| 60　造血幹細胞移植における*KIR*アリル多型の機能解析 | 進藤　岳郎 |
|---|---|

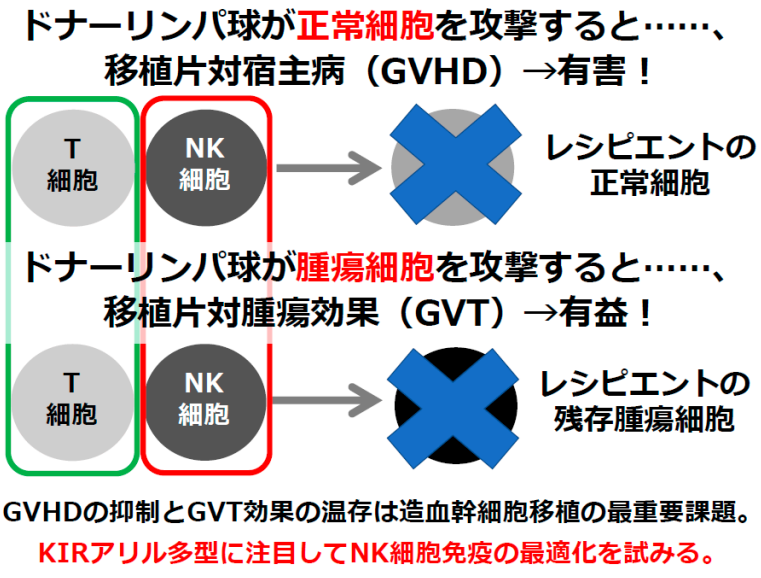
【目的】同種造血幹細胞移植の成功と患者の QOL 維持には、ドナーリンパ球によるレシピエントの組織傷害（Graft-versus-Host Disease：GVHD）と抗腫瘍免疫（Graft-versus-Tumor Effects：GVT 効果）の適正化が求められる。両者にはドナー由来 T 細胞に加えて NK 細胞が関与するが、NK 細胞の機能発現には不明な点が多い（下図）。

Killer immunoglobulin-like receptor（KIR）は NK 細胞が発現する受容体蛋白質で、標的細胞上の特定の human leukocyte antigen（HLA）と会合することで NK 細胞に活性化ないし抑制性シグナルを伝える。KIR と HLA の両者とも多くのサブタイプがあり、それぞれが豊富な多型性を持つ。そして両者の会合親和性および伝達されるシグナル強度は両多型の組み合わせで決定される。よって KIR と HLA 多型に注目してドナー選定法を最適化すれば、GVHD と GVT 効果の調節により移植成績を向上できる可能性がある。しかし既報では KIR の意義は一定せず、移植免疫における KIR、特に近年明らかとなった KIR アリルの意義はなお不明である。今回同多型のタイピングで GVHD の低減と GVT 効果の最大化を可能にする治療戦略の確立を目指した。

【方法】1. 難治性の慢性骨髄性白血病症例（Chronic Myeloid Leukemia：CML）に同種造血幹細胞移植を行った症例で、KIR3DL1 陽性 NK 細胞の多寡と NK 細胞活性、CML の病勢との相関性解析を行った。2. 複数の HLA アリルを導入した CML 細胞株とヒト NK 細胞の共培養系で KIR アリルの機能解析を行った。3. 多数の移植症例での臨床研究により、GVHD 発症の予測に有用なバイオマーカーの検索を行った。4. 免疫不全マウスにヒトリンパ球を輸注して作製した異種移植 GVHD モデルで、免疫再構築の評価を行った。5. 本邦で集積された同種移植症例の保存検体を用いた KIR アリルタイピングの臨床研究の準備を進めた。

【結果】1. KIR3DL1 陽性 NK 細胞が生着したことに伴って NK 細胞活性が低下し、CML の再発に至った。すなわち KIR3DL1 陽性細胞の増加が NK 細胞による抗腫瘍免疫の弱体化を来す可能性が示唆された。2. 異なる KIR アリルと HLA との会合で NK 細胞活性が調節される可能性が示唆された。3. 移植患者の CD4T 細胞内 ERK1/2 のリン酸化がヒト急性 GVHD のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。4. GVHD マウスでは T 細胞の多様性が失われるが、MEK 阻害剤の投与でその多様性が保持された。5. 上記研究につき、日本造血細胞移植データセンターおよび本学の倫理承認を得た。

