

課題番号 : 28指5002
研究課題名 : 多発性骨髄腫の治癒を目指した抗骨髄腫細胞表面抗原モノクローナル抗体併用NK細胞輸注療法の開発
主任研究者名 : 萩原将太郎
分担研究者名 : なし、研究協力者: 反町典子
キーワード : NK 細胞、SLAMF7、多発性骨髄腫、セルプロセッシング、モノクローナル抗体
研究成果 :

1. 多発性骨髄腫患者における NK 細胞機能の検討

多発性骨髄腫患者 31 例および健常者 10 例の末梢血を用い、NK 細胞の割合および表現型の解析を行った。NK 細胞は CD3 陰性、CD56 陽性により同定し、更に骨髄腫細胞との判別のため NKp46 を用いた。NK 細胞表現型は SLAMF7、NKG2D、Fc γ RIII、PD-1 および CD56bright or dim によって分類した。

その結果、骨髄腫診断時の NK 細胞数は健康ドナーと有意差はなかったが、寛解時には有意な増加が認められた ($p=0.013$)。また免疫チェックポイント分子である PD-1 は健康ドナーに比して有意に発現が増加していた ($p=0.004$)。SLAMF7 の発現はどの集団でも差は認めなかった。NK 細胞の抗体依存性細胞傷害に必要な Fc γ RIII は骨髄腫患者の NK 細胞で有意に抑制されていた ($p=0.001$)。IMiDs による治療を受けている患者において、NK 細胞総数は有意に増加し、特に CD56dimNK 細胞分画の増加は著明であり ($p=0.019$)、PD-1 は有意に抑制されていた ($p=0.001$)。

2. NK 細胞による、多発性骨髄腫細胞に対する抗体依存性細胞傷害作用の検討

正常ヒト末梢血単核球を用いて多発性骨髄腫細胞株 MM.1S に対する抗体依存性細胞傷害作用を検討した。

IL2 で刺激した末梢血単核球は抗 SLAMF7 抗体存在下で MM.1S に対する細胞傷害作用を持つことを確認した。

3. 血清中可溶性 SLAMF7 の測定系樹立

BMS より供与された 2 種類の抗 SLAMF7 抗体を用いて、血清中の可溶性 SLAMF7 を定量するための sandwich ELISA の系を立ち上げた。感度としては 1 ng/ml までの検出は十分可能で有り、骨髄腫患者および健常人併せて 39 例の血清中可溶性 SLAMF7 の定量を行った。現在可溶性 SLAMF7 が相関を示す骨髄腫患者の病態および NK 細胞の表現型について解析を進めていると同時に、可溶性 SLAMF7 の機能的意義の解析を *in vitro* 実験系で進めた。

その結果、健常人の血清中には可溶性 SLAMF7 がほとんど検出されなかったのに対し、初発および再発の骨髄腫患者血清中には、可溶性 SLAMF7 が顕著に認められた。

この知見は、可溶性 SLAMF7 が骨髄腫の治療評価あるいは早期再発指標として、今後利用できる可能性を示唆している。

4. NK 細胞の分離、増幅法の確立

我々は健常人末梢血液から単核球を分離し、CD3, CD56 抗体を用いて NK 細胞分画の純化を行った。その後、IL-2, IL-15 等のサイトカイン存在下での培養を行い、NK 細胞の増幅を試みた。

その結果、IL-2 濃度の段階的調整法による培養により、個人差はあるものの、濃縮した末梢血 NK 細胞数を 8-10 倍以上に増加させることが可能な培養法を樹立した。

5. 抗 SLAMF7 モノクローナル抗体と NK 細胞表面上 SLAMF7

骨髄腫患者における NK 細胞表面上 SLAMF7 は健常人に比して低下していた。また、抗 SLAMF7 モノクローナル抗体投与前後で NK 細胞表面の SLAMF7 発現量は減少する傾向が見られた。

NK 細胞表面上の SLAMF 7 発現を経時的に観察できた症例の解析では、M 蛋白減少効果と NK 細胞 SLAMF7 発現量に正の相関が示唆された。

6. 多発性骨髄腫の移植後残存病変に対する Elotuzumab 療法併用自家 NK 細胞輸注療法

我々は、これまでの基礎検討により、多発性骨髄腫の表面および NK 細胞表面に SLAMF7 が発現しており、抗 SLAMF7 抗体による抗体依存性細胞傷害が惹起されることを確認した。

この知見を応用して、寛解導入療法を施行した初発の多発性骨髄腫患者の自己末梢血を採取し保存し、自己末梢血幹細胞移植後に残存病変を認める患者に対して、Elotuzumab を併用した自家培養 NK 細胞輸注療法を行う臨床試験を立案した。

認定再生医療等委員会の承認を得て、厚生労働省へ研究計画を申請し、平成 30 年 5 月 15 日に受理された。今後、症例を蓄積してゆく。

Subject No. : 28-5002

Title : Development of NK cell infusion therapy with anti-myeloma antigen monoclonal antibody for multiple myeloma

Researchers : Shotaro Hagiwara, Noriko Sorimachi

Key word : NK cell, SLAMF7, Multiple myeloma, Cell processing, monoclonal antibody

Abstract :

1. Analysis of NK cell function in Multiple myeloma patients

We performed phenotypic analyses of NK cells in patients with multiple myeloma.

<Methods> Peripheral blood samples were obtained from 31 multiple myeloma patients (10 newly diagnosed cases of myeloma, 10 relapsed, and 11 in complete or partial remission), and 9 healthy volunteers. NK cells were identified as a fraction of CD3 negative and CD56 positive, and NKp46 was further used for NK cell identification in CD56 positive myeloma cell-containing samples. The phenotype of NK cells was characterized by the expression of SALMF7, NKG2D, FcγRIII, PD-1, and CD56bright or dim. <Results> At the diagnosis of multiple myeloma, the number of NK cells was significantly low in comparison to that of patients in remission ($p=0.013$). Regarding immune checkpoint molecule, the expression of PD-1 on the NK cells of myeloma patients was significantly increased in comparison with that of healthy donors ($p=0.004$). The expression of SLAMF7 did not differ between disease statuses. Notably, the expression of FcγRIII, which is a key player in a mechanism of antigen-dependent cytotoxicity, was significantly suppressed in the NK cells of myeloma patients ($p=0.001$). Furthermore, in patients who were treated with immunomodulatory drugs (IMiDs), the significant increases in the total number of NK cells, especially in CD56dim NK cell fraction ($p=0.019$), significant suppression of PD-1 ($p=0.001$) were observed.

2. Analysis of antibody dependent cytotoxicity of NK cells against myeloma cells.

Antibody dependent cell mediated cytotoxicity of normal peripheral blood mononuclear cells (PBMC) against myeloma cell line MM.1S was investigated. Cytotoxic activity of IL2 stimulated PBMC against MM.1S was enhanced by anti-SLAMF7 antibody.

3. Establishment of the measurement system of serum soluble SLAMF-7

We established the measurement system of serum soluble SLAMF-7 using 2 kinds of anti-SLAMF7 antibody, and measured the soluble SLAMF7 in the serum of 30 patients and 9

healthy donors. As a next step, we would like to analysis the correlation between soluble SLAMF7 and clinical feature of multiple myeloma.

4. Development of the method for purification of NK cells and amplification of purified NK cell

From the separated peripheral blood mononuclear cells, we purified CD3⁻, CD56⁺ NK cell fraction. After the purification, the cells were cultured with IL-2 and IL-15, and we tried to amplify the NK cells. As a result, we established the culture method which can amplify the NK cells 8-10 times.

5. Anti-SLAMF7 monoclonal antibody and SLAMF7 on NK cell surface

SLAMF 7 on the surface of NK cells in myeloma patients was lower than in healthy subjects. In addition, the expression amount of SLAMF7 on the surface of NK cells tended to decrease before and after administration of anti-SLAMF7 monoclonal antibody.

Analysis of the cases in which SLAMF7 expression on the surface of NK cells suggested that there was a positive correlation between M protein reduction effect and NK cell SLAMF7 expression level.

6. Ex-vivo expanded NK cell therapy combined with Elotuzumab for residual disease of multiple myeloma after autologous stem cell transplantation.

We have confirmed that SLAMF7 is expressed on the surface of multiple myeloma and NK cell surface. Our basic investigation support anti-SLAMF7 antibody with NK cells induces antibody-dependent cellular cytotoxicity against myeloma cells.

