

令和 2 年 4 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16274

研究課題名(和文) 神経芽腫のがん微小環境における免疫抑制解除を目指したNKT細胞免疫療法の開発研究

研究課題名(英文) Development of iNKT cell-based immunotherapy targeting neuroblastoma by canceling the immunosuppression in the tumor microenvironment

研究代表者

原田 和明 (Harada, Kazuaki)

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00748767

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)：本研究では、神経芽腫が有する抗腫瘍免疫に対する抑制効果の作用機序解明を目的とした。神経芽腫細胞株(NLF、GOTO)の培養上清を加えて誘導した単球由来樹状細胞では、本来発現が消失するCD14の発現持続と、発現が亢進するCD1aの発現低下、細胞性免疫を誘導するIL-12の産生低下を認めた。さらに、この培養系にて誘導した樹状細胞を用いたNKT細胞の刺激にて、IFN- γ 産生の低下を認めることを示した。これらの結果から、神経芽腫における腫瘍微小環境において、樹状細胞の機能抑制を介した同様の免疫抑制が存在す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

がん細胞によって産生される免疫抑制性可溶性因子によって、免疫寛容誘導性樹状細胞(tolerogenic DC)が腫瘍微小環境で誘導されることが、複数のがん種において報告されている。本研究により、神経芽腫細胞株の培養上清に含まれる可溶性因子が、tolerogenic DCを誘導し、NKT細胞活性化能を低下させることが示され、神経芽腫による抗腫瘍免疫に対する免疫抑制機序の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We sought to determine the mechanism by which neuroblastoma inhibits antitumor immunity. When the culture supernatants from neuroblastoma cell lines (NLF, GOTO) were added monocyte derived dendritic cell (moDC) culture, cells retained CD14 with lower CD1a expression and produced much less IL-12 compared to control moDCs. Furthermore, IFN- γ production was reduced by iNKT cells stimulated with dendritic cells induced by the addition of culture supernatants from neuroblastoma cell lines.

These results suggested that immunosuppression via dendritic cell dysfunction may also exist in the tumor microenvironment in neuroblastoma.

研究分野：小児がん

キーワード：樹状細胞 NKT細胞 神経芽腫 腫瘍免疫

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経芽腫の治療成績は、手術、化学療法、放射線療法による集学的治療の進歩により向上しているものの、進行神経芽腫では長期生存率が未だ 50% 未満に留まっていること、また強力な集学的治療による二次がんの発生など、治療に関連する副作用も大きな問題となっている。自家造血幹細胞移植併用大量化学療法も含めた強力な治療が行われると、一旦は寛解が得られるものの、再発という転帰をたどることが少なくないことから、神経芽腫の治療成績向上のため、再発抑制を目的として新規治療が求められている。一方で、神経芽腫の中には自然寛解が認められる症例が存在することが古くから知られており、その作用機序には免疫系が介在することが推測されている。

(2) 自然免疫系に属するリンパ球である NKT 細胞は、特異的なリガンドである α ガラクトシルセラミド (α GalCer) により活性化し、強力な細胞傷害活性を示すとともに、自然免疫系と獲得免疫系を橋渡しして免疫系全体を賦活し抗腫瘍効果を発揮する。この NKT 細胞を標的とした免疫細胞療法の開発研究として、当施設では成人の癌種である原発性肺癌を対象として臨床研究を実施し、その安全性とともに定量的 NKT 細胞特異的免疫反応の検出と、免疫反応と関連した全生存期間の延長を報告している。

(3) 近年、新規のがん免疫療法としてがん微小環境における免疫抑制機構を標的とした治療法の開発が進んでいる。一方、がん細胞によって産生される免疫抑制性可溶性因子を介した抗腫瘍免疫の抑制応答に関する報告はあるものの、未だその制御によるがん治療は困難であり、新規治療法開発には結びついていない。実験的には、*in vitro* での単球から樹状細胞への分化誘導系に腫瘍細胞株の培養上清を加えることで、免疫寛容誘導性樹状細胞 (tolerogenic DC) が誘導されることが複数報告されているが、神経芽腫における tolerogenic DC 誘導の可能性や、活性化 NKT 細胞が腫瘍産生可溶性因子やそれによって誘導される免疫抑制状態に及ぼす影響については報告が無く、未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では神経芽腫腫瘍環境における免疫抑制機構を解明することを目的として、神経芽腫細胞による樹状細胞への抑制効果の検討、神経芽腫細胞が放出する可溶性因子の解析をおこなった。さらに、神経芽腫における免疫抑制状態の打破を目指した NKT 細胞免疫療法有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経芽腫細胞による樹状細胞への抑制効果を検討するため、単球を IL-4、GM-CSF を用いて樹状細胞へと分化させる培養系に、神経芽腫細胞株 (NLF、GOTO、SH-SY5Y) の培養上清を加え、樹状細胞上の表面分子の発現と成熟刺激時のサイトカイン産生 (IL-12、TNF- α) を測定し、神経芽腫細胞株の培養上清を加えていない樹状細胞との違いを比較した。また、神経芽腫細胞株の培養上清を加えて分化させた樹状細胞による NKT 細胞の活性化能を、NKT 細胞から産生される IFN- γ や IL-2 などのサイトカインを測定し比較した。

(2) IL-10 や TGF- β 1 などの抑制性サイトカイン、IL-6 や IL-1 β などの炎症性サイトカインによって、tolerogenic DC が誘導されることが報告されており、神経芽腫細胞株の培養上清に、これらのサイトカインが含まれるか解析した。

(3) 神経芽腫細胞株の培養上清に含まれる可溶性因子によって単球由来樹状細胞の分化が阻害されるメカニズム解析のため、RNA-Sequence を用いた網羅的遺伝子発現解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) 単球由来樹状細胞の培養系 1 日目に神経芽腫細胞株の培養上清 (NLF-sup、GOTO-sup、SH-SY5Y-sup) を加え、培養 6 日目に OK-432 による成熟刺激を加え、培養 7 日目における樹状細胞の表面抗原発現、サイトカイン産生能を測定した。単球由来樹状細胞の分化誘導系に NLF-sup、GOTO-sup を添加すると、本来発現が消失する CD14 分子の発現持続と、発現が亢進する CD1a 分子の発現抑制が認められた。また、樹状細胞上の活性化補助シグナル分子 CD40、CD83、CD86 の発現低下を認め、抑制性補助シグナル分子 PD-L1 の発現上昇を認めた。さらに、成熟化刺激を受けた樹状細胞による IL-12、TNF- α 産生能が劇的に低下した。一方、SH-SY5Y-sup では抑制効果が認められなかった。

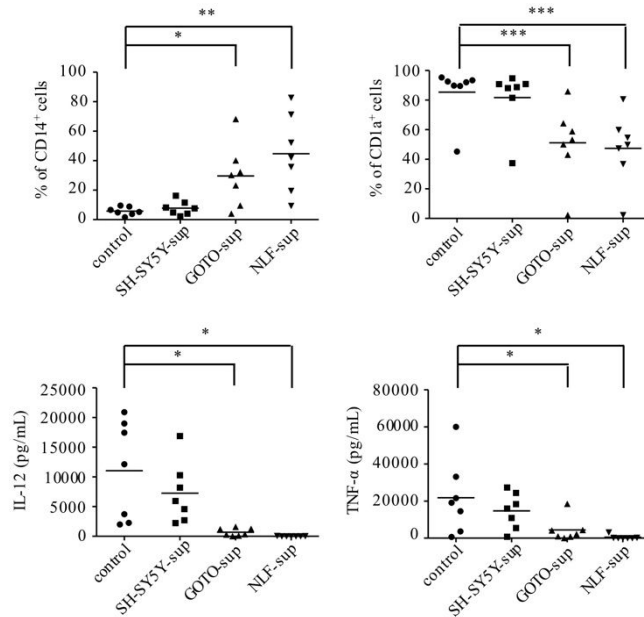


図1 神経芽腫細胞株の培養上清を加えた単球由来樹状細胞の成熟刺激後の表面抗原（上段）とサイトカイン産生（下段）の比較

続いて、本培養系にて誘導した α GalCer パルス樹状細胞による NKT 細胞刺激後の IFN- γ 産生量を比較すると、NLF-sup 添加樹状細胞にて減少した。今までの実験から NLF-sup 添加樹状細胞では IL-12 の産生能が低下しているため、IL-12 によって樹状細胞の NKT 細胞活性化能が回復するかどうか検討した。NKT 細胞を α GalCer パルス樹状細胞で刺激させる際に IL-12 を添加すると、NKT 細胞から産生される IFN- γ の量は control の樹状細胞と同等まで上昇した。

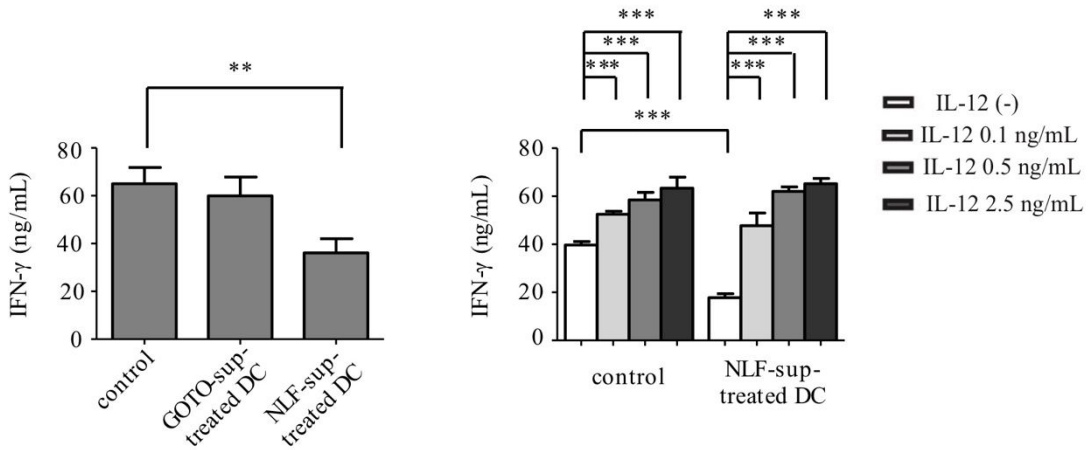


図2（左） α GalCer パルス樹状細胞による NKT 細胞刺激後の IFN- γ 産生の比較
（右）NKT 細胞刺激時に IL-12 添加した条件での IFN- γ 産生の比較

(2) 次に、神経芽腫細胞株の培養上清に含まれる抑制因子の解析のために、上清中に含まれる炎症性サイトカイン(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)と抑制性サイトカイン(IL-10、TGF- β 1、VEGF)について測定したが、VEGF 以外は検出感度以下であった。VEGF に関しては、SH-SY5Y-sup にも含まれていたため、VEGF 単独の関与は否定的と考えた。一方、単球由来樹状細胞の培養開始 24 時間後の上清に含まれるサイトカインの測定では、NLF-sup と GOTO-sup を添加した系で IL-6 と IL-10 の上昇が認められた。IL-6、IL-10 は神経芽腫培養株の培養上清には含まれていないため、単球から産生されたサイトカインと考えられた。

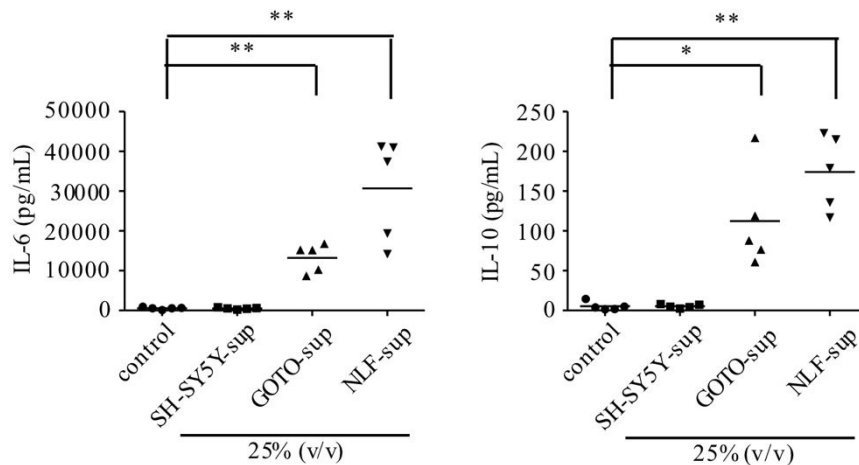


図3 単球由来樹状細胞の培養 24 時間後のサイトカイン産生量

(3) RNA-Sequence を用いた網羅的遺伝子発現解析について

続いて、神経芽腫細胞株から分泌される可溶性因子による単球由来樹状細胞の分化阻害メカニズムを解明するために、RNA-sequence を用いた網羅的遺伝子発現解析をおこなった。神経芽腫細胞株の培養上清を添加し誘導した樹状細胞と、コントロールとして培養上清無添にて誘導した樹状細胞における、それぞれの遺伝子発現量を比較した。さらに、樹状細胞の機能を抑制する神経芽腫細胞株群と抑制しない細胞株群の網羅的遺伝子発現解析をおこない、抑制する腫瘍細胞株群で特異的に発現する 32 種類の遺伝子を特定した。

(4) 以上の結果より、神経芽腫における腫瘍微小環境では、樹状細胞の機能が抑制され、NKT 細胞免疫系による抗腫瘍免疫応答が阻害されている可能性が示唆された。そのメカニズムとして、神経芽腫由来の可溶性因子によって単球から誘導された IL-6、IL-10 が関与している可能性が示唆された。今後は、RNA-sequence の結果から同定された遺伝子をノックアウトした神経芽腫細胞株を作成し、抗腫瘍免疫抑制に関わる遺伝子をさらに特定していく予定である。

< 引用文献 >

1. Motohashi S, Ishikawa A, Ishikawa E, et al. A phase I study of *in vitro* expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(20 Pt 1): 6079-6086.
2. Motohashi S, Nagato K, Kunii N, et al. A phase I-II study of α -galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J Immunol.* 2009; 182: 2492-2501.
3. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7: 610-621.
4. Motta JM, Sperandio A, Castelo-Branco MT, et al. Induction of suppressive phenotype in monocyte-derived dendritic cells by leukemic cell products and IL-1 β . *Hum Immunol* 2014; 75: 641-649.
5. Zong J, Keskinov AA, Shurin G, et al. Tumor-derived factors modulating dendritic cell function. *Cancer Immunol Immunother* 2016; 65: 821-833.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Harada Kazuaki, Ihara Fumie, Takami Mariko, Kamata Toshiko, Mise Naoko, Yoshizawa Hiroko, Hishiki Tomoro, Saito Takeshi, Terui Keita, Nakata Mitsuyuki, Komatsu Shugo, Ikeuchi Takayuki, Nakayama Toshinori, Yoshida Hideo, Motohashi Shinichiro	4. 巻 110
2. 論文標題 Soluble factors derived from neuroblastoma cell lines suppress dendritic cell differentiation and activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 888 ~ 902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13933	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原田和明
2. 発表標題 神経芽腫細胞由来の液性因子による樹状細胞への抑制効果に関する研究
3. 学会等名 第56回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田和明
2. 発表標題 Soluble factors derived from neuroblastoma cell lines suppress dendritic cell differentiation and activation
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉澤比呂子
2. 発表標題 Soluble factors derived from neuroblastoma cell lines suppress dendritic cell differentiation and activation
3. 学会等名 EMBO workshop, CD1-MR1: Beyond MHC-restricted lymphocytes (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	本橋 新一郎 (Motohashi Shinichiro) (60345022)	千葉大学大学院医学研究院・免疫細胞医学・教授 (12501)	
研究協力者	吉澤 比呂子 (Yoshizawa Hiroko) (60814746)	千葉大学大学院医学研究院・小児外科学・医員 (12501)	