

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591252

研究課題名（和文）

小児難治性急性骨髄性白血病に対するアロ反応性NK細胞による抗腫瘍メカニズムの解明

研究課題名（英文）：Graft versus Leukemia effects due to alloreactive NK-cells after HLA mismatched stem cell transplantation in children with refractory leukemia

研究代表者

高橋 義行 (TAKAHASHI YOSHIYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40432273

研究成果の概要（和文）：

化学療法に抵抗性で予後不良な急性白血病に対して、HLA ハプロ一致造血幹細胞移植が試みられている。移植後に白血病細胞がヒト主要組織適合抗原である HLA を失うことが 6 番染色体による異常で起こり、それが再発のメカニズムの一つであることを解明できた。HLA を失った白血病細胞は NK 細胞に攻撃されやすくなっており、移植後にドナーからの NK 細胞を輸注することが再発予防につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated HLA expression on leukemic cells derived from patients at diagnosis and relapse after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) using flow cytometry with locus-specific antibodies. Some relapsed patients demonstrated loss of HLA alleles in leukemic cells at relapse. Single-nucleotide polymorphism array analyses revealed acquired uniparental disomy on the short arm of chromosome 6, resulting in the total loss of the mismatched HLA haplotype. We also found that primary leukemic blasts in this patient were not killed by the donor NK cells, however, leukemic blasts at relapse were efficiently killed after HLA loss of leukemic cells occurred. These results suggested that the escape from immunosurveillance by the loss of mismatched HLA alleles may be a crucial mechanism of relapse after HLA-haploidentical HSCT. These findings may give us the rationale of donor NK cell infusions in suitable setting after HLA haploidentical HSCT to prevent relapse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：小児血液学、腫瘍免疫学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：NK 細胞、graft versus leukemia effects (GVL 効果)、Killer immunoglobulin like receptor (KIR)、白血病

1. 研究開始当初の背景

化学療法不応性の急性白血病はHLA一致同種造血幹細胞移植をもってしても絶対的予後不良である。唯一の治療が期待できる治療法としてHLAハプロ一致造血幹細胞移植が一部の先進的施設で試みられている。当科においてもこれまで再発期急性白血病患者に両親からのハプロ一致移植を行い一定の成績が得られている。

イタリアのRuggeriらは、再発または化学療法抵抗性の急性骨髄性白血病(AML)に対し、HLAハプロ一致造血幹細胞移植を行い、Natural Killer(NK)細胞の抑制性受容体であるKiller immunoglobulin like receptor(KIR)に注目し、そのリガンドであるHLA-CwのミスマッチがGraft versus Hostの方向にある場合に移植後の再発が有意に少ないことを報告した(Ruggeri et al. Science. 15:295(5562):2097-100, 2002)。この報告での、ドナーと患者の間にアロ反応性NK細胞のない組み合わせでは、5年における再発率が75%であるのに対し、アロ反応性NK細胞のある組み合わせでは、再発は0%であった。さらに驚くべきことに移植の主要な副作用であるGraft versus host disease(GVHD)も有意に少ないという結果であった。その後さまざまなグループが追試を行い、このアロ反応性NK細胞の効果を確かめ報告している。

我々は、抗腫瘍効果の増強を目的にハプロ一致移植後にアロ反応性NK細胞輸注療法について、名古屋大学医学部倫理委員会にてそのプロトコールが承認されている。今回、移植患者由来の白血病細胞株が樹立できたことからこの細胞株と移植後患者リンパ球を用いてアロ反応性NK細胞の抗腫瘍メカニズムの解明を目的とした研究計画を立案した。

2. 研究の目的

治療抵抗性白血病患者に対する造血幹細胞移植において、患者とKIRリガンド不一致のドナーを選ぶことによりアロ反応性NK細胞が、Graft versus leukemia(GVL)効果を起こし、そのようなドナーを選ばない場合と比べて有意に再発率が減少し、生存率が向上することから、このアロ反応性NK細胞のGVL効果を解明することは、さらに臨床応用可能な治療法をもたらす可能性が高い。我々は研究期間に以下のことを明らかにすることを目的とした。

