

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17917

研究課題名(和文) 膠芽腫に対するiPS細胞由来NKT細胞を用いた新規複合免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of immunotherapy using iPS-NKT cells for glioblastoma

研究代表者

小林 正芳 (Kobayashi, Masayoshi)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10867857

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)：本研究では、神経膠腫患者の末梢血及び腫瘍切除検体を用いた腫瘍浸潤免疫細胞の解析の結果、膠芽腫患者はコントロール群(非担癌患者)と比較して、末梢血中の抑制性免疫細胞集団が増加傾向であったのに対し、T細胞は有意に減少していたが、Natural Killer T(NKT)細胞に変化は認めなかった。さらに、膠芽腫患者における腫瘍切除検体の腫瘍浸潤リンパ球には疲弊したT細胞が含まれていたが、NKT細胞はほとんど認めなかった。次に同所性ヒト膠芽腫マウスモデルを作成して、*in vitro*で調製したヒト末梢血由来NKT細胞を頭蓋内投与した結果、T細胞の存在下では生存期間の延長と腫瘍増大抑制効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は、標準的治療でも生存期間の中央値は約15か月と非常に予後が悪く、新規治療法の開発が喫緊の課題である。本研究で膠芽腫患者は免疫抑制状態にあるが末梢血のNKT細胞数は保たれており、腫瘍微小環境で疲弊しているT細胞は確認されたがNKT細胞は認めなかった。このことから、NKT細胞の細胞傷害活性を期待し、膠芽腫マウスモデルに対し、NKT細胞を用いた養子免疫細胞療法を行ったところ、T細胞の存在下で抗腫瘍効果が認められた。この研究結果は、実臨床を目指すためにNKT細胞の質と供給量を確保するための供給源となりうるiPS細胞由来NKT細胞(iPS-NKT)を用いた養子免疫療法の足掛かりとなる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed immune cells in the peripheral blood of glioma patients and analyzed tumor-infiltrating immune cells using resected tumors. Among peripheral blood mononuclear cells from glioblastoma (GBM) patients, suppressive immune cell population were increased, and T cells were decreased, while Natural Killer T (NKT) cells were unaffected. Moreover, tumor-infiltrating lymphocytes from GBM patients included exhausted T cells, but few NKT cells. Intracranial administration of NKT cells extended survival and inhibited tumor growth in the orthotopic GBM mouse model in the presence of T cells.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫 NKT細胞 iPS-NKT 抑制性免疫 養子免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は、脳実質の神経膠細胞が腫瘍化したもので、原発性脳腫瘍の約 25%を占める代表的な脳腫瘍である。その中で最も悪性度の高い膠芽腫は、神経膠腫全体の約 36%を占めている。膠芽腫患者に対し現在の標準的治療である手術 + 放射線治療 + 化学療法を行った場合、生存期間の中央値は約 15 か月、5 年生存率は 7%と非常に予後が悪い。また現在の標準的治療は、2005 年に報告された stupp レジメン (Stupp R, et al. N Engl J Med 2005) であり、以降様々な治療が試みられているにもかかわらず、この数十年間新たな治療法の確立には至っていない。近年は、分子標的治療薬の一つであるベバシズマブが併用され、無増悪生存期間 (PFS) を優位に延長させているものの、全生存期間 (OS) の延長には未だに至っていないのが現状である。

現在様々ながんに対する免疫療法の有効性が示唆され、一部のがん腫では免疫チェックポイント阻害剤や CAR-T 細胞などは標準治療としての地位を確立した。一方、脳実質腫瘍である神経膠腫に対しては、血液-脳関門によって脳が保護されている為に免疫細胞が移行できず、リンパ系組織が存在しないために免疫監視システムが働かないと考えられがちであったが、2015 年に脳の古典的なリンパ管システムといえる「中枢神経系リンパ管」が発見された (Antoine Louveau, et al. Nature 2015)。また膠芽腫に対しては、これまでに遺伝子組み換えヘルペスウイルス治療 (Markert JM, et al. Gene Ther 2000)、WT-1 ペプチドワクチン療法 (Izumoto S, et al. J Neurosurg 2008)、腫瘍抗原特異的樹状細胞療法 (Mitchell DA, et al. Nature 2015)、DCVax-L 免疫治療 (Liau LM, et al. J Transl Med 2018)、CAR-T 細胞療法 (Mount CW, et al. Nat Med 2018) などが行われ、膠芽腫に対する免疫治療の有効性が示唆されている。しかし膠芽腫患者の免疫応答においては、免疫チェックポイント分子 Programmed Death-1 (PD-1) の発現を特徴とする T 細胞の疲弊、制御性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) などの抑制性細胞の存在、T 細胞が骨髄中から末梢血中へ移行するための S1PR (スフィンゴシン 1 リン酸レセプター) の発現低下 (Pakawat C, et al. Nat Med 2018) といった、複合要因により抗腫瘍免疫応答が抑制されていることが報告されてきている。

