

論文内容の要旨

JAK2V617 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, 古和田周吾, 関裕葵, 佐藤剛, 前田峻大, 阿保亜希子, 岡野良昭, 佐々木正, 小宅達郎, 伊藤薫樹)

(岩手医学雑誌 73 巻, 5 号 令和 3 年 12 月掲載)

I. 研究目的

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. 末梢血球中の JAK2V617F 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. 一方, JAK2V617F 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. 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 JAK2V617F 変異を伴う MPN においては, JAK2V617F 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. 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 JAK2V617F 変異血球クローンの拡大を促進すると想定されている. 今回我々は, JAK2V617F 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, JAK2V617F 変異を伴う MPN 患者 26 名において, 末梢血液の JAK2V617F 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. 研究対象ならび方法

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 JAK2V617F 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, 骨髄線維症に分類した.

2. 血液サンプル

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 JAK2V617F allele burden は, 診断あるいは経過観察の目的で臨床検査として測定されたデータを用いた.

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. 末梢血のリンパ球とそのサブセットの検討には, CD45-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。

4. 統計解析

2 群間の比較は Student's t 検定で行い, $p < 0.01$ を有意とした。関連性の検討は Person 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, Prism9 (GraphPad Software, San Diego, CA)を用いて行った。

III. 研究結果

1. 血小板上の PD-L1 発現量と JAK2V617F allele burden は明らかな相関関係が無い。JAK2V617F 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。また JAK2V617F 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。各病型間の JAK2V617F allele burden, 各病型間の血小板上の PD-L1 発現量は, いずれも統計学的に有意な差を認めなかった。MPN 診断からの日数および患者年齢は, 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。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。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。

2. JAK2V617F allele burden の増加により, PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞群は減少する。JAK2V617F 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。また, 末梢血白血球中の CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD101 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD28 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率は, 有意な逆相関を認めた。PD-1 陽性 CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率は, 相関関係を認めなかった。Ruxolitinib 投与群は, リンパ球比率, CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD101 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率は, 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。

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。血小板上の PD-L1 発現量と, リンパ球比率 (%), CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD101 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率は, 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 (%), CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CD101 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率, PD-1 陽性 CXCR5 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率は統計学的に有意な相関を認めなかった。

IV. 結 語

結論として, JAK2V617F 変異を伴う MPN において, JAK2V617F 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, JAK2V617F 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。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 板持 広明 (臨床腫瘍学講座)

副査 教授 佐藤 孝 (病理学講座：機能病態学分野)

副査 講師 阿保 亜紀子 (病理学講座：機能病態学分野)

JAK2^{V617F} 変異を伴う骨髄増殖性腫瘍患者において、*JAK2*^{V617F} 変異遺伝子を持つ血球 (*JAK2*^{V617F} 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連が示唆されている。本研究論文は、*JAK2*^{V617F} 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に着目して、骨髄増殖性腫瘍患者 26 名の末梢血を用い、これらの発現と関連性を検討した論文である。*JAK2*^{V617F} 変異アレルの割合は PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率と有意な逆相関を示した。一方、血小板上の PD-L1 発現量は *JAK2*^{V617F} 変異アレル割合や PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞比率との相関を認めなかった。このことは、*JAK2*^{V617F} 変異血球のクローンサイズの増加は、血小板上の PD-L1 発現量には関連しなかったものの、抗腫瘍免疫を担う PD1 陽性 CD8 陽性 T 細胞の減少と相関することを初めて示した論文である。

本論文は、*JAK2*^{V617F} 変異を伴う骨髄増殖性腫瘍に対する PD-1/PD-L1 を標的とした免疫チェックポイント阻害薬による治療の可能性を示した研究といえる。学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

血小板上の PD-L1 発現量が *JAK2*^{V617F} 変異アレル割合と相関しなかった原因や、データの解析方法、実地臨床における将来展望について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考え。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正はないことを確認した。

参考論文

- 1) Autophagosome-rich platelets are increased in immune thrombocytopenia
(ITP 患者では autophagosome 形成血小板比率が高値である) (大津瑛裕 他 9 名と共著)
岩手医学雑誌, 72 巻, 3 号 (2020): p103–113.
- 2) Gastrointestinal: Endoscopic removal of a migrating esophageal metallic stent
(消化管：移動する食道金属ステントの内視鏡的除去) (鳥谷洋右 他 4 名と共著)
Journal of Gastroenterology and Hepatology, (2020): Online ahead of print.
- 3) Successful treatment with nivolumab in a patient with metastatic salivary duct carcinoma
(ニボルマブによる治療が奏効した転移性唾液腺導管癌症例) (佐藤剛 他 8 名と共著)
Case Reports in Oncology, (2021): 掲載予定.