

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16196

研究課題名(和文) 骨髄腫病態におけるSLAMF3の機能解明と新規分子標的治療法の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanism of immunoreceptor SLAMF3 in myeloma pathogenesis and development of new SLAMF3-targeted therapy

研究代表者

石橋 真理子 (Ishibashi, Mariko)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20599047

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫において、新規免疫関連分子であるSLAMF3(CD229, LY9)の発現と機能を解析した。SLAMF3は、骨髄腫の病期に関わらず、骨髄腫細胞上に恒常的に、高発現していた。SLAMF3は、他の骨髄腫細胞に発現するSLAMF3との相互作用を介して、細胞内でアダプター蛋白SHP2とGRB2と結合し、MAPK/ERKの活性化シグナルを伝達し、細胞周期遺伝子・抗アポトーシス遺伝子の発現亢進を誘導した。これにより、SLAMF3は骨髄腫細胞の増殖能の促進、薬剤耐性の獲得を介して、骨髄腫の病勢進行に関与していると推察され、免疫治療標的抗原として有用である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したSLAMF3分子は、多発性骨髄腫において、病期に関わらず高発現しており、更に、細胞増殖能の亢進や薬剤耐性の獲得を介して骨髄腫の増悪化・病勢進行に深く関わることを示した。これら結果より、SLAMF3は再発難治の骨髄腫患者において、アグレッシブな臨床病態に至る機序に関与している可能性が示唆された。このことから、本研究の結果はSLAMF3を標的とした抗体療法やCAR-T療法の治療開発、治療戦略に重要な知見を与えるという点で今後の骨髄腫治療に重要な意義がある。更に、骨髄腫の免疫治療へ大きな貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：To determine whether the new immunoreceptor SLAMF3 is useful as a new therapeutic target in advanced or refractory/relapsed multiple myeloma, this study aimed to define the expression and biologic functions of SLAMF3 in myeloma. SLAMF3 was highly and constitutively expressed on plasma cells from myeloma patients regardless of disease stage. SLAMF3 molecules on myeloma cells transmitted MAPK/ERK signals mediated via the complex of SHP2 and GRB2 by self-ligand interaction between myeloma cells, and upregulated cyclin D1/2 and BCL2 genes, suggesting that SLAMF3 promote a high malignant potential in myeloma. SLAMF3 molecules in myeloma may be not only new cell surface markers but also a new therapeutic target of immunotherapy and novel agents such as small-molecule inhibitors.

研究分野：多発性骨髄腫、腫瘍免疫、分子腫瘍学

キーワード：多発性骨髄腫 SLAMF3 CD229 ERKシグナル 腫瘍悪性化 免疫治療 腫瘍微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 多発性骨髄腫(Multiple myeloma)は骨髄におけるクローナルな形質細胞の増殖に伴い、骨病変、腎障害、血球減少などの多彩な臓器症状を特徴とする極めて予後不良の腫瘍である。近年、免疫調節薬(immunomodulatory drugs, IMiDs; レナリドミド、ポマリドミド)、プロテアソーム阻害薬(ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、イキサゾミブ)、抗体医薬等の新規治療薬の登場により予後は大きく改善したが、未だ多くの症例で再発する。特に、del17p, t(4;14), t(14;16)等の染色体変異を有する高リスク症例、または、再発難治症例では新規薬剤の効果は不十分であり、より有効な治療法を確立が求められている。骨髄腫の治癒を目指した治療戦略としては、骨髄腫細胞の薬剤耐性化、また、免疫異常等の問題を解明することが必須である。
- (2) 骨髄腫に対する新規治療法として、骨髄腫細胞(異常形質細胞)上に発現する腫瘍関連抗原を標的とした抗体療法が脚光を浴びている。骨髄腫に対しては、signaling lymphocytic activation molecule family member 7(SLAMF7; CS1, CRACC, CD317)を標的としたヒト化抗 SLAMF7 抗体薬エロツズマブ(elotuzumab)や CD38 を標的としたヒト抗 CD38 抗体薬ダラツムマブ(daratumumab)が注目され、再発難治性骨髄腫においても有効性が示されている。新規腫瘍関連抗原が腫瘍病態と骨髄微小環境の腫瘍免疫に及ぼす影響を解析・解明することは、新たな治療法の開発に繋がると思われる

## 2. 研究の目的

新規免疫関連分子である SLAMF ファミリーに属する SLAMF 3 (CD229, LY9)は、免疫グロブリン様ドメイン(Igドメイン)を分子内に有するI型膜貫通糖タンパク質であり、他の細胞上に発現する同じ分子をリガンドとして認識する self-antigen である(図1)。また、SLAMF3 は、主に、T細胞・NK細胞・B細胞に発現しており、骨髄腫細胞、正常形質細胞においても高発現していることが報告されている。骨髄腫における SLAMF3 の発現や機能に関しては十分に理解されていない。本研究では、新たな骨髄腫細胞同定抗原として、更には治療標的として SLAMF3 が有用か検討するために、SLAMF3 の発現・機能を解析することを目的とする。

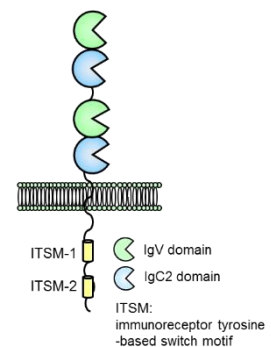


図1: SLAMF3分子の構造

## 3. 研究の方法

- (1) 230 症例の骨髄腫患者の骨髄サンプルから、CD38<sup>high</sup> 骨髄腫細胞上における CD138 と SLAMF3 の発現を flow cytometry (FCM) 法で解析し、病態進行との関連を検討した。
- (2) SLAMF3 発現骨髄腫細胞において、lentiviral shRNA system を用いて SLAMF3 ノックダウン細胞、また、CRISPR-Cas9 システムを用いて SLAMF3 ノックアウト細胞を作製した。一方、SLAMF3 陰性 KMS-34 細胞に SLAMF3 発現ベクターを導入し、SLAMF3 安定発現細胞株を作製した。それら骨髄腫細胞株において、細胞増殖能(MTT assay, BrdU の取り込み, 細胞周期)や、既存の骨髄腫治療薬(melphalan, bortezomib)に対する薬剤感受性等の細胞の特徴を FCM 法で解析した。また、SLAMF3 安定発現骨髄腫細胞とコントロール細胞を重度免疫不全 NOG マウスに皮下移植し、腫瘍細胞の増殖度を検討した。
- (3) SLAMF3 下流の細胞内シグナル経路の解析では、免疫沈降、ウエスタンブロットを用いて検討した。更に、SLAMF3 発現細胞に特徴的な遺伝子・蛋白質発現を DNA マイクロアレイ、Real-time PCR・ウエスタンブロットを用いてそれぞれ解析を行った。

- (4) 16 例の MGUS (意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症) と 112 例の新規骨髄腫患者の血清中の可溶性 SLAMF3 濃度を ELISA 法にて解析し、病態進行や予後との関連を検討した。

#### 4. 研究成果

- (1) 骨髄腫患者の CD38<sup>high</sup> 形質細胞 (異常形質細胞) 上には SLAMF3 が高発現していた。更に、MGUS、無症候性、症候性、再発難治と病態進行しても SLAMF3 の発現は不変であった (図2)。一方、骨髄腫同定抗原 CD138 は病態進行に伴い発現が低下している症例が存在した。以上のことから、SLAMF3 は、新たな骨髄腫細胞同定抗原、又は、免疫治療の標的としての可能性を示された。

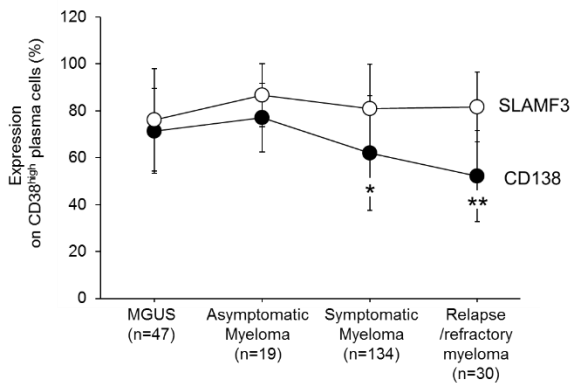


図2: 骨髄腫患者におけるSLAMF3の発現 (引用文献1を改変)

- (2) 骨髄腫細胞上に高発現している SLAMF3 の機能を検討するため、SLAMF3 ノックダウン細胞とノックアウト細胞を樹立した。それら細胞は、細胞増殖能が低下し、骨髄腫治療薬に対する感受性が増加した (図3)。一方、SLAMF3 発現 KMS-34 細胞は、コントロール細胞、または、SLAMF3 細胞内ドメイン欠失 KMS-34 細胞 ( $\Delta$ SLAMF3) と比較し、細胞増殖能が増加し、薬剤に対して耐性を示した (図4)。SLAMF3 発現 KMS-34 細胞を NOG マウスに皮下移植すると、コントロールと比較し、有意に腫瘍細胞の増殖が速く (図5A)、生存期間が短かった (図5B)。更に、抗 SLAMF3 抗体で骨髄腫細胞間の SLAMF3 分子の結合を阻害すると、細胞増殖能は抑制され、薬剤感受性が亢進した。このことから、SLAMF3 は、骨髄腫細胞間の SLAMF3-SLAMF3 相互作用を介して、骨髄腫細胞の細胞増殖能の促進、薬剤耐性化等の増悪化に関連していることが示された。

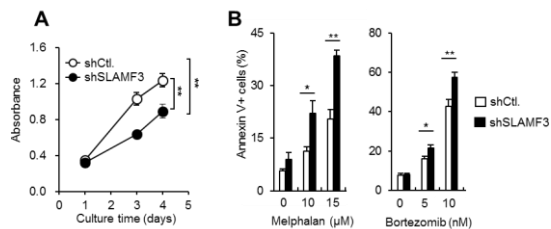


図3: SLAMF3ノックダウン骨髄腫細胞における細胞増殖能(A)と薬剤感受性(B) (引用文献1を改変)

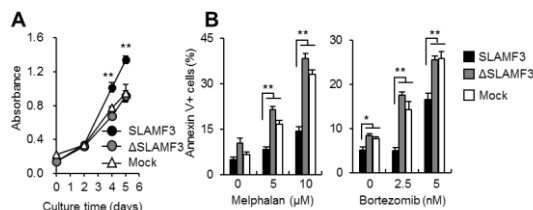


図4: SLAMF3安定発現骨髄腫細胞における細胞増殖能(A)と薬剤感受性(B) (引用文献1を改変)

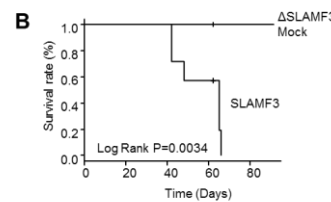
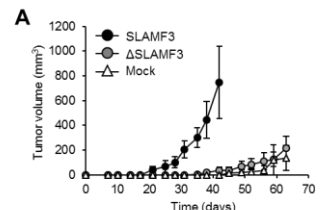


図5: NOGマウスへのSLAMF3安定発現骨髄腫細胞の皮下移植 (引用文献1)

- (3) SLAMF3 を介したシグナル伝達経路を調べるために、骨髄腫細胞における Src homology 2 (SH2) ドメインを持つアダプター蛋白質の発現を検討した。T 細胞や NK 細胞では SLAMF3 はアダプター蛋白 SLAM-associated protein (SAP) や Ewing's sarcoma-associated transcript 2 (EAT-2) と相互作用しシグナルが伝達されるが、8 株の骨髄腫細胞ではそれら蛋白は発現していなかった。一方、全ての骨髄腫細胞では SH2 domain-containing phosphatase-2 (SHP2) と growth factor receptor bound protein 2 (GRB2) が発現していた (図6)。興味深いことに、骨髄腫患者の骨髄腫細胞

胞において、SLAMF3、SHP2、GRB2 の遺伝子発現は有意に関連していた。更に、免疫沈降法で解析したところ、SLAMF3はSHP2とGRB2と相互作用し、且つ、SHP2とGRB2も結合していた。SLAMF3の細胞内ドメインの immunoreceptor tyrosine-based switch motif 1 (ITSM-1)とITSM-2がSHP2内にある2つのSH2ドメインと結合し、SLAMF3のC末端のYENEモチーフにGRB2が結合し、更に、SHP2とGRB2が相互作用し、シグナルが伝達されると推察された。また、SLAMF3は骨髄腫細胞のみならず、正常形質細胞にも同等に発現しているが、正常形質細胞においてはSHP2、特に、GRB2の発現が極めて低い。このことから、SLAMF3-SHP2-GRB2介したシグナル伝達は骨髄腫細胞に特有に起こると考えられた。

