

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：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861156

研究課題名(和文)ステロイド様物質GITRLを介した癌細胞によるNK細胞免疫回避機構の解明と制御

研究課題名(英文) Analysis of cancer immune evasion through induction of steroid like agent, GITRL against NK cells

研究代表者

大平 真裕(OHIRA, MASAHIRO)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：30397947

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)：癌細胞は、免疫細胞による攻撃から逃れるためのメカニズムを持っている。本研究では、自然免疫系の代表であるナチュラルキラー(NK)細胞が癌細胞より放出されるステロイド様物質GITRLにより活性が低下することを明らかにした。肝臓内と末梢血のNK細胞上のステロイド様物質受容体を比較すると肝臓内が有意に高かった。また、肝臓癌患者の肝臓内NK細胞上の受容体発現は有意に低下していた。IL-2などのサイトカインで刺激すると受容体は増加し、シグナルを回避しうる可能性が期待された。今後、マウスを用いた実験系で本研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Cancer might alter microenvironment to enable immune escape. To investigate how HCC got immune evasion through GITRL in human HCC, we analyzed the phenotype of liver NK cells and effect of GITRL on NK cells. GITRL released from HCC were shown to suppress NK cell activity in vitro. Liver NK cells expressed more GITRL receptor, GTR than peripheral blood NK cells did. Interestingly, HCC patients had very low level of GTR expression on liver NK cells. Exposure to inflammatory cytokine upregulated GTR expression on liver NK cells. These findings suggest that the effect of GITRL on NK cells might manipulate microenvironment for cancer cells to evade immune system.

研究分野：消化器・移植外科学

キーワード：NK細胞 癌免疫 ステロイド

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓に対する治療は、外科的切除、肝動脈塞栓化学療法、経皮的焼却などが選択されるが、肝予備能の低下した症例では肝不全を誘発する危険を伴う。この場合、肝臓移植が唯一の根治治療となるが、進行肝臓病の場合では移植後癌再発が懸念される。

(2) 申請者らは 2006 年に、肝臓由来 NK 細胞が末梢血と異なり強力な抗腫瘍分子 (TNF-related apoptosis inducing ligand; TRAIL) を発現し、肝臓細胞を効率よく攻撃することを見いだした。これらの基礎研究の結果に基づき、肝臓由来 NK 細胞を用いた肝臓移植術後補助免疫療法の臨床試験を開始した。現在まで 24 例の肝臓病患者に投与し、特に進行肝臓病において有効性を認めており、C 型肝炎ウイルスや術後感染症への効果も確認できた。さらに、2009 年より広島大学と米国マイアミ大学移植外科との共同研究を開始し、本治療法は米国 FDA の承認を受け Phase I study が進行中である (ClinicalTrial.gov # NCT01147380)。

(3) 肝臓移植術後は拒絶反応を抑えるために免疫抑制剤を使用する必要があるが、ステロイドを含むプロトコールと含まないものがある。驚くことに、NK 療法を施行した患者では、有意差はないものの術後 3 年までの肝臓再発はステロイドを使用した群に多い傾向にあった。

(4) 腫瘍細胞が放出するステロイド様物質 (Glucocorticoid-induced TNF receptor ligand; GITRL) が、NK 細胞による抗腫瘍免疫を低下させることが報告された。さらに、肝臓の発現する GITRL が Regulatory T 細胞を誘導し、腫瘍の増殖を助長することが示された。これらの知見から、ステロイドが NK 活性を抑え、それが故に腫瘍が増大すると推測される。つまり腫瘍細胞から産生される GITRL による NK 細胞の活性低下を防ぐことが、新規治療法の開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞から放出されるステロイド様物質 (GITRL) による NK 細胞の活性低下について、癌摘出標本の病理進行度との関連を検討し、プレコンディショニングによる NK 細胞活性維持を治療法として臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することを目的とする。

本研究は、これまで得た知見を基に NK 細胞が肝臓細胞から放出されるステロイド様物質により抑制されるメカニズムを明らかにするものである。最終的な目標は、自然免疫賦活により肝臓増殖を制御することであり、新規治療法及び細胞免疫療法の前臨床研究と位置づけられる。現在、世界的にも NK 細胞を用いた制癌治療及び NK 細胞と癌再発を

検討する研究が数多く発表されているが、そのほとんどが末梢血 NK 細胞を用いたものである。我々は、自然免疫応答を司る NK 細胞を肝臓移植時にグラフト肝の灌流排液から大量に採取する技術を開発し、末梢血のみならず肝臓由来 NK 細胞の GITRL による影響を詳細に検討可能である。肝臓転移及び癌の初期発生に重要な役割を果たしている NK 細胞の活性を維持する研究は、世界的にも類を見ない新しい試みと言える。本治療法が確立し得れば、医学的貢献のみならず、医療経済的にも大きく貢献できる期待が持たれる。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 肝臓癌切除標本からステロイド様物質 GITRL 及び腫瘍浸潤 NK 細胞を同定し、肝臓癌進行度との関連性を検討する。さらに (2) 肝臓癌から放出される GITRL による NK 細胞の活性低下メカニズムを明らかにし、(3) プレコンディショニングによる NK 細胞の活性を維持する方法を確立する。さらに前臨床的研究として、肝臓再発マウスモデルを用いてプレコンディショニングした NK 細胞移入による抗腫瘍活性を検討する。

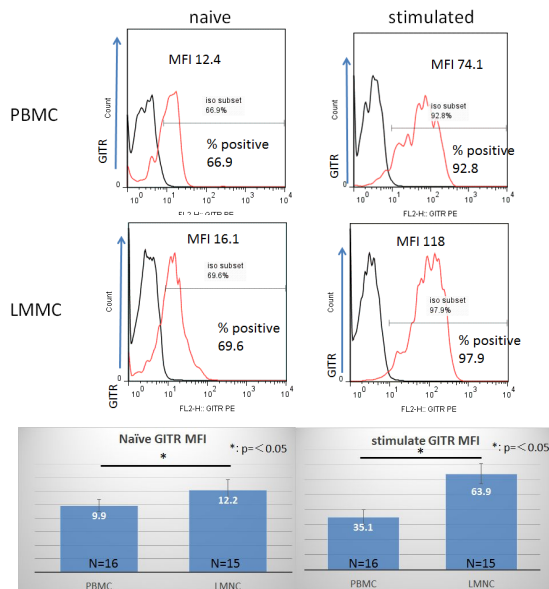
(1) 肝臓癌患者サンプルを用いて、肝臓癌細胞の GITRL 発現を RT-PCR, ELISA で定量化する。肝臓内 NK 細胞の GITRL レセプター発現を含めた表面抗原解析をフローサイトメトリーで行う。肝臓内 NK 細胞の細胞障害活性及びサイトカイン産生能を評価する。

(2) 肝臓内 NK 細胞を肝臓移植グラフトより抽出し、GITRL による NK 細胞活性低下のメカニズムを検討する。GITRL 表出細胞株及び抗 GITRL 抗体固相化フラスコを用いる。

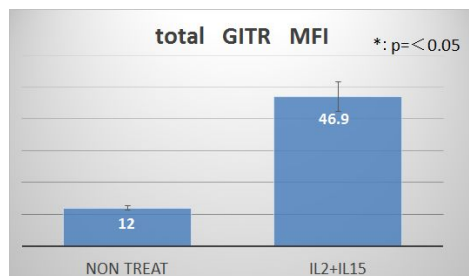
(3) IL-2 を含むサイトカイン刺激、抗 GITRL 抗体によるプレコンディショニングを行った NK 細胞を GITRL 発現腫瘍株及び GITRL 抗体固相化フラスコで共培養試験し、無処置の NK 細胞との活性を比較検討する。肝切除後肝臓転移モデルマウスを用いて in vivo での効果判定を行う。抗 GITRL 抗体の抗腫瘍効果及びプレコンディショニング NK 細胞移入による検討を行う。

4. 研究成果

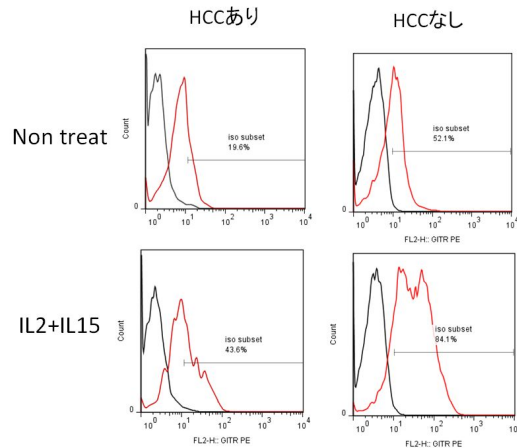
(1) GITRL による NK 活性低下メカニズム解析について、末梢血及び肝臓内 NK 細胞上の GTR (GITRL のレセプター) 発現をフローサイトメトリーで解析した。肝臓移植症例において同一人物の肝臓内 NK 細胞と末梢血 NK 細胞の比較検討を行った。CD3-CD56+NK 細胞に gate をかけて、NK 細胞の表面抗原を解析した。GTR 発現を MFI (Mean Fluorescence intensity) で評価した。肝臓内 NK 細胞の GTR 発現は、末梢血より有意に高値であった (MFI, 12.2 vs 9.9; $p < 0.05$)。



また、IL-2, IL-15 で刺激すると、活性化レセプター CD69, NKp44 や抗腫瘍分子 TRAIL の発現が増加し、肝癌細胞株に対する細胞傷害性が増強する。ステロイド存在下では、抗腫瘍分子の発現が減弱して細胞傷害活性も低下した。さらに、GITRL レセプターである GTR の発現は、IL-2, IL-15 サイトカイン刺激により有意に増強した (MFI, 46.9 vs 12.0; $p < 0.05$)。この傾向は、末梢血 NK 細胞よりも肝臓内 NK 細胞に強かった。この結果から、NK 細胞をサイトカイン刺激でプレコンディショニングすることで、GITRL からの抑制シグナルを回避しうる可能性が期待できる。



(2) 肝臓癌組織中の GITRL 発現と腫瘍浸潤 NK 細胞の解析について、肝臓内 NK 細胞の解析を行った。肝臓移植レシピエントの摘出肝臓を灌流してリンパ球を抽出し、フローサイトメトリーで表面抗原を解析した。肝細胞癌を有する患者の肝臓内 NK 細胞上の GTR 発現は、肝細胞癌を持たないそれよりも有意に低下していた (MFI; 21.6 vs 10.2)。NK 細胞上の GTR は、サイトカイン刺激により発現が増加する活性化マーカーとも考えられており、肝細胞癌患者の肝臓内 NK 細胞活性が低下していることが示唆された。



(3) 組換え型 GITRL が NK 細胞の表現型及び機能を変化させることを確認した後、GITRL 発現腫瘍株が NK 細胞に及ぼす影響について検討することとした。しかし、過去の文献上 GITRL 発現が報告されている HCT116, MDF7 などを様々な条件下で確認したが、発現を認めなかった。GITRL を発現していない肝癌細胞株 (HepG2, Hep3B, Huh7) に GITRL のトランスフェクションを行った。一時的な発現は見られるものの、現時点では安定した発現が得られていない。引き続き条件設定などを継続していく予定である。

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 0 件)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 真裕 (OHIRA MASAHIRO)
広島大学病院 消化器・移植外科 病院助
教
研究者番号：30397947