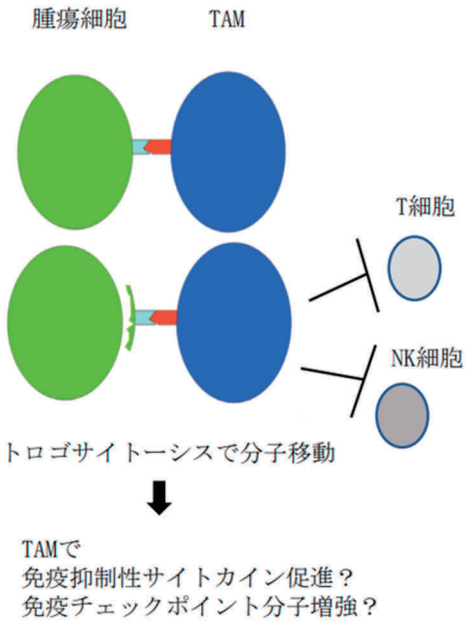
221　骨髄腫細胞とマクロファージの接触に注目した治療開発	川島　雅晴

【目的】腫瘍の形成・進展には、腫瘍細胞と微小環境の相互作用が重要である。以前著者はホジキンリンパ腫と腫瘍関連マクロファージ（TAM）の直接接触で、トロゴサイトーシスという細胞同士の直接接触を介した膜移動が生じ、ホジキンリンパ腫の PD-L1／L2 が単球／TAM に受け渡され、この PD-L1／L2 が $CD3^{+}$T 細胞活性の抑制を導いてがん進展に寄与する可能性を示した（図参照）。今回同じ血液がんであり単球／TAM の重要性が示唆されていた多発性骨髄腫と、マクロファージの接触に着目した。*In vitro* でまずは骨髄腫細胞株とマクロファージを直接接触させ、骨髄腫からマクロファージに移る分子を、RNA-seq や膜蛋白解析を行うことで、mRNA は変化ないが蛋白で上昇した因子に注目することを目的とした。まずそのための条件検討を行った。

【方法】以下の検討を行った。1）効率よくトロゴサイトーシスが発生する骨髄腫細胞株の同定を試みた。代表的な骨髄腫細胞株である RPMI8226、MM1S、KMS-11、OPM-2 において、公共データベースを用いた RNA 発現解析量解析とパスウェイ解析を行い、トロゴサイトーシスに関与する遺伝子発現が多い細胞株を検討した。2）蛋白解析を行うためには、腫瘍細胞の蛋白を効率よく回収する系の確立が必要であり、細胞膜に存在する ATP1A1 に注目した。まずは HeLa 細胞において ATP1A1 を過剰発現させ APEX を用いてラベリングすることが可能ならば、今後骨髄腫細胞でも同様の系を用いて膜蛋白回収が可能と考え検討した。3）さらに多発性骨髄腫患者において末梢血の単球の推移と予後の関連を、現在の骨髄腫治療において標準治療である DRd 療法でも重要であることを示せば、治療と単球／TAM の関連が密接にあり本研究の意義が高まると考えられ、DRd 療法を行った当施設における患者と単球の推移についての検討を行った。

【結果】以下の結果を得た。1）RPMI8226 がトロゴサイトーシスに関与の深い「微小管細胞骨格の制御」についての遺伝子発現が多いことが明らかとなり、今後は RPMI8226 を用いることとした。2）Flag-APEX-ATP1A1 を過剰発現させた HeLa 細胞においてバンドが確認でき、今後この系を用いて膜蛋白解析を進めることとした。3）DRd 療法施行前と比べ、施行後単球が減少した際は予後不良となることが明らかとなった。今後本研究を進めていくにあたり、治療による影響、また骨髄腫の抗体薬自身がトロゴサイトーシスを起こすことも知られており この影響も加味して、解析を進める必要性が示唆された。