1) NK細胞の細胞傷害活性はKiller Immunoglobulin-like Receptor(KIR)に代表される抑制受容体と、同じくNK細胞上に発現する活性化受容体のバランスにより決定

されると考えられている。そのためNK細胞上に発現する抑制性または活性化受容体の持つ役割を明らかにする。移植後のドナーNK細胞のアロ障害活性がどのように変化するかを調べNK細胞輸注療法の根拠を検討する。

2) HLAハプロ一致移植では、抑制性KIR細胞受容体のリガンドであるHLAが患者・ドナー間で不一致であることから、白血病細胞に発現するHLAをモニタリングしてその変化を観察し、ドナーT細胞、NK細胞の障害活性が変化するかを検討する。

3) 大量培養NK細胞を利用した細胞療法の開発患者由来白血病細胞に障害活性を持つドナー由来KIR不一致のNK細胞をクローンレベルで大量培養を行いGMP基準に準拠したNK細胞の大量培養法を確立し患者に投与できるNK細胞製剤の作製を目指す。

3. 研究の方法

1) 活性化NK受容体の発現解析:すでに骨髄移植前の患者骨髄より白血病細胞および移植後再発時の白血病細胞を用いてNK細胞受容体のリガンドであるULBP1, ULBP2, ULBP3およびMICA, MICBをフローサイトメトリー法を用いて発現量を検討し、それぞれの抗体存在下にドナー由来NK細胞の患者由来細胞に対するドナー由来NK細胞が障害活性を示すのに必要な、白血病細胞側のリガンドを推定する。

2) 抑制性NK受容体陽性細胞のモニタリング:フローサイトメトリー法により異なるKIR(CD158aまたはCD158b)陽性NK細胞を移植後のドナーNK細胞のモニタリングを行なう。患者由来白血病細胞株におけるドナー由来NK細胞感受性を細胞傷害活性試験

(⁵¹Cr release assay)によって調べる。患者、ドナーそれぞれの末梢血単核球よりEBウイルスにより不死化したB細胞株およびPHAにより刺激増殖したT細胞を標的細胞の対照コントロールとして用いる。ドナー由来対照コントロール細胞を障害せずに、患者由来白血病細胞を障害するNK細胞をGraft versus Leukemia効果(GVL)効果を示すNK細胞と定義する。

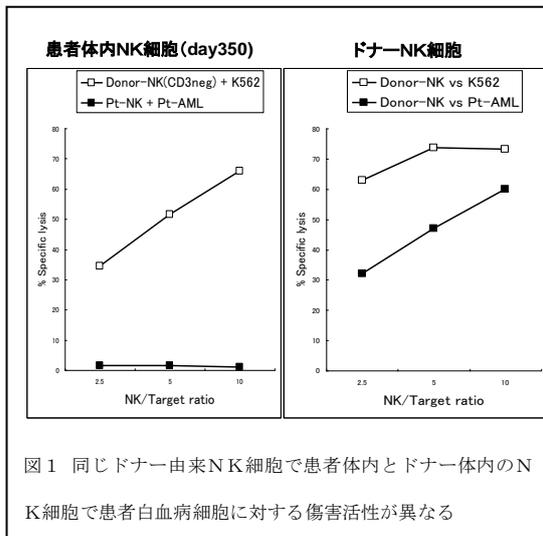
3) 移植後再発白血病細胞におけるHLA発現およびアロ反応性NK細胞の障害活性の変化:ハプロ一致移植後に再発した白血病細胞が、NK細胞の抑制性受容体であるHLAの発現に変化があるかflow cytometry法で検討する。またNK細胞による傷害活性が、移植前と異なるのか⁵¹Cr release assayによって検討する。

