

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21790917

研究課題名 (和文) 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療法の確立

研究課題名 (英文) Identification of multiple myeloma stem cells and establishment of antibody therapy against them

研究代表者 保仙 直毅 (HOSEN NAOKI)

大阪大学 大学院医学系研究科 准教授

研究者番号：10456923

## 研究成果の概要 (和文)：

骨髄腫患者由来 CD19<sup>+</sup>B 細胞を NOG マウスへ移植した。しかし、ヒト骨髄腫の再構築が見られたマウスは一匹もなかった。一方、SCID-rab モデルにおいては、SCID マウス皮下に移植されたウサギ骨髄へのヒト骨髄腫細胞の生着が見られたが、生着していたのは CD38<sup>++</sup>形質細胞のみで、CD19<sup>+</sup>B 細胞の生着は見られなかった。以前の報告にて骨髄腫前駆細胞が存在するとされている CD138<sup>-</sup>骨髄細胞は SCID-rab マウスに生着、骨髄腫を再構築したが、生着している細胞は CD19<sup>+</sup>B 細胞ではなく、CD38<sup>++</sup>CD138<sup>-</sup>骨髄腫形質細胞であった。以上より、骨髄腫前駆細胞は CD38<sup>++</sup>形質細胞中に存在することが示された。さらに我々は本研究において、CD48 がほとんど全ての骨髄腫形質細胞に高発現していることを初めて明らかにし、抗 CD48 抗体による骨髄腫治療の可能性を示した

## 研究成果の概要 (英文)：

CD19<sup>+</sup> cells from peripheral blood or bone marrow (BM) of MM patients were transplanted to NOD/Scid, IL-2R $\gamma$ null mice. However, MM disease did not develop in the recipient mice even in the transplants with highly expanded clonotypic CD19<sup>+</sup> B cells. On the other hand, in the SCID-rab model, CD38<sup>++</sup> MM plasma cells, but not CD19<sup>+</sup> B cells, from MM patients engrafted and generated MM disease in rabbit BM that had been implanted subcutaneously in SCID mice. While CD138<sup>-</sup> BM cells, in which MM progenitors were reported to exist, generated MM disease in the SCID-rab model, the engrafting cells were CD38<sup>++</sup>CD138<sup>-</sup> plasma cells, not CD19<sup>+</sup> B cells. These results indicate that MM progenitor cells that can initiate and maintain MM disease are present in CD38<sup>++</sup> plasma cells. We also found that CD48, a cell surface glycoprotein not previously associated with MM, is a promising candidate as a target antigen for antibody therapy against MM. One of the newly generated anti-CD48 mAbs significantly inhibited tumor growth in SCID mice inoculated with MM cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：多発性骨髄腫、腫瘍幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、多発性骨髄腫の治療には大きな進歩がみられるが、未だに完全治癒を得ることは極めて困難である。その理由として、骨髄腫クローンの維持を担っている“骨髄腫幹細胞”が既存の治療により排除されないということが考えられる。骨髄腫細胞と同じ免疫グロブリン配列をもつCD19<sup>+</sup>B細胞が検出されることもすでに報告されているが、そのCD19<sup>+</sup>B細胞が全ての異常を蓄積した真の骨髄腫幹細胞なのか、あるいはまだ骨髄腫になるまでにいくつかのoncogenic eventが必要な**前**骨髄腫幹細胞なのかについては結論が出ていないと考えられる。骨髄腫幹細胞の同定法として最も優れていると考えられるのは、免疫不全マウスへの移植後、ヒト骨髄腫クローンを再構築でき、かつ自己複製を行う細胞を同定することである。このような方法により、CD19<sup>+</sup>骨髄腫幹細胞の存在が証明されたという報告もあるが、それが多くの症例に当てはまるのかは明らかでない。また、SCID-huマウス(ヒト胎児骨を移植されたマウス)では、CD38<sup>+</sup>成熟骨髄腫細胞を移植しても長期にヒト骨髄腫クローンが維持されたという報告もあり、骨髄腫幹細胞分画に関しては未だ議論がある。骨髄腫幹細胞集団が同定されれば、骨髄腫幹細胞抗原を同定することが重要である。骨髄腫幹細胞抗原は、骨髄腫幹細胞をさらに濃縮するためのマーカーとしてだけでなく、抗体等による治療の標的になる可能性があるという意味でも重要である。私は、すでにCD19<sup>+</sup>B細胞分画とCD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>成熟骨髄腫細胞分画の両方に広汎に高発現し、CD34陽性造血幹/前駆細胞分画および造血系以外の組織での発現が見られない分子をスクリーニングすることにより、そのような抗体療法の標的候補としてCD48という分子を同定した。今後、CD48抗体の骨髄腫幹細胞に対する効果を評価する必要がある。

## 2. 研究の目的

### 目的1 骨髄腫幹細胞分画の同定

骨髄腫クローンの維持に必須な骨髄腫幹細胞がCD19<sup>+</sup>B細胞分画のみに常に存在するのか、それともCD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>のより成熟した骨髄腫細胞分画に存在する症例もあるのかを明らかにする。

目的2 骨髄腫幹細胞表面抗原を標的とした抗体療法の開発

すでに同定した骨髄腫細胞に高発現する抗原CD48に対する抗体療法の可能性、および

その骨髄腫幹細胞への効果を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 骨髄腫幹細胞がCD19<sup>+</sup>B細胞分画、CD38<sup>+</sup>形質細胞分画のいずれにあるのかを明らかにする。免疫不全マウスへの骨髄腫細胞の移植実験により行う。

(2) 骨髄腫幹細胞特異的抗原に対する抗体の作製、抗腫瘍効果の検討を行う。既に同定した骨髄腫抗原MMSC-1に対する抗体についても、骨髄腫幹細胞に対する効果の検討を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 骨髄腫前駆細胞の同定

① 骨髄腫患者において、骨髄におけるclonotypic CD19<sup>+</sup> cellsの増幅は少なからず見られた。

骨髄腫患者由来末梢血、骨髄血由来CD19<sup>+</sup>B細胞において、IgLκ鎖λ鎖の発現をFACSにて解析した。その結果、末梢血CD19<sup>+</sup>B細胞では、κ鎖λ鎖の発現比は正常であり、異常なclonal B細胞の増殖は明らかではなかった。一方、骨髄CD19<sup>+</sup>B細胞の解析においては、16例中4例で、CD19<sup>+</sup>B細胞が骨髄腫細胞と同じ軽鎖をドミナントに発現しており、著明なclonal B cellの異常増殖が強く示唆された。

② 骨髄腫患者由来CD19<sup>+</sup>B細胞もCD34<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>細胞もNOGマウスには生着しない

骨髄腫患者末梢血由来CD19<sup>+</sup>B cellsをNOD/Shi-scid, IL-2Rγnull (NOG) miceの骨髄内に直接移植した。8症例について移植を行ったが、骨髄腫が再構築されることはなく、また、CD19<sup>+</sup>B細胞自体の生着も見られなかった(図1B)。骨髄腫患者由来骨髄細胞からCD19<sup>+</sup>B細胞あるいはCD38<sup>+</sup>形質細胞をFACS-sortし、それぞれNOGマウスに骨髄内移植を行った。一例においてはCD19<sup>+</sup>clonotypic B cellの増幅が明らかであった(図1A)が、それも含め全てのケースでヒト骨髄腫細胞の生着は認められなかった(図1B)。CD3<sup>+</sup>T細胞を除いた全骨髄細胞を移植したマウスでは、正常ヒト造血細胞の生着を認め、また、わずかにCD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>形質細胞も認めたが、それらのIg軽鎖κ鎖λ鎖発現の解析では、モノクローナリティーは認められず、正常形質細胞と考えられ、骨髄腫細胞の生着は認められなかった(図1C)。以上より、CD19<sup>+</sup>B細胞分画に骨

髄腫前駆細胞の存在が証明できる症例は存在しなかった。

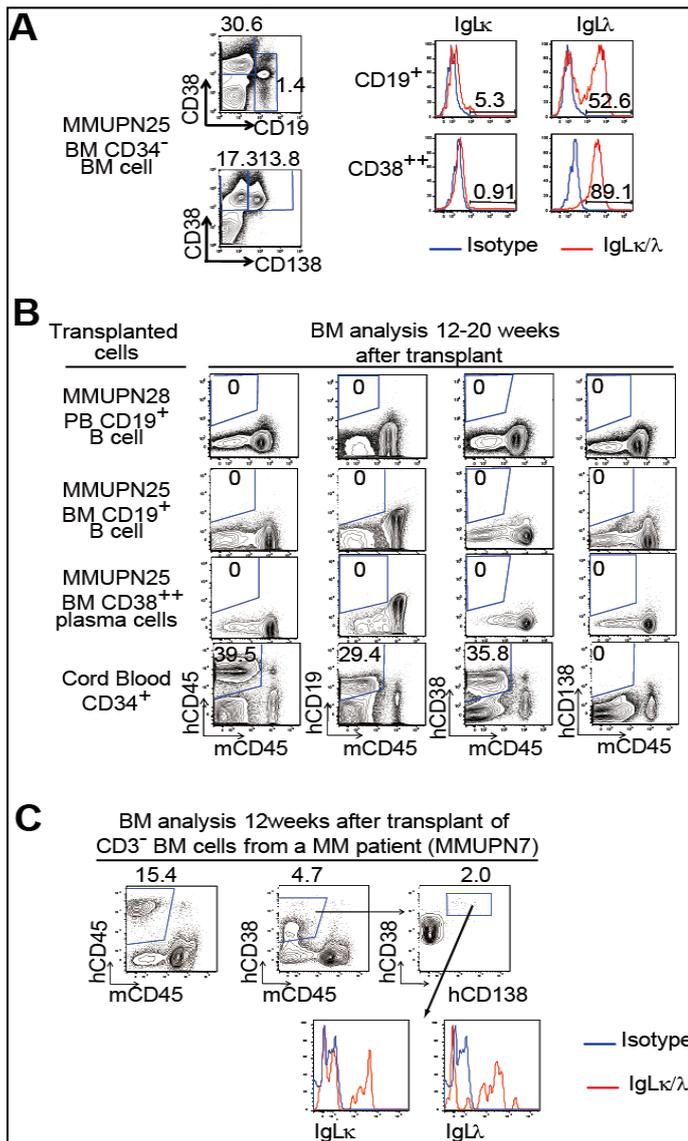


図1 骨髄腫患者由来 CD19+B 細胞および CD38<sup>+</sup>形質細胞はともに免疫不全マウスに生着しない。(A) 骨髄腫患者由来骨髄細胞の FACS 解析。この症例では CD19+B 細胞において monocytic IgL の発現が見られ、clonotypic B 細胞の異常増殖が起こっていることが分かる。(B) 骨髄腫患者由来 CD19+B 細胞あるいは CD19-CD38<sup>+</sup>形質細胞を移植された NOG マウスの骨髄の解析。臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞を移植された NOG マウスの解析も同時に示している。骨髄腫患者由来細胞の生着は全く見られていないことが分かる。(C) 骨髄腫患者由来 CD3<sup>-</sup>骨髄細胞を移植された NOG マウスの骨髄の解析。正常造血細胞の生着は見られるが、モノクローナルな骨髄腫細胞の生着は見られない。

③CD38<sup>+</sup> 骨髄腫形質細胞は SCID-rab マウス

に生着し骨髄腫を再構築するが、CD19+B 細胞の生着は見られない。

SCID-rab モデルとは Yata らにより開発された方法で、SCID マウスの皮下に移植したウサギ骨に骨髄腫患者由来細胞を移植する異種移植法である。骨髄腫細胞の生着はマウス血中におけるヒトイムノグロブリンを測定することによりモニタできる (図2A) 骨髄腫患者由来全骨髄の移植では 12 例中 5 例で生着が見られたが、その際生着している細胞は CD38<sup>+</sup>の形質細胞のみで CD19+B 細胞の生着は見られなかった。次に、以前に骨髄腫幹細胞を含むと報告されている CD34<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup>骨髄細胞を移植したところ 5 例中 2 例で生着が見られた。生着、増殖している細胞を解析すると、CD19+B 細胞は生着しておらず、CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>形質細胞およびそれらから産生されたと思われる CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>細胞が検出された。また、CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>細胞のみを移植した場合でも 5 例中 3 例に生着が見られた。以上より、CD38<sup>+</sup>形質細胞中に、SCID-rab モデルにおいて骨髄腫を再構築する骨髄腫前駆細胞が存在することが示された。

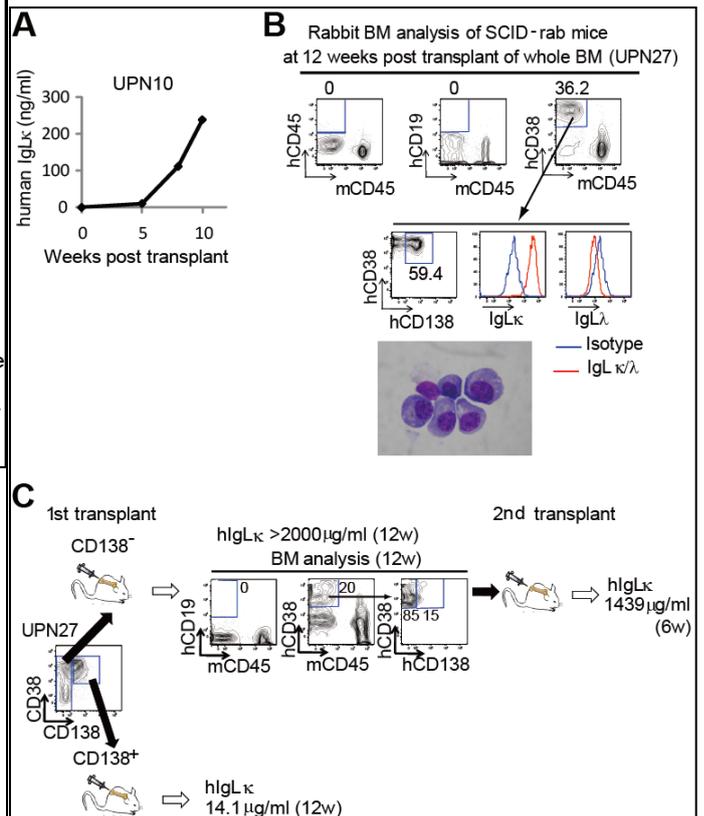


図2 CD38<sup>+</sup> 骨髄腫形質細胞は SCID-rab model に生着し、骨髄腫を再構築するが、CD19+B 細胞の生着は見られない。(A) ヒト骨髄腫患者由来骨髄細胞を移植した SCID-rab マウスの末梢血におけるヒト IgL 濃度の推移 (B) ヒト骨髄腫患者由来骨髄細胞を移植された SCID-rab マウスの骨髄の解析。生着、増殖している細胞は CD38<sup>+</sup>形質細胞のみであ

り、CD19+B 細胞の生着は見られない。(C) 骨髄腫患者由来骨髄 CD138<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> 細胞あるいは CD138<sup>+</sup> 細胞の SCID-rab マウスへの移植。ヒト骨髄腫を再構築する細胞は CD34<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> 細胞中に存在する。また、それらは二次移植可能であった。

(まとめ)

骨髄腫前駆細胞は CD19-CD38<sup>++</sup>形質細胞分画内に存在する。CD19+骨髄腫幹細胞の存在は我々の症例では証明はできなかった。

## (2) 新規抗骨髄腫抗体療法の開発

①CD48 はほぼすべての骨髄腫患者において、ほぼ全ての骨髄腫形質細胞に高発現するが、正常造血前駆細胞での発現はわずかである。骨髄腫患者骨髄腫形質細胞に高発現し、正常造血幹、前駆細胞での発現が非常にわずかである分子として、CD48 を同定した。

②正常成熟リンパ球でも CD48 の発現は見られるが、骨髄形質細胞における CD48 発現は有意に高い

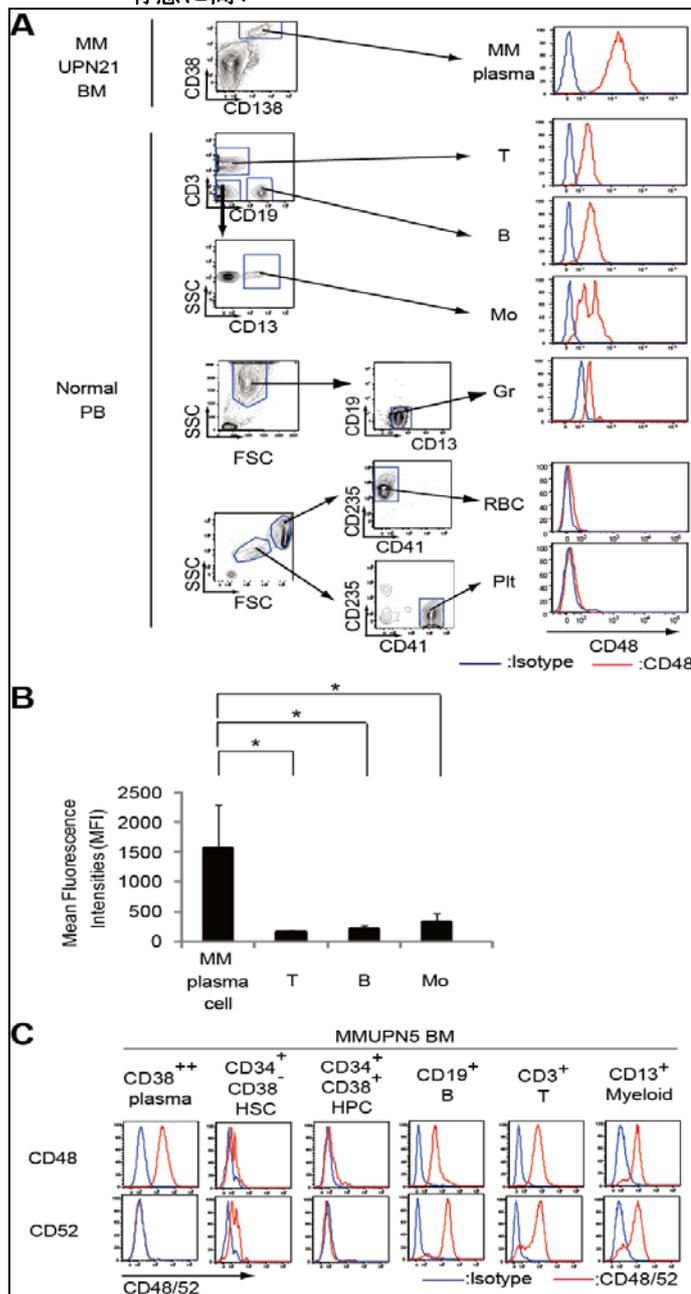


図3 骨髄腫形質細胞における CD48 発現レベルは正常成熟リンパ球よりも有意に高い (A) 骨髄腫患者由来 CD38<sup>++</sup>CD138<sup>+</sup> 骨髄腫形質細胞および健常者末梢血 CD3<sup>+</sup>T 細胞 CD19<sup>+</sup>B 細胞, CD13<sup>+</sup>SSC<sup>lo</sup> 単球, CD13<sup>+</sup>SSC<sup>high</sup> 好中球 CD235<sup>+</sup> 赤血球および CD41<sup>+</sup>血小板における CD48 発現の解析 (B) CD48-FITC の Mean fluorescent intensities (MFI) の比較 (n=4). \*:p<0.05 (C) 骨髄腫患者骨髄細胞各分画における CD48 および CD52 の発現の比較。

健常人末梢血中 CD19<sup>+</sup> B 細胞, CD3<sup>+</sup> T 細胞および SSC<sup>lo</sup>CD13<sup>+</sup> 単球でも CD48 の発現は見られるが、その発現レベルは骨髄腫形質細胞と比べて有意に低かった。また、重要なことに赤血球、血小板には CD48 の発現は見られない。(図 3A, B)。同じように正常リンパ球、単球での広範な発現が知られている慢性リンパ性白血病に対する治療用抗体 (alemtuzumab) の標的抗原である CD52 の発現パターンとの比較を行ったところ、骨髄腫形質細胞が CD48 のみを発現することを除いてはほぼ同様の発現パターンが見られた (図 3C)。

## ③我々が作製した新規抗 CD48 モノクローナル抗体は in vitro で強い細胞傷害活性を示す

我々は、新たに抗 CD48 抗体を作製し、その中の IgG2a サブクラスの 1 クローン (1B4) に関して、その細胞傷害活性を検討した。CD48 は調べた全ての骨髄腫細胞株に発現していた。そこで、SCID マウス脾臓細胞を effector として、1B4 が骨髄腫細胞株に対して ADCC を惹起するかを調べたところ、E:T ratio=50:1 で、OPM2 細胞に対して  $5.6 \pm 0.8\%$ 、U266 細胞に対して、 $0.8 \pm 2.1\%$  と決して高くはないものの確かに ADCC 活性を認めた。一方、CDC 惹起活性は極めて高く、OPM2、U266 細胞に対して、 $49.9 \pm 0.7\%$ 、 $51.0 \pm 7.3\%$ であった。骨髄腫患者骨髄腫形質細胞を標的とした CDC assay でも同様に高い CDC 活性が見られた。抗体が結合することによる直接作用は見られなかった。

## ④異種移植モデルを用いた骨髄腫細胞に対する抗 CD48 抗体の効果は著明であった。

我々が作製した抗 CD48 抗体 1B4 の *In vivo* での効果を検討した。皮下に OPM2 骨髄腫細胞を移植したマウスに対し 1B4 を投与しその治療効果を観察したところ、SCID マウスおよび Rag2<sup>-/-</sup>/γc<sup>-/-</sup> マウスでは極めて著明な抗骨髄腫効果が見られたが、補体活性が欠損している NOD/SCID マウスではその効果は有意ではあるもののわずかであった (図 4A, B)。よって、1B4 は主として CDC 活性により、強い

In vivoでの抗骨髄腫効果を発現していることが分かった。一方、NOD/SCID マウスでも有意な腫瘍増殖の抑制が見られたことは、CDC以外のメカニズムも抗腫瘍効果に寄与していることを示している。継続的に投与を行った3匹のうち1匹は腫瘍の消失が見られたがそれ以外の2匹では最終的に腫瘍の増殖は抑えきれなかった(図4C)。1B4の効果は用量依存性であった。また、1B4の抗骨髄腫効果は別の骨髄腫細胞株であるMM1S細胞を用いても確認された(図4E)。

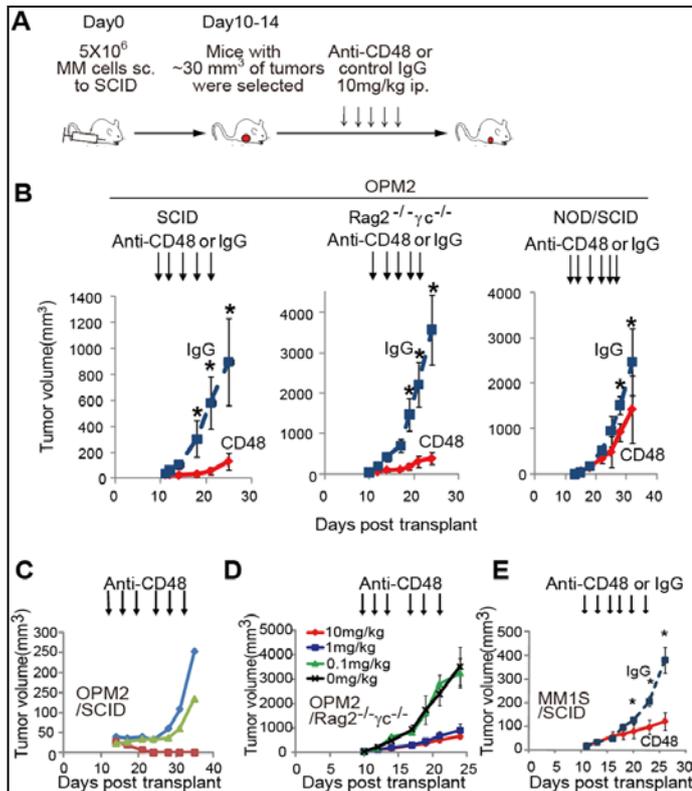


図4 新規抗 CD48 抗体(1B4)は in vivo 治療モデルにて強い抗骨髄腫効果を示す。(A)実験デザインを示すシエーマ(B) SCID, Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>, あるいは NOD/SCID マウスのそれぞれに OPM2 骨髄腫細胞株を皮下移植したのち、1B4 あるいはコントロールのマウス IgG を週 2 回投与した。腫瘍体積を縦軸に示す。(C) 移植後 35 日目まで 1B4 の投与を継続した際の各マウスの腫瘍体積の変化。各グラフが 1 匹のマウスを表している。(D) OPM2 MM cells を移植された Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> mice を様々な dose の 1B4 で治療した際の腫瘍径の変化 (E) MM1S 細胞を移植された SCID マウスに対する 1B4 の治療効果

⑤新規抗 CD48 抗体 1B4 は骨髄中に存在する骨髄腫細胞に対しても有効である。骨髄腫は通常骨髄内において増殖するものであるので、骨髄内に移植した骨髄腫細胞に対する抗 CD48 抗体の効果を検討した。OPM2 MM cells (3X10<sup>5</sup> cells) を Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> マウス

の骨髄内に移植し、1B4 抗体あるいはマウス IgG を投与したところ、1B4 抗体を投与したマウスで明らかな CD38<sup>+</sup>OPM2 細胞の減少が見られた。

⑥抗 CD48 抗体は CD34<sup>+</sup> 造血幹/前駆細胞を傷害しない

抗 anti-CD48 抗体が正常 CFU-GEMM, CFU-GM and BFU-E に対して CDC を引き起こすかどうかを調べた(図 5 A))ところ、コロニー形成細胞には影響を与えなかった。次に同様の実験を行い、その結果を FACS で解析した(図 5 B)。その結果抗 CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>形質細胞は減少するが、特に CD34<sup>+</sup>正常造血幹/前駆細胞では大きな変化がなかった。次に抗 CD48 抗体が正常造血細胞に及ぼす影響をヒト化マウスを用いて検討した。臍帯血 CD34 陽性細胞を移植してヒト造血を構築した NOG マウスに抗 CD48 抗体を投与したところ、リンパ球は一時的に消失するものの、正常造血前駆細胞が残存するため、再びヒト成熟リンパ球が出現することが明らかであった。また、ヒト化マウスでは観察が困難な好中球に対する影響を invitro での CDC アッセイで見たところ、好中球に対しては CDC 活性は惹起されなかった。(次ページ続く)

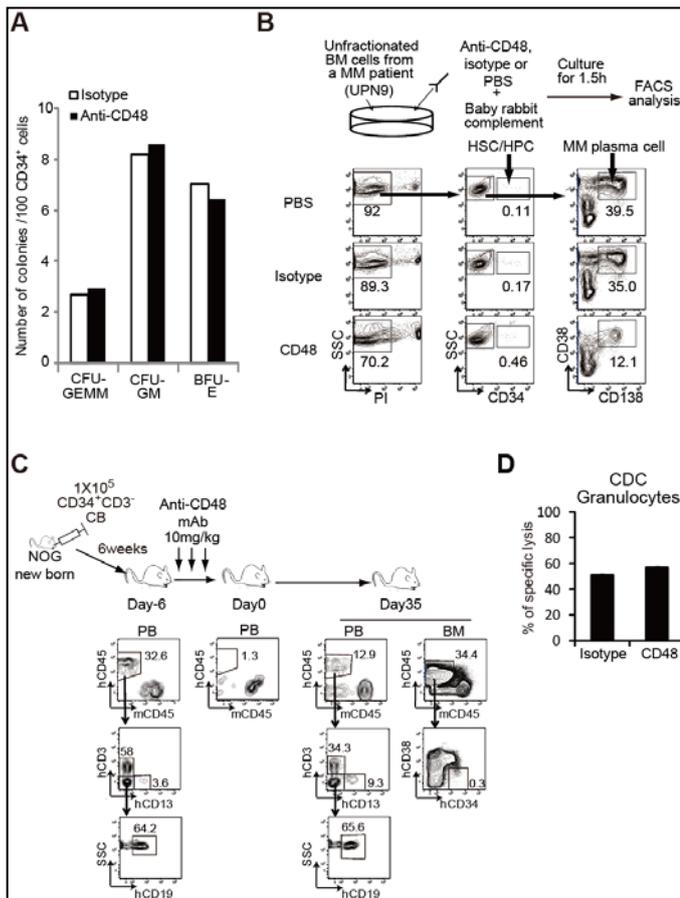


図5 CD34<sup>+</sup>陽性正常造血前駆細胞は抗CD48抗体により傷害されない。(A) CD34<sup>+</sup>造血前駆細胞を抗CD48抗体あるいはisotypeコントロール抗体と補体存在下でincubateしたのち、コロニーアッセイを行った。(B) 分画していない骨髄腫患者由来全骨髄細胞に補体および抗CD48抗体あるいはisotype抗体を加えてインキュベートしたのち、FACS解析を行った。CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>骨髄腫形質細胞が比較的特異的に傷害されている。(C) CD3<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>臍帯血細胞を移植されたNOGマウスにanti-CD48抗体を投与した。(D) ヒト好中球に対して、補体および抗CD48抗体あるいはisotype抗体を加えてCDC活性が惹起されるかを検討した。

(まとめ)

以上より、CD48は新規骨髄腫抗原であり、有望な抗体療法の標的である。

5. 主な発表論文等  
〔学会発表〕(計7件)

1. 保仙 直毅、杉山 治夫

Clonogenic myeloma progenitor exists in CD19-CD38<sup>+</sup> plasma cells 米国血液学会 平成22年12月4日、オーランド、米国

2. 保仙 直毅、岸田 諭、松岡 由和、市原 弘善、青山 泰孝、菱谷 安

津子、川上 学、山上 保、村上 雅樹、玉置 広哉、中尾 隆文、藤 重夫、中島 博子、日野 雅之、岡 芳弘、杉山 治夫 MMSC-1 as a novel molecular target for antibody therapy in multiple myeloma 日本血液学会 平成22年9月26日、横浜

3. 保仙 直毅、岸田 諭、松岡 由和、市原 弘善、青山 泰孝、菱谷 安

津子、川上 学、山上 保、村上 雅樹、玉置 広哉、中尾 隆文、藤 重夫、中島 博子、日野 雅之、岡 芳弘、杉山 治夫 Clonogenic myeloma progenitor exists in CD19-CD38<sup>+</sup> plasma cells 日本血液学会 平成22年9月25日、横浜

4. 保仙 直毅 腫瘍幹細胞：B細胞性腫瘍幹細胞からの考察(ランチョンセミナー) 日本癌学会 平成22年9月22日、大阪

5. 保仙 直毅、岸田 諭、中田 潤、松岡 由和、杉山 治夫 Identification and targeting of multiple myeloma progenitor cells 幹細胞シンポジウム 平成22年5月13日、淡路島

6. 保仙 直毅 MMSC-1 is a novel target molecule for antibody therapy against both multiple myeloma progenitor cells and mature myeloma plasma cells Gordon Research Conference 平成21年9月16日、スイス

7. 保仙 直毅、水谷 陽介、小林 丈二、岸田 諭、岡 芳弘、川瀬 一郎、杉山 治夫

多発性骨髄腫に対する抗体療法のための新規標的抗原 日本造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 平成21年8月28日、大阪

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患の治療薬

発明者：保仙 直毅 杉山治夫

権利者：国立大学法人大阪大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/056449

出願年月日：4/9/2010

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保仙 直毅 (HOSEN NAOKI)

大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10456923