

機関番号：12102

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19689027

研究課題名（和文）

 α -Galcer を用いた NKT 細胞による新規抗癌治療および肝硬変治療法の開発

研究課題名（英文）

Development of new anti-cancer therapy and anti-liver cirrhosis treatment using by NKT cells activated with α -Galcer.

研究代表者

柳澤 和彦（YANAGISAWA KAZUHIKO）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：90431692

研究成果の概要（和文）：

我々は、担癌患者および担癌マウスにおいて NKT 細胞の低反応性が存在することを見だし報告した。実験動物において、担癌宿主では CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団が増加しており、それらの細胞集団が産生する一酸化窒素が NKT 細胞の低反応性に関与していること、さらに、all trans retinoic acid (ATRA) を投与することによってそれらの低反応性を解除することが可能であることも報告した。本研究において、実験動物における CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団がヒトのリンパ球では CD33 陽性 CD14 陰性 CD11b 陽性を示す細胞集団で評価可能であることを確認し、担癌患者において、NKT 細胞の機能が低下する原因がこの細胞集団であることを示した。さらに、ATRA を用いることによって、担癌患者の NKT 細胞の機能回復を *in vitro* で回復すること可能であることがわかった。担癌患者において増加している CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団には、健康人のそれに比べて VEGF が発現している傾向を認めたが、FOXP3 に関しては、担癌患者と健康人各々において有意な発現は認められなかった。分子標的薬（抗 VEGF 抗体）使用前の担癌患者における CD33 陽性 CD14 陰性 CD11b 陽性細胞集団の数は、分子標的薬使用後に減少する傾向を認めた。これらの結果、我々が報告している ATRA やレチノイン酸、G-CSF に加えて、すでに大腸癌治療に使用されている抗 VEGF 抗体が担癌患者の免疫抑制状態を軽減することに寄与する可能性があることがわかった。この成果は、NKT 細胞を用いた臨床試験を開始していくうえで重要な基礎研究結果となると思われ、さらには、大腸癌をはじめとした様々な癌腫への治療の選択肢が増やせるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We reported hypo responsiveness of NKT cells in cancer-bearing state. In animal models, CD11b+ Gr1+ cells are increased in cancer-bearing state, which produce nitric oxide and suppress NKT cell functions. We reported also all trans retinoic acid (ATRA) can absolve hypo responsiveness of NKT cells in cancer-bearing state. We showed clearly in this study that CD11b+ Gr1+ cells in animal models were CD33+ CD14- CD11b+ cells in human, and this population suppressed NKT cell functions in cancer patients. We also indicated that ATRA is able to absolve hypo responsiveness of NKT cells in cancer patients *in vitro*. CD11b+ Gr1+ cells which increased in cancer patients more expressed VEGF than in

healthy donors, but FOXP3 expressions were no significant difference between cancer patient and healthy donors. There was a trend toward that CD33+ CD14- CD11b+ cells were reduced after cancer therapy using with anti VEGF antibody. Based on the result of this study, we indicate that anti VEGF antibody which is already used as cancer therapy drug could be have ability of reducing immune suppression in cancer patient. We believe that this result will be important basic study for new cancer therapy using with NKT cells and we can use this treatment for several cancer therapy commencing with colorectal cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	20,700,000	6,210,000	26,910,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：NKT細胞，腫瘍免疫，肝硬変，癌転移抑制

1. 研究開始当初の背景

現在，癌治療の主流は依然として外科療法であり，放射線療法や化学療法，免疫療法などと組み合わせて治療が行われている。しかしながら，癌の再発，転移について十分にコントロールができていないのが現状である。また，各種臓器不全に対して臓器移植が行われ，特に日本においては，脳死移植法が施行された影響も考え合わせると，今後その数は増加していくものと考えられる。これらの分野において免疫の賦活化や抑制，つまりは免疫システムの制御が重要なキーポイントとなってくると思われる。我々は，第4のリンパ球とも言われている NKT 細胞がこの免疫制御に強く関わっているのではないかと考え着目した。NKT 細胞をその特異的活性化物質である糖脂質の一種， α -galactosylceramide (α -GalCer)を用いて活性化することによって，動物実験モデルにおいて強力に癌の転移を抑制することが報告さ

れている(Kawano et.al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95; 10:5690-5693. 1998.)。しかしながら，我々の研究結果では，担癌宿主では，この α -GalCer によって NKT 細胞が有効に活性化できないことが解っている (J. Immunol. 168; 6494-6499. 2002.)。また，移植免疫においては，副刺激遮断による移植片寛容において NKT 細胞が重要な役割をしていることも我々が見出している (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98; 5:2577-2581. 2001.)。NKT 細胞の低反応性の原因として，担癌宿主では CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団 (未成熟な顆粒球細胞, Fig1) が増加しており，それらの細胞集団が産生する一酸化窒素が関与していること，さらに，all trans retinoic acid (ATRA)を投与することによってそれらの低反応性を解除することが可能であることを発見し報告した (Cancer Research. 66: 11441-11446.2006)。今までの我々が発見した NKT 細胞低反応性のメカニズムとその解除方法について今後は

ヒトでの応用のために本研究を進めていく予定である。2005 年度には、米国において従来の治療に抵抗性を示した腎細胞癌および悪性黒色腫の患者に対し、NKT 細胞を用いた臨床試験の準備にも携わり、患者の末梢血から採取した NKT 細胞を有効に分化増殖させ体内に戻す臨床試験も行ってきた。今後、日本においても同様な臨床試験を行うため、さらには我々が今まで動物実験で解明してきた担癌宿主における NKT 細胞の機能回復を実践することによって、本研究はトランスレーショナルリサーチとして重要な役割を果たすものと考えている。

