

課題番号 : 28指5002

研究課題名 : 多発性骨髄腫の治癒を目指した抗骨髄腫細胞表面抗原モノクローナル抗体併用NK細胞輸注療法の開発

主任研究者名 : 萩原将太郎

分担研究者名 : なし、研究協力者 : 反町典子

キーワード : NK 細胞、SLAMF7、多発性骨髄腫、セルプロセッシング、モノクローナル抗体

研究成果 :

1. 多発性骨髄腫患者におけるNK細胞機能の検討

多発性骨髄腫患者 31 例および健常者 10 例の末梢血を用い、NK 細胞の割合および表現型の解析を行った。NK 細胞は CD3 陰性、CD56 陽性により同定し、更に骨髄腫細胞との判別のためNKp46 を用いた。NK 細胞表現型は SLAMF7、NKG2D、Fc γ RIII、PD-1 および CD56bright or dim によって分類した。

その結果、骨髄腫診断時のNK細胞数は健康ドナーと有意差はなかったが、寛解時には有意な増加が認められた(p=0.013)。また免疫チェックポイント分子であるPD-1は健康ドナーに比して有意に発現が増加していた(p=0.004)。SLAMF7の発現はどの集団でも差は認めなかった。NK細胞の抗体依存性細胞傷害に必要なFc γ RIIIは骨髄腫患者のNK細胞で有意に抑制されていた(p=0.001)。IMiDsによる治療を受けている患者において、NK細胞総数は有意に増加し、特にCD56dimNK細胞分画の増加は著明であり(p=0.019)、PD-1は有意に抑制されていた(p=0.001)。

2. NK細胞による、多発性骨髄腫細胞に対する抗体依存性細胞傷害作用の検討

正常ヒト末梢血単核球を用いて多発性骨髄腫細胞株MM.1Sに対する抗体依存性細胞傷害作用を検討した。

IL2で刺激した末梢血単核球は抗SLAMF7抗体存在下でMM.1Sに対する細胞傷害作用を持つことを確認した。

3. 血清中可溶性SLAMF7の測定系樹立

BMSより供与された2種類の抗SLAMF7抗体を用いて、血清中の可溶性SLAMF7を定量するためのsandwich ELISAの系を立ち上げた。感度としては1 ng/mlまでの検出は十分可能であり、骨髄腫患者および健常人併せて39例の血清中可溶性SLAMF7の定量を行った。現在可溶性SLAMF7が相関を示す骨髄腫患者の病態およびNK細胞の表現型について解析を進めていると同時に、可溶性SLAMF7の機能的意義の解析をin vitro実験系で進めている。

4. NK細胞の分離、増幅法の確立

我々は健常人末梢血液から単核球を分離し、CD3、CD56抗体を用いてNK細胞分画の純化を行った。その後、IL-2、IL-15等のサイトカイン存在下での培養を行い、NK細胞の増幅を試みた。

その結果、IL-2濃度の段階的調整法による培養により、個人差はあるものの、濃縮した末梢血NK細胞数を8-10倍以上に増加させることが可能な培養法を樹立した。

Subject No. : 28-5002

Title : Development of NK cell infusion therapy with anti-myeloma antigen monoclonal antibody for multiple myeloma

Researchers : Shotaro Hagiwara, Noriko Sorimachi

Key word : NK cell, SLAMF7, Multiple myeloma, Cell processing, monoclonal antibody

Abstract :

1. Analysis of NK cell function in Multiple myeloma patients

We performed phenotypic analyses of NK cells in patients with multiple myeloma.

<Methods> Peripheral blood samples were obtained from 31 multiple myeloma patients (10 newly diagnosed cases of myeloma, 10 relapsed, and 11 in complete or partial remission), and 9 healthy volunteers. NK cells were identified as a fraction of CD3 negative and CD56 positive, and NKp46 was further used for NK cell identification in CD56 positive myeloma cell-containing samples. The phenotype of NK cells was characterized by the expression of SALMF7, NKG2D, FcγRIII, PD-1, and CD56bright or dim. <Results> At the diagnosis of multiple myeloma, the number of NK cells was significantly low in comparison to that of patients in remission ($p=0.013$). Regarding immune checkpoint molecule, the expression of PD-1 on the NK cells of myeloma patients was significantly increased in comparison with that of healthy donors ($p=0.004$). The expression of SLAMF7 did not differ between disease statuses. Notably, the expression of FcγRIII, which is a key player in a mechanism of antigen-dependent cytotoxicity, was significantly suppressed in the NK cells of myeloma patients ($p=0.001$). Furthermore, in patients who were treated with immunomodulatory drugs (IMiDs), the significant increases in the total number of NK cells, especially in CD56dim NK cell fraction ($p=0.019$), significant suppression of PD-1 ($p=0.001$) were observed.

2. Analysis of antibody dependent cytotoxicity of NK cells against myeloma cells.

Antibody dependent cell mediated cytotoxicity of normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC) against myeloma cell line MM.1S was investigated. Cytotoxic activity of IL2 stimulated PBMC against MM.1S was enhanced by anti-SLAMF7 antibody.

3. Establishment of the measurement system of serum soluble SLAMF-7

We established the measurement system of serum soluble SLAMF-7 using 2 kinds of anti-SLAMF7 antibody, and measured the soluble SLAMF7 in the serum of 30 patients and 9 healthy donors. As a next step, we would like to analysis the correlation between soluble SLAMF7 and clinical feature of multiple myeloma.

4. Development of the method for purification of NK cells and amplification of purified NK cell

From the separated peripheral blood mononuclear cells, we purified CD3-, CD56+ NK cell fraction. After the purification, the cells were cultured with IL-2 and IL-15, and we tried to amplify the NK cells. As a result, we established the culture method which can amplify the NK cells 8-10 times.

Researchers には、分担研究者を記載する。

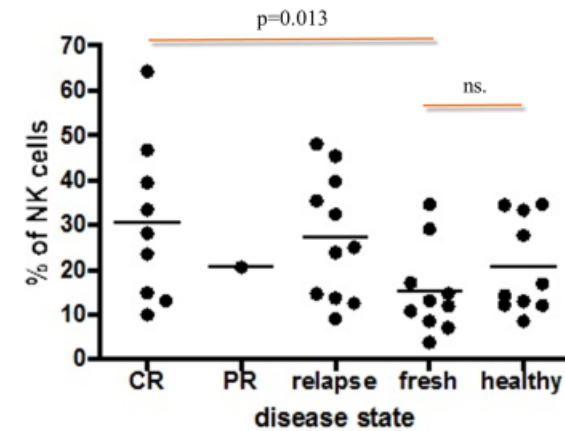
平成28年度国際医療研究開発費中間報告

28指5002

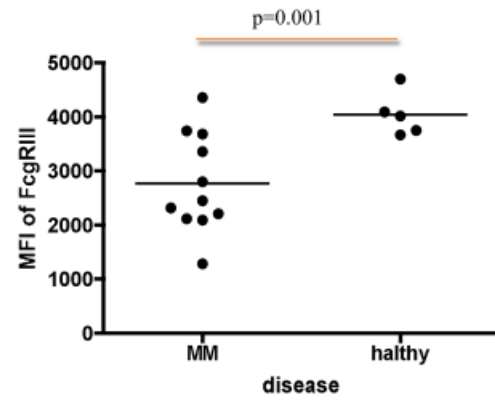
多発性骨髄腫の治癒を目指した抗骨髄腫細胞表面抗原モノクローナル抗体併用NK細胞輸注療法の開発

| | Myeloma patients | Healthy donors |
|--------------------|--------------------|------------------|
| Number | 30 | 10 |
| Age | 62.2 ± 11.0 | 45.8 ± 9.3 |
| Sex | Male 14, Female 16 | Male 6, Female 4 |
| M-protein | | |
| IgG | 21 | |
| IgA | 3 | |
| BJP | 6 | |
| Disease status | | |
| Fresh | 9 | |
| Relapse | 11 | |
| Partial remission | 1 | |
| Complete remission | 11 | |
| IMiDs | | |
| (+) | 10 | |
| (-) | 20 | |

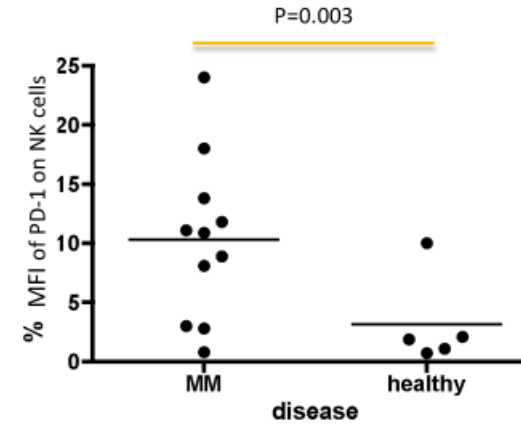
Disease status and number of NK cells



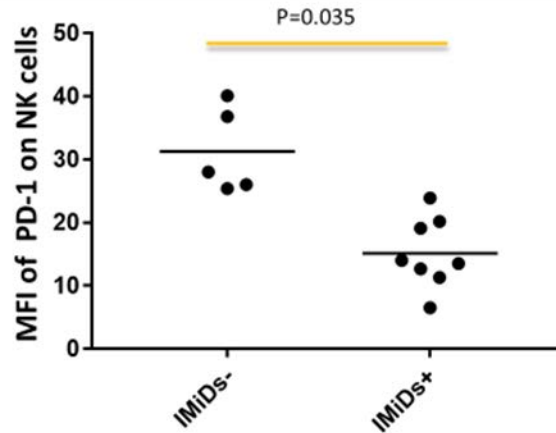
Expression of FcγRIII on NK cells



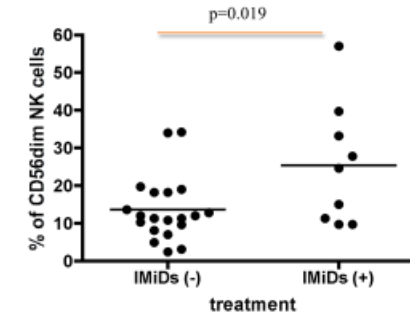
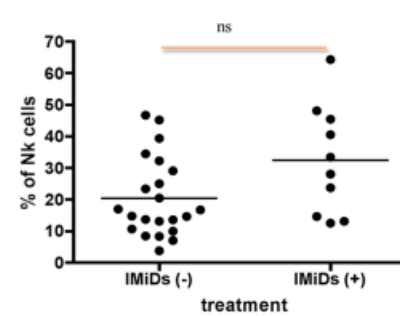
Expression of PD-1 on NK cells



Expression of PD-1 on NK cells



The difference of NK cells with or without IMiDs



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：28指5002

研究課題名：多発性骨髄腫の治癒を目指した抗骨髄腫細胞表面抗原モノクローナル抗体併用NK細胞輸注療法の開発

主任研究者名：萩原将太郎

論文発表

| 論文タイトル | 著者 | 掲載誌 | 掲載号 | 年 |
|--------|----|-----|-----|---|
| | | | | |
| | | | | |

学会発表

| タイトル | 発表者 | 学会名 | 場所 | 年月 |
|---|--|--------------------------------|----------|---------|
| 多発性骨髄腫患者におけるNK細胞表現型の解析 | 萩原将太郎 反町典子 | 日本骨髄腫学会 | 東京 | 2017年5月 |
| 多発性骨髄腫におけるNK細胞機能 | 萩原将太郎 | 日本骨髄腫学会 | 徳島 | 2016年5月 |
| Phenotypic analysis of NK cells in patients with multiple myeloma | 研究課題名：多発性骨髄腫の治癒を目指した抗骨髄腫細胞表面抗原モノクローナル抗体併用NK細胞輸注療法の開発 | International myeloma workshop | NewDelhi | 2017年3月 |

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

| タイトル | 発表者 | 発表先 | 場所 | 年月日 |
|------|-----|-----|----|-----|
| | | | | |

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

| 発明名称 | 登録番号 | 特許権者(申請者) (共願は全記載) | 登録日(申請日) | 出願国 |
|------|------|-----------------------|----------|-----|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと