

## ダサチニブはNK細胞においてJAK-STAT経路を活性化し パーフォリン発現を増強させる

### Enhanced perforin expression associated with dasatinib therapy in natural killer cells

入山規良<sup>1)</sup>、高橋宏通<sup>1),2)</sup>、三浦勝浩<sup>1)</sup>、内野慶人<sup>1)</sup>、中川 優<sup>1)</sup>、濱田高志<sup>1)</sup>、八田善弘<sup>1)</sup>、武井正美<sup>1)</sup>

Noriyoshi IRIYAMA<sup>1)</sup>, Hiromichi TAKAHASHI<sup>1),2)</sup>, Katsuhiko MIURA<sup>1)</sup>, Masaru NAKAGAWA<sup>1)</sup>, Takashi HAMADA<sup>1)</sup>, Yoshihiro HATTA<sup>1)</sup>, Masami TAKEI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本大学医学部 内科学系血液・膠原病内科学分野、<sup>2)</sup>日本大学医学部 病態病理学系臨床検査医学分野

#### [要旨]

チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)のひとつであるダサチニブはNK細胞を活性化することが知られている。本研究ではTKI治療中の慢性骨髄性白血病患者の末梢血検体を解析し、ダサチニブがNK細胞のJAK-STAT系を活性化し、パーフォリン発現を増強させることを明らかにした。

#### [背景]

慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia; CML)はチロシンキナーゼ阻害薬(tyrosine kinase inhibitor; TKI)であるイマチニブの臨床応用により予後が劇的に改善した疾患である。<sup>1)</sup> さらに現在では治療抵抗性および不耐容患者に対して、第二世代TKIであるダサチニブ、ニロチニブ、ボスチニブおよび第三世代TKIであるポンチニブが利用可能となっている。<sup>2)</sup>

これらのTKIのうち、ダサチニブはnatural killer(NK)細胞を増加させ、かつ抗腫瘍活性を増強することが知られている。<sup>3)</sup> 増加したNK細胞は大顆粒リンパ球の形態を呈し、*in vitro*でのCML細胞に対する抗腫瘍活性が高いことも知られている。<sup>3,4)</sup> さらに、NK細胞の増加を認めた症例は治療反応性が良好であることや、TKI中断後の無治療寛解率が高いことも示されている。<sup>3)-6)</sup> しかしながら、ダサチニブが腫瘍免疫を増加させるメカニズムはいまだ不明のままである。

## [目的]

TKI 治療中の CML 患者において、NK 細胞の細胞障害性分子であるパーフォリンの発現、関連する細胞内シグナル活性、およびサイトカイン分析をおこなうことにより、ダサチニブが NK 細胞を活性化する機序を明らかにする。

## [対象および方法]

### (1) 倫理的考慮

本臨床研究実施にあたっては、日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究審査委員会に申請をおこない、当委員会の承認を得ている(RK-150609-15)。登録患者にはインフォームドコンセントを実施し、文書による同意を得た。

### (2) 対象

40 例の TKI 治療中 CML 患者が登録された。23 例はダサチニブ、11 例はイマチニブ、6 例はニロチニブ治療中の患者であった。活動性のある悪性腫瘍、感染症もしくは重大な臓器障害を有する患者は登録不可であった。原疾患による免疫系への影響を除外するため、細胞遺伝学的寛解以上の治療反応を得ている患者を選択し、また 3 か月以上の TKI 治療を受けていることを登録の適格条件とした。末梢血検体は TKI 内服直前に採取された。

### (3) 細胞内シグナルおよびパーフォリン解析

NK 細胞内のリン酸化シグナル解析は phospho-flow 法を用いておこなった。採取した末梢血検体から、Lymphoprep™ を用いた遠心分離により単核球を精製した。末梢血単核球を 1.5%パラホルムアルデヒドで固定し、90%メタノールで透過処理をおこない、分析まで-20℃で保存した。細胞表面を CD3 および CD56 で染色し、CD3-CD56+分画を NK 細胞と定義した。同時に細胞内染色をおこない、pJAK1、pJAK2、pSTAT1、pSTAT3、pERK、pJNK、pAKT、pp38 およびパーフォリンの発現強度を測定した。これらの発現強度は median fluorescence intensity (MFI) で評価した。解析例を図 1 に示す。

