



Targeting of SIRP α as a potential therapy for Langerhans cell histiocytosis

岡本，武士

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2023-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8697号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485881>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Targeting of SIRP α as a potential therapy for
Langerhans cell histiocytosis

ランゲルハンス組織球症に対する治療標的候補分子 SIRP α

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
呼吸器外科学
(指導教員: 真庭 謙昌 教授)

岡本 武士

(背景、目的)

ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH) は、未熟な樹状細胞 (DC) の異常増殖を特徴とする希少疾患である。特に脾臓、肺、肝臓などの重要臓器に病変が及ぶ症例においては、有効な治療法が十分に確立されておらず、新規治療標的の特定が求められている。

SIRP α は膜型分子であり、マクロファージ (MΦ) や DC などの骨髓由来細胞に高度な発現を示す。これまでに MΦ 上の SIRP α とがん細胞上に発現するそのリガンド分子である膜型分子 CD47 との相互作用が、がん細胞に対する MΦ の貪食作用を抑制的に制御することが見いだされている。さらに、CD47-SIRP α 結合を阻害する抗 SIRP α 抗体が、がん抗原を認識する抗体医薬によるがん細胞に対する MΦ の抗体依存性細胞貪食 (ADCP) を増強し、抗体医薬の抗腫瘍効果を増強することが報告されている。また、腎癌や悪性黒色腫では SIRP α の発現が認められ、これら SIRP α 発現がん細胞に対して抗 SIRP α 抗体が、がん細胞上の SIRP α に結合することで MΦ によるがん細胞の ADCP を直接誘導するとともに、CD47-SIRP α 結合を阻害することでその ADCP を増強し、単独で抗腫瘍作用を発揮することが示されている。

そこで本研究では、LCH の責任細胞が病的な DC (LCH 細胞) であることから、これらの LCH 細胞においても SIRP α が発現しており、それを標的分子とする抗 SIRP α 抗体が LCH に対して治療効果を発揮し得るのではないかと想定し、LCH 患者の組織切片での SIRP α の発現と、LCH モデルマウスにおける抗 SIRP α 抗体の治療効果を検討した。

(方法、結果及び考察)

最初に、LCH の患者組織切片を用い、LCH 病変中の DC における SIRP α の発現の有無について検討した。CD1a はヒト LCH の診断マーカーであり、免疫組織化学染色にて CD1a と SIRP α の発現を隣接切片で比較した。39 症例中 37 症例の組織切片において CD1a で染色される DC の分布は SIRP α の発現細胞の分布に内包されるように一致していた。さらに蛍光 2 重免疫組織染色からも、CD1a の染色部分に一致して SIRP α の強い発現が認められ、ヒト LCH の DC (LCH 細胞) において SIRP α の発現が確認された。

LCH 患者の 50% 以上において BRAF 遺伝子に活性型 BRAF となる変異が認められ、この変異が LCH の病態形成の一因であることが示されている。そこで、Cre-Loxp システムを用いて、CD11c 陽性 DC に特異的にヒト BRAF の活性型変異体 (V600E) を発現する LCH のモデルマウス (*BRAFV600E*^{CD11c} マウス) を既報に従い作製し、CD11c 陽性かつ MHC II 陽性細胞を DC として、以下の解析を行った。

12 週齢 *BRAFV600E*^{CD11c} マウスの末梢血中において、野生型マウスと比較して DC

が増加していることをフローサイトメーター(FACS)で確認した。また *BRAFV600E^{CD11c}* マウスでは、著明な脾腫をきたした。FACS を用いて、脾臓の DC において、SIRP α が発現していることを確認した。さらに蛍光 2 重染色法を用いて、肝臓や肺においても同様であることを確認した。このことから *BRAFV600E^{CD11c}* マウスにおいて、LCH 様 DC (LCH-DC) は増加し、ヒト LCH 細胞と同様に SIRP α を発現していることが明らかとなった。

