

	いまい ちはや
氏 名	今 井 千 速
学 位	博 士 (医学)
学 位 記 番 号	新大博(医)第1687号
学位授与の日付	平成17年12月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
博 士 論 文 名	Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells (ヒトナチュラルキラー細胞の遺伝子改変による、抑制性シグナルの克服と白血病細胞特異的障害活性の誘導)
論文審査委員	主査 教授 内 山 聖 副査 教授 安 保 徹 副査 教授 相 澤 義 房

博士論文の要旨

化学療法抵抗性のB細胞系腫瘍(急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫)に対して、現時点での根治的治療オプションは同種造血幹細胞移植のみである。しかし、移植後の再発率は依然高い。移植後再発例において、T細胞の抗腫瘍効果を期待してドナーリンパ球輸注が試みられているものの、ALLへの有効性は低いうえに、輸注されたドナーT細胞が司る Graft vs Host disease (GvHD) は時に致命的であり、無視できない問題である。またHLA 適合ドナーが得られない場合の、血縁者からの HLA 不適合移植においては、このリスクが極めて(>70%)高い。CD19はB細胞性腫瘍細胞表面に広く発現する分子であり、治療標的として適すると考えられる。私達は、白血病・リンパ腫の細胞療法を発展させる目的で、自己Tリンパ球への抗CD19キメラ受容体遺伝子の導入とその応用について研究を進めてきた。しかし、移植後再発患者においては、遺伝子改変ドナーT細胞の投与は重大なGvHDを招くリスクが否定できない。これに対してNatural Killer (NK)細胞は、骨髄性白血病を含む広いがん種に対して細胞障害活性を有する一方で、GvHDには抑制する方向に働くことが示されていることから、移植後再発の治療や再発超危険群の治療への応用が期待されている。しかし、NK細胞はALLに対しては一般的に効果が低いと報告されている。そこで、今回私達は、移植後再発B細胞系腫瘍のドナー由来細胞輸注の安全性と有効性を高めるために、ヒトNatural Killer細胞への抗CD19キメラ受容体遺伝子の導入により、ヒトNK細胞をCD19抗原特異的に活性化させ、B細胞系腫瘍特異的な細胞障害活性を発現させることを目指した。NK細胞は、体外での増幅が難しい細胞であり、通常のmitogenでは、同時に、より急速なT細胞の増殖を招いてしまう。このため、まず克服すべき障壁は、NK細胞を選択的増幅方法であった。K562は、古典的にNK活性の測定に用いられてきたNK感受性の高い細胞株である。さらにNK細胞を活性化するために、2つの遺伝子、インターロイキン-15(IL-15)と4-1BBリガンドを同細胞株に遺伝子導入し、末梢血単核球と共培養したところ、T細胞(CD3+)の増加なく、3週間で中央値1000倍以上のNK細胞(CD3-CD56+)

の増加が得られた。この方法で刺激した NK 細胞を用いることにより、レトロウイルスベクターによる選択的遺伝子導入が可能となった。

NK 細胞の細胞障害活性の発現には、HLA-C をリガンドとする Killer Immunoglobulin-like receptors (KIR)をはじめとした抑制性レセプターが一義的に重要であり、基本的に活性化シグナルと抑制性シグナルのバランスにより決定される。前記の方法で、抗 CD19 キメラ受容体 (anti-CD19-CD3z) 遺伝子を NK 細胞に導入したところ、NK 細胞の白血病細胞に対する殺傷能は著しく向上した。キメラ受容体遺伝子導入によるNK細胞の殺傷能は、4-1BBレセプターの細胞内ドメインをキメラ受容体シグナル伝達部位に加えることで、さらに改善した。この4-1BBレセプター細胞内ドメインを追加した受容体(anti-CD19-BBz)は、インターフェロンガンマ、GM-CSFの産生能も促進した。さらに、寛解期小児 ALL 患者から得た末梢血単核球を用い、上記の方法により遺伝子改変を加えたNK細胞を調整し、自己の白血病細胞(初発時あるいは再発時に凍結保存された)に対する効果について検討した。自己の白血病細胞は、NK細胞表面に発現する抑制性レセプターKIRに対するリガンド(HLA-C)を発現しているため、本質的にNK活性に対し抵抗性である。シグナル能欠損受容体あるいはコントロールベクターを導入したNK細胞は自己の白血病細胞に対し、わずかな障害活性しか示さなかった。これに対し、キメラ受容体(anti-CD19-BBz)を導入したNK細胞は、自己の腫瘍細胞を高い効率で殺傷することが確認された。これらの一連の結果から、抗CD19人工受容体の発現により、KIR等の抑制性シグナルを凌駕し、エフェクター機能を発揮させることが可能であり、同種造血幹細胞移植の効果をさらに高める新たな手段となり得ることが示された。

論文審査の要旨

化学療法抵抗性 B 細胞系腫瘍の治療は同種造血幹細胞移植しかないが、再発率は高い。本研究はヒト Natural Killer 細胞に CD19 キメラ受容体遺伝子導入し、ヒト NK 細胞を CD19 抗原特異的に活性化させ、B 細胞系腫瘍特異的な細胞障害活性を発現させることを目的とした。IL-15 と4-1BB リガンドを K562 細胞株に遺伝子導入し、末梢血単核球と共培養したところ、NK 細胞のみが大幅に増加した。この NK 細胞は抗 CD19 キメラ受容体遺伝子の導入で白血病細胞に対する殺傷能が著しく向上したが、4-1BB レセプターの細胞内ドメインをキメラ受容体シグナル伝達部位に加えるとさらに改善した。この4-1BB レセプター細胞内ドメインを追加した受容体は、インターフェロンガンマや GM-CSF の産生能も促進した。さらに自己白血病細胞に対し、シグナル能欠損受容体またはコントロールベクターを導入した NK 細胞は障害活性が乏しかったが、キメラ受容体を導入した NK 細胞は高い効率で殺傷した。以上、D19 人工受容体の発現により、KIR 等の抑制性シグナルを凌駕し、エフェクター機能を発揮させることが可能であり、同種造血幹細胞移植の効果をさらに高める新たな手段となり得ることを示した点に学位論文としての価値を認める。