

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19508

研究課題名（和文）臍帯血を用いた新しいCAR-NK細胞療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new CAR-NK cell derived from cord blood

研究代表者

保仙 直毅（Hosen, Naoki）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10456923

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：CAR-NK細胞はアロのドナーから多数の患者用の細胞が作れる可能性があり、CAR-T細胞の大きな課題である高いコストの問題を解決する可能性がある。我々が既に開発した活性化型インテグリンb7を標的とするCAR（以後MMG49 CAR と呼ぶ）をヒト臍帯血単核球に導入し、既報に従いCAR-NK細胞の作製を行った。その結果、MMG49 CAR-NK細胞による有意な細胞傷害活性が得られることを示した。さらに、MMG49 CAR-NK細胞のsingle cell RNA seq解析を行い、多様な細胞亜集団があることを明らかにした。現在それぞれの細胞亜集団の機能を解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、わが国で初めて臍帯血由来CAR-NK細胞を臨床開発するための道筋が開かれた。今後、多発性骨髄腫に対してMMG49 CAR-NK細胞を臨床開発していくとともに、様々ながん種に対して新たなターゲットに対する様々なCAR-NK細胞の開発が可能である。また、CAR-NK細胞のheterogeneityの解明が進むことにより、より効率的に抗腫瘍効果の高い細胞集団を誘導する方法が開発されることにつながる。現時点では既報に則ったCAR-NK細胞を行っているが将来的には、その製造法も独自のものを開発していく予定である。

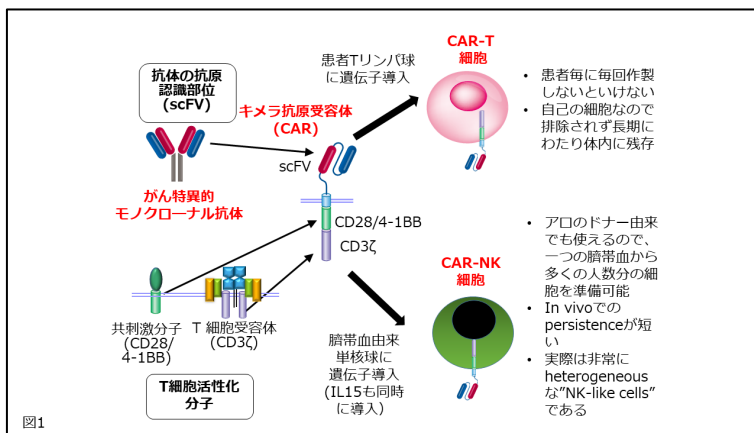
研究成果の概要（英文）：CAR-NK cells can be generated from a single cord blood donor for many patients, which may reduce the cost for cell manufacturing compared with that for CAR-T cells. We have already developed a CAR that targets activated integrin beta7 (hereafter referred to as MMG49 CAR). In this study, we introduced MMG49 CAR into human cord blood mononuclear cells to generate CAR-NK cells according to previous reports. MMG49 CAR-NK cells showed significant cytotoxic activity against myeloma cells. Furthermore, single cell RNA seq analysis of MMG49 CAR-NK cells was performed, revealing diverse cell subpopulations. We are currently analyzing the function of each cell subpopulation.

研究分野：血液内科学

キーワード：細胞医薬

1. 研究開始当初の背景

CAR (キメラ抗原受容体) とはがん特異的な抗体の抗原認識部位と T 細胞活性化分子とを融合した人工的な受容体で、CAR を遺伝子導入により発現させた CAR-T 細胞はがん特異的な抗原を認識すると活性化し、がん細胞を傷害するとともに激しく増殖する。B 細胞性白血病/悪性リンパ腫に対する CD19 を標的とした CAR-T 細胞は驚くべき臨床効果を示し、我が国でも 2019 年に承認された。そこで、現在他の多くの疾患に対する CAR-T 細胞の開発が世界的競争となっている。我々は多発性骨髄腫においてインテグリンβ7 が恒常的に活性化していることを発見し、活性型インテグリンβ7 を特異的に認識する CAR-T 細胞が高い抗骨髄腫活性を持つことを示し (Hosen N et al. *Nature Medicine*, 2017)、その成果を企業へ導出した。CAR-T 細胞に関する一つの大きな問題は、患者毎に自己の T 細胞から作る必要があり、コストが莫大であることである。一方、HLA に拘束されない細胞傷害性細胞である NK 細胞であればアロのドナーから、多数の患者用の細胞が作れる可能性がある (図 1) と考えられ、最近、臍帯血から誘導した CAR-NK 細胞の有効性が示された。しかし、既報の CAR-NK 細胞は “NK 細胞” と呼んではいるものの、非常に heterogeneous な “NK-like cell” 集団であると考えられる。



2. 研究の目的

目的1 活性型インテグリンβ7 を標的とした臍帯血由来 CAR-NK 細胞の作製と抗腫瘍効果の評価

我々が既に開発した活性型インテグリンβ7 を標的とする CAR (以後 MMG49 CAR と呼ぶ) をヒト臍帯血単核球に導入し、既報 (*N Engl J Med*, 382, 545-553, 2020) に従い CAR-NK 細胞の作製を行う。そして、その抗腫瘍効果を評価する。

目的2 CAR-NK 細胞の heterogeneity の解明

CAR-NK 細胞集団は極めて heterogeneous な集団と考えられるので、それらの性状を明らかにし、それらの中で真に抗腫瘍効果を担っている亜集団を同定することを目指す。具体的には MMG49 CAR-NK 細胞の single cell RNA seq 解析を行う。これにより、どのような細胞亜集団があって、どのような機能を有するかを明らかにする。

3. 研究の方法

目的1 活性型インテグリンβ7 を標的とした臍帯血由来 CAR-NK 細胞の作製と抗腫瘍効果の評価

膜結合型 IL-15 と 4-1BB ligand を発現させた K562 細胞および IL-2 で刺激した臍帯血由来単核球に、レトロウィルスベクターを用いて MMG49 CAR と IL-15 を共発現させ、拡大培養することにより CAR-NK 細胞を作製した。さらに、⁵¹Cr を用いた骨髄腫細胞に対する細胞傷害活性の測定を行った。

目的2 CAR-NK細胞の heterogeneity の解明

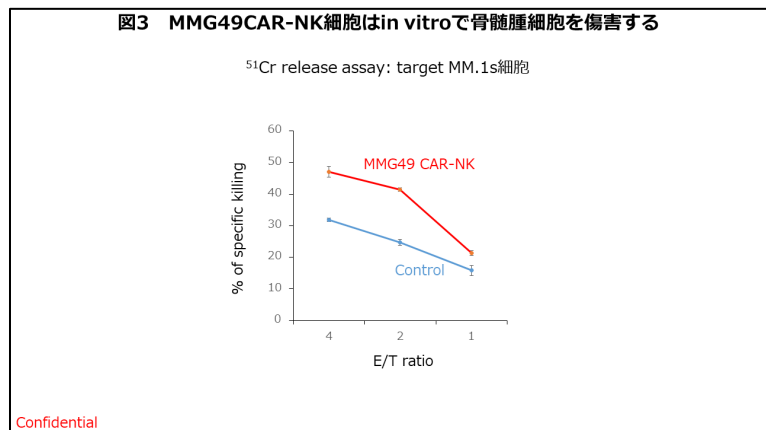
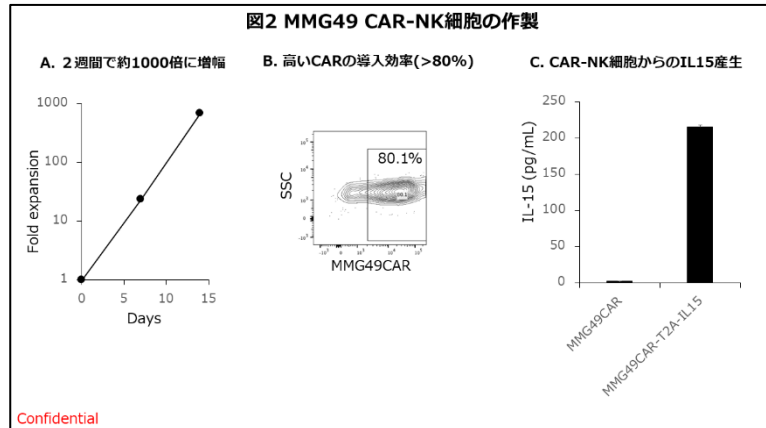
MMG49 CAR-NK細胞の heterogeneity を解明するため、single cell RNA seq 解析を行なった。

4. 研究成果

目的1 活性型インテグリン β 7 を標的とした臍帯血由来 CAR-NK細胞の作製と抗腫瘍効果の評価

臍帯血由来単核球を単離し、膜結合型 IL-15 と 4-1BB ligand を発現させた K562 細胞および IL-2 で刺激した。次に、レトロウイルスベクターにより MMG49 CAR と IL-15 を共発現させ、拡大培養することにより CAR-NK細胞を作製した。その結果、2週間で約1000倍にNK細胞を増幅することに成功した(図2A)。増幅されたNK細胞へのCARの導入効率は80%を超えて極めて高効率であった(図2B)。また、CAR-NK細胞がIL15を産生していることも確認した(図2C)

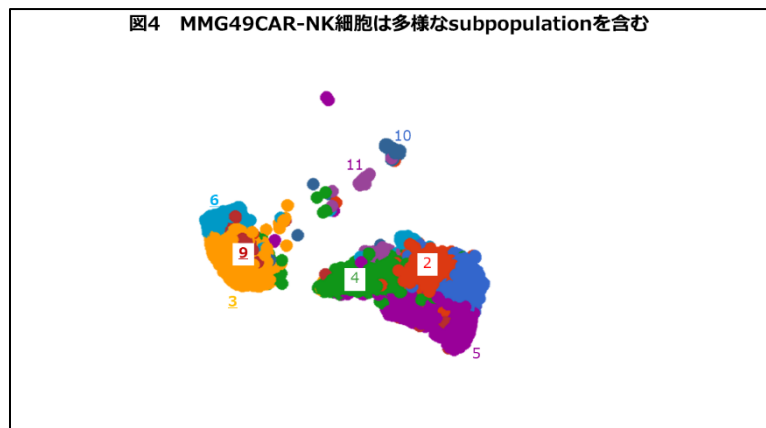
^{51}Cr を用いた骨髓腫細胞に対する細胞傷害活性の測定を行い、有意な細胞傷害活性が得られることを示した(図3)。



目的2 CAR-NK細胞の heterogeneity の解明

MMG49 CAR-NK細胞の heterogeneity を解明するため、single cell RNA seq 解析を行なった。

その結果、CAR-NK細胞集団の中に、非常に多様な細胞集団が存在することを見出した(図4)。これらのそれぞれの細胞亜集団を分離するための細胞表面マーカーを同定しており、それらを用いてFACSにて分取したどの細胞集団が高い細胞傷害活性を持つかを現在検討している。



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

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