

日本医療研究開発機構再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム(技術開発個別課題)事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 多発性骨髄腫に対する臍帯血由来 CAR-NK 細胞療法の開発
(英語) Development of cord blood-derived CAR-NK cell therapy against multiple myeloma

研究開発実施期間: 令和3年5月10日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 保仙 直毅
(英語) Naoki Hosen

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授
(英語) Professor Department of Hematology and Oncology, Osaka Graduate School of Medicine

II 研究開発の概要

CAR-T 細胞に関する一つの大きな問題は、患者毎に自己の T 細胞から作るために必要な莫大なコストである。一方、NK 細胞であればアロのドナー由来でも必ずしも GVHD を起こさないで、一人のドナーから多数の患者用の細胞が作れる可能性があると考えられる。実際に、臍帯血から誘導した CD19 CAR-NK 細胞の有効性が最近示された(*N Engl J Med*, 382, 545-553, 2020)。

我々は既に活性型インテグリン $\beta 7$ を標的とした CAR-T 細胞の開発に成功し(Hosen et al. *Nature Medicine*, 2017)、現在治験が行われている。そこで、本研究では、同じ CAR を用いて臍帯血由来 CAR-NK 細胞を作製し、その抗骨髄腫活性、安全性を検討した。さらに、臍帯血単核球の heterogeneity を明らかにし、それをもとにより効率的な CAR-NK 細胞誘導法を開発することも目指した。

ヒト臍帯血由来単核球を単離し、T 細胞、B 細胞、ミエロイド系細胞を、ビーズを用いて除いた。それらを膜結合型 IL-15 と 4-1BB ligand を発現させた K562 細胞 (stimulator 細胞) と共培養した。培地には IL-2 を添加した。それにより誘導・増幅された NK 細胞に、レトロウィルスベクターにより MMG49 CAR と IL-15 を共発現させ、さらにもう一度 stimulator 細胞で刺激した後に拡大培養することにより MMG49 CAR-NK 細胞を作製した。その結果、2 週間で約 1000 倍に NK 細胞を増幅することに成功した。増幅された NK 細胞への CAR の導入効率は 80%を超えて極めて高効率であった。また、CAR-NK 細胞が IL-15 を産生していることも確認した。

次に、 ^{51}Cr を用いた骨髄腫細胞に対する細胞傷害活性の測定を行い、有意な細胞傷害活性が得られることを示した。Luciferase を発現するヒト骨髄腫細胞株を NOG マウスに経静脈的に移入することにより骨髄に生着させた後、MMG49 CAR-NK 細胞を投与し、IVIS を用いて経時的に腫瘍量の変化を観察することにより抗腫瘍効果を検

討した。その結果、CAR を導入していないNK 細胞の投与と比較して有意な抗腫瘍効果を認めた。MMG49-CAR-T の安全性は企業治験の前臨床のレベルで検証され問題はなく、活性型インテグリン $\beta 7$ の標的としての安全性の検討はすでになされていることから、現段階では安全性についてのさらなる検討は不要と考えた。

次に、single cell RNAseq により、臍帯血単核球の heterogeneity も明らかにした。その結果、当然ではあるが、臍帯血単核球には多彩な heterogeneity があり、それらの中で CAR-NK 細胞の源となっていると考えられる細胞集団も同定した。さらに、それらの細胞の遺伝子発現を解析することにより、その細胞表面に発現するサイトカイン受容体や、増殖因子受容体を明らかにしており、それらを刺激することにより、より効率的に CAR-NK 細胞を誘導できるのではないかと考え、検討を続けている。

化学療法で治癒しなかった非寛解期急性骨髄性白血病 (AML) 患者は同種造血幹細胞移植の適応となるが、大半は再発し長期生存は 20-30% である。再発に対する治療あるいはその予防の手段として CAR-NK 細胞療法は有望と考えられるが、トランスクリプトーム解析等による探索では未だに良い AML 特異的標的抗原は見つかっていない。我々は既に、自作した抗 AML 細胞モノクローナル抗体約 14,000 クローンの中から、多くの患者において AML 細胞に結合するが健常人末梢血 (B 細胞以外) に結合しない抗体として KG2032 を同定しており、それを元に作製した臍帯血由来 CAR-NK 細胞 (KG2032-CAR-NK 細胞) が抗腫瘍効果を持つことを明らかにしていた。そこで、研究開発当初より開発している多発性骨髄腫に対する CAR-NK 細胞だけでなく、AML に対する CAR-NK 細胞についても臨床に向けた開発を進めることにより、”臍帯血由来 CAR-NK 細胞療法の早期実用化”が達成できると考えた。そこで、本研究において、閉鎖系バッグ培養装置 (ミルテニー社 Prodigy) を用いた無血清培地での試験製造を行った。その結果、機能解析に十分な細胞数と CAR の導入効率を得られた。さらに、AML 細胞を移植しておいた免疫不全マウスに、製造した CAR-NK 細胞を投与し、その抗腫瘍効果を検討するとともに、各臓器の凍結切片を作製し、CAR-NK 細胞の局在を検討した。これらの結果から、KG2032 CAR-NK 細胞は AML に対する新しい遺伝子細胞治療となりうる可能性が示された。

A major problem with CAR T cells is the enormous cost of making them from autologous T cells for each patient. On the other hand, since NK cells do not necessarily cause GVHD when infused into allogeneic recipients, there is the possibility that cells for a large number of patients could be made from a single donor. The efficacy of CD19 CAR NK cells derived from cord blood has recently been demonstrated (N Engl J Med, 382, 545-553, 2020).

We have already successfully developed CAR-T cells targeting the active integrin $\beta 7$ (Hosen et al. Nature Medicine, 2017), which are currently in clinical trials. In this study, we used the same CAR to generate cord blood-derived CAR-NK cells and evaluated their anti-myeloma activity and safety. In addition, we aimed to clarify the heterogeneity of CB mononuclear cells and develop a more efficient CAR-NK cell induction method based on this heterogeneity.

Human cord blood mononuclear cells were isolated, and T cells, B cells, and myeloid cells were depleted using beads. They were co-cultured with K562 cells expressing membrane-bound IL-15 and 4-1BB ligand (stimulator cells). IL-2 was added to the medium. Amplified NK cells were retrovirally transduced with MMG49 CAR and IL-15, followed by re-stimulation with stimulator cells and expansion culture. As a result, we were able to amplify NK cells approximately 1000-fold in 2 weeks. The efficiency of CAR delivery into the expanded NK cells was high, exceeding 80%. We also confirmed that CAR NK cells produced IL15. We then showed that MMG49 CAR-NK cells had cytotoxic activity against myeloma cells in vitro. Infusion of MMG49 CAR-NK cells significantly reduced the number of MM cells engrafted in NOG mice.

Next, the heterogeneity of cord blood mononuclear cells was determined by single-cell RNAseq. As a result, we found that cord blood mononuclear cells have a variety of heterogeneity, and among them, we identified a cell population that is thought to be the source of CAR-NK cells. In addition, by analyzing the gene

expression of these cells, we have identified cytokine receptors and growth factor receptors expressed on the surface of these cells. We are investigating the possibility of inducing CAR NK cells more efficiently by stimulating these receptors.

Patients with non-remitting acute myeloid leukemia (AML) who have not been cured by chemotherapy are eligible for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, but most relapse and the long-term survival rate is 20-30%. CAR NK cell therapy is promising for the treatment or prophylaxis of relapse, but good AML-specific target antigens have not yet been identified by transcriptome analysis. We have already identified KG2032 as an antibody that binds to AML cells in many patients, but not to healthy peripheral blood (except B cells), among approximately 14,000 clones of monoclonal anti-AML cell antibodies generated in-house. NK cells transduced with KG2032-derived CAR have been shown to have anti-tumor effects. Therefore, we thought that "early commercialization of cord blood-derived CAR NK cell therapy" could be achieved by advancing the clinical development of CAR NK cells for AML in addition to CAR NK cells for multiple myeloma. Therefore, we decided to develop CAR NK cells for AML in parallel. We performed a test production in serum-free medium using a closed bag culture system (Miltenyi Prodigy). As a result, sufficient cell numbers and CAR transfection efficiency were obtained for functional analysis. In addition, the manufactured CAR NK cells were administered to immunodeficient mice transplanted with AML cells to examine their anti-tumor effect, and frozen sections of each organ were prepared to examine the localization of CAR NK cells. These results suggest that KG2032 CAR-NK cells may be a novel cell therapy for AML.