

機関番号：82401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591160
 研究課題名(和文) 分子標的療法と NKT 細胞療法による複合的免疫療法の造血器悪性腫瘍への応用
 研究課題名(英文) Combined application of molecular-targeted therapy and NKT immunotherapy for hematological malignancy
 研究代表者
 清水 佳奈子 (SHIMIZU KANAKO)
 独立行政法人 理化学研究所 免疫治療モデル開発研究ユニット・ユニットリーダー
 研究者番号：20391980

研究成果の概要(和文)：NKT 細胞のアジュバント効果を利用したワクチンとして NKT のリガンドである α -GalCer をパルスした腫瘍(以下 Tumor/Gal) ワクチンの開発をこれまでおこなってきた。本研究では、このワクチンと抗癌剤、または分子標的療法との併用効果の検討を造血器腫瘍モデルで行った。その結果、Tumor/Gal ワクチンとの併用効果が認められた。

研究成果の概要(英文)：We have been focusing on the development of anti-tumor vaccine using adjuvant activity of NKT cells, which is α -Galcer loaded tumor cells (Tumor/Gal). In current study, we evaluated the efficacy of combination of Tumor/Gal with anti-cancer drug or molecular-targeted therapy in hematological tumor models. We found the possibility of synergistic effect of these approaches.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：NKT 細胞, α -GalCer, 腫瘍細胞、自然免疫、獲得免疫

1. 研究開始当初の背景

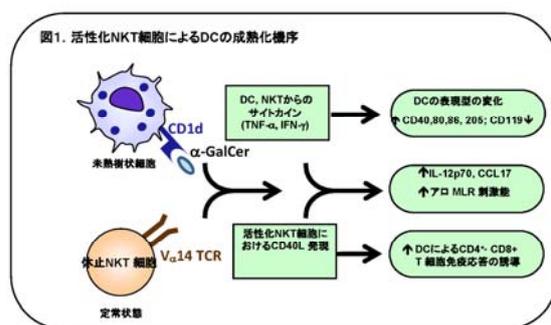
(1) NKT 細胞活性化による自然免疫と獲得免疫の誘導

NKT 細胞は NK 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞と共に自然免疫を代表するリンパ球であり、CD1d 上の糖脂質を認識して活性化する。活性化 NKT 細胞は IFN- γ を産生し他の免疫細胞の活性を促すと共に抗腫瘍効果を発揮する。我々は NKT 細胞のリガンドである α -GalCer を負荷

した腫瘍細胞(B16 メラノーマ) (Tumor/Gal, ここでは B16/Gal) をマウスに静脈内投与することにより B16 の皮下接種に対して抵抗性を示すことを報告してきた。これは、 α -GalCer を提示した腫瘍細胞が NKT, NK 細胞を活性化し (Shimizu K et al. J Immunol. 2007, 178:2853)、その後腫瘍細胞は活性化 NKT/NK 細胞により殺傷され、生体内の樹状細胞により腫瘍抗原のクロスプライミングが

起こることにより腫瘍特異的なT細胞が誘導され、両者の抗腫瘍免疫が働く為である (Shimizu K et al. J. Exp. Med. 2007)。α-GalCer を提示させた親株の腫瘍細胞とCD1d 強発現させた腫瘍細胞の自然免疫の活性化の応答性を比較すると、CD1d の発現強度が高い方が、より強いNKT細胞、NK細胞の活性化能を有することが判明した。

一方で、このクロスプライミングが強力におこる機構は、活性化したNKT細胞にCD40L分子からの樹状細胞へのシグナルが最も重要である。(Fujii et al. J. Exp. Med. 2003, 198:267)。このように考えると、NKT細胞リガンドをパルスした腫瘍細胞による免疫は自然免疫と獲得免疫を同時に活性化し、より強力な抗腫瘍免疫の誘導が可能になる新規性の高い免疫療法である。



②NKT細胞療法の造血器悪性腫瘍への応用

NKT細胞は、脾臓、肺、肝臓に多く含まれている。これまで我々は、NKT細胞は骨髓などの造血組織において数は比較的少ないものの機能は保たれていることを示してきた。(Shimizu et al. Nat. Immunol. 2002, 3:867) また、造血器腫瘍は、他の固型腫瘍と異なり、腫瘍細胞が数的にも問題なく、比較的無菌的に採取できやすいことを考えると、良いターゲットである。

造血器悪性腫瘍は免疫の場が腫瘍増殖の場であるものの、必ずしも全ての免疫能が低下しているわけではない。例えば実際、慢性

骨髄性白血病(CML)患者のNKT細胞を解析した結果、CMLのイマチニブ効果群においてはNKT細胞の機能が温存されていることが判明した(Shimizu et al. J Immunol. 2006, 177:3484)。この現象は白血病状態であっても宿主のNKT細胞の免疫応答が起こりうることを示す。

