

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591880

研究課題名(和文)造血幹細胞・iPS細胞由来TRAIL陽性NK細胞による肝癌免疫細胞療法の基礎研究

研究課題名(英文)Generation of TRAIL positive NK cells from hematopoietic stem cells / iPS cells in vitro for anti-HCC immunotherapy

研究代表者

田中 友加 (Tanaka, Yuka)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：90432666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ヒト肝臓内に局在する未成熟NK細胞に、強い抗癌分子(TNF-related apoptosis-inducing ligand: TRAIL)誘導する方法を確立し、肝臓移植後のドナー肝由来NK細胞補助療法の臨床実施により癌無再発生存率の有意な改善を得た。しかし、末梢血由来の成熟NK細胞からTRAIL分子を誘導することは、現段階では不可能である。本研究では、CD34+細胞およびiPS細胞から未成熟NK細胞への分化誘導を実施し、抗腫瘍分子であるTRAIL, NKG2D, CD226およびIFN- γ 産生の高表出を確認した。また、肝癌細胞株(HepG2, Huh7)を用いて抗腫瘍活性を確認した。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that IL-2-stimulated CD56+ cells derived from the liver exert vigorous cytotoxicity against HCC. To differentiate NK cells, we incubated bone marrow-derived CD34+ hematopoietic progenitor cells in 5% serum-supplemented X-VIVO-15 medium containing SCF, Flt-3, IL-7, and IL-15. These NK cells expressed Nkp46, a specific receptor of NK cells, and were phenotypically similar to resident NK cells, i.e. they expressed TRAIL, NKG2D, and CD226. The propagated NK cells produced IFN- γ . The propagated NK cells exhibited vigorous cytotoxicity against HCC cell lines by using 51Cr release assay. We have also developed a method to differentiate CD34+ hematopoietic progenitor cells from fibroblast-derived iPS cells. The use of NK cells for immunotherapy relies on the availability of large numbers of purified NK cells with optimal anti-HCC activities. This adaptive immunotherapy with these cells may be a promising modality to prevent the recurrence of HCC after hepatectomy.

研究分野：移植免疫学

キーワード：NK細胞 肝臓癌 細胞免疫療法

1. 研究開始当初の背景

成熟フェノタイプを示す末梢血 natural killer (NK) 細胞と異なり、肝局在 NK 細胞は未成熟フェノタイプを示し、IL-2 刺激で強い抗癌分子 (TNF-related apoptosis-inducing ligand: TRAIL) が誘導し得ることを、我々はこれまでに発見した。一方、中・低分化型肝癌細胞は TRAIL 受容体 (Death receptor) を高発現し、TRAIL を介した NK 細胞の抗腫瘍作用に感受性が高いことも確認された。これらの基礎研究成果に基づき、肝由来 TRAIL⁺ NK 細胞を用いた制癌免疫療法を肝癌に対する肝臓移植患者 (再発の可能性のある Stage 以上の肝癌合併肝硬変) へ臨床導入した。

肝臓移植では、凝固を避ける目的でグラフト肝内の血液を体外で灌流するが、その排液から大量の未成熟 NK 細胞が分離可能で、IL-2 刺激により TRAIL 誘導後、術後3日目に静脈内投与した ($40-820 \times 10^6$ 細胞/個体)。NK 細胞移入に伴う宿主免疫能の機能解析を行ったところ、末梢血中の TRAIL⁺ NK 細胞の存在比率が有意に増加し、抗腫瘍活性の著明な改善を認めた。平均 3.5 年の観察期間で、ミラノ基準外肝癌合併患者の無再発生存率を非細胞移入対象群に比べ有意に改善した。さらに、術後菌血症の発症率も有意に抑制された。この TRAIL⁺ NK 細胞による抗腫瘍免疫療法を、肝臓移植時のみならず肝切除後の制癌補助療法として適応拡大できれば、恩恵を得る対象症例は格段に増加する。しかし、可塑性に乏しい末梢血成熟 NK 細胞への TRAIL 分子の誘導は現段階では成し得ていない。

2. 研究の目的

前述のように、TRAIL⁺ NK 細胞による抗腫瘍免疫療法を、肝臓移植時のみならず肝切除後の制癌補助療法として適応拡大できれば、恩恵を得る対象症例は格段に増加する。しかし、可塑性に乏しい末梢血成熟 NK 細胞への TRAIL 分子の誘導は現段階では成し得ていない。本研究では、ヒト幹細胞から未成熟 NK 細胞への分化誘導を図り、その抗腫瘍活性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CD34⁺ 造血幹細胞から induced immature NK (iNK) 細胞への誘導と抗腫瘍活性の評価

骨髄由来 CD34⁺ 血液幹細胞を様々な培養条件で検討し、NK 細胞誘導効率を検討した。培養液は、RPMI medium, DMEM medium, Stemline II medium, X-VIVO medium で比較検討した。また、増殖誘導のための添加因子として、NK 細胞誘導や増殖に関与すると報告されている種々のサイトカインを用いて評価した。また、誘導した iNK 細胞のフェノタイプ解析およびサイトカイン産生能についてフローサイトメトリーを用いて解析

した。さらに、ヒト肝癌細胞株に対する細胞傷害性を ⁵¹Cr release assay を用いて確認した。

(2) iPS 細胞から iNK 細胞への分化・誘導と抗腫瘍活性の評価

ヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞を 2 種類 (Tic, 01) 用いた。誘導法は、第 1 段階として iPS 細胞 CD34⁺ 細胞への分化誘導を実施し、その後 CD34⁺ 細胞 iNK 細胞への分化誘導を試みた。第 1 段階の培養系は、マウス骨髄由来の線維芽細胞 (M210-B4) を feeder として、2 週間培養を行った。その後、magnetic sorting で CD34⁺ 細胞を回収し、前述の (1) のプロトコルを模倣して iNK 細胞への誘導効率を検討した。誘導細胞のフェノタイプおよびサイトカイン産生能とともにヒト肝癌細胞株に対する細胞傷害性試験を実施した。

4. 研究成果

(1) CD34⁺ 造血幹細胞から induced immature NK (iNK) 細胞への誘導と抗腫瘍活性の評価

様々な培養条件を検討した結果、X-VIVO medium (RONZA 社) に Stem Cell Factor (SCF)、Flt-3、Interleukin (IL)-15、IL-7、5% ヒト AB 型血清を加え 26 日間培養後、IL-12 を 48 時間さらに IL-18 を 18 時間培養液に添加することで iNK 細胞を効率良く誘導した (図 1)。また、IL-12 と IL-18 の添加は、iNK 細胞の活性化分子の発現増強を誘導した (図 2)。

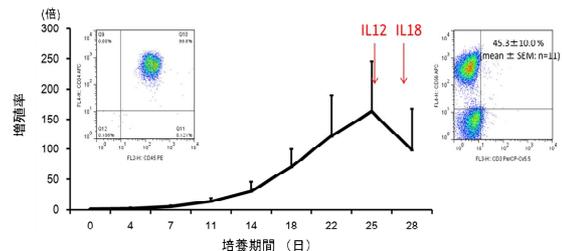


図 1. 培養 28 日で平均 100 倍程度に細胞増殖を示し、CD56⁺細胞誘導効率は平均 50%程度であった。

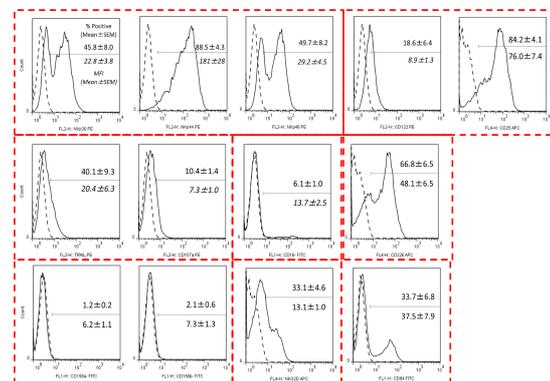


図 2. 誘導 NK 細胞 (CD3⁺CD56⁺細胞) の NK 細胞関連抗原のフェノタイプ解析結果: 活性化分子および抗腫瘍分子の表出を示した。TRAIL 陽性細胞は約 40%程度であった。

また、サイトカイン産生能を細胞内染色で評価した結果、iNK 細胞は IFN- γ および TNF- α 産生能を有していた (図 3)。

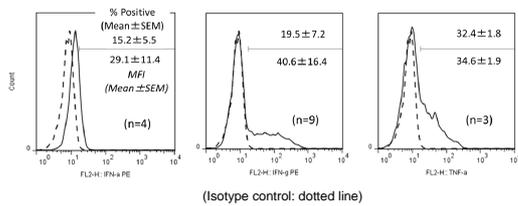


図 3. 誘導 NK 細胞 (CD3 $^+$ CD56 $^+$ 細胞) のサイトカイン評価

次に、ヒト肝癌細胞株 (HepG2, Huh-7) に対する細胞傷害性を ^{51}Cr release assay を用いて確認した。その結果、誘導 NK 細胞は、肝癌細胞株に対し細胞傷害活性を有し、傷害活性は TRAIL, NKG2D, CD226 の表出と関係していた (図 4)。

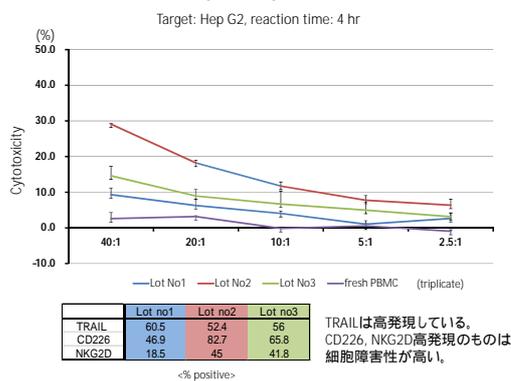


図 4. iNK 細胞の肝癌細胞株に対する細胞傷害性試験結果

(2) iPS 細胞から iNK 細胞への分化・誘導と抗腫瘍活性の評価

iPS 細胞からの NK 細胞の誘導では、図 5 のように培養 42 日で CD56 $^+$ CD3 $^+$ のフェノタイプを呈する NK 細胞誘導に成功した。また、細胞表面抗原は、Nkp46 や CD16 の高発現、IFN- γ 産生能を認める一方で、TRAIL や NKG2D などの発現に乏しく、immature というより mature type の NK 細胞が誘導されている可能性が示唆された。そのため、細胞傷害性も CD34 $^+$ 細胞由来の iNK 細胞に比べ、今回の誘導条件では弱いことが分かった。また、増殖率はやや低く、さらなる改善が必要と思われる。

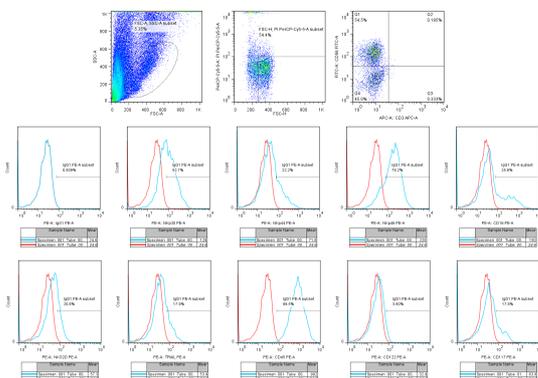


図 5. ヒト線維芽細胞由来 iPS 細胞から誘導した iNK 細胞のフェノタイプ解析
以上の結果から、iPS 細胞からの iNK 細胞誘導には、機能分子の表出を促進する工夫が必要と考えられた。

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 3 件)(すべて査読有)

1. Tanimine N, Tanaka Y, Kobayashi T, Tashiro H, Miki D, Imamura M, Aikata H, Tanaka J, Chayama K, Ohdan H. Quantitative effect of natural killer cell licensing on hepatocellular carcinoma recurrence after curative hepatectomy. *Cancer Immunol Res.* 2(12):1142-1147. 2014.
2. Dang VT, Tanabe K, Tanaka Y, Tokumoto N, Misumi T, Saeki Y, Fujikuni N, Ohdan H. Fasting enhances TRAIL-mediated liver natural killer cell activity via HSP70 upregulation. *PLoS One.* 9(10):e110748. 2014.
3. Tanaka Y, Ohira M, Tashiro H, Imamura M, Chayama K, Ohdan H. Impact of alloimmune T cell responses on hepatitis C virus replication in liver transplant recipients. *Hum Immunol.* 75(12):1259-1267. 2014.

[学会発表](計 6 件)

1. 田中友加, 清水誠一, 大段秀樹, リモデリング NK 細胞による HCV 感染抑制および制癌効果. 第 50 回日本移植学会総会. 2014.9.10 ~ 9.12. 東京.
2. Tanaka Y, Ohdan H. Influence of adoptive immunotherapy employing allograft liver-resident lymphocytes on alloimmune responses. World Transplant Congress 2014. 2014.7.26 ~ 7.31. San Francisco, USA.
3. 田中友加, 石山宏平, 大平真裕, 清水誠一, 井手健太郎, 尾上隆司, 小林剛, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後活性化 NK 細胞移入療法が T 細胞抗ドナー応答に与える影響解析. 第 32 回日本肝移植研究会. 2014.7.3 ~ 7.4. 東京.
4. Shimizu S, Tanaka Y, Hotta R, Ohdan H. Generation of NK cells from hematopoietic stem cells in vitro for anti-HCC and anti-HCV immunotherapy: Evaluation using human hepatocyte chimeric mice. ILTS 2014. 2014.6.4 ~ 6.7. London, UK.
5. Hotta R, Tanaka Y, Shimizu S, Ohira M, Ishiyama K, Hiraga N, Chayama K, Ohdan H. Unlicensed NK cells differentiated from CD34 $^+$ hematopoietic progenitor

- cells exhibit anti-HCC and anti-HCV activity. American Transplant Congress 2013. 2013.5.18. ~5.22. Seattle, USA.
6. Hotta R, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tanaka Y, Onoe T, Ide K, Tashiro H, Ohdan H. Adoptive immunotherapy with donor derived-liver natural killer cells prevents HCC recurrence after liver transplantation in recipients exceeding the milan criteria. American Transplant Congress 2012. 2012.6.2 ~ 6.6. Boston, USA.

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 友加 (Tanaka Yuka)
広島大学 医歯薬保健学研究院(医)・
准教授
研究者番号：90432666

(2)研究分担者

大段 秀樹 (Ohdan Hideki)
広島大学 医歯薬保健学研究院(医)・
教授
研究者番号：10363061

石山 宏平 (Ishiyama Kohei)
広島大学 大学病院・病院助教
研究者番号：50437589

(3)連携研究者