

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461419

研究課題名(和文) 免疫修飾作用を持つ分子標的薬と免疫療法の併用療法における新機軸の開発

研究課題名(英文) Development of innovative therapy combining molecularly targeted drugs and immunotherapy

研究代表者

北脇 年雄 (Toshio, Kitawaki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50378684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダサチニブ治療を受けている慢性骨髄性白血病およびフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病の患者の末梢血でメモリー様NK細胞が増加していることを見出し、リンパ球増加の要因としてサイトメガロウイルス再活性化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらにこれらの患者ではPD-1陽性のCD56陰性NK細胞サブセットが増加しており、これらの細胞の細胞傷害活性が抗PD-1抗体ニボルマブにより増強することを示した。マウス大腸癌細胞株CT26を用いた腫瘍モデルにおいては、ダサチニブと抗PD-L1抗体の併用による相乗効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We found expansion of memory-like NK cells in peripheral blood of chronic myeloid leukemia and Ph-positive acute lymphoblastic leukemia patients treated with dasatinib, and revealed that cytomegalovirus reactivation plays an important role in lymphocytosis observed in these patients. Furthermore, increases in PD-1-expressing CD56-negative NK cells were noted in these patients. Cytotoxic activity of these PD-1-expressing NK cells were enhanced by PD-1 blockade with nivolumab. In a mouse model using a colon cancer cell line, CT26, combination therapy with dasatinib and anti-PD-L1 antibody did not show any synergistic effect.

研究分野：免疫学

キーワード：ダサチニブ 免疫チェックポイント阻害剤 NK細胞 サイトメガロウイルス

1. 研究開始当初の背景

ここ 20 年のがん治療の進歩は分子標的薬、抗体医薬、そして、がん免疫療法の進歩によってもたらされてきた。しかし、これらの進歩によってがんの治療成績は改善してきたものの、治療が奏効しない患者がまだ多数存在し、さらなる治療成績の向上が望まれている。

分子標的薬とがん免疫療法の併用療法はまだ十分に研究されていないが、これらの治療は抗腫瘍効果のメカニズムが異なることから、併用による相乗効果が期待される。というのは、がん免疫療法は分子標的薬が苦手とする休止期にあるがん幹細胞に対しても抗腫瘍効果を発揮することができる一方、分子標的薬は増殖スピードが速くて腫瘍量が多く、がん免疫療法が十分効果を発揮できない腫瘍に対しても有効であるからである。このように分子標的薬とがん免疫療法はお互いの欠点を補い合い、併用による治療成績の向上が期待される。しかし、分子標的薬は薬剤によって異なるさまざまな免疫修飾作用を持つため、分子標的薬とがん免疫療法のどのような組み合わせに相乗効果があるのか明らかになっていない。

我々はこれまで、慢性骨髄性白血病患者の治療に用いられる分子標的薬であるチロシンキナーゼ阻害薬の免疫修飾作用を解析し、チロシンキナーゼ阻害薬のうちでもダサチニブが形質細胞様樹状細胞のインターフェロン産生を強力に抑制するという免疫修飾作用を持つことを明らかにしてきた (Fujita, et al. Eur J Immunol 43:93-103, 2013.)。ダサチニブは、他のグループからも、ダサチニブ治療中の患者の一部で大顆粒リンパ球が増加することが報告されるなど、他のチロシンキナーゼ阻害薬にはない特有の免疫修飾作用を持つことが示されている (Leukemia 23:1398-1405, 2009.)。興味深いことに、ダサチニブ治療中に大顆粒リンパ球が増加する患者では治療成績が良好であることが示されており、ダサチニブが免疫修飾作用によって抗腫瘍免疫を活性化させている可能性が示唆されている。しかし、なぜダサチニブ治療中に大顆粒リンパ球が増加するのかメカニズムは明らかではなく、ダサチニブの免疫修飾作用については不明な点が多い。また、ダサチニブが免疫チェックポイント阻害剤などがん免疫療法と併用された場合に相乗効果があるのかについても不明である。

2. 研究の目的

本研究では、まず、ダサチニブによる免疫修飾作用の特徴を明らかにするため、ダサチニブ治療中の患者の末梢血リンパ球を詳細に解析し、大顆粒リンパ球増加のメカニズムを明らかにすることを目的とした。また、動物モデルでダサチニブと免疫チェックポイント阻害剤の併用療法を行い、相乗効果があるかについて検証することも目的とした。

