

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09353

研究課題名(和文) 膠芽腫に対するNK細胞と新たな免疫チェックポイント阻害の併用療法の開発

研究課題名(英文) Combination Therapy of NK Cells and Novel Immune Checkpoint Inhibition for Glioblastoma

研究代表者

松田 良介 (Matsuda, Ryosuke)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：60453164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫におけるNK細胞の抑制型受容体の機能を解明すべく、本研究では抑制型受容体KIRを抑制することにより、NK細胞のさらなる活性化が得られるかどうかを検証した。

In vitro実験では、膠芽腫細胞株U87MGおよびT98Gに対するNK細胞および抗KIR2DL1抗体の抗腫瘍効果をRTCAを用いて検証した。結果、NK細胞単独群では、良好な抗腫瘍効果が得られたが、抗KIR2DL1抗体を併用すると抗腫瘍効果が減弱する結果となった。同様にU87MGを免疫不全マウスの頭蓋内投与した膠芽腫モデルでの解析においても、抗KIR2DL1抗体投与群ではNK細胞投与群と比較し生存期間の延長は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は既存の治療では、完治しえず、代表的な悪性脳腫瘍の一つである。今回、NK細胞の抗腫瘍効果をさらに高めるべく、抑制型受容体であるKIRに着目して研究を行った。当初の推測とはことなり、NK細胞と抗KIR2DL1抗体の併用療法は、逆にNK細胞の抗腫瘍活性を減弱している結果となった。その要因としては、NK細胞におけるKIRの発現がそれほど高くないことや、KIRファミリーの中の他の受容体であるKIR2DL2/3がより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。NK細胞の抗腫瘍効果をさらに増強すべく、免疫逃避機構の解明が待たれる。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the function of the inhibitory receptor of NK cells in glioblastoma, this study tested whether further activation of NK cells can be obtained by suppressing the inhibitory receptor KIR. In vitro, the antitumor effects of NK cells and anti-KIR2DL1 antibody on glioblastoma cell lines U87MG and T98G were investigated using RTCA. The results showed that the NK cells alone group showed good antitumor effect, but the antitumor effect was attenuated when anti-KIR2DL1 antibody was used in combination with NK cells. Similarly, in the analysis of a glioblastoma model in which U87MG was administered intracranially to immunocompromised mice, the anti-KIR2DL1 antibody-treated group showed no survival advantage over the NK cell-treated group.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma natural killer cell immune checkpoint

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年がん治療において、立て続けに免疫チェックポイント阻害剤が承認され、悪性黒色腫や肺癌などのがん治療が大きく改善している。一方、GBMは難治性の脳腫瘍であり、標準的な治療法では手術後に抗がん剤テモゾロミド (TMZ) と放射線治療を併用するが、5年生存率は20%に満たない。GBMに対するチェックポイント阻害薬については、抗PD-1抗体であるオプジーボならびに抗CTLA-4抗体であるイピリムマブの併用療法は、既存の治療との間に有意差が認められなかった (Omuro et al. Neuro-oncology 2017)。その理由として、免疫系がGBMを認識しておらず、GBMに浸潤する免疫細胞の頻度が低く、GBMが免疫学的に不活性な状態 (Immunological cold) であることが挙げられている (Keskin et al. Nature 2019)。我々の実験結果からも、膠芽腫モデルにおいて、NK細胞と抗PD-1抗体の併用は相加効果がみられなかった。ナチュラルキラー (NK) 細胞は、初期免疫応答に関与し、免疫応答のきっかけを与える細胞である。NK細胞は樹状細胞等から分泌されるIL-2、IL-12、IL-15などにより活性化され、免疫応答を誘導する。また、NK細胞は様々な活性化受容体と抑制性受容体を発現し、それらの抗原を認識することで反応性が決定される。活性化受容体としては、LFA-1、DNAM-1、NKG2D、NKp30、NKp40、NKp46などが、抑制性受容体としては、KIR、TIGIT、CD96、CD94/NKG2A、LAG-3、TIM-3、PD-1、TGF- R、IL-1R8、A2AARが報告されている (Vivier et al. Nature Immunol. 2008, Viel et al. Sci. Signal 2016, Kim et al. Front Immunol 2018, Bi et al. Front Immunol 2019)。前述のNK細胞の機能を抑制する受容体とシグナル伝達分子はNK細胞のチェックポイント分子と定義づけられている。

GBMに対する高純度、高活性のヒトNK細胞を用いた免疫細胞治療において、PD-1/PD-L1 pathway 以外のチェックポイント阻害分子を阻害することにより、NK細胞のがん細胞殺傷効果を増幅する可能性がある。

2. 研究の目的

我々は活性化、抑制性受容体のリガンドの発現を解析しており、NK細胞にKIRの発現が高いこと、またそのリガンドであるHLA-ABCの発現が高いことを報告してきた。GBMの免疫抑制環境でも、持続的に免疫応答のきっかけを与え続けるためには、PD-1/PD-L1 pathway 以外のNK細胞のチェックポイント分子を阻害する必要がある。私たちはこれまでに、臨床応用可能な、高純度、高活性のヒトNK細胞を簡単かつ大量に増幅できる培養技術を確認し、NK細胞に発現する受容体とGBM細胞に発現するリガンドの発現様式やGBM細胞に対する強力な増殖抑制効果、TMZとの相加効果を報告した。GBMに対する高純度、高活性のヒトNK細胞を用いた免疫細胞治療において、PD-1/PD-L1 pathway 以外のチェックポイント阻害分子を阻害することにより、NK細胞のがん細胞殺傷効果を増幅することができるかを検証する。

GBMに対しては、PD-1/PD-L1 以外の pathway が関与している可能性が高いが、NK細胞治療とNK細胞の抑制性受容体であるKIRをターゲットとした研究は報告されていないため、本研究の成果はGBM治療に大きく貢献しうる。

3. 研究の方法

GBM細胞株とNK細胞/抗KIR抗体の共培養実験

NK細胞の分離培養は、健康人末梢血より Lymphoprep®を用いた比重遠心分離法によって単核細胞を分離する。CD3 depletion kit (STEMCELL Tech社)を用いてCD3陽性細胞を除去し、高濃度IL-2とIL-18を含む含有AIM-V培地にて培養を開始する。以降、細胞の増幅培養に際してはIL-2含有AIM-V培地にて増幅培養を行う。7~14日間の増幅培養を実施する。本方法を実施した場合のNK細胞の純度は90%以上である。

GBM細胞株であるU87MGおよびT98GとNK細胞を抗KIR抗体存在下および非存在下で共培養し増殖抑制効果を解析する。解析にはRTCA S16 (ATCA社)を使用しリアルタイムでGBM細胞の増殖をモニタリングする。抗KIR抗体はCreative Biolabs社製のRecombinant Human Anti-KIR2DL1 Antibody (1-7F9)を使用した。

GBM細胞株移植NOGマウスの作製とNK細胞/抗KIR抗体薬の投与及び腫瘍形成能の評価

膠芽腫細胞であるU87MGを高度免疫不全NOGマウスに脳内移植後7日目に、以下の3群に分けて、NK細胞(107)および抗KIR抗体を頭蓋内に直接投与し、生存期間を測定した。3群はGroup 1 対照群 (PBS投与)、Group 2 NK細胞投与群、Group 3 抗KIR抗体/NK細胞投与群とした。

4. 研究成果

In vitro実験では、膠芽腫細胞株U87MGおよびT98Gに対するNK細胞および抗KIR2DL1抗体の抗腫瘍効果をリアルタイムセルアナライザー解析により検証した。結果、U87MGおよびT98G両群において、NK細胞単独群では、良好な抗腫瘍効果が得られたが、抗KIR2DL1抗体を併用するとNK細胞の抗腫瘍効果が減弱する結果となった。またアポトーシス解析でも、NK細胞による抗

腫瘍効果はアポトーシスが主たる要因であり、抗 KIR2DL1 抗体の投与により、アポトーシスが減少していることが示された。In vivo 実験では、膠芽腫細胞株 U87MG を免疫不全マウスの頭蓋内投与した膠芽腫モデルでの解析においても、抗 KIR2DL1 抗体投与群では NK 細胞投与群と比較し、有意差はないものの、生存期間は短縮する傾向がみられた。当初の予想に反し、NK 細胞と抗 KIR2DL1 抗体の併用療法は、in vitro、in vivo 実験ともに NK 細胞の抗腫瘍活性を減弱している結果となった。その要因としては、NK 細胞における KIR の発現がそれほど高くないことや、KIR ファミリーの中の他の受容体である KIR2DL2/3 がより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、我々の培養方法で高純度に培養した NK 細胞においては KIR の有する本来の作用機序が若干異なり、抑制性の機能よりも活性化型受容体としての役割が強く発現していることも示唆される。KIR2DL2/3 の解析も踏まえて、さらなる解析を行っていく必要がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Morimoto Takayuki, Nakazawa Tsutomu, Maeoka Ryosuke, Nakagawa Ichiro, Tsujimura Takahiro, Matsuda Ryosuke	4. 巻 24
2. 論文標題 Natural Killer Cell-Based Immunotherapy against Glioblastoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2111 ~ 2111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24032111	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 Nakazawa Tsutomu, Morimoto Takayuki, Maeoka Ryosuke, Matsuda Ryosuke, Nakamura Mitsutoshi, Nishimura Fumihiko, Yamada Shuichi, Nakagawa Ichiro, Park Young-Soo, Nakase Hiroyuki, Tsujimura Takahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Establishment of an efficient ex vivo expansion strategy for human natural killer cells stimulated by defined cytokine cocktail and antibodies against natural killer cell activating receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 185 ~ 191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2022.07.001	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田良介 中澤務 前岡良輔 森本亮之 至田洋一 西村文彦 中川一郎 辻村貴弘 中瀬裕之
2. 発表標題 Anti-tumor effect of genuine induced natural killer cells for glioblastoma in vitro and vivo study
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田良介 中澤務 前岡良輔 森本亮之 至田洋一 西村文彦 中川一郎 辻村貴弘 中瀬裕之
2. 発表標題 Natural killer 細胞を用いた膠芽腫に対する細胞移植治療の基礎的研究
3. 学会等名 第22回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前岡良輔 中澤務 松田良介 森本堯之 至田洋一 西村文彦 中川一郎 辻村貴弘 中瀬裕之
2. 発表標題 CIS deletion by CRISPR/Cas9 enhances human NK cell-mediated antitumor effects in glioblastoma
3. 学会等名 第26回日本がん免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前岡良輔 中澤務 松田良介 森本堯之 至田洋一 西村文彦 中川一郎 辻村貴弘 中瀬裕之
2. 発表標題 CIS deletion by CRISPR/Cas9 enhances human NK cell-mediated antitumor effects in glioblastoma
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中澤務 前岡良輔 森本堯之 松田良介 中村光利 西村文彦 山田修一 中川一郎 中瀬裕之 辻村貴弘
2. 発表標題 CIS deletion with CRISPR/Cas9 enhances primary human NK cell functions against allogeneic GBM cells
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森本堯之 中澤務 松田良介 西村文彦 中村光利 山田修一 中川一郎 朴永銖 辻村貴弘 中瀬裕之
2. 発表標題 膠芽腫スフェロイドモデルにおける遺伝子発現解析とNK細胞の傷害活性についての検討
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本 堯之 中澤 務 松田 良介 西村 文彦 中村 光利 山田 修一 中川 一郎 朴 永鉄 辻村 貴弘 中瀬 裕之
2. 発表標題 当科における膠芽腫に対するNK細胞療法の開発の歩み
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 良介 中澤 務 至田 洋一 森本 堯之 西村 文彦 中村 光利 山田 修一 中川 一郎 辻村 貴弘 中瀬 裕之
2. 発表標題 The role of PD-1/PD-L1 pathway in anti-tumor effect of genuine induced natural killer cells for glioblastoma in vitro and vivo study
3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	中村 光利 (Nakamura Mitsutoshi) (00305715)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員 (24601)	
研究分担者	中澤 務 (Nakazawa Tsutomu) (00772500)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	
研究分担者	西村 文彦 (Nishimura Fumihiko) (70433331)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

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
---------	---------