

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461443

研究課題名(和文) 活性化NK細胞療法の臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Clinical application of activated NK cell therapy

研究代表者

田中 淳司 (Tanaka, Junji)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：50250452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性リンパ腫などの血液悪性疾患患者末梢血をリンパ球ソースとし、全血単核球を用いてIL-2、IL-15などのサイトカインと抗CD3抗体であるOKT3、タクロリムス、ダルテパリンを用いることにより、GMPグレードの無血清培地にヒト血清を添加してNK細胞を培養増幅することが出来ました。また培養増幅したNK細胞には前感作なしで培養4時間後にK562白血病細胞株に対して強い細胞障害活性が確認されました。このような手法により再発難治悪性リンパ腫患者を対象としたリツキサン併用の自家培養増幅NK細胞療法についての臨床研究(Phase I/II)を計画することができました。

研究成果の概要(英文)：We could establish the GMP-grade clinical NK cell expansion system under the condition with OKT3, tacrolimus, dalteparin and cytokines such as IL-2 and IL-15 using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with hematological malignancies such as malignant lymphoma. Expanded NK cell had strong cytolytic activity against K562 human leukemic cell line without pre-sensitization. Using this system, we could planed autologous expanded NK cell therapy clinical trial with rituximab (Phase I/II) against relapse/refractory B cell malignant lymphoma.

研究分野：血液内科学

キーワード：NK細胞 細胞療法 悪性リンパ腫

1. 研究開始当初の背景
従来 NK 細胞を培養増幅することは容易ではないとされており、大量のドナー末梢血アフェレーシス試料などより磁気ビーズを用いた CD56 positive selection によって調整されていました。本研究では我々が開発した臍帯血より NK 細胞を培養増幅する方法をさらに改良して、末梢血などから GMP グレードで大量に活性化 NK 細胞を培養増幅する有効な方法を検討し、活性化 NK 細胞療法の基盤を整備し臨床応用を目指します。

2. 研究の目的

本研究においては従来から T 細胞のように培養増幅することが困難とされていた、白血病細胞やがん細胞に対して強力な細胞障害活性を有する活性化された NK 細胞を患者末梢血などから効率的に増幅することにより、白血病やがんに対する新しい活性化 NK 細胞療法の基盤を構築し臨床応用を目指すことを目的とします。

3. 研究の方法

健常人(健常人ドナー)あるいは患者末梢血(固形がん患者、白血病、悪性リンパ腫などの血液がん患者、同種移植後の患者など)をリンパ球ソースとし、全血単核球を用いて IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IFN- γ などのサイトカインを用いて活性化 NK 細胞を培養増幅する有効な方法を検討します。また抗 CD3 抗体、抗活性化型 NK 細胞抗体と各種サイトカインなどを組み合わせ、効率良く NK 細胞を増幅する培養方法を検討して確立します。また T 細胞の増殖を抑制する作用のあるシクロスポリンやタクロリムスの添加が NK 細胞増殖に及ぼす影響について検討します。

細胞性フィーダーを使用しなくても効率が向上するようにヘパリン成分などを代用として用いることが可能かどうかについても検討します。

また GMP グレードの無血清培地またヒト血清添での検討も行います。

4. 研究成果

健常人(健常人ドナー)あるいは悪性リンパ腫などの血液悪性疾患患者末梢血をリンパ球ソースとし、全血単核球を用いて IL-2, IL-15 などのサイトカインと抗 CD3 抗体である OKT3、タクロリムス、ダルテパリンを用いることにより通常使用されることの多い細胞性フィーダ

ーを用いることなく、GMP グレードの無血清培地にヒト血清を添加して NK 細胞を培養増幅することが出来ました。

また培養増幅した NK 細胞には前感作なしで培養 4 時間後に K562 白血病細胞株に対して強い細胞障害活性が確認されました。

このように健常人のみならず血液悪性疾患患者末梢血から clinical scale GMP グレードで細胞障害活性を有する NK 細胞を大量に培養増幅することが可能であることが確認できるとともに、再発難治悪性リンパ腫患者を対象としたリツキサン併用の自家培養増幅 NK 細胞療法についての臨床研究(Phase I/II)を計画することができました。

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 19 件)

1) Nishiwaki S, Tanaka J, et al. (17 人、17 番目) Impact of MRD and TKI on allogeneic hematopoietic cell transplantation for Ph+ALL: a study from the Adult ALL WG of the JSHCT. **Bone Marrow Transplant**

51(1):43-50, 2016. 査読有

2) Arima N, Tanaka J, et al. (19 人、4 番目) Influence of differently licensed KIR2DL1-positive natural killer cells in transplant recipients with acute leukemia: a Japanese national registry study. **Biol Blood Marrow Transplant**

22(3):423-431, 2016. 査読有

3) Takahata M, Tanaka J, et al. (12 人、10 番目) Occurrence of adverse events caused by valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation is reduced by low-dose administration. **Transpl Infect Dis.** **Transpl Infect Dis.** 17(6):810-815, 2015. 査読有

4) Aoki K, Tanaka J, et al. (17 人、15 番目) Conditioning Regimen in Allogeneic Transplantation for Elderly Patients with Advanced Myelodysplastic Syndromes. **Br J Haematol.** 168:463-466, 2015. 査読有

5) Mizuta S, Tanaka J, et al. (17 人、17 番目) Pre-transplant administration of imatinib for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. **Blood** 123(15):2325-2332, 2014. 査読有

- 6) Kato H, Tanaka J. (14人、14番目) Analysis of outcomes following autologous transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia during the first complete remission. **Haematologica** 99(11):e228-30. 2014. 査読有
- 7) Kobayashi R, Tanaka J, et al. (13人、2番目) Etoposide-containing conditioning regimen reduces the occurrence of hemophagocytic lymphohistiocytosis after SCT. **Bone Marrow Transplant**. 49(2):254-257, 2014. 査読有
- 8) Sano H, Tanaka J, et al. (14人、3番目) Risk factor analysis of non-Hodgkin lymphoma-associated haemophagocytic syndromes: a multicentre study. **Br J Haematol**. 165(6):786-792, 2014. 査読有
- 9) Shono Y, Tanaka J, et al. (17人、15番目) Bone Marrow Graft-versus-Host Disease: Evaluation of Its Clinical Impact on Disrupted Hematopoiesis after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. 20(4):495-500, 2014. 査読有
- 10) Takahata M, Tanaka J, et al. (11人、9番目) Hepatitis B virus (HBV) reverse seroconversion (RS) can be prevented even in non-responders to hepatitis B vaccine after allogeneic stem cell transplantation: long-term analysis of intervention in RS with vaccine for patients with previous HBV infection. **Transpl Infect Dis**. 2014 16(5):797-801. 査読有
- 11) Takami A, Tanaka J, et al. (13人、11番目) Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective analysis by the Adult AML Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. 20(11):1785-1790, 2014. 査読有
- 12) Kanda J, Tanaka J, et al. (17人、5番目) Decision Analysis for Donor 1 Selection in Stem Cell Transplantation -2 HLA-8/8 Allele-Matched Unrelated Donor vs. HLA-1 AG Mismatched Related Donor. **Blood Cancer J**. 2014 Dec 5;4:e263. 査読有
- 13) Hayase E, Tanaka J, et al. (14人、11番目) Epstein-barr virus-associated smooth muscle tumors after bone marrow transplantation. **Transplantation**. 2014 Jan 15;97(1):e1-5. 査読有
- 14) Tanaka J, et al. (16人、1番目) Effects of KIR-ligand incompatibility on clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission. **Blood Cancer Journal** 3, e164;2013. doi:10.1038/bcj.2013.62 査読有
- 15) Tanaka J, et al. (16人、1番目) Reduced-intensity versus myeloablative conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients aged over 45 years with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in remission: A study from the Adult ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). **Bone Marrow Transplant**. 48:1389-1394, 2013. 査読有
- 16) Kanamori H, Tanaka J et al. (19人、19番目) Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for patients aged 50 years or older with B-cell ALL in remission: a retrospective study by the Adult ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. **Bone Marrow Transplant**. 48:1513-1518, 2013. 査読有
- 17) Nishiwaki S, Tanaka J et al. (17人、17番目) Impact of donor source on adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis from the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. **Ann Oncology** 24:1594-1602, 2013. 査読有
- 18) Nishiwaki S, Atsuta Y, Tanaka J. (3人、3番目) Allogeneic hematopoietic cell transplantation

from alternative sources for adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: What should we choose when no HLA-matched related donor is available? **Bone Marrow**

Transplant 48:1369-1376, 2013. 査読有

19) Wakao H, Tanaka J, et al. (23人、11番目) Expansion of Functional Human Mucosal-Associated Invariant T Cells via Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. **Cell Stem Cell**. 12(5):546-558, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) Mori N, Tanaka J, et al. Progression to myeloproliferative neoplasmas was associated with mutation of the JAK2 and CALR genes in patients with idiopathic leukocytosis and thrombocytosis. 20th Congress of European Hematology Association (EHA) 2015.6.11-14, Vienna, Austria.
- 2) Shigematsu A, Tanaka J, et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia who had central nervous system involvement: A study from the adult ALL working group of the JSHCT. 20th Congress of European Hematology Association (EHA) 2015.6.11-14, Vienna, Austria.
- 3) Tanaka N, Tanaka J, et al. Fractionated ICE with Rituximab Is Safe and Effective for Relapse/Refractory DLBCL Patients with Severe Comorbidities. 57th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2015.12.5-8. Orlando, USA.
- 4) Shiseki M, Tanaka J, et al. Reduced PLCG1 expression Is Associated with Inferior Survival in Myelodysplastic Syndromes. 57th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2015.12.5-8. Orlando, USA.
- 5) Ishibashi M, Tanaka J, et al. Interaction Between B7-H1 Molecules on Myeloma Cells and PD-1 Molecules on T Cells

Induces Resistance to Antimyeloma Chemotherapy. 56th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2014.12.6-9. San Francisco, USA.

6) Watakabe K, Tanaka J, et al. Efficacy of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Steroid-Refractory aGVHD. 56th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2014.12.6-9. San Francisco, USA.

7) Yamada A, Tanaka J, et al. Clinical Utility of Slam Family Member CD229 in Identifying Tumor Cells and High-Risk Disease Markers, CD86 (B7-2) and CD126 (IL-6 receptor), Using Flow Cytometric Analysis in Multiple Myeloma. 56th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2014.12.6-9. San Francisco, USA.

8) Mizutani M, Tanaka J, et al. Comparable Leukemia-Free Survival after Autologous Hematopoietic Cell Transplantation Versus HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Adult Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission: A Registry Study By the Adult AML Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. 56th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2014.12.6-9. San Francisco, USA.

9) Isono N, Tanaka J, et al. Prospective Analysis of Cytomegalovirus Reactivation and the Immune State of Low-Grade B-Cell Lymphoma Patients Treated with Bendamustine 56th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2014.12.6-9. San Francisco, USA.

10) Wang YH, Tanaka J, et al. Knockdown of a Wnt Receptor FZD1 reduces MDR1/P-Glycoprotein Expression in Human Leukemia Cells through the Wnt/ -Catenin Signaling Pathway. 56th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH), 2014.12.6-9. San Francisco, USA.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中淳司 (TANAKA, Junji)
東京女子医科大学・血液内科学講座・
教授
研究者番号：50250452

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：