

“eat me”シグナルの制御による悪性リンパ腫の治療基盤の開発

瀬川勝盛

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 医化学分野

【研究の背景】

ホスファチジルセリン(PS)は細胞膜の内層に局限する。一方、死をとげたアポトーシス細胞は、食食を誘導する“eat me”シグナルとしてPSを露出し、マクロファージに認識・食食される。フリッパーゼは生体膜のPSを外層から内層に移層する。申請者は、ATP11AとATP11Cが細胞膜で機能するフリッパーゼであることを明らかにした。ATP11AとATP11Cは必須のサブユニットであるCDC50Aと結合することで、機能的なフリッパーゼとなる。CDC50Aを欠損したT細胞リンホーマは、細胞膜フリッパーゼ活性を完全に失い、生きたままPSを細胞表面に露出する。このCDC50A欠損Tリンホーマをマクロファージと共培養すると、マクロファージがPS依存的にTリンホーマを食食した(Segawa et al, *Science* 2014)。また、ATP11C欠損マウスは重度のB細胞減少症を発症する。ATP11C欠損B細胞もPSを露出し、骨髄内のマクロファージに食食され、体内から消失していた。これらの結果は、フリッパーゼを阻害すると生きた細胞がPSを露出し、マクロファージに食食されることで体内から消失することを示唆した。最近、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma)では、CDC50Aの機能欠損変異が多く認められること、CDC50A変異をもつリンパ腫患者は標準治療によく反応し、予後が極めて良いことが報告された。そのメカニズムとして、治療で用いられる抗がん剤がCDC50A欠損細胞に集積し、細胞死が亢進することが提唱された。以上、フリッパーゼの阻害により2つの抗腫瘍効果が期待される。一つ目は、マクロファージの食食によるがん細胞のクリアランス、二つ目は抗がん剤の蓄積による細胞死の亢進である。本研究では、CDC50Aを標的としたフリッパーゼの阻害抗体を樹立すること、CDC50A欠損細胞の抗がん剤感受性亢進メカニズムを解明することを目指す。

【目 的】

フリッパーゼは、リン脂質であるホスファチジルセリンの膜動態を制御する膜タンパク質である。申請者は、これまでに細胞膜で機能するフリッパーゼを先駆けて同定し、その生理機能を明らかにしてきた。申請者がこれまでに得た知見と最近の海外のグループの報告から、フリッパーゼが悪性リンパ腫の新しい抗腫瘍ターゲットとして機能することが強く示唆される。本研究では、フリッパーゼの阻害による抗腫瘍効果のメカニズムを解明し、リン脂質膜動態の制御による悪性リンパ腫の新しい治療基盤を開発することを目指す。

【方 法】

1. フリッパーゼの阻害抗体の樹立

がん細胞特異的にフリッパーゼを阻害する抗体を樹立できれば、フリッパーゼの阻害による抗腫瘍効果、さらに抗体依存性細胞障害作用による抗腫瘍効果の相加作用が期待される。B細胞特異性は、既存のDLBCL治療抗体である抗CD20抗体により達成できる。しかし、フリッパーゼを阻害する抗体はない。そこでフリッパーゼを阻害する抗CDC50A抗体を樹立する。具体的に、ヒトCDC50Aタンパク質を発現・精製する。精製タンパク質をマウスに免疫し、ハイブリドーマを作製、フリッパーゼ活性を阻害するクローンを取得する。フリッパーゼ活性は、申請者がこれまで報告してきた方法で測定する。目的の抗体を取得できた場合、抗CD20抗体と組み合わせたバイスペシフィック抗体を樹立する。

2. 抗がん剤への感受性亢進メカニズムの解明

海外グループにより、CDC50A 機能欠損 DLBCL 細胞は、抗がん剤(ビンクリスチンやドキシソルビシン)への感受性が亢進していることが報告された。本研究では、ゲノムワイドスクリーニングを行い、抗がん剤の感受性の制御に関わる遺伝子を網羅的に同定する。具体的に DLBCL 細胞の CDC50A 遺伝子を CRISPR-Cas9 システムで破壊、CDC50A 欠損 DLBCL 細胞を樹立する。CDC50A 欠損細胞と野生型の DLBCL 細胞に、約 2 万遺伝子を標的とした Genome-wide の CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーを導入し、さまざまな遺伝子を欠損させた細胞集団を作製する。これらの細胞集団に、治療で使用される抗がん剤を単剤で、それぞれの細胞が致死となる最低の濃度で添加する。その後、生存した細胞を回収し、破壊された遺伝子を次世代シーケンサーで解析し、抗がん剤への感受性を亢進させる遺伝子標的を同定する。

【結 果】

1. 本年は、ヒトフリッパーゼ複合体に必須のサブユニットである CDC50A の細胞外領域をクローニングし、細胞外分泌のためのシグナル配列と FLAG タグを付加した発現プラスミド(pEF-hCDC50A-FLAG)を作製した。このプラスミド DNA を HEK293T 細胞に遺伝子導入し細胞外に分泌された hCDC50A 細胞外領域を抗 FLAG 抗体で精製した。このリコンビナントタンパク質を合成ポリマーアジュバントである TiterMax Gold と混合し、自己免疫疾患症状を示す $MRL^{lpr/lpr}$ マウスに免疫し十分に抗体価が上昇した後に、リンパ節を回収し、ミエローマ細胞である NSO と融合させハイブリドーマを作製した。複数のハイブリドーマの培養上清を ELISA 法で解析し、抗原に対する抗体を産生するハイブリドーマを複数クローン得ることができた。いずれの抗体もヒトやマウスの CDC50A を Western blotting やフローサイトメトリーで使用することが可能であったが、フリッパーゼ活性を抑制する活性をもつ抗体を得ることができていない。assay 系は動作しており、引き続きフリッパーゼ活性を抑制することのできる CDC50A 抗体の獲得を目指す。また CDC50A がどのフリッパーゼを用いて PS の非対称分布を制御しているのかの解析を行い、細胞膜だけでなくエンドソームのフリッパーゼも用いて細胞膜 PS の非対称分布を維持していることを見出し、論文に報告した(Miyata et al., J Biol Chem 2022)。
2. 本年度は、CRISPR-Cas9 法を用いて CDC50A 欠損 DLBCL 細胞を複数クローン樹立した。海外の先行研究では、CDC50A を欠損した DLBCL 細胞は PS を定常状態で露出しないことが報告されていたが、我々が樹立した CDC50A 欠損細胞は PS を生きながら細胞表面に露出していた。現在、抗がん剤(ビンクリスチンやドキシソルビシン)の添加実験を行い、野生型に比して、CDC50A 依存的な細胞死の増加がみられるかを検討している。

【考 察】

これまでのところ CDC50A を認識する抗体を取得することに成功したが、細胞膜での PS フリッパーゼ活性を減少させる活性を示すものはなかった。引き続き、スクリーニングを続行している。一方、CDC50A は細胞膜フリッパーゼだけでなく、エンドソームのフリッパーゼも同様に制御することを見出し論文に報告した(Miyata et al., J Biol Chem 2022)。この結果から、細胞膜とエンドソーム両方の CDC50A を複合的に抑える手法を樹立しなければ、安定した PS の露出を誘導することが困難な可能性がある。また、これまでの報告では、CDC50A を欠損した DLBCL 細胞は定常状態で PS を細胞表面に露出しないこと、抗がん剤への感受性が増加することが報告されていた(Ennishi et al, *Nat Med* 2020)。しかし、我々が DLBCL 細胞株の一つを用いて CDC50A 欠損株を作製したところ、すべての欠損クローンが PS を露出していた。このことは、DLBCL の細胞株のラインにより性質が異なる可能性を示唆した。今後、種々の DLBCL 細胞株を用いて CDC50A 欠損細胞株を樹立し、PS の露出と抗がん剤への感受性を検討する必要がある。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、リンパ腫の中でも患者数の多い、DLBCL の新しい治療基盤について探索するものであり臨床的に重要である。また、現実には、CDC50A の機能欠損変異をもつ患者の標準治療の成績と予後が良いという報告は(Ennishi et al, *Nat Med* 2020)、研究の方向の妥当性を支持する。本研究で得られた知見は、他のがんについても応用できる可能性があり、その臨

床的意義は高い。引き続き研究を進めていく必要がある。

【参考・引用文献】

Miyata Y, Yamada K, Nagata S, **Segawa K***.

Two types of type IV P-type ATPases independently re-establish the asymmetrical distribution of phosphatidylserine in plasma membranes.

J Biol Chem. 2022 Sep 23;298(11):102527.