

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20787

研究課題名（和文）軟部肉腫におけるNK細胞療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel NK cell therapy for soft tissue sarcoma

研究代表者

大池 直樹（OIKE, NAOKI）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：20961676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：希少がんの一つである軟部肉腫の治療成績は化学療法の強化を行なっても横ばいとなっており、免疫治療などの新しい治療方法が求められている。申請者らは免疫治療の一つであるNK細胞療法の治療効果を細胞株（お皿の上で培養できるようになった細胞）を用いて検討した。軟部肉腫の一つである滑膜肉腫ではNK細胞を活性化するリガンド（表面抗原）が発現していることがわかった。血液からNK細胞を培養し、滑膜肉腫細胞株に対する効果を検討したところ短時間でも長時間でも抗腫瘍効果を認められた。今後は動物実験でも効果を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで軟部肉腫に対するNK細胞の治療効果を検討した報告はない。

本研究において、滑膜肉腫においてNK細胞を活性化するような分子が高発現していることが明らかとなった。また、細胞株を用いて滑膜肉腫における抗腫瘍効果を明らかにした初めての研究である。

他の固形腫瘍において、NK細胞の治療効果は限られており、実際の臨床応用には様々な課題が残っている。しかし、本研究により、滑膜肉腫においてNK細胞による治療が有望である可能性が示唆されており、今後も研究を進める。

研究成果の概要（英文）：The treatment outcome of patients with relapsed soft-tissue sarcoma has remained poor despite intensified chemotherapy, and new treatment methods such as immunotherapy are urgently required. The applicant investigated the therapeutic efficacy of NK cell therapy, an immunotherapy, using cell lines (cells that can now be cultured on a plate).

It was found that synovial sarcoma, one of the soft tissue sarcomas, expresses a ligand (surface antigen) that activates NK cells. NK cells were cultured from blood and their effect on a synovial sarcoma cell line was examined, and an anti-tumour effect was observed for both short and long periods of time. We are now prepared for animal experiments.

研究分野：整形外科

キーワード：免疫療法 NK細胞 軟部肉腫 滑膜肉腫

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

化学療法の導入に伴い、軟部肉腫の治療成績は向上したが、その後横ばいとなっている。そのため、免疫療法を含む新規治療法の確立が望まれている。申請者らは軟部肉腫において、HLA class I が減弱、消失している症例が多く存在することを明らかにした。ここから、HLA の消失により活性化される NK 細胞が軟部肉腫に対する新規治療法となりうると考え、治療効果を検討すべく、本研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は軟部肉腫細胞株における NK 細胞の治療効果を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

脂肪肉腫や滑膜肉腫の細胞株を用いて NK 細胞を活性化するリガンド (NKp44, NKp30, NKp46, NK2GD, DNAM-1 など) の発現についてフローサイトメトリーを用いて解析を行なった。

末梢血からヒト末梢血単核細胞を採取、人工抗原提示 K562 細胞 (K562-mb15-41BBL) と 14 日間共培養を行い、CD3-CD56+ の細胞を NK 細胞として扱った。

肉腫細胞株の NK 細胞の治療効果について WST-8 を用いた cytotoxicity assay、real-time cell analyzing assay を用いて検討した。NK 細胞数 (Effector) と腫瘍細胞数 (Tumor) の比を変更し、治療効果についての検討を行った。

細胞障害性が NK 細胞によるものか CD107a アッセイを用いて評価した。

Ewing 肉腫においてドラッグスクリーニングを行い、薬剤による治療後に細胞障害活性が増強するような薬剤の探索を行った。Ewing 肉腫細胞株に対して 48 時間薬剤による治療を行なったから NK 細胞と共培養をおこない、コントロールに比して NK 細胞の細胞障害性が強まるような薬剤の同定を行った。

## 4. 研究成果

粘液型脂肪肉腫、滑膜肉腫において NKp44 リガンド、NK2GD リガンド、DNAM-1 リガンドが増強していることを確認した(図 1)。これにより NK 細胞が軟部肉腫において、治療する効果を示す可能性が示唆された。また、本データを元に NKp44CAR-T 細胞を作成し、その治療効果について共同研究者の村山が論文報告を行った<sup>1)</sup>。

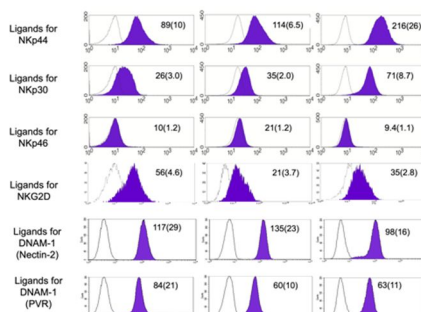


図 1. 滑膜肉腫細胞株におけるNK細胞を活性化に関連する分子の発現

14 日間のヒト末梢血単核細胞により 98% の割合で CD3-CD56+ の NK 細胞を採取することができた。今後の細胞障害性に関する実験にはこの NK 細胞を用いた(図 2)

