

令和元年6月5日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09861

研究課題名(和文) ニッチシグナル阻害によるCD34抗原陰性白血病幹細胞を標的とした抗体療法の開発

研究課題名(英文) Development of a specific antibody therapy for newly identified CD34 antigen-negative leukemic stem cell niche

研究代表者

藤岡 龍哉 (FUJIOKA, Tatsuya)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70403045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：白血病幹細胞は、正常造血幹細胞の階層制と同様に、CD34+CD38-細胞分画に存在すると考えられてきたが、我々の提唱する正常造血幹細胞の新たな階層性モデルに基づいて、CD34-LSCが存在するとの仮説を立て、白血病細胞移植実験によりそれを実証した。移植実験により白血病を再構成した白血病検体を免疫原として、抗体を作製した。これらのうち1クローン(303-23)について標的抗原(抗原X)が同定された。抗原Xは固形腫瘍において治療標的抗原として注目されている抗原である。303-23を白血病モデルマウスに投与することによりin vivoにおける抗白血病効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病に対する治療は進歩を遂げているものの、難治例や再発例は決して少なくなく、未だ難治性の疾患であることには変わりがない。白血病の再発はごく少数体内(骨髄内)に存在する白血病幹細胞が抗がん剤に対する非常に高い耐性を持っているからだと言われている。我々は従来の白血病幹細胞の概念よりもさらに根幹に存在する新規の白血病幹細胞=CD34陰性白血病幹細胞が存在することを見出した。白血病に治療成績を向上させるために、このCD34陰性白血病幹細胞に対する抗体を作製することに成功し、実際に実験によって白血病に対する効果を認めている。さらに臨床応用に向けて、新規抗体療法の開発を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：It has been thought that leukemic stem cells (LSCs) resided in CD34+CD38- population as normal hematopoietic cells (HSCs) did so. But, as we identified more undifferentiated HSCs in CD34- population, we also identified more undifferentiated CD34-leukemic stem cells than CD34+CD38- LSCs.

We showed scid-repopulating capacity of CD34- LSCs and produced antibodies by immunizing mice with CD34- LSCs which were able to repopulate mice. Among these antibodies, antigen of a clone 303-23 was identified as antigen-X which was known as a target of a lot of kinds of solid tumor. Administration of the antibody had an effect to leukemic cells transplanted into mice.

研究分野：白血病に対する免疫療法

キーワード：白血病 抗体療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

白血病細胞集団には、HSCと同様に階層制が存在し、少数のLSCが含まれている（図1）。従って、抗癌剤で白血病細胞を死滅させても、LSCが残存していれば再発し、決して根治的治療とはなり得ない。LSCは化学療法に対する耐性が高く、治療後に骨髄内ニッチに残存して再発の原因となる（Nature Biotechnology 25: 1315, 2007）。現時点では、大量化学療法を伴う造血幹細胞移植療法が最も高い治癒率を望める治療法である。それでもなお再発例は決して少なくなく、また治療関連毒性が強いことも問題である。従ってLSCを殲滅するための新規治療法の開発が社会的に強く要請されている。

LSC 特異的な攻撃療法として、LSCに特異的な抗体療法（免疫学的機序を介した細胞障害（ADCC, CDC）、あるいは抗体による抗原分子の機能阻害を介した細胞障害）が考えられる。現在までに、我が国、及び海外で認可されている抗体医薬品で白血病に有効なものは、AMLに対する抗CD33抗体、B-CLLに対する抗CD52抗体、CLLに対する抗CD20抗体（非ホジキンリンパ腫にも有効）、及びATLに対する抗CCR4抗体（本邦で開発）の4種類のみである。加えて、CD33に対するモノクローナル抗体に抗生物質カリケアマイシンを結合させた薬剤であるゲムツズマブ・オゾガマイシン（Mylotarg）は、CD33の発現が80%以上、再発、60歳以上、他の化学療法に抵抗性を示すという4条件が揃う場合のみ適応となるために治療上の制約が多い。その上、LSCを標的としていないことが根治的な治療を目指す場合に問題となり、実際に米国では有害事象の発現率の高さから承認取り下げとなっている。

新たなLSC抗原として、TIM3、CD47、CD123、CD44、CLL-1、CD96、CD32、CD25などが研究対象となっている。これらのほとんどはすでに特許出願されており、将来的に臨床応用される可能性もある。しかしながら、開発当初よりCD34-LSCを明確な治療標的として、特異的な膜表面抗原を同定し、抗体療法を開発するという報告は国内外にみられない。

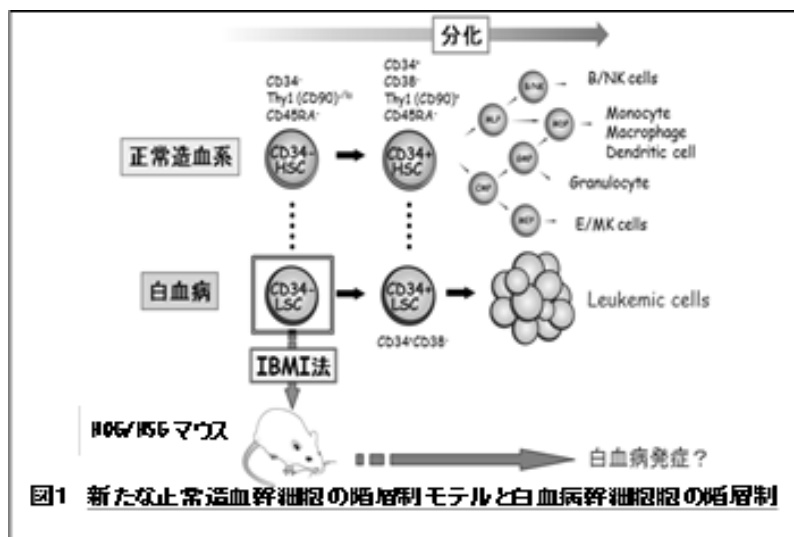


図1 新たな正常造血幹細胞の階層制モデルと白血病幹細胞の階層制

2. 研究の目的

白血病細胞集団には、正常造血幹細胞（HSC）プールと同様に階層制が存在する。すなわち、白血病細胞集団には、少数の白血病幹細胞（LSC）が含まれており、LSCが白血病細胞を供給している。

現在、白血病に対して治癒を期待できる唯一の治療法が造血幹細胞移植療法であることには疑いがない。しかし、LSCが骨髄ニッチに残存することにより再発し、すべての患者で治癒を望むことは困難である。

研究代表者は、CD34抗原陰性（CD34⁻）HSC（階層制の頂点に立つ）のleukemic counterpartとしてCD34-LSCの同定に成功した（図1）。CD34-LSCは、従来のCD34⁺CD38⁺LSCに比べてより未分化と考えられる。加えて、CD34⁻LSCが、白血病の病型に関わらず存在することを明らかにしている。

本課題研究では、階層制上より上位にあるCD34-LSCを標的とする特異抗体を作製し、多剤併用化学療法、造血幹細胞移植療法と併用することで、再発を抑える根治的白血病治療法の開発・確立を目指している。

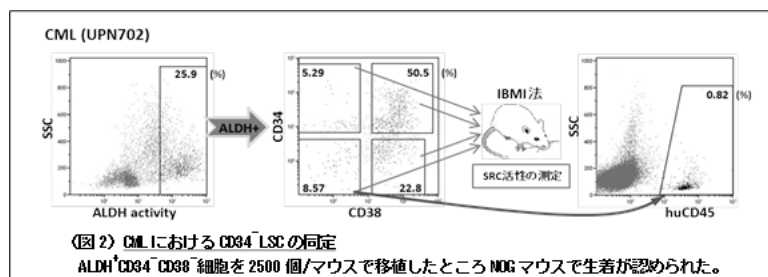
3. 研究の方法

(1) CD34抗原陰性白血病幹細胞の解析

白血病細胞検体（骨髄液、末梢血）は、既に関西医科大学倫理委員会の承認（関医倫題1127号）に基づいて近畿地区の9施設から提供を受ける。ALDHは、造血系や組織における様々な系統の幹細胞・前駆細胞に高発現している。腫瘍細胞の抗がん剤耐性を示すマーカーとしても知られている。ALDH、CD34、CD38などのマーカーを用いてFACSにより白血病細胞を解析し亜分画する。各細胞分画を分取し、IBMI法でNOGあるいはNSGマウスに移植して、白血

病が再構築されるかを継時的骨髄穿刺により骨髄細胞を採取して観察する。

図2にCMLでの1例を示す。複数の検体を用いて移植実験を施行し、病型ごとにCD34⁺LSCが存在する症例の割合を確認するとともに、白血病再構築を認めた検体を抗体作製の材料とする。



〈図2〉CMLにおけるCD34⁺LSCの同定
ALDH⁺CD34⁺CD38⁻細胞を2500個/マウスで移植したところNOGマウスで生着が認められた。

(2) ニッチシグナルを阻害するモノクローナル抗体の作製

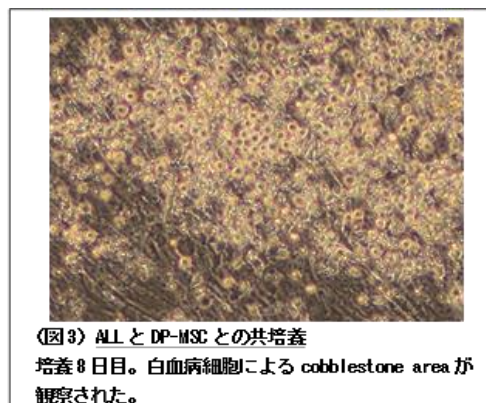
CD34⁺LSCの存在が確認された白血病検体をアジュバントと混合してBalb/cマウスの足底部に1回/週のペースで3週間免疫する。マウスの単径リンパ節よりリンパ球浮遊液を作製し、マウス骨髄種細胞株(SP2/0)と融合させてhybridomaを作製する。hybridomaを2~4週間培養し、免疫に用いた白血病細胞と特異的な結合能を持つモノクローナル抗体を産生するクローンをFACSにより選別する。選別されたクローンはFACSによりシングルセルソーティングを行ったのちに再培養を行うことにより、モノクローナリティを確保する。さらに、これらのクローンを無血清培地中で大量培養を行うことにより、牛胎仔血清由来の抗体を含まない純度の高い抗体を精製する。

(3) 作製抗体の標的抗原の同定

作製したモノクローナル抗体と免疫に用いた白血病細胞を用いて免疫沈降を行い、抗原由来バンドを切り出す。これをサンプルとして質量分析(LC-MS/MS解析)を行い、抗体が認識する抗原の同定を行う。

(4) ニッチシグナル阻害効果の確認

我々はすでにヒト骨髄由来Lin⁻CD45⁻細胞よりCD34⁺HSC、及びCD34⁺HSCに対する高い支持能を持つCD271⁺SSEA-4⁺MSC(DP-MSC)の樹立に成功している(Stem Cells 33:1554, 2015; 特願2013-170480)。このDP-MSCと白血病を再構築した細胞分画との共培養を行い、CD34⁺LSCがこの共培養系により支持されることを確認する。既にパイロット実験を行い、白血病細胞がDP-MSCに強く付着(ピペッティングで浮遊させるのが困難)しながら密集する像(cobblestone area)が観察されている(図3)。



〈図3〉ALLとDP-MSCとの共培養
培養8日目。白血病細胞によるcobblestone areaが観察された。

以上の予備実験結果に基づいて、CD34⁺LSCが共培養系により支持されることを確認した後、標的抗原が同定された抗体のうち、新規の分子、あるいはニッチシグナルと関連性のある既知の分子を標的とする抗体を共培養系に添加する。

その結果に基づいて、CD34⁺LSC支持能に対する阻害活性の有無を判定する。

(5) NOG/NSGマウスを用いる抗白血病効果の確認

生存曲線が観察に適した白血病細胞移植実験系を確立するために、移植白血病細胞数を段階的に増減させて移植実験を行う。共培養系でニッチシグナルに対する顕著な阻害活性が確認された抗体クローンより、白血病を再構築したNOG/NSGマウスへの投与実験を開始し、*in vivo*での抗白血病効果を確認・検証する。

(6) 選別した有望モノクローナル抗体のヒト化

選別した有望なモノクローナル抗体の遺伝子配列を解析して、この配列情報に基づいて、*in silico*で免疫原性および物理化学的リスクを評価し、その結果を考慮して複数のヒト化アミノ酸配列を設計する。設計した各配列の発現ベクターを構築して、抗体を小スケールで293F細胞等に発現させて精製し、医薬品としての開発抗体としての適性(抗原との親和性、*in vitro*生物活性、発現量、物性など)を評価し、総合的に勘案して開発候補抗体を選別する。

4. 研究成果

(1) CD34⁺抗原陰性造血幹細胞(CD34⁻HSC)の発見

従来CD34⁺CD38⁻HSCが最も未分化なHSCであると考えられていた(図1)。しかしながら、我々は骨髄内直接移植(IBMI)法を開発することにより、ヒト臍帯血中に非常に未分化な

CD34-HSC が存在することを世界で初めて明らかにした (Blood 101: 2924, 2003, plenary paper)。その後の研究により、我々が同定した CD34-HSC が、従来最も未分化とされていた CD34⁺CD38-HSC を *in vitro*, *in vivo* で産生することを明らかにした。以上の研究成果に基づいて、CD34-HSC が CD34⁺CD38-HSC よりも、階層制上より上位の未分化 HSC であるという新たなモデルを提唱している (J Autoimmun 30: 136, 2008; Human CD34-negative hematopoietic stem cells. Book chapter in Ratajczak M, ed. “Adult Stem Cell Therapies: Alternatives to Plasticity” . Humana Press, Springer, Berlin, pp.53-77, 2014)。

(2) CD34 抗原陰性造血幹細胞を支持する間葉系幹細胞の樹立

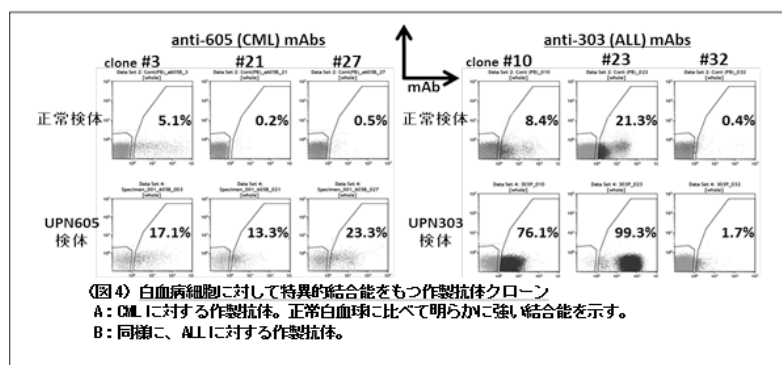
ヒト骨髄由来分化マーカー (Lin) 陰性 CD45 陰性細胞分画より、共培養系において CD34-HSC の幹細胞性を維持することが可能な CD271⁺SSEA-4⁺MSC を樹立した (Stem Cells 33: 1554, 2015)。この CD271⁺SSEA-4⁺MSC を用いることにより、未分化 CD34-HSC を骨髄中で維持している環境 (骨髄ニッチ機能) を *in vitro* で検証することが可能となった。同様に、この共培養系を未分化 CD34-LSC に応用することにより、LSC に対する骨髄ニッチ機能の解析が可能となり、同時にニッチ機能を阻害する抗体のスクリーニング系としても非常に有用であると考えられる。

(3) CD34 抗原陰性白血病幹細胞の同定

周知のように、LSC の発見は、正常 HSC の階層制の概念に基づいており、従来、最も未分化な HSC が存在するとされている CD34⁺CD38⁻細胞分画に LSC が存在するという仮説に基づいている (Nature 367: 645, 1994)。しかし上記 (1) で述べた正常 HSC の新たな階層性モデルに基づいて、CD34-HSC の leukemic counterpart として CD34-LSC が存在するとの仮説 (図 1) を立て、IBMI 法を用いた NOG/NSG マウスへのヒト白血病細胞移植実験によりそれを実証した (図 2)。これまでに 9 例の移植実験を行い、そのうち 5 例 (急性骨髄性白血病 (AML) 1 例、急性リンパ性白血病 (ALL) 2 例、慢性骨髄性白血病 (CML) 2 例) で白血病細胞が生着したが、これら 5 症例の全てにおいて CD34-LSC の存在が確認された (未発表)。

今後さらに多くの症例での解析を行う予定であるが、これらの結果は白血病の病型によらず CD34-LSC が高い確率で存在する可能性を示唆している。

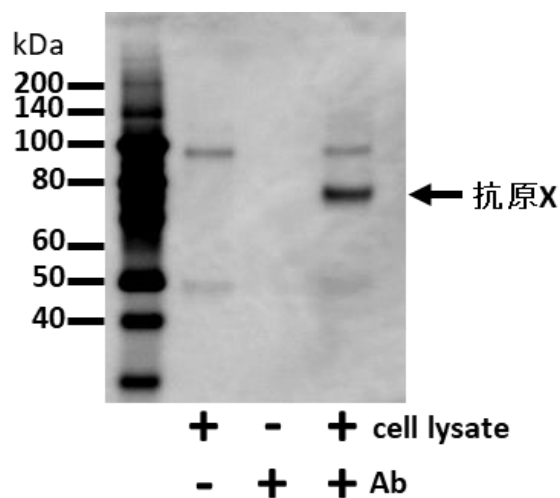
(4) CD34 抗原陰性白血病幹細胞に対するモノクローナル抗体の作製



前項 (3) で述べたように移植実験により白血病を再構築した検体を免疫原として、抗白血病細胞抗体を作製した。これまでに ALL に対する 3 クローン、CML に対する 3 クローンのモノクローナル抗体を作製している (図 4)。このうち ALL (UPN303) に対する 1 クローン (303-23) の抗体について、免疫沈降、及び質量分析による抗原同定により、標的抗原 (抗原 X) を明らかにした (図 5)。

抗原 X は多種の固形腫瘍細胞 (肺がん、乳がん、前立腺がん、膵がん、肝がん等) に高発現していることが多数の論文により報告されている。海外では既に抗 X 抗体を用いた固形腫瘍に対する抗体療法の臨床試験が開始されており、有害事象は軽微であるとの報告がある。

抗原 X は間葉系幹細胞にも発現しているため、LSC に対するニッチシグナルと関連する可能性が高い。抗白血病効果に対する報告は存在せず、ニッチシグナル阻害を介する抗体療法の標的抗原として有力な候補である。



(図5) 免疫沈降による標的抗原の確認
303-23抗体による免疫沈降で特異的抗原由来のバンドを認めた

(5) 抗原 X に対する抗体の *in vitro* での抗白血病細胞効果の確認

我々はすでにヒト骨髄由来 Lin⁺CD45⁻細胞より CD34⁺HSC、及び CD34⁺HSC に対する高い支持能を持つ CD271⁺SSEA-4⁺MSC (DP-MSC) の樹立に成功している (Stem Cells 33:1554, 2015; 特願 2013-170480)。この DP-MSC と白血病を再構築した細胞分画との共培養を行い、CD34⁺LSC がこの共培養系により支持されることを確認した。白血病細胞が DP-MSC に強く付着 (ピペッティングで浮遊させるのが困難) しながら密集する像 (cobblestone area) が観察されている (図 3)

ALL (UPN303) 細胞と DP-MSC の共培養系に抗 X 抗体を添加した結果を図 6 に示す。抗体の濃度が高くなるに従い、白血病細胞の増加率 (図 6A)、および生存細胞率 (図 6B) が有意に減少することが確認された。

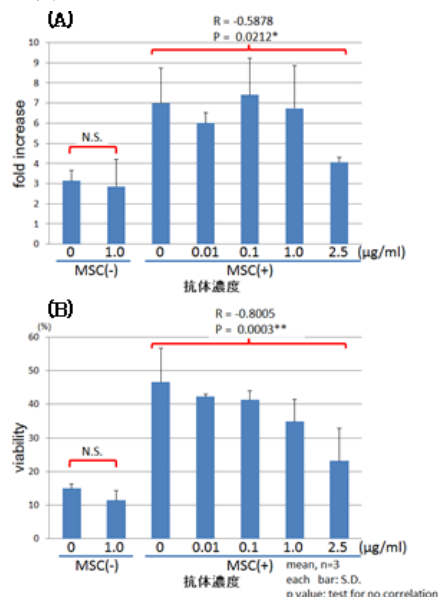


図6 303-23抗体の*in vitro*における抗白血病効果
303-23抗体の濃度が高いほど白血病細胞の増殖が抑制された。

(6) 抗原 X に対する抗体の *in vivo* での抗白血病細胞効果の確認

白血病移植後 10 週目の脾臓の写真 (図 7A 上)、及び重量 (図 7A 下)。303-23 抗体を投与したマウスでは脾腫の抑制効果が認められ、脾臓重量の減少を認めた。

移植部位の骨髄 (left tibia) と他部位の骨髄 (反対側の脛骨と両側大腿骨: other bones) において 303-23 抗体を投与したマウスでは白血病細胞数の減少を認めた。脾臓と末梢血においても 303-23 抗体投与群において著明な白血病細胞数の減少効果を確認した。(図 7B)

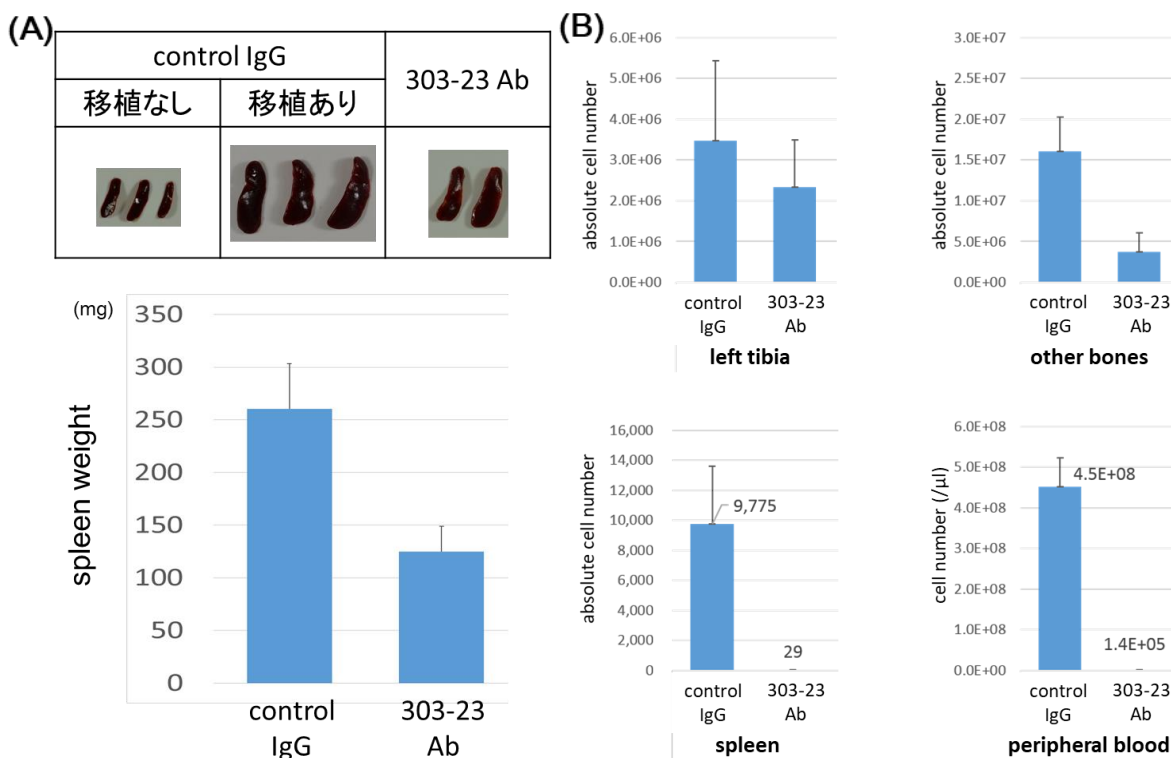


図7 303-23抗体の*in vivo*における抗白血病効果

- (A) 303-23抗体を投与した群において白血病細胞による脾臓の腫大が抑制された。
- (B) 303-23抗体を投与した群において骨髄、脾臓、末梢血の白血病細胞の数が著しく減少していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 藪田 精昭

ローマ字氏名： SONODA, Yoshiaki

所属研究機関名： 関西医科大学

部局名： 医学部

職名： 教授

研究者番号（8桁）： 60206688

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。