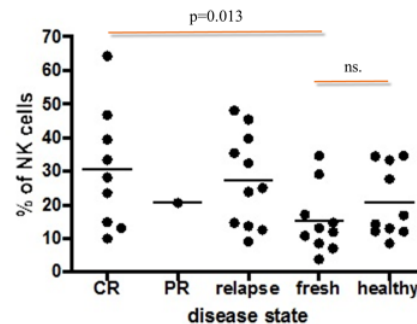
By applying this finding, autologous peripheral blood from multiple myeloma patient who underwent remission induction therapy was collected and preserved, and the expanded autologous NK cells with Elotuzumab were infused after the engraftment of autologous peripheral blood stem cell transplantation.

We made a plan for a clinical trial of cultured NK cell infusion therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma.

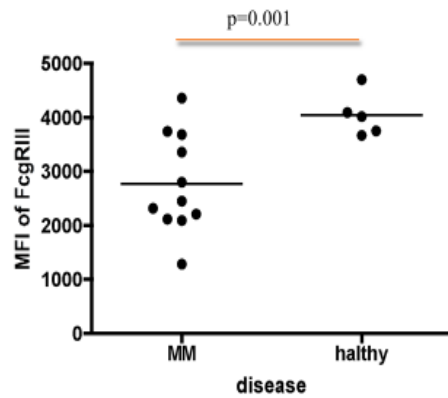
With the approval of the Committee of Certified Regenerative Medicine etc., We applied for a research plan to the Ministry of Health, Labor and Welfare and was accepted on May 15 2018, We have started to accumulate the cases.

	Myeloma patients	Healthy donors
Number		30
Age		45.8 ± 9.3
Sex	Male 14, Female 16	Male 6, Female 4
M-protein		
	IgG	21
	IgA	3
	BJP	6
Disease status		
	Fresh	9
	Relapse	11
	Partial remission	1
	Complete remission	11
IMiDs		
	(+)	10
	(-)	20

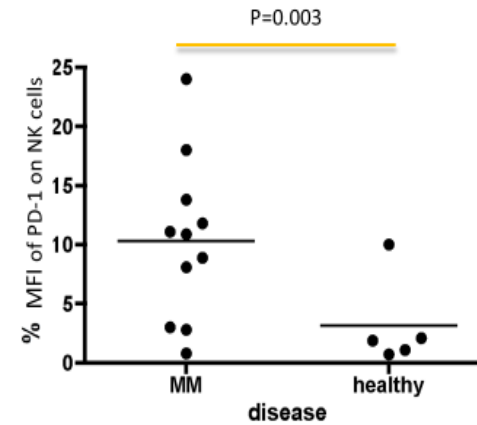
Disease status and number of NK cells



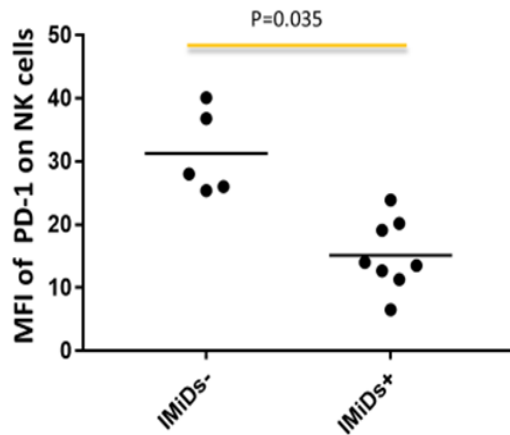
Expression of FcγRIII on NK cells



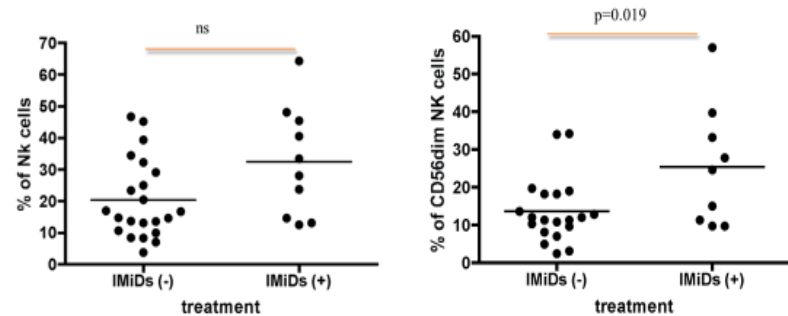
Expression of PD-1 on NK cells



Expression of PD-1 on NK cells



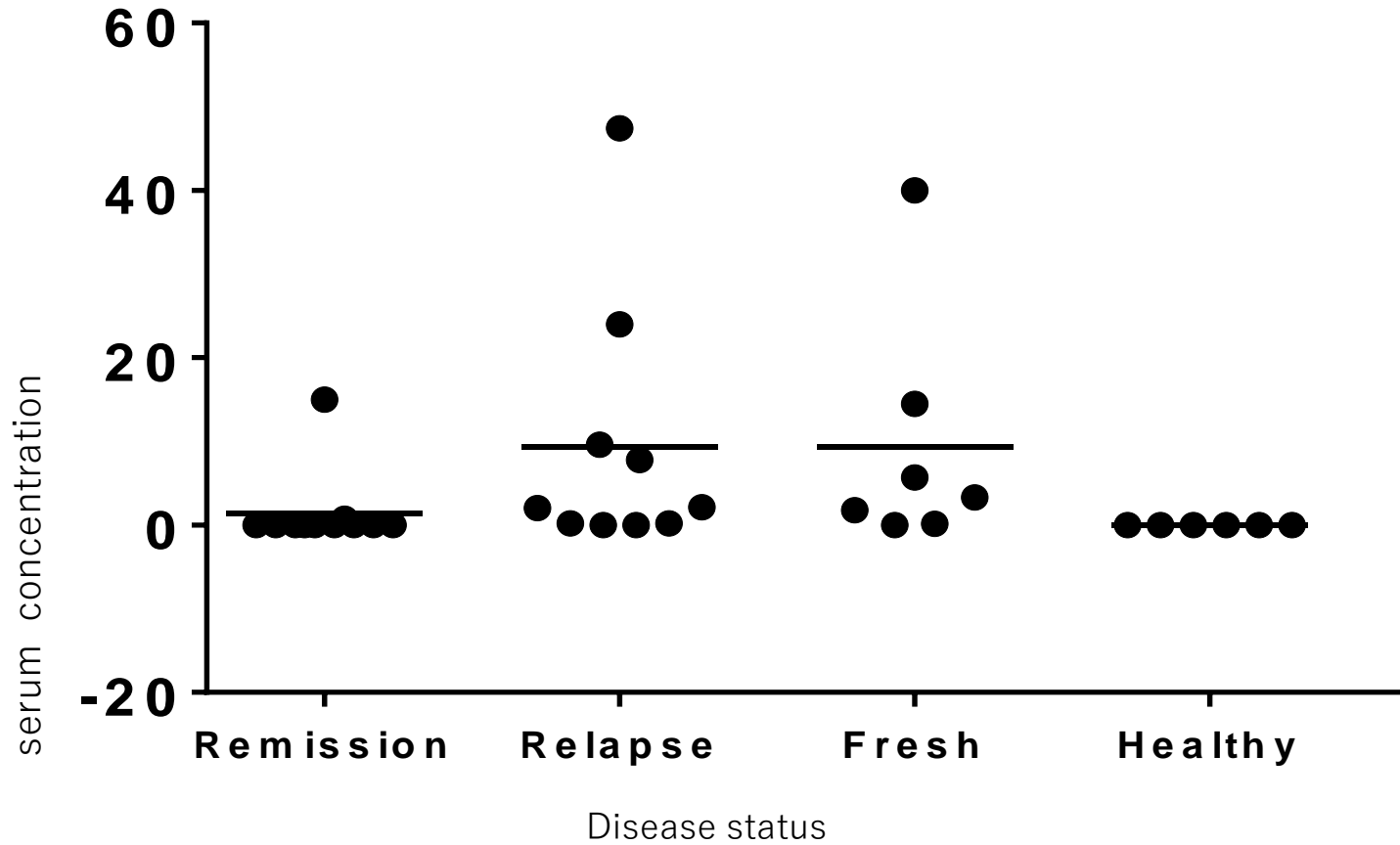
The difference of NK cells with or without IMiDs



