

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15954

研究課題名（和文）CIML NK cellとClass選択的HDAC阻害薬による新規肝癌治療開発

研究課題名（英文）Antitumor effect of histone deacetylase class IIa inhibitor with CIML NK cell in hepatocellular cell carcinoma

研究代表者

久保 智洋（Kubo, Tomohiro）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00634669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：肝癌細胞株に対するCIML NK細胞および肝癌に高発現し、遺伝子発現の調節に関わるHDAC Class IIaの選択阻害薬との併用による抗腫瘍効果を検討した。CIML NK細胞は、コントロールのNK細胞（IL-2の刺激のみ）と比較し、肝癌細胞株に対する細胞障害活性が高いことを明らかにした。一方、選択的 Class IIa HDAC阻害薬の暴露による肝癌細胞株の遺伝子発現の変化を検討したところ、NK細胞活性化受容体のリガンドであるULBP1、B7-H6遺伝子発現が低下し、肝癌細胞株に対するCIML NK細胞の細胞障害活性は選択的 Class IIa HDAC阻害薬を併用することで低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CIML NK細胞による免疫療法は、肝細胞癌に対しても高い抗腫瘍効果を示し、新たな治療戦略の一つとなる可能性が示唆されるが、今後、in vivoマウスモデルでの抗腫瘍効果の検討や癌微小環境内においてCIML NK細胞の細胞傷害活性が維持されるかなどについてさらにこの研究を発展させていく必要がある。一方で選択的 Class IIa HDAC阻害薬はCIML NK細胞の細胞傷害活性を減弱させたため、CIML NK細胞の効果を増強する他のepigenetic drugの探索が必要である。

研究成果の概要（英文）：We evaluated that the antitumor effects of CIML NK cells and their combination with selective inhibitors of HDAC Class IIa, which is highly expressed in hepatocellular cell carcinoma and involved in the regulation of gene expression, in hepatocellular cell carcinoma cell lines. CIML NK cells showed higher cytotoxic activity in hepatocellular cell carcinoma cell lines compared to control NK cells (IL-2 stimulation only). Next we examined changes in gene expression of hepatocellular cell carcinoma cell lines exposure to selective Class IIa HDAC inhibitors, we found that ULBP1 and B7-H6 gene expression, which are ligands for NK cell activation receptors, were decreased. and the cytotoxic activity of CIML NK cells in hepatocellular cell carcinoma cell lines was reduced by concomitant use of selective Class IIa HDAC inhibitors.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：CIML NK cell 選択的Class IIa HDAC阻害薬 肝細胞癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は本邦における癌死亡原因の第5位であり、年間約28,000人をこえる死亡数が累計されている。肝内限局例では切除や局所治療により治癒が見込まれるが、局所および異所再発率が高く、これらの治療の反復には限界がある。細胞傷害性抗癌薬は、肝動脈内投与においてのみ有効性が示されているが、全身投与では無効であり、脈管・リンパ節浸潤や遠隔転移を伴う症例は極めて予後である。全身薬物療法として分子標的薬である Sorafenib と Regorafenib の有効性が無作為化比較試験で明らかにされたものの、プラセボ群よりも2-3ヶ月の予後延長効果を示すのみである。有効性の高い治療法が確立されない原因として、肝臓患者の多くに肝機能低下がみられ、骨髄抑制や消化管毒性が出やすい細胞傷害性抗癌薬では延命効果を示すことができなかったことが挙げられる。従来の問題点を克服する高い抗腫瘍効果の導出方法と有害事象の軽減方法が問われており、近年安全性と忍容性が良好で、肝機能が低下した症例にも使用できる治療法としてがん免疫療法が注目されており、PD-L1 阻害薬と VEGF 阻害薬の併用療法において全生存期間の延長が示され、本邦でも一次治療として承認された。現在、さらに効果の高い肝臓治療法の開発が必要であり、我々は免疫細胞の一つである NK 細胞を用いた免疫治療と肝臓に高発現しており、癌治療抵抗性に関与するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬の併用に着目した。NK 細胞は感染や癌に対する防御に重要な役割を果たし、活性化受容体によってウイルスタンパク、癌抗原を認識し、細胞障害活性を誘導する。一方で NK 細胞は抑制性受容体によって自身の MHC クラス I を認識し、自身の正常細胞を障害するのを防いでいる。NK 細胞は、活性化または抑制性受容体からのシグナルのバランスによって標的細胞を識別し、細胞死に導く。近年 NK 細胞を IL-12, IL-15, IL-18 で刺激することにより、血液癌に対して強力な抗腫瘍効果のある CIML NK 細胞に変化することが報告されている。しかし固形癌(肝臓)に対する CIML NK 細胞の抗腫瘍効果については研究されていない。また HDAC は種々の癌に発現し、HDAC 阻害薬は epigenetic drug として研究されており、細胞内で転写調節に関わるタンパク質と複合体を形成することにより、遺伝子発現調節に深く関わり、発現抑制された遺伝子の発現を促進させる作用を持っていることが知られている。他の epigenetic drug では固形癌細胞株において、NK 活性化受容体の1つである NKG2D のリガンドである MICA/B の発現が上昇することが報告されているが、HDAC 阻害薬で NK 活性化受容体のリガンド発現を上昇させる作用があるかは不明である。HDAC は Class I-IV に分類され、Class II はさらに Class II a (HDAC4,5,7,9) および II b (HDAC5,10) に細分化される。現在臨床応用可能な HDAC 阻害薬は、非選択的に HDAC を阻害する pan-inhibitor であるが、重篤な有害事象の報告があり、問題視されている。肝臓細胞では HDAC4 および HDAC5 の過剰発現が報告されており、Class II a HDAC を選択的に阻害することで、重篤な有害事象を最小限にとどめ、CIML NK 細胞の抗腫瘍効果を高める可能性があり、本研究結果から導き出される結果によっては肝臓治療の新たな治療戦略の一つになる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、免疫細胞の一つである NK 細胞を、IL-12、IL-15、IL-18 で刺激し、抗腫瘍効果を高めた Cytokine Induced Memory Like (CIML) NK 細胞を作成し、肝臓に対する抗腫瘍効果を検討すること、さらに癌治療抵抗性に関与する Class II a HDAC が肝臓に高発現していることに着目し、新たな class-selective HDAC inhibitor (HDACi) の併用による新規治療法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1). CIML NK 細胞の作成

