

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591372

研究課題名(和文) レプチンが骨髄腫の病因に及ぼす役割

研究課題名(英文) Role of leptin in the pathogenesis of multiple myeloma

研究代表者

林 麗君 (Lam, Lai Kwan Queenie)

東京大学・医科学研究所・客員研究員

研究者番号：20599261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：我々はレプチンの炎症性サイトカインとしての側面に着目し、レプチンがマウス骨髄微小環境下において骨髄腫細胞の増殖に関与する可能性を示した。さらにヒト多発性骨髄腫におけるレプチンの病勢への関与の解明を目指したが骨髄穿刺の侵襲性から困難を伴い、より容易に入手可能で臨床応用上も優れた免疫細胞ソースである臍帯血の利用を模索した。我々は臍帯血から細胞傷害性T細胞(CTL)を分離培養し、ビーズ表面に免疫関連分子を結合させた人工抗原提示細胞(aAPC)と反応させることにより、HLA拘束性に血液腫瘍抗原特異性を効率的に誘導した。この手法は多発性骨髄腫のみならず血液悪性諸疾患の新規治療戦略となりうるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have focused on immunological aspect of leptin as a proinflammatory cytokine, and clarified the possible role of leptin on survival of murine myeloma cells with consideration of the bone marrow microenvironment. We further aimed to explore the role of leptin in the pathogenesis of human multiple myeloma, however difficulties associated with invasiveness of bone marrow aspiration obliged us to explore clinical use of umbilical cord blood as available and prominent source of immune cells alternatively. We have successfully isolated and expanded cytotoxic T lymphocytes(CTLs) from umbilical cord blood, as well as induced their HLA-restricted hematological tumor antigen specificity using beads coated with immunological molecules as artificial antigen presenting cells(aAPCs). This new method could potentially be applied clinically as new therapeutic strategy for not only multiple myeloma but also other hematological malignancies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血液腫瘍学 骨髄腫 レプチン 臍帯血 細胞傷害性T細胞

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は白血病・悪性リンパ腫と並んで三大血液悪性疾患の一角をなしている。免疫の一翼を担うB細胞は、最終分化して形質細胞となり、抗体と呼ばれる免疫グロブリン分子を産生するようになるが、この形質細胞が悪性化して単クローン性に増殖することによって引き起こされる難治性疾患が多発性骨髄腫である。世界における多発性骨髄腫の患者数は約 750,000 人(国際骨髄腫財団)にのぼるとも推測されており、日本における多発性骨髄腫の総患者数は約 14,000 人(平成 23 年厚生労働省統計)とされている。近年の多発性骨髄腫治療の進歩には目覚ましいものがあり、プロテアソーム阻害薬であるボルテゾミブや免疫調節薬であるサリドマイド・レナリドミド等の新薬の登場により治療の選択肢は大きく広がった。しかし高齢者に多い疾患のため造血幹細胞移植の適応も限られており、化学療法では一時的に病状をコントロールすることはできても薬剤耐性の進行等により寛解・根治には至らず、多くの患者が骨融解病変の重い症状に苦しめられているのが現状である。

多発性骨髄腫の病因に関しては、第 14 番染色体上の免疫グロブリン領域の転座によるサイクリン D 群、MAF 群、FGFR3、MMSET 等の遺伝子の脱制御が発症と関連づけられている(Hideshima T, Anderson KC, et al. *Nature Rev.* 2007;7:585-98)。また形質細胞の分化におけるマスター制御因子とされる転写抑制因子 Blimp-1 の発症への関与も報告されている(D'Costa K, Corcoran LM, et al. *Blood.* 2009;113:5911-9)。このような遺伝子発現制御異常等によって生じた骨髄腫細胞が、骨髄間質細胞と相互作用することによってサイトカイン分泌や表面分子発現が誘導されて骨髄腫細胞の増殖や移動や化学療法への耐性が促進され、さらには破骨細胞活性化や血管新生が引き起こされる。骨髄腫細胞の増殖を促進して病態の進展に関与するサイトカインとしては、IL-6、IL-1、SDF-1、IGF-1、BAFF、APRIL 等が報告されている(Chauhan D, Anderson KC, et al. *Int J Hematol.* 2003;78:114-20)。このように、骨髄腫細胞が化学療法に耐性を示して生存する背景には、骨髄微小環境から提供されるニッチが深く関わっていることが多くの知見から示唆されている。骨髄腫細胞及び骨髄間質細胞の双方に作用するボルテゾミブやサリドマイド・レナリドミド等の新薬を組み入れた新しい化学療法が治療効果を改善してはいるものの、例えば多発性骨髄腫患者由来の骨髄間質細胞が骨髄腫細胞にボルテゾミブ耐性を示す NF- κ B 活性を誘導したこと等も報告されており(Markovina S, Miyamoto S, et al. *Mol Cancer.* 2010;9:176)、骨髄微小環境のさらなる探究が、化学療法への耐性の克服のために不可欠と考えられる。

脂肪組織の脂肪細胞から分泌され食欲を抑制するホルモンとして見出されたレプチンは、近年になって、骨髄間質の脂肪細胞からも分泌され(Laharrague P, Castella L, et al. *FASEB J.* 1998;12:747-52)、多様な免疫細胞を活性化させる重要な炎症性サイトカインの働きを併せ持つことが明らかとなってきた(Lam QL, Lu L. *Cell Mol Immunol.* 2007;4:1-13)。筆者らはこれまでにレプチンの免疫におけるサイトカインとしての側面に着目し、レプチンが樹状細胞において Akt を介するシグナル経路を活性化させて機能制御に関わっていることや(Lam QL, Lu L, et al. *J Biol Chem.* 2007;282:27587-97)、レプチンが NK 細胞においてアポトーシスを抑制し分化制御に関わっていることを報告したが(Lo CK, Lam QL, Lu L, et al. *Cell Mol Immunol.* 2009;6:353-60)、さらに B 細胞においてもレプチンが STAT3、Akt、NF- κ B 経路を活性化して Bcl-2 及びサイクリン D1 遺伝子発現を誘導し生存を促進することを示した(Lam QL, Lu L, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:13812-7)。このことは、多発性骨髄腫の病態におけるレプチンの関与の可能性を想起させるものであり、実際骨髄腫細胞がレプチン及びレプチン受容体を発現していることも報告されている(Mouzaki A, Georgakopoulos T, et al. *Cytokine.* 2009;48:203-11)。レプチンは IL-6、IL-11、CNTF、LIF 等と同じく 4 本の α 鎖構造が束になった 4 ヘリックスバンドル型サイトカインファミリーに属し、レプチン受容体は IL-6 型サイトカイン受容体のシグナル伝達分子 gp-130 と高い相同性を有している(Tartaglia LA, Tepper RI, et al. *Cell.* 1995;83:1263-71)。形質細胞の分化に不可欠な IL-6 と類似構造を持つレプチンは骨髄微小環境において豊富に供給されており、これまで筆者らが明らかにした B 細胞機能に与える作用も鑑みると、レプチンが化学療法に耐性を示す骨髄腫細胞の生存に関わっている可能性は高く、新たな治療戦略の標的となりうるものと考えられた。

他方においては、多発性骨髄腫の新たな治療として、細胞免疫療法も試みられている。大阪大学では血液悪性腫瘍細胞に広く発現している癌抗原 WT1 を用いたペプチドワクチン療法が施行されており、多発性骨髄腫にも適応されている(Tsuboi A, Sugiyama H, et al. *Int J Hematol.* 2007; 86: 414-7)。東京大学医科学研究所ではこれまで悪性黒色腫に対する樹状細胞療法等を先駆的に行ってきたおり(Nagayama H, Sato K, Yamashita N, et al. *Melanoma Res.* 2003; 13:521-30)、今後の多発性骨髄腫に対する細胞免疫学的治療も視野に入れ、WT1 やその他多発性骨髄腫に特異的に発現がみられるペプチド抗原を標的とした細胞傷害性 T 細胞(CTL)等を利用した免疫細胞療法の開発が検討された。なお、研究開始当初から 3 年が経

