

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23892

研究課題名(和文) CIML NK細胞の各subset毎の機能解析とそれを応用した胃癌新規治療の開発

研究課題名(英文) Analysis of each subset of CIML NK cells and development of new therapy for gastric cancer

研究代表者

久保 智洋 (Kubo, Tomohiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00634669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：NK細胞を複数のサイトカインで刺激することにより、強力な細胞傷害活性のある Cytokine-induced-memory-like(CIML) NK細胞に変化することが報告されているが、サブセットの機能や固形腫瘍に対する効果は不明である。本研究ではCIML NK細胞の各サブセットのNK細胞受容体の発現を検討したが、サブセット間における受容体の発現に有意差を認めず、いずれのサブセットも強力な細胞傷害活性を持つことが示唆された。また胃癌細胞株に対する細胞障害活性を検討し、NK細胞と比較して、有意に細胞障害活性が高いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CIML NK細胞はの両サブセット共にインターロイキンにより効果的に刺激され、同等の強力な細胞傷害活性を有すると推察された。さらにCIML NK細胞は固型癌である胃癌細胞株に対しても既報で示された白血病細胞株と同程度の強力な細胞傷害活性を有し、高いサイトカイン産生能を有することを証明し、胃癌の新たな治療戦略の一つとなる可能性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：NK cells are transformed into Cytokine-induced-memory-like(CIML) NK cells by stimulating with multiple cytokines. And they have a strong cytotoxic effect. The function of subsets of CIML NK cells and the effect on solid tumors are unknown. In this study, we evaluated the expression of NK cell receptors in each subset of CIML NK cells. There was no significant difference in NK cell receptor expression between each subset. It was suggested that both subsets has strong cytotoxic activity. We also evaluated the cytotoxic activity against gastric cancer cell lines. It was revealed that the cytotoxic activity of CIML NK cells against gastric cancer cell lines was significantly higher than that of natural NK cells.

研究分野：免疫療法

キーワード：NK細胞 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

NK 細胞は活性化型受容体によってウイルスタンパク、癌抗原を認識し、細胞傷害活性を示す。一方でNK 細胞は抑制性受容体によって自身のMHCクラスIを認識し、自身の正常細胞を傷害するのを防いでいる。NK 細胞は、活性化または抑制型受容体からのシグナルのバランスによって標的細胞を識別し、細胞死に導く。Human NK 細胞はCD56の表面発現とCD3の欠如により同定され、CD56とCD16の相対的発現に基づいて、CD56^{bright} CD16⁻ NK cell(以下CD56^{bright})とCD56^{dim} CD16⁺ NK cell(以下CD56^{dim})の2つの機能的に異なるサブセットに分類することができる。一般的にCD56^{bright}はCD56^{dim}よりも細胞傷害活性が低く、免疫調節機能が高いと考えられてきたが、本研究者は慢性移植片対宿主病患者の低容量IL-2療法により刺激されたCD56^{bright}において活性化型NK細胞受容体(Nkp30)の発現が選択的に増加し、CD56^{bright}の急性白血病細胞株に対する細胞傷害活性がCD56^{dim}を上回ることを証明した。

近年NK細胞をIL-12, 15, 18で刺激することにより、強力な細胞傷害効果のあるCytokine-induced memory-like NK細胞(以下CIML NK細胞)に変化することが報告されている(Rizwan Romee et al. Sci Transl Med. 2016)が、CIML NK細胞におけるCD56^{bright}とCD56^{dim}のサブセット毎の機能は明らかになっていない。さらに白血病細胞に対してCIML NK細胞は強力な細胞傷害活性を示すことが証明されているが、固形癌における細胞傷害活性を検討した報告は存在しない。CIML NK細胞の各サブセットの機能解析やNK細胞を用いた免疫治療の固形癌治療への応用に、開発研究余地があるものと考えられる。

2. 研究の目的

CIML NK細胞の各subsetのNK細胞受容体(Nkp30, Nkp46, NKG2D, NKG2A, KIR)の発現をコントロールNK細胞(無刺激)及び両subset間で比較し、両subsetの機能変化を明らかにする。また複数の胃癌細胞株を用いて、CIML NK細胞の細胞傷害活性、サイトカイン産生能を評価し、胃癌細胞に対する抗腫瘍効果を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1). CIML NK細胞の作成

健常人から得られるPBMCをFACS sortingの手技によって、NK細胞に分離し、IL-12(10ng/ml), IL-15(50ng/ml), IL-18(50ng/ml)を含んだRPMI培地で16時間培養し、CIML NK細胞を作成する。

(2). CIML NK細胞における各subsetの表面抗原解析

Flow Cytometryを用いてCD56、CD16の相対的発現に基づいてCD56^{bright}及びCD56^{dim}を同定し、それぞれのsubsetのNK細胞受容体の発現を測定する。

(3). CIML NK細胞の胃癌細胞株に対する細胞傷害活性の評価

作成したCIML NK細胞とCFSEでラベルした胃癌細胞株を4時間共培養し、Annexin-V, 7-AADで染色し、Flow Cytometryを用いてapoptosis細胞を測定する。

