

骨髄異形成症候群における腫瘍免疫抑制因子の同定

合山 進

東京大学医科学研究所 細胞療法分野

【研究の背景】

近年、腫瘍免疫を利用したがん治療法の開発が注目を集めている。申請者はこれまで長い間腫瘍幹細胞の研究に取り組んできたが^{1, 2)}、幹細胞も含めて多様な腫瘍細胞を攻撃することのできる免疫療法は、根治的治療法開発のための切り札になり得ると考えている。腫瘍免疫は多くの免疫細胞が、がん微小環境のなかで複雑に相互作用することで制御されており、その複雑な反応を *in vitro* の実験系で忠実に再現することは現時点では不可能である。したがって、腫瘍免疫のメカニズム解明や新規免疫療法の効果判定を行うためには、良い動物モデルの使用が不可欠である。

骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndrome, MDS)は遺伝子異常を有する幹細胞が増殖して血球形態の異形成と血球減少を呈する疾患群である。MDS は高頻度に急性骨髄性白血病(Acute Myeloid Leukemia: AML)に移行し致命的となる。現時点では造血幹細胞移植以外では治療を得ることは難しく、新しい治療法の開発が求められている。そこで本研究では、我々の研究室で開発したマウスMDS/AMLモデルとCRISPR libraryを活用し、造血器腫瘍治療における腫瘍免疫の役割について解析すると共に、新たな腫瘍免疫抑制因子の同定を試みた。

【目 的】

- (1) マウスMDS/AMLの治療モデルを用いて、治療過程における腫瘍免疫の役割を明らかにする。
- (2) CRISPR Libraryを用いて、MDS/AMLにおける腫瘍免疫抑制因子を探索する。

【方 法】

1. マウス造血器腫瘍モデルの作成

骨髄異形成症候群のマウスモデルを作成するため、野生型 C57BL/6 マウスから採取した骨髄前駆細胞(c-Kit+細胞)に変異型ASXL1及び変異型SETBP1を導入し、レシピエントマウスに移植した。骨髄異形成症候群を発症したマウスの脾臓から腫瘍細胞を採取し、2次、3次、4次移植を行い、4次移植後の腫瘍細胞(cSAM細胞: cells with combined expression of SETBP1 and ASXL1 Mutations)³⁾を採取して保存し、以下の実験に使用した。

また同様に、マウス骨髄前駆細胞に白血病遺伝子 MLL-AF9 導入して作成した細胞をレシピエントマウスに移植し、急性骨髄性白血病のマウスモデルを作成した。

2. p53-Mdm2 結合阻害剤(DS-5272)を用いた造血器腫瘍治療モデル

MLL-AF9 細胞を移植したマウスに、移植後 3 日目から p53-Mdm2 結合阻害剤(DS-5272)⁴⁾を経口投与(週 3 回、100 mg/kg)し、生存期間を有意に延長させる造血器腫瘍治療モデルを確立した。この治療モデルを活用して、造血器腫瘍治療における免疫の役割を検証した。

3. CRISPR library 移植実験

上記で作成した cSAM 細胞及び MLL-AF9 細胞にレンチウイルスを用いて Cas9 を導入し(lentiCas9-Blast, Addgene #52962)、レシピエントマウスに移植した。発症したマウスの骨髄及び脾臓から Cas9 発現造血器腫瘍細胞を採取し、CRISPR library(GeCKO v2, Addgene #1000000053)を導入後、通常の C57BL/6 マウスもしくは免疫不全マウス(NSG マウス)に移植した。移植前の造血器腫瘍細胞及び移植後の C57BL/6 マウスもしくは NSG マウスから回収した造血器腫瘍細胞よりゲノムを抽出してシーケンスし、gDNA の変化を解析した。

