

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 3 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591505

研究課題名（和文）

Death receptor を標的とした胆管細胞癌・混合型肝癌の新規 NK 細胞療法

研究課題名（英文）

The new strategy of NK cell therapy with death receptors for the patients with cholangiocellular carcinoma or mixed liver cancer

研究代表者

天野 尋暢（Amano Hironobu）

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：30423370

研究成果の概要（和文）：

肝癌の中でも悪性度の高い胆管細胞癌、混合型肝癌の新規治療法の開発を目指して、肝癌肝移植患者に対して有効性を示してきた NK 細胞療法を、胆管細胞癌の治療に応用する。臨床検体から胆管細胞癌の Death receptor の発現（DR-4）が約 90% に存在し、NK 細胞の標的になりうる事が証明できた。一方、臨床検体の検討から、MUC5 が独立した予後不良因子であることが判明し、抗 MUC IgG 抗体投与により、相乗的な NK 細胞の治療効果も期待できた。細胞株の検討では、HuCC11 において、投与する NK 細胞の投与数に依存して細胞障害が増強することが示された。細胞株によって Death receptor の発現が異なるものの治療効果は期待でき、臨床的に NK 細胞が安定的に確保できれば、有望な治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the new strategy of natural killer (NK) cell therapy for patients with cholangiocellular carcinoma (CCC) and mixed liver cancer that were highly malignant type of liver cancer. According to our clinical specimens of CCC, more than 90% of patients elevated DR-4 expression. On the other hand, we could detect that MUC5 was one of the independent prognostic factors in survival of CCC patients. We have also confirmed human NK cells killed HuCC11 which was cell line of human CCC, in dose dependent manner. The facts would indicated the possibility of NK cell therapy with death receptor and Ab-dependent immune response for CCC patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胆管細胞癌、Death receptor、NK 細胞療法、ムチンタンパク

1. 研究開始当初の背景

臨床的に予後の不良な疾患と考えられている胆管細胞癌、混合型肝癌は、現時点で有効な予防法はなく、術後の抗癌剤の有効性が一部で示されているものの、外科切除以外に有効な治療法がなく、その詳細な病態の解明と新規治療法の開発が求められる。当大学の特徴的な研究背景としてNK細胞を利用した制癌免疫療法の確立がある。これまでに、成熟NK細胞がパーフォリン/グランザイムを介して腫瘍細胞を傷害するのに対し、未成熟NK細胞はTNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)を介した抗腫瘍効果を有し、さらに、再発率が高い中・低分化型肝細胞癌は、パーフォリンを介した成熟NK細胞の細胞傷害に対しては抵抗性を示すが、TRAILを介した未成熟NK細胞の傷害に対しては非常に感受性が高いことを報告した。また、胆管細胞癌にもTRAILレセプターの発現を認める報告があり、NK細胞による抗腫瘍効果の可能性があることが推察される。

一方、我々はこれまで胆管細胞癌、混合型肝癌の特徴として、腺癌成分のムチンコアタンパク (MUC) の形質発現に着目し、正常粘膜に対して強発現している各種MUCの存在を確認してきた。この過剰発現したコアタンパクに対する特異的IgG抗体を作製できれば、抗体のFc部分はNK細胞のFc receptorと結合することによる、胆管細胞癌への細胞障害性が増強されることが予想される。この治療法の確立により、活性化NK細胞のTRAIL及びTRAILレセプターを介するアポトーシス及びパーフォリン/グランザイムによる細胞障害機序に加えて、Fc-Fcレセプターを介するパーフォリン/グランザイムによる細胞障害作用の相乗効果を期待することができる。

当科ではこれまで正常肝組織から最大で1gあたり 1×10^7 の肝細胞を採取する技術と長期継代培養の技術を確認してきた。この手技を応用して胆管細胞癌、混合型肝癌の臨床症例において細胞分離、長期培養を試みる。また、各症例に応じたTRAILレセプターの発現の状況、MUC抗原の発現の状況も確認する。

