

令和 5 年 4 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17408

研究課題名（和文）Invariant NKT細胞のCD1d非依存性腫瘍認識分子の同定

研究課題名（英文）Identification of molecules recognized by invariant NKT cells independently of CD1d

研究代表者

青木 孝浩（Aoki, Takahiro）

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30791553

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Invariant NKT細胞はそのT細胞受容体(TCR)でCD1dに提示された糖脂質を介して腫瘍認識することは知られているが、それ以外の腫瘍認識分子は不明である。そこで本研究ではiPS細胞由来NKT細胞(iPS-NKT細胞)を用いてそのCD1d非依存性腫瘍認識分子を同定することを目的とした。iPS-NKT細胞はTCR非依存性にCD1d陰性腫瘍を認識したことから、マスマイトメトリーを用いてiPS-NKT細胞に発現するNK受容体を同定した。そして腫瘍細胞上に発現する標的分子をCRISPR libraryを用いて同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でiPS-NKT細胞は今回同定したNK受容体とそのリガンドを介して、CD1d非依存性にも腫瘍認識し、細胞傷害活性を発揮することを明らかにした。このことはiPS-NKT細胞療法がCD1d発現がん細胞に限定されることなく、当リガンドを発現するがん種にも有効であることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：Invariant NKT cells are known to recognize tumor cells by detecting glycolipids presented on CD1d through their T cell receptor (TCR). However, the identity of other molecules involved in tumor recognition remains unknown. Therefore, the objective of this study was to identify tumor recognition molecules that function independently of CD1d, using induced pluripotent stem cell-derived NKT cells (iPS-NKT cells). These iPS-NKT cells were able to recognize CD1d-negative tumors in a TCR-independent manner. NK receptors expressed on iPS-NKT cells were identified using mass cytometry, and target molecules expressed on tumor cells were identified by a CRISPR library.

研究分野：がん免疫

キーワード：NKT細胞 NK受容体 CRISPRライブラリー

## 1. 研究開始当初の背景

白血病の治療成績は化学療法の強化により向上しているが、化学療法で寛解導入不応症例や移植後再発症例ではいまだ長期生存は困難であり、新たな治療戦略が求められている。急性リンパ性白血病 (ALL) においては CD19 を標的とした Bispecific T cell Engager や Chimeric antigen receptor T cells を用いた免疫療法がすでに臨床応用されているが、これらの治療後でも再発が多いことが明らかとなっている。さらに、ALL より治療成績に劣る急性骨髄性白血病 (AML) においては CD19 のような有望な標的はまだ同定されておらず、新規治療開発が求められている。そこで申請者は HLA 非拘束性に抗腫瘍効果を示すことや獲得免疫を誘導することを免疫学的特徴として有する invariant NKT (iNKT) 細胞に注目し、治療開発研究を行なってきた。iNKT 細胞は Va24Vb11-TCR を発現し、抗原提示分子 CD1d により提示された糖脂質を認識し、CD1d 陽性白血病細胞に対して直接的な細胞傷害活性を発揮する。これに加えて申請者は iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識の存在を明らかにし、iNKT 細胞養子免疫療法が白血病治療に有用である可能性を示した (Aoki et al, Cancer Sci, 2020)。しかし、研究開始時点においてその標的分子は不明である。その標的分子が明らかとなれば CD1d 陽性がん細胞に限定されず、その分子を有する CD1d 陰性がん細胞に対しても NKT 細胞養子免疫療法の治療効果が期待できる。

## 2. 研究の目的

これまでに iNKT 細胞が CD1d 陰性腫瘍細胞に対し直接的に細胞認識する明らかな証拠やその機序の解明はなされていない。そこで本研究では、iNKT 細胞が CD1d 陰性白血病を認識する標的分子の同定を目的とした。また千葉大学では理化学研究所と共同で iPS 細胞由来 NKT 細胞 (iPS-NKT 細胞) の治療開発に取り組んでおり、今後の NKT 細胞養子免疫療法は iPS-NKT 細胞を用いることを計画している。そこで本研究では iPS-NKT 細胞を用いて、iNKT 細胞の抗腫瘍メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) iPS-NKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識と T 細胞受容体 (TCR) 関与の確認  
iPS-NKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識を確認するため、フローサイトメトリー、PCR を用いて CD1d 陰性を確認した K562 と CD1d-KO U937 白血病細胞株に対して、iPS-NKT 細胞が腫瘍認識し、脱顆粒反応を示すか CD107a assay を用いて評価した。またそこにおける TCR の関与の有無を調べるため、CRISPR/Cas9 system を用いて TRAC 遺伝子ノックアウト (KO) を行なった TCR-KO iPS-NKT 細胞が CD1d 陰性白血病細胞に対して、腫瘍認識し、脱顆粒反応を示すか CD107a assay を用いて評価した。
- (2) iPS-NKT 細胞に発現する NK 受容体の解析  
iPS-NKT 細胞は K562 に対して脱顆粒反応するのに対して、NKT 細胞株は脱顆粒反応しないことから両者の違いに注目することとした。この両者がそれぞれ発現する細胞膜蛋白をマスマスペクトロメトリー (公益財団法人かずさ DNA 研究所 DIA プロテオーム解析) を用いて解析し、それに含まれる NK 受容体を比較した。
- (3) iPS-NKT 細胞に認識される K562 細胞上の標的分子解析  
K562 細胞株を CRISPR/Cas9 library を用いて網羅的な遺伝子 KO を行い、iPS-NKT 細胞共培養条件で培養を行なった。iPS-NKT 細胞共培養前後での KO 細胞分布を次世代シーケンサーを用いて解析した。
- (4) 抽出された標的分子のバリデーション  
上記で中種された標的分子を KO した K562 細胞を作成し、iPS-NKT 細胞の脱顆粒反応と細胞傷害活性を評価した。またそのリガンドを KO した iPS-NKT 細胞の K562 細胞に対する脱顆粒反応を評価した。

## 4. 研究成果

- (1) iPS-NKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識と T 細胞受容体 (TCR) 関与の確認  
まず iPS-NKT 細胞が CD1d 陰性 K562, CD1d-KO U937 に対して脱顆粒反応、細胞傷害活性を示すことを確認した。このことから iPS-NKT 細胞も CD1d 非依存性腫瘍認識を行い、細胞傷害を示すことが示された。  
次に CRISPR/Cas9 system を用いて TRAC 遺伝子 KO を行なった iPS-NKT 細胞が、K562, CD1d-KO U937 に対して脱顆粒反応を示すか確認を行なったところ、TCR 発現群と TCR KO 群では脱顆粒反応に違いを認めなかった。このことから iPS-NKT 細胞は TCR 非依存性にこれら白血病細胞を認識していることが示された。

## (2) iPS-NKT 細胞に発現する NK 受容体の解析

iPS-NKT 細胞は TCR 非依存性に K562 を認識していることから NK 受容体に注目して解析を行なった。その結果を図に示すが、iPS-NKT 細胞は NKT 細胞株と比較し、多くの NK 受容体が発現していることが明らかとなった。これらの NK 受容体リガンドの中に K562 を認識する標的分子が存在することが示唆された。

## (3) iPS-NKT 細胞に認識される K562 細胞上の標的分子解析

CRISPR/Cas9 library を用いて網羅的な遺伝子 KO を行った K562 細胞プールを iPS-NKT 細胞と 2 週間共培養し、共培養前と 1 週時点、2 週間時点の K562 細胞を回収し、KO 遺伝子分布を解析した。そして共培養前後での遺伝子分布を比較したところ 2 つの標的分子が抽出され、その一つは iPS-NKT 細胞で強く発現している NK 受容体リガンドであった (分子 1)。

## (4) 抽出された標的分子のバリデーション

上記で抽出された分子 1 を KO した K562 細胞に対する iPS-NKT 細胞の脱顆粒反応、細胞傷害活性は低下した。また分子 1 の受容体を KO することによって iPS-NKT 細胞の K562 細胞に対する脱顆粒反応は低下した。この分子 1 を発現する Daudi 細胞を用いても同様の結果であることを確認した。