4) 移植後再発白血病細胞にHLA発現の変化があれば、flow sortingにより白血病細胞の

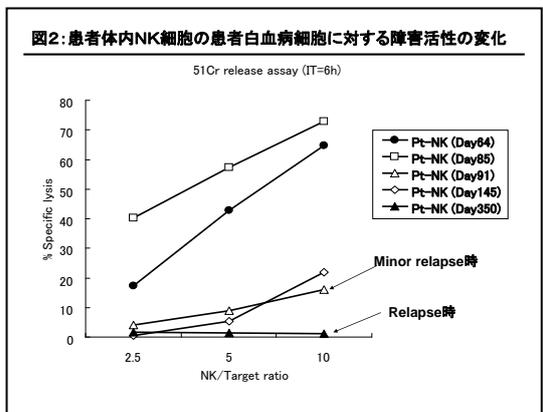
みを純化して DNA を抽出したものを、Single-nucleotide polymorphism (SNP) array 法を用いて遺伝子解析を行なう。

4. 研究成果

2008 年度：我々は HLA 一致非血縁造血幹細胞移植後に再発した 4 歳の AML 患者に対し、NK 細胞の KIR リガンドである HLA-C が Graft versus Host 方向にミスマッチである母親から HLA ハプロ一致移植を行い、そのドナー NK 細胞が患者由来白血病細胞に対し傷害活性を示すことを報告した。移植後患者血液中のドナー由来 NK 細胞は抗白血病効果をしめさなかったが、直接ドナーから採取した NK 細胞は抗白血病効果を示した (図 1)。

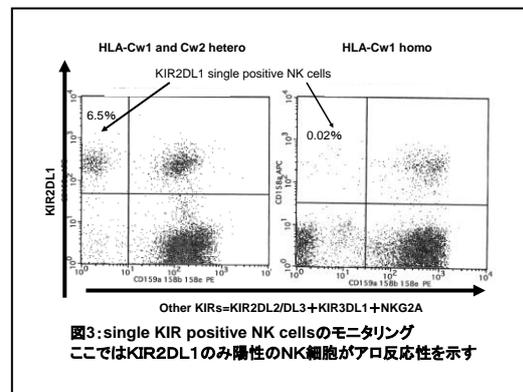


この症例においては患者由来白血病細胞を樹立できたことから以下の結果が得られた。
 1) 患者末梢血中のドナー由来 NK 細胞が直接患者 AML 細胞を障害した。
 2) 移植後 3 ヶ月までは抗白血病障害活性があった患者血液中のドナー由来 NK 細胞が、3 ヶ月以後に障害活性が低下した。
 3) NK 細胞による細胞障害活性の低下に対応し微小残存白血病細胞が増加した (図 2)。



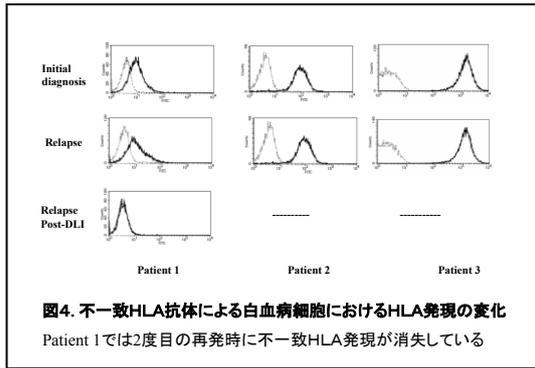
これらの所見から移植後 3 ヶ月以後のアロ NK 細胞が減少する時期に、ドナーから NK 細胞を輸注することで微小残存白血病細胞を殺し、再発を防ぐドナーNK 細胞輸注療法の根拠となると考えられた。

2009 年度：我々は、KIR リガンド不一致造血細胞移植後の患者末梢血単核球より磁気ビーズ法を用いて NK 細胞を分離し、移植前の患者由来 PHA プラストとドナー由来 PHA プラストの傷害活性の差を検討し、移植後のドナー体内に存在するドナー由来 NK 細胞が、患者由来血液細胞を傷害することを確認した。移植後に経時的に傷害活性を調べると移植後 1 年の経過でしだいにアロ反応性 NK 細胞の障害活性が減少していくことが判明した。またアロ反応性NK細胞活性を示す single KIR 陽性NK細胞の数を同定する手法が確立でき、より簡便にアロ反応性 NK 細胞のモニタリングが可能となった (図 3)。



