

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861119

研究課題名(和文)抗体療法併用NKT細胞治療による新規複合免疫療法の開発研究

研究課題名(英文)Development of a novel combination immunotherapy with NKT cells and antibody therapy

研究代表者

鎌田 稔子(Kamata, Toshiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60586692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトNKT細胞におけるPD-1/PDL1の詳細な検討の報告は少ない。本研究では、活性化NKT細胞や肺癌患者由来のNKT細胞表面上のPD-1発現上昇を明らかとした。抗原提示細胞や癌細胞表面に発現したPD-1リガンド(PDL1)の阻害にて、NKT細胞のサイトカイン産生能や殺細胞能が改善することを明らかとした。さらに、他の免疫細胞を活性化し、抗腫瘍効果の増強も示唆された。NKT細胞免疫治療への抗PD-1/PDL1抗体の併用により治療効果改善につながる可能性があり、将来の臨床試験実施のためのエビデンスを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：There are few researches on the function of PD-1/PDL1 in human NKT cells. In our research, we found that PD-1 was upregulated in activated NKT cells and NKT cells derived from lung cancer patients. Cytokine secretion and anti-tumor functions of NKT cells improved when the ligand for PD-1 (PDL1) was blocked on antigen presenting cells and tumor cells. We also found that these NKT cells improved anti-tumor immunity through interaction with other immune cells. Our results imply that the combination of anti-PD-1/PDL1 with NKT cell-mediated immunotherapy would improve the treatment outcomes in cancer patients. These data may become the basis for future clinical trials.

研究分野：肺癌免疫治療、外科治療

キーワード：NKT細胞治療 抗PDL1抗体 癌免疫治療

1. 研究開始当初の背景

切除不能進行期肺癌に対するNKT細胞免疫治療の臨床研究は2012年より先進医療として行われているが、多くの症例では、免疫不応状態の打破による治療効果改善が大きな課題である。

活性化リンパ球表面に発現するprogrammed death-1 (PD-1)受容体は、癌細胞表面や抗原提示細胞上に発現するリガンド(PD-L1、PD-L2)と結合することで、リンパ球の活性を抑制する。マウスNKT細胞やヒトT細胞においては、PD-1/PD-L1の相互作用の阻害で、抗腫瘍効果が改善することが報告されている

2. 研究の目的

抗PD-1/PD-L1阻害抗体により、ヒトNKT細胞の抗腫瘍効果やサイトカイン産生能が増強することを解明する。その成果をもとにNKT細胞免疫療法に抗体療法を併用した複合免疫療法の臨床研究を実施することを目指す。

3. 研究の方法

① 発現の評価

健常人及び原発性肺癌患者の血液検体を用いて、NKT細胞を単離し、細胞表面上のPD-1を抗体で標識し、採取時及び活性化時のPD-1の発現を検討した。

② 増殖能、サイトカイン産生能の評価

健常人及び肺癌患者のNKT細胞を培養し、抗原提示細胞で刺激する際に、PDL1に対する阻害抗体を併用し、増殖能やサイトカイン産生能を比較検討した。さらに抗PDL2抗体、抗PD-1抗体を用いたサイトカイン産生能の評価も行なった。

③ 抗腫瘍活性の評価

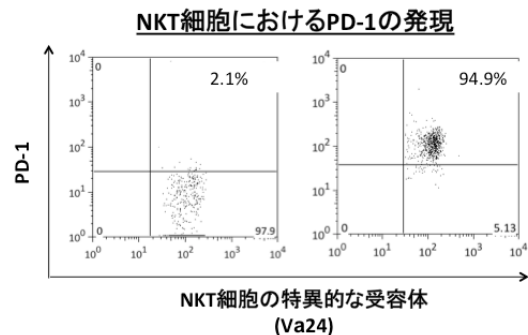
健常人より単離し、培養したNKT細胞を肺癌細胞株と4時間共培養し、死滅した腫瘍細胞から遊離するLDHの濃度を測定することで、抗腫瘍活性を評価した。抗PDL1抗体を併用した際の効果を比較検討した。更に、刺激時に抗PDL1抗体を併用したNKT細胞とNK細胞を24時間共培養した後に、活性化したNK細胞を単離し、その抗腫瘍活性の評価も行った。

④ 重症免疫不全マウスを用いた、肺癌モデルの作成

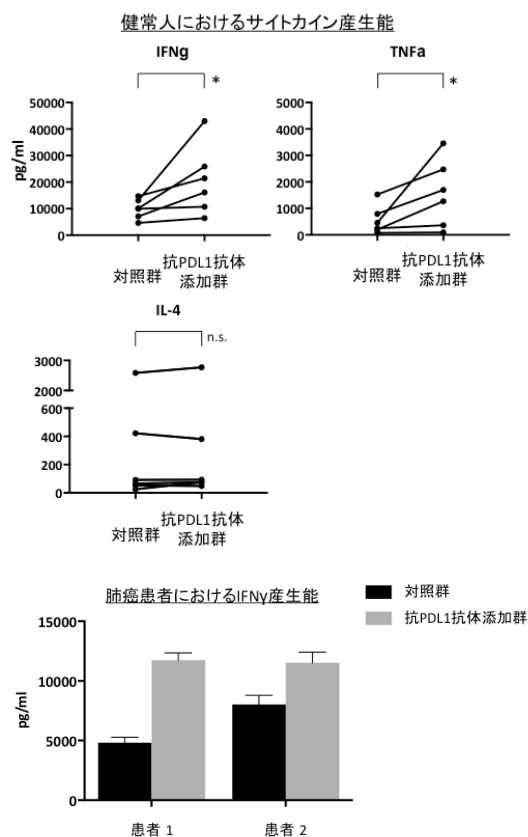
ヒト肺癌細胞株にluciferaseという酵素を遺伝子導入し、基質を加えると発光する細胞株を作成した。重症免疫不全マウスに静脈内投与することで、肺への生着を確認でき、発光を測定することで、生存したまま継続的に腫瘍の増殖が評価できる系を樹立した。この系を用いて、ヒトNKT細胞を投与した際の抗腫瘍効果の評価を行い、マウスにおける有効性及び安全性の確認を行う。

4. 研究成果

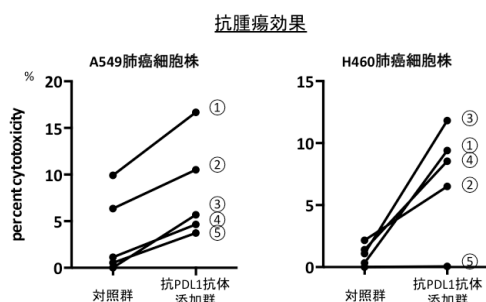
① 健常人のNKT細胞において、PD-1は低いレベルで発現しているが、刺激により活性化するとその発現が上昇することがわかった。また切除不能・進行期の原発性肺癌患者では、NKT細胞上のPD-1の発現は健常人と比較して高いことがわかった。



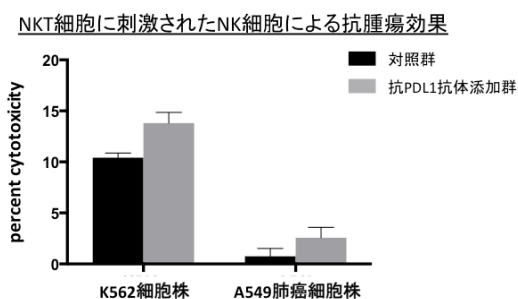
② NKT細胞を刺激する際に抗PDL1抗体を併用しても、NKT細胞の増殖能の明らかな改善は認めなかった。サイトカイン産生については、特に抗腫瘍効果に関連するTh1サイトカインの産生が改善することが、健常人・肺癌患者いずれでも確認された。このことは、過去に報告されたマウス実験の結果と合致する。ヒトにおいて検討を行なった論文は少なく、特に癌患者検体での詳細な評価は、NKT細胞数の観点から困難であるため、非常に有用な成果と考える。