さらに、新しい知見として、 α -GalCer を提示する分子である CD1d 分子 (MHC class I 類似分子) が、C 型肝炎から肝硬変に至る過程において肝細胞表面上に徐々に発現され、硬化性変化の強い肝臓の肝細胞上には強発現している事を確認している。このことから、 α -GalCer かまたはその類似物質が肝細胞上の CD1d 分子に提示され、NKT 細胞を介して C 型肝炎から肝硬変に移行する過程において何らかの役割を果たしているのではないかと考えている。

2. 研究の目的

担癌患者において NKT 細胞の低反応性が存在することは以前にも報告した。今回の研究では i) 担癌患者における未成熟な顆粒球細胞集団の存在とその割合、NKT 細胞低反応性との相関関係の有無を調べ、ii) さらに、*in vitro* での NKT 細胞の機能回復技術の開発を行う。これまでの我々の行った実験結果では ATRA を用いるほか、レチノイン酸や G-CSF 製剤を用いて NKT 細胞の機能回復が可能ではないかと予想している。iii) 臨床応用を踏まえて、大腸癌患者で肝臓転移を有する症例に関して上記内容のデータを蓄積し、倫理委員会を経て NKT 細胞による免疫療法の安全性および有効性を確立する。iv) 以上の結果を踏まえた上で、NKT 細胞による臨床試験として、進行大腸癌術後の患者を対象として、現在確立している抗癌剤による

治療に加えて NKT 細胞による治療を加えることによって、無再発生存率が向上するかどうかを検討することを最終目標とする。

3. 研究の方法

当院の倫理委員会で承認を受けた後に、担癌患者および健常者からのサンプル血液を採取し、術前および術後安定期の末梢血液を採取しリンパ球を分離した後に細胞表面抗体を用いて NKT 細胞および抗原提示細胞を分離し、NKT 細胞単独の機能を調べる。さらに、分離したリンパ球中における未熟顆粒球細胞集団の割合を分析する。マウスでの研究と同じ結果が得られるようであれば、ATRA を用いることによって、担癌患者から採取分離した末梢血中の NKT 細胞の機能回復を *in vitro* で回復することを確認する。

さらに、未熟顆粒球細胞集団の分子生物学的な解析および機能解析を行うことによってその細胞集団の特徴を明らかにする。

4. 研究成果

我々は、担癌患者および担癌マウスにおいて NKT 細胞の低反応性が存在することを見だし報告した。実験動物において、担癌宿主では CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団が増加しており、それらの細胞集団が産生する一酸化窒素が NKT 細胞の低反応性に関与していること、さらに、all trans retinoic acid (ATRA) を投与することによってそれらの低反応性を解除することが可能であることも報告した。本研究において、実験動物における CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団がヒトのリンパ球では CD33 陽性 CD14 陰性 CD11b 陽性を示す細胞集団で評価可能であることを確認した。当院の倫理委員会で承認を受けた後に、担癌患者および健常者からのサンプル血液を採取し、術前および術後安定期の末梢血液を採取しリンパ球を分離した後に細胞表面抗体を用いて NKT 細胞および抗原提示細胞を分離し、NKT 細胞の機能低下を示すことが出来た。さらに、担癌患者では未熟顆粒球細胞集団の割合が増加していること

が解明され、ATRAを用いることによって、担癌患者から採取分離した末梢血中の NKT 細胞の機能回復を *in vitro* で回復すること可能であることがわかった。

次に、CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団が腫瘍の血管新生に関与している可能性に言及した報告 (Farbod S. et.al. 2007. Nature) や、免疫制御性 T 細胞における Foxp3 の発現の重要性の報告 (Amit A. et.al. 2007. Nature Immunol.) が散見されているため、担癌患者および健常人の VEGF や FOXP3 の発現を解析した。担癌患者において増加している CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団には、健常人のそれに比べて VEGF が発現している傾向を認めた。しかしながら、FOXP3 に関しては、担癌患者と健常人各々において有意な発現は認められなかった。さらに、マウスにおいて、抗 VEGF 抗体が CD11b 陽性 Gr1 陽性の細胞集団を減少させるとの報告がなされたため、大腸癌に対する分子標的治療 (アバスチンなど) を行っている患者における CD33 陽性 CD14 陰性 CD11b 陽性細胞集団の数と割合を治療前と比較検討した。サンプル数がやや少ないながらも、分子標的薬 (抗 VEGF 抗体) 使用前の担癌患者における CD33 陽性 CD14 陰性 CD11b 陽性細胞集団の数は、分子標的薬使用後に減少する傾向を認めた。しかしながらこれらの担癌患者群は同時に白金系抗癌剤や代謝拮抗剤系抗癌剤を同時投与され、白血球系全体の減少も来していることが多く、今後抗 VEGF 抗体単独の影響がどの程度のものかは検討の余地があると考えられた。これらの結果、我々が報告している ATRA やレチノイン酸、G-CSF に加えて、すでに大腸癌治療に使用されている抗 VEGF 抗体が担癌患者の免疫抑制状態を軽減することに寄与する可能性があることがわかった。この成果は、NKT 細胞を用いた臨床試験を開始していくうえで重要な基礎研究結果となると思われ、さらには、大腸癌をはじめとした様々な癌腫への治療の選択肢が増やせるものとする。

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] (計 1 件)

- ① H Wada, K Yanagisawa, K Seino. Cancellation of NKT cell immunosuppression targeting myeloid suppressor cells. Inflammation and Regeneration. 29(2)128-130.2009.査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 和彦

(YANAGISAWA KAZUHIKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：90431692