

Modeling regulatory T cells expansion and immunotherapy in Acute Myeloid Leukemia

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/00051421

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



博士論文(要旨)

制御性 T 細胞と白血病細胞との相互作用を
考慮した数理モデルによる免疫療法設計

Modeling regulatory T cells expansion and immunotherapy
in Acute Myeloid Leukemia

金沢大学大学院自然科学研究科

数物科学専攻

学籍番号 1524012006

氏名 西山 義晃

Population dynamics of regulatory T cells (Treg) are crucial for the underlying interplay between leukemic and immune cells in progression of acute myeloid leukemia (AML). The goal is to clarify dynamics of the model including Treg, which could be qualitatively assessed by accumulating clinical findings on the impact of activated immune cell infusion with selective Treg depletion. We constructed an ordinary differential equation model to describe the dynamics of three components in AML: leukemic blast cells, mature regulatory T cells (Treg), and mature effective T cells (Teff), including cytotoxic T lymphocytes. The model includes promotion of Treg expansion by leukemic blast cells, leukemic stem cell and progenitor cell targeting by Teff, and Treg-mediated Teff suppression, and exhibits two coexisting, stable steady states, corresponding to high leukemic cell load at diagnosis or relapse, and to long-term complete remission. Our model is capable of explaining the clinical findings that the survival of patients with AML after allogeneic stem cell transplantation is influenced by the duration of complete remission, and that cut-off minimal residual disease thresholds associated with a 100% relapse rate are identified in AML. By using the model, we performed Monte Carlo simulation of trajectories in phase plane and generated relapse free survival (RFS) curves, which could be compared with clinical data. The resulting RFS curves were in good accordance with clinical outcomes reported in immunotherapies of NK cells infusion with/without Tregs depletion. In addition, our simulation results focusing on consecutive cycles of cell infusion with/without cell depletion qualitatively accounts for the effectiveness of corresponding clinical immunotherapy. The present results suggest that our model may provide valuable information for future design of immunotherapy in AML.

1. がん細胞と免疫細胞との相互作用

急性骨髄性白血病(Acute myelogenous leukemia, AML)は、造血幹細胞あるいは造血幹細胞から細胞分化した前駆細胞における多数の遺伝子変異に起因する細胞増殖・分裂の亢進により、これら変異細胞から分化した白血病芽球細胞が末梢血および骨髄に蓄積し、正常な血液細胞の生成が抑制される血液がんの一種である。AMLと診断された大多数の患者は、白血病芽球細胞をターゲットとする誘導化学療法の適用により、末梢血の白血球数が正常値に回復する血液学的完全寛解(Complete remission, CR)を達成し、そのCRを維持するための地固め療法として化学療法が維持されるにも関わらず再発に至り、5年生存率は約27%にとどまっている。化学療法下で生存維持され再発に寄与する細胞集団の抵抗性の一因は、初発段階で抗がん剤に適応的な遺伝子変異のセットをすでに獲得していることによると考えられている一方で、白血病細胞と免疫細胞との相互作用による免疫抑制環境の時間的進展が、病態の進行、再発につながるとの仮説が有力視されつつある。

このような免疫抑制の成立に中心的な役割を担うのが転写因子FoxP3の発現によって特定される制御性T細胞(regulatory T cells, Treg)である。Treg細胞は、過剰なアレルギー反応や自己免疫を抑制するといった生理的に重要な役割を持っているが、AML患者ではTreg細胞数の顕著な増加が観察される。AML患者の骨髄および末梢血では、白血病細胞表面に発現している抗原を特異的に認識する細胞障害性T細胞(Cytotoxic T cells, CTL)が観察される一方で、白血病細胞は細胞表面に免疫抑制活性を持つ様々な分子を過剰発現し、これらの分子を介したTreg細胞の前駆細胞への作用によって、Treg細胞の生成が促進され、CTLやナチュラルキラー(NK)細胞など白血病細胞を障害するエフェクターT細胞(Teff)の活性抑制に至ると考えられつつある。

