

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04207

研究課題名(和文) 恒常的インテグリン α 7活性化シグナルを標的とした骨髄腫幹細胞排除法の開発

研究課題名(英文) Development of methods for elimination of multiple myeloma stem cells targeting constitutively activated integrin beta 7

研究代表者

保仙 直毅 (Hosen, Naoki)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10456923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR gRNAライブラリー、あるいは骨髄腫細胞由来のcDNAを用いたスクリーニングにより、骨髄腫細胞におけるintegrin α 7の恒常的活性化を惹き起こしている分子のスクリーニングを行ったが、候補となる分子は得られなかった。しかし我々は、骨髄腫細胞の大きな特徴である小胞体ストレスをツニカマイシンあるいはタプシガルギンで誘導してやることによりインテグリン α 7の活性化が誘導されることを見出した。これらの結果から、 α 7インテグリンでは生理的な活性化コンフォーメーションと異なる骨髄腫に特有のコンフォーメーションが存在するのではないかと考え、構造生物学者との共同研究を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

α 7インテグリンでは生理的な活性化コンフォーメーションと似て非なる「骨髄腫に特有のコンフォーメーション」が存在する可能性を示唆し、真の意味でがんと正常との間に蛋白質の“形”の違いがあるかもしれないという新しいコンセプトを提示することができた。今後このコンセプトを検証し、正しいことが実証できれば、他の様々ながんにおいて様々な蛋白質のがん特異的なコンフォーメーションの存在が同定できる可能性が広がり、新たながん治療の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We searched for molecules that cause constitutive activation of integrin α 7 in myeloma cells by screening with CRISPR gRNA library or cDNA derived from myeloma cells, but no candidate molecule was obtained. However, we found that the antigen epitope for the activated integrin α 7 was expressed upon induction of endoplasmic reticulum stress, a major feature of myeloma cells, with tunicamycin or thapsigargin. Based on these results, we hypothesized that α 7 integrin may have a unique conformation in myeloma that is different from the physiological activated conformation, and started a collaboration with a structural biologist.

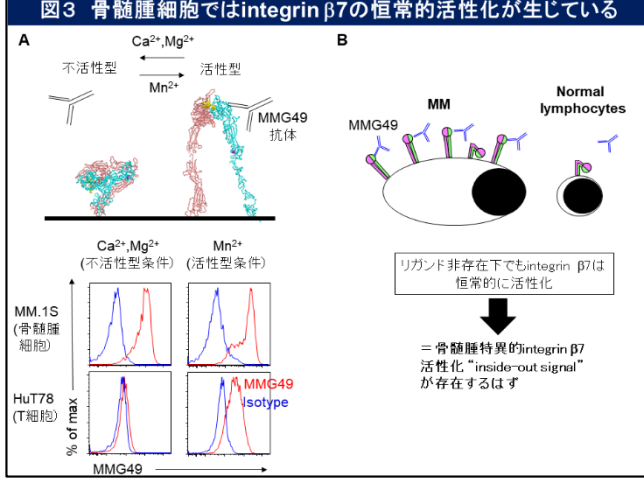
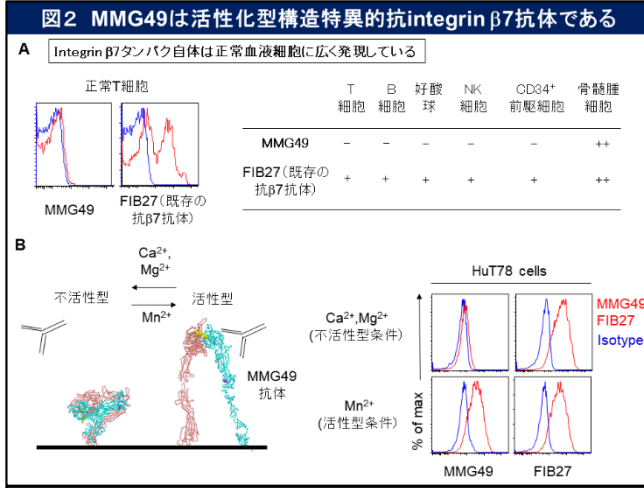
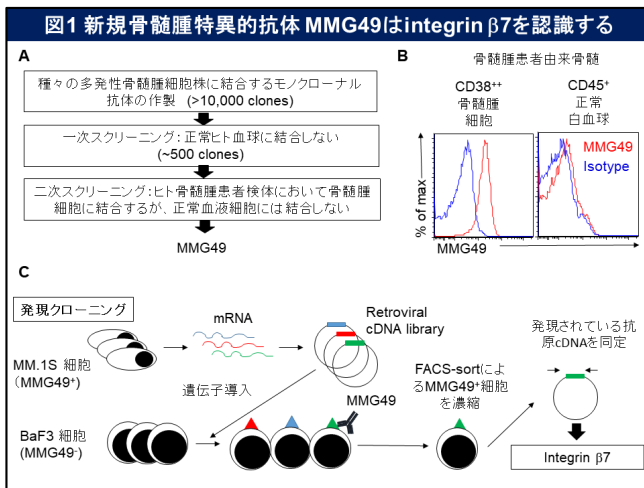
研究分野：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は一貫して、多発性骨髄腫幹細胞の同定およびそれを標的とした抗体医薬の開発を目指して、研究を続けてきた。H23-27 文科省/AMED 次世代がん研究においては、骨髄腫細胞特異的モノクローナル抗体の単離を目指して、一万クローン以上の抗骨髄腫細胞抗体ライブラリーを自作し、その中から骨髄腫特異的抗体を探索した結果、MMG49 という新規骨髄腫特異的抗体を単離した。さらに、発現クローニングにより、MMG49 はインテグリンβ7 を特異的に認識する抗体であることを明らかにした。不思議なことに、インテグリンβ7 自体は正常血液細胞の多くに広く発現するタンパクであるにもかかわらず、MMG49 は骨髄腫細胞にしか結合しなかった。次に、MMG49 が活性型立体構造インテグリンβ7 を特異的に認識する抗体であることを明らかにした(図 1,2)。このことは、骨髄腫細胞においてはリガンド非存在下でもインテグリンβ7 が恒常的に活性化型立体構造をとっていることを示している。(図 3, Hosen N et al. Nature Medicine, 2017)。しかし、そのメカニズムは全く不明であった。



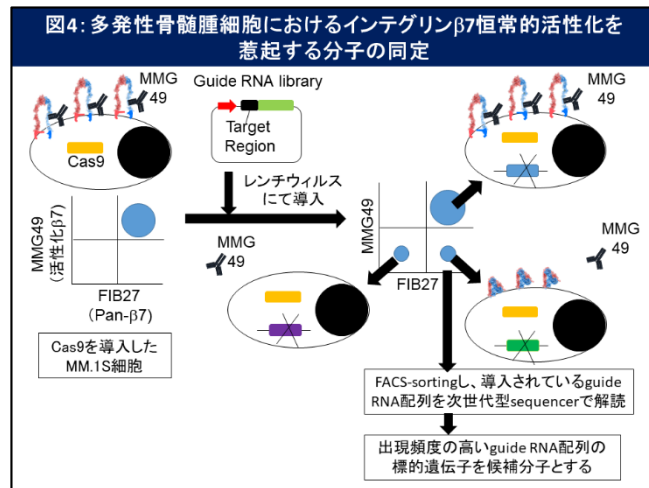
2. 研究の目的

そこで本研究では、我々が単離した活性型構造特異的抗 integrin β7 抗体を用いて骨髄腫細胞においてはリガンド非存在下でもインテグリンβ7 が恒常的に活性化型立体構造をとっているメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 システムを用いた、インテグリンβ7 恒常的活性化を誘導する候補分子のスクリーニング

活性化の状態に関係なくインテグリン $\beta 7$ に結合する FIB27 (「標準抗体」) と活性化インテグリン $\beta 7$ に特異的に結合する MMG49 を用いて、MM.1S 細胞を染色し、FACS 解析すれば、total の $\beta 7$ の発現量と共に、活性化型 $\beta 7$ の発現量を定量的に知ることができる。MM.1S 細胞は全て MMG49/FIB27 共陽性である。まず、Cas9 を恒常的に発現する MM.1S 骨髄腫細胞を樹立し、その後 guide RNA レンチウィルスライブラリーを導入した。ライブラリーが導入された MM.1S 細胞を FACS 解析した時に、MMG49 抗体の結合が低下しているが、FIB27 抗体の結合は変化していない細胞がインテグリン $\beta 7$ の発現量は変化していないが不活性化型立体構造に変化した細胞ということになる (図 4)。そこで、この分画をセルソーターを用いて sort し、回収した細胞を増幅することを試みた。