2. 研究の目的

本研究では我々がこれまですすめてきたNKT細胞のアジュバント効果を利用した免疫療法の造血器悪性腫瘍治療への応用の可能性を探る。さらに、従来の抗癌剤や現在R-CHOP療法として悪性リンパ腫に使用されている分子標的治療薬であるリツキシマブ(マウスヒトキメラ抗CD20抗体)に着目し、NKT細胞療法と併用療法における相乗効果について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) マウス造血器腫瘍細胞株を用いた Tumor/Gal ワクチンの作成と抗腫瘍効果の検討

マウス造血器腫瘍細胞株として単球性白血病細胞株 WEHI3B, 骨髓腫細胞株 J558, リンパ腫細胞株 EL4, A20 を用いた。各々の細胞株の培養中にα-GalCerを48時間添加し、Tumor/Gal ワクチンとして使用した。一部の細胞株についてはCD1dまたはヒトCD20を遺伝子導入した細胞株を作成した。

2) 抗癌剤との併用効果の検討

抗癌剤としてミトキサントロン(Mit), シタラビン(Ara-C)、ゲムシタビン(Gem)をまた分子標的治療薬としてリツキシマブを使用した。

4. 研究成果

1) 造血器腫瘍細胞株を用いた Tumor/Gal ワクチンを免疫したマウスにおける抗腫瘍効

果
 いずれの腫瘍細胞株をマウスに Live cell として静脈内投与すると、マウスは約1ヶ月程度で腫瘍死する。しかし、図1に示すように NKT リガンドである α -GalCer をパルスした Tumor/Gal ワクチンではマウスは腫瘍細胞を完全に殺傷し、長期に(6ヶ月以上)生存する。

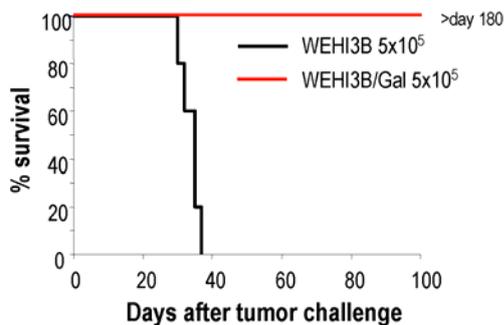


図1 Live WEHI3B/Gal ワクチンは静脈内投与後生体内でNK, NKT 細胞により完全に殺傷されるため、マウスは長期に生存する。

次にワクチン後の抗腫瘍T細胞の誘導を検討した。図2示すように、通常抗腫瘍T細胞が存在しなければ腫瘍を拒絶できないといわれる皮下接種モデルにおいて、Tumor/Gal ワクチンモデルでは腫瘍を拒絶することができた。

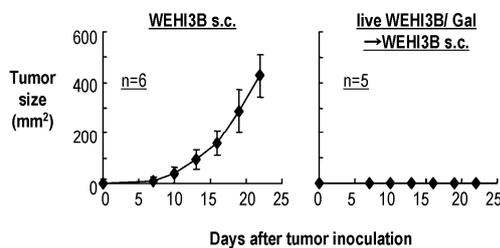


図2 Tumor/Gal ワクチン後の抗腫瘍効果

また、このような Tumor/Gal ワクチン後の抗腫瘍効果は長期にわたり持続することも

明らかになった。図3のようにワクチン後1年後に腫瘍を皮下接種した場合でも抗腫瘍効果を示した。

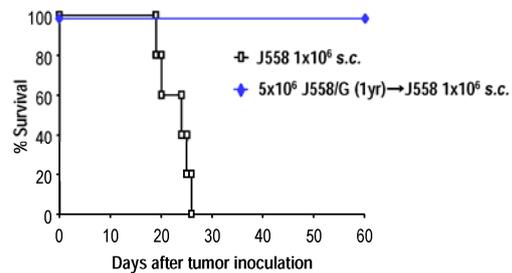


図3. J558/Gal ワクチンを接種後1年後に親株のJ558を皮下接種したところ、コントロールマウス(腫瘍のみを接種した群)では腫瘍が増大し、マウスが死亡するのにに対し、ワクチン群では腫瘍を拒絶した。

しかし、上記のようなワクチンモデルに比べ、白血病細胞株の治療モデルでは腫瘍の増殖速度が非常に速いため、Tumor/Gal 単独免疫による有意な生存率の延長に至らなかった。

