

令和元年6月19日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10768

研究課題名(和文) 超免疫不全マウスを用いた膠芽腫に対する免疫細胞およびPD-1阻害薬併用療法の開発

研究課題名(英文) Combined therapy with natural killer cell and anti PD-1 antibody for glioblastoma

研究代表者

松田 良介 (Ryosuke, Matsuda)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：60453164

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)：膠芽腫細胞株であるU87MGを用いたNOGマウスへの皮下腫瘍モデルで、NK細胞と抗PD-1抗体を併用することによる抗腫瘍効果を検討した。結果、コントロール群とNK細胞移植群およびNK細胞/抗PD-1抗体併用群との間に、overall survivalに有意差がみられたが、NK細胞移植群とNK細胞/抗PD-1抗体併用群との間には有意差がみられなかった。今回の実験からは、抗PD-1抗体による治療効果の相乗効果は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は現在の標準治療である手術、放射線療法、化学療法をもってしても予後不良の腫瘍である。我々はこれまで免疫治療の1つであるNK細胞について研究を行ってきた。がん細胞ががんに対する免疫監視機構から逃避すると、その効果は減弱されうる。脳腫瘍における抗PD-1抗体の治療効果についての報告は少ない。抗PD-1抗体とNK細胞を併用することにより、膠芽腫モデルに対して両者の相乗効果について検討した。結果、NK細胞においては、PD-1の発現自体が低く、今回のin vitro実験、in vivo実験ともに、抗PD-1抗体によるNK細胞との相乗効果は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：We established an effective method for the expansion of highly purified natural killer(NK) cells derived from human PBMCs. In this study, we examined the combined therapy with NK cells and anti PD-1 antibody for NOG mouse with subcutaneous injection of U87MG cells. The retro-orbital administration of NK cells and IL-2 prolonged the survival of NOG mice bearing U87MG-derived tumors. The administration of anti-PD-1 antibodies with NK cells and IL-2 did not show any additive effect on survival.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma Natural killer cell anti PD-1 antibody immunotherapy

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は現在の標準治療である手術、放射線療法、化学療法をもってしても予後不良の腫瘍である。一方で膠芽腫に対する免疫療法として細胞傷害性細胞、とりわけ T 細胞や NK 細胞と呼ばれる MHC(major histocompatibility complex)非拘束性キラー細胞を用いた治療法が現在注目されており、我々のグループもその治療効果を報告してきた。ただ、T 細胞や NK 細胞をもってしても、がん細胞自体が免疫抑制系を利用してがんに対する免疫監視機構から逃避すると、その効果は減弱される。近年 PD-1/PD-L1 pathway によるがん免疫抑制機構の解明が進んでおり、各種癌腫において臨床応用が進んでいる。ただ、脳腫瘍における抗 PD-1 抗体の治療効果についての報告は少ない。そこで我々は、近年注目されているチェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体と T 細胞・NK 細胞を併用することにより、治療効果の相乗効果を検討する。

2. 研究の目的

従来より Lymphokine-activated killer (LAK) と呼ばれる古典的な NK 細胞輸注療法が膠芽腫に対して実施されているが、我々はこれまでに LAK 療法に採用されていた培養法よりも NK 細胞の純度(98 ± 2%、LAK は 36 ± 16%)、増幅倍率(206 ± 3 倍、LAK は 51 ± 17 倍)が高い培養法を確立している。これら 2 つのキラー細胞を用いた免疫療法と抗 PD-1 抗体を併用した免疫細胞化学療法の効果をよりの確に評価するためには *in vitro* 実験系では不十分であり、マウス等の動物を用いた *in vivo* 実験系が不可欠である。またヒトとマウスの免疫系には相違点が存在する。よりの確に免疫細胞化学療法の効果を評価するためにはヒト由来の膠芽腫細胞ならびに免疫細胞を用いて、よりヒトに近い条件下で評価することが求められる。NOG マウスは NOD/Shi-*scid* の IL-2 受容体鎖をノックアウトした重度免疫不全マウスで、ヒト由来細胞の生着率が高く、免疫細胞化学療法の膠芽腫退縮効果の判定に適したマウスである (J Immunol. 191:1993-2000:2013)。

近年 PD-1/PD-L1 pathway によるがん免疫抑制機構の解明が進んでおり、各種癌腫において臨床応用が進んでいる。ただ、脳腫瘍における抗 PD-1 抗体の治療効果についての報告は少ない。また、チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体の直接の作用対象であるリンパ球との併用効果についてはほとんど調べられていないのが現状である。本研究の目的は *in vivo* かつヒトに近い条件下で MHC 非拘束性キラー細胞および抗 PD-1 抗体を用いた免疫細胞化学療法の膠芽腫退縮効果ならびに安全性を評価する。投与したキラー細胞の体内動態と特性変動、腫瘍移植巣の組織学的観察と腫瘍細胞の特性変動を評価することである。