(4). CIML NK細胞のサイトカイン産生能などの評価

作成したCIML NK細胞とCFSEでラベルした胃癌細胞株を6時間共培養し、Flow cytometryを用いてCIML NK細胞におけるCIFN- γ 、TNF- α 、CD107aの発現を測定する。

4. 研究成果

(1). CIML NK 細胞における各 subset の表面抗原解析

健常人から得られる PBMC を FACS sorting の手技によって、NK 細胞に分離し、IL-12(10ng/ml), IL-15(50ng/ml), IL-18(50ng/ml)を含んだ RPMI 培地で 16 時間培養し、CIML NK 細胞を作成した。活性型 NK 細胞受容体である (NKG2D, Nkp30, Nkp46) や抑制型 NK 細胞受容体 (NKG2A, KIR) の発現の違いを NK 細胞 (無刺激)、low dose IL-2 で刺激した NK 細胞および CIML NK 細胞で検討したところ、CIML NK 細胞で NKG2D, Nkp30 の発現が有意に上昇した。一方で Nkp46 の発現に違いは認められなかった (図 1)。また NKG2A, KIR の発現についてはいずれの NK 細胞群でも有意な差は認めなかった。さらに CD56、CD16 の相対的発現に基づいて CD56^{bright} 及び CD56^{dim} を同定し、CIML NK 細胞で上昇を認めた NKG2D, Nkp30, Nkp46 の発現の違いをサブセット間で検討したところ、いずれの発現もサブセット間で有意差を認めなかった (図 1)。以上よりインターロイキン刺激を受けた CIML NK 細胞は活性型 NK 細胞受容体である NKG2D, Nkp30 の発現が上昇することで、標的細胞を認識した際に、上記受容体からの活性化シグナルが増強し、強力な細胞傷害活性を有すると推察された。さらに上記活性型 NK 細胞受容体の発現結果から CIML NK 細胞では CD56^{bright} 及び CD56^{dim} の両サブセット共に同様の強力な細胞傷害活性を有すると推察された。

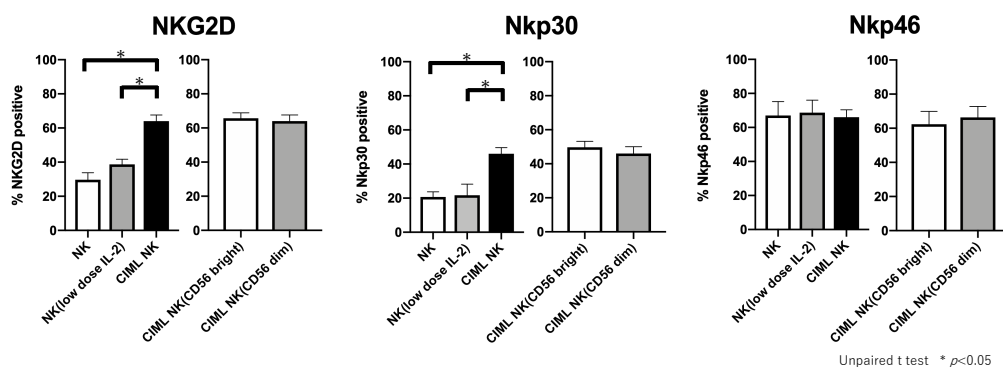


図1 CIML-NK細胞における活性型NK受容体発現の検討

(2). CIML NK 細胞の胃癌細胞株に対する細胞傷害活性の評価

まず CIML NK 細胞の細胞傷害活性の評価を行なった。CFSE でラベルした白血病細胞株 K562 細胞と CIML NK 細胞を 37℃で 4 時間共培養後、Annexin-V, 7-AAD で染色し apoptosis 細胞の割合を測定したところ、70-80%の細胞が apoptosis を起こしており、本研究者が作成した CIML NK 細胞は既報と同様に強力な細胞傷害活性を有することを確認した。次に胃癌細胞株 (KATO-III, HSC39, MKN74) を用いて CIML NK 細胞の細胞傷害活性を評価した。コントロールとして NK 細胞 (無刺激) および low dose IL-2 で刺激した NK 細胞を使用し、いずれの細胞株においても NK 細胞 (無刺激) や low dose IL-2 で刺激した NK 細胞と比較し、有意に CIML NK 細胞は細胞傷害活性が高く、いずれの細胞株においても 60%以上の細胞に apoptosis が誘導されることを証明した (図 2)。上記結果より CIML NK 細胞は白血病細胞株と同様に胃癌細胞株においても強力な細胞傷害活性を有し、さらにその細胞傷害活性は白血病細胞株と同程度であることがわかった。

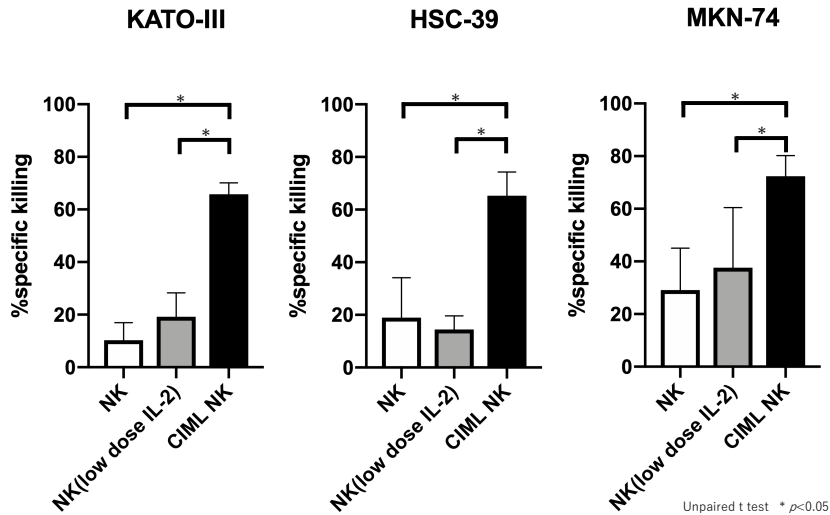


図2 胃癌細胞株に対するCIML-NK細胞の細胞傷害活性の検討

(3). CIML NK 細胞のサイトカイン産生能などの評価

胃癌細胞株と共培養時の CIML NK 細胞の活性化やサイトカイン産生能の評価を行うため、CFSE でラベルした胃癌細胞株と CIML NK 細胞を 37°C で 6 時間共培養後、NK 細胞の活性化マーカーである CD107a やサイトカイン (IFN γ , TNF α) の陽性細胞の割合を FACS で測定した。MKN-74 との共培養において NK 細胞 (無刺激) や low dose IL-2 で刺激した NK 細胞と比較し、CIML NK 細胞は CD107a や IFN γ , TNF α の陽性細胞の割合が高い傾向にあることがわかった (図 3)。さらに KATO-III や HSC39 でも同様の傾向が認められ、この結果から CIML NK 細胞は標的細胞との共培養により、効果的に活性化され、サイトカイン産生能が高まることが証明された。

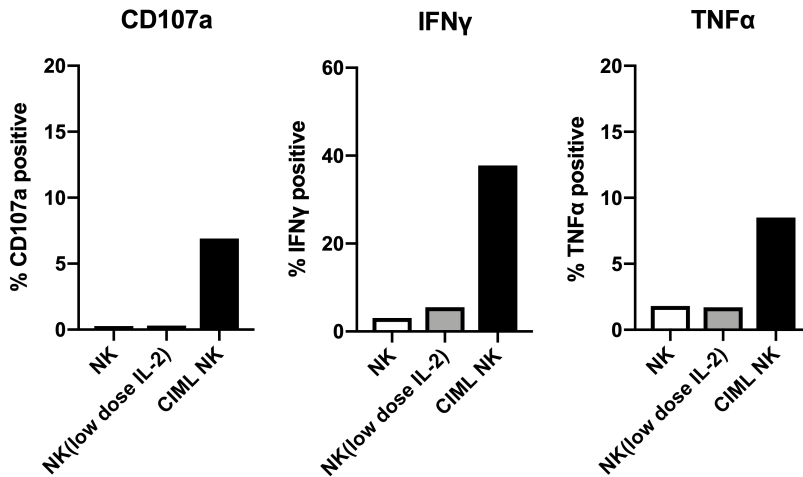


図3 胃癌細胞株(MKN-74)と共培養時のCIML NK細胞活性化の検討

以上より CIML NK 細胞は活性化型 NK 細胞受容体である NKG2D, Nkp30 が上昇することで、標的細胞を認識した際に強力な細胞傷害活性を有し、CD56^{bright} 及び CD56^{dim} の両サブセット共にインターロイキンにより効果的に刺激され、同等の強力な細胞傷害活性を有すると推察された。また CIML NK 細胞は固型癌である胃癌細胞株に対しても既報で示された白血病細胞株と同程度の強力な細胞傷害活性を有し、高いサイトカイン産生能を有することを証明し、胃癌の新たな治療戦略の一つとなる可能性が示唆された。今後、in vivo マウスモデルでの抗腫瘍効果の検討や癌微小環境内において CIML NK 細胞の細胞傷害活性が維持されるかなど、さらにこの研究を進展させていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Benedetta Rambaldi, Haesook T. Kim, Carol Reynolds, Sharmila Chamling Rai, Yohei Arihara, Tomohiro Kubo, Leutz Buon, Mahasweta Gooptu, John Koreth, Corey Cutler, Sarah Nikiforow, Vincent T. Ho, Edwin P. Alyea, Joseph H. Antin, Catherine J. Wu, Robert J. Soiffer, Jerome Ritz, and Rizwan Romee	4. 巻 26
2. 論文標題 Impaired T- and NK-cell reconstitution after haploidentical HCT with posttransplant cyclophosphamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 352-364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2020003005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------