

酸素活性種の EL4 T 細胞分化への影響

The effects on EL4 T-cell differentiation by using active oxygen species

九大総理工¹ ○(M2)植松 陽香¹, (D)シティ スバエダ¹, 林 信哉¹

Kyushu Univ.¹, °Haruka Uematsu¹, Sitti Subaedah¹, Nobuya Hayashi¹

E-mail: uematsu.haruka.574@s.kyushu-u.ac.jp

1. 序論

近年、がん治療の手法の一つとして、免疫治療の研究および実用化が進められている。免疫療法とは、がん患者自身の血液から免疫細胞を取り出し、免疫療法に必要な細胞数に培養、活性化させ、再び患者自身の体内へ戻し、がん細胞を殺す治療法である。この治療法の利点として、患者自身の血液を用いるため、拒絶反応や副作用が少ないことがあげられる。一方、免疫細胞をがん治療に必要な程度に培養するまでの期間が 3 週間と非常に長いことが問題である。先行研究より、短時間照射の大気圧プラズマは、細胞を活性化可能であることが知られている⁽¹⁾。本研究では、T 細胞のセルラインである EL4 細胞を用いて実験を行った。T 細胞の一種である Helper T-cell は、Th1、Th2 と呼ばれる細胞に分化し、細胞間シグナル伝達物質であるサイトカインを産生する。特に、Th1 が産生する IFN- γ はマクロファージ等の免疫細胞を活性化し、Th2 が産生する IL-4 は B 細胞を活性化させる。本研究では、酸素プラズマ照射による T 細胞活性化を目的とし、サイトカイン IFN- γ 、IL-4 放出量の変化を調べた。

2. 実験方法

T 細胞を 5×10^5 cell/ml の濃度で 96-well plate に 100 μ l/well を播き、プラズマを照射した。内径 4 mm のセラミック管を誘電体として、セラミック管内に棒状の高圧側電極を挿入し、外側を接地電極で覆ったトーチ型誘電体バリア放電電極を用いた。本装置に流量 0.6 L/min の酸素ガスを流入することにより酸素プラズマを生成した。使用した印加電圧は 4.2 kV である。プラズマ照射 24 時間後、T 細胞活性化試薬を添加し、さらに 24 時間培養した。生細胞数は、CCK-8 を用いて測定した。IFN- γ 、IL-4 の変化量測定は、Mouse IFN- γ ELISA Kit、Mouse IL-4 ELISA Kit を用いて測定した。

3. 実験結果

図 1 に IFN- γ と IL-4 放出変化量の結果を示す。IFN- γ の産生量はプラズマ照射により変化しなかった。また、本研究により放出された IFN- γ 濃度は、5 pg/ml 以下であったことより、

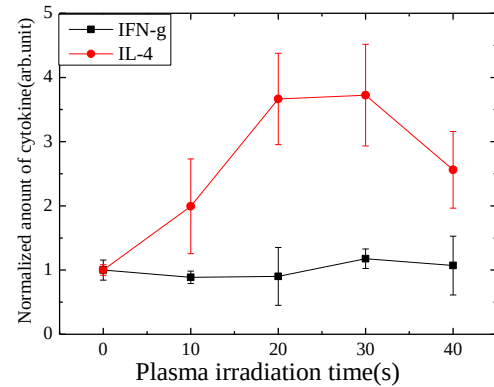


図 1 IFN- γ と IL-4 産生量のプラズマ照射時間依存性

EL4 T 細胞は IFN- γ を放出しない他の T 細胞へ分化したことが考えられる。一方で、IL-4 の産生量は、プラズマ照射 30 秒において、プラズマ未照射と比較して、3.7 倍に増加していた。このことより、EL4 T 細胞はプラズマ照射と活性化試薬の影響により Th2 へと分化していることが考えられる。

ここで、活性化メカニズム解明のため、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現とは遺伝子から情報を読み取りタンパク質を合成する過程であり、遺伝子発現の変動を解析することにより複雑な生体反応を網羅的に調べることが可能である。特定の遺伝子と結合する蛍光試料を用いて、その蛍光強度を測定し、遺伝子発現の変動量を測定する。プラズマ未照射サンプルの発現量と比較することで、プラズマ照射による遺伝子の発現の度合いを見る。マイクロアレイ解析を行う際は、プラズマを照射したのち、照射 2 時間後に TRIzol 試薬を用いて、細胞の RNA を固定し、マイクロアレイ解析を行った。Nfil3 という遺伝子発現量がプラズマ未照射に対し、2.5 倍に増加した。Nfil3 は Th2 において高く発現し、Th2 のサイトカイン産生の制御を行う。このことにより、印加電圧 4.2 kV のプラズマ照射において、プラズマにより生成された活性酸素と、活性化試薬の影響を受け、EL4 T 細胞は Th2 へと分化することが分かった。