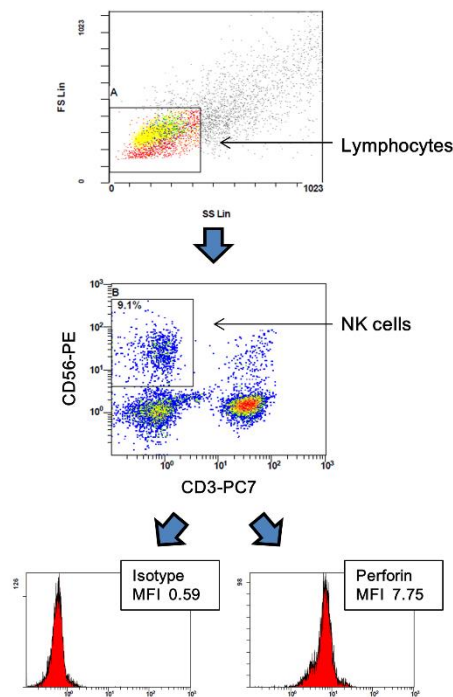


図 1

#### (4) 血漿サイトカイン分析

血漿成分は上記同様に TKI 内服直前に実施した採血検体を遠心分離し、分析まで 80°C で凍結保存した。血漿 IFN- $\gamma$  および IL-2 濃度を ELISA 法で測定した。

#### (5) 統計解析

統計学的解析は、群間比較は Mann-Whitney U test を用い、連続変数の相関については Pearson's correlation coefficient を用いた。P < 0.05 を統計学的有意とみなした。統計解析ソフトは JMP v.11.0.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。

### [結果]

#### (1) 患者背景

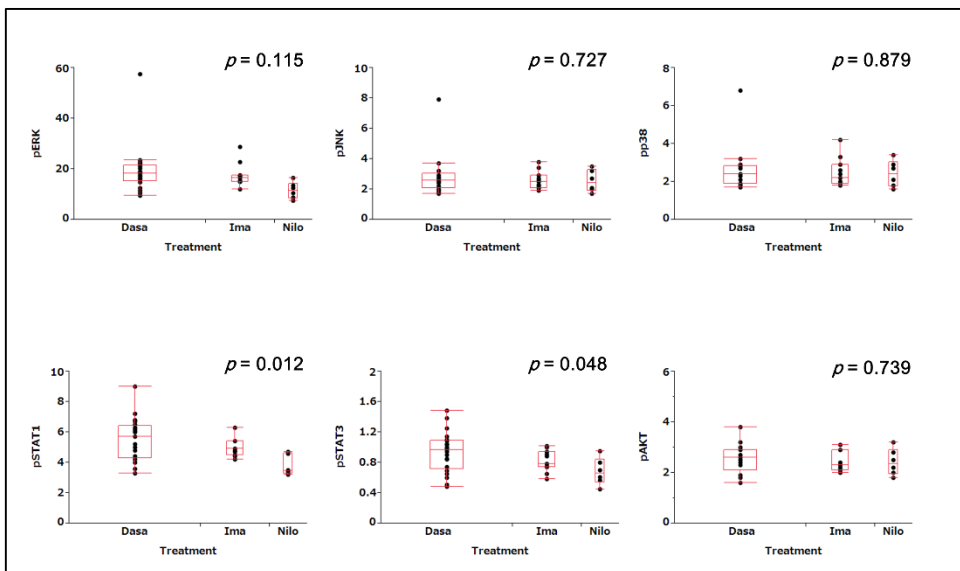
40 例の登録の患者のうち、ダサチニブ投与群の 23 例は年齢中央値 47 歳(範囲 25-85 歳)、他の TKI 投与群は年齢中央値 54 歳(範囲 38-84 歳)であった(P = 0.538)。性別は男性がそれぞれの群で 13 例、10 例であった(P = 1.000)。深い寛解を得られている患者はそれぞれの群で 10 例、11 例であり、分子学的大寛解未到達例はそれぞれ 3 例、1 例であった(P = 0.466)。

#### (2) NK 細胞のリン酸化シグナル強度

TKI 内服前の NK 細胞のリン酸化シグナル強度を図 2 に示す。ダサチニブ投与群の

NK 細胞は、他の TKI 投与群と比較して pSTAT1 および pSTAT3 の強度が高い結果であった。他の pERK、pJNK、pp38 および pAKT の強度は差を認めなかった。

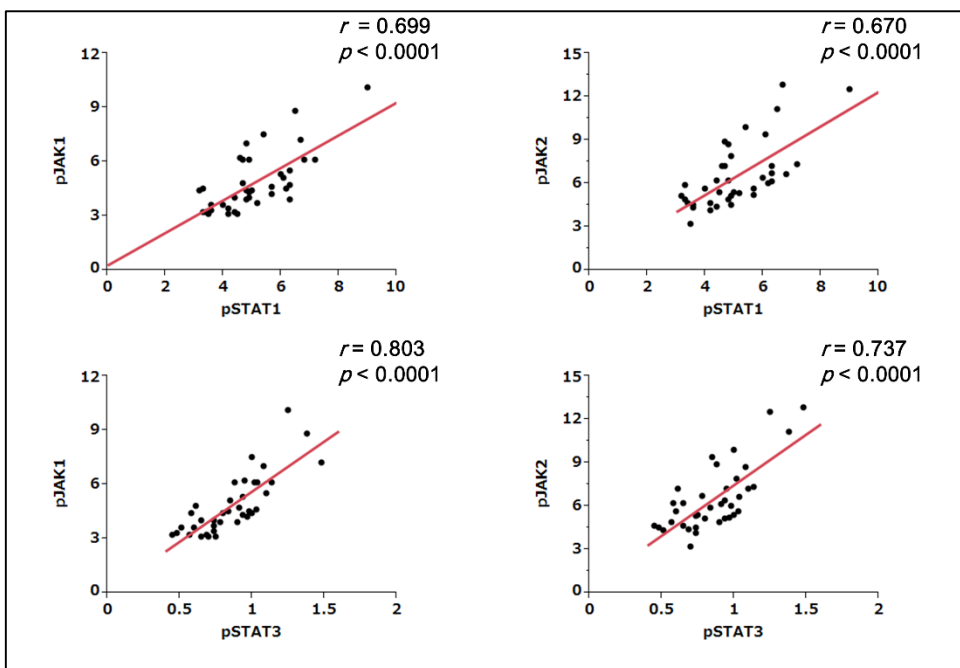
図 2



### (3) NK 細胞の JAK-STAT 経路の活性化

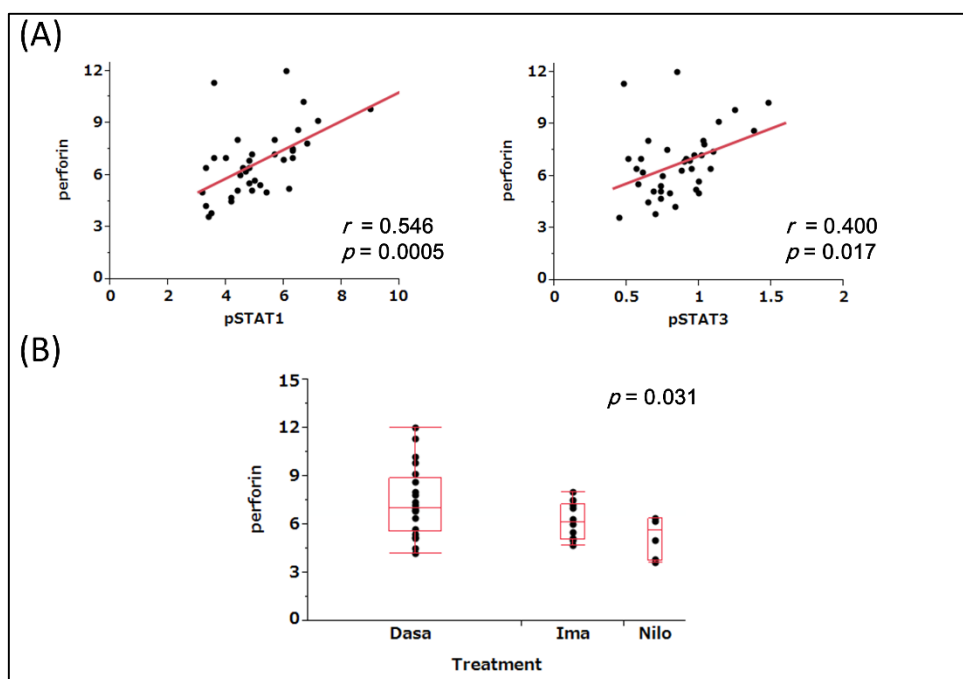
次に、NK 細胞における STAT と JAK の強度の関連について調査した。図 3 に示すように、pSTAT1 および pSTAT3 は pJAK1 および pJAK2 と有意に正の相関を示した。

図 3



また、図4に示すように、TKI治療中のNK細胞におけるパーフォリン発現強度はpSTAT1およびpSTAT3と有意に相関していた(A)。さらに、パーフォリン発現強度はダサチニブ投与群が他のTKI投与群よりも有意に高い結果であった(B)。

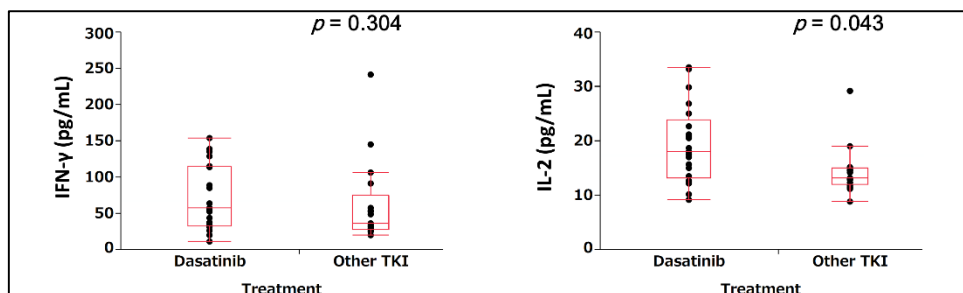
図4



#### (4) 血漿サイトカイン濃度

さらに我々はこれらのTKI治療中の患者血漿中のサイトカイン濃度を測定した。結果を図5に示す。ダサチニブ投与群と他のTKI投与群の血漿IFN- $\gamma$ 濃度は差を認めなかったが、IL-2濃度はダサチニブ投与群で他のTKI投与群よりも有意に高値を示す結果であった。

図5



### [考察]

我々は本研究において、TKI 治療中の CML 患者検体を分析することによって、ダサチニブが抗腫瘍活性を増強させる機序を明らかにしようと試みた。ダサチニブ治療中の NK 細胞数の増加や大顆粒リンパ球の出現は、CML の治療アウトカムを改善することはすでに知られているが、<sup>3)-6)</sup> 本研究ではダサチニブ治療中の患者における NK 細胞は JAK-STAT 系、特に Th1 経路である JAK1、JAK2、STAT1 および STAT3 が活性化しており、パーフォリン発現強度が他の TKI で治療されている患者に比較して有意に高かった。我々は結論として、NK 細胞におけるパーフォリンの発現増強が、ダサチニブが抗腫瘍活性を増強する機序であると結論付けた。過去にはダサチニブ治療中の患者は免疫動態が Th1 優位に傾くことが報告されているが、<sup>7)</sup> ダサチニブは Th1 サイトカインに対して IFN- $\gamma$  の抑制を伴わずの IL-2 発現増強をきたし、結果として他の TKI に比べて NK 細胞の JAK-STAT 経路を活性化しているものと考えられた。

また、実臨床の上で重要なことは、これらの JAK-STAT 系の活性化やパーフォリンの発現増強が治療効果に直接的な影響を与えるかどうかである。今回は検討された症例数が少なく、検体採取の時期も一定していないため、治療効果との関連を明らかにすることはできなかった。今後、症例を蓄積していくことにより、それらの関連を明確にすることができる可能性があると考えられる。

さらに、新規に承認された CML 治療薬であるボスチニブやポナチニブといった TKI においては、免疫動態への影響が明らかにはされておらず、これらの TKI についても免疫系への影響を検討する余地はあるものと考えられる。

### [結論]

本研究はダサチニブが免疫系に与える影響を示し、抗腫瘍活性を誘導するメカニズムを明らかにした。

### [参考文献]

<sup>1)</sup>Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, Baccarani M, Deininger MW, Cervantes F, Fujihara S, Ortmann CE, Menssen HD, Kantarjian H, O'Brien SG, Druker BJ: Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2017; 376(10): 917-927.

<sup>2)</sup>Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, Clark RE, Cortes JE, Deininger MW, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Hughes TP, Janssen JJWM, Kantarjian HM, Kim DW, Larson RA, Lipton JH, Mahon FX, Mayer J, Nicolini F, Niederwieser D, Pane F, Radich JP, Rea D, Richter J, Rosti G, Rousselot P, Saglio G, Saúbele S, Soverini S, Steegmann JL, Turkina A, Zaritskey A, Hehlmann R: European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 2020; 34(4): 966-984.

- <sup>3</sup>Mustjoki S, Ekblom M, Arstila TP, Dybedal I, Epling-Burnette PK, Guilhot F, Hjorth-Hansen H, Höglund M, Kovanen P, Laurinolli T, Liesveld J, Paquette R, Pinilla-Ibarz J, Rauhala A, Shah N, Simonsson B, Sinisalo M, Steegmann JL, Stenke L, Porkka K: Clonal expansion of T/NK-cells during tyrosine kinase inhibitor dasatinib therapy. *Leukemia*. 2009; 23(8): 1398-1405.
- <sup>4</sup>Kim DH, Kamel-Reid S, Chang H, Sutherland R, Jung CW, Kim HJ, Lee JJ, Lipton JH: Natural killer or natural killer/T cell lineage large granular lymphocytosis associated with dasatinib therapy for Philadelphia chromosome positive leukemia. *Haematologica*. 2009; 94(1): 135-139.
- <sup>5</sup>Rea D, Henry G, Khaznadar Z, Etienne G, Guilhot F, Nicolini F, Guilhot J, Rousselot P, Huguet F, Legros L, Gardembas M, Dubruille V, Guerci-Bresler A, Charbonnier A, Maloisel F, Ianotto JC, Villemagne B, Mahon FX, Moins-Teisserenc H, Dulphy N, Toubert A: Natural killer-cell counts are associated with molecular relapse-free survival after imatinib discontinuation in chronic myeloid leukemia: the IMMUNOSTIM study. *Haematologica*. 2017; 102(8): 1368-1377.
- <sup>6</sup>Imagawa J, Tanaka H, Okada M, Nakamae H, Hino M, Murai K, Ishida Y, Kumagai T, Sato S, Ohashi K, Sakamaki H, Wakita H, Uoshima N, Nakagawa Y, Minami Y, Ogasawara M, Takeoka T, Akasaka H, Utsumi T, Uike N, Sato T, Ando S, Usuki K, Morita S, Sakamoto J, Kimura S: Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2015; 2(12): e528-e535.
- <sup>7</sup>Kreutzman A, Ilander M, Porkka K, Vakkila J, Mustjoki S: Dasatinib promotes Th1-type responses in granzyme B expressing T-cells. *Oncoimmunology*. 2014; 3: e28925.