さらに、St. Jude Children's hospital の Dr. Campana のグループとの共同研究により、臨床応用可能な GMP グレードで NK 細胞を効率よく培養増幅可能な modified K562 細胞を供与された。アメリカではこの細胞は FDA に認可されており、実際にハイリスク白血病患者に培養 NK 細胞輸注を組み込んだ治療研究が行われている。わが国における培養 NK 細胞療法への進展につながるものと考えられた。

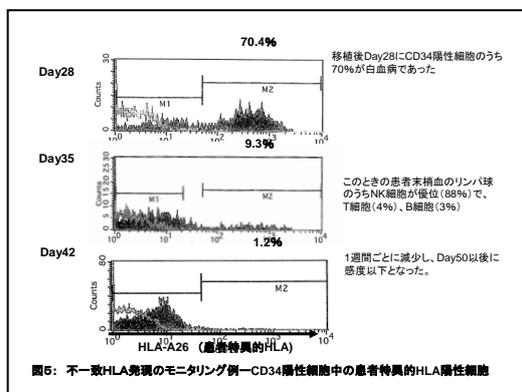
2010 年度：治療抵抗性白血病患者に対して HLA ハプロ一致移植後に再発した白血病細胞の HLA 発現を解析した結果、患者・ドナー間不一致 HLA が欠失する場合があります (図 4)、SNP アレイ解析により白血病細胞の 6 番染色体短腕における uniparental disomy がそのメカニズムであることを解明し、学会および論文報告した (Villalobos et al. Blood 2010)。



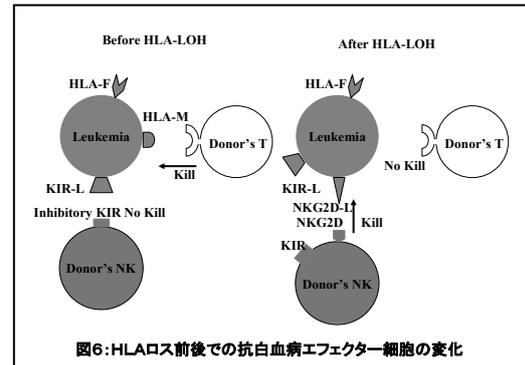
これは不一致 HLA に対する傷害性 T 細胞 (CTL) による強い GVL 効果から白血病細胞が HLA を失うことでエスケープすることを示唆する。実際に、不一致 HLA に対するドナー由来 CTL クロームは HLA をロスした白血病を傷害することができなかった (Villalobos et al. Blood 2010)。

HLA が NK 細胞抑制性 KIR 受容体のリガンドそのものであるため、ハプロ一致移植における患者・ドナー間不一致 HLA モニタリングの有用性について検討した。

2004 年 1 月から 2010 年 3 月までに非寛解期に HLA ハプロ一致移植を行った 8 例の白血病患者に対し患者・ドナー間不一致 HLA に対する抗体 (Onelambda 社) を利用したフローサイトメトリー法により移植後微小残存腫瘍 (MRD) の検出を行った。8 例中 6 例でリネージごとにキメリズム解析が可能で、少なくとも 10^4 個に 1 個の MRD 検出が解析可能であった。さらに顕微鏡的に寛解状態でありながら移植後 30 日を越えて MRD が検出されながら、次第に MRD が消失していく経過を 2 例で観察可能であった。以上より、不一致 HLA のモニタリングはキメリズムだけでなく GVL 効果のモニタリングに有用であることが示唆された (図 5)。



さらに、不一致 HLA ロスを生じた白血病患者 2 例において、ドナー NK 細胞による傷害活性が初診時白血病細胞と比べてロスした白血病細胞で有意に高かった。うち 1 例で HLA ロス後の白血病細胞において NK 細胞の活性化受容体リガンドである ULBP-2 の発現が増加していた。HLA 不一致移植後の GVL 効果においてドナー CTL と NK 細胞が相補的に働いている重要な知見が得られ、移植後の維持療法に NK 細胞輸注療法を組み合わせる治療戦略の根拠となるものと考えられた (図 6)。



