

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03082

研究課題名（和文）鼻性NK/T細胞リンパ腫を治癒に導く複合的免疫療法の確立

研究課題名（英文）Establishment of novel immunotherapy against nasal NK/T cell lymphoma

## 研究代表者

原 淵 保明（Harabuchi, Yasuaki）

旭川医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：80208686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：鼻性NK/T細胞リンパ腫はアジア圏を中心に発症する悪性疾患であり、申請者が腫瘍細胞へのEBウイルス(EBV)感染を世界に先駆けて報告して以降、EBV関連悪性腫瘍のひとつとして確立されている。一連の研究で申請者らは本疾患に発現している遺伝子を網羅的に解析するとともに、EBVが悪性化に関わるメカニズム解析や疾患特異的な腫瘍増殖因子の検索、腫瘍周囲に浸潤している炎症細胞とのクロストークの解明、細胞株を免疫不全マウスに移植した異種移植モデルの作成と薬効評価系の確立などを行い、さらに免疫チェックポイント分子の発現を解析することで、本疾患における免疫治療の実現性についても検討を重ねてきた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫抑制の解除と腫瘍特異的免疫の活性化を同時に標的とした治療法は他の悪性腫瘍においても報告がないため本研究の独自性および創造性は担保されており、臨床応用を目指した実用的な研究と考えられる。さらに、本研究で創出した新規治療アプローチは、腫瘍の組織型によってエピトープペプチドを変更することでその他の悪性腫瘍にも応用可能な治療戦略となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this series of research, we have examined the multiple oncogenic factors of nasal NK/T cell lymphoma. We have focused on Epstein-Barr virus-derived LMP1. This protein has a multiple role to support this type of lymphoma by inducing factors that are related to lymphoma progression. In addition, we found that chemokine and its receptor play a significant role in tumor proliferation. Especially, CCR4 could be a promising target as an antibody-dependent cellular toxicity-based lymphoma suppression. In addition, we have found that this lymphoma would be a target of antitumor immune cells such as cytotoxic helper T cells. c-Met was expressed in this lymphoma that could be killed by c-Met-reactive CD4 T cells. CD27/CD70 and PD-1/PD-L1 signalings also play role in this lymphoma to escape from antitumor immune cells.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：NK/T細胞リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫は申請者が EBV 関連悪性腫瘍と見出した疾患であり、腫瘍細胞に EBV-DNA や EBV 由来蛋白が同定される。申請者らは本疾患の病勢に血清 EBV-DNA がマーカーとして有用であることも明らかとしており (Ishii et al. J Med Virol, 2007)、EBV は病態に深く寄与していると考えられる。ウイルス関連悪性腫瘍はウイルス由来の抗原を発現しているため、免疫細胞に非自己と認識されやすいと考えられている。実際に、本疾患の病理組織では広範な壊死や肉芽組織に加えて、腫瘍組織内にリンパ球や単球、マクロファージなどの炎症細胞が著明に浸潤している。そのため、抗腫瘍免疫におけるアタッカーである腫瘍特異的 T 細胞は病態局所に存在していると考えられるが、腫瘍は様々な因子を用いて T 細胞応答を抑制していることが示唆される。

申請者らは免疫抑制チェックポイントのうち、PD-L1 および可溶性 PD-L1 が鼻性 NK/T 細胞リンパ腫に高発現していることを明らかにした (Nagato et al. Cancer Immunol Immunother, 2017)。しかし、PD-1 を標的とした免疫チェックポイント阻害薬は PD-L1 陽性の悪性腫瘍においても奏効率が約 20%と満足いく成績をあげられておらず、PD-1 以外の免疫抑制機構の解明およびその打破が「どうしたら鼻性 NK/T 細胞リンパ腫を治癒に導けるか?」という「問い」を解く鍵と考えられる。本研究では、腫瘍による免疫抑制の解除および抗腫瘍免疫の活性化という二つの側面から有効な免疫療法を開発していく。具体的な戦略として、①鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における新たな免疫抑制機構の解明から得られた知見をもとに、②腫瘍の免疫原性を上げる分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬を同定する。さらに、本腫瘍が発現している腫瘍抗原からエピトープペプチドを同定し、③鼻性 NK/T 細胞リンパ腫特異的ペプチドワクチンの開発および、ペプチドを用いた腫瘍特異的 T 細胞の In vitro での誘導を最適化することで T 細胞移入による養子免疫療法の基礎的基盤を確立する。②で得られた知見を用いて、④免疫賦活剤とペプチドワクチンもしくは養子免疫療法の併用療法といったこれまでに類を見ない新たな治療法の創生を目指す。

## 2. 研究の目的

鼻性 NK/T 細胞リンパ腫による免疫抑制機構を多方面から明らかにし、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬を用いて抗腫瘍免疫を賦活化する (アジュバント効果)。さらに、多様な検索手法を用いて免疫療法の標的となる新規腫瘍抗原の同定を試みる。同定した腫瘍抗原からエピトープペプチドを同定し、抗腫瘍 T 細胞を惹起可能なペプチドワクチンを創生する。最終的に、免疫抑制を打破するアジュバントとペプチドワクチンを組み合わせることで、腫瘍特異的 T 細胞を介する抗腫瘍効果をマウスモデルで証明する。

