

造血器腫瘍に対する細胞免疫療法を強化する miRNA インヒビターカクテル療法の開発

黒田純也

京都府立医科大学大学院医学研究科 血液内科学

【研究の背景】

B 細胞性リンパ腫(B cell lymphomas: BCLs)や多発性骨髄腫(multiple myeloma: MM)などの成熟 B 細胞性腫瘍における難治患者の救済において、造血幹細胞移植やキメラ抗原受容体 T 細胞療法(CAR-T 療法)などの細胞免疫療法への期待は高い。しかし、これらでは細胞製剤に含まれる骨髄由来抑制系細胞(myeloid-derived suppressor cell; MDSC)や制御性 T 細胞等の免疫抑制系細胞によって抗腫瘍効果が損なわれる。申請者は先行研究においては BCLs や MM では、腫瘍細胞が分泌する複数のケモカインが、正常末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)から MDSC を誘導することで腫瘍免疫監視機構を破綻することを見出した。また、この過程において腫瘍由来エクソソーム(tumor-derived exosome: TEX)に含まれる複数の miRNA が腫瘍細胞から PBMC に移行し、中心的な機能的役割を果たす可能性を見出した。TEX を介した miRNA の PBMC への作用を治療的に制御できるようになれば、造血器腫瘍に対する細胞免疫療法を強化、あるいは治療抵抗性の一部を解除できる可能性がある。

【目 的】

本研究では、*ex vivo*において造血幹細胞移植や細胞療法・細胞免疫療法におけるグラフトや細胞製剤内の PBMC における miRNA 発現を制御することで MDSC への分化を阻止し、同時に既に存在する MDSC を駆逐する治療戦略の開発を目指すための基盤的研究を行う。さらに複数の miRNA インヒビターを PBMC に高効率・低毒性に導入するシステムを構築し、腫瘍誘導性 MDSC 誘導を抑制する「miRNA インヒビターカクテル療法」の開発を目指す。

【方 法】

- ① MDSC 誘導責任 miRNA の候補化
複数の MDSC 誘導性・非誘導性 BCL、MM 細胞株由来の TEX を回収、miRNA を抽出し、その発現プロファイルをマイクロアレイで網羅的に解析、さらに文献的検討などから MDSC 誘導責任 miRNA を候補化した。
- ② PBMC における TEX 介在性 MDSC 誘導責任 miRNA の特定
候補化した miRNA の MDSC 誘導における機能的役割を明らかにするため、それらの miRNA mimic、miRNA inhibitor を順次 PBMC に導入し、複数の責任 miRNA を特定した。
- ③ 最良な miRNA インヒビターカクテルレシピの決定
上記②で特定した複数の miRNA について、最も効果的に MDSC 誘導抑制効果を有する組み合わせを同定し、miRNA インヒビターカクテルレシピを決定した。
- ④ miRNA インヒビターカクテルの PBMC への新規デリバリーシステムの最適化
ヒト末梢血中エクソソーム、人工エクソソーム、非天然型膜透過ペプチドによる miRNA インヒビターカクテルの PBMC への導入効率を比較検討し、投与方法を最適化した。
- ⑤ 臨床検体における miRNA インヒビターカクテル療法の前臨床的検証
miRNA インヒビターカクテルによる MDSC 誘導抑制効果の検証を試みた。

【結 果】

① MDSC 誘導責任 miRNA の候補化

間接的共培養によって正常 PBMC から Monocytic (M)-MDSC を誘導可能な MM 細胞株、非誘導性の MM 細胞株より TEX を抽出した。このうち、M-MDSC 誘導性 MM 細胞株より採取した TEX は、その単独暴露によって PBMC から M-MDSC を誘導可能であること、M-MDSC 非誘導性 MM 細胞由来の TEX には、そうした効果がないことが確認された。そこで、M-MDSC 誘導性・非誘導性 TEX に含まれる miRNA について GeneChip miRNA 4.0 Array を用いて網羅的に解析したところ、28 種の miRNA が M-MDSC 誘導性 TEX において特異的に多く含有されていることが判明した。

② PBMC における TEX 介在性 MDSC 誘導責任 miRNA の特定

上記の結果に基づき、文献的検討や既知の標的分子の情報から、そのうち 6 種について M-MDSC 誘導との関係性が推測された。この結果をもとに、順次、健常人由来末梢血中エクソソームに候補 miRNA を導入し、これを PBMC に暴露して導入したところ、miR-106a-5p と miR-146a-5p が M-MDSC 誘導に関わる責任 miRNA であることが同定された。

③ 最良な miRNA インヒビターカクテルレシピの決定

次に MM 細胞株と正常 PBMC との共培養による M-MDSC 誘導系に、ヒト末梢血由来エクソソームに miR-106a-5p、あるいは miR-146a-5p と相補的配列を有するインヒビターを導入したものを暴露し、M-MDSC 誘導に対する影響を検討した。その結果、miR-106a-5p と miR-146a-5p それぞれ単独に対するインヒビターの暴露のみでは、M-MDSC 誘導は抑制されなかったが、両者を同時に暴露することで M-MDSC 誘導を強力に抑制することが明らかになった。

④ miRNA インヒビターカクテルの PBMC への新規デリバリーシステムの最適化

まずはヒト末梢血中エクソソーム、人工エクソソーム、非天然型膜透過ペプチドへの miRNA インヒビターカクテルの導入や付加の効率の検討を目指したが、今回の検討では適切な人工エクソソームを研究用に準備することが困難であった。非天然型膜透過ペプチドについては、検討した限り miRNA インヒビターの結合効率が良好でなく実験間でのばらつきがある様子であり、何より現段階で定量が困難であることから信頼性あるデータを創出できないことが判明し、今回は断念した。これらの結果から、最終的にヒト末梢血中のエクソソームを活用することとしたところ、健常人由来、患者由来を問わず末梢血由来由来天然型エクソソームへの miRNA インヒビターの導入は高効率で可能であることが示された。

なお、ここまでの研究成果は参考文献 1 において論文発表したほか、2022 年米国血液学会総会などにおいて報告した。

⑤ 臨床検体における miRNA インヒビターカクテル療法の検証

最後に、上記で作成した miRNA インヒビター導入天然型エクソソームを、M-MDSC 誘導性 MM 細胞株と PBMCs の共培養系に添加し、M-MDSC 誘導抑制効果を検討した結果、本処理によりコントロールに比べ、有意に M-MDSC 誘導が抑制されることが示された。本実験は現在も更に検体数を増やしつつ継続中である。

【考 察】

近年、BCL や MM では、病状悪化に伴う腫瘍免疫監視機構の破綻のプロセスにおいて、T 細胞疲弊を伴う T 細胞フィットネスの劣化、免疫抑制系細胞のなかでも免疫抑制性の単球系細胞の増加が重要な役割を有しており、さらに新規の細胞免疫療法の効果を低減すること、治療失敗の原因となり得ることが明らかにされてきた。しかるに、こうしたイベントが生じる機序については不明点が多く残されてきたが、本研究により、腫瘍細胞自身が放出する TEX を介した細胞間コミュニケーションが誘因となる、すなわち、腫瘍細胞は PBMC に働きかけることで M-MDSC を誘導し、腫瘍免疫監視機構の破綻を能動的に導いているかのようなシナリオが示されたと言える。また、本研究では、そのプロセスを媒介する責任 miRNA が複数同定され、それらに対するインヒビターの投与が M-MDSC の誘導を抑制できることが明らかになった。これまでエクソソーム分泌阻害剤や、各種の小分子化合物について、TEX を介した M-MDSC 誘導抑制などの阻害効果が検討されてきたが、いずれもオフターゲット効果が問題となり実現されていないなか、本研究の成果は、より特異度の高い治療アプローチとなる可能性がある。一方で、こうしたフォーマットでの薬理学的効果を期待する場合、全身投与は、必要とされる投与量、他組織への期待外の作用の点から好ましくなく、細胞製剤そのものへの投与によって少量で免疫担当細胞のみへの効果をもたらすことが出来れば、将来の臨床実装化に期待が高まるものと考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の結果から、M-MDSC 誘導における役割を同定した miR-106a-5P と miR-146a-5p に対するインヒビターのカクテルを天然型エクソソームに導入することによるエクソソーム療法の開発への発展が期待される。

【参考・引用文献】

1. Mizuhara K, Shimura Y, Tsukamoto T, Kanai A, Kuwahara-Ota S, Yamaguchi J, Muramatsu A, Okamoto H, Taminishi-Katsuragawa Y, Kawaji-Kanayama Y, Isa R, Mizutani S, Inaba T, Kuroda J. Tumor-derived exosomes promote the induction of monocytic myeloid-derived suppressor cells from peripheral blood mononuclear cells by delivering miR-106a-5p and miR-146a-5p in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 203; 426-438, 2023.