

令和元年5月30日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16604

研究課題名(和文) 腫瘍リンパ球共培養モデルにおける抗体療法併用NKT細胞治療の開発研究

研究課題名(英文) Research and development of NKT cell therapy in combination with antibody therapy in tumor and lymphocyte co-culture model

研究代表者

豊田 行英 (Toyoda, Takahide)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10772163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：コラーゲンゲルドロップ3次元包埋培養法を使用して、肺癌株化細胞とリンパ球を培養したところ腫瘍増殖抑制効果が確認された。腫瘍増殖抑制効果に関連する免疫細胞上に発現する表面抗原分子探索のため、肺癌リンパ節の免疫細胞を解析したところ、腫瘍の存在下にCD103+CD8+T細胞の発現が増加することが認められた。さらに、転移陰性リンパ節においても、進行癌や腫瘍に近い所属リンパ節でCD103の発現が高い傾向にあり、局所だけでなく全身性の反応でもあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コラーゲンゲルドロップ3次元包埋培養法によって腫瘍とリンパ球細胞を共培養し、免疫細胞による腫瘍増殖抑制効果を体外の培養で観察できる可能性を探索した。また肺癌所属リンパ節の解析を行うことで、肺癌のリンパ節転移メカニズムに迫るような免疫細胞の構成の変化や細胞表面抗原の発現の変化を解析することが出来た。転移陽性リンパ節ではCD103陽性の細胞が多く、腫瘍に反応して免疫細胞が変化していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Using Collagen gel drop three-dimensional embedding culture method, inhibitory effects of tumor growth was confirmed when lymphocytes were cultured with lung cancer cell lines. In addition, the exploration of candidate surface molecules on immune cells that were associated with this tumor inhibitory effects was performed. As a result, the expression of CD103+ on CD8+ T cells was increased in the metastatic lymph nodes. Furthermore, among the metastatic negative lymph nodes, there was a trend that the percentage of CD103+ CD8+ T cells was relatively high in the locoregional lymph nodes close to the primary tumors.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 マスサイトメトリー 腫瘍浸潤リンパ球 腫瘍関連マクロファージ NKT細胞免疫療法 コラーゲンゲルドロップ3次元包埋培養法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、肺癌株化細胞に対する NKT 細胞の抗腫瘍効果が抗 PD-L1 抗体を添加することで増強されることを確認し、NKT 細胞免疫療法とチェックポイント阻害薬の併用が有効である可能性を示唆した [Kamata et al. Cancer Immunol Immunother 2016]。一方、自己の腫瘍に特異的な抗腫瘍効果への影響に関しては、不明瞭な点が多い。腫瘍免疫の主役とされる CD8+ T 細胞などの他の抗腫瘍エフェクター細胞への NKT 細胞の活性化能を解析するには、自己の腫瘍とリンパ球を共培養をした実験モデルが必要になる。

一般的に自己の腫瘍の初期培養は低い成功率が問題となる。しかしながら、ヒト癌細胞初代培養システムキット (KURABO 社製 Primaster®) が市販され、コラーゲンゲルドロップ内で 70% 以上の安定した成功率で腫瘍の初期培養が可能となった (コラーゲンゲルドロップ 3 次元包埋培養法)。当施設においても肺癌患者の気管支鏡検査により採取した微小なリンパ節生検検体を 3 次元構造を維持して培養し、抗癌剤感受性試験などの研究に利用している。本培養法は、より生体に近い実験系を確立し、リンパ球との共培養の実現も期待される。成分の大半が水分であり外部からのリンパ球や抗体の添加も理論上は可能である [Lovitt et al. biology 2014]。

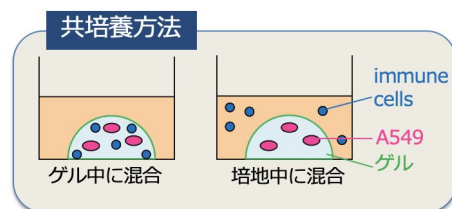
近年、従来のフローサイトメトリーと比較し、より多くの細胞マーカーを同時に計測できるマスサイトメトリー (Cytometry by Time-Of-Flight mass spectrometry: CyTOF 2®) が開発され、様々な細胞種の解析に普及されつつある。蛍光色素の代わりに約 40 種の純度の高い重金属元素の同位体をタグとして用いて同時に計測することで、細胞マーカーの高次元的な解析が出来るようになった。腫瘍浸潤リンパ球のような不均一な細胞集団の解析に極めて有用であり、サイトカイン産生能の一次的な解析も組み合わせることで、腫瘍局所での各構成細胞の複雑な相互作用に新たな知見の獲得を期待される。

