

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15567

研究課題名（和文）変異型CCR4の分子動態の解明に基づく抗CCR4抗体治療法の革新

研究課題名（英文）Innovations in anti-CCR4 antibody therapy based on elucidation of molecular dynamics of CCR4 mutants

研究代表者

平松 寛明（Hiramatsu, Hiroaki）

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：70827253

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ATLL患者におけるモガムリズマブ投与前後の遺伝子変異の解析を行った。治療前に約30%の症例で生じているC末端欠損型CCR4がリガンド依存的に抗アポトーシスシグナルを伝達していることを見出し、C末端欠損型CCR4と特異的に結合している可能性のあるタンパク質を複数同定した。モガムリズマブ治療中に抵抗性が生じたATLL患者において、治療後にのみCCR4遺伝子変異が生じていることを見出した。その中で、膜貫通領域に変異を持つCCR4は、CCR4と結合する小分子化合物の添加により細胞表面の発現と、モガムリズマブの細胞傷害活性を回復させられたことから、今後の併用薬としての可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、CCR4のC末端欠損変異は、正常T細胞に対しても生存に対する優位性を付与することのできる細胞内シグナルを生じさせている可能性が示された。この結果は、ATLLの発症にかかわるシグナルの一端の解明に寄与するものである。また、モガムリズマブ耐性にかかわるCCR4遺伝子変異の耐性化の機序と、それを克服できる可能性のある小分子化合物を発見した。この成果は、将来のモガムリズマブとの併用薬の開発につながることを期待され、ATLL治療法の改善に資する成果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, I analyzed genetic mutations in ATLL patients before and after treatment with mogamulizumab. C-terminal deletion mutant of CCR4, which is observed in around 30% of ATLL patients, was found to induce ligand-dependent anti-apoptotic signals, and several proteins were identified that may bind to CCR4 of C-terminal deletion mutant specifically. Analysis using pre- and post-treatment PBMCs from ATLL patients who acquired resistance during Mogamulizumab treatment revealed that CCR4 mutations associated with resistance occurred only after treatment. Among them, CCR4 with mutations in transmembrane regions could be localized to the cell surface by adding a small molecule compound that binds to CCR4, restoring the cytotoxic activity of Mogamulizumab, indicating its potential as a future combinatorial drug.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：ATLL CCR4 モガムリズマブ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体、モガムリズマブは、日本発の抗体医薬であり、T 細胞リンパ腫の治療薬として世界中で使用されている。近年、成人 T 細胞性白血病リンパ腫 (ATLL) 患者のうち、治療開始前に腫瘍細胞の CCR4 遺伝子に C 末端欠損変異が生じている約 30% の症例では、モガムリズマブ治療による 5 年生存率が 72.7% に達することが報告された。この成績は、ATLL 患者が長期生存を得るのに最も実績を有する治療法である、同種造血幹細胞移植に匹敵、あるいは凌駕するものであった。また、同様の変異は、菌状息肉症 (MF)、セザリー症候群 (SS) においても約 7% の症例で認められることが報告されていた。

2. 研究の目的

C 末端欠損型 CCR4 が T 細胞リンパ腫の悪化と、モガムリズマブ感受性をもたらす機序の解明を当初の目的として実験を開始した。この機序を解明することは ATLL に対するモガムリズマブ治療法の革新に繋がる可能性があると考えた。また、モガムリズマブを用いた治療では、一部の患者で抵抗性を獲得することが知られていたため、感受性にかかわる機序と合わせて抵抗性にかかわる機序の解析を行うことは、治療効果の改善に繋がる追加の知見が得られるだけに留まらない相乗効果が期待できると考えた。

3. 研究の方法

- (1) 変異型 CCR4 発現レンチウイルスベクターを用いて、ATLL 細胞株等に遺伝子導入を行い、恒常発現株を作製する。
- (2) CellTiter-Glo アッセイにより、細胞数の変化を観察する。
- (3) フローサイトメトリー法や免疫蛍光染色法を用いて CCR4 の局在や、発現量を比較する。
- (4) 近位依存型非特異的ピオチン化酵素 (TurboID) を融合した CCR4 を用いて、相互作用している可能性のあるタンパク質をラベリングし、質量分析法により結合している可能性のある候補タンパク質を同定する。
- (5) BiT アッセイにより、細胞内のタンパク質間相互作用を検出する。
- (6) ADCC により細胞傷害活性を測定する

4. 研究成果

(1) ATLL 患者で高頻度に生じる CCR4 の C 末端欠損遺伝子変異は、ATLL の増殖、生存において有利に働いていると考えられる。初めに、CCR4 遺伝子変異を持たない ATLL 由来の様々な細胞株にレンチウイルスベクターを用いて野生型、および C 末端欠損変異型 CCR4 を遺伝子導入し、生細胞数を CellTiter-Glo アッセイで測定した。しかしながら、リガンドの有無にかかわらず、空ベクター、または野生型 CCR4 を発現させた場合と比較して有意な差は認められなかった。ATLL 細胞株は元々増殖速度が速いため、差が出にくかったことが一因と考えられた。そこで、健康人末梢血単核細胞 (PBMC) から CD4 陽性細胞を分離し、同様に遺伝子導入して、低密度条件で培養し、CellTiter-Glo アッセイを行った。その結果、時間経過と共に細胞数が減ってはいくものの、リガンドである CCL22 を加えた条件では有意に減少速度が遅く、C 末端欠損変異型 CCR4 を遺伝子導入した細胞に CCL22 を加えた条件では最も生存率が良いという結果が得られた (図 1)。このことから、CCR4 はリガンド依存的に細胞内に抗アポトーシスシグナルを伝達していることが示唆された。

CCR4 の C 末端はリガンド依存的内在化にかかわっており、C 末端欠損型 CCR4 はリガンドが結合しても内在化がほとんど起こらず細胞表面に留まる。この細胞内動態の異常が異常な細胞生存シグナルの活性化の原因ではないかと考え、C 末端欠損型 CCR4 と正常 CCR4 で異なっているタンパク質間相互作用について解析を行った。CCR4 の C 末端欠損遺伝子変異を持つ ATLL 由来細胞株 ED-40515 (+) 細胞を用いて、近位依存性ピオチン標識によるタンパク質相互作用解析を行った。ED-40515 (+) 細胞に、野生型、C 末端欠損型それぞれの CCR4 の C 末端に TurboID を融合したタンパク質を発現させ、リガンドである CCL22 の存在、非存在下において相互作用しているタンパク質を網羅的にピオチン化し、質量分析による同定を行った。その結果、C 末端欠損型 CCR4 特異的に結合している可能性のあるタンパク質が複数同定された。その中でまず、RhoA に着目し、解析を行った。RhoA は Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の 1 つであり、ATLL において約 8% の症例で活性化変異が生じていることが報告されている。野生型、または C 末端欠損型 CCR4 の C 末端に LgBiT を融合したタンパク質と、RhoA、または CDC42 (結合のポジティブコントロール) の N 末端、または C 末端に SmBiT を融合したタンパク質を共発現させて、NanoBiT assay を行い、細胞内での相互作用について確認を行った。その結果、RhoA は野生型、C 末端欠損型のどちらにも、リガンド非依存的に結合することが分かった (図 2)。リガンド依存的な RhoA の活性化状態の変化についても検討を行ったが、野生型、C 末端欠損型 CCR4 の発現による違いは認められなかった。今後、その他の候補タンパク質についての更なる解析により、C 末端欠損型 CCR4 特異的なシグナル経路にかかわるタ

ンパク質間相互作用が明らかになることが期待される。

図1 CellTiter-Glo アッセイによる生細胞数の経時変化

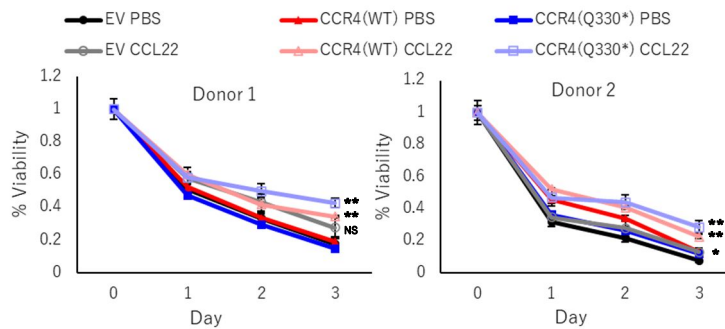
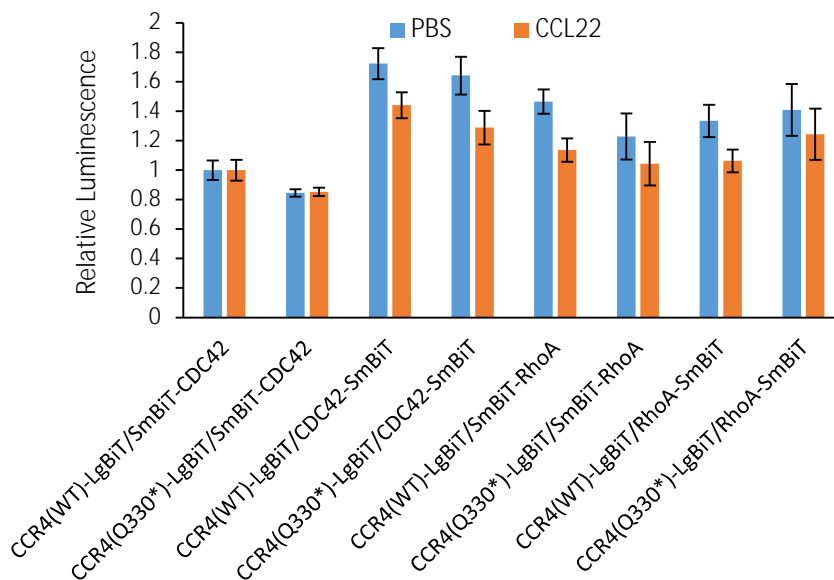


