

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09000

研究課題名(和文) 改変ノッチ受容体導入T細胞による中枢神経系原発悪性リンパ腫抑制効果の検討

研究課題名(英文) Engineering of T cells with customized cancer therapeutic programs using synthetic notch receptor.

研究代表者

西 真由子 (NISHI, Mayuko)

横浜市立大学・医学研究科・助教

研究者番号：90635343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)患者由来PCNSL細胞株(PDC)を新たに9種類樹立した。これらのPCNSL-PDCはニューカッスル病ウイルス(NDV)に対して高い感染感受性を示すことを確認した。次に、NDVのHN抗原に対する一本鎖抗体(scFV)を作製し、これを搭載した合成Notch受容体を創出した。この遺伝子をJurkat T細胞に導入し、NDV感染PCNSL-PDCと共培養したところ、CD19特異的CARの発現が誘導された。一方、CARを介した細胞障害性については認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在実施されているPCNSLに対する免疫細胞療法は、臨床試験において比較的高い有効性を示したが、その投与方法や副作用など未だ解決できていない課題が山積している。一方、腫瘍溶解ウイルスを用いた抗腫瘍療法は、ウイルスによる直接的な細胞障害作用とともに、宿主による腫瘍免疫を増強する効果があることが知られている。本研究課題では、近年開発された、改変Notch技術を活用し、上記の2つの抗腫瘍戦略を融合し、発展させる効果が期待される。本アプローチが成功すれば、PCNSLに対する特異性および有効性の高い細胞免疫療法の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Primary central nervous system lymphoma (PCNSL) is a rare type of highly malignant non-Hodgkin lymphoma, which arises in the central nervous system. In our current study, we aimed to develop a new immunotherapy platform by combining therapies with oncolytic virus and chimeric antigen receptor (CAR) T cell. We initially established nine patient-derived PCNSL cell lines (PDCs) and found that PCNSLs are highly susceptible to infection with NDV. Next, we constructed single-chain variable fragment (scFV) against NDV-HN antigen. The anti-NDV-HN scFv was fused with synNotch gene and introduced into Jurkat T cells for creating NDV sensing cells. Co-culture of the synNotch-Jurkat cells with NDV-infected PCNSL-PDCs resulted in the induction of CD19-specific CAR. On the other hand, there was no significant cell cytotoxicity of PCNSL-PDCs by the co-culture probably due to low expression of CAR on the cell surface.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 悪性リンパ腫 ウイルス 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

中枢神経原発リンパ腫（PCNSL）は、近年増加傾向にある。全身性の悪性リンパ腫とは病態や治療の反応性が異なり、同様の化学療法のひとつは無効である。現在の標準治療は生検による診断確率後、メソトレキセート大量化学療法と全脳照射の併用療法であるが、再発は必発であり、長期予後は依然不良であることから、新たな治療法の開発が必要不可欠である。近年、遺伝子改変 T 細胞受容体を搭載したキメラ抗原受容体発現 T 細胞 (CAR-T) による免疫療法が注目されており、難治性 PCNSL に対しても著効例が報告されている (Jeremy S, NEJM, 2017)。一方、CAR-T 療法は標的抗原をもつ正常細胞も破壊されてしまったり、サイトカインストームを誘導するなどの問題があり、改良が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍溶解ウイルスと CAR-T を融合させた新たな免疫療法の開発を試みた。パラミクソウイルスに感染した腫瘍細胞は、ウイルスの HN 抗原を細胞膜上に提示することが知られている。そこで我々は、腫瘍溶解ウイルスとしてニューカッスル病ウイルス (NDV) を用いて、NDV 感染 PCNSL 細胞における腫瘍抗原として HN を標的とした。続いて、NDV-HN を特異的に認識する改変型 Notch 受容体を用いて、腫瘍細胞に接触した場合のみに抗腫瘍因子を発現誘導するセンサー細胞を樹立し、PCNSL に対する特異性および有効性の高い細胞免疫療法の発展を目指した。

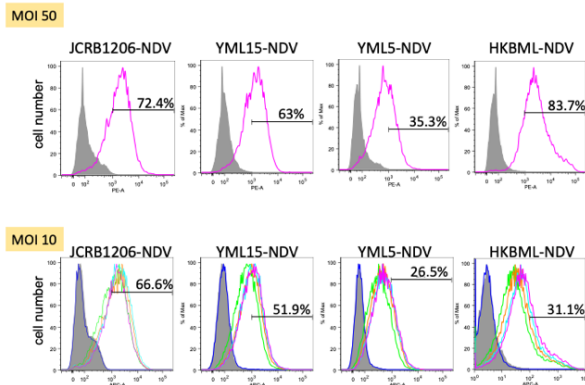
3. 研究の方法

まず PCNSL 細胞に、ニューカッスル病ウイルス (NDV) を感染させ、感染効率および HN 抗原が細胞膜上に提示されるかについてフローサイトメータを用いて確認した。次に、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞から total RNA を抽出し、5'-RACE PCR により、H 鎖および L 鎖の 5' 可変領域をコードする遺伝子をクローニングした。これらの情報を元に、一本鎖抗体 (scFv) 遺伝子を構築した。続いて、ウイルス検知細胞を構築した。Notch 受容体は、細胞外のリガンドと結合すると細胞内ドメインが切断され、細胞内領域タンパク質が核内移行し、転写因子として機能する。この Notch 受容体の切断機能を保持しつつ、細胞外ドメインを HN 抗原に対する一本鎖抗体に置換し、転写標的遺伝子を細胞障害性因子に改変することで、リガンド特異的な応答を確認した。次に、転写標的遺伝子として、CD19 特異的な CAR の発現をデザインした。CAR は、PCNSL 細胞に発現する CD19/CD20 抗原と結合するようにあらかじめ設計しておき、HN 抗原を認識した場合のみ、CAR の発現が誘導できるように設計した。同時に複数カセットに抗腫瘍因子を発現させることで、腫瘍免疫が活性化できるようにデザインした。

4. 研究成果

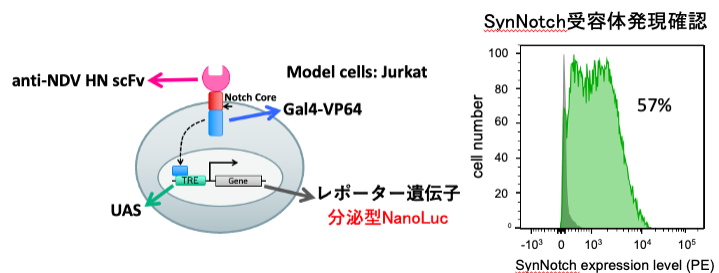
初めに、9 種類の患者由来 PCNSL 細胞株 (PDC: patient-derived cell) を新たに樹立した。組織免疫染色を行ない、全ての細胞株が CD20 陽性であったことから B 細胞リンパ腫を反映する PCNSL 細胞株 パネルであると考えられた。また、その殆どは NF- κ B 経路の恒常的活性化が想定されるサブタイプであった。PCNSL-PDX 株に対するウイルス感染感受性を確認したところ hPIV-3 感染効率が 20%程度と予想より低かったため、代替として、同じパラミクソ

ウイルス科に属するニューカッスル病ウイルス (NDV) を用いて、以降の検討を行った。NDV は、hPIV 3 と同様にパラミクソウイルス科に分類されるマイナス 1 本鎖の RNA ウィルスで、エンベロープを保有している。動物用生ワクチンとして使用されている低病原性 NDV (B1 株) を様々なウイルス価で PCNSL に感染させ、細胞表面の HN 抗原の発現を、フローサイトメータ

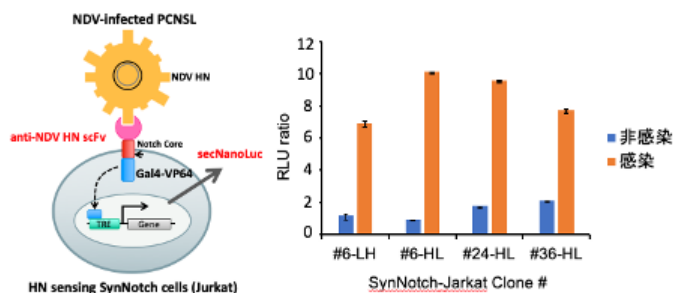


を用いて確認した。その結果、PCNSL は NDV に対する感染感受性が極めて高いことが判明した。次に、NDV のエンベロープタンパク質 HN に対する scFv を構築するため、NDV-HN に対するマウスモノクローナル抗体を作製した。AlphaScreen アッセイを用いて抗原への親和性および特異性を検定した結果、感染細胞膜表面の HN 抗原を認識できるクローンを 3 種類取得することができた。続いて、欠失変異体を用いたエピトープの決定およびエスケープ変異の有無等について、バイオインフォマティクスを用いて解析を行った。選定されたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞から total RNA を抽出し、5'-RACE PCR により、H 鎖および L 鎖の 5' 可変領域をコードする遺伝子をクローニングした。これらの情報を元に、scFv 遺伝子を構築し、コムギ無細胞合成系を用いて scFv リコンビナントタンパク質を合成した。ウイルス感染細胞の標的化について精査するため、蛍光標識した scFv を感染細胞に添加し、それらの結合および局在を、蛍光顕微鏡および発光顕微鏡を用いて確認した。レンチウイルスベクターに抗 NDV-HN

scFv 遺伝子を導入し、Jurkat T 細胞に発現させた NDV センシング synNotch 細胞を樹立し、synNotch 受容体の発現をフローサイトメーターにより確認したところ、57%が陽性であった。



マウス in vivo における PCNSL 細胞傷害活性惹起能の検討については、腫瘍移植マウスへのウイルス感染が施設内のバイオセーフティの問題等により困難であったため、PDC を用いて解析を実施した。免疫不全マウスの脳内に PCNSL を同所移植し、腫瘍形成後、一部は組織染色、一部は PDC を作製した。作製した PDC に NDV を感染させ、Jurkat NDV センシング synNotch 細胞と共培養した。非感染細胞をコントロールとして比較したところ、感染細胞と共培養した synNotch 細胞において CD19 特異的 CAR の発現が誘導された。一方、CAR-T 細胞による細胞障害性については有意な差が認められなかった。細胞障害性が不十分であった可能性として、細胞膜上の CAR の発現が低い、または CAR-T と腫瘍細胞の接触が不十分であることが考えられる。今後、これらの点について考察の上、細胞共培養法や細胞比率などについて検討を行う。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishi M, Miyakawa K, Matsunaga S, Khatun H, Yamaoka Y, Watashi K, Sugiyama M, Kimura H, Wakita T, Ryo A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Regulates the Stability of Hepatitis B Virus Core Protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.00026. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Miyakawa K, Matsunaga S, Yokoyama M, Nomaguchi M, Kimura Y, Nishi M, Kimura H, Sato H, Hirano H, Tamura T, Akari H, Miura T, Adachi A, Sawasaki T, Yamamoto N, Ryo A.	4. 巻 10
2. 論文標題 PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD1 restriction via Vpx phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09867-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tateishi K, Nakamura T, Juratli TA, Williams EA, Matsushita Y, Miyake S, Nishi M, Miller JJ, Tummala SS, Fink AL, et al.	4. 巻 25
2. 論文標題 PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations Promote Malignant Progression and Xenograft Formation in Oligodendroglial Tumors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4375-4387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-4144.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Subedi A, Muroi M, Futamura Y, Kawamura T, Aono H, Nishi M, Ryo A, Watanabe N, Osada H.	4. 巻 593
2. 論文標題 A novel inhibitor of tumorspheres reveals the activation of the serine biosynthetic pathway upon mitochondrial inhibition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 763-776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13361.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura M, Matsumoto K, Shimizu Y, Ikeda M, Amano N, Nishi M, Ryo A, Nagashio R, Sato Y, Iwamura M.	4. 巻 24(1)
2. 論文標題 TROY expression is associated with pathological stage and poor prognosis in patients treated with radical cystectomy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Biomark.	6. 最初と最後の頁 91-96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/CBM-181911.	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 Shima H, Kida K, Adachi S, Yamada A, Sugae S, Narui K, Miyagi Y, Nishi M, Ryo A, Murata S, Taniguchi H, Ichikawa Y, Ishikawa T, Endo I.	4. 巻 170(3)
2. 論文標題 Lnc RNA H19 is associated with poor prognosis in breast cancer patients and promotes cancer stemness.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Breast Cancer Res Treat.	6. 最初と最後の頁 507-516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10549-018-4793-z.	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西 真由子, 立石健祐, 畑山靖佳, 山岡悠太郎, 山本哲哉, 梁 明秀
2. 発表標題 ピトリゲル膜を介した両面培養による中枢神経系原発悪性リンパ腫細胞と脳血管周皮細胞との相互作用解析
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------