

トラスツズマブの効果を増強させる  
新規免疫細胞療法ならびに遺伝子療法の開発

東京大学大学院医学系研究科外科学専攻

指導教官：瀬戸泰久教授

分田 貴子

## 目次

|  |    |
|--|----|
| 要旨 .....   | 2  |
| 1.序論 .....   | 5  |
| 2.目的 .....   | 12 |
| 3.方法 .....   | 13 |
| 3.1 細胞株.....   | 13 |
| 3.2 NK 細胞培養実験のための細胞採取.....                                   | 13 |
| 3.3 NK 細胞培養用の培地と培養バッグ .....                                  | 14 |
| 3.4 NK 細胞の培養 .....   | 14 |
| 3.5 フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析 .....                            | 14 |
| 3.6 細胞内サイトカイン解析.....   | 15 |
| 3.7 細胞傷害活性の解析.....   | 16 |
| 3.8 ボランティア由来末梢血単核球の細胞傷害活性の測定 .....                           | 17 |
| 3.9 V 型 FCGR3A-cDNA のクローニングならびにシークエンスの決定 .....               | 18 |
| 3.10 V 型 FCGR3A 組換えレトロウイルスベクターならびに組換えレトロウイルスの作<br>成 .....    | 19 |
| 3.11 V 型 FCGR3A 組換えレトロウイルスの F/F 型ボランティア由来 NK 細胞への導入<br>..... | 20 |
| 4.結果 .....   | 22 |
| 4.1 培養による NK 細胞数の変化 .....                                    | 22 |
| 4.2 Day0 細胞と培養 NK 細胞の表現型 .....                               | 23 |
| 4.3 培養 NK 細胞の細胞傷害活性 (1) .....                                | 26 |
| 4.4 NK 細胞の細胞傷害活性 (2) 培養による変化 .....                           | 26 |
| 4.5 NK 細胞のトラスツズマブ依存性細胞傷害活性 .....                             | 27 |
| 4.6 乳がん細胞の Her2/neu 発現とトラスツズマブ依存性細胞傷害活性.....                 | 29 |
| 4.7 FCGR3A-cDNA のシークエンシング .....                              | 30 |
| 4.8 FCGR3A 遺伝子型とトラスツズマブ依存性細胞傷害活性 .....                       | 31 |
| 4.9 NK 細胞への V 型 FCGR3A 遺伝子導入.....                            | 33 |

|            |    |
|------------|----|
| 考察 .....   | 35 |
| 参考文献 ..... | 44 |
| 謝辞 .....   | 47 |



## 要旨

トラスツズマブは Her2 陽性乳がんに対し、広く用いられる抗体医薬であるが、その治療効果には差があり、トラスツズマブ治療に対する反応性が低い患者への新たな治療法が求められている。トラスツズマブの抗腫瘍効果には、非特異的免疫細胞である Natural Killer (NK) 細胞が大きく関与する。腫瘍細胞にトラスツズマブが結合すると、NK 細胞は、表面に発現する Fcγ受容体 3A (FCG3A) を介してトラスツズマブの Fc 領域と結合し、腫瘍細胞を強く傷害する(トラスツズマブ依存性細胞傷害活性)。トラスツズマブの効果は、主に、このトラスツズマブ依存性細胞傷害活性によるものであり、NK 細胞を用いた免疫細胞治療はトラスツズマブの効果を増強する可能性がある。

また、トラスツズマブの治療効果に差が生じる原因の一つは、患者 NK 細胞表面に発現する FCG3A の遺伝子多型であることが知られている。FCG3A 遺伝子の V 型と F 型の 2 種の多型のうち、V 型 FCGR3A は、トラスツズマブの Fc 領域との結合が強く、腫瘍細胞への強い傷害活性につながる。臨床的にも、V 型を発現する患者では、F 型を発現する患者より、トラスツズマブへの反応性が良いことが知られている。よって、抗腫瘍効果の高い V 型 FCGR3A 遺伝子を導入した NK 細胞を用いる遺伝子細胞治療も、トラスツズマブの効果を増強する新たな治療法となる可能性がある。

そこで、本研究では、トラスツズマブの効果を増強させる新たな免疫細胞治療の確立を目的とし、NK 細胞療法ならびに V 型 FCGR3A 遺伝子導入 NK 細胞による遺伝子細胞療法についての検討を行った。

NK 細胞細胞療法のためには、選択的な NK 細胞培養法の確立が必要である。本研究では、健常ボランティア末梢血単核球(PBMC)より、磁気ビーズ抗体を用いて、CD3 陰性細胞のみをあらかじめ選択してから培養することで、NK(CD3-/CD56+) 細胞を 99%以上の高純度で培養することができた。培養で得られた NK 細胞について、NK 活性化マーカーならびに細胞障害活性を評価すると、いずれも高い値を示した。また、培養して得られた NK 細胞の Her2 陽性乳がん細胞株に対するトラスツズマブ依存性細胞傷害活性は、培養前の CD3 陰性細胞よりも上昇し、高い値を示した。

4 種の乳がん細胞について、Her2/neu 抗原発現とトラスツズマブ依存性細胞傷害活性の関連を検討すると、発現強度が高い細胞ほどトラスツズマブ依存性細胞傷害活性が高く、NK 細胞に傷害されやすいという結果が得られた。

次に、遺伝子細胞治療の確立のため、V 型 FCGR3A 遺伝子導入細胞の作製を行った。健常ボランティア PBMC より V 型 FCGR3A 遺伝子をクローニングし、組換えレトロウイルスを作製して、F/F 型ボランティアの NK 細胞に導入したところ、導入効率を示すためのマーカー遺伝子は高率に発現した。しかし、細胞傷害活性は、非導入細胞でも導入細胞と同等に、きわめて高い値を示し、導

入による細胞障害活性の変化を検出できなかった。

本研究において、NK 細胞を選択的にかつ強く活性化する培養法を確立することができた。さらに、この培養法で得られた NK 細胞は、高いトラスツズマブ依存性細胞傷害活性を示し、NK 細胞療法とトラスツズマブの併用による効果の可能性を期待させた。今後は、NK 細胞療法の臨床応用化に向け、担がん患者の PBMC を用いた培養可能性の検討を行う予定である。一方、遺伝子細胞治療的アプローチでは、細胞傷害活性が強い V 型 FCGR3A 遺伝子の NK 細胞への導入には成功したものの、細胞傷害活性試験では、コントロールの非導入細胞でも非常に高い値を示したために、導入による活性の変化を検出できず、実験条件の検討が課題となった。

## 1.序論

Her2/neu は主に乳がん細胞表面に発現する腫瘍抗原の 1 種であり、乳がん患者の 20-25%で過剰発現がみられる[1]。トラスツズマブ（ハーセプチン）は、この Her2/neu 抗原に対するヒト化モノクローナル IgG<sub>1</sub> 抗体で、日本では、2001 年に Her2 陽性の進行・再発乳がんに対する分子標的薬として承認され、その後、2008 年には、Her2 陽性乳がんに対する術後補助化学療法にも適応が追加された。

トラスツズマブは、化学療法やホルモン療法との併用によって抗腫瘍効果が高まり、生存が改善することが分かっているが[1]、トラスツズマブ単剤で腫瘍の縮小効果が認められるのは、Her2/neu を過剰発現する乳がん患者の約 25%に過ぎず[2]、トラスツズマブの効果を増強するような治療法の開発が必要と考えられる。

トラスツズマブの抗腫瘍機序には、Natural Killer (NK) 細胞が大きく関与する[3]。NK 細胞は CD3-/CD56+で定義され[4]、Perforin や Granzyme などの細胞傷害性酵素を含む顆粒の放出により、非特異的に標的細胞を攻撃する機能（細胞傷害活性）を持つ[5]。さらに、NK 細胞表面には、抗体の Fc 領域を認識する Fcγ受容体が発現している。標的細胞表面のがん抗原にトラスツズマブをはじめとする抗体の Fab 領域が結合すると、NK 細胞はこの Fcγ受容体を介してこれを認識し、標的細胞を特異的により強く傷害する。これを抗体依存性細胞傷害活



性 (Antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC) と呼ぶ (図 1) [6] [7]。

本研究においては、抗体としてトラスツズマブを用いる場合の抗体依存性細胞傷害活性を、「トラスツズマブ依存性細胞傷害活性」と表記する。

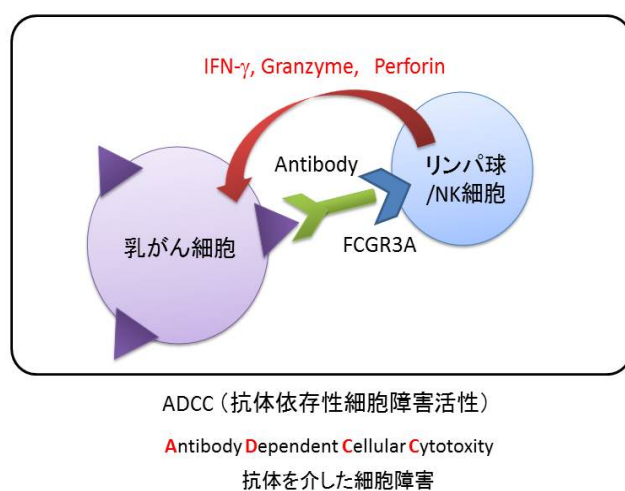


図 1 抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC)

かつては、トラスツズマブの抗腫瘍効果は、Her2/neu 抗原への結合による、増殖シグナルの抑制によるものと見なされていたが[8]、近年では、主にこのトラスツズマブ抗体依存性細胞傷害活性の機序によるものが大きいとされていることから[6]、NK 細胞を用いた免疫治療は、トラスツズマブの効果を増強する可能性がある。

NK 細胞療法においては、患者の血液より得た末梢血単核球 (PBMC) から、

NK 細胞を選択的に体外培養し、患者に投与（静注）する（図 2）。NK 細胞は、非特異的な殺細胞効果の高い細胞として、以前より免疫細胞療法分野で注目されてきた。しかし、インターロイキン-2（IL-2）刺激による大量培養が早くから報告された T リンパ球[9]と異なり、もともと PBMC 中に含まれる割合も少ない NK 細胞の培養は難しく[10]、実際に、これまで「NK 細胞療法」と呼ばれてきた治療法も、投与される細胞浮遊液に含まれる NK 細胞の純度は、それほど高いものではなかった[11]。

近年、NK 細胞研究に先進的な米国国立衛生研究所（National Institutes of Health : NIH）のグループは、PBMC から CD3-/CD56+細胞を選択した後に培養を行うことで、NK 細胞の選択的な培養に成功し、臨床応用を目指している[12]。

しかし、NIH グループの NK 細胞培養法では、EB virus transformed lymphoblast (EBL-LCL) をフィーダー細胞(刺激因子)として使用している[13]。これに対しては、使用前に放射線照射を行うものの、自己由来でない物質を用いる培養法は、日本での承認は難しく、また簡便さにも欠ける。

よって、フィーダー細胞を用いない NK 細胞の培養法を確立し、さらに、この培養 NK 細胞が、高い細胞傷害活性を持つことを明らかにできれば、新たな NK 細胞療法を確立できると考えられる。また、トラスツズマブ依存性細胞傷害活性も高値であれば、トラスツズマブと NK 細胞療法の併用療法が期待できる

可能性もある。

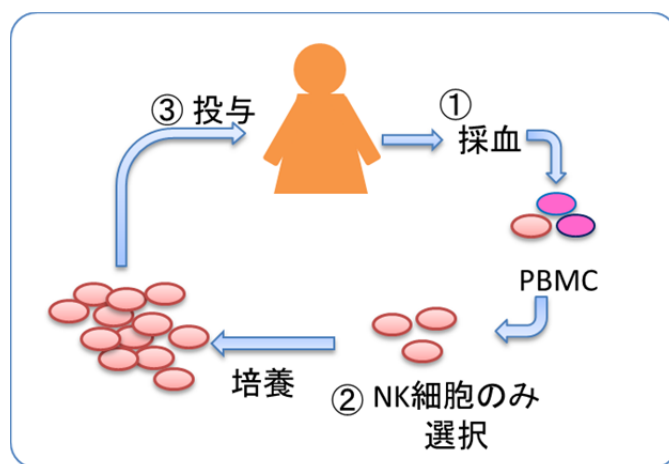


図 2 NK 細胞療法モデル

患者より採取した血液中の末梢血単核球(PBMC)から、NK 細胞を体外で選択的に培養し、患者に投与する。

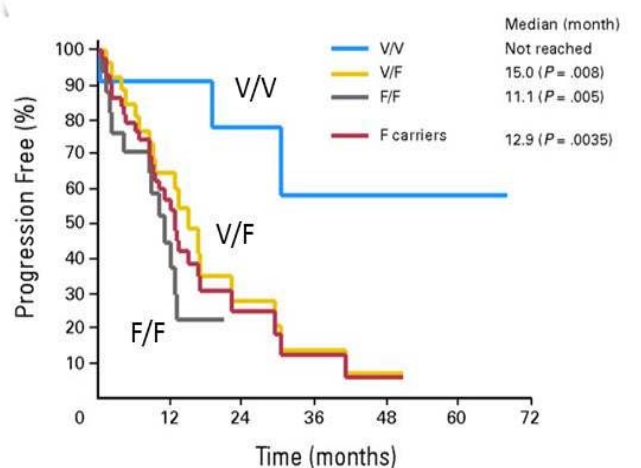
トラスツズマブに対する治療反応性の低い患者において、その原因のひとつは、NK 細胞表面の Fc 受容体の 1 つ、Fcγ受容体 3A (FCGR3A) の遺伝子多型によるものであることが知られている[14]。

NK 細胞表面の FCGR3A には、一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism, SNPs) によって生じる 158 番のアミノ酸多型 (V 型=Valine/F 型=Phenylalanine) があり[15]、この多型によって、トラスツズマブに対する反応性が異なる。V 型 FCGR3A は、分子構造学的に、トラスツズマブをはじめとする抗体の Fc 領域との親和性が強く[16]、乳がん細胞株に対するトラスツズマブ

細胞傷害活性も高いものになる[14]。一方、F型 FCGR3A では、抗体の Fc 領域への親和性が弱く、トラスツズマブ依存性細胞傷害活性も低い（表 1）。臨床的にも、V 型 FCGR3A 発現患者でトラスツズマブ治療への成績がよいことが報告され、イタリアの Musolino らも、V/V 表現型患者では、V/F ならびに F/F 患者より、無再発生存率が高いことを示している（図 3）[14, 17]。

表 1 FCGR3A の遺伝子多型による 2 つのタイプ

|            | SNPs at 819  | 158aa         | 抗体親和性 | ADCC | 臨床効果 |
|------------|--------------|---------------|-------|------|------|
| V 型 FCGR3A | ..tt/gtt/g.. | Valine        | 高     | 高    | 高    |
| F 型 FCGR3A | ..tt/ttt/t.. | Phenylalanine | 低     | 低    | 低    |



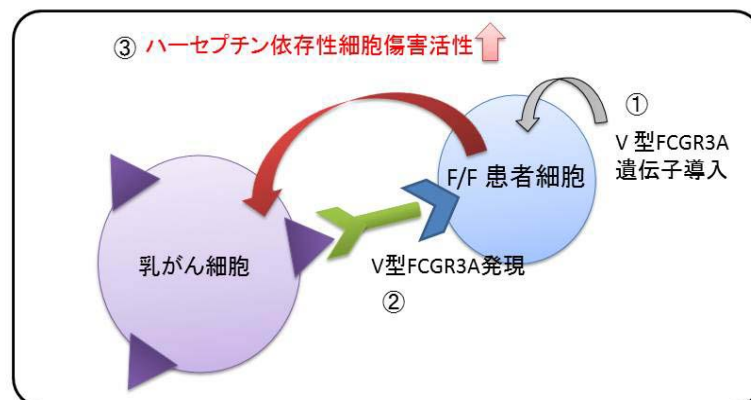
Musolino, A. et al.  
J Clin Oncol; 26 : 2008

図 3 FCGR3A 表現型と乳がん治療の臨床経過

トラスツズマブ治療による無再発生存率は、FCGR3A の遺伝子型が V/V 型の乳がん患者と V/F 型患者、ならびに V/F 型患者と F/F 型患者間において有意に差があり、V 型 FCGR3A 遺伝子を持つ患者で治療成績が良いことが示唆される。

このように、F 型遺伝子を持つ患者でトラスツズマブに対する効果が低いことが示されているにもかかわらず、これに対する治療法は開発されていない。よって、我々はこれに対し、NK 細胞を用いた遺伝子細胞治療学的なアプローチも合わせて試みることにした。

F 型 FCGR3A 患者の NK 細胞に、V 型遺伝子を導入することができれば、これを用いた細胞治療によって、F 型患者のトラスツズマブ反応性を増強できる可能性がある。この遺伝子治療モデルを、図 4a ならびに図 4b に示す。



**図 4 a** F/F 型 FCGR3A 発現患者に対する V 型遺伝子導入 NK 細胞を用いた治療モデル

F/F 型 FCGR3A 発現患者の NK 細胞に V 型遺伝子を導入、発現させ、細胞傷害活性の高い NK 細胞を作製し、治療に応用する。

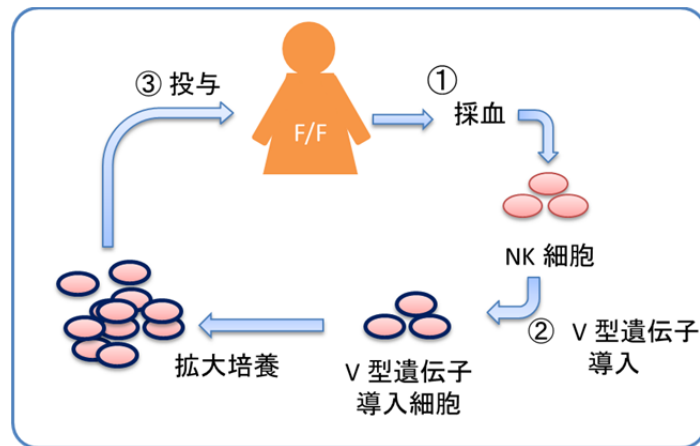


図 4 b 実際の遺伝子治療概念図

F/F 型 FCGR3A 発現患者より採血して得た NK 細胞に、V 型 FCGR3A 遺伝子を導入、発現させ、*ex vivo* で拡大培養して静脈内に投与する。

## 2.目的

本研究においては、トラスツズマブの効果を増強させる免疫細胞療法の確立を目的とし、フィーダー細胞を用いない NK 細胞培養法の確立と、培養された NK 細胞の細胞障害活性の *in vitro* における検討を行う。また、トラスツズマブ存在下での細胞障害活性（トラスツズマブ依存性細胞傷害活性）についても評価する。

さらに、トラスツズマブの治療効果が十分でない原因の一つである FCGR3A 遺伝子多型に対する遺伝子細胞療法の可能性を検討するため、NK 細胞への V 型 FCGR3A 遺伝子導入と、導入された細胞の細胞傷害活性を評価する。

### 3.方法

#### 3.1 細胞株

ヒト前骨髄性白血病細胞株 K562、ならびに Her2/neu 陽性ヒト乳がん細胞株 MCF-7、MDA-MB-231、BT-474 および SK-BR-3 (ATCC、Manassas, VA, USA) を 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下にて培養した。培地は、K562、MCF-7 ならびに MDA-MB-231 には RPMI1640 (Invitrogen Co. Carlsbad, CA)、BT-474 には ATCC Hybri-Care Medium (ATCC)、SK-BR-3 には ATCC-formulated McCoy's 5a (ATCC) を、いずれも 10%非働化 FBS を添加して用いた。

#### 3.2 NK 細胞培養実験のための細胞採取

国立がん研究センター内 IRB 承認【承認番号 2010-103】およびインフォームドコンセント取得の上、11 名の健常ボランティアより PBMC を採取した。これを CD3 抗体磁気ビーズならびに MACS LD カラム (MiltenyiBiotec GmbH, Gladbach, Germany) を用いたネガティブセレクションにより、CD3 陰性細胞のみを回収し、解析と培養に使用した。この際、フローサイトメーター解析により、CD3 陰性細胞が 99%以上であることを確認し、この条件を満たさない場合、再度セレクション操作を繰り返した。



### 3.3 NK 細胞培養用の培地と培養バッグ

先行実験において、コージンバイオ社 (Kohjin bio., Saitama, Japan) ならびにフコク社 (Fukoku. Co. Ltd., Saitama, Japan) から提供された、複数の培地ならびに培養バッグでの比較培養実験を行い、最も NK 細胞培養に適し、かつ、臨床使用可能な培地成分、バッグ原材料のみを用いた KBM570-OK 培地と TAZETTA-F 閉鎖系バッグシステムを選択した。

### 3.4 NK 細胞の培養

選択した CD3 陰性細胞を、 $1\sim 2\times 10^6/\text{ml}$  に調整し、調整できた量に応じて 1~2ml では 24well プレート (BD Falcon, NJ, USA)、2~10ml では T-25cm<sup>2</sup> フラスコ (BD Falcon) を用いて、37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。培地は、10% 非働化自己血漿を含む KBM570-OK 培地 (コージンバイオ社、hIL2 : 700U/ml 含有) を用いた。細胞の増殖に応じて、培地を 2-5ml ずつ添加し、7~10 日目に TAZETTA-F 閉鎖系バッグ (フコク社) へと移した (最終培地量 50-200ml)。14~29 日間の培養後に回収し、直ちに解析した。

### 3.5 フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー解析

Day0 CD3 陰性細胞ならびに培養 NK 細胞を、表 2 に従って蛍光ラベル抗体で染色、FACSCalibur™ and CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

を用いたフローサイトメトリーにて解析した。

**表 2 Day0 CD3 陰性細胞ならびに培養 NK 細胞の表面マーカー解析パネル**

|          | <b>FITC</b>      | <b>PE</b>        | <b>PerCP</b>     | <b>APC</b>       |
|----------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>1</b> | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> | IgG <sub>1</sub> |
| <b>2</b> | CD56             | CD16             |                  | CD3              |
| <b>3</b> | CD56             | NKG2D            |                  | CD16             |
| <b>4</b> |                  |                  | 7AAD             |                  |

### 3.6 細胞内サイトカイン解析

Day0 CD3 陰性細胞ならびに培養 NK 細胞を、BD Cytofix/Cytoperm™キット (BD) を用いて穿孔、固定させたのち、表 3 に従って染色、フローサイトメトリーにて解析した。

**表 3**

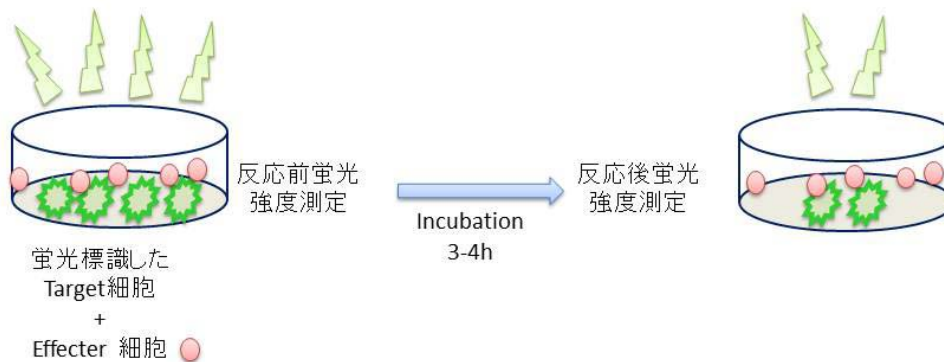
**Day0 CD3 陰性細胞ならびに培養 NK 細胞の細胞内サイトカイン染色パネル**

|          | <b>FITC</b>      |
|----------|------------------|
| <b>1</b> | IgG <sub>1</sub> |
| <b>2</b> | CD107a           |
| <b>3</b> | Perforin         |
| <b>4</b> | GanzymeB         |

### 3.7 細胞傷害活性の解析

細胞障害活性試験は、カルセイン法[18]にて行った。ターゲット細胞を蛍光色素カルセイン(Calcein-AM; Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) にて標識、エフェクター細胞と、複数のエフェクター/ターゲット比 (E/T 比) で混合し、37℃、5%CO<sub>2</sub>にて3時間培養、培養前後に蛍光強度を測定した。最大遊離ウェル (ターゲット細胞に界面活性剤 (TritonX) 添加したもの) をポジティブコントロール、自然遊離ウェル (標的細胞のみ) をネガティブコントロールとして、同時に培養ならびに測定した。

傷害された標的細胞から放出されるカルセイン量は、各ウェルにおける蛍光強度の減衰度 (反応前蛍光強度と反応後蛍光強度の差) で代表される。この差の値から、図 5 の式を用いて、各 E/T 比における細胞傷害活性を算出した。トラスツズマブ依存性細胞傷害活性試験においては、上記にトラスツズマブを 600ng/ml 添加して解析した。このトラスツズマブの濃度は、先行実験の結果より、十分に差を検出できる量として設定した。



$$\text{細胞傷害活性\%} = (\Delta E - \Delta S) \times 100 / (\Delta M - \Delta S) \%$$

$\Delta E$  = 実験 well の反応前蛍光強度－反応後蛍光強度

$\Delta S$  = 自然遊離 well の反応前蛍光強度－反応後蛍光強度

$\Delta M$  = 最大遊離 well の反応前蛍光強度－反応後蛍光強度

## 図5 蛍光色素を用いた細胞傷害活性試験

標的細胞を蛍光標識し、培養後の蛍光強度の減衰度により、細胞傷害活性%を算出する。

### 3.8 ボランティア由来末梢血単核球の細胞傷害活性の測定

V 型 FCGR3A 遺伝子をもつボランティアの末梢血単核球（Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC）では、F 型 FCGR3A 遺伝子を有するボランティア PBMC より、高い細胞傷害活性ならびにトラスツズマブによる細胞傷害活性増強効果を呈する可能性が大きい。そこで、国立がん研究センター内 IRB の承

認【承認番号 20-117】およびインフォームドコンセント取得の上、複数の健康ボランティア PBMC を用いて、Her2/neu 陽性乳がん細胞株 MCF-7 に対する、トラスツズマブ非存在下ならびに存在下での細胞傷害活性を、方法 3.7 に従って評価した。

### 3.9 V 型-FCGR3A-cDNA のクローニングならびにシーケンスの決定

3.8 の細胞傷害活性試験を行うと同時に、ボランティア PBMC から、RNeasy Mini Kit (QIAGEN-GmbH, Hilden, Germany)を用い、プロトコルに準じて total cell RNA を抽出、RT-PCR 法を用いて、FCGR3A-cDNA (922bp) を増幅した。RT-PCR には、TaKaRa bio Inc.( Shiga, Japan)の PrimeScript® 1st strand cDNA Synthesis Kit ならびに PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Premix) を使用し、プライマーは、上流: 5'-aaattgggtgggtgacagagatg-3'、(166-187nts)、下流: 5'-gactgctcttattaccccatg-3' (1067-1088nts) とした。得られた cDNA を TOPO TA cloning Kit (Invitrogen Co.) を用いて、クローニングベクター pCR2.1-TOPO に挿入し (図 6)、24 個のコロニーをピックアップしたのち、シーケンスを決定した。シーケンシングには、ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kits (AB, Foster City, CA) を使用した。GenBank に登録された FCGR3A 遺伝子の塩基配列との照合により、V 型 FCGR3A 遺伝子が挿入されたベクターを選定した。

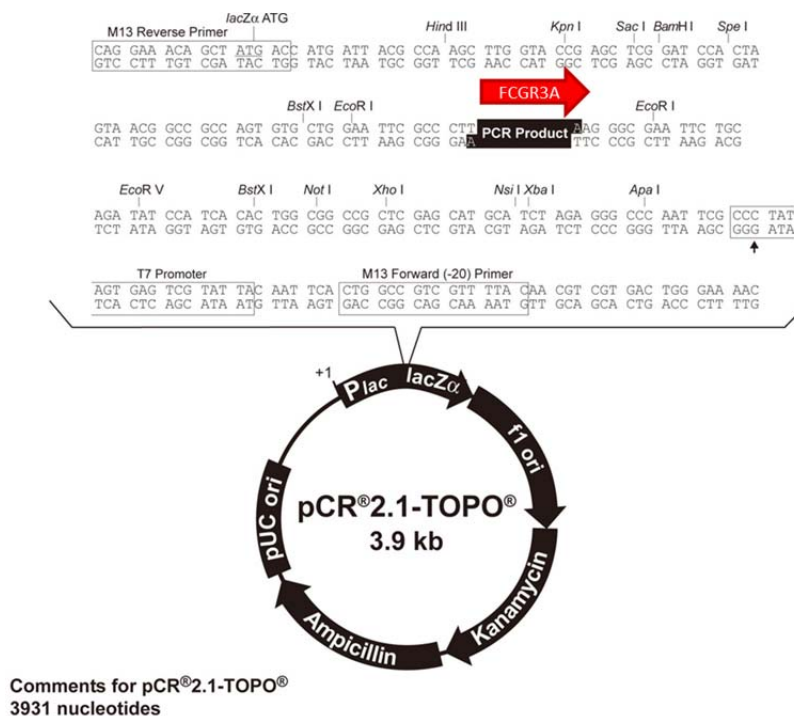


図 6 クローニングベクター pCR2.1-TOPO

健常ボランティア PBMC より得た FCGR3A-cDNA をクローニングベクター pCR2.1-TOPO のクローニングサイトに挿入、塩基配列を確認ののち、V 型 FCGR3A-pCR2.1-TOPO を選定した。

### 3.10 V 型 FCGR3A 組換えレトロウイルスベクターならびにレトロウイルスの作成

V 型 FCGR3A-pCR2.1-TOPO から、制限酵素（ApaI, BamHI）を用いて、V 型 FCGR3A-cDNA を切断し、1025bp の DNA 断片を pDON5-LNGFR レトロウイルス作製用ベクター（TaKaRa bio. Inc. Otsu, Shiga）の 1375bp から 1401bp の部位に 挿入し、V 型 FCGR3A-cDNA\_pDON5-LNGFR を作製した（図 7）。pDON5- LNGFR レトロウイルス作製用ベクターには、マーカー遺伝

子として LNGFR（低親和型神経成長因子受容体; low-affinity nerve growth factor receptor、LNGFR）が組み込まれており、導入効率の指標となる。

さらに、これをパッケージ細胞である PG13 細胞に感染させ、V 型 FCGR3A-LNGFR 組換えレトロウイルスを作製した。

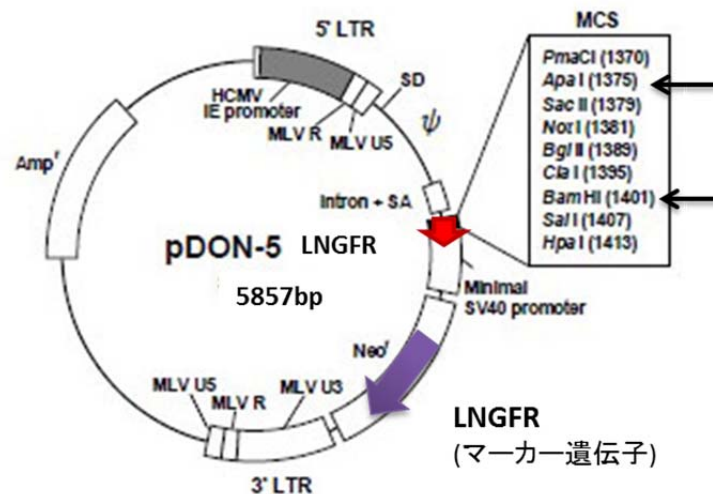


図 7 レトロウイルス作製用ベクター pDON5-LNGFR

V 型 FCGR3A-cDNA をクローニングベクター pCR2.1-TOPO より切断し、制限酵素 (ApaI, BamHI) を用いて、レトロウイルス作成用ベクター pDON5-LNGFR のマルチクローニングサイトに挿入した。

### 3.11 F/F 型ボランティア由来 NK 細胞への V 型 FCGR3A 組換えレトロウイルス導入

F/F 型ボランティア由来 PBMC から、CD3 陰性細胞のみを選択し、3.4 と同様の条件で培養した。また、感染用プレートとして、Retronectin® (TaKaRa bio.

Inc.) でコーティングしたノントリートメントタイプの 24 ウェルプレート

(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) に、V 型 FCGR3A -LNGFR 組換えレトロウイルスを重層、1000rpm で 2 時間遠心後に洗浄したものを作製しておいた。Day4 に、培養中の CD3 陰性細胞を回収、 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$  に調整して感染用プレートに移し、37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。同様の操作を翌日も行い 2 回感染とした。2 回目の感染から 4～5 日目に回収し、遺伝子導入効率、FCGR3A(CD16) 発現能ならびに細胞傷害活性の解析を行った。



## 4.結果

### 4.1 培養による NK 細胞数の変化

11 人のドナーから PBMC を採取し、CD3 抗体磁気ビーズを用いたネガティブセクションにより CD3 陰性細胞を単離し培養した。そのうち 1 例では、長期培養の影響評価を行い、他の 10 例は 14-23 日目に採取したが、うち 1 例は全く増殖しなかったため、残り 9 例を解析した。

Day0 の CD3 陰性細胞数は  $1\sim 17\times 10^6$ 、培養後の細胞数は  $36\sim 341.5\times 10^6$ 、平均細胞数は 6-36 倍に増殖した (mean $\pm$ SD :  $35\pm 39$ )。NK (CD3-/CD56+) 細胞数は、Day0 で  $0.9\sim 13.5\times 10^6$ 、培養後  $36\sim 38\times 10^6$  であり、12~44 倍に増殖した (mean $\pm$ SD :  $32\pm 12$ ) (表 4)。

29 日間培養したサンプルでは、培養効率は 1.6 倍、最終日生存率 (トリパンブルー染色) は 50%と低値であった (他 9 サンプル  $84\pm 6.0\%$ )。

表 4 総細胞並びに NK 細胞の培養効率

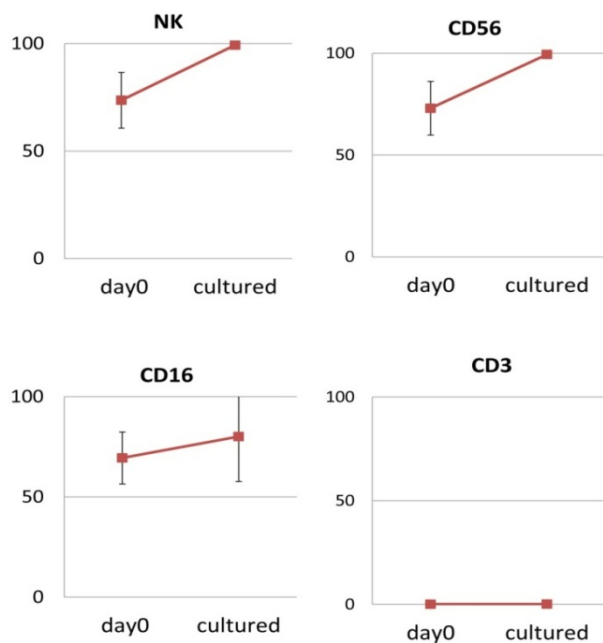
|                  | Cell number ( $\times 10^6$ cells ) |            | Expansion efficacy ( folds ) |             |
|------------------|-------------------------------------|------------|------------------------------|-------------|
|                  | Day0                                | Cultured   | Average                      | Range       |
| Total cells      | 1.0-17.0                            | 36.0-341.5 | $34.9 \pm 39.3$              | 6.0 - 36.0  |
| NK cells         | 0.91-13.5                           | 35.8-338.1 | $31.9 \pm 12.0$              | 11.5 - 44.0 |
| ( Mean $\pm$ SD) |                                     |            |                              |             |

## 4.2 Day0 細胞と培養 NK 細胞の表現型

Day0 の CD3 陰性細胞ならびに培養 NK 細胞の表現型をフローサイトメトリーにて分析した。図 8a に、培養前後の NK 細胞表面マーカーの 9 例の平均値を示す。NK (CD3-/CD56+) 細胞の割合は、Day0 で  $73.6 \pm 12.9\%$  から培養後  $99.3 \pm 0.2\%$  に増加した。CD56 発現は Day0 の  $73.0 \pm 13.1\%$  から、 $99.4 \pm 0.3\%$  に増加した。CD16 (FCGR3A) の発現は、 $69.4 \pm 12.9\%$  から  $80.1 \pm 22.4\%$  とわずかに増加し、CD3 の発現は  $0.1 \pm 0.0\%$  と低値のままであった。

NK 活性化マーカーである NKG2D と CD107a は、それぞれ  $80.2 \pm 6.9\%$  と  $69.4 \pm 0\%$  から、培養後は  $93.3 \pm 0.6\%$  と  $85.8 \pm 0.8\%$  に増加した。細胞傷害因子である Perforin の発現は  $91.2 \pm 5.0\%$  から  $99.9 \pm 0.0\%$  に増加、GranzymeB は培養前から 100% 発現していた。また、培養前後での表現型の代表的なデータを図 8b、8c に示す。

## 表面マーカー



## NK 活性化マーカー

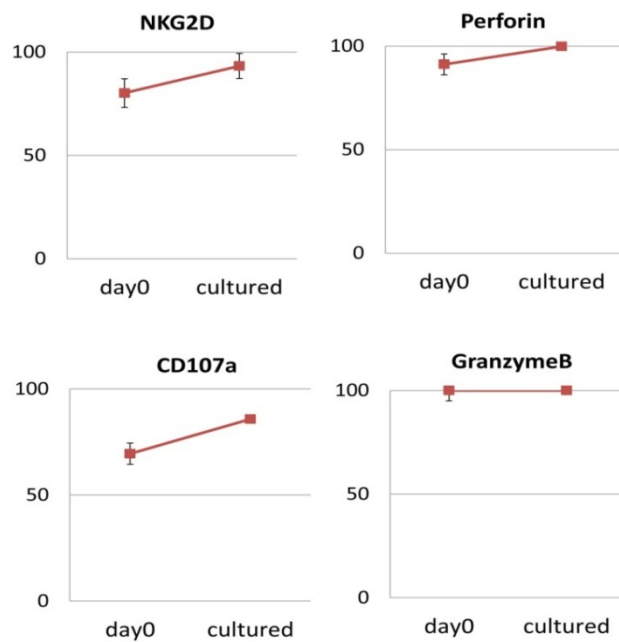


図 8a 培養前後の NK 細胞表面マーカー (9 例の平均値)

NK (CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>) 細胞が選択的に増殖している。また、NK 活性化マーカー発現も培養後に極めて高かった。

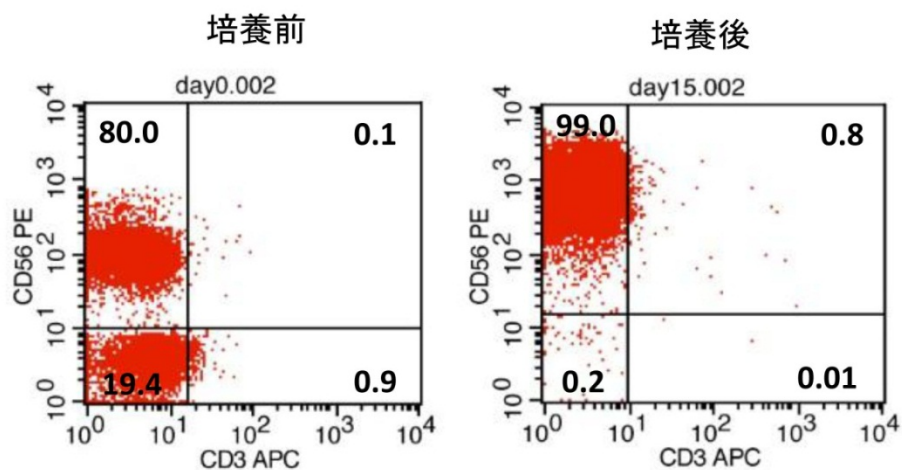


図 8b 培養前後の NK 細胞の表現型 (Dot plot 代表例 )

培養後には NK (CD3-/CD56+) 細胞が 99%を占めた。

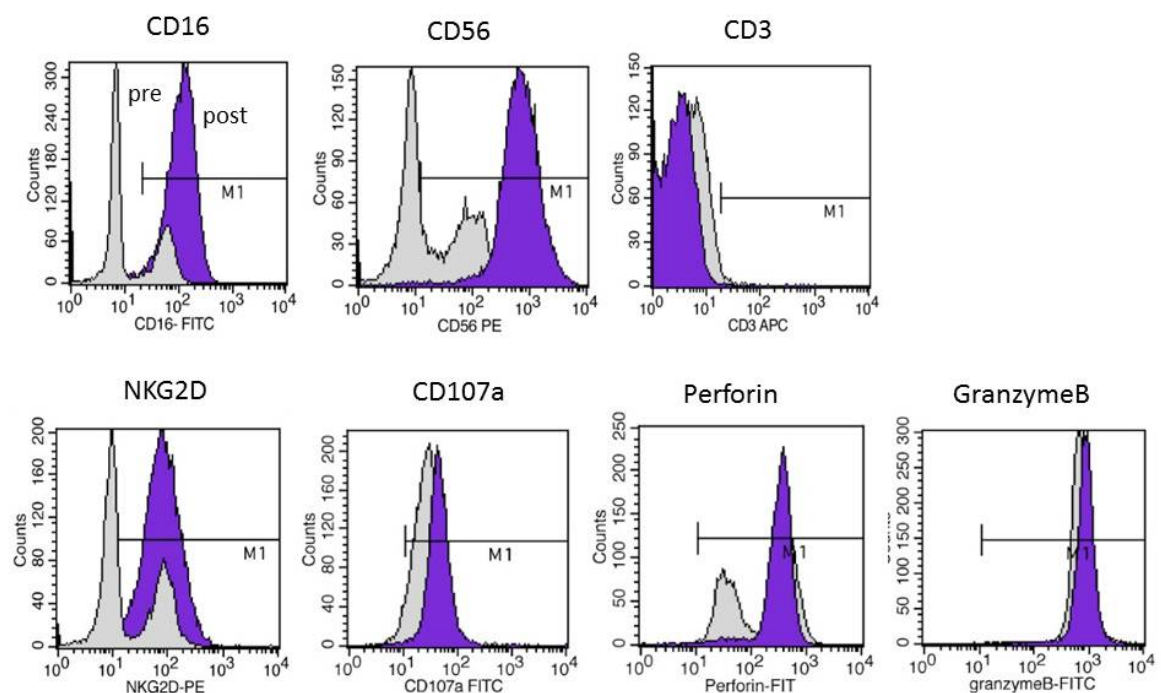


図 8c 培養前後の NK 細胞の表現型 (Histogram 代表例)

灰色が培養前、紫色が培養後のデータを示す。CD3 を除くすべてのマーカーで、培養後に発現が増加した。

### 4.3 培養 NK 細胞の細胞傷害活性 (1)

培養 NK 細胞の細胞傷害活性を、NK 細胞活性評価に一般に用いられる、ヒト前骨髄性白血病細胞株 K562 を用いて評価した。図 9 に 4 例の結果の平均を示す。培養 NK 細胞の K562 に対する細胞傷害活性は、E/T:1 においても、60% 以上となる値を示した。

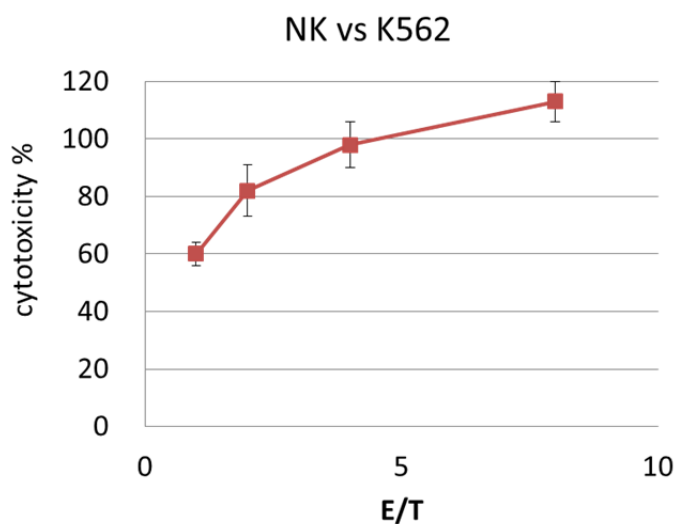


図 9 培養 NK 細胞の K562 に対する細胞傷害活性 (4 例の平均)

培養 NK 細胞の K562 に対する細胞傷害活性は、E/T:1 でも 60%を超えた。

### 4.4 NK 細胞の細胞傷害活性 (2) 培養による変化

Day0 の CD3 陰性細胞および培養 NK 細胞の、代表的乳がん細胞株 MCF-7 に対する細胞傷害活性を比較した。7 例における結果の平均を図 10 に示す。細

胞傷害活性は、培養前（day0）より培養後（cultured）で高くなっており、これを E/T:8 の値で比較すると、培養前  $9.7 \pm 6.1\%$ 、培養後は  $50.0 \pm 13.0\%$  であり、有意な増加がみられた（ $P < 0.01$ ）。

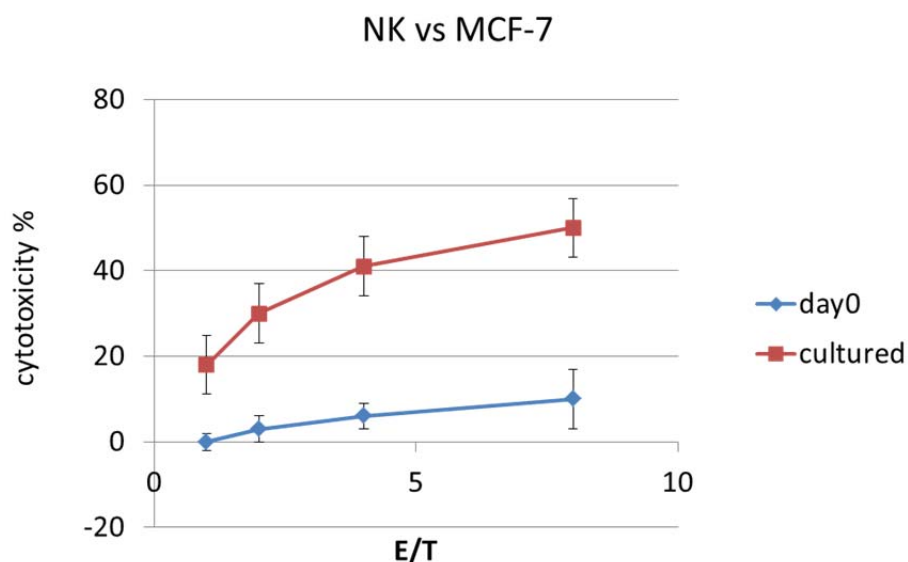


図 10 Day0 CD3 陰性細胞ならびに培養 NK 細胞の乳がん細胞株 MCF-7 に対する細胞傷害活性（7 例の平均）

Day0 の CD3 陰性細胞と培養 NK 細胞の、MCF-7 に対する細胞傷害活性を比較したところ、培養後の細胞傷害活性が有意に高かった。

#### 4.5 NK 細胞のトラスツズマブ依存性細胞傷害活性

まず、乳がん細胞株 MCF-7 の Her2/neu 発現を解析し、95%が陽性であることを確認した（図 11a）。次に、MCF-7 に対するトラスツズマブ依存性細胞傷害活性を、Day0 の CD3 陰性細胞および培養 NK 細胞で比較した。E/T:8 における 7 例の結果の平均は、それぞれ  $50.0 \pm 13.0\%$ 、 $73.2 \pm 13.7\%$  であり、培養後に

有意に増加していた ( $p<0.05$ 、図 11b)。

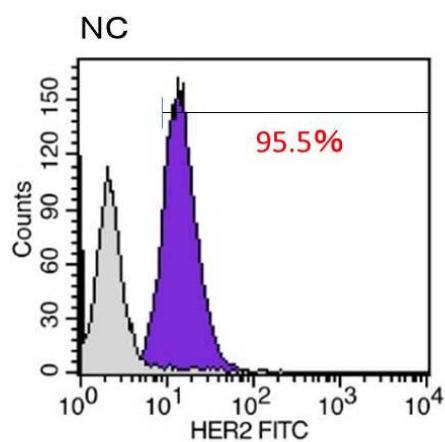


図 11a 乳がん細胞 MCF-7 の 2/neu 発現

灰色が IgG コントロール、紫色が Her2/neu-FITC 染色のピークを示す。MCF-7 の 95%が Her2/neu 陽性であった。

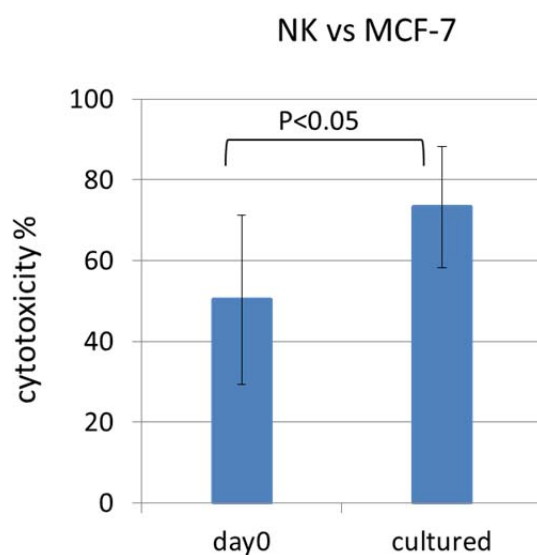
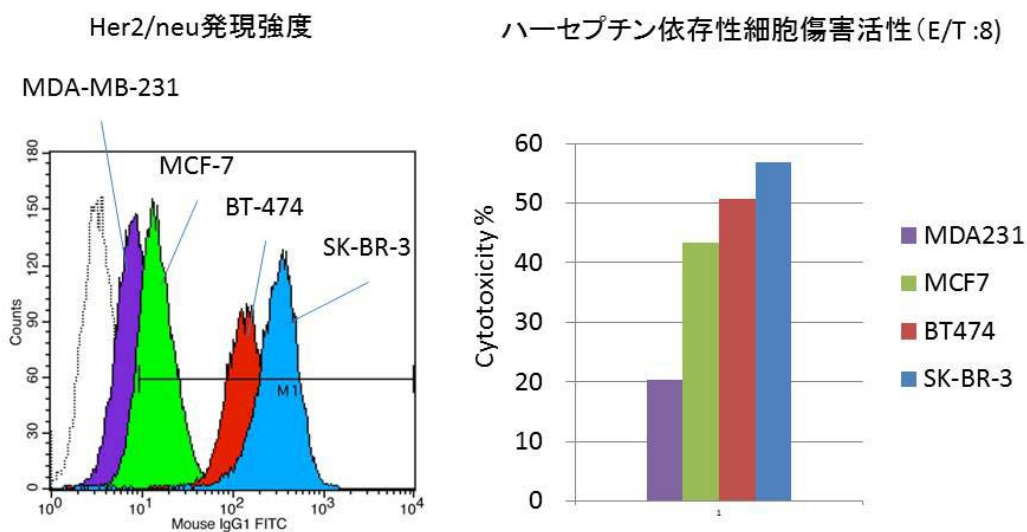


図 11b 培養前後におけるNK細胞のMCF-7細胞に対するトラスツズマブ依存性細胞傷害活性 (E/T:8 における 7 例の平均)

Day0 の CD3 陰性細胞と培養 NK 細胞の、MCF-7 に対するトラスツズマブ依存性細胞傷害活性を比較したところ、培養後のトラスツズマブ依存性細胞傷害活性が有意に高かった。

#### 4.6 乳がん細胞の Her2/neu 発現とトラスツズマブ依存性細胞傷害活性

乳がん細胞の Her2/neu 発現がトラスツズマブ依存性細胞傷害活性と関連するかを検証するため、MCF-7 に加え、MDA- MB-231、BT-474 ならびに SK-BR-3 の 4 種の乳がん細胞において、Her2/neu 発現強度とトラスツズマブ依存性細胞傷害活性の比較を行った（図 12）。左図における白色部分は IgG コントロールを示す。Her2/neu 発現強度、NK 細胞からのトラスツズマブ依存性細胞傷害活性とも、低い順に MDA- MB-231、MCF-7、BT-474、SK-BR-3 となっており、Her2/neu 発現強度と、NK 細胞からのトラスツズマブ依存性細胞傷害活性との間に関連が見られた。





#### 図 12 4 種の乳がん細胞における Her2/neu 発現とトラスツズマブ依存性細胞傷害活性 (E/T : 8)

Her2/neu 発現が高い細胞ほど、NK 細胞のトラスツズマブ依存性細胞傷害活性を強く受けていた。左図における白色部分は IgG コントロール。

#### 4.7 FCGR3A-cDNA のシーケンシング

2 人のボランティア由来 PBMC より、FCGR3A-cDNA をクローニングした後、遺伝子配列を確認したところ、SNP が報告されている第 819 番塩基部位に、a/c (=t/g) の多型が存在し、それぞれが V/F 型、F/F 型に該当すると考えられた。また、他のボランティアについては、FCGR3A-cDNA の RT-PCR 産物を用いて、直接にシーケンスを行った (図 13)。全体で 11 人のシーケンスを決定したところ、V/F 型が 5 人、F/F 型が 6 人となり、V/V 型は見られなかった。アレルの発生頻度は V 型が 0.23、F 型が 0.77 であった。

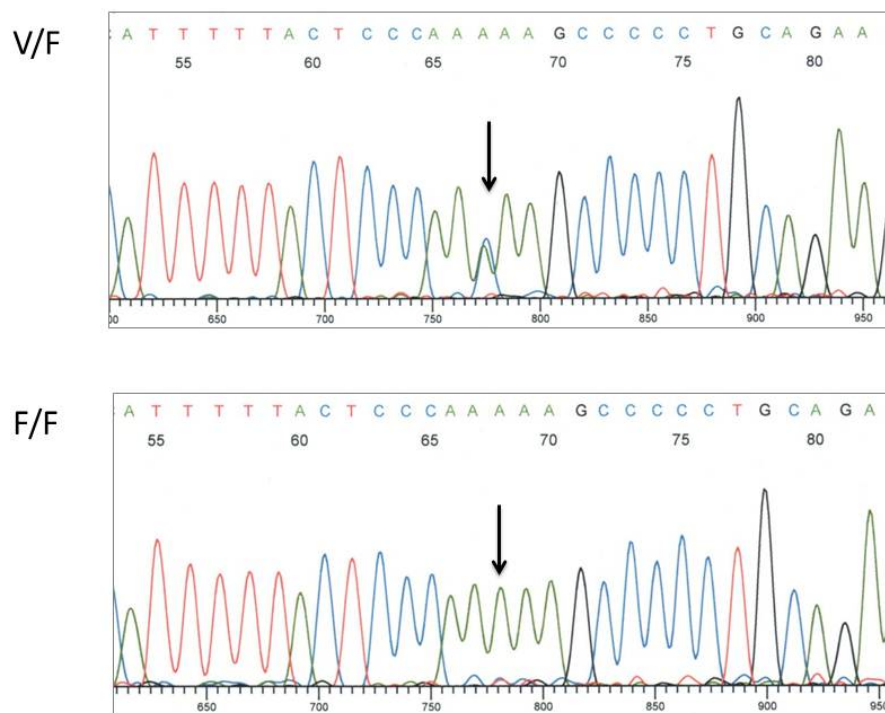
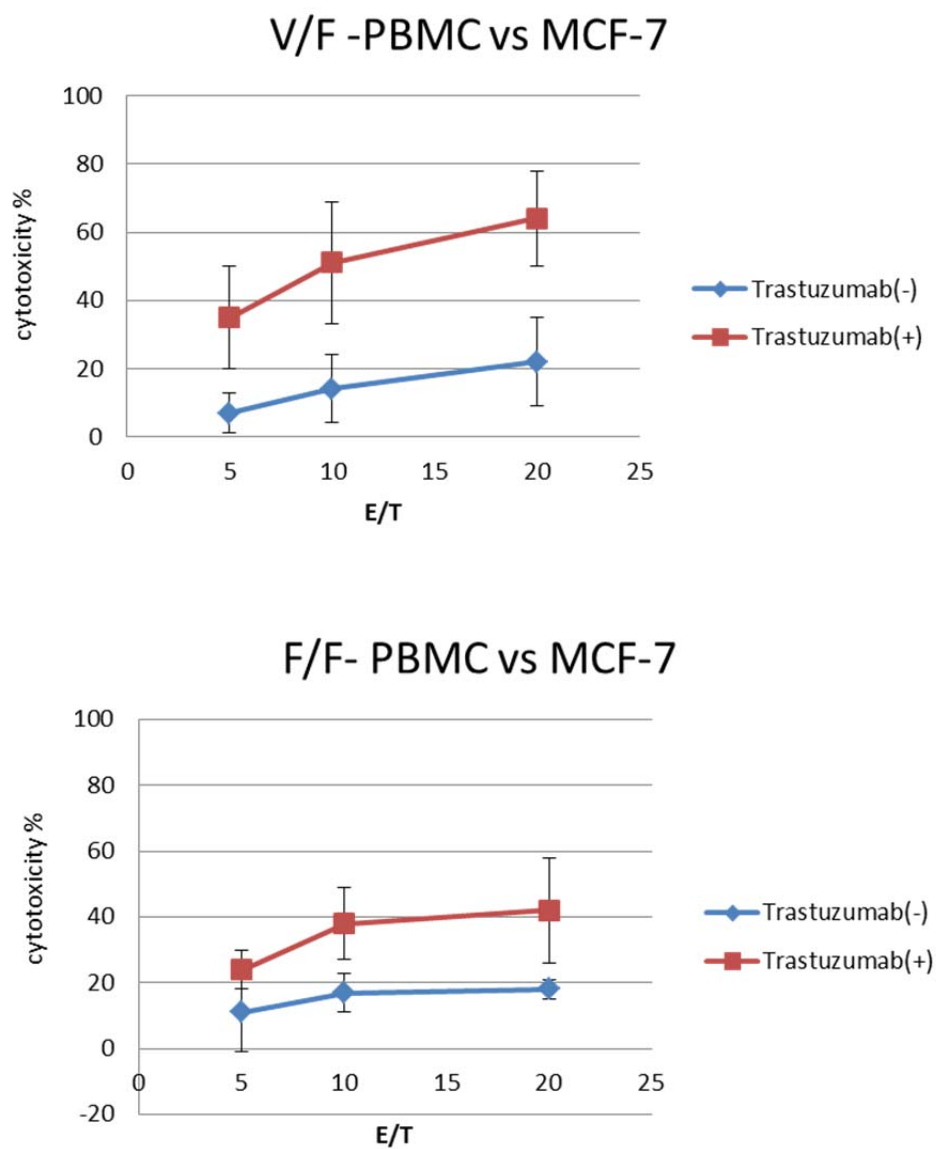


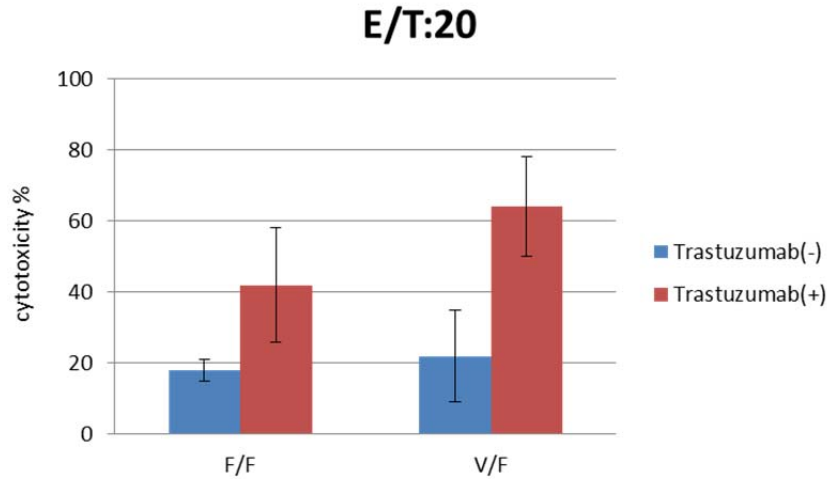
図 13 健常ボランティア由来 FCGR3A-cDNA RT-PCR 産物のシーケンス  
SNP が報告されている第 819 番塩基が a/c ヘテロのサンプルと、a/a ホモの  
サンプルが存在した。

#### 4.8 FCGR3A 遺伝子型とトラスツズマブ依存性細胞傷害活性

ボランティア由来 PBMC を用いて、Her2 陽性乳がん細胞株 MCF-7 に対する  
トラスツズマブ依存性細胞傷害活性を評価した結果、V/F 型ボランティア由来  
PBMC のトラスツズマブ依存性細胞傷害活性は、F/F 型ボランティア由来  
PBMC の活性よりも高かった（図 14a）。E/T:20 における平均をみると、V/F  
型で 63%、F/F 型で 41%と有意な差が認められた（ $P<0.05$ ）（図 14b）。



**図 14a 健常ボランティア由来 PBMC の MCF-7 に対する細胞傷害活性**  
 上段のグラフに V/F 型ボランティア由来 PBMC の、下段に F/F 型の結果を示す。  
 FCGR3A 遺伝子が V/F 型の PBMC では、トラスツズマブ存在下の細胞傷害活性 (トラスツズマブ依存性細胞傷害活性) が、F/F 型の PBMC よりも高かった。



**図 14b 健常ボランティア由来 PBMC の MCF-7 に対する細胞傷害活性 (E/T:20 における結果の比較)**

細胞傷害活性は F/F 型と V/F 型で差はないが、トラスツズマブ依存性細胞傷害活性は V/F 型で有意に高かった。

#### 4.9 F/F 型ボランティア由来 NK 細胞への V 型 FCGR3A 遺伝子導入

Retronectin (TaKaRa bio Inc.) を用い、F/F 型ボランティア由来の NK 細胞に対して V 型 FCGR3A 遺伝子の導入を行った。マーカー遺伝子 LNGFR の発現率は 73% であった (図 15a)。

導入 NK 細胞の細胞傷害活性ならびにトラスツズマブ依存性細胞傷害活性についても検討した。V 型 FCGR3A 遺伝子導入細胞は、乳がん細胞株 MCF-7 に対し、100% の細胞傷害活性ならびにトラスツズマブ細胞傷害活性を示したが、予想外に、非導入細胞も同等に高い細胞障害活性を示し (図 15b)、遺伝子導入による明らかな効果は検出できなかった。

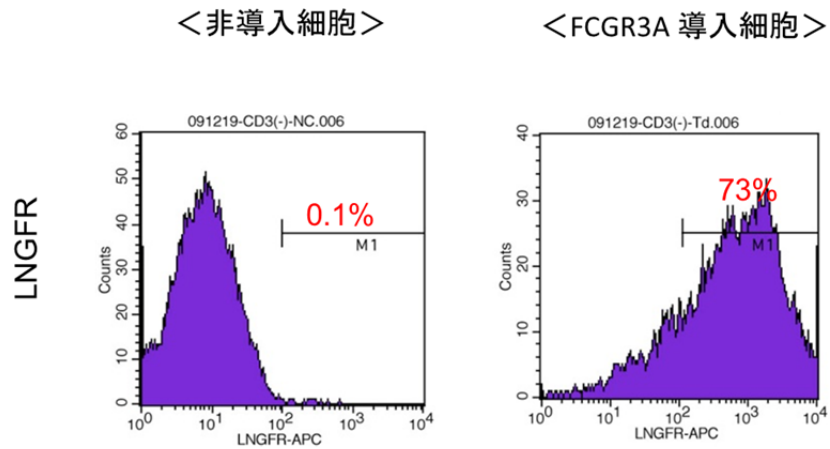


図 15a F/F 型 NK 細胞への V 型 FCGR3A 遺伝子導入

導入細胞におけるマーカー遺伝子 LNGFR の発現率は 73%であった。

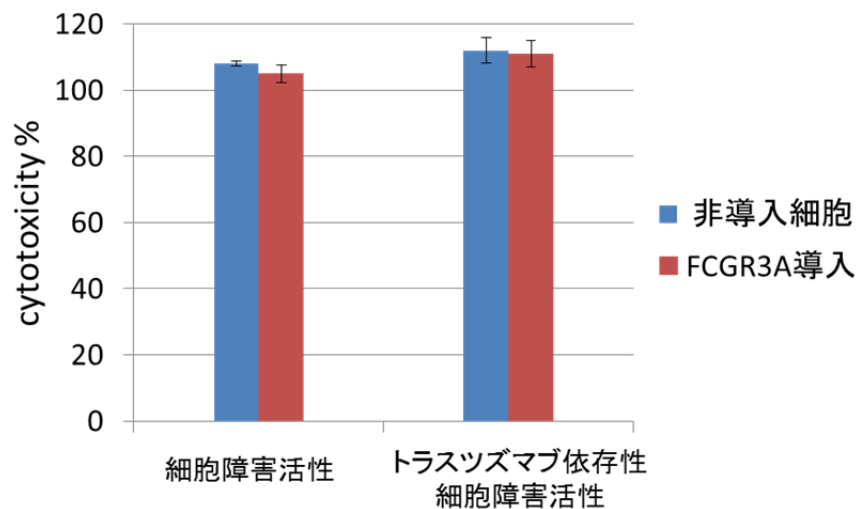


図 15b FCGR3A 遺伝子導入 NK 細胞の MCF-7 に対する細胞傷害活性

非導入細胞も遺伝子導入細胞も同様に、極めて強い細胞傷害活性を示し、遺伝子導入による差は検出できなかった。

## 考察

トラスツズマブは、がん抗原の一つである Her2/neu を過剰発現する乳がん患者に広く使用される抗体医薬である。しかし、遺伝子多型等を背景とし、トラスツズマブ治療に対し、反応性の低い患者がいることが明らかになってきている[2]。よって本研究では、トラスツズマブに反応不良な患者に対する、免疫治療的アプローチによる新たな治療法の開発について検討した。

トラスツズマブの抗腫瘍効果は、当初、上皮細胞増殖受容体の 1 種である Her2/neu 抗原をブロックングすることによる、腫瘍細胞の増殖抑制と考えられてきたが[19]、現在では、主に NK 細胞からのトラスツズマブ依存性細胞傷害活性によって引き起こされると考えられている[20, 21]。

よって本研究では、高い抗腫瘍効果をもつ培養 NK 細胞により、「トラスツズマブ併用 NK 細胞療法」を確立できる可能性もあると考え、選択的な NK 細胞培養法の確立と、培養で得られた NK 細胞のトラスツズマブ依存性細胞傷害活性について評価した。

NK 細胞療法においては、同種または自己末梢血単核球から、*ex vivo* において培養ならびに活性化した NK 細胞を静注投与する方法が行われる[22]。初期の臨床試験において、高リスクの急性骨髄性白血病（CML）患者に対し、同種 NK 細胞を直接静注し、臨床的寛解が誘導されて以降、同種または自己 NK 細胞の

静注は、固形腫瘍を含む他のがん種治療でも数多く試みられてきた[23, 24]。その後、細胞培養技術の最適化と改良も進み、現在では、閉鎖系バッグシステムを用いた臨床グレードの大規模な培養システムが確立され、そこで調整された細胞が、すでに腎細胞癌に対する NK 細胞療法に使用されている[25]。

しかし、これらの方法においては、PBMC にはそれほど多く含まれない NK 細胞[10]を選択的に培養するため、NK 細胞の増殖刺激を目的として、EBV-CL (EBV 遺伝子導入により形質転換した B リンパ芽球様細胞株)や、K562- MB15 - 41BBL 細胞 (IL -15 並びに 41BBL K562 遺伝子を導入した細胞株) などのフィーダー細胞を使用している[24, 25] [26]。フィーダー細胞は、使用前の放射線照射により、生体には安全とみなされているが、自己由来以外の物質は、なるべく混入させない培養法がより好ましい。そこで我々は、NK 細胞培養に適した KBM570 -OK 培地と無菌培養バッグを使用して、フィーダー細胞を含まない、新規培養法の開発を試みた。

この培養法により、NK 細胞の割合は、day0 で 73.6%から、培養後に 99.3%に増加した。培養後の CD56 発現は 99%以上であり、また、CD3 の発現は培養後も 0.1%と低かった。これらのデータは、NK 細胞が、通常の PBMC 培養では優位に増殖する T 細胞の混入を受けることなく、選択的に培養されたことを示す。本研究での NK 細胞の培養効率は平均 30 倍であり、これは、フィーダー細胞を用いて、平均 490 倍の培養効率を報告している NIH グループ[27]と比較

するとかなり低い。しかし、細胞治療では、肺梗塞をはじめとする血栓症のリスクが大きいため、大量に投与することはむしろ危険であり、現在の細胞治療研究においても、第 I 相試験での一般的な投与数は  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  cells/kgBW である。本研究では、30 ml 相当の末梢血 PBMC から、 $3 \sim 30 \times 10^7$  個の NK 細胞を得られており、将来の臨床応用の可能性に十分つながると考えられる。

培養 NK 細胞 では、NK 活性化マーカーである NKG2D、CD107a、Perforin ならびに GranzymeB を発現する細胞の割合は非常に高く、我々が開発した培養法によって、NK 細胞は、培養されると同時に高度に活性化されていることが示唆された。

他に、NK 細胞活性を示すマーカーとして IFN- $\gamma$  産生能がある。本研究でも、培養最終日の培養液中 IFN- $\gamma$  濃度を測定したが、 $20 \sim 12000$  pg/ml と検体によるばらつきが大きかった。これは、同時に測定した他のサイトカイン

(IL-2, TNF $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10) も同様であった。細胞培養においては、増殖の様子に応じた培地 (IL-2 含む) の追加が必要となるため、サンプルごとに最終の培地量や細胞濃度が異なり、IFN- $\gamma$  産生能を濃度から評価することは難しく、評価法の検討が必要と考えられた。

また、1 例ではあるが長期培養 (29 日間) の影響についても評価した。培養効率は 1.6 倍と悪く、またトリパンブルーで評価した生存率も 50% 以下ときわ



めて不良であった。3 週間を超える培養では、細胞の生存率が下がり、細胞の増殖も不良となることが示唆される。なお、NK 細胞は容器底面やバッグ内面に接着して増殖するため、培養途中の剥離操作は増殖に影響する可能性があり、今回は、増殖曲線の評価は行っていない。

培養 NK 細胞の細胞傷害活性試験では、K562 細胞株に対し、E/T:1 でも 60 % 以上、E/T:4 においては、ほぼ 100%の細胞を殺傷する強い活性が示された。

培養 NK 細胞の、乳がん細胞株 MCF-7 に対する細胞傷害活性は、培養前の CD3 陰性細胞より有意に高くなっており、培養によって、NK 細胞は増殖かつ活性化も受けたことが示唆された。これは、培養後 NK 細胞では NK 活性化マーカーが上昇し、高い値を示していたこととも合致する。

Her2 陽性細胞株である MCF-7 に対するトラスツズマブ依存性細胞傷害活性試験でも、やはり培養前 CD3 陰性より培養後 NK 細胞で有意に活性が上昇していた。培養後のトラスツズマブ依存性細胞傷害活性は、E/T:8 において 80%を超しており、培養 NK 細胞療法とトラスツズマブとの併用治療の可能性につながることを期待される。NIH のグループも、ボルテゾミブ（プロテアゾーム阻害薬）存在下で、白血病細胞株である K562 に対する、NK 細胞の細胞傷害活性が上昇することを報告し[25]、NK 細胞療法と分子標的薬の併用療法の可能性を示している。

さらに、乳がん細胞の Her2/neu 発現と NK 細胞の細胞傷害活性との関連について、4 種の乳がん細胞、MDA-MB-231、MCF-7、BT-474 ならびに SK-BB-3 を用いて検討したところ、細胞傷害活性の強さは、Her2/neu の発現強度とほぼ相関していた。よって、トラスツズマブ併用の NK 細胞療法が実際に臨床応用可能となった場合には、HER2/neu 高発現腫瘍に対し、より有効である可能性が高い。

次に、トラスツズマブ効果の増強について、遺伝子治療法的アプローチからの検討を行った。

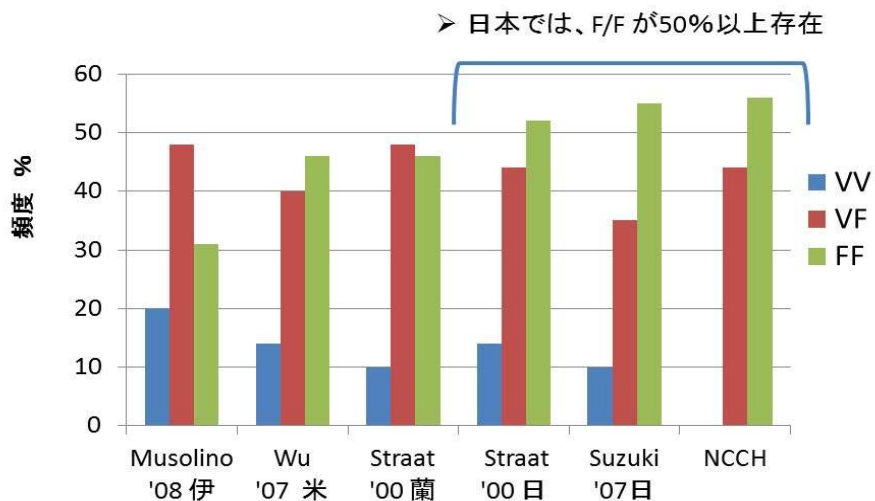
NK 細胞表面に発現する Fc 受容体の一つ、FCGR3A には遺伝子多型が存在し、これが、トラスツズマブに対する反応性の差に関係する。FCGR3A は、第 819 番塩基の一塩基多型 (a/t) に起因するアミノ酸置換 (158V/F) の結果、V 型ならびに F 型の二種類の表現型を持つ[17]。V 型 FCGR3A は、トラスツズマブの Fc 領域に高い親和性を有し、ADCC 活性の増強につながる。一方、F 型 FCGR3A はトラスツズマブ Fc 領域に対して親和性が低く、ADCC も低い[28]。この FCGR3A の遺伝子多型は、トラスツズマブ治療の臨床効果と相関し、低親和性 F 型 FCGR3A の患者は、トラスツズマブ治療に反応が低いことが報告されている[14, 17]。

この低親和性 F 型 FCGR3A を持つことが原因となって、トラスツズマブ治療に対する反応性が低い患者に対する治療法の開発が進められている。その一つが、抗体の Fc 領域の糖鎖からフコースを除去する defucosilation（脱フコシル化）技術の開発であり[29]、この脱フコシル化技術によって、トラスツズマブと NK 細胞間の結合を増強させ、トラスツズマブを介した細胞傷害活性を増強させることが可能となった。しかし、低親和性 F 型 FCGR3A 患者に対するトラスツズマブの臨床効果改善にまでは至っていない[30]。

そこで、トラスツズマブの効果を向上させるための新たなアプローチとして、低親和性 F 型 FCGR3A 患者の NK 細胞に、V 型 FCGR3A 遺伝子を導入して行う遺伝子細胞治療の可能性について検討した。

まず、複数の健常ボランティア PBMC を用いて、シーケンスと Her2 陽性乳がん細胞株 MCF-7 に対するトラスツズマブ依存性細胞傷害活性を評価した結果、V/F 型ボランティア由来 PBMC のトラスツズマブ依存性細胞傷害活性は、F/F 型ボランティア由来 PBMC よりも高かった。11 人のシーケンシングの結果は、V/F 型が 5 人と F/F 型が 6 人であり、V/V 型は見られなかった。、これまでの報告を図 10 に示すように、日本では F/F 型の頻度が高い傾向にあり、実際にこの遺伝子細胞治療が実現すれば、国内での有用性は大きいと考えられる。

# FCGR3A遺伝子多型の頻度



|          |   |      | FCGR3A多型頻度(%) |     |     | アリル頻度 |      |
|----------|---|------|---------------|-----|-----|-------|------|
|          |   |      | V/V           | V/F | F/F | V     | F    |
| Musolino | 伊 | 2008 | 20            | 48  | 31  | 0.14  | 0.86 |
| Wu       | 米 | 2007 | 14            | 40  | 46  | 0.34  | 0.66 |
| Straat   | 蘭 | 2000 | 10            | 48  | 42  | 0.34  | 0.66 |
| Straat   | 日 | 2000 | 4             | 44  | 52  | 0.26  | 0.74 |
| Suzuki   | 日 | 2007 | 10            | 35  | 55  | 0.32  | 0.68 |
| NCC      | 日 | 2009 | 0             | 45  | 55  | 0.26  | 0.74 |

図 18 FCGR3A 遺伝子多型のこれまでの報告[14] [15] [30] [31]

日本では欧米に比して F/F 型が多い。

そこで、V/F 型ボランティア由来 PBMC から V 型 FCGR3A 遺伝子をクローニングし、組換えレトロウイルスを作製して、F/F 型ボランティアの NK 細胞への導入を行った。

レトロネクチンを用いた遺伝子導入の結果、マーカー遺伝子 LNGFR の発現

率は 73%であり、高い導入効率を示すことができたといえる。しかし、トラスツズマブ依存性細胞傷害活性の評価においては、遺伝子導入の過程でも細胞の活性化が起こるため、非導入細胞でも細胞傷害活性が上昇し、遺伝子導入による差を検出するには至らなかった。今後、導入に伴うトラスツズマブ依存性細胞傷害活性上昇を検出する実験条件の確立が課題となる。

また、FCGR3A (CD16) の V 型と F 型を見分ける方法を確立し、導入後の F 型 NK 細胞で V 型 FCGR3A が発現していることを確認する必要もある。V 型と F 型の差を認識する抗体を用いたフローサイトメトリーによる確認法が報告されており [32]、今後検討を行う予定である。

本研究においては、トラスツズマブの効果を増強させる新規的治療法の開発について、乳がん細胞をモデルに検討した。

NK 細胞療法の開発においては、新規培地と閉鎖系バッグシステムによって、NK 細胞の純度が高く、安全な培養法が確立され、かつ、この方法により培養された NK 細胞は、Her2/new 陽性細胞株に対し、高い細胞傷害活性を示しており、今後の臨床応用が期待される。また、高いトラスツズマブ依存性細胞傷害活性も示され、トラスツズマブと NK 細胞療法併用の効果に期待が繋がる

また、トラスツズマブと乳がんの組み合わせだけでなく、B 細胞リンパ腫とリツキシマブ抗体の組み合わせでも、同様の細胞傷害活性増強効果が得られる

ことが報告され[33]、我々もこれを確認している。今後、その他の抗体についても、本研究で得られた知見が応用されることが期待される。

NK 細胞療法の臨床応用化に向け、現在、担がん患者の PBMC を用いた培養の可能性の検討を進めている。

F 型 FCGR3A 発現を原因としてトラスツズマブへの反応性が低い患者に対する治療法として発案した遺伝子治療においては、現在のところ、遺伝子導入による抗腫瘍効果の増強は示せておらず、さらなる検討が必要である。しかし、遺伝子導入があまり行われることのなかった NK 細胞に対して、高い効率での導入可能性を示せたことについては、NK 細胞を用いた今後の遺伝子治療に対し、期待を広げたものと考えられる。

## 参考文献

1. Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M., Mackey, J., Glaspy, J., Chan, A., Pawlicki, M., Pinter, T., Valero, V., Liu, M. C., Sauter, G., von Minckwitz, G., Visco, F., Bee, V., Buyse, M., Bendahmane, B., Tabah-Fisch, I., Lindsay, M. A., Riva, A., and Crown, J., Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer, *N Engl J Med*, *365*, 1273 (2011).
2. Vogel, C. L., Cobleigh, M. A., Tripathy, D., Gutheil, J. C., Harris, L. N., Fehrenbacher, L., Slamon, D. J., Murphy, M., Novotny, W. F., Burchmore, M., Shak, S., and Stewart, S. J., First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer, *Oncology*, *61 Suppl 2*, 37 (2001).
3. Weiner, L. M., and Adams, G. P., New approaches to antibody therapy, *Oncogene*, *19*, 6144 (2000).
4. Robertson, M. J., and Ritz, J., Biology and clinical relevance of human natural killer cells, *Blood*, *76*, 2421 (1990).
5. Papamichail, M., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., and Baxevanis, C. N., Natural killer lymphocytes: biology, development, and function, *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, *53*, 176 (2004).
6. Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N. L., Faust, J., Rumpold, H., Kraft, D., and Lanier, L. L., The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies, *J Immunol*, *133*, 180 (1984).
7. Mandelboim, O., Malik, P., Davis, D. M., Jo, C. H., Boyson, J. E., and Strominger, J. L., Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*, 5640 (1999).
8. Albanell, J., Codony, J., Rovira, A., Mellado, B., and Gascon, P., Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4, *Adv Exp Med Biol*, *532*, 253 (2003).
9. Morgan, D. A., Ruscetti, F. W., and Gallo, R., Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows, *Science*, *193*, 1007 (1976).
10. Somanchi, S. S., Senyukov, V. V., Denman, C. J., and Lee, D. A., Expansion, purification, and functional assessment of human peripheral blood NK cells, *J Vis Exp* (2011).
11. Berg, M., and Childs, R., Ex-vivo expansion of NK cells: what is the priority--high yield or high purity?, *Cytotherapy*, *12*, 969 (2010).
12. Berg, M., Lundqvist, A., McCoy, P., Samsel, L., Fan, Y., Tawab, A., and Childs, R., Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against

- tumor cells, *Cytotherapy*, *11*, 341 (2009).
13. Igarashi, T., Wynberg, J., Srinivasan, R., Becknel, B., McCoy, J. P., Takahashi, Y., Suffredini, D. A., Linehan, W. M., Caligiuri, M. A., and Childs, R. W., Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells, *Blood*, *104*, 170 (2004).
  14. Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T. M., and Ardizzoni, A., Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer, *J Clin Oncol*, *26*, 1789 (2008).
  15. Wu, J., Edberg, J. C., Redecha, P. B., Bansal, V., Guyre, P. M., Coleman, K., Salmon, J. E., and Kimberly, R. P., A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease, *J Clin Invest*, *100*, 1059 (1997).
  16. Peter Sondermann, R. H., Vaughan Oosthuizen and Uwe Jacob, The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment–FcRIII complex, *Nature*, *406* (2000).
  17. Beano, A., Signorino, E., Evangelista, A., Brusa, D., Mistrangelo, M., Polimeni, M. A., Spadi, R., Donadio, M., Ciuffreda, L., and Matera, L., Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients, *Journal of translational medicine*, *6*, 25 (2008).
  18. Wang, X. M., Terasaki, P. I., Rankin, G. W., Jr., Chia, D., Zhong, H. P., and Hardy, S., A new microcellular cytotoxicity test based on calcein AM release, *Hum Immunol*, *37*, 264 (1993).
  19. Molina, M. A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J., and Baselga, J., Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells, *Cancer Res*, *61*, 4744 (2001).
  20. Hudis, C. A., Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice, *N Engl J Med*, *357*, 39 (2007).
  21. Cuello, M., Ettenberg, S. A., Clark, A. S., Keane, M. M., Posner, R. H., Nau, M. M., Dennis, P. A., and Lipkowitz, S., Down-regulation of the erbB-2 receptor by trastuzumab (herceptin) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines that overexpress erbB-2, *Cancer research*, *61*, 4892 (2001).
  22. Sutlu, T., and Alici, E., Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects, *J Intern Med*, *266*, 154 (2009).
  23. Miller, J. S., Verfaillie, C., and McGlave, P., Expansion and activation of human natural killer cells as therapy for autologous transplantation, *Prog Clin Biol Res*,



- 389, 39 (1994).
24. Cho, D., Shook, D. R., Shimasaki, N., Chang, Y.-H., Fujisaki, H., and Campana, D., Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *16*, 3901 (2010).
  25. Lundqvist, A., Berg, M., Smith, A., and Childs, R. W., Bortezomib Treatment to Potentiate the Anti-tumor Immunity of Ex-vivo Expanded Adoptively Infused Autologous Natural Killer Cells, *J Cancer*, *2*, 383 (2011).
  26. Imai, C., Iwamoto, S., and Campana, D., Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells, *Blood*, *106*, 376 (2005).
  27. Berg, M., Lundqvist, A., McCoy, P., Jr., Samsel, L., Fan, Y., Tawab, A., and Childs, R., Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells, *Cytotherapy*, *11*, 341 (2009).
  28. Koene, H. R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A. E., and de Haas, M., Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype, *Blood*, *90*, 1109 (1997).
  29. Okazaki, A., Shoji-Hosaka, E., Nakamura, K., Wakitani, M., Uchida, K., Kakita, S., Tsumoto, K., Kumagai, I., and Shitara, K., Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and Fc gammaRIIIa, *J Mol Biol*, *336*, 1239 (2004).
  30. Suzuki, E., Niwa, R., Saji, S., Muta, M., Hirose, M., Iida, S., Shiotsu, Y., Satoh, M., Shitara, K., Kondo, M., and Toi, M., A nonfucosylated anti-HER2 antibody augments antibody-dependent cellular cytotoxicity in breast cancer patients, *Clin Cancer Res*, *13*, 1875 (2007).
  31. Leppers-van de Straat, F. G., van der Pol, W. L., Jansen, M. D., Sugita, N., Yoshie, H., Kobayashi, T., and van de Winkel, J. G., A novel PCR-based method for direct Fc gamma receptor IIIa (CD16) allotyping, *J Immunol Methods*, *242*, 127 (2000).
  32. Bottcher, S., Ritgen, M., Bruggemann, M., Raff, T., Luschen, S., Humpe, A., Kneba, M., and Pott, C., Flow cytometric assay for determination of Fc gammaRIIIA-158 V/F polymorphism, *J Immunol Methods*, *306*, 128 (2005).
  33. Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., Watier, H., and Thibault, G., Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship, *Cancer Res*, *64*, 4664 (2004).

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科消化管外科学 瀬戸泰之教授、ならびに代謝内分泌外科学 小川利久准教授に深甚なる感謝の意を表します。

実際の研究遂行にあたっては、始終直接のご高配とご指導を賜りました国立がん研究センター中央病院幹細胞移植科 平家勇司医長に心より深い御礼を申し上げます。

有益なご教示を賜りました東京大学大学院医学系研究科消化管外科学・代謝栄養内分泌外科学の皆様、ならびに、日々の研究生活に多大なるご協力を頂きました国立がん研究センター中央病院幹細胞移植科の皆様に深く感謝いたします。

また、東京大学大学院ならびに国立がん研究センター以外の皆様方からも多くのあたたかいご支援をいただきました。心より深い御礼を申し上げます。支えていただいた皆様方、本当にありがとうございました。