2. 研究の目的

コラーゲンゲルドロップ 3 次元包埋培養法ならびにマスサイトメトリーを利用した、自己腫瘍局所における NKT 細胞の自然免疫系や獲得免疫系の抗腫瘍効果に対する増強作用ならびに、NKT 細胞と抗 PD-1/PD-L1 抗体併用療法の効果を確認することが本研究の主目的である。

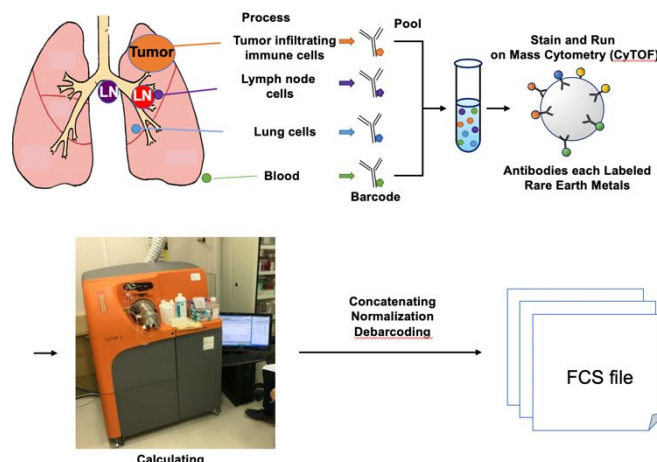
3. 研究の方法

(1) 肺癌株化細胞 (A549) を single cell の状態で末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear cells: PBMC) や cell sorting した CD56+ 細胞、CD8+ T 細胞を混合し、コラーゲンゲル中に包埋してプレートに滴下し、腫瘍増殖抑制効果を比較した。また培養液中のサイトカイン量を測定し、細胞増殖抑制に關するサイトカインを検討することや、培養後の免疫細胞を回収し、Flow cytometry 法を使用して免疫細胞の各表面分子の発現の変化を確認した。



(2) 当施設呼吸器外科で原発性肺癌の診断で手術もしくは内視鏡検査を受けた患者の血液および肺・リンパ節・腫瘍検体から、酵素処理・遠心分離を行い、マクロファージやリンパ球を採取した。29 例の原発性手術症例の解析を行ない、それぞれの検体における、CD8+ T 細胞、CD4+ T 細胞、NK 細胞、制御性 T 細胞、マクロファージなどの構成細胞を比較検討し、PD-1 や PD-L1 の発現解析を行った。22 例はマスサイトメトリーを使用して金属標識をした検体の解析をし、約 30 種の表面マーカーや核内マーカーで染色し、多次元的な解析をした。

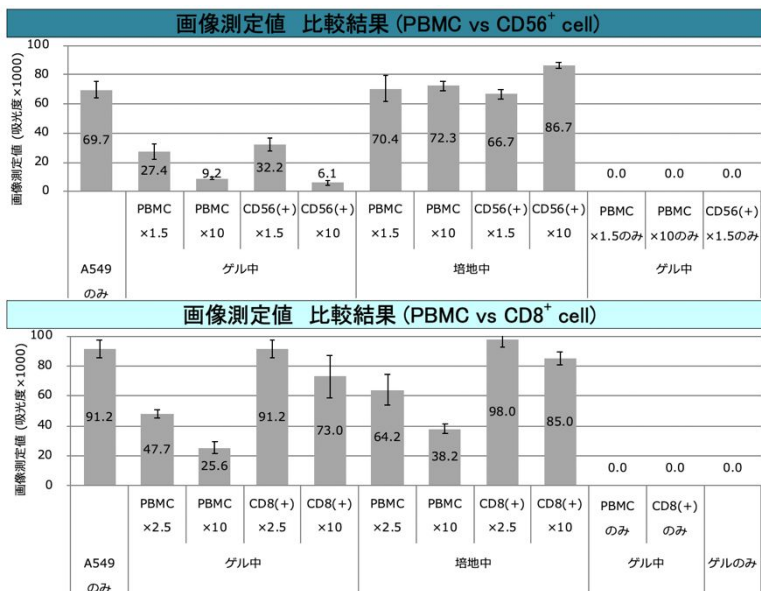
手術検体の解析の例



4. 研究成果

(1) コラーゲンゲルドロップ 3次元包埋培養法を利用した肺癌株化細胞 (A549) と免疫細胞の共培養モデル

肺癌株化細胞 (A549) を single cell の状態で PBMC や cell sorting した CD56⁺細胞、CD8⁺T細胞を混合し、コラーゲンゲル中に包埋してプレートに滴下し、画像比色定量法を用いて腫瘍増殖抑制効果を比較した。



その結果、PBMC や CD56⁺細胞と混合して培養した系で腫瘍増殖が抑制されていた。免疫細胞による腫瘍増殖抑制効果を *ex vivo* で観察可能なモデルとして期待が持てる結果であった。