健康人から得られる PBMC を FACS sorting の手技によって、NK 細胞に分離し、IL-12(10ng/ml)、IL-15(50ng/ml)、IL-18(50ng/ml)を含んだ RPMI 培地で 16 時間培養し、CIML NK 細胞を作成する。

#### (2). CIML NK細胞における表面抗原解析

Flow Cytometry を用いて CIML NK 細胞の活性型 NK 細胞受容体(NKG2D、Nkp30、Nkp46)や抑制型 NK 細胞受容体(NKG2A、KIR)の発現を測定し、コントロール NK 細胞と比較する。

#### (3). 選択的 Class II a HDAC 阻害薬による肝癌細胞株での活性型 NK 細胞受容体のリガンド発現変化の検討

選択的HDAC Class II a阻害薬(TMP269)を含んだ培地で各種ヒト肝細胞癌株(HuH-7、JHH-6、JHH-7)を 48 時間共培養し、RNA シークエンスを用いて活性型 NK 細胞受容体のリガンドの発現変化を解析する。

#### (4). 選択的 Class II a HDAC 阻害薬併用下での CIML NK 細胞の肝癌細胞株に対する細胞毒性の検討

肝癌細胞株を選択的 Class II a HDAC 阻害薬(TMP269)を含んだ培地で 48 時間培養し、その後 CIML NK 細胞と 4 時間共培養する。肝癌細胞株を CFSE でラベルし、Annexin-V、7-AAD で染色し、Flow Cytometry を用いて apoptosis 細胞を測定する。

### 4. 研究成果

#### (1). CIML NK 細胞における各 subset の表面抗原解析

健康人から得られる PBMC を FACS sorting の手技によって、NK 細胞に分離し、IL-12(10ng/ml)、IL-15(50ng/ml)、IL-18(50ng/ml)を含んだ RPMI 培地で 16 時間培養し、CIML NK 細胞を作成した。活性型 NK 細胞受容体である(NKG2D、Nkp30、Nkp46)や抑制型 NK 細胞受容体(NKG2A、KIR)の発現の違いを NK 細胞（無刺激）、low dose IL-2 で刺激した NK 細胞および CIML NK 細胞で検討したところ、CIML NK 細胞で NKG2D、Nkp30 の発現が有意に上昇した。一方で Nkp46 の発現に違いは認められなかった(図 1)。また NKG2A、KIR の発現についてはいずれの NK 細胞群でも有意な差は認めなかった。以上より CIML NK 細胞は活性型 NK 細胞受容体である NKG2D、Nkp30 の発現が上昇することで、活性化シグナルが増強し、強力な細胞傷害活性を有すると推察された。

