

固形がん治療を目指した遺伝子導入iPS細胞由来NK細胞の作製と評価

山田雅司、鳥澤勇介、櫻井哲哉、宮田琴子、竹野友理子、倉知 建始、細谷朋方、西垣扶佐子、木村博信、田村康一

株式会社ヘリオス・神戸研究所

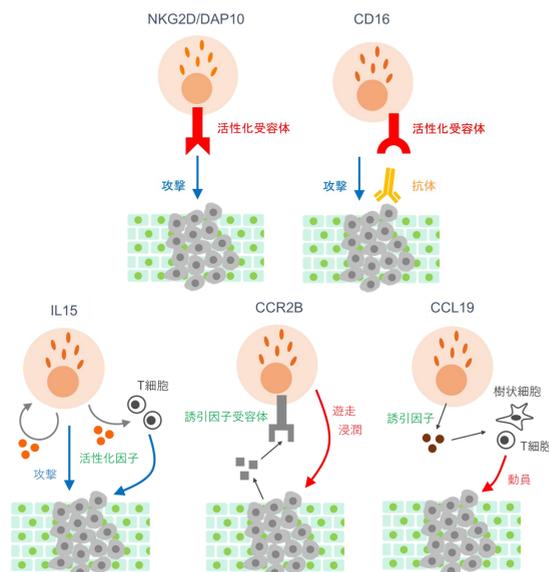
要旨

がん免疫細胞療法は、CAR-T療法を代表に、近年特に注目されており、血液がんに対する劇的な治療効果が示されている。一方、固形がんに対しては、現在のところ十分な治療効果は認められていない。我々はこれまでに、ヒトiPS細胞からNK細胞を高効率に誘導でき、かつ大量に作製可能な方法の開発に成功している。本研究では、iPS細胞由来NK細胞を用いた固形がん治療を目的に、NK細胞の抗腫瘍作用強化に働くと考えられる遺伝子をiPS細胞に導入した。その上で、NK細胞に分化誘導をし、得られたNK細胞において導入遺伝子の効果の検証を行った。

6つの遺伝子 (IL-15, CCR2B, CCL-19, NKG2D, DAP10, CD16) を導入したヒトiPS細胞株を樹立し、その細胞株から分化誘導を行うことで、遺伝子導入NK細胞 (eNK細胞: HLCN061) を作製した。eNK細胞における、各導入遺伝子の発現を評価した結果、iPS細胞に導入した全ての遺伝子において、良好な発現がタンパク質レベルで確認できた。さらに、各導入遺伝子の機能の評価を行った結果、IL-15の発現に起因する生存・増殖機能の向上、CCR2B発現に起因するがん細胞への遊走能力の亢進、CCL-19の発現に起因する免疫細胞のリクルート機能、およびNKG2D/DAP10発現に起因するサイトカイン産生・細胞傷害活性の増強が認められた。加えて、高親和性CD16(F176V)の発現に起因する抗EGFR抗体添加による顕著な抗体依存性細胞傷害活性も確認できた。以上の結果、上記6種類の遺伝子を導入したiPS細胞より得られたeNK細胞は、生存・増殖能、がん細胞への集積能、免疫細胞の動員能、およびがん細胞に対する傷害能の増強を顕著に示すことから、固形がんに対して高い抗腫瘍効果を有することが期待される。

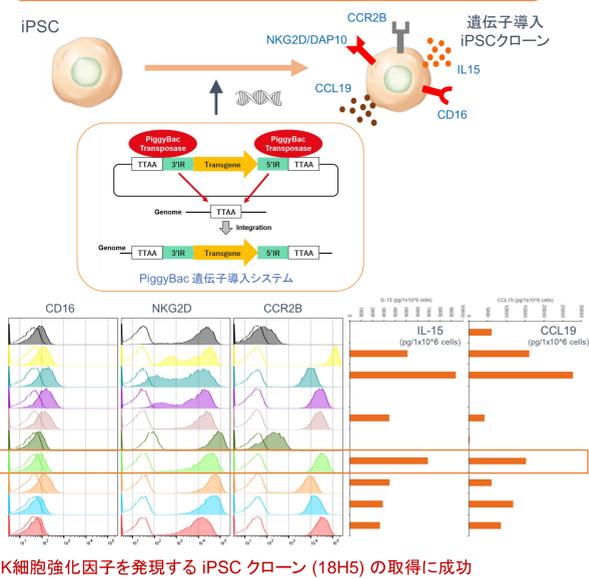
1. 遺伝子導入したNK細胞機能強化分子

- NKG2D:** がん細胞の認識能力の強化
- CCR2B:** がん細胞への遊走能力の促進
- CD16:** 抗体依存性細胞傷害活性の向上
- CCL19:** 免疫細胞のリクルート機能の亢進
- IL-15:** 生存・増殖機能の亢進



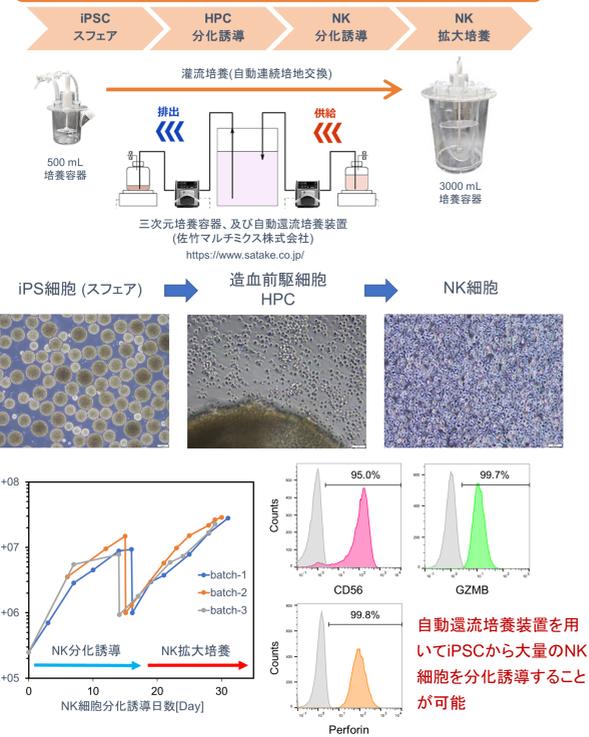
殺傷能力・生体内持続性・腫瘍部位への遊走・浸潤能力を増強
患者さんの免疫細胞も動員し、抗腫瘍効果を強化

2. 遺伝子導入iPS細胞クローンの作製



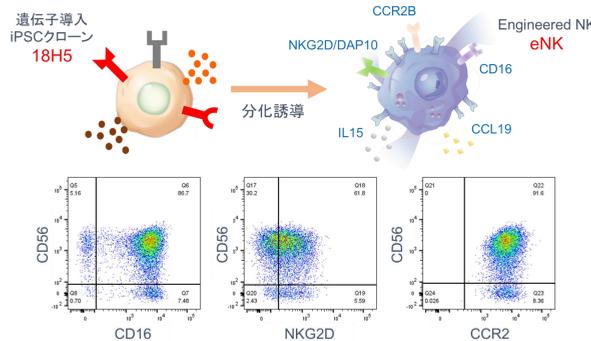
NK細胞強化因子を発現するiPS細胞クローン (18H5) の取得に成功

3. iPS細胞からNK細胞への分化誘導法



自動遠流培養装置を用いてiPS細胞から大量のNK細胞を分化誘導することが可能

4. 遺伝子導入iPS細胞からNK細胞への分化誘導

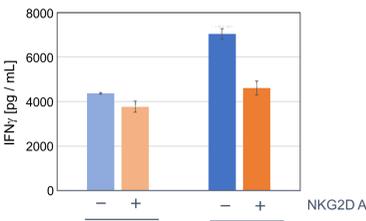


遺伝子導入iPS細胞 (18H5) からeNK細胞への分化誘導に成功

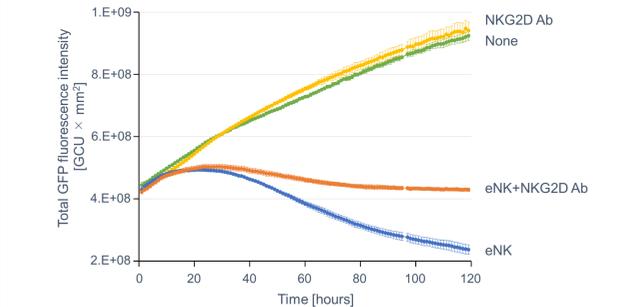
5. NKG2D/DAP10の活性評価

導入遺伝子の効果を、遺伝子未導入の親株より誘導したiNK細胞との比較により確認

A549との共培養4時間後の培養液中のInterferon-γの濃度をELISAで評価



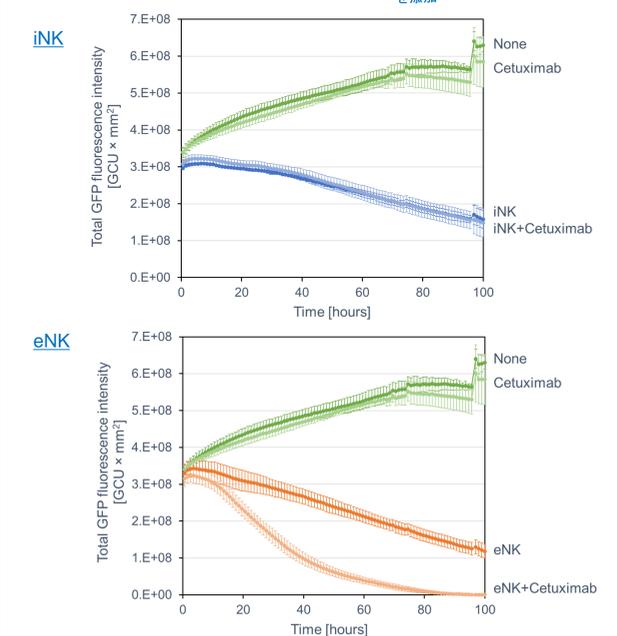
A549 (GFP発現) に対する細胞傷害活性をIncucyteを用いて評価



1.0 × 10⁴ cellsのGFP発現A549スフェロイド
3.0 × 10⁴ cellsのNK細胞を播種
1 μg/mL anti-NKG2D抗体を添加
eNK細胞では、NKG2Dに起因するサイトカイン産生・細胞傷害活性が増強

6. CD16の活性評価

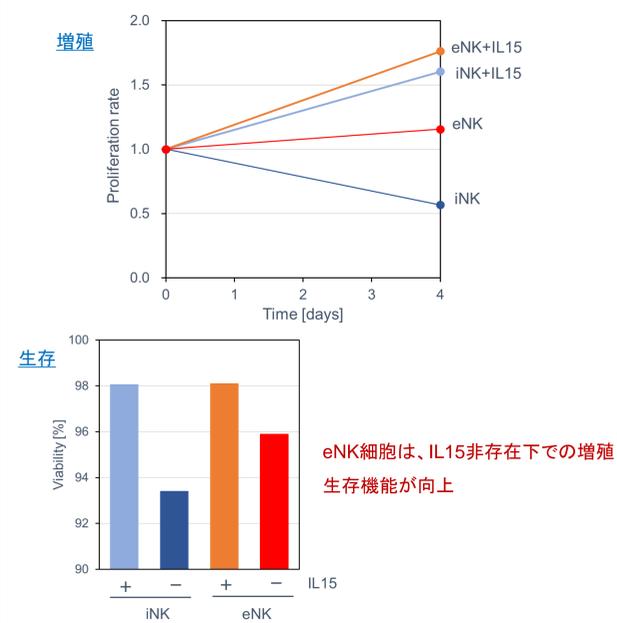
GFP発現A549のスフェロイドに対する抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC活性) をIncucyteで評価 (がんスフェロイドのGFP強度を経時的に計測)



CD16を導入したeNK細胞では、抗体併用による細胞傷害活性が亢進

7. IL15の活性評価

IL15 (1 ng/mL) の存在・非存在下でのNK細胞の増殖・生存を評価

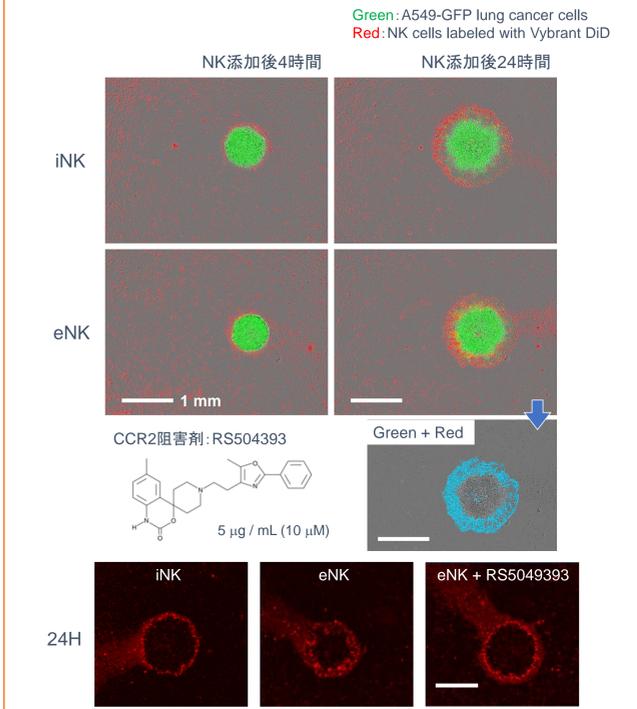


eNK細胞は、IL15非存在下での増殖・生存機能が向上

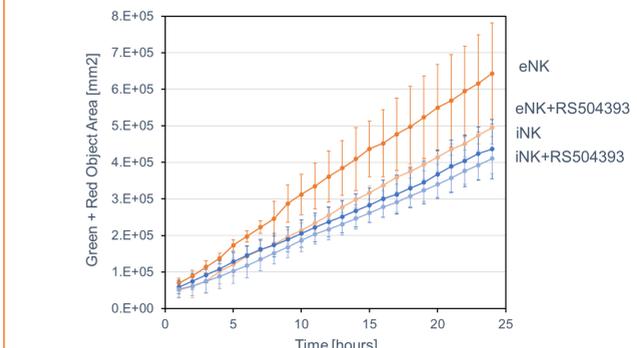
8. CCR2Bの活性評価

実験方法

- 1.0 × 10⁴ cellsのA549 (肺がん細胞株) を4日間培養してスフェロイドを形成
- ↓ 平底の24 well plateの中央に播種
- ↓ 蛍光染色したNK細胞 (1.0 × 10⁵ cells) を播種
- ↓ Incucyteでタイムラプス計測
- ↓ 緑色蛍光 (がん細胞) かつ赤色蛍光 (NK細胞) の領域を経時的に評価



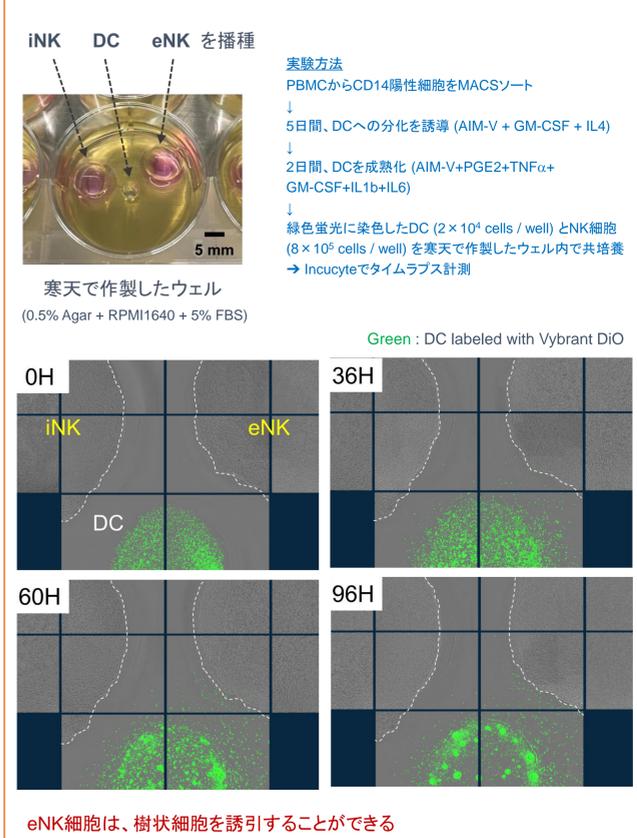
Incucyteを用いて定量



eNK細胞では、CCR2Bに起因するがん細胞塊への遊走能力が向上

9. CCL19の活性評価

樹状細胞 (DC) とNK細胞を共培養することで、免疫細胞のリクルート機能を評価



eNK細胞は、樹状細胞を誘引することができる

まとめ

- eNK細胞の機能
- ✓ NKG2D 発現により、がん細胞の認識能力・殺傷能力が強化
 - ✓ CD16 発現により、抗体依存性細胞傷害活性が亢進
 - ✓ IL15 の分泌により、生存・増殖機能が向上
 - ✓ CCR2B 発現により、がん細胞への遊走能力が向上
 - ✓ CCL19 の分泌により、免疫細胞のリクルートが可能
- 遺伝子導入を施したiPS細胞から分化誘導したeNK細胞は、固形がんに対し、従来よりも強い抗腫瘍作用を示す可能性がある