

令和元年6月14日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10767

研究課題名(和文) EGFRvIII特異的CAR導入免疫細胞を用いた膠芽腫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of immunotherapy for glioblastoma using EGFRvIII specific CAR transduced immune cells

研究代表者

西村 文彦(Nishimura, Fumihiko)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70433331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫の40%程度が発現している抗原EGFRvIIIをターゲットとし、EGFRvIII特異的キメラ受容体発現natural killer細胞(KHYG-1)を用いてEGFRvIII発現U87腫瘍細胞に対する増殖抑制試験を行い腫瘍増殖抑制効果を得た。またapoptosis detection assayでもEGFRvIII特異的キメラ受容体発現KHYG-1がEGFRvIII発現U87腫瘍細胞に対して腫瘍抗原特異的にapoptosisを誘導することを確認した。以上の成果をANTICANCER RESEARCH 38:5049-5056(2018)に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性神経膠芽腫に対する治療の3本柱は、手術、化学療法、放射線治療であるが、それでも難治性の腫瘍であるため、治療が非常に有効な可能性のある免疫療法が必要である。我々は、免疫細胞であるナチュラルキラー細胞株に、遺伝子導入を用いて、腫瘍抗原特異的なキメラ受容体を導入し、腫瘍増殖抑制効果と、腫瘍抗原特異的なアポトーシスが誘導されることを証明した。この基礎研究により、将来的に臨床応用の可能性も考えられ、学術的にも社会的にも意義があると考えられる。今後は、さらに動物実験などでのキメラ受容体発現ナチュラルキラー細胞の抗腫瘍効果を評価していきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Among glioblastoma cells, 40% of tumor cells express EGFRvIII antigen. Using tumor growth inhibition assay, we have proved EGFRvIII tumor antigen specific chimeric antigen receptor(CAR)-natural killer(NK)cells(KHYG-1) have an ability to inhibit the tumor growth of U87 tumor cell line which expressed EGFRvIII antigen. Also, using apoptosis detection assay, we have proved that EGFRvIII-CAR-NK-KHYG-1 induced tumor antigen specific apoptosis against U87. We reported those results on ANTICANCER RESEARCH 38:5049-5056(2018).

研究分野：脳腫瘍

キーワード：悪性神経膠芽腫 キメラ受容体 ナチュラルキラー細胞 EGFRvIII アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

(1) 研究開始当初の背景

膠芽腫は手術、放射線療法、化学療法をもってしても予後不良の腫瘍であり、革新的な治療法の開発が切望されている。一方で、がんに対する遺伝子免疫細胞治療の研究が現在非常に注目されている。中でも、がん関連抗原に対する単鎖抗体(single-chain variable fragment: scFv)と細胞シグナル伝達分子 CD28、4-1BB、CD3 を連結させたキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR) 遺伝子をウイルスベクターで免疫細胞の 1 種である

型 T 細胞に導入した CAR-T 細胞を用いた臨床研究が行われており(図 1, 2)、既に白血病に対する CD19 特異的 CAR-T 細胞の有用性が報告されている (Lee DW et al. Lancet 2015)。

膠芽腫においても CAR-T 細胞を用いた研究が実施されている。中でも膠芽腫症例の約 40% で発現する epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) 特異的 CAR-T 細胞の膠芽腫に対する抗がん効果が報告されており、臨床応用が期待されている (Ohno M et al. J immunother cancer 2013)。これまでに、型 T 細胞とはがん細胞に対する認識機構が異なり、ヒト白血球抗原 (Human leukocyte antigen: HLA) 非拘束性にごん細胞を認識する Natural killer (NK) 細胞や型 T 細胞に EGFRvIII 特異的 CAR を導入し、膠芽腫に対する抗がん効果を評価した研究は報告されていない。

筆者らは、ヒト型 T 細胞の増幅培養法を既に確立しており、本細胞の膠芽腫細胞株に対する細胞傷害活性が骨粗鬆症薬 Bisphosphonate によって強力に誘導され、その認識機構に型 T 細胞受容体が関与することを報告している (Nakazawa T, Nishimura F et al. J neuro-oncology 2014)。また、膠芽腫に対して Lymphokine-activated killer (LAK) と呼ばれる NK 細胞輸注療法が実施されているが、我々は LAK 療法に採用されていた培養法よりも NK 細胞の純度 (98 ± 2%、LAK は 36 ± 16%)、増幅倍率 (206 ± 3 倍、LAK は 51 ± 17 倍) が高い増幅培養法を確立している。本細胞は抗がん剤であるテモゾロマイドに耐性の膠芽腫細胞株に対して増殖抑制効果を示すことを確認している (未発表)。ヒト型 T 細胞ならびに NK 細胞に EGFRvIII 特異的 CAR を導入することで、双方の細胞のがん細胞認識機構の多様性をさらに高めることが可能となり、不均一な細胞集団で形成される膠芽腫組織において効果的な抗がん効果を誘導できる可能性がある。

2. 研究の目的

膠芽腫細胞に発現するがん変異抗原 epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) に特異的な chimeric antigen receptor (CAR) 遺伝子をレンチウイルスベクターを用いて Natural killer (NK) 細胞に導入し、膠芽腫細胞に対する抗がん効果を評価する。

3. 研究の方法

(1) EGFRvIII 特異的 CAR 発現レンチウイルスの準備

Elongation factor-1 遺伝子プロモーターの下流に EGFRvIII 抗体の抗原結合部位と CD28、4-1BB、CD3 の細胞内ドメインを連結させた CAR 遺伝子を挿入した Self-inactive (SIN) 型レンチウイルスベクターを gag / pol / RRE 発現ベクターである pMDLg/pRRE、Rev 発現ベクターである pRSV-Rev、VSV-G 発現ベクターである pMD2.G の 3 つのベクターとともに HEK293T 細胞に導入し、EGFRvIII 特異的 CAR 発現レンチウイルスを作製する。

(2) 細胞の準備

A. ヒト膠芽腫由来細胞株

ヒト膠芽腫由来細胞株である EGFRvIII 非発現および発現 U87MG を用いる。10% FBS 含有 DMEM 培地にて 37℃、5% CO₂、湿度 100% の環境で継代培養を行う。

B. EGFRvIII 特異的 CAR の NK 細胞への導入

増幅培養した NK 細胞株(KHYG-1)に EGFRvIII 特異的 CAR 発現レンチウイルスを加えて、2~3 日培養し、遺伝子導入を行う。樹立した細胞については FITC 標識ヒト Fab 抗体で染色し、EGFRvIII 特異的 CAR の発現をフローサイトメータを用いて解析する。

C. **細胞増殖抑制試験**: EGFRvIII 発現 U87MG と IP-10 と EGFRvIII 特異的 CAR 発現 NK 細胞もしくは T 細胞を混合し、4 日間の培養を行う。得られた腫瘍細胞について、トリパンブルー染色法を用いて生存細胞数を算定する。

D. **Apoptosis detection assay**: annexin V を用いて EGFRvIII-CAR-NK(KHYG-1)の EGFRvIII 発現 U87 腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導効果をフローサイトメトリーで評価する。

4. 研究成果

当初健常者末梢血由来の NK 細胞に遺伝子導入しようと試みたが、導入効率が低かったため、KHYG-1 の NK cell line を用いて、遺伝子導入を行った。導入効率を高めるために磁器ビーズを用いて、純度を高めた。EGFRvIII 特異的 CAR-NK(KHYG-1)を用いて、EGFRvIII 発現 U87 細胞に対する growth inhibition assay を行い、腫瘍増殖抑制効果を得た。また apoptosis detection assay でも、EGFRvIII 特異的 CAR-KHYG-1 が、EGFRvIII 発現 U87 腫瘍細胞に対して、腫瘍抗原特異的に apoptosis を誘導することを確認した。以上の成果を ANTICANCER RESEARCH 38:5049-5056(2018)に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells.

Murakami T, Nakazawa T, Natsume A, Nishimura F, Nakamura M, Matsuda R, Omoto K, Tanaka Y, Shida Y, Park YS, Motoyama Y, Nakagawa I, Yamada S, Tamura K, Takeshima Y, Takamura Y, Wakabayashi T, Nakase H

ANTICANCER RESEARCH 38:5049-5056(2018)

Doi: 10.21873/anticancer.12824

査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

Establishment of an efficient ex-vivo expansion method for highly purified human natural killer cells and evaluation of their antitumor activity on glioblastoma.

Nakazawa T, Tanaka Y, Shida Y, Nakamura M, Nishimura F, Matsuda R, Murakami T, Nakagawa I, Motoyama Y, Tsujimura T, Nakase H.

Keystone Symposia: Innate and Non-Classical Immune Cells in Cancer

Immunotherapy 2019年3月

Novel Human NK Cell Line Carrying CAR Targeting EGFRvIII Induces Antitumor Effects in Glioblastoma Cells

Murakami T, Nakazawa T, Nishimura F, Natsume A, Wakabayashi T, Nakase H

European Association for Cancer Research: Defence is the Best Attack: Immuno-Oncology Breakthroughs 2019年3月

Novel human NK cell line carrying CAR targeting EGFRvIII induces antitumor effects
in glioblastoma cells in vitro

村上敏春、中澤務、夏目敦至、西村文彦、中村光利、松田良介、至田洋一、若林俊彦、中
瀬裕之

第19回日本分子脳神経外科学会 2018年8月

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：中村光利

ローマ字氏名：Nakamura Mitsutoshi

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：脳神経外科

職名：非常勤医師

研究者番号(8桁)：00305715

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。