

## 平成 27 年度日本骨髄腫学会奨励賞研究報告書

慶應義塾大学薬学部病態生理学講座

松下 麻衣子

### 研究課題

「新規ホメオボックス蛋白由来抗原を用いた多発性骨髄腫に対する複合免疫治療法の開発」

近年、多発性骨髄腫に対する治療法として免疫療法が注目されており、その中には、骨髄腫細胞に特異的に発現しているがん抗原を標的としたワクチン療法や T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子改変 T 細胞輸注療法がある。

我々はこれまでに、造血器腫瘍における新規がん抗原として、ホメオボックス蛋白である PEPP2 (Pem, Esx1 (Spx1), Psx-1, Psx-2 (Gpbox)) を見出し、日本人の約 60% が保有する HLA-A\*24:02 に提示される PEPP2 タンパク質由来のエピトープとして PEPP2-271 (EFGPFPFVI) を同定した。そこで本研究では、この新規抗原を用いた多発性骨髄腫に対する免疫療法の開発を目指し、主に薬剤による免疫原性の増強効果について検討した。

まず、エピトープペプチドを用いて、健常人末梢血リンパ球より抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の誘導を行った。その結果、3 名のドナーにおいて、PEPP2 特異的 CTL を誘導することができた。ELISpot 法によりこれらの CTL の各種細胞株に対する IFN- $\gamma$  産生能を評価したところ、PEPP2-271 を加えた C1R-A24 細胞株に対する有意に高い IFN- $\gamma$  産生が認められた。また、PEPP2 陽性 HLA-A\*24:02 陽性である多発性骨髄腫細胞株 KMS21 に対しても高い IFN- $\gamma$  産生が認められた。<sup>51</sup>Cr 細胞傷害試験においても同様に、PEPP2 特異的 CTL が KMS21 を認識するという結果が得られた。現在我々は、PEPP2-271 のアンカー残基を改変し、PEPP2-271 よりも HLA-A\*24:02 に対してより高い結合親和性を示すペプチドを用いた検討を行っている。

次に、PEPP2 を殆ど発現していないハイリスク多発性骨髄腫細胞株である KMS11 および健常人末梢血単核球に 5-azacytidine または 5-aza-2'-deoxycytidine を 2 日間連続添加した後、RT-qPCR 法により、PEPP2 の発現を検討した。これらの薬剤添加により、PEPP2 遺伝子の発現量は KMS11 で約 62 倍、健常人末梢血単核球で約 2 倍増加した。同様に、KMS11 を 5-aza-2'-deoxycytidine で処理したところ、PEPP2 遺伝子の発現量はそれぞれ 413 倍、1.6 倍増加した。これらの結果より、脱メチル化剤の添加によって、健

常人末梢血単核球と比較して、多発性骨髄腫細胞株において、PEPP2 遺伝子発現がより顕著に誘導されると考えられた。さらに、免疫蛍光染色法を用いた解析により、KMS11 においては 5-azacytidine または 5-aza-2' -deoxycytidine の添加による PEPP2 タンパク質の発現の増強が認められた。一方で、健康人末梢血単核球においてはこれらの脱メチル化剤を添加しても PEPP2 タンパク質の発現は認められなかった。

さらに、脱メチル化剤処理により PEPP2 発現が増強した腫瘍細胞を、PEPP2 特異的 CTL が強く認識し得るかどうかが  $^{51}\text{Cr}$  遊離細胞傷害試験により検討したところ、PEPP2 エピトープペプチドで誘導した CTL は、5-azacytidine を添加した PEPP2 陰性 HLA-A\*24:02 陽性細胞をより強く認識することが示された。5-azacytidine はわが国では骨髄異形成症候群に対してすでに承認されており、速やかな臨床応用が可能であると考えられる。また、これらの治療法は従来の抗がん剤に比べて副作用が少ないため高齢者にも使用し易い点も、多発性骨髄腫の治療として適していると考えられる。

ただし、先述の PEPP2 陰性 HLA-A\*24:02 陽性腫瘍細胞において、5-azacytidine の添加により PD-L1 分子の発現がやや増強することも観察されたため、脱メチル化剤を使用する際は、抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤の併用が必要であるかもしれない。

現在、我々は、他の既存治療薬が樹状細胞を初めとする免疫細胞に作用し、より強い抗腫瘍免疫効果を惹起できるかどうかについて *in vitro* で広く検討中であり、もし、免疫増強作用を持つ既存薬が抽出されれば、将来的にはこれらの薬剤と PEPP2 を標的としたワクチン療法や TCR 遺伝子改変 T 細胞療法などの免疫療法を併用することにより、難治性多発性骨髄腫患者に対してより効果的な免疫療法を確立できると期待している。

末筆ながら、本研究に対する貴学会の御援助に心より感謝申し上げます。

#### 学会発表

Uchiumi A, **Matsushita M**, Otsuka Y, Tsutsumida N, Tanaka C, Ozawa K, Suzuki T, Ichikawa D, Okamoto S, Kawakami Y, Hattori Y. Identification of Novel HLA-A\*24:02-Restricted Epitope Derived from PEPP2 Expressed in Hematological Malignancies. The 7th JSH International Symposium 2016. (2016/5/13)