

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号	2021B-18						
研究開発課題名	iPS/ES 細胞由来 off-the-shelf 型細胞製剤 (CAR-NK 細胞) による小児肝芽腫肝移植後再発予防・抑制療法の開発						
分類*	<input checked="" type="checkbox"/> ①	<input checked="" type="checkbox"/> ②	<input checked="" type="checkbox"/> ③	<input checked="" type="checkbox"/> ④	<input checked="" type="checkbox"/> ⑤	<input type="checkbox"/> ⑥	<input type="checkbox"/> ⑦
区分	<input type="checkbox"/> A	<input checked="" type="checkbox"/> B	<input type="checkbox"/> C	<input type="checkbox"/> E	<input type="checkbox"/> S		
主任研究者	所属	移植免疫研究室					
	役職	室長					
	氏名	梨井 康					
実施期間	2023年 4月 1日 ~ 2024年 3月 31日						

成果の概要

本研究は、難治性小児肝芽腫に対する肝移植後再発予防・抑制療法として、off-the-shelf 製品化された iPS 細胞由来 CAR-NK 細胞療法の確立するための科学的根拠に基づいた基礎的知見の確立、非臨床 POC を獲得することを最終目的とする。

今年度は、引き続き昨年度 CiRA から譲渡を受けた拒絶反応が起きにくい HLA 編集 iPS 細胞株 (21B78) を用いて、様々な培養方法について検討し、培養条件の最適化を行った。その結果、本システムで培養した細胞の未分化マーカー (SSEA4、TRA-1-60) の発現量は、従来の味の素社製 iPS 細胞用培養システム StemFit® で培養した細胞に比べて有意に高いことが明らかになった。この結果から、CiRA の標準的な培養方法よりも、自ら検討した本システムを用いた培養方法の方が優れていることがわかった。

一方、小児肝芽腫をより正確に模倣 (Mimic) するマウス担癌モデルを作成するため、新たに HuH-7/Luc 細胞株を入手し、モデル作成を試みた。従来の Hep-G2/Luc 細胞株と比べて、今回のテーマである iPS 細胞由来 CAR-NK 細胞 (iPS-GPC3-CAR-NK 細胞) の標的 GPC3 分子が HuH-7/Luc 細胞表面での発現が高いことがわかった。その結果を踏まえて、HuH-7/Luc 細胞株を用いた肝臓同所性担癌マウスモデルを樹立した。

さらに、iPS 細胞から GPC3-CAR-NK 細胞への分化誘導するため、今年度は GPC3-CAR 発現ユニットの構築の改良を行なった。我々は ScFv 抗原結合ドメインの重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) の両方を改変するアプローチで、scFv_A を scFv_B へとヒト化した。この改良により、CAR を導入した T 細胞の免疫原性が低減でき、将来 off-the-shelf 製品化された iPS 細胞由来 CAR-NK 細胞療法への応用の可能性を広げたと期待したい。

最後に、最適な iPS 細胞への遺伝子導入条件を決定するため、ZsGreen でタグ付けした CAR コンストラクトを作製し、最も効果的な導入効率を iPS 細胞 (21B78) 用いてトランスフェクション条件を検討した。選別された ZsGreen 陽性 iPS 細胞が 95%以上であった。その後、これらの ZsGreen 陽性 iPS 細胞を継代培養し、陰性細胞と同様な安定した継代能力を示した。フローサイトメトリー解析でも、複数回継代しても、ZsGreen 陽性 iPS 細胞の割合は常に 95%以上を維持していることが確認できた。