

利用成果報告書

- 1 課題番号 H26-019
- 2 報告者 長岡 孝治 株式会社メディネット 先端医学研究所
- 3 利用区分 トライアルユース
- 4 利用課題名 マウスB16腫瘍および、腫瘍内に浸潤した免疫細胞の遺伝子解析
- 5 使用装置名 FACS Aria II セルソーター、AutoMACS
- 6 利用期間 平成 27年 1月 20日 ~ 平成 27年 3月 13日

- 7 利用成果・実績の概要
- [背景]: 近年のhigh-throughputシーケンシング技術の向上によりTCRレパトアのディープシーケンシングが可能となり、腫瘍免疫においてもさまざまな治療法による腫瘍内浸潤T細胞のTCRレパトアの変動が検討されはじめています。しかしながら現時点では、どの治療法がTCRレパトアにどのような影響を与えるのか、それがどのような治療効果に結びつくのか、情報は不十分である。我々はこれまでB16マウスメラノーマモデルを使用して、がん細胞と腫瘍内に浸潤した免疫細胞の性状を解析し、がん免疫治療の効果増強を目指してきた。本研究期間は、このモデルを用いて、種々の免疫治療による腫瘍内浸潤T細胞のTCRレパトアの変動を解析することを目的として実験を行った。
- [方法と結果]: C57BL/6マウスの皮内にB16メラノーマ細胞を移植した担がんマウスに免疫チェックポイント分子の阻害抗体(抗CTLA-4抗体)や、免疫応答を増強することが報告されている抗体(抗CD4抗体、抗4-1BB抗体)を投与した。腫瘍組織、所属リンパ節、非所属リンパ節、脾臓を回収して、各組織をRNA laterで、組織から調製したCD8a陽性T細胞をTRIzolで処理した。また、腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)のTCRシーケンスを得るために、これらのマウス脾細胞をメラノーマの抗原として知られているTRP2ペプチドの存在下で1週間培養した。培養した細胞を再度TRP2ペプチドで刺激して、TRP2反応性のCTLをIFN-g secretion assay kitを用いて、PE標識抗IFN-g抗体で蛍光染色した。さらにAPC/Cy7標識抗CD8a抗体で染色した後、FACS Aria II セルソーターを用いてCD8a陽性IFN-g陽性細胞を分離した。無治療群では、分離前CD8a陽性IFN-g陽性細胞が2.81%だったものを、ソーティング後には、98.1%に、抗4-1BB抗体投与群では、分離前15.5%だったものを、94.0%に、抗CTLA-4抗体投与群では、分離前28.3%だったものを97.8%に、抗CD4抗体投与群では、分離前18.9%だったものを98.9%に精製することができた。細胞数としてはいずれの群も $1 \sim 2 \times 10^4$ 程度ソートすることができ、高純度の細胞を十分な細胞数得られた。ソーティング後の細胞は速やかにTRIzol溶液を用いて処理した。
- 8 社会・経済への波及効果 TCRシーケンスによるレパトア解析により、免疫治療の効果を測る高精度なモニタリングが可能となるだけでなく、患者ごとに持っているレパトアのパターンから効果の高い治療法の選択も可能になると期待される。
- 9 学会等における口頭・ポスター発表 該当なし
- 10 学会誌・雑誌等における論文掲載 該当なし