

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 笠原 靖史  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 986 号  
学位授与の日付 令和3年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Development and characterisation of Nkp44-based chimeric antigen receptors that confer T cells with NK cell-like specificity.  
(NK細胞様の特性をT細胞に付与するNkp44を用いたキメラ抗原受容体の開発と評価)  
論文審査委員 主査 教授 西條 康夫  
副査 教授 川島 寛之  
副査 准教授 増子 正義

### 博士論文の要旨

#### <背景と目的>

キメラ抗原受容体(CAR)遺伝子導入T細胞(CAR-T細胞)を用いた免疫療法は近年急速な発展を遂げ、特にCD19を攻撃対象としたCAR-T細胞療法は治癒困難なB細胞性リンパ性白血病(ALL)に著効し、目覚ましい臨床的成功を収めた。しかし、急性骨髄性白血病(AML)や固形腫瘍に対する有効なCAR-T細胞療法は未確立で、CAR-T細胞が攻撃対象とする適切な抗原が同定されていない事が大きな障壁である。ナチュラルキラー(NK)細胞はリンパ球の一分画で、攻撃対象の細胞表面に発現したリガンドがNK細胞表面の活性化受容体と結合することでNK細胞は活性化され、対象への攻撃が開始される。Nkp44は活性化受容体の一つで、リガンドは幅広い白血病や固形腫瘍で発現が報告されているが、正常細胞では発現をほぼ認めない。申請者らはこの特徴に基づき、幅広い腫瘍細胞を安全に攻撃するためにNkp44の持つ抗原認識能力をCAR-T細胞療法に利用することを着想した。この研究の目的は、小児悪性腫瘍に対するNkp44を用いた新規CARの開発である。

#### <方法>

申請者はNkp44の細胞外ドメインを抗原認識部位に用いた第一世代および第二世代CAR(Nkp44-CAR)を新規に設計した。ヒンジ部位および膜貫通部位の構造が、遺伝子導入後のCARの発現量や機能に大きく影響を与えるため、当該部位をCD8 $\alpha$ やCD28由来の部位に置換した複数のCARを作成した。これらのNkp44-CAR遺伝子をヒトT細胞およびNK細胞に導入し、機能評価を行った。

#### <結果>

T細胞性ALL、B細胞性ALL、AML、小児固形腫瘍(骨肉腫、神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫)、膠芽腫の細胞株でNkp44に対するリガンドの高発現を確認した。第一世代Nkp44-CARではNkp44由来のヒンジ部位、CD28由来の膜貫通部位を用いた構造がT細胞、NK細胞ともに最も良好な発現を認め、以降の実験に用いた。このNkp44-CARを導入したT細胞(Nkp44-CAR-T細胞)は、各種腫瘍細胞株に対し強力な細胞

傷害性を発揮し、また抗原刺激によるサイトカインの産生を認めた。一方で、リガンドを発現しない自家・同種 T 細胞は障害しなかった。抗 NKp44 抗体を用いた抗原認識部位のブロッキングにて細胞傷害性の減弱を認めた。また、NKp44-CAR-T 細胞は各種腫瘍細胞株との 7 日間の共培養においても優れた細胞増殖抑制効果を認めた。NKp44 のヒンジ部位の抗原認識への関与が指摘されており、ヒンジ部位を NKp44 由来から CD8 $\alpha$  由来に置換した NKp44-CAR と機能比較を行い、この置換により細胞傷害性・サイトカイン産生の低下が明らかとなった。NK 細胞との機能比較では、短期の細胞傷害性は NK 細胞が優れていたが、長期の細胞増殖抑制効果は NKp44-CAR-T 細胞が NK 細胞および NKp44-CAR 遺伝子を導入した NK 細胞(NKp44-CAR-NK 細胞)より有意に優れていた。NKp44-CAR-T 細胞は、NK 細胞や NKp44-CAR-NK 細胞より有意に良好な抗原刺激後の増殖を認めた。NKp44 と同じ活性化受容体群に属する NKp30 を抗原認識部位に用いた CAR(NKp30-CAR)を作成し、機能比較を行った。NKp30 に対するリガンドを発現している腫瘍細胞株は少なく、NKp44-CAR-T 細胞は NKp30-CAR-T 細胞よりも幅広い対象を攻撃可能だった。第二世代 NKp44-CAR では、CD8 $\alpha$  由来のヒンジ部位および膜貫通部位、4-1BB 由来の副刺激部位を有する CAR 構造が T 細胞、NK 細胞ともに最も発現が良好だった。この第二世代 NKp44-CAR 遺伝子を導入した T 細胞は優れた抗原刺激後の増殖を認め、第一世代 NKp44-CAR より有意に良好な細胞増殖抑制効果を認めた。

#### <考察と結論>

NKp44-CAR は、T 細胞に NK 細胞様の抗原認識能を付与し、ALL、AML、小児固形腫瘍といった幅広い腫瘍細胞株を攻撃可能とした。新規 CAR の設計にあたり、構造の入念な検討が重要だった。NK 細胞は対象を攻撃後にアポトーシスに陥るが NKp44-CAR-T 細胞は抗原刺激後に増殖可能であり、この点が NK 細胞と NKp44-CAR-T 細胞の長期の細胞増殖抑制効果の差に関与したと申請者は考えた。NKp44-CAR-T 細胞は NKp30-CAR-T 細胞より幅広い対象を攻撃可能であり、腫瘍細胞株でのリガンド発現の違いを反映したものと申請者は考えた。副刺激分子に 4-1BB を用いた第二世代 NKp44-CAR は優れた増殖能と細胞増殖抑制効果を認めた。NKp44-CAR は小児悪性腫瘍に対する新規 CAR-T 細胞療法として今後期待できる。

#### 審査結果の要旨

CAR-T 細胞を用いた免疫療法は近年急速な発展を遂げている。しかし、急性骨髄性白血病や固形腫瘍に対する有効な CAR-T 細胞療法は CAR-T 細胞が攻撃対象とする適切な抗原が同定されていない事が大きな障壁である。そこで、NK 細胞に発現し、幅広い抗原認識能力を持つ NKp44 を用いた新規 CAR の開発を行った。申請者は NKp44 の細胞外ドメインを抗原認識部位に用いた第一世代および第二世代 CAR(NKp44-CAR)を新規に設計した。これらの NKp44-CAR 遺伝子をヒト T 細胞および NK 細胞に導入し、機能評価を行った。NKp44-CAR を導入した T 細胞(NKp44-CAR-T 細胞)は、各種腫瘍細胞株に対し強力な細胞傷害性を発揮し、また抗原刺激によるサイトカインの産生を認めた。一方で、リガンドを発現しない自家・同種 T 細胞は障害しなかった。長期の細胞増殖抑制効果は NKp44-CAR-T 細胞が NK 細胞および NKp44-CAR-NK 細胞より有意に優れていた。第二世代 NKp44-CAR では、第一世代 NKp44-CAR より有意に良好な細胞増殖抑制効果を認めた。NKp44-CAR は小児悪性腫瘍に対する新規 CAR-T 細胞療法として今後期待できる治療法を示し、学位論文に十分値する。