今後、治療抵抗性白血病に対する HLA ハプロ移植においてアロ NK 細胞を利用した新規移植治療法による臨床研究の根拠を示せたこと、また HLA ハプロ一致移植後再発白血病ではドナーリンパ球輸注の前に白血病細胞の HLA 発現が消失していないかを調べるべきであることが示されたことは、移植後治療を必要とする患者にとって不必要で有害な治療を避けることが可能となるため意義が高い。

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 3 件)

① Muramatsu H, Takahashi Y (11人中2番目), Kojima S (11人中11番目) et al. Excellent outcomes of children with CML treated with imatinib mesylate compared to that in pre-imatinib era. International journal of hematology 査読有り、93(2), 2011, 186-191

② Watanabe N, Takahashi Y (9人中2番目), Kojima S (9人中9番目) et al. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia and ergoing allogeneic progenitor cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 査読有り 17(4), 2011, 516-523

③Villalobos IB, Takahashi Y (11人中2番目), Kojima S (11人中11番目) et al. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Blood 査読有り、115(15)、2010、3158-3161

〔学会発表〕(計12件)

①高橋義行、ハプロ不一致移植における患者・ドナー間不一致HLAモニタリングの有用性. 第33回日本造血細胞移植学会総会 2011.03.09. ひめぎんホール(松山市、愛媛県)

②高橋義行(招待演者)、難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性T細胞(CTL)の体外増幅法の開発と臨床第1相試験. 第52回日本小児血液学会総会 2010.12.18. 大阪国際会議場(大阪府)

③Takahashi Y. Increase in NK-cell lysis of leukemic blasts due to loss of mismatched HLA haplotype after haploidentical stem cell transplantation. The 52nd annual meeting of American Society of Hematology 2010.12.10. Orange county convention center (Orland, FL, USA)

④高橋義行(招待演者)、ATGによるin vivo T cell depletionを用いたUnmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. 第5回HLA不適合移植研究会 2010.11.27. リーガロイヤルホテル(大阪府)

⑤高橋義行、ハプロ不一致移植における患者・ドナー間不一致HLAモニタリングの有用性. 第2回血液腫瘍免疫研究会 2010.08.30. 大和屋、(松山市、愛媛県)

⑥Takahashi, Y (invited speaker), Recent Advances in the treatment of High-risk neuroblastoma ; A clinical trial for extremely high-risk patients with neuroblastoma stage IV using KIR ligand mismatched cord blood transplantation. Sumsung medical center mini symposium 2010.04.10. Sumsung medical center, Soul, Korea

⑦ Takahashi Y. A clinical trial for extremely high-risk patients with neuroblastoma stage IV using KIR ligand mismatched cord blood transplantation. The 14th Japan Neuroblastoma conference 2010.03.06. Nagoya University, Nagoya,

Aichi

⑧高橋義行、HLAハプロ一致移植後に起こった白血病細胞の不一致HLAロスによるCTLからのエスケープとNK細胞感受性の増強. 第32回日本造血細胞移植学会総会 2010.02.19. オークラクトシティホテル、浜松市、静岡県

⑨高橋義行、進行期神経芽腫に対しKIRリガンド不一致非骨髄破壊性臍帯血移植による新規治療法の開発とアロ反応性NK細胞モニタリング. 第1回血液腫瘍免疫研究会 2009.08.29. 大阪国際会議場、大阪

⑩高橋義行、ハプロ一致幹細胞移植後の白血病再発メカニズム:6番染色体短腕UPDによる免疫監視機構からの逃避. 第71回日本血液学会総会 2009.10.23. 京都国際会館、京都

⑪Takahashi Y. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic transplantation. The 51st annual meeting of American Society of Hematology 2009.12.09. New Orleans USA

⑫高橋義行、HLAハプロ一致移植後の再発白血病細胞に対するドナーNK細胞輸注療法の安全性と有効性に関する臨床研究. 第70回日本血液学会総会 2008.10.11. 京都国際会館、京都

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 義行 (TAKAHASHI YOSHIYUKI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40432273

(2) 研究分担者

小島 勢二 (KOJIMA SEIJI)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20313992

(3) 研究協力者

ブストス イッツエル (BUSTOS ITZEL)
名古屋大学・医学系研究科・大学院生
研究者番号：なし