

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591532

研究課題名(和文) 小児難治性固形腫瘍に対する同種ナチュラルキラー細胞による抗腫瘍効果

研究課題名(英文) The cytotoxic effect by natural killer cells against pediatric malignant solid tumors

研究代表者

合井 久美子 (GOI, Kumiko)

山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70324192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々はNK細胞による小児固形腫瘍への細胞傷害活性とその機構について検討した。NK細胞抑制性受容体のリガンドであるHLA class1の発現は神経芽腫細胞で他の細胞株に比較して低値であった。また、NK活性化受容体のリガンドの発現も神経芽腫細胞では低かったが、一部の腫瘍細胞では高かった。我々はNK細胞による神経芽腫細胞および悪性ラブドイド腫瘍に対する抗腫瘍活性を確認したが、ドナーNK細胞および腫瘍細胞でのHLA-Cのミスマッチによる影響は明らかではなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effect and the mechanisms of the cytotoxicity of NK cells against pediatric solid tumors. The surface expressions of HLA class I as ligand of NK inhibitory receptors in neuroblastoma cell lines were significantly lower than ones in the other tumor cell lines. The expressions of the ligands of NK activating receptor were also low in neuroblastoma cells, but slightly high in some other tumor cells. We confirmed the cytotoxicities of NK cells against the neuroblastoma and malignant rhabdoid tumor. However, the effects by the mismatch of HLA-C group between donor NK cells and target tumor cells were not significant in this cytotoxicities.

研究分野：医歯薬学

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 小児固形腫瘍 同種移植

1. 研究開始当初の背景

同種移植は固形腫瘍に関しては GVT 効果自体に疑問が持たれていることから、世界的にはほとんど行われていない。神経芽腫などでは HLA-classI の発現が極めて低いため、cytotoxic T-cell(CTL)による抗腫瘍効果があまり期待できないことも原因としてあげられるが、進行性神経芽腫や横紋筋肉腫に対する GVT 効果についての報告も少数ながら認められる。

GVT 効果には CTL と NK 細胞が関与している。NK 細胞の傷害活性には多種類の活性化受容体、抑制性受容体、接着因子などの副受容体、それらのリガンドが関っており、これらのシグナルのバランスによって抗腫瘍効果が発揮される。主要な抑制性 NK 細胞レセプターである killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs)のうち、KIR2DL2/3 は Group1 に属する HLA-C(C1:Cw1,w3,w7 など)を、KIR2DL1 は Group2 に属する HLA-C (C2:Cw2,w4,w5 など)をリガンドとして認識するが、同種移植時にドナーが患者にはない Group に属する HLA-C を持つ場合、ドナー由来の NK 細胞は患者細胞上の HLA から抑制シグナルが入らないため、患者細胞に対し傷害活性をもたらす GVL 効果が得られる。国内外で急性骨髄性白血病に対する KIR リガンド(HLA-C)不一致移植による GVL 効果が報告され、我々も成人末梢血、臍帯血 NK 細胞を用いて、小児難治性白血病である 11q23 型急性リンパ性白血病細胞株に対し、KIR リガンド不一致ドナーの方が一致ドナーより抗腫瘍効果が高いことを報告した。一方、固形腫瘍においては、腎がんで HLA-C 不一致の同種移植の効果が報告されており、IL-15 導入細胞株で増幅活性化された末梢血 NK 細胞は *in vitro*, *in vivo* で Ewing 肉腫と横紋筋肉腫細胞株に対して抗腫瘍効果を持つ。進行性神経芽腫に対する自家移植の解析で、自己 KIR リガンドの自己 KIR に対する不一致が多いものほど再発率が低いと報告された。

一方、NK 細胞活性化受容体も細胞傷害活性に大きく寄与すると考えられている。たとえば活性化受容体の NKG2D には傷害活性の異なるハプロタイプ(HNK1,LNK1)が存在し、HNK1 は LNK1 に比較して抗腫瘍効果が高い。また、NKG2D は様々ながんで NK 細胞による抗腫瘍活性の主要な受容体である。また、副受容体である DNAM-1 およびそのリガンドである PVR-1 も神経芽腫および横紋筋肉

