

## 学位論文の要旨

# Compromised anti-tumor-immune features of myeloid cell components in chronic myeloid leukemia patients

(慢性骨髄性白血病患者の骨髄系細胞は抗腫瘍免疫能が損なわれた特徴を持つ)

March, 2022

(2022年3月)

Ibuki Harada

原田 生起

Department of Immunology

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 免疫学

( Doctoral Supervisor : Tomohiko Tamura, Professor )

( 指導教員:田村 智彦 教授 )

## 学位論文の要旨

### Compromised anti-tumor-immune features of myeloid cell components in chronic myeloid leukemia patients

(慢性骨髄性白血病患者の骨髄系細胞は抗腫瘍免疫能が損なわれた特徴を持つ)

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-97371-8>

#### 1. 序論

慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia: CML) は融合遺伝子 *BCR-ABL* に起因する骨髄増殖性腫瘍の1つである。CML患者の予後は、恒常的なチロシンキナーゼ活性を有する *BCR-ABL* に対する阻害剤 (Tyrosine Kinase Inhibitor: TKI) によって、劇的に改善した (Wong and Witte, 2004)。しかし TKI 療法には T315I 変異などの耐性例や副作用、服薬中止後の約6割の患者における再発など様々な問題点がある (Mahon et al., 2010; Ross and Hughes, 2020)。すなわち、CMLは未だに根治できていない疾患である。近年、多くのがんで腫瘍に対する免疫療法が注目され、中でも免疫チェックポイント分子 PD-1/PD-L1 の阻害抗体薬は、固形腫瘍において複数の根治例が報告され (McGranahan et al., 2016; Ribas and Wolchok, 2018)、大きな期待が集まっている。CMLは IFN- $\alpha$  療法の有効例があることから、腫瘍免疫に感受性があると考えられてきた (Biernacki et al., 2010; Talpaz et al., 2013)。しかし、CMLを発症した患者において腫瘍免疫は有効に作用しておらず、そのメカニズムについての解析は不十分である。本研究では、CMLで腫瘍免疫が働かないメカニズムを理解するために、フローサイトメーターで CML患者と健常人の末梢血および骨髄に含まれる免疫細胞 (特に骨髄系細胞) およびその前駆細胞集団の解析を行った。また、RNA-seq を用いて各骨髄系細胞の遺伝子発現を比較することで、CML患者において腫瘍免疫が抑制される原因の一端を明らかにした。

#### 2. 材料と方法

##### フローサイトメトリー

CML患者および健常人から採取した細胞を、各免疫細胞および前駆細胞に特異的な抗体で標識した (Breton et al., 2015; Bruck et al., 2018)。PD-L1 の発現解析には抗 PD-L1 抗体を、IRF8 の発現解析には抗 IRF8 抗体を用いた。標識細胞は FACS Canto II で分析し、FlowJo software で解析した。本研究で行われた全ての解析は、横浜市立大学の倫理委員会から承認されている (ヒト検体: A150723003 およびマウス細胞: #F-A-17-018 および #F-A-20-043)。

##### RNA シークエンス (RNA-seq)

古典的 1 型樹状細胞 (cDC1), 好中球, 好塩基球, 単球の RNA から Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina) で cDNA を調製した. 各 cDNA は Illumina HiSeq 500 を用いてシーケンスした.

#### バイオインフォマティクス解析

上記シーケンスデータ (GSE162462) および既報データ (GSE5550, GSE44920, GSE84509, GSE89020) の遺伝子発現は統計ソフトの R および R のパッケージ (prcomp, edgeR, limma) を用いて, 発現量の算出, 主成分分析, 相関解析, 発現変動遺伝子の抽出, 非階層的クラスタリング解析を行った.

### 3. 結果

#### CML 患者では樹状細胞分化が早期段階から障害される

CML 患者および健常人の末梢血を, フローサイトメーターを用いて, 解析した. すると CML 患者で骨髄系細胞の割合が増え, リンパ球系細胞は割合が 3 割程度に減少した. 興味深いことに, 骨髄系細胞の中でも古典的樹状細胞 (cDC) の割合は著減した. そこで, フローサイトメーターで CML 患者と健常人の骨髄における各前駆細胞の割合を調べると, CML 患者では cDC 系譜の前駆細胞の割合が著しく少なかった.

#### CML 患者の造血幹前駆細胞 (HSPC) では IRF8 の発現が低い

CML 患者の HSPC とマウスの骨髄前駆 (Lineage<sup>-</sup>) 細胞に BCR-ABL を遺伝子導入した細胞の発現プロファイルから, 共通して発現が著減する遺伝子として *IRF8*, *FLT3*, *DNTT* 遺伝子を抽出した. 前二者は cDC 分化に重要であることが知られている. さらにマウス HSPC を用い, BCR-ABL による cDC 分化抑制が転写因子 IRF8 の強制発現によって解除される一方で, サイトカイン受容体 FLT3 の強制発現にはそのような効果がないことを見出した. また, CML 患者の HSPC において, IRF8 タンパク質の発現が減少していることも確認した.

#### CML 患者の好中球では免疫抑制関連分子の発現が高い

次に, CML 患者の免疫細胞で質的な変化が起こっているのかを調べるために, CML 患者と健常人の cDC1, 好中球, 好塩基球, 単球の RNA-seq を行なった. なお cDC1 はがん抗原のクロスプレゼンテーションによって T 細胞による抗腫瘍免疫を惹起するのに必須な細胞である. CML 患者と健常人の遺伝子発現プロファイルは, cDC1, 好塩基球, 単球では大きな差がなかったのに対して, 好中球では大きく変動していた. そして, CML 患者の好中球では免疫抑制関連分子の発現が顕著に高かった.

## CML 患者の単球と好塩基球では PD-L1 が高発現である

RNA-seq データをより詳細に解析をするために、各免疫細胞集団間あるいは健常人と CML 患者間で遺伝子発現変動が大きい遺伝子を抽出して、クラスタリング解析を行なった。免疫関連分子に着目すると、PD-L1 が好塩基球に選択的に発現する遺伝子クラスターに含まれていた。そこで、フローサイトメトリーを用いて末梢血の骨髓系細胞表面の PD-L1 タンパク質発現を調べると、CML 患者および健常人いずれにおいても好塩基球で最も発現が高かった。加えて、CML 患者の単球では健常人の単球と比較すると、細胞表面 PD-L1 の発現が高いことが明らかになった。

## 4. 考察

本研究結果から、CML 患者では IRF8 の発現低下によって腫瘍免疫の活性化を担う cDC1 分化が阻害される一方で、免疫抑制性に働く骨髓系細胞が増加していることが示された。この状況を例えると、腫瘍免疫のアクセルが壊れるのみならず、ブレーキが踏まれている状態であると言えよう。腫瘍免疫のアクセルを踏むための IFN $\alpha$  療法やブレーキの解除のための抗 PD-1 抗体投与などが試みられてきたが、効果は限られている (Zitvogel et al., 2016)。その理由として、CML に対する腫瘍免疫のアクセルまたはブレーキのいずれか一方を標的にするだけでは不十分である可能性が考えられる。本研究によって、腫瘍免疫のアクセルとブレーキ両側面を標的とする CML 治療法開発の必要性が示唆された。

## 引用文献

Biernacki, M.A., Marina, O., Zhang, W., Liu, F., Bruns, I., Cai, A., Neuberg, D., Canning, C.M., Alyea, E.P., Soiffer, R.J., Brusic, V., Ritz, J., and Wu, C.J. (2010), Efficacious immune therapy in chronic myelogenous leukemia (CML) recognizes antigens that are expressed on CML progenitor cells. *Cancer Research*, 70, 906-915.

Breton, G., Lee, J., Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2015), Defining human dendritic cell progenitors by multiparametric flow cytometry. *Nature Protocols*, 10, 1407-1422.

Bruck, O., Blom, S., Dufva, O., Turkki, R., Chheda, H., Ribeiro, A., Kovanen, P., Aittokallio, T., Koskenvesa, P., Kallioniemi, O., Porkka, K., Pellinen, T., and Mustjoki, S. (2018), Immune cell contexture in the bone marrow tumor microenvironment impacts therapy response in CML. *Leukemia*,

32, 1643-1656.

Mahon, F.X., Réa, D., Guilhot, J., Guilhot, F., Huguet, F., Nicolini, F., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., Legros, L., Charbonnier, A., Guerci, A., Varet, B., Etienne, G., Reiffers, J., and Rousselot, P. (2010), Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncology*, 11, 1029-1035.

McGranahan, N., Furness, A.J., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G.A., Birkbak, N.J., Hiley, C.T., Watkins, T.B.K., Shafi, S., Murugaesu, N., Mitter, R., Akarca, A.U., Linares, J., Marafioti, T., Henry, J.Y., Van-Allen, E.M., Miao, D., Schilling, B., Schadendorf, D., Garraway, L.A., Makarov, V., Rizvi, N.A., Snyder, A., Hellmann, M.D., Merghoub, T., Wolchok, J.D., Shukla, S.A., Wu, C.J., Peggs, K.S., Chan, T.A., Hadrup, S.R., Quezada, S.A., and Swanton, C. (2016), Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*, 351, 1463-1469.

Ribas, A., and Wolchok, J.D. (2018), Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359, 1350-1355.

Ross, D.M., and Hughes, T.P. (2020), Treatment-free remission in patients with chronic myeloid leukaemia. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17, 493-503.

Talpaz, M., Hehlmann, R., Quintas-Cardama, A., Mercer, J., and Cortes, J. (2013), Re-emergence of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 27, 803-812.

Wong, S., and Witte, O.N. (2004), The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annual Review of Immunology*, 22, 247-306.

Zitvogel, L., Rusakiewicz, S., Routy, B., Ayyoub, M., and Kroemer, G. (2016), Immunological off-target effects of imatinib. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 13, 431-446.

## 論文目録

### I 主論文

Compromised anti-tumor-immune features of myeloid cell components in chronic myeloid leukemia patients

Harada, I., Sasaki, H., Murakami, K., Nishiyama, A., Nakabayashi, J., Ichino, M., Miyazaki, T., Kumagai, K., Matsumoto, K., Hagihara, M., Kawase, W., Tachibana, T., Tanaka, M., Saito, T., Kanamori, H., Fujita, H., Fujisawa, S., Nakajima, H., and Tamura, T.

*Scientific Reports*, 11, 18046 (2021)

### II 副論文

なし