

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592083

研究課題名(和文)次世代NKT細胞免疫治療に向けた肺癌微小環境下の抗腫瘍エフェクター機構の解明

研究課題名(英文)Anti-tumor effector mechanisms of activated NKT cells in the tumor microenvironment for novel NKT cell-based immunotherapy

研究代表者

本橋 新一郎(MOTOHASHI, Shinichiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60345022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：強力な抗腫瘍効果を有するNKT細胞の作用機序解明のため、重度複合免疫不全マウスを用いたNKT細胞免疫治療モデルを樹立し、その抗腫瘍効果発揮メカニズムを明らかにする研究を行った。その結果、本肺癌モデルに対する特異的T細胞の抗腫瘍効果は活性化NKT細胞併用により明らかに増強するとともに、腫瘍浸潤T細胞増加とインターフェロン産生増強を認めた。

また、マイクロアレイを用いたNKT細胞免疫治療に関連する遺伝子発現解析から得られた遺伝子の発現調節により、腫瘍由来の免疫抑制因子に対する抵抗性を獲得することから、本遺伝子の発現制御によりNKT細胞免疫療法の効果を増強出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cellular and molecular mechanisms underlying potent anti-tumor effects of ligand activated invariant NKT cells. We established the lung cancer treatment models using severe combined immunodeficiency mouse and found out that activated iNKT cells augmented the cytotoxicity of tumor-antigen specific CD8+ T cells in vitro and in vivo. The number of CD8+ T cells and interferon-gamma production in the tumor microenvironment were increased after combination immunotherapy with CD8+ T cells and iNKT cells.

Ltb4dh gene was up-regulated in good responder cases after iNKT cell-based immunotherapy. We demonstrated that increased ltb4dh expression could overcome the tumor-derived immune suppressive effects. Therefore, it raises the possibility that the regulation of this gene could lead to the improvement of therapeutic effect of iNKT cell-based immunotherapy.

研究分野：NKT細胞による抗腫瘍効果発揮機序の解明およびNKT細胞を利用した免疫細胞療法の開発研究

キーワード：免疫学 NKT細胞 免疫療法 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

我々の施設において、NKT 細胞の特異的なリガンドである ガラクトシルセラミド (GalCer) が発見された (*Science* 1997)。GalCer により活性化した NKT 細胞は強力な細胞傷害活性を示すのみならず、NK 細胞や細胞傷害性 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免疫系全体を活性化し、抗腫瘍活性を示すと考えられる (*Nat Immunol* 2003)。これらの研究結果から NKT 細胞のもつがん転移抑制能を利用した免疫細胞療法の開発に関する研究として、肺癌再発例ならびに進行期肺癌症例を対象とした、内在性 NKT 細胞活性化を目指す GalCer パルス樹状細胞投与および活性化 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 (*Clin Cancer Res* 2005, *Clin Cancer Res* 2006)。その後、GalCer パルス樹状細胞投与の Phase I/II 試験にて安全性を確認するとともに、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全生存期間の延長を認めた (*J Immunol* 2009)。さらに、肺癌症例に対して GalCer パルス樹状細胞の静脈内投与により、NKT 細胞の肺癌腫瘍局所 (TIL) への有意な集積と活性化を検出することが初めて可能となった (*J Clin Immunol* 2012)。しかしヒト NKT 細胞の詳細な抗腫瘍エフェクター機構に関してはいまだ不明な点が多い。重度複合免疫不全マウスである NOD/SCID/IL2R^{-/-}マウス (NOG マウス) は、他の免疫不全マウスと比較して、*in vivo* で多様なヒト細胞を分化・増殖させることが可能である。申請者は平成 22 年に、この NOG マウスを用いた腫瘍特異的 T 細胞による癌治療モデル (*Proc Natl Acad Sci USA* 2009) から探索的臨床研究 (*N Engl J Med* 2011) を成功させている米国 Pennsylvania 大学 June 教授の研究室にて、ヒト肺癌に対するヒト NKT 細胞免疫治療を再現するための NOG マウスモデルの基盤を構築してきた (文部科学省優秀若手研究者海外派遣事業)。このモデルを用いてヒト NKT 細胞の抗腫瘍エフェクター機構を解明する。

