作成日：2024 年 5 月 1 日

2010 年 5 月論文掲載

体外で増殖させた NK 細胞は、がん細胞の殺傷を促す受容体を発現する

- ポイント

固形がんに対する有効な治療手段を検討するため、NK 細胞[※1] の大量製造法の検討およびその特性の解析を行いました。製造した NK 細胞の特徴を調べたところ、がん細胞を殺傷する能力を持ち、その機能を促す複数の受容体が発現していることが確認されました。

- 概要

ヒト由来の NK 細胞を 14 日間培養し、増殖効率、増殖前後の NK 細胞上の受容体[※2] の種類の変化、リガンド[※2] の発現の有無、自己および他者由来のがん細胞株に対する傷害（殺傷）活性を調べたところ、下記のことが明らかとなりました。

(1) 培養プロセスにより NK 細胞が選択的に増殖し、がん細胞に対する傷害性が増加しました
(2) この NK 細胞は、複数の受容体による認識機構によってがん細胞を殺傷しました
(3) またこの NK 細胞は、抗体を介してがん細胞を殺傷することができました

これらの結果は、体外で増殖させた NK 細胞によるがんの免疫療法の臨床試験実施をサポートする前臨床的データとして有望です。

- 研究の背景

自己 NK 細胞を利用したがん免疫療法を実現するためには、下記のような技術的な問題の克服が必要とされています。

・末梢血中の NK 細胞は、治療に必要な細胞数を満たしておらず、GMP に準拠した大量製造を行うことで数を増やす必要があること
・NK 細胞に腫瘍を殺傷させるためには、NK 細胞を活性化する必要があること
・NK 細胞が機能するためには、阻害性受容体—リガンド相互作用による機能抑制を回避する必要があること

NK 細胞の表面には、NK 細胞の機能を活性化する受容体群と、逆に阻害する受容体群があり、これらが連携することで、がん細胞を攻撃する（活性化）、あるいは自己正常細胞は攻撃しない（阻害）という具合に NK 細胞の挙動が変化します。

本研究では、将来の臨床試験への足掛かりとするため、NK 細胞を体外で培養してその特性（がん細胞の殺傷効率や受容体のパターンなど）を詳細に調べました。

- 研究の成果

(1) 培養プロセスにより NK 細胞が選択的に増殖し、がん細胞に対する傷害性が増加した

ヒト末梢血から抽出したリンパ球（いろいろな種類の細胞が混ざった状態のもの）を、所定の手順で 14 日間培養し、培養前と培養後の細胞表面のマーカーの分析を行いました。その結果、本報告で使用した培養法では、培養前の下処理（NK 細胞の抽出精製）なしに、NK 細胞が選択的

に増殖しました（Figure 1A）。また、培養した NK 細胞を各種がん細胞と接触させたところ、培養後の細胞では、効率的にがん細胞を殺すことができることが示されました。一方で、培養前の細胞では、ほとんどがん細胞を殺すことができず、培養によって NK 細胞が活性化していることが示唆されました。なお、細胞の増殖効率が高いケースでは、がん細胞に対する傷害性もまた高い傾向が見られました（データ示さず）。

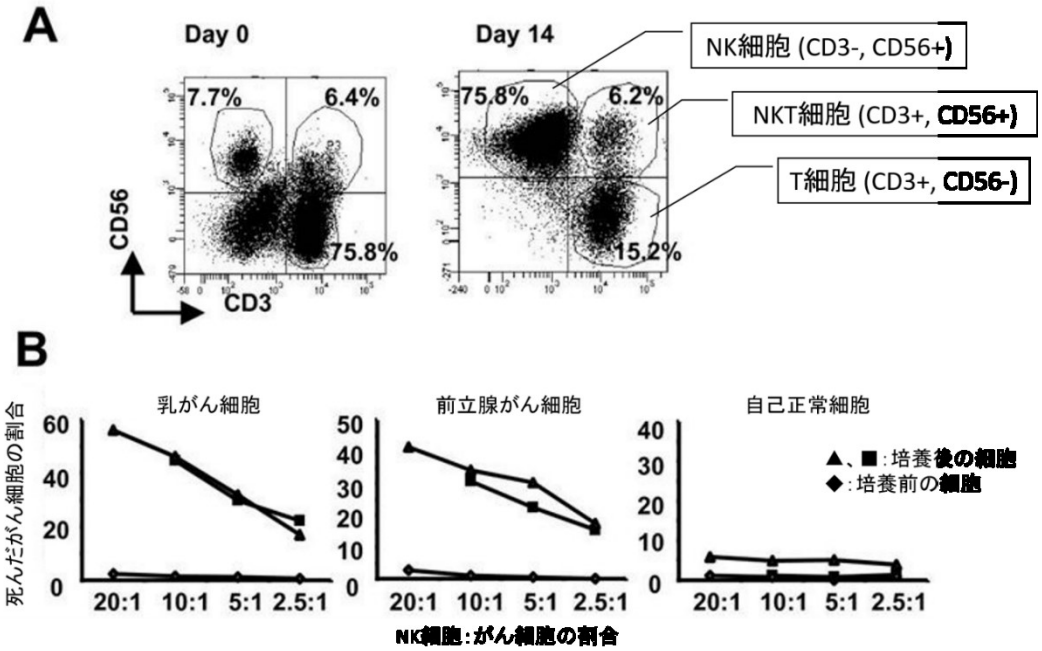

Figure 1（一部改変）：ヒト末梢血由来細胞（PBMC）から、がん細胞を傷害する NK 細胞を効率的に増殖させることができる

A, Day 0：培養前の細胞群、Day 14：培養後の細胞群。培養前の NK 細胞の割合は、全体の 7.7%に過ぎませんが、培養後、その割合は 75.8%まで増加しました。

B, 培養した NK 細胞は、乳がんや前立腺がんの細胞を効率的に殺傷しましたが、培養前の細胞は傷害性を示しませんでした。また、培養の前後に関わらず、自己正常細胞は攻撃しません。

(2) 体外で増殖させた NK 細胞は複数の受容体を介してがん細胞を殺傷する

2 名の患者の血液から採取し、体外で増殖させた NK 細胞を使用して、細胞の表面のどの受容体によってがん細胞が認識され、殺傷されるのか調べました（Figure 2B）。活性化受容体（鍵穴）は、がん細胞の表面にあるリガンド（鍵）と結合することでがん細胞を殺傷する機能のスイッチがオンになりますが、人為的にこの鍵穴をふさいでしまうことで、鍵が結合できなくなります。従いまして、いずれかの鍵穴をブロックした時にがん細胞が殺傷されなくなれば、NK 細胞がその鍵穴（受容体）を利用してがん細胞を殺していると考えられます。

複数ある活性化受容体のうち、特に培養後に大きく量が増えていた DNAM-1、NKp46、NKp44、NKp30 と呼ばれる 4 つの受容体に注目しました。それぞれの受容体（鍵穴）をブロックする試薬（抗体）を添加して、がん細胞と混ぜて、どのくらいがん細胞が殺傷されるか測定した結果が

下記の図です。なお、抗体を一切加えず、鍵穴をブロックしなかった場合の殺傷率を 100%として表示しています（下図の「ブロックなし」のグラフ）。

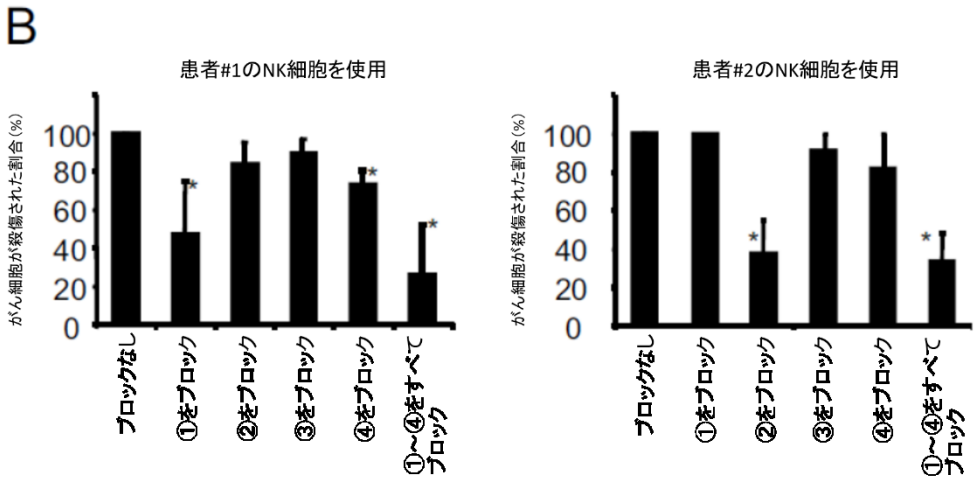

Figure 2B（一部改変）：体外で増殖させた NK 細胞は、異なる活性化受容体を通じて自己がん細胞を殺傷する

①：DNAM-1、②：NKp46、③：NKp44、④：NKp30

グラフ中の「*」印が付いた項目が、統計学的に有意な差があったもの

実験の結果、患者#1 の場合は①（DNAM-1）および④（NKp30）を、患者#2 の場合は②（NKp46）の受容体をふさいだ時にがん細胞が殺傷される割合が下がったことから、これらが主にがん細胞を殺傷する際に使われている受容体であることがわかりました。（すなわち、患者によって NK 細胞上のどの受容体ががん細胞への攻撃に使われているのか、異なっているという結果でした。）また、①～④の受容体のすべてをふさいでも、完全にがん細胞の殺傷率が 0 まで下がることはなかったため（図中の一番右側のグラフ）、その他の受容体（あるいは別の仕組み）によってもがん細胞が殺傷されていることが示唆されました。

(3) 体外で増殖させた NK 細胞は、抗体を介してがん細胞を殺傷する

NK 細胞は、上記のように様々な受容体を使って直接がん細胞を認識するほか、抗体と結合する受容体（CD16）を介して異物（がん細胞）を認識し、殺傷することもできます（抗体依存性細胞傷害）。本研究で調製した NK 細胞は、CD16 受容体も高発現していたため、次に、がんの治療に使用されているセツキシマブという抗体薬をがん細胞に結合させ、NK 細胞による細胞傷害性がより増強されるかどうかを確認しました。その結果、予想通り、セツキシマブを反応させたがん細胞に対して、NK 細胞の傷害活性が大幅に増強されました（Figure 3 の③）。

この結果から、NK 細胞は体外で増殖させても、抗体を介してより効率的にがん細胞を殺傷できる能力を引き続き保有していることが確認されました。

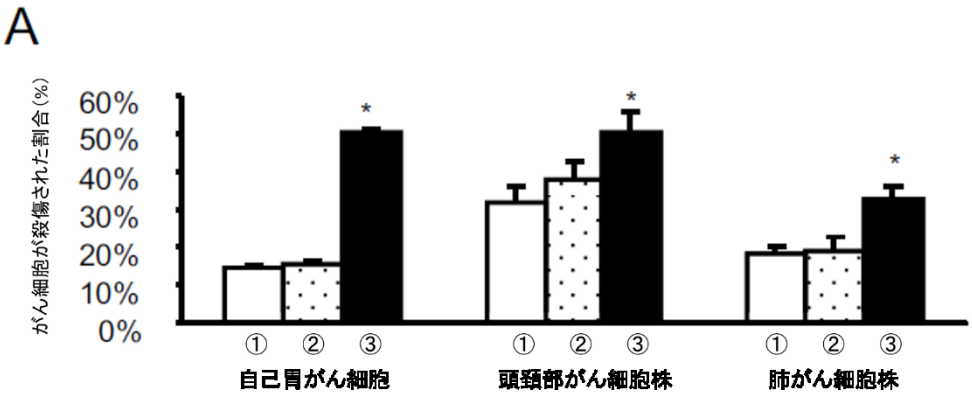

Figure 3A（一部改変）：セツキシマブ（抗体薬）は、NK 細胞のがん傷害活性を増強する
①：NK 細胞とがん細胞以外に何も添加しない、②：IgG1 抗体添加（がん細胞に結合しない抗体、陰性対照）、③：セツキシマブ抗体添加（がん細胞に結合する抗体）

- 今後の展望

今回の研究により、体外で増殖させた NK 細胞が、がん細胞を殺傷する能力を有することが確認されました。この前臨床結果を根拠の 1 つとして、NK 細胞を利用したがん免疫療法の臨床試験が推進されると期待されます。

- 用語説明

(1) NK 細胞（Natural Killer 細胞）
血液中を循環するリンパ球の一種で、生まれつき（Natural）、細胞を傷害する（Killer）機能を持つ細胞として NK 細胞と名付けられました。自然免疫において主要な役割を持つ細胞の 1 つで、がん細胞やウイルスに感染した細胞を異物として認識し、体内から排除します。

(2) 受容体、リガンド
受容体は鍵穴、リガンドは鍵に相当し、それぞれがピタリと結合するとスイッチが入ります。受容体には色々な種類があり、アクセル（活性化）の役割を持つものや、ブレーキ（抑制化）の役割を持つものがあります。前者の受容体のスイッチが入った場合には、細胞が特定の機能（抗がん効果など）を発揮するようになり、後者のスイッチが入った場合には、機能が停止します。

- 論文情報

タイトル　Ex-vivo expanded human NK cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity

著者　Caroline J Voskens, Ryuko Watanabe, Sandra Rollins, Dario Campana, Kenichiro Hasumi, and Dean L Mann

掲載誌　Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2010, 29(1): 134.

URL　https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2965714/

以上