3. 研究の方法

本研究では以下のごとくに実験系を作成して検討を行った。NK 細胞および T 細胞における PD-1 の発現解析 U87MG ならびに T98G については PD-1 のリガンドである PD-L1 の発現解析 各膠芽腫細胞株 (U87MG, T98G) に対する NK 細胞および T 細胞と抗 PD-1 抗体の併用増殖抑制試験と apoptosis 誘導効果解析 NOG マウスに皮下移植した膠芽腫細胞株に対する NK 細胞と抗 PD-1 抗体併用療法の抗腫瘍効果の解析

実験

(1) T細胞調整：ヒト末梢血由来 T

細胞の増幅培養と純化健常人末梢血より Lymphoprep® を用いた比重遠心分離法によって単核細胞を分離し、5% 自己血漿ならびに高濃度の IL-2 を含む AIM-V 培地に終濃度 1 μM のゾメタ® を培養初発時のみ加えて培養を行う。以後、細胞の増幅培養に際しては IL-2 含有 AIM-V 培地にて増幅培養を行う。14 日間の増幅培養後、MACS を用いて T 細胞を除去し、T

細胞の純度を高める。

- (2) NK細胞の調整：ヒト末梢血由来NK細胞の増幅培養健常人末梢血よりLymphoprep®を用いた比重遠心分離法によって単核細胞を分離する。MACSを用いて特定の細胞集団を除去し、高濃度IL-2含有AIM-V培地にて培養を開始する。以降、細胞の増幅培養に際してはIL-2含有AIM-V培地にて増幅培養を行う。14～21日間の増幅培養を実施する。
- (3) NK細胞および T細胞のPD-1発現に関しては、PE標識anti-human CD279 (PD-1) (clone: EH12.2H7)) を用いてフローサイトメーターで解析を行った。

実験

- (1) 膠芽腫細胞株：ヒト膠芽腫由来細胞株であるU87MG、T98Gを用いる。2つの細胞株は10%FBS含有DMEM培地にて37℃、5%CO₂、湿度100%の環境で培養を行った。
- (2) U87MG、T98G、のPD-L1の発現解析についてはPE標識anti-human CD274 (PD-L1) (clone: 29E.2A3)) を用いてフローサイトメーターで解析を行い、Relative Fluorescence Intensity (RFI)を算出して評価した。

実験

U87MG、T98G に、14 日間培養した NK 細胞と抗 PD-1 抗体 (opdivo: 小野薬品) を加え、4 時間培養し、MEBCYTO® Apoptosis Kit (MBL 社) を用いて染色を実施する。染色後の細胞に存在する annexin V 陽性 apoptosis 細胞の頻度をフローサイトメーターを用いて解析した。膠芽腫細胞数とNK細胞もしくは T細胞数の混合比はそれぞれGBM:NK もしくはGBM: T=1:2、1:1、1:0.5 とした。

実験

GBM 細胞株(U87MG)を皮下移植した NOG マウスに対する膠芽腫退縮効果を検証するため、NK 細胞と抗 PD-1 抗体の併用実験を行った。U87MG(5×10^6)を NOG マウスの皮下に移植し、1、4、7 日目に Group 1 には PBS と IL-2 (10,000 IU/body)を、Group 2 には NK 細胞(1×10^7)と IL-2 (10,000 IU/body)を、Group 3 には NK 細胞(1×10^7)、抗 PD-1 抗体(40 μ g/body)ならびに IL-2 (10,000 IU/body)を眼窩静脈叢より投与した。

4. 研究成果

実験 : NK 細胞および T細胞ともに PD-1 発現細胞の頻度は、 T細胞が 39.2%、NK 細胞が 3.3%であり、NK 細胞では PD-1 発現細胞の頻度は予想よりかなり低い結果となった。

実験 : U87MG、T98G、の PD-L1 の発現は、各 GBM 細胞株で若干の差はあるものの、腫瘍細胞に PD-L1 が発現していた。(RFI 値として、U87MG: 7.12 T98G: 2.78)

実験 : NK 細胞投与群および T細胞投与群いずれにおいても、U87MG および T98G に対する抗 PD-1 抗体によるアポトーシス誘導効果の増強は認めなかった。

実験 : Group 1 と比較して、NK 細胞を投与する Group 2 および 3 は有意差をもって生存日数が延長していた(それぞれ 59.7 ± 15.3 、 88.3 ± 21.7 、 81.3 ± 22.6 日)。しかし、抗 PD-1 抗体を投与している Group 3 では抗 PD-1 抗体を投与していない Group 2 と比較して生存期間に有意差は認められなかった。