## 3. 研究の方法

### ① 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における免疫抑制機構の解明 (原測、高原、熊井、大原)

#### a. PD-1/PD-L1 以外の免疫チェックポイント分子の発現解析

申請者らは本腫瘍による免疫抑制に PD-1/PD-L1 パスウェイが関与していることを明らかとしたが (Nagato et al. Cancer Immunol Immunother, 2017)、VISTA などのその他の免疫チェックポイント分子の発現は解明されていない。鼻性 NK/T 細胞リンパ腫細胞株および患者由来の生検組織を用いて、腫瘍細胞および免疫細胞の免疫チェックポイント分子の発現をフローサイトメトリーやウエスタンブロット、マルチプレックス免疫組織化学染色などの手法により明らかにする。さらに、腫瘍細胞とリンパ球や骨髄球 (健康人ドナーから誘導したマクロファージや myeloid-derived suppressor cells: MDSC および、単球系細胞株 THP-1) を共培養することによる、腫瘍細胞もしくは免疫細胞上の免疫チェックポイント分子発現および免疫細胞の形質変化 (M2 マクロファージの誘導など) を上記手法で検討する。

#### b. 腫瘍細胞と制御系免疫細胞が分泌する免疫抑制因子の同定

腫瘍は免疫チェックポイント分子以外にも液性の免疫抑制因子を分泌することが知られており、申請者らは本腫瘍が CCL17 や可溶性 PD-L1 を分泌することを明らかとしてきた (Kumai et al. Cancer Immunol Immunother, 2015)。細胞株培養上清や患者血清中を用いて、腫瘍もしくは制御系免疫細胞が分泌している TGF- $\beta$  やプロスタグランジン E2 などの免疫抑制因子を MULTIPLEX ELISA 法やプロテオーム解析を用いて網羅的に解析する。同定した因子の発現細胞を免疫組織化学染色を用いて同定し、TCGA データベースで該当因子の発現が上昇しているかを検討する。

#### c. micro RNA (miR) による免疫関連分子制御メカニズムの解明

申請者らは先行研究で本腫瘍細胞株が産生する miRNA を網羅的に解析し、発現に変化がある miR を同定した (Komabayashi et al. Am J Hematol, 2014)。これらが免疫チェックポイント分子および液性免疫抑制因子に与える影響を TargetScan や MicroCosm といったデータベースを用いて解析する。ついで、miR のインヒビターおよび miR mimic を腫瘍細胞に導入して、標的免疫抑制因子の発現が増強もしくは低下することを確認することで miR の免疫抑制環境における役割を明らかにする。

#### ② 腫瘍の免疫原性を上げる分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の同定 (岸部、熊井、大原、大栗、長門)

本検討では、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫の微小環境において免疫賦活化 (アジュバント) 効果を有する新規薬剤を同定する。

##### a. 新規免疫チェックポイント阻害薬の鼻性 NK/T 細胞リンパ腫における有用性の検討

①の実験系で同定した新規免疫チェックポイント分子が腫瘍微小環境に及ぼす影響について検討する。具体的には、申請者らが有している本腫瘍細胞株 (SNK-6 および SNT-8 など) と HLA を一致させたドナー由来の T 細胞および NK 細胞を共培養し、T 細胞の抗腫瘍応答を LDH や CFSE/7-AAD ラベリングを用いた細胞障害活性アッセイで評価する。

##### b. サイトカイン/ケモカイン阻害による抑制系 T 細胞誘導/浸潤能への影響の解析

申請者らは本腫瘍が CCR4 を発現しており、CCL17 を介したポジティブフィードバックを形成していることを明らかとした (Kumai et al. Cancer Immunol Immunother, 2015)。CCR4 は抑制系 T 細胞 (Treg) にも発現しており、CCL17 は Treg の腫瘍内浸潤にも寄与する。そのため、腫瘍細胞株の培養上清によるナイーブ CD4 T 細胞から Treg への形質転換が抗 CCR4 抗体 (Mogamulizumab) によって抑制できるかを Foxp3/CD25 染色で、また腫瘍細胞株の培養上清による Treg の浸潤能が抗 CCR4 抗体によって抑制されるかをマトリジェル浸潤アッセイで検討する。

##### c. 分子標的薬の免疫アジュバントとしての有用性の検討

申請者らは本腫瘍が c-Met を介して細胞増殖に寄与していることを見出した (Kumai et al. Oncoimmunology, 2015)。c-Met は MDSC の誘導に寄与していることが示唆されているため、腫瘍細胞株の培養上清によってドナー由来骨髓球から MDSC が誘導されるかを CD11b 染色や T 細胞の CD3/CD28 応答などで確認したのち、c-Met 阻害剤 (ARQ197) によってその誘導が抑制できるか検討する。

