

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08743

研究課題名(和文)多発性骨髄腫の病態形成に関わる抗腫瘍免疫機構の解析研究

研究課題名(英文) Analysis of anti-tumor immune mechanisms involved in the pathogenesis of multiple myeloma

研究代表者

田中 宏和 (Tanaka, Hirokazu)

近畿大学・医学部・臨床教授

研究者番号：40360846

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)：本研究は、MM(幹)細胞における免疫チェックポイント分子の発現を解析するとともに、抗骨髄腫免疫を担当する細胞の特性を解析し、MMにおける抗腫瘍免疫機構を明らかにすることを目的とした。免疫抑制分子の発現は、幹細胞分画に有意に高く、初発症例よりも再発難治例により強いことを見出した。幹細胞分画に含まれる免疫担当細胞を組織的に比較した結果、抵抗例では幹細胞集団により多くの抑制性細胞が誘導されていた。さらに、幹細胞分画に発現する免疫チェックポイント分子は、腫瘍細胞と免疫担当細胞との共培養において細胞障害活性を抑制したが、特定の分子ではなく、症例ごとに免疫抑止に関わる分子は異なることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、種々がんに対して免疫チェックポイント分子を標的とした治療法が実用化されているが、骨髄腫では、抗PD-1抗体単剤ではほとんど効果が認められていない。この一因として各免疫チェックポイント分子の発現、および機能が症例ごと、さらには病期により異なっていることが明らかとなり、この成果は今後抗骨髄腫免疫を標的とした治療戦略を構築する上で有用な基盤となる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the expression of immune checkpoint molecules in MM (stem) cells and to characterize the cells responsible for anti-myeloma immunity, and to elucidate the anti-tumor immune mechanism in MM. We found that the expression of immunosuppressive molecules was significantly higher in the stem cell fraction and stronger in relapsed refractory cases than in newly diagnosed cases. A histologic comparison of immune cells in the stem cell population revealed that suppressive cells were induced more in the stem cell population of resistant cases. In addition, immune checkpoint molecules expressed in the stem cell fraction suppressed cytotoxic activity in co-cultures of tumor cells and immune cells, but not specific molecules, indicating that molecules involved in immune suppression differ from case to case. These results provide a useful foundation for future therapeutic strategies targeting anti-myeloma immunity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：多発性骨髄腫 骨髄微小環境 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫(MM)の治療成績は、プロテアソーム阻害薬(PiS)、免疫調節薬(IMiDs)などの新規薬剤の登場により飛躍的に改善した。しかし、MM 幹細胞は治療抵抗性であり、PCR 等の分子レベルで微小残存病変(MRD)が検出不可能な深い寛解を達成、維持している症例においても、多くの症例は再発する。一方で、治療中止後、ある程度の MM 細胞の残存が確認されているにもかかわらず、病勢が進行せず再発に至らない、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症(MGUS)様の病態を呈する症例も存在する。したがって、どの程度の強度、期間で治療すべきかについては、症例により大きく異なっているが、それを判別しうる指標はない。また、このような残存 MM(幹)細胞が再発を起こす、あるいは起こさない機構として、細胞障害性 T 細胞(CTL)や制御性 T 細胞(Treg)などの腫瘍免疫細胞の調節機構が推測されているが、その詳細は明らかではない。

申請者らは、MM 患者骨髄の CD38+138+45-19- で定義した MM 細胞(phenotypic MM, phMC)中に、造血幹/前駆細胞のマーカー CD34 を発現する集団が数%存在することを見出した。CD34+ phMC は、幹細胞活性を有する clonogenic な MM 細胞であり、治療後 CD34+ phMC の頻度が増加するとともに、CD34+ phMC の表面上に免疫チェックポイント分子である PD-L1 の発現が有意に増加することも見出した。

2. 研究の目的

本研究では、初発時および治療により様々な奏効度にある MM 患者骨髄から CD34+ phMC を分離し、シングルセルを用いた全トランスクリプトーム、メチローム解析を行い、MM 幹細胞の分子遺伝学的特性の全貌解明を目指す。同時に種々の免疫チェックポイント分子の発現変化をスクリーニングし、MM 幹細胞の抗腫瘍免疫の回避機構について検討する。また、寛解例、再発例、MGUS 様の病態を維持している例において、CD34+ phMC におけるこれらの分子の発現を検討することで、病態に関わる免疫チェックポイント分子も検索する。さらに CTL, NK 細胞, Treg など抗腫瘍免疫担当細胞の数および特性を解析することで、MM 患者における抗腫瘍免疫の状態を包括的に明らかにする。また、PiS や IMiDs などの薬剤が MM 幹細胞における免疫チェックポイント分子の発現に及ぼす影響、およびその発現制御機構について解析を行う。これらの結果をもとに、MM 幹細胞を標的とする新規の抗腫瘍免疫療法、および免疫状態を指標とした至適治療法を開発することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 初発(12例)及び治療により部分寛解、あるいは完全寛解を得ている症例(計15例)の骨髄から、MM 幹細胞集団として phMC を分離し、CD34+ phMC, CD34- PhMC における抗腫瘍免疫に関わる代表的な免疫チェックポイント分子(CD155, CD86, CD270, CD274, CD275, GAL9, CD137L, CD200, HLA-DR, CD319)の発現を網羅的に比較した。

(2) 初発時の骨髄組織を用いて、CD34+ phMC の局在を免疫組織化学染色法にて評価した。ホルマリン固定標本を酵素処理により抗原賦活し、骨芽細胞および類洞血管内皮細胞を各々 ALP+, および CD31+ で標識し、定義した。

(3) 治療奏効例、治療抵抗例の骨髄組織を用い、CD34+ phMC 集団に含まれる免疫担当細胞の割合を後ろ向きに比較した。Treg および骨髄由来抑制細胞, MDSC は各々 CD4+CD25+FoxP3+ および CD14-CD11b+CD33+ で標識し、定義した。

(4) CD34+ phMC と同一症例から得た樹状細胞, pDC, 細胞障害性 T 細胞, CTL との共培養の系(Ref. Cancer Cell. 2009; 16: 309-23.)を用いて、各免疫チェックポイント分子の中和抗体が抗骨髄腫免疫に及ぼす影響を解析した。

4 . 研究成果

CD34+ phMC, CD34- PhMC における抗腫瘍免疫に関わる免疫チェックポイント分子の発現を網羅的に比較した結果、CD274 (PDL1)の他、CD155 (TIGIT), CD270 (TNFSFR14), GAL9 等の抗腫瘍免疫の抑制分子の発現が、CD34- PhMC と比較して CD34+ PhMC において有意に高いことを見出した。さらにそれぞれ初発症例よりも再発難治例により強く発現を認めた。さらに、これら分子が抗骨髄腫免疫に果たす機能について評価するため、CD34+ phMC と同一症例から得た pDC、CTL との共培養の系を用いて各免疫チェックポイント分子の中和抗体を添加することによる CTL 活性の変化を検討した。CTL 活性は、CTL の増殖能、培養上清へのサイトカイン放出能等で評価し、CTL 活性に及ぼす免疫チェックポイント分子の同定を試みた。その結果、症例ごとに MM 特異的 CD8+ CTL 活性を引き起こす中和抗体は異なり、症例ごとに免疫抑止に関わる分子は異なることが明らかになった。

また、初発時の骨髄組織における CD34+ phMC の局在を評価した結果、CD34+ phMC は、骨芽細胞および類洞血管内皮細胞で構成される正常造血幹細胞、HSC ニッチではなく、骨髄内で不均一に集団を形成しながら存在していた。寛解導入による奏効と CD34+ phMC 集団に含まれる免疫担当細胞を比較した結果、治療抵抗例では、CD34+ phMC 集団に Treg や MDSC などの抑制性の細胞がより多く誘導されており、CTL の活性を抑制していると推測された。

さらに、いずれの免疫チェックポイント分子も、初発例よりも再発難治例、また治療ライン数が進むほど CD34+PhMC 上により強く認められたが、治療早期に IMiDs を投与された症例では、その発現は比較的 low、また CD34+ phMC 集団への Treg や MDSC の誘導も少なかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Serizawa Kentaro, Tanaka Hirokazu, Ueda Takeshi, Fukui Ayano, Kakutani Hiroaki, Taniguchi Takahide, Inoue Hiroaki, Kumode Takahiro, Taniguchi Yasuhiro, Rai Shinya, Hirase Chikara, Morita Yasuyoshi, Espinoza J. Luis, Tatsumi Yoichi, Ashida Takashi, Matsumura Itaru	4. 巻 115
2. 論文標題 CD34+ myeloma cells with self-renewal activities are therapy-resistant and persist as MRD in cell cycle quiescence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 336 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03261-0	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 Kumode Takahiro, Tanaka Hirokazu, Espinoza Jorge Luis, Rai Shinya, Taniguchi Yasuhiro, Fujiwara Ryosuke, Sano Keigo, Serizawa Kentaro, Iwata Yoshio, Morita Yasuyoshi, Matsumura Itaru	4. 巻 115
2. 論文標題 C-type lectin-like receptor 2 specifies a functionally distinct subpopulation within phenotypically defined hematopoietic stem cell population that contribute to emergent megakaryopoiesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 310 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03220-9	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 Rai Shinya, Inoue Hiroaki, Sakai Kazuko, Hanamoto Hitoshi, Matsuda Mitsuhiro, Maeda Yasuhiro, Haeno Takahiro, Watatani Yosaku, Kumode Takahiro, Serizawa Kentaro, Taniguchi Yasuhiro, Hirase Chikara, Espinoza J. Luis, Morita Yasuyoshi, Tanaka Hirokazu, Ashida Takashi, Tatsumi Yoichi, Nishio Kazuto, Matsumura Itaru	4. 巻 113
2. 論文標題 Decreased expression of T cell associated immune markers predicts poor prognosis in patients with follicular lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 660 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15224	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 Rai Shinya、Tanaka Hirokazu、Espinoza J. Luis、Kumode Takahiro、Matsumura Itaru	4. 巻 15
2. 論文標題 Potent efficacy of chlorpromazine in acute myeloid leukemia harboring KIT-D816V mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia Research Reports	6. 最初と最後の頁 100256 ~ 100256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lrr.2021.100256	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 Rai Shinya、Inoue Hiroaki、Hanamoto Hitoshi、Matsuda Mitsuhiro、Maeda Yasuhiro、Wada Yusuke、Haeno Takahiro、Watatani Yosaku、Kumode Takahiro、Hirase Chikara、Espinoza J. Luis、Morita Yasuyoshi、Tanaka Hirokazu、Tatsumi Yoichi、Matsumura Itaru	4. 巻 114
2. 論文標題 Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor for untreated advanced follicular lymphoma treated with rituximab plus bendamustine: results of the prospective phase 2 CONVERT trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 205 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03148-0	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 Takakuwa Teruhito、Tanaka Hirokazu、Matsumura Itaru, et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 Plateau is a prognostic factor of lenalidomide therapy for previously treated multiple myeloma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 349 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hon.2863	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 Takakuwa Teruhito、Tanaka Hirokazu、Matsumura Itaru、Kanakura Y、Nomura S., et al.	4. 巻 106
2. 論文標題 Outcomes of ixazomib/lenalidomide/dexamethasone for multiple myeloma: A multicenter retrospective analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 555 ~ 562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejh.13586	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 田中 宏和	4. 巻 61
