

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2020B-18

課題名：肝移植後肝芽腫再発に対する養子免疫療法確立に向けた基礎研究

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター
(所属・職名 氏名) 臓器移植センター 副センター長 阪本 靖介

(研究成果の要約) 小児肝芽腫に対する養子免疫療法の確立に向けて、肝芽腫の摘出組織と肝移植時の肝灌流液を用いて、**target** と **effector** 両面から研究を行った。腫瘍組織については、手術時に凍結保存していた検体から **RNA** を抽出している。肝芽腫の病理組織別 (**embryonal type**、**fetal type**) および化学療法施行症例に対して、**RNA sequence** を行い、蛋白発現解析を行う予定である。対照群として、正常肝組織、肝芽腫 **cell line** に対しても **RNA** 抽出を行っている。リンパ球解析においては、小児肝移植においてドナー**LMNC** を肝臓灌流液から回収し、フローサイトメトリーで **LMNC** の **NK** 細胞の比率を確認した。また細胞増殖に適切な培養条件の検討も行い、**PBMC** で 200 倍、**LMNC** で 40-60 倍の細胞数を獲得できることを確認した。またサイトカインの産生を示す脱顆粒マーカーの **CD107a** の表出も有意に上昇していた。機能解析については、**51 Cr release assay** による細胞傷害性試験をおこなう予定である。**In vivo** では、超免疫不全マウス **BRJ** を用いて、**cell line (HepG2)** を腹腔内に注入することで腫瘍生着することを確認し、肝芽腫モデルを確立した。

1. 研究目的

肝芽腫は小児の肝臓悪性腫瘍で最も多い疾患であるが、小児の肝腫瘍は小児の悪性腫瘍の中で 1%程度のまれな病気であり、全国規模の登録でも年間 50~70 例程度である。近年、化学療法と外科手術(肝切除および肝移植)の組み合わせによって、肝芽腫の治療成績は向上した。当センターでも、5 年生存率 95.8%と非常に良好な成績を得ている。一方で診断時に肺転移、リンパ節転移などを認める病変、手術時の **AFP** 高値症例、化学療法によって腫瘍縮小効果が得られなかった症例に関しては、無再発生存が低下していた(**Uchida H, et al. Pediatr Blood Cancer.2018**)。しかし、再発リスク因子を拾い上げても、従来の化学療法以外に有効な再発抑制目的の補助療法は確立されておらず、化学療法以外に有効な再発抑制治療の開発が望まれる。

肝移植後の免疫抑制剤使用下では効果的な腫瘍特異的細胞傷害性 **T** 細胞 (**CTL**) の誘導は困難であるのに対して、自然免疫系は免疫抑制剤の影響を受けにくい。自然免疫系で抗腫瘍活性の高い **NK** 細胞をサイトカインを用いて活性化することで、肝細胞癌切

除後の再発が抑制されることが報告されている(**Takayama T, et al. Lancet.2000.**)。

広島大学では肝移植術後の肝細胞癌再発抑制に対して、ドナー肝臓由来活性化 **Natural killer** 細胞 (**NK** 細胞) をレシピエントに経静脈投与することで、進行肝癌症例において術後無再発生存が有意に延長することを認めた (**Ishiyama K, et al. Hepatology, 2006. 一部 unpublished data**)。また脳死肝移植においても、マイアミ大学と広島大学の共同臨床試験において、肝癌に対する肝移植後無再発生存が延長することを認めた (**unpublished data**)。この臨床試験に際して、ドナー肝由来活性化 **NK** 細胞の投与については、**FDA** の承認を得ており、ドナー肝由来活性化 **NK** 細胞の安全性と肝癌再発抑制に対する有効性は証明されている。

本研究では、肝摘出された肝芽腫組織に **NK** 細胞の **Target** 分子がどの程度発現し、活性化 **NK** 細胞を用いた細胞療法を行うことで抗腫瘍効果が期待できるか検討を行う。また、抗腫瘍活性が高い肝臓内 **NK** 細胞を多く含む肝移植ドナーの肝由来単核球 (**LMNC**)、ドナーおよびレシピエントの末梢

血由来単核球(PBMC)のいずれが養子免疫療法 **Effector cell** として適切な細胞 **Source** であるか検討を行う。本研究により、肝移植後の肝芽腫再発抑制を目的とした養子免疫療法を行う基礎データを構築し、再生医療法に基づく非臨床 **POC** 試験および臨床試験の開始が可能となることが期待される。

2. 研究組織

研究者	所属施設
阪本 靖介	臓器移植センター
笠原 群生	臓器移植センター
福田 晃也	臓器移植センター
清水 誠一	臓器移植センター
内田 孟	臓器移植センター
義岡 孝子	病理診断部
梨井 康	RI 管理室／移植免疫研究室
平野 啓	RI 管理室／移植免疫研究室

3. 研究成果

本年度の研究は、肝芽腫の腫瘍評価と小児肝移植患者におけるドナー灌流液中のリンパ球を中心に解析した。

1) 腫瘍組織の評価について

当院病理診断部と小児がんセンター加藤先生に協力を頂き、手術時に凍結保存していた検体から **RNA** を抽出している。肝芽腫の病理組織別 (**embryonal type**, **fetal type**) および化学療法施行症例に対して、**RNA sequence** を行い、蛋白発現解析を行う。サンプルの回収と **RNA** 抽出を並行して行っており、現在 30 症例の **RNA** の抽出を行っている。対照群として、正常肝組織、肝芽腫 **cell line** に対しても **RNA** 抽出を行っている。

来年度に **RNA sequence** まで終了させて、肝芽腫の組織別、化学療法施行症例、正常肝組織、**cell line** における **mRNA** 発現量の比較検討を行い、養子免疫療法の **key** 分子の評価を定量的に行う。**mRNA** 発現が実際に蛋白として発現しているかについては **Western blotting** をおこない、定量した蛋白が腫瘍のどの部位にどの程度発現して

いるか、免疫組織学的染色を行って確認を行う。

2) リンパ球解析について

●LMNC および PBMC の評価について

小児肝移植ドナー **LMNC** を肝臓灌流液から比重遠沈法によって回収し、細胞数を確認し、フローサイトメトリーで **LMNC** の **NK** 細胞の比率を確認した。また **PBMC** に対しても同様に検討を行った。併せて細胞増殖に適切な培養条件の検討も行った (**n=26**)。

培養を繰り返すことで **PBMC** および **LMNC** ともに細胞数の増加を認め (**PBMC** で 200 倍、**LMNC** で 40-60 倍の細胞数を獲得できることを確認した)、適切な培養条件を確立したことから、この条件で得られた細胞の機能解析を行った。

また、検討した培養条件で **LMNC** および **PBMC** を培養して、ドナー **LMNC** に含まれる **NK** 細胞の割合 (**CD56** の **intensity** によって細分化した) と活性化マーカーの発現をフローサイトメーターを用いて評価した。

この解析によって、**CD56** が高発現の肝由来 **NK** 細胞の割合が培養によって有意に増加しており、この培養条件によって抗腫瘍活性が高い肝由来 **NK** 細胞 **rich** な培養細胞を獲得できることを確認した。またサイトカインの産生を示す脱顆粒マーカーの **CD107a** の表出も有意に上昇していた。

また抗腫瘍マーカーである **TRAIL**、**natural cytotoxic receptor (NCR)**、**NKG2D**、**F γ gR IIIa (CD16)**、**CD69** などの機能分子の詳細な解析は次年度にかけて継続して行う予定である。

●機能解析について

hepatoblastoma の **cell line** である **HuH-7** に対する **⁵¹Cr release assay** による細胞傷害性試験をおこなう。**Target** 細胞に対する細胞傷害性が **Effector** 細胞との比率で変化することを確認する。また **NK** 細胞の活性化マーカーである **NKG2D** や **NKp46** の **blocking** 抗体を用いることで、抗腫瘍効果の経路を同定する。**In vitro** の機能解析は抗腫瘍マーカーの詳細なフローサイトメトリー解析の後、次年度に行う予定である。

●In vivo の検証について

In vivo では、超免疫不全マウス BRJ を用いて、cell line (HepG2) を腹腔内に注入することで腫瘍生着することを確認し、肝芽腫モデルを確立した。

この肝芽腫モデルマウスにたいして活性化NK細胞の投与を行う。投与細胞数と投与間隔の検討を行い、適切な抗腫瘍効果が得られる条件の設定を行う。条件設定後に肝臓に生着した腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討を、効果判定時の肝重量の変化と病理組織学的検査によって行う。これらについては次年度にかけて行う予定である。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究実施においては検体提供者個人のプライバシーをはじめとした人権擁護を最

優先し、提供者に対する危険性の排除や、説明と理解（インフォームドコンセントおよびアセント）を徹底した。肝移植における肝灌流液および血液採取に於いては通常検査の一環として施行するが、検体検査の医学的な意味については説明書を用いて十分に説明し、また、検査結果についても十分に説明を行った。

動物実験においては、成育医療研究センター動物実験指針に基づき、動物実験の承認を受けている。動物愛護ならびに福祉の観点から、実験目的に適した動物種・系統の選定、実験成績の精度や再現性の検討に必要な最低限の供試動物の数、飼育条件等を考慮し、実験動物の生理、生態、習性等を理解し、愛情をもって飼養し、科学上の利用に供するように努める。