2) 抗癌剤、分子標的治療薬との併用効果の検討

今回 MIT、Ara-C、GEM の3種の抗癌剤を低用量組み合わせることにより、治療効果が認められるかどうか検討した。その結果、GEM と Tumor/Gal の組み合わせの群で生存率の延長が認められた。

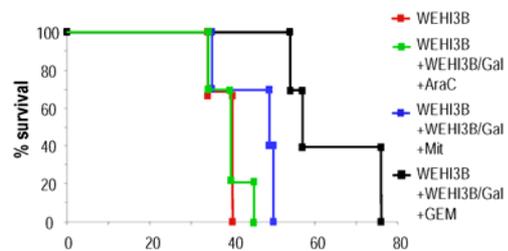


図4 WEHI3B 白血病モデルにおいて

Tumor/Gal と化学療法の併用療法の効果
 このように白血球減少を起こさない程度のごく低用量のGEMとの併用で相乗効果が認め

られたことより、併用療法の展開が期待できる。GEM については制御性 T 細胞や骨髄由来抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cells) に対する効果がこれまで報告されており、Tumor/Gal ワクチンとの相乗効果が免疫細胞のどのような相互作用によるものか、今後検討していく必要があると考える。

リツキシマブ (抗 CD20 抗体) を用いた抗体療法は抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) を介し、自然免疫細胞である NK 細胞による殺傷効果を作用機序として悪性リンパ腫に使用され効果を上げているものの、やはり再発が問題となっている (Manches et al. *Blood* 2003, 101: 949)。そこで、残存細胞に対する抗腫瘍効果を上げる為、この抗体療法と自然リンパ球を活性化する方法は、両者とも自然免疫の増強という面で共通であり、相乗効果が得られれば、理想的な新規療法として期待できる。

抗体療法の主となる作用機序は、腫瘍特異的な抗体が腫瘍に結合し、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) により NK 細胞、マクロファージにより腫瘍が殺傷されるものであり自然免疫の活性化は必須であることが判明している。故に両者の免疫療法の確立のためには、NK 細胞が活性化することが一つの目標となる。この部分は、我々がこれまで推進してきた自然免疫療法の目的と一致しており、応用可能であると考えられる。実際これまでの研究で α -GalCer を提示した腫瘍細胞を用いることで NKT 細胞の活性化した後に NK 細胞の活性化が長期に誘導されることが判明した。そこで次に Tumor/Gal 自体のワクチンとしての有効性を高める目的として、WEHI3B, A20 にヒト CD20 の遺伝子導入株を用いた研究を進めたところ抗腫瘍効果の部分的増強を認めた。併用療法には今後更に開発の余地があると考えている。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Okita K, Motohashi S, Shinnakasu R, Nagato K, Yamasaki K, Sato Y, Kitamura H, Hijikata A, Yamashita M, Shimizu K, Fujii S, Ohara O, Taniguchi M, Sakaida I, Nakayama T. A set of genes associated with the interferon- γ response of lung cancer patients undergoing α -galactosylceramide-pulsed dendritic cell therapy. *Cancer Sci.* 101:2333-2340, 2010. 査読有.
2. Shimizu K, Hidaka M, Bickham K, Moriwaki M, Fujimoto K, Kawano F, Fujii S. Human leukemic cells loaded with alpha-galactosylceramide (alpha-GalCer) activate murine NKT cells in situ. *Int J Hematol.* 92:152-160, 2010. 査読有.
3. Watarai H, Fujii S, Yamada D, Rybouchkin A, Sakata S, Nagata Y, Iida-Kobayashi M, Sekine-Kondo E, Shimizu K, Shozaki Y, Sharif J, Matsuda M, Mochiduki S, Hasegawa T, Kitahara G, Endo TA, Toyoda T, Ohara O, Harigaya K, Koseki H, Taniguchi M. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells. *J Clin Invest.* 120:2610-2618, 2010. 査読有.
4. Tashiro T, Sekine-Kondo E, Shigeura T, Nakagawa R, Inoue S, Omori-Miyake M, Chiba T, Hongo N, Fujii S, Shimizu K, Yoshiga Y, Sumida T, Mori K, Watarai H, Taniguchi M. Induction of Th1-biased cytokine production by alpha-carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for NKT cells. *Int Immunol* 22: 319-328, 2010. 査読有.
5. Watarai H, Rybouchkin A, Hongo N, Nagata Y, Sakata S, Sekine E, Dashtsoodol N, Tashiro T, Fujii S, Shimizu K, Mori K, Masuda K, Kawamoto H, Koseki H, Taniguchi M. Generation of functional NKT cells in vitro from embryonic stem cells bearing rearranged invariant Valpha14-Jalpha18 TCRalpha gene. *Blood.* 115: 230-237, 2010. 査読有.
6. Fujii S, Motohashi S, Shimizu K, Nakayama T, Yoshiga Y, Taniguchi M. Adjuvant activity mediated by iNKT

