

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02789

研究課題名（和文）CARとCIML NK細胞を用いた新規固形癌治療の開発

研究課題名（英文）Novel strategies for the treatment of solid tumors with CAR and CIML NK cells

研究代表者

宮西 浩嗣（Miyanishi, Koji）

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60372819

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：piggyBacトランスポゾンプラスミドベクターを用いて、CAR-CIML NK細胞を作成し、*in vitro*においてCAR-CIML NK細胞は標的細胞を認識した際に強力な細胞傷害活性を有することを証明した。一方でエレクトロポレーションでのベクター導入は細胞毒性が強く、*in vitro*ではCAR-CIML NK細胞の増殖は認められなかった。今後、ベクター導入に際して細胞毒性を軽減する方法の開発や*in vivo*マウスモデルでのCAR-CIML NK細胞の抗腫瘍効果の検討などを行う必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではCIML NK細胞の概念をCAR細胞に応用し、膵癌細胞株に対して高い抗腫瘍効果を発揮することを証明し、今後の新規固形癌治療に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Using piggyBac transposon plasmid vector, CAR-CIML NK cells were generated and proved to have potent cytotoxic activity upon recognition of target cells *in vitro*. Vector transduction by electroporation was highly cytotoxic, and no proliferation of CAR-CIML NK cells was observed *in vitro*. In the future, it is necessary to develop a method to reduce the cytotoxicity of vector transduction and to examine the anti-tumor effect of CAR-CIML NK cells in an *in vivo* mouse model.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：CAR-NK

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

治療切除不能がん患者の予後は現在もなお極めて不良である。患者自身の抗腫瘍免疫を治療に活用する免疫療法である免疫チェックポイント阻害薬療法は多くの固形癌において抗腫瘍効果が認められ、標準治療となっている。さらに CD19 特異的キメラ抗原受容体 chimeric antigen receptor (CAR) を用いた遺伝子改変 T 細胞療法 (CAR-T 療法) は、造血器腫瘍に対して劇的な治療効果をもたらし、世界的に大きな注目を集め、これまでのがん治療の歴史を大きく塗り替えた。しかしながら CAR-T 療法は MHC 拘束性のため、患者自身の T cell が必要となり、生産過程が複雑で費用がかかるという点や Cytokine release syndrome や重篤な神経毒性などの有害事象の点が問題となっている。

さらに造血器腫瘍に対する CD19 CAR-T 療法の治療効果と比較すると、固形腫瘍に対する CAR 療法の臨床的効果は限定的である。CAR 細胞の固形腫瘍に対する効果が限定的である原因の一つとして、腫瘍環境内に集簇する MDSC (myeloid derived suppressor cells) 等の抑制性免疫細胞が細胞エフェクター細胞の免疫を強力に阻害するため、CAR 細胞が本来の抗腫瘍効果を発揮できないためと考えられている。これらの問題点を克服するため、本研究は、免疫細胞の一つである NK 細胞に着目した。NK 細胞は HLA クラス I 分子のダウンレギュレートや、ストレスマーカーを発現する癌やウイルス感染細胞を標的とすることにより、免疫監視において極めて重要な役割を果たす。NK 細胞は活性化型受容体によってウイルスタンパク、癌抗原を認識し、細胞傷溶解活性を誘導する。さらに NK 細胞は抑制性受容体によって自身の HLA クラス I を認識し、自身の正常細胞を障害するのを防ぎ、活性化または抑制性受容体からのシグナルのバランスによって標的細胞を識別し、細胞死に導く。近年 NK 細胞を IL-12、IL-15、IL-18 で刺激することにより、NK 細胞活性化型受容体の発現が増加し、細胞生存率が維持される CIML NK 細胞に変化することが示され、血液癌に対して強力な細胞毒性効果を持つことが報告されているが (Rizwan Romee et al. Sci Transl Med. 2016)、固形癌に対する抗腫瘍効果については明らかにされていなかった。我々は事前実験で CIML NK 細胞を作成し、胃癌細胞株に対して強力な抗腫瘍効果を有することを確認している。この CIML NK 細胞を CAR 細胞に応用し、腫瘍環境内において Target となる固形癌を認識し、自ら IL-12、15、18 を分泌し、CIML NK 細胞に変化する CAR-CIML NK 細胞を作製する。さらに NK 細胞は T 細胞とは異なり、MHC 拘束性がない。そのため HLA を完全に一致させる必要がなく、患者ごとに独自の CAR 製品を作成する必要がなく、臍帯血などの同種起源の NK 細胞を用いて安全に投与できると考えられる。以上より本研究では CIML NK 細胞の概念を CAR 細胞に応用することで腫瘍環境内で高い抗腫瘍効果を発揮し、なおかつ既報の CAR-T 療法の問題点となっていた作製の煩雑性を解決する新規固形癌治療の可能性を検討する。

### 2. 研究の目的

本研究は、免疫細胞の一つである NK 細胞に着目し、CAR による腫瘍認識で、CAR 依存性標的溶解を誘導すると同時に自身が IL12/15/18 を分泌し、自身の活性化型 NK 受容体や FAS 受容体等の発現を増加させ、NK 受容体依存性標的溶解能力も高める新たな CAR-NK 細胞を作成し、固形癌に対する抗腫瘍効果を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1). CAR-CIML NK 細胞の作成

標的抗原、CD28膜貫通ドメインおよび T 細胞受容体複合体の 鎖を標的とする一本鎖抗体

(scFv) をコードするcassetteをクローニングする。さらにヒトIL12、IL15およびIL18遺伝子を、プラスミドからPCRによってクローン化する。また小分子二量体CIDAP20187との特異的結合時にアポトーシスを誘導する誘導性カスパーゼ9(iCasp-9)遺伝子を既報 (Straathof KC, et al Blood 2005) に基づき構築する。これらを用いて標的抗原特異的CARとヒトIL12、15、18遺伝子およびiCasp-9遺伝子を口蹄疫ウイルスに由来する2A配列ペプチドを使用して結合し、ベクターを生成する。市販のNK細胞を使用し、NK cell Expansion Mediumを用いて5日間培養し、6日目にベクターをNK細胞に形質導入する。

#### (2). CAR-CIML NK細胞のviabilityの検討

CAR導入後のCAR-CIML NK細胞のviabilityを測定するために、アネキシンV/7AAD染色によるFACS分析を使用し、NK細胞死について評価する。

#### (3). CAR-CIML NK細胞の増殖能の検討

CAR-CIML NK細胞の増殖を評価するためにCAR-CIML NK細胞をNK cell Expansion Mediumで培養し、トリパンブルーを用いてcell カウントする。

#### (4). CAR-CIML NK細胞の抗腫瘍効果およびサイトカイン産生能の評価

形質導入の7日後、コントロールNK細胞、CAR-CIML NK細胞をTarget細胞と共培養し、4時間の培養後、細胞を収集し、残存腫瘍細胞をFACS分析により解析する。この実験では、Target細胞をCFSEで標識し、その後CAR-CIML NK細胞と共培養後にアネキシンV/7AAD染色によるFACS分析でTarget細胞死を評価する。またコントロール細胞、CAR-CIML NK細胞それぞれのIFN $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ の産生をそれぞれの抗体を用いてFACSで測定する。

### 4. 研究成果

#### (1). CAR-CIML NK細胞の作成

研究当初ウイルスベクターを構築し、NK細胞への導入を予定していたが、ウイルスベクターのパッケージング容量は10kb程度ほどであり、IL12/15/18をベクターに組み込めず、ウイルスCARベクターを作成することはできなかったためpiggyBacトランスポゾンプラスミドベクターを用いた導入法に変更した。piggyBacトランスポゾンプラスミドベクターはトランスポゼースを提供するヘルパーベクターとともに細胞にトランスフェクションすることにより、piggyBacベクターのITR間に設計された遺伝子が宿主細胞のゲノムに組み込まれる。これにより、宿主細胞への永続的な遺伝子導入が可能になる。このベクターをエレクトロポレーションによりNK細胞へ導入を行った。

#### (2). CAR-CIML NK細胞のviabilityの検討

エレクトロポレーションによるベクター導入後のNK細胞のviabilityを評価するため、ベクター導入前後でapoptosisを来した細胞数をFACSを用いて評価した。エレクトロポレーションの設定を複数回調整したが、もっとも良い設定でもエレクトロポレーション前と比較して、エレクトロポレーション後のNK細胞は約50%のapoptosisを来した(図1)。

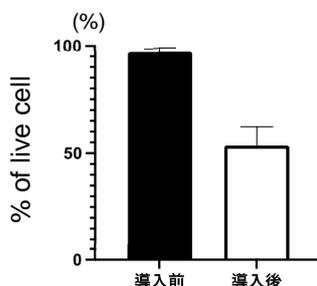


図1 ベクター導入前後のcell viability

### (3). CAR-CIML NK 細胞の増殖能の検討

続いてエレクトロポレーションによるベクター導入後のNK細胞をNK cell Expansion Mediumを用いて7日間培養し、その間の増殖能を評価した。in vitroの培養ではベクターを導入したNK細胞の細胞数の増加は認められなかった(図2)。

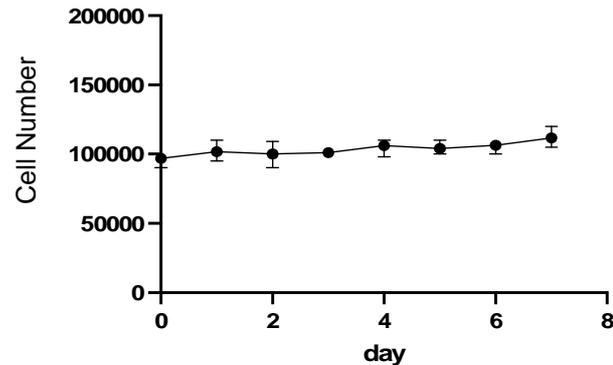


図2 CAR-CIML NK 細胞の増殖能

### (4). CAR-CIML NK 細胞の抗腫瘍効果およびサイトカイン産生能の評価

ベクター導入したNK細胞をNK cell Expansion Mediumを用いて7日間培養後、targetとなる膵癌細胞株と4時間共培養し、抗腫瘍効果およびCAR-CIML NK細胞のサイトカイン産生能をFACSを用いて評価した。ベクター導入を行っていないコントロールのNK細胞と比較してCAR-CIML NK細胞は膵癌細胞株のapoptosisを誘導し、CAR-CIML NK細胞はin vitroにおいて抗腫瘍効果を有することを示した(図3a)。さらにコントロールのNK細胞と比較してCAR-CIML NK細胞のサイトカイン(IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )の産生能は上昇が認められた(図3b)。

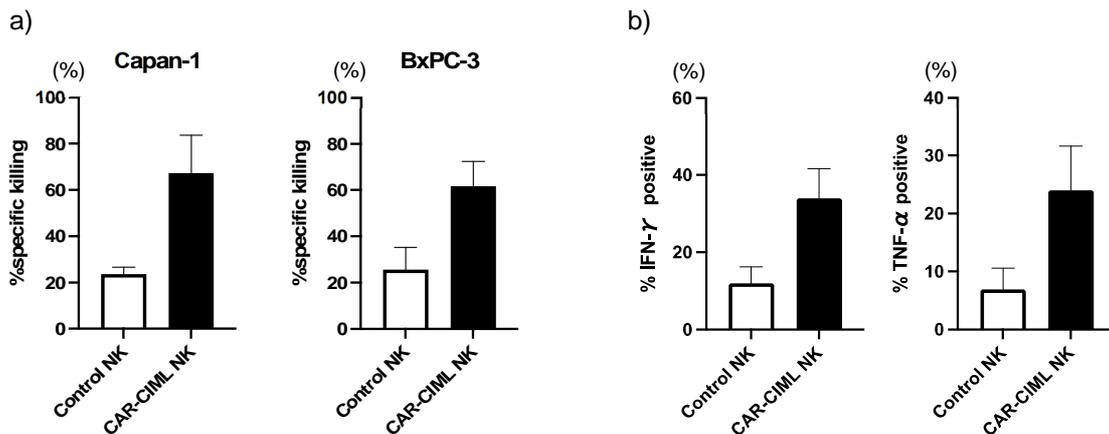


図3 CAR-CIML NK 細胞の抗腫瘍効果およびサイトカイン産生能

以上より in vitro においては CAR-CIML NK 細胞は標的細胞を認識した際に強力な細胞傷害活性を有することが証明された。一方でエレクトロポレーションでのベクター導入は細胞毒性が強く、in vitro では CAR-CIML NK 細胞の増殖は認められなかった。今後、ベクター導入に際して細胞毒性を軽減する方法の開発や in vivo マウスモデルでの CAR-CIML NK 細胞の抗腫瘍効果の検討などを行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	久保 智洋  (Kubo Tomohiro)  (00634669)	札幌医科大学・医学部・助教   (20101)	
研究分担者	大須賀 崇裕  (Oosuga Takahiro)  (40619714)	札幌医科大学・医学部・助教   (20101)	
研究分担者	田中 信悟  (Tanaka Shingo)  (60561024)	札幌医科大学・医学部・助教   (20101)	
研究分担者	加藤 淳二  (Kato Junji)  (20244345)	札幌医科大学・医学部・教授   (20101)	
研究分担者	濱口 孝太  (Hamaguchi Kota)  (50866613)	札幌医科大学・医学部・研究員   (20101)	

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