

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670581

研究課題名(和文) 肝臓に対する分子標的薬を併用したunlicensed NK細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cell therapeutic strategy using unlicensed NK cells combined with molecular target medicine for liver cancer

研究代表者

大段 秀樹 (Ohdan, Hideki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：10363061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：NK細胞が自己のHLAを認識する抑制性killer immunoglobulin-like receptors (KIRs)の表出と共に、潜在的活性強化を受ける機構を「license」と呼ぶ。KIRとHLA遺伝子型の多様性による個体差が肝細胞癌術後再発に与える影響を検討した。初回肝切除症例170例を対象とし、genotypingを行った。KIR-HLAペア保有数により無再発生存曲線は階層化され、有効なKIR-HLAペア3個の群はペア2個の群に比べ、有意に術後再発予後が良好であった。KIR-HLA遺伝多型によるlicenseの多様性が再発危険因子となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：NK cells have a potential role in immune surveillance of HCC. Self-recognition of HLA through killer immunoglobulin-like receptors (KIR) confers competence to NK cells—a process termed "licensing." We investigated the effect of NK-cell licensing on the susceptibility of patients to HCC recurrence. A total of 170 patients with HCC who underwent curative hepatectomy were enrolled. We analyzed their KIR-HLA genotypes. The presence of KIR2DL1-C2, KIR2DL2-C1, KIR3DL1-BW4, or KIR3DL2-A3/11, functional compound genotypes that intrinsically license NK cells, did not markedly affect HCC recurrence. However, the multiplicity of those compound KIR-HLA genotypes was significantly associated with the HCC recurrence rate, i.e., the cumulative risk of recurrence in patients with at least three compound genotypes was significantly lower than that in patients with one or two compound genotypes. Patients at high risk of HCC recurrence after curative hepatectomy could be identified by KIR-HLA genotyping.

研究分野：消化器・移植外科学

キーワード：NK細胞 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

Natural Killer(NK)細胞は、自然免疫の主要な役割を担い、監視免疫担当細胞として知られている。さらに、抗原感作を必要とせず標的を認識・傷害する機構を有している。一方、自己のヒト白血球抗原(Human leukocyte antigen:HLA)を認識する抑制性 Killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR)を介した抑制シグナルによって自己と非自己を認識し、標的細胞の選別を行う。腫瘍細胞は、しばしば HLA の発現が欠如・低下することで、非自己と認識されNK細胞から細胞傷害を受ける。このNK細胞の自己認識能獲得、すなわちNK細胞上のKIRの発現とともに、免疫細胞としての成熟を経ることで、潜在的な細胞活性の強化がなされるという機構は“license”と呼ばれている。自己組織適合性抗原(self-MHC) class Iに結合するレセプターKIRを発現する“licensed NK細胞”は標的に対し高い応答性である一方で、KIRの発現を欠く“unlicensed NK細胞”は低反応性であると考えられている。しかし、最近、unlicensed NK細胞がサイトメガロウイルス感染細胞や、抗体製剤で分子標的された腫瘍組織に強く応答することも明らかになり、NK細胞の生体防御機構の多様性が認識されつつある。

Licenseに關する抑制性KIRは5種類(KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 3DL1, 3DL2)存在し、各々異なる特定の配列を認識する。HLAが遺伝的に多様性に富むのと同時に、KIRも遺伝子上に可変領域を含みコーディングの有無に個体差を認めるため、個体内で遺伝的に活性のあるKIR-HLAペアの存在には多くの多様性が存在し、腫瘍細胞に対する個体の免疫応答に影響を与えている可能性が示唆される。我々は、unlicensed NK細胞がマウスおよびヒトの肝臓に局在し、抗腫瘍分子TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)を誘導し得ることを報告した。最近、ヒト骨髓あるいは末梢血CD34⁺造血幹細胞から未成熟NK細胞を誘導することに成功したが、KIRを欠落しNKG2DとTRAIL分子を表出したunlicensed様フェノタイプを示す事が確認された。さらにiPS細胞からCD34⁺造血幹細胞に分化させ、未成熟NK細胞を誘導し得る技術を開発した。

2. 研究の目的

肝癌再発・予後へのlicensed NK細胞保有の影響を臨床検体のHLA-KIR genotypingを行い明らかとする。造血幹細胞あるいはiPS細胞から誘導したunlicensed様フェノタイプ(KIR-

TRAIL⁺ NKG2D⁺)を示すNK細胞(induced NK細胞:iNK細胞)は、肝癌細胞にTRAILやNKG2Dのligandを誘導し得る分子標的薬との相乗効果が期待される。本研究では、NKG2D ligandであるMHC class I-related chain A (MICA)の表出を肝癌に誘導し得るキナーゼ阻害剤 sorafenib、プロテアソーム阻害剤 bortezomib、および抗EGFR抗体に暴露した肝癌細胞株を標的としたiNK細胞の抗腫瘍効果を解析し、これらの分子標的薬とiNK細胞を用いた免疫細胞療法の臨床応用の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

HLA および KIR genotype による licensed NK 細胞の存在と肝癌再発の関連

広島大学病院で1997年~2010年に施行した初回肝切除症例のうち、術前肝予備能がChild-Pugh分類Aかつ肉眼的腫瘍完全切除症例(非治療切除症例を除く)および術後病理にて肝細胞癌と診断された170例を解析対象とした。

患者血球より精製したgDNAのSSO-PCR法(Luminex®)を用いたKIR, HLAの遺伝子タイピングを行い、遺伝子レベルでのKIR-HLAペアの有無を判定し、NK細胞のLicense機構の術後再発予後に対する影響をpropensity score matching法を用い解析を行った。

造血幹細胞および iPS 細胞からの unlicensed NK 細胞の分化誘導

ヒト骨髓CD34⁺幹細胞(Lonza社)を5%ヒト血清添加のX-VIVO mediumを用い、SCF(20ng/ml)・Flt-3(20ng/ml)・IL-15(20ng/ml)・IL-7(20ng/ml)の存在下で3週間培養し、続けてIL-12と3日間、IL-18と24時間培養してNK細胞誘導を試みた。また、OCT3/4・SOX2・KLF4・C-MYCをヒト由来線維芽細胞に導入しiPS細胞を樹立した。このiPS細胞をfeeder細胞(M2-10B4)と培養しCD34⁺造血幹細胞を誘導した。誘導CD34⁺細胞をさらにIL-15・IL-3・IL-7・SCF・FLT3・IL-12・IL-18の存在下でfeeder細胞(AFT024)と共に培養し、NK細胞誘導能を検討した。各々誘導したNK細胞の表面抗原およびサイトカイン、ケモカインレセプター表出をフローサイトメトリーで解析した。

分子標的薬とiNK細胞の抗腫瘍相乗効果の解析

経口キナーゼ阻害剤である sorafenib は肝癌細胞のMICA表出を増強し、NKG2Dを介してNK細胞の抗腫瘍活性を増強することが報告された。また、

bortezomib等のプロテアソーム阻害剤が肝臓に NKG2D ligand の発現を誘導し得ることが報告された。さらに、抗 EGFR 抗体と結合した合成 TRAIL はプロテアソーム阻害剤(bortezomib)との併用において肝臓細胞を選択的に傷害することが報告された。しかし、これらの分子標的薬が肝臓細胞の MICA・DR4/5 表出に如何に影響するかは不明である。

そこで、肝臓癌細胞株(HepG2・Huh7)を各種分子標的薬存在下で培養し、MICA・MICB・DR4/5 の表出を評価した。また、C57/BL6 マウスに各分子標的薬(肝臓で使用されるソラフェニブ、HDAC インヒビターの vorinostat、移植分野で免疫抑制薬として使用されるボルテゾミブやエベロリムス、NDA メチル化阻害剤のデシタピン、5 アザシチジンを投与し、肝臓内 NK 細胞の機能分子発現への影響についてフローサイトメトリーを用いて解析した。

4. 研究成果

HLA および KIR genotype による licensed NK 細胞の存在と肝臓再発の関連

肝臓癌初回肝切除症例 170 例に対して遺伝子解析を行い、患者背景因子、腫瘍因子を propensity score matching 法を用いて調整後、予後解析を実施した。

その結果、各々単独の遺伝的 KIR-HLA ペアの保有は再発に対して有意な影響は認めなかったものの、遺伝的ペア保有群の累積再発曲線は、いずれの遺伝的ペアに関しても非保有群と比べ良好であった(図1)。そこで、license による活性強化が複数経路働くことにより累積的な効果を認める、という基礎研究の報告に基づき、遺伝的 KIR-HLA ペア保有数による累積再発曲線の階層化を行い、KIR-HLA ペアが 3 個以上の群 (highly NK license 群) とペア 2 個以下の群 (poorly NK license 群) の再発予後を比較すると、highly NK license 群は調整ハザード比 0.57 と有意に累積再発予後が良好であることが確認された(図1)。