過した現時点においては、多発性骨髄腫の新規治療として WT1 特異的 CTL の役割が支持されるに至っており (Tyler MT, Koehne G, et al. *Blood*. 2013;121:308-317)、さらに WT1 に限らず、多発性骨髄腫の抗原ペプチドの探索も精力的に行われている (Bae J, Munshi NC, et al. *Clin Cancer Res*. 2012;18:4850-60) ことを追記しておく。

2. 研究の目的

(1) レプチンの多発性骨髄腫の病因に及ぼす影響の探索

野生型マウス骨髄及びマウス骨髄腫細胞株を用いて、レプチンがマウス形質細胞及びマウス骨髄腫細胞に及ぼす作用について探索を行う。さらに、マウス骨髄間質細胞とマウス骨髄腫細胞の相互作用へのレプチンの関与について探索を行う。

続いて、健常人及び多発性骨髄腫患者の骨髄サンプルを用いて、レプチンがヒト形質細胞及びヒト骨髄腫細胞に及ぼす作用について探索を行う。さらに、ヒト骨髄間質細胞とヒト骨髄腫細胞の相互作用へのレプチンの関与について探索を行う。

(2) 臍帯血由来リンパ球からの WT1 特異的 CTL の誘導

ヒト凍結臍帯血より CD8 陽性 T リンパ球を精製し、多発性骨髄腫治療に応用されうる WT1 ペプチド特異的 CTL を効率的に誘導する方法を開発する。

以上のような異なる二方向からのアプローチで、多発性骨髄腫の新規免疫細胞療法に資することを最終的な目標とした。

3. 研究の方法

(1) レプチンの多発性骨髄腫の病因に及ぼす影響の探索

野生型マウス及びレプチン受容体を欠損する *dbl/db* マウスの骨髄由来形質細胞を用いて IgG に関する ELISPOT アッセイを行った。マウス骨髄腫細胞株 P3X 及び J558 をレプチン存在下で培養し、³H-チミジンの取り込みによる増殖の評価を行った。野生型マウス骨髄由来形質細胞にレプチンを作用させて、RT-PCR 法により Blimp-1 の遺伝子発現レベルを検討した。一方で野生型マウス骨髄由来間質細胞表面のレプチン受容体の発現を FACS 解析にて確認した。さらに野生型マウス骨髄由来間質細胞にレプチンを作用させて、RT-PCR 法により IL-6、BAFF、APRIL、Bcl-2、ICAM-1 の遺伝子発現を検討した。

以上に続き、東京大学医科学研究所附属病

院において倫理委員会の承認を得て、骨髄採取の手続を進めたが、侵襲的な骨髄穿刺によって多発性骨髄腫患者のみならず対照群として健常人からも骨髄を採取しなければならない点に困難が見出され、対象検体の見直しを行うことに方針を転換した。

(2) 臍帯血由来リンパ球からの WT1 特異的 CTL の誘導

臍帯血は異なる分化段階にある様々な幹細胞及び前駆細胞のヘテロな集合体で未成熟な免疫細胞を豊富に含み、その可塑性や移植時の宿主寛容性や豊富な供給を併せて考慮すると、臨床応用時の免疫細胞ソースとして優位性が高いものと考えられた。汎用性を考慮し、日本人の約 6 割が白血球型として有している HLA-A*24:02 と、多発性骨髄腫をはじめ血液悪性疾患で広く発現がみられる癌抗原 WT1 を、併せて標的とした細胞免疫療法の開発を模索した。

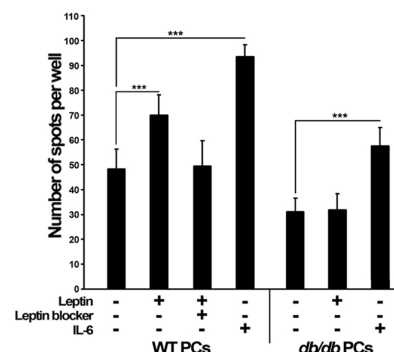
HLA-A*24:02 適合凍結臍帯血を解凍後デキストラン存在下で洗浄し単核球を得て、CD8 陽性 T リンパ球を精製した。IL-7 存在下で 1 週間培養した後、IL-15 存在下で HLA-A*24:02 拘束性変異型 WT1 ペプチドと抗 CD28 抗体ビーズを加えて 1 週間おきに抗原刺激を 2 回行った。テトラマー染色により WT1 特異的 CTL を検出した。一方で、健常人末梢血あるいは同一臍帯血から CD14 陽性単球由来成熟樹状細胞をそれぞれ調製し、CD8 陽性 T リンパ球に対して抗原刺激を行い、WT1 特異的 CTL の誘導率に関する比較を行った。

4. 研究成果

(1) レプチンの多発性骨髄腫の病因に及ぼす影響の探索

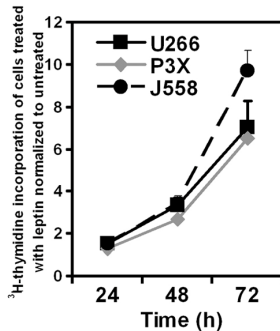
ELISPOT アッセイの結果、レプチンを野生型マウスの骨髄由来形質細胞に作用させると IgG 分泌が増加したが、レプチン阻害剤としてレプチン受容体-Fc 領域融合蛋白を添加するとこの作用は相殺された。このことからレプチンは IL-6 と同様に形質細胞に生存促進作用を示すことが示唆された。なお、レプチン受容体を欠損する *dbl/db* マウスの骨髄由来形質細胞にレプチンを作用させてもこのような生存促進作用はみられなかった (図 1)。

図 1



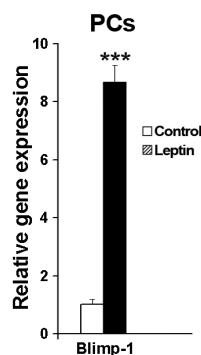
マウス骨髄腫細胞株 P3X 及び J558 をレプチン有無の条件下で培養し、³H-チミジンの取り込みにより増殖を比較したところ、レプチン添加により増殖の著しい促進がみられた(図 2)。このことから、レプチンは骨髄腫細胞に増殖促進作用を示すことが示唆された。なお、ヒト骨髄腫細胞株 U266 についても同等の結果が示された。

図 2



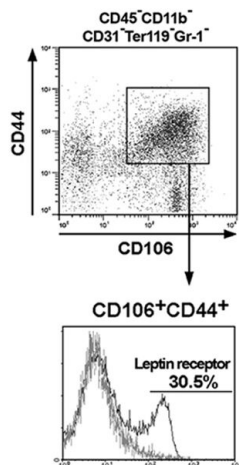
野生型マウス骨髄由来形質細胞にレプチンを作用させ RT-PCR にて解析したところ、転写抑制因子 Blimp-1 の遺伝子発現の著しい上昇が観察され、レプチンが形質細胞の分化・機能に強い影響を及ぼすことが示唆された(図 3)。

図 3



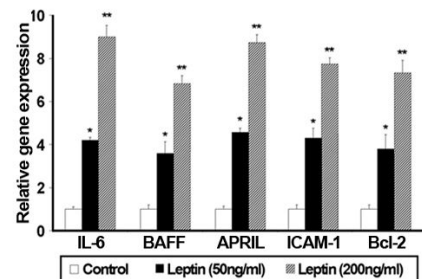
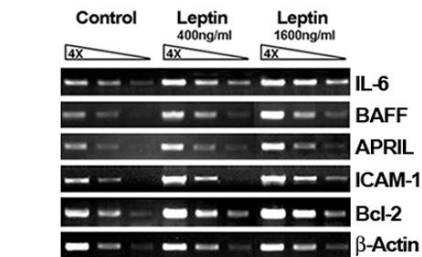
FACS にて野生型マウス骨髄由来 CD106 陽性 CD44 陽性間質細胞の解析を行ったところ、細胞表面にレプチン受容体の発現が確認され、骨髄間質細胞におけるレプチンの自己分泌機構の存在も示唆された(図 4)。

図 4



野生型マウス骨髄由来間質細胞にレプチンを作用させ RT-PCR にて解析したところ、B 細胞の生存や活性化に関わる重要なサイトカインである IL-6、BAFF、APRIL や、抗アポトーシス蛋白 Bcl-2 や、接着分子 ICAM-1 の遺伝子発現が用量依存的に強力に誘導された(図 5)。これらの結果から、レプチンが骨髄微小環境の活性を修飾し、骨髄間質細胞と形質細胞の相互作用に際して形質細胞の生存を促進する可能性が示唆された。

