

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21269

研究課題名(和文)膵癌における腫瘍免疫抑制性Natural Killer T細胞の機能解析

研究課題名(英文)Characterization of immuno-suppressive NKT cells in mouse pancreatic cancer model

研究代表者

加藤 真吾 (KATO, Shingo)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：20622583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌における腫瘍免疫抑制性Natural Killer T(NKT)細胞の機能解析を行った。NKT細胞は、脂質抗原を認識し、自然免疫系と獲得免疫系を橋渡しする特殊なT細胞である。NKT細胞には、腫瘍免疫を亢進するtype I NKT細胞と、抑制するtype II NKT細胞の2つのサブセットが存在する。マウス膵癌細胞株同所移植モデルと、NKT細胞のノックアウトマウスを用いて、解析を行った。結果として、NKT細胞のノックアウトマウスにおいて膵癌細胞株の増殖が促進し、NKT細胞が抗腫瘍免疫に関与している可能性が示唆された。今後、この現象の詳細な機序を解析する。

研究成果の概要(英文)：Functional analysis of tumor immunosuppressive Natural Killer T (NKT) cells in pancreatic cancer mouse model was performed. NKT cells are unique T cell subset that recognizes lipid antigens and bridge the innate immune system and the acquired immune system. There are two subsets of NKT cells, type I NKT cells that enhance tumor immunity and type II NKT cells that suppress tumor immunity. Analysis was carried out using mouse pancreatic cancer cell line orthotopic transplant model and knockout mouse of NKT cell. As a result, proliferation of pancreatic cancer cell line was promoted in knockout mice of NKT cells, suggesting that NKT cells may be involved in antitumor immunity. From now on, we analyze the detailed mechanism of this phenomenon.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：Natural Killer T 細胞 膵癌

1. 研究開始当初の背景

生体には過剰な免疫反応や自己免疫反応から身を守るために、負の制御機構が存在する。この負の制御機構は、効果的な抗腫瘍免疫の誘導を目的とするがん免疫療法において、大きな障害となっている。Natural Killer T (NKT) 細胞は、自然免疫系の免疫細胞と獲得免疫系の免疫細胞の特徴を併せ持つ特殊な T 細胞で、両者の架け橋として重要な細胞である。そのサブセットの一つである type II NKT 細胞は、腫瘍免疫抑制細胞としての機能を持つことが知られているが、解析の技術的な難しさから、未知の部分が多い細胞である。

2. 研究の目的

本研究では、type II NKT 細胞の既知の抗原である sulfatide が膵臓に豊富に存在することに着目し、最も治療困難ながんの一つである膵臓において、type II NKT 細胞の腫瘍免疫調節への関与を解析し、膵臓に対する効果的ながん免疫療法の治療標的としての可能性を評価する。

3. 研究の方法

CRISPER CAS9 システムを用いたマウス膵臓オルガノイド細胞株の作成

Lox-stop-lox KrasG12D マウスから、正常膵管上皮オルガノイド細胞株を樹立した。6 週齢の Lox-stop-lox KrasG12D マウスから膵臓を取り出し、Collagenase P、Dispase II によりシングルセルとした。PBS による洗浄後、マトリゲル上に撒き、培養した。

レンチウイルスを用いて、Cre recombinase を導入し、シングルセル化した後、Lox-stop-lox サイトの脱落を確認した KrasG12D 膵管上皮オルガノイド細胞株を得た。ダブルニッカーゼ型の CRISPER CAS9 システムを用いて p53 のノックアウトを行い、シングルセル化の後、ゲノム編集された細胞株を得た。Geno typing により、p53 遺伝子の編集、RT-PCR により p53 mRNA の発現低下、ウェスタンブロッティングによりタンパク質レベルでの発現低下を確認した。

マウス膵臓オルガノイド同所移植モデルの確立

の細胞株を用いて、一度皮下腫瘍を作り、それを 3 mm 大に刻んだ腫瘍片を別のマウスの膵臓に縫い付けた。

マウス膵臓オルガノイド同所移植モデルにおける抗腫瘍免疫の解析

のモデルより、膵腫瘍を取り出し、ハサミで小さく刻んだ後、gentleMACS™ Dissociator を用いて、組織をすりつぶした。

Collagenase D と Dispase II を用いて酵素処理し、洗浄後にフローサイトメトリーにて解析を行った。

type I NKT 細胞、type II NKT 細胞の解析用に、それぞれの抗原である α -Galactosylceramide、Sulfatide を load した CD1d tetramer を作成し、解析に使用した。

