

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07259

研究課題名(和文)新規膜結合型キメラサイトカインによるNK細胞増幅法の開発

研究課題名(英文)Development of NK Cell expansion by a novel membrane-bound chimeric cytokine

研究代表者

今村 勝 (Imamura, Masaru)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80464006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膜結合型キメラサイトカインの開発により副作用の危険があるサイトカインの全身投与をすることなくNK細胞を増やし、安全で効果的なNK細胞療法を実現することが目的である。まず、インターロイキン15と21のハイブリッド膜結合型サイトカイン遺伝子を作成した。次にNK細胞を対外増幅させるために必要な腫瘍細胞株K562に遺伝子導入したところ、導入効率は85.5%と高い効率が得られた。この新しい遺伝子を導入したNK細胞の増え方を調べたところ、7日後に27倍増えたが期待通りの増え方ではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜結合型サイトカインはサイトカイン分泌を伴わないため全身投与より安全と考えられる。サイトカインの種類及び構造の最適化によりNK細胞を効率的に増やすことができ、安全で効果的な新規NK細胞療法の実現が可能になると考えられる。今回新しく開発したIL-15とIL-21のハイブリッド膜結合型サイトカインはNK細胞を十分に増やす効果は得られず、新たな工夫が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop membrane-bound chimeric cytokines to increase NK cells without systemic administration of cytokines that may cause side effects and to realize safe and effective NK cell therapy. First, we generated the construct of hybrid membrane-bound interleukins 15 and 21. Next, we transduced the construct into a tumor cell line, K562 necessary for the expansion of NK cells, and the efficiency of transduction was as high as 85.5%. When we examined the expansion of NK cells transfected with the construct, we found that the expansion was 27-fold after 7 days, but not as expected.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：膜結合型サイトカイン 細胞療法 NK細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫細胞療法の重要な点は、腫瘍特異的で強力な攻撃細胞 (effector 細胞) を腫瘍細胞 (target 細胞) に対して高い比率 (ET 比) で十分な期間維持させることである。臨床試験で主に effector 細胞として使用される免疫細胞はヒト T 細胞と NK 細胞である。

T 細胞は抗原刺激を受けた後、clonal expansion を来すため in vivo で多数の細胞を得やすいが、過剰な活性化によるサイトカイン放出症候群や移植片対宿主病 (Graft-versus-host disease: GVHD) は時に致命的なリスクを伴う。

NK 細胞は強力な抗腫瘍効果を有し、GVHD のリスクがないなどのメリットがあるが、ヒト体内で十分量の NK 細胞数を増幅することが困難であった。体内に投与された NK 細胞を維持するには IL-2 の投与が必須であるが、IL-2 による致命的な毛細血管漏出症候群が問題となっている。申請者らは膜結合型 IL-15 遺伝子導入慢性骨髄性白血病細胞株 (K562) による刺激で強力な腫瘍効果を有する NK 細胞の体外増幅法を確立した (Imai, et al. Blood 2005)。以後、体外増幅した活性化 NK 細胞の体内増幅を可能とするために膜結合型 IL-15 遺伝子導入 NK 細胞を開発し、IL-15 を分泌しないこと、IL-2 非存在下で自律性増殖、抗腫瘍効果を増加させることを報告した (Imamura, Imai, et al. Blood 2014)。

2. 研究の目的

NK 細胞療法を成功させる鍵は、高い ET 比を十分な期間維持できるかである。膜結合型キメラサイトカインの開発によりサイトカインの全身投与をすることなく活性化 NK 細胞の効率的な増幅を獲得し、高い ET 比を維持し、安全で効果的な NK 細胞療法を実現する。

3. 研究の方法

この研究計画では、膜結合型キメラサイトカイン遺伝子の最適な種類及び構造を検討し、抗腫瘍効果の優れた NK 細胞の体外及び体内 (自己) 増幅を行い、より安全に高い ET 比を維持し、効果の高い NK 細胞療法の開発を行う。研究計画の進め方として、以下の様に行う。

(1) 膜結合型サイトカイン遺伝子の新規作成

サイトカイン cDNA を膜結合型サイトカインとして発現するようにシグナルペプチド、ヒンジ、膜貫通ドメインをつなぎ合わせて作成する。

(2) 新規 feeder cell の開発

作成された新規遺伝子を MSCV-IRES-GFP レトロウイルスベクターのマルチクローニングサイトにサブクローニングする。発現ベクターを K562 細胞に発現させフローサイトメトリー法にてサイトカイン蛋白発現を確認する。

(3) 新規膜結合型サイトカイン遺伝子導入 NK 細胞による NK 細胞増幅の検討

(2) で得られたコンストラクトを活性化 NK 細胞にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う。遺伝子導入後、GFP を指標に経時的に増殖をカウントする。

4. 研究成果

(1) 膜結合型サイトカイン遺伝子の新規作成

IL-15 と IL-21 のハイブリッド膜結合型サイトカイン (membrane-bound hybrid IL15/21) のコンストラクトを作成した (図 1)。

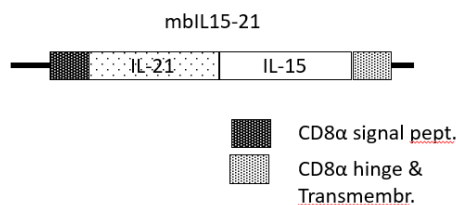


図 1

membrane-bound hybrid IL15/21 遺伝子の模式図

(2) 新規 feeder cell の開発

membrane-bound hybrid IL15/21 遺伝子を K562 に遺伝子導入 (membrane-bound hybrid IL15/21-K562) したところ、72 時間後の GFP 陽性細胞は 85.5% であり高い導入効率を得られた (図 2A)。

遺伝子導入細胞のサイトカイン蛋白発現を調べるため、抗 IL-21 抗体によるフローサイトメトリー解析を行ったところ 58.3% の陽性率であった (図 2B)。

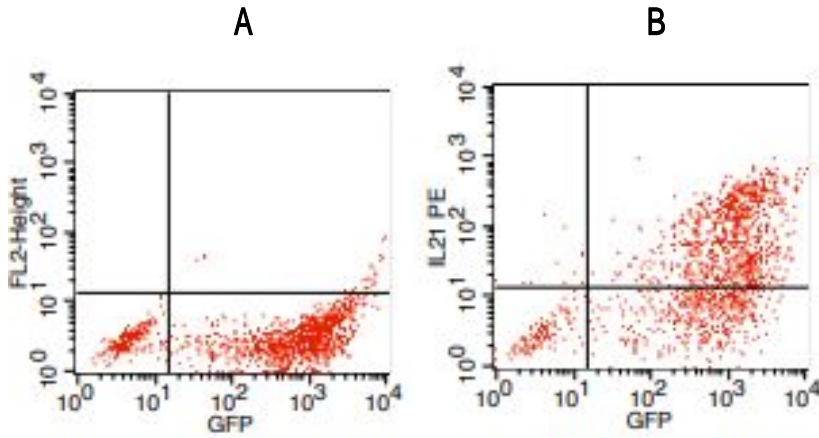


図 2

A; membrane-bound hybrid IL15/21 遺伝子の導入効率

B; membrane-bound hybrid IL15/21 遺伝子導入 K562 における IL-21 発現効率

(3)新規膜結合型サイトカイン遺伝子導入 NK 細胞による NK 細胞増幅の検討

IL-2 100 IU/ml 添加下で遺伝子導入後 7 日目における mbIL15/IL21 導入 NK 細胞 (mbIL15/IL21-NK) とコントロールとして膜結合型サイトカイン以外のコンストラクトを導入した NK 細胞 (mock-NK) の増幅率を比較した。IL-21 の細胞表面における発現は、NK 細胞が有する IL-21 レセプターと結合したと思われる、検出できなかった。GFP を指標とした遺伝子導入効率は mbIL15/IL21-NK (図 3A)、mock-NK (図 3B) についてそれぞれ 34%、53% だった。mbIL15/IL21-NK、mock-NK の増幅率はそれぞれ 27 倍、41 倍で増幅効率の改善は得られなかった (図 3C)。

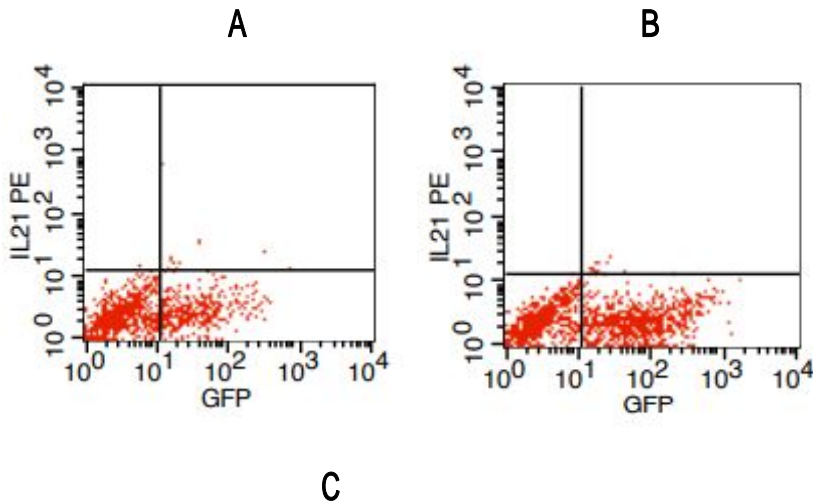
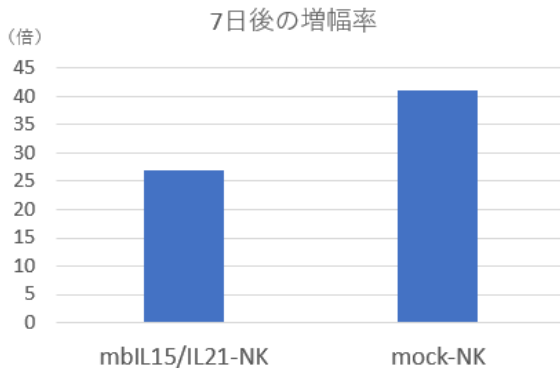


図 3

A; mbIL15/IL21-NK の遺伝子導入効率 (7 日後)

B; mock-NK の遺伝子導入効率 (7 日後)

C; mbIL15/IL21-NK と mock-NK の遺伝子導入 7 日後の増幅率の比較



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	今井 千速 (Imai Chihaya) (90419284)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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