3. 研究の方法

ダサチニブおよびその他のチロシンキナーゼ阻害薬の治療を受けている慢性骨髄性白血病およびフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病患者から末梢血を経時的に採取し、フローサイトメトリーにてリンパ球の発現抗原を詳細に解析した。これまでの研究で、ダサチニブ内服後 1~2 時間をピークとして 6 時間くらいまで、ダサチニブの血中濃度と並行して、末梢血中にリンパ球が動員され、リンパ球数が増加する現象が知られている。我々は、この現象がリンパ球の発現抗原の解析に影響することを避けるため、ダサチニブ内服後 6 時間以上経過した時点で患者から採血を行った。

また、分子標的薬とがん免疫療法の併用に相乗効果があるかを検証するため、すでに免疫チェックポイント阻害剤抗 PD-L1 抗体による治療効果が明らかにされているマウス大腸癌細胞株 CT26 を同系マウスに移植する腫瘍モデルを用い、ダサチニブと抗 PD-L1 抗体の併用療法の効果を観察した。

4. 研究成果

ダサチニブおよびその他のチロシンキナーゼ阻害薬の治療を受けている慢性骨髄性白血病およびフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病患者 62 名の末梢血リンパ球を解析したところ、ダサチニブ治療中の患者で増加しているリンパ球は主に NK 細胞であった。NK 細胞増加の機序を解明するため、各患者における 19 種類の NK 細胞マーカーの発現を調べ、主成分分析を用いてこれらのマーカーを解析したところ、主成分分析の第一主成分 (PC1) の値によって各患者におけるメモリー様 NK 細胞の割合を表すことができることが分かった。さらに PC1 値に基づく解析により、ダサチニブ治療によって経時的に NK 細胞の総数とともにメモリー様 NK 細胞の割合が増加していくことが分かった。ダサチニブ以外のチロシンキナーゼ阻害薬ではメモリー様 NK 細胞は増加しなかった。さらに健常人との比較により、慢性骨髄性白血病患者では白血病患者を発症した段階ですでにわずかなメモリー様 NK 細胞の増加があり、それがダサチニブ治療によってさらに増加していくことが分かった。(図 1)

NK 細胞はさまざまな刺激によって活性化するが、ナイーブ NK 細胞からメモリー様 NK 細胞への分化はサイトメガロウイルス (CMV) 感染によってのみ誘導されることが報告されている。これに合致して、ダサチニブ治療および慢性骨髄性白血病患者の発症によるメモリー様 NK 細胞の増加は CMV 既感染者のみで観察された。Nested PCR 法あるいは CMV IgM 抗体により CMV 再活性化の有無を調べたところ、ダサチニブ治療中の CMV 既感染患者 30 名のうち 9 名で、また、慢性骨髄性白血病患者の診断時の CMV 既感染患

図 1

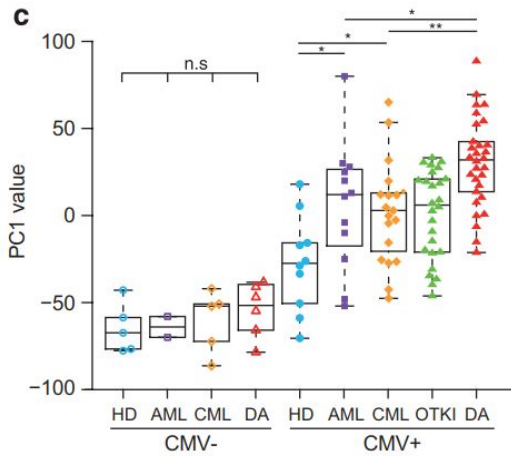


図 1 各群における PC1 値

HD: 健常人, AML: 急性骨髄性白血病診断時, CML: 慢性骨髄性白血病診断時, DA: ダサチニブ治療中の慢性骨髄性白血病, OTKI: その他のチロシキナーゼ阻害薬による治療中の慢性骨髄性白血病, CMV-: サイトメガロウイルス未感染者, CMV+: サイトメガロウイルス既感染者, n.s.: 有意差なし, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

者 20 名のうち 6 名で CMV 再活性化が認められた。これらのデータは CMV 既感染者における CMV 再活性化がダサチニブ治療および慢性骨髄性白血病発症によるメモリー様 NK 細胞の増加の原因であることを示唆している。ダサチニブは試験管内では T 細胞, NK 細胞および形質細胞様樹状細胞の活性化を抑制することが示されており, ダサチニブによる一過性の免疫抑制が CMV 再活性化を引き起こし, それが NK 細胞を刺激して, メモリー様 NK 細胞を増加させている可能性が考えられた。

