

令和 6 年 4 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04832

研究課題名(和文)我々が新しく発見したNK細胞subsetの機能解明と養子免疫治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the function of the new NK cell subset and its application to adoptive immunotherapy

研究代表者

米満 吉和 (Yonemitsu, Yoshikazu)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40315065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に見出し、細胞製剤としての臨床開発を開始したNK細胞様細胞(開発コード：GAIA-102)の生物学的な意義を、特にEmergency NKとしての性質の観点から解析し、臨床応用のための基礎データを取得した。遺伝子発現パターン、メチレーションパターン、Memory-like NKとの類似点/相違点などから、この細胞が特に固形腫瘍に対する高い傷害活性を有するメカニズムの一端が明らかとなり、進行中の治験結果と合わせて有望な臨床成果をもたらすための重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形腫瘍を対象とする養子免疫療法としての実用化を目指す上で、GAIA-102のような特異な形質(固形腫瘍の傷害能がin vitro/in vivoで共に極めて高い)を持つ細胞の特性を解析することは、有効性及び安全性の観点から意義深い。本研究の最終目標であるGAIA-102の生物学的特性の解明は、社会的に大きな課題である悪性腫瘍に対する治療体系に変革をもたらし得ると考える。悪性腫瘍を根治させることが可能な免疫治療がもたらしたパラダイムシフトは今後、免疫システムの理解によってその活用が促進されることを想定し、重要なエフェクターの一つであるNK細胞のバイオロジーを紐解く意味でも社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We initiated clinical development for a novel NK-like cell therapy, designated GAIA-102, to investigate its biological significance as "Emergency NK" cells and acquire foundational data for clinical applications. Our analyses focused on gene expression and methylation patterns, highlighting the similarities and differences with memory-like NK cells. These studies uncovered mechanisms behind GAIA-102's pronounced cytotoxic activity against solid tumors. Combined with ongoing clinical trial results, GAIA-102 demonstrates potential for substantial clinical outcomes in treating solid tumors.

研究分野：腫瘍免疫学、病理学

キーワード：NK細胞 GAIA-102 固形腫瘍 養子免疫 再生医療等製品 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤 (ICPI: immune checkpoint inhibitor、特に抗 PD-1 抗体) そしてキメラ遺伝子導入 T 細胞 (CAR-T) の登場により、がん三大標準治療 (手術、放射線、化学療法) に続く第 4 の治療として、がん標準治療を激変させつつある。特に CAR-T を含む「養子免疫療法 (adoptive immunotherapy)」は、進行がんを根治させるポテンシャルを有することが、この分野のパイオニアである Steven Rosenberg 博士からも強く示唆されている (Raising the Bar: The Curative Potential of Human Cancer Immunotherapy. *Sci Transl Med.* 2012;4:127ps8)。

以上の背景から現在 CAR-T の研究開発が世界中で活発化しているが、その製剤開発上の問題点として、<1>固形がんへの効果が依然低い、<2>製剤化に望まれる「他家」T 細胞による GvHD 予防のための複雑な遺伝子改変が必須、<3>高頻度に見られる神経系浮腫やサイトカインストームなどの致死副副作用、があり、開発が思うように進まないジレンマに陥っている。そんな中、もう一つの重要な effector である Natural killer (NK) 細胞による養子免疫治療に大きな進展が見られた。それは MD Anderson がんセンターによる他家臍帯血由来 CD19 CAR-NK (奏効率: CAR-T に匹敵、安全性: 脳浮腫・サイトカインストーム無し) (Lie E, et al. *N Engl J Med.* 2020;382:545-553)、そして Washington 大学による他家造血幹細胞移植併用 memory-like NK の臨床成績 (奏効率: 100%、完全寛解 15 例全例) (ASH, Innate Killer Summit 2020) という驚くべき結果である。ただ現時点で、これまでなかなか有効性を証明出来なかった NK 細胞による養子免疫治療が、なぜ CAR 遺伝子導入あるいは memory-like NK で効果を発揮し始めたのかについては明らかになっていない。

これらの動きとは全く独立して、我々は ICI を含む CTL 依存性治療に対する補完技術として、NK 細胞の *ex vivo* 増幅・活性化培養技術の開発に 2009 年より取り組み、3 年間の検討の末、ようやく技術の確立に成功した (開発コード: GAIA-102、Saito S, et al. *Hum Gene Ther Methods* 2013、国内特許登録 5572863, 5989016, 5511039, 6164650 他、複数申請中)。この技術は特に、<1>固形がんにおいて強力な殺傷効果を示すことに加え、<2>担がんマウスのエフェクター細胞を活用してがん特異的な抗腫瘍免疫を誘導することが明らかになったことから、臨床開発が AMED 臨床研究・治験推進研究事業にて支援を受け製剤化開発がほぼ完了すると共に、九大発バイオベンチャー (GAIA BioMedicine 社: <http://gaiabiomed.com>) に導出され、2021 年春からの治験準備に入っている。

2. 研究の目的

我々が開発した GAIA-102 は「一体如何なる NK 細胞なのか?」、即ち、<1>体外で調整された、あくまで「人工的 (artificial) な NK 細胞」なのか?、あるいは、<2>これまで見過ごされて来た「ある段階・ある病態で生体内に出現 (physiological/pathological) する NK 細胞」なのか? という問いに結論を出すことが本研究の目的である。本研究は、<1>我々が独自の細胞培養系 (特許取得済) で新規に発見し、<2>これまでに報告された NK 細胞のあらゆる phenotype にも合致しない全く新しい細胞集団 (特許取得済) であり、<3>全く新しい「Emergency NK」という概念を確立することを意図した、学術的観点から独自の・創造的かつ意欲的な研究である。またそもそも、この新しい細胞集団 (GAIA-102) の培養技術は養子免疫治療への応用を前提に開発されたものであり、この研究の成功により、GAIA-102 はがんのみならず重度の感染症への応用も可能になる。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 分化・増幅培養系を用いた検討

：我々が特許を有する GAIA-102 の培養系のアドバンテージをフルに活用する。

(2) *in vivo* (マウス) における NK 細胞 (ヒト) 分化増幅培養系の構築と検討

：(1) で得られた情報を基に、「Emergency」NK と memory-like NK を特徴付ける 各分子・細胞群を *vivo* で再確認する。

(3) ヒト病態における「Emergency」NK 細胞の存在の検証

：以上で得られた知見を総合し、患者検体での本細胞の存在を証明する。

GAIA-102 は再生医療等製品として臨床開発が進められており、その GMP/GCTP 製造 SOP の整備が並行して進められていたことから、当該プロジェクトでの製造方法に準じて細胞の調製を行った。フローサイトメーターを用いた各種抗原発現パターンの検証、セルソーターを用いた表面抗原発現パターンに基づく細胞分取と機能評価、網羅的発現解析、そして *in vivo* での機能解析をメインに GAIA-102 の生物学的特性の解析を進めた。

4. 研究成果

Washington 大学のグループより初めて報告された「サイトカイン(IL-12/15/18)誘導性 memory-like NK」は、それ以前に報告されていたヒトサイトメガロウイルス(CMV)再感染 に対する NK 細胞の即応性(即時型の強力なインターフェロン :IFN-g 産生)を指標として 同定された(Romee et al. Blood 2012)。我々によるこれまでの予備的な検討では、この memory-like NK と GAIA-102 には、通常の活 性化 NK 細胞にはほとんど発現が無い/微弱である活性化分子群(NKp30 など)や ケモカイン 受容体群(CCR5/CCR6/CXCR3 など)の発現レベル・パターンについて類似性があり、 加えて GAIA-102 には memory-like NK と同様に、IL-12/15/18 刺激に対する強力な即時型の IFN-g 産生を示すことを明らかにしてきた。そこで本研究では特許取得済みの GAIA-102 の培養系の アドバンテージを最大に活かすことにより、これまでの知見を更に網羅的に拡張し、以下の各点 を重点的に検証した。

<1>遺伝子発現解析による GAIA-102 と memory-like NK の特徴の明確化

遺伝子発現アレイデータの 3 次元マッピング(PCA: Principal Component Analysis)+遺伝子クラス タリング解析による GAIA-102 と memory-like NK の異同に関する検証を進めた (図 1)。

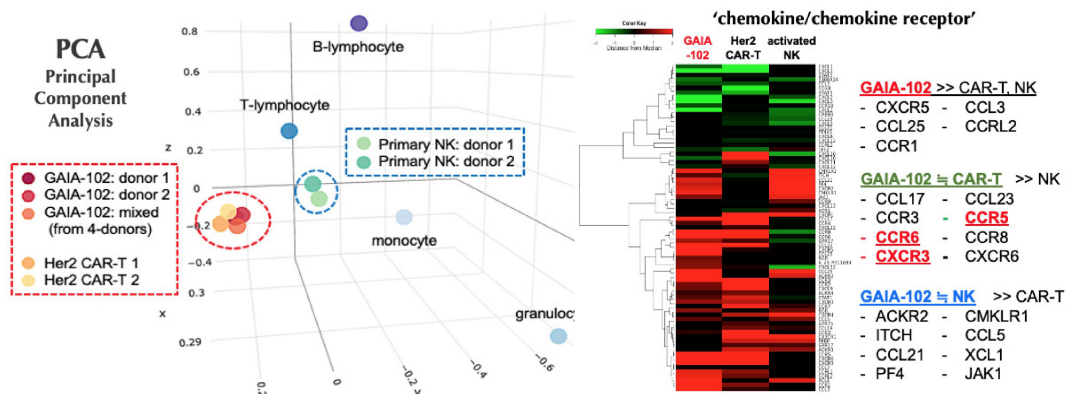


図 1:(左図)健康人血球細胞(T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、顆粒球)と GAIA-102(2 ドナー個別培養、4 ドナー混合培養)、Her2 CAR-T(2 ロット)の遺伝子発現をアレイにて定量化し、3 次元マッピングした。Her2 CAR-T と GAIA-102 はそれぞれの母細胞である T 細胞・NK 細胞とは全く異なるパターンを示し、類似の細胞であることが明らかとなった。(右図)同じアレイデータをクラスタリング解析した上で、heat-map 表示した。特にここでは、腫瘍局所への trafficking に必要なケモカイン・ケモカイン受容体群を示す。GAIA-102 は CAR-T に類似するクラスター、あるいは NK 細胞に有するクラスターがある一方、双方とは異なる独自のパターンを示す遺伝子群クラスターも存在する。

<2>エピジェネティック解析による GAIA-102 と memory-like NK の特徴の明確化

Memory-like NK に特徴的な IL-12/15/18 に対する即時型の強力な IFN-g 産生は、わずか 16 時間で惹起されるため、誘導時にエピジェネティックな変化を受けている可能性が高いと考え、これを GAIA-102 と memory-like NK における、DNA メチル化パターンに対する bisulfite sequencing 法により明らかとした (図 2)。

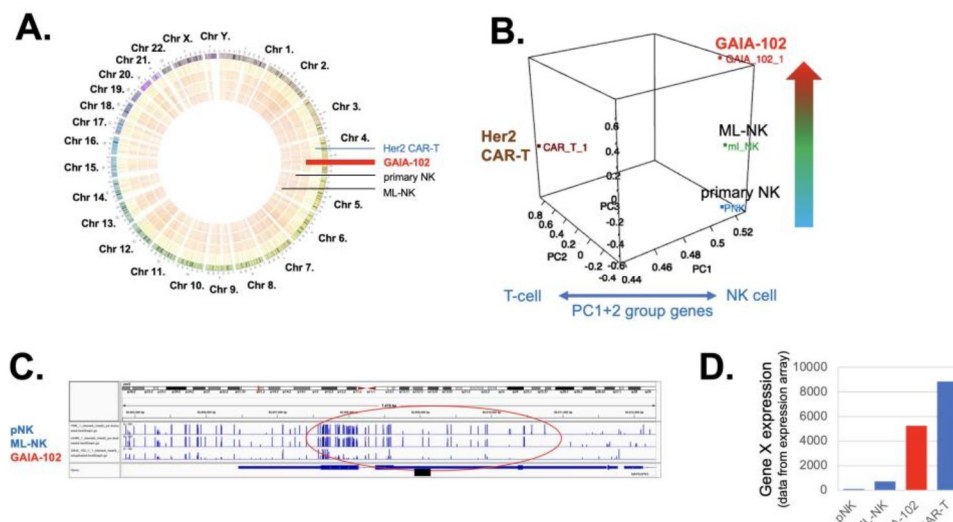


図 2:

(A) Genome-wide な methylation cluster の分布(heat-map)

NK 細胞由来の pNK/ML-NK/GAIA-102 は全体的に類似しており、T 細胞由来の CAR-T とは異なるパターンを示した。

(B) メチル化に対する PCA 解析による、各細胞の空間的プロット

PC1+PC2 グループの遺伝子群を用いることにより、CAR-T と NK 細胞由来の 3 細胞種は、明らかに異なることがわかる。一方 PC3 グループの遺伝子群は primary-NK/ML-NK/GAIA-102 の順に直線的に配置されており、primary NK から GAIA-102 への分化ベクトルの存在が示唆され、更にその中途に ML-NK が存在することが示唆される。

(C) 特徴的な methylation pattern を示す Gene X(非公開:JAK/STAT pathway の制御因子)

Gene X をコードする遺伝子領域では、GAIA-102 にのみ多くの脱メチル化が見られ、Gene X の発現量に変

化がある可能性が示唆される。

(D) Gene X の mRNA 発現アレイ比較データ

NK 細胞由来の 3 種の細胞のうち、Gene X は GAIA-102 で強発現し、CAR-T に類似する。

<ML-NK と GAIA-102 の「類似点」>

ML-NK(原法: Romee R, et al. Blood 2012 の通りに作成)と GAIA-102 の比較検討より、類似点として以下が明らかとなった。

- ・末梢血 NK 細胞と異なり、CD56bright/CD3-/CXCR3+/CCR5+他、似通った表現形を示す
- ・IL-12/15/18 の共刺激により、強力に IFN-gamma を発現する

<ML-NK と GAIA-102 の「相違点」>

逆に GAIA-102 と CAR-T、ML-NK との相違点を明確にするために、genome-wide な methylation の状態を解析し、視覚化するために mapping した。その結果以下のことが明らかになった。

・Genome-wide な methylation cluster の分布については、NK 細胞由来の primary- NK/ML-NK/GAIA-102 は類似しており、T 細胞由来の CAR-T とは異なるパターンを示した。

・PCA でも、PC1/PC2 次元においては、CAR-T と NK 細胞由来の 3 細胞種は、明らかに異なっていた。一方 PC3 では primary-NK/ML-NK/GAIA-102 の順に直線的に配置されており、別途実施した解析に基づく樹形図と照らし、ML-NK は pNK から GAIA-102 へ活性化が進む途中に存在することが示唆された。

・微視的に調べて行くことで、特徴的な methylation pattern を示す Gene X(未公表:JAK/STAT pathway の制御因子)の存在を同定した。Gene X をコードする遺伝子領域では、GAIA-102 にのみ多くの脱メチル化が見られることがわかり、Gene X の発現調整に変化がある可能性が示唆された。

- ・Gene X は GAIA-102 で強く発現しており、CAR-T に類似することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 米満吉和
2. 発表標題 再生医療等製品を取り巻く諸問題：特に薬価について
3. 学会等名 琉球大学AMED再生事業シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshikazu Yonemitsu
2. 発表標題 MANUFACTURING: Optimizing Cell Expansion Protocols for High Quality Product Yeild GAIA-NK: Off-the-shelf 'NK-like' cell product that can eliminate solid tumors
3. 学会等名 7th Innate Killer Summit (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yoshikazu Yonemitsu
2. 発表標題 GAIA-NK: Off-the-shelf 'NK-like' cell product that can eliminate solid tumors
3. 学会等名 Oncology Immunotherapy Webinar Virtual Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米満吉和
2. 発表標題 固形がんを破壊可能な新しいNK細胞様フェノタイプGAIA-NKの臨床開発
3. 学会等名 第28回 日本遺伝子細胞治療学会 (JSGCT2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米満 吉和
2. 発表標題 血管生物医学のイノベーション
3. 学会等名 第29回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshikazu Yonemitsu
2. 発表標題 Designing Expansion Protocols to Induce Desirable Phenotypes for Solid Tumor Therapy
3. 学会等名 Innate Killer Summit 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 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、特願2021-146461	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	原田 結 (Harada Yui) (00608507)	九州大学・薬学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	和田 健一 (Wada Kenichi) (20525919)	九州大学・薬学研究院・特任准教授 (17102)	

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