- cells. *Semin Immunol.* 22:97-102, 2010. 査読有.
- Ishii Y, Motohashi S, Shimizu K, Nakayama Taniguchi M, and Fujii S. Application of NKT cells in immunotherapy. *Curr Immunol Review* 6:109-115, 2010. 査読無.
 - Shimizu K, Fujii S. DC therapy induces long-term NK reactivity to tumors via host DC. *Eur J Immunol.* 39:457-68, 2009. 査読有.
 - Fujii S, Goto A, Shimizu K. Antigen mRNA-transfected, allogeneic fibroblasts loaded with NKT-cell ligand confer antitumor immunity. *Blood.* 113: 4262-4272, 2009. 査読有.
 - Fujii S, Takayama T, Asakura M, Aki K, Fujimoto K, Shimizu K. Dendritic cell-based cancer immunotherapies. *Arch Immunol Ther Exp.* 57:189-198, 2009. 査読有.
 - Fujii S, Motohashi S, Shimizu K, Nakayama T, Yoshiga Y, Taniguchi M. Adjuvant activity mediated by iNKT cells. *Semin Immunol.* 査読有.
 - Shimizu K, Fujii S.: An adjuvant role of in situ dendritic cells (DCs) in linking innate and adaptive immunity. *Front Biosci.* 13:6193-201, 2008. 査読有.

[学会発表] (計 7件)

- Kanako Shimizu. Evaluation of long term NK reactivity to tumor generated by Dendritic cell therapy. 14th International Congress of Immunology, Aug 26, 2010, Kobe Japan.
- 清水佳奈子 抗原mRNAとNKTリガンドを提示させたアジュバントベクター細胞による抗腫瘍効果の誘導 第14回日本がん免疫学会総会 2010年7月23日 熊本
- 清水佳奈子 抗原mRNAとNKTリガンドを提示させたアジュバントベクター細胞による抗腫瘍効果の誘導 麒麟塾 6th Kirin-Juku meeting 2010年6月5日 東京
- 清水佳奈子 Novel mode of action of DCs leading to long term NK cell reactivity to tumors. 日本癌学会 2009年10月23日横浜
- 清水佳奈子 New Development of DC therapy. 日本血液学会 2009年10月23日京都
- 清水佳奈子 Dendritic cell therapy induces long term NK reactivity to

tumors. 日本免疫学会 2009年12月4日 大阪

- 清水佳奈子 ヒト腫瘍細胞を用いたNKT細胞療法への応用の考察 第70回日本血液学会 2008年10月11日 京都

[図書] (計 8 件)

和文総説

- 清水佳奈子, 朝倉三貴, 藤井眞一郎. 「癌の免疫療法 人工アジュバントベクター細胞の開発」 月刊メディカル・サイエンス・ダイジェスト (ニューサイエンス社) 36:75-753, 2010.
- 清水佳奈子, 藤井眞一郎. 「樹状細胞によるT細胞とNKT細胞への二重交差提示機能」 臨床免疫 (科学評論社) 51:595-604, 2009.
- 清水佳奈子, 藤井眞一郎. 「自然免疫から獲得免疫への橋渡し」 最新医学 (最新医学社) 64:2371-2377, 2009.
- 藤井眞一郎, 清水佳奈子. 「がん免疫療法-NKT細胞から獲得免疫へ」 血液フロンティア (医薬ジャーナル社) 19:531-539, 2009.
- 藤井眞一郎, 本橋新一郎, 清水佳奈子, 安芸かおり, 中山俊憲, 谷口克. 「NKT細胞の新展開と臨床応用」 炎症と免疫 (先端医学社) 16:76-82, 2008.
- 藤井眞一郎, 川口真喜子, 清水佳奈子. 「NKT細胞による細胞免疫療法」 血液・腫瘍科 (科学評論社) 57:127-138, 2008.
- 藤井眞一郎, 清水佳奈子. 「NKT細胞と樹状細胞のクロストークを利用した免疫療法の新展開」 実験医学 (羊土社) 26:196-204, 2008.
- 藤井眞一郎, 清水佳奈子. NKT細胞の新展開と臨床応用 炎症と免疫 (先端医学社) 16:76-82, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 佳奈子 (SHIMIZU KANAKO)
独立行政法人理化学研究所・免疫治療モデル
開発研究ユニット・ユニットリーダー
研究者番号: 20391980

(2) 研究分担者

藤井 眞一郎 (Fujii Shin-ichiro)
独立行政法人理化学研究所・免疫細胞移植戦
略研究ユニット ユニットリーダー
研究者番号: 10392094