

平成 21 年 5 月 4 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2006～2008  
 課題番号： 18790706  
 研究課題名 (和文) 遺伝子改変NK細胞を用いた、白血病・リンパ腫に対する新たな治療戦略の開発  
 研究課題名 (英文) Development of a novel therapy against refractory leukemia and lymphoma by using genetically-modified natural killer cells

研究代表者  
 今井 千速 (IMAI CHIHAYA)  
 新潟大学・医歯学系・助教  
 研究者番号： 90419284

研究成果の概要：

従来遺伝子導入が困難とされてきたヒト Natural Killer (NK)細胞の、抗がん治療の上で有用な遺伝子改変について検討した。NK 細胞にリンパ球増殖因子である IL-2 遺伝子を導入したところ、NK 細胞の生存促進と抗腫瘍効果の向上が示された。さらに、B リンパ性腫瘍特異的キメラ型受容体遺伝子、IL-2 遺伝子、マーカー遺伝子 GFP を組み込んだ治療用ベクターを試作した。この 3 遺伝子を同時発現するベクターの実用化には、高い効率のパッケージング技術の確立が必要と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学 (小児血液学)

キーワード：NK 細胞、遺伝子導入、細胞療法、chimeric receptor、白血病、リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

急性リンパ性白血病 (ALL) の治療は過去 30 年で目覚ましい進歩を遂げたが、依然小児例の約 20%、成人例の約 65%が化学療法に抵抗し再発をきたす。化学療法のさらなる強化は治療関連毒性の増加を招くため、これらの患者群に対する新たな治療手段の開発が望まれている。造血幹細胞移植の成果が示す通り、リンパ球の抗白血病効果は明白であり、白血病細胞特異的細胞障害性エフェクター細胞の樹立・増幅が可能となれば、より少ない副作用でより高い効果が期待できる。

抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の樹立と臨床応用は、がんおよび難治性ウイルス疾患の新たな治療として注目されてきた。EB ウイルス関連疾患に対しては、先端的な施設における臨床試験で既に高い有効性が示されている (Heslop HE et al, Nat Med 1996; Bollard CM et al, J Exp Med 2004)。しかしがんに対する CTL の樹立・体外増幅は、未だ技術的に確立していない。がん抗原・エピトープの同定、がん細胞の HLA 発現低下・欠損、down-regulation、共刺激分子の欠損などがその理由として挙げられる。Eshher らは、これ

らの障壁を越える画期的な system を報告した (Eshher Z et al, PNAS 1993)。彼らの報告した抗原特異的キメラ受容体の抗原認識・結合は HLA 非拘束性であり、HLA の異なる全ての患者に対し、一つの遺伝子コンストラクトで対応できる。この研究は様々ながん種に対するキメラ受容体の開発を促し、ALL をはじめとする B 細胞系腫瘍にも応用され (Brentjen RJ et al, Nat Med 2003; Imai C et al, Leukemia 2004)、キメラ受容体導入ヒト T 細胞による NOD/SCID マウス xenograft の根絶にも成功している。しかし、この戦略を臨床応用する場合、対象となる難治性 ALL の多くは移植後患者と予想されるため、活性化ドナー T 細胞の使用は重症 GvHD の危険性を伴うと考えられる。それに対して NK 細胞は GvHD の危険性がなく安全性が高いと予想される。申請者は、ヒト primary NK 細胞への高効率の選択的遺伝子導入法をはじめて確立した (Imai C et al, BLOOD 2005)。この方法では、T 細胞活性化を最小限に抑えることができ、T 細胞の混入率も常に 1% 未満を達成可能である。

NK 細胞は、ヒト末梢血リンパ球の 5-20% を構成し、自然免疫の一部として、ウイルス感染細胞や腫瘍化細胞に対する生体防御機構において重要な役割を果たしている。T 細胞、B 細胞と異なり、NK 細胞は抗原特異的レセプター (T 細胞レセプターあるいは免疫グロブリン) の遺伝子再構成を欠き、自己 MHC-class I あるいは class-I-like molecules を認識する NK cell receptors により制御されている。Killer Immunoglobulin-like receptor (KIR) リガンド、すなわち HLA-C の incompatible な同種細胞、例えば同種造血幹細胞移植における白血病細胞に対して活性化し、細胞障害活性を発揮する。イタリアの Velardi らのグループは、HLA 半合致造血幹細胞移植における NK 細胞による抗白血病効果 (graft versus leukemia effect) について詳細に報告した (Ruggeri, et al. Science 2002)。最近では、臍帯血移植においても同様の報告がなされている (Willemze, et al. Leukemia 2009)。

従来、抗がん治療を目的とした免疫細胞療法は、いわゆる LAK (lymphokine-activated killer) 細胞のように自己リンパ球を非特異的活性化・体外増幅して投与する、あるいは NK 細胞の in vivo activation を目的として比較的大量のリコンビナント・ヒトインターロイキン (rhIL) -2 投与が行なわれてきたが、十分な効果は得られなかった。この理由として、自己 NK 細胞と自己がん細胞においては、HLA class I が原則合致するため KIR による抑制が生じること、抗がん剤治療中の患者では NK

細胞の数的／質的低下が避け得ないこと、担がん患者では intrinsic な NK 細胞機能の低下が観察されることなどによると思われる。これらの条件を克服するために、米国ミネソタの Miller らは、造血幹細胞移植を伴わず、HLA 半合致の家族ドナー由来の活性化 NK 細胞による細胞療法を行い、再発／治療抵抗性 AML 症例 19 人において 5 例に完全寛解を達成した (Miller, et al. Blood 2005)。ドナー NK 細胞の患者体内での増幅がみられた症例でのみ治療反応が得られたことから、NK グラフトの患者体内での persistence が効果に密接に関与し得ることが示された。難治症例における有望な戦略と考えられたが、十分量の NK 細胞を得ることが容易でないこと、NK 細胞の純度が低く、T 細胞、B 細胞、単球の多量の混入が認められたこと、B 細胞性リンパ球増殖性疾患の合併症死亡が発生したことなど、問題点も挙げられた。また rhIL-2 への intolerance のため、投与量を次々と減量せざるを得なかったことから、NK 細胞の in vivo activation および post-infusion survival を保証する異なる戦略が必要と思われた。

申請者は、ヒト NK 細胞の特異的体外増幅を実現する新たな手法を開発し、さらにヒト NK 細胞への安定的遺伝子導入法を開発した (Imai C et al, BLOOD 2005)。文献上、NK 細胞への効率的遺伝子導入は、我々の報告までは存在しなかった。この方法では、ヒト末梢血単核球から NK 細胞を特異的に活性化・増幅が可能である。T 細胞や B 細胞の活性化は最低限に抑えられ、T/B 細胞の混入はごくわずかに抑えることが可能であるため、上述の同種 NK 細胞療法にとっても、申請者の NK 細胞増幅方法は最適と目された。

## 2. 研究の目的

- 1) ヒト NK 細胞の生存促進を目的とした遺伝子の選定とその機能評価
- 2) 上記 1) で選定した遺伝子と、抗原特異的キメラ型受容体遺伝子、およびマーカー遺伝子 (GFP) を同時発現可能な tricistronic vector の開発

NK 細胞の生存を促進する因子を同定し、NK 細胞に単独で遺伝子導入することにより、自家あるいは同種 NK 細胞療法の有効性の向上を目指した。インターロイキン (IL) -2 などのサイトカイン遺伝子を導入する場合には、患者における様々な副作用を引き起こす rhIL-2 の投与量の軽減の可能性も開けると予想される。さらに、NK 細胞に生存促進のための分子と抗原特異性を付与するための

キメラ型受容体遺伝子を同時に導入できれば、従来NK耐性と考えられてきた腫瘍 (e.g. 急性リンパ性白血病など) に対する有効性を大幅に向上させることができると予想される。本研究は、遺伝子改変NK細胞を用いたがん・白血病に対する細胞免疫療法の臨床応用に向けて、重要な基礎データを構築するものと期待される。尚、ヒトNK細胞の安定的遺伝子改変は、申請時点では申請者以外からの報告はなく、本研究の推進により、高い独自性を持つデータが集積されると期待できる。

### 3. 研究の方法

#### プラスミッド、recombinant retrovirus 作製

レトロウイルスベクターMSCV-IRES-GFP、pEQ-PAM3(-E)、pRDFはSt. Jude小児病院から供与された。ヒトIL-2 cDNAは、PHAで活性化したJurkatヒトTリンパ性白血病細胞株から得たcDNAを用いてPCRクローニングし、MSCV-IRES-GFPベクターのEcoRIおよびXhoI制限酵素切断部位に挿入した (Figure 1A)。recombinant retrovirusは3プラスミッドシステムで、293T細胞株の一過性遺伝子導入により作製した。レトロウイルスタイターはHeLa細胞株を用いて測定し、 $1 \times 10^5$ /ml以上のウイルス液を遺伝子導入に用いた。

#### NK細胞の培養、増幅、遺伝子導入法

NK細胞の活性化、増幅は既報 (Imai C, et al. Blood 2005) を一部改変して行った。Ficoll比重遠心で分離した健康者末梢血単核球  $1.5 \times 10^6$  個、K562-mb15-41BBL  $0.5 \times 10^6$  個を少量のIL-2 (10単位/ml) の存在下で共培養した (Figure 1B, 1C)。

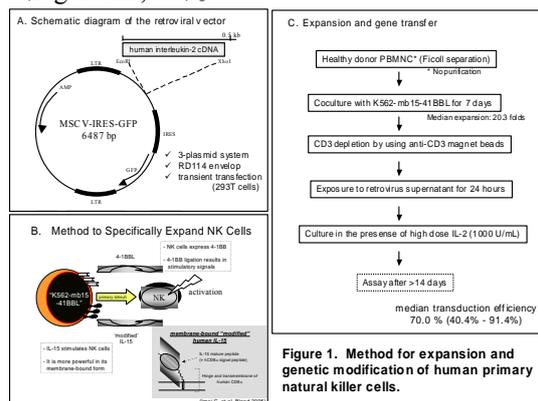


Figure 1. Method for expansion and genetic modification of human primary natural killer cells.

1週間後、NK細胞の増幅率をカウントし、T細胞を完全に除去するためにマグネットビーズによるCD3陽性細胞除去を行い、引き続きレトロウイルスによる遺伝子導入に供した。遺伝子導入はRetronectin (Takara Shuzo) の存在下で行い、24時間後に細胞を洗浄し、

培養液(RPMI1640 + 10%FCS)に浮遊し、再び培養が継続された。以後の培養は、高用量のIL-2 (1000単位/ml) の存在下で行い、培養開始から14日以降に機能解析した。

#### IL-2 発現

細胞内サイトカイン染色には、細胞内染色専用試薬 (CALTAG)、Brefeldin A (Sigma)、ラット抗ヒトIL-2抗体 (CALTAG)を用い、FACSCalibur (BD)、CellQuest Pro softwareを用いて解析した。培養液中IL-2の定量にはELISA (BioSource Europe)を用いた。

#### 細胞障害活性

細胞障害活性は既報に従い (Imai C, et al. Blood 2005)、フローサイトメトリーを用いて行なった。96ウェルUボトム培養プレートに  $2 \times 10^5$  個のK562骨髄性白血病細胞株、あるいはその他の白血病細胞株を蒔き、様々なEffector : Target Ratio (E/T ratio)で行なった。長期間培養によるアッセイでは、フラットボトム培養プレートを用いて行なった。実験の目的に応じて、NK細胞はIL-2存在下で直前まで培養、あるいはIL-2を除去後72時間の時点で使用された。実験ウェルへのIL-2のcarry overの防止のため、NK細胞は十分洗浄してからseedingした。

#### アポトーシスアッセイ

アポトーシスの検出には、PE結合Annexin-V (CALTAG)と7-AAD (BD)を用いて、製造元の推奨する方法に従って行った。

#### Tricistronic vector の作製

3種類の異なる遺伝子発現のため、それぞれの遺伝子フラグメントをInternal ribosomal entry site (IRES) およびfoot and mouth disease virus (FMDV) -2A sequenceにより隔てることにより、1つのベクターから3遺伝子が発現するようにデザインした。ベクター作製には申請者の既報のごとく、splice by overlapping extension (SOE) と呼ばれるPCR法で、途中で制限酵素切断サイトを挿入せずに行なった。作成した発現カセットはMSCVベクターに既存の制限酵素サイトを用いて挿入した。すべてのフラグメントのヌクレオチド配列をダイレクトシーケンシングにより確認した。

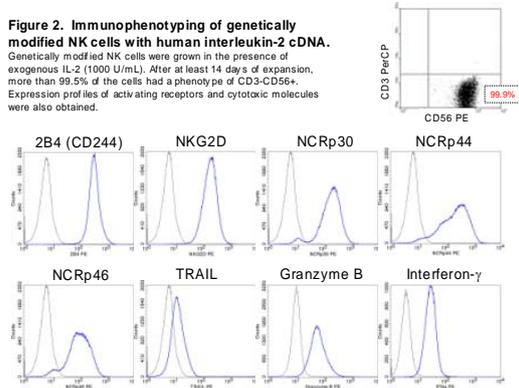
### 4. 研究成果

#### NK細胞の体外増幅と遺伝子導入効率

NK細胞の生存を促進すると予想される治療用遺伝子の候補として、IL-2、IL-7、IL-15を選び、それらの発現ベクターを作製し、リコンビナントウイルスの調整も完了した。しかし、最終目標である治療応用を想定した場合には既に薬剤として臨床応用されているIL-2

を用いることが最も近道と思われること、また研究計画全体の進行度との調整から、IL-2 遺伝子に限定して詳細な検討を行うことに決定した。上記の方法により高い純度 (99.5% 以上) の NK 細胞の体外増幅が得られ、増幅した NK 細胞は NCRp30, p44, p46, NKG2D, 2B4 などの活性化受容体を高発現していた (Figure 2)。

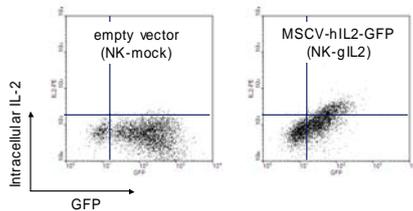
**Figure 2. Immunophenotyping of genetically modified NK cells with human interleukin-2 cDNA.** Genetically modified NK cells were grown in the presence of exogenous IL-2 (1000 U/mL). After at least 14 days of expansion, more than 99.5% of the cells had a phenotype of CD3-CD56<sup>+</sup>. Expression profiles of activating receptors and cytotoxic molecules were also obtained.



マーカー遺伝子 GFP の発現を指標に遺伝子導入効率を評価したところ、中央値 70.0% (range 40.4%-91.4%) と高率の遺伝子導入が得られた。

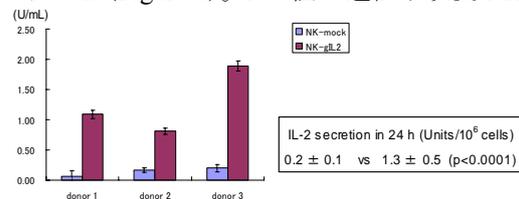
#### 遺伝子導入による IL-2 の発現

細胞内サイトカイン染色により、IL-2 遺伝子を導入した NK 細胞 (NK-gIL2) において constitutive な IL-2 の発現が示された (Figure 3)。



**Figure 3. Intracellular expression of interleukin (IL)-2 after hIL-2 cDNA transfer into primary NK cells.** Peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy individuals were stimulated with K562-mb15-41BBL cells and were transduced with a retroviral vector which co-expressed human interleukin(IL)-2 and green fluorescent protein (GFP) as a marker (NK-gIL2). Control cells were transduced with empty vector and expressed only GFP (NK-mock). In both of control NK cells (NK-mock) and NK cells genetically modified to express IL-2 (NK-gIL2), highly efficient transduction were achieved. Intracellular staining with an anti-IL2 monoclonal antibody showed intracellular expression of IL-2 in NK-gIL2, not in NK-mock.

培養上清に分泌された IL-2 濃度は  $10^6$  細胞、24 時間当たりで 1.3 単位程度と比較的低濃度であった (Figure 4)。 $10^{10}$  個の遺伝子改変 NK



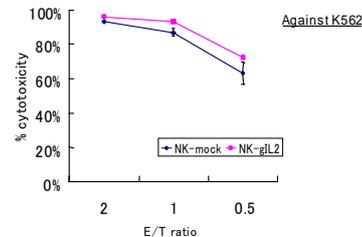
**Figure 4. Significant but relatively low levels of IL-2 secretion.** NK-gIL2 ( $3 \times 10^6$  cells/mL) were propagated in RPMI1640 medium containing 10%FCS and antibiotics. After 24 hours, culture supernatants were harvested and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The levels of human IL-2 were determined using a commercially available ELISA kit (IL-2 EASIA, BioSource Europe S.A., Nivelles, Belgium). Amount of secreted IL-2 was significantly higher in NK-gIL2 than in NK-mock in independent experiments using independent donors. The secreted IL-2 in NK-gIL2 were only  $1.3 \pm 0.5$  Units/ $10^6$  cells/24 hours. Thus, it was assumed that infusion of  $10^{10}$  cells per body will result in secretion of only 0.01 million U IL-2 per day, which is much less than the dose of rhIL-2 in the clinical settings (e.g. 1.75 million U/m<sup>2</sup>/day).

細胞 (NK-gIL2) からは、24 時間当たり 1.3 万単位の IL-2 が分泌されると算定されたが、

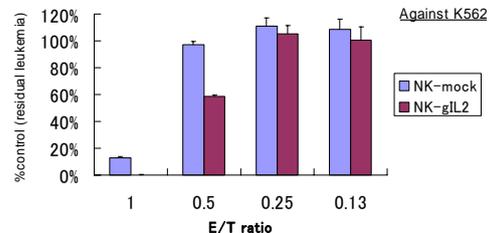
この量は腎細胞がんに対して本邦で認可されている rhIL-2 投与量である 70 万単位~210 万単位/日に比較すると著しく低値と考えられ、遺伝子改変 NK 細胞に由来する IL-2 による副作用発現の可能性は比較的低いと想定された。

#### IL-2 遺伝子導入 NK 細胞における白血病細胞障害活性の向上

遺伝子改変 NK 細胞 (NK-gIL2) の K562 細胞株に対する 4h-cytotoxicity は、コントロール NK (NK-mock) に比較し、わずかに高いのみで有意な差はなかった (Figure 5)。これは、両者ともに高用量 IL-2 (1000 単位/ml) の存在下で培養されたことから当然と考えられる。しかし、K562 細胞との共培養を IL-2 非存在下で 7 日間に延長すると、NK-gIL2 で有意な腫瘍細胞増殖抑制を示した (residual leukemia cells;  $58.4 \pm 1.3\%$  vs  $97.3 \pm 2.1\%$  of control, E/T 比 0.5:1) (Figure 6)。



**Figure 5. 4-hour cytotoxicity assay.** Genetically modified NK cells were propagated in the presence of IL-2 (1000U/mL). Cytotoxicity against NK-sensitive myeloid leukemia cell line K562 in 4-hour was measured in NK-gIL2 and NK-mock at a relatively low effector: target (E/T) ratio. Comparable killing rates were observed.



**Figure 6. The greater anti-leukemic activity of NK cells transduced with hIL-2 cDNA in a long-term culture assay.** The anti-leukemic activity of hIL2-transduced NK cells was assessed in 7-day cultures using lower E:T ratios. Briefly,  $2 \times 10^4$  K562 cells were plated on a 96-well tissue culture plate. After extensive washing to remove residual IL-2-containing medium, NK cells were added to the wells at lower E:T ratios. Plates were incubated in a standard condition for 7 days. Cells were harvested and assayed by flow cytometry. Significantly lower number of K562 leukemic cells were recovered at E/T ratio of 1:1 and 0.5:1, indicating a greater anti-leukemic activity of NK-gIL2 in a long term culture.

