

生体内に残存する慢性骨髄性白血病幹細胞の抗腫瘍免疫機構の解析

近畿大学医学部 血液・膠原病内科

福井 彩乃

田中 宏和、岩田 吉生、口分田 貴裕、松村 到

1.緒言

チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の登場により、慢性期の慢性骨髄性白血病 (CML) は、治癒を目指せる時代になった。しかし、TKI により深い寛解を達成・維持していても、中止後多くの症例は再発する。これには、CML 幹細胞の TKI 抵抗性に起因すると考えられる^{1),2)}。CML は、抗腫瘍免疫に対して感受性が高く、実臨床においても TKI 開発前の慢性期 CML の治療に、IFN- α が広く用いられていた。一方、TKI 自体が抗腫瘍免疫に関わる免疫担当細胞の増殖や機能に影響を与えることが報告されているが、その臨床的意義についてはいまだ明らかではない。

申請者らは TKI 投与中の BCR-ABL 陽性 CD34+38-細胞に特異的に発現する表面抗原として CD120a、CD225 を同定した。さらに CD34+38-120a+225+ CML 幹細胞表面にチェックポイント分子 PD-L1 の発現を認め、治療に伴い PD-L1+CML 幹細胞が濃縮されることを見出した。

本研究では、治療前後の様々な奏効度の CML 患者骨髄から CML 幹細胞を分離し、使用薬剤や奏効度との相関を解析し、チェックポイント阻害薬が有用な症例の抽出を試みるとともに、CML 幹細胞において抗腫瘍免疫に関わる新たな治療標的分子を探索することを目的とした。

2.方法

2-1) 治療奏効度と PD-L1+CML 幹細胞の残存率、および免疫担当細胞数との相関
使用 TKI 別に、分子遺伝学的完全寛解を得ている症例、さらには無治療寛解 (treatment free remission, TFR) を得ている症例における PD-L1+CML 幹細胞の残存率を評価した。

2-2) 他のチェックポイント分子の発現

種々の腫瘍細胞に発現することが報告されている免疫チェックポイント分子：CD80/CD86

(CTLA4 ligands)、B7 ファミリー分子、MHC-classII (LAG3 ligand)、CD112/CD155、CD96 (TIGIT ligand)、Galectin 9 (TIM-3 ligand)、反対に抗腫瘍免疫を活性化する分子：CD137 (4-1BB) ligand、CD252 (OX40) ligand などについて、CML 幹細胞表面における発現の有無を評価した。

2-3) PD-L1+CML 幹細胞の T 細胞の活性化抑制能

CD8+PD-1+, PD-1- T 細胞を分離し、*in vitro* で PD-L1+CML 幹細胞と共培養した。培養上清へのサイトカイン放出能、および T 細胞の分裂能をそれぞれサイトカイン定量抗体アレイ、CFSE Cell Division Assay Kit を用いて CTL 活性に及ぼす影響を評価した。

2-4) CML 幹細胞の抗腫瘍免疫に関わる新たな治療標的分子の探索

骨髄組織より CML 幹細胞をマイクロダイセクション法により単離し、CD120a/NF- κ B 経路の遺伝子発現をシングルセルレベルで評価し、パスウェイ解析を行った。

3.結果

3-1) CD34⁺38⁻225⁺120a⁺で定義される CML 幹細胞において、免疫チェックポイント分子 PDL1 は、初発時 18.8 ± 14.2% に発現を認めたのに対し、TKI 投与により細胞遺伝学的寛解 (CyR) を得ている症例の CML 幹細胞では 47.6 ± 22.5% と有意な発現上昇を認めた (n=17, P<0.01)。投与 TKI による差は認められず、PDL2 の発現は初発、治療中いずれにおいても認められなかった。興味深いことに CD34⁺38⁻225⁺120a⁺ CML 細胞では、PDL1 の発現上昇が軽度であったことから、CD120a/NF- κ B 経路が CML 細胞における PDL1 の発現調節に機能している可能性が示唆された。

3-2) PDL1/L2 以外の免疫チェックポイント分子である CD80/CD86, B7 ファミリー分子、CD112/CD155、CD226, Galectin 9、CD137 ligand, CD252 (OX40) ligand の発現に関しては、TKI 治療前後での一定の傾向は認められなかった。

3-3) CyR を得ている患者骨髄より PDL1⁺、PDL1⁻CML 幹細胞を sorting し、同一患者由来の CD8⁺細胞とサイトカイン非存在下で 48 時間共培養した際の培養上清中に産生される液性因子を定性的に評価した。その結果 PDL1⁺細胞との共培養では、PDL1⁻細胞との共培養と比較して、IFN γ , TNF α , IGFBP2 の上清中の濃度が低く、IL10 の濃度が高かったことから、PDL1⁺細胞は CD8⁺細胞に対して抑制的に作用していると考えられた。