マクロファージへ移った分子の意義を検討する



221. 骨髄腫細胞とマクロファージの接触に注目した治療開発

川島　雅晴

東京慈恵会医科大学 腫瘍・血液内科

Key words：多発性骨髄腫，マクロファージ，直接接触，がん微小環境

緒　言

腫瘍の形成・進展には腫瘍細胞と微小環境の相互作用が、重要であることが明らかとなっている。近年腫瘍細胞そのものではなく、こうした非腫瘍細胞を標的とする治療は患者への負担の少ない低侵襲の治療となりうるため、注目されている［1］。特に腫瘍関連マクロファージ（TAM）は様々な機構により腫瘍形成を促進することが分かっているが、いまだ TAM を標的とする十分な治療は開発されていない。具体的には腫瘍の放出するサイトカインの一つで、マクロファージ分化に重要とされる CSF1 の受容体阻害剤など、治療標的になり得るか試みられていたものの薬効は限られていた。

我々は TAM に作用するサイトカインなどの液性因子ではなく、腫瘍細胞と単球／TAM の直接接触そのものに注目し、以前に悪性リンパ腫の一つであるホジキンリンパ腫において、トロゴサイトーシスという細胞接触による免疫細胞間の細胞膜移動ががんの進展に密接に関わり得ることを見出した。具体的にはリンパ腫細胞から単球／TAM へトロゴサイトーシスで PD-L1／L2 が移動し、この PD-L1／L2 が $CD3^{+}$T 細胞活性の抑制を導き、がん進展に寄与する可能性を示した［2］。

多発性骨髄腫は形質細胞の腫瘍であり、近年その病態形成や進展にがん微小環境が関わることが明らかとなっている。骨髄腫は B 細胞・NK 細胞・T 細胞・樹状細胞の異常、免疫抑制に関与する制御性 T 細胞や骨髄由来抑制細胞の増加が見られ、病勢進行に寄与する［3］。抗体治療として形質細胞に発現する CD38 に対するダラツムマブ（Dara）などの抗体薬や、免疫調節薬の一種であるレブラミド（LEN）などの免疫超節約（IMiDs）が、近年骨髄腫治療の中心となり、Dara、LEN にステロイドを組み合わせた DRd 療法は 2017 年に承認され標準治療の一つとなっている。Dara、LEN は免疫抑制細胞障害・免疫賦活化の作用を持ち、治療効果に密接に関連することが知られている［4］。 多発性骨髄腫と単球／TAM においても、骨髄内で腫瘍細胞周囲の TAM 浸潤量が多いほど予後不良であることが明らかとなっている［5］。また骨髄腫細胞から単球へトロゴサイトーシスは生じ、病態に関わることが示されている［6］。以上より骨髄腫細胞から TAM への接触に着目した。*In vitro* で骨髄腫細胞株とマクロファージを直接接触させ、骨髄腫からマクロファージに移る分子を、RNA-seq や膜蛋白解析を行うことで、mRNA は変化ないが蛋白で上昇した因子に注目することとした。膜蛋白解析を行う上で、まずそのための条件検討を行った。また骨髄腫の新規治療である DRd 療法が実際単球／TAM にどのように影響するかは明らかとはなっておらず、DRd 療法を行った患者の単球の推移について検討した。

方　法

1. トロゴサイトーシスが効率よく見られる骨髄腫細胞株の検討

骨髄腫細胞における膜蛋白回収が困難であったため、効率よくトロゴサイトーシスが見られる骨髄腫細胞株の検討が必要となった。骨髄腫細胞株である RPMI8226、MM1S、KMS-11、OPM-2 について、公共データベースを用いた RNA 発現解析を行った。RNA-seq は NCBI（National Center for Biotechnological Information）のデータベースに登録されているデータ（登録番号 SRR8615354、SRR8615877、SRR8616028、SRR8616070）

