

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07652

研究課題名（和文）NK細胞のアジュバント効果を利用したNKT細胞療法による肺癌免疫治療の検討

研究課題名（英文）Adjuvant effect of NK cells for NKT cell-based immunotherapy targeting 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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、肺癌に対するNKT細胞を用いた免疫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。NK細胞がNKT細胞の抗腫瘍効果に対するアジュバント効果を発揮することに着目し、そのメカニズムを解明するために研究を進めた。NK細胞がNKT細胞のアジュバント効果を発揮する液性因子の特定を試みたが関与因子の特定には至らなかった。しかし、その実験過程において、NKT細胞の培養上清の中にNKT細胞の抗腫瘍活性に関与する因子を特定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、本来の目的であるNK細胞のNKT細胞に対するアジュバント効果を誘導する因子の特定には至らなかったものの、その実験過程で抗NKT-TCR抗体が白血病細胞株K562細胞に対して細胞傷害活性を惹起するのに必要な因子であることを特定し、新たな併用療法の可能性が示唆された。しかし、肺癌細胞株に対しては、抗NKT-TCR抗体を添加してもNKT細胞の抗腫瘍活性の増強は見られなかった。以上の結果からNKT細胞のTCRシグナルを活性化し、さらに腫瘍抗原を特異的に認識する二重特異性抗体を使用するなどにより、肺癌をターゲットとした新たなNKT細胞療法を開発できるのではないかと考察された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to develop a new combination therapy to enhance the antitumor activity of NKT cell-based immunotherapy. We previously found that NK cells enhance the antitumor activity of NKT cells against the leukemic cell line, K562 cells. Therefore, we analyzed the mechanisms by which NK cells enhance the antitumor activity of NKT cells. We found that the anti-NKT-TCR antibody enhanced the antitumor activity of NKT cells against K562 cells, although we could not identify the soluble factor produced by NK cells. On the other hand, anti-NKT-TCR antibody treatment did not augment the antitumor activity of NKT cells against lung cancer cell line A549 cells. In the future, we plan to test if bispecific antibodies, which recognize lung cancer antigen and TCR of NKT cells, might enhance the antitumor activity of NKT cells against lung cancer.

研究分野：免疫学

キーワード：NKT細胞 免疫療法 NK細胞 アジュバント効果 肺癌

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、2018年には12万5千人の罹患者数と7万8千人の死亡者数が予測されている。さらに高齢者に好発するため、超高齢社会を迎えた日本における罹患者数は増加の一途をたどることが予想されている。近年の臨床試験の成功にて肺癌の標準治療となった「免疫チェックポイント阻害剤」は、胆がん状態における免疫抑制状態の打破を目指した非特異的免疫療法であり、極めて高い注目を集めているものの、有効性を示す症例は限定的であり、時に免疫関連の重篤な有害事象が生じることから、依然として有効で安全性の高い新規治療法の開発は喫緊の課題である。

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 Natural killer T (NKT) 細胞は、T細胞レセプターを介して α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) を特異的に認識し、活性化する。活性化した NKT 細胞は、自ら細胞傷害活性を發揮するだけでなく、NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞といった他の細胞群を活性化する役割も果たし、強力な抗腫瘍効果を誘導する。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、 α -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ことを目指した臨床試験を行ってきた。 α -GalCer パルス樹状細胞による肺癌治療は、第3項先進医療として承認され実施した臨床試験にて、生存期間延長効果を示した。

これらの臨床試験の結果から、ヒト NKT 細胞が肺癌に対して抗腫瘍効果を發揮することは明らかになりつつある。一方で、NKT 細胞は、健康人末梢血中において多くとも全体の0.1%ほどしか存在しない細胞群で、NKT 細胞の腫瘍免疫における他の細胞群との相互作用、細胞レベルでの機能、制御メカニズムに関しては未だ明らかにされていない点が多くある。より強力な次世代 NKT 細胞療法の開発には、それらの未解明な NKT 細胞の役割を解明することが必要である。そこで申請者は、他の免疫細胞群の中でも NK 細胞と NKT 細胞との相互作用に着目した。NK 細胞は NKT 細胞と同様に自然免疫を司る細胞群の一つで、NK レセプターを介して直接腫瘍を認識し IFN- γ などのサイトカインを産生するだけでなく、自ら細胞傷害活性を發揮する。NKT 細胞が IFN- γ 、IL-15 などのサイトカイン産生を介して NK 細胞の抗腫瘍効果を増強することは知られているが、逆に NK 細胞が NKT 細胞に及ぼす作用については解明されていない。そこで NKT 細胞が發揮する抗腫瘍効果に対して NK 細胞がどのような作用を有するか共培養の系を用いて検討したところ、NK 細胞には NKT 細胞の細胞傷害活性への有意な増強作用を有するという予備データを得た。

2. 研究の目的

本研究は、肺癌に対する NKT 細胞を用いた免疫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。本研究において、NK 細胞が NKT 細胞の抗腫瘍効果に対するアジュバント効果に關与するメカニズムを明らかにすると共に、その効果を利用し抗腫瘍効果を増強させる因子の特定を試みた。

3. 研究の方法

NK細胞がNKT細胞の抗腫瘍効果に与えるアジュバント効果の検討

健康人由来の PBMC から NKT 細胞と NK 細胞をそれぞれマグネットビーズにより分離し、 α -GalCer をパルスし放射線照射した PBMC を抗原提示細胞として用いて NKT 細胞を活性化させながら IL-2 の存在下にて NK 細胞との共培養を行った。NK 細胞と共培養した後に NKT 細胞と再分離した後、白血病細胞株である K562 細胞に対する NKT 細胞傷害活性を測定した。同様の実験系を用いて、肺癌細胞株である A549 細胞に対する細胞傷害活性を測定した。さらに9日間の共培養期間中において、NK 細胞が NKT 細胞に作用するタイミングを明らかにするために NK 細胞と NKT 細胞の共培養期間を変えて NKT 細胞の細胞傷害活性へ与える変化を検討した。

NKT細胞の抗腫瘍効果を増強させる因子の特定

同様に健康人由来の PBMC から分離した NKT 細胞と NK 細胞の共培養をする際にトランスウェルを用いて NK 細胞と NKT 細胞を分離して培養する群が、直接接触させて培養するコントロール群とを比較して、NKT 細胞の細胞傷害活性が同様に増強されるかを検証した。液性因子の中でどの分子が關与しているかを特定するためにカラムクロマトグラフィーを用いて分子量ごとの分画に分け、それぞれの分画を NKT 細胞に添加して、細胞傷害活性の増強が得られる分画を特定した。さらに特定された分画をマススペクトロメトリーにかけ、NKT 細胞の細胞傷害活

性を増強させる因子を特定するためプロテオーム解析を行った。また、特定した因子の添加により NKT 細胞の抗腫瘍活性への影響を、*in vitro* で解析した。

NKT 細胞抗腫瘍活性増強因子を用いた新規免疫併用療法の有効性及びエビデンスの構築

で特定した因子である抗 NKT-TCR 抗体を用いた新規併用免疫療法の有効性エビデンスを構築するために、hIL-7/IL-15 NSG マウスに K562 細胞を皮下投与し、皮下腫瘍モデルマウスを作成した。K562 皮下腫瘍モデルマウスに、ヒト NKT 細胞のみ、または抗 NKT-TCR 抗体を添加したヒト NKT 細胞を腫瘍局所に投与し、経時的に腫瘍サイズを測定した。さらに肺癌への抗 NKT-TCR 抗体と NKT 細胞免疫療法の併用療法を検討するために、*in vitro* で抗 NKT-TCR 抗体を添加し、NKT 細胞の肺癌細胞株 A549 細胞に対する細胞傷害活性、サイトカイン産生能について検証した。

4. 研究成果

NK細胞がNKT細胞の抗腫瘍効果に与えるアジュバント効果の検討

予備実験の結果から、NK 細胞と NKT 細胞を 9 日間共培養すると NKT 細胞の抗腫瘍活性が増強したため、共培養の期間を 1、3、5、7 日間と変化させ、NKT 細胞の K562 細胞に対する細胞傷害活性を評価したところ、共培養の期間が 3 日以上で 9 日間の共培養と同じ程度の NKT 細胞の抗腫瘍活性が増強された。A549 細胞株に対する抗腫瘍効果も同様に検討したが、NK 細胞の共培養によって NKT 細胞の細胞傷害活性は誘導されなかった。

NKT 細胞の抗腫瘍効果を増強させる因子の特定

トランスウェルアッセイの結果から、NK 細胞と NKT 細胞の cell-cell コントラクトは NKT 細胞の抗腫瘍効果増強には関与せず、液性因子によるものであることが明らかとなった。NK 細胞から産生される液性因子で NKT 細胞の抗腫瘍効果増強に関与する因子の特定を試みる中で、NKT 細胞のみを培養した培養上清中に NKT 細胞の抗腫瘍活性に関与する因子があることを発見した。そこで、関与する液性因子を、マスマスペクトロメトリーを用いたプロテオーム解析により特定しようと試みたが、候補となる因子は特定されなかった。NKT 細胞を、マグネットビーズを用いてポジティブセレクションにてソートする際に使用する抗 NKT-TCR 抗体 (抗 V α 24 抗体) に着目し、NKT 細胞の培養上清からマウス Ig ビーズを用いて抗 NKT-TCR 抗体を除去したところ、NKT 細胞の抗腫瘍活性増強がキャンセルされた (図 1)。以上から、NK 細胞による因子ではないものの、抗 NKT-TCR 抗体が、NKT 細胞の K562 細胞に対する細胞傷害活性を増強する因子であることが明らかとなった。

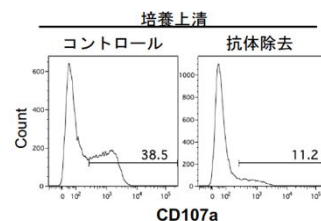


図 1 抗 NKT-TCR 抗体除去による NKT 細胞の K562 細胞に対する細胞傷害活性への影響

NKT 細胞抗腫瘍活性増強因子を用いた新規免疫併用療法の有効性及びエビデンスの構築

K562 細胞皮下腫瘍モデルにおいては、抗 NKT-TCR 抗体を添加した NKT 細胞を投与した群で、腫瘍の増殖が抑制されていることが確認された (図 2)。NKT 細胞のみ投与群では、コントロールの PBS 投与群と比較して腫瘍の増殖速度に差が見られなかったことから、抗 NKT-TCR 抗体の添加が NKT 細胞の K562 細胞の抗腫瘍効果を *in vivo* でも増強させることが明らかとなった。一方で、抗 NKT-TCR 抗体を添加した NKT 細胞が、肺癌細胞株である A549 細胞に対しても細胞傷害活性を増強させるかをまず *in vitro* で検討した。抗 NKT-TCR 抗体を添加した NKT 細胞は、A549 細胞に対して細胞傷害活性の増強は示さなかった。また、IFN- γ 、TNF- α 等のサイトカイン産生も認められなかった。

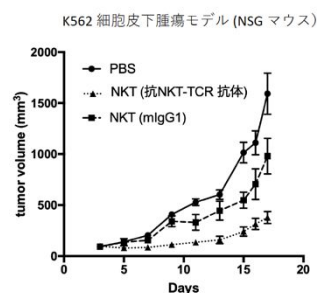


図 2 *in vivo* での抗 NKT-TCR 抗体と NKT 細胞療法の併用による治療効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hagiya, M., Tanaka, T., Aita, K., Shiragami, R., Ihara, F., Ishii, A., Takami, M., Homma, T., Wada, Y., Motohashi, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Administration of α -galactosylceramide-pulsed Antigen Presenting Cells in Combination with First-line Chemotherapy for Advanced Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chiba Survey Research Journal	6. 最初と最後の頁 27-33
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 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 Aoki Takahiro, Takami Mariko, Takatani Tomozumi, Motoyoshi Kiwamu, Ishii Ayana, Hara Ayaka, Toyoda Takahide, Okada Reona, Hino Moeko, Koyama Nasu Ryo, Kiuchi Masahiro, Hirahara Kiyoshi, Kimura Motoko Y., Nakayama Toshinori, Shimojo Naoki, Motohashi Shinichiro	4. 巻 111
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 2223 ~ 2233
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 Hara Ayaka, Koyama-Nasu Ryo, Takami Mariko, Toyoda Takahide, Aoki Takahiro, Ihara Fumie, Kobayashi Masayoshi, Hirono Seiichiro, Matsutani Tomoo, Nakayama Toshinori, Iwadata Yasuo, Motohashi Shinichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 CD1d expression in glioblastoma is a promising target for NKT cell-based cancer immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	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） 10.1007/s00262-020-02742-1	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takami, M., Motohashi, S.
2. 発表標題 Anti-NKT cell antibody treatment enhances anti-tumor activity of NKT cells toward CD1d (-) tumors in a CD32 dependent manner
3. 学会等名 EMBO workshop CD1/MR1-restricted T lymphocytes（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takami, M., Motohashi, S.
2. 発表標題 Anti-NKT cell antibody treatment enhances anti-tumor activity of NKT cells toward CD1d (-) tumors in a CD32 dependent manner
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ishii, A., Takami, M., Motohashi, S.
2. 発表標題 Blockade of aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling enhances anti-tumor efficacy of iNKT cell-based immunotherapy
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takami, M., Ishii, A., Motohashi, S.
2. 発表標題 Blockade of AhR signaling enhances anti-tumor activity of NKT cells in vivo
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takami, M., Ishii, A., Motohashi, S.
2. 発表標題 Adjuvant effect of NK cells on the anti-tumor activity of NKT cells
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高見 真理子, 本橋 新一郎 (分担執筆: がんとNKT細胞)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 223
3. 書名 がん免疫ペディア (吉村清 編集)	

〔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 分担者	本橋 新一郎 (Motohashi Shinichiro) (60345022)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究 分担者	木村 元子 (Kimura Y. Motoko) (00345018)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------