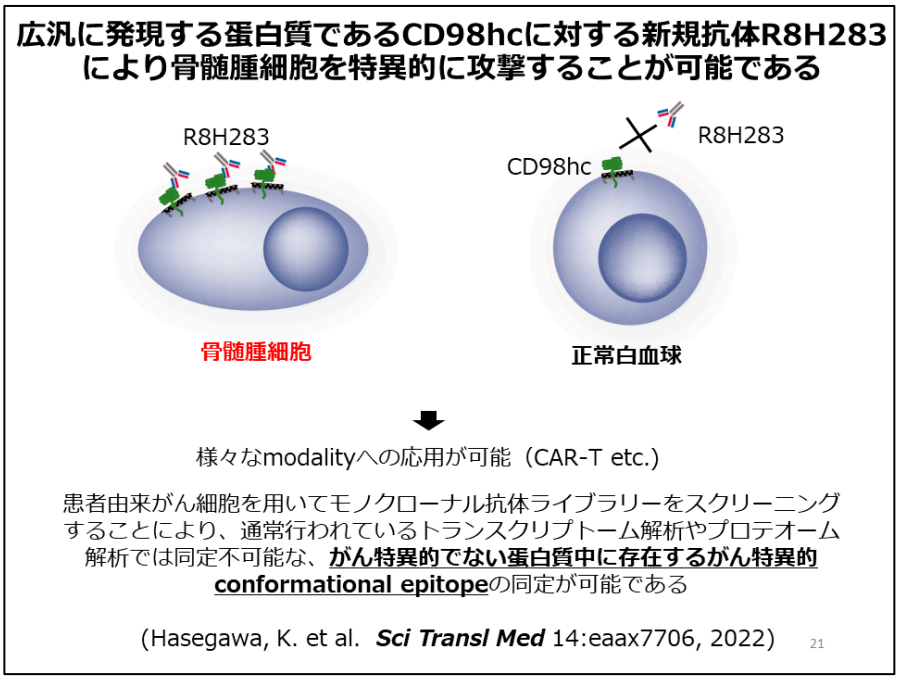
68　多発性骨髄腫の微小残存病変を排除する治療法の開発	保仙　直毅

【目的】多発性骨髄腫は代表的な血液がんであり、プロテアソーム阻害剤、免疫調整薬（レナリドミド等）、抗体医薬の導入により予後の改善は著しい。しかし、治癒は極めて稀であるのが大きな問題であり、微小残存骨髄腫細胞を排除し、骨髄腫患者を治癒に導く方法の開発が望まれている。その一つとして、CAR-T 細胞は有望であり、世界中で開発が進められている。我々は骨髄腫の治癒を目指した治療として活性型インテグリンβ7 を標的とした CAR-T 細胞（MMG49 CAR-T 細胞）を開発した。今後、更に多くの治療標的抗原を同定し、複数の抗原を標的とした CAR-T 細胞治療が進んでいくと考えられ、新たな骨髄腫特異的抗原の同定が必要である。そこで、本研究において我々は、新たな多発性骨髄腫特異的抗原の同定を目指した。

【方法および結果】多発性骨髄腫特異的な細胞表面抗原は、抗体治療及びその派生物である CAR-T 細胞治療などの理想的な治療標的である。しかし、トランスクリプトーム解析を使用した広範な努力の結果、骨髄腫細胞に特異的に発現する遺伝子にはもはや未同定なものは残っていないと考えられる。そこで、我々は蛋白質の翻訳後変化によって形成される骨髄腫特異抗原の同定を目指して、自作した 10,000 を超える抗骨髄腫細胞モノクローナル抗体をスクリーニングし、骨髄腫細胞に結合するが、正常な造血細胞または非造血細胞には結合しない抗体として R8H283 を同定した。R8H283 は CD98hc を認識したが、CD98hc 蛋白質を発現する正常な血液細胞には結合しなかったことから、何らかの骨髄腫に特異性の高いエピトープを認識していると考えられた。正常な白血球に発現している CD98hc は、骨髄腫細胞で発現される CD98hc とは、付着しているN型糖鎖に大きな違いがあることが明らかになった。また、N型糖鎖の成熟に必要な酵素を欠損する細胞では、R8H283 の結合が優位に上昇した。これらのことから、CD98hc に付着する N 型糖鎖構造の違いが、R8H283 が正常血球に結合しない原因となっている可能性が強く示唆された。R8H283 の投与はマウスでの異種移植モデルにおいて、有意な抗骨髄腫効果を発揮した。これらの発見は、R8H283 が骨髄腫に対する新しい治療用抗体の候補であり、CAR-T 細胞などへの応用が期待されることを示している。また、患者由来がん細胞を用いてモノクローナル抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより、通常行われているトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析では同定不可能な、がん特異的でない蛋白質中に存在するがん特異的 conformational epitope の同定が可能であることを改めて示した。

多発性骨髄腫に対する新規治療用抗 CD98hc 抗体



68. 多発性骨髄腫の微小残存病変を排除する治療法の開発

保仙　直毅

大阪大学 大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

Key words：多発性骨髄腫，抗体療法，CAR-T 細胞，CD98hc，糖鎖修飾

緒　言

多発性骨髄腫（MM）は代表的な血液がんであり、プロテアソーム阻害剤、免疫調整薬（レナリドミド等）、抗体医薬の導入により予後の改善は著しい。しかし、治癒は極めて稀であるのが大きな問題であり、血清学的に寛解あるいはそれに近い状態となっても、多くの症例ではMM 細胞をフローサイトメトリーで解析すれば、微小残存 MM 細胞が同定される。それらを排除し、MM 患者を治癒に導く一つの方法として、CAR-T 細胞は有望であり、世界中で開発が進められている。我々は MM の治癒を目指した治療として活性型インテグリンβ7 を標的とした CAR-T 細胞（MMG49 CAR-T 細胞）を開発した［1］。今後、更に多くの治療標的抗原を同定し、複数の抗原を標的とした CAR-T 細胞治療が進んでいくと考えられ、まだまだ、新たな MM 特異的抗原の同定が必要である。そこで、本研究において我々は、新たな多発性 MM 特異的抗原の同定を目指した。

方法および結果

1. 多発性骨髄腫特異的 mAb としての新規抗 CD98 抗体 R8H283 の同定

最初に、さまざまな MM 細胞株に結合するモノクローナル抗体（mAb）を分泌する 10,000 を超えるハイブリドーマを確立した。次に、それらの中から、健常人ドナーからの末梢血単核細胞（PBMC）に対する反応性を欠いた mAb を産生する約 500 のハイブリドーマを選択した。そして、MM 患者の骨髄（BM）細胞をそれらの候補 mAb で染色し、最終的に R8H283 を MM 特異的 mAb として同定した（図 1）。MM 細胞への R8H283 の結合は、調べた 34 人の MM 患者のうち 27 人で観察された。

