

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 25 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592624

研究課題名(和文) 小児悪性固形腫瘍に対するNK T細胞免疫系を用いた新規免疫細胞療法の開発研究

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic approach for pediatric malignant solid tumors using NKT cell-mediated immune system

研究代表者

菱木 知郎 (HISHIKI, TOMORO)

千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ・主任医長

研究者番号：00375776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児悪性固形腫瘍の治療成績は目覚ましく向上したが、いまだ一部の腫瘍の予後は著しく不良である。さらに現行の治療で幸いにも救命できた場合にも、副作用等によりその後のQOLが損なわれることが少なくない。本研究ではNKT細胞免疫系を用いた新規免疫細胞療法の開発を行うべく、前臨床的な研究をおこなった。NKT細胞は担がん小児患者においても検出され、それらをin vitroで増殖させることが可能であることがわかった。さらに患者由来のNKT細胞は代表的な小児悪性固形腫瘍である神経芽腫の培養細胞株に対し細胞傷害性をもつことが示された。本研究の結果は新たな免疫細胞療法の開発の礎となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of patients with pediatric malignant solid tumors have dramatically improved, although a part of these tumors are yet aggressive and fatal. Survivors suffer from grave side effects as a result of multimodal therapy, and the QOL of these patients are not satisfactory. In the present preclinical study, we aimed to develop a novel therapeutic approach for these tumors. NKT cells were detected in tumor-burden patients and were expandable in vitro. These cells showed significant cytotoxicity against neuroblastoma cell lines. Clinical implication of NKT mediated immunotherapy is awaited on the basis of these results.

研究分野：小児外科学

科研費の分科・細目：小児腫瘍学

キーワード：神経芽腫 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

小児悪性固形腫瘍の治療成績は、手術・化学療法・放射線療法を組み合わせた集学的治療の進歩によりめざましく向上した。しかし、進行神経芽腫、進行横紋筋肉腫、ユーイングファミリー肉腫など、従来生存の可能性がほとんどなかった難治性腫瘍群は、いまなお予後が極めて不良である。本来ほとんどの小児悪性固形腫瘍は化学療法に対する感受性が高く、一旦は腫瘍がほぼ消失した状態となることも少なくないが、そのうちの多数が後に再発し不幸な転帰をたどる。これら難治性小児悪性固形腫瘍の治療成績向上には既存の治療法と異なるアプローチを用いた新規治療法の開発が急務であると考えられる。

<NKT細胞免疫系を標的にしたがん免疫細胞治療>

がんに対する免疫療法は、担がん宿主において腫瘍に対する免疫を増強することにより抗腫瘍効果を得る治療法である。これまでに多くのがんに対し、生体の免疫応答を高める種々の工夫をこらした研究が報告されている。NKT細胞免疫系を標的にしたがん免疫細胞治療は特徴的な細胞傷害性と高い安全性の両面から近年注目されている免疫療法である。ヒトNKT細胞はNK受容体とともにV₂₄J₁₈遺伝子でコードされる単一のT細胞抗原受容体を発現し、さまざまな免疫反応の調節に関与している。当施設で糖脂質の α -ガラクトシルセラミド(α -GalCer)がNKT細胞の特異的リガンドであることが発見されて以来、活性化NKT細胞の機能が明らかにされてきた。抗腫瘍免疫におけるNKT細胞の役割として、マウス活性化NKT細胞を介したがん免疫機構の解明により以下のことが明らかになっている。 α -GalCerによって活性化されたNKT細胞は、Th1、Th2両タイプのサイトカインであるIFN- γ およびIL-4迅速をかつ大量に産生するほか、さまざまな殺細胞誘導因子を発現することで、標的のがん細胞に対して直接細胞傷害活性を示す。それだけでなく、CD40/CD40Lを介した樹状細胞(以下DC)の成熟化や、それに引き続いて起こるTh1タイプのサイトカイン産生増強により、NK(natural killer)細胞や細胞傷害性CD8+T細胞といった他のエフェクター細胞の標的細胞傷害活性の増強も行う。このようNKT細胞が強力な抗腫瘍効果をもつことが示された結果を受け、当施設ではNKT細胞免疫系を標的にしたがん免疫細胞治療をおこなってきた。非小細胞性肺癌および頭頸部癌において、患者単核球をサイトカインにて分化誘導したDCに α -GalCerをパルス提示させたあと患者の静脈内、あるいは鼻粘膜下に投与すると

いうデザインでphaseI試験を施行したところ、重篤な副作用や有害事象なく施行可能であった(Ishikawa et al, Clin Cancer Res, 2005. Ishikawa E et al, Int J Cancer, 2005. Uchida T et al, Cancer Immunol Immunother, 2008)。また、肺癌患者の末梢血単核球を α -GalCerとIL-2で共培養し活性化NKT細胞を誘導し、これを静脈内投与するデザインのphaseI試験もおこなっており、安全に施行可能であった(Motohashi et al Clin Cancer Res, 2006)。

<担がん患者におけるNKT細胞の意義>

担癌患者における免疫不全は古くから知られており、がんの進行や再発と密接な関与があることが指摘されている。肺癌をはじめとする複数のがんを罹患する患者の末梢血中のV₂₄NKT細胞数が減少していることが示されており、担癌患者における免疫不全の一因となっていると考えられている。当施設におけるこれまでの解析によると、担癌状態の成人患者血液中のV₂₄NKT細胞はその数は健常コントロールに比して少ないものの、IFN- γ 産生能や細胞傷害性は保たれている(Motohashi et al, Int J Cancer, 2002)。このことは α -GalCerをパルス提示させたDCを患者に投与する免疫細胞療法を成功させる上で非常に重要であると考えられる。

<小児悪性固形腫瘍におけるNKT細胞>

一方、小児悪性固形腫瘍におけるNKT細胞の関与についての研究は今日までに散見されるに過ぎず、担癌患者におけるNKT細胞の機能まで解析した研究は過去にない。以前から神経芽腫腫瘍組織内に腫瘍浸潤リンパ球の存在が確認され、その生物学的特性における抗腫瘍免疫の関与が示唆されてきた。stage4 神経芽腫の腫瘍組織内および血液中にNKT細胞が存在することを指摘した報告によると、腫瘍細胞が産生するケモカインが外来性のNKT細胞を誘導する(Metelisa et al, J Exp Med 2004)。神経芽腫のほとんどにCD1d発現はないが、マウスの系ではNKT細胞がNK細胞を介し神経芽腫細胞株に対し細胞傷害性を活性化できることが確認されており、成人腫瘍と同様に小児腫瘍においてもNKT細胞を中心とする自然免疫系が腫瘍の浸潤・転移の抑制に関わっている可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、小児悪性固形腫瘍に対するヒトNKT細胞免疫系を標的にした免疫細胞治療の確立をめざし、小児悪性固形腫瘍患者におけるNKT細胞の局在およびその機能を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

未治療および化学療法後の腫瘍組織にお

ける NKT 細胞の発現 (real-time PCR) 腫瘍組織より total RNA を抽出し real-time RT-PCR 法にて V 24-J 18 RNA の検出を行った。この解析は過去の症例の凍結標本からおこなうことも可能であり、説明同意の得られたサンプルについては新規症例に限らず解析を行い、年齢・病期・病理組織型などの予後因子との比較検討をおこなった。

末梢血中の CD3positive および V 24-J 11-positive 細胞の同定(正常者との比較)

Flow cytometry により循環 NKT 細胞分画の定量をおこなった。正常コントロールは同年齢の健常患者(他疾患で手術予定の患者など)の余剰検体を同意取得のもと使用した。

CD3, V 24, V 11 の各々に対する抗体を用い、PI により死細胞を gate out して 3 色識別の flow cytometry をおこなった。担癌患者の末梢血は少なくとも治療開始前と治療終了後の 2 点で検討し、さらに自家造血幹細胞移植を施行する患者については前処置前後の末梢血についても検討した。

-GalCer による患者 NKT 細胞の増殖作用の検討

患者末梢血を Ficoll-Hypaque technique により分離し PBMC として解析まで凍結保存し、PBMC を AIM-V 培地にて 100 U IL-2 および 100 ng/ml -GalCer を加え 7 日間培養した。培養前後の NKT 細胞の定量を上記方法にて行った。

患者 NKT 細胞による細胞傷害性の検討 神経芽腫細胞株 NB1 を sodium ⁵¹Cr-chromate で標識する。PBMC を AIM-V 培地にて 100 U IL-2 および 100 ng/ml α-GalCer を加え 7 日間培養し、Vα24 抗体を用いて MACS システムにより NKT 細胞を単離する。これを effector 細胞とし抗原提示細胞で再刺激したのちに、上記細胞 株とともに 4 時間培養し、⁵¹Cr 放出を定量した。

NKT 細胞による NK 細胞を介する細胞傷害性の増強

実際の生体内では NKT 細胞は局所腫瘍免疫応答の生後の中心的役割をにない、種々の方法で NK 細胞や CTL を刺激し間接的な殺細胞機能を発揮していると考えられている。NK 細胞との共培養実験をおこない、NK 細胞の殺細胞機能に NKT 細胞が boost をかける事ができるかどうかを検証した。

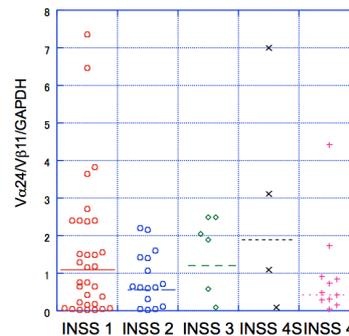
4. 研究成果

未治療および化学療法後の腫瘍組織における NKT 細胞の発現 (real-time PCR)

神経芽腫 107 例の腫瘍検体より抽出・合成された cDNA を用い、real-time PCR をおこなった。

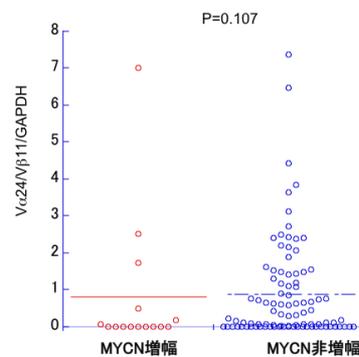
53 例に NKT 細胞のマーカーである V 24-J 18 RNA が検出された。stage 1, 4s で発現が高く stage 4 では低発現であった

臨床病期と腫瘍組織内のNKT細胞



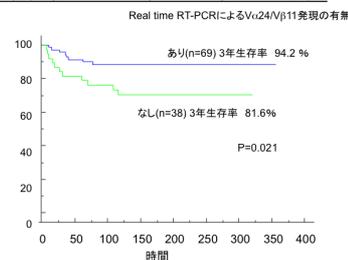
細胞内の NKT 細胞浸潤は MYCN 増幅の有無と負の相関にあった。

MYCN増幅と腫瘍組織内のNKT細胞



NKT 細胞浸潤の有無は予後と相関した。

腫瘍組織内NKT細胞の有無と予後

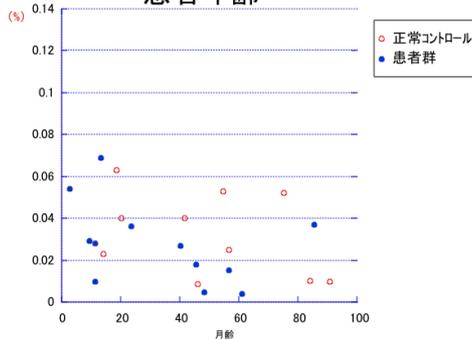


末梢血中の CD3positive および V 24-J 11-positive 細胞の同定(正常者との比較)

担がん状態の患者群と正常コントロール群

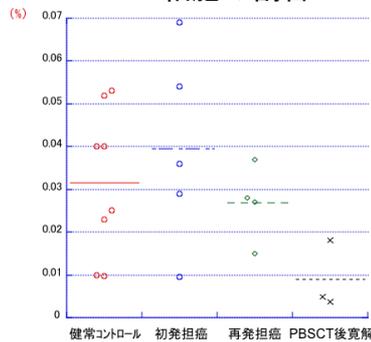
とを比較すると末梢血中 NKT 細胞の割合には有意な差はない。

末梢血単核球中のNKT細胞の割合と患者年齢



治療の時期別では造血幹細胞移植後6ヵ月でNKT細胞の割合は低値であった。

治療相別の末梢血単核球中のNKT細胞の割合

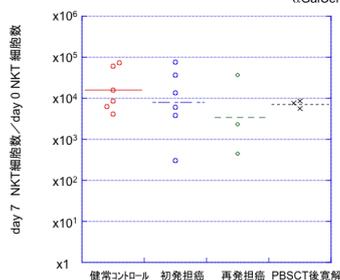


-GalCer による患者 NKT 細胞の増殖

作用の検討

-GalCer パルスにより患者 NKT 細胞分画は 1000-100000 倍に増幅されることが確認された。

αGalCerパルスによる培養末梢血単核球中のNKT細胞分画の増加

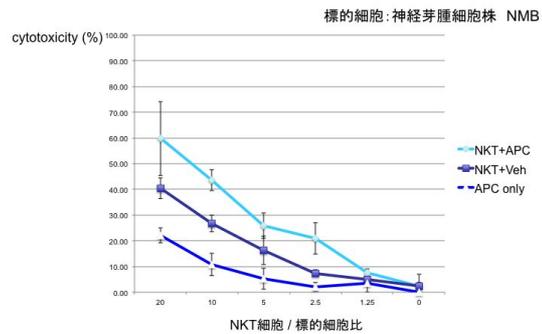


患者 NKT 細胞による細胞傷害性の検討

神経芽腫細胞株 NB1 を sodium ⁵¹Cr-chromate で標識する。PBMC を AIM-V 培地にて 100 U IL-2 および 100 ng/ml

α-GalCer を加え 7 日間培養 し、Vα24 抗体を用いて MACS システムにより NKT 細胞を単離する。これを effector 細胞とし抗原提示細胞で再刺激したのちに、上記細胞株とともに 4 時間培養し、⁵¹Cr 放出を定量した。NKT 細胞を刺激したものはより協力的な細胞傷害性を示したが、NK 細胞のそれに比較するとその作用は弱かった。

α-GalCerパルス抗原提示細胞によるNKT細胞の細胞傷害性の増強



NKT 細胞による NK 細胞を介する細胞傷害性の増強

神経芽腫培養細胞株 NMB を、NK 細胞および NKT 細胞共培養し、LDH Cytotoxicity Detection 法により殺細胞能を検討したところ、NK 細胞のみを用いた系にくらべ、5~10 倍の殺細胞活性を有することが示された。

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 15 件)

Hishiki T. Current therapeutic strategies for childhood hepatic tumors: surgical and interventional treatments for hepatoblastoma. *Int J Clin Oncol*, 18, 962- 968, 2013.

Hishiki T, Saito T, Mitsunaga T, Nakata M, Terui E, Komatsu S, Mise N, Harada K, Iwai J, Higashimoto Y, Okimoto Y, Kakuda H, Ochiai H, Hino M, Homma S, Osa Y, Yoshida H. Optimal surgical treatment and urological outcomes in boys with pelvic and urogenital rhabdomyosarcomas and soft tissue sarcomas. *Pediatr Surg Int*. 29, 1077-1082, 2013.

Fujii SI, Shimizu K, Okamoto Y, Kunii N, Nakayama T, Motohashi S, Taniguchi M. NKT Cells as an Ideal Anti- Tumor

Immunotherapeutic. Front Immunol 2, 409, 2013.

Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T. Novel 1p tumour suppressor Dnmt1- associated protein 1 regulates MYCN/ ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway. Eur J Cancer 50, 1555-1565, 2014

Tajiri T, Kimura O, Fumino S, Furukawa T, Iehara T, Souzaki R, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, Oda Y, Hishiki T, Hosoi H, Hiyama E, Taguchi T. Surgical strategies for unresectable hepatoblastomas. J Pediatr Surg.47, 2194-2198, 2012.

Iwamura C, Shinoda K, Endo Y, Watanabe Y, Tumes DJ, Motohashi S, Kawahara K, Kinjo Y, Nakayama T. Regulation of memory CD4 T-cell pool size and function by natural killer T cells in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 16992-16997, 2012.

Nagato K, Motohashi S, Ishibashi F, Okita K, Yamasaki K, Moriya Y, Hoshino H, Yoshida S, Hanaoka H, Fujii S, Taniguchi M, Yoshino I, Nakayama T. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after galactosylceramide pulsed antigen presenting cells. J Clin Immunol 32, 1071-1081, 2012.

Motohashi S et al. Anti-tumor immune responses induced by iNKT cell-based immunotherapy for lung cancer and head and neck cancer. Clin Immunol.140, 167-176, 2011

Yamasaki K, Motohashi S, et al. Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. Clin Immunol. 138, 256-265, 2011.

Kurosaki M, Motohashi S, et al. Migration and immunological reaction after the administration of GalCer-pulsed antigen-presenting cells into the submucosa of patients with head and neck cancer. Cancer Immunol Immunother 60, 207-215, 2011

〔学会発表〕(計4件)

菱木 知郎 . Review of surgical treatment in patients enrolled in the JNBSG high risk neuroblastoma clinical trial (A phase II study of multidisciplinary approach to establish standard treatment for advanced neuroblastoma); A report from Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG) .第54回 日本小児血液・がん学会学術集会 . 2012年12月10日 .

菱木 知郎 . 小児悪性固形腫瘍に対する NKT 細胞系を用いた新規免疫療法の開発研究 . 第54回 日本小児血液・がん学会学術集会 . 2012年12月10日 .

菱木 知郎 . 小児悪性固形腫瘍に対するNKT 細胞系を用いた新規免疫療法の開発研究 . 第50回 日本小児外科学会学術集会 . 2013年5月29日 .

三瀬 直子, 菱木 知郎, 斎藤 武, 照井 慶太, 光永 哲也, 中田 光政, 國井 直樹, 藤川 陽, 堀中 敦史, 鎌田 稔子, 蒔田 勇治, 内田 亮介, 伊原 史英, 吉田 英生, 本橋 新一郎 . 神経芽腫細胞に対するNKT細胞によるADCC増強効果の検討 . 第55回 日本小児血液・がん学会学術集会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菱木 知郎 (HISHIKI TOMORO)
千葉県がんセンター研究所・発がん研究部・主任医長
研究者番号 : 00375776

(2)研究分担者

吉田 英生 (YOSHIDA HIDEO)
千葉大学大学院・医学研究院・教授
研究者番号 : 60210712
本橋新一郎 (MOTOHASHI SHINICHIRO)
千葉大学大学院・医学研究院・教授
研究者番号 : 60345022
上條 岳彦 (KAMIJO TAKEHIKO)

千葉県がんセンター・発がん研究部・部長
研究者番号：90262708