T$細胞と共培養し、PI染色を施しフローサイトメーターを用いて細胞死の割合を比較検討した。結果、LNCaPおよびPC3細胞とも、殺細胞能を示さない低濃度(1μM)でZOLを前処置した場合、$\gamma\delta T$細胞との共培養群(E:T比=10:1)において、非共培養群と比較し有意に細胞死の割合が高かった(図1)。</p> <div data-bbox="403 1411 1337 1848"> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Condition</th> <th>ZOL(-)</th> <th>ZOL(+)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>no treatment</td> <td>G3: 12.4%, G4: 87.6%</td> <td>G3: 11.6%, G4: 88.4%</td> </tr> <tr> <td>E:T比=10:1</td> <td>G3: 7.7%, G4: 92.3%</td> <td>G3: 40.1%, G4: 59.9%</td> </tr> </tbody> </table> <p>図1: CFSE染色したLNCaPにゾレドロン酸(Zoledronic acid)を前処置した群(ZOL(+))としなかった群(ZOL(-))にそれぞれ$\gamma\delta T$細胞を共培養した群と未治療群に分けてフローサイトメーターを用いて検討し、典型的な結果を示した。</p> <p>CFSE陽性細胞中のPI陽性細胞の割合(G3)をCytotoxicityとした。</p> <p>G3: CFSE陽性中のPI陽性細胞の割合 G4: CFSE陽性中のPI陰性細胞の割合</p> </div> <p>【3】前立腺がん細胞Cryoablation上清が$\gamma\delta T$細胞の抗腫瘍効果へ与える影響の検討 ヒト前立腺細胞株であるLNCaP細胞を液体窒素で凍結・解凍したのち</p>	Condition	ZOL(-)	ZOL(+)	no treatment	G3: 12.4%, G4: 87.6%	G3: 11.6%, G4: 88.4%	E:T比=10:1	G3: 7.7%, G4: 92.3%	G3: 40.1%, G4: 59.9%
Condition	ZOL(-)	ZOL(+)								
no treatment	G3: 12.4%, G4: 87.6%	G3: 11.6%, G4: 88.4%								
E:T比=10:1	G3: 7.7%, G4: 92.3%	G3: 40.1%, G4: 59.9%								

	<p>遠心して得られる前立腺がん細胞成分を含む培養上清を、【2】と同様の手法でLNCaP と$\gamma\delta$T 細胞を共培養する際に添加し抗腫瘍効果の変化を検討した。結果抗腫瘍効果に有意な変化を認めなかった。</p> <p>【4】今後の共同研究計画</p> <p>$\gamma\delta$T 細胞は腫瘍細胞におけるメバロン酸代謝の中間代謝産物であるイソペンテルピロリン酸 (IPP) に反応し抗腫瘍効果を認める。またZOL はメバロン酸代謝のファルネシルピロリン酸合成酵素を阻害し腫瘍細胞にIPP を蓄積させる効果があるため、あらかじめ低濃度のZOL 処置をおこなったLNCaP 細胞をCryoablation することでIPP が豊富な上清を得ることができ、$\gamma\delta$T 細胞の活性化につながる可能性がある。よって、低濃度ZOL 処置をおこなったLNCaP をCryoablation して作製した上清を使用し、再度【3】を検討する予定である。</p>
地域への研究成果の還元状況	<p>本共同研究の成果は、研究のさらなる継続により、がんに対する新たな低侵襲治療開発の足掛かりになる。また、本共同研究は腫瘍学領域を担う地域の若手研究者・大学院生の人材育成に寄与しており、今後の地域におけるがん診療に福音をもたらすと確信している。</p>
研究成果が4大学連携にもたらす意義	<p>本共同研究内で4大学相互の専門分野を補填しあうことで得られる新たな知見や考察は、次世代の研究者への育成につながると考えられる。現在、京都府立医科大学より京都薬科大学へ特別研究学生を派遣し、本研究を共有することで医学と薬学の知識を互いにより深めることが可能となった。今後はさらに生化学や栄養学とも知識を共有することで、総合的な見地から腫瘍学をより発展させることができる。</p>
研究発表(注3)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Shimizu T, Tomogane M, Miyashita M, Ukimura O, Ashihara E. Low dose gemcitabine increases the cytotoxicity of human $\gamma\delta$T cells in bladder cancer cells in vitro and in an orthotopic xenograft model. OncoImmunology, in press. 2. Ukimura O. Focal Cryo. The 10th International Symposium on Focal Therapy and Imaging in Prostate & Kidney Cancer. 2018 Feb 12; Noordwijk, Netherlands.

注1 「研究のキーワード」欄には、ホームページ閲覧者が、研究内容のイメージをつかめるように、キーワードとなる用語を3個から5個程度、記述すること。

注2 「研究の概要」欄には、ホームページ閲覧者の理解の助けとなるように、写真、表、グラフ、図などを用いて、作成すること。

注3 「研究発表」欄には、論文、学会発表、ニュース・リリース等について記述すること。

注4 研究成果が「知的財産」の発明に該当する場合は、ホームページでの公表により、新規性の喪失となるため注意すること。

注5 本書は、A4サイズ3ページ以内とすること。