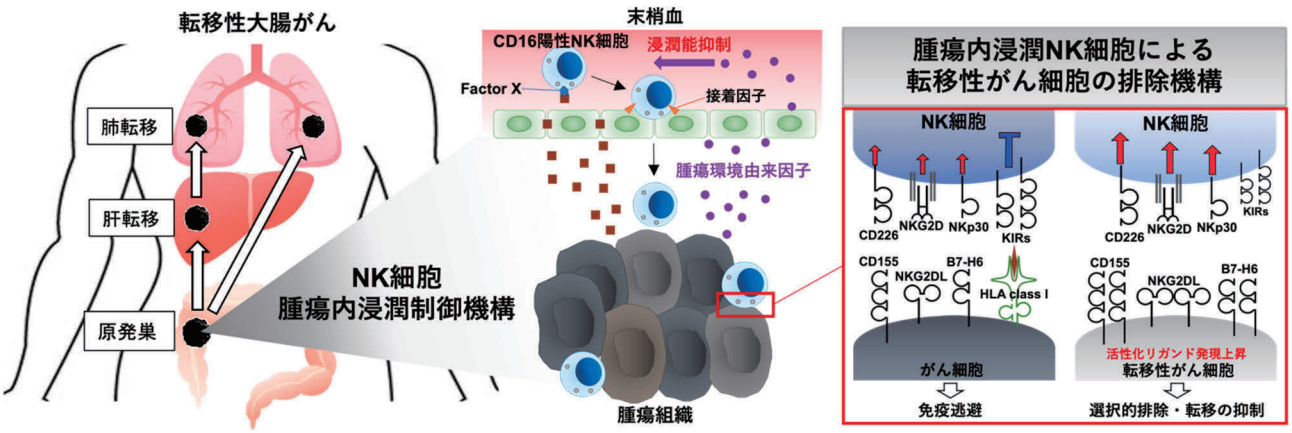
117　大腸がんに対する、NK細胞浸潤を介した新規治療法樹立	奥村　元紀

【目的】大腸がんは肺や肝臓に転移しやすく、両臓器に転移が認められる場合、5 年生存率は 12.7%と予後不良である。近年、抗腫瘍免疫応答を再活性化する免疫チェックポイント阻害剤により、一部の患者において予後を改善する結果が得られているものの、未だ大多数で効果が認められず、新規治療戦略の提案が急務である。我々は、転移性がん細胞の排除を担うとされる NK 細胞に着目している。前立腺がんやメラノーマにおいて、NK 細胞が転移を抑制することが示唆されている。しかしながら、NK 細胞は MHC クラス I をリガンドとする抑制性受容体を発現するため、MHC クラス I 陽性の固形がんにおける NK 細胞浸潤の重要性については不明な点も多い。さらに、網羅的解析技術の進歩とメタ分析により、乳がんや大腸がんなど一部の固形がんにおいて、NK 細胞の浸潤が多い患者で有意に死亡率が低下することが報告されたが、NK 細胞浸潤を制御するメカニズムについても同様に明らかになっていない。そこで、本研究では、転移性大腸がん患者検体を用いた、原発巣浸潤 NK 細胞の機能解析及び腫瘍内浸潤メカニズムの解明により、大腸がんの転移を抑制する新規治療法の樹立を目的とする。

【方法】原発巣の病理組織標本 FFPE を用いた多重免疫染色により、NK 細胞を始めとした腫瘍内浸潤免疫細胞の局在及び機能を解析した。同時に、NK 細胞ががん細胞を排除する際に必要とする活性化受容体のリガンド（NKG2DL、CD155、B7-H6 など）の発現についても検証した。同一患者由来の原発巣浸潤免疫細胞と末梢血単核細胞のフローサイトメトリー解析により、NK 細胞サブセットの機能解析、浸潤を制御すると予想されるケモカインレセプター及び接着因子の発現を解析し、NK 細胞浸潤と相関する因子を探索した。NK 細胞の浸潤能について、トランズウェルやフローサイトメトリー法により評価した。さらに、NK 細胞の浸潤能を制御する因子の網羅的探索のため、血漿プロテオーム解析を行った。

【結果】FFPE を用いた多重免疫染色では、転移のない患者に比べて、転移のある患者では、NK 細胞浸潤が少なかった。さらに活性化リガンドである B7-H6 の発現レベルと NK 細胞浸潤には負の相関があることが明らかになり、B7-H6 陽性のがん細胞を優先的に排除している可能性が示唆された。フローサイトメトリー解析では、原発巣浸潤 NK 細胞が少ない患者では、末梢血 NK 細胞のケモカインレセプターX の発現が低下していることがわかった。さらに、その患者集団の血漿を、健常者末梢血 NK 細胞に処置すると、Factor X の発現が低下した。数種類の大腸がん細胞株の培養上清を用いた同様の実験系においても同様に、NK 細胞の Factor X の発現を低下させる細胞株が同定された。患者血漿プロテオーム解析を行い、24 種類のタンパク質が同定されたが、NK 細胞の浸潤を制御する因子の特定には至っておらず、解析中である。

本研究の概略図



117. 大腸がんに対する、NK 細胞浸潤を介した新規治療法樹立

奥村　元紀

国立がん研究センター 先端医療開発センター 免疫 TR 分野

Key words：大腸がん，NK 細胞，転移，腫瘍内浸潤，免疫逃避

緒　言

NK 細胞は自然免疫系に属し、腫瘍免疫監視を担う細胞である。T 細胞と異なり、TCR を発現しないが、NKG2D や DNAM-1 など活性化受容体ががん細胞に発現するリガンド NKG2DL、CD155 とそれぞれ結合することで、NK 細胞に活性化シグナルが伝達され、迅速にがん細胞を排除する。私はこれまで DNAM-1 に着目して研究を行い、がん細胞由来可溶型 CD155 が DNAM-1 に結合することで、NK 細胞の細胞傷害活性が抑制されることを、マウス肺転移モデルを用いて、世界で初めて明らかにした［1］が、ヒト腫瘍環境において NK 細胞の細胞傷害活性や腫瘍内浸潤を制御する腫瘍由来分泌型因子は未だほとんど同定されていない。NK 細胞は MHC クラス I をリガンドとする抑制性受容体を発現するため、MHC クラス I 陽性の固形がんにおける NK 細胞浸潤の重要性については不明な点も多い中、近年は転移性がん細胞を排除する可能性があることを示唆する論文が多数報告されている［2］。しかしながら、そのメカニズムについては細胞株レベルの解析に留まっており、実際の患者検体を用いた解析はほとんど行われていない。

大腸がんにおいては、転移の制御が大きな課題となっており、転移のきっかけとなる EMT（Epithelial-Mesenchymal Transition：上皮間葉転換）やがん幹細胞の発生に着目した研究が世界中で行われている。大腸がんに対する標準化学療法は、5-FU（フルオロウラシル）と LV（レボホリナート）の併用療法などが主に用いられるが、がん幹細胞は治療耐性を示すことが知られており、さらに、5-FU 自体が大腸がんの EMT を促進することも近年報告された［3］。NK 細胞による直接的な転移性がん細胞排除は未だ報告されていないものの、NK 細胞の浸潤が多い患者で有意に死亡率が低下することが報告されている［4］。一方で、NK 細胞浸潤を規定する因子については未だ明らかになっておらず、浸潤制御メカニズムの解明により、腫瘍内への NK 細胞浸潤を促すことによって、抗腫瘍免疫の活性化が期待できる。

本研究では、上に記した「NK 細胞による転移性がん細胞の排除メカニズム解明」及び「NK 細胞の腫瘍内浸潤メカニズム解明」の二本立てで研究を進めてきた。

病理組織標本を用いた多重免疫染色では、NK 細胞の腫瘍内浸潤と NK リガンド B7-H6 の発現に相関があることを見出し、フローサイトメトリー法により、NK 細胞の細胞傷害活性に対して感受性、耐性を示す細胞集団をそれぞれ同定することができた。さらに、腫瘍内では NK 細胞が多い領域と少ない領域があることがわかり、不均一性が示唆された。NK 細胞浸潤を制御する因子の探索のため、腫瘍内浸潤が少ない患者の末梢血 NK 細胞におけるケモカインレセプターの発現を解析すると、Factor X の発現が低下していることがわかり、がん細胞株を用いた培養実験から、がん細胞由来の可溶型因子である可能性が見出された。血漿プロテオーム解析により、Factor X 発現が低下している患者の末梢血中で対象群に比べ濃度が特に変動している可溶型因子を 24 種類同定したが、NK 細胞の Factor X 発現に影響を与える因子の特定には至っておらず、さらなる解析が必要である。

今後は、NK 細胞の細胞傷害に対して耐性を示す細胞集団が発生する分子メカニズムを解明するとともに、NK 細胞浸潤を制御する特定因子を標的とした抗体及び低分子化合物による治療効果について、マウスモデルを用いた検証も計画している。

方法および結果

1. 多重免疫染色を用いた NK 細胞浸潤と NK リガンド発現の解析

国立がん研究センター東病院との連携により、院内のアーカイブ病理組織標本を使用することが可能であり、本研究では遠隔転移のある患者の原発巣 FFPE（n＝9）と遠隔転移のない原発巣 FFPE（n＝10）を多重免疫染色に用いた。Opal 多重免疫染色システムを使用し、NK 細胞及び T 細胞を同定するマーカーと機能マーカーを含むパネルを樹立した（図 1A）。腫瘍内浸潤 NK 細胞数を比較した結果、転移のある患者では NK 細胞浸潤が有意に少ないことが示され、細胞傷害活性のマーカーである Granzyme B 陽性の NK 細胞についても同様であった（図 1B）。さらに、正常組織とがん組織が混在する検体（n＝12）について、NK 細胞浸潤を両領域で比較すると、T 細胞はがん領域で増加していたが、NK 細胞は減少していることがわかった（図 1C）。

腫瘍内浸潤 NK 細胞が排除しているがん細胞集団を推測するため、NK 細胞が細胞傷害活性を発揮するために重要な活性化受容体 NKG2D、DNAM-1、NKp30 のリガンド発現を多重免疫染色により評価した。具体的には、MICA/B、ULBPs、CD155、B7-H6、HLA class I、Pan-CK、を含むパネルで染色し、NK 細胞の浸潤との相関を解析した。その結果、NK 細胞浸潤と B7-H6 発現強度が負の相関を示すことが明らかになった（図 1D）。

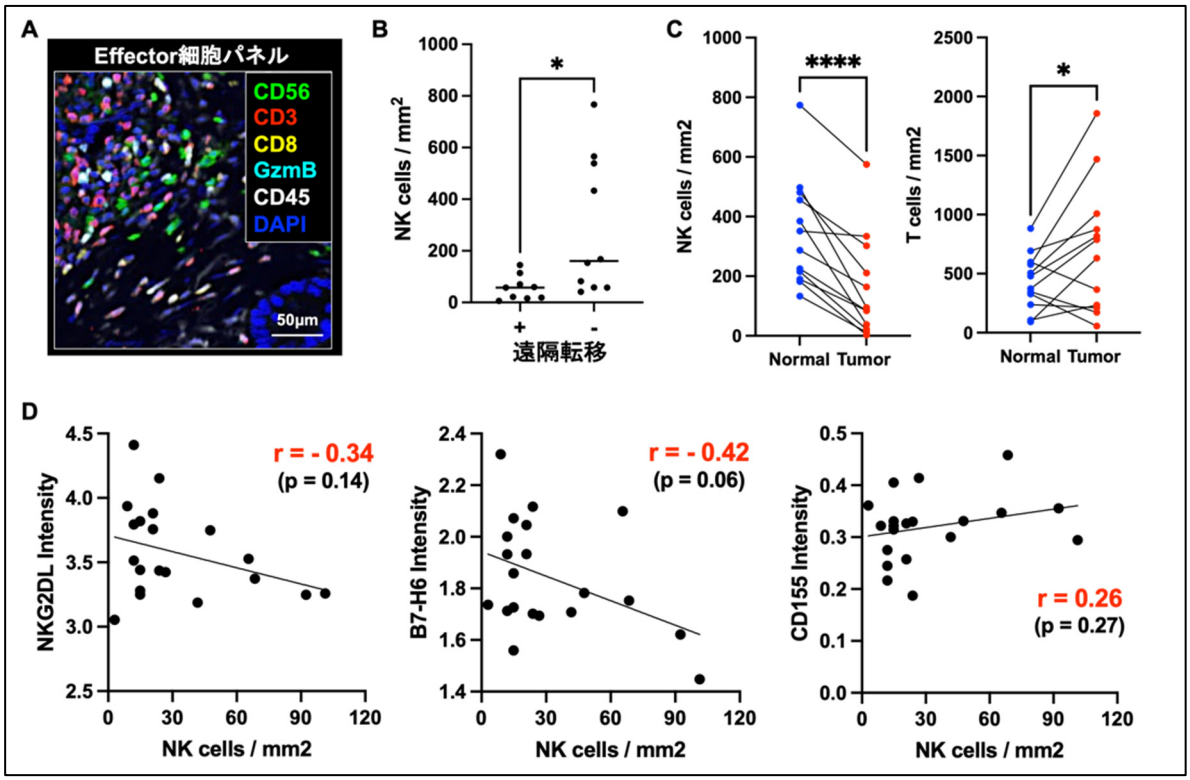


図 1. NK 細胞浸潤と活性化リガンドの発現解析

A） Opal 多重免疫システムにより NK 細胞と T 細胞を評価するパネルを作製した。

B） 遠隔転移の有無と NK 細胞の浸潤を比較した。*p＜0.05（Unpaired T test）。

C） 正常領域とがん領域における NK 細胞及び T 細胞の浸潤を比較した。
****p＜0.0001、 *p＜0.05（Paired T test）。

D） 各活性化リガンドと NK 細胞浸潤数の相関を解析した。r＝相関係数。

2. フローサイトメトリー法による、腫瘍内浸潤 NK 細胞と末梢血 NK 細胞の解析

ヒト NK 細胞は主に 2 種類のサブセットが存在する。$CD56^{dim}CD16^{hi}$ で表現される NK 細胞は細胞傷害活性を有する成熟 NK 細胞であり、約 90%を占める。一方で、$CD56^{bright}CD16^{low}$ で表現される細胞は未熟 NK 細胞である。どちらのサブセットも特異的なケモカインレセプターが発現しているが、何が腫瘍内浸潤を制御するのか解析が乏しい。また、LFA-1 などの接着分子も、NK 細胞の浸潤を制御すると考えられている［5］。そこで、凍結保存されている大腸がん組織由来の腫瘍浸潤細胞及び末梢血単核細胞のペア検体（n＝13）について、フローサイトメトリー法により各サブセットにおける活性化受容体（NKG2D、DNAM-1、NKp30）、抑制性受容体（TIGIT、NKG2A、PD-1、LAG-3、Siglec-7）、ケモカイン受容体、接着分子の発現を解析した（図 2A）。興味深いことに、健常者末梢血 NK 細胞と比べて、CD16 陽性 NK 細胞における Factor X や CD16 陰性 NK 細胞における Factor Y の発現が低下していることを観察した（図 2B）。

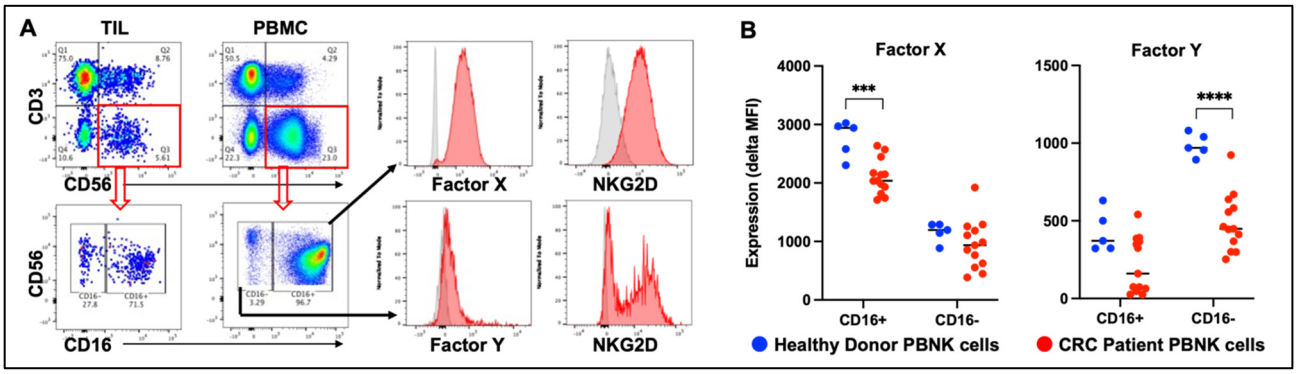


図 2. Factor X の発現が CD16 陽性 NK 細胞において低下していた

A） 腫瘍内浸潤 NK 細胞と末梢血 NK 細胞をマルチカラーフローサイトメトリー法により　解析した。代表的な Dot Plot と Histogram を示す。

B） 健常者末梢血 NK 細胞と患者末梢血 NK 細胞における Factor X 及び Factor Y 発現を比較した。****p＜0.0001、***p＜0.001（Unpaired T test）。

3. 患者血漿を用いたプロテオーム解析

がん細胞由来可溶型因子が CD16 陽性 NK 細胞の Factor X 発現を低下させるのか調べるため、5 種類の大腸がん細胞株の培養上清の存在下で健常者末梢血 NK 細胞を培養し、フローサイトメトリー法にて発現を解析した。その結果、SW620 を除く細胞株の培養上清で処理した際に Factor X 発現が低下した（図 3A）。Factor X 現低下により、NK 細胞の遊走能が低下するか調べるため、Transwell を用いた Migration assay を行った。Transwell の下層には Factor X のリガンドケモカインを加え、上層には細胞株の培養上清で前処理した NK 細胞（CFSE で蛍光標識）を加え、37℃インキュベーターで 2 時間反応させた。反応後、蛍光顕微鏡にて浸潤した NK 細胞数をカウントし、Factor X 依存的な浸潤を計算した。その結果、NK 細胞の Factor X 発現低下に伴い、ケモカイン依存的な NK 細胞の細胞遊走が抑制されることがわかった（図 3B）。

患者由来末梢血中に、CD16 陽性 NK 細胞の Factor X 発現を低下させる可溶型因子が循環しているか調べるため、患者血漿（n＝19）の存在下で健常者末梢血 NK 細胞を培養し、同様に Factor X 発現を解析した。その結果、一部の患者由来血漿で処理した NK 細胞の Factor X 発現が低下した（図 3C）。

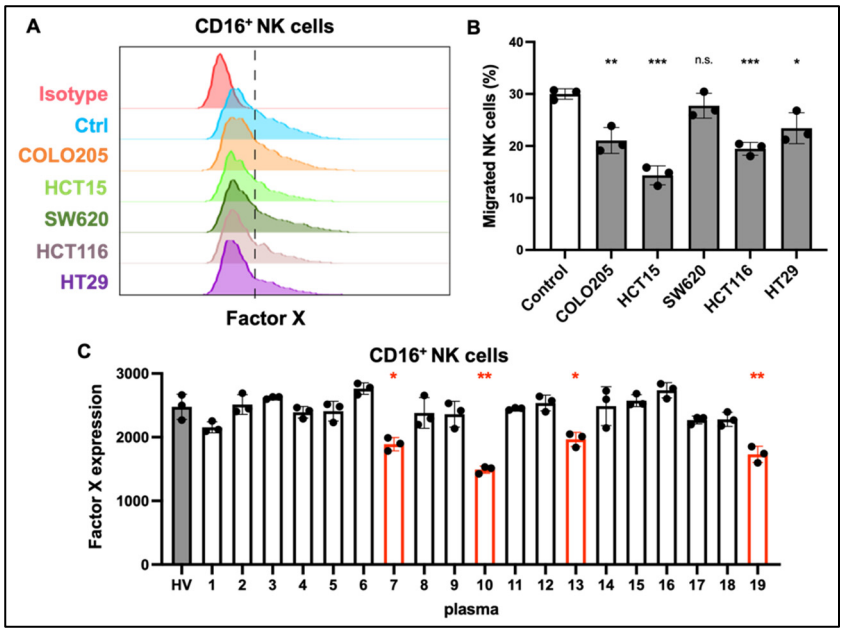


図 3. がん細胞由来可溶型因子が Factor X 発現を低下させた

A) 5 種類の大腸がん細胞株の培養上清の存在下で、健常者末梢血 NK 細胞を培養し、Factor X 発現強度をフローサイトメトリー法で解析した。

B) A で処理した NK 細胞を蛍光色素で標識し、リガンドケモカインを加えた Transwell にて浸潤能を評価した。

C) 患者血漿の存在下で、健常者末梢血 NK 細胞を培養し、Factor X 発現をフローサイトメトリー法で解析した。***p＜0.001、**p＜0.01、*p＜0.05（Unpaired T test）。

その患者群（n＝4）と発現に変化がなかった対象群（n＝6）の血漿を用いたプロテオーム解析を実施した。その結果、対象群に比べ特に存在量に変動があったタンパク質が 24 種類同定された（data not shown）。

考　察

これまでマウス肺転移モデルにて、転移巣浸潤 NK 細胞が転移を抑制することが多く報告されているが、原発巣浸潤 NK 細胞による転移の制御についてはほとんど解析されていない。また、ヒトにおいては、がん細胞株を用いた解析により、EMT を誘導したがん細胞が NK 細胞に対する感受性が亢進すること［6］、NK リガンドの中でも特に B7-H6 を高発現するがん細胞株に対して細胞傷害を発揮しやすいことが報告されている［7］が、患者検体を用いたトランスレーショナルリサーチは未だ行われておらず、実際のヒト腫瘍環境における NK 細胞の機能は不明な点が多い。本研究では、大腸がん病理組織標本を用いた多重免疫染色にて、NK 細胞浸潤の多いがんでは、NK リガンド B7-H6 の発現強度が低下していることを明らかにし、B7-H6 がヒト腫瘍環境においても NK 細胞の細胞傷害活性を制御する重要な因子である可能性が示唆された。今後は、B7-H6 の発現を制御する分子メカニズムの解明に取り組む。

NK 細胞浸潤メカニズムについては、これまでに、神経膠芽腫細胞株と NK 細胞の共培養の実験系において、がん細胞由来 TGF-beta が Factor X の発現を低下させることによって、成熟 NK 細胞の浸潤を抑制する可能性が報告されている。マウス腫瘍モデルにおいては、TGF-beta だけでなく、プロスタグランジン E2（PGE2）やインドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）が成熟 NK 細胞の抗腫瘍免疫を抑制する因子として知られる［8］。しかし、そのメカニズムは、NKG2D や DNAM-1 など活性化受容体の発現を低下させることであり、NK 細胞の浸潤を直接的に制御するものではない。本研究では、大腸がん患者検体を用いたフローサイトメトリ

一法や、細胞株を用いた培養実験により、がん細胞由来可溶型因子が Factor X 発現を低下させ、細胞傷害活性を有する CD16 陽性末梢血 NK 細胞の腫瘍内浸潤を抑制していることが明らかになった。血漿プロテオーム解析で抽出された変動タンパク質による NK 細胞の機能への影響について、今後、細胞株を用いた培養実験やマウスモデルにより検討を進める。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター東病院大腸外科の伊藤雅昭科長、塚田祐一郎医長である。

文　献

1) Okumura G, Iguchi-Manaka A, Murata R, Yamashita-Kanemaru Y, Shibuya A, Shibuya K. Tumor-derived soluble CD155 inhibits DNAM-1-mediated antitumor activity of natural killer cells. J Exp Med. 2020 Mar 2;217(4):1. doi: 10.1084/jem.20191290. PMID: 32040157; PMCID: PMC7144518.

2) López-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of Metastasis by NK Cells. Cancer Cell. 2017 Aug 14;32(2):135-154. doi: 10.1016/j.ccell.2017.06.009. PMID: 28810142.

3) Cho YH, Ro EJ, Yoon JS, Mizutani T, Kang DW, Park JC, Il Kim T, Clevers H, Choi KY. 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/β-catenin pathway activation. Nat Commun. 2020 Oct 21;11(1):5321. doi: 10.1038/s41467-020-19173-2. PMID: 33087710; PMCID: PMC7578039.

4) Nersesian S, Schwartz SL, Grantham SR, MacLean LK, Lee SN, Pugh-Toole M, Boudreau JE. NK cell infiltration is associated with improved overall survival in solid cancers: A systematic review and meta-analysis. Transl Oncol. 2021 Jan;14(1):100930. doi: 10.1016/j.tranon.2020.100930. Epub 2020 Nov 10. PMID: 33186888; PMCID: PMC7670197.

5) Ran GH, Lin YQ, Tian L, Zhang T, Yan DM, Yu JH, Deng YC. Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. Signal Transduct Target Ther. 2022 Jun 29;7(1):205. doi: 10.1038/s41392-022-01058-z. PMID: 35768424; PMCID: PMC9243142.

6) Chockley PJ, Chen J, Chen G, Beer DG, Standiford TJ, Keshamouni VG. Epithelial-mesenchymal transition leads to NK cell-mediated metastasis-specific immunosurveillance in lung cancer. J Clin Invest. 2018 Apr 2;128(4):1384-1396. doi: 10.1172/JCI97611. Epub 2018 Feb 26. PMID: 29324443; PMCID: PMC5873856.

7) Sheffer M, Lowry E, Beelen N, Borah M, Amara SN, Mader CC, Roth JA, Tsherniak A, Freeman SS, Dashevsky O, Gandolfi S, Bender S, Bryan JG, Zhu C, Wang L, Tariq I, Kamath GM, Simoes RM, Dhimolea E, Yu C, Hu Y, Dufva O, Giannakis M, Syrgkanis V, Fraenkel E, Golub T, Romee R, Mustjoki S, Culhane AC, Wieten L, Mitsiades CS. Genome-scale screens identify factors regulating tumor cell responses to natural killer cells. Nat Genet. 2021 Aug;53(8):1196-1206. doi: 10.1038/s41588-021-00889-w. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34253920.

8) Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. Nat Rev Cancer. 2016 Jan;16(1):7-19. doi: 10.1038/nrc.2015.5. PMID: 26694935.