#### ③ 鼻性 NK/T 細胞リンパ腫特異的ペプチドワクチンの開発 (熊井、小林、大栗、長門)

申請者らはこれまでに p53 などの多くの腫瘍抗原から腫瘍特異的な T 細胞を誘導可能なエピトープペプチドを同定してきた (Ohara et al. Oncoimmunology, 2018 など)。本検討では、これまで構築してきたペプチド解析アルゴリズムを用いて本腫瘍に発現している腫瘍抗原および、そのエピトープを同定する。具体的には、発現している腫瘍抗原を TCGA データベースで検索し、発現が予測されるタンパクの腫瘍細胞株および患者組織における発現を、フローサイトメトリーやウエスタンブロット、免疫組織化学染色で明らかにする。次に、IEDB や SYFPEITHI によるアルゴリズム解析を用いて複数の HLA に結合可能なペプチドを推定、合成する。このペプチドと、磁気ビーズ法で分離したドナー由来樹状細胞および T 細胞を共培養/クローニングすることで、腫瘍特異的 T 細胞株を樹立する。樹立した T 細胞の HLA 拘束性は、抗 HLA 抗体による増殖阻害および ELISA 法およびサイトカインの細胞内染色で評価する。T 細胞による腫瘍応答能を、ELISA 法を用いた IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産性能および LDH や CFSE/7-AAD ラベリングを用いた細胞障害活性アッセイで評価することで、同定したペプチドのワクチンとしての有用性を検討する。

#### ④ 免疫賦活剤とペプチドワクチンもしくは養子免疫療法の併用療法 (原渕、高原、岸部、熊井、小林、大栗、長門)

本検討では、①～③で得られた成果を統合させ、患者の治療に直結する新たな複合的免疫療法の開発を目指す。具体的には、③で同定したペプチドで樹立した腫瘍特異的 T 細胞の腫瘍細胞への応答性が②で同定した免疫チェックポイント阻害薬やケモカイン阻害薬、分子標的薬で増強するかを、ELISA 法および細胞内染色による Granzyme B 産性能および LDH や CFSE/7-AAD ラベリングを用いた細胞障害活性アッセイで評価する。さらに、NOD/Shi-scid.IL-2R  $\gamma$  KO (NOG) マウスに腫瘍細胞を接種した異種移植モデルに、ペプチドで樹立した T 細胞株を尾静脈より移入して T 細胞による抗腫瘍応答がこれらのアジュバントにより増強するか検討する。これらの成果に基づき、鼻性 NK/T 細胞リンパ腫に対するペプチドワクチンもしくは養子免疫療法へのアジュバントの有用性を証明する。

## 4. 研究成果

我々は鼻性 NK/T 細胞リンパ腫が PD-1 を介して腫瘍免疫から逃避しており、また c-Met 特異的免疫療法、CCR4 抗体、CD27/70 シグナル阻害が新規治療として有用なことを見出した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nagato T, Komatsuda H, Hayashi R, Takahara M, Kishibe Kan, Yasuda Shunsuke, Yajima Yuki, Kosaka Akemi, Ohkuri Takayuki, Oikawa Kensuke, Harabuchi Shohei, Kono Michihisa, Yamaki Hidekiyo, Wakisaka Risa, Hirata-Nozaki Yui, Ohara Kenzo, Kumai Takumi, Katada Akihiro, Hayashi Tatsuya, Harabuchi Yasuaki, Kobayashi Hiroya	4. 巻 Online
2. 論文標題 Expression of soluble CD27 in extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type: potential as a biomarker for diagnosis and CD27/CD70-targeted therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-023-03394-7	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 Komatsuda Hiroki, Wakisaka Risa, Kono Michihisa, Kumai Takumi, Hayashi Ryusuke, Yamaki Hidekiyo, Sato Ryosuke, Nagato Toshihiro, Ohkuri Takayuki, Kosaka Akemi, Ohara Kenzo, Takahara Miki, Katada Akihiro, Kobayashi Hiroya	4. 巻 114
2. 論文標題 Mitogen activated protein kinase inhibition augments the T cell response against H0XB7 expressing tumor through human leukocyte antigen upregulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 399 ~ 409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15619	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nozaki Y, Kumai T, Komatsuda H, Kono M, Yamaki H, Kishibe K, Takahara M, Hayashi T, Harabuchi Y
2. 発表標題 C-met as a novel antigen in extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type for helper T cell-based immunotherapy
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and associated diseases（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
研究分担者	熊井 琢美  (Kumai Takumi)  (00596306)	旭川医科大学・医学部・講師    (10107)	
研究分担者	大原 賢三  (Ohara Kenzo)  (20596308)	旭川医科大学・医学部・講師    (10107)	
研究分担者	高原 幹  (Takahara Miki)  (50322904)	旭川医科大学・医学部・講師    (10107)	
研究分担者	大栗 敬幸  (Ohkuri Takayuki)  (70564061)	旭川医科大学・医学部・准教授    (10107)	
研究分担者	長門 利純  (Nagato Toshihiro)  (80431419)	旭川医科大学・医学部・講師    (10107)	
研究分担者	岸部 幹  (Kishibe Kan)  (80447101)	旭川医科大学・医学部・講師    (10107)	
研究分担者	小林 博也  (Kobayashi Hiroya)  (90280867)	旭川医科大学・医学部・教授    (10107)	

## 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
---------	---------