

平成 30 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：2016～2017

課題番号：16K19974

研究課題名(和文) 肺癌免疫療法へ向けたNKT細胞におけるAhRシグナルの作用機構の解明

研究課題名(英文) Effect of AhR signaling in iNKT cell based immunotherapy for lung cancer

研究代表者

高見 真理子 (Takami, Mariko)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60770906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌に対するNKT細胞を用いた免疫療法の有効性の向上のため、新たな免疫療法を確立することを目的とした。

AhRリガンドの存在下で培養したNKT細胞表面上ではPD-L1の発現が減少した。しかしながら、AhRリガンド投与によるNKT細胞の抗腫瘍効果における変化は認められなかった。単球の樹状細胞培養条件にAhRリガンドを添加すると分化した樹状細胞のPD-L/PD-L2の発現が減少し、NKT細胞をより活性化させることが明らかになった。本研究から現行のNKT細胞療法に加えて、AhRリガンドを添加して樹状細胞を作成することで、より効果的にNKT細胞を活性化させる次世代のNKT細胞療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To improve our current iNKT cell based immunotherapy for lung cancer, I focused on aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling. I hypothesized that AhR signaling suppresses an immune checkpoint molecule, PD-L1/PD-L2 expression on iNKT cells, thus augmenting anti-tumor effect of iNKT cells.

PD-L1 expression on iNKT cells was downregulated in the presence of AhR ligand. These data suggest that AhR signaling negatively regulates PD-L1 expression. However, AhR signaling did not affect anti-tumor effect of iNKT cells. When monocytes derived DCs (moDCs) were cultured in the presence of AhR agonist, moDCs downregulated PD-L1/PD-L2 expression. Moreover, AhR agonist-treated moDCs induced enhanced cytokine production of iNKT cells. These data indicate that AhR agonist enhances moDC function to induce greater cytokine production by iNKT cells. AhR agonist treatment could be combined with our current iNKT cell based immunotherapy as next generation of combination therapy.

研究分野：免疫学

キーワード：NKT細胞 免疫療法 AhRシグナル 肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌は死亡率が高い難治性癌の一つである。現在、日本における原発性肺癌の死亡者数は年間7万人を超えており、罹患者数は増加を続けていることから、新規治療法の開発が求められている。そのような背景の中、現在、担癌患者に認められる免疫抑制状態の打破を目指した非特異的免疫療法である「免疫チェックポイント阻害剤」の肺癌における有効性が臨床試験にて示されたことから、免疫療法が注目を集めている。

我々の施設で研究を進めている自然免疫系のリンパ球である NKT 細胞は、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) を特異的に認識することによって活性化される。活性化された NKT 細胞は、自ら細胞傷害活性を発揮するだけでなく、NK 細胞や細胞傷害活性 $CD8^+$ T 細胞といった他の細胞群を活性化する役割も果たし、強力な抗腫瘍効果を誘導する (Fujii et al. *Front Immunol* 2013)。

当施設では、NKT 細胞を用いた癌免疫療法の臨床応用として、 α -GalCer をパルスした樹状細胞投与により *in vivo* で NKT 細胞を活性化させ抗腫瘍効果を上げることを目指した臨床試験が行われている。

本療法を受けた患者のうち、NKT 細胞による IFN- γ 産生量が増強した症例においては全生存期間の延長が認められ一定の効果を上げたと考えられる一方で、反応の乏しい症例も存在したことから、より効果的に NKT 細胞を活性化させることが、次世代の NKT 細胞療法の開発をする上での課題である (Motohashi et al. *J Immunol.* 2009, Nagato et al. *J Clin Immunol.* 2012)。

そこで、我々は免疫チェックポイントの一つとして知られる **programmed death-1 (PD-1) 受容体シグナルとその制御機構** に着目し、NKT 細胞における PD-1 シグナルの抑制をすることで、抗腫瘍活性が上昇するかどうかを *in vitro* で予備的な検討を行ったところ、以下のような結果を得た。

- (1) α -GalCer によって活性化された NKT 細胞は、抗 PD-L1 抗体の添加により、IFN- γ の産生量を増加させ、より強力な抗腫瘍効果を発揮するという結果が得られた。これらの結果から、NKT 細胞の活性化が PD-1 シグナルによって抑制されていることが示唆され、その解除が NKT 細胞のより効果的な活性化および、NKT 細胞療法の改善につながると予想される。
- (2) PD-1 シグナルを活性化する PD-L1、PD-L2 は、癌細胞が細胞表面に発現し免疫応答を抑制することが知られているが、我々は α -GalCer で活性化された NKT 細胞自身も PD-L1 を細胞表面に発現することを確認した。
- (3) ヘルパー $CD4^+$ T 細胞においても同じく刺激を受け活性化した細胞では PD-L1 が発現されることを確認し、さらに転写因子である Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の

シグナルによって、その発現が制御されることを発見した。

AhR は、普遍的に発現しているが、そのリガンドが結合することによって細胞質より核内へと移行することで遺伝子の転写調節領域に結合し、多様な遺伝子の発現調節を行う。特定されている AhR のリガンドには、ダイオキシン・トリプトファン代謝産物・ブロッコリー・キャベツなどに含まれる成分が挙げられる。AhR シグナルが細胞の癌化を促進するという報告もある一方、逆に AhR リガンドが癌細胞の増殖を抑制することも明らかにされており、**癌と AhR の関係は不明瞭な点が多い** (Fukasawa et al. *Mol Can Ther* 2014, Safe et al. *Toxicol Sci* 2013)。

免疫システムにおいて AhR は、 $CD4^+$ T 細胞の iTreg・Th17・Th22 への分化、また NK 細胞の細胞傷害活性に重要な役割を果たすことが示唆されているが、**NKT 細胞における AhR の役割は明らかにされていない** (Shin et al. *Proc Natl Acad Sci* 2013)。

以上より、本研究では AhR シグナルが PD-L1 の発現を抑制することにより NKT 細胞活性を上げる役割を果たすと仮説を立て、**NKT 細胞療法に AhR リガンド投与を併用することによって、より強力な抗腫瘍効果が得られるかどうかの検討**を行う。

2. 研究の目的

本研究では、肺癌に対する NKT 細胞を用いた免疫療法の有効性の向上を目指した、新たな併用免疫療法を確立するために、以下の3点を研究期間内に究明することを目標とする。

- (1) **NKT 細胞の抗腫瘍効果における AhR 作用機序の解明**
NKT 細胞の AhR による PD-L1 発現調節及び NKT 細胞抗腫瘍活性の変化を AhR リガンドおよびアンタゴストを用いて *in vitro* で解析する。
- (2) **AhR のリガンドを用いた新規併用免疫療法の有効性の探求およびエビデンス構築**
現行の NKT 細胞療法に *ex vivo* での NKT 細胞培養中に AhR リガンド投与を併用し、より効果的な抗腫瘍効果が得られるか否かを重度免疫不全マウス肺癌モデルを用いて検討する。
- (3) **AhR シグナルと抗腫瘍効果の関連の検討**
AhR のリガンド量と NKT 細胞療法への免疫応答および PD-L1 の発現を比較し、AhR シグナルと抗腫瘍効果の関連を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、AhR シグナルが NKT 細胞上もしくは樹状細胞上の PD-L1/PD-L2 の発現を抑え、NKT 細胞による IFN- γ 等のサイトカイン産生および細胞傷害活性を上げるとい

う仮説を検証するため、以下のように実験を行った。

(1) *in vitro* での AhR シグナルが NKT 細胞の抗腫瘍活性に及ぼす影響およびメカニズム解明

健康人由来の単核球細胞を NKT 培養条件で培養し、AhR アンタゴニスト、CH223191 もしくは AhR リガンド、FICZ を添加した条件下における NKT 細胞上の PD-L1、PD-L2 の経時的な発現の変化をフローサイトメーターにより検証した。

