

研究報告書  
令和3年度：A課題

令和5年4月26日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 千葉大学大学院医学研究院

住所 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1

研究者氏名 高見 真理子

(研究課題)

肺癌をターゲットとする二重特異性抗体を用いた新規NKT細胞療法の開発とそのメカニズム解析

---

令和4年1月24日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## [研究の目的]

原発性肺癌は、罹患率・死亡率ともに高い難治性の癌であり、新規治療法の開発が求められている。当施設では、強力な抗腫瘍効果を発揮する自然免疫系リンパ球 Natural Killer T (NKT) 細胞を用いた癌免疫療法として、NKT 細胞が特異的に認識する $\alpha$ -ガラクトシルセラミド ( $\alpha$ -GalCer) をパルスした樹状細胞により、*in vivo* で NKT 細胞を活性化させる臨床試験を行ってきた。本研究では、汎用性が高くより強力な NKT 細胞療法の開発を目的とした。

これまでの予備実験から、NKT 細胞が低い抗腫瘍活性しか示さない白血球細胞株 (K562 細胞) に対し NKT 細胞の T cell receptor (TCR) を認識する抗体 (NKT-TCR 抗体) を低容量添加することで、腫瘍上で発現する FC レセプター依存的に強力な細胞傷害活性を発揮するという現象を見出した。肺癌細胞は FC レセプターを発現しないことから、NKT-TCR 抗体添加による効果は確認されなかった。そこで、肺癌細胞の腫瘍抗原の一つとされる HER-2 と NKT 細胞上の TCR を認識する二重特異性抗体 (CD3-HER2 抗体) の添加が肺癌に対しての細胞傷害活性を増強させるという仮説に基づいて研究を行なった。

## [研究方法と結果]

### *In vitro* での CD3-HER2 抗体が NKT 細胞の肺癌に対する抗腫瘍活性に与える影響及びそのメカニズム解析

健康人末梢血より単核球を分離し、 $\alpha$ -GalCer 及び IL-2 を添加し *ex vivo* で培養した NKT 細胞を実験に用いた。ヒト NKT 細胞に CD3-HER2 抗体を添加することで肺癌細胞株 (A549 細胞、Calu3 細胞、H460 細胞) への細胞傷害活性を CD107a アッセイにより NKT 細胞の脱顆粒を測定し、LDH アッセイにより腫瘍の細胞死のレベルを測定した。コントロールの CD3-HER2 抗体を添加していない NKT 細胞は、肺癌細胞株に対して全く細胞傷害活性を示さなかったのに対して、CD3-HER2 抗体添加した NKT 細胞は高い細胞傷害活性を示した。さらに、CD3-HER2 抗体を添加した NKT 細胞は、A549 細胞と共培養すると IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  などのサイトカインも産生することが明らかになった。

### *In vivo* での NKT 細胞療法・CD3-HER2 抗体投与による併用療法の有効性の検証

CD3-HER2 抗体を用いた NKT 細胞新規併用療法の有効性のエビデンスを構築するために、重度免疫不全 NSG マウスに A549 を尾静脈投与した肺転移モデルを作成し、ヒト NKT 細胞を投与することで肺癌の免疫療法を再現した。CD3-HER2 抗体を添加した NKT 細胞は、コントロールの NKT 細胞のみ投与した群に比較して腫瘍の増殖が抑制された。また、腫瘍局所からリンパ球を分離しヒト NKT 細胞の割合、活性化マーカーである CD25 の発現を確認したところ、CD3-HER2 抗体を添加した NKT 細胞は、コントロールの NKT 細胞のみ投与した群に比較して、腫瘍局所への NKT 細胞の集積割合が増加し、CD25 の発現が上昇していることが明らかとなった。

## [考察と今後の展望]

CD3-HER2 抗体の添加が、NKT 細胞を肺癌細胞と近接させ、さらに NKT 細胞を活性化させて細胞傷害活性を誘導することが明らかとなった。NKT 細胞は、腫瘍細胞認識に関わる NK レセプターなどを発現しているため、それらのレセプターと CD3-HER2 抗体により誘導される活性化シグナルの相互作用によるものなのか、今後検討する必要がある。また、*in vivo* の肺癌マウスモデルでは、CD3-HER2 抗体添加により NKT 細胞の抗腫瘍効果が増強され腫瘍の増殖を抑制したが、抗体投与の量やタイミングの検討により、今後より強力な NKT 細胞併用療法の確立を目指していきたいと考える。