- (4) 骨髄腫細胞でSLAMF3を介したシグナル経路を検討したところ、SLAMF3ノックダウン細胞、ノックアウト細胞、ΔSLAMF3発現KMS-34細胞、SHP2阻害剤NS87877で処理した骨髄腫細胞では、SHP2とERK1/2のリン酸化が低下していた(図7)。一方、それら骨髄腫細胞ではAKTの活性化低下は観察されなかった。

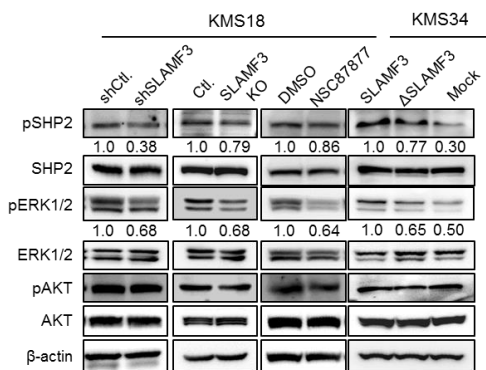


図7: 骨髄腫細胞におけるSLAMF3を介したシグナル経路(引用文献1)

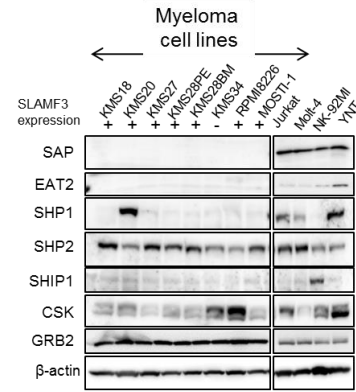


図6: 骨髄腫細胞におけるSH2ドメインを持つアダプター蛋白の発現(引用文献1)

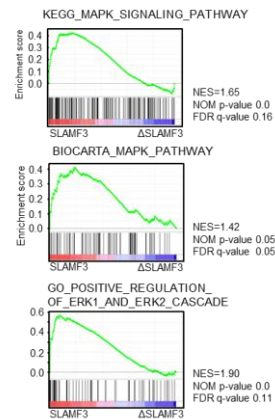


図8: SLAMF3安定発現細胞においてERKシグナル経路が活性化している(引用文献1)

次に、SLAMF3発現KMS-34細胞とΔSLAMF3細胞の遺伝子発現違いを把握するため、DNAマイクロアレイ解析を行った。2群間で1.5倍以上の差があった遺伝子をピックアップし、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)で解析したところ、SLAMF3発現細胞にてERKシグナル伝達経路に関連する遺伝子セットが多数抽出された(図8)。また、SLAMF3、SHP2、GRB2の遺伝子が含まれる遺伝子セットも多く抽出された。

更に、細胞周期関連遺伝子、アポトーシス・抗アポトーシス関連遺伝子の発現をReal-time PCRで検討したところ、SLAMF3ノックダウン細胞、ノックアウト細胞、ΔSLAMF3細胞、NS87877処理細胞において、細胞周期遺伝子Cyclin D1/2遺伝子、抗アポトーシス遺伝子BCL2が有意に低下して

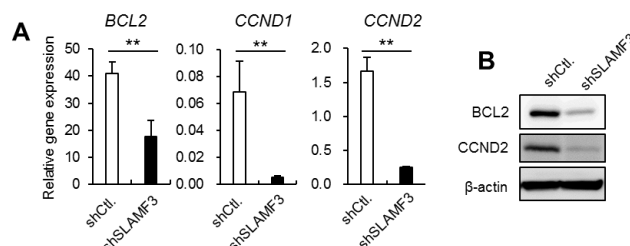


図9: SLAMF3ノックダウン細胞におけるBCL2, CCND1/2の遺伝子発現(A)と蛋白質発現(B; 引用文献1)

