

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22591056

研究課題名（和文）

臍帯血などからの活性化同種 NK 細胞培養増幅に関する研究

研究課題名（英文）

Expansion of activated NK cells from cord blood

研究代表者 田中 淳司 (Tanaka Junji)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50250452

研究成果の概要（和文）：

約 3 週間で NK 細胞を純度約 70-80%、約 1000 倍に増幅しうることが可能となった。またこの培養増幅した活性化 NK 細胞は白血病細胞株 K562 のみならず患者由来の白血病細胞をも障害することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：

We can expand NK cells more than 1,000 fold from cord blood after 3 weeks culture. These expanded NK cells can attack not only K562 leukemic cell line but also patients' leukemic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1500000	450000	1950000
2011 年度	1000000	300000	1300000
2012 年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：NK 細胞、臍帯血

## 1. 研究開始当初の背景

従来のがんや白血病に対する免疫療法は基本的のがん特異的細胞障害性 T 細胞（がん特異的 CTL）誘導を目的としていますが、臨床的には十分な効果をあげているとは言い難いのが現状であった。それは根本的のがん、白血病細胞は生体の免疫監視をくぐり抜けて増殖してきたものであり、かりにがん特異的な抗原が存在していた

としても、それを細胞表面に提示して特異的細胞障害性 T 細胞の標的となりうる HLA の発現ががん、白血病細胞では低下ないし消失していることが多いからと考えられます。HLA の発現が低下ないし消失してしまっているがん、白血病細胞に対しては免疫応答の原点に立ち戻り自然免疫 (Innate Immunity) の最強の担い手である NK 細胞をより有効に利用することが新しい有効ながん免疫療法の開発に繋がるものと考えられました。

## 2. 研究の目的

本研究においては従来培養増幅することが困難とされていた、がん細胞や白血病細胞に対して強力な細胞障害活性を有する同種 NK 細胞を臍帯血などから効率的に増幅することにより、新しい細胞療法の基盤構築を目的としています。

また抑制性 NK 細胞受容体を発現した NK 細胞は自己の HLA class I 分子を発現している正常細胞を攻撃することなく (GVHD 抑制)、HLA class I 分子の発現が低下あるいは消失している白血病/腫瘍細胞を攻撃できます (GVL/T 誘導)。そこで本研究は活性化同種 NK 細胞を増幅し、これらの細胞を用いることにより GVHD など生体に有害な反応を抑制しつつ同時にがんや白血病に対する有効な反応 (GVL) を誘導することを可能にする同種細胞療法開発を目指しています。

## 3. 研究の方法

臍帯血をリンパ球ソースとし、IL-2、IL-15 などのサイトカインや抗 CD3 抗体、タクロリムス、ダルヘパリンなどを加えて NK 細胞培養増幅に最も優れた条件を検討を行い確立した。また培養は可能な限り GMP に準じて行い、ヒト血清を添加した GMP グレーの培地によって培養した。

## 4. 研究成果

約 3 週間で NK 細胞を純度約 70-80%、約 1000 倍に増幅しうることが可能となった。さらにこのようにして培養増幅した NK 細胞は、NK 細胞活性化受容体である NKG2D や細胞内障害物質である Granzyme を高発現しており、活性化された NK 細胞であることが明らかとなった。これらの NK 細胞は CD16+CD56+細胞が 7 割であり NKp30, NKp44, NKp46 などの活性化 NK 細胞受容体を発現していた。またこの培養増幅した活性化 NK 細胞は白血病細胞株 K562 を効率よく障害したばかりでなく、患者由来の白血病細胞をも障害することが可能であった。しかし一方で同種 PHA blast を障害することはないことが明らかとなった。これらの結果から、臍帯血から培養増幅された NK 細胞は白血病細胞のみならず HLA class I 発現の低下することの多い固形癌などに対する細胞障害活性を有する活性化 NK 細胞であることが推測された。このように臍帯血から活性化 NK 細胞を特異的かつ効率的に培養増幅する方法が確立できた。今後、培養増幅した活性化 NK 細胞を用いた細胞