造血幹細胞移植における免疫動態：GVHD と GVT 効果



# 60. 造血幹細胞移植における *KIR* アリル多型の機能解析

進藤　岳郎

京都大学 医学部附属病院 血液内科

Key words：造血幹細胞移植，NK 細胞，KIR，GVHD，GVT 効果

## 緒　言

同種造血幹細胞移植は難治性の造血器腫瘍に治癒をもたらし得るが、その成功には免疫反応の適正化が欠かせない。すなわちドナーリンパ球によるレシピエントの組織傷害（Graft-versus-Host Disease：GVHD）を抑制しつつ、抗腫瘍免疫（Graft-versus-Tumor Effects：GVT 効果）や感染免疫を温存することが求められる。両者にはドナー由来 T 細胞と NK 細胞が関与するが、T 細胞免疫に比して NK 細胞免疫の機能発現には不明な点が多く、その最適化戦略は未確立である。NK 細胞免疫の機能と強度と相関する因子やバイオマーカーを明らかにできれば、移植成績をさらに向上できる可能性がある（図 1）。

Killer immunoglobulin-like receptor（KIR）は NK 細胞上に発現する受容体蛋白質で、標的細胞上の特定の human leukocyte antigen（HLA）と会合することで NK 細胞に活性化ないし抑制性シグナルを伝える。KIR と HLA の両者とも豊富なサブタイプと多型性を持ち、その会合親和性および伝達されるシグナルの強度は両多型の組み合わせで規定されると考えられている。よって KIR と HLA 多型に注目してドナー選定法を最適化し、移植成績を向上できる可能性がある。しかし過去の解析では互いに矛盾する報告や否定的な報告も多く、いまだ臨床応用には至っていない。次世代シークエンサーの登場で各 KIR 分子は豊富なアリル多型を持つことが明らかとなったが、造血幹細胞移植におけるその臨床的意義には不明な点が多い。

我々は、KIR と HLA のアリル多型の組み合わせが慢性骨髄性白血病におけるチロシンキナーゼ阻害剤の治療効果と相関することを見出した［1］。今回、実際の移植症例で経時的な免疫学的解析を行い、KIR3DL1 蛋白を発現する NK 細胞の出現により抗腫瘍免疫が抑制される可能性が示唆された［2］。また多数の移植症例の末梢血を用いて GVHD 発症のバイオマーカー検索を行い、移植後 30 日目の CD4 T 細胞中 ERK1/2 蛋白のリン酸化亢進が急性 GVHD 発症の予測マーカーになり得ることを見出した［3］。さらに現在は次世代シークエンサーを用いたより簡便で正確な KIR アリルのタイピング法開発に取り組んでおり、一方では *in vitro* で KIR アリル多型の機能解析実験を行っている（未発表）。そして本邦で集積された造血幹細胞移植のレジストリデータと DNA 検体を用いて KIR アリルの診断を行い、移植成績との相関性を抽出する作業中である。これらの知見に基づき、最終的には同多型のタイピングにより GVHD を低減し、GVT 効果を最大化する戦略を確立する、すなわち KIR アリル多型に基づいて移植ドナー選択アルゴリズムを最適化することを目指している。

## 方　法

### 1.　ヒト同種造血幹細胞移植症例におけるフローサイトメトリー解析

治療抵抗性の慢性骨髄性白血病（Chronic Myeloid Leukemia：CML）に同種末梢血幹細胞移植を行った症例で経時的に末梢血のフローサイトメトリー解析を行い、KIR3DL1 陽性 NK 細胞の多寡と NK 細胞活性、CML の病勢との相関性解析を行った。

### 2.　KIR アリルの機能解析実験

遺伝伝子導入細胞株を用いた実験で、KIR アリルの機能解析実験を行った。

**3. ヒト造血幹細胞移植における GVHD のバイオマーカー抽出**

多数の移植症例でフローサイトメトリーによる末梢血中リンパ球の経時的評価を行い、GVHD 発症の予測に有用なバイオマーカーの検索を行った。

**4. 異種移植 GVHD モデルにおける TCR レパトア解析**

免疫不全マウスにヒトリンパ球を輸注して異種移植による GVHD モデルを作製した。生着した T 細胞の多様性維持について、次世代シークエンサーを用いて T 細胞受容体（T-cell receptor：TCR）のレパトアを評価し、さらに分子標的薬を用いた治療効果について検証した。

**5. 本邦のレジストリを用いた同種造血幹細胞移植における臨床研究**

本邦で集積された同種骨髄移植症例の保存検体を用いた KIR アリルタイピングとそれに基づく臨床成績との相関性解析計画を策定し、倫理承認手続きを進めた。

## 結　果

**1. 同種造血幹細胞移植後の KIR3DL1 陽性細胞の出現と腫瘍の病勢との相関性（図 1）**

移植直後は KIR3DL1 陽性 NK 細胞が稀少で、NK 細胞活性が高く、CML の病勢は抑制されていた。しかし KIR3DL1 陽性 NK 細胞の出現・増加に伴って NK 細胞活性が低下し、CML の再発をみた。すなわち KIR3DL1 分子を介したシグナルが NK 細胞による抗腫瘍免疫を抑制する可能性がある。