本研究の目的は、Treg細胞が関与する免疫抑制機構についての数理モデルを構築し、白血病細胞と免疫細胞との相互作用ネットワーク系が発現する非線形ダイナミクスを明らかにすることにより、免疫抑制機構の破たんを指向するAML免疫細胞療法プロトコル設計に寄与することである。本研究におけるアイデアは、免疫抑制機構についての新規のモデルに基づき、発現するアトラクターと急性骨髄性白血病の病態との対応付けを行い、完全寛解(CR)や再発などの病態変化をアトラクター間遷移として捉えることにより、多数報告されている臨床知見を力学系の観点から理解し、治療戦略特に免疫細胞療法の設計に寄与しようとするものである。本研究では、Treg細胞に基づく免疫抑制機構に対する新規のモデルを提案し、そのダイナミクスによって急性骨髄性白血病に関する多くの臨床研究結果を説明することができることを示す。

2. モデル

白血病芽球細胞(L)、制御性T細胞(Treg)、白血病幹細胞および白血病前駆細胞を障害するCTLやNK細胞などのエフェクターT細胞(Teff)から構成される常微分方程式モデルについて検討した。CTL、NK細胞、Tregなど免疫細胞を含むすべての成熟血液細胞は、造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)、それぞれの前駆細胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)、最終分化細胞という一連の細胞分化の連鎖からなる細胞系譜の末端に位置する。一方、白血病幹細胞(leukemic stem cell, LSC)、白血病前駆細胞(leukemic progenitor cell, LPC)はHSCあるいはHPCに遺伝子変異が蓄積した結果生じる。LSCおよびLPCは高い細胞増殖・分裂能を獲得しており、本モデルに含まれる白血病芽球細胞(L)はLSCからLPCを経由して細胞分化を経て大量に供給される。また、白血病芽球細胞(L)では自発的細胞死(アポトーシス)が抑制されているため、骨髄および末梢血での蓄積が進行する。本モデルでは、L、Teff、Tregの濃度の時間変化は、それぞれ一定の流入速度(a_L , a_{Teff} , a_{Treg})と1次のアポトーシス速度(速度定数 d_L , d_{Teff} , d_{Treg})によって決まる。LはLSCおよびLPCの細胞分化に基づき流入する。一方、TeffとTregはともに最終分化した成熟細胞であり、これらはそれぞれのHPCの細胞分化に

基づき流入する。これらの流入速度(a_L , a_{Teff} , a_{Treg})は、それぞれの前駆細胞濃度には依存せず一定であると仮定される。 L , $Teff$, $Treg$ の間の相互作用は、相互作用の強度を示すしきい定数(k_1 , k_2 , k_3)とHill係数 p を用いてHill関数によって定式化した。細胞間の相互作用は、以下の実験研究報告に基づいている。

1) $Teff$ によるLSCおよびLPCのターゲッティング ($[Teff]$ の増加に伴う a_L の減少) ; 慢性骨髄性白血病のマウスから単離されたLSCはCTLによって認識され、LSCの細胞数が少ない条件下ではCTLはLSCを殺傷することができる。また、リンパ球を移植されたAML患者およびCML患者では、LSCおよびLPCを認識し殺傷するCTLが誘導される。

2) $Treg$ による成熟 $Teff$ の抑制($[Treg]$ の増加に伴う a_{Teff} の減少) ; $CD8(+)$ T細胞の増殖・分裂とエフェクターT細胞への分化は、IL-2のオートクリン生成によるが、 $Treg$ 細胞がIL-2を競合的に消費することによって間接的に $Teff$ の生成が抑制される。さらに、 $CD8(+)$ T細胞によりオートクリン生成されたIL-2が $Treg$ の生成を促進して $Teff$ の抑制が加速するループが存在する。

3) L による $Treg$ 生成の促進($[L]$ の増加による a_{Treg} の増加) ; 白血病芽球細胞が発現する免疫抑制活性を持つ分子 (programmed death-1(PD-1)受容体に対するリガンドであるPD-L1、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)、細胞膜貫通型糖タンパク質CD200) を介した $Treg$ 細胞の前駆細胞への作用によって、 $Treg$ 細胞の生成が促進される。以上より、以下の常微分方程式モデルを作成した。

$$\frac{d[L]}{dt} = a_L \left(\frac{k_1^p}{k_1^p + [Teff]^p} \right) - d_L [L] \quad (1.1)$$

$$\frac{d[Teff]}{dt} = a_{Teff} \left(\frac{k_2^p}{k_2^p + [Treg]^p} \right) - d_{Teff} [Teff] \quad (1.2)$$

$$\frac{d[Treg]}{dt} = a_{Treg} \left(\frac{[L]^p}{k_3^p + [L]^p} \right) - d_{Treg} [Treg] \quad (1.3)$$

