

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860847

研究課題名(和文)NK細胞に3種のシグナルを同時に伝達する第3世代キメラ型人工受容体の新規開発

研究課題名(英文)Development of 3rd generation anti-CD19 chimeric receptor for primary natural killer cells

研究代表者

吉田 咲子(Yoshida, Sakiko)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：30535183

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)：既存の治療を行っても絶対的予後不良である小児再発・難治性白血病には新規治療の開発が必要である。健常ヒト primary NK細胞における抗CD19特異的キメラ型受容体のCD19抗原結合可変部位にCD3-zeta鎖をつなぎ(第1世代)、さらに4-1BBをつなぐと(第2世代)殺細胞効果が増強することが報告されてきた。この機能をさらに増強させるため、T細胞の共刺激因子を同時発現させた第3世代遺伝子改変キメラ受容体を作成し、受容体の発現および細胞障害活性を解析した。発現はコントロールと比較すると低い傾向であったが機能は保たれていた。発現および機能向上のためのさらなる工夫が今後の課題と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Development of new targeted therapy for primary refractory or relapse leukemia in childhood is needed to overcome cellular resistance to current chemotherapy. We previously reported genetic modification of primary human NK cells by enforced expression of anti-CD19 chimeric receptors linked to CD3 zeta; (1st generation chimeric receptor) and CD3 zeta plus 4-1BB signaling molecules (2nd generation) could markedly enhanced cytotoxicity against leukemic cells. To further enhance cellular functions, we developed the 3rd generation chimeric receptor with triple signaling molecules. The novel construct of the 3rd generation was successfully transduced with primary NK cells. Surface expression of the chimeric receptors was relatively low compared to 1st and 2nd generation, however, the function of cytotoxicity was confirmed as same level as previous generations. We plan to assess the potential for further improvement of surface expression and function of the 3rd chimeric receptor.

研究分野：医歯学

キーワード：遺伝子改変NK細胞療法 小児再発・難治性白血病

1. 研究開始当初の背景

新規薬剤の開発や治療研究成果の蓄積により、小児白血病の治療成績は年々向上しており、2000年に入ってから多くの治療研究グループが80%を超える5年生存率を報告している。そのため、再発、難治症例数は減少する一方で、より治療抵抗性となり既存の多剤併用化学療法や造血幹細胞移植を行っても移植後再発率は依然として高く、絶対的予後不良である。小児の再発、難治性白血病は絶対的予後不良であり新しい治療戦略が必要である。

小児白血病の多くを占める前駆B細胞性の急性リンパ性白血病(ALL)では通常ナチュラルキラー細胞(NK細胞)には抵抗性である。これに対し、健常ヒト末梢血から採取した primary NK 細胞を体外増幅させ、その primary NK 細胞に治療用遺伝子である抗 CD19 特異的キメラ型受容体遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入することで、前駆B細胞性 ALL 細胞株に対して細胞障害活性、NK細胞活性が増強されたことが報告されている (Imai C, et al. Leukemia18:676, 2004; Imai C, et al. Blood106:376, 2005)。これらの報告では、共刺激分子として CD3-zeta 鎖 (第1世代) および CD3-zeta 鎖と 4-1BB (CD137) シグナル分子を同時に発現 (第2世代) させた抗 CD19 特異的キメラ型受容体を遺伝子導入したところ、第2世代のキメラ型受容体の方が有為に前駆 B 細胞性 ALL 細胞株に対し細胞障害活性の増強を認めた。これらの報告から抗 CD19 特異的キメラ型受容体発現 NK 細胞による細胞療法は、前駆 B 細胞性 ALL に対する有用な治療方法として開発が期待されている。

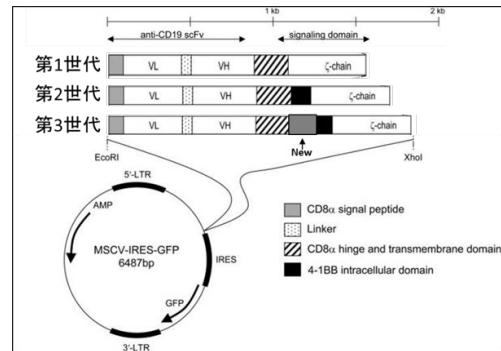
2. 研究の目的

申請者が所属する教室では、健常ヒト末梢血から採取した primary NK 細胞を対外増幅させ、治療用遺伝子である抗 CD19 特異的キメラ型受容体遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて導入し、NK細胞の殺細胞効果を増強させる実験をしてきた。キメラ型受容体は、CD19 抗原結合可変部位に CD3-zeta 鎖をつなぎ (第1世代) さらに 4-1BB (CD137) シグナル分子をつなぐと (第2世代) 殺細胞効果が増強する。申請者はさらに何らかのシグナル分子をつなぎ (第3世代) 殺細胞効果を増強させることで、抗 CD19 特異的キメラ型受容体による NK 細胞の機能を向上させ、小児再発・難治性白血病の新規治療開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 第3世代キメラ型受容体遺伝子発現レトロウイルスベクターの作成: CD19 抗原結合可変部位に CD3-zeta 鎖と 4-1BB (CD137) シグナル分子をつないだ第2世代キメラ型受容体に、T細胞の共刺激因子である CD28 を追加挿入させた第3世代キメラ型受容体遺伝子

発現レトロウイルスベクターを作成。CD19 抗原結合可変部位に CD3-zeta 鎖のみをつないだ第1世代と、第2世代、第3世代キメラ型受容体のそれぞれの機能解析を行った。



(2) 複数の健常提供者より末梢血を採取し、Ficollにより単核球分離を行った後、7日間 IL-2 入りの完全培地で K562-mb15-41BBL (改変型 K562 細胞株) と共培養させ、NK細胞の体外増幅を行った。K562 細胞株は HLA-class II とともに発現がなく極めて NK 細胞感受性が高いことから従来 NK 細胞活性の測定に用いられている。K562-mb15-41BBL とは、T細胞への活性化刺激を最小限に抑え、かつNK細胞の最大限の体外増幅・活性化を目的に作成された細胞株で、K562細胞に 4-1BB リガンドと modified IL-15 (membrane bound form) を発現させ作成された遺伝子改変 K562 細胞株である。

(3) K562-mb15-41BBL と共培養することで増幅した末梢血 primary NK 細胞中には、わずかに T 細胞が混入しているため、CD3 結合ビーズを用いて CD3 陽性細胞の除去を行った。純化した末梢血 primary NK 細胞に、様々なキメラ型受容体遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを用い遺伝子導入した。レトロウイルス液は 293T 細胞株を利用し作成した。事前に、Hela細胞を用いてレトロウイルスの Titer を測定しておき、multiplicity of infection (MOI) を揃えて transduction を行った。これらの方法で作成した抗 CD19 特異的キメラ型受容体を発現させた primary NK 細胞を高濃度の IL-2 投与下で 7~14 日間培養した。

(4) Transduction 後、7日から14日後にキメラ型受容体発現を確認した。細胞表面の受容体発現は、一次抗体に goat anti-mouse (Fab)2 polyclonal antibody conjugated with biotin、二次抗体に streptavidine PerCP を用い、フローサイトメトリーで検出した。

(5) 前駆 B 細胞性白血病細胞株に対しての機能解析:

直接の細胞障害活性: キメラ型受容体発現が確認できた primary NK 細胞を、前駆 B 細胞性 ALL 細胞株 (RS4-11) と共培養し、4~6 時間後に回収後、フローサイトメトリーを用いて生細胞中の前駆 B 細胞性 ALL 細胞株

の残存数を確認することで、直接的な細胞障害活性を測定した。

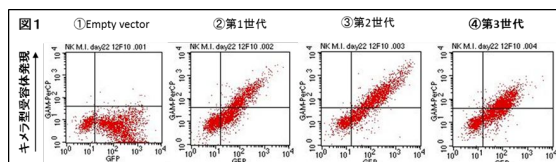
CD25 誘導：前駆 B 細胞性 ALL 細胞株 (RS4-11) と共培養して 24 時間後に、NK 細胞活性化を活性化シグナルである IL-2 chain CD25 の抗体を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 第 3 世代キメラ型受容体発現の確認

第 3 世代キメラ型受容体の発現は、これまでの第 1 世代、第 2 世代と比較すると発現が低かった (図 1)。第 1 世代、第 2 世代と比べ、レトロウイルスベクター内の遺伝子発現のための配列が長くなることで遺伝子導入率の低下の要因の一つと考えられた。同様の傾向は T 細胞での実験でもこれまでに報告されているため (Nguyen P, et al. Blood 102: 4320, 2003)、NK 細胞でも同様である可能性は否定できない。発現を向上させるためのさらなる工夫が必要と考えられた。また、T 細胞では発現が低くなるにもかかわらず、機能は向上されていたと報告されているため、NK 細胞でも同様であるのかを検討していく必要があると考えられた。

図 1.



(2) 直接の細胞障害活性

第 1 世代と第 2 世代での差がほとんどなく、これまでの報告の再現性が取れなかった (図 2)。原因として、一つにはレトロウイルスの Titer 確認や共培養時の細胞数のカウントなどが精密に行われなかった可能性が考えられた。実験の過程を見直し、より厳密に繰り返し実験を行うことで、まず第 1 世代と第 2 世代の細胞障害活性の差がこれまでの報告と同様に確認できれば、その後第 3 世代の細胞障害活性を改めて確認していく。また、もう一つには、NK 細胞の健常供血者によって細胞障害活性に違いを認めるというデータもあるため、より多くの健常供血者からの NK 細胞を用いて実験を繰り返すことで、同様のパターンなのかどうかを判断していく必要があると考えられた。

(3) CD25 誘導

直接の細胞障害活性と同様、第 1 世代と第 2 世代での差がほとんどなく、これまでの報告の再現性が取れなかった (図 3)。第 1 世代と第 2 世代との差がなかったため信頼性は低いものの、第 3 世代キメラ型受容体は (1) のように遺伝子発現が低いにもかかわらず CD25 誘導がより高い可能性が示唆された。この実験に関しても、健常供血者によるデータの違いを認めるため、より多くの健常供血者

からの NK 細胞を用いて実験を行い結果を比較することで、個々の NK 細胞の違いによる結果の違いがあるのかどうかを検討する必要があると考えられた。

図 2.

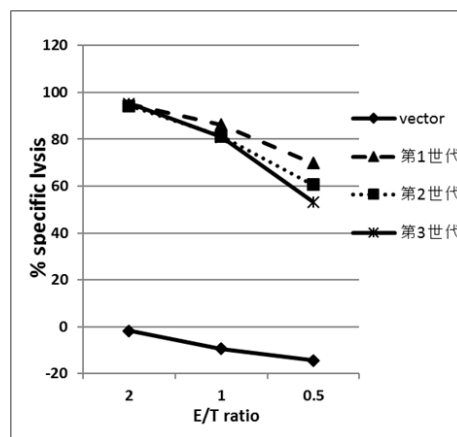
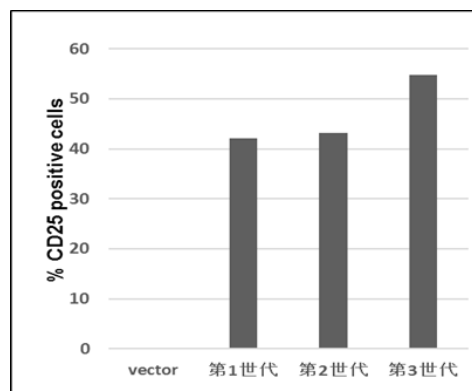


図 3.



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshida S, Tuscano E, Duong C, Chung J, Li Y, Beckett L, Tuscano JM, Satake N. Efficacy of an anti-CD22 antibody-monomethyl auristatin E conjugate in a preclinical xenograft model of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. E-pub ahead: Oct 5. p1-4. 2016. (May;58(5): p1254-1257. 2017.)

査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

Sakiko Yoshida, Emily Tuscano, Connie Duong, Joseph Tuscano and Noriko Satake. Efficacy of an Anti-CD22 Antibody-Monomethyl Auristatin E Conjugate in a Preclinical Xenograft Model of Precursor B Cell Acute Lymphoblastic

Leukemia.
56th American Society of Hematology Annual
Meeting and Exposition.
December 6-9, 2014.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 咲子 (YOSHIDA Sakiko)
新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員
研究者番号：30535183