我々の実験結果から、NK 細胞は *in vitro* 実験および膠芽腫細胞株 U87MG 由来皮下腫瘍モデルを用いた *in vivo* 実験においては抗腫瘍効果を発揮していることが証明された。しかしながら、我々が培養した NK 細胞は PD-1 発現細胞の頻度自体が低いため、*in vitro* 実験、*in vivo* 実験ともに NK 細胞の抗腫瘍効果に対する抗 PD-1 抗体の影響が少なかったものと考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Tanaka Y, Nakazawa T, Nakamura M, Nishimura F, Matsuda R, Omoto K, Shida Y, Murakami T, Nakagawa I, Motoyama Y, Morita H, Tsujimura T, Nakase H: Ex vivo-expanded highly purified natural killer cells in combination with temozolomide induce antitumor effects in human glioblastoma cells in vitro. PLoS One (6)1-14,2019

Murakami T, Nakazawa T, Natsume A, Nishimura F, Nakamura M, Matsuda R, Omoto K, Tanaka Y, Shida Y, Park YS, Motoyama Y, Nakagawa I, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Takamura Y, Wakabayashi T, Nakase H: Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells. Anticancer Res.(38) 5049-5056,2018

Marutani A, Nakamura M, Nishimura F, Nakazawa T, Matsuda R, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nakagawa I, Yokota H, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Omoto K, Tanaka Y, Ouji Y, Yoshikawa M, Tsujimura T, Nakase H.: Tumor-inhibition effect of levetiracetam in combination with temozolomide in glioblastoma cells. Neurochemical Journal.(11)43-49,2017

Nakazawa T, Nakamura M, Matsuda R, Nishimura F, Park YS, Motoyama Y, Hironaka Y, Nakagawa I, Yokota H, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Omoto K, Tanaka Y, Ouji Y, Yoshikawa M, Tsujimura T, Nakase H. : Antitumor effects of minodronate, a third-generation nitrogen-containing bisphosphonate, in synergy with T cells in human glioblastoma in vitro and in vivo. Journal of Neurooncology (129)231-241,2016

[学会発表] (計 6 件)

Tsutomu Nakazawa, Fumihiko Nishimura, Ryosuke Matsuda, Mitsutoshi Nakamura, Yaeko Yamashita, Ichiro Nakagawa, Yasushi Motoyama, Takahiro Tsujimura, Hiroyuki Nakase : Establishment of an efficient ex-vivo expansion method for highly purified human natural killer cells and evaluation of their antitumor activity on glioblastoma. Keystone symposia Innate and Non-Classical Immune Cell in Cancer Immunotherapy (国際学会) 2019 年

Tsutomu Nakazawa, Fumihiko Nishimura, Ryosuke Matsuda, Mitsutoshi Nakamura, Yaeko Yamashita, Ichiro Nakagawa, Yasushi Motoyama, Takahiro Tsujimura, Hiroyuki Nakase : Capability of dendritic cells loaded with induced pluripotent stem cells to induce cancer-responsive T cells from a donor with HLA class I-A33 in vitro. European Association for Cancer Research: Defence is the Best Attack: Immuno-Oncology Breakthroughs (国際学会) 2019年

Murakami T, Nakazawa T, Nishimura F, Natsume A, Wakabayashi T, Nakase H: Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells. European Association for Cancer Research: Defence is the Best Attack: Immuno-Oncology Breakthroughs (国際学会) 2019年

村上敏春、中澤務、夏目敦至、西村文彦、中村光利、松田良介、至田洋一、朴永銖、本山靖、中川一郎、山田修一、田村健太郎、竹島靖浩、高村慶旭、若林俊彦、中瀬裕之: Novel human NK cell line carrying CAR targeting EGFRvIII induces antitumor effects in glioblastoma cells in vitro. 第19回日本分子脳神経外科学会 2018年

Nakazawa T, Nakamura M, Matsuda R, Nishimura F, Park YS, Motoyama Y, Nakagawa I, Yokota H, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Omoto K, Tanaka Y, Shida Y, Murakami T, Takanabe R, Tsujimura T, Nakase H: Anti-tumor effect of minodronate, a third-generation nitrogen-containing bisphosphonate, in synergy with T cells, in human glioblastoma invitro and in vivo. The AACR Special Conference on Immunobiology of Primary and Metastatic CNS Cancer. 2018年

田中祥貴、中澤務、中村光利、辻村貴弘、竹島靖浩、松田良介、田村健太郎、山田修一、中川一郎、西村文彦、横田浩、本山靖、朴永 銖、中瀬裕之:高純度NK細胞を用いた膠芽腫細胞に対する抗腫瘍効果とTMZを用いた併用効果の基礎的検討. 第14回日本免疫治療学研究会学術集会 2017年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中村 光利

ローマ字氏名：Mitsutoshi Nakamura

所属研究機関名：公立大学法人奈良県立医科大学

部局名：脳神経外科

職名：研究員

研究者番号(8桁): 00305715

研究分担者氏名：中澤 務

ローマ字氏名：Tsutomu Nakazawa

所属研究機関名：公立大学法人奈良県立医科大学

部局名：脳神経外科

職名：研究員

研究者番号(8桁): 00772500

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。