

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19591609  
 研究課題名（和文）原発性肺癌に対する NKT 細胞免疫系を用いた免疫細胞療法に関する研究  
 研究課題名（英文）NKT cell-based immunotherapy for lung cancer  
 研究代表者  
 氏名（ローマ字）：本橋 新一郎（MOTOHASHI SHINICHIRO）  
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
 研究者番号：60345022

## 研究成果の概要：

*In vivo* での NKT 細胞活性化を目的とした $\alpha$ ガラクトシルセラミドパルス樹状細胞(DC)療法後の腫瘍局所における NKT 細胞免疫系を解析した結果、DC 投与により活性化した NKT 細胞の腫瘍への浸潤が明らかに増強していることが判明した。さらに NKT 細胞免疫療法施行症例の末梢血を用いて cDNA microarray による遺伝子発現解析を行い、免疫反応の増強が認められた症例に特異的な複数の遺伝子発現変化を認めた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：NKT 細胞・免疫細胞療法・肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

我々の施設において、 $\alpha$ ガラクトシルセラミド( $\alpha$ GalCer)が NKT 細胞に特異的なリガンドであることが発見された (Kawano et al. Science 1997)。NKT 細胞は、種属に種類しかない MHC 様分子である CD1d に抗原提示された糖脂質を、NKT 細胞の唯一の  $V\alpha 24$  抗原受容体で認識するきわめて単純な全てのヒトに共通の免疫系で、強力な抗腫瘍作用を

示す(Kawano et al. Cancer Res 1999)。活性化した NKT 細胞は直接的な細胞傷害活性を示すのみならず、NK 細胞や細胞傷害性  $CD8^+T$  細胞といった自然免疫系、獲得免疫系双方を橋渡しして活性化する役割を果たし、抗腫瘍活性を示すと考えられる。これらの研究結果から NKT 細胞のもつがん転移の抑制能を利用した免疫細胞治療法の開発に関する研究を行っている。現在までに、肺癌再発例なら

びに進行期肺癌症例を対象として、内在性 NKT 細胞の活性化を目指す  $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞(DC)投与および活性化 NKT 細胞投与 (phase I 相当臨床研究) を施行し、その安全性につき検証してきた(Ishikawa et al. Clin Cancer Res 2005, Motohashi et al. Clin Cancer Res 2006)。現在は  $\alpha$ GalCer パルス DC 投与の Phase I-II 試験として 17 症例を終え、その安全性の確認とともに、定量的モニタリングによる NKT 細胞免疫系の機能増強ならびに生存期間の延長を認めた。自然免疫系及び獲得免疫系共に活性化することが可能な NKT 細胞免疫療法の開発ができれば、がん治療の研究領域に貢献できると考え、NKT 細胞免疫療法の抗腫瘍効果発揮メカニズムについて解析を進めている。

## 2. 研究の目的

原発性肺癌進行期に対する NKT 細胞免疫療法における免疫反応の解析は、唯一繰り返し採取が可能な末梢血で行い、 $\alpha$ GalCer パルス DC 投与に伴う末梢血 NKT 細胞の有意な変化を認めた症例が存在した。しかし、実際に腫瘍が拒絶されると我々が想定している肺組織における NKT 細胞免疫系の機能解析の報告は現在までになく、またその方法論もいまだ確立したものは存在していない。気管支喘息の研究では、気管支肺胞洗浄液中の解析にて認められる  $CD4^+$  T 細胞のほとんどは NKT 細胞であり、この NKT 細胞の Th2 タイプへの明らかな偏位が認められることが報告されているが (Akbari et al. N Engl J Med 2006)、担癌状態で肺組織中の NKT 細胞に関しては全く不明である。本研究では、1) 肺局所での NKT 細胞免疫系の新規評価系の確立を目指し、原発性肺癌切除標本を用いて癌組織、正常肺及び所属リンパ節での NKT 細胞免疫系の機能評価方法を確立し、 $\alpha$ GalCer パルス DC 療法による腫瘍局所での、NKT 細胞特異的免疫反応の解析を進めることを目指す。さらに 2) 免疫療法を行った患者のうち、現在までに数例の長期安定生存例が存在するが、この長期生存例の血液を用いてマイクロアレイ解析を行い、免疫細胞療法効果判定につながる新規バイオマーカーの発見を目指すことを目的とする。これは、免疫療法の症例選択のための非常に良い適応基準の開発にもつながり、効果が期待できる症例をあらかじめ選択することが可能となる。