**2. *in vitro* の共培養実験による KIR の機能解析**

特定の HLA アリルと KIR との会合により、ヒト NK 細胞の活性が亢進・抑制されることが示唆され、現在はその検証作業を進めている。

**3. 移植症例での検討による GVHD 発症のバイオマーカー検索**

移植後 30 日目の末梢血中 CD4T 細胞の ERK1/2 蛋白質のリン酸化亢進が急性 GVHD の発症予測に有用なバイオマーカーであることが示された（図 2）。

**4. 異種移植 GVHD モデルにおける TCR レパトア解析**

GVHD マウスでは T 細胞の多様性が失われたが、分子標的薬 MEK 阻害剤の投与でその多様性は保持された（図 3：第 62 回米国血液学会議で発表、Itamura H, Muranishi H, Shindo T*, Kitaura K, Okada S, Shin-I T, Suzuki R, Takaori-Kondo A, Kimura S. “The MEK inhibitor trametinib enhances diverse T cell reconstitution with suppressing xenogeneic GVHD.” Blood 2019; 134: Supplement 1, 1929, abstract）。

**5. 本邦のレジストリを用いた同種造血幹細胞移植における臨床研究**

2019 年度中に日本造血細胞移植データセンターおよび京都大学の両者で倫理承認を得た。現在は検体委譲の手続き中である。並行して、次世代シークエンサーを用いた KIR アリルの新規タイピング法を開発中である。

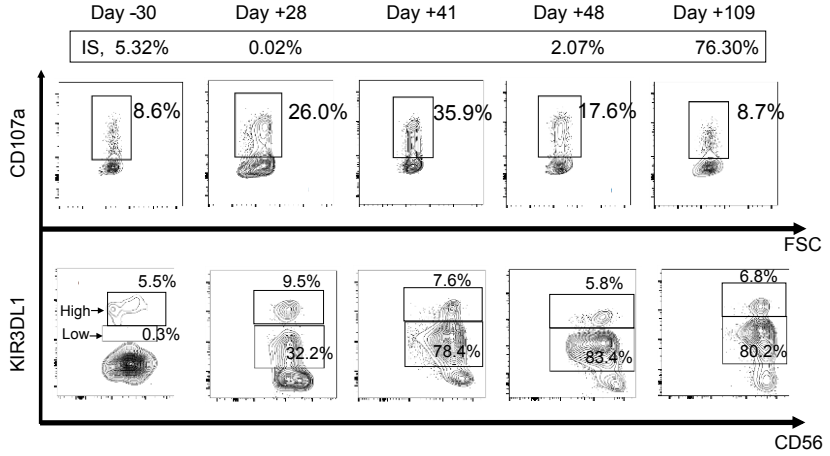



図 1. CML に対する同種移植後の KIR3DL1 陽性細胞数と CML の病勢・NK 細胞活性の経時的変化
KIR3DL1 陽性 NK 細胞の増加に伴い、NK 細胞活性が低下し、CML の再発がみられた。

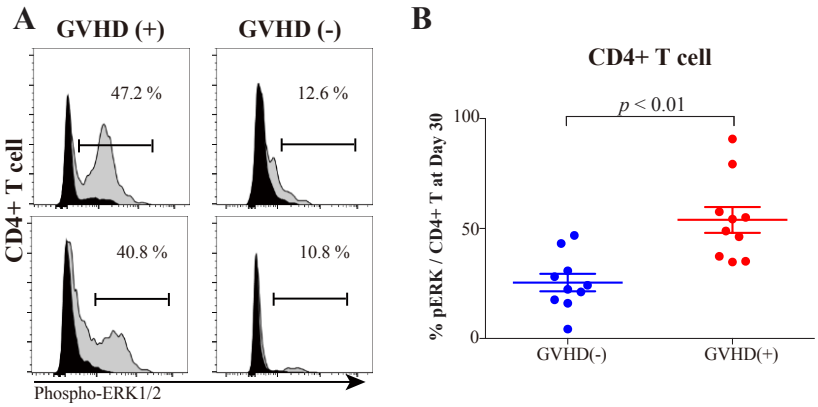



図 2. 移植後 30 日目の末梢血中 CD4T 細胞の ERK1/2 リン酸化は急性 GVHD の発症と相関した

A）GVHD 発症患者では CD4 T 細胞における ERK1/2 のリン酸化が亢進した。

B）多数例での解析でも、GVHD 発症患者の CD4 T 細胞中 ERK1/2 のリン酸化は有意に高値を示した。Student's t 検定、P＜0.01。

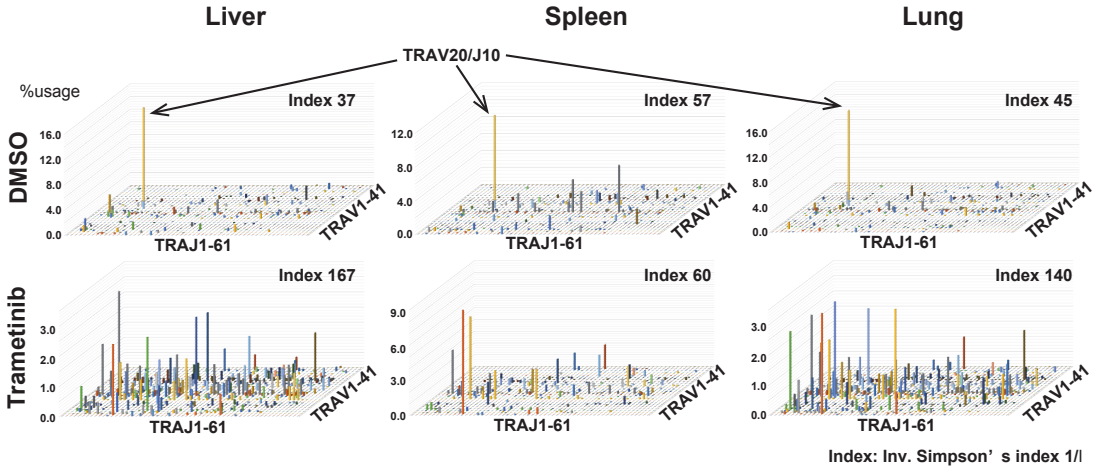



図 3. 異種移植 GVHD における T 細胞受容体のレパトア解析

ヒト末梢血中リンパ球を免疫不全マウスに輸注して GVHD マウスを作製し、肝臓・脾臓・肺で TCR のレパトア解析を行った。

上段）GVHD 発症マウスでは TCR の多様性が失われ、共通のクローンが多臓器で認められた。

下段）MEK 阻害剤トラメチニブを投与すると TCR の多様性が保持され、GVHD 徴候も軽減した。

## 考　察

本研究では、第一にヒト移植症例における解析を通して、NK 細胞免疫における KIR3DL1 蛋白陽性細胞の意義を見出した。これは我々の作業仮説に矛盾しない結果で、続いて多数例での検証を予定している。第二に *in vitro* での実験で KIR アリル多型の機能が明らかになりつつあり、近日報告する予定である。本結果は臨床研究と合わせてさらに補強される見込みで、最終的には KIR アリル多型に基づいて造血幹細胞移植のドナー選定アルゴリズムを改善できる可能性がある。

一方ヒトでの移植後 GVHD の診断に有用なバイオマーカーの検索により、CD4T 細胞内 ERK1/2 蛋白のリン酸化亢進で急性 GVHD の発症を予測できることを見出した。また異種移植による GVHD モデルで生着 T 細胞の多様性が失われること、さらに分子標的薬 MEK 阻害剤がその多様性を保持することを示した。これらの知見は今後移植症例の前向き臨床研究を行うにあたり、T 細胞と NK 細胞の相互作用を解析する上で有用と考えられる。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、佐賀大学医学部血液・呼吸器・腫瘍内科の木村晋也博士、熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター造血・腫瘍制御学分野の岡田誠治博士、また国立感染症研究所エイズ研究センター第二室の立川愛博士である。本稿を借りて、深謝いたします。

## 文　献

1） Ureshino H, Shindo T*, Kojima H, Kusunoki Y, Miyazaki Y, Tanaka H, Saji H, Kawaguchi A, Kimura S. “Allelic polymorphisms of KIRs and HLAs predict favorable responses to tyrosine kinase inhibitors in CML.” Cancer Immunol Res. 6(6): 745-54, 2018. Epub 2018 Apr 25. PMID: 29695383 DOI: 10.1158/2326-6066. CIR-17-0462.

2） Ureshino H, Shindo T*, Sano H, Kubota Y, Ando T, Kidoguchi K, Kusaba K, Itamura H, Kojima H, Kusunoki Y, Miyazaki Y, Kojima K, Tanaka H, Saji H, Oshima K, Kimura S. “Reconstitution of NK cells expressing KIR3DL1 is associated with reduced NK cell activity and relapse of CML after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.” Int J Hematol. 111(5): 733-8, 2020. Epub 2019 Dec 23. PMID: 31873846 DOI: 10.1007/s12185-019-02809-5.

3） Itamura H, Shindo T*, Yoshioka S, Ishikawa T, Kimura S. “Phosphorylated ERK1/2 in CD4 T cells is associated with acute GVHD in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.” Blood Adv. 4(4): 667-71, 2020. PMID: 32078679 DOI: 10.1182/bloodadvances.2019000343