

令和 2 年 6 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：18K16409

研究課題名（和文）肺癌治療に向けたNKT細胞免疫療法におけるAhRシグナルの作用機構の解明

研究課題名（英文）A role of AhR signaling in NKT 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、肺癌に対するNKT細胞療法の有効性の向上のため、新たな併用免疫療法を確立することを目的とした。当初は、AhRシグナルが樹状細胞上のPD-1/PD-L2の発現を抑制することでNKT細胞の活性化能が増強するという仮説に基づき実験を進めてきたが、マウス皮下腫瘍モデルにおいては、NKT細胞療法に、逆にAhRアンタゴニスト投与を併用することで抗腫瘍効果が増強されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究施設では、NKT細胞を用いた癌免疫療法の臨床応用として、 $\alpha$ -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臨床試験を実施し一定の患者における全生存期間の延長が認められるなどの効果を上げてきた。本研究は、肺癌に対するNKT細胞療法の有効性の向上のため新たな併用免疫療法の開発を目的とした。AhRシグナルに着目し、AhRアンタゴニスト投与とNKT細胞療法の併用という新規治療法の可能性を、マウス腫瘍モデルを用いて示唆したことから学術的、社会的に意義のある成果を上げたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To improve our current iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer, I sought to develop the combination therapy of iNKT cell-based immunotherapy using aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling. I initially focused on the fact that AhR signaling downregulated PD-L1/PD-L2 expression on monocyte-derived dendritic cells and enhanced antitumor activity of iNKT cells. However, the effect of iNKT cell-based immunotherapy was enhanced by adding AhR antagonist instead of AhR agonist in the CT26 s.c. mouse model in vivo. Furthermore, IFN- $\gamma$  producing cells in CD8+ T cells was increased. These data suggest that the combination of AhR antagonist and iNKT cell-based immunotherapy can be a better treatment option for cancer patients than the current iNKT cell-based immunotherapy.

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

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌は、罹患率・死亡率ともに高い難治性癌の一つであり、2017年の罹患者数は13万人、死亡者数は7万8千人に上ると推定されている。さらに高齢者に好発するため、超高齢社会を迎える日本における罹患者数は増加の一途をたどっており、新規治療法の開発は喫緊の課題である。近年、そのような背景の中で、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、免疫療法は高い注目を集めている。

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、 $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -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細胞や細胞傷害性CD8<sup>+</sup>T細胞といった他の細胞群を活性化する役割も果たし、直接的及び間接的に強力な抗腫瘍活性を誘導する。

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、 $\alpha$ -GalCerをパルスした樹状細胞の投与により *in vivo* でNKT細胞を活性化させ、抗腫瘍効果を引き上げることを目的とした臨床試験を行っている。

本治療を受けた患者のうち、NKT細胞によるIFN- $\gamma$ 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、IFN- $\gamma$ などのサイトカインの産生量を増加させることが、次世代NKT細胞療法の開発をする上での課題であると考えられる。

そこでNKT細胞をより活性化させるために、免疫チェックポイントの1つである **programmed death 1(PD-1)** シグナルに着目した一連の実験を行なったところ、以下の事実が明らかとなった。

- 活性化されたNKT細胞はPD-1受容体を発現し、抗PD-L1抗体を用いてPD-1シグナルを抑制するとIFN- $\gamma$ の産生量が増加した(Kamata et al. *Cancer Immunol Immunother* 2016)。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を誘導することが明らかとなった。
- 単球由来の樹状細胞を誘導する際に、Aryl hydrocarbon receptor (AhR)のリガンドである FICZを添加すると、PD-ligand 1 (PD-L1)及びPD-ligand 2 (PD-L2)の発現が顕著に減少することが示された。
- AhRリガンドであるFICZを添加し誘導した単球由来樹状細胞を用いてNKT細胞を活性化すると、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ などのサイトカインの産生量が増加したことから、NKT細胞療法の改善につながる事が予想される。
- AhRは、多岐にわたる細胞で普遍的に発現しており、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して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、毒性のダイオキシンの他、トリプトファン代謝産物やブロッコリー・キャベツなどの野菜に含まれる成分も含まれる。AhRシグナルが細胞の癌化を促進するという報告がある一方で、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。免疫システムにおけるAhRは、CD4<sup>+</sup>T細胞のiTreg・Th17・Th22への分化、または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細胞療法におけるAhRの役割は明らかにされていない。

以上のことから、下記の仮説を解明すべき学術的「問い」と位置付ける本研究の着想に至った。

仮説: AhRシグナルが、樹状細胞上のPD-L1/PD-L2の発現を抑制することにより免疫チェックポイント機構を解除し、NKT細胞の抗腫瘍効果を増強させる

## 2. 研究の目的

本研究は、次世代NKT細胞療法の開発を目的とし、現行のNKT細胞療法とAhRリガンド投与の併用療法について検討する。さらに上記の仮説を検討するため、本研究では AhRシグナルが樹状細胞に与える影響と、それがNKT細胞活性化を増強させるメカニズムについて解析する。

## 3. 研究の方法

### ① 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

健康人末梢血より単球を分離し、FICZを添加して分化誘導した樹状細胞上のPD-L1・PD-L2の

経時的な発現変化を、フローサイトメトリーにより検証する。また、AhR による PD-L1・PD-L2 の発現調節が、転写レベルもしくはタンパクレベルなのかを確認するために、定量 PCR にて定量した。

## ② AhR シグナルによる樹状細胞上の PD-L1/PD-L2 の発現調節関連遺伝子の網羅的解析

AhR シグナルが PD-L1/PD-L2 の発現を転写レベルで調節するメカニズムを明らかにするために、RNA シークエンシングを用いた網羅的解析により AhR のリガンドを添加し作成した樹状細胞の遺伝子発現パターンをコントロールの DMSO を添加し誘導した樹状細胞と比較検討した。

## ③ AhR のリガンドを用いた新規併用免疫療法の有効性及びエビデンスの構築

AhR リガンドを用いた新規併用免疫療法の有効性のエビデンスを構築するために、Balb/C マウス CT26 細胞皮下腫瘍モデルを用いて NKT 細胞療法を再現した。マウス骨髄細胞に GM-CSF を添加し分化誘導した $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞を皮下腫瘍マウスモデルに尾静脈投与した。尾静脈投与の前日にあらかじめ、AhR リガンドもしくは AhR アンタゴニストを腹腔内投与し、AhR シグナルが NKT 細胞の抗腫瘍活性にどう影響するかを評価した。具体的には経時的に腫瘍サイズを測定した。さらに AhR シグナルの NKT 細胞療法への影響を確認するために、樹状細胞投与後の NKT 細胞の活性化マーカーの発現、IFN- $\gamma$  の産生量及び細胞傷害性 T 細胞の活性化マーカーの発現、IFN- $\gamma$  の産生量、制御性 T 細胞の割合の変化をフローサイトメトリーにより解析した。研究計画調査では、NOG マウス肺癌モデルに、ヒト NKT 細胞を投与する条件下にて AhR リガンドの効果を確かめる予定であったが、 $\alpha$ -GalCer パルスマウス樹状細胞を投与するマウス皮下腫瘍モデルに変更した。

## 4. 研究成果

本研究は、肺癌に対する NKT 細胞療法の有効性の向上のため、新たな併用免疫療法を確立することを目的とし下記の項目に取り組んだ。

### ① 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

単球の樹状細胞培養条件に AhR リガンドである FICZ を添加すると分化した樹状細胞の PD-L1、PD-L2 の発現が減少した。発現調節が転写レベルによるものなのかを確認するためにリアルタイム PCR を行ったところ、mRNA レベルで発現量の差が確認されたことから AhR シグナルによる PD-L1、PD-L2 の発現抑制は転写レベルで調節されていることを明らかにした。

