

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10095

研究課題名（和文）抗体依存性細胞傷害活性を増強する免疫細胞療法の開発

研究課題名（英文）Cancer immnotherapy to augment antibody dependent cellular cytotoxicity

研究代表者

工藤 耕（Kudo, Ko）

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20455728

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）：本研究の目的は、抗体製剤と併用することで、悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果を増強し、患者細胞以外の利用で品質を均一化し、誰にでもいつでも使える細胞免疫療法を開発することである。具体的には、抗体製剤と併用で抗腫瘍効果を発揮するキメラ型受容体遺伝子を導入した細胞株を作成し、抗腫瘍効果について検討を行った。抗体に結合するFc受容体をキメラ型受容体に遺伝子改変し、細胞株N92に遺伝子導入し、悪性腫瘍細胞株への細胞障害性試験を行い抗腫瘍効果を評価した。抗腫瘍効果は認められるが、健常人リンパ球を使用した細胞療法に比べ効果が弱く、先行研究に比較して優れていない結果であったため、改良を加えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子改変免疫細胞療法は進歩が著しいが、患者由来のリンパ球を用いることにより、作成コスト、所要時間、および品質のばらつきが問題点である。本研究では細胞株の使用により、このような課題を解決できる可能性を有する新規治療法の開発に取り組んだ。残念ながら、現時点では抗腫瘍効果において難点があるため、また、先行研究に比べ優越性を示すことができなかった。今後、さらなる改良を進めていく必要がある。

研究成果の概要（英文）：This study aims to establish the novel cell line-based cancer immunotherapy, which augments the antitumor effect in combination with therapeutic antibodies. We transduced Fc-receptor based chimeric antigen receptors into natural killer cell originated cell line NK-92 instead of primary T lymphocytes. We performed cytotoxicity assay to test the antitumor effect on tumor cell lines in the presence of the responsible therapeutic antibodies. We compared the capacity of the cell lines to those of the genetically modified primary lymphocytes and the existing products, which have been reported. The genetically modified NK-92 cell exerted antitumor effect. However, the efficacy was not superior to the existing products and even less than those of the genetically modified primary T-cells. We, therefore, continued to evaluate the durability of the cells and try to improve the chimeric receptor to increase the antitumor effect.

研究分野：小児がん

キーワード：細胞療法 免疫療法 遺伝子改変 抗体依存性細胞傷害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) キメラ型受容体 (Chimeric antigen receptor: CAR)を用いた遺伝子改変T細胞免疫療法は、近年、顕著な有効性が証明された免疫細胞療法であるが、我々はこの技術に抗体療法を融合した、「抗体製剤と併用し抗腫瘍効果を発揮するキメラ型人工受容体 CD16V-BB-z を用いたがんに対する革新的な免疫細胞療法」を開発した。遺伝子導入された細胞は、抗体投与により自己増幅し、同時に抗体依存性細胞傷害による抗腫瘍効果を飛躍的に増強する。さらに、抗体の種類を変えても同様の効果を示す万能型受容体 universal CARであることを示し、臨床応用が開始されている。(Cancer Res2014, 8カ国で特許出願)

(2) しかしながら、臨床応用において「細胞製剤の品質にばらつきが生じる」という問題が、未解決のまま残されており、いつでも誰にでも安心して使用可能な製剤が強く求められている。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、「小児がんに対する抗体療法の効果を増強する細胞免疫療法の品質を均一化し、汎用性を高めること」であり、遺伝子編集技術によりアロ免疫反応を回避した他家移植細胞療法モデルの作成②キメラ型受容体遺伝子導入した細胞株による細胞療法の確立③抗腫瘍効果の持続期間の長い細胞集団の生物学的特徴の同定の3点に絞り研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 ノックアウトベクターを用いて TCR 削除 T 細胞を作成し、Fc 受容体キメラ型受容体を遺伝子導入し、腫瘍細胞株あるいはヒト腫瘍細胞と共培養し、抗体製剤存在下での A 抗腫瘍効果および細胞増殖能を測定し、TCR を削除しないものと比べ同様の機能を有することを確認しようと試みた。

(2) 抗体に結合する Fc 受容体をキメラ型受容体に遺伝子改変し、ヒトナチュラルキラー細胞由来細胞株である NK-92 における抗腫瘍効果を最大限に発揮するキメラ型受容体はまだわかっていないため、複数の異なる組み合わせのシグナル分子で構成された新規キメラ型受容体を作成し抗腫瘍効果および自己増殖能を解析した。

(3) 抗体依存性細胞傷害と T 細胞疲弊マーカーとの関係を調べるため、健常ドナー由来のポリクローナル T 細胞に Fc 受容体型キメラ型受容体を遺伝子導入し、腫瘍細胞株とくりかえし共培養を行い長期間生存する細胞に着目し、この細胞群のリンパ球疲弊化マーカーをフローサイトメトリーで解析した。

### 4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 システムによりヒト T 細胞受容体を削除した T 細胞の作成を試みた。異なる複数のガイド RNA のデザインでゲノム編集を行い、T 細胞受容体の表出をフローサイトメトリー法で確認したが、残念ながら、目的とする T 細胞が得られなかった。原因としては、T 細胞受容体の多様性に起因すると思われる技術的問題が考えられた。

(2) 抗体に結合する Fc 受容体型キメラ型受容体を遺伝子改変し、ナチュラルキラー細胞株 NK92 に遺伝子導入し、悪性腫瘍細胞株への細胞障害性試験により抗腫瘍効果を測定したところ、一定の抗腫瘍効果を確認した。(図 1) しかしながら、同様の細胞株がすでに開発され特許出願されていることが判明した。

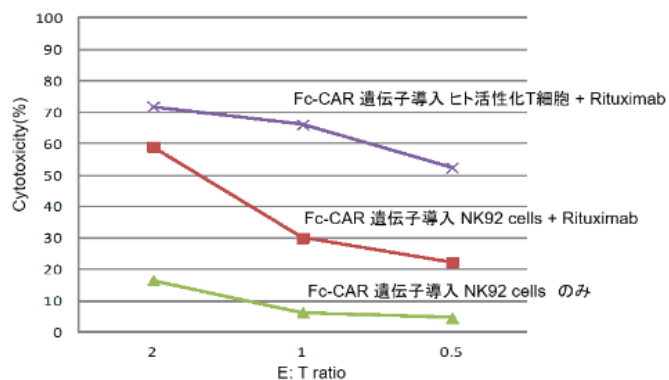


図1. CD20陽性リンパ腫細胞株Daudiに対するRituximab併用での抗腫瘍効果

そこで、糖鎖改変による抗体への結合能を改善すべく、遺伝子改変を追加した。同様に抗腫瘍効果について検討した結果、抗体能の結合能においても有意差を認めず、さらに抗腫瘍効果においても優位性を示すことができなかった。(図2) 現在、さらなる改良を加え、作製した複数のキメラ受容体の抗腫瘍効果および耐久性について検証している。

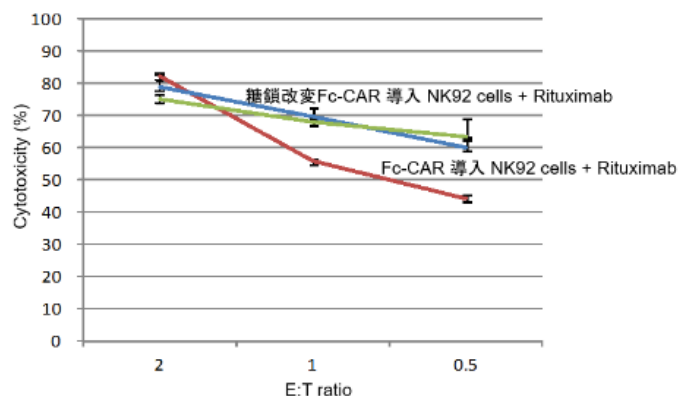


図2. 糖鎖改変Fc受容体CAR-NK92のDaudiに対するRituximab併用での抗腫瘍効果

(3) 抗体依存性細胞傷害とT細胞疲弊マーカーとの関係をフローサイトメトリーで解析した。細胞障害性試験を反復し、その後、キメラ受容体遺伝子導入リンパ球または細胞株を採取し、リンパ球疲弊マーカーについて、表面マーカー解析を行い検討した。Tim-3をはじめとした疲弊マーカーの上昇と、抗腫瘍効果の減弱には相関が認められたため、リンパ球の疲弊化を防止する新たな改善が必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaori Kubo, Ko Kudo, Tsutomu Toki, Rika Kanazaki, Fumika Ikeda, Tatsuya Ito, Akie Kobayashi, Tomohiko Sato, Takuya Kamio, Shinya Sasaki, Kiminori Terui, Etsuro Ito	4. 巻 70
2. 論文標題 Comprehensive genetic analyses of relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in children	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hirosaki Medical Journal	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32216/hirosakiigaku.70.113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kudo Ko, Tanaka Tatsuhiko, Kobayashi Akie, Terui Kiminori, Ito Etsuro	4. 巻 61
2. 論文標題 Zoledronic acid for relapsed Langerhans cell histiocytosis with isolated skull bone lesion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 315～317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.13774	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Natsuki, Kudo Ko, Tanaka Miyuki, Kumagai Naoya, Sato Tomohiko, Kamio Takuya, Sasaki Shinya, Terui Kiminori, Kurose Akira, Yanagisawa Ryu, Nakazawa Yozo, Ito Etsuro	4. 巻 -
2. 論文標題 A Rapid Cytologic Double Staining of Epstein-Barr Virus?encoded Small RNA and Cell Surface Markers for Diagnosis of Epstein-Barr Virus?associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 1～1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPH.0000000000001647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuzawa K, Terui K, Toki T, Kanazaki R, Kobayashi A, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Endo M, Ozono S, Nomura K, Ito E.	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical, Cytogenetic, and Molecular Analyses of 17 Neonates With Transient Abnormal Myelopoiesis and Nonconstitutional Trisomy 21	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 1～1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/pbc.28188.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 5. Terui K, Toki T, Taga T, Iwamoto S, Miyamura T, Hasegawa D, Moritake H, Hama A, Nakashima K, Kanezaki R, Kudo K, Saito AM, Horibe K, Adachi S, Tomizawa D, Ito E.	4. 巻 59
2. 論文標題 Highly sensitive detection of GATA1 mutations in patients with myeloid leukemia associated with Down syndrome by combining Sanger and targeted next generation sequencing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Chromosomes Cancer	6. 最初と最後の頁 160-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1002/doi: 10.1002/gcc.22816.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kudo K
2. 発表標題 BRAF V600E-positive precursors as molecular markers of bone marrow involvement in pediatric langerhans cell histiocytosis.
3. 学会等名 The 61th American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kudo K
2. 発表標題 BRAFF600E-POSITIVE PRECURSORS AS MOLECULAR MARKERS OF BONE MARROW INVOLVEMENT IN PEDIATRIC LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS
3. 学会等名 The 35th Annual Meeting of the Histiocyte Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤耕
2. 発表標題 Langerhans cell histiocytosisにおける BRAFF600E変異 検出による残存病変の評価
3. 学会等名 第61回日本小児血液がん学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤耕
2. 発表標題 HNRNPH1-MLLT10融合遺伝子を検出した5q- AMLの1例
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 フローサイトメトリーを用いた遺伝子変異による短縮たんぱく質の同定方法	発明者 工藤耕、伊藤悦朗	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-124814	出願年 2017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	土岐 力  (Toki Tsutomu)  (50195731)	弘前大学・医学研究科・講師    (11101)	