遺伝子改変 NK 細胞 (NK-gIL2) の優位性は、細胞障害活性の測定前の exogenous IL-2 withdrawal によりさらに顕著となった。IL-2 非存在下で 72 時間培養した NK 細胞で検討を行なったところ、NK-gIL2 は細胞障害活性を維持していたが、コントロール NK 細胞 (NK-mock) では著明な障害活性の低下を認めた ( $82.9 \pm 1.1\%$  vs  $30.9 \pm 4.1\%$ , E/T 比 1:1) (Figure 7A)。さらに、同様の前処置をした NK 細胞で 7 日間の K562 との共培養を行なうと、コントロール NK 細胞 (NK-mock) では

E/T 比 1 : 1 で既に K562 細胞の増殖抑制効果が全く見られなくなり、その差は明白であった (Figure 7B)。

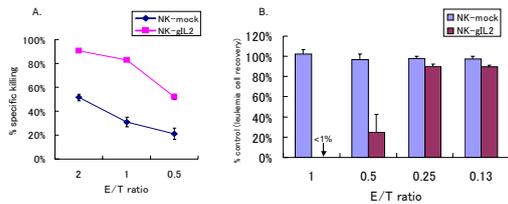


Figure 7. Significantly higher killing efficiency against K562 cells in NK cells transduced with hIL2 cDNA after conditioned in the absence of exogenous IL-2

### IL-2 遺伝子導入NK 細胞におけるアポトーシス抑制と細胞生存の亢進

高用量 IL-2 により誘導された活性化 NK 細胞は、IL-2 withdrawal によって apoptosis が誘導されることが知られている。IL-2 除去後 72 時間後に Annexin-V/7-AAD 染色を行なったところ、コントロール NK 細胞 (NK-mock) では著明な apoptosis が誘導されたが、遺伝子改変 NK 細胞 (NKgIL2) では、apoptosis rate はコントロール NK 細胞を IL-2 添加培養したものと同様ならず、IL-2 withdrawal による apoptosis を完全に抑制した (Figure 8)。

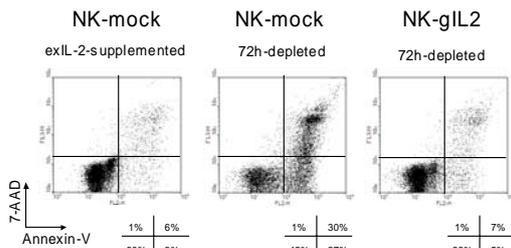


Figure 8. Low levels of secreted IL-2 in an autocrine/paracrine fashion protects NK cells from apoptosis induced by IL-2 withdrawal. NK-gIL2 cells, propagated in the presence of rhIL-2 (1000 U/mL), were washed thrice, suspended in a medium lacking exogenous rhIL2, and cultured in an incubator. After 72-hour culture, the cells were stained with Annexin-V-PE and 7AAD and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer. In control experiments using NK-mock cells, more than half of the cells led to apoptosis. However, in NK-gIL2, apoptotic rates were comparable to those in culture of NK-mock supplemented with exogenous IL-2, suggesting that low levels of secretion of IL-2 in an autocrine or paracrine fashion would be enough for suppressing cytokine-withdrawal apoptosis.

さらに、IL-2 withdrawal 後の survival も NKgIL2 で著しい延長を認めた (Figure 9)。以上より、NK 細胞へのヒト IL-2 遺伝子導入により、post-infusion apoptosis を抑制し、輸注後の細胞生存を向上できる可能性が示唆された。さらに、apoptosis の抑制と NK 細胞の生存延長により、結果として抗腫瘍効果も向上し得ることが示唆された。

Cell survival after 7days of exogenous IL-2 depletion

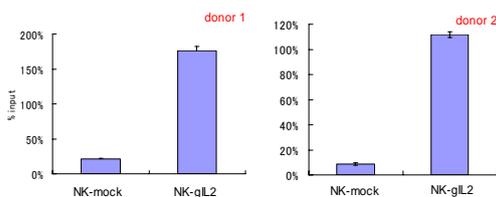


Figure 9. hIL-2 gene transfer into primary NK cells prolongs survival in the absence of exogenous IL-2. NK-gIL2 cells, propagated in the presence of rhIL-2 (1000 U/mL), were washed thrice, suspended in a medium lacking exogenous rhIL2, seeded in a 96-well culture plate at a cell density of  $2 \times 10^5$  cells/mL. After 7-day culture, the cells were harvested and analyzed as to cell number and viability. NK-gIL2 cells showed at least 100% (of input cell number) recovery. In contrast, only modest number of viable cells were observed in control experiments using NK-mock cells.

また、NKgIL2 では K562 との共培養後の

activation-induced cell death (AICD) も有意に抑制された (Figure 10)。

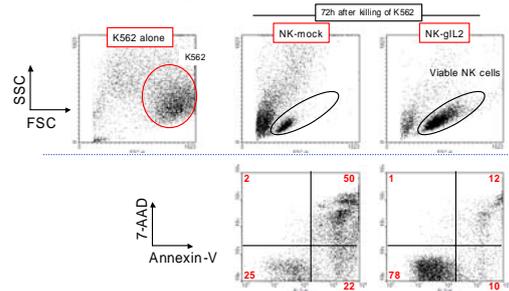


Figure 10. Protection from activation-induced cell death by hIL-2 gene transfer into primary NK cells. NK cells were transduced with hIL-2cDNA and propagated in an IL-2 supplemented medium (IL-2 1000U/mL). After extensive washing, NK cells were plated onto a 96-well tissue culture plate with round bottom and cultured with K562 cells at E/T ratio of 2:1 in the absence of exogenous IL-2. After 72 hours, in both NK-gIL2 and NK-mock, K562 cells were completely eradicated. The residual NK cells were analyzed using flow cytometer for the FSC/SSC profiles and an apoptotic phenotype. In NK-gIL2, residual NK cells had a broader FSC/SSC value, which represented a typical phenotype of activated lymphocytes. In addition, we observed much less apoptosis in the residual NK-gIL2 cells than in NK-mock, implying that hIL-2 cDNA transfer rendered NK cells resistant to post-activation apoptosis.

一方、コントロール NK 細胞における AICD 抑制には 100 U/mL 程度の exogenous IL-2 添加が必要だった (Figure 11)。

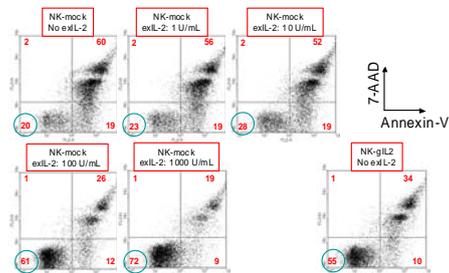


Figure 11. Requirement of relatively high dose exogenous IL-2 for mock-transduced NK cells to achieve protection from activation-induced cell death with equivalent rates compared to NK-gIL2. Apoptotic cell rates were analyzed after 72-hour coculture with K562 cells in control NK cells supplemented with a various concentration of exogenous IL-2. The protocols for these experiments were identical to those described in the legend for Figure 9 except for exogenous IL-2 supplementation. The rates of viable cell fractions were marked with a bold, green-colored circles in each experiment. As shown in the figure, exogenous supplementation of high doses (> 100 U/mL) IL-2 were required to suppress post-activation cell death and sustain NK cell viability after killing of K562. These data suggested that dosage of IL-2 used in the clinical setting might not be enough for sustaining function and viability of ex vivo activated NK cells after infusion into cancer/leukemia patients.

すなわち、たとえ比較的少量であっても、autocrine/paracrine 様式での IL-2 分泌が高い AICD 抑制効果を得るのに重要な要素となっていることが示唆された。患者への細胞輸注後の in vivo での NK 細胞の AICD 抑制とそれによる NK 細胞生存延長、および抗腫瘍効果持続を目指すためには、耐用量を超えた rhIL-2 投与が必要である可能性が示唆され、この点でも遺伝子改変 NK 細胞の利点が示された。

### Tricistronic vector の作製

FMDV-2A sequence はわずか 63 ヌクレオチドの短い断片のためテンプレートは必要なく、比較的長い合成プライマーを用いた SOE-PCR により、キメラ型受容体遺伝子 (anti-CD19-BB-z) 断片とヒト IL-2 遺伝子断片を、FMDV-2A sequence をはさんでひとつの遺伝子カセットとして作製することができた。このカセットを MSCV-IRES-GFP の EcoRI および XhoI サイトに挿入した。型どおりに 293T 細胞を用いて、ウイルス産生を行ったが、複数回の試行によってもウイルス濃度は  $0.1 \times 10^5$ /ml 前後あるいはそれ以下と不十分であった。PT67 細胞 (ClonTech ; 10A1

エンベロプ・レトロウイルスを産生する) も用いたが、RD114 エンベロプウイルス産生系と比較して著明な向上は得られなかった。

#### 結果のまとめ

以上より、NK 細胞への IL-2 遺伝子導入により、少量ではあるが持続的に autocrine/paracrine 様式で IL-2 分泌され、IL-2 非存在下での NK 生存が保障され、IL-2 除去による apoptosis や AICD を抑制し、その結果として抗腫瘍効果を増強したと考えられた。また、遺伝子改変 NK 細胞からの IL-2 分泌量は、がん患者への投与量 (e.g. 腎細胞癌: 70-210 万単位/日) に比較すると低濃度であり、高用量 IL-2 療法に伴う副作用の発現に関しても危険は低いと推察された。我々の方法では、少量のドナー末梢血から比較的大量の NK 細胞が調整でき、T 細胞のみならず B 細胞のコンタミネーションのリスクも低い点も含めて、健常ドナー由来 NK 細胞を利用した抗がん・細胞免疫療法の今後の発展に寄与し得るものと考えられた。

この研究では、NK 細胞に導入するサイトカイン遺伝子として IL-2 を選択した。その理由としては、IL-2 は欧米のみならず本邦でも既に臨床使用可能なサイトカインで、効果および副作用に関して 20 年近い経験の積み重ねが既にあることから、遺伝子改変 NK 細胞の臨床応用が相対的に容易である可能性が想定されたからである。一方、IL-12、IL-15、IL-21 など、IL-2 以外にも NK 細胞の biology において重要な役割が示されているサイトカインが知られているため、治療遺伝子候補としてどれが最適であるかは今後検討すべき問題と考えられる。

抗原選択的キメラ受容体遺伝子、IL-2 遺伝子、GFP の 3 遺伝子の同時発現ベクターの開発については実用可能なレベルでの成功は得られなかった。この点については、遺伝子導入技術におけるさらなる技術革新が必要と考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Fujisaki H, Kakuda H, Imai C, Mullighan CG, Campana D. Replicative potential of human natural killer cells. *Br J Haematol.* 2009 [Epub] (査読有)
2. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, Eldridge P, Leung WH, Campana D. Expansion of Highly Cytotoxic Human Natural Killer Cells for Cancer Cell

Therapy. *Cancer Res.* 2009 [Epub] (査読有)

3. Imamura M, Imai C, Takachi T, Nemoto T, Tanaka A, Uchiyama M. Juvenile myelomonocytic leukemia with less aggressive clinical course and KRAS mutation. *Pediatr Blood Cancer.* 51; 569, 2008 (査読有)
4. Marin V, Kakuda H, Dander E, Imai C, Campana D, Biondi A, D'Amico G. Enhancement of the anti-leukemic activity of cytokine induced killer cells with an anti-CD19 chimeric receptor delivering a 4-1BB- $\zeta$  activating signal. *Experimental Hematology* 35: 1388-97, 2007 (査読有)
5. Imai C, Kakuda H, Fujisaki H, Iwamoto S, Campana D. Genetic Modification of Natural Killer Cells for Leukemia Therapies. *Anti-Inflammatory Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry.* 6, 101-108, 2007 (査読有)
6. Rabinovich PM, Komarovskaya ME, Ye ZJ, Imai C, Campana D, Bahceci E, Weissman SM. Synthetic messenger RNA as a tool for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 17:1027-35, 2006 (査読有)
7. 今井千速. 抗 CD19 レセプターを導入した NK 細胞による白血病・リンパ腫の治療. *臨床免疫* 45:503-510, 2006 (執筆依頼、査読なし)
8. 今井千速. 遺伝子操作により誘導される抗白血病 NK 細胞. *血液・腫瘍科* 52: 414-423, 2006 (執筆依頼、査読なし)

[学会発表] (計 2 件)

1. Chihaya Imai, et al. Interleukin-2 gene transduction in human natural killer cells augments their survival and anti-leukemic capacity (publication only). 50th American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, USA, Dec 2008
2. 今井千速. IL-2 遺伝子導入 NK 細胞の生存促進と抗腫瘍効果の持続的発現 (優秀ポスター演題) 第 67 回日本血液学会、京都、2008 年 10 月

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

今井 千速 (Imai Chihaya)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号 90419284

##### (2)研究分担者：なし

##### (3)連携研究者：なし