

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19591093

研究課題名（和文） NK 受容体発現細胞障害性 CD8 細胞と免疫制御性 CD4 細胞の同時増幅とその臨床応用

研究課題名（英文） Expansion of inhibitory NK cell receptor-expressing CD8 T cells and immunoregulatory CD4 T cells

研究代表者 田中 淳司(JUNJI TANAKA)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

50250452

研究成果の概要：

同種造血細胞移植においては移植片対宿主病を抑制しつつ、移植片対白血病効果を誘導することがその安全性と有効性において極めて臨床的に重要である。このような理想的な細胞療法を目指して、臍帯血の CD4 陽性分画から CD3/CD28 ビーズと IL-15, TGF- β を用いて免疫制御性 CD25/CD4 細胞 (Treg) を、そして CD4 陰性分画からは OKT3 と IL-15 を用いて抑制性 NK 細胞受容体 (CD94) 発現細胞障害性 CD8 細胞を同時に増幅しうることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植学

1. 研究開始当初の背景

我々は最近、HLA 非拘束性に患者白血病細胞に対して強い細胞障害活性を有し、一方で HLA class I 分子を高発現した自己 PHA 芽球を障害しない抑制性 NK 細胞受容体 (CD94/NKG2A) 発現 CD8 細胞を約 1,000 倍に増幅し得ることを報告した

(Tanaka J et al, **Blood** 104; 768-774, 2004)。さらに、その後の研究により臍帯血などからも患者白血病細胞に対して強い細胞障害活性を有する抑制性 NK 細胞受容体 (CD94/NKG2A) 発現 CD8 細胞を増幅することができることを報告した (Tanaka J et al, **Leukemia** 19; 486-489, 2005)。

一方、最近免疫制御機能を有する CD25/CD4 細胞 (Regulatory T cell, Treg) が注目されている。免疫制御性 CD4 細胞は同種造血細胞移植後の同種免疫反応を抑制しひいては GVHD を沈静化する効果が期待されている。

2. 研究の目的

細胞障害性 CD8 細胞と免疫制御性 CD4 細胞を同時に増幅することができれば、細胞障害性 CD8 細胞による GVL/T 誘導と免疫制御性 CD4 細胞による GVHD 治療を同時に可能とすることができる。このように本研究は癌や白血病に対する GVHD 抑制/GVL 誘導の両立を可能にする新しい同種細胞療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

臍帯血よりもまず CD4 陽性細胞を磁気ビーズ法 (Immunomagnetic beads) を用いて Negative selection により分離する。この CD4 陽性分画細胞より CD25 陽性細胞をさらに Positive selection によって分離し、このようにして調整した細胞を用いて CD3/CD28 Beads と IL-2/IL-15/TGF- β などのサイトカインを加えて効率よく CD25/CD4 陽性かつ FoxP3 陽性の免疫制御性 CD4 細胞を増幅できる培養系を確立する。次に CD4 陰性分画細胞を用いて抑制性 NK 細胞受容体 (CD94/NKG2A) 発現細胞障害性 CD8 細胞をさらに効率良く増幅する培養方法を各種サイトカイン (IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IL-23, TGF- β など)、OKT3 抗体などの組み合わせにより検討して確立する。この際、できうるかぎり GMP グレードに準ずる環境にて培養系を確立する。実際に同種臍帯血移植の際に一部の臍帯血を保存しておき、移植後の再発や GVHD 発症時などの際に必要なに応じて抑制性 NK 細胞受容体発現細胞障害性 CD8 細胞と免疫制御性 CD4 細胞を増幅し輸注する新しい細胞療法の開発を目指す。

4. 研究成果

臍帯血の CD4 陽性分画から CD3/CD28 ビーズと IL-15, TGF- β を用いて免疫制御性 CD25/CD4 細胞 (Treg) を、そして CD4 陰性分画からは OKT3 と IL-15 を用いて抑制性 NK 細胞受容体 (CD94) 発現細胞障害性 CD8 細胞を同時に増幅しうることを明らかにした。

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 13 件)

1. Shigematsu A, Yasumoto A, Yamamoto S, Sugita J, Kondo T, Onozawa M, Kahata K, Endo T, Ota S, Sato N, Takahata M, Okada K, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Koike T, Asaka M, Imamura M.

Regimen-related mucosal injury of the gut increased the incidence of CMV disease after allogeneic bone marrow transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 15:679-685, 2009. (査読有)

2. Toubai T, Shono Y, Tone S, Ibata M, Kato N, Malter C, Lowler KP, Ota S, Tanaka J, Asaka M, Imamura M. Serum soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand level after allogeneic hematopoietic cell transplantation. Leuk Lymphoma. 50:844-847, 2009. (査読有)

3. Onozawa M, Hashino S, Morita R, Takahata M, Shigematsu A, Kahata K, Kondo T, Tanaka J, Imamura M, Asaka M. HB vaccination in the prevention of viral reactivation in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients with previous HBV infection. Biol Blood Marrow Transplant. 14:1226-1230, 2008. (査読有)

4. Kaji M, Tanaka J, Sugita J, Kato N, Ibata M, Shono Y, Ota S, Kondo T, Asaka M, Imamura M. Ciprofloxacin inhibits lipopolysaccharide-induced toll-like receptor-4 and 8 expression on human monocytes derived from adult and cord blood Ann Hematol 87:229-231, 2008. (査読有)

5. Sugita J, Tanaka J, Kurosawa M, Fukuhara T, Hashino S, Torimoto E, Koizumi K, Masauji N, Nishimura S, Koda K, Imamura M, Kasai M. Effects of the mean daily doses of imatinib during the first year on survival of patients with chronic myeloid leukemia (CML) in Japan: a study of the Hokkaido Hematology Study Group. Eur J Haematol. 80:160-163, 2008. (査読有)

6. Kondo T, Mori A, Darmanin S, Hashino S, Tanaka J, Asaka M. The seventh pathogenic fusion gene FIP1L1-RARA was isolated from a t(4;17)-positive Acute Promyelocytic Leukemia. Haematologica 93:1414-1416, 2008. (査読有)

7. Sugita J, Iwao N, Tanaka J, Kato N, Shiratori S, Wakasa K, Shigematsu A, Toubai T, Takahata M, Kondo T, Asaka M, Imamura M. T cell receptor excision circle (TREC) levels in CD94-expressing CD8 T Cells during graft-versus-host disease Leukemia Lymphoma 49:1306-1310, 2008. (査読有)

8. Shiratori S, Tsutsumi Y, Kawamura T, Kudo K, Shimoyama N, Masauji N, Tanaka J, Asaka M, Imamura M. HCV non-structural

protein 3 and HCV RNA genome in non-Hodgkin lymphoma and transition of the serum HCV RNA level: a retrospective analysis in one institution. Int J Hematol. 87: 298-302, 2008. (査読有)

9. Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, Sugita J, Onozawa M, Kahata K, Endo T, Shiratori S, Ota S, Obara M, Wakasa K, Takahata M, Takeda Y, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Koike T, Asaka M, Imamura M. Excellent outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a conditioning regimen with medium-dose VP-16, cyclophosphamide and total body irradiation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Biol Blood Marrow Transplant. 14:568-575, 2008. (査読有)

10. Shiratori S, Yasumoto A, Tanaka J, Shigematsu A, Yamamoto S, Nishio M, Hashino S, Morita R, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Kondo T, Ota S, Wakasa K, Sugita J, Koike T, Asaka M, Kasai M, Imamura M. A retrospective analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL): clinical impact of graft-versus-leukemia/lymphoma effect. Biol Blood Marrow Transplant 14:817-823, 2008. (査読有)

11. Sugita J, Tanaka J, Hashimoto A, Shiratori S, Yasumoto A, Wakasa K, Kikuchi M, Shigematsu A, Miura Y, Tsutsumi Y, Kondo T, Asaka M, Imamura M. Influence of conditioning regimens and stem cell

sources on donor-type chimerism early after stem cell transplantation. Ann Hematol 87: 1003-1008, 2008. (査読有)

12. Tanaka J, Sugita J, Kato N, Toubai T, Ibata M, Shono Y, Ota S, Kondo T, Kobayashi T, Kobayashi M, Asaka M, Imamura M. Expansion of NK receptor (CD94/NKG2A)-expressing cytolytic CD8 T cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from the same cord blood unit. Exp Hematol 35:1562-1566, 2007. (査読有)

13. Kato N, Tanaka J, Sugita J, Toubai T, Miura Y, Ibata M, Shono Y, Ota S, Kondo T, Asaka M, Imamura M. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. Leukemia 21:2103-2108, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

1. 田中淳司

NK 細胞受容体発現細胞と同種造血細胞移植療法
第 31 回 日本造血細胞移植学会総会 2009、2、5-6 : 札幌

2. 田中淳司

同種末梢血幹細胞移植
骨髄バンクコーディネーターブラッシュアップ研究
2009、2、6 : 札幌

3. Tanaka J, Sugita J, Shigematu A, Shiratori S, Wakasa K, Shigematu A, Takahata M, Kondo T, Asaka M, Imamura M.

Expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from cord blood CD4⁺ cells using the common g-chain cytokine IL-15. 37th Annual Meeting of International Society of Hematology (ISEH) 2008. 7. 9-12. Boston, USA.

4. 田中淳司

造血細胞移植における GVHD/GVL 制御
第 6 回 Tokushima Stem Cell Transplantation (TSCT) 研究会
2008、6、20 : 徳島

5. 田中淳司

地区調整医師活動の現況
全国骨髄バンクボランティアの集い in 札幌
2008、5、31 : 札幌

6. 田中淳司

悪性リンパ腫-病態分類と従来の治療法、新しい薬
血液がん-より良い治療とより良い治療
NPO 法人つばさ/骨髄移植推進財団 共催フォーラム 2007、12、1 : 札幌

7. 田中淳司

造血細胞移植における NK 受容体発現細胞の役割
第 7 回血液疾患先端フォーラム 2007、11、3 : 金沢

8. 田中淳司

GVHD/GVL 制御における NK 細胞受容体発現細胞の役割
第 69 回日本血液学会第 49 回日本臨床血液学会合同シンポジウム 2007、10、12 : 横浜

9. Tanaka J, Sugita J, Shigematu A, Shiratori S, Wakasa K, Kondo T, Asaka M, Imamura M. Subpopulations of human NK cells after allogeneic stem cell transplantation. 36th Annual Meeting of

International Society of Hematology
(ISEH) 2007. 9. 28-30. Humberg, Germany.

10. 田中淳司

造血細胞移植後の免疫再構築

第3回東大医科研細胞療法セミナー 20

07、4、20：東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

田中淳司

50250452

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし