

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16125

研究課題名（和文）多発性骨髄腫におけるMDSCによる免疫制御機構の解析および治療への応用

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying the induction of myeloid-derived suppressor cells in multiple myeloma

研究代表者

志村 勇司（Shimura, Yuji）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：00714685

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）：健常人由来の血液細胞と多発性骨髄腫由来細胞株を共培養することで、通常はごく少数しか存在しない骨髄由来抑制細胞を血液細胞から誘導することに成功した。この誘導に関わる物質を調べてみると、サイトカインの一種であるCCL5およびMIFと呼ばれる分子が骨髄由来抑制細胞の誘導に関わっていることが解明された。さらに、すでに一般的に使用されている多発性骨髄腫に対する薬を検討した結果、免疫調整薬と呼ばれる薬に骨髄由来抑制細胞を選択的に低下させる効果があることもわかった。免疫調整薬は、血液細胞にも影響を与え、骨髄由来抑制細胞を産生しにくくさせる効果があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腫瘍に対する免疫療法は、従来の治療に難治性であった患者に対しても劇的な効果を示す可能性があることから注目を浴びている。一方で、免疫療法に対する治療抵抗性の一因に腫瘍による免疫抑制が挙げられており、その克服が課題となっている。本研究は、腫瘍による免疫抑制の主体と考えられている骨髄由来抑制細胞がどのように誘導されるかを一部解明したものであり、今後、骨髄由来抑制細胞を制御し、免疫療法の効果を高める戦略を開発する上での礎となると考えている。また、既存の多発性骨髄腫に対する薬による骨髄由来抑制細胞への効果についても解明しており、今後の治療反応性予測などにも応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanisms underlying myeloid-derived suppressor cell (MDSC) induction in multiple myeloma (MM). Using a transwell co-culture system, a part of human myeloma-derived cell lines were potent in inducing MDSCs from normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). As the results, we identified that secretion of C-motif chemokine ligand 5 (CCL5) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) by myeloma cells is a prerequisite for induction of MDSCs in MM. The immunomodulatory drug (IMiD) compounds were identified as potent inhibitors of MDSC induction through bidirectional molecular effects of downregulation of CCL5 and MIF in myeloma cells; and downregulation of CCR5, a receptor for CCL5, and induction of interferon regulatory factor 8, a critical transcription factor for monocytic differentiation, in PBMCs. Totally, we identified a novel effect of IMiD of inhibiting MDSC induction via overlapping regulatory effects in myeloma cells and normal PBMCs.

研究分野：血液内科

キーワード：骨髄由来抑制細胞 多発性骨髄腫 CCL5 MIF 抗腫瘍免疫 免疫調整薬

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫 (multiple myeloma, MM) は造血器悪性腫瘍の一つであり、多彩な合併症を呈しながら、最終的には致命的転機を辿る難治性疾患である。高齢者に好発することから、近年、罹患率は増加の一途にあり、今後も更なる患者数の増加が見込まれる。MM は従来型の細胞障害性抗癌剤に対する感受性は概して低く、生存予後は約 3 年程度に留まるなど治療効果は極めて限定的であったが、2000 年代半ば以降、プロテアソーム阻害剤や免疫調節薬などの様々な新規治療薬が登場し、治療成績は格段に向上した。しかし、依然として根治は困難であり、より効果的な薬剤の開発が望まれている。近年、様々な癌腫において抗腫瘍戦略の一つとして、免疫チェックポイント阻害剤や CAR-T 療法など、様々な免疫学的治療戦略による治療効果に注目が集まっている。こうした免疫学的治療戦略の最大の魅力は、従来の抗癌剤に対し低感受性であった癌腫にも有効性が認められること、一部症例では非常に長期に癌抑制効果が持続することである。実際、造血器悪性腫瘍においても免疫賦活化作用が期待される各種のモノクローナル抗体が開発され、悪性リンパ腫や MM などの難治性血液疾患に対し臨床応用されている。なかでも MM では、免疫調節薬やモノクローナル抗体治療によって一部の症例では極めて長期の病勢コントロールが可能となったことは免疫学的治療戦略の可能性への期待を高めるものであるが、未だ十分な普遍性や強度を有するものとは言えないのが実情である。よって、MM における腫瘍免疫抑制を司るボトルネックとなる機序を詳らかにし、その制御戦略の開発を推進することは極めて重要な研究課題であると考えられた。

2. 研究の目的

MM における抗腫瘍免疫抑制状態に主体的に関わる中心プレイヤーとエフェクター細胞の階層的役割、並びに、制御メカニズムの詳細は未解明である。骨髄由来免疫担当細胞 (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) は強力な免疫抑制活性を示す細胞群であり、近年、腫瘍免疫抑制における重要性が注目されている。我々は、かねてより MM に対する新規治療戦略の開発に向けた多角的な研究を継続してきたが、その過程での予備的検討において、①MM 患者では末梢血および骨髄において MDSC が増加していること、② MDSC が MM におけるナチュラルキラー (Natural killer, NK) 細胞や細胞障害性 T 細胞を抑制し、制御性 T 細胞を増加させること、③ MM 細胞と MDSC が相互作用することで MM 細胞増殖を促進することを見出した。そこで、本研究では MM 細胞と MDSC の共培養環境において各々の増殖を促進する液性因子、exosome 等と、媒介する細胞内シグナル伝達経路についての網羅的な検討を進め、MDSC と MM 細胞や免疫担当細胞との間における細胞間クロストークを司る分子機序を解明することを主な目的に設定した。分子機序の解明が進んだ場合には、MM に対する治療標的となりうる普遍的な分子標的を見出すことで「直接的抗腫瘍効果」および「抗腫瘍免疫賦活化(腫瘍免疫抑制解除)効果」を併せ持つ画期的なダブルブロック標的治療戦略の開発に挑戦する計画も立案した。このような腫瘍による抗腫瘍免疫抑制作用を制御しうる戦略は、既存の免疫調節薬やモノクローナル抗体などの免疫活性化作用を有する標準的治療薬の効果増強も期待できるものと考えられた。

3. 研究の方法

(1) MMにおけるMDSCの数的・機能的異常の臨床的意義についての検討

様々な臨床病期のMM患者（前骨髄腫状態（MGUS）、未治療MM、再発・難治性MM）における末梢血・骨髄中のMDSCの数・割合、MDSCの標的となるNK細胞、細胞障害性T細胞、制御性T細胞の数についてフローサイトメトリーを用いた解析を行った。

(2) MM細胞とMDSCの間の細胞間相互効果(Cell-cell interaction)の解析

① 直接的な細胞接触効果の解析 In vitroにおいて健常人由来末梢血単核細胞と研究室が所有するMM細胞株の混合共培養を行い、細胞株毎のMDSC誘導能を解析、比較した。

② 間接的な細胞情報伝達効果の解析 In vitroにおいて①と同様の細胞を用いた共培養をトランスウェル形式で行い、細胞株毎のMDSC誘導能を解析、比較した。

③ MMによるMDSC誘導媒介因子の同定

①、②においてMDSC誘導能の異なるMM細胞株を複数選定し、(i) MM細胞株毎の分泌サイトカイン、ケモカインプロファイルの抗体アレイ等を用いたスクリーニング解析、(ii) MDSC誘導性候補分子の発現状態についてのMM細胞株毎の定量的PCR、Western blot、ELISAによる解析と細胞株間の比較検討を行った。

(3) MM細胞、MDSC同時標的治療戦略の検討

(3)-1. MM細胞・MDSC同時標的治療戦略における標的分子の同定

上記(2)で明らかにされたMDSC誘導を媒介すると想定された液性因子、分子に対する阻害剤や中和抗体を用いてMDSC誘導能に対する効果を確認した。

(3)-2. MM細胞・MDSC同時標的治療戦略の検討

既存の抗MM薬やすでに他癌腫でMDSCを抑制すると報告されている薬剤を用いてMDSC抑制効果を検討した。次に、効果の認められた薬剤について、western blot、定量的PCR、フローサイトメトリーによるMDSC抑制に関与する分子機序解明を試みた。

4. 研究成果

(1) MMにおけるMDSCの数的・機能的異常の臨床的意義についての検討

試験的に治療中のMM患者検体（末梢血）を用いてMDSCの解析を試みたが、フローサイトメトリーではMDSCの有意な増加は認められなかった。これは、前治療の影響でMDSCがすでに抑制されている可能性や一定程度病勢が抑えられているためにMDSCが増加していない可能性が考えられた。

(2) MM細胞とMDSCの間の細胞間相互効果(Cell-cell interaction)の解析

はじめに、MM 細胞株と健常人由来末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) の直接混合培養を行ったが、MDSC の有意な増加は認められなかった。次に PBMCs と、9 種類の異なる MM 細胞株とを、各々、5 日間、1 μm 孔フィルターを介した間接的条件下での共培養を行った。培養後の PBMCs をフローサイトメトリーで解析したところ、9 種類のうち 4 種類のみで CD14⁺HLA-DR⁻の表面形質を有する monocytic MDSC (M-MDSC) が誘導されることを見出した (figure 1)。

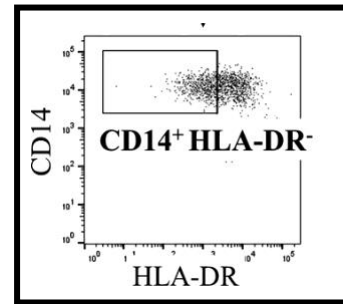


figure 1

この誘導された M-MDSC と考えられる分画を CD33 magnetic beads を用いて濃縮し、別の PBMCs とさらに共培養したところ、PBMCs において Treg の有意な増加、MDSC 誘導時に必要とされる IL-8 や IDO の高発現が認められた。このことから、誘導された分画は M-MDSC としての機能を有する集団と確認できた。また、もう一つの主要な MDSC とされる polymorphic nuclear MDSC (PMN-MDSC) の誘導についても解析したが、9 種類の MM 細胞株との共培養では誘導は確認できなかった。

次に、間接的共培養系においては液性因子の関与が考えられたため、各々の細胞株培養上清を材料にサイトカインアレイを用いた網羅的解析を試みた。MDSC 誘導能を有する MM 細胞株と MDSC 非誘導 MM 細胞株の培養上清を比較したところ、MDSC 誘導能を有する MM 細胞株のみにおいて、C C motif chemokine ligand 5 (CCL5) および Macrophage Inflammatory Protein-1 (MIP-1α) の濃度が高いことが判明した。一方で macrophage migration inhibitory factor (MIF) は全ての細胞株での分泌亢進が確認された。

(3) MM細胞、MDSC同時標的治療戦略の検討

これらの分子と MDSC 誘導との関連を調べるため、上記の MM 由来細胞株と PBMCs との共培養系に CCL5 中和抗体、MIP-1α 中和抗体を添加したところ、CCL5 中和抗体により MDSC 誘導は有意に抑制された一方で、MIP-1α 中和抗体の効果は限定的であった。また、CCL5 中和抗体に加え MIF 阻害剤も添加すると MDSC 誘導をほぼ抑えることが可能であった (figure 2)。逆に、MDSC 非誘導性 MM 由来細胞株と PBMCs 共培養系に CCL5 を添加すると、部分的ではあるが M-MDSC の誘導が確認された。以上から MM においては腫瘍細胞から分泌される CCL5 と MIF が協調的に作用することで M-MDSC を誘導することが強く示唆された。

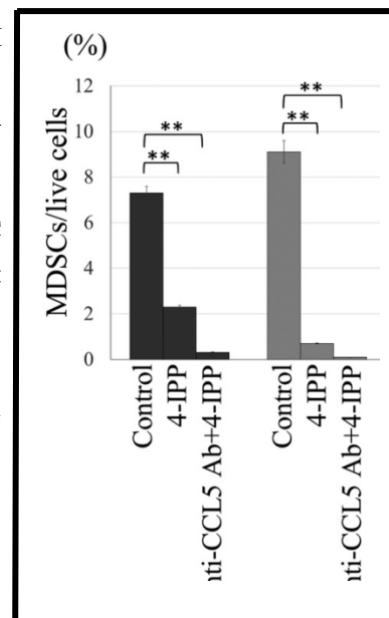


figure 2

MDSC 誘導細胞株に対する抗 CCL5 中和抗体、MIF 阻害剤 (4-IPP) の MDSC 誘導抑制効果

続いて、これら実験結果を元に、MDSC 制御の治療戦略を検討するため、既存の抗 MM 薬や、

既報で MDSC 抑制作用が報告される薬剤を本培養系に添加し、MDSC 誘導能に対する効果の検討を行った。その結果、現在の MM 治療における key drug の一つである IMiDs (LEN、POM) 投与下では、PBMCs に対する細胞毒性を示さず、かつ M-MDSC 誘導を選択的に低下させる効果が得られた。また、その作用は LEN よりも POM で特に強力であることが判明した (figure 3)。

IMiDs の作用機序を解明するため、上記で MDSC 誘導に関わる分子とされた CCL5、MIF についての検討も行った。IMiDs 投与後の MM 由来細胞株の CCL5、MIF の発現、細胞上清中の濃度を real time PCR、ELISA で測定したところ、いずれも有意に低下しており、これら分子の発現制御により MDSC 誘導が抑制された可能性が示唆された。

さらに、MM 由来細胞株のみではなく、末梢血単核球についても IMiDs 投与による変化が認められた。具体的には、末梢血単核球において、CCL5 受容体である CCR5 の細胞表面における発現が低下し、MDSC 誘導に抑制的に働く IRF8 の細胞内発現レベルが上昇することがフローサイトメトリー、PCR 検査で判明した。

これらの結果より、IMiDs は骨髄腫細胞と末梢血単核球の両者に作用することで M-MDSC 誘導を強く抑制する薬理学的効果を有することが明らかになった (figure 4)。

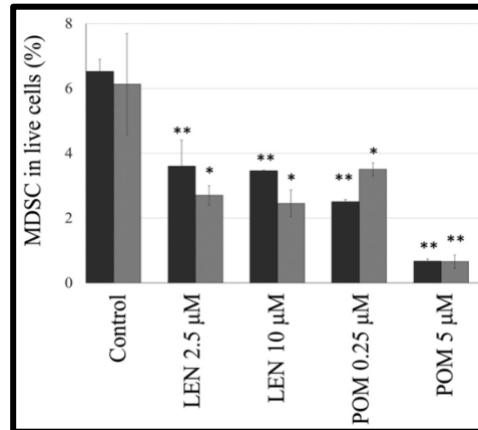


figure 3 MDSC 誘導細胞株 (2 株) に対する IMiDs (LEN,POM) の効果

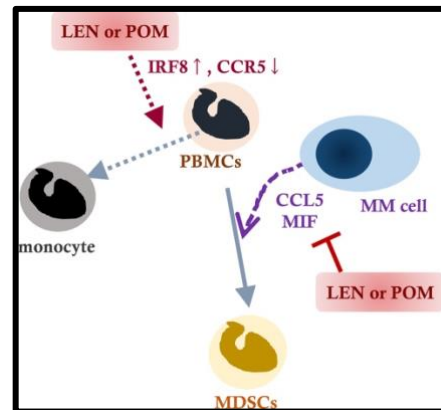


figure 4 IMiDs による MDSC 誘導抑制メカニズム (推定)

以上、本研究では MM において骨髄腫細胞から産生される CCL5 や MIF が PBMCs からの MDSC 誘導に重要な役割を果たしていることを解明した。さらに IMiDs は骨髄腫細胞と末梢血単核球の両者に CCL5 や MIF の抑制、ならびにそのシグナル伝達経路の遮断を介する作用を発揮することで MDSC 誘導を強力に抑制する作用を有することも発見した。今後の更なる研究により、MDSC、CCL5 や MIF の治療反応性予測のバイオマーカーとしての意義の確立、さらに更なる治療効果の増強戦略の開発への発展が期待される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kuwahara Ota Saeko, Shimura Yuji, Steinebach Christian, Isa Reiko, Yamaguchi Junko, Nishiyama Daichi, Fujibayashi Yuto, Takimoto Shimomura Tomoko, Mizuno Yoshimi, Matsumura Kimoto Yayoi, Tsukamoto Taku, Chinen Yoshiaki, Kobayashi Tsutomu, Horiike Shigeo, Taniwaki Masafumi, G?tschow Michael, Kuroda Junya	4. 巻 191
2. 論文標題 Lenalidomide and pomalidomide potently interfere with induction of myeloid derived suppressor cells in multiple myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 784 ~ 795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16881	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 太田沙絵子、志村勇司 他
2. 発表標題 多発性骨髄腫における骨髄由来免疫抑制細胞に対するIMiDsの抑制効果
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田沙絵子、志村勇司 他
2. 発表標題 Myeloma-induced myeloid-derived suppressor cells are targeted by immunomodulatory drugs that regulate the CCL5/CCR5 axis and MIF and IRF8 expression
3. 学会等名 The annual congress of EHA (European Hematology Association) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田沙絵子
2. 発表標題 Potency of immunomodulatory drugs in interfering molecular mechanisms underlying the induction of myeloid-derived suppressor cell in multiple myeloma
3. 学会等名 第44回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------