2. 研究の目的

肝細胞癌移植症例に有効性を示した治療成績を応用して、悪性度の高い胆管細胞癌、混合型肝癌に対して、未成熟NK細胞の治療効果を検討、細胞療法としての可能性を確認する。加えて悪性度、予後に大きく影響を与える腺癌成分、特にそのMUCを標的とした

抗MUC抗体の投与と、その抗体存在下において、NK細胞が本来持つFcレセプターを介した抗腫瘍効果を検討し、従来の未成熟NK細胞自身が持つ抗腫瘍効果に、レセプターを介した抗腫瘍効果の、両者を組み合わせ、相乗治療効果の可能性を検討する。

3. 研究の方法

臨床検体 (胆管細胞癌や混合型肝癌) におけるTRAILレセプターの発現の評価、MUC染色と予後を解析する。

各種胆管細胞癌株のTRAILレセプター発現強度の解析とNK細胞投与による細胞障害性を評価する。

臨床検体からの胆管細胞癌、混合型肝癌の細胞採取ならびに培養を検討する。

4. 研究成果

広島大学先進医療開発科学講座外科学で経験した胆管細胞癌 (肝内胆管癌) 37症例を対象に各種表面抗原の免疫染色を行った。まずNK細胞の標的としてTRAIL receptorの表出を検討、Death receptor (DR)-4、-5の臨床検体の発現はそれぞれ約94%14%であった。以前、肝細胞癌の臨床検体における当科での結果はDR-4、-5の発現が同等に発現しており、同じ原発性肝癌でもDRの発現が異なることが判明した。各種粘液染色 (MUC1、MUC2、MUC5、MUC6、pS2、CD10、HGM) の結果はそれぞれ88.9%、16.7%、61.1%、55.6%、80.6%、55.6%、66.7%であった。

一般的にはMUC1が生命予後に大きく関わりと諸家の報告があり、同様の傾向を当施設でも認めた一方、当施設での臨床成績の検討から、胆管細胞癌の予後に関与する因子として、悪性度に脈管侵襲、腫瘍サイズとともに、MUC5が独立した予後規定因子であり、NK細胞療法の一つの標的にMUC5もMUC1と同様にMUC5もなりうる可能性が確認できた。

手術で得られた胆管細胞癌の臨床2検体の分離、培養を行った。1検体は初代培養に成功したが、その後の継代培養が困難。他の1検体は細胞分離の時点で十分な収量は得られなかった。これまで我々が培ってきた正常肝組織の分離・培養法と異なり、特に固形癌である胆管細胞癌からの分離・培養には新たな手技的工夫、組織に見合ったコラゲナーゼの選択など還流液の調整、培養法の工夫などを再考する必要があると考えられた。

胆管細胞癌細胞株3種類 (HuH-28, TFK-1, HuCCT1) の細胞培養とFACSを行い、表

面マーカーのうちTRAILの発現(DcR-1, DcR-2, DR4, DR5)を解析した。TFK-1は4つの表面マーカーの発現が減弱していたが、HuCCT1ではDcR-1、DcR-2の発現が弱い一方で、DR4、DR5の発現が比較的増強発現していた。HuH-28は、DcR-1、DcR-2、DR4、DR5 4つのマーカーが比較的増強していた。よって同じ胆管細胞癌株におけるTRAILのサブタイプの発現形態が異なることが判明した。

胆管細胞癌細胞株2種類(TFK-1, HuCCT1)に対して、広島大学先進医療開発科学講座外科学での生体肝移植手術症例から得られた肝臓内(グラフト内)NK細胞に対する細胞障害試験を行った。どちらの細胞株においても濃度依存性にNK細胞による細胞障害性が確認できた。ただしNK細胞による細胞障害性の程度はHuCCT1に強く、細胞株によってNK細胞の障害性(抗腫瘍性)が異なることが判明した。

