

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591249

研究課題名(和文) 小児難治性悪性腫瘍に対するナチュラルキラー細胞による抗腫瘍効果

研究課題名(英文) The cytotoxic effect by natural killer cells against pediatric malignant tumors.

研究代表者

合井 久美子 (GOI KUMIKO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：70324192

研究成果の概要(和文)：小児白血病および固形腫瘍に対して、末梢血および臍帯血NK細胞の抗腫瘍効果およびその機序について解析した。MLL再構成型急性リンパ性白血病細胞株やT細胞型急性リンパ性白血病細胞株に対して、ドナーNK細胞のkiller cell Ig-like受容体(KIR)リガンドを標的腫瘍細胞が持っていない場合、NK細胞の抗腫瘍効果が増大した。そのため、臍帯血移植のドナーとしてKIRリガンド不一致ドナーを選んだ場合、これらの悪性疾患に対する移植片対腫瘍効果が期待されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effect and the mechanisms of the cytotoxicity of the peripheral blood (PB) and the cord blood (CB) NK cells against pediatric leukemia and solid tumors. If donor KIR (killer cell Ig-like receptor) ligand is not present in the tumor cells, alloreactivity against the recipients' tumor cells is increased in MLL rearranged acute lymphoblastic leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. Therefore the graft versus tumor effect against these malignancies 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
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・小児科学

キーワード：NK細胞、難治性腫瘍、白血病、KIR、同種移植

## 1. 研究開始当初の背景

主要なヒトの抑制性NK細胞レセプターであるKIRsのうち、CD158b(KIR2DL2/3)はGroup1に属するHLA-C(Cw1, w3, w7, w8など)を、

CD158a(KIR2DL1)はGroup2に属するHLA-C(Cw2, w4, w5, w6など)をリガンドとして認識する。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。近年、国外で進行期の急性骨髄性白血病に対する KIR リガンド(HLA-C)不一致の同種造血幹細胞移植の GVL 効果が報告されたが、ALL に対しては否定的な意見が多かった。しかし、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、少なくとも一部の ALL には有用であることが推測された。melanoma、renal cell carcinoma などの固形腫瘍でも HLA-C 不一致の同種移植の効果が報告されているが、小児悪性腫瘍に対する報告はわずかである。これらの KIR リガンド不一致移植療法はドナーソースが末梢血幹細胞、骨髄に限られており、臍帯血移植での検討はほとんど行われていない。

NK 細胞の傷害活性には KIR2DL1, KIR2DL2/3 以外にも多種類の活性化受容体 (NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D, NKG2C, DAM-1)、抑制性受容体(NKG2A, KIR3DL)、co-receptor (LFA-1, CD16, CD40ligand)、それらの ligand(MICA, MICB, ULBPs, HLA-E, Nectin-2, PVR, HLA-Bw4, ICAM-1, Fc of IgG, CD40 など)、chemokine (CXC3L)の関与が報告されている。抗腫瘍剤として臨床治験が行われている Histone deacetylase (HDAC) inhibitorは白血病細胞に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。

## 2. 研究の目的

本研究は 11q23 転座型急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia : ALL)、神経芽腫などの難治性小児悪性腫瘍に対して KIR リガンド不一致移植ドナーの有用性を明らかにすることで移植成績の向上をめざすと同時に、各々の腫瘍/NK 細胞間の主たるリガンド/受容体の同定、臍帯血も含むNK細胞による抗腫瘍効果の増幅を行い、同種造血幹細胞移植をベースとしたNK細胞療法により小児難治性悪性疾患の治療成績の改善をめざすものである。本研究によりKIRリガンド不一致による小児難治性腫瘍に対するドナーNK細胞の抗腫瘍効果が明らかになれば、移植時にKIRリガンド不一致ドナーを選択することにより移植成績の向上につながる可能性がある。患者の腫瘍細胞に発現している

NK細胞のリガンドを同定し、それに対し抗腫瘍活性の高いNK細胞を持つドナーの選択を移植前に行うことにより、治療成績を向上させることが期待される。さらに、抗体療法、薬剤併用等でNK細胞による抗腫瘍活性をあげることができれば、これを抗腫瘍活性の高いドナー細胞の選択に加えることにより、さらなる効果が期待できるかもしれない。また、抗腫瘍活性の高いNK細胞のexpansion、誘導が可能であれば、同種移植後のドナーリンパ球輸注療法のようにNK細胞を誘導もしくは体外で増幅した後輸注し、抗腫瘍効果を得ることも可能かもしれない。現在、臍帯血バンクでNK細胞によるallo-reactivityを得ることを目的として、ドナー臍帯血におけるHLA-Cの検索も検討されつつあるが、臍帯血由来NK細胞でも抗腫瘍効果がみとめられれば、患者の状態に合わせて迅速に移植片を獲得することが可能となり、さらなる移植成績の向上が期待できる。さらにミニ移植で抗腫瘍効果が得られるのであれば、小児の移植後の重大な合併症である成長発達障害などを防止でき、より安全な移植法が確立できると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) ドナー末梢血および臍帯血NK細胞のNKレセプター発現と白血病細胞および固形腫瘍細胞株に対するin vitroでの細胞傷害活性の検討

① ドナー末梢血、臍帯血NK細胞表面の活性化型、抑制型receptor、Co-receptorの発現をFCMにより測定する。

② 腫瘍細胞上のNK receptorおよびco-receptorのリガンドの発現をFCMで測定するとともに、これらのリガンドのうち発現がみられたものに対するblocking、もしくは末梢血NK細胞上の対応するレセプターのblockingを行ったのち細胞に対する<sup>51</sup>Cr 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。また、HDACiなどの薬剤を添加した後、これらのリガンドの発現の変化について検討する。

③ 健常ドナー末梢血、臍帯血NK細胞の白血病細胞株、神経芽腫細胞株に対する<sup>51</sup>Cr releasing assay法による細胞傷害活性の測定。KIR一致および不一致の影響に関しては健常ドナー細胞と腫瘍細胞株をC1C1ドナー対C1C1細胞株、C1C2ドナー対C1C1細胞株のように組み合わせ、傷害活性を検

討する。

(2) NK 細胞による細胞傷害のメカニズムおよび増幅についての解析

細胞傷害時の活性化 NK 細胞の抗 CD107a 抗体染色による phenotype の同定 ドナーNK 細胞と、エフェクター細胞を共培養した後、抗 CD56 抗体、抗 CD107a 抗体、および抗 NK レセプター抗体と 3 重染色することにより、各腫瘍細胞に対する活性化ドナーNK 細胞の phenotype を同定する。

(3) サイトカインによるドナーNK 細胞の活性化の増強についての検討

ドナーNK 細胞を feeder layer として放射線照射した EB-LCL を用いて、リコンビナントヒト IL-2 100U/ml を添加し、2 週間 37°C で培養する。培養前後での細胞数、抗 CD3, CD8, CD56, CD16 抗体、1-①で示した抗体で染色し、陽性細胞比率をフローサイトメーターで測定する。さらに腫瘍細胞株と共培養後の CD107a の発現を測定し、抗腫瘍活性の変化について検討する。

#### 4. 研究成果

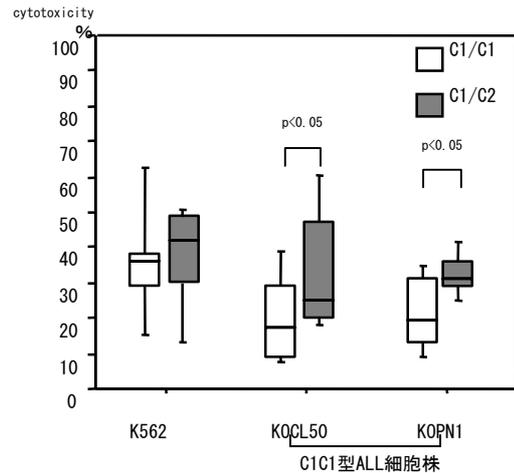
(1) -① NK 受容体の発現に関しては、成人末梢血 NK 細胞と比較し臍帯血 NK 細胞では KIRs (CD158a, CD158b) はやや低発現であり、NKG2D, DNAM-1 は同等の発現を示し、NKG2A, NKp30, NKp44 の発現が有意に高かった。臍帯血、末梢血いずれの NK 細胞でも NKG2D の発現は極めて高かったが、細胞傷害活性と NKG2D の SNP 型で比較検討したところ、臍帯血 NK 細胞の細胞傷害活性が、ドナーの NKG2D の SNP により活性の差があることが示唆された。

(1) -② MLL 再構成 ALL 細胞株表面の NKG2D リガンドの発現は全体的に低発現だったが、DNAM-1 のリガンドである CD155, CD112、接着分子の LFA-1, ICAM-1 は全ての細胞株で発現していた。また、T 細胞型急性リンパ性白血病が NK 活性化型受容体 NKG2D のリガンドの発現が極めて高かった。この傷害活性はドナーの NKG2D の blocking により著明に抑制され、NKG2D を介しての細胞傷害活性が強いことが推定された。これらの細胞株の一部に HDACi である TSA を添加し、発現の誘導を試みたが、明らかな発現の変化は認められなかった。小児難治性腫瘍である Ewing 肉腫、神経芽腫、骨肉腫、横紋筋肉腫様腫瘍細胞株でも NK 受容体リガンドを検討したところ、一部の細胞株で NKG2D リガンドの MICA/B および DNAM-1 リガンドの発現が高いこと

が確認され、末梢血 NK 細胞による細胞傷害活性も示された。

(1) -③ 成人末梢血 NK 細胞および臍帯血 NK 細胞における C1C1 型 MLL 再構成型 ALL 細胞株に対する傷害活性は、C1C1 型 NK 細胞より C1C2 型血 NK 細胞の方が高く、成人末梢血由来と臍帯血由来でほぼ同等の細胞傷害活性を有していた。

MLL+ALL細胞株に対するKIRリガンド一致、不一致臍帯血NK細胞による細胞傷害活性の比較



T細胞型急性リンパ性白血病がNK活性化型受容体 NKG2D のリガンドの発現が極めて高いことにより、末梢血、臍帯血 NK 細胞による T細胞型急性リンパ性白血病に対する傷害活性は非常に強く、KIR リガンド不一致ドナーを選択することにより、その効果がより増強することを確認した。

(2) MLL 細胞と NK 細胞を共培養後、NK 細胞上の CD107a の発現は、KIR 陰性 NK 細胞上で最も高い傾向が認められた。また、KIRL ミスマッチドナーでは、ミスマッチリガンドに対応する受容体を有する NK 細胞上の CD107a の発現も高い傾向であった。

(3) NK 細胞における CD107a の発現が IL-2 添加後に著明に増加したことから、IL-2 添加により NK 細胞傷害活性が上昇することが示唆された。

以上により、一部の小児悪性腫瘍に関しては、少なくとも in vitro での KIR リガンド不一致による小児難治性腫瘍に対するドナーNK 細胞の抗腫瘍効果が明らかになった。また、臍帯血でも成人末梢血と同様に NK 細胞による細胞傷害活性を有することが判明した。これらの細胞種に関して

は、移植時に KIR リガンド不一致ドナーを選択することにより移植成績の向上につながる可能性がある。また、臍帯血の使用により、患者の状態に合わせて迅速に移植片を獲得することが可能となり、さらなる移植成績の向上が期待できる。さらにミニ移植で抗腫瘍効果が得られるのであれば、小児の移植後の重大な合併症である成長発達障害などを防止でき、より安全な移植法が確立できると考えられる。

## 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 1 件)

(1) Goi K, Inukai T, Honna H, et al  
Successful tandem (autologous-cord blood) SCT in advanced neuroblastomas with highly amplified MYCN. Bone Marrow Transplant. 2010 Aug 9. [Epub ahead of print] (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 本名浩子、合井久美子 The cytotoxicity of cord blood NK cells against MLL-rearranged ALL is associated with SNPs of NKG2D 第 7 2 回日本血液学会学術集会 平成 2 2 年 9 月 2 4 日 パシフィコ横浜

(2) 本名浩子、合井久美子 同種臍帯血 NK 細胞の T 細胞性急性リンパ性白血病に対する細胞傷害活性に関する検討 日本小児血液学会 平成 2 1 年 1 1 月 2 7 日 千葉県浦安市

(3) 本名浩子、合井久美子 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 2 0 年 1 0 月 1 1 日 国立京都国際会館

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

合井 久美子 (GOI KUMIKO)  
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・  
助教  
研究者番号：7 0 3 2 4 1 9 2

### (2) 研究分担者

大城 浩子 (OSHIRO HIROKO)  
山梨大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：5 0 3 7 7 5 3 7

### (3) 連携研究者

なし