

令和元年5月15日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16625

研究課題名(和文) 膠芽腫に対するNKT細胞を用いた免疫治療の確立

研究課題名(英文) Development of NKT cell-based cancer immunotherapy for glioblastoma

研究代表者

原 彩佳 (Hara, Ayaka)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90792705

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)：膠芽腫患者切除検体を用いた解析の結果、NKT細胞が認識する特異的抗原提示分子CD1dが陽性の膠芽腫が存在することを見出した。また、CD1d陽性膠芽腫細胞にNKT細胞特異的糖脂質抗原-GalCerを提示させた場合、NKT細胞の腫瘍に対する細胞傷害活性、サイトカイン産生能が増強した。免疫不全マウスを用いて作成したCD1d陽性ヒト膠芽腫モデルにおいて、NKT細胞と-GalCerを併用する治療実験を行い、CD1d陽性膠芽腫に対する抗腫瘍効果を認めた。本研究結果は、膠芽腫におけるCD1d発現が膠芽腫患者に対するNKT細胞を用いた免疫療法の新規標的となりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良な膠芽腫に対する新規治療法の開発は困難を極めている。本研究では、膠芽腫患者の腫瘍組織を解析し、Natural Killer T(NKT)細胞に対する特異的な抗原提示分子であるCD1d陽性の腫瘍細胞が存在することを見出した。さらに免疫不全マウスにCD1d陽性細胞株を同所移植して作成した膠芽腫モデルに対して、NKT細胞とNKT細胞の代表的な糖脂質抗原である-GalCerを投与する免疫治療実験を行い、抗腫瘍効果を認めた。これらの結果は、膠芽腫におけるCD1d発現は、NKT細胞を用いた膠芽腫プレシジョン医療の新規標的となりうることを示している。

研究成果の概要(英文)：This study showed that CD1d, an antigen-presenting molecule for invariant natural killer T (iNKT) cells, was expressed on several patient glioblastoma cells. CD1d-expressing glioblastoma cells presented glycolipid antigens to induce iNKT cell-mediated cytotoxicity in vitro. Moreover, intracranial administration of human iNKT cells caused a regression in orthotopic CD1d-expressing human glioblastoma xenografts in immunodeficient mice. Thus, CD1d expression may represent a novel target for NKT cell-based precision cancer immunotherapy for glioblastoma patients.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 NKT細胞

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

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは、原発性脳腫瘍の約 25% を占める代表的な脳腫瘍である。脳実質内に浸潤性に増大するため根治症例は少なく、極めて予後の悪い腫瘍である。本研究の対象である膠芽腫はグリオーマの中で約 35% と高率に存在するが、手術・放射線治療・化学療法を施行しても、生存期間中央値 15 か月、5 年生存率 6% 程度に留まり、最も悪性度の高い grade 4 に分類されている。2005 年の報告により標準治療となった、術後放射線治療とテモゾロミド投与を併用する Stupp レジメンの成績は、この十数年間改善を認めていない (Stupp R, et al. N Engl J Med 2005)。

現在種々のがんに対して免疫療法の有効性が示されつつあり、グリオーマに対しても新規治療法として期待が持たれている。多くの固形腫瘍は、発生・増殖の過程において自己の免疫系に晒されるが、免疫逃避機構を有することによって発育していくと考えられている。しかし血液-脳関門に守られた脳実質に発生する脳腫瘍に対しては、抗腫瘍免疫が初期段階では機能せず、腫瘍による免疫逃避機構が構築されていないため (Proescholdt MA, et al. J Neurosurg. 2001) 免疫系を用いた治療介入にて排除できる可能性がある。現在までにグリオーマに対し試みられた免疫療法としては、ペプチドワクチン療法 (Schuster J, et al. Neuro Oncol 2015) や腫瘍抗原特異的樹状細胞療法 (Mitchell DA, et al. Nature 2015)、遺伝子組換えヘルペスウイルス製剤治療 (Markert JM, et al. Gene Ther 2000, Markert JM, et al. Mol Ther 2009、Ino Y, et al. Clin Cancer Res 2006) が報告されており、免疫治療が膠芽腫に有効である可能性が示唆されている。

千葉大学大学院医学研究院免疫発生学教室では、原発性肺がん患者を対象に Natural Killer T (NKT) 細胞を標的とした免疫細胞療法に関する研究開発を行ってきた。NKT 細胞は千葉大学大学院医学研究院が世界に先駆けて同定したリンパ球集団で、末梢血中に 0.1% 以下と非常に少ない細胞集団であるにも関わらず、抗腫瘍免疫を始めとする様々な免疫反応に関与することが知られている (Taniguchi M, et al. Annu Rev Immunol 2003)。さらに、抗原提示細胞上の CD1d 分子に提示された外来性抗原である糖脂質、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) が、NKT 細胞の特異的な外因性リガンドであることが発見されている (Kawano T, et al. Science 1997)。マウスのがん転移モデルにおいては、 α -GalCer を単独で投与するよりも、樹状細胞に提示させて投与する細胞治療の方が、より強力な抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなっている (Toura I, et al. J Immunol 1999)。このような悪性腫瘍に対する NKT 細胞を用いた免疫細胞療法の基礎研究および臨床研究の成果から、千葉大学では原発性肺がんおよび頭頸部がんにおいて先進医療に承認され、現在臨床研究が実施されている。一方、脳腫瘍患者における NKT 細胞免疫系の解析については、グリオーマ患者の末梢血を用いた報告において、正常人と同等の機能を持った NKT 細胞の存在と、グリオーマにおける CD1d の発現が報告されている (Dhodapkar KM, et al. Int J Cancer 2004)、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

予後が悪い膠芽腫に対する新規治療法の開発は困難を極めている。本申請研究では、膠芽腫と診断された患者の末梢血および手術時に摘出された腫瘍組織を用いて、NKT 細胞を中心とした各種免疫細胞の機能解析を行い、腫瘍局所における抗腫瘍効果発揮メカニズムを明らかにする。さらに重症複合免疫不全マウスを用いて作成したヒト膠芽腫マウスモデルを用いて、ヒト樹状細胞および NKT 細胞を投与する免疫治療実験を行う。膠芽腫に対する NKT 細胞の抗腫瘍効果発揮メカニズムを解明するとともに、治療方法の検討を行い、新規治療法開発のための臨床研究を実施するエビデンスを構築する。

3. 研究の方法

- 1) 膠芽腫患者の末梢血および腫瘍局所の NKT 細胞を中心とした免疫環境の解析
千葉大学医学部附属病院脳神経外科を受診し膠芽腫の診断が得られた患者に同意を得て、術前に末梢血を採取し、単核球を比重分離した後に、フローサイトメトリーにより T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞などのリンパ球サブセットを同定した。同時に PD-1 などの共刺激・抑制分子の発現解析を行った。さらに手術により摘出された膠芽腫の腫瘍浸潤リンパ球サブセットをフローサイトメトリーおよび免疫染色にて同定するとともに、共刺激・抑制分子の発現解析を行った。
- 2) NKT 細胞の膠芽腫細胞に対する細胞傷害活性の評価、サイトカイン産生能の評価
2-a) ヒト膠芽腫由来の細胞株を用いて、NKT 細胞の膠芽腫細胞に対する細胞傷害活性の評価を行った。
2-b) ヒト膠芽腫由来の細胞株を用いて、NKT 細胞を腫瘍細胞共培養した際のサイトカイン産生能の評価を行った。
- 3) ヒト膠芽腫マウスモデルにおける NKT 細胞の抗腫瘍効果の解析
3-a) ヒト膠芽腫マウスモデルの確立
重度複合免疫不全マウスである NOD/Shi-scid IL-2R γ KO マウス (NOG マウス) に、ヒト膠芽腫由来の細胞株を頭蓋内投与にて移植し、ヒト膠芽腫マウスモデルを作成した (Carpenito C, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2009)。
3-b) 作成したヒト膠芽腫マウスモデルを用いて、下記のモデルを作成した。
NKT 細胞同時投与群：ヒト膠芽腫由来の細胞株と同時に NKT 細胞を頭蓋内投与した。
NKT 細胞・ α -GalCer 同時投与群：ヒト膠芽腫由来の細胞株と同時に NKT 細胞と α -GalCer を

頭蓋内投与した。

無治療群

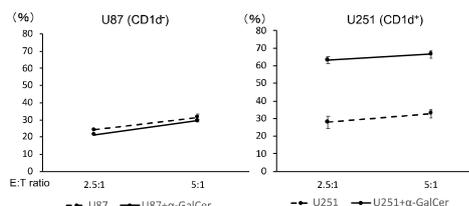
各モデルについて、NKT 細胞の抗腫瘍効果を画像により評価するとともに、安楽死後に腫瘍浸潤リンパ球を回収し、免疫学的解析を行った。

4. 研究成果

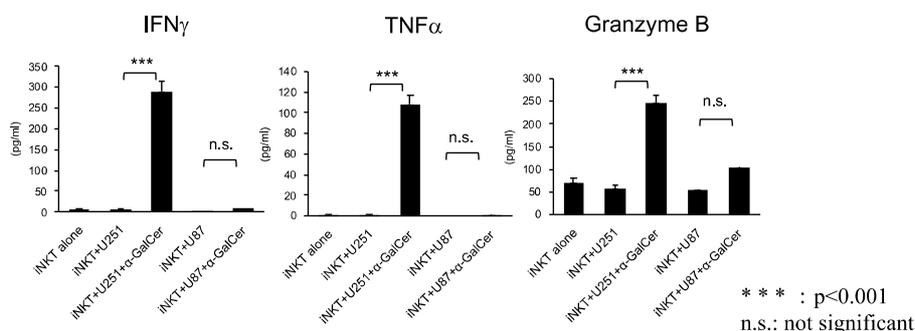
1) 千葉大学医学部附属病院脳神経外科で膠芽腫と診断された患者の末梢血および手術時に摘出された腫瘍組織について、フローサイトメトリーを用いて免疫学的解析を行った。膠芽腫手術検体から分離した腫瘍細胞を用いてフローサイトメトリー解析を行い、抗原提示分子 CD1d の発現を 15 例中 6 例 (40%) に認めた。膠芽腫手術検体から分離した腫瘍浸潤リンパ球の解析では、14 例全例で CD3+ T 細胞の腫瘍浸潤を認めた。一方、腫瘍細胞の CD1d 発現にかかわらず、NKT 細胞は検出されなかった。

2) 4 種の膠芽腫細胞株の CD1d 発現を検討したところ、U251 と T98G は CD1d 陽性細胞株であり、U87 と U138 は CD1d 陰性細胞株であった。

3) NKT 細胞の膠芽腫細胞に対する細胞傷害活性の評価を行った。CD1d 陰性細胞株 U87 では、 α -GalCer 提示の有無による NKT 細胞の細胞傷害活性の変化は認められなかったが、CD1d 陽性細胞株 U251 では、 α -GalCer 添加により、NKT 細胞の細胞傷害活性は増強した。