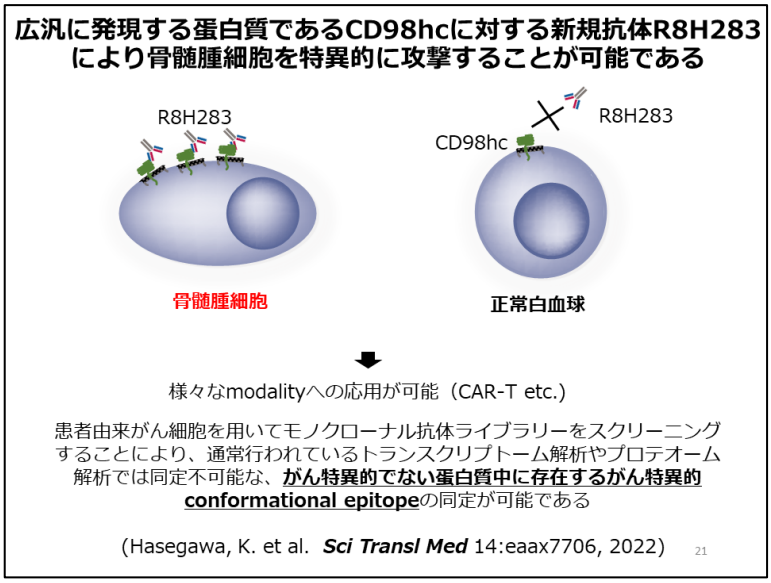


図 1. 多発性骨髄腫に対する新規治療用抗 CD98hc 抗体

R8H283 によって認識される抗原は、レトロウイルスを使用した発現クローニング法によって同定した。具体的には、RPMI8226 細胞（R8H283 陽性）から作製した cDNA ライブラリーを、レトロウイルスを使用して BaF3 細胞（R8H283 陰性）に感染させ、R8H283 で標識された細胞を FACS で濃縮した。R8H283 陽性に導入されているインサート cDNA の配列決定により、R8H283 が CD98 hc を認識していることが分かった（図 1）。

2. R8H283 は、正常な白血球および非造血組織で発現する CD98 タンパク質とは反応しない

既存の抗 CD98hc 抗体である MEM-108 で染色すると、すべての白血球で CD98hc の発現が検出された。対照的に、R8H283 は正常な白血球と反応しなかった。MM 患者の BM 細胞では、R8H283 は MM 細胞にのみ結合したが、MEM-108 は $CD34^{+}$造血幹／前駆細胞を含むすべての BM 細胞に結合した（図 2）。

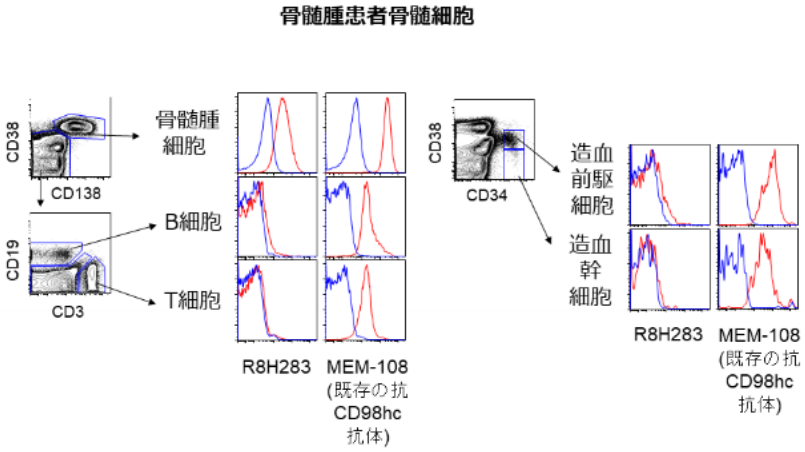


図 2. R8H283 は正常血液細胞に発現する CD98hc には結合せず骨髄腫細胞のみに結合する
骨髄腫患者骨髄腫細胞中の各細胞分画への R8H283 および既存の抗 CD98hc 抗体（MEM-108）の結合をフローサイトメトリーにより解析した一例。

3. R8H283 は CD98hc と CD98 軽鎖のヘテロダイマーに結合する

MEM-108 は、ヒト細胞で発現した可溶性組換え CD98hc 細胞外領域と反応するのに対して、R8H283 は結合しなかった。また、R8H283 は、R8H283 エピトープ領域内の N-グリコシル化部位が変異した組換え CD98hc、またはキフネンシン処理または N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I（GnTI）欠損 293 細胞で発現した組換え CD98hc に結合しなかった。これらの結果は、N 型糖鎖の変化に関係なく、R8H283 が CD98hc 単量体には結合しないことを示している。MM 細胞溶解物から R8H283 で免疫沈降した CD98hc 種の電気泳動移動度は、非還元条件下では還元条件下よりも低く、R8H283 は CD98hc アミノ酸トランスポーターである軽鎖とのヘテロダイマーとのみ結合していることが示唆された。実際、R8H283 の反応性は CD98 軽鎖である *LAT1* 欠損 MM 細胞で完全に失われた。

4. 正常な白血球で発現する CD98hc グライコフォームは、MM 細胞で発現するものと大きく異なる

MM 細胞と正常白血球で発現する CD98hc 種の電気泳動移動度は異なるが、PNGase F 処理により N 型糖鎖を除去すると同じになった（図 3）。このことは、正常白血球が MM 細胞で発現したものとは異なる CD98hc グライコフォームを発現していることを示している。また、高マンノース型 N 型糖鎖構造を生成する *GnTI* 欠損細胞では、R8H283 に対する反応性が増加するが、MEM-108 に対する反応性は増加しないこともわかった（図 4）。これらの結果は、N-グリコシル化の違いが R8H283 の反応性に影響を与える可能性があることを強く示唆している。

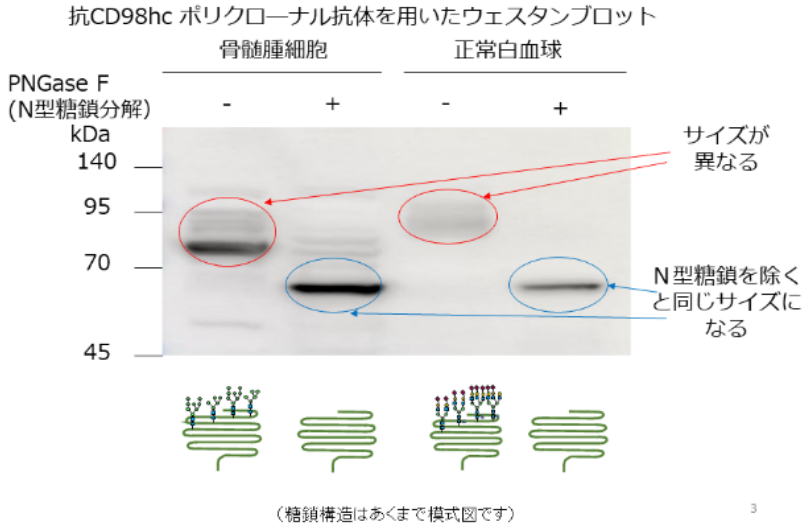


図 3. 骨髄腫と正常白血球では発現している CD98hc glycoform が異なる

骨髄腫患者由来骨髄腫細胞および正常白血球の cell lysate を SDS-PAGE 電気泳動にて分離したのち、抗 CD98hc ポリクローナル抗体を用いて western blotting を行った。N 型糖鎖を分解する PNGaseF で処理してから泳動したものを並べて流している。

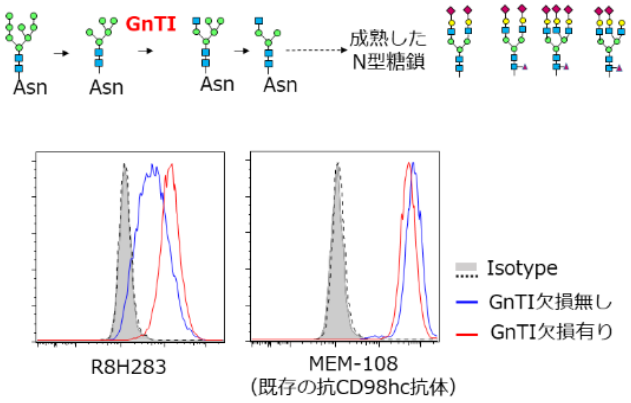


図 4. N 型糖鎖の伸長に必要な *GnTI* 欠損細胞では CD98hc 自体の発現は変化しないが R8H283 への結合が上昇する

（上）N 型糖鎖の成熟過程を示したシェーマ。

（下）*GnTI* 欠損 293T 細胞に対する R8H283 および既存の抗 CD98hc 抗体（MEM-108）の結合をフローサイトメトリーにて解析した結果。

5. R8H283 は、正常な造血細胞に損傷を与えることなく、有意な抗 MM 効果を発揮する

R8H283 は、MM 細胞に対する抗体依存性細胞傷害（ADCC）および補体依存性細胞傷害（CDC）を引き起こした。対照的に、通常の PBMC は、R8H283 の存在下で ADCC または CDC を介して溶解されなかった。MM 細胞の増殖はエフェクター細胞または補体の非存在下で R8H283 によって阻害されなかった。これは、R8H283 がアミノ酸トランスポーターとしての CD98hc-軽鎖複合体の機能を阻害する可能性が低いことを示唆している。CD98hc はインテグリンβ1 と関連しており、そのシグナルを調節すると報告されているが、R8H283 処理は、インテグリンβ1 のリガンドである VCAM-1 への MM 細胞の接着を阻害しなかった。SCID マウスを用いた皮下 MM 腫瘍モデルにおいて R8H283 は強い抗骨髄腫効果を示した（図 5）。

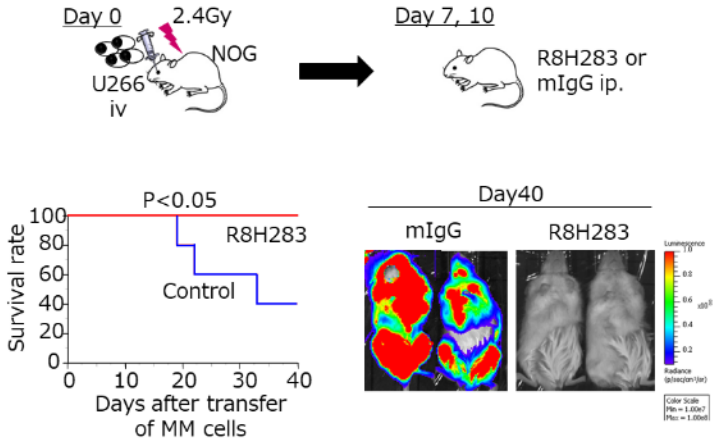


図 5. R8H283 抗体治療の著明な抗骨髄腫効果

（上）R8H283 抗体治療実験の概要を示すシェーマ。

（左下）R8H283 および control IgG 投与群の生存曲線。Log Rank test、P＜0.05。

（右下）R8H283 および control IgG 投与群の腫瘍の広がり IVIS を用いて解析した結果。

考　察

R8H283 は、正常な白血球に損傷を与えることなく MM 細胞を標的にすることができ、抗体療法のみならず、CAR-T 細胞など様々な応用が期待される。さらに、LAT1 は、アミノ酸摂取の過剰な必要性のために、いくつかのタイプの癌でも高度に発現しており、R8H283 は MM 細胞以外の癌細胞とも反応する可能性がある。

我々の結果は、R8H283 が MM に対する mAb を基にした治療の新しいソースであることを示しているだけでなく、がん患者検体を用いて mAb ライブラリーをスクリーニングすることにより、トランスクリプトームまたはプロテオーム分析では同定できない癌特異的な conformational エピトープが同定できるということを改めて実証している［2］。現在他の様々ながん種に対して同様の試みを続けている。

謝　辞

臨床検体の提供に同意いただいた数多くの患者さんに感謝いたします。

文　献

1） Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, et al. The activated conformation of integrin beta7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. *Nat Med.* 2017;23(12):1436-1443. doi: 10.1038/nm.4431.

2） Hasegawa K, Ikeda S, Yaga M, et al. Selective targeting of multiple myeloma cells with a monoclonal antibody recognizing the ubiquitous protein CD98 heavy chain. *Sci Transl Med.* 2022;14(632):eaax7706. doi: 10.1126/scitranslmed.aax7706.