

令和 2 年 4 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16108

研究課題名（和文）NKT細胞のCD1d陰性腫瘍細胞に対する腫瘍認識機構の解明と白血病治療への応用

研究課題名（英文）Tumor recognition mechanism of NKT cells for CD1d-negative leukemia cells

研究代表者

青木 孝浩（Aoki, Takahiro）

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：30791553

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）：インバリアントNKT（iNKT）細胞はCD1d拘束性に糖脂質を認識することが知られている。しかし本研究によりiNKT細胞がCD1d非依存性の腫瘍認識機構を有することが明らかとなった。iNKT細胞のCD1d非依存性細胞傷害活性は、NOGマウスにCD1d陰性白血病細胞を移植したヒト白血病マウスにおいても確認された。これらのことからiNKT細胞養子免疫療法がCD1dの発現に依存せず、ヒト白血病に対して有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はiNKT細胞がCD1d拘束性に糖脂質を認識すること以外にもCD1d非依存性に腫瘍認識機構を有することを明らかにした。このことからiNKT細胞養子免疫療法がCD1dの発現に依存せずヒト白血病に対して有効である可能性が示唆された。またiNKT細胞のCD1d非依存性細胞傷害活性には複数のNK受容体が関与していること、そしてその認識にはTCRが重要な役割を担っていることが明らかとなった。このことはiNKT細胞の新たなリガンドの発見につながる重要な示唆である。

研究成果の概要（英文）：Invariant NKT (iNKT) cells are generally known to recognize glycolipid presented by CD1d. iNKT cell recognition of CD1d-negative tumor cells is unknown, and direct cytotoxicity of iNKT cells toward CD1d-negative tumor cells remains controversial. Here we demonstrated that activated iNKT cells recognize leukemia cells in a CD1d-independent manner, however, still in a TCR-mediated way. We also showed that iNKT cell in vivo cytotoxicity for CD1d-negative leukemia cells in NOG mice. Therefore, adoptive iNKT cell therapy can be effective for leukemia independently of CD1d.

研究分野：血液学

キーワード：NKT細胞 CD1d 白血病

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害薬やキメラ抗原受容体 T 細胞療法の開発に伴い、免疫細胞が強く抗腫瘍効果を持つことが改めて認識されている。小児白血病診療においても CD19 を標的分子とした B 細胞性急性リンパ性白血病に対するキメラ抗原受容体 T 細胞療法に期待が集まっているが、再発が少なくないことや T 細胞性急性リンパ性白血病や骨髄性白血病に対してはまだ至適な標的分子が定まっていないなど未解決な課題も多い。

Invariant NKT (iNKT) 細胞は通常の T 細胞と異なり、NK 細胞関連マーカーを発現するとともに、ヒトにおいては Va24 と Vβ11 からなる不可変な T 細胞受容体 (TCR) を発現する。HLA 非拘束的に、抗原提示分子 CD1d に提示された α ガラクトシルセラミド (αGalCer) を代表とする糖脂質抗原を認識し、直接的な抗腫瘍効果を示す (Kawano et al. Cancer Res. 1999.)。iNKT 細胞は白血病細胞に対しても CD1d/αGalCer 依存的に直接的な抗腫瘍効果を示すことが報告されており (Metelitsa et al. J Immunol. 2001.)、白血病治療において新たな標的分子を提供する。このことは腫瘍細胞への細胞傷害性顆粒の放出 (脱顆粒) を免疫細胞表面上の CD107a の発現で同定する CD107a assay においても確認される (図 1)。一方で iNKT 細胞が CD1d 陰性白血病細胞株である K562 に抗腫瘍効果を示している研究と、それに否定的な研究の双方が報告されており、iNKT 細胞の CD1d 陰性腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害活性の有無は明らかにされていない (Vivier et al. Nat Rev Immunol. 2012.)。しかし、申請者が行った実験において iNKT 細胞は確かに CD1d 陰性 K562 を認識して脱顆粒を示した (図 2)。研究開始時点において、この細胞傷害活性がどのようなメカニズムで生じているのかは不明であり、本研究を行うに至った。

灰色：iNKT細胞のみ 黒線：CD1d陽性Jurkat添加

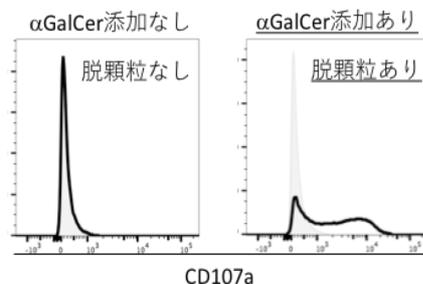


図 1 CD1d陽性Jurkat細胞に対するNKT細胞の αGalCer依存性な直接的細胞傷害活性

灰色：iNKT細胞のみ 黒線：CD1d陰性K562添加

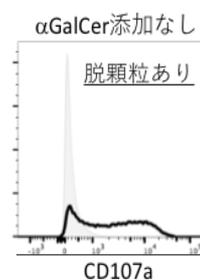


図 2 CD1d陰性K562細胞に対する NKT細胞の直接的細胞傷害活性

2. 研究の目的

これまでに iNKT 細胞が CD1d 陰性腫瘍細胞に対し直接的に細胞認識する明らかな証拠やその機序の解明はなされていない。しかし、その腫瘍認識、抗腫瘍効果が明らかとなれば CD1d 陽性白血病に限定されず、CD1d 陰性白血病に対しても NKT 細胞養子免疫療法の治療効果が期待できる。そこで本研究では、iNKT 細胞における CD1d 陰性白血病に対する直接細胞傷害活性の有無、そしてその機序を明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識の確認

Flow cytometry、real-time PCR において CD1d 陰性を確認した K562、HL-60、REH の白血病細胞株、そして CRISPR/Cas9 system を用いて遺伝子ノックアウト (KO) を行なった CD1d-KO U937、B2M-KO K562 細胞を用いて、iNKT 細胞の脱顆粒反応を CD107a assay を用いて評価した。

(2) iNKT 細胞の CD1d 陰性腫瘍に対する細胞傷害活性

iNKT 細胞と CellTrace Violet で予め染色した腫瘍細胞とを 4 時間共培養した後、腫瘍細胞の死細胞割合を Annexin V/PI で染色することにより解析し、iNKT 細胞の CD1d 陰性腫瘍に対する *in vitro* 細胞傷害活性を評価した。同時にその上清中の IFN γ 、TNF α 濃度を Cytokine Beads Array を用いて評価した。また NOG マウスに K562 細胞を移植した後に、ヒト iNKT 細胞を経静脈的に輸注し iNKT 細胞の *in vivo* 細胞傷害活性を評価した。

(3) iNKT 細胞における NK 受容体の発現と細胞傷害活性への関与

iNKT 細胞表面の NK 受容体の発現 (NKG2D, DNAM1, 2B4, LFA-1, CD2, CD16,

KIR2DS1) を Flow cytometry を用いて評価した。また阻害抗体を用いて NK 受容体をブロックした上で、CD1d 陰性腫瘍細胞に対する細胞傷害活性、IFN γ 産性能を評価した。

- (4) iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識における NK 受容体の関与
NK 受容体が CD1d 非依存性腫瘍認識に寄与しているか評価するために、各受容体に対する抗体をその二次抗体を用いて架橋し、単一受容体刺激を加え CD107a assay を行なった。また単一受容体刺激により脱顆粒を示した NK 受容体を CRISPR/Cas9 system を用いて KO し、KO 細胞における CD1d 陰性腫瘍細胞の脱顆粒反応を評価した。
- (5) iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識における TCR の関与
CRISPR/Cas9 system を用いて iNKT 細胞の TRAC もしくは TRBC 遺伝子を KO し、iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識、細胞傷害活性における TCR の役割を評価した。TCR-KO は iNKT 細胞表面の V α 24 の発現消失と α GalCer-loaded CD1d-tetramer への非結合により確認した。

4. 研究成果

- (1) iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識の確認
iNKT 細胞は CD1d 陰性白血病株 K562, HL-60, REH を認識し、脱顆粒を示した。また wild-type U937 と CD1d-KO U937、wild-type K562 と B2M-KO K562 で CD107a 発現は変わらなかった (図3)。このことから iNKT 細胞は CD1d 非依存性に腫瘍認識する機構を有することが示された。また CD1d のみでなく他の CD1 family や MR1 を含む HLA class Ib 分子にも依存していないことが示された。

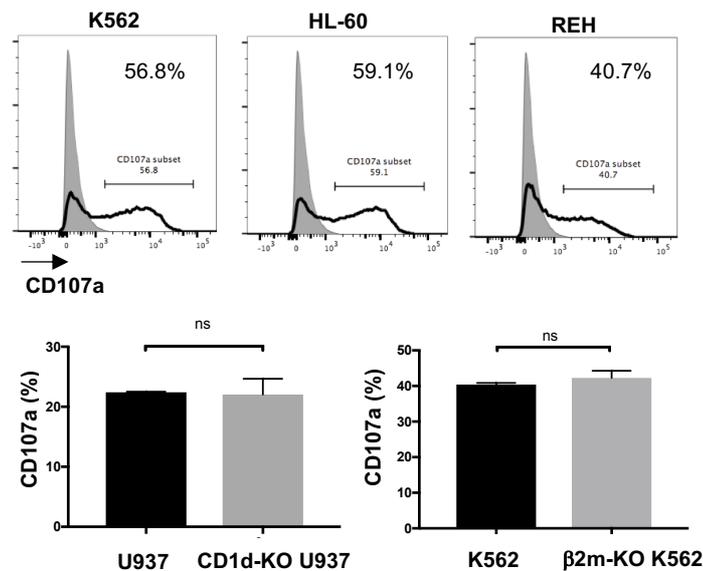


図3. iNKT細胞のCD1d非依存性腫瘍細胞認識

- (2) iNKT 細胞の CD1d 陰性腫瘍に対する細胞傷害活性
iNKT 細胞は CD1d 陰性白血病株 K562, HL-60, REH に対して *in vitro* 細胞傷害活性を示した。同時に Th1 サイトカインを分泌することも確認した。またヒト iNKT 細胞を投与することで白血病モデルマウスの生存期間は延長した (図4)。このことから iNKT 細胞の CD1d 陰性腫瘍に対する *in vivo* 細胞傷害活性も示された。