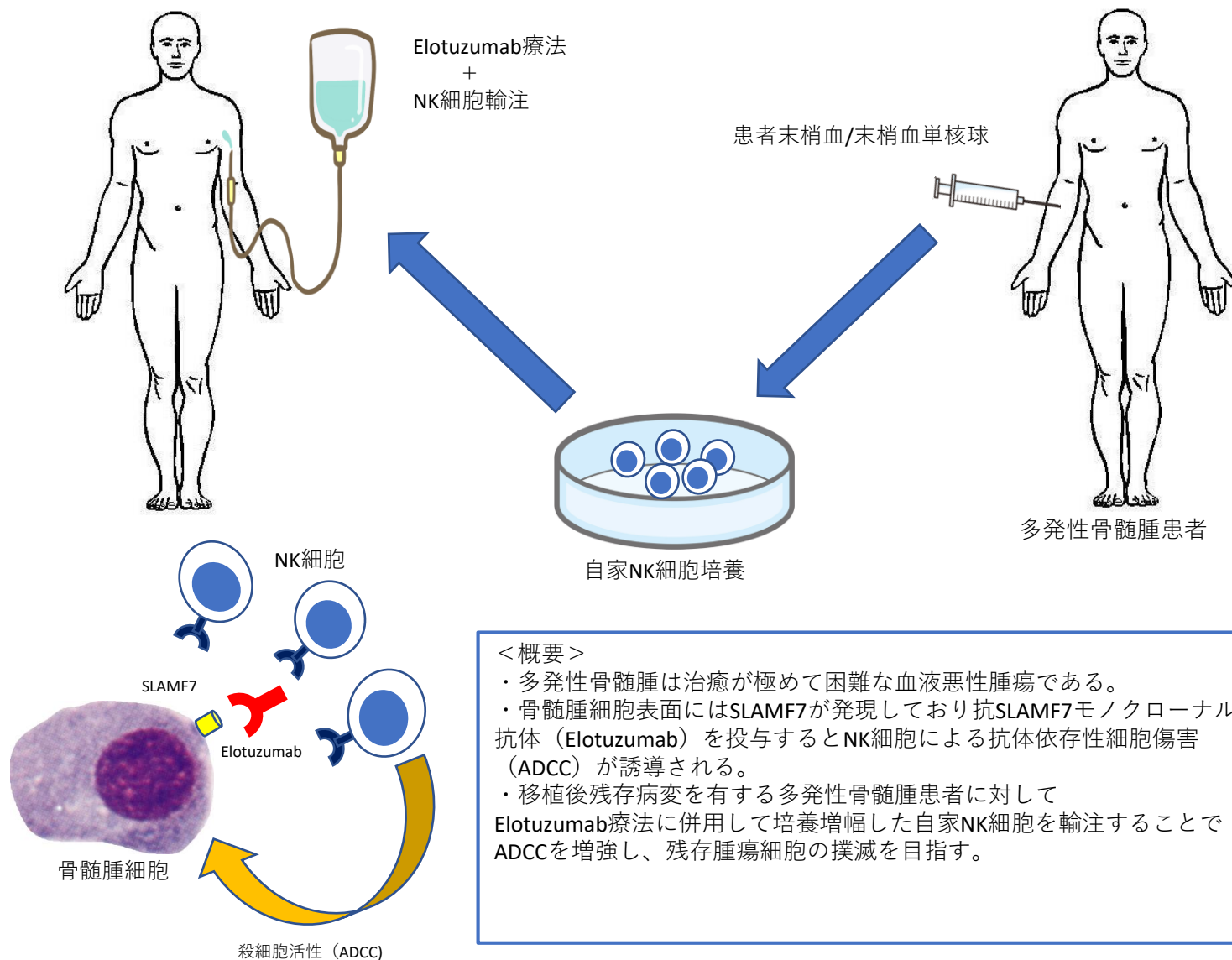
骨髓腫患者における可溶性SLAMF7の検討

(ng/ml)

Soluble SLAMF7 in serum



多発性骨髄腫の移植後残存病変に対するElotuzumab療法併用 自家NK細胞輸注療法臨床第 I / II 相試験



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：28指5002

研究課題名：多発性骨髄腫の治癒を目指した抗骨髄腫細胞表面抗原モノクローナル抗体併用NK細胞輸注療法の開発

主任研究者名：萩原将太郎

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
多発性骨髄腫患者におけるNK細胞表現型の解析	萩原将太郎 反町典子	日本骨髄腫学会	東京	2017年5月
多発性骨髄腫におけるNK細胞機能	萩原将太郎	日本骨髄腫学会	徳島	2016年5月
Phenotypic analysis of NK cells in patients with multiple myeloma	萩原将太郎 反町典子	International myeloma workshop	NewDelhi	2017年3月
Elotuzumabの抗腫瘍効果とNK細胞表面SLAMF7の変動についての検討	梅野富光 萩原将太郎 反町典子	日本骨髄腫学会	千葉	2018年5月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。