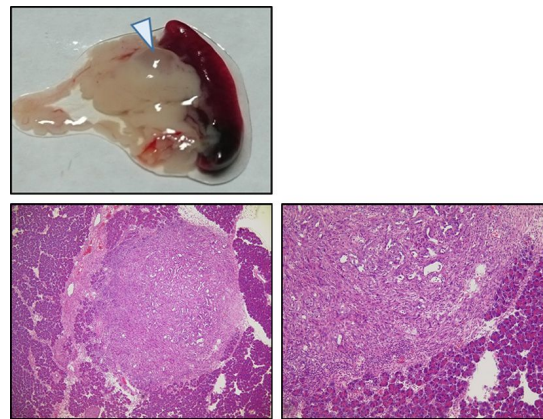
4. 研究成果

CRISPER CAS9 システムを用いたマウス膵臓オルガノイド細胞株の作成

研究計画の時点では、恒常的 KrasG12D 発現に加え shRNA による p53 のノックダウンにより、膵臓オルガノイド細胞株を樹立した系を用いていた。しかし、この細胞株は、in vivo での移植の際、再現性が低いという問題が発生した。免疫染色による解析の結果、shRNA による p53 のノックダウンが in vivo の系では安定しないという結論となり、CRISPER CAS9 システムを用いて再度オルガノイド細胞株を立ち上げる方針とした。ダブルニッカーゼ型の CRISPER CAS9 システムを用いて p53 のノックアウトを行い、シングルセル化を行い、ゲノム編集された細胞株を得た。

マウス膵臓オルガノイド同所移植モデルの確立

の細胞株を用いて、一度皮下腫瘍を作り、それを 3 mm 大に刻んだ腫瘍片を別のマウスの膵臓に縫い付けることで、安定して 4 週間後に 10 mm 大の膵腫瘍を得ることができた。



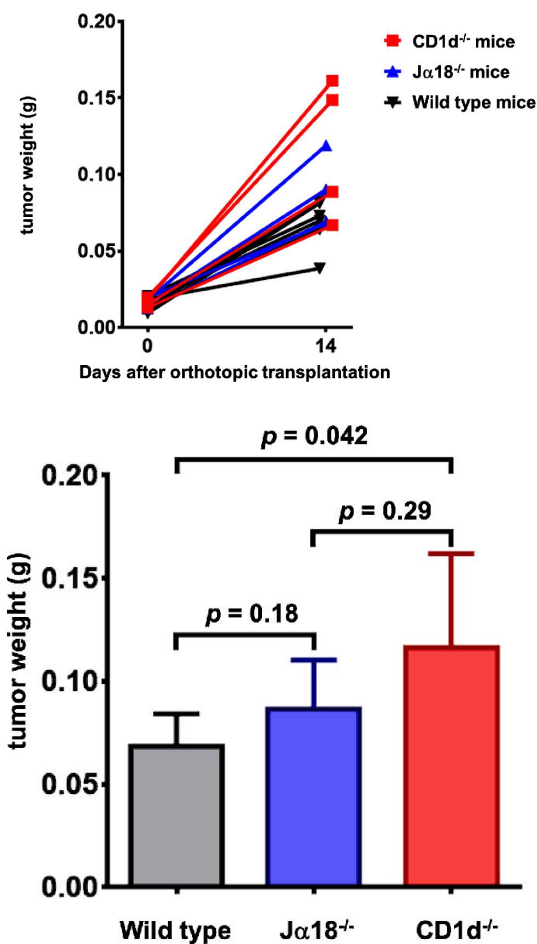
マウス膵臓オルガノイド同所移植モデルにおける抗腫瘍免疫の解析

のモデルを使って、腫瘍浸潤 T 細胞の解析を行った。NKT 細胞のフローサイトメトリーに関して、type I NKT 細胞は解析可能であったものの、type II NKT 細胞に関しては解析困難であった。これは、日本で手に入るモノビオチン化 CD1d モノマーの質の問題であると考えられた。米国留学時代の NIH tetramer core facility を用いて作成した sulfatide loaded