3-4) 分子遺伝学的寛解を得た 4 例の骨髄組織標本を用いて、CD34⁺38⁻225⁺120a⁺CML 幹細胞の局在を評価した結果、正常造血幹細胞, HSC と同様に内骨膜上に存在する骨芽細胞、および類洞血管内皮細胞に接着して存在し、病勢や臨床病態との関連は見出されなかった。CML 幹細胞周囲には、制御性 T 細胞、Treg や骨髄由来抑制細胞 MDSC が誘導されており、エフェクター T 細胞の活性を抑制していることが推測された。CML 幹細胞周囲の抑制性細胞の

割合を比較した結果、TKI を中止し得た症例では、その割合は低い傾向にあった。骨髓組織より CML 幹細胞をマイクロダイセクション法により単離し、CD120a/NF- κ B 経路の遺伝子発現をシングルセルレベルで評価し、パスウェイ解析を行った。その結果、一部の CML 幹細胞では、NF- κ B の下流に位置する Indoleamine 2, 3-dioxygenase-1, IDO1 の有意な発現上昇を認めた。

4. 考察

TKI により CML の治療は飛躍的に進歩し、一部の症例では TKI 中止後も RQ-PCR 法で微小残存病変 (MRD) が検出されない TFR が得られている。しかし、TKI を中止できる症例は約 40%とまだまだ少ない。また、TFR を維持している症例には依然として CML 幹細胞が残存しており、抗腫瘍免疫能により TFR が維持されていると推測されているが、その詳細は明らかではない。従って、TFR を維持している患者に残存する CML 幹細胞の特性を明らかにすることは、学術的のみでなく、臨床的にも極めて重要な問題である。また、CML 幹細胞が残存した状態での TFR が抗腫瘍免疫能によって維持されているのであれば、どの程度安定なものであるのか、例えば、ウイルス感染などで破綻しないのかなど、明らかにすべき問題が数多く残されている。

本研究では、生体内に残存する CML 幹細胞の抗腫瘍免疫回避機構について解析を行った。申請者らが同定した表面マーカーを用いて CML 幹細胞を分離、解析した結果、CML 幹細胞は TKI 投与に対して PDL1 の発現増強を介して CTL の機能を抑制し、生体内に残存している可能性が示唆された。また、CML 幹細胞における PDL1 発現制御機構として、CD120a/NF- κ B 経路の活性化を見出した。さらに、CML 幹細胞の骨髓組織における局在と、CD120a/NF- κ B 経路活性化の観点から解析した結果、骨髓組織における局在に関しては、申請者らが同定した表面マーカーを発現する CML 幹細胞は、正常 HSC と同様に造血ニッチに位置し、一方、TKI を中止し得た症例では、CML 幹細胞周囲の Treg や MDSC の集簇割合が低かったことから、これらの細胞が CML 幹細胞、ひいては CML の病態維持に対する抗腫瘍免疫に生体内で機能している可能性が示唆された。また、CML 幹細胞における CD120a/NF- κ B 経路を介した PDL1 の発現上昇に加え、NF- κ B の下流に位置する IDO1 の発現上昇を見出した。IDO1 は、腫瘍微小環境においてトリプトファンを免疫抑制性のキヌレニンへと代謝する律速酵素であり、その発現上昇は、Treg 発生の増加、エフェクター T 細胞の増殖能低下を誘導することが報告されている。さらにいくつかの癌種では、腫瘍微小環境において IDO1 の発現が抑制性細胞の誘導に寄与していることが示されており、IDO1 阻害薬と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法についても検討が行われていることから³⁾、今後造血器腫瘍への応用も期待される。

5.結語

CML 幹細胞は TKI 投与に対して PDL1, IDO1 の発現増強を介して CTL の機能を抑制し、体内に残存している可能性が示唆された。また、この機序に関わる CD120a/NF- κ B 経路の活性化は、CML 幹細胞の抗腫瘍免疫機構における新たな標的となる可能性が示唆された。

6.文献

- 1) Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017; 129: 1595-606.
- 2) Vetrie D, Helgason GV, Copland M. The leukaemia stem cell: similarities, differences and clinical prospects in CML and AML. *Nat Rev Cancer*. 2020; 20: 158-73.
- 3) Matino D, Afraz S, Zhao G, et al. Tolerance to FVIII: Role of the Immune Metabolic Enzymes Indoleamine 2,3-Dioxygenase-1 and Heme Oxygenase-1. *Front Immunol*. 2020; 11: 620.