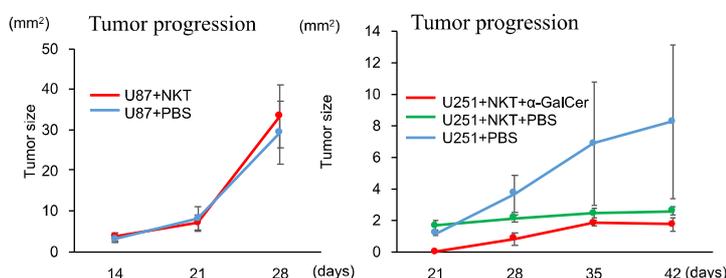


4) 腫瘍細胞と共培養した際の NKT 細胞のサイトカイン (IFN γ , TNF α) および Granzyme B 産生能の評価を行なった。サイトカイン、Granzyme B の産生は、 α -GalCer を添加した CD1d 陽性細胞株 U251 との共培養では、コントロールと比較し増強した。一方、 α -GalCer を添加した CD1d 陰性細胞株 U87 との共培養では、変化が見られなかった。



5) NOG マウスにヒト膠芽腫由来の CD1d 陰性細胞株 U87、CD1d 陽性細胞株 U251 をそれぞれ安定して頭蓋内に移植することが可能となり、ヒト膠芽腫マウスモデルを作成した。このヒト膠芽腫マウスモデルの頭蓋内に NKT 細胞を投与し、腫瘍浸潤リンパ球を回収して経時的な解析を実施した結果、腫瘍浸潤リンパ球における NKT 細胞は経時的に減少を認めた。

6) 作成したヒト膠芽腫マウスモデルを用いて、NKT 細胞を投与してその抗腫瘍効果を評価した。CD1d 陽性細胞株 U251 の腫瘍細胞移植と同時に NKT 細胞および α -GalCer を投与した場合、NKT 細胞投与群では非投与群と比較し、腫瘍増大が抑制される傾向にあった。また、NKT 細胞を α -GalCer とともに投与した群の生存期間は、コントロール群と比較し有意に延長した。一方、CD1d 陰性細胞株 U87 の腫瘍細胞移植と同時に NKT 細胞を投与した場合には、NKT 投与群において腫瘍増大は抑制されず、生存期間にも変化を認めなかった。



CD1d 陽性細胞株 U251 に luciferase を導入し、IVIS Imaging System を用いて発光強度にて腫瘍増殖の評価が可能である CD1d 陽性膠芽腫マウスモデルを作成した。腫瘍移植後 1 週間目で発光強度により腫瘍形成を確認後、NKT 細胞と α -GalCer を投与した。NKT 細胞と α -GalCer 投与後 1 週目と 2 週目の発光強度を比較すると、コントロール群では発光強度が増強したのに対し、NKT 細胞と α -GalCer 投与群では発光強度が有意に減弱し、NKT 細胞と α -GalCer 投与治療によ

る抗腫瘍効果を確認できた。

膠芽腫における CD1d 発現は、NKT 細胞を用いた膠芽腫プレジジョン医療の新規標的となりうることを示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1 Yasuo Iwadate, Tomoo Matsutani, Ayaka Hara, Seiichiro Hirono, Shiro Ikegami, Masayoshi Kobayashi, Daisuke Ito, Daisuke Kawauchi, Kentaro Horiguchi, Ado Tamiya, Yoshinori Higuchi, Eighty percent survival rate at 15 years for 1p/19q co-deleted oligodendroglioma treated with upfront chemotherapy irrespective of tumor grade, Journal of Neuro-Oncology 査読有, 141, 2019, 205-211

DOI: 10.1007/s11060-018-03027-5

2 Masaki Yoshioka, Tomoo Matsutani, Ayaka Hara, Seiichiro Hirono, Takaki Hiwasa, Masaki Takiguchi, Yasuo Iwadate, Real-time methylation-specific PCR for the evaluation of methylation status of MGMT gene in glioblastoma., Oncotarget, 査読有, Vol.9, (No.45), 2018, 27728-27735

DOI: 10.18632/oncotarget.25543

〔学会発表〕(計 1 件)

原彩佳、那須亮、伊原史英、高見真理子、廣野誠一郎、松谷智郎、本橋新一郎、岩立康男、膠芽腫に対する NKT 細胞を用いた免疫治療の確立、第 13 回 Chiba neuroresearch meeting、2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。