2. 研究の目的

肺癌に対する NKT 細胞を標的とした免疫細胞治療により、有効で侵襲性の低い肺癌の新規治療を確立することを目的とする。これまでの進行・再発肺癌に対する NKT 細胞免疫治療の静脈内投与において認められた全生存期間延長や腫瘍縮小効果といった抗腫瘍効果発揮メカニズムの詳細は不明であり、NOG マウスを用いた NKT 細胞免疫治療モデルにおいてその抗腫瘍メカニズム解析および治療効果予測バイオマーカーの探索研究を行う。

3. 研究の方法

(1) NOG マウスにおける肺癌モデルの確立

NOG マウスに対して様々ながん抗原を発現するヒト肺癌細胞株を移植することで、ヒト肺癌モデルを構築する。同所性および異所性腫瘍モデルとして肺転移および皮下転移を形成し、腫瘍形成条件および治療至適時期を確立する。

(2) NKT 細胞の獲得免疫系への増強効果の検討

健常人および肺癌患者由来末梢血からウイルスベクターを用いた遺伝子導入技術にて樹立したがん抗原特異的 T 細胞を、がん抗原を発現したヒト肺癌モデルに NKT 細胞と共に投与し、がん抗原特異的 T 細胞併用 NKT 細胞免疫治療の *in vivo* での抗腫瘍効果を検討する。細胞治療後の腫瘍縮小効果を肉眼的に検討するとともに、腫瘍浸潤リンパ球を回収し、T 細胞および NKT 細胞のサイトカイン産生能や各種活性化もしくは抑制性表面抗原分子を解析する。

(3) NKT 細胞の抗腫瘍活性誘導機能分子の網羅的解析

NKT 細胞免疫治療症例における末梢血単核球を用いて、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、抗腫瘍効果増強につながる機能分子の同定を行い、NKT 細胞の抗腫瘍効果発揮メカニズムの解明および本免疫治療の効果発揮が期待される症例選択につながるバイオマーカー探索を行う。マイクロアレイにて得られた候補遺伝子群の機能解析について、健常人および肺癌患者末梢血リンパ球を用いて、候補遺伝子の CD4⁺ T 細胞や CD8⁺ T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞への遺伝子導入による強制発現などを行い、細胞増殖能やサイトカイン産生能、細胞傷害活性などの機能変化を検討し、同定された機能分子から想定されるメカニズムの詳細な解明を進める。

4. 研究成果

(1) 重度複合免疫不全マウス NOG マウス上に、異所性および同所性にヒト悪性腫瘍細胞株を移植するヒト肺癌モデルと、免疫細胞投与による治療効果の画像評価法を確立した。このマウスモデルにおいて、ヒト肺癌のモデル抗原としてメソテリンを発現する細胞株を皮下に投与し、遺伝子導入法を用いて作成したメソテリン特異的 T 細胞による *in vivo* での抗腫瘍効果を検討したところ、肉眼的に腫瘍縮小効果を認めた。さらに末梢血単核球由来活性化 NKT 細胞を併用することによって、明らかに腫瘍縮小効果の増強を認めた。この抗腫瘍効果増強のメカニズム解析を行うために腫瘍を摘出し、腫瘍浸潤リンパ球を比重分離法により回収した。フローサイトメリーによる解析にて腫瘍浸潤リンパ球中には T 細胞を認め、NKT 細胞併用により腫瘍浸潤 T 細胞の明らかな増加を認めた。また腫瘍浸潤 T 細胞において認められたインター

フェロン 産生能は、活性化 NKT 細胞の併用により顕著な増強を認めた。

(2) マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析にて NKT 細胞免疫治療後に発現上昇を認めた遺伝子 *Itb4dh* の作用機序を解析した。*Itb4dh* 遺伝子を強制発現した CD4⁺ T 細胞を Th1/Th2 に分化誘導しサイトカイン産生能を検討すると、Th1 サイトカインの産生増強と Th2 サイトカインの産生抑制を認めた。腫瘍から産生されるプロスタグランジン E2 は、T 細胞が産生するサイトカインを抑制することが報告されているが、CD4⁺もしくは CD8⁺ T 細胞における *Itb4dh* の発現を上昇させることにより、この抑制効果をキャンセル出来ることが明らかとなった。しかし CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞では、この抑制効果発現には違いがあり、*Itb4dh* の作用機序には CD4⁺ T 細胞と CD8⁺ T 細胞で異なる可能性が示唆された。今回この遺伝子発現を人為的に操作し、腫瘍由来の免疫抑制作用に抵抗可能することで、NKT 細胞免疫療法の効果を増強出来る可能性が示唆され、今後更なるメカニズム解析を実施していく予定である。また *Itb4dh* の発現レベルの測定が、治療有効性を予測するバイオマーカーとして有効か、今後の臨床研究を通じて検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Frigault, M. J., Lee, J., Basil, M., Carpenito, C., Motohashi, S., Scholler, J., Kawalekar, O. U., Guedan, S., McGettigan, S., Posey, A Jr., Ang, S., Cooper, L. J., Platt, J., Johnson, F. B., Paulos, C. M., Zhao, Y., Kalos, M., Milone, M. and June, C. H. Identification of chimeric antigen receptors that mediate constitutive or inducible proliferation of T cells. *Cancer Immunol. Res.* 3(4):356-67(2015) 査読有 10.1158/2326-6066.CIR-14-0186
2. Sun, Y., Furihata, T., Ishii, S., Nagai, M., Harada, M., Shimozato, O., Kamijo, T., Motohashi, S., Yoshino, I., Kamiichi, A., Kobayashi, K. and Chiba, K. Unique expression features of cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 mRNA expression in human colon and lung cancers: potential biomarker implications. *Clin. Transl. Med.* 3:37(2014) 査読有 10.1186/s40169-014-0037-y
3. Fujii, S., Shimizu, K., Okamoto, Y., Kunii, N., Nakayama, T., Motohashi, S., and Taniguchi, M. NKT cells as an ideal anti-tumor immunotherapeutic. *Front. Immunol.* 4:409(2013) 査読有 10.3389/fimmu.2013.00409
4. 本橋 新一郎 NKT 細胞免疫治療における腫瘍局所免疫応答 最新肺癌学-基礎と臨床の最新研究動向- **日本臨床** 71(6):248-252(2013) 査読無
5. 本橋 新一郎 肺癌に対する免疫細胞治療 最新肺癌学-基礎と臨床の最新研究動向- **日本臨床** 71(6):581-584(2013) 査読無
6. 國井 直樹 本橋 新一郎, 中山 俊憲 頭頸部がんに対する iNKT 細胞療法 **実験医学** 31(12):190-193(2013) 査読無
7. 本橋 新一郎 肺癌に対する免疫細胞治療 **癌と化学療法** 40(8):1015-1017 (2013) 査読無
8. 本橋 新一郎 肺癌に対するがん免疫細胞治療における NKT 細胞の有用性-臨床研究の経験から **医学のあゆみ** 244(9):850-853(2013) 査読無
9. Iwamura, C., Shinoda, K., Endo, Y., Watanabe, Y., Tumes, J. D., Motohashi, S., Kawahara, K., Kinjo, Y. and Nakayama, T. Regulation of memory CD4 T-cell pool size and function by natural killer T cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:16992-16997(2012) 査読有 10.1073/pnas.1203494109
10. Nagato, K., Motohashi, S., Ishibashi, F., Okita, K., Yamasaki, K., Moriya, Y., Hoshino, H., Yoshida, S., Hanaoka, H., Fujii, S., Taniguchi, M., Yoshino, I. and Nakayama, T. Accumulation of activated invariant natural killer T cells in the tumor microenvironment after α -Galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. *J. Clin. Immunol.* 32:1071-1081(2012) 査読有 10.1007/s10875-012-9697-9

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 本橋 新一郎 非小細胞肺癌に対する NKT 細胞特異的免疫細胞療法の開発 第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会 2015 年 2 月 28 日, 東京ガーデンパレス (東京都・文京区)
2. 本橋 新一郎 NKT 細胞を標的とした

- 癌免疫治療とバイオマーカー探索研究
第9回獣医アトピー・アレルギー・免疫
学会シンポジウム 2015年2月1日,
国際ファッションセンター(東京都・墨
田区)
3. Kunii, N., Makita, Y., Ihara, F., Uchida, R.,
Fujikawa, A., Sakurai, D., Motohashi, S.,
Nakayama, T. and Okamoto, Y. Antigen
Specific Immunotherapy Based on
Chimeric Antigen Receptor Expressing T
Cells Targeted to Salivary Gland Tumor.
第43回日本免疫学会学術集会 2014年
12月11日, 国立京都国際会館(京都
府・京都市)
 4. Nagato, K., Motohashi, S., Nakayama, T.,
Yoshino, I. and Nishimura, M. I. Human
melanoma antigen-specific iNKT cells
engineered by the TIL 1383I T cell receptor
gene transfer. 第43回日本免疫学会学術
集 2014年12月11日, 国立京都国際会
館(京都府・京都市)
 5. 鎌田 稔子, 鈴木 茜, 藤川 陽, 三瀬 直
子, 蒔田 勇治, 吉田 成利, 鈴木 秀海,
中島 崇裕, 岩田 剛和, 吉野 一郎, 中
山 俊憲, 本橋 新一郎 原発性肺癌に対
する NKT 細胞免疫療法における PD-1
阻害の有用性 第55回日本肺癌学会学
術集会 2014年11月15日, 国立京都国
際会館(京都府・京都市)
 6. 堀中 敦史, 本橋 新一郎, 岡本 美孝
骨髄系免疫抑制細胞の頭頸部腫瘍にお
ける検討 第73回日本癌学会学術総
会 2014年9月25日, パシフィコ横浜
(神奈川県・横浜市)
 7. 本橋 新一郎 NKT cell-targeting
immunotherapy for non-small cell lung
cancer. 第18回日本がん免疫学会総会
2014年8月1日, ひめぎんホール(愛
媛県・松山市)
 8. 本橋 新一郎 悪性腫瘍に対する NKT
細胞を標的とした免疫細胞治療 第1
回細胞加工・細胞治療研究会 2014年
6月28日, 東京大学医学部附属病院
(東京都・文京区)
 9. 鎌田 稔子, 本橋 新一郎, 吉田 成利,
鈴木 秀海, 中島 崇裕, 田川 哲三, 岩
田 剛和, 溝淵 輝明, 吉野 一郎 原発
性肺癌患者における NKT 細胞免疫治
療と PD-1 阻害療法の有用性 第31回
日本呼吸器外科学会総会 2014年5月
29日, ホテル日航東京(東京都・港区)
 10. Fujikawa, A., Kunii, N., Horinaka, A.,
Makita, Y., Uchida, R., Ihara, F., Motohashi,
S., Okamoto, Y., and Nakayama, T. Phase
I/II clinical study of
 α -galactosylceramide-pulsed antigen
presenting cells as adjuvant
immunotherapy for patients with head and
neck mucosal malignant melanoma after
carbon ion radiotherapy. 第42回日本免疫
学会総会学術集会 2013年12月12日,
幕張メッセ(千葉県・千葉市)
 11. 中山 俊憲, 本橋 新一郎, 國井 直
樹, 岡本 美孝 抗腫瘍免疫機構の最先
端 第66回日本胸部外科学会定期学術
集会 2013年10月17日, 仙台国際セン
ター(宮城県・仙台市)
 12. 伊藤 俊広, 平原 潔, 本橋 新一郎, 矢
野 郁也, 中山 俊憲 BCG-LM による好
酸球活性化の抗腫瘍効果 第72回日本
癌学会学術総会 2013年10月4日, パシ
フィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 13. Motohashi, S., Kunii, N., Taniguchi, M.,
Yoshino, I., Okamoto, Y., and Nakayama, T.
NKT cell-targeting therapy for lung cancer
and head and neck cancer. 7th International
symposium on CD1 and NKT cells.
9/13/2013, Tours (France)
 14. 中山 俊憲, 本橋 新一郎, 國井 直樹,
岡本 美孝 NKT 細胞免疫系をターゲッ
トにしたがんの免疫細胞治療—10年
間の臨床研究の成果と今後の展望—第
17回日本がん免疫学会総会 2013年7
月3-5日, ANA クラウンプラザホテル宇部
(山口県・宇部市)
 15. 藤川 陽, 國井 直樹, 櫻井 大樹, 長谷
川 安都佐 鎌田 正 溝江 純悦 岡本 美
孝, 本橋 新一郎, 中山 俊憲 炭素イオ
ン線治療後の頭頸部粘膜悪性黒色腫患
者に対する α ガラクトシルセラミドパ
ルス抗原提示細胞を用いたアジュバン
ト免疫治療に関する第 I/II 相臨床研究
第17回日本がん免疫学会総会 2013年7
月4日, ANA クラウンプラザホテル宇部
(山口県・宇部市)
 16. Motohashi, S. NKT cell-targeting therapy

- for lung cancer. Current and Future Trends in Genome-based Immunity, Infection and Cancer 2013年1月28日, 東京ステーションコンファレンス (東京都・千代田区)
17. 本橋 新一郎 NKT 細胞を標的とした免疫細胞治療の現状と今後の展望 第9回がんワクチン療法研究会学術集会 2012年11月17日, 筑波大学 (茨城県・つくば市)
 18. 田川 哲三, 岩田 剛和, 山田 義人, 鈴木 秀海, 坂入 祐一, 山本 高義, 田中 教久, 畑 敦, 豊田 行英, 溝淵 輝明, 本橋 新一郎, 吉田 成利, Marc de Perrot, 吉野 一郎 マウス胸膜中皮腫における IFN- γ 産生性 iNKT 細胞の役割 第53回日本肺癌学会総会 2012年11月9日, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)
 19. 本橋 新一郎 非小細胞肺癌に対する α ガラクトシルセラミドパルス樹状細胞療法 第50回日本癌治療学会学術集会 2012年10月26日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 20. Nakayama, T. and Motohashi, S. Tumor immunity: Regulation by innate and acquired immunity. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日, さっぽろ芸文館 (北海道・札幌市)
 21. Motohashi, S., Ishibashi, F., Nagato, K., Kunii, N., Taniguchi, M., Yoshino, I. and Nakayama, T. Analysis of immune responses in the tumor microenvironment after NKT cell-targeted therapy in patients with lung cancer. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日, 札幌市教育文化会館 (北海道・札幌市)
 22. Taniguchi, M., Fujii, S., Motohashi, S., Nakayama, T., Harada, M., Dashtsoodol, N. and Watarai, H. NKT cell-mediated adjuvant activity on anti-tumor responses and its clinical application in patients with advanced lung cancer. FOCIS 2012 From Innate to Adaptive Immunity 6/22/2012 Vancouver (Canada)
 23. Nagato, K., Motohashi, S. and Nakayama, T. Accumulation of activated invariant NKT cells in the tumor microenvironment after α -galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells. CIS 2012 Annual Meeting 5/17/2012, Chicago (USA)
 24. Kamiichi, A., Furihata, T., Nagai, M., Matsumoto, S., Ishii, S., Motohashi, S., Yoshino, I. and Chiba, K. A novel variant is a bona fide organic anion transporting polypeptide 1B3 in cancer cells. The 2nd Japan-China Symposium on Cancer Research 2012年5月9日, 幕張メッセ 国際会議場 (千葉県・千葉市)
- 〔図書〕(計2件)
1. 本橋 新一郎 他, 南山堂, **がん免疫** 印刷中 (2015)
 2. 本橋 新一郎 他, 日本医学出版, **先進医療 NAVIGATOR -再生医療・がん領域の実用化へのTOPICS-** 35-36 (2014)
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・教授
 研究者番号: 60345022