

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間： 2007 年度 ~2008 年度

課題番号：19790711

研究課題名 (和文) 臍帯血由来 NK 細胞の抗白血病効果の検討

研究課題名 (英文) The study of graft-versus-leukemia (GVL) effect of NK cells from umbilical cord blood (CB)

研究代表者 本名 浩子 (HONNA HIROKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：50377537

研究成果の概要：

近年、ドナーと患者間の NK 細胞抑制性レセプター (KIR) のリガンド不一致が NK 細胞による移植片対白血病 (GVL) 効果をもたらすと報告された。本研究は難治性小児急性リンパ性白血病 (ALL) である 11q23 転座型 ALL に対する、臍帯血移植における KIR リガンド不一致ドナーの有用性を基礎的に検討したところ、KIR リガンド不一致による NK 細胞の細胞傷害活性が発揮されることが示され、今後は臍帯血移植への応用も期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

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：臍帯血移植、graft-versus-leukemia 効果、KIR リガンド不一致

1. 研究開始当初の背景

(1) 臍帯血移植 (Cord Blood Transplantation: CBT) とは、分娩時に胎盤から臍帯血を採取し、そのなかに含まれる造血幹細胞を凍結保存し、移植時に解凍してレ

シピエントに輸注するものである。CBT の患者側の一般的利点としては、重症な移植片対宿主病 (GVHD) が少ないため HLA1-2 座不一致でも移植ができ、かつ移植片対白血病 (GVL) 効果は骨髄移植と同等に得られると報告され

ており、また、バンクを介する非血縁間の移植ではあらかじめ臍帯血が凍結保存されているため移植片の供給が迅速である点などが挙げられる。しかし、採取される臍帯血量に限りがあるため、主に小児患者を対象として CBT は行われてきた。

(2) そのなかでも 11q23 転座型急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia: ALL) は、乳児期発症が多く、化学療法のみでは根治が困難であるため CBT の代表的な移植対象疾患である。しかし、11q23 転座型 ALL は GVL 効果のエフェクターである細胞障害因子 TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)、FasL に対して耐性であるうえ、同種移植後の GVL 効果について疑問視する報告もあり、移植成績に関しては一定の見解は得られていない。

(3) 近年、ドナーと患者間の NK 細胞抑制性レセプターのリガンドの不一致が NK 細胞による GVL 効果をもたらすと報告された。NK 細胞は自己の HLA クラス I を持っている細胞に対しては寛容が成立しているが、特定の自己の HLA クラス I 抗原を発現していない細胞に対して細胞障害因子 perforin を介して細胞死をもたらす。主要なヒトの抑制性 NK 細胞レセプターである killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs)のうち、CD158b (KIR2DL2/3) は Group1 に属する HLA-C (Cw1, w3, w7, w8) を、CD158a (KIR2DL1) は Group2 に属する HLA-C (Cw2, w4, w5, w6) をリガンドとして認識する⁴⁾。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、

患者細胞に対し障害活性をもたらし、GVL 効果が得られると考えられている。

(4) Ruggeri らは、成人の再発ハイリスク急性骨髄性白血病 (AML) に対して HLA-C 不適合ドナーから T 細胞除去末梢血幹細胞移植を行った場合の移植後再発率が、一致している場合に比べて著明に低下したと報告した。これらの移植は、従来 of 移植前処置より治療強度を落とした reduced intensity stem cell transplantation (RIST) によるもので、再発率の低下はドナー細胞による免疫学的機序によると考えられた。

(5) これまで NK 細胞が関与する GVL 効果は AML の一部でのみ認められると考えられてきたが、2005 年に乳児 11q23 転座型 ALL の HLA 一致同胞からの移植後再発例に対して、非寛解期に T 細胞除去を行った、HLA-C 不一致の末梢血幹細胞を用いた RIST を行ったところ、1 年以上寛解を維持している症例が報告された。

2. 研究の目的

(1) 我々は予備実験として、健常人 9 人と 11q23 型白血病細胞 10 株で HLA のアリルタイプピングを行ったところ、健常人は C1/C1 型が 5 名、C1/C2 型が 4 名であり、細胞株は C1/C1 型が 9 株、C1/C2 型が 1 株であった。C1/C1 型の 2 細胞株に対し、C1/C1 型と C1/C2 型健常人末梢血由来 NK 細胞による細胞障害活性を測定したところ、C1/C1 型の NK 細胞より、C1/C2 型の NK 細胞で明らかに細胞障害活性は強かった。このことから 11q23 転座型などの小児難治性 ALL に対して HLA-C などの KIR リガンド不一致ドナーを選択した場合、NK 細胞による GVL 効果が期待できると考えた。

(2) また、予備実験として 1 例の臍帯血由来

NK細胞を用いて11q23転座型ALL細胞株に対する細胞障害活性を測定したところ、末梢血と同等の効果が得られた。これまでKIRリガンド不一致移植は主に末梢血幹細胞や骨髓血を用いて行われてきた。現在成人領域では、移植合併症の軽減のため、RISTを併用するRI-CBTが行われつつあり、我が国での臍帯血移植件数は増加の一途にある。これにKIRリガンド不一致を考慮して移植を行うことにより、GVL効果が増強し、移植成績が向上する可能性がある。

(3)本研究は難治性小児急性リンパ性白血病である11q23転座型ALLに対する臍帯血移植におけるKIRリガンド不一致ドナーの有用性を基礎的に検討し、臨床応用を目的として以下の解析を行う。

3. 研究の方法

(1)研究に用いる細胞

本研究では11q23転座型(10株)、Ph1陽性(12株)、1;19転座型(5株)、その他のB precursor株(6株)、T細胞型(7株)の急性リンパ性白血病細胞株を対象とした。また、臍帯血は患者様から文書でinformed consentを得た後、分娩後に娩出された胎盤から採取し用いる。白血病細胞株うち11q23転座型9株(KOPN1, KOPB26, KOCL33, KOCL44, KOCL45, KOPN50, KOCL51, KOCL58, KOCL69, YAACL95)はHLA-A, B, Cのアリルのタイピングを行い、HLA-C座とBw4の有無で各々分類した。HLA-C座がGroup1はC1、Group2はC2と定義した。11q23転座型急性リンパ性白血病細胞株はすべてC1C1型(10 cell line)であり、Bw4+ (7細胞株)、Bw4- (3細胞株)であった。また、末梢血由来NK細胞のコントロールとして、健常ドナーからinformed consentを得た後、末梢血を採取し使用する。

(2)臍帯血由来KIR不一致NK細胞の白血病細胞株に対するin vitroでの細胞傷害活性の

検討

①臍帯血におけるNK細胞比率およびNK細胞表面のKIRの発現の検討

臍帯血から単核球をフィコール法で分離し、抗CD3抗体、抗CD56抗体、抗CD16抗体、抗CD158a抗体、抗CD158b抗体、抗CD158e抗体で染色し、陽性細胞比率をフローサイトメーターで測定する。さらにその他のNK細胞表面の活性型レセプター(NKG2D, natural NKG2C, cytotoxic receptors)、抑制型レセプター(NKG2A)、Co-receptor(DNAM1, LFA1)の発現をフローサイトメーターで測定する。

②臍帯血由来NK細胞の11q23転座型白血病細胞株に対するin vitroでの細胞傷害活性の検討

陽性コントロールとしてHLA classIを発現していないヒト赤芽球系白血病K562を、陰性コントロールとしてC1/C2である11q23転座型急性非リンパ性白血病細胞株KOCL48を使用した。臍帯血単核球を分離した後、Milyeny Biotec社のNK cell selection kitを用いてNK細胞が濃縮し、エフェクター細胞として使用する。ターゲット細胞としてコントロール細胞株と11q23転座型白血病細胞株に各々⁵¹Crを加え1時間37°Cで培養する。その後エフェクター細胞をE/T(エフェクター/ターゲット)比:10~80倍で加え、37°Cで4時間培養する。エフェクター細胞によって傷害されたターゲット細胞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¹⁾。これらの解析が可能だった臍帯血はHLA-A, B, Cのアリルタイピングを行い、白血病細胞株とのKIRの適合について検討する。また、末梢血由来のエフェクター細胞と抗腫瘍活性について比較検討する。

③ターゲット細胞である腫瘍細胞上のリガンドのblocking, もしくはNK細胞上における、腫瘍細胞のリガンドに対応するレセプターのblockingによる細胞傷害活性の測定を

行う。

4. 研究成果

(1) 臍帯血のNK細胞もKIR(158a, 158b)を発現していたが、成人末梢血中のNK細胞と比較すると、CD158bの発現は有意差をもって低かった。その他のNKレセプターの発現は、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。

(2) 臍帯血のNK細胞において、HLA-C1C1型ALL細胞株に対する傷害活性は、C1C1型NK細胞よりC1C2型NK細胞を用いた方が高かった(成人末梢血のNK細胞においても同様の結果であることを報告している)。C1C1型ALL細胞株に対する傷害活性は、臍帯血、成人末梢血の両者で差は認めなかった。従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、臍帯血移植への応用も期待される。

(3) 活性型NK細胞のblocking実験では、NKG2D, NCRs, DNAM1のいずれも傷害活性の抑制効果は確認できず、これらの傷害活性への関与は証明できなかった。今後はNK細胞傷害活性機構の解明及び、IL2等によるNK細胞傷害活性の増強、in vivoでの検討等が必要である。

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)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 3件)

1, 本名浩子、合井久美子、廣瀬衣子、黒田格、犬飼岳史、加賀美恵子、中澤眞平、杉田完爾. 同種臍帯血NK細胞のMLL遺伝子再構成陽性ALLに対する細胞傷害活性に関する検討、第70回日本血液学会総会、平成20年10月11日、京都

2, 本名浩子、合井久美子、廣瀬衣子、黒田格、犬飼岳史、加賀美恵子、杉田完爾. 11q23転座型白血病に対する同種NK細胞の抗腫瘍効果の検討、American society of hematology, 平成19年12月8~11日、アメリカ、アトランタ

3, 本名浩子、合井久美子、廣瀬衣子、黒田格、犬飼岳史、加賀美恵子、佐藤広樹、中澤眞平、杉田完爾. 11q23転座型白血病に対する同種NK細胞の抗腫瘍効果の検討、第69回日本血液学会総会、平成19年10月12日、横浜

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本名 浩子 (HONNA HIROKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・

医学研究員

研究者番号：50377537

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし