

「ランゲルハンス細胞組織球症に対する新規免疫療法の開発」

神戸大学医学研究科 齊藤 泰之

1 研究の背景と目的

ランゲルハンス細胞組織球症 (Langerhans cell histiocytosis; LCH) は、骨、皮膚、肝臓、脾臓/リンパ節に多発性の病変を認める希少疾患である。LCH は皮膚に常在する樹状細胞 (Dendritic cell; DC) であるランゲルハンス細胞に由来する造血細胞の増殖性疾患であるが、希少疾患 (小児 100 万人あたり約 5~9 例/年) であることに加え LCH の病態を再現した株化細胞や動物モデルが存在しないことからこれまで LCH の病態解明は困難であった。近年の解析手法の進歩により、LCH は他の造血器悪性腫瘍と同様に造血幹前駆細胞に由来し、DC (ランゲルハンス細胞) への分化の過程で生じた異常細胞によって生じることが明らかとなったものの (Allen, CE. et al., *N Eng J Med*, 2018)、LCH を標的とした創薬研究は依然進んでいない。そこで本研究課題では、臨床検体を用いて LCH における SIRP α の発現と重症度に関与するか検討するとともに、LCH の病態形成における SIRP α の役割について遺伝子改変動物モデルを用いて検討を行う。さらに、LCH モデルマウスを用い、SIRP α を標的とした創薬 (抗マウスおよび抗ヒト SIRP α モノクローナル抗体) による LCH に対するがん免疫療法の可能性について *in vivo* での検討を行う。

2 研究方法・研究内容

研究計画1 ヒト LCH における SIRP α の発現および臨床経過との関連の探索

本研究においては、LCH 組織標本サンプルを多数有する県立こども病院 血液・腫瘍科 (小阪嘉之小児がん医療センター長、長谷川大一郎小児がん医療センター次長) との研究協力のもと、LCH 組織サンプルにおける SIRP α の発現について検討した (神戸大学倫理委員会承認番号 170199 ならびに県立こども病院倫理委員会承認番号 29-93)。パラフィン包埋 LCH 腫瘍組織から切片を作製し、HE 染色ならびに LCH の特異的マーカーである CD1a に加え SIRP α の発現について免疫染色をおこなった。さらに一部のサンプルについては、蛍光染色法を用いて CD1a と SIRP α の発現について二重染色をおこなった。得られた結果と臨床情報 (浸潤臓器ならびに進展度) を照らし合わせて LCH の進展度と SIRP α 発現について検討をおこなった。

研究計画2 LCH マウスモデルを用いた抗マウス SIRP α モノクローナル抗体による抗腫瘍効果の検討

LCH の病態解析がこれまで困難であった理由の一つに、希少疾患でありサンプルの蓄積が困難であることに加え、LCH の病態を再現した株化細胞やモデル動物が存在しなく、*in vitro* や *in vivo* での解析が困難であった経緯がある。しかし、近年の遺伝子解析手法の進歩により LCH 症例の大多数の症例に Ras-MAPK 経路の遺伝子異常、なかでも半数以上の症例に *BRAFV600E* 変異を有することが明らかとなり (Allen, CE. et al., *N Eng J Med*, 2018)、実際に DC 特異的に *BRAFV600E* を発現するマウスを作製したところ、このマウスにおいて、肺、肝臓を中心に組織球の著しい浸潤および結節病変 (組織球症) を認めた (Berres, ML. et al., *J Exp Med*, 2014)。本件研究においても、DC 特異的 *BRAFV600E* 発現マウス (*CD11c-Cre; BRAFV600E, BRAFV600E^{CD11c}*) を用い、抗マウス SIRP α 抗体の単剤投与による抗腫瘍効果の検討を行った。さらに、治療後のマウスの各臓器における LCH 細胞の浸潤の程度、ならびに腫瘍微小環境内における免疫細胞の浸潤の程度についてもフローサイトメトリーを用いて検討を行うと同時に、抗マウス SIRP α 抗体投与による血液学的ならびに非血液学的毒性の有無についても検討をおこなった。

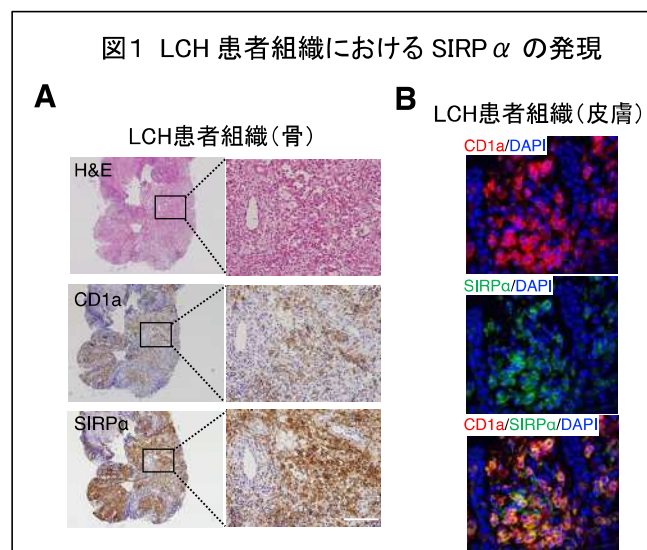
研究計画3 抗ヒト SIRP α モノクローナル抗体を用いたヒト LCH 治療モデルの開発

ヒト由来の造血幹細胞に関しては、ひょうご臍帯血バンクとの研究協力により得られたヒト臍帯血より CD34 陽性細胞を単離して得られたヒト造血幹細胞を用いた。ヒト造血幹細胞を免疫不全マウスに投与することで、ヒト免疫細胞を有した免疫系ヒト化マウスを作製し、さらにヒト腫瘍細胞を投与することで、ヒト腫瘍に対するがん免疫療法の評価が可能なマウスモデルの樹立をおこなった。これらのマウスに対し、抗ヒト SIRP α 抗体もしくはコントロール抗体を腹腔内に投与し、抗腫瘍効果の有無につき検討をおこなった。

3 研究成果

(1) ヒト LCH における SIRP α の発現および臨床経過との関連の探索

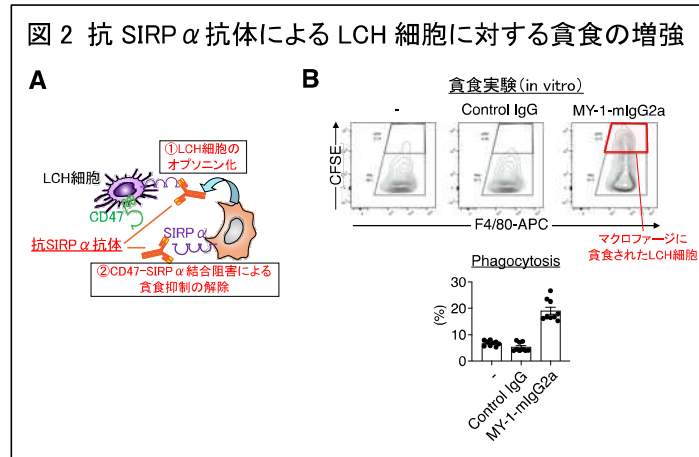
まず LCH 細胞が実際に SIRP α を特異的に発現しているかについて LCH 組織標本を用いて検討をおこなった。その結果、連続切片を用いて解析した 39 症例のうち 37 症例(約 95%)で LCH のマーカーである CD1a 陽性腫瘍組織における SIRP α の発現が陽性であった(図 1A)。さらに、一部の腫瘍サンプルを用いて CD1a 抗体と SIRP α 抗体での蛍光染色をおこなったところ、CD1a 陽性細胞における SIRP α の発現が共在することが明らかとなった(図 1B)。続いて、SIRP α の発現量を二段階評価(+もしくは++)に分け、進展度(限局性もしくは全身性)との関連について検討をおこなったところ、SIRP α の発現量と進展度には明らかな関連性を認めなかった(未発表データ)。



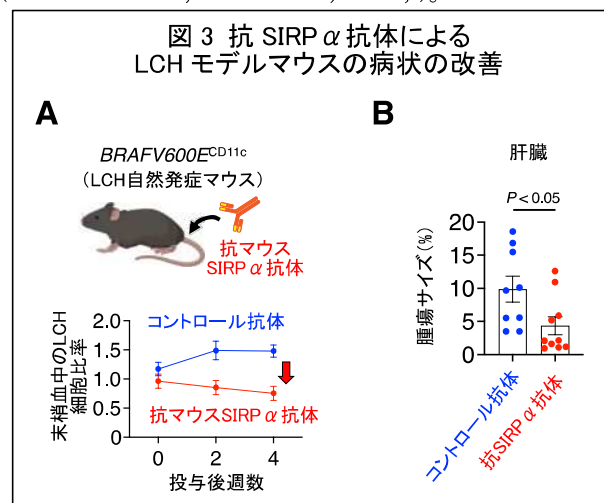
(2) LCH マウスモデルを用いた抗マウス SIRP α モノクローナル抗体による抗腫瘍効果の検討

LCH 患者において、SIRP α は腫瘍細胞のみならずマクロファージや DC にも発現すると想定されている。これらの貪食細胞に発現する SIRP α は標的細胞(がん細胞)上に発現する CD47 の細胞外領域で相互作用することにより、抗体依存性細胞貪食(ADCP)を負に制御することが申請者らによって明らかにされてきた。このことから、CD47 と SIRP α との結合を阻害する抗 SIRP α モノクローナル抗体の使用により、SIRP α 発現腫瘍である腎細胞がんや悪性黒色腫に対して、抗 SIRP α モノクローナル抗体の単剤使用により、ADCP の増強効果を誘導することが示されてきた(Yanagita, *et al.*, *JCI Insight*, 2017)。したがって、SIRP α 発現腫瘍である LCH に対しても同様に抗 SIRP α モノクローナル抗体の単剤使用によって

マクロファージによるLCH細胞のADCP活性を増強させる可能性を想定している(図2A)。そこで、LCHモデルマウス(*BRAFV600E^{CD11c}*)を用い、*BRAFV600E^{CD11c}*マウスより単離したLCH細胞と同マウスの骨髄細胞より誘導したマクロファージを用いた *in vitro* の食食実験をおこなったところ、抗マウス SIRP α モノクローナル抗体(MY-1 mIgG2a)がマクロファージによるLCH細胞に対する食食を増強させることを明らかにした(図2B)。

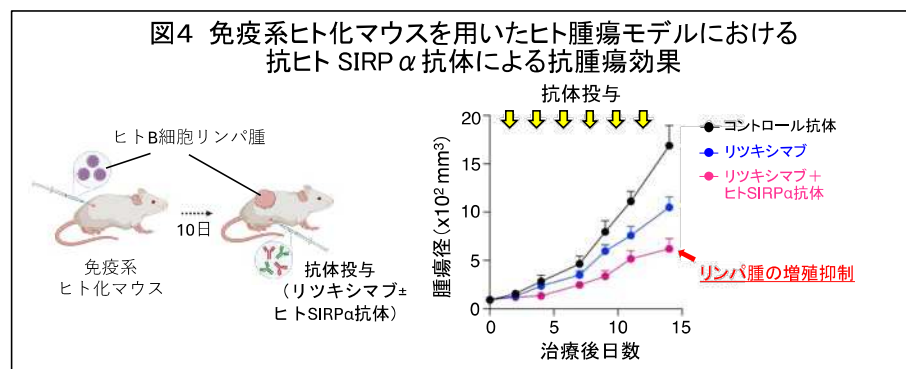


次に、*in vivo* で抗 SIRP α モノクローナル抗体によるLCHに対する抗腫瘍効果を検討するため、*BRAFV600E^{CD11c}*マウスに対して抗マウス SIRP α モノクローナル抗体を組織学的に発症が見られる8週令より経時的(週2回)に投与し、腫瘍の増大の抑制の有無、貧血抑制効果の有無等について検討をおこなった。抗マウス SIRP α 抗体投与により、*BRAFV600E^{CD11c}*マウスにおける末梢血中のLCH細胞比率が減少(図3A)、さらに脾腫や肝臓の結節性病変のサイズが改善していたことから(図3B)、抗マウス SIRP α 抗体単剤投与によりこれらの臓器におけるLCHの腫瘍量が減少することが明らかになった。一方、腫瘍内に浸潤した免疫細胞について解析をおこなったところ、抗体の投与後4週の段階で脾臓に浸潤した好中球数の増加を認めたものの、T細胞数やNK細胞数、マクロファージの数には影響は認められなかった。さらに、抗体投与による血液学的ならびに非血液学的毒性について、正常マウスに抗体投与後に末梢血中の細胞分画や生化学的解析を行ったところ、好中球数の軽度増加を認めた。一方、生化学的項目の異常や貧血については特に認めなかった。以上の結果から、抗 SIRP α 抗体の単剤投与はLCHに対する新たな免疫療法となり得る可能性が考えられた(Okamoto et al., *Cancer Sci*, 2023;)。



(3) 抗ヒト SIRP α モノクローナル抗体を用いたヒト LCH 治療モデルの開発

ヒト LCH モデルマウスに対する抗ヒト SIRP α 抗体の効果を検討する目的で、まずヒト SIRP α 抗体の樹立とその抗腫瘍効果について、ヒト造血幹細胞を免疫不全マウス(ヒトサイトカイン発現免疫不全マウス、MITRG マウス)に投与することで免疫細胞をヒト化したマウス(免疫系ヒト化 MITRG)を作製した。このマウスにおいて、ヒト SIRP α とヒト CD47 との結合を阻害する抗ヒト SIRP α 抗体(SE12C3)の効果をヒト B 細胞リンパ腫モデルを用いて検討したところ、免疫系ヒト化 MITRG マウスにおいて、ヒト SIRP α 抗体と抗 CD20 抗体(リツキシマブ)との併用により、リツキシマブによる抗腫瘍効果を増強させることを見出した(Saito et al., *Front Immunol*, 2023) (図4)。さらに現在本マウスモデルを用いて、ヒト臍帯血に組換えレンチウイルスを用いて *BRAFV600E* 変異遺伝子を導入させ、抗ヒト SIRP α 抗体単剤投与によるヒト LCH モデルに対する抗腫瘍効果について検討を行っている。



4 生活や産業への貢献および波及効果

今回の研究成果により、希少疾患であるランゲルハンス細胞組織球症に対して、SIRP α が選択的に高発現することから、SIRP α は LCH に対する新たな診断マーカーの一つとして有用である可能性が示唆された。また、マウスモデルを用いた研究成果により、抗 SIRP α 抗体単剤投与により LCH の病勢を抑えられることが明らかとなった。さらに、抗 SIRP α 抗体による毒性はほとんど認めないことから、化学療法を繰り返し行っている難治性の進行期 LCH の症例に対して、病勢を抑える目的として有用である可能性が示唆された。現在、複数の製薬会社より抗 SIRP α 抗体を用いたがん免疫療法に対する臨床試験が行われており、本研究成果により将来的に LCH に対しても臨床試験が開始されることが期待される。