



# Inhibition of natural killer cytotoxicity in vitro by clinicalgrade serine protease inhibitors

山本, 光輝

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-07-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2892

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002892>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 6 5 】

氏 名・（本 籍） 山本 光輝 （ 兵庫県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博ろ第1982号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年7月12日

【 学位論文題目 】

Inhibition of natural killer cytotoxicity in vitro by clinical  
grade serine protease inhibitors

（臨床応用されているセリンプロテアーゼ阻害剤による  
in vitro でのナチュラルキラー（NK）細胞の細胞障害活性阻害）

審 査 委 員

主 査 教 授 横野 浩一

教 授 松尾 雅文

教 授 林 祥剛

## 【はじめに】

重篤な輸血副作用の一つである輸血後移植片対宿主病(PT-GVHD)は、発症すればほぼ100%死に至る病態であるが、幸いにも今日では血液製剤への放射線照射によりほとんどが予防できるようになっている。しかしながら移植医療のめざましい進歩の中で、移植臓器中の残存リンパ球による本症の発症や、超緊急時の輸血療法による併発などの可能性も否定できず、今日も発症時の対策について十分な検討を要するものと考えられる。Nishimuraらはin vitroの検討である種の蛋白分解酵素剤(Nafamostat mesilate、フサン)が細胞障害性Tリンパ球の活性化を制御する可能性のあることを報告した。その後我々は食道がん術後に本症を発症した症例を経験し、治療にフサンの使用を試みたところ一過性であったものの臨床効果を確認した。今後の対策のひとつとして蛋白分解酵素阻害剤は臨床的に意義があるのではないかと期待されるが臨床応用可能な薬剤では殆ど研究されていない。

## 【目的】

私達はフサン等のリンパ球の機能に対する効果について検討することを目的とし、CTLと同様なperforin-granzyme系やFas-FasL系を介して殺細胞効果を示すと考えられるNK細胞を用いて臨床応用可能な蛋白分解酵素阻害剤を用いて細胞傷害抑制を試みる実験をin vitroで行った。

## 【材料および方法】

### 1・効果細胞の準備

新鮮ヒト末梢血から単球を除去後リンパ球分離液にて単核球(MNCs)を分離した。この細胞を効果細胞とし5%FBS添加Hanks' Balanced salt Solution/without phenol red(HBSSF)中に浮遊させた。またMNCsにIL-2を2ng/mlに加えてCO<sub>2</sub>培養器内において4日間培養したものをLymphokine activated killer(LAK) cellとして用いた。

### 2・標的細胞の準備

K-562、Raji、HL-60、CMKを10%FBS添加RPMI1640で培養し標的細胞として用いた。

### 3・細胞障害試験

#### <Calcein-AMを用いた殺細胞効果の測定>

標的細胞をHBSSFに1~3×10<sup>6</sup>個/mlに浮遊させ、37℃で30分間、25μMの生細胞染色蛍光色素剤Calcein-AMと培養標識した。その後細胞数を1.5×10<sup>5</sup>/mlに調整してHBSSF

中に再浮遊させた。96穴丸底プレートに、自然溶解としてHBSSFを、障害活性の測定に効果細胞を、最大溶解指数に1%TritonX-100を、それぞれ100μlずつ、triplicateで分注した。この各wellに標的細胞を同100μlずつ添加し、CO<sub>2</sub>培養器内で3時間培養後、その浮遊液を採取し、放出された蛍光色素をFuluroscan(フィルター485/538nm)で蛍光量を測定し細胞障害度を算出した。

また上記のMNCsを用いて<sup>51</sup>Cr release assayを既存の方法によりE:T比20:1で測定しCacein-AM assayと比較した。

#### <カルシウム依存性の検討>

Ca<sup>2+</sup>依存性の検討にはCaキレート剤EGTA 2mMとMgCl<sub>2</sub> 2mMを各wellに添加し殺細胞効果を測定した。

#### <Perforin および Fas の関与に関する検討>

Perforin 阻害剤[concanamycinA(CMA)]、Fas 依存性細胞障害阻害剤[brefeldinA(BFA)]を用いて検討した。効果細胞にCMA20nM、BFA10μMをそれぞれ、あるいは混合して2時間preincubateしてから上記の細胞障害試験を行った。

#### <蛋白分解酵素阻害剤の効果の検討>

標的細胞のK-562とRaji細胞を添加する直前に蛋白分解酵素阻害剤[Nafamostat Mesilate(フサン)、Urinastatin(ミラクリッド)、Gabexate Mesilate(FOY)、anti-thrombin III(AT-III)]の4種をそれぞれHBSSFに溶解し添加し細胞障害試験に及ぼす効果について検討した。

## 【結果】

(1) Calcein-AMによるNK細胞とLAK細胞の殺細胞効果は測定可能であり、従来の<sup>51</sup>Cr release assayと有意な相関(r<sup>2</sup>=0.8781)を示した。

(2) NK細胞が引き起こす殺細胞効果はCa<sup>2+</sup>依存性であり、CMAでおおよそ90%抑制する事が出来た。一方、BFAでの抑制は僅かであった。同時にK562、Raji細胞は共にFas(CD95)陰性であり、K562に対するNK細胞の殺細胞効果はCa<sup>2+</sup>依存性のperforinによって引き起こされるものが殆どと思われた。

(3) 50μg/mLのnafamostat mesilateにおいてNK細胞による殺細胞効果は、ET比10:1では最大約65%、20:1では47%、40:1で27%活性の抑制がみられた。Urinastatinにおいては最大約55%抑制。しかしgabexate mesilate、AT-IIIでは抑制は起きなかった。

(4) LAK細胞によるK562に対する細胞障害は、刺激しないものに比べて約1.5倍の活性があり、Raji細胞に対してもET比10:1で約15%の細胞障害を示した。またLAK活性も20nMのCMAで約90%抑制された。前述の蛋白分解酵素阻害剤ではK562、Rajiに対する細胞障害性はいずれも抑制されなかった。

【考察】

Nafamostat Mesilate（フサン）は他の蛋白分解酵素阻害剤に比べて補体抑制作用が最も強く、NK 細胞による殺細胞効果は大半が perforin 依存性であり、perforin と補体蛋白 C6,C7,C8 $\alpha$ ,C8 $\beta$ ,C9 は相同性を示すので、フサンが補体同様に perforin を抑制しNK細胞の細胞傷害活性を抑えるものと考えられる。そしてLAK細胞を抑制出来ないのは、FasL やTNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 等のサイトカインで障害を起こしている可能性があるが今回の実験からは確認できなかった。

NK/Tリンパ腫は aggressive で組織壊死の強い厄介な腫瘍であるが、これらの細胞が perforin-granzyme、Fas ligand を発現しており、perforin を抑えるフサンがNK/Tリンパ腫に対する補助的な薬剤としても検討する価値があると思われる。

一方これらの薬剤を使用する際には、免疫抑制効果に伴う感染症、腫瘍の増殖、その他の副作用についても考慮する必要があるが今のところ大きな報告はない。

【結論】

細胞障害試験を用いヒトに投与可能な蛋白分解酵素阻害剤の効果を NK 細胞で検討した結果、有効血中濃度で Nafamostat Mesilate（フサン）あるいは Urinastatin（ミラクリッド）では細胞障害活性を抑制する可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第1985号	氏 名	山本 光輝
論文題目 Title of Dissertation	Inhibition of natural killer cytotoxicity <i>in vitro</i> by clinical grade serine protease inhibitors 臨床応用されているセリンプロテアーゼ阻害剤による <i>in vitro</i> でのナチュラルキラー（NK）細胞の細胞障害活性阻害		
審査委員 Examiner	主 査 権野 浩一 Chief Examiner 副 査 松尾 雅文 Vice-examiner 副 査 坪 祥剛 Vice-examiner		
審査終了日	平成18年 6 月 21 日		

（要旨は1, 000字～2, 000字程度）

## 論文審査の結果の要旨

放射線照射により輸血後移植片対宿主病（GVHD）の多くが予防可能となってきたが、緊急時輸血や骨髄移植などの臓器移植において、残存リンパ球によるGVHDの併発は現在も大きい問題である。Ryoらは食道ガン術後に本症を発症した症例に対し、蛋白分解酵素阻害剤（Nafamostat Mesilate＝NM、フサン）を使用し治療効果を得ている。その機序としてNishimuraらは、in vitroでNMが細胞障害性Tリンパ球の活性化を制御する可能性を報告している。このようなことからNMなどの蛋白分解酵素はGVHD対策の一つとして期待されるが、臨床応用可能な蛋白分解酵素阻害剤ではその機序や効果が殆ど研究されていない。そこで申請者はNM等が及ぼすリンパ球の機能に対する効果についての検討を目的とし、CTLと同じperforin-granzyme系で殺細胞効果を示すNK細胞を用いて臨床応用可能な薬剤による細胞傷害活性の影響を検討した。

種々のヒト白血病由来細胞株（K-562、Raji、HL-60、CMK）を標的細胞とした。ヒト末梢血から単球を除去後リンパ球分離液で分離した単核球（MNCs）からCD56陽性細胞を分離し得たNK細胞と、MNCsにIL-2を加えて培養したLymphokine activated killer（LAK）を効果細胞として、細胞障害作用を検討した。細胞障害試験は標的細胞を生細胞染色蛍光色素剤Calcein-AMで標識後、96穴プレートに分注し、効果細胞を添加し、蛍光色素の放出をFuluoroscanで測定し算出した。NM（フサン）とUlinastatin（ミラクリッド）、Gabexate Mesilate（FOY）、antithrombin（ノイアート）の4種類の蛋白分解酵素阻害剤を細胞障害試験の培養液に加え、細胞障害活性に及ぼす影響を検討した。

まずCalcein-AMによるNK、LAKの細胞障害活性の妥当性を確認した。標準法である<sup>51</sup>Cr release assayと有意な相関（ $r^2=0.8781$ ）を示し、感度も十分であることを確認した。K562、Raji細胞は共にFas（CD95）陰性であり、Caキレート剤EGTAの添加により抑制されたため、これらの殺細胞効果はCa<sup>2+</sup>依存性のperforinによ

って引き起こされるものと思われた。そこでこの系にPerforin阻害剤concanamycinA（CMA）およびFas依存性細胞障害阻害剤brefeldinA（BFA）を加えたところ、K562に対する細胞障害作用はCMAにより90%抑制されたため、その殺細胞効果はperforinを介したNK活性であることが確認された。

次に各種蛋白分解酵素阻害剤の、NK細胞による殺細胞効果への影響を検討した。高濃度NMはNK細胞を65%抑制し、Ulinastatinも55%抑制した。しかしながら、FOYやantithrombinには抑制効果は認められなかった。一方、LAK細胞を効果細胞としたK562に対する細胞障害は、非誘導に比べ1.5倍の活性があり、このLAK活性もCMA添加により90%抑制されたが、前述の4種の蛋白分解酵素阻害剤はいずれもこのLAK活性に対しては抑制を示さなかった。

4種の蛋白分解酵素阻害剤の中でNMは、他の蛋白分解酵素阻害剤に比べて抗補体作用が強いことが知られている。Perforinは補体蛋白C6～C9と相同性を示すことから、NMはperforinの酵素活性を阻害することによりNK細胞傷害を抑制したものと考えられる。一方LAK活性がNMにより抑制されなかったのは、TNF- $\alpha$ やINF- $\gamma$ 等のサイトカインにより細胞障害がもたらされるためと推察される。GVHDにおいては、NK細胞やキラーT細胞が重要な役割を有することから、NMによる治療効果が期待される。またNK/Tリンパ腫はaggressiveで強い組織壊死を起こすことが知られているが、この細胞はperforin-granzymeとFasLを発現しているため、NMはこの疾病に対する補助的な治療薬剤としても期待される。

本研究は、蛋白分解酵素阻害剤であるNafamostat Mesilate（フサン）がperforinを介したNK細胞活性を抑制することを初めて明らかにしたものであり、GVHDの治療を考える上で重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって、本研究は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。