これまでに抗マウス SIRP α 抗体(MY-1、ラット抗体)が、がん細胞に対するマクロファージの貪食活性を高め、SIRP α 発現がんに対して単独で抗腫瘍効果を発揮することが示されている。そこで、その貪食活性をより高めることのできる改変型 MY-1 (MY-1-mIgG2a: MY-1 の Fc ドメインをラット IgG2a からマウス IgG2a に改変)を *BRAFV600E^{CD11c}* マウスに投与し、SIRP α を発現する LCH に対する抗体の治療効果を検討した。

LCH を発症し始める 8 週齢 *BRAFV600E^{CD11c}* マウスに週 2 回のコントロール抗体または MY-1-mIgG2a の投与を行った。その結果、抗体投与開始 2、4 週間後の FACS による末梢血中の DC の割合の計測において、MY-1-mIgG2a 投与群ではその割合に有意な低下が認められ、さらに抗体投与 4 週間後の MY-1-mIgG2a 投与群では脾臓の重量と脾臓における DC の総数に有意な低下が確認された。また肝臓においても病変部の縮小が HE 染色により認められた。これらのことから、MY-1-mIgG2a 投与は *BRAFV600E^{CD11c}* マウスの LCH 症状を改善することが強く示唆された。

LCH-DC の増加に加え、*BRAFV600E^{CD11c}* マウスでは野生型マウスに比べ肝臓や肺において T 細胞、B 細胞、MΦ 等の免疫細胞数が増加することが報告されている。同様に、脾臓において DC、MΦ、CD4 陽性 T 細胞の数と割合が増加することを確認したが、B 細胞についてはその数、割合ともに低下が認められた。一方、MY-1-mIgG2a を投与した *BRAFV600E^{CD11c}* マウスの脾臓では、コントロール抗体投与に比べ、脾細胞の総数と DC の有意な減少を認めたが、好中球を除く他の複数の免疫細胞の存在比率については有意差な違いは認められなかった。すなわち、MY-1-mIgG2a による脾臓での治療効果は LCH-DC を含む各種免疫細胞の脾臓への異常蓄積の抑制と考えられた。

上記の *BRAFV600E^{CD11c}* マウスでの解析に加え、抗体投与の副作用の評価として、MY-1-mIgG2a の投与後の野生型マウスにおける血液生化学的解析を行った。その結果、MY-1-mIgG2a 投与群において単球の減少と好中球の増加を認めたが、それ以外の複数の血液・生化学的項目については PBS 投与群と比較して有意な差は認められず、忍容性があると考えられた。

MY-1-mIgG2a 投与による治療効果が認められたことから、その作用機序についてさらに解析を進めた。SIRP α 発現がんに対する MY-1 の抗腫瘍効果には MY-1

によるMΦのSIRP α 発現がん細胞に対するADCPの誘導とその増強という二重の作用が関与することから、LCH-DCに対してMY-1-mIgG2aが同様の作用を介して殺細胞作用を示し治療効果を発揮した可能性が考えられた。そこで、CFSE標識を行なったBRAFV600E^{CD11c}マウス骨髓由来CD11c陽性DC (BRAFV600E^{CD11c}BMDC)とPHK26標識MΦの共培養下にMY-1-mIgG2aを加え、in vitroでの貪食実験を行ったところ、コントロール抗体に比べMΦによる有意なBMDCの貪食が確認された。一方、Fc領域を欠損したMY-1-mIgG2aでは非欠損のMY-1-mIgG2aに比べ貪食の低下が認められた。すなわち、MY-1-mIgG2aはMΦによるLCH-DCに対するADCPを誘導すること明らかとなった。

一方、DC上のSIRP α はDCの生存と細胞運動の制御に関与することが示されており、また、BRAFV600E変異持つLCHでの病態形成にはLCH細胞の病変部での生存の延長とCCR7依存性の細胞運動の抑制が重要であることが報告されている。そこで、MY-1-mIgG2aのBRAFV600E^{CD11c}BMDCの生存や運動能に対する作用についての検討を試みた。その結果、DCの増殖因子であるGM-CSF存在下もしくは非存在下で、MY-1-mIgG2aまたはコントロール抗体でBRAFV600E^{CD11c}BMDCを24、48時間処理した際には、MY-1-mIgG2a抗体処理において細胞の生存率の上昇または上昇する傾向が認められたが、抑制する作用は観察されなかった。さらに、CCR7のリガンドであるCCL19によるBRAFV600E^{CD11c}BMDCの遊走能に対するMY-1-mIgG2aの作用をBoyden chamberを用い評価を行なったが、コントロール抗体とMY-1-mIgG2a処理間で違いは認められず、CCR7のmRNAの発現量においても差は確認できなかった。これらのことから、MY-1-mIgG2aはBRAFV600E^{CD11c}BMDCの生存やCCR7依存性の細胞遊走能に対して実質的に影響を与えないものと考えられた。また、LCH-DCから産生されるCCL5、CCL20、CXCL11、CXCL12などのケモカインがCD4陽性T細胞の蓄積を伴う炎症性肉芽腫の形成に関与すると考えられていることから、MY-1-mIgG2aもしくはコントロール抗体存在下でのBRAFV600E^{CD11c}マウスのBMDCにおけるCCL5、CCL20、CXCL11、CXCL12のmRNA発現量をQ-PCRにて定量的に評価したが、両抗体処理間でこれらのmRNAの発現量には違いは認められなかった。

(結論)

本研究により、SIRP α がヒトLCH細胞およびLCHモデルマウスのLCH-DCに発現していることが明らかとなった。さらに、抗マウスSIRP α 抗体であるMY-1-mIgG2a投与を行なったLCHモデルマウスでは、血中におけるLCH-DCの増加抑制、脾臓でのLCH-DC数の減少、肝臓での病変部の減少が認められ、MY-1-mIgG2aがLCHの症状を緩和することが明らかとなった。また、MY-1-mIgG2aはADCPを介したMΦのLCH-DCに対する殺細胞効果を増強した。以上の結果か

ら、SIRP α は LCH における新規の治療標的候補分子であり、それを標的とする抗 SIRP α 抗体が LCH の治療薬として利用できる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第3299号	氏名	岡本 武士
論文題目 Title of Dissertation	<p>ランゲルハンス組織球症に対する治療標的候補分子 SIRPα Targeting of SIRPα as a potential therapy for Langerhans cell histiocytosis</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 副査 Vice-examiner 副査 Vice-examiner</p> <p>松政 有三 伊藤 一郎 篠山 陵司</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【背景、目的】

ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH) は、未熟な樹状細胞(DC)の異常増殖を特徴とする希少疾患である。特に脾臓、肺、肝臓などの重要臓器に病変が及ぶ症例には、有効な治療法が十分に確立されておらず、新規治療標的の特定が求められている。

SIRP α は膜型分子であり、マクロファージ(MΦ)やDCなどに高発現している。これまでにMΦ上のSIRP α とがん細胞上に発現する膜型分子CD47との相互作用が、がん細胞に対するMΦの食食作用を抑制的に制御しており、この結合を阻害する抗SIRP α 抗体が、がん抗原を認識する抗体医薬によるがん細胞に対するMΦの抗体依存性細胞食食 (ADCP) を増強し、抗腫瘍効果を増強することが報告されている。また腎癌や悪性黒色腫ではSIRP α の発現が認められ、抗SIRP α 抗体が、これらがん細胞上のSIRP α に結合することでMΦによるADCPを直接誘導するとともに、CD47-SIRP α 結合を阻害することでそのADCPを増強し、単独で抗腫瘍作用を発揮することが示されている。

そこで本研究では、LCH の責任細胞が病的な DC (LCH 細胞) であることから、これらの LCH 細胞においても SIRP α が発現しており、それを標的分子とする抗 SIRP α 抗体が LCH に対して治療効果を発揮し得ると想定し、LCH 患者の組織切片での SIRP α の発現と、LCH モデルマウスにおける抗 SIRP α 抗体の治療効果を検討した。

【方法、結果及び考察】

最初に LCH 患者の組織切片を用い、LCH 細胞における SIRP α の発現の有無について検討した。CD1a はヒト LCH の診断マーカーであり、免疫組織化学染色と蛍光 2 重免疫組織染色を用いたところ、CD1a の染色部分に一致して SIRP α は染色され、ヒト LCH 細胞において SIRP α 発現が確認された。

CD11c 陽性 DC に特異的にヒト BRAF の活性型変異体 (V600E) を発現する LCH のモデルマウス (BRAFV600ECD11c マウス) を既報に従い作製し、CD11c 陽性かつ MHC II 陽性細胞を LCH-DC として、以下の解析を行った。12 週齢 BRAFV600ECD11c マウスでは、脾臓、肝臓、肺の HE 染色では多発炎症性結節を認めた。また脾臓の LCH-DC において、SIRP α が発現していることを確認した。LCH を発症し始める 8 週齢 BRAFV600ECD11c マウスに週 2 回のコントロール抗体または MY-1-mIgG2a(抗 SIRP α 抗体)の投与を行った。末梢血中の LCH-DC の割合は、抗 SIRP α 抗体投与群で有意な低下が認められた。さらに抗体投与 4 週間後の脾臓重量と脾臓における LCH-DC の総数に有意な低下が確認され、肝臓の病変部の減少を確認した。またヒト LCH 患者と同様に、このモデルマウスも貧血を呈したが、抗 SIRP α 抗体投与群では貧血は有意に改善した。

抗SIRP α 抗体投与による治療効果における作用機序について、in vitroで解析を進めた。BRAFV600ECD11cマウス骨髓由来DC(BMDC)とM Φ の共培養下に抗SIRP α 抗体を加え、貪食実験を行ったところ、M Φ による有意なBMDCの貪食が確認された。一方、エフェクター候補細胞である骨髓由来好中球との共培養では、抗SIRP α 抗体は好中球のLCH-DCへの抗体依存性細胞傷害活性を誘導しなかった。さらにLCHの病態形成にはLCH細胞の生存の延長とCCR7依存性の細胞運動の抑制が重要であることから、抗SIRP α 抗体のBRAFV600ECD11cBMDCの生存や運動能に対する作用についての検討を試みた。抗SIRP α 抗体処理でBRAFV600ECD11cBMDCの生存率は抑制されなかった。さらにCCL19によるBRAFV600ECD11cBMDCの遊走能とそのリガンドであるCCR7のmRNA発現量にもコントロール抗体との差は認めなかった。またLCH細胞から産生されるCCL5、CCL20、CXCL11、CXCL12などのケモカインが炎症性肉芽腫の形成に関与することから、BRAFV600ECD11cBMDCにおけるそれらのmRNA発現量を評価したが、これらに差は認めなかった。

【結論】

SIRP α がヒトLCH細胞およびLCHモデルマウスのLCH-DCに発現が確認された。さらに抗SIRP α 抗体投与を行なったLCHモデルマウスでは、血中LCH-DCの増加抑制、脾臓でのLCH-DC数の減少、肝臓での病変部の減少が認められ、症状が緩和された。また抗SIRP α 抗体はADCPを介したM Φ のLCH-DCに対する殺細胞効果を増強した。以上の結果から、SIRP α はLCHにおける新規の治療標的候補分子であり、それを標的とする抗SIRP α 抗体がLCHの治療薬となり得る可能性が示された。

以上、本研究は、ランゲルハンス細胞組織球症の責任細胞である未熟な樹状細胞におけるSIRP α の発現を確認し、治療標的となりうることを明らかにした。有効な治療法が十分に確立されていないランゲルハンス細胞組織球症の新規治療につながる可能性があり、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。