

学位論文の要旨

氏名	立尾清悟
学位論文題目	糖鎖結合性一本鎖抗体を用いた成人T細胞白血病に対する治療法の開発

本論文は、これまでに当研究室で開発された成人T細胞白血病（ATL）細胞表層糖鎖に結合性を示す一本鎖抗体（scFv : S1TSCFR3-1）を活用し、成人T細胞白血病に対する治療法の開発についてまとめたものである。

第1章は、近年取り組まれているATLの治療法についてまとめ、ATLは病態によって治療方針が異なること、また治療が必要な病態の場合には、既存の治療法では効果が不十分であることについてまとめた。また、既存の治療法では副作用も生じるため、より安全で治療効果の高い新たな治療法の開発が必要であることについて考察した。

第2章は、ATLに対する副作用の小さな治療法の開発を目指し、scFv固定化蛍光性ナノ粒子（scFv-FNPs）を活用した、ATLに対する光線力学療法（PDT）の有効性について検討した。まず、scFvを固定化するためのリンカー化合物をFNPsに固定化し、凝集性や蛍光特性から、scFvの固定化に適したリンカー化合物の固定化量を決定した。次に、scFvの固定化数の異なる複数のscFv-FNPsを調製し、水中での凝集性や、蛍光特性を解析した。scFvの多量体効果は、ATLまたは非ATL細胞株、ATL患者由来末梢血単核細胞（PBMCs）に対するフローサイトメトリーを用いた細胞結合性解析によって評価した。続いて、scFv-FNPsがPDTの光感受性物質として利用可能か検討するため、scFv-FNPsの活性酸素産生能を評価した。最後に、ATL細胞に対するPDT効果を検討し、scFv-FNPsの光線力学療法の有効性について解析した。

第3章は、より効果的で副作用の小さなATLに対する治療法の開発を目指し、キメラ抗原受容体導入ナチュラルキラー（CAR-NK）細胞を用いたATLに対する細胞免疫療法の有効性について評価した。まず、S1TSCFR3-1を導入したCARコンストラクトを設計し、レンチウイルスベクターシステムを用いてNK細胞の細胞株であるNK-92 MI細胞に導入した。CAR遺伝子導入細胞はセルソーターを用いてマーカータンパク質であるEGFPを指標に分離・回収した。次に、CARがタンパク質として細胞上に発現しているかウエスタンブロッティングとフローサイトメトリーにより解析した。CAR-NK細胞のATL細胞株に対する殺細胞活性は、フローサイトメトリー解析から得られる、ATL細胞株の細胞生存率から評価した。殺細胞活性のメカニズム解析として、CAR-NK細胞のグランザイムB/パーフォリンの産生能をELISA法により解析した。続いて、ATL患者由来PBMCを用いて、scFvの細胞結合性を解析するとともに、CAR-NK細胞の殺細胞活性をフローサイトメトリーにより解析した。最後に、CAR-NK細胞の生体内における抗腫瘍活性を検討するため、ATL移植免疫不全モデルマウスを作成し、CAR-NK細胞を投与した。CAR-NK細胞の抗腫瘍活性は、ATL細胞が放出する血中のヒト可用性IL-2受容体をELISA法によって定量することで評価した。

第4章は、本博士論文で検討した2種の治療法の有効性をそれぞれ考察した。第2章でまとめたscFv-FNPsを用いたPDTは、scFvの結合強度が高い細胞においては殺細胞活性が観察されたため、scFvが結合する糖鎖抗原の発現量が多い細胞においては有効であることを考察した。第3章でまとめたCAR-NK細胞を用いた細胞免疫療法は、ATL細胞株に限らず、患者由来ATL細胞にも殺細胞活性が観察され、ATLに対する治療法として有用であることを総括した。また、今後の展望として、CAR-NK細胞を用いた細胞免疫療法の安全性をより一層高めるためには、より殺細胞活性の高いCAR-NK細胞を調製する必要があることについて考察した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Development of therapeutic method against adult T cell leukemia using sugar chain binding single-chain variable fragment antibody

Name: Seigo Tateo

This thesis mainly described the development of therapeutic method against adult T cell leukemia (ATL) using a single-chain variable fragment antibody (scFv) which binds to ATL cell surface sugar chain.

Chapter 1 summarizes the treatment methods for ATL including recent treatment approaches. The treatment strategies of ATL vary depending on the pathology. In the case of pathologies that require treatment, existing treatments have side effects. Thus, novel therapeutic methods which are more effective and have low side effects are required.

Chapter 2, investigated the efficiency of photodynamic therapy (PDT) using the scFv immobilized fluorescent nanoparticles (scFv-FNPs) against ATL. First, 5 kinds of scFv-FNPs in which different numbers of scFv immobilized were prepared, and their aggregation and fluorescence properties were analyzed. Then, cell-binding analysis was performed using ATL cell lines, and the clustering effect of scFv on FNPs was evaluated. Next, the reactive oxygen species producing ability of scFv-FNPs was examined. Finally, the PDT effect of scFv-FNPs was demonstrated against ATL cells.

In Chapter 3, evaluated the cell immunotherapeutic effect of chimeric antigen receptor modified natural killer (CAR-NK) cells against ATL. First, NK-92 MI cells were transduced with the CAR gene which was genetically incorporated scFv that binds to ATL cell surface sugar chains using lentiviral vector systems. The CAR-NK cells were separated and collected using a cell sorter. Next, CAR expression in the CAR-NK cells was analyzed using western blotting analysis and flow cytometry analysis. Then, the cytotoxicity of CAR-NK cells against ATL cell lines and ATL patient derived peripheral blood mononuclear cells was investigated. Finally, *in vivo* experiment demonstrated the antitumor activity of CAR-NK cells using ATL xenograft model mice.

In Chapter 4 discusses the efficacy of the two treatments examined in this thesis. In the investigation of PDT using scFv-FNPs, it could be useful for photosensitizer, but the usage was limited to ATL cells which highly expressed carbohydrate antigens of scFv. In the investigation of CAR-NK therapy, CAR-NK cells showed cell-killing activity against not only ATL cell lines but also in patient-derived ATL cells, suggesting that the cell immunotherapy using CAR-NK cells will be efficacy for the treatment method for ATL.