式(1.2)および(1.3)に含まれるパラメーター(a_{Teff} , a_{Treg} , d_{Teff} , d_{Treg})については、文献で報告されているAML患者における誘導化学療法後のリンパ球数の回復の時系列データから $Teff$ と $Treg$ の細胞数の時間変化を推定し、この推定値を再現するパラメーターの分布をMCMC(Markov chain Monte Carlo)法を用いて推定した。式(1)の3つのヌルライン ($d[L]/dt=0$, $d[Teff]/dt=0$, $d[Treg]/dt=0$)の交点である定常状態は、`nleqslv` R-packageを用いてニュートン法で数値的に求めた。式(1)の常微分方程式については、MATLAB Ver. 7.13 (The Mathworks, Inc.)の`ode23`を用いて数値解を求めた。

a_L , d_L , k_1 については表1に示す広い範囲でダイナミクスを探索し、単一の安定な定常状態または安定な2つの定常状態が存在することが判明したが、本モデルがリミットサイクルなど他のダイナミクスを持つことを否定はできない。 k_2 , k_3 , p については安定な2つの定常状態が生じる値に固定した。

薬剤投与時間における体内での薬剤濃度は一定とし、薬剤による L , $Teff$, $Treg$ の消失速度は、それぞれの細胞濃度に比例すると仮定すると、薬剤の効果はアポトーシスによる

消失速度定数に含めることができるため、誘導化学療法は、薬剤投与時間における dL 、 dT_{eff} 、 dT_{reg} の増大としてモデル化した。 T_{eff} の細胞移植および T_{reg} のターゲットティングは、 $[T_{eff}]$ および $[T_{reg}]$ の瞬時増加および瞬時減少としてモデル化した。

3. 2重定常状態と吸引域の境界

図1は、パラメーター k_2 の値に対する L の定常濃度の依存性を示している。2つの安定な定常状態と1つの不安定な定常状態が広いパラメーター範囲で認められる。図1で認められる2つの安定定常状態は、白血病芽球細胞(L)が増大している状態(SS_{high})と $[L]$ が低い状態(SS_{low})が長期間にわたり維持される long-term CR と見なすことができる。図2は、 SS_{high} ($[L]=100000/\mu L$, $[T_{eff}]=0.00031/\mu L$, $[T_{reg}]=4955/\mu L$ 、濃度空間内の位置は図外)にある系に対して、化学療法を適用した場合の軌道を示している。 L に対するアポトーシス速度定数 dL の値を増加させることにより、化学療法により到達する状態点が移動する。到達した状態点に依存して、再び元の SS_{high} に戻る(再発する)か、 $[L]$ が低い安定な定常状態 SS_{low} ($[L]=40/\mu L$, $[T_{eff}]=283/\mu L$, $[T_{reg}]=8/\mu L$)に到達する(long-term CRとなる)かに分かれている。これは、 SS_{high} と SS_{low} のそれぞれの吸引域(basin)とその境界(basin boundary)の存在を示している。図3は、 SS_{high} の吸引域を示しており、吸引域内の各状態点を示す点の大きさが、その状態点から SS_{high} に至るまでの時間に比例している。 SS_{high} と SS_{low} の吸引域の境界近傍に位置する状態点から SS_{high} に到達するまで、より時間を要することがわかる。白血病芽球細胞で特異的に発現している転写産物量を微小残存病変(MRD, minimal residual disease)の指標とした場合、完全寛解から再発するか寛解が維持されるかどうかを予測するMRDの閾値が存在することが報告されており、この閾値が本モデルでの吸引域の境界の存在を強く支持することを示した。また、2回目の完全寛解に適用された造血幹細胞移植後の生存率が初回の完全寛解の維持時間と正の相関があることや完全寛解におけるリンパ球の回復の程度と生存率との相関など、急性骨髄性白血病に関する臨床知見が吸引域の境界近傍を系が通過する場合に予想される過渡的なダイナミクスによって説明できることを示した。

4. 免疫細胞療法のシミュレーション

本研究で提案するモデルは、AMLの病態進行を支配するCTLやNK細胞などエフェクターT細胞(T_{eff})とともに免疫抑制機構で中心的な役割を担う制御性T細胞(T_{reg})を考慮したもので、臨床で行われているAMLに対する免疫細胞療法の効果を説明する枠組みとなるかどうか、免疫細胞療法の効果的なプロトコルの設計に寄与しうるかどうかが検討を行った。

誘導化学療法直後から閾値以下に $[L]$ が維持される時間としてCR時間を定義する。500名の仮想的なAML患者集団を想定し、免疫細胞療法プロトコルに沿ってシミュレーションを行った。 $[L]$ の閾値を $500/\mu L$ と仮定して得られたCR時間の分布を、臨床研究で多用されているRFS(Relapse free survival)曲線に変換した。各患者に対応するパラメーターの値は同一であるとし、したがって濃度空間における SS_{high} と SS_{low} の位置は同一である。各患者の誘導化学療法に対する感受性の差異をモデル化するために、パラメーター(dL , dT_{eff} , dT_{reg})については、MCMC法で推定した平均値を用いて正規分布からランダムサンプリングを行った。その結果を図4に示した。1) 誘導化学療法のみの場合、2) 誘導化学療法に続いて T_{eff} 細胞移植を行った場合、3) 誘導化学療法を行った後 T_{eff} 細胞移植に先行して T_{reg} 細胞除去を行った場合、以上3つの処置のいずれにおいても、時間とともに再発が起こらない割合(ratio of relapse free)がほぼ一定になっている。図4から、誘導化学療法に続いて T_{eff} 細胞移植を行ったほうが治療効果が良好であることがわかる。

造血幹細胞移植やNK細胞、CTL細胞などのエフェクターT細胞(T_{eff})移植では、一般に移植

する細胞数が多い方がより高い治療効果が期待できるが、GVHD(graft versus host disease、移植片対宿主病)の発生率が高まるため、移植細胞数が制限される。本研究でのモデルは、[Teff] と [Treg]の濃度変動に基づく免疫細胞療法設計の枠組みを指向するものであり、[Treg]の減少と[Teff]の増加とを複数回にわたって繰り返した場合の効果について検討を行った。1)誘導化学療法のみの場合、2)誘導化学療法に続いて[Teff]の瞬時増加のみをn回繰り返し行った場合、3)誘導化学療法に続いて[Treg]の瞬時減少と[Teff]の瞬時増加をn回繰り返し行った場合、以上3つの場合について、誘導化学療法後から700days後における再発が起こらない割合(ratio of relapse free)をシミュレーションによって求めた。n=5の場合、1)36.5±2.7%、2)54.1±1.8%、3)56.7±2.1%であり、本モデルによるシミュレーションの結果と直接の比較できる臨床知見は現時点ではないが、周期的な[Teff]の増加や[Treg]の減少によって2つの吸引域の境界を越えてSSlowに系を到達させる免疫細胞療法プロトコルの設計に本モデルが活用可能であることを示唆している。

5. 総括

本研究では、急性骨髄性白血病の病態進行を説明し、その制御方策の検討に活用可能な新規の速度式モデルを提案した。既存のモデルでは注目されていなかった白血病芽球細胞による制御性T細胞の細胞増殖・分裂のプロセスを組み込んだ。急性骨髄性白血病の臨床知見をうまく説明することができる本モデルを用いて、免疫細胞療法のシミュレーションを行った。本モデルの免疫細胞療法プロトコルの設計に活用できる可能性が示唆された。