腫に対する NK 細胞の抗腫瘍活性に関与することが報告されている。神経芽腫では HLA-classI の発現が極めて低いため、CTL による GVT 効果は期待できない一方で、NK 細胞に対しては有力な標的となりうることが予想される。我々は MYCN 遺伝子が強増幅した stage4 の神経芽腫 3 例の臍帯血移植後の長期生存例や、肺と骨への多発転移を有する骨肉腫に対する同種移植後の長期生存例を経験し、これらは GVT 効果を示唆するものと考えた。移植後の造血の再構築において、NK 細胞の回復は他のリンパ球系細胞より速やかであることから、少なくとも移植早期の抗腫瘍効果は NK 細胞が主体であることが予想される。また、HLA-classI の発現も低いながら認められることから、KIR リガンドミスマッチドナーを選択することにより、より強い抗腫瘍効果が得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は神経芽腫などの難治性小児悪性腫瘍に対して KIR リガンド不一致移植ドナーの有用性を明らかにすることで移植成績の向上をめざすとともに、各々の腫瘍/NK 細胞間の主たるリガンド/受容体の同定を行い、同種造血幹細胞移植をベースとした NK 細胞療法により小児難治性悪性疾患の治療成績の改善をめざすものである。本研究により KIR リガンド不一致による小児難治性腫瘍に対するドナーNK 細胞の抗腫瘍効果が明らかになれば、移植時に KIR リガンド不一致ドナーを選択することにより移植成績の向上につながる可能性がある。さらに、抗体療法、薬剤併用等で NK 細胞による抗腫瘍活性をあげることができれば、これを抗腫瘍活性の高いドナー細胞の選択に加えることにより、さらなる効果が期待できるかもしれない。

3. 研究の方法

本研究では神経芽腫細胞株(4 株)、骨肉腫細胞株(2 株)、Ewing 肉腫細胞株(2 株)、横紋筋肉腫細胞株(2 株)悪性ラブドイド腫瘍(MRT)細胞株(4 株)を対象とした。ドナーNK 細胞は健常ドナーから文書で informed consent を得た後、末梢血を採取し単核球を分離後、Milteny Biotec 社の NK cell isolation kit を用いて濃縮分離(純度 90%以上)したものをを用いた。腫瘍細胞株およびドナーの HLA-A,B,C のアレルのタイピングを

行い KIR-ligand の有無で分類した。NK 細胞傷害活性の陽性コントロールとして HLA-classI 陰性の急性白血病細胞株 K562 を使用した。

(1) 末梢血 NK 細胞による細胞傷害のメカニズムおよび細胞傷害活性の増幅についての解析

各腫瘍細胞株のNK細胞受容体リガンドおよび接着因子発現の検討

各腫瘍細胞上のNK細胞受容体リガンドおよび接着因子の発現をFCMで測定する。

これらの腫瘍細胞株に対する健常ドナー末梢血NK細胞の⁵¹Cr releasing assay 法もしくはCalcein AM/PI染色法による細胞傷害活性の測定。KIR一致および不一致の影響に関しては健常ドナー細胞と腫瘍細胞株をC1C1ドナー対C1C1細胞株、C1C2ドナー対C1C1細胞株のように組み合わせ、傷害活性を検討する。

(2) NK 細胞による細胞傷害のメカニズムの解析

細胞傷害時の活性化NK細胞の抗CD107a抗体染色による phenotype の同定 ドナーNK細胞と、エフェクター細胞を共培養した後、抗CD56抗体、抗CD107a抗体、および抗NKレセプター抗体と3重染色することにより、各腫瘍細胞に対する活性化ドナーNK細胞の phenotype を同定する。

4. 研究成果

(1)-①

神経芽腫細胞株表面には HLA-class1 は低値であるものの発現が認められた。また、NKG2D リガンドの発現は全体的に低値であり、NK細胞の副受容体である DNAM-1 のリガンド CD155, CD112 は HLA-class1 に比較してやや高い発現が認められた。しかし、接着分子である LFA-1, ICAM-1 の発現は非常に低値であった。横紋筋肉腫、骨肉腫細胞株では、HLA-class1 の発現は、横紋筋肉腫の SJCRH30 以外は極めて高く、NKG2D 野リガンドである ULBP2, DNAM-1 のリガンド CD155, CD112 の発現も比較的高値であった。MRT 細胞株は HLA-class1, DNAM1 リガンドの発現は横紋筋肉腫などと同等であったが、NKG2D リガンドである MIC A/B, ULBP の発現は様々な程度で認められた (図1)。