### ② AhR シグナルによる樹状細胞上の PD-L1/PD-L2 の発現調節関連遺伝子の網羅的解析

RNA シークエンシングの結果から AhR リガンドである FICZ を添加し作成した樹状細胞では、複数の遺伝子発現がコントロール樹状細胞と異なることが明らかになった。それらの中から、候補遺伝子を絞り込んだものの、いずれも PD-L1、PD-L2 の発現調節に関連付けるには至らなかった。

### ③ AhR のリガンドを用いた新規併用免疫療法の有効性及びエビデンスの構築

AhR シグナルが NKT 細胞療法においてどのように作用するかを検討するために、CT26 皮下腫瘍モデルマウスに $\alpha$ -GalCer パルス樹状細胞を尾静脈投与し、並行して AhR リガンドである FICZ または AhR アンタゴニストである CH223191 を腹腔内投与した。FICZ を投与することにより樹状細胞が NKT 細胞をより活性化させ強力な腫瘍効果を発揮するという仮説とは異なり、FICZ を投与した群においても NKT 細胞療法の治療効果の増強は認められなかった。一方で、CH223191 を投与した群においては、腫瘍の増殖が顕著に抑制された (図 1)。さらに、CH223191 を投与した群では、CD8<sup>+</sup>T 細胞による IFN- $\gamma$  産生が増加することが明らかになった (図 2)。以上から、AhR アンタゴニストの投与と NKT 細胞療法による併用療法の可能性が示唆された。AhR アンタゴニストとしてポリフェノールの成分であるレスベラトロールなどの天然成分も知られている。今後は、より安全性の高いレスベラトロールと NKT 細胞療法の併用による抗腫瘍効果の増強効果を検討し、AhR シグナルと NKT 細胞療法の関係について作用機序の解析を進める必要がある。

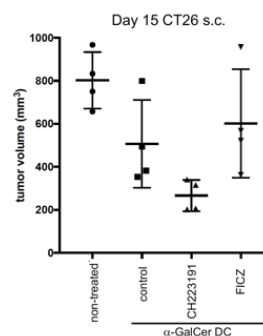


図1 CT26 マウス皮下腫瘍モデルにおける AhR リガンド、AhR アンタゴニスト投与と NKT 細胞療法の併用

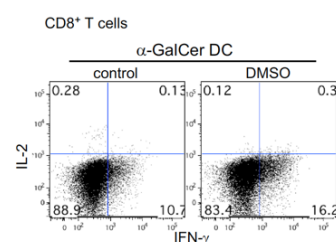


図2 AhR リガンド、AhR アンタゴニスト投与と NKT 細胞療法下での CD8<sup>+</sup>T 細胞による IFN- $\gamma$  産生能

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Toyoda, T., Kamata, T., Tanaka, K., Ihara, F., Takami, M., Suzuki, H., Nakajima, T., Ikeuchi, T., Kawasaki, Y., Hanaoka, H., Nakayama, T., Yoshino, I., and Motohashi, S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Phase II study of $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Immunother. Cancer	6. 最初と最後の頁 e000316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jitc-2019-000316	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 Kamata, T., Yoshida, S., Takami, M., Ihara, F., Yoshizawa, H., Toyoda, T., Takeshita, Y., Nobuyama, S., Kanetsuna, Y., Sato, T., Yoshino, I., and Motohashi, S.	4. 巻 111
2. 論文標題 Immunological Features of a Lung Cancer Patient Achieving an Objective Response with Anti-PD-1 Blockade Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 288-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14222	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 Ihara, F., Sakurai, D., Takami, M., Kamata, T., Kunii, N., Yamasaki, K., Iinuma, T., Nakayama, T., Motohashi, S., and Okamoto, Y.	4. 巻 68
2. 論文標題 Regulatory T cells induce CD4 <sup>+</sup> NKT cell anergy and suppress NKT cell cytotoxic function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Immunol. Immunother.	6. 最初と最後の頁 1935-1947
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-019-02417-6	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 Harada, K., Ihara, F., Takami, M., Kamata, T., Mise, N., Yoshizawa, H., Hishiki, T., Saito, T., Terui, K., Nakata, M., Komatsu, S., Ikeuchi, T., Nakayama, T., Yoshida, H., Motohashi, S.	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 Sci.	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 -

1. 著者名 Takami, M., Cunha, C., Motohashi, S., Nakayama, T., Iwashima, M.	4. 巻 48
2. 論文標題 TGF- $\beta$ suppresses RasGRP1 expression and supports regulatory T cells resistance against p53-induced CD28-dependent T cell apoptosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur. J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1938-1943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.201847587	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Tanaka, T., Kanesaka, Y., Takami, M., Suzuki, A., Hosokawa, H., Onodera, A., Kamata, T., Nagato, K., Nakayama, T., Yoshino, I., Motohashi, S.	4. 巻 506
2. 論文標題 Role of Leukotriene B4 12-Hydroxydehydrogenase in $\alpha$ -Galactosylceramide-Pulsed Dendritic Cell Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 27-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.10.048	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Takami, M., Ihara, F., Motohashi, S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Clinical Application of iNKT Cell-mediated Anti-tumor Activity Against Lung Cancer and Head and Neck Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 2021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.02021	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 原彩佳, 那須亮, 高見真理子, 小林正芳, 廣野誠一郎, 松谷智郎, 中山俊憲, 本橋新一郎, 岩立康男
2. 発表標題 膠芽腫に発現するCD1d分子はNKT細胞を用いた免疫療法における有望な標的となる
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara, A., Nasu, R., Takami, M., Hirono, S., Matsutani, T., Nakayama, T., Iwadate, Y., Motohashi, S.
2. 発表標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell- based cancer immunotherapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hara, A., Nasu, R., Takami, M., Hirono, S., Matsutani, T., Nakayama, T., Iwadate, Y., Motohashi, S.
2. 発表標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell- based cancer immunotherapy
3. 学会等名 EMBO workshop CD1-MR1 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aoki, T., Takami, M., Takatani, T., Motoyoshi, K., Ishii, A., Hara, A., Hino, M., Shimojo, N., Motohashi, S.
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

1. 発表者名 Yoshizawa, H., Harada, K., Ishii, A., Mise, N., Hishiki, T., Saito, K., Nakata, M., Komatsu, S., Nakayama, T., Yoshida, H., Takami, M., Motohashi, S.
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 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takami, M., Ihara, F., Ishii, A., Motohashi, S.
2. 発表標題 NK cells enhance the anti-tumor activity of NKT cells
3. 学会等名 EMBO workshop CD1-MR1 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木 孝浩, 高見 真理子, 高谷 具純, 本吉 究, 石井 絢菜, 岡田 玲緒奈, 日野 もえ子, 下条 直樹, 本橋 新一郎
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

1. 発表者名 原 彩佳, 那須 亮, 高見 真理子, 廣野 誠一郎, 松谷 智郎, 中山 俊憲, 岩立 康男, 本橋 新一郎
2. 発表標題 膠芽腫に発現するCD1d分子はNKT細胞を用いた免疫療法における有望な標的となる
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 Takami, M., Cunha, C., Iwashima, M.
2. 発表標題 Reduced RasGRP1 expression supports survival of regulatory T cells under continuous TCR stimulation
3. 学会等名 Cold Spring Harbor meeting on Gene Expression & Signaling in the Immune System (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motohashi, S., Kamata, T., Toyoda, T., Tanaka, T., Ihara, F., Takami, M., Yosino, I., Nakayama, T.
2. 発表標題 Phase II study of $\alpha$ -Galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells for advanced or recurrent non-small cell lung cancer
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----