療法の臨床試験を計画していきたい。活性化 NK 細胞療法が可能となれば白血病や癌に対する T 細胞以外を用いた新しい細胞療法への発展が期待されることが意義深い。

## 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 12 件)

- 1) Kurosawa S, Tanaka J et al. (16 人、14 番目) Changes in incidence and causes of non-relapse mortality after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute leukemia/myelodysplastic syndrome. **Bone Marrow Transplant** 48(4):529-536, 2013. 査読有
- 2) Imahashi N, Tanaka J et al. (20 人、16 番目) Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for intermediate cytogenetic risk acute myeloid leukemia in first complete remission. **Bone Marrow Transplant** 48(1):56-62, 2013 査読有
- 3) Kanda J, Tanaka J et al. (16 人、13 番目) Unrelated cord blood transplantation vs. related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. **Leukemia** 27(2):286-294, 2013. 査読有
- 4) Tanaka J et al. (5 人、1 番目) Dasatinib enhances the expansion of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK cells from cord blood. **Blood** 119:6175-6176, 2012 査読有
- 5) Tanaka J et al. (9 人、1 番目) Expansion of NK cells from cord blood with antileukemic activity using GMP-compliant substances without feeder cells. **Leukemia** 26:1149-1152, 2012 査読有
- 6) Kanda J, Tanaka J et al. (19 人、14 番目) Related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction and HLA 8/8-allele-matched unrelated transplantation: A nationwide retrospective study. **Blood** 119:2409-2416, 2012 査読有
- 7) Sugita J, Tanaka J et al. (19 人、17 番目) Efficacy of folinic acid in preventing oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients receiving MTX as prophylax

- xis for GVHD. **Bone Marrow Transplant.** 47:258-264. 2012査読有
- 8) Asanuma S, Tanaka J et al. (12人、2番目) Expansion of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells from cord blood CD4<sup>+</sup> cells using the common  $\gamma$ -chain cytokines (IL-2 and IL-15) and rapamycin. **Ann Hematol** 90 : 617-624, 2011 査読有
  - 9) Hayakawa S, Tanaka J et al. (19人、14番目) ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. **Nature Immunol** 12: 37-44, 2011 査読有
  - 10) Kobayashi T, Tanaka J et al. (16人、10番目) p53 transactivation is involved in the antiproliferative activity of the putative tumor suppressor RBM5. **Int J Cancer.** 128:304-318, 2011査読有
  - 11) Inamoto Y, Tanaka J et al. (15人、11番目) Disease stage stratified effects of cell dose in unrelated bone marrow transplantation for hematological malignancies: A report from Japan Marrow Donor Program. **Bone Marrow Transplant.** 46:1192-1202, 2011 査読有
  - 12) Onozawa M, Tanaka J et al. (17人、14番目) The 8p11 myeloproliferative syndrome due to rare FGFR10P2-FGFR1 fusion. **Eur J Haematol** 86:347-349, 2011 査読有

[学会発表] (計 18 件)

- 1) 田中淳司  
抗腫瘍効果におけるNK細胞の役割  
函館血液疾患セミナー  
2013、2、22 : 函館、ホテル函館 (北海道)
- 2) Tanaka J, Kanamori H, Nishiwaki S, Ohashi K, Taniguchi S, Eto T, Nakamae H, Katayama Y, Morishima Y, Suzuki R, Kato K, Sakamaki H, Nishimoto N, Masauzi N. Reduced-Intensity Versus Myeloablative Conditioning Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients Aged Over 45 Years with Acute

Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Remission: A Study From the ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). 54<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2012. 12. 8-11. Atlanta, Georgia World Congress Center (USA).

- 3) Aoki K, Ishiyama K, Itonaga H, Fukuda T, Taniguchi S, Ueda Y, Doki N, Sugio Y, Morishima Y, Nagamura T, Tanaka J, Atsuta Y, Ishikawa T, Miyazaki Y. Unfavorable Outcome of Single-Unit Umbilical Cord Blood Transplantation for Elderly Patients with Myelodysplastic Syndromes. 54<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2012. 12. 8-11. Atlanta, Georgia World Congress Center (USA).
- 4) Shigematsu A, Tanaka J, Kobayashi N, Yasui H, Shindo M, Kakinoki Y, Iyama S, Kuroda H, Tsutsumi Y, Hashino S, Imamura M, Teshima T. Role of Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adult T-Cell Leukemia in an HTLV-1 Non-Endemic Area of Japan. 54<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2012. 12. 8-11. Atlanta, Georgia World Congress Center (USA).
- 5) Kato H, Kawase T, Kako S, Mizuta S, Ohashi K, Kurokawa M, Iwato K, Mori T, Suzuki R, Sakamaki H, Morishima Y, Tanaka J. Favorable Outcomes of Autologous Stem Cell Transplantation in Adult Patients with Philadelphia Chromosome-Negative Acute Lymphoblastic Leukemia in First Remission: On Behalf of the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). 54<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2012. 12. 8-11. Atlanta, Georgia World Congress Center (USA).
- 6) Ichinohe T, Kanda J, Inagaki J, Inoue M, Koh K, Kikuta A, Yabe H, Tanaka J, Atsuta Y, Kanda Y. Impact of Parental

- Donor Type On Outcomes After HLA-Matched and HLA-Mismatched T-Cell-Replete Hematopoietic Cell Transplantation for Patients with Leukemia: A Retrospective Cohort Study. 54<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2012. 12. 8-11. Atlanta, Georgia World Congress Center (USA).
- 7) 田中淳司  
抗腫瘍効果におけるNK細胞の役割  
第78回青森血液疾患セミナー  
2012、9、19：青森、ホテル青森（青森県）
- 8) 田中淳司  
血液がんの治療  
つばさ共催フォーラム、2012、9、1：  
札幌、北海道大学クラーク会館（北海道）
- 9) Tanaka J, Sugita J, Shiratori S, Shigematsu A, Imamura M. The effect of dasatinib on the expansion of CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> NK cells from cord blood. 41<sup>st</sup> Annual Meeting of International Society of Hematology (ISEH) 2012. 8. 23-26. Amsterdam, Hotel Okura (Netherlands).
- 10) 田中淳司  
成人 ALL の移植療法について  
第7回 Tokai Leukemia Club  
2012、3、3：名古屋、ミッドスクエア（愛知県）
- 11) Kanamori H, Kako S, Kato H, Nishiwaki S, Furukawa T, Saito M, Taniguchi S, Nakamae H, Yujiri T, Naganuma-Inoue T, Morishima Y, Suzuki R, Sakamaki H, Tanaka J. Fludarabine-Based Reduced Intensity Hematopoietic Stem Cell Transplantation (RIST) for Patients Aged 50-70 Years with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in Remission: A Study From the ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2011. 12. 10-13. San Diego, San Diego Convention Center (USA).
- 12) Yano Y, Yokoyama H, Nishimura R, Fukuda T, Ogawa H, Ohashi K, Kanamori H, Tanaka J, Sakamaki H, Atsuta Y, Takami A. Prognostic Factors of Reducing Relapse in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation From Related Donor for Acute Myeloid Leukemia: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT) AML Working Group. 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2011. 12. 10-13. San Diego, San Diego Convention Center (USA).
- 13) Izutsu K, Suzuki R, Kako S, Sakai R, Mori T, Yano S, Kato J, Fukuda T, Taniguchi S, Takanashi M, Morishima Y, Tanaka J, Suzumiya J. Poor Performance Status, Chemorefractory Disease At Transplantation, and Umbilical Cord Blood As Donor Source Were Adverse Prognostic Factors for Overall Survival After Allogeneic Stem Cell Transplantation for Follicular Lymphoma: Retrospective Study of the Japan Society of Hematopoietic Stem Cell Transplantation (JSHCT) Lymphoma Working Group. 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2011. 12. 10-13. San Diego, San Diego Convention Center (USA).
- 14) Tanaka J, Sugita J, Asanuma S, Shiratori S, Shigematsu<sup>1</sup> A, Fujimoto K, Nishio M, Kondo T, Imamura M. The comparative study for expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells from cord blood CD4<sup>+</sup> cells using IL-15 or IL-2 with rapamycin. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society of Hematology (ISEH) 2011. 8. 25-28. Vancouver, Westin Bayshore Hotel (Canada).
- 15) 田中淳司  
GVHD/GVL 制御とNK細胞  
第33回 日本造血細胞移植学会総会  
2011、3、9-10：松山、愛媛県県民文化会館（愛媛県）

16) Masauzi N, Tanaka J, Imamura M. The Yield of Peripheral Blood (PB) Graft and the Changes of Adhesion Molecules Expression on PB CD34 Positive (CD34+) Cells before and during Administration of Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) American Society for Blood and Marrow Transplantation 2011. 2 17-21, Hawaii, Hawaii Convention Center (USA).

17) 田中淳司  
造血細胞移植とNK細胞  
第45回 愛媛臨床血液懇話会  
2010、8、7:松山、大和屋本店(愛媛県)

18) Shigematsu A, Kobayashi N, Minauchi K, Kobayashi H, Mori A, Masauzi N, Umehara S, Fukuhara T, Kurosawa M, Haseyama M, Hashino S, Nishio M, Kondo T, Tanaka J, Kasai M, Imamura M. Retrospective analysis for 272 patients with mature T-cell neoplasmas in Hokkaido, Japan. 15<sup>st</sup> Congres of European Hematology Association, 2010. 6. 10-13. Barcelona, Barcelona Convention Center (Spain).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: NK細胞を増幅するための組成物及び方法

発明者: 田中淳司

権利者: テラ株式会社

種類: 特願 2011-140504

番号: 2011-140504

出願年月日: 2011/6/24

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 淳司 (Tanaka Junji)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

授

研究者番号: 50250452

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: