

京都大学	博士（医学）	氏名	石山 賢一
論文題目	Principal component analysis uncovers cytomegalovirus-associated NK cell activation in Ph <sup>+</sup> leukemia patients treated with dasatinib (主成分分析により明らかになったダサチニブ治療中のフィラデルフィア染色体陽性白血病患者におけるサイトメガロウイルス関連NK細胞の活性化)		
(論文内容の要旨)			
<p>[背景] フィラデルフィア染色体(Ph)陽性白血病の治療はチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)の登場によって劇的に改善された。現在本邦ではイマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ(DA)の3つのTKIが第一選択薬として使用可能である。近年、DA治療中の一部の患者においてNK細胞やCD8陽性T細胞からなる顆粒リンパ球(Large granular lymphocyte : LGL)の増加を認め、これが高い治療効果と相関することが報告されている。LGLの増加はほぼサイトメガロウイルス(CMV)既感染者にのみ見られるが、CMVの再活性化を認める患者はごく一部であることから、CMVの関与は明らかにされていない。一方で、CMV感染はNK細胞の分化を促進し、NKG2C、CD57陽性の高分化型NK細胞の割合を増加させることが報告されている。本研究では、DA服用患者において、主にNK細胞が増加していることを見出したことから、詳細にNK細胞マーカーを解析し、NK細胞増加のメカニズムを探索した。</p> <p>[方法] Ph陽性白血病のDA服用患者36名、他のチロシンキナーゼ(OTKI)服用患者26名、健常者15名を対象にフローサイトメトリーを用いて19種類のNK細胞マーカーを測定し、主成分分析(PCA)を用いて解析した。機能解析として慢性骨髄性白血病(CML)細胞株であるK562との共培養による細胞傷害活性、サイトカイン産生能の解析を行った。</p> <p>[結果] CMV既感染(CMV<sup>+</sup>)のDA服用患者では30名のうち17名でNK細胞の増加を認め、CMV再活性化は9名に認めた。一方でCMV未感染(CMV<sup>-</sup>)のDA服用患者6名ではNK細胞増加を認めなかった。NKG2C、CD57の発現割合はCMV<sup>+</sup>群でCMV<sup>-</sup>群より有意に高かったが、TKI間の違いは明らかではなかった。PCAでは第1主成分(PC1)の値がCMV関連高分化を示すNK細胞マーカーの発現割合と正の相関を示した。PC1値はCMV群で最も低く、CMV<sup>+</sup>健常者、CMV<sup>+</sup>OTKI群、CMV<sup>+</sup>DA群の順に有意に増加した。即ち、CMV関連高分化型NK細胞の割合がこの順に増加していることが分かった。第2主成分の値は主にNKG2C、KIRなど遺伝的背景の影響下でNK細胞の分化とともに発現するマーカーの発現割合によって規定され、PC1値の増加に伴って拡散する傾向を示した。PC1値の解析により以下の結果を得た。CML及び急性骨髄性白血病の初診時に既にCMV<sup>+</sup>健常者群より高分化型NK細胞の割合が増加していた。さらにCMV<sup>+</sup>のCML患者はDA治療によって高分化型NK細胞の割合が増加したが、OTKI治療では変化がなかった。また初診時に高分化型NK細胞の割合が高いCMV<sup>+</sup>CML患者は、割合が低い患者に比べてDA開始後のNK細胞の絶対数の増加が有意に顕著であった。K562を用いた機能解析では、CMV<sup>+</sup>DA群において、NKG2C<sup>+</sup>NK細胞はNKG2C<sup>-</sup>NK細胞に比較し、高い細胞傷害活性を示した。</p> <p>[考察] DA治療中に増加するLGLの主体がCMV関連高分化型NK細胞であることから、LGL増加のメカニズムとして無症候性のCMV再活性化の関与が強く示唆される。更に白血病発症によってもCMV関連高分化型NK細胞が増加し、治療前の高分化型NK細胞の割合はその後のDA治療によるLGLの増加を予測する重要な因子と考えられる。以上の知見はNKG2C、CD57などNK細胞マーカーの個別解析では得られないものであり、PCA</p>			

による多数のマーカーの統合的な解析の重要性が強調される。In vitroの実験でDAは免疫細胞(T細胞、NK細胞、形質細胞様樹状細胞)の機能を抑制することから、NK細胞の分化・増殖はDAによる免疫抑制により引き起こされたCMV再活性化による間接的な作用が示唆される。近年、CMLの治療中止後の無治療寛解(TFR)維持例ではNK細胞が有意に多いとの報告があり、活性化したCMV関連NK細胞がTFR維持に寄与している可能性がある。本研究では、PCAを用いた詳細なNK細胞の分子マーカー解析によって白血病患者におけるNK細胞の特徴を捉え、CMVとダサチニブがNK細胞の分化、増殖に決定的な役割を果たしていることを明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

本研究はフィラデルフィア染色体陽性白血病のダサチニブ治療中にみられる大顆粒リンパ球(LGL)増加の機序解明を目的として臨床検体を解析した観察研究である。これまで、LGL増加の機序の一つとしてサイトメガロウイルス(CMV)の関与が指摘されていたが、多くの患者ではCMV再活性化を認めず、その関与は不明であった。本研究では末梢血リンパ球の広範な表面及び細胞内マーカーを主成分分析により解析し、CMV既感染のダサチニブ治療患者では他の薬剤で治療した患者よりNK細胞がCMV関連高分化型形質を持つことを示した。この形質はCMV再活性化の有無に関わらず認められ、ダサチニブ治療により経時的に促進した。以上より、ダサチニブ治療はCMVの不顕性再活性化を介して高分化型NK細胞を誘導していることが強く示唆された。また、治療前に高分化型NK細胞の割合が高い患者はダサチニブ治療によってNK細胞が著増し、早期に深い治療効果を得ることから、NK細胞の形質はその後の治療によるLGL増加及び治療効果を予測する重要な因子であることが示された。以上の知見はNK細胞マーカーの個別解析では得られず、NK細胞を評価する上で主成分分析などによる多数のマーカーの統合的な解析の重要性が示された。

以上の研究はチロシンキナーゼ阻害薬による免疫修飾メカニズムの解明に貢献し、今後の白血病治療の改善に寄与するところが大きい。

従って、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成28年11月21日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降