を用いた。ゲノムデータのアライメントに必要なリファレンスゲノム配列としては、GRCh38 を用いた。リファレンス後の転写産物の発現量を定量するためのアセンブリツールとしては Stringtie2 を用いた［7］。RNA 発現量の高い上位 1,000 個の遺伝子を抽出した上で、パスウェイ解析として DAVID（Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery）を用いて、各々の細胞株について検討した。

2. APEX 法によるビオチン標識による膜蛋白質の解析の検討

トロゴサイトーシスによって細胞膜表面で交換された蛋白質の解析を質量分析（MS）で効率よく行うために、APEX2 を用いた proximity labeling による MS の精度向上に取り組んだ。そのために細胞膜に広く存在する ATP1A1 に注目することとした。まずは HEK293T の cDNA より、ATP1A1 タンパク質をコードする遺伝子配列を取り出し、それを図 1 のように pMSCV ベクターに導入することで、3xFlag-APEX-ATP1A1 タンパク質を過剰発現させた。

このプラスミドを用いて、骨髄腫細胞株の表面に 3xFlag-APEX-ATP1A1 を過剰発現し、単球との共培養によってトロゴサイトーシスを惹起し、その後回収した単球を FACS によって集めた上で、その単球に対して APEX2 法を用いて APEX タンパク質の周囲にあるトロゴサイトーシスにより交換が行われた膜蛋白質をビオチン化できると考えた。その後細胞融解後、ビオチン化蛋白質を Streptavidin ビーズによりラベリングし、この蛋白質を回収することが可能ならば膜蛋白の解析が可能と考え、まずは HeLa 細胞を用いた検討を行った。

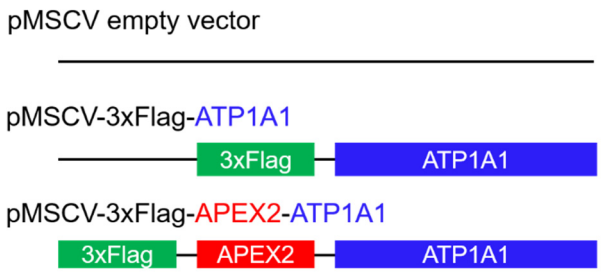


図 1. 作製した proximity labeling 用プラスミド
ATP1A1 タンパク質のタンパク質をビオチン化するための 3xFlag-APEX2-ATP1A1 およびコントロールとして 3xFLag-ATP1A1 タンパク質過剰発現のためのプラスミドをクローニングした。

3. DRd 療法を施行した多発性骨髄腫患者における施行前後の単球数推移の検討

実臨床でも単球／TAM が重要な役割を果たすか検証をするために、DRd 療法を施行した患者の末梢血単球推移の検討を行った。具体的に我々は施設の再発・難治性骨髄腫患者で、DRd 療法を施行した 37 名を後方視的に解析した。DRd 療法施行前と、2 コース目開始前の単球数についてそれぞれ比較した。2 コース目開始前に単球が減少した群を単球減少群（n＝14）、減少しなかった群を単球非減少群（n＝23）として、PFS（Progression-Free survival）、TTNT（Time to next treatment）についてそれぞれ比較した。

結果および考察

1. RPMI8226 は微小管細胞骨格の制御に関わる遺伝子を多く有した

トロゴサイトーシスはがん細胞と免疫細胞が直接接触した際の細胞膜断片の移動であり、細胞骨格の制御の関与（cellular process）が示唆されていた［8］。RPMI8226、MM1S、KMS-11、OPM-2 の各々について、RNA 発現量の高い遺伝子のパスウェイ解析を行ったところ、RPMI8226 に関しては、トロゴサイトーシスが生じるのに関与する「cellular process」に関わる遺伝子の発現量が多いことが明らかとなった（図 2）。よって今後の解析で RPMI8226 を用いることが妥当と考えられた。

2. 3xFlag-APEX-ATP1A1 標識は HeLa 細胞において確認できた

Empty vector、3xFlag-ATP1A1、3xFlag-APEX-ATP1A1 を過剰発現させた HeLa 細胞を作製し、ウエスタンブロッティング（WB）によって蛋白質の解析を行った。その結果、ATP1A1 抗体の際は HeLa 細胞の内因性の ATP1A1 のシグナルで、過剰発現させた蛋白質の確認は困難であったが、Flag 抗体の際は Empty vector 導入細胞では WB のバンドは見られず、3xFlag-ATP1A1、3xFlag-APEX-ATP1A1 のサンプルを比較すると図 3 のように APEX2 蛋白質の分子サイズの大きな蛋白質のバンドを確認することができた。

以上結果 1、2 をふまえて、今後は

・Flag 抗体を用いた免疫染色により細胞の膜表面に実際に 3xFlag-APEX-ATP1A1 が発現していることを確認
・3xFlag-APEX-ATP1A1 を過剰発現させた骨髄腫細胞株の作製
・単球との共培養によるトロゴサイトーシスの惹起
・FACS による単球の抽出
・APEX2 法を用いた蛋白質のビオチン化
・Streptavidin ビーズを用いたビオチン化ラベルされた蛋白質の回収
・MS を用いた膜蛋白の同定

を行うことで、トロゴサイトーシスによる膜蛋白解析を進めていくこととした。

3. DRd 療法施行後、単球減少群の PFS、TTNT は単球非減少群と比して不良だった

DRd 療法施行後、図 4 に示す通り単球減少群の PFS は単球非減少群と比して、2 年時点での PFS が前者で 26.8%であった一方、後者では 66.8%と予後不良であった（P＝0.0193）。また TTNT の比較においても単球減少群が、単球非減少群と比べて同様に予後不良となった（2 年 TTNT：単球減少群 23.8% vs 単球非減少群 66.8%、P＝0.0204）。

血液腫瘍において末梢血単球の割合と TAM の割合は正の相関を示すと考えられたため［9］、当初 DRd 療法で末梢血単球が減少した際は予後良好と関与すると仮説を立てていたが、逆の結果となった。LEN のもつ免疫賦活作用により TAM が抗腫瘍的な M1 マクロファージへと再誘導されて、単球数が多い方が予後良好となった可能性は考えられるが、Dara 自身も腫瘍に結合した CD38 分子が単球へトロゴサイトーシスで移動することが報告されている［10］。今後本研究を進めていくにあたり、治療による影響、また抗体薬自身のトロゴサイトーシスによる影響も加味して、解析を進める必要性が示唆された。

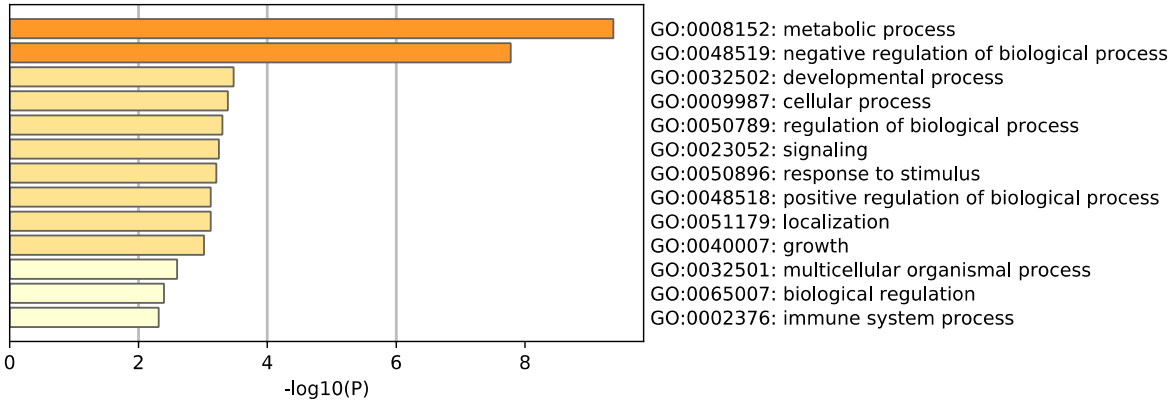


図 2. RPMI8226 でのパスウェイ解析の結果

RPMI8226 について、発現高い 1,000 個の遺伝子を抽出して、DAVID を用いてパスウェイ解析を行った結果を示した。トロゴサイトーシスに関与する cellular process の遺伝子群はパスウェイ解析で上位 4 番目と発現目立つことが明らかとなった。

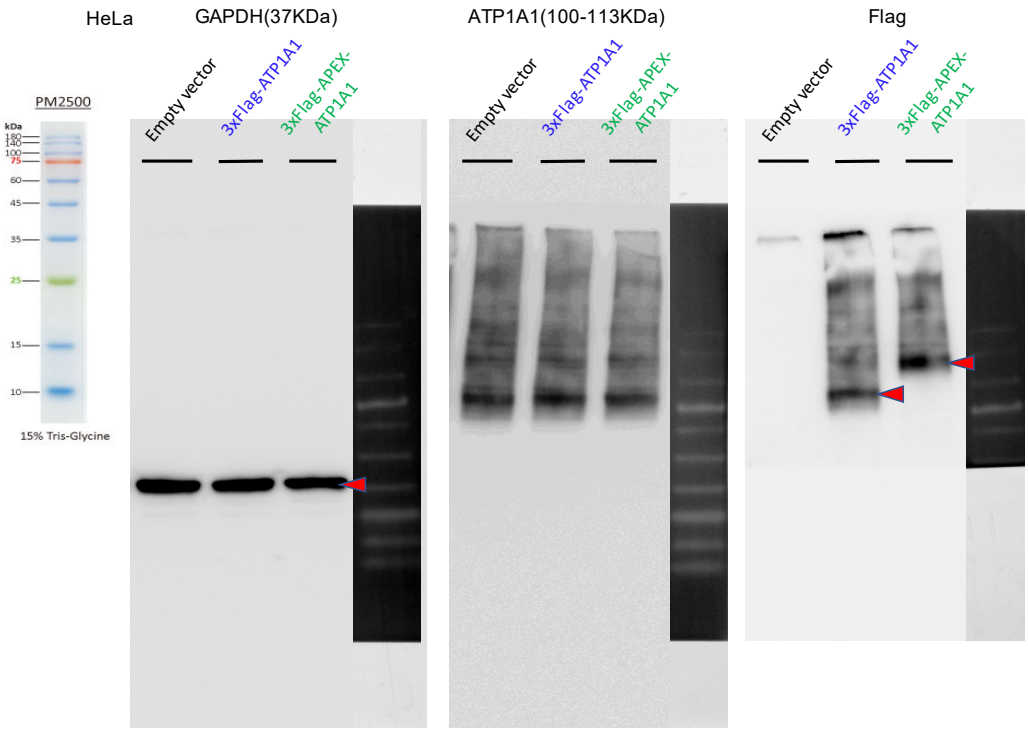


図 3. HeLa 細胞に 3xFlag-APEX-ATP1A 標識が可能であった

Empty vector、3xFlag-ATP1A1、3xFlag-APEX-ATP1A1 を過剰発現させた HeLa 細胞を作製し、WB によって蛋白質の解析を行った。Flag 抗体の際は 3xFlag-ATP1A1、3xFlag-APEX-ATP1A1 のサンプルを比較すると APEX2 蛋白質の分子サイズの大きな蛋白質のバンドを確認することができた。

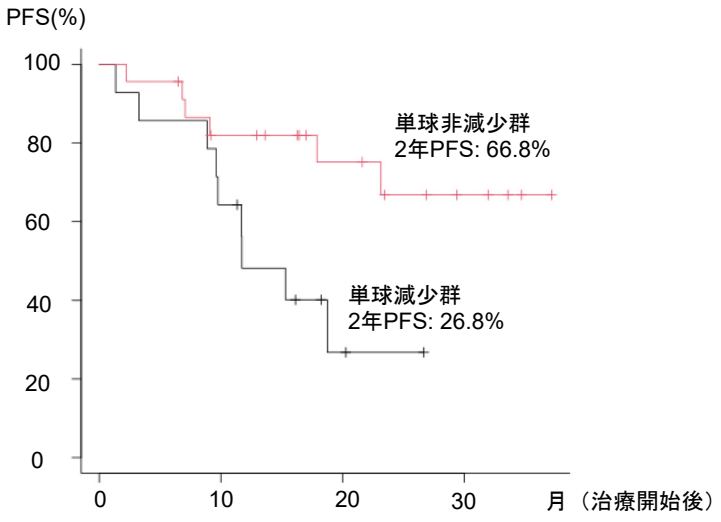


図 4. DRd 療法施行後の単球減少群と非減少群の PFS の比較

DRd 療法施行後の PFS の比較を行った。DRd 療法後、単球減少群（n＝14）では 2 年 PFS が 26.8%である一方、単球非減少群（n＝24）では 66.8%と前者で有意に低かった（P＝0.0193）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学腫瘍血液内科の矢野真吾教授、横山洋紀助教、石井敬人助教である。

文　献

1) Eddine N, Noël A. Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. Clin Chem. 2013 Jan;59(1):85-93. Epub 2012 Nov 28. PMID: 23193058 Doi: 10.1373/clinchem.2012.185363

2) Kawashima M, Carreras J, Higuchi H, et al. PD-L1／L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma. Leukemia. 2020 Sep;34(9):2405-17. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32089543 DOI: 10.1038/s41375-020-0737-9

3) Nakamura K, Smyth M J, Marinet L. Cancer immunoediting and immune dysregulation in multiple myeloma. Blood. 2020 Dec 10;136(24);2731-40. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32645135 DOI: 10.1182/blood.2020006540

4) Uckun F M. Overcoming the Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma. Cancers (Basel). 2021 Apr 22;13(9):2018 PMID: 33922005 DOI: 10.3390/cancers13092018

5) Panchabhai S, Kelemen K, Ahmann G, et al. Tumor-associated macrophages and extracellular matrix metalloproteinase inducer in prognosis of multiple myeloma. Leukemia. 2016 Apr;30(4)951-4. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26202926 DOI: 10.1038/leu.2015.191

6) Brown R, Suen H, Favaloro J, et al. Trogocytosis generates acquired regulatory T cells adding further complexity to the dysfunctional immune response in multiple myeloma. Oncoimmunology. 2012 Dec 1;1(9)1658-60. PMID: 23264928 DOI: 10.4161/onci.22032

7) Kovalka S, Zimin A V, Pertea G M, et al. Transcriptome assembly from long-read RNA-seq alignments with StringTie2. Genome Biol. 2019 Dec 16;20(1):278. PMID: 31842956 DOI: 10.1186/s13059-019-1910-1

8) Davis D M. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. Nat Rev Immunol. 2007 Mar;7(3):238-43. Epub 2007 Feb 9. PMID: 17290299 DOI: 10.1038/nri2020

9) Koh Y, Kang H J, Park C, et al. The ratio of the absolute lymphocyte count to the absolute monocyte count is associated with prognosis in Hodgkin's lymphoma: correlation with tumor-associated macrophages. Oncologist. 2012; 17(6):871-80. Epub 2012 May 15. PMID: 22588324 DOI: 10.1634/theoncologist.2012-0034

10) Krejcik J, Frerichs K A, Nijhof I S, et al. Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab. Clin Cancer Res. 2017 Dec 15;23(24):7498-511. Epub 2017 Oct 12. PMID:29025767 DOI: 10.1158/1078-0432.Ccr-17-2027