169　全く新しいNK細胞養子免疫技術の研究・実用化開発	原田　結

【目的】がんは国民死亡原因の第1位であり、このがん死亡率を低下させると共にがん患者のQOLの維持に主眼を置いた包括的治療戦略を構築することは極めて重要であり、今なお試行錯誤の最中にある。従来の治療技術では成し得なかった”Total tumor cell killing” を達成し得る治療法として免疫の利用が検討され始めて40年近くなる近年、免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がんに対する免疫の積極的利用に注目が集まるようになった。

しかし依然としてHLAや特定の抗原に依存するモダリティの開発に留まっており、T細胞に依らないモダリティの開発が嘱望されていることから、NK細胞に着目をしてその実用化研究開発を行うことを目的とした。

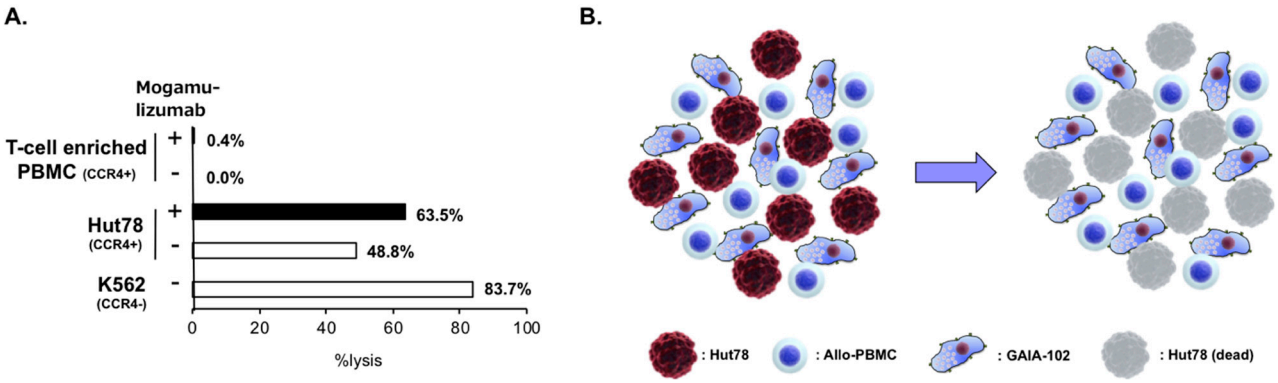
【方法】我々が開発してきたNK細胞プラットフォーム技術GAIA-102：WO2014188680A1（JP5511039/JP5989016/）、WO2012176796A1（JP5572863/US9404083/CN ZL201280031188.5、JP-2016176379、JP-2016188166、JP-2017095288）、他を総動員し、NK細胞が傷害活性を発揮する際のキーとなる因子の探索を行った。ヒト検体の使用については九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会により承認を得ており（体外培養NK細胞を用いた再生医療等製品の開発のための予備試験、許可番号：29-218、許可期間：平成29年8月9日～平成34年3月31日）、GAIA-102の作製はAdoptCell®-NK Kit（Kohjin Bio）のプロトコールに準じて行った。

【結果】NK細胞の抗腫瘍活性の測定に標準的に用いられるK562の他、種々の組織に由来する腫瘍細胞に対する傷害活性の測定を行った結果、HLA null かつNKG2D ligand陰性であるため一般にNK-resistantとして知られるRajiを含め、K562／IMR32／HCT116／SKOV3／MCF7／Hut78に対してE：T＝1：1、2時間の共培養による傷害活性はPrimary NK細胞のそれを大きく上回ることが確認された。予想に反し、接着系の細胞に対してはSpheroidを形成した際により高い傷害活性を示すことが明らかになり、臨床応用の際には固形腫瘍に高い奏功が期待される結果となった。また急性単球性白血病細胞であるTHP-1はSpheroidを形成しないが、驚くべきことに液性因子X（炎症性サイトカインの一つ）を添加するだけでその感受性が大幅に向上することが明らかになった。

またGAIA-102をエフェクターとした場合、MogamulizumabはCCR4陽性であるHut78に対してADCC活性を示した一方、CCR4陽性の正常細胞（末梢血中CD4陽性T細胞の一部）に対する傷害活性は観察されなかった。つまり、多くの抗体医薬品が抱える有害事象の一つ、”On-target Off-tumor効果” の原因細胞がNK細胞（GAIA-102のような体外で活性化培養を経た細胞であっても）ではないことが確かめられた。

本研究の成果はNK細胞を再生医療等製品として開発する際に貴重な情報を与えると共に、NK細胞による腫瘍細胞識別機構解明の糸口を発見した有意義なものであった。

GAIA-102によるADCC活性と腫瘍細胞特異的傷害活性



169. 全く新しいNK細胞養子免疫技術の研究・実用化開発

原田　結

九州大学 大学院薬学研究院 革新的バイオ医薬創成学講座

Key words：NK細胞，再生医療等製品，悪性腫瘍，免疫，ADCC活性

緒　言

がんは国民死亡原因の第1位であり、このがん死亡率を低下させると共にがん患者のQOLの維持に主眼を置いた包括的治療戦略を構築することは極めて重要であり、今なお試行錯誤の最中にある。従来の治療技術では成し得なかった"Total tumor cell killing"を達成し得る治療法として免疫の利用が検討され始めて40年近くなる近年、免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がんに対する免疫の積極的利用に注目が集まるようになった。現時点でPD-1、PD-L1、CTLA4の阻害抗体は臨床応用されており、これらはいずれもT細胞をエフェクターとする治療戦略として開発されてきた。しかしその有効性には大きな個人差が見られ、腫瘍細胞におけるHLAや特定の抗原に依存するモダリティであることがその原理的な要因の一つであることは疑う余地も無い。そのため、HLAの発現低下或いは消失、または腫瘍抗原を認識するCTLが少ないか或いは存在しない症例においては、少なくともCTLをエフェクターと考えた場合には原理的に無力である。また、CAR-T細胞の登場はその高い奏効率で注目を浴びたものの、やはり特定の抗原に依存するモダリティの限界は変わらず［1，2］、加えて汎用性の高い"Universal Antigen"なるものも存在していないことが臨床検体の解析から明らかになった［3］。免疫による治療戦略ががん治療の歴史を変えつつある現在も尚、腫瘍の種類横断的に治療効果を発揮し得る強力なエフェクター細胞の製剤化が嘱望されているのである。

そこで本研究では、HLAや特定の抗原に依存性を示さず、腫瘍細胞特異的に高い傷害活性を発揮する独自のNK細胞を用いた治療技術を開発することを目的とした。我々はこれまでに、他に類を見ない高活性を示すNK細胞（開発コード：GAIA-102）の作製に成功してきたが［4，5］、そのNK細胞が腫瘍細胞を認識するメカニズムの全貌は明らかになっていなかった。そこでこれまでに蓄積された知見を元に、1. HLA/KIRミスマッチ、2. Positive/Negative signal強度の大きく2つの視点から、種々の細胞株に対する傷害活性を指標として『NK細胞が腫瘍細胞を認識するメカニズムの解明』に挑み、その一端を知ることとなった。

方　法

1.　NK細胞（GAIA-102）の培養

健常人ボランティアの末梢血を材料とし、Ficoll Paque PLUS （GE Healthcare、Uppsala、Sweden）およびOptiPrep™（Axis-Shield Diagnostics Ltd.、Scotland）を用いた比重遠心法によりPBMCを回収、次いでCliniMACS CD3 MicroBeads （Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany）によりCD3陽性細胞を除去したのち、10% UltraGRO™（AventaCell BioMedical、New Taipei City、Taiwan） 含有KBM-501（Kohjin Bio、Saitama、Japan）で14日間の培養を行った。培養はAdoptCell®-NK Kit（Kohjin Bio）のプロトコールに準じて行った。

本研究で用いたヒト検体の利用については、九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会により承認を得ている（体外培養NK細胞を用いた再生医療等製品の開発のための予備試験、許可番号：29-218、許可期間：平成29年8月9日～平成34年3月31日）。

2. 腫瘍細胞株と Spheroid 形成

K562（慢性骨髄性白血病）、IMR32（小児神経芽腫）、HCT116（大腸がん）、SKOV3（卵巣がん）、MCF7（乳がん）、Raji（バーキットリンパ腫）、Hut78（セザリー症候群）、THP-1（急性単球性白血病）の各細胞株は RPMI-1640（10% FBS、1% PS）にて培養を行った。

IMR32、HCT116、SKOV3、MCF7 について、Spheroid は EZ-BindShut™ SP MICROPLATE 96 well （ASAHI GLASS CO. LTD.、Tokyo、Japan）を用いて 3×10^3 cells/ml で播種し、72 時間の培養を行うことで作製した。

3. 細胞傷害活性測定

ターゲットとなる腫瘍細胞株を PKH26（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）で標識し、EZ-BindShut™ SP MICROPLATE 96 well にて NK 細胞数：ターゲット細胞数を 1：1 とし、2 時間インキュベートを行った。その後、死細胞を 7-AAD で染色し、LSRFortessa（BD Biosciences、Franklin Lakes、NJ）を用いたフローサイトメトリー法にて解析を行った。傷害活性は以下の式により算出した：（% of target cell lysis in the test－% of spontaneous cell death）／（% of maximum lysis－% of spontaneous cell death）×100。また、生細胞数の算出には AccuCheck Counting Beads（Thermo Fisher Scientific K.K.、Waltham、MA）を用いた。

また ADCC 活性の測定に際し、適宜以下の抗体医薬品を用いた：Unituxin™ （Dinutuximab; United Therapeutics Corporation、Silver Spring、MD）、Poteligeo ™（Mogamulizumab ; Kyowa Hakko Kirin Co、Ltd. Tokyo）。いずれについても終濃度 1 μg/ml として使用した。

結果および考察

1. 腫瘍細胞株に対する傷害活性

まず始めに、NK 細胞の抗腫瘍活性の測定に標準的に用いられる K562 の他、種々の組織に由来する腫瘍細胞に対する傷害活性の測定を行った。その結果、HLA null かつ NKG2D ligand 陰性であるため一般に NK-resistant として知られる Raji を含め、K562／IMR32／HCT116／KOV3／MCF7／Hut78 に対して E：T＝1：1、2 時間の共培養による傷害活性は Primary NK 細胞のそれを大きく上回ることが確認された。

予想に反して確認された現象が二つある。一つ目は、HCT116／SKOV3／MCF7 について、特に Spheroid を形成した際に GAIA-102 による傷害活性が上昇するというものである。Primary NK 細胞、並びに研究用に市販されている第二世代 Her-2 targeting CAR-T 細胞との比較も行ったが、Spheroid に対する浸潤能および傷害能は GAIA-102 が圧倒的に高いことが明らかになった。そのメカニズムは未だ明らかではないが、その一因と考えられるのは特徴的なケモカイン／ケモカイン受容体による走化性であった。GAIA-102 は Primary NK と全く異なるケモカイン受容体発現パターンを示し、$CCR5^+$／$CCR6^+$／$CXCR3^+$という表現系を示す。これは、一般に固形腫瘍による発現量が多いことで知られる CCL20、また GAIA-102 自身が多く産生する CCL3/4/5 に対する正の走化性を示すことを示唆しており、実際に SKOV3／MCF7 においては発現アレイ解析によって Spheroid 形成時に CCL20 の発現が大きく上昇していることが確かめられた（data not shown）。今後、この実験系においてこれらケモカインが責任因子であるか否かを確定する必要があるが、臨床において固形腫瘍に対する高い奏功が期待される結果を得られたことには大きな意義があると考える。

もう一つは、GAIA-102 において Primary NK より高い傷害活性を示したものの、その他の細胞株に比して GAIA-102 に感受性が低かった THP-1 の挙動についてである。急性単球性白血病細胞である THP-1 は Spheroid を形成することはなく［6］、別の手段による感受性の低さ解消法が無いかを検討した。すると驚くべきことに、特定の液性因子 X（炎症性サイトカインの一つ、THP-1 の増殖性や分化・接着性・形態に影響は無い）を添加するだけでその感受性が大幅に向上することが明らかになった（図 1）。同因子での刺激の有無による THP-1 の何かしらの変化を GAIA-102 が捉えたものと推察されるが、その原因分子は今尚明らかではなく、新規治療標的分子になり得ると考えられるその因子の特定を引き続き進める予定である。

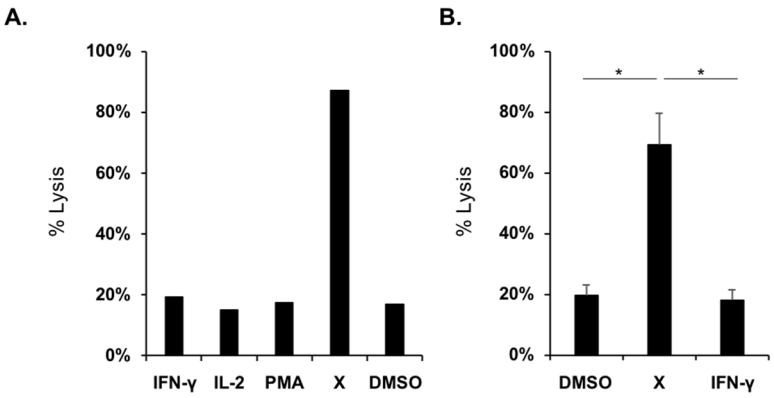


図 1. THP-1 に対する GAIA-102 による傷害活性

A) E : T = 1 : 1、2hrs での傷害活性。因子 X 添加時のみ大幅に傷害活性が向上した。

B) E : T = 1 : 1、2hrs での傷害活性。再現性良く因子 X の添加で傷害活性が向上することを確認した。One-way ANOVA、Tukey-Kramer の HSD 検定を実施。*P < 0.01。

2. ADCC 活性の評価と腫瘍細胞の認識

NK 細胞が対象細胞を傷害するか否かは、Positive signal（受容体 : NKp30／NKG2D／CD16 など）と Negative signal（受容体 : KIRs／NKG2A／TIGIT など）のバランスで決定されることが知られている。かつて Missing-self 仮説として広く知られた現象（NK 細胞は HLA を欠失した細胞を傷害する現象）はこのルールの一部であったことが分かる。NK 細胞に備わる Positive signal 受容体の中で ITAM の数が最も多い、つまり 1 分子当たりの Positive signal が最も強いと考えられるのが FcγRIII、即ち CD16 である［7］。そこで、ADCC 活性を持つ抗体医薬品を用いて 1. GAIA-102 による傷害活性の向上が見られるか、2. 抗体医薬品が結合した正常細胞に対して傷害活性を示すか、の 2 点の確認を行った。

予想していた通り、Unituxin™ は GD2 陽性である IMR32 に対して GAIA-102 をエフェクターとした ADCC 活性を示し、また Poteligeo ™ は CCR4 陽性である Hut78 に対して同様に ADCC 活性を示した。一方、微かな不安を抱きつつ解析を行った Poteligeo ™ による CCR4 陽性の正常細胞（末梢血中 CD4 陽性 T 細胞の一部）に対する傷害活性は観察されず、杞憂に終わった。ここで重要なことは、多くの抗体医薬品が抱える有害事象の一つ、”On-target Off-tumor 効果” ［8］の原因細胞が NK 細胞（GAIA-102 のような体外で活性化培養を経た細胞であっても）ではないことが確かめられたことであり、臨床での高い安全性が示唆された（図 2）。尚、”On-target Off-tumor 効果”の原因細胞の一つがマクロファージ系細胞であることは既報［9］であるが、この点についても本研究において確認が取れた（data not shown）。

