

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591386

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開発

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

研究代表者

保仙 直毅 (Hosen, Naoki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10456923

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)：研究においては、骨髄内に存在する“Myeloma-initiating cell”上に発現する細胞表面抗原の同定およびそれをターゲットにした抗体療法の開発を試みた。まず、さまざまな骨髄腫細胞株を抗原としてそれらに結合するモノクローナル抗体ライブラリーを作製し、その中から骨髄ストローマ細胞からの生存支持を阻害するMM1(仮名)抗体を同定した。その後、さらに抗骨髄腫モノクローナル抗体ライブラリーの作製を続け骨髄腫形質細胞特異的抗体を複数同定し、その認識抗原を発現クローニングにより同定した。これらの抗体により“myeloma-initiating cell”の排除が可能かどうかを検討中である。

研究成果の概要(英文)：We have already shown that "myeloma-initiating cells", which are the origin of the whole myeloma cells, exist within the CD19+CD38- plasma cell population. In this study, we aimed to identify cell surface antigens expressed on "myeloma-initiating cells" and target them with monoclonal antibody. Thousands of monoclonal antibodies that bind to several myeloma cell lines were first established. Next, we screened for antibodies that inhibit the support by bone marrow stromal cells, and found that MM1 antibody is a good candidate. Furthermore, we searched for antigens specifically expressed on myeloma cells but not on normal hematopoietic cells. We have identified several antibodies as candidates, and also isolated antigens recognized by them by using cDNA expression cloning. Now we are examining whether these antibodies can eliminate "myeloma-initiating cells" in vivo using xenograft models.

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：多発性骨髄腫 がん幹細胞 抗体療法

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は、最近の急速な治療の進歩にもかかわらず、依然として完治が困難である。その大きな理由として、骨髄腫前駆細胞/幹細胞が治療後に残存していることが考えられている。骨髄腫前駆細胞/幹細胞が CD19⁺B 細胞中に存在するのかが CD19-CD38⁺⁺形質細胞中に存在するのかは大きな論点であった(1)が、我々は、H21-22 年度における研究の結果(若手 B)、SCID-rab モデル(2) (SCID マウスの皮下に移植したウサギ骨の中にヒト骨髄腫細胞を移植する xenograft model)において、長期間骨髄腫クローンを増幅、維持する能力を持つ骨髄腫前駆細胞は、CD19-CD38⁺⁺形質細胞分画中に存在することを示した。

腫瘍幹細胞にある程度特異的に発現している細胞表面抗原を同定できれば、それに対する抗体による抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)/補体依存性細胞傷害(CDC)を介した細胞傷害が期待できる。我々はすでに多発性骨髄腫においてそのような抗原の探索を行い、それぞれ CD48 という候補抗原、抗体を得た。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄腫前駆細胞およびその源となる骨髄腫幹細胞は骨髄腫形質細胞中のどの細胞であるのかを明らかにし、さらにそれらを排除する方法の開発を試みた。

目的 1 CD48 抗体の in vivo での抗腫瘍効果の評価およびサル CD48 に交差結合する抗体の作製

まず、CD48 抗体が高い抗骨髄腫活性を有することを示すことを目的とした。さらに安全試験性試験を行うことを容易にするためサル CD48 にも結合する抗体を作製することとした。

目的 2 新規標的抗原の同定

1) 抗骨髄腫細胞モノクローナル抗体ライブラリーの作製、およびその中で骨髄由来ストローマ細胞への接着を阻害する新規モノクローナル抗体の同定

骨髄腫前駆細胞/幹細胞を含む骨髄腫形質細胞は、多くの場合、骨髄微小環境内でのみ生存可能であるため、骨髄内にそれらのニッチが存在し、それが骨髄腫前駆細胞/幹細胞の生存を支持していると考えられる。また、骨髄腫細胞株を用いた in vitro の実験より、骨髄腫細胞は骨髄ストローマ細胞への接着によりその生存が支持されることが示されている。そこで、骨髄腫前駆細胞/幹細胞は、骨髄ストローマ細胞に接着するために必要な細胞表面分子を数多く高発現しており、それらの発現をマーカーに骨髄腫前駆細胞/幹細胞が同定できるのではないかと考えた。

2) 多発性骨髄腫前駆細胞/幹細胞に特異的結合する抗体の同定

実用化に向けての大きなポイントは正常細胞における発現がないことである。そこで、われわれは、発現様式が骨髄腫前駆細胞/幹細胞に特異的である抗原の探索も行った。

3. 研究の方法

目的 1 CD48 抗体の in vivo での抗腫瘍効果の評価およびサル CD48 に交差結合する抗体の作製

Xenograft モデルを用いてわれわれが作製した抗 CD48 抗体の薬効評価を行った。さらに、サル CD48 の cDNA クローニングを行い、それを高発現させたマウス細胞でマウスを免疫源として、抗サル CD48 モノクローナル抗体を多数作製し、その中でヒト CD48 にも結合するものを選択した。そして、その in vitro、マウスモデル in vivo での抗腫瘍効果の評価を行い、安全性試験を行うべき候補抗体を選択した。

目的 2 新規標的抗原の同定

1) 抗骨髄腫細胞モノクローナル抗体ライブラリーの作製、およびその中で骨髄由来ストローマ細胞への接着を阻害する新規モノクローナル抗体の同定

骨髄腫細胞の骨髄ストローマへの接着に関与する分子を同定するためには、簡易な in vitro モデルが必要と考えた。まず、骨髄腫細胞株として、SCID-rab マウスに移植した際に骨髄微小環境依存性に生着、増殖することが分かっている INA-6 細胞を用いることとした。次に、INA-6 細胞に対して生存支持作用を示す骨髄由来ストローマ細胞を探索したところ、間葉系幹細胞(Lonza 社より購入)が最も著明な支持作用を示すことを見出した。さらに、間葉系幹細胞に接着した INA-6 細胞は抗骨髄腫薬であるボルテゾミブに対し強い耐性を示すことを見出し、分泌因子のみでなく、直接的な接着が間葉系幹細胞による INA-6 細胞の生存支持において、重要な機能的役割を持っていることが示唆された。そこで、そこで、まず、INA-6 細胞上に発現する分子のうち、間葉系幹細胞から生存支持を受けるために必要な細胞表面分子を同定することにした。具体的には、抗 INA-6 細胞抗体ライブラリーを作製し、その中から、間葉系幹細胞による INA-6 細胞の生存支持を阻害しうる抗体を同定することを試みた。選択された候補抗体については、その抗原を cDNA 発現クローニングおよび Mass spectrometry を用いて同定することを試みた。

2) 多発性骨髄腫前駆細胞/幹細胞に特異的結合する抗体の同定

さらに多くの骨髄腫細胞株を抗原として抗骨髄腫抗体を作製し、非常に多数の候補抗体を得た。次に、選択された抗体を用いて、骨髄腫患者検体数例と健康人末梢血を染色し、多発性骨髄腫前駆細胞/幹細胞に特異的結合

する抗体を同定した。選択された候補抗体については、その抗原を cDNA 発現クローニングおよび Mass spectrometry を用いて同定することを試みた。

3. 研究成果

目的1 CD48 抗体の in vivo での抗腫瘍効果の評価およびサルCD48に交差結合する抗体の作製

Xenograft モデルを用いてわれわれが作製した 1B4 という抗 CD48 抗体の薬効評価を行い、著明な抗腫瘍効果を確認した。その効果は皮下腫瘍移植モデルだけでなく、骨髄内に移植した骨髄腫細胞に対しても明らかであった。さらに、サルCD48のcDNAクローニングを行うため、医薬基盤研究所霊長類センターからサル末梢血の供与を受け、サルCD48のcDNAクローニングに成功した。次いで、それを高発現させたマウス BaF3 細胞を作製した。ヒトCD48を強制発現させた BaF3 細胞はすでに以前に作製しており、この両者を抗原としてマウスを免疫し、モノクローナル抗体の作製を行い、4-15-2 というクローンがサルとヒトのCD48に交差結合し、しかも非常に強い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

目的2 新規標的抗原の同定

1) 抗骨髄腫細胞モノクローナル抗体ライブラリーの作製、およびその中で骨髄由来ストローマ細胞への接着を阻害する新規モノクローナル抗体の同定

まず、骨髄腫細胞株 INA6 を抗原として抗骨髄腫モノクローナル抗体ライブラリー約 1000 クローンを作製した。INA6 細胞は骨髄由来ストローマ細胞と共培養すると生存が支持されアポトーシスを起こしにくくなる。そこで、そのストローマからの支持作用を受けるために必要な細胞表面分子を抗体を共培養系に加えることによりスクリーニングした。その結果 MM1 (仮名) 抗体を候補抗原として得た。

2) 多発性骨髄腫前駆細胞/幹細胞に特異的結合する抗体の同定

われわれは、さらに 6 種類のヒト骨髄腫細胞株を抗原として非常に多数 (約 10,000 クローン) の抗骨髄腫抗体を作成し、その中で正常血球には結合せず骨髄腫細胞株に特異的に結合する抗体を選択した。そのようにして得られた抗体の中から実際の骨髄腫患者検体において高頻度に腫瘍細胞に結合するものを選択して候補抗体とした。さらに、その候補抗体の多くに関して、すでに結合抗原を cDNA 発現クローニングにより同定した。

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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Hosen N, Sugiyama H. [Identification of myeloma-initiating cells and development of their targeting therapy]. Rinsho Ketsueki. 2013;54(6):505-512.
2. Hosen N. Multiple myeloma-initiating cells. Int J Hematol. 2013;97(3):306-312.
3. Hosen N, Matsuoka Y, Kishida S, et al. CD138-negative clonogenic cells are plasma cells but not B cells in some multiple myeloma patients. Leukemia. 2012;26(9):2135-2141.
4. Hosen N, Ichihara H, Mugitani A, et al. CD48 as a novel molecular target for antibody therapy in multiple myeloma. Br J Haematol. 2012;156(2):213-224.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 保仙 直毅 Analysis of escape mechanism from tumor immunity in leukemia-initiating cells using mouse leukemia models induced by MLL-ENL oncogenes 幹細胞シンポジウム、2012/5/31
2. 保仙 直毅 Clonogenic Multiple Myeloma Cells 日本血液学会国際シンポジウム、2012/5/26
3. 保仙 直毅 Origin of the myeloma initiating cells and development of its targeting therapies 日本血液学会総会 2012/10/21
4. 保仙 直毅 CD48 as a novel molecular target for antibody therapy in multiple myeloma Keystone Symposium、2013/1/30

〔図書〕(計 3 件)

1. 保仙 直毅
骨髄腫幹細胞
多発性骨髄腫治療マニュアル
南江堂、東京、pp12-16、2011
2. 保仙 直毅
多発性骨髄腫幹細胞攻略のストラテジー
実験医学増刊 がん幹細胞
羊土社、東京、pp46-52、2011
3. 保仙 直毅
造血器腫瘍におけるがん幹細胞を標的とした抗体医薬の開発

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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 寄附講座
准教授
研究者番号：10456923

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：