

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861664

研究課題名(和文) 神経芽腫における抗体を併用した新たなNKT細胞免疫治療の開発研究

研究課題名(英文) Research and development of combination therapy using iNKT cells and an anti-GD2 antibody toward neuroblastoma

研究代表者

三瀬 直子 (Mise, Naoko)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40646402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経芽腫で有用性が報告されている抗GD2抗体を用い、神経芽腫細胞に対するiNKT細胞のADCC(抗体依存性細胞傷害)への関与を明らかにすることを目的とした。結果として、iNKT細胞が抗体を認識することによるADCCへの直接的な関与は否定的であったが、活性化iNKT細胞がNK細胞を活性化し、グランザイムやIFNの発現など、その機能を増強することにより、間接的にADCCを増強することが示された。また、NK細胞の機能増強にはサイトカインだけでなく細胞間接触も重要であった。以上より、iNKT細胞と腫瘍抗原特異的抗体の併用という新たな免疫治療の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Anti-ganglioside GD2 antibodies mainly work through antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and have demonstrated clinical benefit for children with neuroblastoma. In this report, we investigated the feasibility of combination therapy using iNKT cells and an anti-GD2 antibody. As a result, iNKT cells were not directly associated with ADCC. However, when co-cultured with activated iNKT cells, the granzyme A (GrA), granzyme B (GrB) and interferon gamma (IFN) production from NK cells were upregulated, and the cytotoxicity of the NK cells treated with anti-GD2 antibodies was increased. Not only cytokines produced by activated iNKT cells, but also NK-NKT cell contact contributed to the increase in NK cell cytotoxicity and further IFN production by iNKT cells and NK cells. In conclusion, iNKT cell-based immunotherapy could be an appropriate candidate for anti-GD2 antibody therapy for neuroblastoma.

研究分野：小児がん

キーワード：NKT細胞 神経芽腫 ADCC NK細胞 抗GD2抗体

1. 研究開始当初の背景

(1)神経芽腫をはじめとする小児悪性固形腫瘍の治療成績は手術、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療の進歩により向上してきた。しかし、進行神経芽腫などの難治性腫瘍群では多くが再発の転帰をたどり、今なお予後不良である。治療成績向上のため、転移を抑制し再発を防ぎ、かつ安全な新規治療法の開発が求められており、免疫治療が新たな治療の柱として注目されている。

(2)小児進行神経芽腫における免疫治療としては、正常組織にほとんど存在せず、腫瘍に特異的な抗原であるスフィンゴ糖脂質 Disialoganglioside (GD2)に対する抗体を用いた臨床試験において有用性が報告されている。しかし効果は限定的であり、副作用の報告も多いことが抗 GD2 抗体療法の課題である。

この抗体の効果発現には、ADCC (Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity、抗体依存性細胞傷害)が重要であるとされ、ADCCにおいてはとくにNK細胞が重要な役割を担うことが知られている。

(3)invariant Natural Killer T cell (iNKT)細胞はガラクトシルセラミド(α GalCer)により活性化され、自身が直接細胞傷害活性を示すとともに、NK細胞を含む自然免疫系と細胞傷害性T細胞などの獲得免疫系、双方を橋渡しして免疫系全体を賦活し、抗腫瘍効果を示すことが知られている。

肺癌や頭頸部癌などの成人腫瘍の領域における臨床試験では、その安全性や免疫反応と関連した有効性が報告されているが、iNKT細胞の抗腫瘍効果発揮のメカニズムについてはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的はiNKT細胞のADCCへの直接的もしくはNK細胞を介した間接的な関与を明らかにし、iNKT細胞の抗腫瘍効果発揮のメカニズムの一端を明らかにすることである。またこれにより、小児神経芽腫における抗GD2抗体療法とiNKT細胞療法の併用の実現可能性について検討し、新規免疫治療として提唱することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) iNKT細胞が直接ADCCに関与するかどうかを検討するため、神経芽腫細胞(NMB:GD2高発現)に対するiNKT細胞単独での細胞傷害活性を抗GD2抗体存在下に測定した。また、iNKT細胞と神経芽腫細胞を共培養したときのiNKT細胞のIFN γ の産生量を抗GD2抗体存在下に測定した。

(2) iNKT細胞がNK細胞の活性化により間

接的にADCCを増強するかを検討するため、NK細胞、培養し増殖させたiNKT細胞、 α GalCer提示樹状細胞を共培養し、活性化iNKT細胞がNK細胞に及ぼす影響について、フローサイトメトリーによるNK細胞表面抗原の解析や定量的RT-PCRによる細胞傷害性分子の解析、産生されるサイトカインの測定、さらには抗GD2抗体存在下でのNK細胞の細胞傷害活性試験による検討を行った。

(3)また、NK細胞の機能増強における活性化iNKT細胞由来のサイトカインや細胞間接触の影響を調べるため、トランスウェルを用いた実験を行った。

4. 研究成果

(1)まず標的細胞である神経芽腫細胞

(NMB)に対するNK細胞もしくはiNKT細胞の細胞傷害活性を測定した。NK細胞は末梢血単核球より分離し、iNKT細胞は末梢血単核球をIL-2と α GalCerにより培養し増殖させたのちに分離して使用した。

NK細胞では抗体のFc部分を認識するFc γ レセプター(CD16)が高発現であることがわかっており、増殖したiNKT細胞においても一部にFc γ レセプターの発現がみられ、iNKT細胞がADCCを引き起こす可能性が示唆されていた。しかし、実際に細胞傷害活性を測定すると、NK細胞においては抗GD2抗体存在下で、抗体が無い場合に比較して細胞傷害活性が増すADCCが引き起こされるのに対し、iNKT細胞単独では抗GD2抗体を加えた場合と加えない場合の細胞傷害活性が同等であり、iNKT細胞は単独ではNK細胞のようなADCCを引き起こさないことが確認された。

さらに、iNKT細胞が活性化するとIFN γ が大量に放出されることが知られているが、腫瘍細胞とiNKT細胞を抗GD2抗体存在下に共培養し、上清のサイトカインを計測したところ、IFN γ の産生増強は認められなかった。従って、iNKT細胞が神経芽腫細胞そのものを認識したり、抗体を介して神経芽腫細胞を認識し活性化されることはないことということが示された。

これらより、iNKT細胞は抗体認識により直接ADCCを引き起こすことも、活性化してサイトカインを産生することもなく、iNKT細胞の抗体を介した系への直接的な関与は否定的であると考えられた。

(2)次いで、 α GalCerにより活性化したiNKT細胞がNK細胞を介して間接的にADCCを増強するかどうかを検討した。 α GalCer提示樹状細胞を用いて活性化した

iNKT 細胞と NK 細胞を共培養すると、NK 細胞の活性化マーカーである CD69 の発現が増強した。また、活性化 iNKT 細胞と共培養した NK 細胞の神経芽腫細胞に対する細胞傷害活性も抗 GD2 抗体存在下、非存在下双方において増強することが確認できた。

同様の条件で、細胞傷害性顆粒であるグランザイム A、グランザイム B やパーフォリン、及び IFN γ の NK 細胞内での mRNA 発現量を、内部コントロールとして GAPDH を用いて調べたところ、iNKT 細胞と共培養した NK 細胞において、これら全ての発現増強が認められた (図 1)。

以上のことより、 α GalCer 提示樹状細胞により活性化された iNKT 細胞は、NK 細胞を活性化しその機能を増強することにより、間接的に ADCC を増強しようと考えられた。

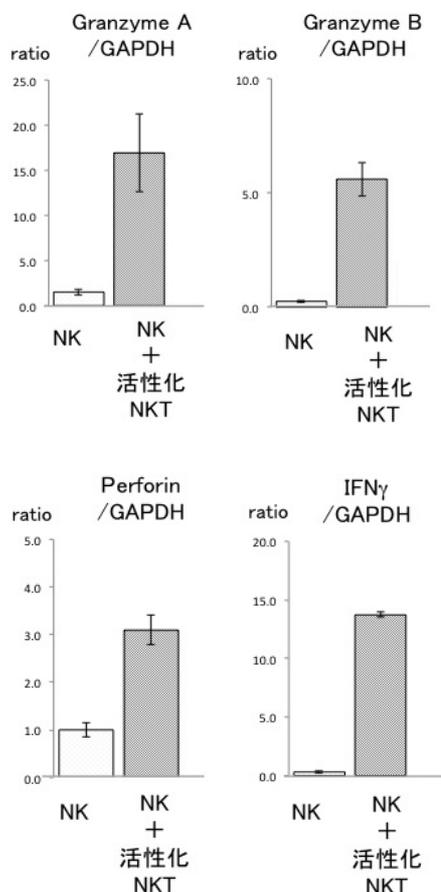


図 1 単独で培養した NK 細胞 (左) と活性化 iNKT 細胞と共培養した NK 細胞 (右) における mRNA 発現量の比較

(3) 上記に示した iNKT 細胞による NK 細胞の活性化において、iNKT 細胞の活性化により放出される IFN γ などのサイトカインと、NK 細胞と iNKT 細胞の細胞間接触、

