

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07213

研究課題名(和文)安全で有効かつ、いつでも誰でも使えるCAR-NK細胞療法の新規開発

研究課題名(英文) Novel CAR-NK cell therapies that are safe, effective and can be used by anyone at any time

研究代表者

今村 勝 (Masaru, Imamura)

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号：80464006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：標的結合力を調整した新規HER2-CAR遺伝子を作成する前に、通常の標的結合力をもつ新規HER2-CAR遺伝子をT細胞に新規遺伝子を導入し、滑膜肉腫の細胞株に対して優れた抗腫瘍効果を示すことができた。次に新たに作成した新規遺伝子をNK細胞株であるKHYG-1細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入後、滑膜肉腫の細胞株であるSY0-1(4日間)とYamato-SS(2日間)を共培養し、抗腫瘍効果を検討した。SY0-1とYamato-SSともに新規遺伝子導入KHYG-1細胞は腫瘍効果を認めたと、コントロールとして作成した新規遺伝子を導入しなかったKHYG-1細胞との抗腫瘍効果に関する優越性は示せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HER2に対する新規CAR-NK細胞を作成し、その抗腫瘍効果を示すことができたが、コントロールに比べ優れた抗腫瘍効果を示すことはできなかった。理由としてNK細胞として用いたKHYG-1自体が持つ抗腫瘍効果が強力であったためと思われる。今後はその他のNK腫瘍細胞株であるNK92, YT, SNT-8に新規HER2-CAR-NKを遺伝子導入し、抗腫瘍効果を検討する必要がある。また、HER2に対する結合力を調整した新規遺伝子作成や凍結保存された臍帯血からのCAR-NK作成は今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Before creating a novel HER2-CAR gene with adjusted target-binding capacity, a novel HER2-CAR gene with normal target-binding capacity was transfected into T cells with the novel gene, which showed an excellent anti-tumour effect against synovial sarcoma cell lines. Next, the newly created novel gene was gene-transfected into KHYG-1 cells, an NK cell line. After gene transfer, the synovial sarcoma cell lines SY0-1 (4 days) and Yamato-SS (2 days) were co-cultured to investigate the anti-tumour effect. The newly created gene-transfected KHYG-1 cells showed tumour effects against both SY0-1 and Yamato-SS. However, no superiority in terms of anti-tumour effect compared with control could be demonstrated.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：CAR CAR-NK 細胞療法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

キメラ抗原受容体 (CAR) はがん細胞表面の特異抗原を認識する人工受容体で、CAR 遺伝子導入 T (CAR-T) 細胞は白血病・リンパ腫に対して顕著な効果を発揮しているが、難治性固形がんに対しては有効性を発揮できていない。理由の1つとして、CAR-T 療法に伴う合併症があげられる。CAR-T ががん細胞上の標的抗原と結合し過剰に活性化するサイトカイン放出症候群 (CRS)、移植片対宿主病 (GVHD)、神経障害は時に致命的である。また固形がんの標的抗原は通常正常組織にも微量に発現しており、正常組織上の抗原と CAR-T が結合してしまう on-target off-tumor toxicity も致命的となる。

CRS 対策の1つとして、抗原認識部位と標的抗原の結合能を調整 (減弱) させた CD19-CAR-T を用いた臨床試験が行われた (Ghorashian, et al. Nature med. 2019)。また、Liu らは T 細胞の代わりに凍結保存された臍帯血から増幅させた NK 細胞を用いた CD19-CAR-NK を難治性急性リンパ性白血病患者に投与し、重篤な CRS を認めることなく良好な治療成績を得たことを報告した。臍帯血移植は HLA 不一致でも GVHD のリスクが少ない。Liu らが使用した臍帯血は HLA アリルレベルで 4/6 適合が全 11 例中 9 例、2/6 適合が 1 例、1/6 適合が 1 例であったにもかかわらず、GVHD は認めなかった。(Liu, et al. NEJM 2020)。

### 2. 研究の目的

細胞療法による生存率をあげるには、治療効果を増強すると同時に致命的な副作用を減らす必要がある。加えて、誰にでも適切な時期に使えるのが理想である。本研究では、HER2 に対する結合力を調整した新規の CAR-NK を作成する。作成された CAR-NK を十分量増幅し、最適な殺腫瘍効果が得られるように遺伝子改変を行う。更に、凍結保存された臍帯血から CAR-NK を作成することにより、将来の OTS 製剤化を目指す。

### 3. 研究の方法

- ① HER2-CAR 遺伝子の新規作成  
HER2-scFv (モノクローナル抗体 FRP3 由来) に CD8 $\alpha$  ヒンジ、膜貫通ドメイン、共刺激因子、CD3 $\zeta$  を Splice by overlap extension PCR によりつなぎ合わせる。
- ② 新規 HER2-CAR-NK の作成  
NK 細胞株である KHYG-1 にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入する (Imai, et al. Blood 2005)。遺伝子導入後、KHYG-1 細胞上の HER2-CAR 蛋白の発現をフローサイトメトリーにて確認する。
- ③ 新規 HER2-CAR-NK の機能解析  
新規 HER2-CAR-NK (KHYG-1) を HER2 陽性の滑膜肉腫細胞株である SY0-1、Yamato-SS に対する細胞障害能を検討する。新規遺伝子を遺伝子導入しない KHYG-1 (mock) を対象とする。

・WST-8 試薬による細胞障害能: SY0-1、Yamato-SS と HER2-CAR-NK を異なる ET 比で、SY0-1 は 4 日間、Yamato-SS は 2 日間共培養後に残存腫瘍を評価する。

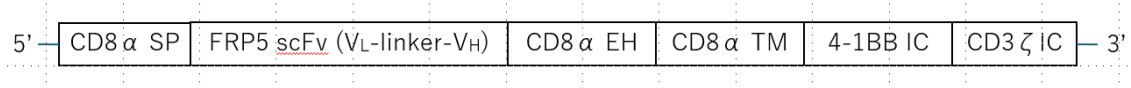
・iCELLigence real-time killing assay による細胞障害能 (Kasahara, Imamura, Imai, et al. Clin Transl Immunology 2020): SY0-1 と HER2-CAR-NK を異なる ET 比で 5 日間共培養し、リアルタイムで残存腫瘍を評価する。

### 4. 研究成果

- ① HER2-CAR 遺伝子の新規作成

新規抗 HER2-CAR 遺伝子のコンストラクトを作成した。模式図を図 1 に示す。

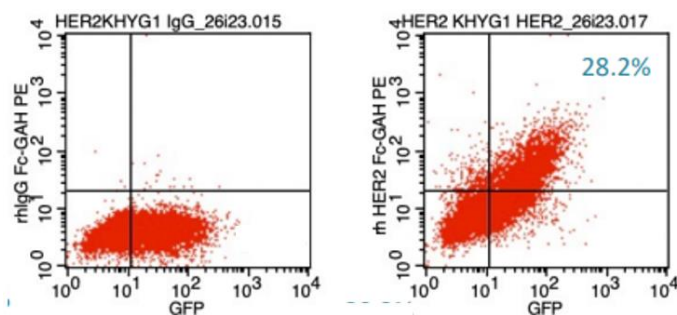
図 1 HER2-CAR 遺伝子の模式図



- ② 新規 HER2-CAR-NK の作成

新規抗 HER2-CAR 遺伝子を KHYG-1 に遺伝子導入したところ、28.2%の導入効率が得られた (図2)。

図2 新規遺伝子の HER2-CAR 遺伝子導入効率



③ 新規 HER2-CAR-NK の機能解析

・WST-8 試薬による細胞障害能：新規 HER2-CAR-NK は SYO-1、Yamato-SS いずれの腫瘍細胞株に対しても抗腫瘍効果を示したが、コントロールに比し優れた抗腫瘍効果を示すことはできなかった (図3A, B)。

図3A SYO-1 に対する細胞障害能

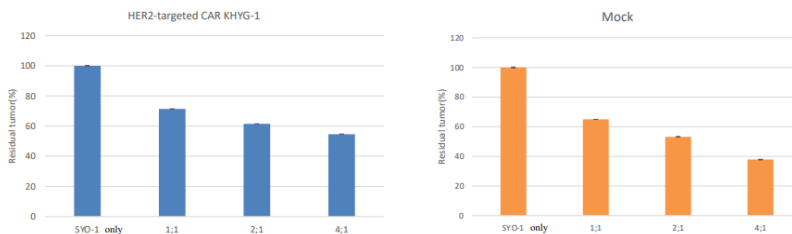
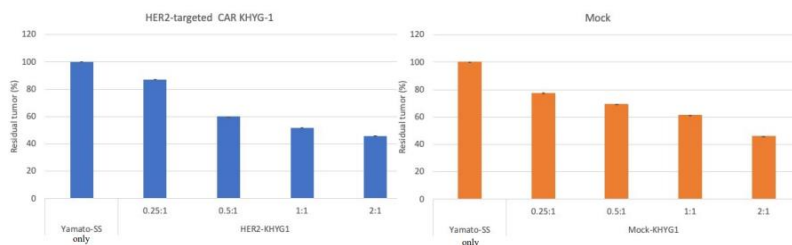
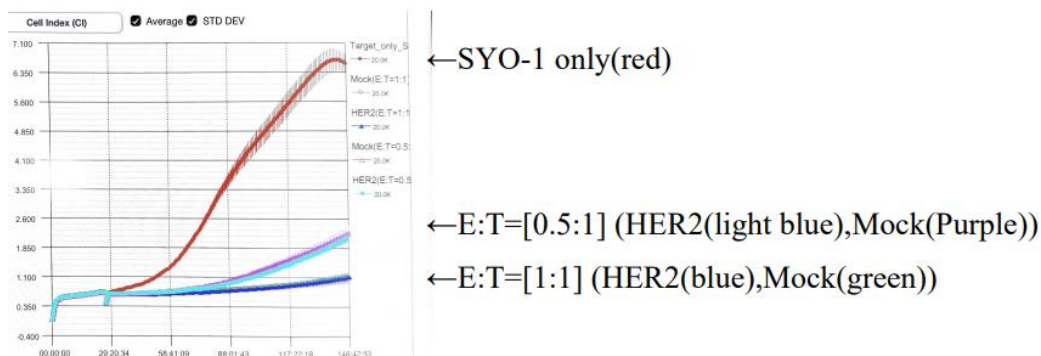


図3B Yamato-SS に対する細胞障害能



・iCELLigence real-time killing assay による細胞障害能：新規 HER2-CAR-NK は SYO-1 に対して抗腫瘍効果を示したが、コントロールに比し優れた抗腫瘍効果を示すことはできなかった (図4)。

図4 iCELLigence real-time killing assay を用いた SYO-1 に対する細胞障害能



以上の結果より、HER2 に対する新規 CAR-NK 細胞を作成し、その抗腫瘍効果を示すことができたが、コントロールに比べ優れた抗腫瘍効果を示すことはできなかった。理由としてNK 細胞として用いた KHYG-1 自体が持つ抗腫瘍効果が強力であったためと思われる。今後はその他のNK 腫瘍細胞株であるNK92, YT, SNT-8 に新規 HER2-CAR-NK を遺伝子導入し、抗腫瘍効果を検討する必要がある。また、HER2 に対する結合力を調整した新規遺伝子作成や凍結保存された臍帯血からの CAR-NK 作成は今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murayama Yudai, Kawashima Hiroyuki, Kubo Nobuhiro, Shin Chansu, Kasahara Yasushi, Imamura Masaru, Oike Naoki, Ariizumi Takashi, Saitoh Akihiko, Mihara Keichiro, Umezu Hajime, Ogose Akira, Imai Chihaya	4. 巻 14
2. 論文標題 Effectiveness of 4-1BB-costimulated HER2-targeted chimeric antigen receptor T cell therapy for synovial sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101227 ~ 101227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2021.101227	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 -

〔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	今井 千速  (IMAI Chihaya)  (90419284)	富山大学・学術研究部医学系小児科学・教授   (13101)	

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