図2 BiT アッセイによるタンパク質相互作用の検出



(2) モガムリズマブ治療中に抵抗性が生じた2名のATLL患者の、モガムリズマブ治療前後のPBMCを用いたWhole Exome Sequence (WES) とRNA-seqデータ解析により、治療後のみ1アミノ酸の違いが生じる*CCR4*遺伝子変異がそれぞれのアレルに生じていることを見出した。1名の変異部位はモガムリズマブのエピトープ領域、および、第一膜貫通領域で、もう1名の変異部位は第七膜貫通領域であった。後者の患者検体を用いてWhole Genome Sequence (WGS)を行ったところ、ヘテロ接合性の喪失(LOH)が生じていた。これらの*CCR4*遺伝子変異はモガムリズマブ治療抵抗性と直接的にかかわっていると考えられるため、変異型*CCR4*を発現するレンチウイルスベクターを作製し*CCR4*陰性細胞株であるJurkatとHEK293細胞に遺伝子導入して解析を行った。フローサイトメトリー解析の結果、エピトープ領域に変異を持つ*CCR4*は、モガムリズマブは結合できなくなっていたが、別の抗*CCR4*抗体(クローン205410)では検出できたことから、細胞表面には局在しているもののモガムリズマブとの結合能を喪失していることが分かった(図3)。第一、第七膜貫通領域に変異を持つ*CCR4*は、細胞膜上に発現することはできなくなっていたが、細胞内には存在していた(図4)。これらの変異体について免疫蛍光染色を行ったところ、どちらも小胞体にとどまっていることが確認できた(図5)。さらに、シクロヘキサミドチェイスアッセイを行った結果、膜貫通領域に変異のある*CCR4*は不良タンパク質としてプロテアソームで分解されていることが分かった(図6)。そこで、*CCR4*と結合する小分子化合物が薬理学シャペロンとして働くのではないかと考え、いくつかの化合物について検討したところ、変異型*CCR4*の細胞表面の発現とモガムリズマブの細胞傷害活性を回復させることのできる化合物を発見した(図7, 8)。

本研究により、モガムリズマブ治療中にモガムリズマブの標的である*CCR4*遺伝子変異が両アレルに生じて、モガムリズマブがATLL細胞と結合できなくなり、ADCC活性による効果が得られなくなる、という抵抗性の獲得機序が解明できた。治療抵抗性が*CCR4*の1アミノ酸違

いの変異だけでなく LOH によっても生じていたことから、抵抗性の原因を同定するにはフローサイトメトリー解析や RNA-seq だけでは十分でなく、複数の方法を組み合わせる必要があることが示唆された。また、このような変異を誘発しないためには、モガムリズマブだけではなく他の治療法を組み合わせることが重要であると考えられ、ATLL に対する新たな治療法開発の必要性が再確認された。一方で、膜貫通領域の変異では小分子化合物が薬理学シャペロンとして働く可能性があることが見いだされたため、今後の併用薬としての可能性が示されたことは、本研究の大きな成果である。

図 3 フローサイトメトリーアッセイによる CCR4 の変異体 (モガムリズマブのエピトープ領域) の発現解析

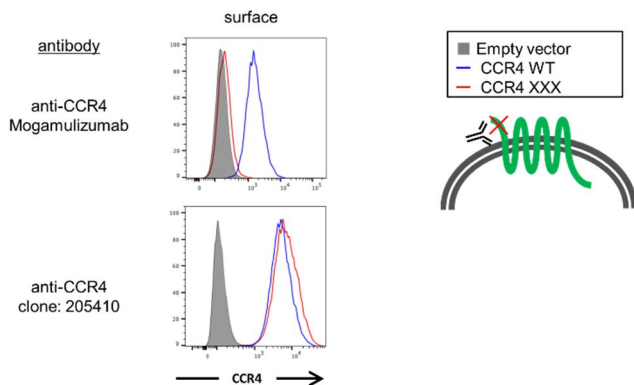


図 4 フローサイトメトリーアッセイによる CCR4 の変異体 (膜貫通領域) の発現解析

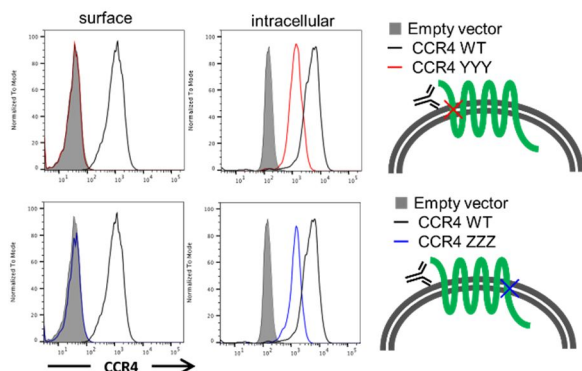


図 5 免疫蛍光染色による CCR4 の変異体 (膜貫通領域) の発現解析

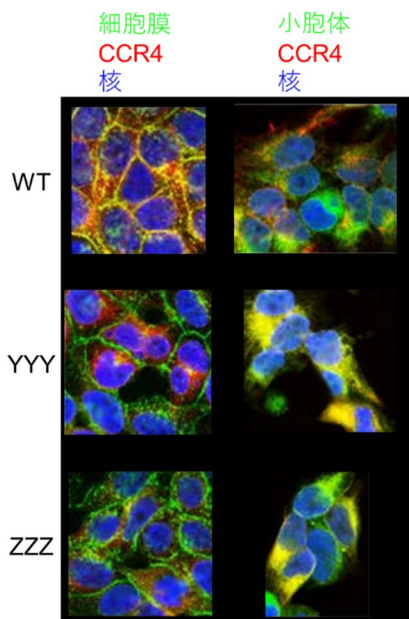


図 6 シクロヘキシミドチェイスアッセイによる CCR4 の変異体 (膜貫通領域) の分解経路の同定

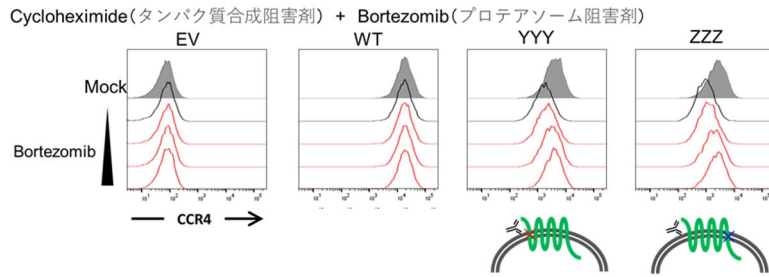


図 7 CCR4 と結合する小分子化合物 DrugX による CCR4 の変異体 (膜貫通領域) の細胞表面への発現回復

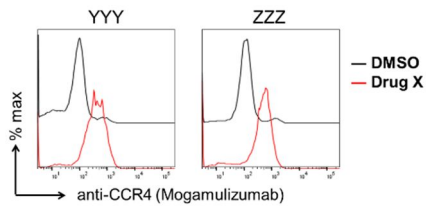
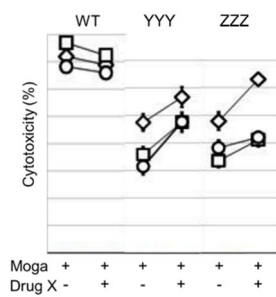


図 8 CCR4 と結合する小分子化合物 DrugX による CCR4 の変異体 (膜貫通領域) 発現細胞へのモガムリズマブの細胞傷害活性の回復



5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Hiramatsu H, Yokomori R, Shengyi L, Tanaka N, Mori S, Kiyotani K, Gotoh O, Kusumoto S, Nakano N, Suehiro Y, Ito A, Choi I, Ohtsuka E, Hidaka M, Nosaka K, Yoshimitsu M, Imaizumi Y, Iida S, Utsunomiya A, Noda T, Nishikawa H, Ueda R, Sanda T, Ishida T | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Clinical landscape of TP73 structural variants in ATL patients | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Leukemia | 6. 最初と最後の頁 2502 ~ 2506 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-023-02059-9 | 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 該当する |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Hiramatsu H, Nosaka K, Kusumoto S, Nakano N, Choi I, Yoshimitsu M, Imaizumi Y, Hidaka M, Sasaki H, Makiyama J, Ohtsuka E, Jo T, Ogata M, Ito A, Yonekura K, Tatetsu H, Kato T, Kawakita T, Suehiro Y, Ishitsuka K, Iida S, Matsutani T, Nishikawa H, Utsunomiya A, Ueda R, Ishida T | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 Landscape of immunoglobulin heavy chain gene class switch recombination in patients with adult T-cell leukemia-lymphoma | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Haematologica | 6. 最初と最後の頁 1173 ~ 1178 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2022.281435 | 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|