いた(図9)。同様に、タンパク質発現も低下していた。

- (5) 新規骨髄腫患者の血清中の可溶性SLAMF3をELISAにて測定したところ、健常コントロールとMGUS患者と比較し、骨髄腫患者の血清中可溶性SLAMF3が有意に高かった(図10)。更に、骨髄腫患者の中で、ISSステージ、R-ISSステージの進行とともに、可溶性SLAMF3の濃度高値を示した。更に、可溶性SLAMF3高値症例では、アグレッシブな臨床病態を示し、有意に無増悪生存期間(PFS)が短かった(図11)。可溶性

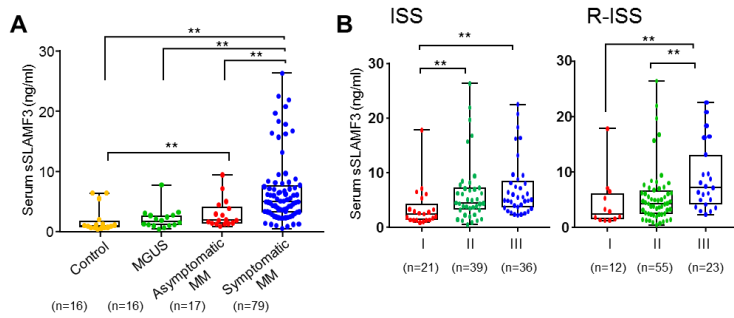


図10: 骨髄腫患者の血清における可溶性SLAMF3 (引用文献1改変)

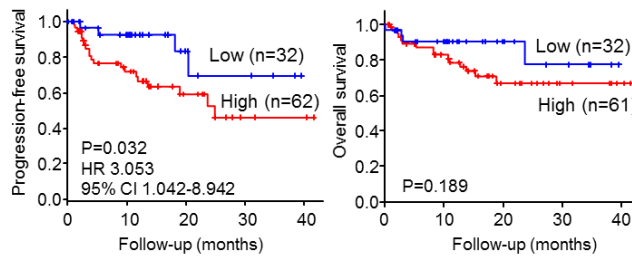


図11: 新規骨髄腫患者における可溶性SLAMF3の濃度と予後 (引用文献1)

SLAMF3は、骨髄腫細胞上に発現するSLAMF3の細胞外ドメインがMMP-9等のプロテアーゼによって切断されて産生されることが示された。このことから、可溶性SLAMF3は病態進行を反映している可能性があり、予後指標として有用であることが示唆された。

- (6) SLAMF3は骨髄腫細胞上に高発現しており、病勢進行してもその発現は保持されていた。SLAMF3は他の骨髄腫細胞に発現しているSLAMF3と結合し、その後、SLAMF3は細胞内ドメインにてアダプター蛋白SHP2とGRB2の相互作用を介して、MAPK/ERKシグナル経路が活性化し、抗アポトーシス遺伝子と細胞周期関連遺伝子の発現亢進が誘導され、細胞増殖能と薬剤耐性の獲得に関与していることが示された(図12)。以上のことから、SLAMF3は骨髄の病勢進行に関与していると考えられ、免疫治療標的抗原として有用である可能性が示された。また、可溶性SLAMF3の濃度は病勢進行を反映しており、骨髄腫患者の予後予測因子として有用と推察された。

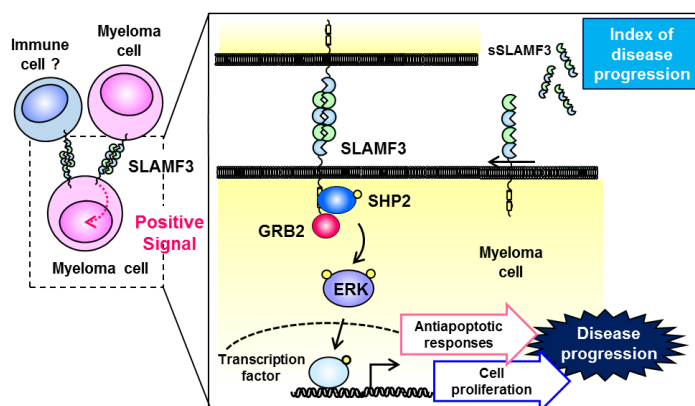


図12: 骨髄腫におけるSLAMF3の機能

[引用文献]

- Ishibashi M, Takahashi R, Tsubota A, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Tanaka N, Tsukune Y, Tanosaki S, Ito S, Asayama T, Sunakawa M, Kaito Y, Kuribayashi-Hamada Y, Onodera A, Moriya K, Komatsu N, Tanaka J, Odajima T, Sugimori H, Inokuchi K, Tamura H. SLAMF3-mediated signaling via ERK pathway activation promotes aggressive phenotypic behaviors in multiple myeloma. *Mol Cancer Res.* 2020 Apr;18(4):632-643.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishibashi M, Takahashi R, Tsubota A, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Tanaka N, Tsukune Y, Tanosaki S, Ito S, Asayama T, Sunakawa M, Kaito Y, Kuribayashi-Hamada Y, Kondo-Onodera A, Moriya K, Komatsu N, Tanaka J, Odajima T, Sugimori H, Inokuchi K, Tamura H.	4. 巻 18(4)
2. 論文標題 SLAMF3-mediated signaling via ERK pathway activation promotes aggressive phenotypic behaviors in multiple myeloma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 632-643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-19-0391.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishibashi M, Soeda S, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Tanaka N, Tanosaki S, Ito S, Odajima T, Sugimori H, Asayama T, Sunakawa M, Kaito Y, Kinoshita R, Kuribayashi Y, Onodera A, Moriya K, Tanaka J, Tsukune Y, Komatsu N, Inokuchi K, Tamura H.	4. 巻 9(78)
2. 論文標題 Clinical impact of serum soluble SLAMF7 in multiple myeloma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 34784-34793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26196.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 石橋真理子, 田村秀人	4. 巻 74
2. 論文標題 多発性骨髄腫におけるSLAMファミリー分子の発現と機能	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本臨牀社	6. 最初と最後の頁 158-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ishibashi M, Tamura H, Sunakawa M, Kaito Y, Kinoshita R, Asayama T, Moriya K, Inokuchi K, Takahashi H.
2. 発表標題 The rs509749 genotype of the SLAMF3 gene is associated with multiple myeloma aggravation.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kinoshita R, Ishibashi M, Handa H, Sasaki M, Imai Y, Tanaka N, Tanosaki S, Ito S, Isada A, Asayama T, Inokuchi K, Komatsu N, Tanaka J, Matsumoto M, Koike M, Tamura H.
2. 発表標題 Prognostic evaluation of surface antigen and soluble factors in multiple myeloma: KT-MM analysis.
3. 学会等名 第43回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishibashi M, Tamura H, Takahashi R, Tsubota A, Asayama T, Kuribayashi-hamada Y, Onodera A, Moriya K, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Ito S, Komatsu N, Inokuchi K.
2. 発表標題 Mechanism of multiple myeloma aggravation mediated by immunoreceptor SLAMF3 molecules.
3. 学会等名 第42回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishibashi M, Tamura H, Asayama T, Onodera A, Moriya K, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Tanaka J, Tanosaki S, Ito S, Komatsu N, Inokuchi K, Yamada A, Tamura H, Ishibashi M, Isoda A, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Koike M, Ito S, Moriya K, Hamada Y, Asayama T, Matsumoto M, Komatsu N, Tanaka J, Ishida Y, Tanosaki S, Inokuchi K.
2. 発表標題 Pathophysiological functions and clinical impact of the new immunoreceptor SLAMF3 in multiple myeloma.
3. 学会等名 The 22nd European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishibashi M, Tamura H, Asayama T, Kuribayashi-hamada Y, Onodera A, Moriya K, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Tanaka N, Tanaka J, Tanosaki S, Ito S, Komatsu N, Inokuchi K.
2. 発表標題 The new immunoreceptor SLAMF3 promotes aggressive biological and clinical characteristics in multiple myeloma.
3. 学会等名 59th American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kaito Y, Tamura H, Soeda S, Asayama T, Ishibashi M, Sasaki M, Handa H, Imai Y, Tanaka J, Tanosaki S, Ito S, Inokuchi K.
2. 発表標題 Serum soluble SLAMF7 is correlated with disease progression in multiple myeloma and may affect anti-SLAMF7 antibody therapy.
3. 学会等名 16th International Myeloma Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考