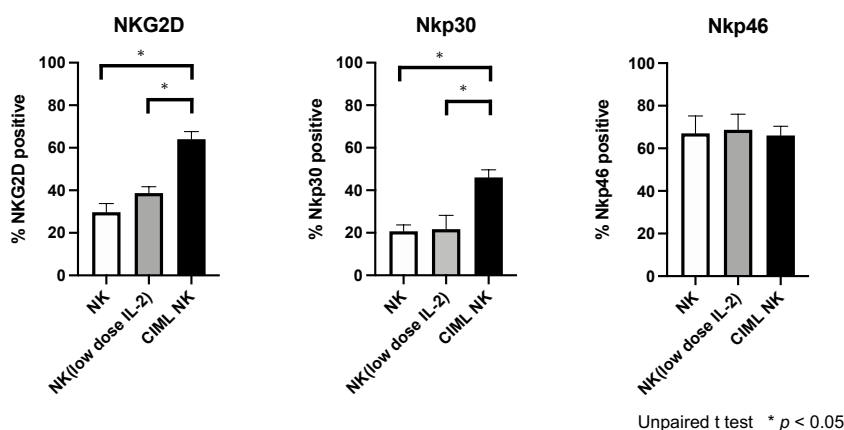


図1 CIML-NK細胞における活性型NK受容体発現の検討

## (2). 選択的 HDAC Class IIa 阻害薬による肝癌細胞株での活性型 NK 細胞受容体のリガンド発現変化の検討

選択的 HDAC Class IIa 阻害薬(TMP269 30 $\mu$ M)を含んだ培地で各種ヒト肝細胞癌株(HuH-7、JHH-6、JHH-7)を48時間共培養し、RNAを抽出し、RNAシーケンスを行った。TMP269投与により様々な遺伝子発現の変化が認められた。活性型NK細胞受容体(NKG2D、Nkp30)のリガンド遺伝子に着目して解析したところ、いずれの細胞株においてもNKG2DのリガンドであるMICAはTMP269の投与で発現変化は認められなかったが、ULBP1の発現が低下していた。またNkp30のリガンドであるBAG6の発現変化は認められなかったが、B7-H6の発現が低下していた(図2)。上記結果よりTMP269の投与により肝細胞癌株における活性型NK細胞受容体(NKG2D、Nkp30)のリガンドの発現は低下し、選択的HDAC Class IIa阻害薬を併用することで、肝細胞癌株に対するCIML NK細胞の細胞傷害活性は減弱することが推察された。