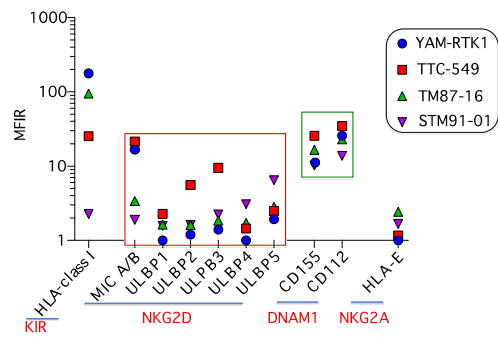


図1 MRT細胞株におけるNK受容体リガンドの発現

(1)-②

神経芽腫細胞およびMRT細胞株に対するNK細胞傷害活性を測定した。⁵¹Cr releasing assay を用いて神経芽腫細胞に対する細胞傷害活性を検討したが、CHP134 に対する抗腫瘍効果はコントロールの K562 にほぼ匹敵するほど最も高い傷害活性を示したが、他の細胞株はコントロールの 15-40%に留まった。MRT 細胞株に対する細胞傷害活性は、コントロールの 30-60%で傷害活性が認められた (図2)。

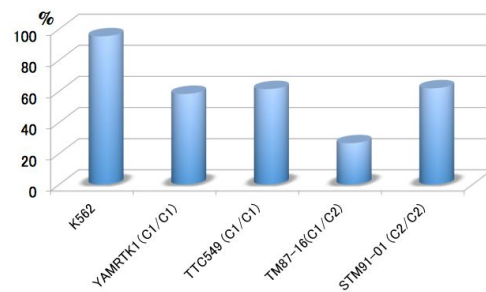


図2: C1C2ドナー由来の末梢血NK細胞による細胞傷害活性

また、この傷害活性はドナーの抗 NKG2D、抗 DNAM-1 抗体によるブロッキングで抑制され、これらの受容体を介する細胞傷害の関与が考えられた (図3)。

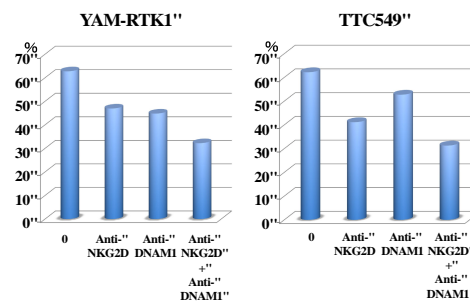


図3 抗NKG2D、抗DNAM1抗体によるNK細胞のブロッキングによる細胞傷害活性への影響

(2) C1/C1 腫瘍細胞と C1/C1 および C1/C2 ドナー由来の NK 細胞を各々共培養後、NK細胞上の CD107a の発現を検討したところ、

C1/C1 および C1/C2 ドナーいずれも KIR 陰性 NK 細胞上で CD107a の発現が最も高い傾向が認められたが、KIRL ミスマッチドナーにおける、ミスマッチリガンドに対応する受容体を有する NK 細胞上の CD107a の発現の優位性はあきらかではなかった。

以上により、一部の小児悪性腫瘍に関しては、少なくとも *in vitro* でのドナー NK 細胞の抗腫瘍効果が認められた。これらの細胞種に関しては、移植時に KIR リガンド不一致ドナーを選択することにより移植成績の向上につながる可能性がある。また、臍帯血の使用により、患者の状態に合わせて迅速に移植片を獲得することが可能となり、さらなる移植成績の向上が期待できる。さらにミニ移植で抗腫瘍効果が得られるのであれば、小児の移植後の重大な合併症である成長発達障害などを防止でき、より安全な移植法が確立できると考えられる。

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)

1) 合井久美子, 本名 浩子 同種ラブドイド腫瘍に対する同種 NK 細胞の抗腫瘍効果
第 54 回日本小児がん学会 平成 24 年 12 月 1 日 パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合井 久美子 (GOI, Kumiko)
山梨大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 70324192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし