

『ミラノ基準外肝癌に対する肝移植の肝由来活性化NK細胞移入療法』における
抗肝癌・HCV効果のメカニズムの解明

研究分担者 渡辺 信和 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター
病態解析領域 特任准教授

研究要旨

我々は『ミラノ基準外肝癌に対する肝移植の肝由来活性化NK細胞移入療法』における抗肝癌・HCV効果のメカニズムを解明する目的で、肝移植後に投与されたNK細胞の生体内動態を末梢血のキメリズム解析/HLA-Flow法で検討した。NK療法症例7例のうち、有意な頻度のドナー由来細胞を検出できたのは5例であったが、検出されたドナー由来細胞のフェノタイプは様々であった。一方、NK療法非施行の2例でも、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された。移植後のドナー肝臓からはドナー由来の血液細胞が末梢血流入するので、輸注したNK由来細胞をこれらと区別して検出するためには、輸注する細胞を検出するために何らかの標識を施すことが必要と思われる。

A. 研究目的

我々の研究目的は、現在広島大学と米国マイアミ大学で施行中の『ミラノ基準外肝癌に対する肝移植の肝由来活性化NK細胞移入療法』において、抗肝癌・HCV効果のメカニズムを解明することである。そのため平成25年度は、肝移植後に投与されたNK細胞の生体内動態を知る目的で、NK細胞移入療法後に経時的に採取された末梢血検体をキメリズム解析/HLA-Flow法で解析した。

B. 研究方法

【患者と検体】

解析対象患者は、広島大学医学部消化器・移植外科学で生体肝移植を受けたミラノ基準外肝癌の患者である。NK細胞移入療法は、生体肝移植後3日目に行なわれた。患者の末梢血の採取は、通常は移植後1、3、6、13、20、27日目に行った。移植後1および3日目の検体は、NK細胞移入療法が行なわれる前に採血された。採血後、末梢血からファイコール比重遠心法で単核細胞を分離し、凍害保護液を添加して凍結保存した。

【染色とフローサイトメトリー解析】

東大医科研で解凍後に蛍光標識抗体で染色し、BD FACS Aria II SORP (Becton Dickinson社)で測定した。得られたFCSデータをFlowJoソフトウェアで解析し、白血球サブセットごとのキメリズム、およびNK細胞分画におけるTRAIL分子の発現レベルを解析した。典型例として、症例1のキメリズム解析に用いた蛍光標識抗体の組合せを表1に示す。

広島大学から提供された凍結保存検体は、NK療法症例が9例、NK療法非施行症例が3例であった。NK療法を行なった9症例中の2例では、ドナーとレシピエントのHLAの組合せからHLA-Flow法によるキメリズム解析が困難と判断され、残り7例を解析した。NK療法を行なわなかった3症例のうち、1例では抗HLA-A1抗体がレシピエントHLA-A*01:02を染色できず、キメリズムを解析できなかった（表2）。

（倫理面への配慮）

広島大学医学部消化器・移植外科学で研究

表1 症例1のキメリズム解析に使用した染色組合せ

CDナンバーの下に会社名とクローン名を記す。

Stain 1: Lineage-specific chimerism						*SA-APC				
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	Pacific Blue	Pacific Orange
A2(R)	CD253	CD235a/ PI	CD8	CD56	CD3	Biotin-A9(D)	CD16	CD19	CD4	CD14
AbD	BL	BL /-	BL	BDP	inv	OL	BL	BL	BL	CAL
BB7.2	RIK-2	HIR2	RPA-T8	B159	S4.1	IH0964	3G8	HIB19	RPA-T4	Tuk4

Stain 2: Isotype control for Stain 1						*SA-APC				
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	Pacific Blue	Pacific Orange
A2(R)	IgG1	CD235a/ PI	CD8	CD56	CD3	Biotin-A9(D)	CD16	CD19	CD4	CD14
AbD	BL	BL /-	BL	BDP	inv	OL	BL	BL	BL	CAL
BB7.2	MOPC-21	HIR2	RPA-T8	B159	S4.1	IH0964	3G8	HIB19	RPA-T4	Tuk4

AbD, AbD-serotec; BL, BioLegend; BDP, BD Pharmingen; inv, invitrogen; OL, One Lambda; CAL, CALTAG invitrogen

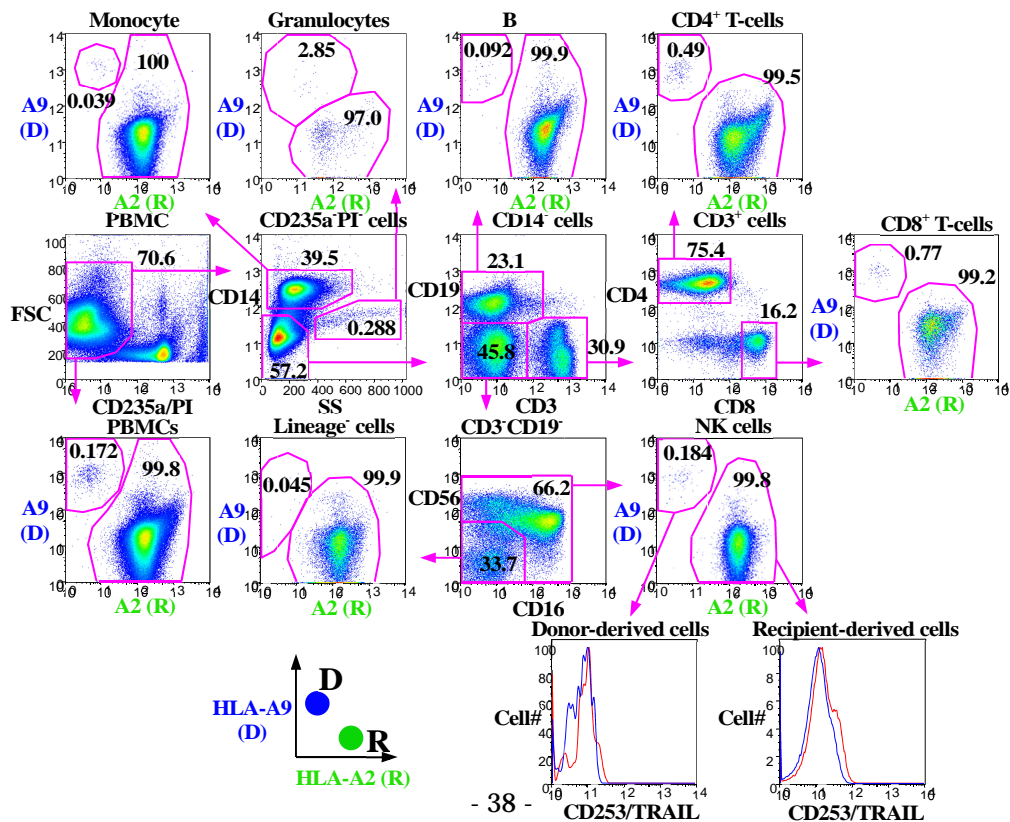
表2 症例解析の結果

赤文字の採血日は、有意な頻度（全単核細胞中0.1%以上）のドナー由来細胞が検出された日を表す。紫文字の採血日は、解析細胞数が少なかったり、抗体の染色性が不良であったりしたため解析ができなかった日を表す。

Date of Analysis	UPN	Sampling Date	Donor		Recipient	
			HLA-A	HLA-B	HLA-A	HLA-B
NK therapy (+)						
120412	Case 1	Day 20	24:03/33:03	03:02/07:02	02:07/33:03	46:01/58:01
120511	Case 2	Day 3, 16	24:02/24:02	15:07/40:02	24:02/02:01	15:07/35:01
120522	Case 3	Day 6, 13, 20, 24; Donor	11:01/31:01	40:01/48:01	31:01/33:03	40:01/44:03
120522	Case 4	Day 6, 13, 20; Donor	31:01/31:01	07:02/35:01	24:02/31:01	07:02/54:01
120525	Case 5	Day 1, 13, 20, 27; Donor	02:07/24:02	46:01/54:01	24:02/33:03	44:03/54:01
120525	Case 6	Day 10, 13, 20, 27; Donor	11:01/31:01	15:01/55:02	24:02/26:03	15:01/46:01
120525	Case 7	Day 3, 6, 27; Donor	02:01/26:01	15:11/56:01	02:01/26:01	15:11/52:01
NK therapy (-)/Negative controls						
120525	Case 8	Day 3, 6, 13, 21, 27; Donor	02:06/02:01	13:01/48:01	02:06/24:02	40:06/48:01
131113	Case 9	Day 3, 6, 13, 16, 27; Donor	31:01/33:03	44:03/51:01	24:02/31:01	51:01/52:01
131114	Case 10	Day 3, 6, 13, 20, 27; Donor	11:01/24:02	07:02/40:01	11:01/01:02	07:02/40:01

Anti-HLA-A1 antibody (clone: H0331) does not stain HLA-A*01:02-positive cells

図1 症例1のフローサイトメトリーによるキメリズム解析



計画書を作成し、同大学の倫理審査委員会に提出し、承認された。患者への研究計画の説明および同意の取得は広島大学で行なわれており、医科研では行なわなかった。検体の取り違いを避ける目的で、患者検体には患者名が記入されており、医科研でもそれらの情報を報告書等で使用した。個人情報に記載されたデータは、研究室内のパスワードを設定したコンピュータと施錠したロッカーで厳密に保管し、個人情報の保護に留意した。

C. 研究結果

解析を行なったNK療法症例7例のうち、有意な頻度（全単核細胞中で0.1%以上）のドナー由来細胞を検出できたのは5例であった（表2）。ドナー由来細胞の頻度は、最も高いものでも全単核細胞中で0.67%であった。検出されたドナー由来細胞のフェノタイプは様々で、NK細胞がとくに高頻度検出されることはなかった。図1に典型的な解析結果（症例1、移植後20日目）を示す。ドナー由来のNK細胞が検出された症例では、細胞表面のTRAIL分子の発現レベルを解析したが、アイソタイプコントロールと比べて発現レベルが高い症例は無かった（図1）。

一方、解析を行なったNK療法非施行の2例でも、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された（表2）。

D. 考察

広島大学では肝臓移植に際し、肝グラフト内の血液を体外で灌流し、その排液から大量の未成熟NK細胞が分離して、抗癌分子（TRAIL）を誘導することに成功している。さらに、これらの活性化NK細胞を用いた制癌免疫療法をミラノ基準外肝癌に対する肝移植患者へ臨床導入し、無再発生存率の改善を確認した。したがって、NK細胞移入療法が抗肝癌作用を発揮していることは間違いない。

NK細胞移入療法の抗肝癌作用のメカニズムとして、移入された肝由来活性化NK細胞が

患者の体内で抗腫瘍効果を発揮していることが予想される。しかしながら、そのことをヒトの体内で直接証明するのは極めて困難である。そこで本年度の研究では、移入した肝由来活性化NK細胞がNK療法後の患者末梢血で実際に検出されるのか検討した。

本細胞療法では、 $2 - 5 \times 10^8$ 個の肝臓由来細胞（NK細胞の頻度は平均46.4%）を3日間の活性化培養後に輸注している（Ohira M, et al. J. Clin. Invest. 119: 3226-3235, 2009）。したがって、NK細胞数が培養中に変化しなかったと仮定すると、輸注されるNK細胞は 2×10^8 個程度と推定される。それらがレシピエントに輸注され、全血液中に均等に分散したとすれば、 2×10^8 cells/5,000 ml = 40 cells / μ lの頻度となる。末梢血におけるNK細胞の頻度は個人差が大きいが、300 cells / μ lとすると、約10%がドナー由来のNK細胞で占められる。NK細胞の一部は培養中や輸注後に破壊されたり、血管外の臓器・組織に分布すると考えられるが、末梢血のキメリズム解析 / HLA-Flow法の検出感度は0.1%以下であるから、輸注されたNK細胞を検出することは理論上不可能ではない。

解析の結果、NK療法を施行した7症例において、有意な頻度のドナー由来細胞が検出されたのは5例のみであった。また、それら5例においても、ドナー由来細胞のうちNK細胞がとくに高頻度である症例はなかった。また、ドナー由来NK細胞表面には、TRAIL分子の発現は認められなかった。一方、NK療法非施行症例の2例においても、移植後有意な頻度のドナー由来細胞が検出された。これは、移植されたドナー肝臓の血管系に付着していた血液細胞が遊離して、レシピエントの流血中に流れ込んだものと思われる。

E. 結論

NK細胞移入療法を受けた症例において、移植肝臓から流血中に流入したと思われるNK細胞を明らかに上回る頻度のドナー由来のTRAIL陽性NK細胞は、いずれの症例でも検出されなかった。また、NK細胞移入療法前（移

植後1日目と3日目)の末梢血や、NK細胞移入療法自体を受けていない患者においても、肝移植後にドナー由来細胞が検出された。それらは移植されたドナー肝臓の血管から遊離したドナー由来の血液細胞と思われた。

したがって、輸注したNK細胞を末梢血で検出しようと試みる場合、移植されたドナー肝臓から遊離した細胞と区別する必要があり、我々が使用した方法論で証明することは困難と思われた。

NK細胞移入療法で輸注された細胞を特異的に検出するためには、細胞療法に使用する培養細胞に何らかの標識を施す必要がある。今後、移入した細胞の末梢血での動態を把握するための標識方法を考えたい。また、移植後にドナー肝臓から遊離して末梢血に存在するドナー由来細胞については、移植された臓器に対する免疫寛容の誘導など、その生理的な意義が注目される。今後の検討課題として注目したい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。