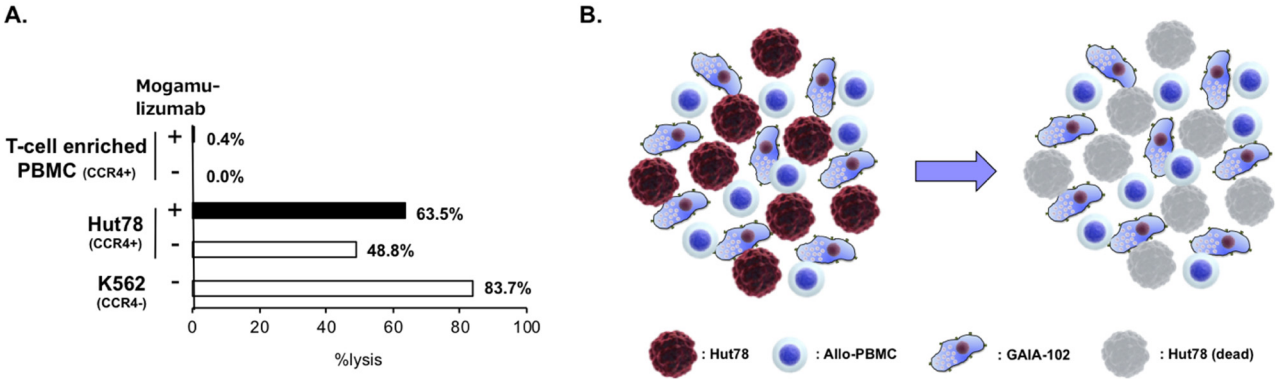


図 2. ADCC 活性と安全性

A) Mogamulizumab 存在下における傷害活性。正常細胞には一切傷害活性を示さない。

B) 模式図。図中の Hut78 と Allo-PBMC はそれぞれ CCR4 陽性であり Mogamulizumab が結合する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院薬学研究院革新的バイオ医薬創成学講座の米満吉和教授である。また、協力頂いた同講座の中村良子氏、田中李紗氏、永田寛子氏、鶴田智子氏に謝意を表する。

文　献

1） Evans AG, et al. Evolution to plasmablastic lymphoma evades CD19-directed chimeric antigen receptor T cells. Br J Haematol. 2015 Oct;171(2):205-209. doi: 10.1111/bjh.13562.

2） Ruella M, Maus MV. Catch me if you can: Leukemia Escape after CD19-Directed T Cell Immunotherapies. Comput Struct Biotechnol J. 2016 Sep 28;14:357-362. doi: 10.1016/j.csbj.2016.09.003

3） Pasetto A, et al. Tumor- and Neoantigen-Reactive T-cell Receptors Can Be Identified Based on Their Frequency in Fresh Tumor. Cancer Immunol Res. 2016 Sep 2;4(9):734-43. doi: 10.1158/2326-6066.

4） Saito S, et al. Ex vivo generation of highly purified and activated natural killer cells from human peripheral blood. Hum Gene Ther Methods. 2013 Aug;24(4):241-52. doi: 10.1089/hgtb.2012.183.

5） Harada Y, et al. Clinical Applications of Natural Killer Cells. Ed. by Mourad Aribi, Natural Killer Cells. nTech Open. pp87-125, 2017. doi: 10.5772/intechopen.68991

6） Tsuchiya S, et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). Int J Cancer. 1980 Aug;26(2):171-6. doi: 10.1002/ijc.2910260208

7） Hara H, et al. Cell type-specific regulation of ITAM-mediated NF-kappaB activation by the adaptors, CARMA1 and CARD9. J Immunol. 2008 Jul 15;181(2):918-30. doi: 10.4049/jimmunol.181.2.918

8） Tasian SK, Gardner RA. CD19-redirected chimeric antigen receptor-modified T cells: a promising immunotherapy for children and adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL). Ther Adv Hematol. 2015 Oct;6(5):228-41. doi: 10.1177/2040620715588916.

9） Sugata K, et al. Enhancement of anti-STLV-1/HTLV-1 immune responses through multimodal effects of anti-CCR4 antibody. Sci Rep. 2016 Jun 2;6:27150. doi: 10.1038/srep27150.