

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15476

研究課題名(和文) 遺伝子多型に起因するNK細胞の機能脆弱を克服する免疫賦活法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a method for immunostimulation to compensate gene polymorphism-associated deterioration of NK cell function

研究代表者

大段 秀樹 (Hideki, Ohdan)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：10363061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目標は、NK細胞の遺伝学的脆弱性を克服することを目的として、NK細胞の分化・成熟・活性化に即した免疫賦活化あるいは養子免疫療法を開発することである。マウスモデルを用いて検討では、heat shock protein (HSP)70 inducerにより、肝NK細胞へTRAIL分子の発現が誘導された。また、エピジェネティックドラッグによる腫瘍修飾およびNK細胞活性への影響と、癌糖鎖抗体によるNK細胞の機能制御機構に関して、ヒトリンパ球および臨床検体を用い解析した。さらに、養子免疫を目的として造血幹細胞から分化・誘導したNK細胞が、ex vivoでlicense化することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to establish a method for immunostimulation to compensate gene polymorphism-associated deterioration of NK cell function. In mouse models, we found that heat shock protein (HSP)70 inducer enhance the expression of TRAIL on live NK cells. We investigated the effects of epigenetic drugs on immunogenicity of neoplastic cells and function of NK cells by use of clinical specimens and human lymphocytes. In addition, we found that ex vivo licensing NK cells developed from hematopoietic stem cells for adoptive immunotherapy was feasible by cultivating them with HLA class I-KIR matched fibroblasts.

研究分野：消化器外科、移植外科

キーワード：免疫賦活療法 NK細胞 個別化医療 癌免疫 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

Natural Killer(NK)細胞は、遺伝子再構成を伴わない独自のレセプターを発現し、細菌やウイルス感染細胞、腫瘍細胞に対して、迅速に細胞傷害活性を発揮する。重要な生体防御機構を果たす事が指摘される一方、臨床病態におけるNK細胞の役割を証明する研究は少ない。

近年、NK細胞に表出する killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) が、ヒト白血球抗原(HLA) class I 上の一定の配列を認識することで、抑制シグナルを伝達するとともに、NK細胞の機能成熟をもたらし、標的細胞に対する高い応答性を獲得する(license)ことが解明された。個体の HLA type と KIR の subset の適合性により NK細胞が”license”を受けるか否かが規定される。KIR/HLA 適合性は、各 KIR の遺伝子レベルのコーディングの有無と、HLA class I の各遺伝子座に規定される KIR リガンドの A3/11 アレル、Bw4 エピトープ、C 遺伝子座の C1/C2 ハプロタイプの分類を遺伝子タイピングにより判定できる。我々は、肝癌治療切除例を対象に、KIR/HLA 適合性の再発予後に対する影響を解析した結果、臨床病理学的因子を調整した 138 症例において、3 個以上の licensing pathway を保有する Highly licensed NK 群が、2 個以下の Poorly licensed NK 群に比べ再発リスクが有意に低いことが明らかとなった。すなわち、遺伝子レベルで規定される licensed NK 細胞の存在が、再発抑制に重要な意義を持つ事が初めて証明された。

2. 研究の目的

本研究では、NK細胞の遺伝学的脆弱性を克服することを目的として、NK細胞の分化・成熟・活性化に即した免疫賦活化あるいは養子免疫療法を開発する。最近の我々の研究成果を基盤として、heat shock protein (HSP)70 inducer による NK細胞活性化の可能性に関して、マウスモデルを用いて検討する。また、エピジェネティックドラッグによる腫瘍修飾および NK細胞活性への影響と、癌糖鎖抗体によるNK細胞の機能制御機構に関して、ヒトリンパ球および臨床検体を用い解析する。また、養子免疫を目的として造血幹細胞から分化・誘導したNK細胞が、*ex vivo*で”license”可能か否かを解明する。また、臨床研究では、肝細胞癌で確認された KIR/HLA genotype の再発への影響が、大腸癌と胃癌およびその肝転移においても関連するか否かを解明する。

3. 研究の方法

(1) HSP70 inducer によるNK細胞の賦活化

最近我々は、短期間絶食したマウスの肝臓に HSP70 が誘導され、これを介してNK細胞に TRAIL 分子が高発現し、抗腫瘍活性が有意に亢進することを確認した。本研究では、

C57BL/6J HSP-70.1 knock-out (KO) マウスを用い、HSP-70 の投与によりNK細胞に TRAIL 分子の誘導が可能か否かを検討した。また、C57BL/6J wild-type マウスに HSP70 inducer を投与して、NK細胞の賦活化の可能性を解析した。HSP70 inducer には、Celastrol を用いた。

(2) エピジェネティックドラッグによる腫瘍修飾とNK細胞活性への影響

エピジェネティックドラッグである histone deacetylase inhibitor (HDACi) や DNA-methyl transferase inhibitor (DNMTi) は、腫瘍細胞の NKG2D-ligand や DNAM-1-ligand の表出を促進し、NK細胞による細胞傷害活性を促進する可能性が指摘されている。しかし、これらの薬剤がNK細胞の licensing や活性化にいかに関与するかは明らかにされていない。そこで、C57BL/6J マウスに種々のエピジェネティックドラッグを静脈内投与し、24 時間後の肝臓内単核球を採取し、NK細胞活性化および抗腫瘍分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。

また、ヒト末梢および肝由来NK細胞を用い、HDACi/DNMTi や tyrosine kinase inhibitor/proteasome inhibitor/mTOR inhibitor によるNK細胞のエピジェネティックな変化が、フェノタイプと機能にいかに関与するかを解明した。さらに、ヒト肝癌/大腸癌株 (HepG2、Huh-7、DLD-1、HCT 116、LoVo) を標的とした granzyme B/perforin 系および TRAIL/DR シグナルによる抗腫瘍活性への各種エピジェネティックドラッグの影響を解明した。

(3) 癌糖鎖抗体による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) におけるNK細胞活性化機構

ある種の固形癌は異好性抗原として糖脂質 (N-グリコシル型シアル酸: NeuGc) を表出し、癌抗原として標的に成り得る。最近我々は、NeuGc 抗原がヒト自然抗体やB細胞の標的となり免疫応答が誘導されることを報告した。肝細胞癌にの NeuGc 抗原が発現するか否か、また、抗体の標的となって ADCC が惹起されるか否かを解析する。

(4) 幹細胞由来NK細胞を用いた解析

我々は、ヒト骨髄あるいは末梢血 CD34⁺造血幹細胞からNK細胞を誘導することに成功したが、NKG2D, TRAIL, DNAM-1 分子を表出した unlicensed 様フェノタイプを示すことが確認された。ここでは、KIR と親和性のある HLA Class I 分子の表出したフィーダー細胞 (繊維芽細胞) と共培養することで、KIR の発現と licensing の誘導が成し得るか否かを検討する。

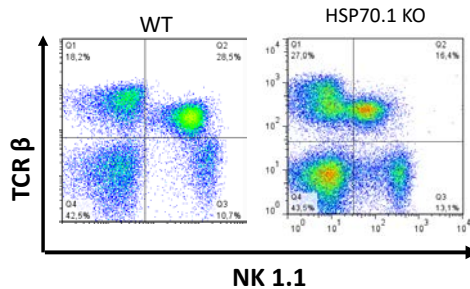
4. 研究成果

(1) HSP70 inducer によるNK細胞の賦活化

C57BL/6J HSP-70.1 KO マウスにおいても、

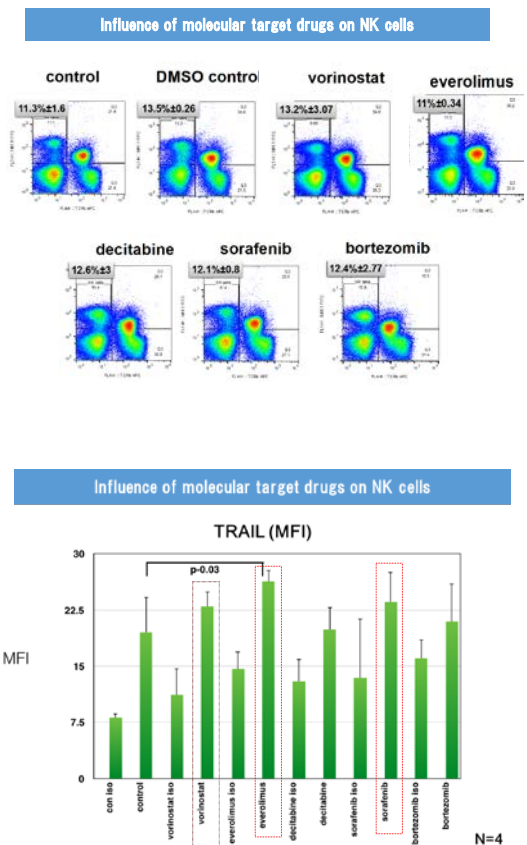
TRAIL⁺ NK 細胞の肝内存在比率は wild-type マウスと比べ有意な変化を認めなかったが (下図)、recombinant HSP-70 の投与により増加した。

また、C57BL/6J wild-type マウスに Celestrol を投与したが、TRAIL⁺ NK 細胞の肝内存在比率の有意な増加には至らなかった。NK 細胞の TRAIL 分子の誘導には HSP-70 は関連するが、必須因子ではないと考えられた。



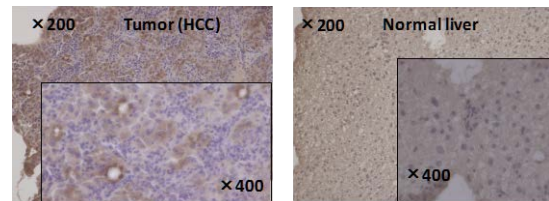
(2) エピジェネティックドラッグによる腫瘍修飾と NK 細胞活性への影響

HDACi と DNMTi がヒト肝癌/大腸癌株 (HepG2、Huh-7、DLD-1、HCT 116、LoVo) の NKG2D-ligand と DNAM-1-ligand の表出を促進し、NK 細胞による細胞傷害活性を促進することを確認した。しかし、HDACi と DNMTi は NK 細胞の TRAIL 表出に影響を及ぼさなかった。一方、mTOR inhibitor は NK 細胞の TRAIL 表出を有意に促進し、TRAIL/DR シグナルによる抗腫瘍活性を増強した (下図)。



(3) 癌糖鎖抗体による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) における NK 細胞活性化機構

肝細胞癌は異好性抗原として糖脂質 (N-グリコリル型シアル酸: NeuGc) を表出することを臨床摘出標本の免疫染色によって確認した (下図)。また、NeuGc 陽性肝細胞癌の担癌患者には抗 NeuGc 抗原が血清中に検出された。NeuGc 抗原が抗体の標的となって惹起される ADCC における NK 細胞が関わる可能性が示唆された。



(4) 幹細胞由来 NK 細胞を用いた解析

ヒト骨髄あるいは末梢血 CD34⁺造血幹細胞から誘導した NK 細胞は、NKG2D、TRAIL、DNAM-1 分子を表出したが KIR 及び TRAIL 分子の表出に乏しい unlicensed 様フェノタイプを示した。ここでは、KIR と親和性のある HLA Class I 分子の表出したフィーダー細胞 (繊維芽細胞) と共培養することで、KIR の発現が促進され、*in vitro* での licensing の誘導が可能であった。

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 4 件)

1. Das LK, Ide K, Tanaka A, Morimoto H, Shimizu S, Tanimine N, Tanaka Y, Ohdan H. Fc-gamma receptor 3A polymorphism predicts the incidence of urinary tract infection in kidney-transplant recipients. Hum Immunol. 78(4):357-362. 2017.
2. Tanimine N, Tanaka Y, Abe T, Piao J, Ishiyama K, Kobayashi T, Ide K, Ohira M, Tahara H, Shimizu S, Saeki Y, Sakai H, Yano T, Ohdan H. MELD and Child-Pugh Scores Are Related to Immune Status of Intrahepatic Natural Killer Cells in Liver Transplant Candidates. Transplant Proc. 49(1):98-101. 2017.
3. Shimizu S, Tanaka Y, Tazawa H, Verma S, Onoe T, Ishiyama K, Ohira M, Ide K, Ohdan H. Fc-Gamma Receptor Polymorphisms Predispose Patients to Infectious Complications After Liver Transplantation. Am J Transplant. 16(2):625-33. 2016.
4. Tanimine N, Tanaka Y, Abe T, Piao J, Chayama K, Ohdan H. Functional Behavior of NKp46-Positive Intrahepatic Natural Killer Cells Against Hepatitis C

Virus Reinfection After Liver Transplantation.

100(2):355-64. 2016.

[学会発表] (計 12 件)

1. Ohira M, Hotta R, Yano T, Nakano R, Tzakis A, Nishida S, Ohdan H. Corticosteroids dampen Natural Killer cell function including cytotoxicity and anti-HCV effect. Asian Transplantation Week 2016. 2016. 10. 27-29. Incheon, Korea.
2. 田中友加, 清水誠一, 堀田龍一, 大段秀樹. CD34⁺細胞を用いた活性化自然免疫細胞リモデリングと抗腫瘍機能解析. 第 5 2 回日本移植学会総会. 2016. 9. 29-10. 1. 東京.
3. 矢野琢也, 大平真裕, 中野亮介, 石山宏平, 井手健太郎, 田原裕之, 清水誠一, 佐伯吉弘, 坂井寛, 石田伸樹, 柳川泉一郎, 田中飛鳥, 尾上隆司, 田中友加, 大段秀樹. 肝移植後肝癌再発における NK 細胞機能脆弱化のメカニズムの解明. 第 5 2 回日本移植学会総会. 2016. 9. 29-10. 1. 東京.
4. 清水誠一, 田中友加, 大平真裕, 石山宏平, 井手健太郎, 田原裕之, 佐伯吉弘, 坂井寛, 矢野琢也, 小林剛, 大段秀樹. 肝移植後重症感染症における自然免疫遺伝子多型に対するドナー肝由来活性化 NK 細胞療法の有用性. 第 5 2 回日本移植学会総会. 2016. 9. 29-10. 1. 東京.
5. Ohdan H. Adjuvant immunotherapy using liver NK cells enhances protective immunity against HCC recurrence and infectious complications in liver transplantation. GAP(Global Academic Program) related Meeting Between Hiroshima University and The University of Texas MD Anderson Cancer Center. 2016. 7. 22. Hiroshima, Japan.
6. 石山宏平, 大平真裕, 小林剛, 井手健太郎, 田原裕之, 矢野琢也, 清水誠一, 中野亮介, 大段秀樹. Immunotherapy using donor liver NK cells for preventing severe infection after liver transplantation. 第 7 1 回日本消化器外科学会総会. 2016. 7. 13-15. 徳島.
7. 大段秀樹. 肝癌とNK細胞. 第 1 3 回日本免疫治療学会. 2016. 2. 27. 東京.
8. Tanaka Y, Ohdan H. Up-regulation of anti-tumor activity on liver NK cells under the fasting condition. TSS 2015 14th Transplantation Science Symposium. 2015. 11. 11-13. Lorne, Australia.
9. 谷峰直樹, 田中友加, 小林剛, 石山宏平, 大平真裕, 田原裕之, 黒田慎太郎, 安部智之, 岩子寛, 清水誠一, 橋本昌和, 坂井寛, 矢野琢也, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝細胞癌切除後再発抑制に対する NK 細胞免疫賦活療法の可能性. 第 2 7 回日本肝胆膵外科学会・学術集会. 2015. 6. 11-13. 東京.
10. 清水誠一, 田中友加, 石山宏平, 尾上隆司, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之,

安部智之, 谷峰直樹, 佐伯吉弘, 坂井寛, 矢野琢也, 石田伸樹, 柳川泉一郎, 佐々木由布, 小林剛, 黒田慎太郎, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後抗 HCV 療法の効果に対する自然免疫関連一塩基多型の影響解析. 第 3 3 回日本肝移植研究会. 2015. 5. 28-29. 神戸.

11. 田中友加, 大段秀樹. 絶食ストレスは HSP70 発現を介し肝臓内NK細胞の TRAIL 依存性抗腫瘍活性を増強する. 第 5 1 回日本肝臓学会総会. 2015. 4. 21-22. 熊本.

12. 谷峰直樹, 田中友加, 小林剛, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝細胞癌切除後に対する NK 細胞 License の累積効果. 第 1 1 5 回日本外科学会定期学術集会. 2015. 4. 16-18. 名古屋.

[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
大段 秀樹 (Ohdan Hideki)
広島大学 医歯薬保健学研究所 (医)・教授
研究者番号 : 10363061
- (2) 研究分担者
田中 友加 (Tanaka Yuka)
広島大学 医歯薬保健学研究所 (医)・准教授
研究者番号 : 90432666
- (3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()