どちらがより重要であるのかを検討するため、細胞は通過できないがサイトカインは透過できる膜で上下が仕切られたトランスウェルを用いて実験を行った。

下段のウェルに NK 細胞を、iNKT 細胞とこれを活性化させるための α GalCer 提示樹状細胞を上段 (NK 細胞と接触なし) もしくは下段 (NK 細胞と接触あり) のウェルにいれ培養したのち、NK 細胞を分離して腫瘍細胞とあわせ細胞傷害活性を測定したところ、NK 細胞は活性化 iNKT 細胞と同じ段のウェルで培養された時に、そうでない場合と比べてより高い細胞傷害活性を示すことが抗 GD2 抗体存在下・非存在下両方で確認された (図 2)。

また、同様のトランスウェルの系で培養液中のサイトカイン産生量を測定したところ、NK 細胞と活性化 iNKT 細胞の共培養により両方の細胞からの IFN γ の相乗的な産生増加を認めた。

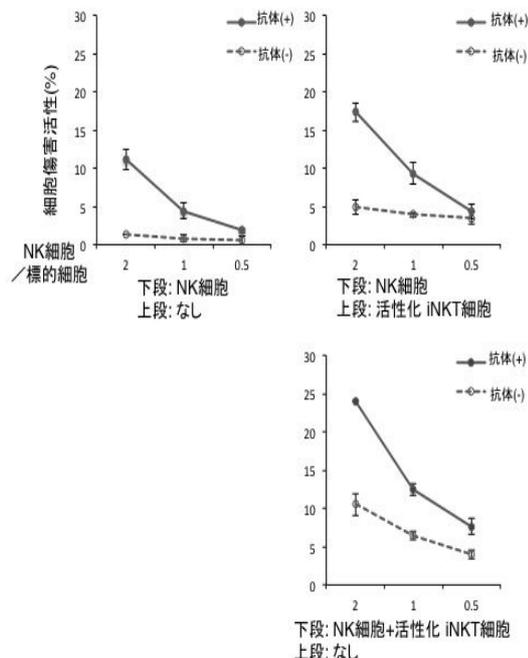


図 2 トランスウェルを用いて培養した NK 細胞による細胞傷害活性

(4) 以上の結果より、iNKT 細胞は単独では抗体を認識せず、ADCC に関与する可能性は少ないが、 α GalCer 提示樹状細胞により活性化された iNKT 細胞は NK 細胞を活性化し、NK 細胞の細胞傷害性顆粒や IFN γ の発現量を増加することにより、結果として ADCC が増強しようことが示された。また、iNKT 細胞による NK 細胞の活性化には、iNKT 細胞から放出されるサイトカインのみならず、細胞間接触も重要であることが示唆された。

これらにより、iNKT細胞活性化を標的とした免疫療法と腫瘍抗原特異的抗体の併用によりさらなる抗腫瘍効果が期待できると思われ、新たな免疫治療の可能性が示された。

(5)今後はヒト iNKT細胞の抗腫瘍効果のさらなるメカニズム解明のため、ADCC増強に関わるサイトカインに対する阻害抗体を用いてその作用機序を明らかにするとともに、免疫不全マウスを用いた担癌モデルに対する治療実験を行っていく必要があると考えている。

引用文献

Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010;363(14):1324-34.

Taniguchi M, Seino K, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2003;4(12):1164-5.

Motohashi S, Ishikawa A, Ishikawa E, Otsuji M, Iizasa T, Hanaoka H, et al. A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(20 Pt 1):6079-86.

Motohashi S, Nagato K, Kunii N, Yamamoto H, Yamasaki K, Okita K, et al. A phase I-II study of alpha-galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol*. 2009;182(4):2492-501.

Nagato K, Motohashi S, Ishibashi F, Okita K, Yamasaki K, Moriya Y, et al. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after alpha-galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. *J Clin Immunol*. 2012;32(5):1071-81.

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〕

なし

〔学会発表〕(計3件)

三瀬直子、Investigation of ADCC enhancement by NKT cell toward neuroblastoma、ADVANCES IN NEUROBLASTOMA RESEARCH 2014、2014年5月13日～5月16日、ケルン(ドイツ)

三瀬直子、神経芽腫細胞に対するNKT細胞によるADCC増強効果の検討、第51回日本小児外科学会学術集会、2014年5月8日、大阪国際会議場(大阪府、大阪市)

三瀬直子、神経芽腫細胞に対するNKT細胞によるADCC増強効果の検討、第55回日本小児血液・がん学会学術集会、2013年11月30日、ヒルトン福岡シーホーク(福岡県・福岡市)

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

三瀬直子(MISE, Naoko)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40646402

(2)研究協力者

本橋 新一郎(MOTOHASHI, Shinichiro)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60345022