以上から、臨床検体から胆管細胞癌のDeath receptorの発現(DR-4)が約90%に存在し、NK細胞の標的になりうることが証明できた。当科の臨床検体の検討から、MUC5が独立した予後不良因子であることが判明し、抗MUC IgG抗体投与により、相乗的なNK細胞の治療効果も期待できた。細胞株の検討では、HuCCT1において、投与するNK細胞の投与数に依存して細胞障害が増強することが示された。細胞株によってDeath receptorの発現が異なるものの治療効果は期待でき、臨床的にNK細胞が安定的に確保できれば、有望な治療法となる可能性が示唆された。

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8件)

1. Oshita A, Tashiro H, Amano H, Ohdan H, et al. Safety and feasibility of diet-treated donors with steatotic livers at the initial consultation for living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2012, 9:1024-1030 (査読あり)
2. Iwako H, Tashiro H, Amano H, Ohdan H, et al. Prognostic significance of antithrombin III levels for outcomes in patients with hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Annals of Surgical Oncology* 2012, 19: 2886-2896 (査読あり)
3. Kuroda S, Tashiro H, Amano H, Ohdan H, et al. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver. *Journal of Hepatology* 2012, 56: 146-152 (査読有)
4. Amano H, Tashiro H, Ohdan H, et al. Significance of platelet count in the outcomes of hepatectomized patients with hepatocellular

carcinoma exceeding the Milan criteria. *J Gastrointest Surg* 2011, 15: 1173-81 (査読有)

5. Y.Ushitora, H.Tashiro, H.Amano, H.Ohdan et al. Splenectomy in chronic hepatic disorders: Portal vein thrombosis and improvement of liver function. *Digestive Surgery* 2011, 28 : 9-14 (査読有)
6. Amano H, Hino H, Tashiro H, Ohdan H, et al. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *Journal of Surgical Research* 2011, 167: e29-37 (査読有)
7. S.Kuroda, H.Tashiro, H.Amano, H.Ohdan, et al. Selection criteria for hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma classified as child-pugh class B. *World Journal of Surgery* 2011, 35: 834-841 (査読有)

[学会発表] (計7件)

1. 天野尋暢、田代裕尊、大段秀樹ら 上腹部正中切開からの肝Graft採取術 - LHMの有用性と応用 - 第74回日本臨床外科学会総会 2012.11.24 東京
2. 天野尋暢、田代裕尊、大段秀樹ら 肝細胞癌術後多発再発に対する治療戦略 第67回日本消化器外科学会総会 2012.7.19 富山
3. 天野尋暢、田代裕尊、大段秀樹ら 生体肝移植における胆道再建の工夫 第112回日本外科学会定期学術集会 2012.4.12 東京
4. 天野尋暢、田代裕尊、大段秀樹ら 進行肝細胞癌に対する肝切除の意義 -ミラノ基準を逸脱した症例の検討- 第66回日本消化器外科学会総会 2011.7.10 名古屋
5. 天野尋暢、田代裕尊、大段秀樹ら (ビデオシンポジウム) 生体肝移植胆道再建法の工夫 第23回日本肝胆膵外科学会学術集会 2011.6.13 東京
6. 天野尋暢、田代裕尊、大段秀樹ら 肝細胞癌術後再発に対する治療戦略-再発危険因子の解析、再肝切除の役割と限界- 第111回日本外科学会定期学術集会 2011.5.26 東京
7. 天野尋暢、田代裕尊、大段秀樹ら (シンポジウム)「手術手技(生体肝移植手術手技の標準化)～次世代への匠の技の継承～」第28回日本肝移植研究会 2010.7.1-2 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 尋暢 (Amano Hironobu)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号 : 30423370

(2) 研究分担者

田代 裕尊 (Tashiro Hirotsuka)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：90359894

大段 秀樹 (Ohdan Hideki)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10363061

(3)連携研究者

()

研究者番号：