## 3. 研究の方法

### (1) 原発性肺癌切除症例での切除肺を用いた肺内 NKT 細胞数測定及び機能解析の検討

原発性肺癌の最も多い切除形式は、肺葉切除である。つまり腫瘍が発生した肺葉ごと切除するため、正常肺も同時に切除される。また片肺全摘や二葉切除などでは、ほとんど癌が含まれない肺葉も切除される。この腫瘍部位及び正常肺組織部位での NKT 細胞を効率よく分離する方法を検討し、分離された肺内 NKT 細胞の表面マーカーによる性質の違いや、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) やインターロイキン 4 (IL-4) などのサイトカイン産生能を中心に解析を行う。また、NKT 細胞を分離する際に同時に採取される単核球の解析を行い、NKT 細胞活性化による NK 細胞、 $CD8^+$  T 細胞への作用も検討する。

採取されたサンプルの一部は分子生物学的アプローチにて解析を行い、NKT 細胞活性化やサイトカイン産生プロファイルなどを検討する。

### (2) 進行期肺癌患者で免疫細胞治療を行った後、長期生存が得られている症例からは、腫瘍の増殖を抑えるメカニズム解明の可能性がある。すなわち、NKT 細胞特異的免疫反応が得られ長期生存している症例の末梢血単核球の mRNA を抽出し、免疫細胞治療前後で有意に変動している遺伝子を cDNA マイクロアレイにて解析し、統計学的手法を用いて遺伝子を選別する。NKT 細胞特異的免疫反応が得られず、予後不良であった症例と比較することで遺伝子の同定を行う。マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行わなかった $\alpha$ GalCer パルス DC 投与後の症例の末梢血単核球からの mRNA を用いて、real-time PCR により候補遺伝子を検証する。

## 4. 研究成果

### (1) 肺癌術前 $\alpha$ GalCer パルス DC 投与後の切除肺組織での解析

まず腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の比重分離による分離方法を確立した。その方法を用いて TIL、非担癌正常肺組織、所属リンパ節における  $V\alpha 24^+V\beta 11^+$  NKT 細胞数を FACS にて解析したところ、切除組織では

TIL 中に最も多くの NKT 細胞の集積を認めた。また $\alpha$ GalCer パルス DC 投与群と非投与群とを比較すると、 $\alpha$ GalCer パルス DC 投与群の TIL 中において最も著明な増加を認めた。この TIL における細胞浸潤は NKT 細胞特異的で、CD3<sup>+</sup> T 細胞の集積には変化を認めなかった。さらに各組織中から mRNA を抽出し、NKT 細胞特異的 T 細胞抗原受容体遺伝子である V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 遺伝子および T 細胞抗原受容体共通の遺伝子である C $\alpha$  遺伝子の mRNA 発現レベルを real-time PCR にて検討すると、FACS の結果と同様に、TIL における NKT 細胞特異的遺伝子の発現が最も高いという結果が得られた。

次いで、切除組織中から抽出した単核球を *in vitro* で $\alpha$ GalCer にて再刺激した後の IFN- $\gamma$ 産生を ELISPOT 法を用いて定量化した。その結果、 $\alpha$ GalCer パルス DC 投与後の TIL において、最も高い IFN- $\gamma$ 産生能を認めた。ELISPOT 法による IL-4 産生の測定は検出限界以下であり、 $\alpha$ GalCer パルス DC 投与により、抗腫瘍効果に重要とされる Th1 タイプの免疫反応が誘導されていることが示唆された。

これらのことより、 $\alpha$ GalCer パルス樹状細胞の投与により、腫瘍に浸潤するリンパ球中に NKT 細胞が著明に動員され、腫瘍局所において Th1 タイプの免疫反応優位に活性化を引き起こし、抗腫瘍効果を発揮している可能性が示唆された。

さらに癌組織での免疫組織学的検討を行った。切除組織での NKT 細胞、CD4/8 T 細胞、CD56<sup>+</sup> NK 細胞、樹状細胞の浸潤を免疫組織学的に半定量化して評価を行い、腫瘍浸潤リンパ球中に、CD4/8 T 細胞が明らかに増強して認められる症例が存在することが判明した。

- (2)  $\alpha$ GalCer パルス DC 投与により IFN- $\gamma$ 産生増強を認め長期生存した症例、および IFN- $\gamma$ 産生増強を認めず予後不良であった症例の末梢血単核球の mRNA を抽出し、免疫細胞治療前後で有意に変動している遺伝子を cDNA マイクロアレイにて抽出した。現在までに $\alpha$ GalCer パルス DC 投与後の効果判定に有用なバイオマーカーとして複数の候補遺伝子が同定されている。

## 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 11 件 )

Kunii, N., Horiguchi, S., Motohashi, S., Yamamoto, H., Ueno, N., Yamamoto, S., Sakurai, D., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Okamoto, Y.: Combination therapy of *in vitro*-expanded natural killer T cells and  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci.* 2009, inpress, 査読有

Motohashi, S., and Nakayama, T.: Invariant natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Immunotherapy* 1:73-82, 2009, 査読有

Motohashi, S., and Nakayama, T.: Natural killer T cell-mediated immunotherapy for malignant diseases. *Frontiers in Bioscience* S1:108-116, 2009, 査読有

Motohashi, S., Nagato, K., Kunii, N., Yamamoto, H., Yamasaki, K., Okita, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Suzuki, M., Yoshino, I., Taniguchi, M., Fujisawa, T., and Nakayama, T.: A phase I-II study of  $\alpha$ -Galactosylceramide-pulsed IL-2/GM-CSF-cultured peripheral blood mononuclear cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *J. Immunol.* 182(4):2492-501, 2009, 査読有

Ito, T., Hasegawa, A., Hosokawa, H., Yamashita, M., Motohashi, S., Naka, T., Okamoto, Y., Fujita, Y., Ishii, Y., Taniguchi, M., Yano, I., and Nakayama, T.: Human Th1 differentiation induced by lipoarabinomannan/lipomannan from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo-172. *Int. Immunol.* 20(7):849-860, 2008, 査読有

Suzuki, M., Mohamed, S., Nakajima, T., Kubo, R., Tian, L., Fujiwara, T., Suzuki, H., Nagato, K., Chiyo, M., Motohashi, S., Yasufuku, K., Iyoda, A., Yoshida, S., Sekine, Y., Shibuya, K., Hiroshima, K., Nakatani, Y., Yoshino, I., Fujisawa, T.: Aberrant methylation of CXCL12 in non-small cell lung cancer is associated with an unfavorable prognosis. *Int. J. Oncol.* 33:113-9, 2008, 査読有

Shinnakasu, R., Yamashita, M., Kuwahara, M., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., Nakayama, T.: Gfi1-mediated stabilization of GATA3 protein is required for Th2 cell differentiation. *J Biol Chem*, 2008, 査読有

Uchida, T., Horiguchi, S, Tanaka, Y., Yamamoto, H., Kunii, N., Motohashi, S., Taniguchi, M., Nakayama, T., Okamoto, Y.: Phase I study of  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells administration to the nasal submucosa in unresectable or recurrent head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 57(3):337-45, 2008, 査読有

Yamashita, M., Kuwahara, M., Suzuki, A., Hirahara, K., Shinnakasu, R., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Motohashi, S., Iwama, A., and Nakayama, T.: Bmi1 regulates memory CD4 T cell survival via repression of the *Noxa* gene. *J. Exp. Med.* 205:1109-1120, 2008, 査読有

Motohashi, S., and Nakayama, T.: Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Sci.* 99:638-645, 2008, 査読有

Suzuki, M., Shigematsu, H., Nakajima T., Kubo, R., Motohashi, S., Sekine, Y., Shibuya, K., Iizasa, T., Hiroshima, K., Nakatani, Y., Gazdar, AF., Fujisawa, T.: Synchronous alterations of Wnt and epidermal growth factor receptor signaling pathways through aberrant methylation and mutation in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 13(20) 6087-92, 2007, 査読有

[学会発表](計 8 件)

Motohashi, S.  
A Phase I-II study of  $\alpha$ GalCer-pulsed antigen presenting cells in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer.

The 5th International Symposium on CD1/NKT Cells.

2009年3月23日 鎌倉

本橋 新一郎

Activation of tumor infiltrating V<sub>24</sub> NKT cells after preoperative  $\alpha$ -Galactosylceramide-pulsed dendritic cell treatment.

千葉大学 G-COE シンポジウム

2009年1月6日 東京

本橋 新一郎

Natural Killer T cell-based Immunotherapy

for Lung Cancer.

第12回基盤の癌免疫研究会

2008年7月3日 大宮

本橋 新一郎

原発性肺癌に対するNKT細胞免疫系を標的とした免疫細胞療法

第32回日本リンパ学会総会

2008年6月6日 東京

Motohashi, S.

Phase I/II study of  $\alpha$ GalCer-pulsed dendritic cell in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer.

2008 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting

2008年5月29日 Chicago

本橋 新一郎

Phase I/II study of  $\alpha$ GalCer-pulsed dendritic cell in patients with advanced or recurrent non-small cell lung cancer.

第66回日本癌学会学術総会

2007年10月3日 横浜

本橋 新一郎

原発性肺癌に対するNKT細胞免疫系を標的にした免疫細胞療法

第11回基盤の癌免疫研究会

2007年7月12日 大宮

本橋 新一郎

原発性肺癌術後再発抑制を目的とした $\alpha$ -GalactosylCeramide パルス樹状細胞投与によるNKT細胞免疫療法

第107回日本外科学会定期学術集会

2007年4月12日 大阪

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本橋 新一郎(MOTOHASHI SHINICHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院

准教授

研究者番号:60345022

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者