③ 健常人 5 例から得られた検体を用いて NKT 細胞の直接的な抗腫瘍活性の評価を行なった。NKT 細胞培養時・腫瘍認識時に PDL1 を阻害することで、肺癌細胞株に対する抗腫瘍効果が改善した。



さらに PDL1 を阻害して刺激した NKT 細胞は NK 細胞と相互作用することで、NK 細胞の殺細胞能も改善することが示唆された。



これらの結果から、PD-1/PDL1 の相互作用を阻害することで、NKT 細胞の抗腫瘍効果に関連した機能が改善することが、*in vitro* でわかった。この成果を論文として発表した。

④ A549 肺癌細胞株を肺に生着したマウスモデルを作成し、ヒト NKT 細胞を投与して、腫瘍の縮小を確認する研究を行っている。今後、抗 PD-1/PDL1 抗体を加えた系での、抗腫瘍効果の比較検討を予定している。

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 2 件)

① Kamata T, Suzuki A, Mise N, Ihara F, Takami M, Makita Y, Horinaka A, Harada K, Kunii N, Yoshida S, Yoshino I, Nakayama T, Motohashi S.

Blockade of programmed death-1/programmed death ligand pathway enhances the antitumor immunity of human invariant natural killer T cells.

Cancer Immunology Immunotherapy. 査読有、2016 Dec;65(12):1477-1489.

DOI:10.1007/s00262-016-1901-y

② Mise N, Takami M, Suzuki A, Kamata T, Harada K, Hishiki T, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ikeuchi T, Nakayama T, Yoshida H, Motohashi S

Antibody-dependent cellular cytotoxicity toward neuroblastoma enhanced by activated invariant natural killer T cells.

Cancer Science. 査読有、2016 Mar;107(3):233-41.

DOI:10.1111/cas.12882

[学会発表] (計 7 件)

① Blockade of PD-1/PDL1 in iNKT cell mediated antitumor immunity

Toshiko Kamata, Akane Suzuki, Naoko Mise, Yuji Makita, Atsushi Horinaka, Naoki Kunii, Shigetoshi Yoshida, Ichiro Yoshino, Toshinori Nakayama, Shinichiro Motohashi
第 44 回日本免疫学会学術集会

平成 27 年 11 月 19 日

札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

② Blockade of Programmed Death-1/Programmed Death Ligand pathway enhances the antitumor immunity of human invariant Natural Killer T cells

Toshiko Kamata, Akane Suzuki, Yuji Makita, Naoki Kunii, Toshinori Nakayama, Shinichiro Motohashi

第 19 回日本がん免疫学会

平成 27 年 7 月 9 日

伊藤国際学術研究センター (東京都文京区本郷)

③ 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

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
第 55 回日本肺癌学会学術集会
平成 26 年 11 月 15 日
国立京都国際会館（京都府）

④ 原発性肺癌患者における NKT 細胞免疫
治療と PDL1 阻害療法の有用性
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, 溝渕輝明,
吉野一郎
第 31 回日本呼吸器外科学会
平成 26 年 5 月 29 日
ホテル日航東京（東京都）

⑤ 神経芽腫細胞に対する NKT 細胞による
ADCC 増強効果の検討
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, 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
第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会
平成 25 年 11 月 30 日
ヒルトン福岡シーホーク（福岡県福岡市）

〔図書〕（計 0 件）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鎌田 稔子 (KAMATA Toshiko)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：60586692

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者
本橋 新一郎 (MOTOHASHI Shinichiro)
千葉大学大学院医学研究院・免疫細胞医学・
教授
研究者番号：60345022