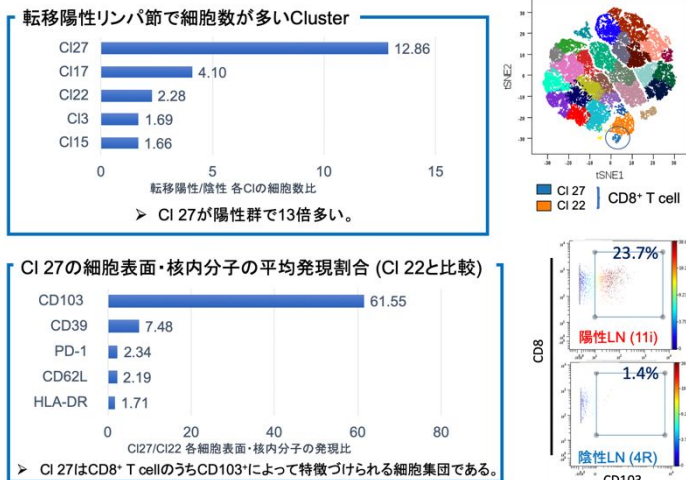
また培養液中のサイトカイン量を測定し、細胞増殖抑制に関与するサイトカインを検討したところ、IL-6 濃度が画像比色定量との相関関係を持つことが示された。IL-6 は NK 細胞の活性化や NK 細胞による細胞障害性活性への関与が報告されており、この培養モデルにおいて IL-6 が関連していることが示唆された。

さらに、培養後の免疫細胞を回収し、Flow cytometry 法を使用して免疫細胞の各表面分子の発現の変化を確認したところ、CD8⁺細胞のうち CD62L の発現が低下した細胞が増加しており、effector 細胞としての subset の変化が起きていることが確認された。

(2) 原発性肺癌臨床検体のマスサイトメトリー解析

当施設呼吸器外科で原発性肺癌の診断で手術もしくは内視鏡検査を受けた患者の血液および肺・リンパ節・腫瘍検体から、酵素処理・遠心分離を行い、マクロファージやリンパ球を採取し、原発性手術症例のマスサイトメトリー解析を行なった。

約30種の表面マーカーや核内マーカーで標識し、viSNE や FlowSOM といった解析アプリケーションを用いて多次元的な解析を行い、検体や患者の臨床プロファイルと比較して検討した。その結果、リンパ節の転移陽性もしくは転移陰性かによって、CD45RO や CD69 などの細胞表面の活性マーカーや疲弊マーカーの他、tissue resident memory T細胞に特徴づけられる細胞表面マーカーである CD103 が CD8⁺T細胞中に増加していることを確認した。



CD8⁺T細胞中に CD103 陽性である細胞は、腫瘍浸潤リンパ球では 42.9%、転移陽性リンパ節では 9.2%、転移陰性リンパ節では 4.7%、末梢血単核球では 2.9%にそれぞれ確認され、腫瘍の存在下に発現が増加するリンパ球である可能性が示唆された。CD103 は腫瘍の放出する TGF-β による CD8⁺T細胞上に発現が増加することが報告されており、本研究において、腫瘍局所だ

けではなく所属リンパ節においてもリンパ細胞の変化が起きていることを支持する結果であった。また転移陰性リンパ節においても進行癌や腫瘍に近い所属リンパ節で高い傾向にあり、局所だけでなく全身性の反応でもあることも示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

第 36 回 日本呼吸器外科学会 「多次元マスマイトメトリーによる肺癌所属リンパ節の免疫細胞プロファイル解析」

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学

千葉大学大学院医学研究院 免疫細胞医学

豊田行英 1, 2、本橋新一郎 1, 2、山中崇寛 1、内藤 潤 1、伊藤祐輝 1、海竇大輔 1、大橋康太 1、佐田諭己 1、椎名裕樹 1、畑 敦 1、山本高義 1、森本淳一 1、坂入祐一 1、和田啓伸 1、鈴木秀海 1、中島崇裕 1、吉野一郎 1

第 42 回 日本呼吸器内視鏡学会 「EBUS 検体を用いた肺門・縦隔リンパ節免疫細胞の Mass Cytometry 解析」

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器病態外科学 1

千葉大学大学院医学研究院 免疫細胞医学 2

豊田行英 1, 2、中島崇裕 1、本橋新一郎 1, 2、山中崇寛 1、内藤 潤 1、伊藤祐輝 1、海竇大輔 1、大橋康太 1、佐田諭己 1、椎名裕樹 1、山本高義 1、森本淳一 1、坂入祐一 1、和田啓伸 1、鈴木秀海 1、吉野一郎 1

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：本橋新一郎、吉野 一郎

ローマ字氏名：Shinichiro Motohashi, Ichiro Yoshino

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。