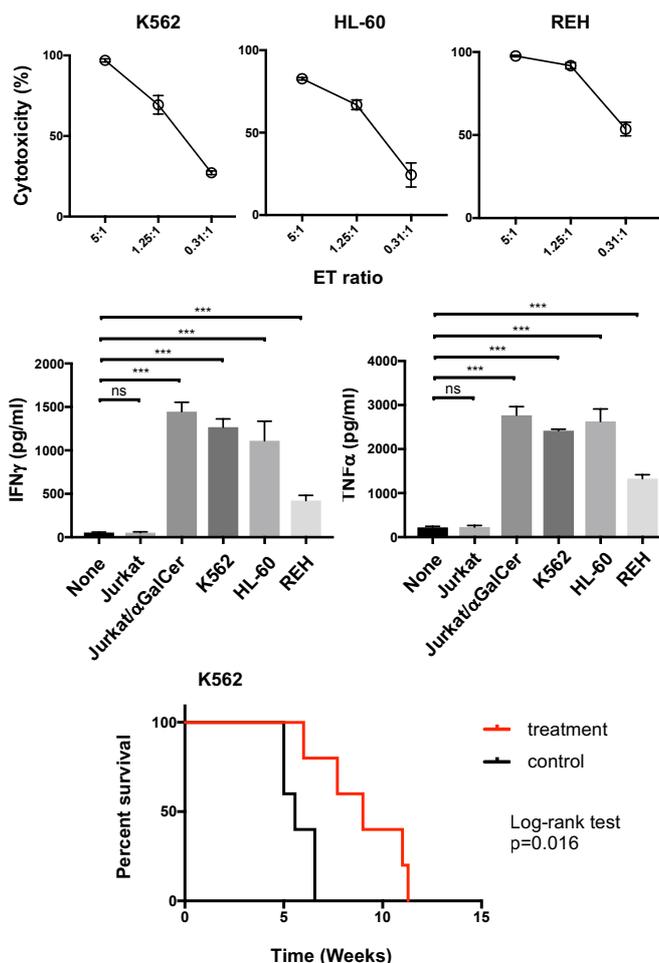


図4. iNKT細胞のCD1d陰性腫瘍に対する細胞傷害活性

- (3) iNKT 細胞における NK 受容体の発現と細胞傷害活性への関与
 iNKT 細胞表面には DNAM1, 2B4, LFA-1, CD2 が安定して発現していた (N=10)。NKG2D は発現しているドナーと非発現のドナーが存在した。これらの受容体をブロックした後に細胞傷害活性と IFN γ 産性能を評価したところ、いずれの阻害抗体によっても iNKT 細胞の細胞傷害活性と IFN γ 産性能は阻害された (図5)。このことから、iNKT 細胞におけるこれらの NK 受容体はその細胞傷害活性に寄与していることが明らかとなった。

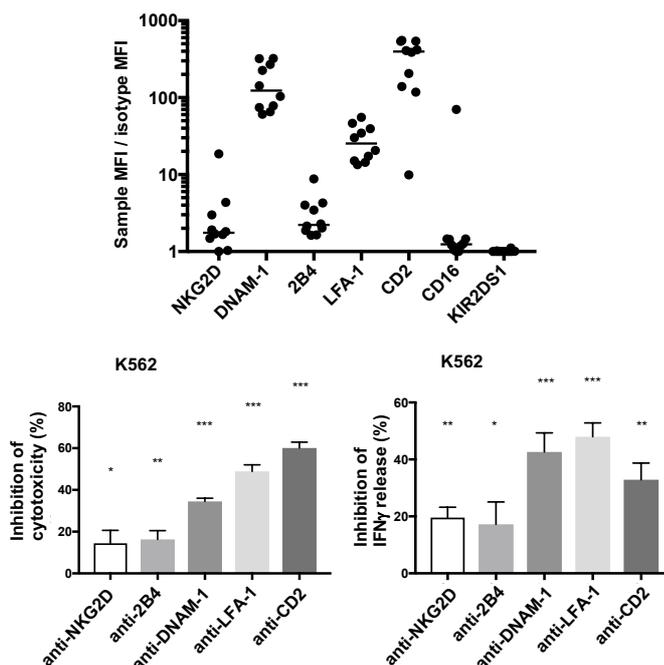


図5. iNKT細胞におけるNK受容体の発現と細胞傷害活性への関与

- (4) iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識における NK 受容体の関与
 iNKT 細胞の NKG2D, DNAM1, 2B4, LFA-1, CD2 をそれぞれ架橋し、単一受容体刺激を加えると、LFA-1, CD2 でのみ脱顆粒を示した。iNKT 細胞から LFA-1 を構成している CD11a と CD2 の遺伝子を KO したところ、脱顆粒は部分的に抑制されたが、KO 細胞においても CD1d 陰性細胞を認識していた (図 6)。このことからこれらの NK 受容体は共刺激分子としての役割を担っていると考えられ、iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識に中心的に関わっている NK 受容体は同定できなかった。

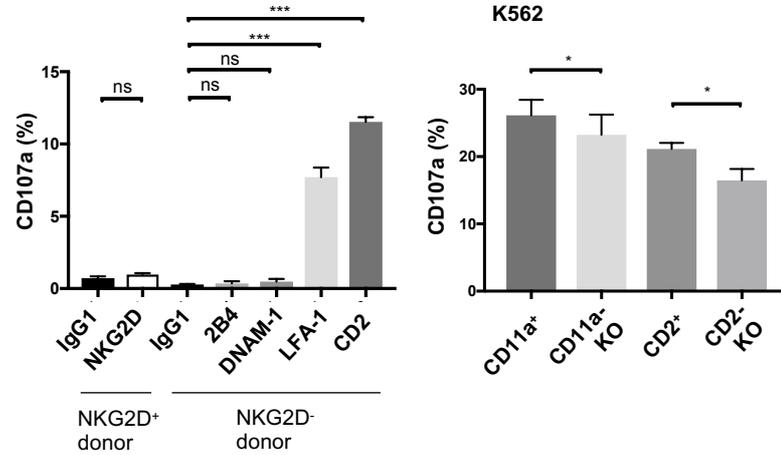


図6. iNKT細胞のCD1d非依存性腫瘍認識におけるNK受容体の関与

- (5) iNKT 細胞の CD1d 非依存性腫瘍認識における TCR の関与
 TCR-KO iNKT 細胞では V α 24 鎖は失われており、 α GalCer-loaded CD1d-tetramer との結合能は失われることを確認した。TCR-KO iNKT 細胞では CD1d 陰性白血病細胞に対する脱顆粒能、IFN γ 産性能は失われ、細胞傷害活性も低下した (図 7)。このことから iNKT 細胞は CD1d 非依存性腫瘍認識においても TCR に依存していることが明らかとなった。

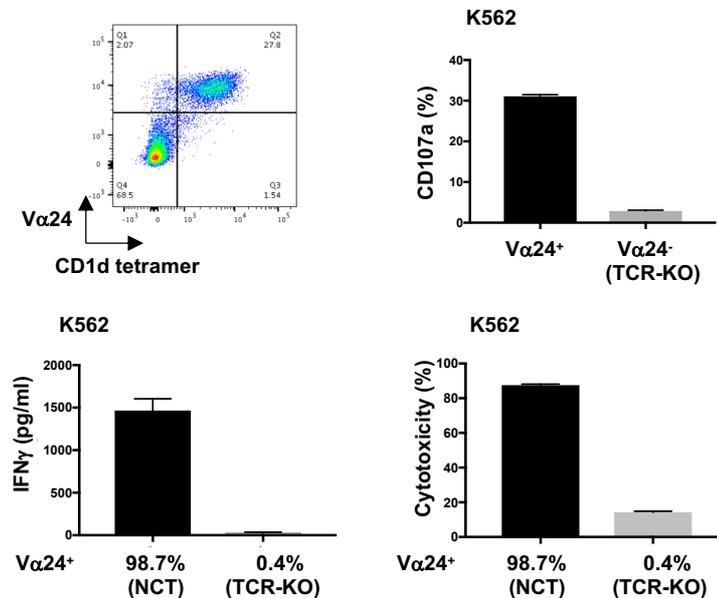


図7. iNKT細胞のCD1d非依存性腫瘍認識におけるTCRの関与

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahiro Aoki, Mariko Takami, Tomozumi Takatani, Kiwamu Motoyoshi, Ayana Ishii, Ayaka Hara, Takahide Toyoda, Reona Okada, Moeko Hino, Ryo Koyama-Nasu, Masahiro Kiuchi, Kiyoshi Hirahara, Motoko Y. Kimura, Toshinori Nakayama, Naoki Shimojo, Shinichiro Motohashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d-independent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14428	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 高見 真理子, 青木 孝浩, 本橋 新一郎	4. 巻 26
2. 論文標題 がん免疫におけるNK/NKT細胞の意義とその制御.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 炎症と免疫. 26: 157-161, 2018.	6. 最初と最後の頁 157-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahiro Aoki, Mariko Takami, Tomozumi Takatani, Kiwamu Motoyoshi, Ayana Ishii, Ayaka Hara, Takahide Toyoda, Reona Okada, Moeko Hino, Ryo Koyama-Nasu, Masahiro Kiuchi, Kiyoshi Hirahara, Toshinori Nakayama, Naoki Shimojo, Shinichiro Motohashi
2. 発表標題 Invariant NKT Cells Recognize Leukemia Cells with T-Cell and NK Receptors in a CD1d-Independent Manner.
3. 学会等名 The 61th ASH annual meeting and exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Takahiro Aoki, Mariko Takami, Tomozumi Takatani, Kiwamu Motoyoshi, Ayana Ishii, Reona Okada, Moeko Hino, Naoki Shimojo, Shinichiro Motohashi
2. 発表標題 Invariant NKT cells target CD1d-negative leukemia cells with TCR and NK receptors.
3. 学会等名 EMBO Workshop - CD1-MR1 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Takahiro Aoki, Mariko Takami, Tomozumi Takatani, Kiwamu Motoyoshi, Ayana Ishii, Reona Okada, Moeko Hino, Naoki Shimojo, Shinichiro Motohashi
2. 発表標題 Invariant NKT cells recognize leukemia cells in a CD1d independent manner.
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----