

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07874

研究課題名(和文) TGF- β 経路の阻害による同種NK細胞の抗腫瘍作用の増強効果

研究課題名(英文) Enhancement of the antitumor effect of allogeneic NK cells by inhibition of TGF-beta pathway

研究代表者

合井 久美子 (GOI, Kumiko)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：70324192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：TGF- β 経路の阻害による直接的な抗腫瘍活性とNK細胞による抗腫瘍活性の増強効果について検討した。TGF- β R阻害剤の添加により、悪性ラブドイド腫瘍においては、NK細胞活性化受容体リガンドの軽度の発現増強が認められたが、直接的な抗腫瘍効果、臍帯血NK細胞による抗腫瘍効果の増強のいずれも認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、同種血液幹細胞移植後のNK細胞の抗腫瘍活性の増強による小児難治性固形腫瘍の治療成績の向上を目指すものであった。TGF- β は小児難治性腫瘍細胞株自体が産生しており、その経路の遮断は抗腫瘍活性とNK細胞による免疫的な抗腫瘍効果の増強をもたらす可能性が示唆されていたが、今回の研究では、少なくともin vitroではその抗腫瘍効果は明らかでなく、現段階では、TGF- β 受容体阻害剤の抗腫瘍効果は限定的であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of TGF- β pathway inhibition on direct antitumor activity and enhancement of antitumor activity by NK cells. In malignant rhabdoid tumor cell lines, the addition of TGF- β R inhibitor resulted in mild enhancement of NK cell activation receptor ligand expression. However, neither direct antitumor effect nor enhancement of antitumor effect by cord blood NK cells was observed.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：NK細胞 小児難治性腫瘍 TGF- β

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行期の横紋筋肉腫、悪性ラブドイド腫瘍などの難治性小児がんの予後は集学的治療の進歩にもかかわらず、未だ不良である。特に、悪性ラブドイド腫瘍は非進行の症例でも予後は不良なうえ、確立された治療法はなく、これらの疾患に対する治療法の開発は急務である。

悪性腫瘍に対する免疫療法の一環として、NK細胞の抑制性受容体 KIR のリガンドである HLA-C グループの不一致ドナーを用いた同種移植の血液悪性疾患、特に AML, MDS に対する抗腫瘍効果が報告された (Ruggeri et al, Science, 2002)。しかし、我々の解析では、小児難治性固形腫瘍に対する *in vitro* での KIRL-MM ドナーによる効果は限定的であり、さらに NK 細胞による抗腫瘍活性が明らかでない癌種も認められた。近年の腫瘍微小環境における免疫寛容の研究から、腫瘍の NK 細胞による免疫監視機構からの逸脱に関して、免疫抑制分子である TGF- β 、VEGF、IL-10、IL-6 等のサイトカインの関与が推定されている。その中でも TGF- β は様々な小児がんが高発現し、NK 細胞に関しては、幹細胞から NK 細胞への分化を阻害し、さらに SMAD pathway を介して細胞傷害性の高い CD56^{dim} NK 細胞を細胞障害活性のない innate lymphoid cell (ILC) type 1 に変換するなどの免疫抑制的な効果が報告されている。したがって、難治性小児固形腫瘍においては TGF- β によるこれらの免疫抑制的な作用により、NK 細胞の傷害活性が阻害されていた可能性があり、TGF- β 経路の阻害により、効果的な抗腫瘍免疫が得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

小児難治性腫瘍に対する TGF- β 経路の阻害による同種 NK 細胞の抗腫瘍効果および腫瘍への直接の影響について検討し、同種血液幹細胞移植後の NK 細胞の抗腫瘍活性の増強による小児難治性固形腫瘍の治療成績の向上を目指すものである。

3. 研究の方法

すでに HLA 型が判明している小児難治性固形腫瘍細胞株である悪性ラブドイド腫瘍 4 株、横紋筋肉腫 2 株、未分化肉腫 1 株を対象とした。NK 細胞傷害活性の陽性コントロールとして HLA-class I の発現陰性の急性白血病細胞株 K562 を使用した。ドナー同種 NK 細胞は臍帯血バンク (東海大学) から供与を受けた保存臍帯血 (HLA 判定済) を解凍後、NK cell isolation kit を用いて臍帯血 NK 細胞を分離し、放射線を照射した末梢血単核球を feeder 細胞として IL-15 と共に培養し、NK 細胞を増幅後、細胞傷害活性に使用した。

(1) 各腫瘍細胞株の培養上清での TGF- β 1 濃度の測定

腫瘍細胞株の培養液交換 1 日を経過したのち、その培養上清中の TGF- β 1 濃度を TGF- β 1 Human Elisa kit を用いて測定する。

各腫瘍細胞株に対する TGF- β R インヒビターの影響

各腫瘍細胞株に対し、TGF- β R インヒビター LY2157299 5 μ mol/L を 48 時間培養し、添加前後での以下の変化を検討する。

A) 各腫瘍細胞における NK 受容体のリガンド発現 (HLA-class I, MICA/B, ULBPs, ICAM-1, CD112, CD155 等) の変化をフローサイトメーターを用いて測定する。

B) 細胞を Propidium iodide で染色し、細胞周期についても検討する。

(2) NK 細胞による細胞障害と TGF- β R inhibitor の影響

臍帯血 NK 細胞をエフェクター細胞として使用する。ドナー NK 細胞を HLA 型による KIR グ

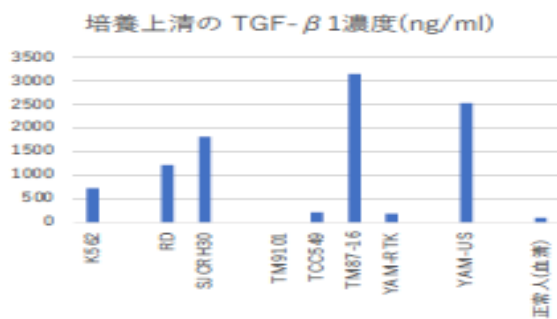
ループ一致もしくは不一致となるように組み合わせた。Target となる腫瘍細胞は Calcein で染色し、腫瘍細胞：ドナー細胞 = 1: 2 もしくは 1:10 となるように混合、4 時間培養後、上清の Calcein 蛍光強度を測定することにより、細胞傷害活性を測定した。

ドナーNK 細胞に対し、予め抗 CD107a 抗体で染色し、同様に腫瘍細胞と 4 時間培養後、細胞傷害活性検討時に、NK 細胞による活性化の指標である CD107a の発現について、フローサイトメーターを用いて測定した。

各々の腫瘍細胞を 48 時間 LY2157299 5 $\mu\text{mol/L}$ で培養した後、同種さい帯血 NK 細胞と 4 時間培養後、Calcein 陽性細胞を FCM で測定した。

4 . 研究成果

(1) - 腫瘍細胞培養上清での TGF- β 1 濃度の測定を ELISA 法で行った。横紋筋肉腫 2 株 (RD, SJCRH30) と悪性ラドイド腫瘍の 1 株 (TM-8716)、未分化肉腫 (YAM-US) の 1 株の細胞上清中の TGF- β 1 濃度は正常人血清と比較して極めて高値であったが、悪性ラドイド腫瘍 3 細胞株の上清では TGF- β 1 の細胞上清は検出されない (TM9101) か、正常人血清と同程度であった。

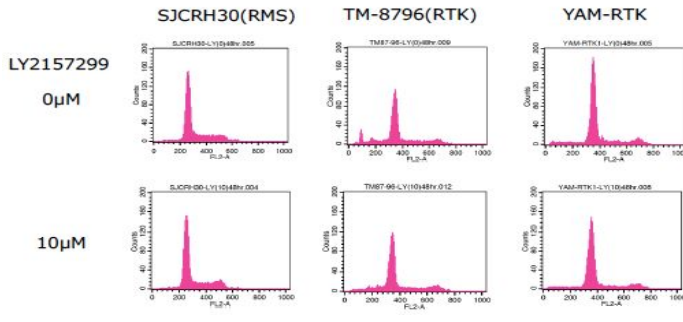


(図 1)

(1) - A) 横紋筋肉腫 2 株 (RD, SJCRH30) と悪性ラドイド腫瘍の 2 株 (TM-8716, YAM-RTK)、未分化肉腫 (YAM-US) で TGF- β 1 インヒビター LY2157299 添加前後の NK 受容体リガンドの発現の変化を検討した。HLA-class1、NKG2D リガンドである MIC A/B、DNAM-1 リガンドである CD155、CD112 発現の変化は全ての細胞株で認められなかった。NKG2D リガンドである ULBP5 に関しては、横紋筋肉腫 2 株では軽度発現が増加したが、他の 3 株ではいずれも発現がむしろ低下していた。

(1) - B) 細胞株に対し、TGF- β 1 インヒビター LY2157299 を添加し、培養後 48 時での細胞周期、細胞死を PI-staining 法で検討したが、コントロールとほぼ同様であり、LY2157299 による短期的な抗腫瘍効果に対する影響は少ないものと考えられた (図 2)。

LY2157299添加後48時間の
細胞周期・細胞死への影響



(図 2)

(2) - 実験に使用した細胞株の HLA-C グループ型は以下の通りであった。

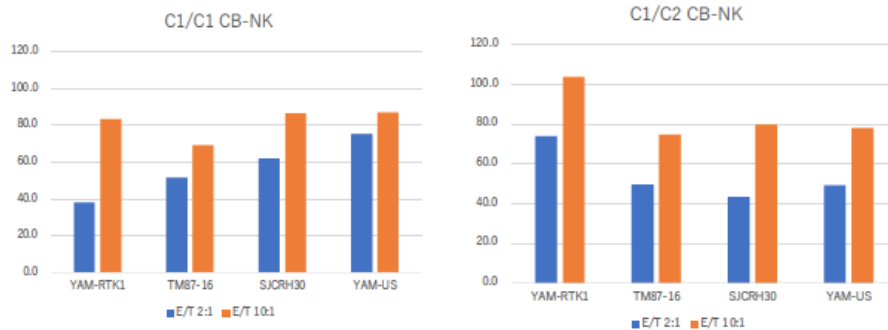
横紋筋肉腫 SJC-RH30 (C2/C2)

悪性ラブドイド腫瘍 TM8716 (C1/C2)

YAM-RTK (C1/C1)

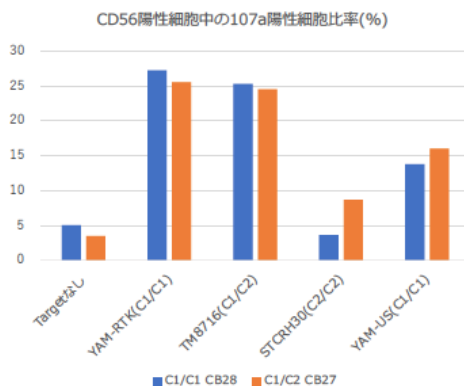
未分化肉腫 YAM-US (C1/C1)

これらの Target 細胞株と NK 細胞との共培養後の Calcein 細胞上清蛍光強度の測定による細胞傷害活性の結果では、ラブドイド腫瘍細胞株においては、C1/C2 型臍帯血 NK 細胞が C1/C1 型さい帯血 NK 細胞に比較して、軽度細胞傷害活性が高い傾向が認められた (図 3)。しかし、他の細胞株では C1/C2 型臍帯血 NK 細胞の優位性は認められなかった。



(図 3)

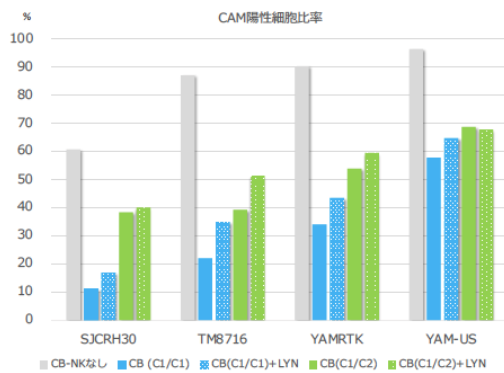
(2) - 行った細胞傷害活性時に、ドナーNK 細胞を抗 CD107a 抗体で染色しドナーNK 細胞の活性化状態を測定した。CD107a 陽性 NK 細胞は Target との共培養により、特に悪性ラブドイド腫瘍株で増加が著明であったが、C 1 /C1 型細胞株と C1/C2 型細胞株の差は明らかではなかった (図 4)。



(図 4)

(2)－ これらの腫瘍細胞に予め LY2157299 を添加したものとし、それに対しそれぞれ、C1/C1 型および C1/C2 型のさい帯血 NK 細胞を各々エフェクター細胞として加え、細胞傷害活性を測定した。

CAM 陽性の腫瘍細胞比率を検討した結果では、TGF- R 阻害剤の添加でも障害活性の明らかな増強効果は認められなかった (図 5)。



(図 5)

以上により、難治性小児悪性腫瘍細胞株、特に悪性ラブドイド腫瘍に対して、少なくとも *in vitro* での NK 細胞による細胞傷害活性があることが示唆された。また、TGF- R 阻害剤の添加により、悪性ラブドイド腫瘍においては、NK 細胞活性化受容体リガンドの軽度の発現増強が認められたが、その傷害活性における *in vitro* で明らかな増強効果は認められず、また、その難治性腫瘍細胞株に対する直接の抗腫瘍効果も明らかではなかった。従って、今回の研究においては、TGF- 経路の阻害による抗腫瘍効果は、直接、NK 細胞を解する間接効果ともに認めることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大城 浩子 (OSHIRO Hiroko) (50377537)	山梨大学・大学院総合研究部・医学研究員 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関