

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462056

研究課題名(和文) NKT細胞の自然免疫と獲得免疫のクロストークを用いた癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer treatment harnessing NKT cells with a cross-talk of innate and acquired immunity

研究代表者

山下 公大 (Yamashita, Kimihiro)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：80535427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：-Galactosylceramide(-Gal)を樹状細胞(dendritic cell ;DC)に付加して投与する方法(DCG療法)とされるが、本研究の目的は、同種異系DCGが自然免疫と獲得免疫に直接作用し、抗腫瘍効果という点で同種同系DCGより強力に働くことをNKT細胞のマウス肺転移治療モデルでその有用性を示すことである。また、同種異系DCGに腫瘍抗原を導入し、腫瘍抗原特異的なT細胞を誘導することにより、その分化の程度と機能を解析するシステムを作成する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is show allogeneic DCG will work stronger than syngeneic DCG in terms of anti-tumor effect in mouse lung metastasis treatment model of NKT cells that act on the innate and acquired immunity system. By introducing tumor antigen into allogeneic or syngeneic DCG, we will elucidate to generate tumor antigen-specific T cells in this system, and moreover, we will create the system to analyze the functions and sequential differentiation of them.

研究分野：消化器外科学

キーワード：腫瘍免疫 NKT細胞 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

NKT細胞は、そのリガンドである α -Galactosylceramide (α -Gal) を樹状細胞 (dendritic cell ; DC) に付加して投与する方法 (DCG療法) により、NK細胞を中心とする自然免疫を発動させ、肺転移に対し強力な抗腫瘍活性を示す。このシステムを用いて腫瘍抗原の同時投与により、獲得免疫系である腫瘍反応性CD8+T細胞及びCD4+細胞が誘導される。NKT細胞を用いた肺転移モデルを用いて、NKT細胞が発動する肺転移におけるNK細胞の機能、細胞傷害性T細胞を中心とする獲得免疫の発動についてのメカニズムが十分解析されていない状況であった。

2. 研究の目的

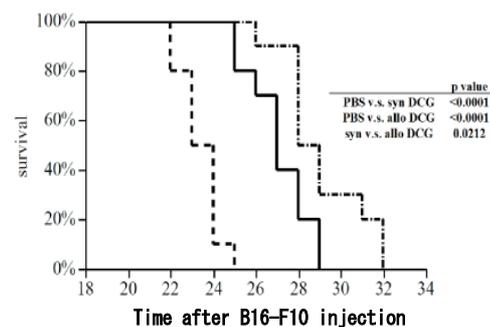
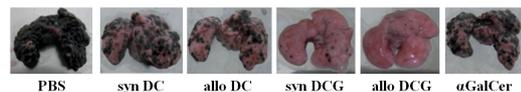
同種異系由来樹状細胞に α -Gal を付加して投与する allogeneic DCG療法が高い抗腫瘍効果があることを示し、同時に獲得免疫系に有利に働くことを示すことを第一の目的とする。自然免疫と獲得免疫を同時に作動するDCG療法のメリットをCD40や肝障害を含めて解析し、その有用性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

同種異系の組み合わせとして、C57/BL6およびBALBcの組み合わせを用いる。同種異系由来樹状細胞に α -Gal を付加して投与する allogeneic DCG療法で肺転移治療モデルにおいてより高い抗腫瘍活性があることを示し、同種異系由来樹状細胞に電気的穿孔法 (electroporation; EP法) により腫瘍タンパク抗原を導入し α -Gal を付加した抗原 (EP-allogeneic/semiallogeneic DCG) として、投与経路依存的な治療効果をNKT細胞、腫瘍反応性CD8+T細胞の活性化を評価する。同時にNKT細胞の機能に抑制的に作用する骨髄由来免疫抑制性細胞について検討する。また、DCGにおける獲得免疫への作用の解析として、CD40-CD40Lの相互作用に着目し、解析した。

4. 研究成果

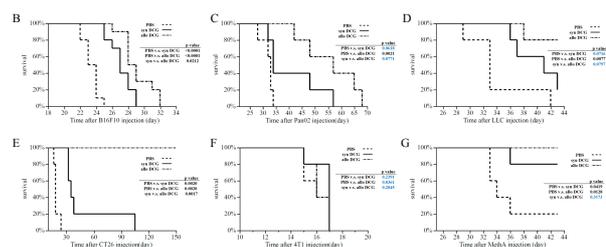
- (1) 同種異系由来樹状細胞に α -Gal を付加して投与する allogeneic DCG療法で肺転移治療モデルにおいてより、同等以上の効果があり、状況や癌腫 (細胞株種) により、極めて有効な場合があることが明らかとなった。同時にこの反応は、肺NK細胞を強力に活性化していることを確認した。また、 α -Gal による再刺激後の interferon- γ 産生については、肺での allogeneic DCG 刺激によるものが亢進していることを示した。宿主 DC における CD40 の発現の異常は認められなかった。



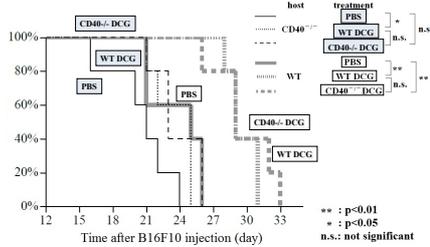
Allo DCG 治療群は Syn DCG 治療群に対して、肺転移モデルにおいて、同等の治療効果を示した。

他の癌種に変更しても、宿主を変更した場合でも、Allo DCG 治療群は、抗腫瘍効果が発揮された。場合によっては有意差を持って、治療効果があった組み合わせがあった。

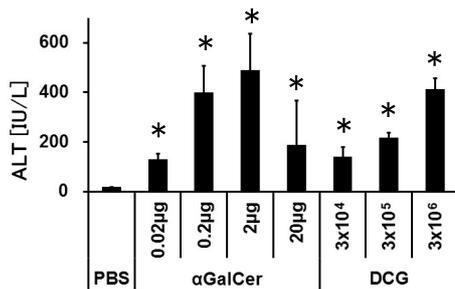
CD8+T 細胞の活性化を示唆する所見が認められ、抗腫瘍免疫応答が獲得免疫にも作用している可能性が示唆された。



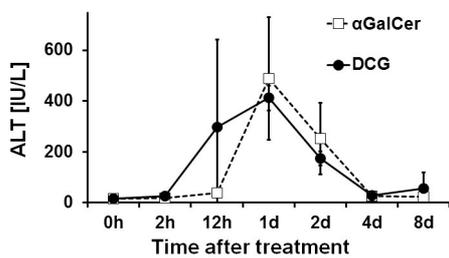
(2) 同種異系由来樹状細胞の解析において、CD40-CD40L の相互作用には同系と比較して、明らかな変化はなかった。同実験系で CD40-CD40L の相互作用が肺転移モデルにおいて、投与 DC ではなく、宿主に必須であることをと直接示すことができた。



(3) NKT 細胞療法のデメリットとして問題視されている肝障害であるが、DCG ではその程度が、 α -Gal 単独投与に比べて抑制されることを示した。



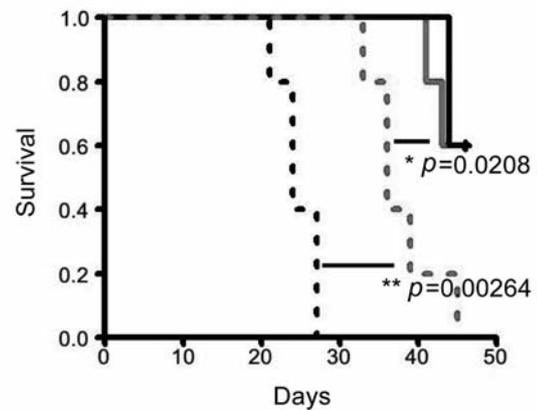
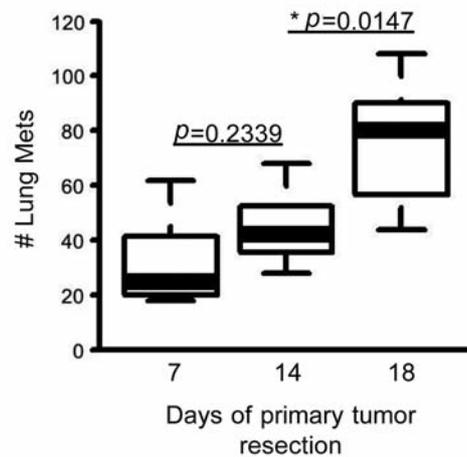
DCG は α -Gal と同様に投与後、肝障害を示し、ALT の上昇を促すことがある。この障害は用量依存的であると言える。



経時的に肝障害の程度を見ると、DCG の方がやや早期に障害が始まるのがわかる。血管内皮細胞が α -Gal を介した肝障害関与していることを示した。

(4) NKT 細胞に対し、抑制的に作用する MDSC であるが、allogeneic DCG 療法を用いても syngeneic DCG 療法と比べて MDSC を特

異的に抑制することはなかった。一方で、腫瘍の肺転移の過程で MDSC が関与することを示した。病態を MDSC が反映し、これを調節することで肺転移の程度を抑制することを示した。



原発巣を早期切除すれば、肺転移の程度は抑制され、生存期間が延長する可能性が示唆された。

電気的穿孔法を用いたタンパク導入システムは現在も解析中である。mOVA を DC に導入したシステムでは抗原特異的 T 細胞が作動することが示唆された。同系を用いて、Allo DCG の効果を検証する予定である。

期間は終了したが、引き続き NKT 細胞の抗原特異的反応には解析を進めている。

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 6 件)

① Hasegawa H, Yamashita K, Otsubo D, Takeji Y. Liver injury after invariant NKT cells activation by free alpha-galactosylceramide and alpha-galactosylceramide-loaded dendritic cells. Anticancer Res. 2016(in press)

② Yamashita K, Hasegawa H, Fujita M, Nishi M, Tanaka T, Arimoto A, Suzuki S, Kamigaki T, Takeji Y. Host CD40 is essential for DCG treatment against metastatic lung cancer. Anticancer Res. 2016(in press)

③ Otsubo D, Yamashita K, Fujita M, Nishi M, Kimura Y, Hasegawa H, Suzuki S, Takeji Y. Early-phase Treatment by Low-dose 5-Fluorouracil or Primary Tumor Resection Inhibits MDSC-mediated Lung Metastasis Formation. Anticancer Res. 35 巻. 4425-4431. 2015.

④ 山下 公大、西 将康、掛地 吉弘、癌の遺伝子診断・治療 (総説)、消化器外科学レビュー2015-'16、2015、186-190

⑤ Hasegawa H, Yamashita K, Otsubo D, Fujii S, Kamigaki T, Kuroda D, Takeji Y. Allogeneic DCG promote lung NK cell activation and antitumor effect after invariant NKT cell activation. Anticancer Res. 査読有. 34 巻. 3411-3417. 2014

⑥ Kamigaki T, Kaneko T, Naitoh K, Takahara M, Kondo T, Ibe H, Matsuda E, Maekawa R, Goto S. Immunotherapy of autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccines by a closed-flow electroporation system for solid tumors. 査読有. 33 巻. 2791-2796. 2013

[学会発表] (計 3 件)

① 山下 公大、西 将康、田中 智子、山本将士、金治 新悟、金光 聖哲、角 泰雄、

中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、NKT 細胞活性化の抗腫瘍効果におけるアロ樹状細胞の有用性、第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会、2015. 7. 23-24、シティプラザ大阪 (大阪府)

② Yamashita K, Fujita M, Nishi M, Otsubo D, Suzuki S, Takeji Y. Early-phase administration of low-dose 5-fluorouracil and early-phase resection of the established melanoma prevents the formation of lung metastases by inhibiting MDSC generation and accumulation. The International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015 (ICCIM2015). 2015. 7. 9-11. 東京大学 (東京都)

③ 山下 公大、転移性肺腫瘍に対する治療標的としての腫瘍誘導性骨髄由来抑制細胞、第 25 回日本消化器癌発生学会総会、2014. 11. 13-14、ホテル日航福岡 (福岡県)

④ 山下 公大、肺転移における骨髄由来抑制性細胞の役割、第 22 回日本癌病態治療研究会、2013. 6. 27-28、ホテル日航東京 (東京都)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 公大(YAMASHITA Kimihiro)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80535427

(2) 研究分担者

角 泰雄(SUMI Yasuo)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：00529521

中村 哲(NAKAMURA Tetsu)

神戸大学・医学部附属病院・助教

申請者番号：10403247

神垣 隆(KAMIGAKI Takashi)

神戸大学・大学院医学研究科・客員教授

申請者番号：20372641

掛地 吉弘(KAKEJI Yoshihiro)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

申請者番号：80284488

(3) 連携研究者

なし