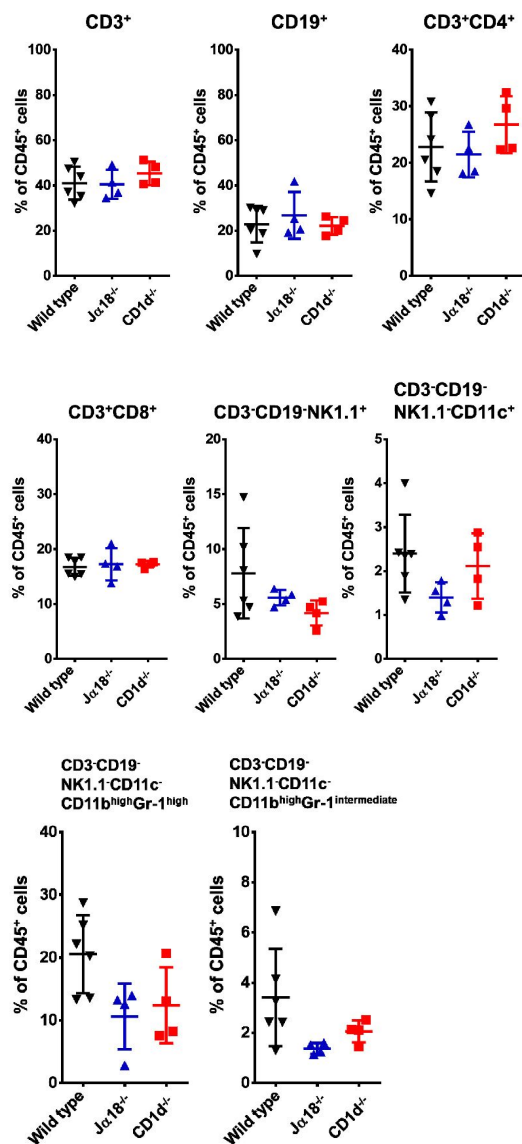
CD1d tetramer とは染色パターンが大きく異なっていた。

Ja18 KO、CD1d KO マウスを用いた解析のモデルにおける NKT 細胞の機能解析を行うため、NKT 細胞のノックアウト (KO) マウスを用いた解析を行った。NKT 細胞の KO マウスは、全ての NKT 細胞を欠いた CD1d KO マウスと、type I NKT 細胞は欠くが、type II NKT 細胞は保持した Ja18 KO マウスの 2 種類が存在する。

野生型 (WT) マウス、Ja18 KO マウス、CD1d KO マウスを用いて、膵癌オルガノイド細胞株同所移植モデルを作成し、4 週間後に腫瘍の重量を測定した。WT マウスと比較して、CD1d KO マウスで作成した手法は重量が重かった。しかし、Ja18 KO マウスと比較すると差がなかった。



この差の原因を解析するため、腫瘍浸潤リンパ球のサブセット解析を行った。結果として、研究期間中の解析では有意な差のあるサブセットを発見することはできなかった。



今後の展望

今回の解析では、NKT 細胞が膵がんの抗腫瘍免疫の調節に関与している可能性は示唆されたが、その機序に関しては結論が得られなかった。今後、さらなる解析を加え、詳細な機序の解明を目指す。

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 2 件)

Kato S, Berzofsky JA, Terabe M
Possible Therapeutic Application of Targeting Type II Natural Killer T Cell-Mediated Suppression of Tumor Immunity. 査読有
Frontiers in immunology
2018;9:314.

Terabe M, Robertson FC, Clark K, De Ravin E, Bloom A, Venzon DJ, Kato S, Mirza A, Berzofsky JA

Blockade of only TGF- β 1 and 2 is sufficient to enhance the efficacy of vaccine and PD-1 checkpoint blockade immunotherapy. 査読有
Oncoimmunology. 2017 ;6(5):e1308616.

〔学会発表〕(計 3 件)

第 75 回 日本癌学会総会

Shingo Kato

Characterization of immuno-suppressive NKT cells in mouse lungs

2016 年 10 月 06 日 ~ 10 月 08 日

パシフィコ横浜 (神奈川県)

第 20 回 日本がん免疫学会総会

Shingo Kato

Characterization of sulfatide reactive type II NKT cells in mouse lungs

2016 年 07 月 27 日 ~ 07 月 29 日

大阪国際交流センター (大阪府)

第 45 回日本免疫学会学術集会

Shingo Kato

Characterization of type II NKT cells in mouse lungs using sulfatide-loaded CD1d Tetramers

2016 年 12 月 05 日 ~ 12 月 07 日

沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 真吾 (KATO, Shingo)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号: 20622583

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし