

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04060

研究課題名（和文）我々が新しく発見したNK細胞subsetの機能解明と養子免疫治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the function of the newly discovered NK cell subset and its application to adoptive immunotherapy

研究代表者

米満 吉和（YONEMITSU, YOSHIKAZU）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40315065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,800,000円

研究成果の概要（和文）：我々が独自に見出し、細胞製剤としての臨床開発を開始したNK細胞様細胞（開発コード：GAIA-102）の生物学的な意義を、特にEmergency NKとしての性質の観点から解析し、臨床応用のための基礎データを取得した。特異なケモカイン/ケモカイン受容体の発現、遺伝子発現パターン、Memory-like NKとの類似性などから、この細胞が特に固形腫瘍に対する高い傷害活性を有するメカニズムの一端が明らかとなり、臨床での有効性を示すための礎となる知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特に固形腫瘍を対象とする養子免疫療法としての実用化を目指す上で、GAIA-102のような特異な形質（固形腫瘍の傷害能がin vitro/in vivoで共に極めて高い）を持つ細胞の特性を解析することは、有効性および安全性の観点から意義深い。本研究の最終目標であるGAIA-102の正体解明は、社会的に大きな課題である悪性腫瘍に対する治療体系に変革をもたらし得ると考える。悪性腫瘍を根治させることが可能な免疫治療がもたらしたパラダイムシフトは今後、さらに免疫の理解によって利用が促進されることを想定し、重要なエフェクターの一つであるNK細胞のバイオロジーを紐解く意味でも社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the biological significance of NK cell-like cells (development code: GAIA-102), which we independently discovered and started clinical development as a cell-based medicine, especially from the viewpoint of their properties as "Emergency NK". The characteristic chemokine / chemokine receptor expression, gene expression pattern, and similarity to Memory-like NK have revealed a part of the mechanism by which these cells have high cytotoxic activity especially against solid tumors in vivo/in vitro. We believe that the above findings will be the basis for demonstrating clinical effectiveness.

研究分野：腫瘍免疫学、病理学

キーワード：NK細胞 Licensing 固形腫瘍 養子免疫 再生医療等製品 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤 (ICPI : immune checkpoint inhibitor、特に抗 PD-1 抗体)、そしてキメラ遺伝子導入 T 細胞 (CAR-T) の登場により、がん三大標準治療 (手術、放射線、化学療法) に続く第 4 の治療として、ようやく免疫治療が現実の選択肢となった。一方 ICPI の問題点は、有効性が 20-30%程度に留まる点であり、現在その効果を高めるために世界中が併用薬の臨床試験を進めており、米国臨床試験登録サイト clinical-trial.gov には 800 以上の試験が登録されている。しかしながら ICPI2 剤併用は奏効率が向上するものの致死性有害事象を増やし、また多発性骨髄腫にて既存薬と抗 PD-1 抗体の併用により死亡率の増加が認められ試験が中止になる (http://release.nikkei.co.jp/attach_file/0450610_01.pdf) など、必ずしも順調に進展しているとは言いがたい。

一方で、がんに対する養子免疫に使用する細胞、そして CTL との併用による相乗効果が期待出来る細胞として、CTL とは異なり MHC class I 抗原の発現に殺細胞効果が依存しない NK 細胞は、古くから注目されて来た。しかしながら T 細胞の活性化・増幅技術は 1980 年代から確立していたのとは対照的に、NK 細胞はその活性化培養が容易ではなく、臨床試験もほとんど進んでいなかった (2015 年末で論文 12 件ほど)。

ところが 2016 年末、驚くべき臨床試験データが Washington 大学より報告された (Romee R, et al. *Sci Transl Med* 2016;8:357ra123)。Phase I 部分、難治性 AML9 例の報告であるが、うち 5 例で完全寛解 (CR/CRi/MLFS=55.6%) であり、一過性に白血病細胞が激減した症例 2 例を加えると奏効率は 77.8%。これは最近米国で上市された若年者 ALL に対する CD19CAR-T の初期試験データと比較しても全く遜色ない成績であり、最近数年で国際的に複数の企業が種々の NK 細胞治療の開発に乗り出している。Washington 大学で使用された「adoptive memory-like NK 細胞」と称される細胞集団は、その分画においてほぼ末梢血 NK 細胞と同様であるが、彼らが強調しているのは minor population (数%) である「CD56bright」を示す集団の重要性である。特にこの集団が彼らの NK 細胞の抗腫瘍活性の本体である可能性が示唆されているもの (Romee R, et al *Blood* 2012)、その細胞集団の生物学的な意義は明らかにされていない。

「CTL とは異なり、MHC class I 抗原の発現に殺細胞効果が依存しない」という NK 細胞の特性から、これらの動きとは全く独立して、我々は ICPI を含む CTL 依存性治療に対する補完技術として、NK 細胞の *ex vivo* 増幅・活性化培養技術の開発に 2009 年より取り組み、3 年間の検討の末、ようやく技術の確立に成功した (Saito S, et al. *Hum Gene Ther Methods* 2013+原著論文 2 編準備中、国内特許登録 5572863,5989016,5511039,6164650、他複数申請中)。GAIA-102 の代表的な性質を列挙すると、①ほぼ 100%が CD56bright (一般的に NK 細胞は CD56dim)、②極めて高い細胞傷害活性 (活性測定標準株 K562 に対し 1-2 時間で 90%以上を殺傷)、③perforin/granzyme B 含有量が末梢血 NK 細胞の 4-10 倍、④活性化受容体 (NKG2D 等) 発現が 3-20 倍、⑤IFN- γ 含有量が 5 倍以上など、のデータが得られており、臨床的に有用と考えられることから、この新しい技術は 2015 年末に設立された九大発バイオベンチャー (GAIA BioMedicine 社 : <http://gaia-biomed.com>) に導出され、現在治験準備に入っている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、*ex vivo* での NK 細胞増幅培養技術を開発する過程において、1). 従来報告されている活性化 NK 細胞と比較して極めて強い抗腫瘍活性を持ち、2). 造血幹細胞移植後や HCV 感染時に一過性に増加する CD3⁺/CD56^{bright} という表現系を示す集団に類似している細胞集団を見出し、細胞製剤としての臨床開発を開始した (開発コード : GAIA-102)。本研究では、この全く新しく極めて高い抗腫瘍活性を有する GAIA-102 の生物学的な意義を、特に Emergency NK としての性質の観点から解析し、臨床応用のための基礎データを取得することを目的とした。

3. 研究の方法

GAIA-102 は再生医療等製品として臨床開発が進められており、その GMP/GCTP 製造 SOP の整備が並行して進められていたことから、当該プロジェクトでの製造方法に準じて細胞の調製を行った。

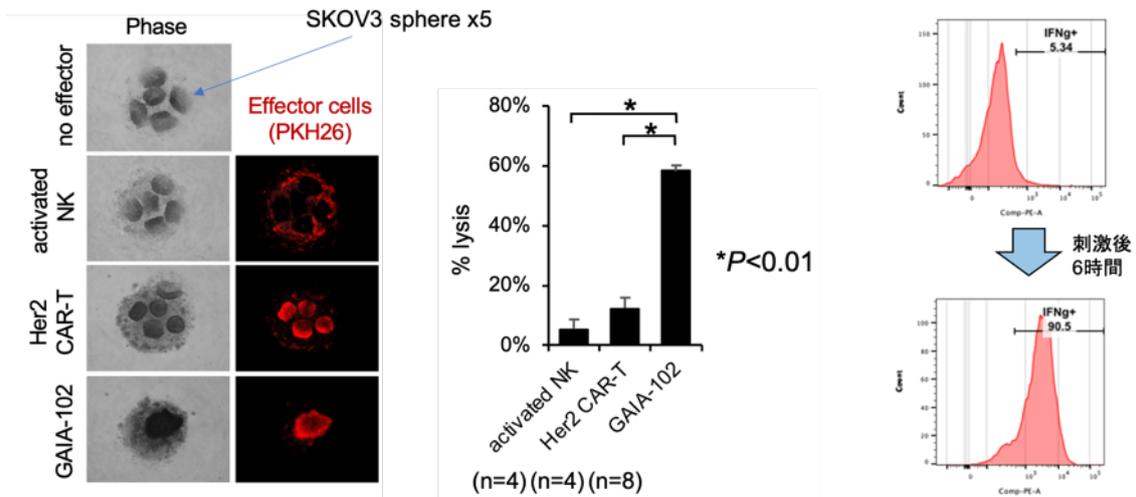
フローサイトメーターを用いた各種抗原発現パターンの検証、セルソーターを用いた表面抗原発現パターンに基づく細胞分取と機能評価、網羅的発現解析、そして *in vivo* での機能解析をメインに GAIA-102 の生物学的特性の解析を進めた。

4. 研究成果

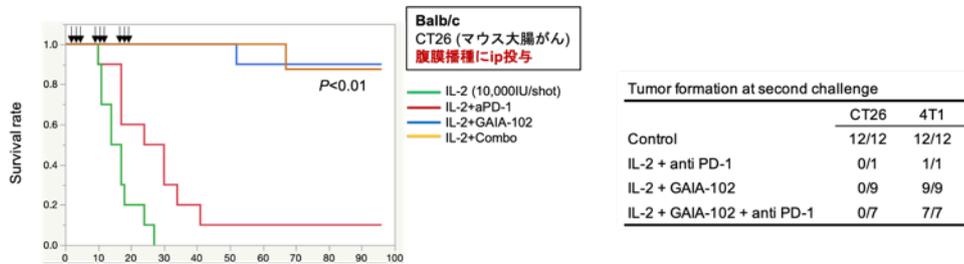
まず、GAIA-102 における NKG2A、その他ライセンシングに関与することが想定される分子群 (KIRs) の発現と、NK 細胞チェックポイント分子の発現パターンを明らかにした。また NK 細胞および種々の腫瘍細胞側の関連分子発現に基づく傷害活性を精査した。

GAIA-102 は KIRs 分子群全般の発現が低いが、それは培養工程中に段階的に低下していくことが明らかになった。また PD-1 は陰性であり、TIGIT や NKG2A といった ITIM 分子を持つ抗原についても多くは陰性であり、所謂 **negative signal** を受容し難い形質であることが判明した。関連して、Missing-self 仮説として知られる現象、即ち NK 細胞は対象細胞が HLA を発現しているか否かを識別して傷害活性を調節するという現象は、30 種類を超える腫瘍細胞株に対する網羅的な傷害活性測定の結果、GAIA-102 については成立しない (対象細胞の HLA 発現の多寡によらず傷害する) ことが明らかになった。分子メカニズムの解明は今後の課題である。

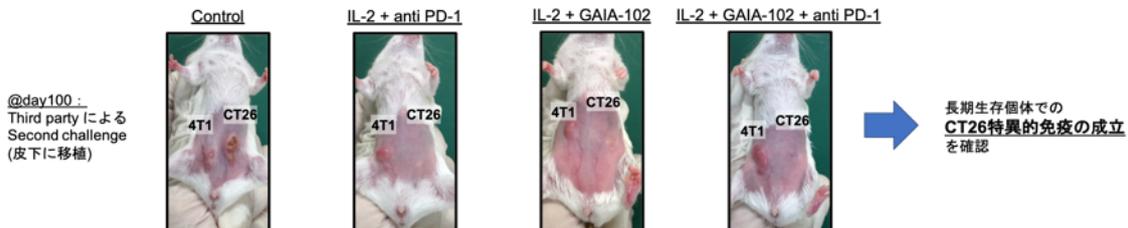
次に、発展的な解析として、ライセンシングに関わる分子群のパターン分類を進めるとともに、GAIA-102 の発生的解析並びに殺細胞活性の高低を決める因子の絞り込みを進めた。特に立体構造を持つ固形腫瘍に対する傷害能に着目し、由来を問わず腫瘍細胞株の 3D 培養により形成した Sphere に対する遊走・浸潤・傷害能が極めて高いこと、またそれは特定のケモカイン・ケモカイン受容体によって特徴付けられること、*in vivo* において腫瘍特異的獲得免疫を惹起させる機能が強く、Memory-like NK としてカテゴライズされる即時応答性を備えることを明らかにした。



続いて、*in vivo* での機能解析 (腹膜播種モデルマウスでの治療実験) によってその治療技術としての有用性が確かめられた。



※ Nude mouseやEffector-repletionで治療効果はキャンセルされる: Immunogenic cell deathの誘導が重要



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagai K, Harada Y, Harada H, Yanagihara K, Yonemitsu Y, Miyazaki Y	4. 巻 40
2. 論文標題 Highly activated ex vivo-expanded natural killer cells in patients with solid tumors in a Phase I/IIa clinical study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 5687-5700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki K, Harada M, Yoshikawa T, Tagawa H, Harada Y, Yonemitsu Y, Ryujin T, Kishimura A, Mori T, Katayama Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Fc-binding antibody-recruiting molecules targeting prostate-specific membrane antigen: defucosylation of antibody for efficacy improvement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 496-500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202000577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 米満吉和
2. 発表標題 機能を持つ新生血管の誘導：メカニズム解析からトランスレーショナルリサーチへ
3. 学会等名 第47回日本血管外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikazu Yonemitsu
2. 発表標題 DVC1-0101- An RNA gene drug based on recombinant Sendai virus to treat peripheral arterial disease
3. 学会等名 International Gene and Cell therapy Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikazu Yonemitsu
2. 発表標題 DVC1-0101- An RNA gene drug based on recombinant Sendai virus to treat peripheral arterial disease
3. 学会等名 25th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米満吉和
2. 発表標題 PADにおける薬物療法と血管新生療法：エビデンス集積の現状
3. 学会等名 第60回日本脈管学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshikazu Yonemitsu
2. 発表標題 GAIA-102: A novel natural killer cell-like phenotype that can eliminate solid tumor.
3. 学会等名 27th Annual Meeting of European Society of Gene and Cell Therapy (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米満吉和
2. 発表標題 CAR-T vs. NK：固形がん養子免疫治療にはどちらが適しているか？
3. 学会等名 第7回日本免疫・細胞治療学会 学術総会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yonemitsu Y,Harada Y.
2 . 発表標題 AdoptCell (R)-NK: a Novel Natural Killer Cell Phenotype That Can Eliminate the Solid Tumors
3 . 学会等名 American society of Gene and Cell Therapy 21st Annual meeting (Chicago)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yonemitsu Y,Harada Y.
2 . 発表標題 GAIA-102: a new class NK cells manufactured in accordance with GMP/GCTP that can eliminate the solid tumors
3 . 学会等名 The 24th Annual Meeting of JSGCT (東京)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yonemitsu Y,Harada Y.
2 . 発表標題 AdoptCell(R)-NK: a new class NK cells manufactured in accordance with GMP/GCTP that can eliminate the solid tumors
3 . 学会等名 Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) 33rd Anniversary Annual Meeting (Washington DC)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Yonemitsu Y,Harada Y.
2 . 発表標題 Development of innovative therapeutics for solid tumors
3 . 学会等名 The 29th Annual Meeting of the Japanese Society for Gastroenterological Carcinogenesis (東京)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Yonemitsu Y, Harada Y.
2. 発表標題 AdoptCell(R)-NK: a new class NK cells manufactured in accordance with GMP/GCTP that can eliminate the solid tumors
3. 学会等名 The 3rd Innate Killer Summit (San Diego)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada Y, Yonemitsu Y
2. 発表標題 GAIA-102: 固形腫瘍に対する新規革新的細胞製剤
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会 (札幌/オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Harada Y, Yonemitsu Y
2. 発表標題 GAIA-102: a new class off-the-shelf allogeneic NK-like cells that can eliminate solid tumors
3. 学会等名 Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) 35th Anniversary Annual Meeting (Washington DC/On-line) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 高活性NK細胞の処理方法	発明者 原田 結、米満吉和	権利者 株式会社ガイア バイオメディシ ン
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-035297	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 高活性NK細胞、およびその利用	発明者 米満吉和、原田 結	権利者 株式会社ガイア バイオメディシ ン
産業財産権の種類、番号 特許、JP Patent 6697611	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	原田 結 (HARADA YUI) (00608507)	九州大学・薬学研究院・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関