

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18379

研究課題名（和文）NKT細胞を用いた膠芽腫プレシジョン医療の確立

研究課題名（英文）Development of NKT cell-based precision cancer immunotherapy for glioblastoma patients

研究代表者

原 彩佳（Hara, Ayaka）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90792705

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）：膠芽腫患者検体の解析の結果、NKT細胞が認識する特異的抗原提示分子 CD1dが陽性の膠芽腫が存在することを見出した。膠芽腫患者検体を無血清培地で培養し樹立したstem-like cellのCD1d発現は陰性であったが、これにレチノイン酸を投与して分化誘導するとCD1d発現が増強し、NKT細胞はその特異的糖脂質抗原 -GalCer依存的に高い細胞傷害活性を示した。CD1d陰性膠芽腫細胞株にCD1dを強制発現させた場合に、NKT細胞は -GalCer依存的に高い細胞傷害活性を示した。以上の結果から、CD1d発現が膠芽腫患者に対するNKT細胞免疫療法の新しい標的となることをまとめ、論文投稿を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良な膠芽腫に対する新規治療法の開発は困難を極め、喫緊の課題となっている。本研究では、膠芽腫患者検体を解析し、NKT細胞に対する特異的な抗原提示分子であるCD1d陽性の腫瘍細胞が存在することを見出した。膠芽腫患者検体から樹立したstem-like cellにレチノイン酸を投与して分化誘導するとCD1d発現が増強し、NKT細胞は高い細胞傷害活性を示した。CD1d陰性膠芽腫細胞株にCD1dを強制発現させた場合にも、NKT細胞は高い細胞傷害活性を示した。これらの結果は、膠芽腫におけるCD1d発現は、NKT細胞を用いた膠芽腫プレシジョン医療の新規標的となりうることを示している。

研究成果の概要（英文）：This study showed that CD1d, an antigen-presenting molecule for invariant natural killer T (iNKT) cells, was expressed on several patient glioblastoma cells. Although CD1d expression was low on glioblastoma stem-like cells, retinoic acid, which is the most common differentiating agent, upregulated CD1d expression in these cells and induced iNKT cell-mediated cytotoxicity. Next, we transiently transfected the CD1d-negative U87 cells with CD1d plasmid. CD1d-transfected U87 cells were sensitive to direct NKT cell-mediated cytotoxicity. Thus, CD1d expression may represent a novel target for NKT cell-based precision cancer immunotherapy for glioblastoma patients.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 NKT細胞

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは、原発性脳腫瘍の約 25%を占める代表的な脳腫瘍である。脳実質内に浸潤性に増大するため根治症例は少なく、極めて予後の悪い腫瘍である。本研究の対象である膠芽腫はグリオーマの中の約 35%を占め、手術・放射線治療・化学療法を施行しても、生存期間中央値 15 か月、5 年生存率 6%程度に留まり、最も悪性度の高い grade 4 に分類されている。2005 年の報告により標準治療となった、術後放射線治療とテモゾロミド投与を併用する Stupp レジメンの成績は、この十数年間改善を認めていない(Stupp R, et al. N Engl J Med 2005)。再発時の有効な治療も確立されておらず、新たな治療法の開発が不可欠と考えられている。現在種々のがんに対して免疫療法の有効性が示されつつあり、グリオーマに対しても新規治療法として期待が持たれている。現在までに試みられた免疫療法としては、ペプチドワクチン療法(Schuster J, et al. Neuro Oncol 2015)や腫瘍抗原特異的樹状細胞療法(Mitchell DA, et al. Nature 2015)、遺伝子組換えヘルペスウイルス製剤療法(Markert JM, et al. Gene Ther 2000, Markert JM, et al. Mol Ther 2009、Ino Y, et al. Clin Cancer Res 2006)、膠芽腫自己ワクチン療法(Liau LM, et al. J Transl Med 2018)が挙げられるが、その有効性は定かではない。さらに様々ながん腫に対する有効性が示されている免疫チェックポイント阻害剤に関しては、膠芽腫患者に対する抗 PD-1 抗体を用いた第 III 相臨床試験では有効性は証明されなかった(Deardon DA, et al. Neuro Oncol 2017)。その一方で、グリオーマ細胞に特異的な表面抗原を認識するキメラ抗原レセプター(CAR)を用いた CAR-T 細胞療法(Migliorini D, et al. Clin Cancer Res 2018, Mount CW, et al. Nat Med 2018)が報告され、免疫細胞治療が膠芽腫に有効である可能性が示唆されている。

千葉大学では、悪性腫瘍患者に対する NKT 細胞を標的とした免疫細胞療法に関する研究開発を行ってきた。NKT 細胞は千葉大学大学院医学研究院が世界に先駆けて同定したリンパ球集団で、末梢血中に 0.1%以下と非常に少ない細胞集団であるにも関わらず、抗腫瘍免疫を始めとする様々な免疫反応に関与することが知られている(Godfrey DI, et al. Immunity 2018)。さらに、抗原提示細胞上の CD1d 分子に提示された外来性抗原である糖脂質、 α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)が、NKT 細胞の特異的な外因性リガンドであることが発見されている(Kawano T, et al. Science 1997)。マウスのがん転移モデルにおいては、 α -GalCer を単独で投与するよりも、樹状細胞に提示させて投与する細胞治療の方が、より強力な抗腫瘍効果を発揮する (Fujii S, et al. Front Immunol 2013)。このような悪性腫瘍に対する NKT 細胞を用いた免疫細胞療法の基礎研究および臨床研究の成果から、当院では原発性肺癌および頭頸部癌において先進医療に承認され、現在臨床研究が実施されている。

一方、脳腫瘍患者における NKT 細胞免疫系の解析については、グリオーマ患者の末梢血解析による正常人と同等の機能を持った NKT 細胞の存在(Hunn MK, et al. Clin Cancer Res 2012) と、膠芽腫細胞株における CD1d の発現(Dhodapkar KM, et al. Int J Cancer 2004)が報告されているが、患者腫瘍組織における CD1d 発現などグリオーマに対する NKT 細胞の抗腫瘍効果発揮メカニズムについては未だ不明な点が多い。

我々は、平成 28 年度より当院で膠芽腫と診断された患者の末梢血および手術時に摘出された腫瘍組織を用いて各種免疫細胞の解析を行ってきた。NKT 細胞の特異的な外因性リガンドである CD1d 陽性の腫瘍細胞が、グリオーマには一定の割合で存在することを見出した。さらに、NKT 細胞が α -GalCer 依存的に CD1d 陽性膠芽腫に対して抗腫瘍効果を示すことを、細胞傷害アッセイと、ヒト膠芽腫モデルに対する治療実験で明らかにしている。

2. 研究の目的

予後が悪い膠芽腫に対する新規治療法の開発は困難を極めている。本申請研究では、膠芽腫と診断された患者の末梢血および手術時に摘出された腫瘍組織を用いて、NKT 細胞を中心とした各種免疫細胞の機能解析を行う。さらに膠芽腫における NKT 細胞を中心とした抗腫瘍免疫系の機能を明らかとし、臨床研究実施に向けたエビデンスを構築する。

3. 研究の方法

1) 膠芽腫患者の末梢血および腫瘍局所の NKT 細胞を中心とした免疫環境の解析

千葉大学医学部附属病院脳神経外科を受診し膠芽腫の診断が得られた患者に同意を得て、術前に末梢血を採取し、単核球を比重分離した後に、フローサイトメトリーにより T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞などのリンパ球サブセットを同定した。同時に PD-1 などの共刺激・抑制分子の発現解析を行った。さらに手術により摘出された膠芽腫の腫瘍浸潤リンパ球サブセットをフローサイトメトリーおよび免疫染色にて同定するとともに、共刺激・抑制分子の発現解析の発現解析を行った。

非腫瘍性疾患のコントロールとして適当と思われる頸動脈狭窄症などの脳血管障害患者を対象に、同意を得て、末梢血を採取し、単核球を比重分離した後に、フローサイトメトリーにより T

細胞、NK 細胞、NKT 細胞などのリンパ球サブセットを同定した。

2) 膠芽腫 stem-like cell の樹立と分化誘導

2-a) 膠芽腫患切除者検体を、神経幹細胞培養に用いる成長因子を添加した無血清培地で培養して、膠芽腫 stem-like cell を樹立し、CD1d の発現を評価した。

2-b) 膠芽腫 stem-like cell に、臨床現場で最も一般的な分化剤であるレチノイン酸 (RA) を投与して分化を誘導した、RA-differentiated cells を樹立し、その CD1d の発現を評価した。

3) RA-differentiated cells に対する NKT 細胞の細胞障害活性の評価

RA-differentiated cells に対する NKT 細胞の細胞傷害活性の評価を行った。

4) transfection により CD1d を発現させた CD1d 陰性膠芽腫 cell line に対する NKT 細胞の細胞傷害活性の評価

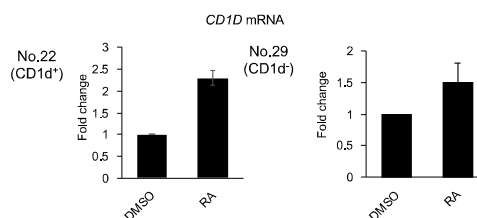
CD1d 陰性 cell line U87 に CD1d を transfect し、これに対する NKT 細胞の細胞傷害活性の評価を行った。

4. 研究成果

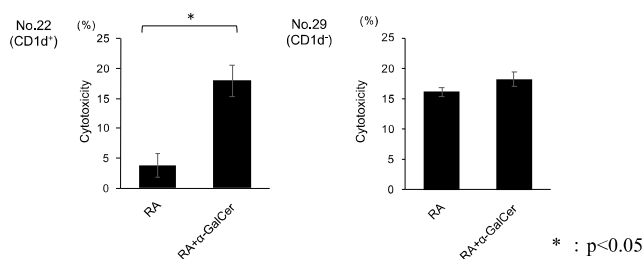
1) 膠芽腫と診断された患者の末梢血および手術時に摘出された腫瘍組織について、フローサイトメトリーを用いて免疫学的解析を行った。膠芽腫手術検体から分離した腫瘍細胞を用いてフローサイトメトリー解析を行い、抗原提示分子 CD1d の発現を 15 例中 10 例 (67%) に認めた。膠芽腫手術検体から分離した腫瘍浸潤リンパ球の解析では、14 例全例で CD3+ T 細胞の腫瘍浸潤を認めた。一方、腫瘍細胞の CD1d 発現にかかわらず、NKT 細胞は検出されなかった。

2) 膠芽腫患切除者検体を、神経幹細胞培養に用いる成長因子を添加した無血清培地で培養して、膠芽腫 stem-like cell を樹立した。CD1d 陽性、陰性膠芽腫由来の stem-like cell はいずれも CD1d 陰性であった。

3) 膠芽腫 stem-like cell にレチノイン酸を投与して、RA-differentiated cells を樹立した。CD1d 陽性、陰性膠芽腫由来の RA-differentiated cells はいずれも CD1d 陽性であった。さらにリアルタイム RT-PCR も行い、RA-differentiated cells の CD1d mRNA の発現レベルはいずれも、膠芽腫 stem-like cell と比較し高いことを確認した。

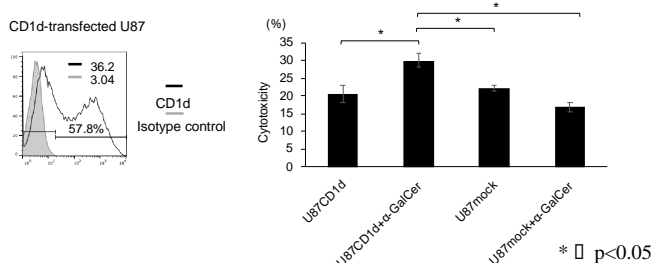


4) RA-differentiated cells に対する NKT 細胞の細胞傷害活性の評価を行った。CD1d 陽性膠芽腫患者検体 (No.22) から樹立した RA-differentiated cells では α -GalCer 処置により、NKT 細胞の細胞傷害活性は増強した。一方、CD1d 陰性神経膠芽腫患者検体 (No.29) から樹立した RA-differentiated cells では α -GalCer 処置により、NKT 細胞の細胞傷害活性がわずかに増強したが、その差は統計的に有意ではなかった。



5) CD1d 陰性 cell line U87 に CD1d を transfect し、CD1d 発現率 57.8% の CD1d transfect U87 を作成し、これに対する NKT 細胞の細胞傷害活性の評価を行った。NKT 細胞は α -GalCer 依存的に、transfection により CD1d を発現させた CD1d 陰性膠芽腫 cell line に対して高い細胞傷害活性を示した。

このことから、CD1d 発現の有無が NKT 細胞の細胞傷害活性に影響を及ぼすことが確認できた。



以上の結果は、膠芽腫における CD1d 発現が、NKT 細胞を用いた膠芽腫プレジジョン医療の新規標的となりうることを示しており、論文投稿を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hara Ayaka, Koyama-Nasu Ryo, Takami Mariko, Toyoda Takahide, Aoki Takahiro, Ihara Fumie, Kobayashi Masayoshi, Hirono Seiichiro, Matsutani Tomoo, Nakayama Toshinori, Iwadate Yasuo, Motohashi Shinichiro	4. 巻 70
2. 論文標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell-based cancer immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 1239 ~ 1254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02742-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Aoki Takahiro, Takami Mariko, Takatani Tomozumi, Motoyoshi Kiwamu, Ishii Ayana, Hara Ayaka, Toyoda Takahide, Okada Reona, Hino Moeko, Koyama Nasu Ryo, Kiuchi Masahiro, Hirahara Kiyoshi, Kimura Motoko Y., Nakayama Toshinori, Shimojo Naoki, Motohashi Shinichiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d independent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2223 ~ 2233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原 彩佳
2. 発表標題 膠芽腫に発現するCD1d分子はNKT細胞を用いた免疫療法における有望な標的となる
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 彩佳
2. 発表標題 膠芽腫に発現するCD1d分子はNKT細胞を用いた免疫療法における有望な標的となる
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 彩佳
2. 発表標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell-based cancer immunotherapy
3. 学会等名 EMBO Workshop - CD1-MR1: Beyond MHC restricted lymphocytes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 彩佳
2. 発表標題 膠芽腫に発現するCD1d分子はNKT細胞を用いた免疫療法における有望な標的となる
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関