Natural Killer T 細胞 (NKT 細胞) は、末梢血中においては非常に少ない細胞集団であるにもかかわらず、抗腫瘍免疫応答をはじめとする様々な免疫反応に関与することが知られている。これまで千葉大学大学院医学研究院免疫細胞医学教室では、原発性肺癌患者を対象に NKT 細胞を標的とした免疫細胞療法に関する研究開発を行ってきた。一方で、膠芽腫患者における NKT 細胞の解析や免疫細胞療法に関しては報告も少なく、いまだ不明な点が多い。そのため千葉大学医学研究院免疫細胞医学教室では、神経膠腫患者の末梢血及び手術で摘出された腫瘍検体を用いて各種免疫メカニズムの解析に着手し、膠芽腫患者への NKT 細胞を標的とした免疫細胞療法を検討している。そこで本研究では頭蓋内という腫瘍環境を考慮し、iPS 細胞由来 NKT 細胞 (iPS-NKT) を用いた養子免疫療法の開発を検討する。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経膠腫患者から得られたデータや腫瘍検体をもとに、同所性ヒト膠芽腫モデルやマウス膠芽腫 PDX モデルを作成して動物実験を行い、NKT 細胞を用いた養子免疫療法について、最善の治療方法を検討する。千葉大学医学部附属病院では、すでに原発性肺癌及び頭頸部癌に対して NKT 細胞を標的とした免疫細胞療法が基礎研究や臨床研究をもとに先進医療として実施されている。そこで、膠芽腫に対しても NKT 細胞を標的とした免疫療法の有効性を示し、膠芽

腫患者の新規治療法として臨床研究へとつなげることが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 神経膠腫患者の末梢血を用いた免疫細胞の解析

千葉大学脳神経外科で神経膠腫と診断された患者とコントロール群として脳血管障害患者を対象に同意を得て血液を採取し、フローサイトメトリーで T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞などのリンパ球サブセットや代表的な免疫抑制性細胞集団である MDSC 及び Treg の解析を行った。

#### (2) 神経膠腫患者の腫瘍検体を用いた免疫細胞の解析

当院脳神経外科で神経膠腫と診断された患者に同意を得て手術で摘出された腫瘍検体を採取し、比重分離法によって腫瘍と腫瘍浸潤単核球に単離し、フローサイトメトリーで T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞などのリンパ球サブセットや免疫抑制機構を中心に PD-1 などの免疫抑制分子の発現解析を行った。

#### (3) 膠芽腫マウスモデルに対する NKT 細胞を用いた免疫療法の検討

##### 同所性ヒト膠芽腫マウスモデルの確立

ヒト膠芽腫細胞株 U251 を重症免疫不全マウスの頭蓋内に移植した同所性ヒト膠芽腫マウスモデルを作成し、頭部造影 CT を用いて腫瘍の生着・増大速度を観察した。

##### 同所性ヒト膠芽腫マウスモデルにおける NKT 細胞の抗腫瘍効果の解析

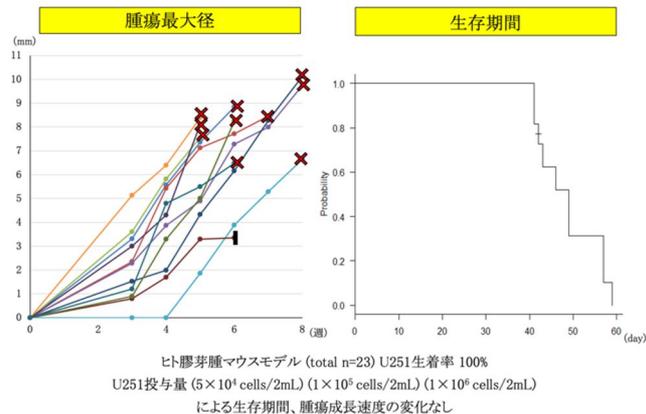
確立した同所性ヒト膠芽腫マウスモデルを用いて、健常ボランティアから採取した末梢血由来 NKT 細胞をエフェクター細胞としてマウスの頭蓋内に投与する免疫細胞療法を行い、NKT 細胞による腫瘍増大抑制効果と生存期間を観察した。

### 4. 研究成果

(1) 膠芽腫患者はコントロール群と比較して、末梢血中の単球系骨髄由来抑制細胞 (M-MDSC) が有意に増加しており、活性型制御性 T 細胞 (Effector Treg) も増加傾向にあった。一方、T 細胞は有意に減少していたが、NKT 細胞に変化は認めなかった。これらの末梢血データは治療前に得られたものであり、膠芽腫は患者を全身性の免疫抑制状態に誘導するが、末梢血 NKT 細胞には影響しないことがわかった。

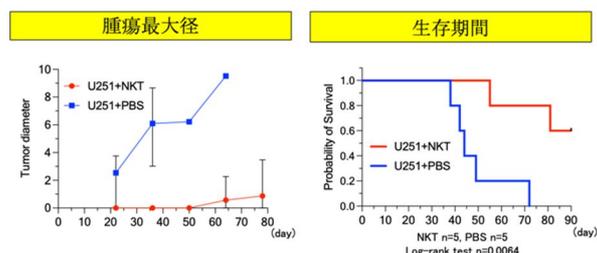
(2) 神経膠腫患者の腫瘍検体解析から膠芽腫は有意に腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) が増加し、T 細胞の浸潤も増加していたが、TIL 中の CD8 陽性 T 細胞は PD-1 を高発現していた。一方、膠芽腫を含め神経膠腫には NKT 細胞の浸潤をほとんど認めなかった。これらの解析結果より腫瘍微小環境では疲弊していると思われる T 細胞の存在は確認されたが NKT 細胞はほとんど認められないため、細胞傷害活性を有する NKT 細胞を腫瘍に浸潤させることにより抗腫瘍効果が期待できる可能性を示唆している。

(3) 重症免疫不全マウスの頭蓋内にヒト膠芽腫細胞株 U251 をすることで、同所性ヒト膠芽腫マウスモデルを作成した。その後、U251 の投与量を 3 段階に分け、頭部造影 CT を用いて腫瘍の生着・増大速度を観察した。その結果、この同所性ヒト膠芽腫マウスモデルでは、腫瘍の投与量の変化による生存期間や腫瘍成長速度の変化は認めず、腫瘍径が 6~10mm 大になると頭蓋内圧が高まることで死亡し、U251 投与後 40~60 日程度で死亡することがわかった。

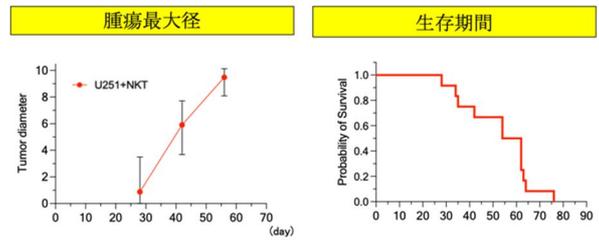


(4) 同所性ヒト膠芽腫マウスモデルを用いて、健常ボランティアから採取した末梢血由来 NKT 細胞をエフェクター細胞としてマウスの頭蓋内に投与する治療実験を行った。

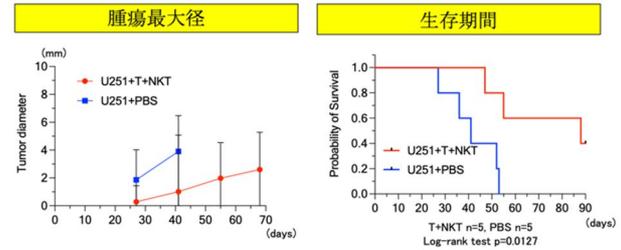
同所性ヒト膠芽腫マウスモデルの頭蓋内に健常ボランティアの末梢血から作成した Purity が 90% の NKT 細胞を隔日 3 回頭蓋内投与する治療実験を行った。その結果、コントロール群と比較し著明な生存期間の延長と腫瘍増大抑制効果を認めた。



別の健常ボランティアの末梢血から作成した Purity が 99%以上の NKT 細胞に変えて同様の治療実験を行ったところ、生存期間の延長や腫瘍増大抑制効果は認められなかった。この違いに関して、投与した NKT 細胞の population を解析した結果、初回治療実験で抗腫瘍効果があった NKT 細胞の population には、T 細胞が全体の 7%含まれていた。一方、抗腫瘍効果がなかった NKT 細胞の population には、T 細胞が全体の 0.2%程度しか含まれていなかった。



T 細胞及び NKT 細胞の頭蓋内投与による in vivo 抗腫瘍効果の検討として、先の実験で効果がなかった健常ボランティアの末梢血から T 細胞と NKT 細胞を単離し、同所性膠芽腫マウスモデルの頭蓋内に T 細胞を投与してから、NKT 細胞を隔日 3 回投与する治療実験を行った。その結果、ほぼ同等の生存期間の延長と、腫瘍増大抑制効果を認めた。



これらの結果により、同所性ヒト膠芽腫マウスモデルに対して、T 細胞の存在下では頭蓋内 NKT 細胞投与により抗腫瘍効果が認められた。この研究結果は、実臨床を目指すために NKT 細胞の質と供給量を確保するための供給源となりうる iPS-NKT を用いた養子免疫療法の足掛かりとなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林正芳
2. 発表標題 膠芽腫患者の免疫環境解析とNKT細胞を用いた治療モデルの開発
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林正芳
2. 発表標題 膠芽腫患者の免疫環境解析とNKT細胞を用いた治療モデルの開発
3. 学会等名 ニューロ・オンコロジーの会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林正芳
2. 発表標題 膠芽腫患者の免疫環境解析と臨床応用を目指したNKT細胞治療モデルの開発
3. 学会等名 Chiba neuroreseach meeting
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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