

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 諏訪部 達也
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1002 号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 WT1-specific CD8+ cytotoxic T cells with the capacity for antigen-specific expansion accumulate in the bone marrow in MDS
(MDS患者の骨髄中に抗原特異的な増幅能を有するWT1特異的CD8陽性細胞障害性T細胞が集積する)
論文審査委員 主査 教授 片貝 智哉
副査 教授 西條 康夫
副査 准教授 瀧澤 淳

博士論文の要旨

背景と目的

骨髄異形成症候群 (MDS) は、骨髄中の異常な造血幹細胞がクローン性に増幅した結果生じる骨髄造血器腫瘍であり、末梢血における血球減少および急性骨髄性白血病へ移行しやすい潜在的悪性性格を特徴とする。MDS の治癒を目指した治療法は同種造血幹細胞移植のみであり、病勢のコントロールを得るための治療法も限られており、新たな治療法の開発が期待されている。免疫チェックポイント阻害薬や腫瘍関連抗原を使用したワクチン療法などのがん免疫療法が、MDS に対して試みられてきている。ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 は、白血病や多くの固形癌に高発現しているがん遺伝子であり、WT1 蛋白は腫瘍関連抗原として腫瘍免疫療法の重要なターゲットの一つである。WT1 ペプチドワクチンを用いた複数の臨床試験で、MDS を含む血液悪性腫瘍に対して芽球数の低下や輸血依存状態の改善といった効果が一部の症例で示された。WT1 ペプチドワクチン療法は、WT1 特異的 CD8+T 細胞を患者内に増幅させることで抗腫瘍効果を示すと考えられている。一方で、免疫療法前に MDS 患者内に存在し WT1 ペプチドワクチン反応性を示す WT1 特異的 CD8+T 細胞が、どのくらいの頻度で、どのような表現型を有して存在しているかは明らかではない。本研究は、MDS において自然発生した WT1 特異的 CD8+T 細胞の頻度や分布、表現型を詳細に調べることを目的とした。

方法

HLA-A24 を有する 39 例の MDS および骨髄異形成変化を伴う急性骨髄性白血病 (AML/MRC) の患者から骨髄血と末梢血のペア検体を得た。単核球分離した検体について、従来の WT1/MHC テトラマー (WT1 tetramer) を用いたフローサイトメトリーによる解析に加え、mixed lymphocyte peptide culture (MLPC assay; Int J Med Sci. 2010;7:72-81)により WT1 ペプチド特異的に増幅した WT1 特異的 CD8+T 細胞クローンの検出を行い、これらのクローンの存在頻度を推定した。WT1 tetramer 結合 CD8+T 細胞および WT1 特異的 CD8+T 細胞クローンに関して、その表面抗原をフローサイトメトリーにより解析した。WT1 特異的 CD8+T 細胞に関して、形質細胞様樹状細胞腫瘍由来株 PMDC11 を用いて WT1 ペプチド特異的な更なる増幅を試み、得られた

培養リンパ球について T2A24-GFP 細胞株を用いた細胞障害性試験を行い、併せて細胞障害性試験で産生された IFN- γ を ELISA 法で測定した。本研究のプロトコルは倫理審査委員会での承認を得た。全ての患者にインフォームドコンセントを行い、書面による同意を得た。

結果

WT1 tetramer 結合 CD8+T 細胞の中央値は末梢血で 0.11%、骨髄で 0.18%であった。MLPC assay の結果、23%の症例で末梢血から WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出された一方で、61%もの症例において骨髄血から WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出され、末梢血より有意に高頻度であった ($P=0.001$)。CD8+T 細胞中における WT1 特異的 CD8+T 細胞の存在頻度は、中央値として骨髄血では末梢血の約 10 倍であると推定された (PB 3.0, BM 39.9 cells/106 CD8+T cells)。1 例の MDS 患者の末梢血から検出された WT1 特異的 CD8+T 細胞は、PMDC11 を用いた WT1 特異的な増幅に成功し、WT1 反応性の細胞障害性を示した。骨髄における WT1 tetramer 結合 CD8+T 細胞は、慢性抗原刺激による疲弊マーカーである CD39 と、ナイーブ T 細胞が主に有する homing receptor である CXCR4 を共発現する特異的な表現型を呈していた。一方で、固形腫瘍へ浸潤する腫瘍反応性 T 細胞に特徴的であると報告される CD39 および CD103 の共発現は認めなかった。

考察

本研究により、増幅能を有する WT1 特異的 CD8+T 細胞は MDS 患者の半数以上で自然発生的に存在することが明らかとなった。また、WT1 特異的 CD8+T 細胞は MDS 患者の骨髄内に、特徴的な表現型を有して集積していることが明らかとなった。MDS における骨髄は、病的細胞が多く存在する「腫瘍コンパートメント」と考えられているが、多くの固形癌と同様に、腫瘍細胞およびその抗原に反応する特異的 CD8+T 細胞が集積する腫瘍微小環境を形成している可能性が示された。これらの結果は、MDS に対する腫瘍免疫学的な新たな知見を示すとともに、WT1 ペプチドワクチン療法や免疫チェックポイント阻害薬、あるいはそれらの腫瘍免疫学的な治療アプローチが、MDS において有効である可能性を強く支持する。

審査結果の要旨

骨髄異形成症候群 (MDS) に対して腫瘍免疫療法が試みられてきている。WT1 は腫瘍関連抗原として MDS の腫瘍免疫療法の重要なターゲットの一つであり、WT1 ペプチドワクチン療法は一部の症例で有効性を示している。本研究は、MDS において自然発生した WT1 特異的 CD8+T 細胞の頻度や分布、表現型を詳細に調べることを目的とした。

対象は HLA-A24 を有する 39 例の MDS および骨髄異形成変化を伴う急性骨髄性白血病 (AML/MRC)。骨髄と末梢血の単核球を、WT1/MHC tetramer を用いて 2 つのアッセイを行った。従来フローサイトメトリーを用いた解析と、mixed lymphocyte peptide culture (MLPC assay) を用いた解析である。

WT1 tetramer 結合 CD8+T 細胞の中央値は末梢血で 0.11%、骨髄で 0.18%であった。MLPC assay の結果、23%の症例で末梢血から WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出された一方で、61%もの症例において骨髄血から WT1 特異的 CD8+T 細胞が検出され、末梢血より有意に高頻度であった。CD8+T 細胞中における WT1 特異的 CD8+T 細胞の存在頻度は、中央値として骨髄血では末梢血の約 10 倍であると推定された。WT 特異的 CD8+T 細胞は細胞障害性を示した。骨髄における WT1 tetramer 結合 CD8+T 細胞は、慢性抗原刺激による疲弊マーカーである CD39 と、ナイーブ T 細胞が主に有する homing receptor である CXCR4 を共発現する特異的な表現型を呈していた。

本研究は、40 例近い症例で機能的な WT1 特異的 CD8+T 細胞の検出を試み、その存在頻度を明らかにしたことに加え、特徴的な表現型を調べた点は新規性があり、博士論文として十分価値を認めるものである。