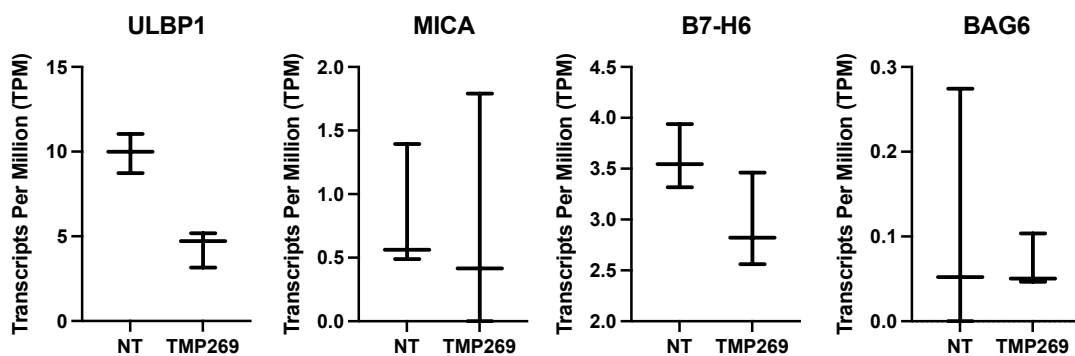


図2 肝細胞癌株(JHH-7)におけるTMP269投与での遺伝子発現変化の検討

## (3). 選択的 HDAC Class IIa 阻害薬併用の有無での CIML NK 細胞の肝癌細胞株に対する細胞毒性の検討

CIML NK細胞の細胞傷害活性の評価を、FACSを用いて行った。まずCFSEでラベルした肝細胞癌株(JHH-7)とCIML NK細胞およびlow dose IL-2で刺激したNK細胞(コントロール)を37 $^{\circ}$ Cで4時間共培養後、Annexin-V、7-AADで染色しapoptosis細胞の割合を測定したところ、low dose IL-2で刺激したNK細胞と比較してCIML NK細胞は有意にapoptosisを誘導し、本研究者が作成したCIML NK細胞は固形癌細胞株にも強力な細胞傷害活性を有することを示した(図3a)。次にTMP269(30 $\mu$ M)を含んだ培地および含まない培地でそれぞれヒト肝細胞癌株(JHH-7)を48時間培養し、その後上記と同様にCIML NK細胞およびlow dose IL-2で刺激したNK細胞(コントロール)で共培養し、TMP269を併用したCIML NK細胞の細胞傷害活性はTMP269を併用しないCIML NK細胞と比較して低下する傾向を認めた(図3b)。

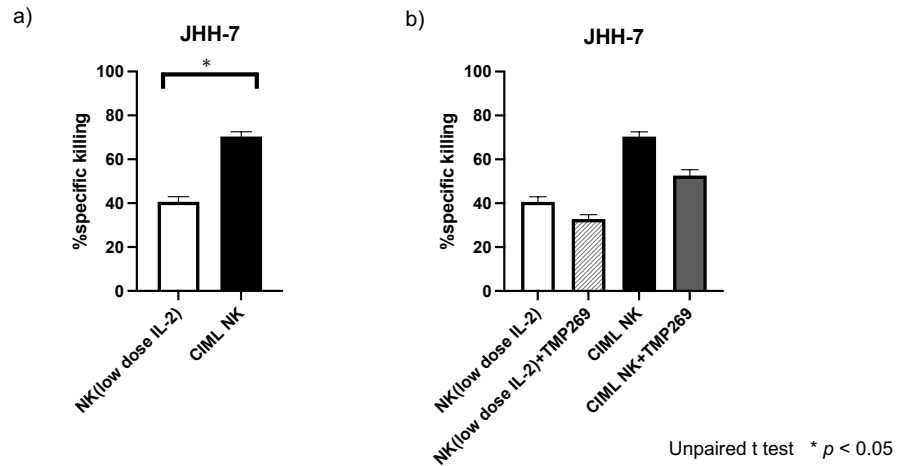


図3 肝細胞癌株(JHH-7)に対するCIML-NK細胞の細胞傷害活性の検討

以上より CIML NK 細胞は活性型 NK 細胞受容体である NKG2D、Nkp30 が上昇することで、標的細胞を認識した際に強力な細胞傷害活性を有し、肝細胞癌株においても強力な細胞傷害活性を有することが証明された。一方で選択的 HDAC Class II a 阻害薬は肝細胞癌株に対して NKG2D、Nkp30 のリガンドである ULBP1 および B7-H6 をそれぞれ低下させ、選択的 HDAC Class II a 阻害薬を併用することで CIML NK 細胞の細胞傷害活性は減弱することが示された。CIML NK 細胞による免疫療法は、肝細胞癌に対しても高い抗腫瘍効果を示し、新たな治療戦略の一つとなる可能性が示唆されるが、今後、*in vivo* マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討や癌微小環境内において CIML NK 細胞の細胞傷害活性が維持されるかなどについてさらにこの研究を発展させていく必要がある。一方で選択的 Class IIa HDAC 阻害薬は CIML NK 細胞の細胞傷害活性を減弱させたため、CIML NK 細胞の効果を増強する他の *epigenetic drug* の探索が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ryo Ito, Koji Miyanishi, Tomohiro Kubo, Kota Hamaguchi, Takahiro Osuga, Shingo Tanaka, Hiroyuki Ohnuma, Kazuyuki Murase, Kohichi Takada, Minoru Nagayama, Yasutoshi Kimura, Toru Mizuguchi, Ichiro Takemasa, Junji Kato	4. 巻 17
2. 論文標題 Synergistic antitumor effect of histone deacetylase class IIa inhibitor with lenvatinib in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology International	6. 最初と最後の頁 735-744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12072-023-10484-2	査読の有無 有
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 0件）

1. 発表者名 久保智洋, 伊藤亮, 宮西浩嗣, 大須賀崇裕, 田中信悟, 大沼啓之, 村瀬和幸, 高田弘一, 加藤淳二
2. 発表標題 肝細胞癌に対するLenvatinibとHDAC class IIa選択阻害薬併用療法の有用性の検討
3. 学会等名 第26回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------