

鳥澤勇介、櫻井哲哉、宮田琴子、竹野友理子、山田雅司、木村博信、田村康一

株式会社ヘリオス・神戸研究所

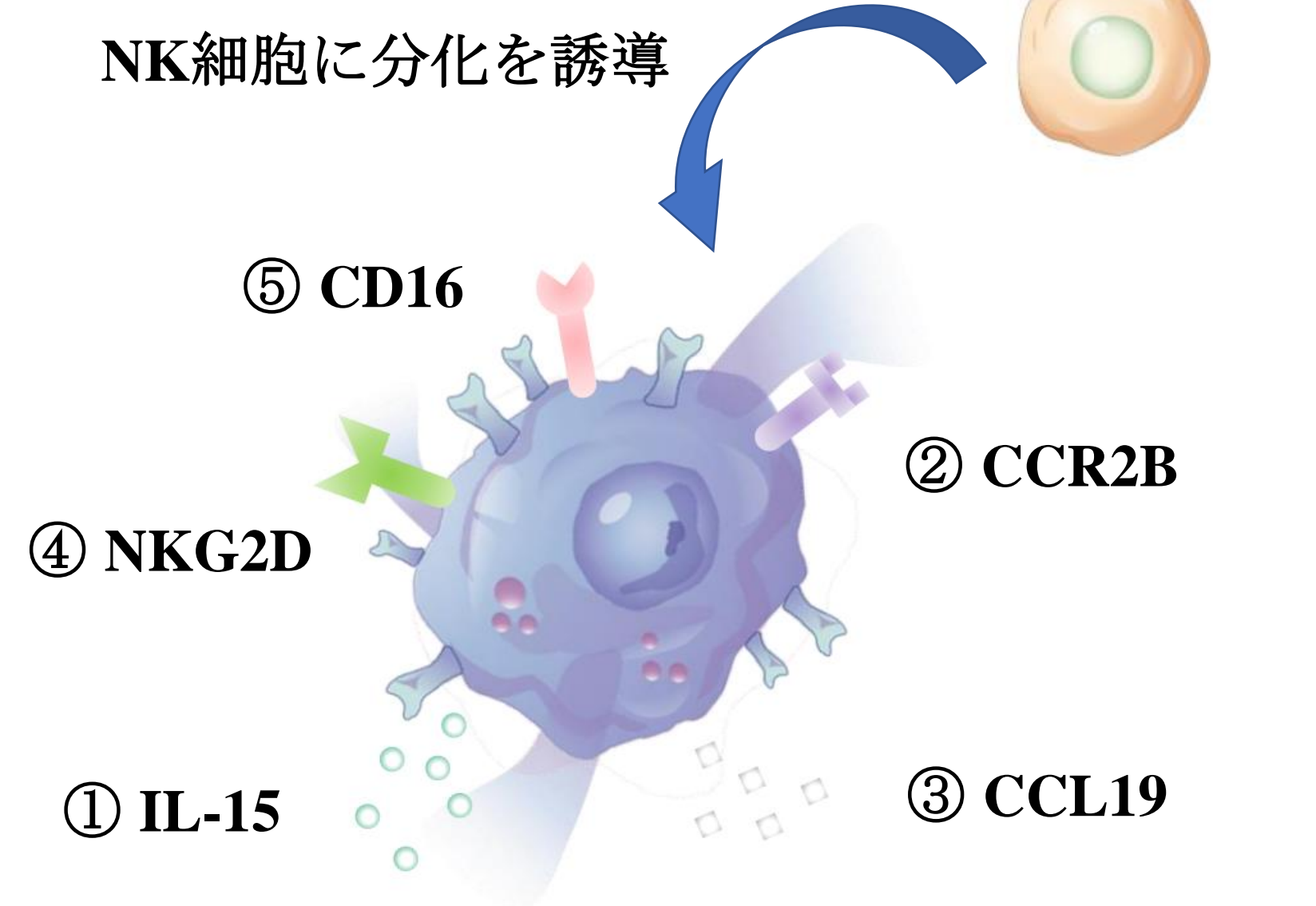
がん免疫細胞療法は新規の治療法として注目されており、血液がんでは劇的な治療効果が報告されている。しかしながら、固形がんに対しては治療効果を示すに至っていない。我々はこれまでに、ヒトiPS細胞からNK細胞を高効率で誘導でき、かつ大量培養が可能な手法の開発に成功している。そこで本研究では、iPS細胞に遺伝子導入を施すことで、NK細胞の固形がんに対する抗腫瘍作用の強化を試みた。

5つの遺伝子を導入したヒトiPS細胞株を樹立後、分化を誘導することでCD56陽性のNK細胞 (eNK細胞: HLCN061) を作製した。iPS細胞に導入した全ての因子はNK細胞においても良好に発現・分泌が維持されていた。今回、これら導入因子についてeNK細胞での機能検証を行った。

eNK細胞に導入した各因子の機能

- ① IL-15の分泌 ⇒ 生存・増殖機能の向上
- ② CCR2B発現 ⇒ がん細胞への遊走能力の向上
- ③ CCL19の分泌 ⇒ 免疫細胞のリクルート機能
- ④ NKG2D発現 ⇒ がん細胞の認識能力の向上
- ⑤ CD16発現 ⇒ 抗体依存性細胞傷害活性の向上

eNK細胞の特徴

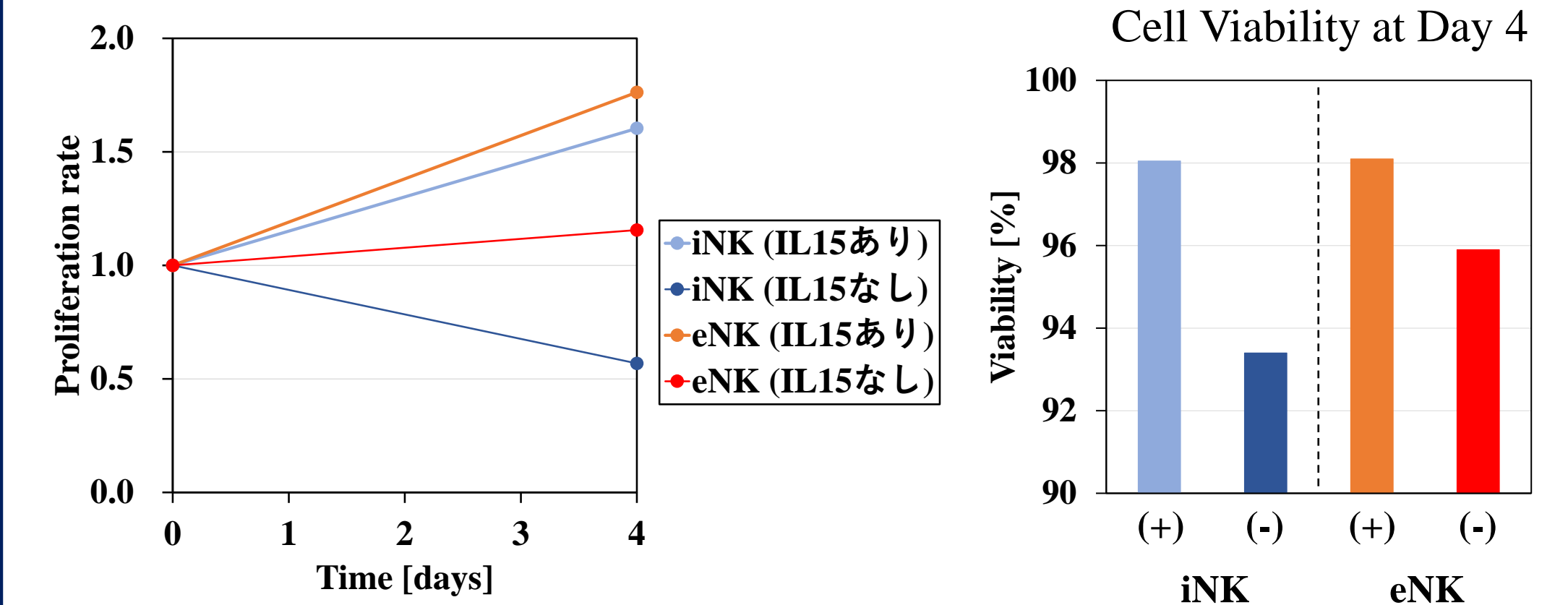


殺傷能力・生体内持続性・腫瘍部位への浸潤能力を増強
患者さんの免疫細胞も動員し、抗腫瘍効果を強化

① IL-15

eNK細胞は、IL-15の分泌機能が強化されている

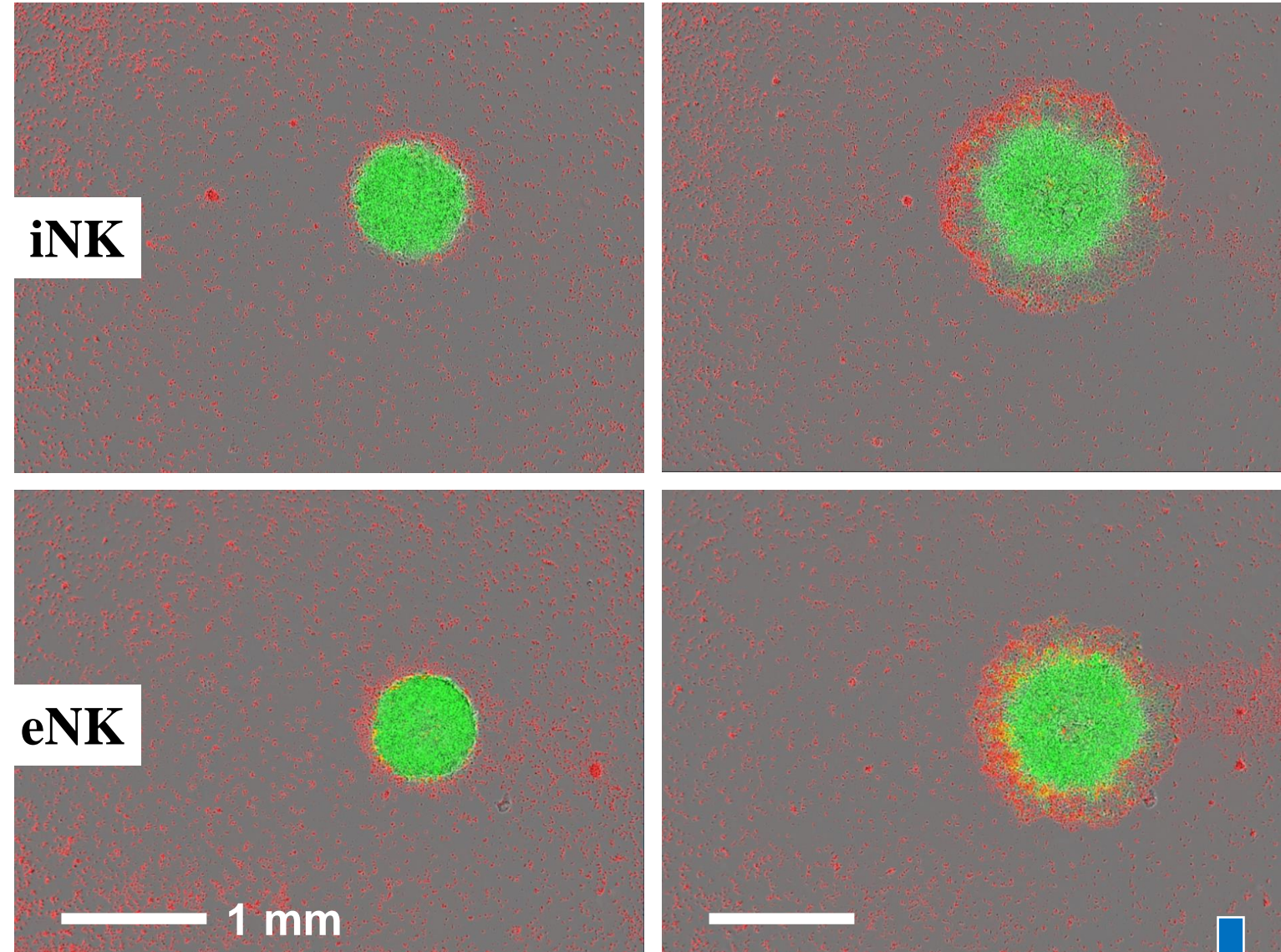
(1 ng / mL) IL-15添加の有無によるNK細胞の増殖・生存を評価



eNK細胞は、IL-15の無い環境下で、生存・増殖機能が向上
⇒ NK細胞の生存・増殖機能が増強

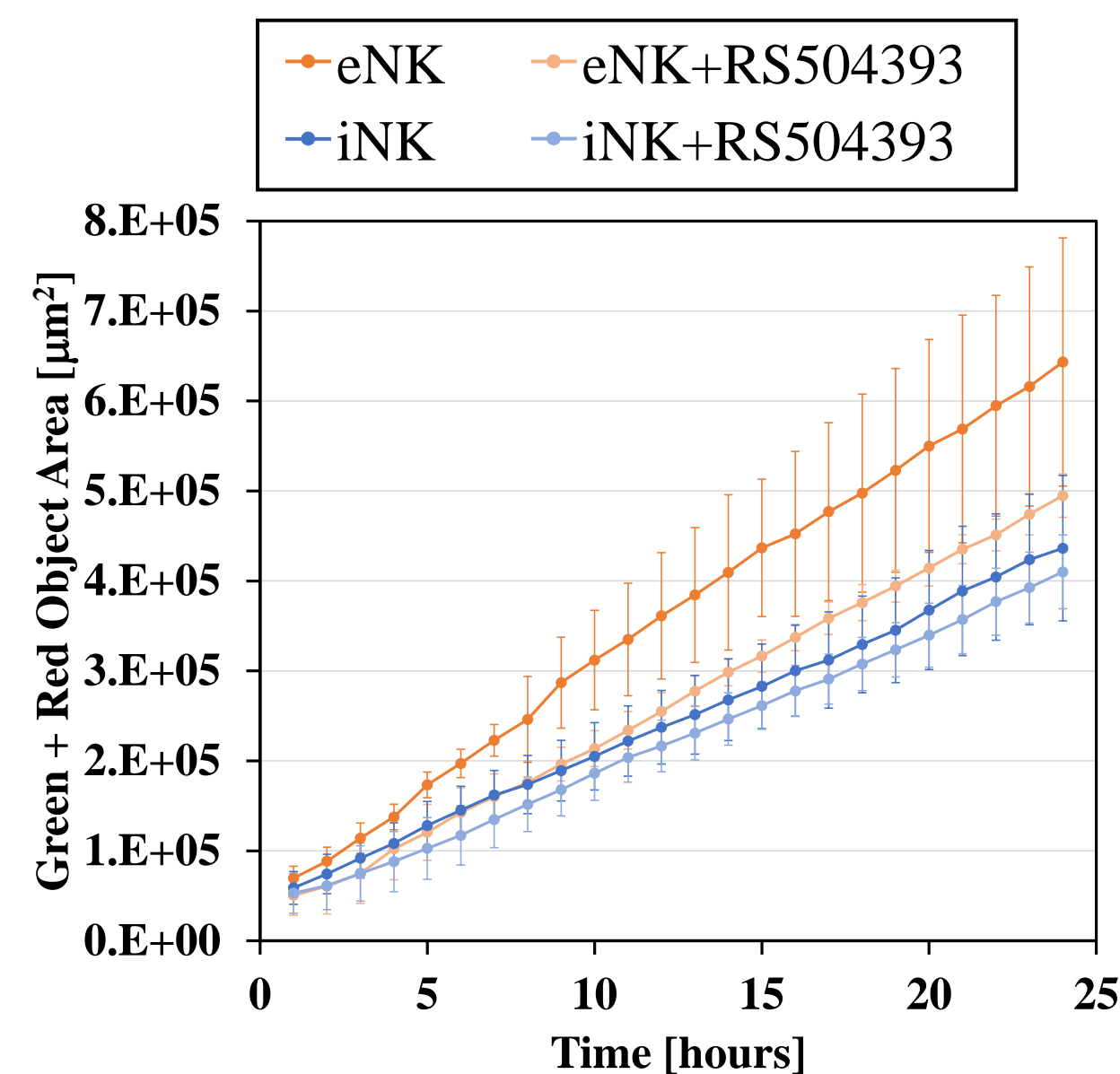
② CCR2B

NK添加後4時間 NK添加後24時間



Green : A549-GFP lung cancer cells
Red : NK cells labeled with Vybrant DiD

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



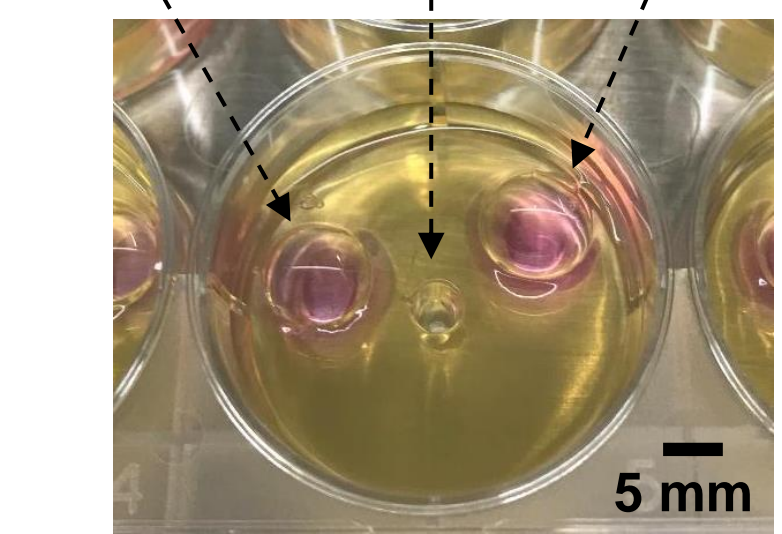
eNK細胞は、CCR2Bに起因するがん細胞塊への遊走能力が強化 ⇒ 腫瘍部位への遊走機能が向上

③ CCL19

eNK細胞は、CCL19を分泌する

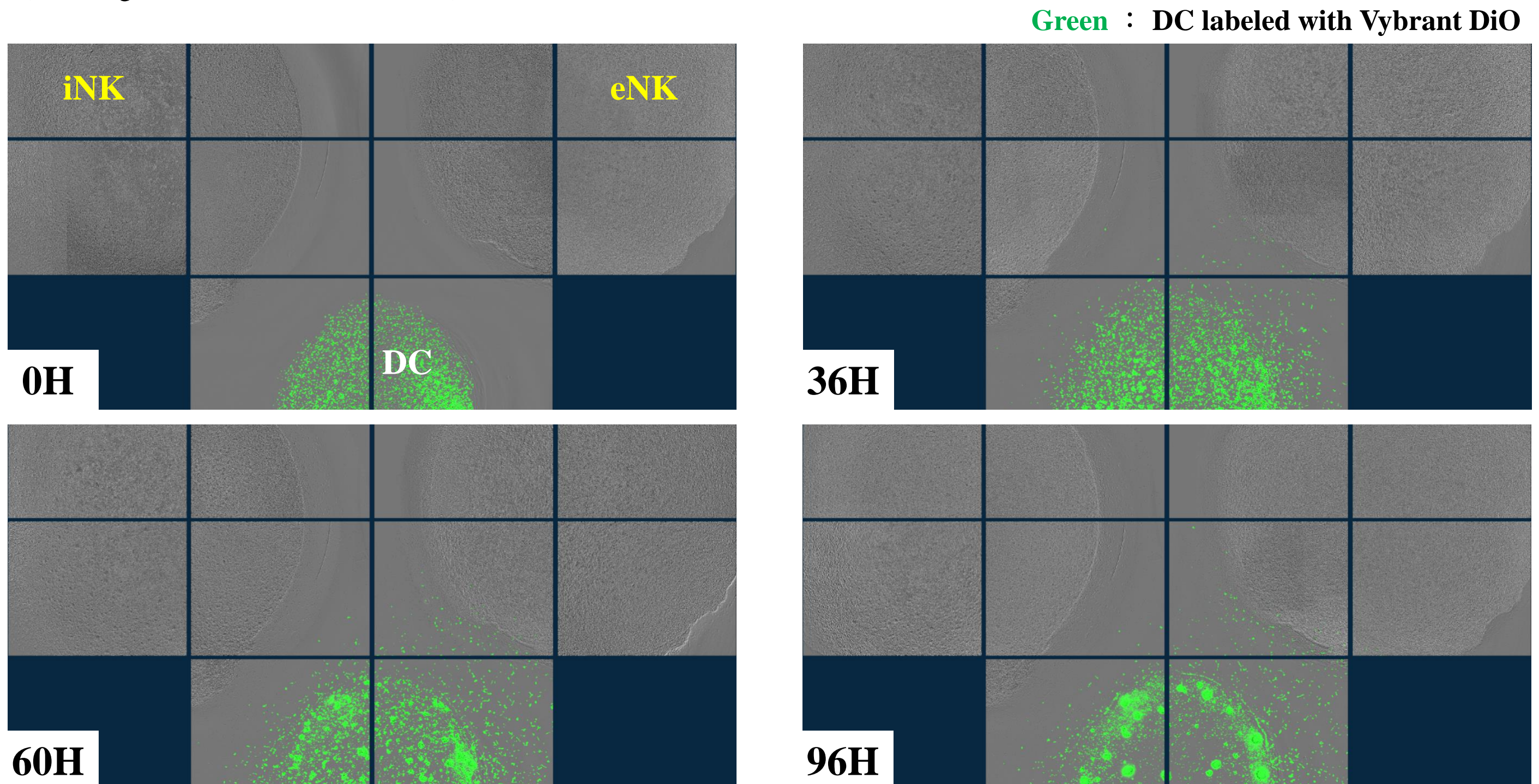
樹状細胞 (DC) とNK細胞を共培養することで、免疫細胞のリクルート機能を評価

(左)iNK、(中)DC、(右)eNKを播種



寒天で作製したウェル (0.5% Agar + RPMI1640 + 5% FBS)

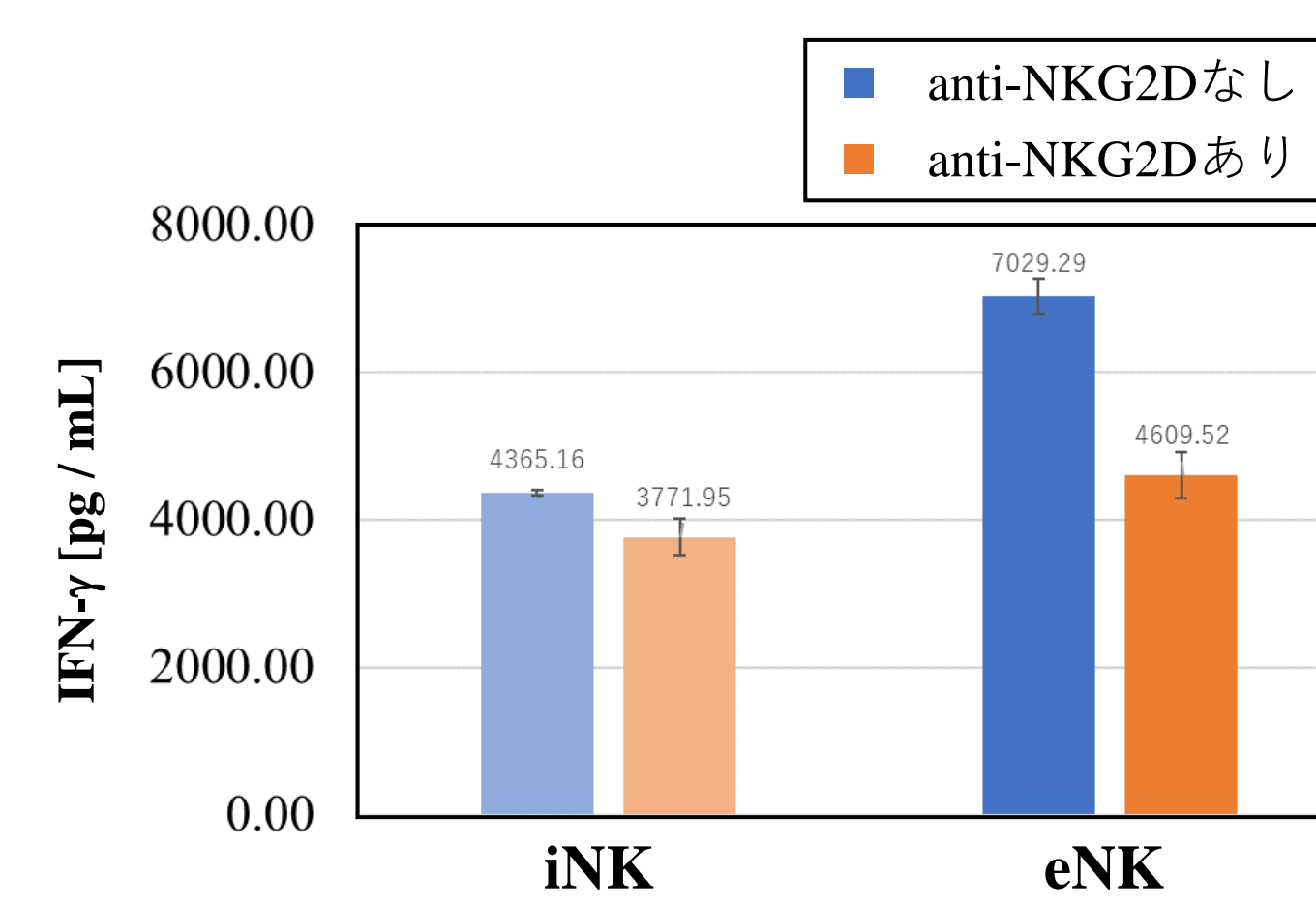
実験方法
PBMCからCD14陽性細胞をMACSソート
↓
5日間、DCへの分化を誘導 (AIM-V + GM-CSF + IL-4)
↓
2日間、DCを成熟化 (AIM-V + PGE2 + TNFα + GM-CSF + IL-1β + IL-6)
↓
緑色蛍光に染色したDC (2 × 10⁴ cells / well) とNK細胞 (8 × 10⁵ cells / well) を寒天で作製したウェル内で共培養
↓
Incucyteでタイムラプス計測



eNK細胞が分泌するCCL19により、樹状細胞をリクルートできる
⇒ 免疫細胞のリクルート機能を獲得

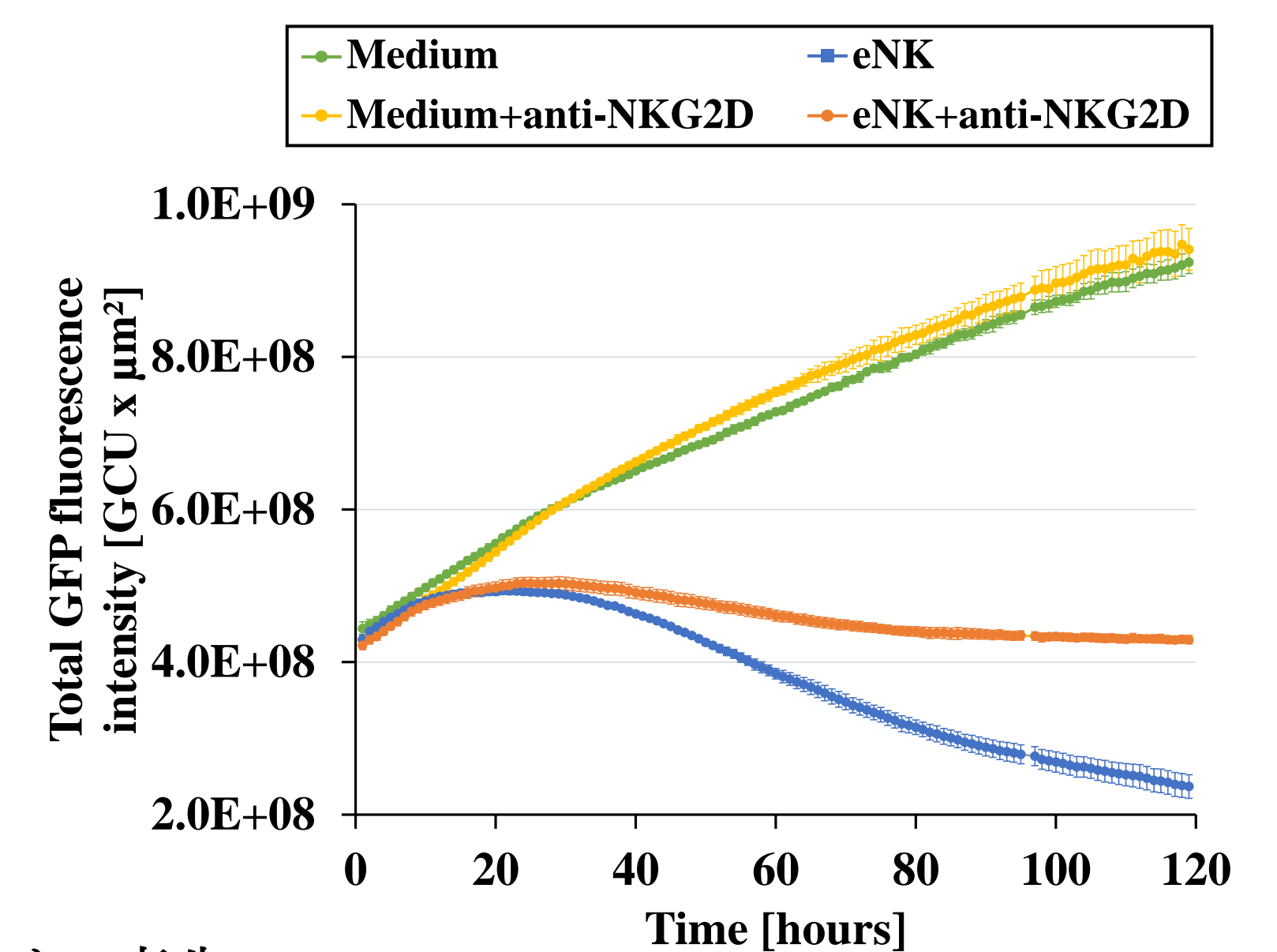
④ NKG2D

A549との共培養4時間後の培養液中の炎症性サイトカインの濃度をELISAで評価



eNK細胞は、NKG2Dに起因するサイトカイン産生・細胞傷害活性が強化
⇒ がん細胞認識能力・殺傷能力が向上

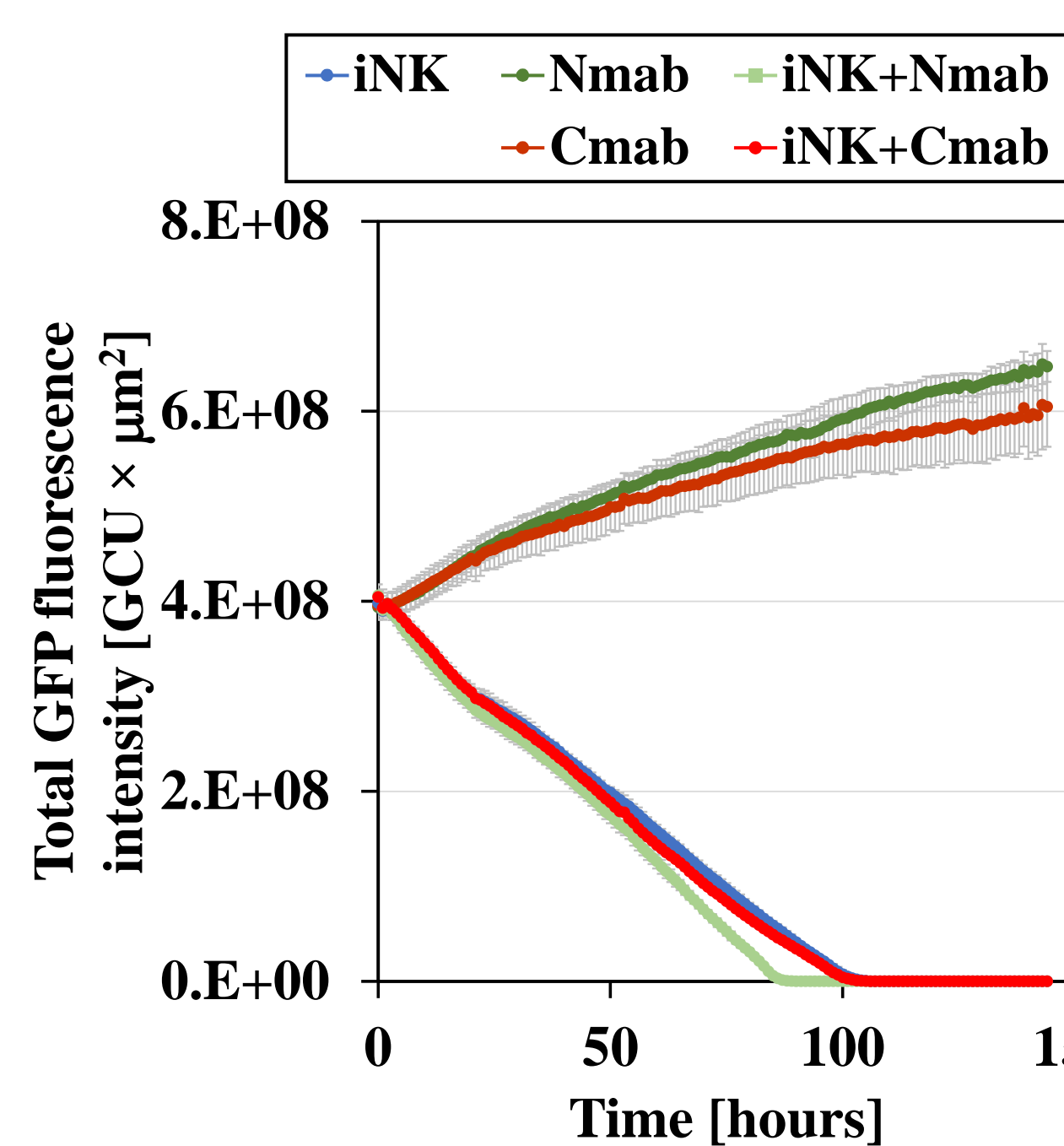
A549に対する細胞傷害活性をIncucyteを用いて評価



- 1.0 × 10⁴ cellsの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

⑤ CD16

A549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の導入により、eNK細胞は抗体併用による細胞傷害活性が増強

- 1.0 × 10⁴ cellsのA549スフェロイド
- 3.0 × 10⁴ cellsのNK細胞を播種
- 10 µg / mL Nectinumab (Ntab) を添加
- 2.5 µg / mL Cetuximab (Ctab) を添加

まとめ

- eNK細胞の機能
- ① IL-15の分泌により、生存・増殖機能が向上
 - ② CCR2B発現により、がん細胞への遊走能力が向上
 - ③ CCL19の分泌により、免疫細胞のリクルートが可能
 - ④ NKG2D発現により、がん細胞の認識能力・殺傷能力が向上
 - ⑤ CD16発現により、抗体依存性細胞傷害活性が向上

遺伝子導入を施したiPS細胞からNK細胞を誘導することで、従来よりも固形がんに対する抗腫瘍作用を強化したNK細胞の作製が可能

演題名: iPS細胞由来NK細胞の遺伝子導入による固形がんに対する抗腫瘍機能の強化

施設名: 株式会社ヘリオス
氏名: 鳥澤勇介