ダサチニブ治療中の患者には大顆粒リンパ球が増加する患者と増加しない患者がいるが, 増加する患者の方がダサチニブによる治療成績が良好であることが示されている。しかし, これまでダサチニブ治療を開始する前に大顆粒リンパ球の増加を予測する因子は報告されていなかった。我々は, NK 細胞マーカーの主成分分析によって求められる PC1 値が, ダサチニブ治療前に大きい患者の方がダサチニブ治療を開始した後の NK 細胞の増加数が顕著であることを見出した(図 2)。また, 治療開始前の PC1 値が小さい患者では, 治療開始 3 ヶ月時点で分子遺伝学的寛解を達成した患者が 6 名中 0 名であった一方で, PC1 値の大きい患者では 9 名中 5 名が分子遺伝学的大寛解を達成していた。この結果は, メモリー様 NK 細胞の割合を反映する PC1 値が治療開始後の大顆粒リンパ球の増加および治療効果を予測するバイオマーカーとなり得ること

を示している。PC1 値がダサチニブ治療に適した患者を選択するひとつの基準となる可能性がある。

図 2

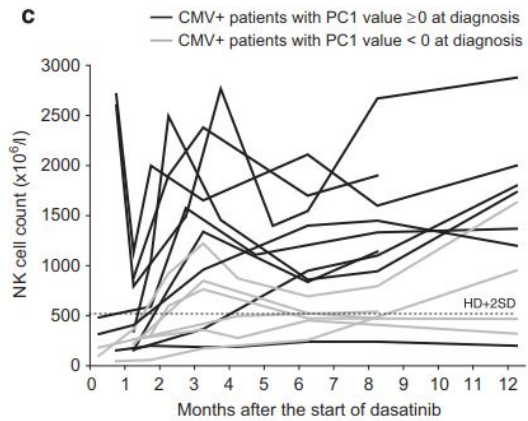


図 2 CMV 既感染患者における治療開始後の NK 細胞数の推移

濃い実線: 治療開始前の PC1 値が中央値以上の患者, 薄い実線: 治療開始前の PC1 値が中央値未満の患者

なお, 以上の研究成果は Leukemia 誌で発表している。(Ishiyama, et al. Leukemia 31:203-212, 2017)

さらに NK 細胞のサブセットを検討したところ, ダサチニブ治療中の患者では CD56 陰性の NK 細胞サブセットが増加していた(図 3)。

図 3

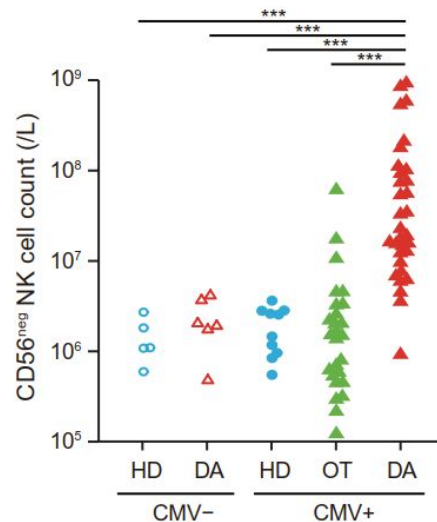


図 3 各群における CD56 陰性 NK 細胞数

HD: 健常人, DA: ダサチニブ治療中の慢性骨髄性白血病, OT: その他のチロシキナーゼ阻害薬による治療中の慢性骨髄性白血病, CMV-: サイトメガロウイルス未感染者, CMV+: サイトメガロウイルス既感染者, ***: $P < 0.001$

この CD56 陰性 NK 細胞の増加は PC1 値によって示されるメモリー様 NK 細胞の割合の増加と相関していたことから、CD56 陰性 NK 細胞の増加の要因についても CMV 再活性化が重要な働きをしていることが示唆された (図 4)。

CD56 陰性 NK 細胞数は PC1 値と相関し、CD56 陰性 NK 細胞数の測定は PC1 値を算出するより容易であることからダサチニブ治療による大顆粒リンパ球の増加及び治療効果を予測する因子として CD56 陰性 NK 細胞数は有用である可能性がある。

