

# Suppression mechanism of acute graft-versus-host disease by cytokine-induced killer cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-02-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Mase, Shintaro メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00057130">https://doi.org/10.24517/00057130</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



## サイトカイン誘導キラー細胞の急性移植片対宿主病抑制機序の検討

金沢大学医薬保健研究域医学系小児科学

(主任: 和田 泰三教授)

馬 瀬 新 太 郎

サイトカイン誘導キラー (cytokine-induced killer, CIK) 細胞は、生体外で増殖させたリンパ球で、ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞およびT細胞マーカーの両方を発現する。造血幹細胞移植においてCIK細胞の養子輸注は、NK細胞上の活性化受容体であるNKG2Dを介した抗腫瘍活性を示しつつ、移植片対宿主病 (graft-versus-host-disease, GVHD) を非致命的に留めることが報告されている。しかし、その機序はまだ完全には解明されていない。本研究は、CIK細胞が宿主樹状細胞 (dendritic cell, DC) を除去することによりGVHDを抑制するか否か、そしてそのような抑制機序にインターフェロンガンマ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) が関与するかどうかの二点について検討した。CIK細胞は $^{51}\text{Cr}$ 放出細胞傷害アッセイにおいて、マウス骨髓細胞から生成したDCに対し、強い細胞傷害活性を示した。この細胞傷害活性は、NKG2D中和抗体の添加によって変化せず、NKG2D / NKG2Dリガンド系以外の機序の関与が示唆された。同種IFN- $\gamma$ 欠損マウス由来CIK細胞のDCに対する細胞傷害活性は、野生型マウス由来CIK細胞と比較して少なかったが、IFN- $\gamma$ 中和抗体を添加した野生型CIK細胞の細胞傷害活性に変化はなかった。IFN- $\gamma$ は、それ自体は細胞傷害活性に影響を与えないが、CIK細胞の培養中に細胞傷害活性を高める必須サイトカインであると考えられた。次に、同種CIK細胞が生体内で宿主DCを除去するかを同種骨髓移植モデルマウスにて検討した。骨髓細胞輸注時にCIK細胞を輸注した宿主マウスの脾臓における宿主DCの残存数はIFN- $\gamma$ 欠損マウス由来CIK細胞を輸注されたマウスや致命的GVHDモデルマウスのそれと比べると有意に低かった。結論として、同種CIK細胞は、IFN- $\gamma$ による傷害活性の増強により宿主DCを排除し、GVHDを抑制していると考えられた。

**Key words** bone marrow transplantation, cytokine-induced killer cell, dendritic cell, graft-versus-host-disease, interferon- $\gamma$

サイトカイン誘導キラー (cytokine-induced killer, CIK) 細胞は、1991年に最初に報告され、ヒトでは末梢血リンパ球を、マウスでは脾細胞をインターフェロン (interferon, IFN) - $\gamma$ 、インターロイキン (interleukin, IL) -2、抗CD3抗体の存在下で2~3週間培養増殖することで得られる<sup>1)</sup>。CIK細胞は単一の細胞集団ではなく、ナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞のマーカーであるNKG2DとキラーT細胞マーカーのCD8両方を発現するNKG2D<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>の亜群とNKG2D<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>の亜群を含む複数の細胞集団である。CIK細胞はNKG2Dによって媒介される主要組織適合遺伝子複合体非依存性の抗腫瘍活性を保ちつつ<sup>2)</sup>、移植片対宿主病 (graft versus host disease, GVHD) を非致命的に留めることが移植マウスモデルに

おける同種CIK細胞の養子輸注実験で報告されている<sup>3)</sup>。また実際の臨床応用も始まっており、再発血液悪性腫瘍や難治性固形腫瘍の治療に組み合わせることで一定の効果を上げている<sup>4)~6)</sup>。しかし、CIK細胞の抗腫瘍効果のメカニズムに関しては多くの知見があるが、この細胞によるGVHD抑制のメカニズムはまだしっかりと解明されていない。本研究では、宿主の残存樹状細胞 (dendritic cell, DC) が、移植片対宿主反応を開始する上で最も重要な細胞であることより、CIK細胞は腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を示すのと同様に宿主DCを除去し、GVHDの重症度を低下させるのではないかと仮定した。またIFN- $\gamma$ 欠損 (knockout, KO) マウスから生成されたCIK細胞が致命的なGVHDを引き起こすことから、IFN- $\gamma$ はCIK細

令和1年9月24日受付, 令和1年10月15日受理

Abbreviations: BM, bone marrow; BMT, bone marrow transplantation; CIK, cytokine-induced killer; DC, dendritic cell; GVHD, graft-versus-host disease; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL-2, interleukin-2; KO, knockout; NK, natural killer; WT, wild type

胞がGVHDを抑制するための重要なサイトカインであることが報告されている<sup>7)</sup>。本研究では、同種CIKが宿主DCを除去することによりGVHDを抑制するか否か、そしてそのような抑制機序にIFN- $\gamma$ が関与するかどうかの二点について検討した。

### 対象および方法

#### I. 倫理審査

すべての動物実験は金沢大学動物実験委員会の承認を受け、ガイドラインに従い実施した。(承認番号: AP-122574 「Cytokine induced killer (CIK) 細胞のマウス移

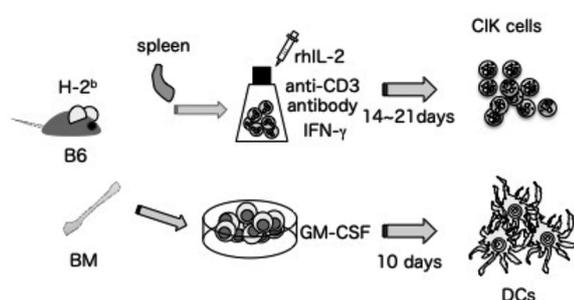


Fig. 1. Expansion of CIK cells and generation of dendritic cells (DCs).

CIK cells were expanded ex vivo as follows. Splenocytes were isolated from C57BL/6 (B6) mice and cultured in RPMI-1640 medium with 10% FBS in the presence of IFN- $\gamma$  at 300 IU/ml. After 24 hrs of culture, the cells were transferred to a plastic flask coated with anti-CD3 monoclonal antibody and the culture was continued with recombinant human IL-2 at 300 IU/ml. For the generation of DCs,  $2 \times 10^6$  bone marrow (BM) cells from B6 mice or Balb/c (H-2<sup>d</sup>) mice were cultured in 10 ml RPMI-1640 supplemented with GM-CSF at 20 ng/ml. On day 3, 6 and 8, GM-CSF was further added and non-adherent DCs were harvested on day 10. More than 90% of the harvested cells expressed phenotype characteristic of DCs (CD11c<sup>+</sup> MHC class II<sup>+</sup>).

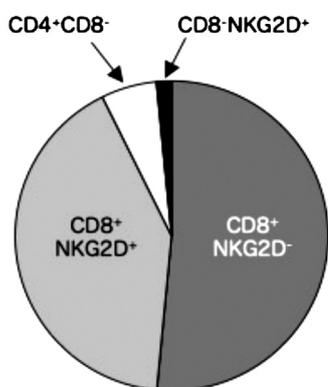


Fig. 2. Compositions of CIK cells.

Within the bulk culture of expanded CIK cells, two main subpopulations can be distinguished, one co-expressing the CD8 and NKG2D molecules (CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>+</sup>) while the other presenting a CD8<sup>+</sup>NKG2D<sup>-</sup> phenotype. The majority of expanded CIK cells are CD8<sup>+</sup> but CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells can be found as well. Double positive (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) or double negative (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) phenotypes are rarely detected within bulk CIK cultures.

植モデルにおける検討)」(遺伝子組換え実験承認番号: 金大6第1940号「マウス骨髄移植モデルにおけるCytokine-induced-killer (CIK) 細胞の有用性」)。

#### II. 実験動物

C57BL/6 (B6, H-2<sup>b</sup>), Balb/c (H-2<sup>d</sup>) マウスは日本チャールスリバーから購入し野生型 (wild type, WT) として使用した。B6背景のIFN- $\gamma$  KOマウスは岩倉洋一郎先生 (東京理科大学) より譲渡していただいた。全ての移植マウスは8~12週齢のマウスを用いた。

#### III. フローサイトメトリー

以下の蛍光標識単クローン抗体, 抗マウスCD3 (クローン名; 145-2C11), CD11c (N418), B220 (RA3-6B2), Gr-1 (RB6-8C5), NKG2D (DEX5), H-2K<sup>b</sup> (AF6-88.5), H-2K<sup>d</sup> (SF1-1.1) はBiolegend (San Diego, USA) から購入した。死細胞検出のために7AAD (日本ベクトン・デッキンソン, 日本BD, 東京) を用いた。フローサイトメトリーのデータ収集はFACSCanto II フローサイトメーター (BD Biosciences, 東京) を用いて行い, データ解析はFlowJo ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて行った。全ての解析は製造者の説明書に基づき行った。

#### IV. CIK細胞の作成

二酸化炭素にて犠死させた8週齢のB6マウスの脾臓を摘出し, 溶血, 洗浄後, 非働化した10%胎児仔牛血清と2ME (2-mercapto-ethanol) を添加したRPMI-1640培養液にて $3.0 \times 10^6$ /mlに調整した。脾細胞浮遊液にIFN- $\gamma$  (Biolegend) を1000 U/mlの濃度で添加し, 5% CO<sub>2</sub>存在下に37℃で培養した。24時間後, 抗CD3抗体 (BD Bioscience) を付着させたフラスコに移し, リコンビナントIL-2 (イムネース注35, 塩野義製薬, 東京) 300 IU/mlの存在下で2~3週間培養した (図1)。既報の如く<sup>8)</sup>, CIK細胞はCD8<sup>+</sup>かつNKG2D<sup>+</sup>の細胞を含む非単一な細胞集団であることを確認した (図2)。

#### V. マウス骨髄由来DCの作成

DCの作成にあたってはLutzら<sup>9)</sup>の論文を参考にした。8週齢のB6 (H-2<sup>b</sup>) およびBalb/c (H-2<sup>d</sup>) マウスを二酸化炭素にて犠死させた後, 大腿骨, および腓骨より骨髄細胞を採取した。 $2.0 \times 10^6$ 個の骨髄細胞を20 ng/mlのGM-CSF (Prospec, Ness-Ziona, Israel) を添加した10 mlのRPMI-1640培養液にて, 5% CO<sub>2</sub>存在下に37℃で培養した。培養3日目に, 20 ng/mlのGM-CSFを添加した10 mlの培養液を加えた。培養6日目, 8日目には上清を10 ml採取し, 細胞を遠心再回収し, さらに20 ng/mlのGM-CSF添加培養液を10 ml加えた (図1)。培養10日目に非接着細胞を採取し, 洗浄後, これを以下の実験に使用した。なお, 培養10日目には, 90%以上の細胞がDC (CD11c<sup>+</sup>MHC Class II<sup>+</sup>) の表現型を示した。

## VI. $^{51}\text{Cr}$ 放出細胞傷害性アッセイ

上記にて得られたB6マウスおよびBalb/cマウスの骨髄由来DC  $1 \times 10^6$  を標的細胞として $^{51}\text{Cr}$  (クロム酸ナトリウム  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  200  $\mu\text{Ci}$ ) を加え、5%  $\text{CO}_2$  存在下に37°Cで2時間反応させた。その後、2回洗浄し、 $2 \times 10^5/\text{ml}$  になるように、RPMI-1640培養液で希釈し調整し、100  $\mu\text{l}$  ずつ96ウェルプレートに播種した。エフェクター細胞として、B6マウス由来CIK細胞、WT B6マウス由来脾細胞、あるいはIFN- $\gamma$  KOマウス由来CIK細胞を使用した。エフェクター細胞：標的細胞比が20倍、10倍、5倍、2.5倍となるように希釈系列を作成し、それぞれ100  $\mu\text{l}$  ずつ96ウェルプレートへ播種し標的細胞と5%  $\text{CO}_2$  存在下に37°Cで6時間反応させた。標的細胞のみの放射活性を測定するためRPMI-1640培養液100  $\mu\text{l}$  のみを標的細胞とともに播種した。また、全標的細胞の崩壊時の放射活性を測定するため50倍希釈ノニドットP-40 (シグマアルドリッチジャパン, 東京) 100  $\mu\text{l}$  を標的細胞とともに播種した。プレートを遠心 (1500 rpm  $\times$  5分) し、細胞を沈降させ、上清100  $\mu\text{l}$  をオートウェルガンマカウンター (型番ARC-380, アロカ, 東京) で放射活性を測定した。また標的細胞とエフェクター細胞を共培養する際に、抗IFN- $\gamma$  中和抗体 (R4-6A2, Biologend), 抗NKG2D 中和抗体 (CX5, Biologend) を反応液に添加し、添加しなかったものと比較した。

細胞傷害活性は以下の計算式を用いて算出した。

$$\% \text{ specific lysis} = (E - N) / (Mx - N) \times 100$$

E: 標的細胞とエフェクター細胞を共培養後の培地に含まれる $^{51}\text{Cr}$ 由来放射活性

Mx: 標的細胞全て殺傷された時に含まれる培地の $^{51}\text{Cr}$ 由来放射活性

N: 標的細胞のみの培地に含まれる $^{51}\text{Cr}$ 由来放射活性

## VII. マウス移植系と脾臓内DCの同定

主要組織抗原が異なるマウス (B6 (H-2<sup>b</sup>) マウス, Balb/c (H-2<sup>d</sup>) マウス) を用いて同種骨髄移植を施行した。WT Balb/c宿主マウスに計9.0 Gy (4.5 Gy  $\times$  2回, 4時間間隔) の致死的全身放射線照射施行し、二酸化炭素にて犠死させたWT B6ドナーマウスより採取した骨髄 ( $5 \times 10^6$ ) を尾静脈より静脈内投与した。致死的なGVHDを誘導するためにWT B6ドナーマウスの脾細胞 ( $10 \times 10^6$ ) を同時に静脈内投与しGVHDモデルマウスとした (図3)。同様に、WT B6由来のCIK細胞およびIFN- $\gamma$  KO B6マウス由来のCIK細胞を静脈内投与し、移植後1, 3日目ないし、5日目の宿主マウスの脾臓中のDCの絶対数を比較した。二酸化炭素にて犠死させた宿主マウスより脾臓を摘出し、溶血、洗浄し、適量の非働化した10%胎児仔牛血清を添加したPBSに浮遊させ計数板にて総細胞数を計測した。さらに、フローサイトメトリーにて浮遊細胞中のCD11c陽性かつ、顆粒球マーカーのGr-1, T細胞マーカーのCD3, NK細胞マーカーのNKG2D, B細胞マーカーのB220の全て

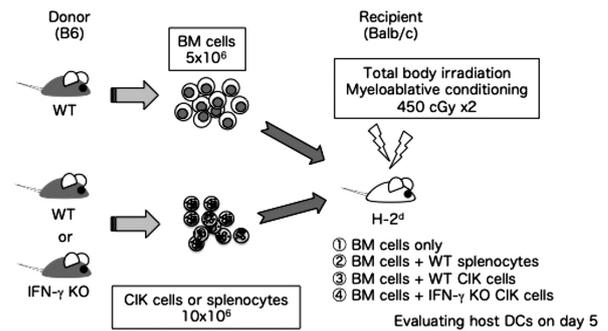


Fig. 3. Transplantation model and evaluation of host DCs by flow cytometry.

Lethally irradiated Balb/c (H-2<sup>d</sup>) hosts received BM cells from WT B6 (H-2<sup>b</sup>) together with splenocytes from WT B6, CIK cells from B6 or CIK cells from IFN- $\gamma$  KO B6 at indicated doses.

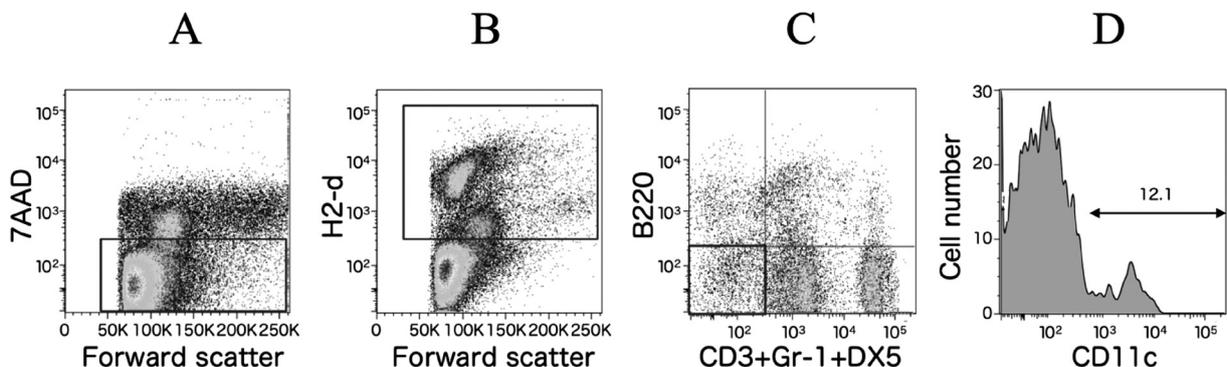


Fig. 4. Determination of the absolute numbers of DCs.

Absolute number of host DCs (Gr-1<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>DX5<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>, and CD11c<sup>+</sup>) within the spleen was evaluated on day 5 after bone marrow transplantation (BMT) by counting chambers and flow cytometry. Within the total splenic mononuclear cells, 7AAD negative live cells were gated (A) for analysis. Among the live cells, H2-d positive host splenocyte were selected for further analysis (B). Within the host live splenocytes, lineage-negative (Gr-1<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>DX5<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>) cells (C) were analyzed for the expression of CD11c (D). Total counts of CD11c<sup>+</sup> DCs were calculated from these data.

が陰性の集団のうちH-2<sup>d</sup>陽性のものを宿主DCとした。総細胞数と宿主DCの割合を乗じることで脾細胞中の宿主DCの絶対数を算出した(図4)。

## VIII. 統計

統計学的解析はGraphPad Prism ver.4.0 (Graphpad software, Inc., La Jolla, USA) を用いて行った。群間比較にはStudent's t検定およびMann-Whitney U検定を用い検討した。

## 成 績

### I. DCを標的としたCIK細胞の細胞傷害活性

CIK細胞がDCに対して細胞傷害能を有するか、Balb/c (H-2<sup>d</sup>) マウス骨髄細胞から生成したDCを標的細胞として、<sup>51</sup>Cr放出細胞傷害アッセイを行った。DCに対して、Balb/cマウス由来の自己CIK細胞は比較的強い細胞傷害活性を有し、主要組織抗原が異なるB6 (H-2<sup>b</sup>) マウス由来の同種CIK細胞でも高い細胞傷害活性を有した(図5)。この結果より、CIK細胞は少なくとも生体外では、DCに対する細胞傷害能を有することが判明した。

### II. CIK細胞輸注による宿主DCの減少

次に同種骨髄移植モデルマウスを用いて、同種CIK細胞が生体内で宿主DCを除去するかどうかを評価した。この移植モデルでは、骨髄細胞単独投与ではGVHDは引き起こされませんが、脾細胞をともに投与することで致死的なGVHDが誘導される。一方でCIK細胞をともに投与

すると致死的なGVHDは引き起こされることが分かっている<sup>3)</sup>。それぞれの群の脾臓における宿主DCの絶対数を比較した。その結果、移植後1日目に脾臓およびCIK細胞を受けた脾臓における残存した宿主DCの絶対数はほぼ同じであったが、骨髄単独投与されたマウスのそれは少なかった。一方、移植後3日目には全ての群における宿主DCの絶対数が減少したが、特にCIK細胞を受けたマウスにおける宿主DCの数は劇的に減少し、最終的には骨髄単独を受けたマウスと同じ数の宿主DCに達した。逆に、脾臓を受けたマウスにおける宿主DCの数はあまり減少せず、骨髄単独を受けたマウスにおける宿主DCの数よりも多かった(図6)。この結果より同種CIK細胞は宿主脾臓内では、移植後1日目には宿主DCは増殖させるが、3日目には同種CIK細胞の細胞傷害活性により宿主DCがほぼ消失することが示唆された。

### III. CIK細胞の細胞傷害活性に与えるNKG2D 中和抗体の影響

さらにCIK細胞のDCに対する細胞傷害活性の機序に、NKG2Dが関わるかどうかを<sup>51</sup>Cr放出細胞傷害アッセイで検討した。CIKのBalb/c (H-2<sup>d</sup>) 由来のDCに対する細胞傷害活性は、主要組織抗原が同じBalb/c由来の自己CIK細胞でもB6 (H-2<sup>b</sup>) マウス由来の同種CIK細胞でもNKG2D中和抗体を添加によって変化しなかった(図7)。この結果より、CIK細胞の同種DCに対する細胞傷害活性にはNKG2D / NKG2Dリガンド系以外の機序の関与が示唆された。

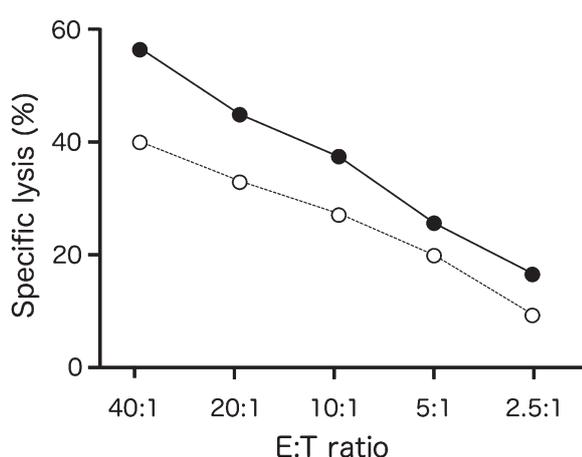


Fig. 5. Cytotoxic assay of CIK cells against DCs.

<sup>51</sup>Cr release assay was performed to evaluate the cytotoxic activity of CIK cells against DCs. Both syngeneic (open circles) and allogeneic (closed circles) CIK cells showed significant killing activity against DCs. Allogeneic CIK cells exhibited significantly more killing activity at broad range of effector-target ratios than syngeneic CIK cells. Allogeneic CD8 positive cells did not show any killing activity against DCs (data not shown).

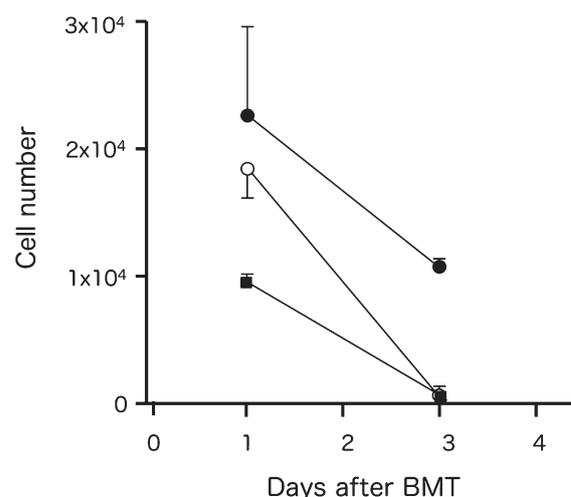


Fig. 6. Reduction of host DCs induced by CIK cell transplantation.

Splenic DC numbers were compared between days 1 and 3 after BMT and compared among different BMT conditions. Compared to standard BMT model (closed circles, BM cells with splenocytes), DC numbers were significantly reduced when BMT was done with CIK cells (open circles). Closed squared show the control with BM cells only.

IV. IFN- $\gamma$  KO マウス由来CIK細胞による細胞傷害活性

次にCIK細胞のDCに対する細胞傷害活性の機序に、IFN- $\gamma$ が関わるかどうかを同種 (B6) IFN- $\gamma$  KO マウス由来のCIK細胞とIFN- $\gamma$  中和抗体を用い、<sup>51</sup>Cr放出細胞傷害アッセイで検討した。IFN- $\gamma$  KO 由来のCIK細胞のDCに対する細胞傷害活性はWT CIK細胞のそれと比較して低かった。しかし、IFN- $\gamma$  中和抗体をWT CIK細胞との混合物に添加しても、WT CIK細胞は添加しないものに比べて変わらず強いDCに対する細胞傷害活性を示した (図8)。WT マウス由来のCIK細胞を用いた検討では、IFN- $\gamma$  中和抗体を使用してもその細胞傷害活性は減弱しなかったことから、CIK細胞が産生するIFN- $\gamma$  はDCの傷害に直接は関与しないことが示唆された。しかしIFN- $\gamma$

KO 由来のCIK細胞はDCに対する細胞傷害活性を失っていた。これらの結果からは、IFN- $\gamma$  がCIK細胞の細胞傷害活性の誘導に関わっていることが強く示唆された。

V. IFN- $\gamma$  KO マウス由来CIK細胞輸注による宿主DC量の変化

最後に同種骨髄移植モデルマウスにおいて、IFN- $\gamma$  が生体内で同種CIK細胞の宿主DCの除去に関わっているかどうかをIFN- $\gamma$  KO マウスを用いて検討した。この移植モデルでは、骨髄細胞とIFN- $\gamma$  KO マウス由来のCIK細胞をともに投与すると、脾細胞をともに投与するのと同様に致死的なGVHDが誘導されることが分かっている<sup>7)</sup>。移植後5日目の骨髄単独投与群、骨髄と脾細胞投与群、

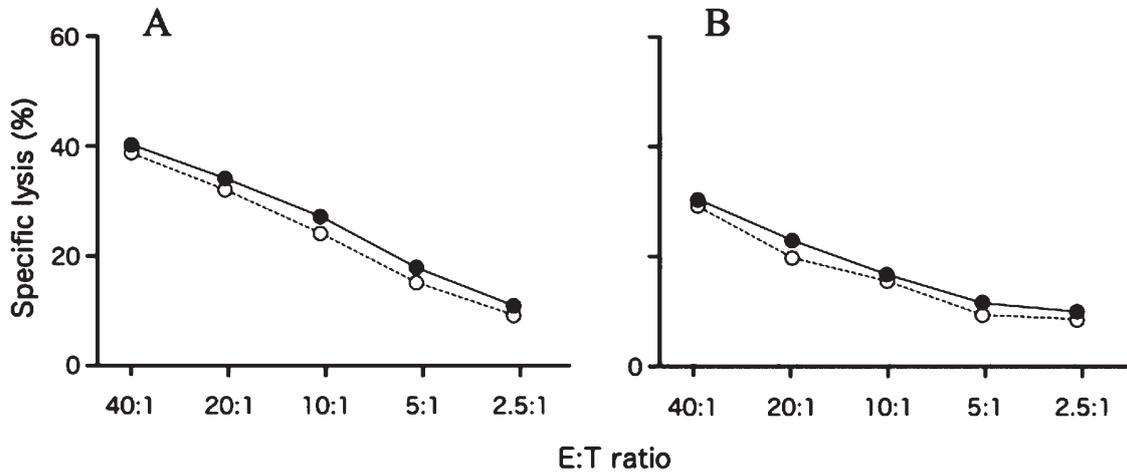


Fig. 7. Effect of NKG2D blocking antibody.

Role of NK cell surface antigen NKG2D in cytotoxic activity of allogeneic and syngeneic CIK cells was evaluated by adding neutralizing anti-NKG2D antibody in the killing assay. (A) Cytotoxic activity of B6 CIK was determined using Balb/c DC with (open circles) or without (closed circles) anti-NKG2D antibody. (B) Cytotoxic activity of B6 CIK was determined using B6 DC with (open circles) or without (closed circles) anti-NKG2D antibody.

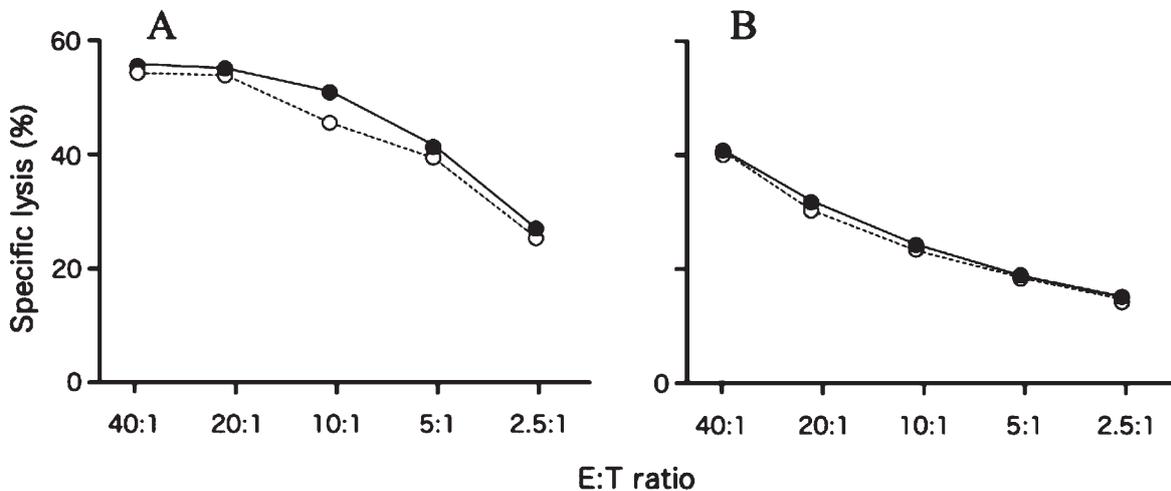


Fig. 8. Cytotoxic assay of IFN- $\gamma$  KO CIK cells against DCs.

Killing activity of CIK derived from WT B6 (A, closed circles) was compared with CIK derived from IFN- $\gamma$  KO mice (B, closed circles), using syngeneic DC as target cells. Killing activity of IFN- $\gamma$  KO CIK cells was much less compared to that of WT CIK cells. Addition of anti-IFN- $\gamma$  neutralizing antibody to the assay did not show any significant effect (A and B, open circles).

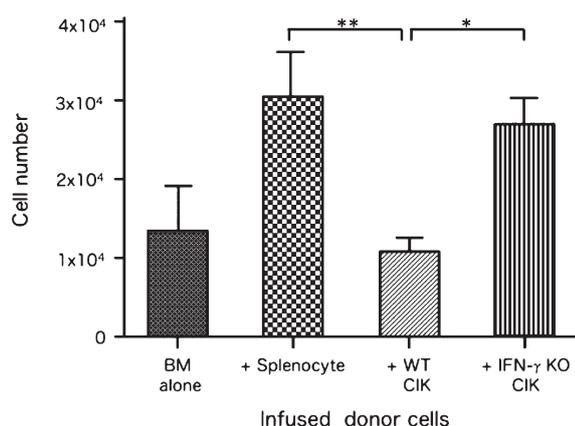


Fig. 9. Reduction of host DCs induced by IFN- $\gamma$  KO CIK cells. Splenic DC numbers were compared on day 5 after BMT among different BMT conditions. Compared with standard BMT model, splenic DC numbers were significantly reduced in the presence of WT CIK cells ( $p < 0.05$ ). This reduction was reversed when CIK cells from IFN- $\gamma$  KO mice were used. \*  $p = 0.0028$  \*\*  $p = 0.0191$

骨髄とWT CIK細胞投与群、骨髄とIFN- $\gamma$  KO CIK細胞投与群の脾臓における宿主DCの残存数を比較した。結果WT CIK細胞を受けたマウスの脾臓における宿主DCの数は、IFN- $\gamma$  KO CIK細胞を受けたマウスと比較して有意に低かった(図9)。この結果よりIFN- $\gamma$ はCIK細胞が宿主DCを除去する機序に重要な役割を果たすことが示唆された。

## 考 察

本研究ではまず<sup>51</sup>Crを用いた細胞傷害アッセイにて、同種異系CIK細胞が宿主DCに対して細胞傷害活性を示すことを明らかにした(図5)。このことからCIK細胞が移植早期に細胞傷害により宿主DCを減少させることで、結果的にGVHDに抑制的に働いていることが示唆された。Yi Zangら<sup>10)</sup>は、マウス移植モデルにおいて放射線照射後6時間という短時間で、宿主DCが宿主脾臓領域に集積し、その後早期に消失するが、消失する前にドナーT細胞を初回抗原刺激し、ドナーCD8<sup>+</sup>T細胞媒介GVHDの誘発において重要な役割を果たすことを示している。GVHDの抑制の為に、CIK細胞が宿主DCを移植早期に脾臓内で減少させることが重要と考え、実際にマウス移植モデルにおいて宿主脾臓内の宿主DCの絶対数を比較した(図6)。移植後1日目においてCIK輸注群のマウス宿主脾臓内の宿主DCの絶対数は、GVHD誘発モデルである脾細胞輸注群のそれと変わらなかったが、移植後3日目にはCIK輸注群では脾細胞輸注群と比較して明らかに宿主DCの絶対数が少なかった。Nishimuraら<sup>3)</sup>は、CIK輸注マウスにおいて、輸注されたCIK細胞は移植後3日目には脾臓に限局的に集積、増殖し、その24時間後には全身に拡散されることを示している。

このことより、同種CIK細胞が宿主脾臓内で最初に

DCに会合すると移植後1日目にはDCおよびCIK細胞は共に増殖し、その後同種CIK細胞の細胞傷害活性により宿主DCは急速に死滅し、脾臓から消失するのではないかと考える。

では、CIKの宿主DCへの傷害活性はどのようなメカニズムによるものなのだろうか? CIK細胞の抗腫瘍効果は細胞-細胞接触依存性NKG2Dを介したものであることが知られている<sup>11)</sup>。本研究ではまず、DCに対する傷害活性も同様にNKG2Dを介したのではないかと検討した。NKG2D中和抗体を用いた検討では、NKG2Dを介した細胞間相互作用を阻害しても、CIK細胞のDCに対する細胞傷害活性は影響を受けなかった(図7)。この結果から、同種CIK細胞のDCへの傷害活性は腫瘍細胞に対する傷害活性と異なり、NKG2Dを介した細胞間相互作用以外の機序によることが示唆された。従来の検討では、CIK細胞の抗腫瘍効果にはNKG2D以外にもパーフォリンやFas、Fasリガンドといった活性化誘導細胞死に関与する蛋白が関与していることが知られている<sup>12)13)</sup>。興味深いことに、これらの分子を欠損したマウス由来のCIK細胞は腫瘍細胞に対する傷害活性を認めない一方、WT由来のCIK細胞と同様に致死的なGVHDを強く抑制することが知られている<sup>7)</sup>。CIKのGVHD抑制機序が本研究の結果が示す仮説の如く、NKG2Dを介さない宿主DCの傷害によるものであれば、NKG2D KOマウス由来のCIK細胞も同様に生体内で致死的なGVHDを抑制することが予想される。今後の検討が必要であろう。

次に本研究ではCIK細胞によるGVHD抑制におけるIFN- $\gamma$ の役割に注目した。IFN- $\gamma$ はNK細胞や活性化T細胞等の種々の免疫応答細胞から産生され、様々な作用をもつサイトカインである。とりわけ、マクロファージの活性化やNK細胞活性化、抗腫瘍作用等、受容免疫、自然免疫に関わる機能は良く知られている<sup>14)</sup>。移植医療においては患者でのGVHDの重症度と患者血清IFN- $\gamma$ が相関するとの報告がある<sup>15)</sup>。これはGVHDにより惹起された活性化T細胞による過剰産生を反映したものであり、IFN- $\gamma$ 自体は、むしろGVHDに対しては抑制的に働くことが示唆されている<sup>16)</sup>。一方CIK細胞はNK細胞や活性化CD8細胞同様にIFN- $\gamma$ を大量に産生していること<sup>1)3)</sup>、同種IFN- $\gamma$  KOマウス由来のCIK細胞輸注が同種脾細胞輸注と同様に致死的なGVHDを引き起こすことから、CIK細胞輸注のGVHD抑制にはIFN- $\gamma$ が関与していることが示唆されている<sup>7)</sup>。本研究ではIFN- $\gamma$ がCIK細胞のDCへの細胞傷害活性に関与しているかどうかをIFN- $\gamma$  KOマウス由来のCIK細胞とIFN- $\gamma$ 中和抗体を用いて検討を行った。結果、<sup>51</sup>Crを用いた細胞傷害活性の検討では、IFN- $\gamma$  KO由来のCIK細胞はDCに対する細胞傷害活性を失っており、IFN- $\gamma$ がCIK細胞の誘導に密接に関与していることが強く示唆された(図8)。しかし、WTマウス由来のCIK細胞を用いた検討では、IFN- $\gamma$ 中和抗体を使用してもその細胞傷害活性は減弱しなかった。この

ことは、CIK細胞が産生するIFN- $\gamma$ は直接DCの傷害に関与するのではなく、CIKが分化・誘導される経過に於いて細胞傷害性を獲得する為にIFN- $\gamma$ の存在が必須であることを示唆した。また移植モデルを用いた検討でも、IFN- $\gamma$  KO由来CIK細胞輸注群では脾臓内での宿主DCの絶対数の減少は強く抑制された(図9)。これらの結果からは、CIK細胞がDCに対する傷害活性を獲得するプロセスにおいてIFN- $\gamma$ が重要な役割を果たすと考えられた。

GVHD反応におけるIFN- $\gamma$ の役割は複雑である。骨髄移植例においては投与のタイミングに依存し、IFN- $\gamma$ を遅く投与するとGVHDを悪化させ、逆に早期投与は抑制効果を有することが知られている<sup>16)17)</sup>。この後の課題は、移植後早期におけるIFN- $\gamma$ を介したCIK細胞の分化誘導の詳細な仕組みを解明することである。特に、IFN- $\gamma$ により誘導される腫瘍壊死因子関連蛋白を介した細胞死や細胞接触により誘導されるアポトーシス機構の関与についての検討が必要である。これらの仕組みを明らかにし、CIK細胞の大量輸注療法など、CIK細胞を臨床応用しGVHDを抑制することにより安全で有効な移植治療が行われることが期待される。

## 結 論

今回のIFN- $\gamma$ 中和抗体とIFN- $\gamma$  KOマウスを用いた<sup>51</sup>Cr放出細胞傷害アッセイ、および移植モデルでの実験から、同種CIK細胞はIFN- $\gamma$ による傷害活性の増強により宿主DCを排除し、GVHDを抑制していると考えられた。今後さらに移植後早期におけるIFN- $\gamma$ を介したCIK細胞の分化誘導の詳細な仕組みを解明することでCIK細胞を臨床応用し、GVHDの少ない、より安全で有効な移植治療が行われることが期待される。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師和田泰三教授、谷内江昭宏前教授に深甚の謝意を捧げるとともに、終始直接の御助言と多大なる御指導をいただきました西村良成先生に深謝いたします。さらに本研究の遂行に際し、マウスを譲渡していただきました東京理科大学教授 岩倉洋一郎先生に深く御礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J Exp Med* 174: 139-149, 1991
- 2) Verneris MR, Karimi M, Baker J, Jayawal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded. *Blood* 103: 3065-3072, 2004
- 3) Nishimura R, Baker J, Beilhack A, Zeiser R, Olson JA, Segal EI, Karimi M, Negrin RS. In vivo trafficking and survival of cytokine induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity. *Blood* 112: 2563-2574, 2008
- 4) Laport GG, Sheehan K, Baker J, Armstrong R, Wong RM, Lowsky R, Johnston LJ, Shizuru JA, Miklos D, Arai S, Benjamin JE,

Weng WK, Negrin RS. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 17: 1679-1687; 2011

5) Ma Y, Xu YC, Tang L, Zhang Z, Wang J, Wang HX. Cytokine-induced killer (CIK) cell therapy for patients with hepatocellular carcinoma: efficacy and safety. *Exp Hematol Oncol* 1: 11; 2012

6) Pan K, Guan XX, Li YQ, Zhao JJ, Li JJ, Qiu HJ, Weng DS, Wang QJ, Liu Q, Huang LX, He J, Chen SP, Ke ML, Zeng YX, Xia JC. Clinical activity of adjuvant cytokine-induced killer cell immunotherapy in patients with post-mastectomy triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 20: 3003-3011; 2014

7) Baker J, Verneris MR, Ito M, Shizuru JA, Negrin RS. Expansion of cytolytic CD8<sup>+</sup> natural killer T cells with limited capacity for graft-versus-host disease induction due to interferon production. *Blood* 97: 2923-2931; 2001

8) Verneris MR, Baker J, Edinger M, Negrin RS. Studies of ex vivo activated and expanded CD8<sup>+</sup> NK-T cells in humans and mice. *J Clin Immunol* 22: 131-136; 2002

9) Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Röbbner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77-92; 1999

10) Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, Rivera AJ, Emerson SG. Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8<sup>+</sup> T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 109: 1335-1344; 2002

11) Verneris MR, Karami M, Baker J, Jayaswal A, Negrin RS. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 103: 3065-3072; 2004

12) Verneris MR, Ito M, Baker J, Arshi A, Negrin RS, Shizuru JA. Engineering hematopoietic grafts: purified allogeneic hematopoietic stem cells plus expanded CD8<sup>+</sup> NK-T cells in the treatment of lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 7: 532-542; 2001

13) Verneris MR, Kornacker M, Mailänder V, Negrin RS. Resistance of ex vivo expanded CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> T cells to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 49: 335-345; 2000

14) Michael JHR. *Encyclopedia of Immunobiology*, 1st ed, p494-500, Elsevier Science, Amsterdam, 2016

15) Nakamura H, Komatsu K, Ayaki M, Kawamoto S, Murakami M, Uoshima N, Yagi T, Hasegawa T, Yasumi M, Karasuno T, Teshima H, Hiraoka A, Masaoka T. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN- $\gamma$  in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Allergy Clin Immunol* 106: S45-S50; 2000

16) Brok HPM, Vossen JM, Heidt PJ. IFN- $\gamma$ -mediated prevention of graft-versus-host disease: pharmacodynamic studies and influence on proliferative capacity of chimeric spleen cells. *Bone Marrow Transplant* 22, 1005-1010; 1988

17) Yang YG, Dey BR, Sergio JJ, Pearson DA, Sykes M. Donor-derived interferon  $\gamma$  is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin-12. *J Clin Invest* 102: 2126-2135; 1998

**Suppression mechanism of acute graft-versus-host disease by cytokine-induced killer cells** Shintaro Mase, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Kanazawa 920-8641 Juzen Med. Soc., **128**, 86 – 93 (2019)

**Key words** bone marrow transplantation, cytokine-induced killer cell, dendritic cell, graft-versus-host-disease, interferon- $\gamma$

#### Abstract

Cytokine-induced killer (CIK) cells are *ex vivo*-expanded T lymphocytes expressing both natural killer (NK)- and T-cell markers. It was reported previously that adoptive transfer of allogeneic CIK cells in a murine model causes minimal graft-versus-host disease (GVHD) with retention of antitumor activity mediated by NKG2D, an activating receptor expressed on NK cells. The mechanism of suppression of GVHD by CIK cells is not fully understood. We examined whether allogeneic CIK cells suppress GVHD by eliminating host dendritic cells (DCs), and then whether interferon (IFN)- $\gamma$  is involved in such suppression mechanisms. In the  $^{51}\text{Cr}$  release cytotoxicity assay, CIK cells showed strong cytotoxic activity against DCs generated from rodent bone marrow (BM) cells. This cytotoxic activity did not change with the addition of NKG2D blocking antibody, suggesting the involvement of mechanisms other than the NKG2D / NKG2D ligand system. Next, we showed that the killing activity of IFN- $\gamma$  knockout (KO) CIK cells was decreased compared to that of wild-type (WT) CIK cells. To further explore the mechanism whereby IFN- $\gamma$  KO CIK cells exhibit reduced killing activity against DCs, IFN- $\gamma$  neutralizing antibody was added to the reaction mixture with WT CIK cells. However, the killing activity of WT CIK cells against DCs did not change with IFN- $\gamma$  neutralizing antibody. These results suggested that IFN- $\gamma$  itself does not affect killing activity, although IFN- $\gamma$  is essential to the enhancement of killing activity during the *ex vivo* culture of CIK cells. Our next experiment addressed whether CIK cells eliminated host DCs *in vivo*. We compared the residual number of host-typed splenic DCs between mice receiving BM cells plus WT CIK cells and mice receiving BM cells plus IFN- $\gamma$  KO CIK cells. The data showed that the number of host DCs in the spleen in mice receiving the WT CIK cells was significantly lower than that in mice receiving IFN- $\gamma$  KO CIK cells. In conclusion, we propose that allogeneic CIK cells eliminate host DCs due to enhancement of killing activity by IFN- $\gamma$ , leading to attenuation of GVHD.