2. 論文標題 腫瘍起源からみた多発性骨髄腫の病態と治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1317 ~ 1324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.61.1317	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 Nakaya Aya, Kansai Myeloma Forum Investigators, Tanaka Hirokazu, Nomura Shosaku, et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 Retrospective multi-center study of Adolescent and Young Adult (AYA) Multiple Myeloma in Kansai Myeloma Forum registry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 435 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02996-6	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 Kumode Takahiro, Rai Shinya, Tanaka Hirokazu, Espinoza J. Luis, Kakutani Hiroaki, Watatani Yosaku, Minamoto Shuji, Taniguchi Yasuhiro, Nakayama Shoko, Morita Yasuyoshi, Ashida Takashi, Matsumura Itaru	4. 巻 14
2. 論文標題 Targeted therapy for medullary and extramedullary relapse of FLT3-ITD acute myeloid leukemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia Research Reports	6. 最初と最後の頁 100219 ~ 100219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lrr.2020.100219	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 Rai Shinya, Tanaka Hirokazu, Suzuki Mai, Espinoza J. Luis, Kumode Takahiro, Tanimura Akira, Yokota Takafumi, Oritani Kenji, Watanabe Toshio, Kanakura Yuzuru, Matsumura Itaru	4. 巻 11
2. 論文標題 Chlorpromazine eliminates acute myeloid leukemia cells by perturbing subcellular localization of FLT3-ITD and KIT-D816V	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-17666-8	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 Nakaya Aya, Kansai Myeloma Forum Investigators, Tanaka Hirokazu, Matsumura Itaru, et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 Retrospective analysis of plasmacytoma in Kansai Myeloma Forum Registry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 666 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02961-3	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 Taniguchi Yasuhiro, Takahashi Naoto, Miura Masatomo, Hirase Chikara, Sueda Sanae, Espinoza Jorge Luis, Rai Shinya, Nakayama Shoko, Serizawa Kentaro, Kumode Takahiro, Watatani Yosaku, Morita Yasuyoshi, Tanaka Hirokazu, Matsumura Itaru	4. 巻 59
2. 論文標題 The Impact of Hemodialysis and Liver Cirrhosis on the Plasma Concentrations of Tyrosine Kinase Inhibitors in a Patient with Chronic Myeloid Leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2745 ~ 2749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.4871-20	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 Inoue Hiroaki, Rai Shinya, Tanaka Hirokazu, Espinoza J. Luis, Watatani Yosaku, Kumode Takahiro, Serizawa Kentaro, Nakayama Shoko, Taniguchi Yasuhiro, Morita Yasuyoshi, Tatsumi Yoichi, Ashida Takashi, Matsumura Itaru	4. 巻 191
2. 論文標題 Tumour immune microenvironment in duodenal type follicular lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bjh.16715	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 Tanaka Hirokazu	4. 巻 111
2. 論文標題 Introduction by the Guest Editor: Recent advances in biology and treatment of multiple myeloma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 494 ~ 495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02830-z	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 Inoue Hiroaki, Rai Shinya, Tanaka Hirokazu, Espinoza J. Luis, Komori-Inoue Maiko, Kakutani Hiroaki, Minamoto Shuji, Kumode Takahiro, Nakayama Shoko, Taniguchi Yasuhiro, Morita Yasuyoshi, Okuda Takeshi, Tatsumi Yoichi, Ashida Takashi, Matsumura Itaru	4. 巻 12
2. 論文標題 Epstein Barr Virus-Induced Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder of the Central Nervous System Successfully Treated with Chemo-Immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 416 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v12040416	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷口康博、平瀬主税、芦田隆司、波江野高大、角谷 宏明、源 周治、綿谷 陽作、口分田貴裕、芹澤憲太郎、頼 晋也、森田 泰慶、田中宏和、辰巳 陽一、松村 到
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植におけるレテルモビルの有用性の検討
3. 学会等名 第43回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中宏和
2. 発表標題 腫瘍起源からみた多発性骨髄腫の病態と治療
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020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
研究分担者	松村 到 (Matsumura Itaru) (00294083)	近畿大学・医学部・教授 (34419)	

6. 研究組織（つづき）

	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	頼 晋也 (Rai Shinya) (70460855)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	
研究分担者	森田 泰慶 (Morita Yasuyoshi) (80411594)	近畿大学・医学部・准教授 (34419)	

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