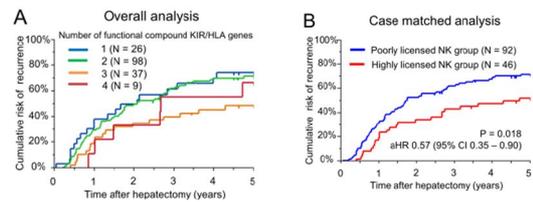


図1. 肝臓癌切除後5年の累積再発率。いずれの KIR-HLA ペアの保有も統計学的な有意性は認めなかったが、遺伝的ペア保有群の累積再発曲線はいずれの KIR-HLA ペアにおいても非保有群の曲線を下回り、再発予後が良好な印象を認めた。保有する KIR-HLA ペア数によって患者を分類すると 5 種類の KIR-HLA ペアのうちそれぞれ 1 つから 4 つの遺伝的ペアを保有する群に分かれ、保有ペア数が 2 個と 3 個の間で大きく再発予後が層別化される可能性が示唆された。

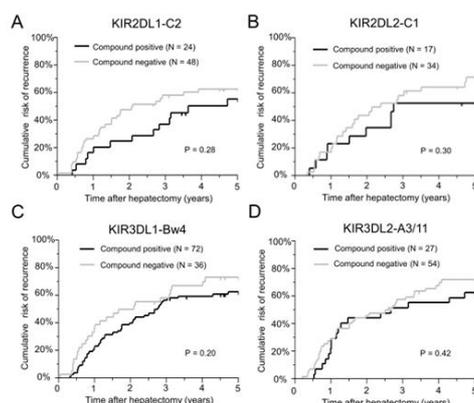
また、C 型肝炎ウイルス感染患者において NK 細胞の細胞傷害活性が低下するという報告に一致して、同解析の HCV 感染患者におけるサブ解析では NK 細胞 Licensing の累積効果は統計学的有意差を認めず、非 HCV 感染患者においては統計学的有意差をもって highly license NK 群で再発予後は良好であった。以上より、KIR-HLA 遺伝型による術後再発ハイリスク群が存在すること、これら免疫学的ハイリスク群は NK 細胞を標的とした術後補助免疫療法が奏功する対照群となり得ることが考えられた。

造血幹細胞および iPS 細胞からの unlicensed NK 細胞の分化誘導

SCF, Flt-3, IL-15, IL-3, IL-7, IL-12, IL-18 存在下でヒト CD34⁺造血幹細胞を培養することで、CD56⁺CD3⁻ NK 細胞が誘導された。そのフェノタイプの特徴は、KIR⁺TRAIL⁺NKG2D⁺ であり、unlicensed type NK 細胞が誘導されたものと考えられた。

分子標的薬と iNK 細胞の抗腫瘍相乗効果の解析

癌細胞における分子標的薬肝臓癌細胞株(HepG2・Huh7)を分子標的薬 sorafenib および bortezomib 存在下で培養し、MICA・MICB・DR4/5 の表出を評価した。その結果、sorafenib は肝臓細胞の MICA 表出を増強した。また、bortezomib は、TRAIL-receptor の表出を濃度依存性に高めた(図2)。



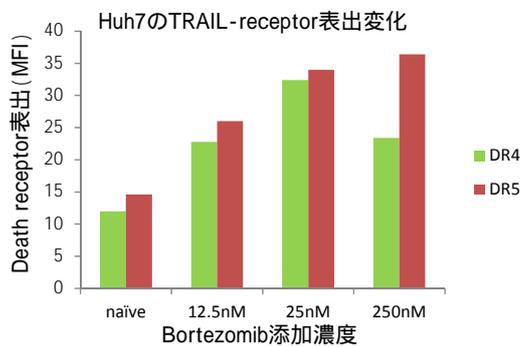


図2. 肝臓癌細胞株 (Huh7) を分子標的薬 sorafenib の存在下で培養し、DR4/5 の表出を評価した。Bortezomib は、TRAIL-receptor の表出を濃度依存性に高めた。

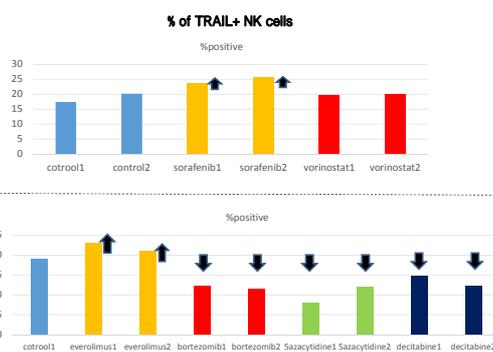


図3. 分子標的薬の肝内 NK 細胞の機能分子発現への影響。C57/BL6 マウスに各分子標的薬を1週間連続投与し、TRAIL 表出をフローサイトメトリーを用いて解析した。Sorafenib および everolimus が肝内 NK 細胞における TRAIL 陽性細胞数の増加を促した。

また、C57/BL6 マウスに各分子標的薬を1週間連続投与し、肝臓内 NK 細胞の機能分子発現への影響についてフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、sorafenib および everolimus の2種類が肝臓内 NK 細胞における TRAIL 陽性細胞数の増加を促した(図3)。

本研究によって Licensing 累積効果による潜在的 NK 細胞活性強化が、肝細胞癌切除後の再発予後に影響を及ぼすことが明らかになったとともに、NK 細胞活性が肝癌切除後再発抑制に関わることが臨床的に確認された。

今後の治療戦略として NK 細胞 License を意図的に操作することによる治療法の可能性が示唆される。

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 3件)

1. Tanimine N, Ohdan H. Impact of multiplicity of functional KIR-HLA compound genotypes on hepatocellular

carcinoma. *Oncoimmunology*. 4(1):e983765. 2015(査読有).

2. Tanimine N, Tanaka Y, Kobayashi T, Tashiro H, Miki D, Imamura M, Aikata H, Tanaka J, Chayama K, Ohdan H. Quantitative effect of natural killer-cell licensing on hepatocellular carcinoma recurrence after curative hepatectomy. *Cancer Immunol Res.* 2(12):1142-1147. 2014(査読有).
3. Dang VT, Tanabe K, Tanaka Y, Tokumoto N, Misumi T, Saeki Y, Fujikuni N, Ohdan H. Fasting enhances TRAIL-mediated liver natural killer cell activity via HSP70 upregulation. *PLoS One.* 9(10):e110748. 2014(査読有).

[学会発表](計 7件)

1. Tanimine N, Tanaka Y, Ohdan H. Impact of natural killer cell licensing associated with KIR-HLA genotype on the recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy: Can the KIR-HLA genotype be a selection criterion for potential donors for liver transplantation with adoptive immunotherapy using NK cells extracted from liver allografts? ATC 2014. 2014. 7.26 ~ 7.31. San Francisco, USA.
2. Tanimine N, Tanaka Y, Ishiyama K, Kobayashi T, Ide K, Ohira M, Tahara H, Tashiro H, Ohdan H. Risk factor of the hepatocellular carcinoma recurrence after living liver transplantation: a single center experience retrospective analysis. ILTS2014. 2014.6.5 ~ 6.7. London, UK.
3. 谷峰直樹, 田中友加, 小林剛, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 田代裕尊, 大段秀樹. KIR-HLA 遺伝子型の肝細胞癌切除後再発予後に対する影響. 第23回日本組織適合性学会大会. 2014.9.13 ~ 9.15. 長崎.
4. 谷峰直樹, 田中友加, 小林剛, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田原裕之, 田代裕尊, 大段秀樹. NK 細胞 License 機構の肝細胞癌切除後再発予後に対する影響. 第32回日本肝移植研究会. 2014.7.3 ~ 7.4. 東京.
5. 大段秀樹. Adjuvant immunotherapy using liver NK cells enhances protective immunity against HCC recurrence and infectious complications in liver transplantation. 第114回日本外科学会総会. 2014.4.3 ~ 4.5. 京都.
6. 大段秀樹. 肝癌治療としての肝移植の近未来. 第40回日本臓器保存生物医学学会総

- 会. 2013.11.9. ~ 11.10. 東京.
7. 谷峰直樹, 田中友加, 安部智之, 朴金蓮, 石山宏平, 井手健太郎, 大平真裕, 田代裕尊, 大段秀樹. 肝移植後肝細胞癌再発に対する腫瘍外因子の影響. 第49回日本移植学会総会. 2013.9.5 ~ 9.7. 京都.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0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 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

大段 秀樹 (Ohdan Hideki)
広島大学 医歯薬保健学研究院 (医)・
教授
研究者番号：10363061

(2) 研究分担者

田中 友加 (Tanaka Yuka)
広島大学 医歯薬保健学研究院 (医)・
准教授
研究者番号：90432666

(3) 連携研究者

()

研究者番号：