【結 果】

1. 造血器腫瘍治療薬の効果発現過程における腫瘍免疫の関与

MLL-AF9 細胞を移植したマウスに、コントロールもしくは p53-MDM2 結合阻害剤 DS-5272 を投与し、RNA-Seq 及び Mass Cytometry (CyTOF) 解析を行った。DS-5272 投与後の MLL-AF9 細胞では、Hif1 \cdot や PD-L1 など炎症や免疫に関与する分子の発現が上昇していた。そこで、DS-5272 の治療効果発現過程における腫瘍免疫の関与について調べるため、MLL-AF9 細胞を通常の C57BL/6 マウスと免疫不全マウス(NSG マウス)に移植し、異なるレシピエントマウスを用いることによる DS-5272 の治療効果の違いについて検証した。その結果、通常マウスに白血病細胞を移植した場合に比べて、NSG マウスに移植した場合は DS-5272 の治療効果が著しく減弱することが判明した。さらに、PD-L1 欠失 MLL-AF9 細胞を用いた実験や、DS-5272 と Hif1 \cdot 阻害薬 Echinomycin との併用実験により、Hif1 \cdot -PD-L1 経路が腫瘍免疫を抑制して治療抵抗性造血器腫瘍細胞の出現に貢献していることが明らかとなった。

2. CRISPR library を用いた造血器腫瘍における腫瘍免疫抑制因子の探索

造血器腫瘍における PD-L1 以外の腫瘍免疫抑制因子を広く網羅的に探索するため、Cas9 を発現させた MLL-AF9 細胞及び cSAM 細胞に CRISPR library を導入してレシピエントマウスに移植した。レシピエントとして、正常な免疫系を持つ C57BL/6 マウス及び免疫不全マウス(NSG マウス)を使用し、免疫の有無による gDNA の変化の違いを解析した。どちらの細胞を用いた場合も、NSG マウス移植時には C57BL/6 マウスに移植した場合と比べて造血器腫瘍の発症が早く、腫瘍免疫による造血器腫瘍発症抑制作用が証明された。また、NSG マウスに移植した場合は、移植前後で gDNA の総数に大きな変化が見られないのに対し、C57BL/6 マウス移植時には gDNA 数が著明に減少していた。この結果は、腫瘍免疫存在下では免疫の監視を逃れた一部の MDS/AML クローンだけが特異的に増殖していることを示唆している。また、この結果をもとに 6 つの新たな腫瘍免疫抑制候補因子を同定し、現在個々の分子について解析を行っている。

【考 察】

本研究により、造血器腫瘍の発症や治療抵抗性に、腫瘍免疫の抑制が深く関与していることが明らかとなった。今後は、これらの造血器腫瘍治療モデルを駆使して、より効果的な分子標的療法と腫瘍免疫活性化療法の組み合わせについて検討していく。また、今回の CRISPR library 解析結果をもとに、造血器腫瘍における新たな腫瘍免疫抑制因子の同定に向けてさらに研究を継続する。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

幹細胞も含めて多様な腫瘍細胞を攻撃することのできる免疫療法は、根治的治療法開発のための切り札になり得ると考えられる。今回の研究により、p53-Mdm2 結合阻害剤などの分子標的療法と免疫療法を組み合わせた新しい造血器腫瘍治療法を開発するための基盤を確立することができた。

【参考・引用文献】

1. Goyama S, Wunderlich M, Mulloy JC. Xenograft models for normal and malignant stem cells. *Blood* 125(17): 2630-2640 (2015).
2. 合山進 白血病幹細胞の本態 *臨床血液* 57(10): 1852-1859 (2016).
3. Inoue D, Kitaura J, Matsui H, Hou HA, Chou WC, Nagamachi A, Kawabata KC, Togami K, Nagase R, Horikawa S, Saika M, Micol JB, Hayashi Y, Harada Y, Harada H, Inaba T, Tien HF, Abdel-Wahab O, Kitamura T. SETBP1 mutations drive leukemic transformation in ASXL1-mutated MDS. *Leukemia* 29(4): 847-857 (2015).
4. Discovery of DS-5272 as a promising candidate: A potent and orally active p53-MDM2 interaction inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23(10): 2360-2367 (2015).