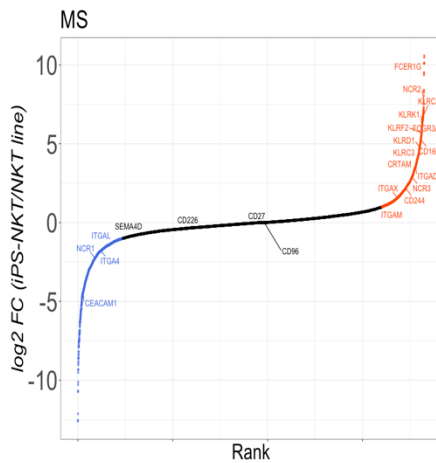


図 1. iPS-NKT 細胞で強く発現する NK 受容体 (赤ドット)

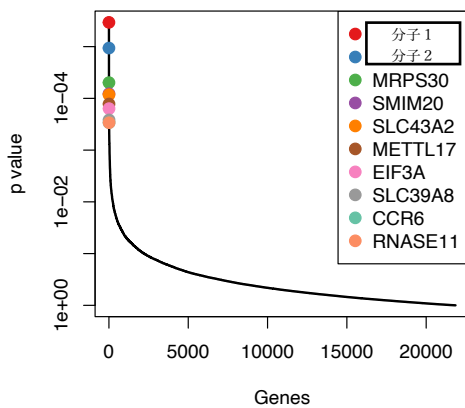


図 2. CRISPR スクリーニングの結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 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 -

1. 著者名 青木孝浩、本橋新一郎	4. 巻 50
2. 論文標題 iPS細胞由来NKT細胞を利用したがん免疫療法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Technology	6. 最初と最後の頁 1164-1166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 青木孝浩、古関明彦	4. 巻 38
2. 論文標題 細胞療法の新しい戦略 幹細胞ベース iPS細胞由来NKT細胞	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2956-2962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 青木孝浩、古関明彦	4. 巻 275
2. 論文標題 再生医療の応用による免疫リプログラミング iPS細胞を用いたNKT細胞再生と治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 67-72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takahiro Aoki, Genta Kitahara, Midori Kobayashi, Momoko Okoshi, Munechika Yamaguchi, Hiroko Okura, Nayuta Yakushiji, Masami Kawamura, Tomonori Iyoda, Kanako Shimizu, Shin-ichiro Fujii, Shinichiro Motohashi, Haruhiko Koseki
2. 発表標題 The iPS cell-derived NKT cell therapy with aGalCer-loaded dendritic cells for solid tumors
3. 学会等名 Japanese Society for Transplantation and Cellular Therapy
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Aoki, Genta Kitahara, Momoko Okoshi, Midori Kobayashi, Munechika Yamaguchi, Hiroko Okura, Nayuta Yakushiji, Masami Kawamura, Tomonori Iyoda, Kanako Shimizu, Shin-ichiro Fujii, Shinichiro Motohashi, Haruhiko Koseki
2. 発表標題 Alpha-galactosylceramide-loaded antigen-presenting cells induce direct cytotoxicity and adjuvant effects of induced pluripotent stem cell-derived natural killer T cells
3. 学会等名 Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahiro Aoki, Genta Kitahara, Midori Kobayashi, Momoko Okoshi, Munechika Yamaguchi, Hiroko Okura, Nayuta Yakushiji, Masami Kawamura, Tomonori Iyoda, Kanako Shimizu, Shin-ichiro Fujii, Shinichiro Motohashi, Haruhiko Koseki
2. 発表標題 Preclinical study of the combination therapy of iPS-NKT cells and aGalCer-loaded antigen presenting cells
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究協力者	古関 明彦  (Koseki Haruhiko)		
研究協力者	本橋 新一郎  (Motohashi Shinichiro)		

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
---------	---------