

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15487

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫におけるインテグリン 7の恒常的活性化を惹き起こす分子の同定

研究課題名(英文) Identification of molecules to induce the constitutive activation of Integrin beta7 in multiple myeloma

研究代表者

長谷川 加奈 (Hasegawa, Kana)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：20777370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：がんの免疫療法の一つであるキメラ抗原受容体-T細胞療法(CAR-T細胞療法)の開発のためには、がん特異的抗原を認識するモノクローナル抗体が必要である。我々は、以前に単離した多発性骨髄腫特異的抗体R8H283について、その骨髄腫特異性の原因を明らかにした。さらに、R8H283が肺がんに対してもがん特異的結合を示すことを明らかにした上で、R8H283を元に作製したCAR-T細胞が肺がん細胞に対して抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。R8H283は正常血液細胞および非血液系組織には結合しないため、R8H283由来CAR-T細胞は肺がんに対する新規治療になり得る可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キメラ抗原受容体-T細胞療法(CAR-T細胞療法)は、血液がんに対して効果を発揮している一方で、固形がんに対してはその開発に未だ成功していない。その理由の一つに、がんの特異性の高い細胞表面抗原の欠如がある。我々は、独自に単離した多発性骨髄腫特異的抗体R8H283の骨髄腫特異性の原因を明らかにした上で、1) R8H283が肺がんに対してもがん特異的結合を示すこと、2) R8H283を元に作製したCAR-T細胞が肺がん細胞に対して抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。これらの結果は、R8H283が認識する抗原が肺がんに対するCAR-T細胞療法の新たな治療標的となり得る可能性があることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel chimeric antigen receptor (CAR)-T cell therapy, a monoclonal antibody (mAb) binding to an antigen specifically expressed in cancer cells is needed. We found that a novel anti-CD98 heavy chain (hc) mAb, R8H283, we previously identified, specifically bound to multiple myeloma (MM) cells due to the difference of N-glycosylation expressed in CD98hc protein between MM cells and normal hematopoietic cells. In addition, R8H283 bound to lung cancer cells but not to normal lung epithelial cells derived from a part of lung cancer patients. CAR-T cells generated from R8H283 demonstrated anti-lung cancer efficacy in mouse model. We had clarified that R8H283 binding was not detected in normal non-hematopoietic tissues expressing CD98hc protein. These results showed that R8H283-derived CAR-T cells were promising as a novel therapy for patients of lung cancer.

研究分野：がん免疫

キーワード：CAR-T細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、抗体療法や CAR-T 細胞療法などのがん免疫療法の治療標的となる多発性骨髄腫特異的抗原の探索を目的とし、骨髄腫細胞に結合するモノクローナル抗体を 1 万クローン以上自作した。その中から、正常血液細胞には結合せずに骨髄腫細胞にのみ特異的に結合する抗体として MMG49 という抗体を単離した。その後の解析により、1) MMG49 抗体は、インテグリン β 7 の活性型構造を特異的に認識すること、さらに、2) 骨髄腫細胞においてはインテグリン β 7 が恒常的に活性化していることを見出した。骨髄腫におけるインテグリン β 7 の恒常的な活性化はその病態形成に関与している可能性があるが、そのメカニズムおよびその意義については未だに明らかになっていなかった。そこで、骨髄腫におけるインテグリン β 7 の恒常的活性化の原因となっている分子の同定とその経路を明らかにすることを目的とした。さらに、その機能的意義を明らかにし、骨髄腫の病態形成に関与しているのかを解析することで治療標的となり得る分子の同定を目指すことにした。

さらに、我々は上記のモノクローナル抗体スクリーニングにおいて、MMG49 以外にもう一つの多発性骨髄腫特異的抗体である R8H283 という抗体を単離していた。R8H283 は、CD98 heavy chain (hc) を特異的に認識することは分かっていたが、どうして R8H283 が広汎に発現するタンパク質である CD98hc を認識するにもかかわらず、骨髄腫に特異的に結合するのかという点については不明であった。R8H283 が正常血球のみならず、CD98hc タンパクを発現する皮膚や大腸などの非血液系の正常組織には結合しないことは、既に検討され実証されていた。それだけではなく、R8H283 が骨髄腫以外に肺がんなどの固形がんにも結合することが予備的検討により明らかとなっており、骨髄腫のみならず他のがんに対しても、R8H283 を応用した CAR-T 細胞の開発が期待できた。そのためにも、R8H283 のがん特異性のメカニズムを明らかにすることは重要な課題であった。

2. 研究の目的

目的 1：多発性骨髄腫におけるインテグリン β 7 の恒常的活性化を惹き起こす分子の同定

目的 2：多発性骨髄腫特異的抗体である R8H283 の骨髄腫特異性のメカニズムの解明

目的 3：肺がんに対する R8H283 由来 CAR-T 細胞の開発

3. 研究の方法

目的 1：多発性骨髄腫におけるインテグリン β 7 の恒常的活性化を惹き起こす分子の同定

初めに、MMG49 抗体が結合する骨髄腫細胞株 MM.1S に Cas9 タンパクを発現させた細胞を作製する。そして、CRISPR gRNA library を遺伝子導入し、一細胞あたり一遺伝子をランダムにノックアウトさせた細胞を作製する。次に、それらの細胞を増やし、既存の抗インテグリン β 7 抗体および MMG49 抗体で染色し、インテグリン β 7 タンパク自体の発現は維持されているが非活性型になったインテグリン β 7 を発現している、即ち、既存の抗インテグリン β 7 抗体では陽性に染まるが、MMG49 抗体には染まらなくなった細胞分画をセルソーターで回収する。そして、NGS 解析を行い、それらの細胞に高い頻度で発現している gRNA を同定することで、骨髄腫におけるインテグリン β 7 の恒常的活性化を惹き起こしている候補分子を同定する。

目的 2：多発性骨髄腫特異的抗体である R8H283 の骨髄腫特異性のメカニズムの解明

骨髄腫細胞および正常血液細胞の全細胞タンパク溶解液の SDS-PAGE と、抗 CD98hc ポリクローナル抗体によるウェスタンブロッティングを行い、電気泳動度を解析する。さらに、それらを N 型糖鎖の糖鎖切断酵素で処理した場合に電気泳動度がどのように変化するかを解析し、それぞれに細胞に発現する CD98hc の糖鎖修飾の度合いを比較する。また、N 型糖鎖伸長に必要な GnTI 遺伝子を欠損し、ハイマンノース型と呼ばれる未熟な N 型糖鎖を発現する細胞を用いて、野生型と比較して R8H283 の結合が変化するか、フローサイトメトリーにより解析する。

目的 3：肺がんに対する R8H283 由来 CAR-T 細胞の開発

まず、肺がん患者の手術検体を用いて、肺がん細胞および、その周囲の正常部位から正常肺胞上皮細胞を分離して採取する。そして R8H283 で染色し、R8H283 ががん特異的に結合するのかをフローサイトメトリーにより解析する。もし、R8H283 ががん特異的結合性を示せば、R8H283 を元に CAR-T 細胞を作製し (“R8H283 CAR-T 細胞” とする)、肺がん細胞を傷害できるのかを in vitro の細胞傷害試験を行い検討する。さらに、免疫不全マウスにヒト肺がん細胞を移植した後、R8H283 CAR-T 細胞を移入し、抗腫瘍効果を示すのかを検討する。

4. 研究成果

目的 1：多発性骨髄腫におけるインテグリン β 7 の恒常的活性化を惹き起こす分子の同定

上記の方法でソーティングにより回収した細胞分画の NGS 解析を行った結果、様々な遺伝子に対する gRNA が検出された一方で、想定していたような候補分子の同定には至らなかった。例えば、インテグリン $\beta 7$ の恒常的活性化が骨髄腫の病態形成に関与しているのであれば、骨髄微小環境でのストローマ細胞などへの接着を促す経路に関わる分子などで、遺伝子の転写調節に関わる分子や、他のタンパク（例えば talin など）との会合を介して機能を発揮すると予想される分子などを想定していた。今後は、スクリーニング系を見直し再度実施する予定である。

目的 2 : 多発性骨髄腫特異的抗体である R8H283 の骨髄腫特異性のメカニズムの解明

骨髄腫細胞および正常血液細胞の全細胞タンパク溶解液の SDS-PAGE を行い、抗 CD98hc ポリクローナル抗体でウェスタンブロッティングを行ったところ、両者において CD98hc タンパクの電気泳動度が異なることが分かった。一方で、N 型糖鎖切断酵素である PNGase という薬剤で処理した後では、両者の CD98hc タンパクの電気泳動度が同じになることから、骨髄腫細胞および正常血液細胞では発現している CD98hc glycoform が異なることを見出した。さらに、N 型糖鎖伸長に必要な GnTI 遺伝子欠損細胞を用いて R8H283 の結合をフローサイトメトリー解析により検討したところ、既存の抗 CD98hc 抗体の結合強度はほとんど変化しない一方で、R8H283 の結合は野生型に比べて GnTI 欠損細胞で上昇した (図 1)。これらの結果より、骨髄腫細胞と正常血液細胞に発現する CD98hc の糖鎖修飾の違いが R8H283 の骨髄腫特異性の原因となっている可能性を示した (Hasegawa et al. Science Translational Medicine, 2022) (図 2)。

目的 3 : 肺がんに対する R8H283 由来 CAR-T 細胞の開発

肺がん患者の手術切除検体を用いて、R8H283 の肺がんにおけるがん特異性を検討したところ、肺がん細胞には、一部の症例ではあるが R8H283 の結合が見られた一方で、正常部位から採取した正常肺胞上皮細胞には全く結合しなかった。そこで、R8H283 を元に CAR-T 細胞を作製した。R8H283 CAR-T 細胞は in vitro において、肺がん細胞株に対して抗原特異的に細胞傷害活性を示した。さらに、in vivo において、免疫不全マウスに移植した肺がん細胞に対して著明な抗腫瘍効果を示した (図 3)。これらの結果は、R8H283 CAR-T 細胞を肺がんに対する新たな治療に応用できる可能性があることを示している。

骨髄腫細胞と正常血液細胞の間の CD98hc の N 型糖鎖修飾の違いが R8H283 の骨髄腫特異性の原因となっている可能性がある

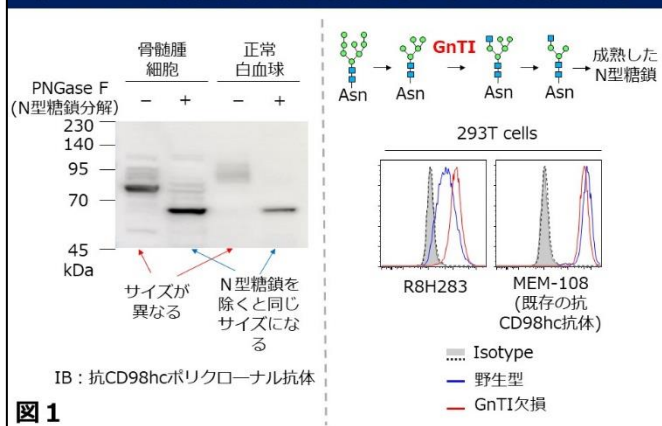


図 1 (左) 骨髄腫細胞および正常血液細胞の全細胞タンパク溶解液の抗 CD98hc ポリクローナル抗体によるウェスタンブロッティング (右) GnTI 遺伝子欠損細胞に対する R8H283 および既存の抗 CD98hc 抗体の結合のフローサイトメトリー解析

と、両者において CD98hc タンパクの電気泳動度が

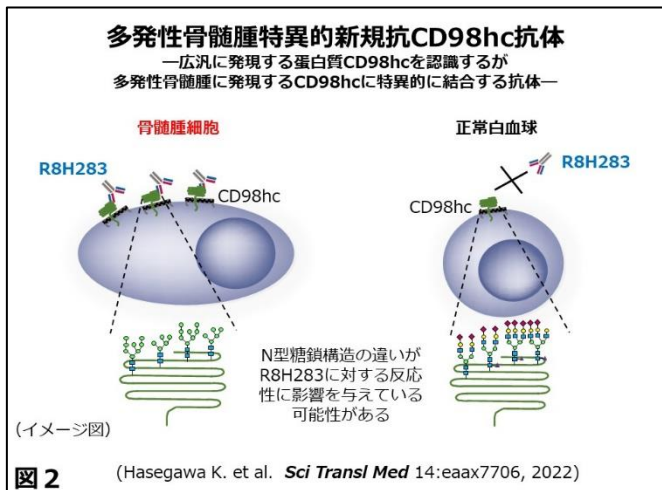


図 2 骨髄腫特異的新規抗 CD98hc 抗体 R8H283 の骨髄腫特異性のメカニズムを示したシェーマ

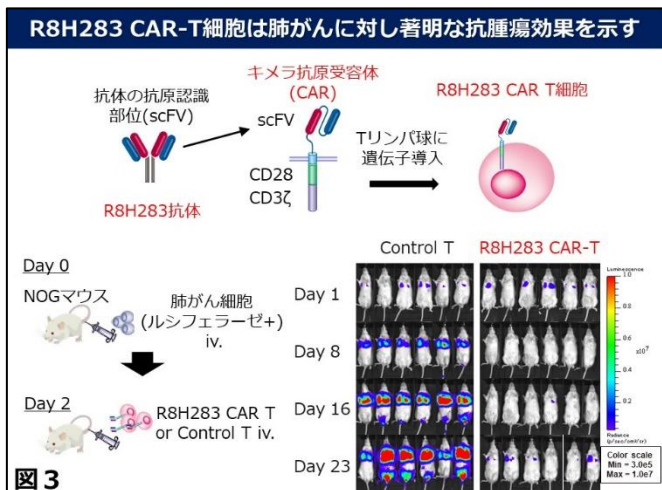


図 3 “R8H283 CAR-T 細胞” と in vivo 実験のシェーマ、および R8H283 CAR-T 細胞の抗腫瘍効果を検討したマウスの IVIS 写真

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 長谷川加奈、池田峻也、矢賀元、（間省略）、保仙直毅	4. 巻 14
2. 論文標題 Selective targeting of multiple myeloma cells with a monoclonal antibody recognizing the ubiquitously protein CD98 heavy chain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	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） 10.1126/scitranslmed.aax7706	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0件

〔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
---------	---------