

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K16119
研究課題名（和文）NK細胞のLicensingと活性に関する研究～臨床応用に向けて

研究課題名（英文）Licensing and activating mechanisms of NK cells

研究代表者

原田 結（Harada, Yui）

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：00608507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）： K562の他、種々の組織に由来する腫瘍細胞に対する傷害活性の測定を行った結果、独自の培養技術で製造を行った活性化NK細胞GAIA-102はHLA nullかつNKG2D ligand 陰性であるため一般にNK-resistantとして知られるRajiを含め、腫瘍由来組織横断的に、K562/IMR32/HCT116/SKOV3/MCF7/Hut78などに対してPrimary NK細胞のそれを大きく上回る傷害活性を示した。予想に反し、接着系の細胞に対してはSpheroidを形成した際により高い傷害活性を示すことが明らかになり、臨床応用の際には固形腫瘍に高い奏効が期待される結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍の治療に免疫が応用されるようになって以来、固形腫瘍に対する有効性の向上は大きな課題であり続けている。本研究で得られた高活性NK細胞様細胞GAIA-102がこれまで知られた免疫細胞とは異なり、腫瘍細胞が3D形状を形成した時に特に傷害活性を強く発揮する現象は、今後の臨床応用を期待するのみならず、固形腫瘍を破壊するために免疫細胞に要求される特性を明らかにし、また新たな創薬ターゲットの創出にも繋がる意義がある。

研究成果の概要（英文）： Activated NK cells GAIA-102 produced by our original culture technology showed extremely high cytotoxicity against tumor cells derived from various tissues (K562/IMR32/HCT116/SKOV3/MCF7/Hut78, etc.). .. Contrary to what was expected, it was revealed that GAIA-102 showed higher cytotoxicity against Spheroid-forming tumor than 2D cultured tumor. The result is expected to be highly successful in solid tumors in clinical applications.

研究分野：腫瘍免疫学、分子生物学

キーワード：NK細胞 固形腫瘍 GAIA-102 再生医療等製品

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NK 細胞はその発見から 40 年余りが経ち、その名は一般にも広く知られるようになったが、一方でその機能については厚いベールに包まれたままである。ウイルス感染細胞やがん細胞などの形質転換細胞を傷害するという能力自体には疑う余地が無いが、NK 細胞が腫瘍細胞の何を認識しているのか、またその精度(傷害活性)の差は何によって生じるのか、答えは未だに得られていない。

自己抗原=HLA の発現が低下或いは消失した細胞が NK 細胞のターゲットであるとする Missing-self 仮説に疑義が生じたのは、NK 細胞が HLA を強発現する腫瘍細胞をも傷害することが確認されたからである。そこで次に考えられた仮説は、NK 細胞が対象細胞を傷害するか否かは Positive signal と Negative signal とのバランスで決定する、というものであった。即ち、NK 細胞は多くのレセプター群を駆使して対象細胞の細胞膜表面を探知し、トータル Positive signal がトータル Negative signal を上回った時にだけ傷害活性を発揮する、という仮説である。これは多くの研究者らによっておおよそ正しいであろうことが確認され、2017 年現在、世界的にコンセンサスが得られていると言える。

ここで、おおよそと表現せざるを得ないのには大きな理由がある。それこそが本研究の最も強い学術的動機付けとなった「問い」の一つである。それは、他の免疫細胞には見られない「例外的」な現象が少なく無いことである。例えば、Positive signal を与える分子群 (NKG2D ligands: MICA, MICB, ULBP1, ULBP2) の発現が無く、逆に Negative signal を与える分子群 (HLA-ABC) の発現が多いため NK-resistant な細胞株として知られる Raji 細胞 (パーキットリンパ腫) に対し、末梢血中の NK 細胞はほとんど傷害活性を示すことが無いが、申請者が作出した培養法で得られた NK 細胞 (=AdoptCell®-NK と呼ぶ: Saito S, et al. *Hum Gene Ther Methods*. 2013) は極めて高い傷害活性を示す。一方で、AdoptCell®-NK は末梢血単核球 (正常細胞) はもちろん、NKG2D ligands を発現する正常細胞 (気道上皮細胞や臍帯静脈上皮細胞) も一切傷害しないことから、単に暴走しているわけではないことが分かる。AdoptCell®-NK は何を以って正常と異常とを見分けているのであろうか。

本研究の大事なもう一つのキーワード、“Licensing”についても触れておきたい。NK 細胞はその発見の経緯から Natural に、初めから Killing 活性を有していると誤認されてきた歴史がある。確かに、T 細胞のような HLA 拘束性があるわけでもなく、発生過程で正負の選択を受けることも確認されていないが、しかし NK 細胞が傷害活性を発揮するためには KIR 分子群あるいは NKG2A/CD94 複合体から Negative signal を受け取ることが必要であることが実験的に示されたのである。この過程は Licensing (Arming と同) と命名され、HLA と KIR の遺伝子タイピングが AML 治療時の造血幹細胞移植の際に重要な指標となるなど、臨床応用にも繋がっている。そしてここにも「例外的」な現象が確認され、本研究におけるもう一つの大きな「問い」を投げかける。AdoptCell®-NK は極めて腫瘍傷害活性が高いにもかかわらず、KIR 分子群を発現していないのである。また、末梢血中にもこれらを発現していない (=Licensing を受けられないはず) 成熟 NK 細胞が存在しており、その存在意義は今なお明らかにされていない。果たして、極めて高活性な AdoptCell®-NK は Licensing を受けているのであろうか。

本研究はこれら学術的な問いを背景に開始された。研究の動機自体は、臨床的視点に立ちアンメットメディカルニーズを満たすことに尽きる。がんは国民死亡原因の第 1 位であり、このがん死亡率を低下させると共にがん患者の QOL の維持に主眼を置いた包括的治療戦略を構築することは極めて重要であり、今なお試行錯誤の最中にある。申請者は免疫チェックポイント阻害剤の初期臨床試験データが公になりつつあった当時から、「CTL 依存性抗腫瘍免疫」を利用したがん治療にはやがて原理的限界 (=HLA 発現低下) が来る可能性を見越し、CTL をエフェクターとする治療に『CTL をエフェクターとしない治療』を加えることで、より安全かつ効果的 (より広い治療スペクトラム) な抗腫瘍免疫の誘導が可能になると考え、その代表的なエフェクター細胞である「NK 細胞」に着目した。しかしその培養は極めて困難であり、目指すべき活性すなわち強力な治療効果を期待できる NK 細胞を創出するには、その性状を正しく理解しなければならぬと感じた。基礎培養技術は試行錯誤から確立できたものの、しかしその培養行程で何が起きているのかを未だ説明できない。それは今後の臨床開発の発展を妨げるものであり、AdoptCell-NK の開発過程で最も知るべき情報であると考えた。

2. 研究の目的

以上の背景から、いわゆる高活性な NK 細胞である AdoptCell®-NK が種々のがん細胞株を認識するために利用しているキー分子を絞り込むこと、そして NK-resistant 株さえ傷害可能な高活性を得るメカニズム=培養行程中に起きるであろう Licensing の機序（どの細胞の、どの分子からのシグナルが必要なのか）を紐解くことを目的とする。また、計画通りに研究を進めることが出来れば、現在再生医療等製品として準備を進める AdoptCell®-NK の開発へフィードバックしたい（製造技術や患者/ドナー選択アルゴリズムなど）。

AdoptCell®-NK の培養技術確立に至る過程には、本研究の「問い」へのヒントになる学術的独自性がある。NK 細胞を活性化・増殖させようとする場合、NK 細胞を単離したのちにサイトカインカクテル（IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 等）や Positive signal（NKp46 agonist 抗体など）を利用することが一般的であるが、それでは満足のいく活性が得られなかった（臨床的視点に立ち NK 細胞でアンメットメディカルニーズを満たすことを目標に開発していたため）。そこで試行錯誤を重ねた結果、『CD3 と CD34 陽性細胞のみを除去した単核球を材料とし、IL-2 のみを用いて接着系培養を行う』という方法を確立した。

本研究は、申請者が開発してきたこれまでの成果：NK 細胞プラットフォーム技術 (WO2014188680A1 (JP5511039/JP5989016/), WO2012176796A1 (JP5572863/US9404083/CN ZL201280031188.5), JP-2016176379, JP-2016188166, JP-2017095288) を総動員し、培養・活性化が難しいがために知る事の出来なかった学術的問いに対し、これら技術があつて初めて実施が可能になるオリジナリティの高い研究を行うものである。

3. 研究の方法

1. KIR リガンドミスマッチの普遍性の確認

KIR 分子群は NK 細胞が持ち、Licensing にも深く関わる事が示唆される一連の IgG 様ドメインを持つ細胞膜結合型タンパクで、活性/抑制の種々のシグナルを伝達するが、そのリガンドである HLA を極めて高精度で認識することが分かっている。しかも個々の NK 細胞によってその発現パターンは異なり、例えば 6 つの分子に着目すると $2^6=64$ 通りの NK 細胞が存在することが分かる。そこで本項目では KIR の発現量が変化する培養行程中に多重染色（7 色以上）FACS を用い、腫瘍を持つ HLA と NK が持つ KIR による傷害活性について CD107a（脱顆粒時に NK 膜上に出現）を指標に測定し、傷害を受けにくい腫瘍細胞の特徴を KIR リガンドミスマッチの観点から明らかにする。

2. 活性化型レセプターとリガンドへの依存性確認

NK 細胞が持つ活性化型レセプターのうち、会合分子が持つ ITAM（細胞内で活性化シグナルを伝達するモチーフ）の数が特に多い NKp30 と NKp46 については、実はそのリガンドが一部を除いて未だ明らかになっていない。特に後者についてはウイルスが持つヘマグルチニン以外では、候補分子として Vimentin が挙げられるに留まる。そこで、高活性 NK 細胞が正常細胞と腫瘍細胞とを高精度に見分けられる理由が、これら活性化型レセプターのリガンド発現パターンにあるという仮説のもと、中和抗体・中和活性を持つ組換えタンパクを用いて、AdoptCell®-NK が腫瘍を認識する際に NKp30/p46 にどれだけ依存しているかを確認する。特に注目している CSV（Cell Surface Vimentin）と B7-H6 は、NKp30 と NKp46 を高発現する AdoptCell®-NK ならではの反応が見られることが期待される。いずれも指標は Killing activity 並びに CD107a 発現とする。

3. 抑制型レセプターとリガンド：Licensing 状態への影響確認

NK 細胞が持つ抑制型レセプターは、活性化型レセプター以上に未解明と言える。これまでの研究結果から、Licensing は主に接着系の細胞（恐らく単球）を介して行われている可能性が高い。そこで、HLA のタイピング結果と照らしながら培養行程中の NK の KIR 発現パターンをモニタリングすると共に、培養中に接着系の細胞と NK とを HLA/KIR タイピング結果の異なる細胞とスワッピングし、Licensing の状態変化を確認する。ここで、Licensing 状態を「傷害活性と KIR の発現量変化」として定義し、培養中に HLA からシグナルを受け取る NK と受け取らない NK との間に生じる差を種々の HLA パターンの細胞株を用いて検出する。

4. 結果の意味付けと応用展開の可能性探索

以上の結果を踏まえ、腫瘍細胞/AdoptCell-NK 双方の HLA/KIR の発現パターンと活性化型リガンドの多寡を反映させた *in vivo* モデル（NOG マウス使用予定）を 3 パターン作成し、実際の治

療効果に生じる差を確認することで、ヒトへの応用可能性を探索する。

4. 研究成果

NK 細胞の抗腫瘍活性の測定に標準的に用いられる K562 の他、種々の組織に由来する腫瘍細胞に対する傷害活性の測定を行った結果、独自の技術で製造される高活性 NK 細胞様細胞 GAIA-102 は HLA null かつ NKG2D ligand 陰性であるため一般に NK-resistant として知られる Raji を含め、腫瘍由来組織横断的に E:T=1:1、2 時間の共培養による傷害活性は Primary NK 細胞のそれを大きく上回ることが確認された (K562/IMR32/HCT116/SKOV3/MCF7/Hut78 など)。予想に反し、接着系の細胞に対しては Spheroid を形成した際により高い傷害活性を示すことが明らかになり、臨床応用の際には固形腫瘍に高い奏功が期待される結果となった。また急性単球性白血病細胞である THP-1 は Spheroid を形成しないが、驚くべきことに液性因子 X(炎症性サイトカインの一つ)を添加するだけでその感受性が大幅に向上することが明らかになった。また GAIA-102 をエフェクターとした場合、Mogamulizumab は CCR4 陽性である Hut78 に対して ADCC 活性を示した一方、CCR4 陽性の正常細胞(末梢血中 CD4 陽性 T 細胞の一部)に対する傷害活性は観察されなかった。つまり、多くの抗体医薬品が抱える有害事象の一つ、“On-target Off-tumor 効果”の原因細胞が NK 細胞 (GAIA-102 のような体外で活性化培養を経た細胞であっても)ではないことが確かめられた。

また、GAIA-102 は多くの KIR 分子の発現がその培養工程中に失われることがドナー非依存的に明らかになったが、その Kinetics はドナーの HLA haplotype の影響を受けるとともに、一部発現の残った分子から negative signal が入ることで傷害活性の影響を受ける集団がわずかに存在することが明らかになった。

最も重要なことに、GAIA-102 は既知の活性化レセプターおよび抑制性レセプターそれぞれのリガンドの腫瘍細胞上の発現強度に全く依存せずに傷害活性を発揮することが明らかになり、従って GAIA-102 が何を認識して正常細胞と腫瘍細胞とを識別しているのかのメカニズムはこれまでに知られていない創薬ターゲットの創出に繋がる可能性のある研究対象であることが浮き彫りになった。

本研究の成果は NK 細胞を再生医療等製品として開発する際に貴重な情報を与えると共に、NK 細胞による腫瘍細胞識別機構解明の糸口を発見した有意義なものであった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1 . 発表者名 Harada Y, Yonemitsu 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 Harada Y, Yonemitsu 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 Harada Y, Yonemitsu 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 Harada Y, Yonemitsu 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 Harada Y, Yonemitsu 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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 原田 結、米満吉和他、分担執筆	4. 発行年 2020年
2. 出版社 飯田橋パピルス	5. 総ページ数 243
3. 書名 分子細胞治療フロンティア2020	

〔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、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 Patemt 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
---------------------------	-----------------------	----