図 4

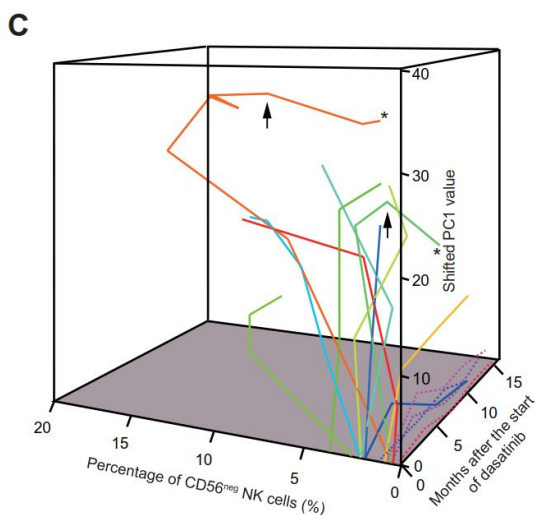


図 4 各患者におけるダサチニブ治療開始後の CD56 陰性 NK 細胞と PC1 の変化の 3D プロット

CD56 陰性 NK 細胞には PD-1 が発現しており、PD-L1 発現 K562 細胞株との共培養の系において腫瘍細胞に対する細胞傷害活性の低下が認められた。この低下した細胞傷害活性は、抗 PD-1 抗体ニボルマブにより部分的に回復した。(投稿準備中)

上記の結果はダサチニブと抗 PD-1 抗体の併用が、NK 細胞による抗腫瘍免疫を回復させ、相乗効果をもたらす可能性を示唆している。これを検証するため、マウスの腫瘍モデルにおいてダサチニブと抗 PD-L1 抗体の併用療法の検討を行った。この検討には、試験管内でダサチニブに感受性を示すマウス大腸癌細胞株 CT26 を同系マウスに移植する系を用いた。CT26 はマウス移植モデルの系において抗 PD-L1 抗体の治療効果が示されている。また、我々の検討では試験管内でダサチニブによって細胞増殖が抑制された。残念なことに、この検討ではダサチニブと抗 PD-L1 抗体の併用療法に相乗効果は認められなかった。(図 5)

図 5

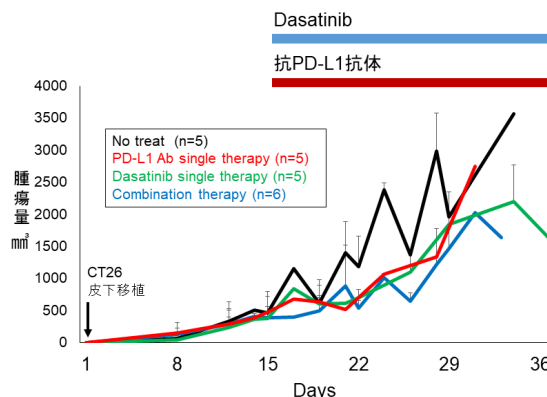


図 5 マウス CT26 移植モデルにおける抗 PD-L1 抗体とダサチニブの併用療法の治療効果

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Ishiyama K, Kitawaki T, Sugimoto N, Sozu T, Anzai N, Okada M, Nohgawa M, Hatanaka K, Arima N, Ishikawa T, Tabata S, Onaka T, Oka S, Nakabo Y, Amakawa R, Matsui M, Moriguchi T, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Principal component analysis uncovers cytomegalovirus-associated NK cell activation in Ph+ leukemia patients treated with dasatinib. **Leukemia** 31(1):203-212, 2017.

[学会発表] (計 2 件)

Ishiyama K, Kitawaki T, Sugimoto N, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Expansion of Dysfunctional CD56-Negative NK Cells Is a Hallmark of NK Cell Activation in Ph+ Leukemia Patients Treated with Dasatinib. The 58th Annual Meeting & Exposition of American Society of Hematology, San Diego, USA, 2016.

Ishiyama K, Kitawaki T, Takaori A, Kadowaki N. Dasatinib Expands Pre-Existing, CMV-Associated, Highly Differentiated NK Cells in Ph+ Leukemia. The 56th Annual Meeting & Exposition of American Society of Hematology, San Francisco, USA, 2014.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 件)

名称 :

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北脇 年雄 (KITAWAKI, Toshio)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 50378684

(2) 研究分担者

()

研究者番号

(3) 連携研究者

()

研究者番号

(4) 研究協力者