

Original

*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異を伴う骨髄増殖性腫瘍の  
変異クローンの拡大は  
PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞の減少を伴う

宮島真理<sup>1)</sup>, 古和田周吾<sup>1)</sup>, 関 裕葵<sup>1)</sup>,  
佐藤 剛<sup>1)</sup>, 前田峻大<sup>1)</sup>, 阿保亜紀子<sup>2)</sup>, 岡野良昭<sup>1)</sup>,  
佐々木了政<sup>1)</sup>, 小宅達郎<sup>1)</sup>, 伊藤薫樹<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 岩手医科大学医学部, 内科学講座血液腫瘍内科分野  
<sup>2)</sup> 岩手医科大学医学部, 病理学講座機能病態学分野

(Received on January 20, 2021 & Accepted on February 10, 2021)

要旨

*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異を伴う骨髄増殖性腫瘍患者の血液では, 野生型 *JAK2* 遺伝子血球 (正常造血細胞由来) と, *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異遺伝子をもつ血球 (*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異造血細胞由来) の両者が混在する. そして近年, *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異血球に対する抗腫瘍免疫の存在と, 免疫チェックポイント分子の関与が示唆されている. 今回我々は, *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異クローンの拡大と, 血球上に発現する免疫チェックポイント分子の関係性を明らかにする為に, 患者 26 名の末梢血液を用い, *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異血球クローンの割合 (*JAK2*<sup>V617F</sup> allele

burden), PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群比率, 血小板上の PD-L1 発現レベル, を評価した. その結果, *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden は PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群比率と有意な逆相関を示した. 一方で, 血小板上の PD-L1 発現量は, *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden や PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群と明らかな相関を認めなかった. 結論として, *JAK2*<sup>V617F</sup> 血球のクローンサイズの増加とともに, PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群は減少する. 一方で血小板上の PD-L1 発現量は *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異血球や抗腫瘍免疫細胞の動態を反映しない.

**Key words** : *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden, myeloproliferative neoplasms, PD-L1, PD-1, PD-1+CD8 T cells

I. 背景

骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms: MPN) は骨髄系細胞の遺伝子変異により, そのクローナルな増殖を特徴とする疾患である. 中でも *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異は高頻度に認められ, WHO 分類において診断の必須項目である<sup>1)</sup>. *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異を伴う MPN は, 真性多血症, 本態性血小板血症, 原発性骨髄線維症に分類されるが, 経年的に病型が移行することが多

い<sup>2)</sup>. およそ 20% の患者は, 骨髄線維症または急性白血病へ移行し生命予後が不良となる<sup>3)</sup>. MPN 患者の血球は, 野生型 *JAK2* 遺伝子をもつ血球 (正常造血細胞由来) と *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異遺伝子をもつ血球 (*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異をもつ造血細胞由来) の両者が混在している<sup>4, 5)</sup>. *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異をもつ血球クローンの割合すなわち *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden は, 野生型 *JAK2* 遺伝子と *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異の定量を行うことにより評価可能である<sup>4, 6)</sup>. しかし患者末梢血液中の個々の血液細胞を, 野生型または変異遺伝子由来かを識別し, それぞれに分離して解

Corresponding author: Shugo Kowata  
skowata@iwate-med.ac.jp

析することは困難である。そして末梢血球中の  $JAK2^{V617F}$  allele burden の増加が、血栓症や骨髄線維化への移行リスクなどの病態につながる事が報告されている<sup>7-9)</sup>。一方、 $JAK2^{V617F}$  allele burden の増加が、免疫細胞の動態とどのように結びついているのかは不明な点が多い<sup>10)</sup>。その一因として  $JAK2^{V617F}$  allele burden の変化は経年的に生じる為に、長期のフォローが必要となることが考えられる。

免疫細胞から腫瘍が逃避するメカニズムの一つとして、免疫チェックポイント分子 {Programmed cell death receptor (PD-1) / ligand (PD-L1)} が知られている<sup>11)</sup>。腫瘍細胞上の PD-L1 と T 細胞上の PD-1 が結合することで、T 細胞の代謝変化やいわゆる疲弊化が誘導されることが知られている<sup>11)</sup>。 $JAK2^{V617F}$  変異を伴う MPN においては、 $JAK2^{V617F}$  変異を伴う巨核球より産生される血小板は、その細胞表面に PD-L1 を過剰に発現している<sup>12)</sup>。そして PD-L1/PD-1 結合を介して、PD-1 陽性の免疫細胞を排除し、結果として  $JAK2^{V617F}$  変異血球クローンの拡大を促進すると想定されている<sup>12)</sup>。またごく最近、腫瘍や慢性のウイルス持続感染のような持続的抗原暴露環境下では直接的な腫瘍や感染細胞の除去には、PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞が主要な担い手 (イフェクター細胞) であることが明らかとなった<sup>13-15)</sup>。さらに PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞の中でも、幹細胞様細胞 (CXCR5 陽性) が腫瘍を攻撃する際のイフェクター細胞 (CD101 陽性) を生み出すことが示されている<sup>13, 16)</sup>。しかし MPN におけるこれらの細胞の動態は明らかではない。

今回我々は、 $JAK2^{V617F}$  変異血球クローンの拡大と、血球上に発現する免疫チェックポイント分子の関係性を明らかにする為に、 $JAK2^{V617F}$  変異を伴う MPN 患者 26 名において、末梢血液の  $JAK2^{V617F}$  allele burden, PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群の割合、血小板上の PD-L1 発現レベルを測定し、その関係性を評価した。

## II. 方 法

### 1. 対象

2020 年 7 月 1 日から同年 12 月 11 日の間に岩手医科大学付属病院血液腫瘍内科通院中の  $JAK2^{V617F}$  変異を伴う MPN と診断された患者 26 名を登録した。診断は WHO 分類 (第 4 版) により行われ真性多血症、本態性血小板血症、骨髄線維症 (真性多血症後、本態性血小板血症後を含む) に分類した。輸血療法中または活動性感染症を持つ患者は除外した。この研究は岩手医科大学医学部倫理委員会で審査承認され (MH2019-011)、すべての患者へ研究内容の説明を行った後に、本人から書面による同意を得た。

### 2. 血液サンプル

血球数、血小板 PD-L1、リンパ球サブセットの測定は、通常の臨床検査後の残血を使用した。具体的には抗凝固薬として EDTA を使用したサンプルで、全自動血球計算機で全血球数を測定後、フローサイトメトリーを用いて PD-L1 陽性血小板、PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞を測定した。末梢血球中の  $JAK2^{V617F}$  allele burden は、診断あるいは経過観察の目的で臨床検査 [ $JAK2$  遺伝子変異定量キット (シスメックス)]<sup>6)</sup> として測定されたデータを用いた。具体的には、末梢血液を採取、単核球を分離した。単核球からゲノム DNA を抽出し、 $JAK2^{V617F}$  変異遺伝子または  $JAK2$  野生型遺伝子をそれぞれに特異的なプライマーおよびプローブを用いて、定量 PCR により増幅・検出した。 $JAK2^{V617}$  allele burden (%) は  $JAK2^{V617}$  のコピー数  $\times$  100 /  $JAK2^{V617}$  のコピー数 + 野生型  $JAK2$  のコピー数として算出した。

### 3. フローサイトメトリー

全血を単核球分離後に下記抗体で室温 30 分で染色した。血小板上の PD-L1 の検討には CD41-APC/Cy7 (HIP8)、PD-L1-PE (29E.2A3) を用い、Rolfes らの方法に準じた<sup>17)</sup>。末梢血のリンパ球とそのサブセットの検討には、CD45-

Table1. Patients' characteristics

Characteristics	PV n=7	ET n=9	post PV/ET MF n=10	total n=26
Median age (years) (range)	63.8 (53-72)	65.8 (35-83)	62.7 (44-78)	64.1 (35-83)
Sex	Male (%)	4 (15.39)	4 (15.39)	4 (15.3)
	Female (%)	3 (11.5)	5 (19.2)	6 (23.0)
Treatment	Cytoreductive drugs			
	Hydroxycarbamide (%)	2 (7.6)	4 (15.3)	4 (15.3)
	Ruxolitinib (%)	0 (0)	0 (0)	4 (15.3)
	Anagrelide Hydrochloride Hydrate(%)	0 (0)	1 (3.8)	3 (11.5)
phlebotomy (%)	5 (19.2)	0 (0)	3 (11.5)	8 (30.7)
Disease duration day (days) (range)	1618 (82-4851)	2383 (143-4745)	2341 (22-6971)	2161 (22-6971)
Allele burden mean (%) (range)	67.1 (8.8-95.9)	42.9 (3.1-86.3)	61.5 (1.4-96.3)	56.6 (3.1-96.3)
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ ) mean (range)	71.1 (39.9-97.2)	62.4 (36.0-91.5)	42.6 (5.7-103.4)	57.8 (5.7-103.4)
No. of prior thrombosis (%)	1 (3.8)	1 (3.8)	3 (11.5)	5 (19.2)

ET; essential thrombocythemia, MF; myelofibrosis, PV; polycythemia vera.

APC/Cy7 (2D1), CD3-PE/Cy7 (OKT3), CD8-PerCP (RPA-T8), PD-1-PE (EH12.2H7), CD101-APC (BB27), CXCR5 -APC (252D4), CD28-APC (CD28.2) を用いた。以上の全ての抗体は Biolegend より購入した。染色後の赤血球溶血と固定処理を BD FACSTM Lysing Solution (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて行い、測定サンプルを作成した。サンプルの測定とデータ取得は FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) で行い、FACS Diva version 8.0 software (BD Biosciences) を用いて解析した。

#### 4. 統計解析

2群間の比較は Mann-Whitney の U 検定で、3群間の比較は Kruskal - Wallis 検定で行い、 $p < 0.01$  を有意とした。関連性の検討は Spearman の相関分析を行い  $p < 0.01$  を有意とした。全ての統計解析は、Prizm9 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いて行った。

### III. 結 果

真性多血症 7 名、本態性血小板血症 9 名、両者からの骨髓線維症移行例 10 名の合計 26 名が登録された。患者背景を別表に示す (Table 1)。

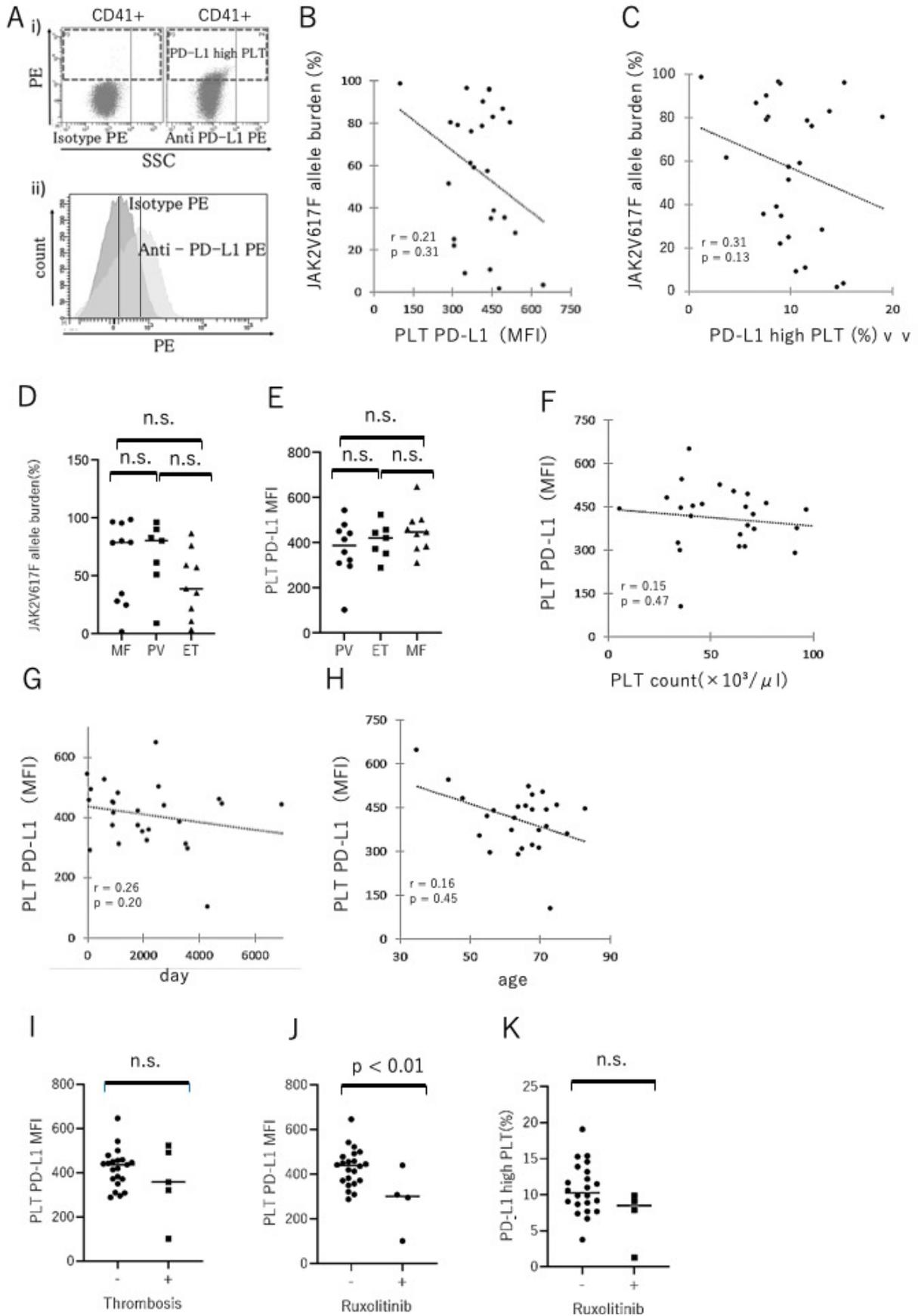
何らかの細胞減少療法は 17 名 (65.3%)、瀉血療法は 8 名 (30.7%) へ行われていた。細胞減少療法の中でも Ruxolitinib の投与を受けている患者は 4 名 (15.3%) であった。

#### 1. 血小板上の PD-L1 発現量と *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden は明らかな相関関係が無い。

Prestipino ら<sup>12)</sup>によれば、*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異が血小板上の PD-L1 発現を増加させる為、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden と血小板上の PD-L1 発現量は相関することが予想された。血小板上の PD-L1 発現の評価は、CD41 陽性の細胞集団を血小板とし、PE 標識した抗 PD-L1 抗体により PE 波長の蛍光強度をフローサイトメトリーにより測定した。PD-L1 強発現血小板率 (Fig. 1A-i) と平均蛍光強度 (mean fluorescent intensity: MFI) (Fig. 1A-ii) を図に示す。

予想に反して *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden は、血小板上の PD-L1 発現量との弱い逆相関を示したが、統計学的に有意性を認めなかった (Fig. 1B)。また *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden は PD-L1 強発現血小板率と弱い相関を認めたが、統計学的に有意性を認めなかった (Fig. 1C)。

そこで、血小板上の PD-L1 発現に影響すると予想される臨床因子を以下で検討した。初



めに病型間の違いを比較した。各病型間の *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (Fig. 1-D), 各病型間の血小板上の PD-L1 発現量 (Fig. 1-E) は、いずれも統計学的に有意な差を認めなかった。次に骨髓線維症への病型移行は血小板減少を引き起こすことから、血小板数との相関関係を調べたが相関は認めなかった (Fig. 1-F)。MPN 診断からの日数 (Fig. 1-G) および患者年齢 (Fig. 1-H) は、弱い相関を認めたが統計学的に有意性を認めなかった。また血栓症の既往による違いを検討したが、有意な差を認めなかった (Fig. 1-I)。Ruxolitinib は *JAK2* キナーゼ活性を抑制し、PD-L1 発現を抑制する可能性がある<sup>12)</sup>。Ruxolitinib 投与中の患者群では血小板全体の PD-L1 発現は有意に低下していた (Fig. 1-J)。しかし PD-L1 の高発現血小板の割合は有意な差を認めなかった (Fig. 1-K)。

これらの結果は、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden と血小板上の PD-L1 発現量との間に明らかな相関関係が無いことを示している。また、病型、血小板数、診断からの時間、年齢、血栓症の既往は、血小板上の PD-L1 発現量に影響しないことを示している。

2. *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden の増加により、PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群は減少する。

次に CD45 陽性 CD3 陽性 CD8 陽性で規定される細胞集団を CD8 陽性 T 細胞とし、その細胞集団中の PD-1、CD101 (エフェクター細胞)、

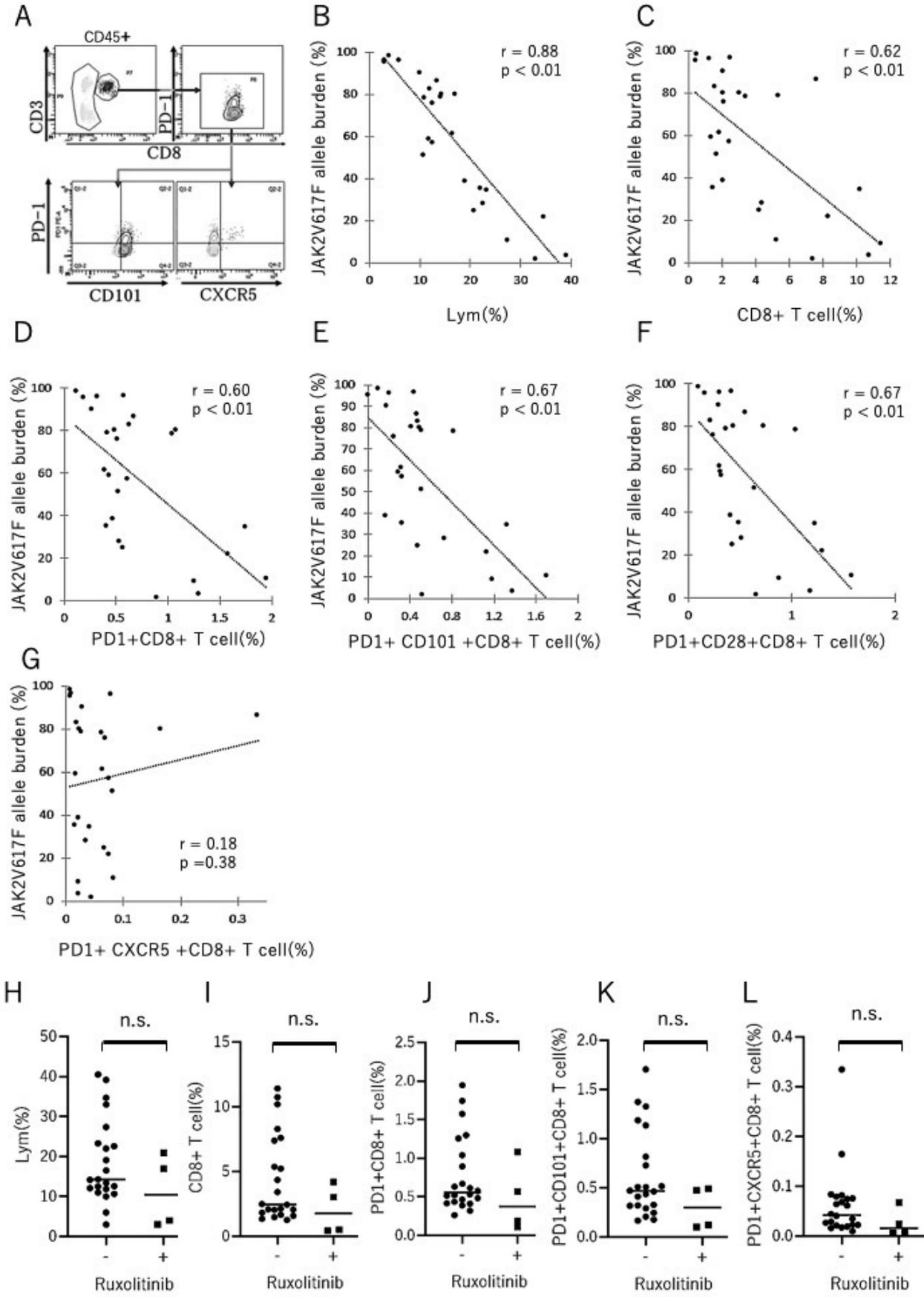
CXCR5 (幹細胞様細胞)、CD28 (補助刺激因子受容体) の発現をフローサイトメトリーにより評価した (Fig. 2-A)。

*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden と、末梢血白血球中のリンパ球比率は強い逆相関を認めた ( $r = 0.88, p < 0.01$ ) (Fig. 2-B)。また、末梢血白血球中の CD8 陽性 T 細胞比率 ( $r = 0.62, p < 0.01$ ) (Fig. 2-C), PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 ( $r = 0.60, p < 0.01$ ) (Fig. 2-D), PD-1 陽性 CD101 陽性 CD8 陽性 T 細胞 (エフェクター細胞) 比率 ( $r = 0.67, p < 0.01$ ) (Fig. 2-E), PD-1 陽性 CD28 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 ( $r = 0.67, p < 0.01$ ) (Fig. 2-F) は、有意な逆相関を認めた。PD-1 陽性 CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞 (幹細胞様細胞) 比率は、相関関係を認めなかった (Fig. 2-G)。通常健常者の末梢血中に幹細胞様細胞はほとんど認められないのと同様に<sup>16)</sup>、今回 MPN 患者においても極めて少数の検出であった。

Ruxolitinib は *JAK2* キナーゼ活性を抑制し、リンパ球数を抑制する可能性がある Ruxolitinib 投与群は、リンパ球比率 (Fig. 2-H), CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 2-I), PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 2-J), PD-1 陽性 CD101 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 2-K), PD-1 陽性 CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 2-L) は、いずれも低い傾向は認めたが統計学的に有意な差を認めなかった。

Fig. 1. PD-L1 expression level on platelets.

(A) i) Flow cytometry analysis showing the PD-L1 high platelet population. ii) Representative histogram of the fluorescence of anti-PD-L1 PE (light gray), or an IgG matched isotype control antibody PE (gray), on platelets from MPN patients. Bar indicates MFI. (B) Association between *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) and PD-L1 expression on platelets (MFI). (C) Association between *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) and PD-L1 high platelet (%). (D) *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) from MF, PV and ET patients. (E) PD-L1 expression on platelets (MFI) from MF, PV and ET patients. (F) Association between PD-L1 expression on platelets (MFI) and platelet count. (G) Association between PD-L1 expression on platelets (MFI) and days from diagnosis of MPN. (H) Association between PD-L1 expression on platelets (MFI) and age. (I) PD-L1 expression on platelets (MFI) and history of prior thrombosis. (J) PD-L1 expression on platelets (MFI) and present administration of ruxolitinib. (K) PD-L1 high platelet population (%) and present administration of ruxolitinib. PE; Phycoerythrin, MFI; mean fluorescent intensity, MPN; myeloproliferative neoplasms, n.s.; not significant.



以上より、PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群は、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden と有意な負の相関関係を示した。この結果は、*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異クローン拡大に伴い、腫瘍免疫の主要な担い手と想定されるエフェクター細胞が減少することを示している。

3. 血小板上の PD-L1 発現量と PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群は明らかな相関関係に無い。

次に血小板上の PD-L1 発現が、PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞へ与える影響について検討した。血小板上の PD-L1 発現量と、リンパ球比率 (%) (Fig. 3-A), CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 3-B), PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 3-C), PD-1 陽性 CD101 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 3-D), PD-1 陽性 CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 3-E) は、正の弱い相関関係にあるが、統計学的に有意性は認めなかった。また、PD-L1 の高発現血小板の割合と、リンパ球比率 (%) (Fig. 3-F), CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 3-G), PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 3-H), PD-1 陽性 CD101 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 3-I), PD-1 陽性 CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率 (Fig. 3-J) は統計学的に有意な相関を認めなかった。これらの結果は、血小板上の PD-L1 発現亢進が PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群とは明らかな相関関係にないことを示す。また、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden の増加により、PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群が減少する病態を、末梢血液中の

血小板上の PD-L1 発現量が反映しない事を示す。

#### IV. 考 察

今回の検討では、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden の増加とともに、抗腫瘍免疫を担う PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群が減少することが明らかとなった。一方で血小板上の PD-L1 発現量は、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden や PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群との明らかな相関関係を示さなかった。

MPN では、これまで *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異クローンに対する特異的細胞障害性 T 細胞は直接的な証明がなされていない。しかし以前からインターフェロンが一定の *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden 抑制効果を示すことや、同種移植により治癒する症例の存在から、*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異クローンに対する腫瘍免疫の存在が考えられてきた<sup>18)</sup>。

今回の我々の検討では、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden と PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率が逆相関した。しかし同時に、リンパ球比率も強い逆相関を示しており、CD8 陽性 T 細胞に限らずリンパ球全体が allele burden 増加とともに抑制されていた。MPN では、Myeloid DC の低下<sup>19)</sup>、Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) の増加<sup>20)</sup>、サイトカイン環境の変化<sup>21)</sup> など、T 細胞の減少や活性低下を促す環境変化が報告されている。腫瘍量 (allele burden) が増加すると、これらの変化によりリンパ球全体が減少し、それに伴い CD8 陽性

Fig. 2. Correlation between PD-1 positive CD8+T cells and *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden.

(A) Flow cytometry analysis showing CD8+Tcells and their subpopulations. (B) Correlation between *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) and frequency of lymphocytes (%). (C) Correlation between *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) and frequency of CD8+Tcells (%). (D) Correlation between *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) and frequency of PD1+CD8+Tcells (%). (E) Correlation between *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) and frequency of PD1+CD101+CD8+Tcells (%). (F) Correlation between *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) and frequency of PD1+CD28+CD8+Tcells (%). (G) Association between *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden (%) and frequency of PD1+CXCR5+CD8+Tcells (%). (H-L): Frequency of lymphocytes (H), CD8+Tcells (I), PD1+CD8+Tcells (J), PD1+CD101+CD8+Tcells (K), PD1+CXCR5+CD8+Tcells (L) (%) and present administration of ruxolitinib.

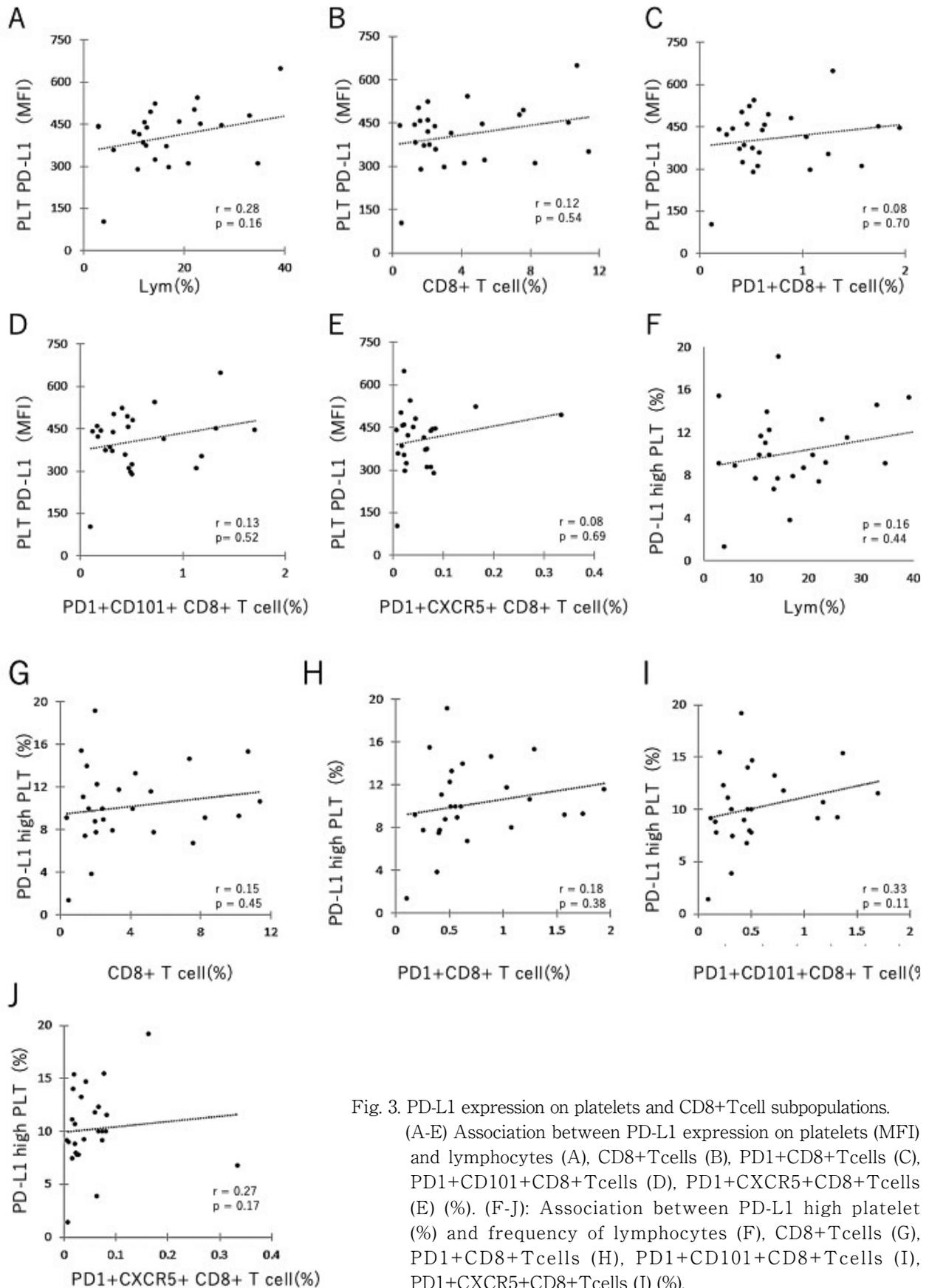


Fig. 3. PD-L1 expression on platelets and CD8+Tcell subpopulations.

(A-E) Association between PD-L1 expression on platelets (MFI) and lymphocytes (A), CD8+Tcells (B), PD1+CD8+Tcells (C), PD1+CD101+CD8+Tcells (D), PD1+CXCR5+CD8+Tcells (E) (%). (F-J): Association between PD-L1 high platelet (%) and frequency of lymphocytes (F), CD8+Tcells (G), PD1+CD8+Tcells (H), PD1+CD101+CD8+Tcells (I), PD1+CXCR5+CD8+Tcells (J) (%).

T 細胞群が減少する可能性が示唆された。

また、MPN 患者の CD34 陽性の造血幹細胞分画では PD-L1 が高く発現している<sup>19)</sup>。それゆえここから生み出される *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異血球クローン（巨核球・血小板系と単球系）には PD-L1 高発現が受け継がれる<sup>12, 22)</sup>。これらが共同して PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞を次第に抑制する機構が考えられる。一方、今回の検討で血小板上の PD-L1 発現量や PD-L1 高発現血小板率は、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden と明らかな相関関係を認めなかった。その理由として、① PD-L1 高発現血小板は骨髄内や脾臓などで PD-1 陽性細胞に結合し末梢血でその比率が下がる可能性、② 単球系細胞の PD-L1 が主として T 細胞の抑制を行っている可能性、が挙げられる。これらの解明には、PD-L1/PD-1 の会合する場である骨髄や脾臓内で PD-L1 を保持する巨核球・血小板系細胞と単球系細胞の動態を解析する必要があると考えられた。

以上の知見からは、PD-L1/PD-1 の会合を阻害する免疫チェックポイント阻害剤の治療効果が期待される。実際、MPN と肺がんを合併した症例に対し、免疫チェックポイント阻害剤の投与を行った後に、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden の減少が認められた症例報告がある<sup>23)</sup>。そして既に MPN 患者への免疫チェックポイント阻害剤投与の臨床試験が始まっている（その結果は 2021 年 1 月現在公表されていない）<sup>24)</sup>。

今回の研究にはいくつかの限界がある。同一患者で *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden と免疫細胞の変化を観察するには数年以上の経過を追うことが必要になる。それゆえ今回は様々な *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden 値を持つ MPN 患者群において横断的に研究を行った。今後、実際に同一患者における経時的な検証が必要である。また、CXCR5 陽性細胞は、健常人の末梢血液に極めて低頻度でしか存在せず<sup>16)</sup>、今回の MPN 患者における検討においても同様であった。今後、CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞が本来存在して

いる場（脾臓、リンパ節、骨髄など二次リンパ装置組織）の検討が必要である。また PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群の減少が、PD-L1/PD-1 を介さないメカニズムで生じる可能性について検討することが必要である。さらに CD8 陽性 T 細胞自体が *JAK2*<sup>V617F</sup> 変異クローン由来の場合も報告されており<sup>25)</sup>、今後 PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞の *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden を確認する必要がある。また、今回の検討では末梢血液中の単核球を用いて *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden を測定・算出している為、巨核球・血小板系細胞のみの *JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden は示していない。

結論として、*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異を伴う MPN において、*JAK2*<sup>V617F</sup> 変異遺伝子をもつ血球のクローンサイズの増加とともに、抗腫瘍免疫を担う PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群比率が減少することが明らかとなった。一方で、血小板上の PD-L1 発現量は、*JAK2*<sup>V617F</sup> allele burden や PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群比率と明らかな相関を認めず、クローンサイズや抗腫瘍免疫の動態を反映していなかった。

稿を終えるにあたり本研究に関わった研究協力者の方々に感謝いたします。

本研究は JSPS 科研費 19K08873 の助成を受けた。

利益相反：著者らには開示すべき利益相反はない。

## References

- 1) **Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, et al.**: The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J* **8**,15, 2018.
- 2) **Dan K, Yamada T, Kimura Y, et al.**: Japanese elderly leukemia and lymphoma study group. Clinical features of polycythemia vera and essential thrombocythemia in Japan: retrospective analysis of a nationwide survey by the Japanese elderly leukemia and lymphoma study group. *Int J Hematol* **83**, 443-449, 2006.
- 3) **Tam CS, Kantarjian H, Cortes J, et al.**: Dynamic model for predicting death within 12 months in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *J Clin Oncol* **27**, 5587-5593, 2009.
- 4) **Morishita S, Komatsu N, Kirito K, et al.**: Alternately binding probe competitive PCR as a simple, cost-effective, and accurate quantification method for *JAK2* V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res* **35**, 1632-1636, 2011.
- 5) **Edahiro Y, Morishita S, Takahashi K, et al.**: *JAK2* V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. *Int J Hematol* **99**, 625-634, 2014.
- 6) **Kirito K, Koike M, Noguchi M, et al.**: A novel quantitative *JAK2* V617F detection kit: prospective clinical performance study comparing MPN patients and healthy subjects. *Rinsho Ketsueki* **59**, 669-674, 2018.
- 7) **Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al.**: MPD Research Consortium. Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on *JAK2* (V617F) allele burden. *Leukemia* **21**, 1952-1959, 2007.
- 8) **Borowczyk M, Wojtaszewska M, Lewandowski K, et al.**: The *JAK2* V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res* **135**, 272-280, 2015.
- 9) **Shirane S, Araki M, Morishita S, et al.**: Consequences of the *JAK2* V617F allele burden for the prediction of transformation into myelofibrosis from polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Int J Hematol* **101**, 148-153, 2015.
- 10) **Kovacsovics-Bankowski M, Kelley TW, Efimova O, et al.**: Changes in peripheral blood lymphocytes in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients treated with pegylated-interferon alpha and correlation with *JAK2*<sup>V617F</sup> allelic burden. *Exp Hematol Oncol* **5**, 28, 2016.
- 11) **Jerby-Arnon L, Shah P, Cuoco MS, et al.**: A cancer cell program promotes T cell exclusion and resistance to checkpoint blockade. *Cell* **175**, 984-997, 2018.
- 12) **Prestipino A, Emhardt AJ, Aumann K, et al.**: Oncogenic *JAK2*<sup>V617F</sup> causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med* **10**, 7729, 2018.
- 13) **Jansen CS, Prokhnjevskaja N, Master VA, et al.**: An intra-tumoral niche maintains and differentiates stem-like CD8 T cells. *Nature* **576**, 465-470, 2019.
- 14) **Cabrita R, Lauss M, Sanna A, et al.**: Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature* **577**, 561-565, 2020.
- 15) **Helming BA, Reddy SM, Gao J, et al.**: B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* **577**, 549-555, 2020.
- 16) **Im SJ and Ha SJ**: Re-defining T-Cell Exhaustion: Subset, Function, and Regulation. *Immune Netw* **20**, 2, 2020.
- 17) **Rolfes V, Idel C, Pries R, et al.**: PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget* **9**, 27460-27470, 2018.
- 18) **Lange T, Edelmann A, Siebolts U, et al.**: *JAK2* V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms one month after allogeneic stem cell transplantation significantly predicts outcome and risk of relapse. *Haematologica* **98**, 722-728, 2013.
- 19) **Romano M, Sollazzo D, TrabANELLI S, et al.**: Mutations in *JAK2* and calreticulin genes are associated with specific alterations of the immune system in myelofibrosis. *Oncoimmunology* **6**, e1345402, 2017.
- 20) **Wang JC, Kundra A, Andrei M, et al.**: Myeloid-derived suppressor cells in patients with myeloproliferative neoplasm. *Leuk Res* **43**, 39-43, 2016.
- 21) **Skov V, Larsen TS, Thomassen M, et al.**: Molecular profiling of peripheral blood cells from patients with polycythemia vera and related

- neoplasms: identification of deregulated genes of significance for inflammation and immune surveillance. *Leuk Res* **36**, 1387-92, 2012.
- 22) **Wang JC, Chen C, Kundra A, et al.:** Programmed cell death receptor (PD-1) ligand (PD-L1) expression in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res* **79**, 52-59, 2019.
- 23) **Hara R, Kawada H, Kikuti YY, et al.:** A case of *JAK2* V617F-positive essential thrombocythemia where allele burden was reduced by a PD-1 inhibitor. *Int J Hematol* **113**, 606-610, 2021.
- 24) **Braun LM and Zeiser R:** Immunotherapy in myeloproliferative diseases. *Cells* **9**, cells9061559, 2020.
- 25) **Nishanth G, Wolleschak D, Fahldieck C, et al.:** Gain of function in *Jak2*<sub>V617F</sub>-positive T-cells. *Leukemia* **31**, 1000-1003, 2017.

Frequency of PD-1 positive CD8 T cells  
inversely correlates with JAK2V617F allelic burden in  
 $JAK2^{V617F}$ -positive myeloproliferative neoplasms

Shinri MIYAJIMA<sup>1)</sup>, Shugo KOWATA<sup>1)</sup>, Yuki SEKI<sup>1)</sup>,  
Tsuyosi SATO<sup>1)</sup>, Takahiro MAEDA<sup>1)</sup>, Akiko YASHIMA-ABO<sup>2)</sup>,  
Yoshiaki OKANO<sup>1)</sup>, Ryosei SASAKI<sup>1)</sup>, Tatsuo OYAKE<sup>1)</sup> and Shigeki ITO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Hematology and Oncology, Department of Internal Medicine,  
School of Medicine, Iwate Medical University, Yahaba, Japan

<sup>2)</sup>Department of Pathology, School of Medicine,  
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

*(Received on January 20, 2021 & Accepted on February 10, 2021)*

---

Abstrat

Chronic myeloproliferative neoplasms carrying the somatic  $JAK2^{V617F}$  mutation ( $JAK2^{V617F}$  MPN) are characterized by the expansion of neoplastic clones and high immunogenicity. Expression of programmed cell death ligand-1 (PD-L1) in  $JAK2^{V617F}$  MPNs is mainly induced in megakaryocytes, platelets, and monocytes. The  $JAK2^{V617F}$  allele burden indicates the size of clonal hematopoiesis from hematopoietic progenitor cells. Although the importance of T cell-mediated anti-tumor immunity and  $JAK2^{V617F}$  allele burden in the pathogenesis of MPN progression has previously been documented, little is known about the relationship between these factors.

We therefore analyzed the phenotype and frequency

of PD-1+ CD8+ T cells and the expression levels of PD-L1 in platelets in 26 patients with  $JAK2^{V617F}$  MPN. We found that the frequency of PD-1+ CD8+ T cells inversely correlated with the  $JAK2^{V617F}$  allelic burden. However, the PD-L1 expression levels on platelets had no correlation with  $JAK2^{V617F}$  allele burden or the CD8+ T cell subpopulations.

These data indicate that the expansion of clonal hematopoiesis restrains antitumor immunity, resulting in reduced frequency of PD1+ CD8+ T cells, and that the expression level of PD-L1 on platelets may not reflect the  $JAK2^{V617F}$  allele burden or antitumor immunity.