図 5



(2) 臍帯血由来リンパ球からの WT1 特異的 CTL の誘導

凍結臍帯血由来 CD8 陽性 T 細胞に HLA-A*24:02 拘束性変異型 WT1 ペプチドと抗 CD28 抗体ビーズを加えて抗原刺激を行ったところ、WT1 特異的 CTL が 6~9% と高率で誘導され、この誘導率は、健康人末梢血由来成熟樹状細胞(図中に allo-mDC と記載)または同一臍帯血由来成熟樹状細胞(図中に auto-mDC と記載)を用いた抗原刺激に比して優れていた(図 6)。本来は樹状細胞等の抗原提示細胞の MHC class I 分子に抗原ペプチドが提示されたものと T 細胞受容体が結合し、さらに抗原提示細胞の共刺激分子と T 細胞の CD28 分子が結合することによって活性化された抗原特異的 CTL が誘導される。抗原ペプチドと抗 CD28 抗体ビーズを併せて用いて抗原刺激を行った本法は人工抗原提示細胞 (artificial antigen presenting cell; aAPC) の手法の一種に含まれるものと考えられ、この現象には "bystander cell" の関与による MHC class I 分子の提示等、なんらかの機序の存在が想定されたが現在のところ不明である。我々は、さらにビーズに MHC class I 分子及び CD28 分子を結合させた aAPC を作製し、癌抗原特異的 CTL の誘導を試みている。東京大学医科学研究所でもこれまでに

樹状細胞を用いた細胞免疫療法の臨床治験が施行されてきたが、実際に臨床応用される樹状細胞の調製には高度な無菌培養の技術を要するため多大の費用と時間がかかり、樹状細胞を用いずに癌抗原特異的 CTL を高率に誘導可能な手法が確立すれば画期的なものとなる可能性がある。WT1 は血液悪性諸疾患の他、多くの固形癌でも発現が認められるため、多発性骨髄腫のみならず、多くの癌種に応用可能と考えられるが、我々はさらに他の癌抗原ペプチドも用いて研究を進めている。

6 . 研究組織

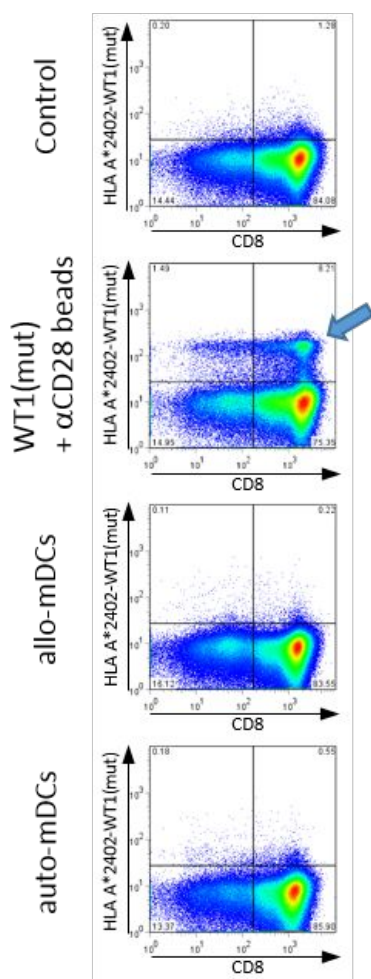
(1) 研究代表者

林 麗君 (LAM LAIKWAN QUEENIE)
 東京大学・医科学研究所・客員研究員
 研究者番号：20599261

(2) 研究分担者

山下 直秀 (YAMASHITA NAOHIDE)
 東京大学・医科学研究所・教授
 研究者番号：90174680

図 6



5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：細胞傷害性 T 細胞誘導用組成物

発明者：山下直秀 他

権利者：東京大学、テラ株式会社

種類：PCT

番号：JP2012/053396

出願年月日：平成 24 年 2 月 14 日

国内外の別：国外