(2) 小胞体ストレスと integrin $\beta 7$ 恒常的活性化の関係の検討

そこで我々はアプローチを変更し、Hut78 細胞に様々な treatment を施し、インテグリン $\beta 7$ の活性化を惹き起こすものを探索することにした。その一つとして、骨髄腫細胞の大きな特徴である小胞体ストレスをツニカマイシンあるいはタプシガルギンで誘導してやることによりインテグリン $\beta 7$ の活性化が誘導されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

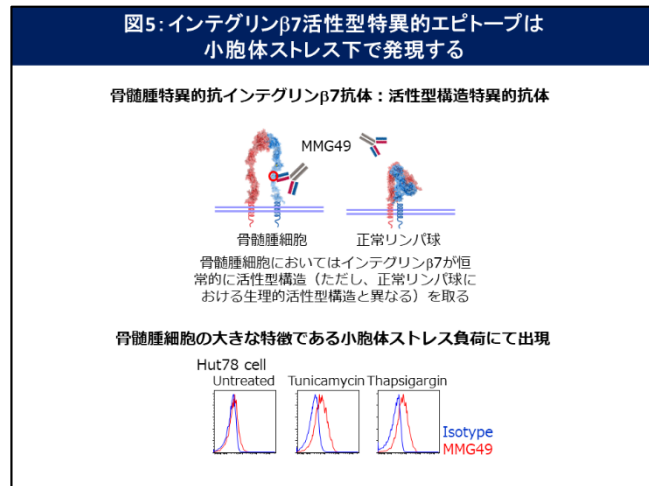
(1) CRISPR/Cas9 システムを用いた、インテグリン $\beta 7$ 恒常的活性化を誘導する候補分子のスクリーニング

ライブラリーが導入された MM.1S 細胞を FACS 解析した時に、MMG49 抗体の結合が低下しているが、FIB27 抗体の結合は変化していない細胞分画をセルソーターを用いて sort し、回収した細胞を増幅することを試みたが、その状態を維持したまま増殖しうる細胞は単離できなかった。そこで、骨髄腫細胞由来の cDNA ライブラリーを活性化型 $\beta 7$ の発現がない Hut78 細胞に導入し、その活性化を促進する分子を単離するというスクリーニングを新たに開始した。その結果、4つの候補分子を同定したが、それらの分子単独でインテグリン $\beta 7$ の活性化を誘導できるものではなかった。

(2) 小胞体ストレスと integrin $\beta 7$ 恒常的活性化の関係の検討

我々は骨髄腫細胞の大きな特徴である小胞体ストレスをツニカマイシンあるいはタプシガルギンで誘導してやることによりインテグリン $\beta 7$ の活性化が誘導されることを見出した (図 5)。

MMG49 は Mn^{2+} 存在下においてインテグリン $\beta 7$ に結合するようになることから、活性型構造特異的抗体であり、骨髄腫細胞では恒常的にインテグリン $\beta 7$ が活性型構造を取っていることが示唆される。しかしこれまでの研究で、正常リンパ球上の $\beta 7$ インテグリンが生理的シグナルによって活性化する際の「起き上がり型」構造はほとんど認識しないことがわかっている (Hosen N et al., Nature Medicine, 2017)。すなわち、生理的な構造変換とは質的に異なる、いわば「がん特異的な立体構造」が想定される。実際、インテグリンのコンフォーメーションは、内在化後のユビキチン化効率を左右することが知られており、運動能が亢進したり、分泌経路や膜輸送系が異常に活性化したりしているがん細胞では、正常細胞と異なるものが存在することは十分に予想される。そこで、我々は、骨髄腫細胞において小胞体ストレス下で起こる糖鎖修飾の変化が integrin $\beta 7$ の構造に変化を起こして、それにより MMG49 が認識するエピトープが露出するのではないかという仮説をするために、糖鎖生物学者、構造生物学者との共同研究を立ち上げた。



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 Hosen Naoki, et al.	4. 巻 23
2. 論文標題 The activated conformation of integrin b7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 1436 ~ 1443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/nm.4431	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Naoki Hosen
2. 発表標題 The Activated Conformation of Integrin b7 is a Novel Multiple Myeloma-Specific Target for CAR T-cell Therapy.
3. 学会等名 The 24th Congress European Hematology Assocoation（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Hosen
2. 発表標題 The Activated Conformation of Integrin b7 is a Novel Multiple Myeloma-Specific Target for CAR T-cell Therapy.
3. 学会等名 2nd European CAR T cell meeting,（招待講演）（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----