

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 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790971

研究課題名（和文）小児難治性白血病に対する臍帯血ナチュラルキラー細胞による抗白血病効果

研究課題名（英文）The study of graft-versus-leukemia effect of cord blood NK cells Against refractory childhood leukemia

研究代表者

大城 浩子 (OHSHIRO HIROKO)

山梨大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50377537

研究成果の概要（和文）：

11q23転座型急性リンパ性白血病(ALL)は強力な化学療法や、造血幹細胞移植を施行しても予後不良な疾患である。近年、移植後にドナーのNK細胞によるGVL効果(移植片対白血病効果)によって、一部の白血病で再発率が低下することが報告された。今回の研究では臍帯血由来のNK細胞が、KIR(NK細胞レセプター)リガンド不一致の11q23転座型ALL細胞に対して、細胞傷害活性が上昇することが示され、臍帯血移植においてKIRリガンド不一致ドナーを選択することでより強力なGVL効果が期待できると思われる。

研究成果の概要（英文）：

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) with 11q23 translocation is associated with an extremely poor prognosis despite intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation (SCT). In recent years, it has been postulated that NK cells can play a role in reducing disease recurrence through GVL (graft-versus leukemia) effect. ALL cells with 11q23 translocation are sensitive to killing by KIR (major NK receptors) ligand incompatible cord blood-NK cells, and therefore the GVL effect against this leukemia could be considerably expected if the KIR ligand incompatible donor is selected for CBT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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、急性リンパ性白血病、臍帯血移植、KIRリガンド不一致

1. 研究開始当初の背景

同種移植後のGVL効果を担っているのはドナーの細胞傷害性T細胞(cytotoxic T cell: CTL)とNK細胞であるが、臍帯血移植後のレシ

ピエントにおける免疫系の再構築においては、移植後2-3週間でNK細胞が増加し、移植後数ヶ月を経てCTLが回復する。したがって、臍帯血移植後早期のGVL効果にはCTLよりも

しる NK 細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。

NK 細胞の傷害活性には NK 細胞上に発現する多種類の抑制性受容体 (KIRs) と活性化受容体 (natural cytotoxic receptor: NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, NKG2C, DNAM-1)、co-receptor と、標的細胞上の ligand (MICA, MICB, ULBPs など)、chemokine が関与している。主要なヒトの抑制性 NK 細胞レセプターである KIRs のうち、KIR2DL2/3 (CD158b) は Group1 に属する HLA-C1 (Cw1, w3 など) を、KIR2DL1 (CD158a) は Group2 に属する HLA-C2 (Cw2, w4 など) をリガンドとして認識する。NK 細胞による抗腫瘍活性はこれらの活性化および抑制型受容体のバランスによって決定されると考えられている。特に抑制型受容体である KIR は強力であり、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 (例えば患者が HLA-C1C1 型、ドナーが HLA-C1C2 型の場合)、ドナー由来の NK 細胞クローンは患者細胞上の 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し、GVL 効果が得られると推測されている。これらの効果は主に急性骨髄性白血病で報告されていたが、進行期の 11q23 転座型 ALL に対する HLA-C 不一致の末梢血幹細胞ミニ移植の成功例が報告され、一部の ALL には有用であることが推測された。一方、活性化受容体に関しても、標的細胞上のそのリガンドの存在が細胞傷害活性に寄与する事が報告されている。抗腫瘍剤として臨床治験が行われている Histone deacetylase (HDAC) inhibitor は一部の白血病細胞に対して NK 活性化受容体のリガンドを発現させ細胞傷害活性を増強することが報告された。また、代表的な活性化受容体である NKG2D には傷害活性に差があるハプロタイプ (HNK1 と LNK1) が存在する事が明らかになっている。さらに腫瘍

細胞特異的な抗体療法、例えば 11q23 転座型に対する抗 FL 3 抗体や B 細胞性リンパ腫に対する抗 CD20 抗体等を組み合わせることによる NK 細胞の Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) の誘導も報告されている。

2. 研究の目的

我々はこれまで 11q23 転座型 ALL が TRAIL、FasL に対して耐性であることから、同種移植後の CTL による GVL 効果が低いこととの関連性を示唆した。しかし、HLA-C 不一致ドナーからの再発 11q23 転座型 ALL へのミニ移植後の長期寛解例が報告されたことや、臍帯血移植早期の免疫系の回復は NK 細胞が主体であり、臍帯血 NK 細胞が十分な細胞傷害活性を有することからも、CBT は小児難治性白血病に対しドナーの選択、NK 活性化受容体のリガンドの発現増強などの措置を行うことにより、より強力な GVL 効果を誘導することが期待できると考えた。

今回は、臍帯血 NK 細胞/白血病細胞の細胞傷害活性に主に寄与する NK 受容体/リガンド、接着因子、chemokine を同定し、さらに薬剤、放射線等によるリガンドの発現の変化についても検討する。また KIR リガンド不一致および NKG2D ハプロタイプの影響についても検討することを目的とした。

3. 研究の方法

各種類の白血病細胞における NK 細胞傷害活性の機構の解析のため、各白血病細胞の NK 受容体リガンドの発現と、臍帯血ドナーNK 細胞による in vitro での細胞傷害活性を測定 (^{51}Cr releasing assay)、blocking assay で細胞傷害活性の主な分子について特定し、

KIRリガンド不一致臍帯血NK細胞の有効性について検討する。また11q23転座型ALL細胞以外の難治性白血病(1;19転座型、T細胞型、Philadelphia染色体陽性型)細胞株に対するNK細胞傷害活性についても測定する。

本研究では白血病細胞株は1;19転座型(5株)、17:19転座型細胞株(4株)、T細胞型(7株)、Philadelphia染色体陽性(6株)のALL細胞株を対象とした。臍帯血ドナーNK細胞は妊娠の経過が良好な母親から文書でinformed consentを得た後、臍帯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%)したものを用いる。全白血病細胞株およびドナー臍帯血のHLA-A, B, Cのアリルのタイピングを行いKIR ligandの有無を分類した。NK細胞傷害活性の陽性コントロールとしてHLA-classIを発現していないK562を使用した。

(1) 各種白血病細胞株におけるNK受容体リガンド、接着因子、chemokine発現の検討
腫瘍細胞上のNK受容体リガンドであるHLA-class I, MICA, MICB, ULBPs, HLA-E, Nectin-2, PVR, ICAM-1, CD40およびchemokineであるCXC3Lの発現をフローサイトメーターで測定する。

(2) NKG2D遺伝子型

NKG2D遺伝子型をTaqMan-Allelic discrimination method(real time PCR)によって解析し、HNK1ホモ、HNK1/LNK1ヘテロ、LNK1ホモの3つのハプロタイプに分類した。

(3) 健常ドナー臍帯血NK細胞の白血病細胞株に対する⁵¹Cr releasing assay法による細胞傷害活性の測定とblocking assay
末梢血、臍帯血ドナーNK細胞をエフェクター細胞として使用する。ターゲットである腫瘍細胞に⁵¹Crを取り込ませた後、エフェ

クター細胞を加える。傷害されたターゲット細胞質内から上清に放出した⁵¹Crを遠心回収後、シンチレーションカウンターで測定する。さらに腫瘍細胞上で発現が認められたNK受容体リガンドの抗体による

blockingと、臍帯血NK細胞上の相対するNK受容体のblockingを行ったのちに⁵¹Cr releasing assayを行い、NK細胞傷害活性におけるこれらの分子の影響を検討する。さらに臍帯血ドナー細胞のHLA-A, B, Cを判定後、腫瘍細胞株とのKIR一致および不一致による細胞傷害活性への影響に関して検討する。

4. 研究成果

- (1) NK細胞上のNKレセプターの発現強度は、成人末梢血、臍帯血全てのドナーにおいてNKG2Dは比較的高い発現を示したが、NKG2Aの発現は低く、NKG2Cはドナー間で様々であった。またNCRsの中ではNKp30, NKp46と比較し、NKp44の発現は著明に低かった。さらに臍帯血と成人末梢血を比較すると、臍帯血の方がNKG2A, NKp30, NKp44の発現が有意に高かった。抑制型レセプターであるKIRの発現は成人末梢血ドナーの方が軽度高かった。
- (2) 成人末梢血、臍帯血ともに、HLA-C1C1型11q23転座型ALL細胞株に対する傷害活性は、HLA-C1C1型NK細胞よりC1C2型NK細胞をドナーとして用いた方が高かった。したがって臍帯血においても11q23転座型ALL細胞に対して、KIRリガンド不一致によるNK細胞のalloreactivityが発揮されると考えられる。
- (3) 成人末梢血由来のNK細胞の11q23転座型ALL細胞株に対する細胞傷害活性は、NK活性化型レセプターであるNKG2Dのブロック

ングにより著明に抑制されたことと、11q23 転座型 ALL 細胞表面上には NKG2D のリガンドが発現していることから、これらの細胞障害活性に NKG2D が強く関与していると考えられた。しかしこれについては臍帯血由来の NK 細胞においては確認できていない。

- (4) 臍帯血由来の NK 細胞の傷害活性につき、NKG2D のハプロタイプ別に検討すると、K562 に対しては HNK1 ホモで高い傾向が、11q23 転座型 ALL 細胞株である KOCL50 では LNK1 ホモで低い傾向がみられたが、もう一つの 11q23 転座型 ALL 細胞株である KOPN1 に対しては、ハプロタイプによる明らかな差はみられなかった。KIR リガンド (HLA-C グループ) 一致、NKG2D LNK1/LNK1 の臍帯血 NK 細胞の傷害活性が特に低い傾向が認められたが、一方、KIR リガンド不一致ドナーでは NKG2D ハプロタイプによる明らかな差は認められなかった。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 大城浩子、Eculizumab treatment followed by U-BMT for a pediatric PNH/AA patient、日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 15 日、名古屋国際会議場
- ② 大城浩子、2 回目の同種移植 7 年後に ALL の骨髄局所再発を来した 1 男児例、日本小児血液・がん学会学術集会、2011 年 11 月 27 日、前橋ベイシア文化ホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大城 浩子 (OHSHIRO HIROKO)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50377537

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし