

受賞者

保仙 直毅

大阪大学大学院医学系研究科癌幹細胞制御学寄附講座

研究テーマ

腫瘍幹細胞を標的とした治療法の開発を目指した骨髄腫幹細胞特異的抗原の同定

1. 緒言

過去の報告には、NOD/SCID マウスへの移植実験により CD19⁺B 細胞分画に骨髄腫幹細胞が存在することを示したものと、SCID-hu マウスモデル (SCID マウスに移植されたヒト胎児骨内への移植) を用いて CD19⁺ではなく CD38⁺⁺骨髄腫形質細胞中に骨髄腫幹細胞が存在することを示した報告がある。この両結果を説明可能な仮説は、CD19⁺B 細胞分画、CD38⁺⁺骨髄腫形質細胞分画の両方に骨髄腫クローンを維持する能力を持つ骨髄腫幹細胞が存在するというものである。実際、CD20 (骨髄腫患者骨髄においても CD19⁺B 細胞分画のほとんどすべてに発現している) 抗体 Rituximab 単剤での治療効果は乏しいことは、CD38⁺⁺骨髄腫形質細胞分画にも骨髄腫幹細胞が存在し、それも治療標的に含まねばならないことを強く支持する。そこで、骨髄腫患者骨髄において、CD19⁺B 細胞分画と CD38⁺⁺骨髄腫形質細胞分画にともに広く高発現し、CD34⁺造血幹/前駆細胞分画では発現の低い分子 (Figure1-2B 中の X) が、骨髄腫幹細胞を含む骨髄腫細胞をすべて標的化できる理想的な抗体療法の標的抗原となりうると思われその同定を試みることにした。(Figure1)

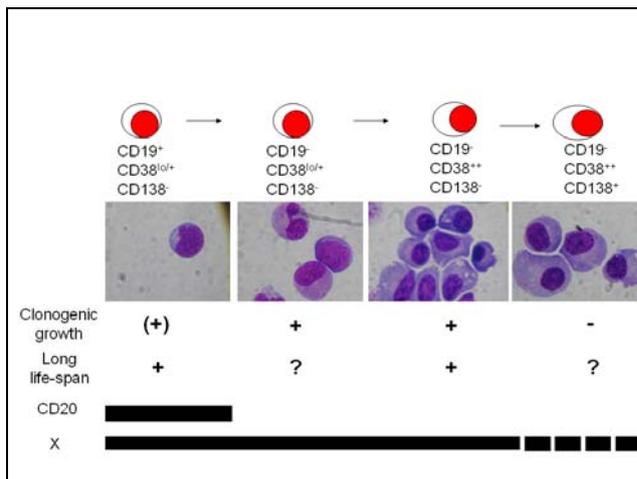


Figure1 骨髄腫患者 (UPN20) 骨髄における各分画の細胞の形態学的特徴を示す。それぞれの分画の細胞が持つ特徴を下に示している。骨髄腫クローンを長期間にわたって維持できる骨髄腫幹細胞は CD19⁺/CD19⁻CD38⁺⁺両方の分画に存在する可能性が高く、骨髄腫に対する抗体治療の標的抗原としては、図に示した X のような発現様式を示すものが望ましい。

2.方法

1. 骨髄腫患者 CD19⁺細胞および CD19⁻CD38⁺⁺ CD138⁺細胞分画ともに高発現する細胞表面分子の同定

骨髄腫患者検体 CD19⁺B 細胞分画および CD19⁻CD38⁺⁺CD138⁺骨髄腫形質細胞分画由来の RNA を用いて、Signal sequence trap PCRscreening および Gene Chip による遺伝子発現比較を行い、両分画においてともに高い発現の見られる分子を選択した。次に、定量的 RT-PCR により、3 症例の患者検体 CD19⁺、CD19⁻CD38⁺⁺ CD138⁺細胞に共に高発現している分子を候補として選択した。以上のスクリーニングにより選択された 4 候補分子に対する抗体を入手し、それらを用いて、各分子の発現を蛋白レベルで検討することにより、CD19⁺、CD19⁻CD38⁺⁺CD138⁺分画に高発現し、CD34⁺細胞での発現は低い分子を同定した。

2. 骨髄腫幹細胞に結合し細胞傷害活性を持つモノクローナル抗体の作製

ヒト MMSC1cDNA (FLJ クローン、TOYOBO) を MSCV-ires-GFP ベクターに挿入し、レトロウィルスを用いて、BaF3 に導入することにより、ヒト MMSC1 発現マウス細胞を作製した。この細胞を Balb/c マ

ウスの Foot pad に 4 回免疫し、マウスミエローマ細胞 SP2/0 と細胞融合を行うことにより、MMSC1 抗体産生ハイブリドーマを得た。

3. In vitro における細胞傷害活性の検討

MMSC1 抗体による in vitro での骨髄腫細胞傷害活性を検討した。標的細胞として、MMSC1 を高発現する骨髄腫細胞株 OPM2、U266 を用いた。抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) 活性は、SCID マウス骨髄細胞を GM-CSF、IL-2 存在下で 6 日間培養したものを effector として用い、E:T ratio 50:1 で、クロミウム遊離法にて行った。補体依存性細胞傷害活性(CDC)は Baby rabbit complement (Cedarene)を用いてクロミウム遊離法にて行った。

4. マウス in vivo における骨髄腫細胞傷害活性惹起能の検討

In vivo での MMSC1 抗体の骨髄腫細胞に対する作用を検討した。2Gy の放射線照射を行った Rag2^{+/+}cyt^{+/+}マウスの皮下に骨髄腫細胞株 OPM2 細胞を移植したのち、腫瘍体積 (長径 X 短径 X 高さ/2) が 10mm³ を超えた時点で、MMSC1 抗体あるいはコントロールマウス IgG 10mg/kg の腹腔内投与を週 3 回行い、腫瘍体積の変化を追跡した。

3. 結果

1. 骨髄腫患者骨髄 CD19⁺B 細胞および CD19⁻CD38⁺⁺骨髄腫形質細胞分画のいずれにも広汎に高発現し、CD34 陽性造血幹/前駆細胞での発現が低い細胞表面分子として MMSC1 を同定した

まず、signal sequencing trap 法により、骨髄腫患者骨髄 CD38⁺⁺細胞から作製した cDNA ライブラリーに含まれる細胞表面分子を網羅的に単離した。さらに、別の骨髄腫患者由来骨髄細胞 CD19⁺細胞および CD19⁻CD38⁺⁺CD138⁻細胞を分離し、それぞれの分画における発現遺伝子の比較を Gene Chip にて行い、両分画にとも高発現が見られる分子を同定した。次に、3 人の異なる骨髄腫患者 (UPN6、UPN9、UPN12) 由来の骨髄 CD19⁺、CD19⁻CD38⁺⁺ CD138⁻細胞由来の cDNA を用いて、定量的 RT-PCR による二次スクリーニングを行った。定量的 PCR により、CD19⁻CD38⁺⁺ CD138⁻分画において CD19⁺分画と同様の発現レベルが見られる分子を選択した。そのような条件を満たす分子は計 4 分子であった。次に、それらに対する抗体を入手し、骨髄腫患者骨髄細胞において、蛋白レベルで CD19⁺、CD19⁻CD38⁺⁺CD138⁻分画の両分画に高発現し、CD34⁺細胞分画での発現が低い分子として、MMSC1 を同定した (Figure2)。さらに多くの症例を用いた検討により、ほとんどの症例で、MMSC1 は上記の条件を満たすことが明らかになった。MMSC1 は CD3⁺T 細胞、CD19⁺B 細胞に広く発現していたが、血液系以外の細胞分画における発現はほとんど見られなかった。

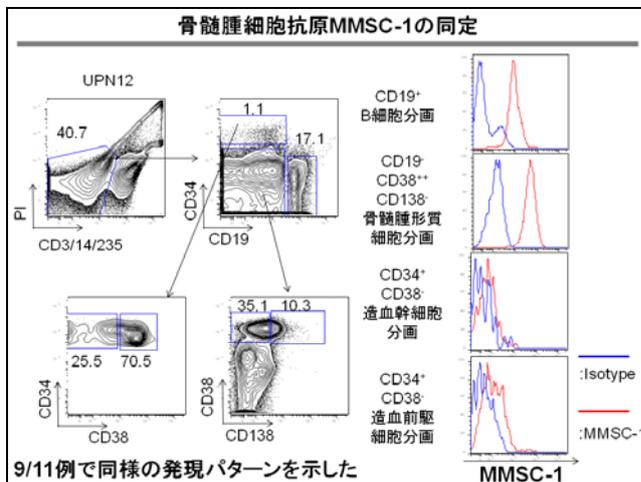


Figure. 2 骨髄腫患者骨髄の解析の一例。右の histogram が各分画における MMSC-1 の発現を示す。CD19⁺B 細胞分画および CD38^{high} の骨髄腫形質細胞分画ではほとんどすべての細胞に発現しているのに対して、CD34⁺CD38⁻の造血幹細胞分画では発現が見られない。10 症例以上において、同様の解析を行ったが、ほとんどの例で同様の結果を示した。

2. MMSC1 に対するモノクローナル抗体の作製を試み、IgG2a サブクラス 2 クローンを得た

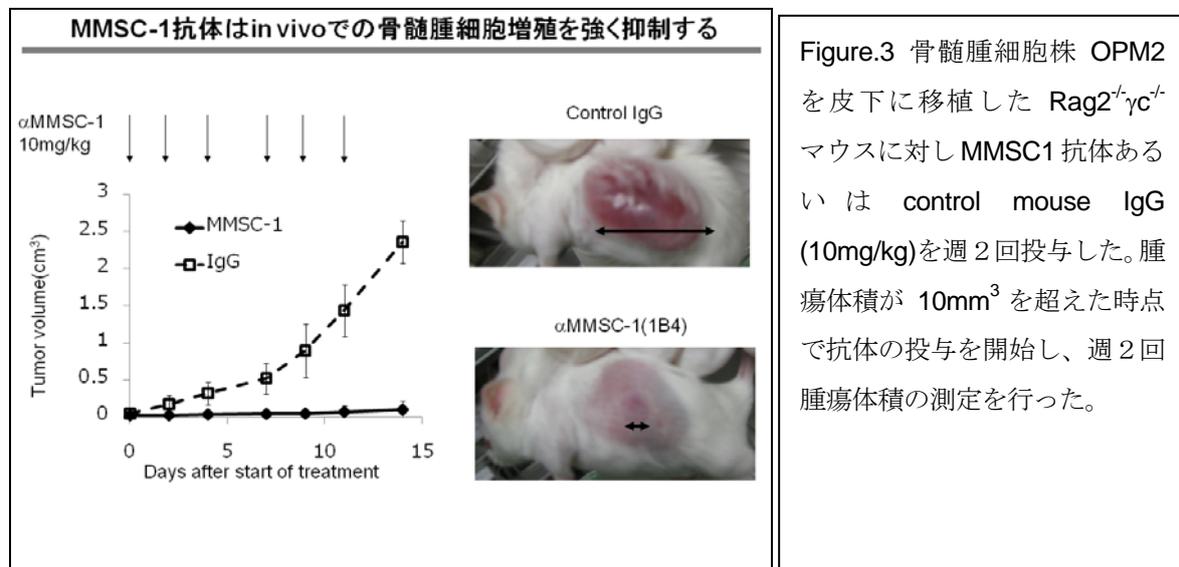
1回目の細胞融合より、4クローンのハイブリドーマを得た。それらのうち2クローン（1B4, 2E2）は Fc レセプターに高い親和性を持ち、ADCC 惹起活性が高いと考えられる IgG2a サブクラスであったので、このうち、1B4 クローンをを用いて、その細胞傷害惹起活性を検討することとした。

3. MMSC1 抗体は骨髄腫細胞株に対して強い補体依存性細胞傷害活性を示した

MMSC1 抗体による *in vitro* での骨髄腫細胞傷害活性を検討した。標的細胞として、MMSC1 を高発現する骨髄腫細胞株 OPM2、U266 を用いた。明らかな ADCC 活性は示さなかったが、著明な CDC 活性を示した。さらに、骨髄腫患者骨髄細胞から FACS-sort した CD19⁺B 細胞、CD19⁻CD38⁺⁺骨髄腫形質細胞に対する CDC 活性についても検討した結果、それらの細胞に対しても、MMSC1 抗体は明らかな CDC 活性を示した。

4. MMSC1 抗体は骨髄腫細胞株に対して *in vivo* での強い増殖抑制を示した

皮下に骨髄腫細胞株 OPM2 細胞を移植した Rag2^{-/-}γc^{-/-}マウスに対して、腫瘍の形成が明らかになった時点から、MMSC1 抗体あるいはコントロールマウス IgG 10mg/kg の腹腔内投与を週 3 回行った。その結果、MMSC1 抗体投与群で有意に腫瘍増殖抑制が見られた。(Figure3) 以上より、MMSC1 抗体が骨髄腫に対して細胞傷害活性を持つことが示された。



4. 考察 まとめ

IgG2aサブクラスMMSC1抗体の作製に成功し、すでに、それらが骨髄腫細胞に対して、細胞傷害活性を持つことを明らかにした。MMSC1は正常T、B細胞に広く発現しており、それが副作用の原因となる可能性は否めない。しかし、血液細胞におけるMMSC1の発現様式は、形質細胞での発現を除いては、CD52に非常に類似しており、CD52抗体が慢性リンパ性白血病の治療薬として、FDAに認可されており、広く使用されていることを考えると、その副作用は使用に耐えうる範囲にあることが予想される。今後、ヒト化抗体の作製へと開発を進め、臨床応用の可能性を探る。