(2) AhR シグナルによる樹状細胞上の PD-L1、PD-L2 の経時的な発現調節メカニズムの検討

健康人由来の単核球をマグネットビーズにて末梢血より分離する。樹状細胞培養条件において FICZ もしくは CH223191 を添加した条件下における樹状細胞上の PD-L1、PD-L2 の経時的な発現の変化をフローサイトメーターにより検証した。

(3) AhR シグナルによる PD-L 発現制御が樹状細胞の機能へ及ぼす影響の検討

AhR シグナルが樹状細胞における PD-L1、PD-L2 の発現を減少させることにより、NKT 細胞をより活性化させているかどうかを検討した。健康人由来の単核球を分離し、樹状細胞の培養条件にて AhR リガンドである FICZ を添加して培養した。NKT 細胞とそれらの樹状細胞の抗腫瘍活性を測定した。具体的には、培養上清中の IFN- γ 等のサイトカイン産生を CBA により検出した。

4. 研究成果

本研究は、肺癌に対するNKT細胞を用いた免疫療法の有効性の向上のため、新たな免疫療法を確立することを目的とした。当初は、AhRシグナルがNKT細胞上のPD-L1の発現を抑え、NKT細胞によるIFN- γ 等のサイトカイン産生及び細胞障害活性を上げるという仮説に基づき以下の実験を行ってきた。

AhRリガンド、FICZの存在下で培養したNKT細胞表面上ではPD-L1の発現が減少したがPD-L2の発現に変化は見られなかった。逆に、AhRアンタゴニスト、CH223191の添加によりAhRシグナルを抑制した状態で培養したNKT細胞上ではPD-L1の発現が大きく上昇することが明らかとなった。しかしながらそれぞれの条件で培養したNKT細胞と肺癌細胞株A549との共培養を行い、細胞傷害活性を測定したところ、FICZもしくはCH223191投与によるNKT細胞の抗腫瘍効果への影響は認められなかった。以上のことからNKT細胞上で発現するPD-L1の発現は、AhRシグナルによって調節されていることは明らかとなったが、そのPD-L1の発現はNKT細胞の抗腫瘍効果には直接的に関与せず、FICZ投与によりNKT細胞におけるAhRシグナルを活性化させても当初の仮説に反し、抗腫瘍効果は増強されなかった。

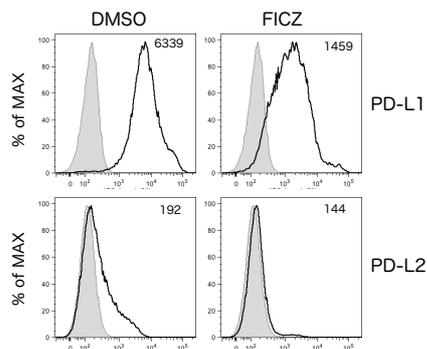


図1 AhRリガンド存在下における単球由来樹状細胞のPD-L1/PD-L2発現

そこで、次にNKT細胞を α -GalCerを掲示し活性化させる抗原提示細胞側である樹状細胞に着目した。単核の樹状細胞培養条件にFICZもしくはCH223191を添加し、AhRシグナルが樹状細胞上のPD-L1及びPD-L2の発現変化に及ぼす影響を検討した。

単核の樹状細胞培養条件にAhRリガンドを添加すると分化した樹状細胞のPD-L1の発現が減少し、PD-L2においては発現が顕著に抑制された。逆にAhRアンタゴニストを添加するとPD-L1、PD-L2の発現が上昇した(図1)。さらに、それらの樹状細胞からRNAを抽出し、リアルタイムPCRを行ったところ、PD-L1、PD-L2の発現量は転写レベルで調節されていることが明らかになった。次に、FICZ存在下で培養しPD-L1、PD-L2の発現が抑制された樹状細胞において、免疫チェックポイントシグナルが解除され、より効率的にNKT細胞を活性化させ抗腫瘍効果を増強させるという仮説を立て検討した。FICZ添加条件にて培養した

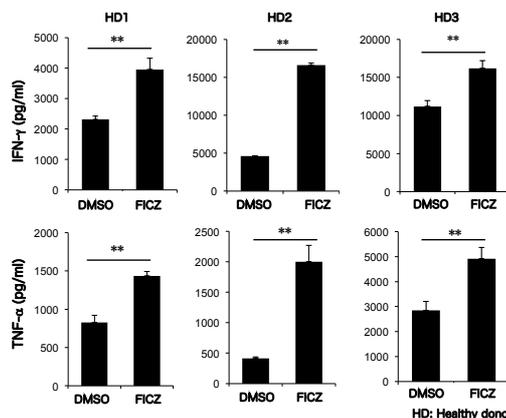


図2 樹状細胞により活性化されたNKT細胞のサイトカイン産生量
樹状細胞が、NKT細胞をより活性化させ、NKT細胞によるIFN- γ 、TNF- α などのサイトカインの産生を増加させることが明らかになった(図2)。

本研究から現行のNKT細胞療法に加えて、AhRリガンドを添加して樹状細胞を作成することにより、免疫チェックポイントを解除し、より効果的にNKT細胞を活性化させる次世代のNKT細胞療法の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Hishiki, T., Mise, N., Harada, K., Ihara, F., **Takami, M.**, Saito, T., Terui, K., Nakata, M., Komatsu, S., Yoshida, H., and Motohashi, S.: Invariant natural killer T infiltration in neuroblastoma with favorable outcome. *Pediatr. Surg. Int.* 34(2):195-201. (2018)
DOI: 10.1007/s00383-017-4189-x 査読有
- ② Hishiki, T., Mise, N., Harada, K., Ihara, F., **Takami, M.**, Saito, T., Terui, K., Nakata, M., Komatsu, S., Yoshida, H., and Motohashi, S.: Frequency and proliferative response of circulating invariant natural killer T cells in pediatric patients with or without malignant solid tumors. *Pediatr. Surg. Int.* 34(2):169-176. (2018)
DOI: 10.1007/s00383-017-4185-1 査読有
- ③ Kamata, T., Suzuki, A., Mise, N., Ihara, F., **Takami, T.**, Makita, Y., Horinaka, A., Harada, K., Kunii, K., Yoshida S., Yoshino, I., Nakayama, T., and Motohashi, S.: Blockade of Programmed Death-1/Programmed Death Ligand pathway enhances the antitumor immunity of human invariant Natural Killer T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 65(12):1477-1489 (2016).
DOI: 10.1007/s00262-016-1901-y 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① **Takami, M.**, Ihara, F., Kamata, T., Motohashi, S.: AhR signaling enhances moDC function to activate NKT cells. 第 46 回日本免疫学会学術集会 2017 年 12 月 12 日、仙台国際センター (仙台)
- ② **Takami, M.**, Ihara, F., Kamata, T., Motohashi, S.: A role of AhR signaling in NKT cell immunotherapy. CD1-MR1 2017, 11/6/2017, Napa/USA.
- ③ Ihara, F., Sakura, D., **Takami, M.**, Okamoto, Y., Motohashi, S.: Regulatory T cells increased in advanced head and neck cancer patients suppress NKT cell function and correlate with disease progression. CD1-MR1 2017, 11/6/2017, Napa/USA.
- ④ 本橋 新一郎、**高見 真理子** NKT 細胞のがん免疫療法における役割と今後の展望 第 21 回日本がん免疫学会総会 2017 年 6 月 30 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高見 真理子 (TAKAMI, Mariko)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号 : 60770906