

## 令和 5 年度 学内研究助成金 研究報告書

研 究 種 目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
研 究 課 題 名	MRD として残存する CD34 陽性骨髄腫細胞に対する新規治療法と骨髄腫幹細胞の同定	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部内科学教室（血液・膠原病内科部門） 芹澤 憲太郎 共同研究者：なし	

### 1. 研究目的・内容

多発性骨髄腫（multiple myeloma, MM）は、難治性の腫瘍であり、病態解明と新規薬剤の開発が急務である。申請者らは、CD38+138+45-19-で定義した MM 細胞（MM cell, MC）の Side Population 中に、造血幹/前駆細胞のマーカー CD34 を発現する MC 集団が濃縮されていることを見出した。CD34+MC は、clonogenic であり、異種移植実験において長期間生着した。また、治療後の微小残存病変（minimal residual disease, MRD）中に高比率に存在する治療抵抗性の集団であった。

新規治療薬の開発を目的として、CD34+MC の増殖・生存機構を明らかにするために、まずは、腫瘍免疫環境として免疫チェックポイント分子の発現変化と制御機構を解析した。前報告の際に行った実験において、CD34+MC の一部の症例において、PD-L1、PD-L2 の発現を認めており、更なる詳細な解析を行い、より高発現する免疫チェックポイント分子を同定する事は治療標的を検索することにおいて重要となる。新規発症 MM（newly diagnosed MM, NDMM）と再発難治性 MM（relapsed refractory MM, RRMM）のサンプルを用いて検証を行った。

また、これまでの検討で、SCF, IL-3, G-CSF, GM-CSF EPO を含有したメチルセルロース培地を用いた場合、CD34-MC は colony 形成能を示さなかったが、CD34+ MC は colony 形成能を示した。CD34+MC を各サイトカイン添加液体培養する際にサイトカインを 1 種ずつ抜いたところ、GM-CSF を抜いた場合に細胞増殖が著明に低下した。また、CD34+MC 表面には、IL-3, G-CSF, GM-CSF 受容体が CD34-MC と比較して高発現しており、IL-3/IL-5/GM-CSF に共通する受容体 common  $\beta$  chain も CD34+MC で高発現していた。さらに、CD34+MC に対する JAK2 のリン酸化を調べたところ、ルキソリチニブで抑制されることが示された。

これらの結果をもとに、本研究では、以下の点を明らかにする。

1. CD34+MC における免疫チェックポイント分子の発現と制御機構の解析
2. ルキソリチニブの CD34+MC に対する増殖・生存に及ぼす効果の検証

MM 治療において、MRD 陰性を達成する事は全生存率、無増悪生存期間の延長に繋がる事が知られている。MRD を根絶することが、MM を根治させる上で非常に重要となる。一方、MM はヘテロな腫瘍集団であり、治療抵抗性の機序も一様ではない。

本研究は腫瘍免疫環境と CD34+MC が有する特性に注目し、両方面からの治療開発に向けたアプローチとして実験を実施した。

## 2. 研究経過及び成果

### 1. CD34+MCにおける免疫チェックポイント分子の発現と制御機構の解析

CD34+MCにおいて、高発現する免疫チェックポイント分子を探索するために、フローサイトメトリーを用いて、CD34-MCをコントロールとして解析を行った。12名のNDMM、15名のRRMMのサンプルを用いて、以下の代表的な免疫チェックポイント（CD112、CD86、CD275、GAL9、CD270、CD274、HLA-DR、CD319、CD137L、CD200）を評価した。結果として、NDMMとRRMM共にCD112、CD270、CD275、GAL9、CD137の発現はCD34-MCに比べてCD34+MCで有意に高かった。また、HLA-DRはRRMMのみでCD34-MCに比べてCD34+MCで有意に増加を示した（図1）。しかし、NDMMとRRMMでの有意差は認めなかった。

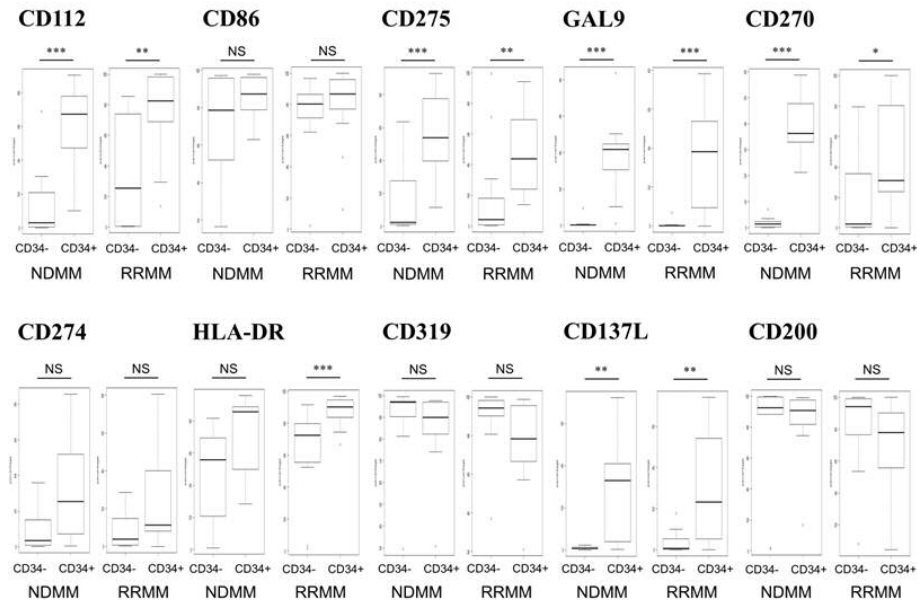


図1. CD34+MC, CD34-MCにおける免疫チェックポイント分子の比較

\* $P < .05$ , \*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ , NS: not significant

NDMM; newly diagnosed multiple myeloma, RRMM; relapsed refractory multiple myeloma

次に免疫チェックポイント分子の解析で用いたNDMMの骨髄中CD3陽性T細胞を用いて、CD34+MM細胞で発現増加を示したCD112、CD270、CD275、CAL9、CD137L、およびHLA-DRに対応するT細胞上の分子の発現を評価した。これらの分子は、CD112ではTIGIT、CD270ではBTLA、GAL9ではTim-3、CD137ではCD137L、HLA-DRではLAG3にそれぞれ対応することが報告されている。5名のNDMMと対照群として5名の健常ドナー（HD）のT細胞におけるこれらのチェックポイント分子の発現率をフローサイトメトリーで解析したところ、CD8陽性T細胞上でTIGITとCD137の発現率はHDよりもNDMMで有意に高かった（図2）。上記2つの結果よりTIGIT抗体とCD137抗体は、治療抵抗性集団であるCD34+MCに効果を示す可能性が示唆された。

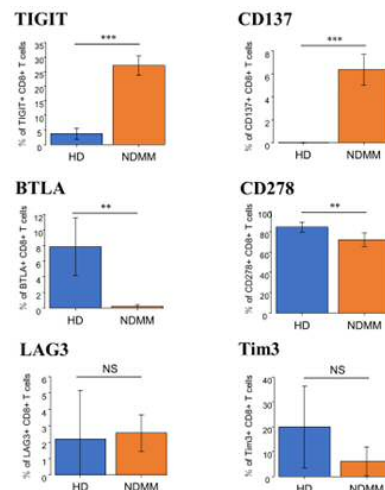


図2. NDMMの骨髄CD8+T細胞上の発現分子の変化

\*\* $P < .01$ , \*\*\* $P < .001$ , NS: not significant

NDMM; newly diagnosed multiple myeloma

## 2. ルキシロチニブの CD34+MC に対する増殖・生存に及ぼす効果の検証

これまでの実験結果より CD34+MC に対して、ルキシロチニブは腫瘍の増殖や生存に作用を及ぼす可能性が示唆された。in vitro と in vivo によるルキシロチニブの CD34+MC に対する増殖・生存に及ぼす効果を検証した。

まず、6名のNDMMのサンプルを用いて、CD34+MCとCD34-MCに、レナリドミド (Len, 2 μM)、ボルテゾミブ (Bor, 1nM)、ルキシロチニブ (Rux, 10nM)、ルキシロチニブとレナリドミドの併用療法、ルキシロチニブとボルテゾミブの併用療法、コントロールとしてDMSOをそれぞれ添加し、4日間培養後にATP assayを行い、6群で比較した。その結果として、CD34-MCではルキシロチニブの腫瘍に対する効果は確認できなかったが、CD34+MCにおいて、ルキシロチニブ単剤での腫瘍抑制とレナリドミド、ボルテゾミブとの併用療法では更なる抑制効果を示した (図3)。

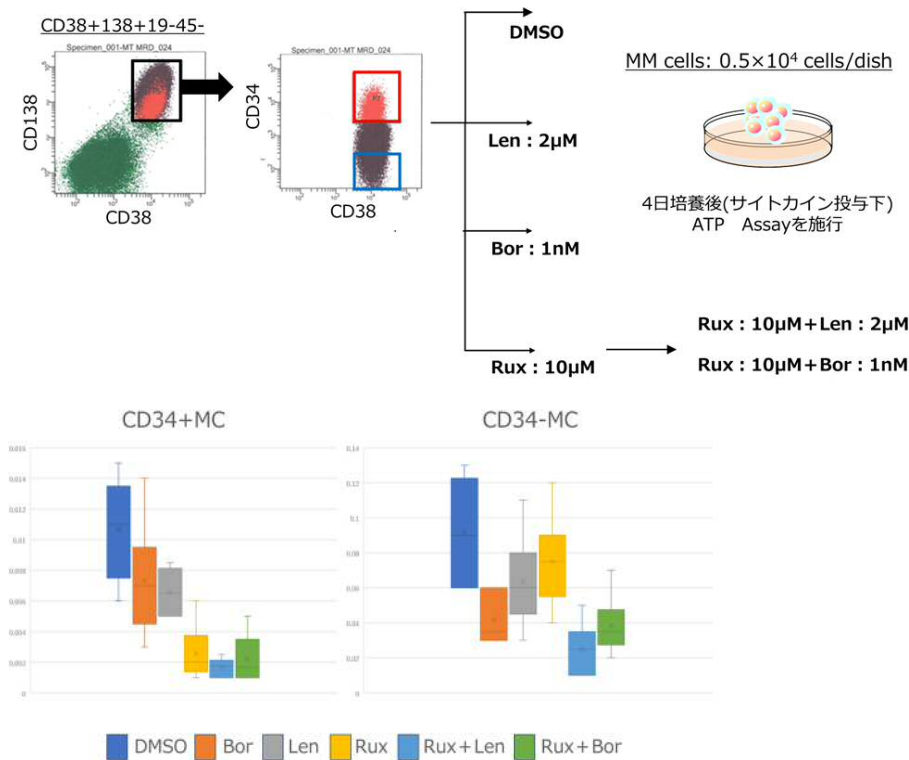
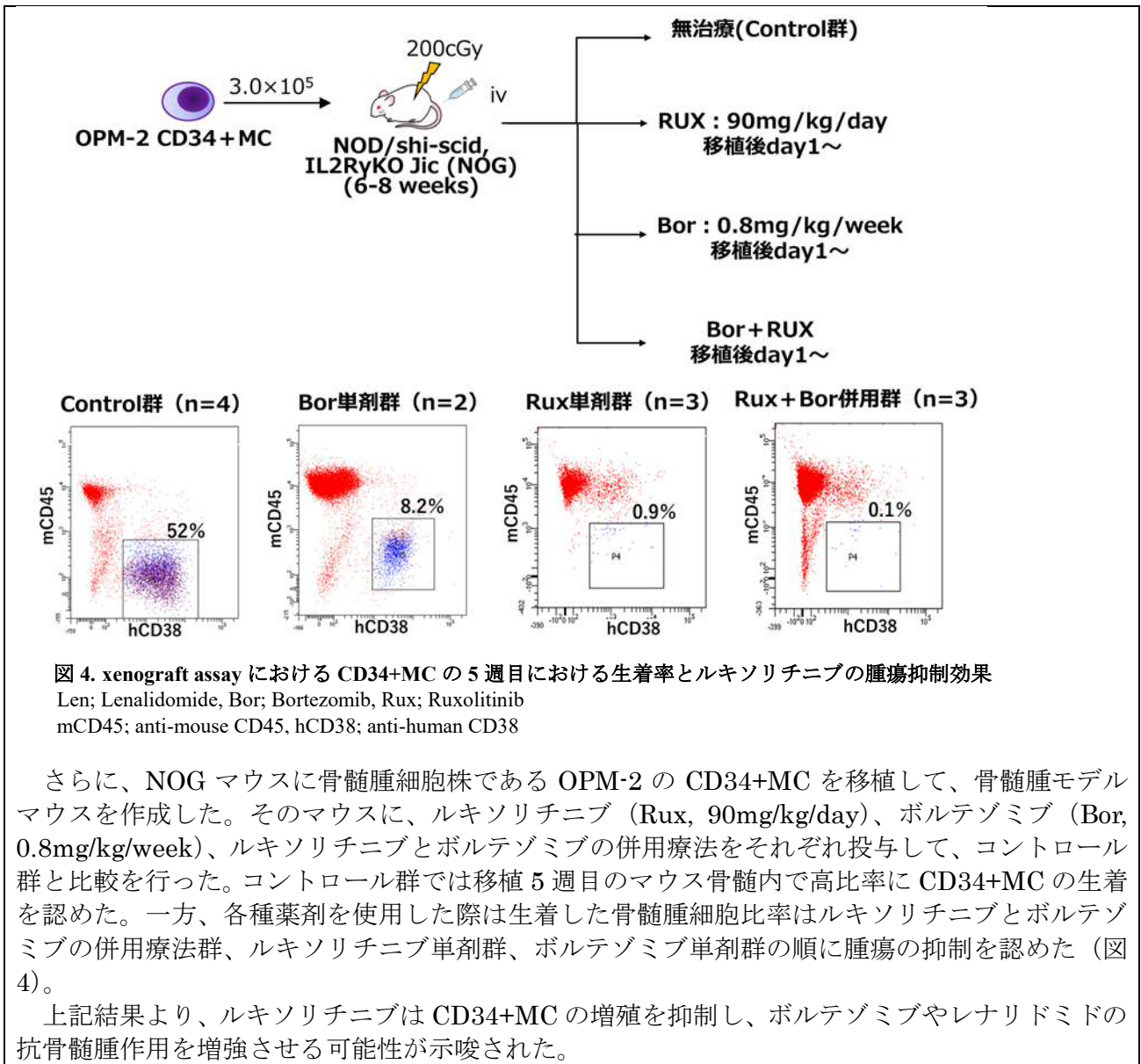


図3. CD34+MC に対する薬剤感受性の検討

Len; Lenalidomide, Bor; Bortezomib, Rux; Ruxolitinib



### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

CD34+MC に GM-CSF を添加後、マイクロアレイ解析を行い、Ingenuity Pathways Analysis を行い、CD34+MC 特異的な細胞内増殖シグナルを明らかにし、新たな治療標的を同定する。

初発時、治療後奏効、難治、再発例の患者骨髄から CD34+MC を分離し、シングルセル RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing) 用ライブラリーを作成し、イルミナの HiSeq 2000 により、遺伝子の DNA メチル化パターンを比較することで、CD34+MC の治療抵抗性の分子機構を明らかにする。さらに、同一患者由来の CD34+MC における DNA メチル化のランドスケープと比較することで、可塑性に関わる分子群を同定する。また、脱メチル化酵素阻害薬、HDAC 阻害薬などのエピジェネティクス制御薬で CD34+MC、CD34+MC で処理した場合、それぞれの特性がどのように変化するかを解析する。

また、MM 患者の造血幹/前駆細胞 (CD34+38-45dim) 分画は正常細胞と異なり、サイトカイン非存在下で自律的にコロニーを形成する事を発見している。CD34+MC よりさらに骨髄腫幹細胞に近い集団の可能性があり、全エクソン解析にて遺伝子異常を同定し、MM 細胞と比較することで MM の発症・進展機構を明らかにする。また、全トランスクリプトームによって特性を明らかにする。得られた遺伝子変異が同一患者の CD34+MC にも認められるかを解析することで、CD34+MC が CD34+38-45dim を起源とする細胞群なのかを明らかにする。さらに、CD34+38-45dim のシングルセル PCR 解析を行い、遺伝子変異を有する細胞と有さない細胞に発現する表面抗原を網羅的に比較解析することで、遺伝子変異を有する CD34+38-45dim 特異的に発現する表面抗原を同定する。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)