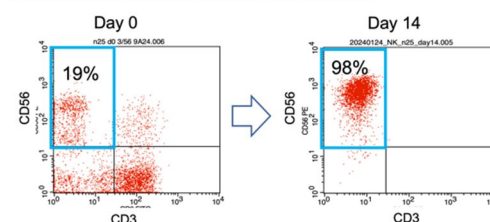


図 2. NK 細胞の培養

三種類の滑膜肉腫細胞株において、NK 細胞が細胞障害性を示すことを WST-8 アッセイにより確認した(図 3)。NK 細胞においては CAR-T 細胞と比して Effector 細胞が多く必要であると考えられた。また、この細胞障害性は長時間にわたり、継続することを確認した(図 4)

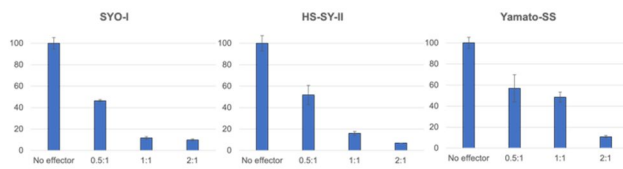


図 3. NK 細胞は肉腫細胞株に対して細胞障害性を示した。

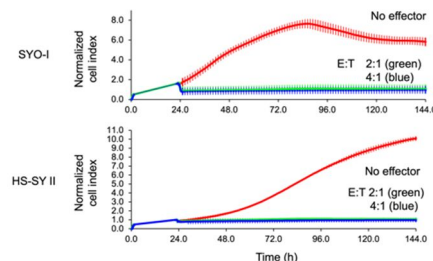


図 4. NK 細胞の細胞障害性は長時間継続した。

CD107a アッセイにおいて脱顆粒を認めた。これは本研究における細胞障害性が NK 細胞による効果であることを示唆している ( 図 5 )

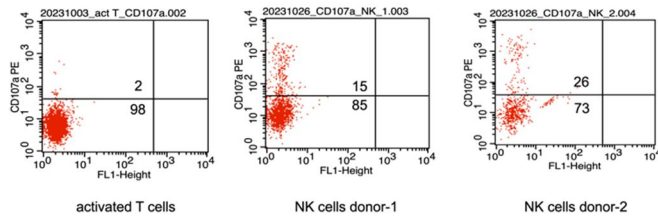


図5.細胞障害活性はNK細胞によるものと考えられた。

Ewing 肉腫細胞株を用いて GSK3B 阻害薬が NK 細胞の細胞障害性を強めることを明らかにした ( 図 6 )。その機序について検討を行い、論文投稿準備中である。

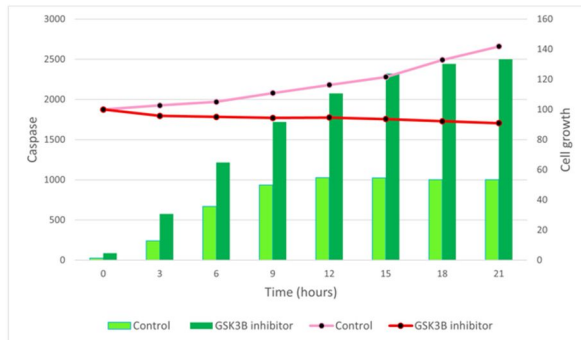


図6GSK3B阻害薬によりNK細胞の細胞障害性が増強した。

1)Murayama Y, Oike N, et al. Nkp44-based chimeric antigen receptor effectively redirects primary T cells against synovial sarcoma. Transl Oncol. 25; 2022

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 1件）

1. 著者名 Murayama Y, Kasahara Y, Kubo N, Shin C, Imamura M, Oike N, Ariizumi T, Saitoh A, Baba M, Miyazaki T, Suzuki Y, Ling Y, Okuda S, Mihara K, Ogose A, Kawashima H, Imai C	4. 巻 25
2. 論文標題 Nkp44-based chimeric antigen receptor effectively redirects primary T cells against synovial sarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Transrational Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2022.101521	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大池 直樹, 白井 了太, 生越 章, 有泉 高志, 村山 雄大, Bodlak Avery, 川島 寛之, Verneris Michael, 林 正憲
2. 発表標題 Glycogen synthase kinase 3阻害薬はEwing肉腫においてNK細胞の抗腫瘍効果を増強する
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Oike, Ryota Shirai, Taylor Gillis, Deandra Walker, Avery Bodlak, Timothy Porfilio, Michael Verneris, Masanori Hayashi
2. 発表標題 HIGH-THROUGHPUT DRUG SCREENING IDENTIFIES GSK3B INHIBITION AS A THERAPEUTIC TARGET TO ENHANCE ALLOGENEIC NK CELL CYTOTOXICITY IN EWING SARCOMA
3. 学会等名 2022 CTOS annual meeting（国際学会）
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
---------	---------