

奨励金No.1634

記憶細胞分化とがん免疫の抑制因子を標的とした 次世代 CAR NK 細胞の基盤技術の開発

鍋倉 宰

愛知県がんセンター 研究所 腫瘍免疫応答研究分野 分野長

Development of next-generation CAR NK cell therapy targeting memory cell differentiation and a suppressive factor in cancer immunity

Tsukasa Nabekura

Aichi Cancer Center Research Institute, Division of Immune Response, Chief



がん免疫療法の奏効率は未だ限定的である。現行の T 細胞賦活化を基軸とする免疫療法に対し、がんは HLA の低下により抵抗性を獲得する。ナチュラルキラー（NK）細胞はこれらのがんを傷害する事で、がん免疫に必須の役割を果たす。しかし、NK 細胞賦活化法は確立されていない。本研究では、NK 細胞の抑制因子を標的とし、細胞機能を増強したキメラ抗原受容体（CAR）NK 細胞を開発を目的とする。腫瘍モデルにて当該 NK 細胞の有効性を検証し、機能強化の分子機構を解明する事で、次世代 NK 細胞療法の基盤構築を目指す。

The efficacy of cancer immunotherapy remains limited. Current immunotherapies are modalities to activate T cells; however, tumors acquire the treatment resistance through reduced HLA expression. Although natural killer (NK) cells play an essential role in cancer immunity by killing these tumor cells, any strategy to unleash NK cell activity has not been established. The objective of this study is to develop chimeric antigen receptor (CAR) NK cells with enhanced cellular functions by targeting inhibitory factors of memory differentiation and anti-tumor activity. By verifying their efficacy in tumor models and elucidating the molecular mechanisms underlying this functional enhancement, we aim to establish the foundation for next-generation NK cell therapy.

1. 研究内容

1.1. 背景

がんは本邦の死因の第 1 位である。免疫療法はがんに対する治療法としての地位を確立したが、その奏効率は未だ限定的である。現行の免疫療法は T 細胞がん免疫の賦活化法であるが、がん細胞は HLA クラス I の低下により治療抵抗性を獲得する。ナチュラルキラー（NK）細胞はこれらのがんを多様な NK 受容体で認識し、細胞傷害活性を示して排除する事で、がん免疫に必要不可欠な役割を果たす。従って、NK 細胞の賦活化法は次世代のがん免疫療法の開発に有用である。しかしな

がら現在まで、難治がんに対して治療効果の高い NK 細胞療法は確立されていない。近年、がんに対する新たな免疫療法として、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する他家 NK 細胞を用いた治療法が注目されている。B 細胞リンパ腫に対する他家臍帯血由来 CAR NK 細胞の臨床試験において、その有効性と安全性が確認されている。しかしながら、再発・難治性 B 細胞リンパ腫に対しては、依然として治療効果が十分ではない。その原因の一つとして、NK 細胞の生存能、及び増殖能の乏しさが挙げられる。

NK 細胞は短寿命であるが、至適環境下で活性

化 NK 受容体シグナルを受け分化した記憶 NK 細胞は、長期生存能と強い傷害活性を有する。これまでに研究代表者は、記憶 NK 細胞分化の制御分子機構の研究に従事し、記憶 NK 細胞が強力な抗がん活性を持つ事を明らかにした。また、記憶 NK 細胞の分化と機能の制御に関わる分子を複数同定してきた。

本研究課題では、これら CAR NK 細胞の欠点を克服する目的で、至適条件下で CAR NK 細胞を人為的に記憶 NK 細胞に分化させ、生存率・増殖能・細胞傷害活性の向上を図る事を目的とした。

1.2. 方法

ヒト臍帯血、或いは末梢血由来の NK 細胞に、レトロウイルスベクターを用いて抗ヒト CD19 CAR を導入し、ヒト B 細胞性腫瘍に対する CAR NK 細胞を調整する。この時、初代培養ヒト NK 細胞における高効率の CAR の遺伝子導入、並びに過剰発現による機能増強の為、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入法の最適化を実施する。また、ゲノム編集を用いた遺伝子改変条件の最適化を実施する。加えて、人為的な記憶 NK 細胞の誘導を目的とし、NK 細胞を刺激・増殖・記憶 NK 細胞分化させる為の共培養フィーダー細胞の開発に取り組む。更に、当該共培養系において、NK 細胞の記憶細胞分化の為に至適な活性化 NK 受容体刺激、並びにサイトカインの組み合わせ（インターロイキン（IL）2・IL-12・IL-15・IL-18・インターフェロン（IFN） β 等）を検討し、NK 細胞の活性化・分化・細胞増殖・記憶 NK 細胞分化等を評価する。また、CAR NK 細胞の細胞機能の評価として、細胞傷害活性と IFN- γ 産生（エフェクター機能）・活性化・成熟・細胞周期・細胞死等の変化をフローサイトメトリーと RNA-seq により解析する。更に、*in vitro* において CD19 陽性 B 細胞性腫瘍株 Raji に対するエフェクター機能の評価する。

1.3. 結果

レトロウイルスベクターのエンベロープタンパク質・ウイルス粒子の濃縮法・細胞培養培地の組成・細胞密度・遺伝子導入のタイミング・NK 細胞の培養法等を最適化する事により、初代培養ヒト臍帯血・末梢血由来 NK 細胞に対し、90%以上の効率で CAR を遺伝子導入する手法を確立した。更に、磁気ビーズを用いる事で CAR を高発現する NK 細胞集団を高純度で単離する方法を樹立した。CAR 未導入の NK 細胞と比較し、上記方法で得られた CAR NK 細胞は、NK 細胞傷害活性に抵抗性を示す CAR 認識抗原陽性腫瘍細胞株に対して *in vitro* で強い細胞傷害活性と顕著な IFN- γ 産生を示した。現在、ヒト腫瘍細胞株を移植した遺伝子改変免疫不全マウスに初代培養ヒト NK 細胞を移入する腫瘍治療マウスモデルにおいて、これら CAR NK 細胞のがん治療効果の評価を進めている。

これら CAR NK 細胞を *in vitro* で人為的に記憶 NK 細胞に分化させる為、ゲノム編集によって記憶 NK 細胞の分化と機能の抑制因子のノックダウンを試みた。現在までに、電気穿孔法によるゲノム編集により、初代培養ヒト NK 細胞において標的抑制遺伝子をノックダウンする材料・条件を確立した。また、CAR NK 細胞を記憶 NK 細胞に分化させる目的で、NK 細胞の活性化と増殖を促進するフィーダー細胞の作製を試みた。NK 細胞傷害感受性が高いヒト白血病細胞株 K562 を親株とし、腫瘍壊死因子受容体ファミリー CD137 リガンド 4-1BBL・膜結合型 IL-21・活性化 NK 受容体 DNAM-1 リガンド CD155 の全て強発現するフィーダー細胞株を複数種類樹立した。更に、ヒト記憶 NK 細胞分化に必要な不可欠とされる活性化 NK 受容体 NKG2C を刺激する目的で、サイトメガロウイルス由来刺激性ペプチドをリンカーで結合した HLA-E を NKG2C リガンドとして細胞表面に発現する様、上記フィーダー細胞に遺伝子改変を施した。現在、当該フィーダー細胞を用いた

CAR NK 細胞との共培養において、最適なサイトカインの組み合わせと濃度を最適化する事により、効率的な記憶 NK 細胞分化誘導法を確立する計画である。

1.4. 考察

今後、上記手法で調整した CAR NK 細胞の免疫学的表現型解析をフローサイトメトリーによって解析すると共に、RNA シークエンス解析による網羅的遺伝子発現とバイオインフォマティクス的手法により、記憶 NK 細胞分化や機能変化を解析する。また、*in vitro* 及び免疫不全マウスへの移入後のこれら CAR NK 細胞の生存能と増殖能の評価、並びに CAR 認識抗原陽性腫瘍細胞（B リンパ腫細胞株、及び B 細胞リンパ腫患者由来腫瘍細胞）に対する細胞傷害活性と IFN- γ 産生能等を評価する事で、CAR NK 細胞の記憶 NK 細胞分化の機能的変化を評価する。更に、上記腫瘍治療マウスモデルを用い、従来型 CAR NK 細胞と人為的記憶分化型 CAR NK 細胞のがん治療効果を比較する事で、従来の CAR NK 細胞に対する技術的優位性を検証する。

2. 発表（研究成果の発表）

なし