

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14634

研究課題名(和文)好中球を用いた遺伝子導入の基礎的検討

研究課題名(英文)gene introduction using myeloid lineage cells

研究代表者

白藤 尚毅 (Shirafuji, Naoki)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00206301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトCD47遺伝子に対するアンチセンスRNA並びにmiRNAを発現するシャトルベクターを構築した。ヒト正常骨髄由来単核球層を用い、CD13、CD33陽性骨髄芽球分画をmagnet beadで選別し、構築したウイルスベクターを遺伝子導入後human granulocyte colony-stimulating factor を添加後培養し、好中球へ分化、増殖させた。得られた好中球には導入したshuttle vectorが確認され抗腫瘍効果も増強した。

研究成果の概要(英文)：We constructed shuttle vector that expressed antisense nad miRNA RNA for human CD47. This vector was introduced into CD13 and CD33-positive bone marrow mononuclear cell fractions which was isolated with magnetic beads. The positive cell-fraction was cultured with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. The obtained mature neutrophilic granulocytes expressed anti CD47 antisense RNA and miRNA. Biological antitumor effects were also elevated.

研究分野：造血幹細胞

キーワード：CD34 CD47 造血幹細胞 遺伝子導入

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子導入による細胞の形質転換はレトロウイルスやプラスミドなどを用いて行われている。しかし臨床応用に関しては種々の問題がある。特にレトロウイルスを用いた場合、改変がされているものの integration site に特異性がまだ乏しく、正常な転写への影響があり一部では癌化が懸念されている。臨床への応用を考える点で新しい遺伝子導入の方法に関する開発が待たれている。その点で遺伝子導入された細胞が残存して癌化することを防ぐ研究も価値があると思われる。好中球は半減期 10 時間で体内において apoptosis するため長期にわたる遺伝子導入の副作用を認めることは無い。細胞自体も DNase, RNase, protease が豊富で、導入遺伝子は細胞死に呼応し消化を受けると考えられる。

悪性腫瘍に対する治療として、現在 CAR-T 細胞を用いた特異的免疫療法が脚光を浴びている。一方、抗腫瘍作用として貪食細胞による悪性細胞の消化も今後有力な可能性を期待できる治療法の一つである。CD47 及びその情報伝達系は「don't eat me signal」とも称され、生理的な細胞における自己認識シグナルの重要な一つと位置付けされており、その発現低下は血球貪食症候群で報告がある。米国スタンフォード大学 Weissman らは CD47 をターゲットとした遺伝子治療を *in vivo* non-obese diabetic/severe combined immune deficiency (NOD/SCID) mouse を用いてリンパ腫や白血病に対して報告している。しかしこの系ではヒト CD47 抗体をマウスに対して用いており、ヒトの系でどのようにその合併症があるのかが未知数である。CD47 は恒常的に非常に多くの細胞で発現しており、その自己認識を低下させる抗体を用いた治療は血球貪食症候群などの危険性を伴う。抗腫瘍効果の増強効果として特

異的に腫瘍細胞における CD47 の発現を低下させる研究が必須である。

### 2. 研究の目的

好中球を用いた遺伝子治療の基礎的な研究を目的として 2 年間の挑戦的萌芽へ公募する。半減期が短く、細胞膜が脆弱で遺伝子導入や操作が煩雑な成熟好中球ではなく、骨髄芽球を用いて遺伝子の操作を行い、その後 recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) を用いて *in vitro* で増殖、分化させてから腫瘍に対する特異的細胞療法を行う。標的となる腫瘍細胞は CD19 陽性並びに CD20 陽性 B 細胞性腫瘍を選択し、それぞれ CD19Ab, CD20Ab 添加またはその細胞膜貫通型抗体発現 vector を導入し、好中球の接着に特異性を誘導する。また、好中球に CD47 に対する antisense RNA 発現 shuttle vector や 3' non-coding region に特異的な miRNA 発現 shuttle vector を遺伝子導入し、CD47 分子の発現抑制による貪食能の亢進を観察する。positive control として、報告されている CD19 陽性細胞に対する CAR-T 細胞を設置、比較することでその抗腫瘍効果を検討する。*In vitro* において好中球を vehicle として用いた群で腫瘍細胞特異的な接着、並びに貪食能の亢進、抗腫瘍効果が確認された後、NOD/SCID mouse を用いて担癌マウスを作成し、好中球による抗腫瘍効果を *in vivo* で観察し、その臨床における可能性、有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

1 ヒト CD47 遺伝子の antisense RNA, miRNA を発現する vector を構築する。RNA を直接導入するものと比較する。

ヒト CD47mRNA の 5'領域に対する antisense RNA, short hairpin (sh) RNA をデザインする。すでに RNA 干渉による報告があり、その確認と他の領域を探索し、

より効果的な発現抑制部位を決定する。発現 vector はすでに確立されており購入する。一方 CD47 に対する miRNA に関しては報告がないため 3'領域で他の遺伝子を参照しながら発現抑制が生じる領域を選択、より効果的な発現抑制部位を決定する。miRNA 発現 vector もすでに確立されているため購入する。

遺伝子導入は電気穿孔法、lipofectin 法、retrovirus を用い、RQ-PCR により発現抑制を定量化して比較、決定する。

2 ヒト正常骨髄細胞から CD13, CD33, CD34 陽性細胞を単離し骨髄芽球細胞を得る。

Informed consent を得た正常人から骨髄細胞を採取、比重遠心法により単核球層を分離する。Cell sorting を用いて CD13, CD33, CD34 陽性分画を選別する。G-CSF 50 ng/mL を添加し好中球へ分化、増殖させる際、細胞の至適培養条件を DMEM/F12 medium の下、Fetus calf serum (FCS) と knockout serum replacement (KSR) とで比較、その濃度を定める。骨髄球系細胞用培養液も販売されており、同様に比較検討する。形態変化、myeloperoxidase や neutrophilic alkaline phosphatase の発現、活性を経時的に観察し、骨髄球から後骨髄球レベルになる培養時間を決定する。

#### 4 . 研究成果

ヒトCD47遺伝子に対するアンチセンスRNA並びにmiRNAを発現するシャトルベクターを構築した。ヒト正常骨髄を採取、単核球層を分離、抗体を用いてCD13, CD33陽性骨髄芽球分画をmagnet beadで選別し、構築したウイルスベクターを遺伝子導入後 human granulocyte colony-stimulating factor を添加後培養し、好中球へ分化、増殖させた(論文準備中)。この系を用いて細胞の選別や培養に関して条件を変えなが

ら観察を続けた。CD34陽性造血前駆細胞を magnet beadで選別し、造血幹細胞増殖培地で培養後G-CSFを添加し再び培養を行った後CD13, 33 陽性細胞群を選別、さら G-CSF添加して培養することで最も高い効率が得られた。以上の観察から現在末梢血幹細胞採取の際患者さんに協力していただき、その1/100量の細胞を用いてin vitroでの治療実験を行っている。ヒト末梢血造血幹・

前駆細胞からCD34陽性細胞を分離し、CD19-CAR 及び CLL-1-CAR vectorを感染させ、CD13 及び CD33 陽性細胞を選別する。G-CSFを添加し、CAR-N とする。Positive control としてCD3, 8 陽性 T 細胞を選別、IL-7, IL-15 添加下培養し、活性化した状態でウイルスに感染させCAR-T とする。標的となる細胞はCD19-CAR では Daudi、CLL-1-CAR では HL60 を標的として現在標準的CAR-Tと各種CAR とで in vitro 治療実験を行っている。研究期間は本春で終了するがかなり優位な結果が得られており今後も本研究を行っていく計画である。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件、すべて査読あり)

1 Haruko Tashiro, Ryosuke Shirasaki, Masato Watanabe, Kazuo Kawasaki, Yoshihisa Takahashi, Naoki Shirafuji. Direct Factor X sequestration by systemic amyloid lightchain amyloidosis. Clinical Case Reports 2018; 6(3): 513–515.

Kimiko Nogi, Haruko Tashiro, Kazuo Kawasaki, Mayumi Matsuzawa, Takeshi Osawa, Ryohei Toyooka, Taiji Furukawa, Naoki Shirafuji. Aggressive NK Cell Leukemia with Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Case Report.

Journal of Clinical and Laboratory  
Medicine doi.org/10.16966/2572-9578.116

Tashiro H, Brenner MK.

Immunotherapy against cancer-related  
viruses. Cell Res. 2017 Jan;27(1):59-73.

Tanaka M, Tashiro H, Omer B,  
Lapteva N, Ando J, Ngo M, Mehta B,  
Dotti G, Kinchington PR, Leen AM,  
Rossig C, Rooney CM. Vaccination  
targeting native receptors to enhance the  
function and proliferation of chimeric  
antigen receptor (CAR)-modified T cells.  
Clin Cancer Res. 2017 Jul 15;  
23(14):3499-3509.

Schmueck-Henneresse M, Omer B,  
Shum T, Tashiro H, Mamonkin M,  
Lapteva N, Sharma S, Rollins L, Dotti G,  
Reinke P, Volk HD, Rooney CM.  
Comprehensive Approach for Identifying  
the T Cell Subset Origin of CD3 and  
CD28 Antibody-Activated Chimeric  
Antigen Receptor-Modified T Cells. J  
Immunol. 2017 May 26. pii: 1601494. doi:  
10.4049/jimmunol.1601494.

Heczey A, Louis CU, Savoldo B,  
Dakhova O, Durett A, Grilley B, Liu H,  
Wu MF, Mei Z, Gee A, Mehta B, Zhang H,  
Mahmood N, Tashiro H, Heslop HE,  
Dotti G, Rooney CM, Brenner MK. CAR  
T Cells Administered in Combination  
with Lymphodepletion and PD-1  
Inhibition to Patients with  
Neuroblastoma. Mol Ther. 2017 Jun 8.  
pii: S1525-0016 (17) 30230-7. doi:  
10.1016/j.ymthe.2017.05.012.

Tashiro H, Sauer T, Shum T, Parikh K,  
Mamonkin M, Omer B, Rouce R, Lulla P,  
Rooney C, Gottschalk S, Brenner MK.  
Treatment of acute myeloid leukemia  
with T cells expressing chimeric antigen

receptors directed to C-type lectin-like  
molecule 1. Mol Ther. 2017 Jul 1. pii:  
S1525-0016(17)30260-5. doi:  
10.1016/j.ymthe.2017.05.024. 2017  
25:2202-2213.

〔学会発表〕(計 15 件)

第 65 回日本輸血・細胞治療学会 (2017  
年)

灰野夏澄、前島理恵子、藤原孝記、富山秀  
和、金子 強、永友ひとみ、蟹井はるか、  
笠井英利、難波宏美、大曾根和子、松本謙  
介、白藤尚毅。赤血球抗原情報検索システ  
ムの有用性と問題点について

蟹井はるか、藤原孝記、前島理恵子、富  
山秀和、灰野夏澄、金子 強、永友ひとみ、  
笠井英利、難波宏美、大曾根和子、松本謙  
介、白藤尚毅。ABO 不適合臍帯血移植後の  
ドナー由来赤血球抗原量の解析

第 633 回日本内科学会関東地方会 (2017  
年)

芳賀、幸、松本謙介、住吉 立、松尾 琢  
二、山本 義、白崎良輔、田代晴子、大井  
淳、白藤尚毅、滝川 一。好中球増多を伴  
った多発性骨髄腫の 1 例。

第 7 回日本血液学会関東甲信越地方会  
(2017 年)

田代晴子、住吉 立、松尾 琢二、山本 義、  
松本謙介、大井 淳、秋山 暢、川杉 和  
夫、白藤尚毅。全身性アミロイドーシスに  
よる高度の第 X 因子欠乏を来した B 細胞性  
リンパ増殖性疾患

78 回日本血液学会総会 (2017 年)

Ritsu Sumiyoshi, Tadashi Yamamoto,  
Takuji Matsuo, Yoko Oka-Miura, Haruko  
Tashiro, Kensuke Matsumoto, Jun Ooi,  
Naoki Shirafuji. *FLT3-ITD* mutation in  
MDS onset is associated with early  
transformation to AML.

Takuji Matsuo, Ritsu Sumiyoshi,  
Tadashi Yamamoto, Haruko Tashiro,

Kensuke Matsumoto, Jun Ooi, Nobu Akiyama, Kazuo Kawasugi, Naoki Shirafuji. Low HDL is a significant poor prognostic factor in malignant lymphoma (ML)

Yoko Miura, Takuji Matsuo, Ritsu Sumiyoshi, Tadashi Yamamoto, Haruko Tashiro, Kensuke Matsumoto, Jun Ooi, Naoki Shirafuji. Perkinson's disease (PD) developed after Bortezomib (Bor)-containing chemotherapy for Mantle cell lymphoma (MCL)

第 8 回日本血液学会関東甲信越地方会 (2018 年) 多発性骨髄腫の治療経過で CD3 陽性形質細胞の肝浸潤を認めた 1 例 落合 亮介 他 (帝京大学医学部附属病院 血液内科)

第 17 回再生医療学会 (2018 年) IL-1 $\beta$  と電気刺激による hemogenic endothelium への変化に関する研究 白藤尚毅、松尾琢二、住吉 立、田代晴子

International Meeting

ENDO 2017 (2017)

Masumi Ogawa, Naoki Edo, Takuji Matsuo, Tadashi Yamamoto, Satoshi Takahashi, Yamato Mashimo, Koji Morita, Yuko Sasajima, Hiroshi Uozaki, Fukuo Kondo, Yasunori Ota, Naoki Shirafuji, Hiroko Okinaga, Kazuhisa Tsukamoto, Toshio Ishikawa. Primary Adrenal Lymphoma with Adrenal Insufficiency: Report of Three Cases and Review of Literature

ASGCT 20<sup>th</sup> Annual Meeting (2017)

Thomas Shum, Bilal Omer, Haruko Tashiro, Robert Kruse, Dimitrios Wagner, Kathan Parikh, Zhongzhen Yi, Tim Sauer, Robin Parihar, Leonid Metelitsa, Stephen Gottschalk, Cliona

Rooney. Constitutive Signaling from an Engineered IL-7 Receptor Promotes Durable Tumor Elimination by Tumor Redirected T-Cells.

Dimitrios L. Wagner, Haruko Tashiro, Thomas Shum, Debopriyo Halder, Michael C. Gundry, Lorenzo Brunetti, Ciaran M. Lee, Benjamin H. Shin, Tim Sauer, Maksim Mamonkin, Gang Bao, Margaret A. Goodell, Cliona M. Rooney. A Single CRISPR-Mediated Knockout as Novel Suicide Switch and Selection Tool for Gene-Modified T Cells

59<sup>th</sup> ASH meeting (2017)

Takuji Matsuo, Haruko Tashiro, Ritsu Sumiyoshi, Tadashi Yamamoto, Yoko Oka-Miura, Kensuke Matsumoto, Jun Ooi, Naoki Shirafuji Low high-density lipoprotein cholesterol (HDL) is a significant poor prognostic factor in malignant lymphoma

Ritsu Sumiyoshi, Haruko Tashiro, Takuji Matsuo, Tadashi Yamamoto, Yoko Oka-Miura, Kensuke Matsumoto, Jun Ooi, Naoki Shirafuji. *FLT3-ITD* mutation in MDS patients is associated with early transformation to AML

23<sup>rd</sup> EHA (June Stockholm) (2018)

Naoki Shirafuji, Takuji Matsuo, Ritsu Sumiyoshi, Rhosuke Shirasaki, and Haruko Tashiro Myofibroblasts derived from chronic myelogenous leukemia patients expressed Bcr-Abl transcript when cultured with interleukin-1 beta

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白藤 尚毅 (Shirafuji Naoki)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00206301

(4) 研究協力者

田代 晴子 (Tashiro Haruko)

帝京大学・医学部・講師