

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07653

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫における免疫ランドスケープの検証

研究課題名(英文) Deciphering the immune landscape of multiple myeloma

研究代表者

藤井 眞一郎 (Fujii, Shin-ichiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：10392094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：難治性造血器腫瘍である多発性骨髄腫(以下、骨髄腫)において、骨髄微小環境における免疫細胞の役割は散発的な報告はあるものの不明な点が多い。本研究は、骨髄腫に着目し、マスサイトメトリを利用して多スケールの免疫プロファイリングを行った。免疫系の初期防御として機能する自然リンパ球であるNK細胞に着目し、他の免疫細胞との関連を調べたところ、NK細胞とCD8T TEMRA サブセットの正の相関、骨髄及び末梢におけるNK細胞の機能を示す活性化マーカーCD226及びNKG2Dの発現に違いがみられることが判った。免疫プロファイルと病態との関連は、将来的にバイオマーカー探索の糸口になりうると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多発性骨髄腫は造血の場である骨髄を腫瘍の場とする疾患である。種々の新規治療薬が使用されるようになってきているが、まだ完全に治癒をもたらすには至っていない。腫瘍細胞自体をターゲットとした治療法の開発のみならず、腫瘍をとりまく環境(腫瘍微小環境)に着目し、腫瘍微小環境を理解し、改善することも一つのアプローチである。本研究のように多発性骨髄腫の免疫環境をあたらしい技術により紐解いていく試みにより、疾患の病態の進行や改善のバイオマーカー、さらには新しい治療法の糸口を見つけることにつながると考える。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma (MM) is one of the refractory hematological malignancies. The role of stromal cells and osteoclasts in tumor microenvironment (TME) in tumor progression has been revealed but the involvement of the immune cells remains unclear. We focused on TME of MM and investigated the immune profiling of MM samples using Mass Cytometer, which can assess multiple parameters. Especially, by focusing on NK cells, which are main effectors of innate immunity, we found the positive correlation between NK and CD8T terminally differentiated effector memory (TEMRA) subset and also differential expression of activation markers, NKG2D and CD226 of BM NK cells and blood NK cells. These finding suggested that immune profiling of multi-scales using mass cytometer may act as the immunological biomarkers in an evaluation of progression of MM.

研究分野：免疫学

キーワード：多発性骨髄腫 腫瘍微小環境 自然免疫 獲得免疫

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(Multiple myeloma; MM)は、造血幹細胞より分化した形質細胞の腫瘍であり、免疫系細胞の腫瘍化である。また MM はゲノム不安定性を有し、細胞遺伝学的に不均一で、初発時より複数のクローンが競合的あるいは協調的に存在するといわれている。病態進行には、腫瘍微小環境(Tumor microenvironment; TME)におけるストローマ細胞や破骨細胞など骨髄ニッチの関与が明らかになりつつあるが、免疫細胞の役割は散発的な報告はあるものの不明な点が多い。我々はこれまで、免疫系の初期防御として機能する自然リンパ球(NKT 細胞、及び NK 細胞)に着目して、MM におけるこれらの細胞群の数的、機能的解析を行い、保存されている症例と低下している症例があることを報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では MM の TME および末梢血における自然免疫から獲得免疫系までの免疫細胞の網羅的免疫プロファイリング技術を確立し、病態進行と免疫システムの関係性を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

健康人末梢血および共同研究機関から提供された MM 症例(Stage I-III)末梢血および骨髄検体を解析に用いた。

健康人検体を用いて各免疫細胞の細胞頻度および表現型のフローサイトメトリーのデータを参考に、マスサイトメリーの抗体パネルパターンの最適化を行い、患者検体の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 多発性骨髄腫に対する免疫ランドスケープの確立

複雑な免疫システムの包括的な理解の為には、単一細胞解析が必須である。少数の細胞数で 40 種類以上のマーカーを同時検出できるマスサイトメリーを用いた。まず、MM 症例用の抗体パネルを作製し、その金属標識パターンや、抗体濃度などの最適化を行った。健康人及び MM 患者由来の患者サンプルを用いて、SPADE 解析によるクラスタリングを行ったところ、免疫細胞集団は下記のように分類された。健康人に対し、MM 患者では NK 細胞の低下を認めた(図 1)。

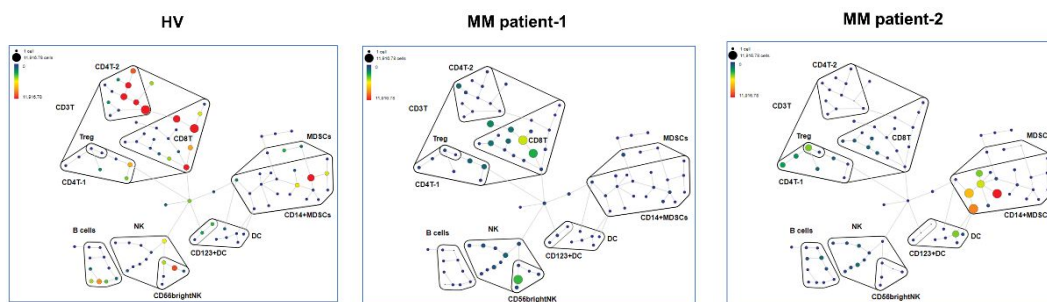


図 1 SPADE 解析

健康人(左)MM 症例 1(中)NK 細胞が保たれている。MM 症例 2 (右)NK 細胞が減少

(2) 免疫ランドスケープを用いた MM の免疫学的分類：NK 細胞群による免疫プロファイル分類

MM 患者は NK 細胞群解析によると高 NK 細胞群、低 NK 細胞群に分類された(図 2)。他の免疫細胞の比率を高 NK 細胞群、低 NK 細胞群とで比較をおこなった。T 細胞免疫の解析により、CD3T 細胞、及び CD4T 細胞は差が認められないことに対して、CD8T 細胞は NK 細胞高値群が高いのに対して、NK 細胞低値群は低かった。更に相関解析を行うと NK 細胞と CD8T 細胞の明確な相関が認められた。機能的解析においては、最終分化 T 細胞(TEMRA)サブセットに正の相関セントラルメモリー T 細胞サブセット(TCM)では NK 細胞高値群との負の相関が認められるのに対して、ナイーブ T 細胞サブセット(naïve)やエフェクター・エフェクターメモリー T 細胞サブセット(TEM)に対しての差は認められなかった。

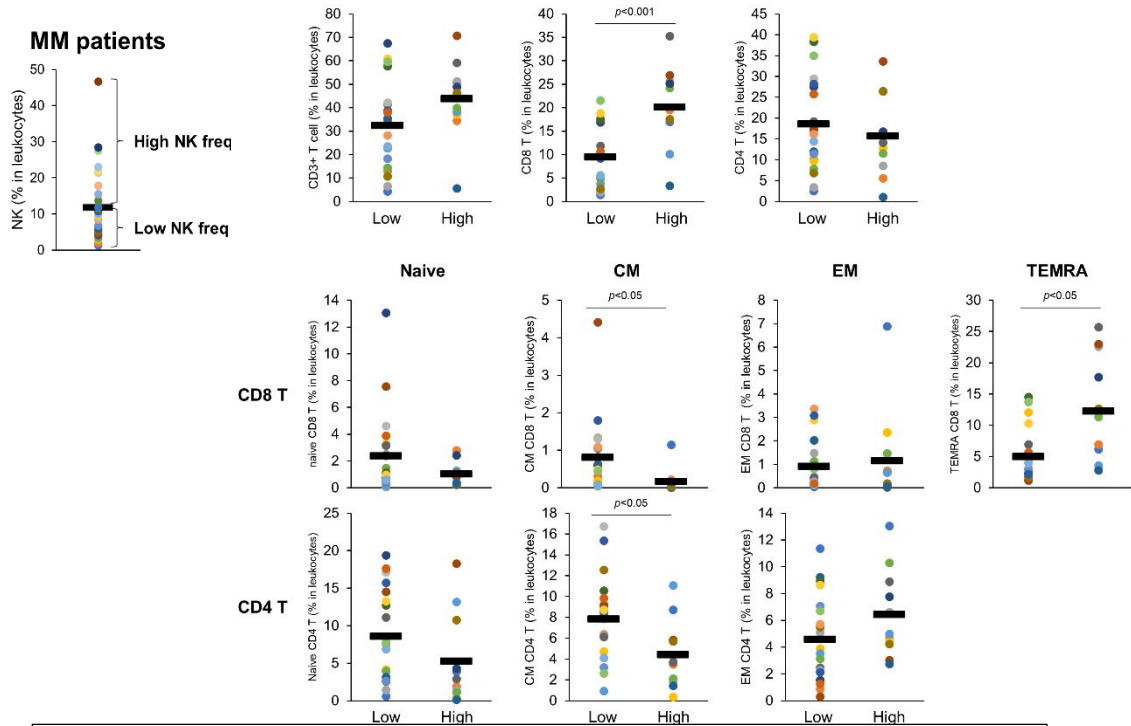


図2 免疫細胞解析

NK細胞頻度による分類（左）高NK群と低NK群における各T細胞頻度の比較（右）

(3) MMのNK細胞活性化マーカーによるNK細胞の分類

次にNK細胞の解析を行い、NK細胞の活性化マーカーであるCD226及びNKG2Dの発現を解析した。MM細胞に副刺激分子であるDNAM-1リガンドやNKG2Dリガンドを発現している場合に、応答するはずである。末梢血及び骨髄においてこのような活性化マーカーを検討した。骨髄では末梢血に比べNK細胞の頻度は低値の傾向であった。また骨髄のNK細胞ではCD226、NKG2Dの発現が低下している場合があった（図3）。

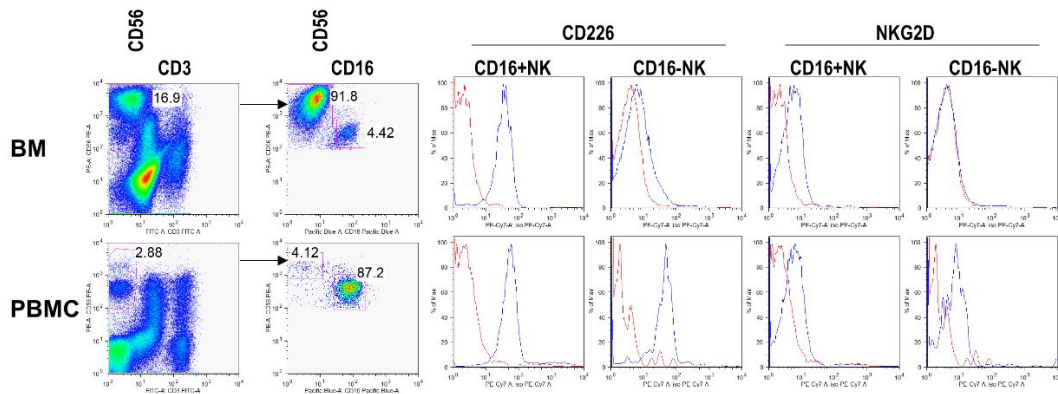


図3 骨髄および末梢血におけるNK細胞のCD226およびNKG2D発現

このようにMM症例でマスサイトメリーを利用して多スケールの免疫プロファイリングを行うことで、NK細胞の低値を確認することができた。さらにその結果を詳細に解析することで、(i)NK細胞とCD8T細胞の相関があること、TEMRAとの関連が認められることが判明した。更に、(ii)骨髄及び末梢におけるNK細胞の機能を示す活性化マーカーCD226及びNKG2Dの発現を調べることで病態と免疫プロファイルの関連を見出すことができると考えられる。以上より、免疫プロファイルと病態との関連は、将来的にバイオマーカー探索の糸口になりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Shimizu K, Iyoda T, Yamasaki S, Kadowaki N, Tojo A, Fujii S	4. 巻 12
2. 論文標題 NK and NKT Cell-Mediated Immune Surveillance Against Hematological Malignancies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 E817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12040817	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 Fujii S, Shimizu K	4. 巻 40
2. 論文標題 Immune Networks and Therapeutic Targeting of iNKT Cells in Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Immunology	6. 最初と最後の頁 984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.it.2019.09.008	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 Okada M, Shimizu K, Fujii S	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification of Neoantigens in Cancer Cells as Targets for Immunotherapy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2594
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23052594.	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 2.Fujii S, Yamasaki S, Hanada K, Ueda S, Kawamura M and Shimizu K	4. 巻 113
2. 論文標題 Cancer immunotherapy using artificial adjuvant vector cells to deliver NY-ESO-1 antigen to dendritic cells in situ.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 864-874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15259	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 Shimizu K, Ueda S, Kawamura M, Sato M, and Fujii S	4. 巻 in press
2. 論文標題 A single immunization with cellular vaccine confers dual protection against SARS-CoV-2 and cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 18件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「シンポジウム28自然免疫と獲得免疫の両者を誘導する人工アジュバントベクター細胞によるがん免疫細胞療法」
3. 学会等名 日本臨床薬理学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「腫瘍微小環境における免疫担当細胞」
3. 学会等名 日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「樹状細胞を標的とした抗腫瘍細胞治療“人工アジュバントベクター細胞”」
3. 学会等名 日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「生体内樹状細胞を標的としたがんに対する細胞治療“人工アジュバントベクター細胞”」
3. 学会等名 日本血液疾患免疫療法学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「癌免疫ネットワークと免疫療法の最先端」
3. 学会等名 日本消化器病学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「腫瘍免疫における樹状細胞の役割」
3. 学会等名 日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 Development of anti-cancer therapeutic cellular drug as in vivo DC targeting therapy
3. 学会等名 日本免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 樹状細胞を標的とするがんワクチン“人工アジュバントベクター細胞”療法
3. 学会等名 日本がん免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 Development of the therapeutic cancer vaccine utilizing invariant NKT cell-licensed dendritic cells
3. 学会等名 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 生体内樹状細胞を標的とした自然免疫と獲得免疫の両者を誘導する人工アジュバントベクター細胞によるがん免疫細胞療法
3. 学会等名 日本輸血・細胞治療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 免疫バランスの破たんと病気の関係
3. 学会等名 日本医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shin-ichiro Fujii
2. 発表標題 Establishment of a new therapeutic cancer vaccine inducing multifunctional immunity, "artificial adjuvant vector cells(aAVC
3. 学会等名 JSH International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 難治性急性骨髄性白血病に対するWT1発現人工アジュバントベクター細胞の臨床治験 (First-in-Human trial)
3. 学会等名 AMED 革新的医療技術創出拠点プロジェクト 令和2年度成果報告会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 "Immune responses of cancer immunotherapy with artificial adjuvant vector cells in Phase I trial"
3. 学会等名 日本血液疾患免疫療法学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 "Immune response of first-in-human phase I clinical trial by WT1-expressing artificial adjuvant vector cells (aAVC-WT1)"
3. 学会等名 日本がん免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「自然免疫と獲得免疫の両者を誘導する人工アジュバントベクター細胞・エーベック療法」
3. 学会等名 日本組織適合性学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「新規細胞治療薬人工アジュバントベクター細胞の開発」
3. 学会等名 ARO協議会総会第8回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin-ichiro Fujii
2. 発表標題 "A new therapeutic cancer vaccine inducing multifunctional immunity, artificial adjuvant vector cells"
3. 学会等名 The 1st JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井眞一郎
2. 発表標題 「癌、感染症における記憶T細胞免疫」
3. 学会等名 AMED 革新的先端研究開発支援事業令和4年度研究開発目標の検討に関するワークショップ
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 伊豫田智典、清水佳奈子、藤井眞一郎	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 9
3. 書名 腫瘍内科	

1. 著者名 藤井眞一郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 「臨床血液」編集部	5. 総ページ数 9
3. 書名 臨床血液	

1. 著者名 藤井眞一郎、清水佳奈子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 藤井眞一郎、山崎哲、清水佳奈子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 7
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 清水佳奈子、山崎哲、藤井眞一郎	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 実験医学	

〔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
研究分担者	清水 佳奈子 (SHIMIZU KANAKO) (20391980)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ 上級研究員 (82401)	

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
---------	---------