

平成30年6月14日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860785

研究課題名(和文)NK細胞へのIL-21遺伝子導入：新たな細胞療法の開発

研究課題名(英文)Augmentation of the cytotoxicity of NK cells by IL-21 gene transduction

研究代表者

高地 貴行(Takachi, Takayuki)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70444164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：IL-21発現ベクターをクローニングし蛋白分泌型と膜結合型の2種類のIL-21遺伝子導入ベクターを作成した。NK細胞への遺伝子導入効率は平均90%以上であった。K562細胞とNK細胞を4時間共培養する系でMockに対しIL21導入NK細胞は約2倍の殺細胞効果を認めた。72時間共培養の系でさらに差を認めた。Jurkatに対しても抗腫瘍効果に差異を認めた。IL-21発現量増加と、パーフォリン/グランザイムBの高発現を確認した。IL21遺伝子導入NK細胞の寿命の延長は認めなかった。膜結合型と分泌型とで殺細胞効果に差はなかったが、膜結合型ではサイトカインによる毒性軽減の手段となりうる。

研究成果の概要(英文)：We transferred the IL-21 gene into primary NK cells with retroviral vector. The both membrane-binding and secretory type of IL-21 retroviral vectors were constructed. Average transduction efficiencies of IL-21 genes were over 90%. The cytotoxicity of gene-transduced NK cells against K562 and Jurkat cell lines was assessed by four-hour and 72-hour co-culture assay, which revealed augmentation of the cytotoxicity of IL-21 gene transferred NK cells. We confirmed the elevation of IL-21 expression and perforin and granzyme B production in gene-transferred NK cells. That may be one of the reasons of cytotoxicity augmentation. NK cell life span did not extend by both membrane-binding and secretory type of IL-21 gene transduction. While the cytotoxicity of the membrane-binding type would not achieve that of the secretory type, there was no significant difference for the cytotoxicity. The membrane-binding type is expected to reduce cytokine-release symptoms.

研究分野：小児悪性腫瘍

キーワード：細胞療法 NK細胞 遺伝子導入 小児悪性腫瘍 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

NK 細胞は、T リンパ球と異なり前感作を必要とせず、幅広いがん治療への応用が期待されている。欧米では、HLA 半合致血縁者からの大量 IL-2 短期培養 NK 細胞を単独投与する臨床試験が白血病、リンパ腫、骨髄腫、卵巣がん、乳がん、肺がんなどに対して複数実施されており、特に難治性 AML に対しては有望な初期成績が得られた (Blood 105:3051,2005 などの 7 論文)。NK 細胞療法では大量かつ高純度の NK 細胞を必要とする。さらに、大量 IL-2 で刺激後に輸注される NK 細胞は、輸注後に IL-2 刺激が消失するとアポトーシスが誘導される問題点がある。それに対する IL-2 の全身投与の試みでは、毛細血管漏出症候群などの重篤な副作用を招き、解決策が求められている。

申請者の所属研究室は、K562 改変細胞株である K562-mbIL15-4-1BBL を用いて、選択的に NK 細胞を体外増幅し、大量かつ高純度の NK 細胞を得る方法を確立している (Campana D and Imai C, US Patent No.7435596, 2008/No. 8026097, 2011)。体外増幅した NK 細胞では細胞障害活性やサイトカイン産生能は有意に向上するが、IL-2 を除去すると一定のアポトーシスが誘導される。そこで NK 細胞にレトロウイルスベクターにより IL-2 遺伝子を導入したところ、IL-2 除去下によるアポトーシスが抑制され、NK 細胞の生存期間は延長し、さらに IL-2 除去後の細胞障害活性も保持された (Imai C, Takachi T, et al. Blood; 112: 5437, 2008)。IL-2 はすでに臨床応用されたサイトカインであるという利点の一方で、大量 IL-2 は NK 細胞の増殖を促すと同時に Fas/FasL 系の誘導とその autocrine-loop によるアポトーシス誘導が生じるという欠点がよく知られている。

IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21 は共通ガンマ鎖サイトカインであり、IL-2、IL-7、IL-15 は NK 細胞の発生、分化増殖、生存に重要なサイトカインとして知られている。IL-21 は、T 細胞、B 細胞および NK 細胞の分化、増殖、活性化、生存などに関し多彩な作用を示し、腫瘍免疫増強を目的とした臨床応用が期待されている。NK 細胞に対する IL-21 の機能として、分化増殖促進、CD2/CD8/キラー細胞免疫グロブリン様 (KIR) 受容体などの誘導、IL-15 存在下でのインターフェロン(IFN)- γ 誘導、NK 細胞共受容体を介する細胞障害活性増強、IL-21 濃度依存性 (共通ガンマ鎖非依存性) アポトーシスの誘導などが知られている (Nat. Rev. Immunol. 5: 688, 2005)。IL-2、IL-7、IL-15 は主に STAT5 を介して作用するが、IL-21 は STAT3 の活性化を介して様々な生体機能に参与する。テロメア逆転写酵素 (TERT) の活性化もそのひとつである (Clin Exp Immunol. 172: 104, 2013)。MD アンダーソ

ンの研究グループの報告では、IL-21 を発現する feeder cell と共培養した NK 細胞では体外増幅効率の著明な向上が示された。本システムで刺激された NK 細胞ではテロメア長の延長が観察されており、細胞寿命延長効果は STAT3 を介した TERT の活性化によるものと考えられた (PLoS one ;7: e30264, 2012)。実際に、TERT 遺伝子を強制発現させた体外増幅 NK 細胞では、著しい細胞寿命の延長が報告されている (Br J Haematol. 145: 606, 2009)。

2. 研究の目的

本研究では、臨床応用を目的とした場合の問題点である、NK 細胞の体外増幅の培養終了後に起こるサイトカイン除去に伴う NK 細胞の機能低下を解決するために、IL-21 遺伝子導入により、NK 細胞の抗腫瘍効果の増強のほか、細胞寿命の延長を目指し以下の検討を行う。

NK 細胞に IL-21 遺伝子 (分泌型) を導入し、増幅効率、細胞寿命、アポトーシス抵抗性の変化を観察する。

サイトカインの全身的影響を最低限に抑えるために膜結合型 IL-21 遺伝子コンストラクトを作成し、分泌型と同等あるいはそれ以上の作用を有するかを比較検討する。

3. 研究の方法

(1) NK 細胞に、分泌型、膜結合型 IL-21 遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し、コントロール細胞との比較において、IL-21 産生 / 細胞外分泌、細胞増幅効率、細胞障害活性、IFN- γ 産生能などについて解析する。これらは通常 NK 細胞の体外増幅法と同様に IL-2 存在下で行う。

(2) IL-2 除去下でアポトーシス誘導、細胞寿命を定量的に評価する。また IL-2 除去後の細胞障害活性について、コントロール細胞と比較する。

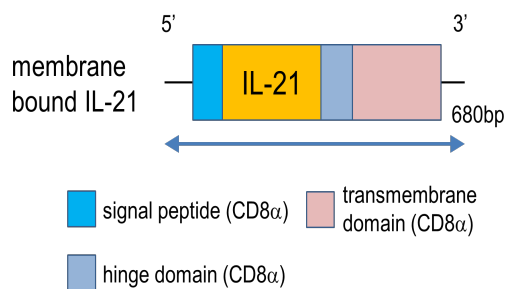
(3) すでに作成済みの IL-2、IL-7、IL-15 遺伝子についてレトロウイルスベクターを用いて各遺伝子導入した NK 細胞と、本研究で作成した IL-21 遺伝子レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した NK 細胞を比較して機能解析を行う。

(4) 分泌型あるいは膜結合型の IL-21 遺伝子導入 NK 細胞の有効性を見出した場合、難治性白血病あるいは小児固形腫瘍に対する NK 細胞療法を、マウスモデルを用いて検証し有効性を確認する。

4. 研究成果

(1) wild type IL-21 (wtIL-21) cDNA を体外で活性化した健常人ドナーT 細胞を活性化し PCR クローニングした。分泌型 IL-21 レトロウイルスベクターを作成した。膜結合型 IL-21 遺伝子導入レトロウイルスベクターの配列は、CD8 のシグナルペプチド、ヒンジドメイン、膜貫通部ドメインを同様に PCR クローニングし、これらの部位を SOE-PCR 法を用いて、IL-21 遺伝子と連結し作成した(図1)。レトロウイルスベクターは MSCV-IRES-GFP を用いた。作成したレトロウイルスベクターを用いて 293T 細胞にトランスフェクションした後、NK 細胞に遺伝子導入した。

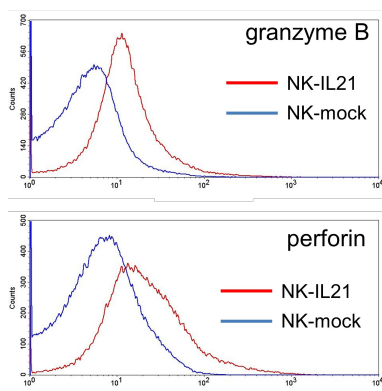
図1 膜結合型 IL-21 遺伝子導入ベクター



Mock-ウイルスベクターも同時に作成し比較検討した。Mock と wtIL-21 (分泌型) の NK 細胞への遺伝子導入効率率はそれぞれ、中央値 99.0% (74.5-97.1%, n=7), 90.9% (72.7-95.1%, n=6) と有意差を認めなかった。

(2) IL-21 はインターフェロンの分泌を促進するほか、同時にパーフォリン、グランザイム B の産生亢進も細胞障害活性を高める機序として知られる。そこで、IL-21 遺伝子導入 NK 細胞の細胞質内のパーフォリンとグランザイム B の発現への影響を FACS で解析したところ、IL-21 遺伝子導入によりグランザイム B、パーフォリン双方の産生量の増加を認めた(図2)。

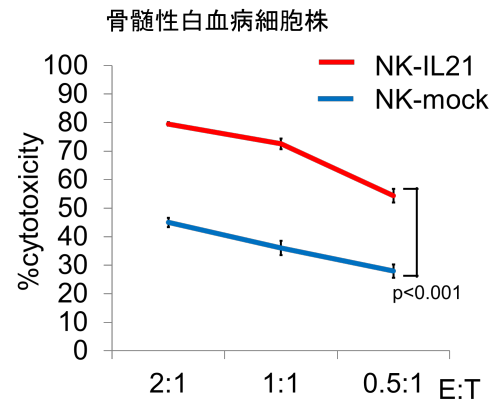
図2 IL-21 遺伝子導入後のパーフォリン、グランザイム B の発現の変化



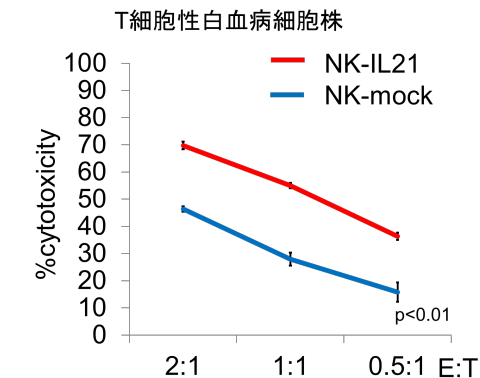
(3) 細胞障害活性を評価するため、K562 細胞株と Jurkat 細胞株を用いて解析した。Mock-、wtIL-21-遺伝子導入 NK 細胞を用いて両細胞株と共培養し、4 時間後の残存腫瘍細胞率を算出して比較した。E/T 比を 2:1、1:1、0.5:1 とした。IL-21 遺伝子導入 NK 細胞の殺細胞効果は有意差をもって増強していた(図3)。

(図3) 分泌型 IL-21 発現 NK 細胞の抗腫瘍効果 (4 時間 短時間共培養)

A) 骨髄性白血病細胞株に対する抗腫瘍効果



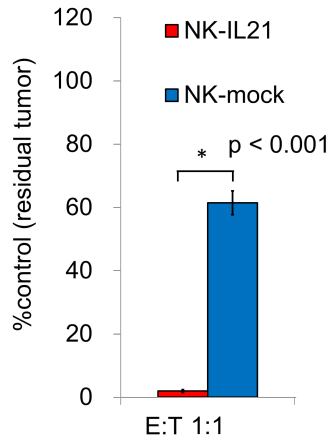
B) T 細胞性白血病細胞株に対する抗腫瘍効果



短時間の共培養系のみでなく、72 時間の共培養系でも検討した。E/T 比は 1:1、0.5:1、0.25:1 とした。Mock-NK に比して明らかな細胞活性の著名な増強を示した(図4)。分泌型 IL-21 遺伝子と膜結合型 IL-21 遺伝子導入した NK 細胞の寿命に関しては、IL-2 非添加状態で培養し生細胞率を比較したが、明らかな有意差は認めなかった。

(図4) 分泌型 IL-21 発現 NK 細胞の抗腫瘍効果 (72 時間共培養)

骨髄性白血病株に対する抗腫瘍効果 co-culture with IL-2 (100U/ml)



(4) 分泌型と膜結合型とで IL-21 遺伝子導入 NK 細胞の殺細胞効果の差異を検討した。K562 細胞株との 4 時間の共培養後の K562 生細胞率を比較した。Mock-NK 細胞と比較すると分泌型、膜結合型の IL-21 遺伝子導入 NK 細胞の殺細胞効果は有意差をもって向上している。E/T 比が 1:1 で NK-mock により 40%の細胞を死滅させたのに対し、IL-21 発現 NK 細胞は 95%以上を死滅させ、顕著な差を示した。E/T 比を 0.5:1, 0.25:1 としても有意差をもって殺細胞効果を示した。しかし、分泌型、膜結合型では殺細胞効果に有意差は認めなかった(データ非表示)。

以上の結果から、レトロウイルスベクターによる NK 細胞への IL-21 遺伝子導入効率は良好であり、IL-21 遺伝子導入 NK 細胞は、白血病細胞に対する殺細胞効果が増強していた。パーフォリン、グランザイム B の産生増加をきたすことがその一因であることが分かった。また分泌型 IL-21 産生 NK 細胞と、膜結合型 IL-21 発現 NK 細胞とでは抗腫瘍効果に有意差は認めなかった。膜結合型 IL-21 発現 NK 細胞療法はサイトカイン産生による症状の発現を抑制する手段になりうると推測された。これまでの共通鎖をもつサイトカイン遺伝子導入 NK 細胞による抗腫瘍効果と比して劇的な殺細胞効果増強はないと評価し、本研究ではマウスモデルでの in vivo での検証は試みなかった。

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)

Interleukin-21 Gene Transduction in Human Natural Killer Cells Enhances Their Anti-Leukemic Capacity
 Yasushi Kasahara, Changsu Shin, Takayuki Takachi, Haruko Iwabuchi, Masaru Imamura, Akihiko Saitoh and Chihaya Imai
 Blood 2015 126:5425; (Publication only)

[学会発表](計1件)

ヒト primary NK 細胞へのインターロイキン 21 遺伝子の導入は抗白血病作用を増強する Genetic engineering of primary natural killer cells with human Interleukin-21 enhances their antileukemic capacity.
 笠原靖史 申将守 高地貴行 岩淵晴子 今村勝 齋藤昭彦 今井千速
 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 (2016.12 東京 品川)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高地 貴行 (TAKACHI, Takayuki)

新潟大学医歯学総合病院 特任助教

研究者番号: 70444164

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

笠原 靖史 (KASAHARA, Yasushi)