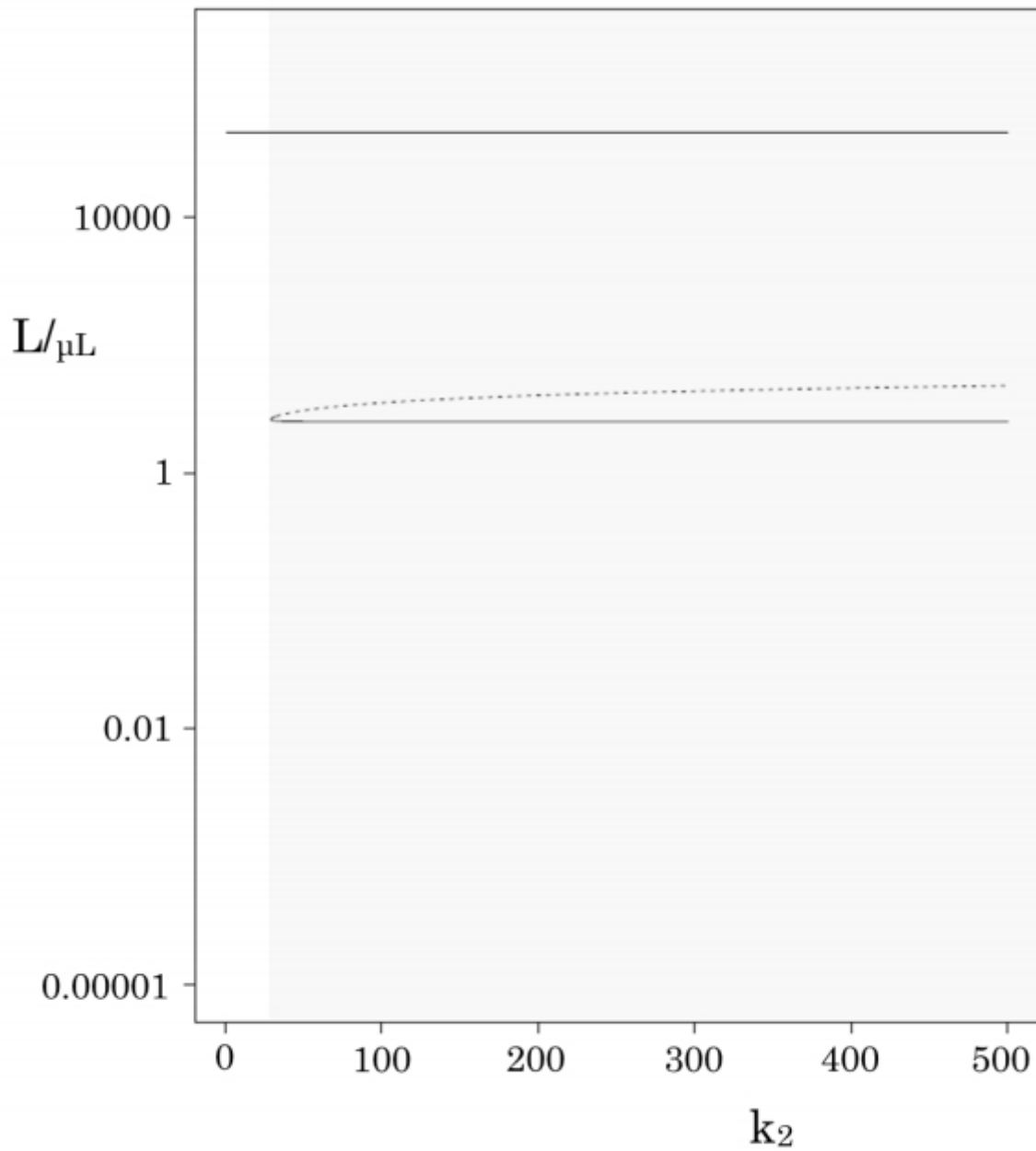


Figure 1. Steady states as a function of the threshold constant k_2 of a) leukemic blast cells (L),
 Steady states along the solid lines are stable and steady states along dashed lines are unstable.
 Parameter ranges characterized by the existence of two stable steady states separated by an unstable
 fixed point are marked by gray backgrounds. Parameter values are $aL=1000$,
 $aTeff=56.53$, $aTreg=198.2$, $dL=0.01$, $dTeff=0.2$, $dTreg=0.04$, $k1=40$, $k3=200$, $p=4$

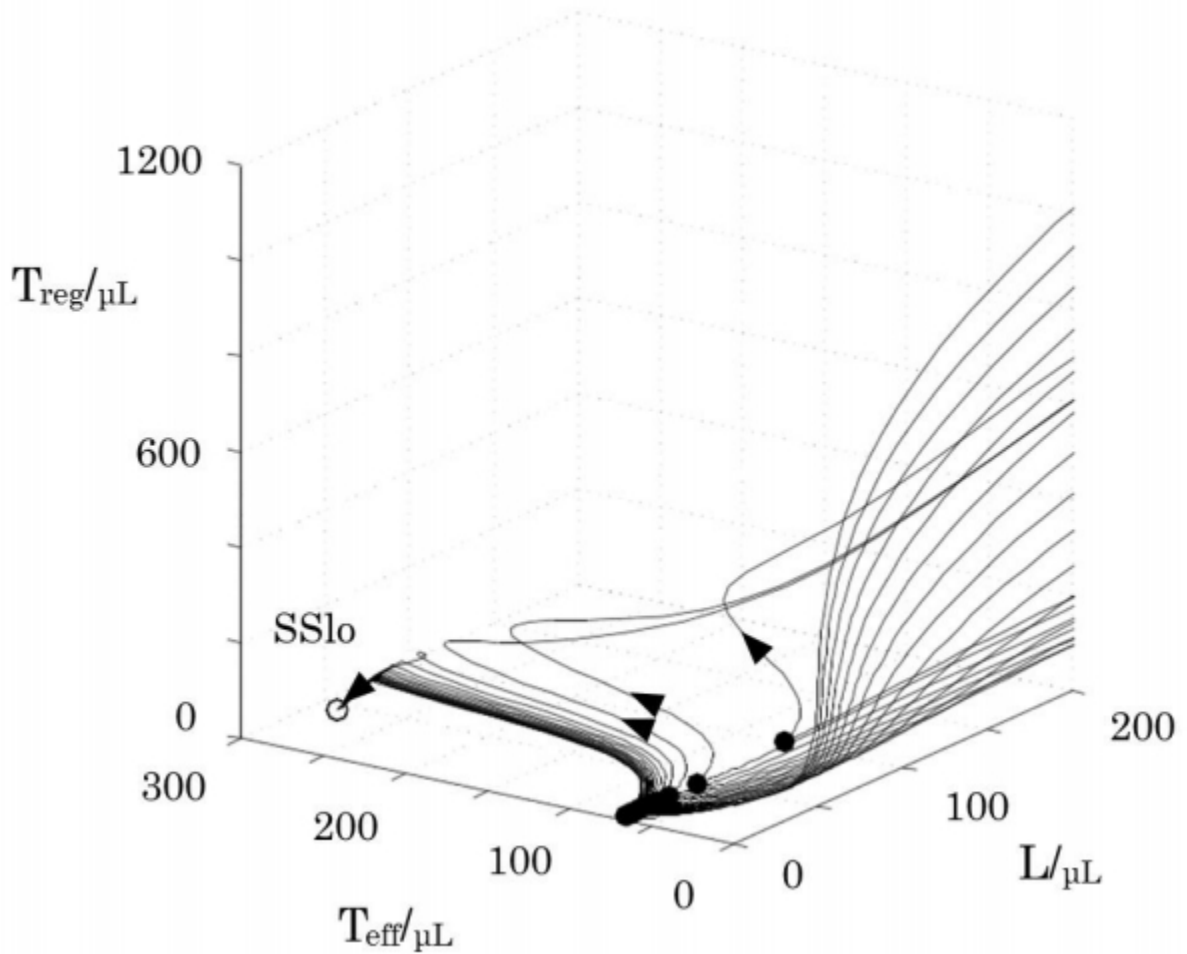


Figure 2. The trajectories from SS_{Shi} (not shown in figure) after chemotherapy with different values of dL . The locations of the state produced by chemotherapy are denoted by closed circles. For higher dL , the trajectories with dL beyond a critical value change direction from returning to SS_{Shi} to converging to SS_{lo}, suggesting two basins of attraction. SS_{Shi} ($[L], [T_{eff}], [T_{reg}] = 100000/\mu\text{L}, 0.00031/\mu\text{L}, 4955/\mu\text{L}$, out of figure) and SS_{lo} ($[L], [T_{eff}], [T_{reg}] = 40/\mu\text{L}, 283/\mu\text{L}, 8/\mu\text{L}$, open circle in figure) were calculated with $dL=0.01$. Other parameter values are $aL=1000, aT_{eff}=56.53, aT_{reg}=198.2, dT_{eff}=0.2, dT_{reg}=0.04, k1=40, k2=160, k3=200, p=4$. For the chemotherapy duration of 10 days, decay rate constants were $dT_{eff}=0.8, dT_{reg}=5.0$ and dL was changed from 1.0 to 20.0.

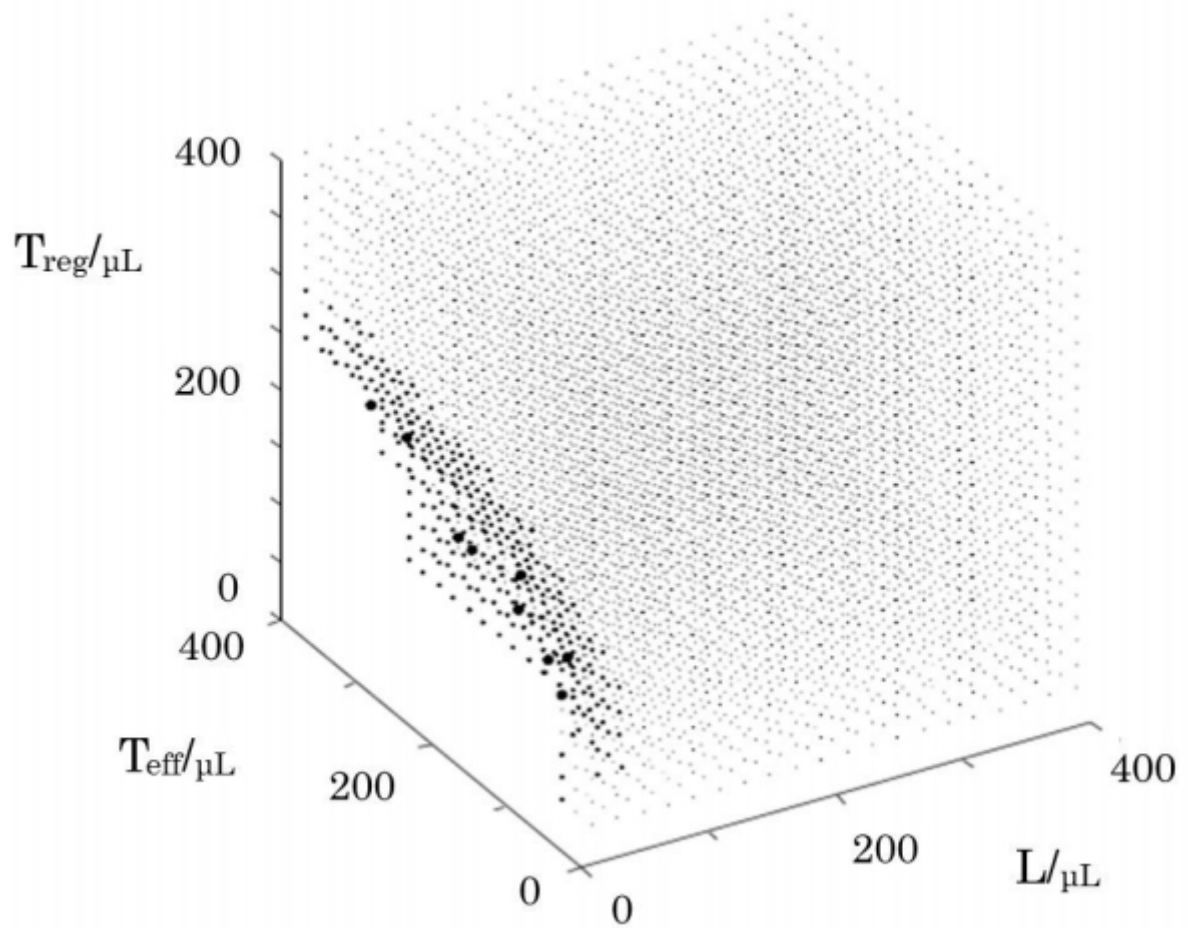


Figure 3. The basin of attraction of SSi. The size of each dot in the basin indicates the time required for the system to arrive at SSi from the state denoted by a dot. It takes longer for the system to arrive at SSi from states distributed along the basin boundary. Parameter values are $aL=1000$, $aTeff=56.53$, $aTreg=198.2$, $dL=0.01$, $dTeff=0.2$, $dTreg=0.04$, $k1=40$, $k2=160$, $k3=200$, $p=4$.

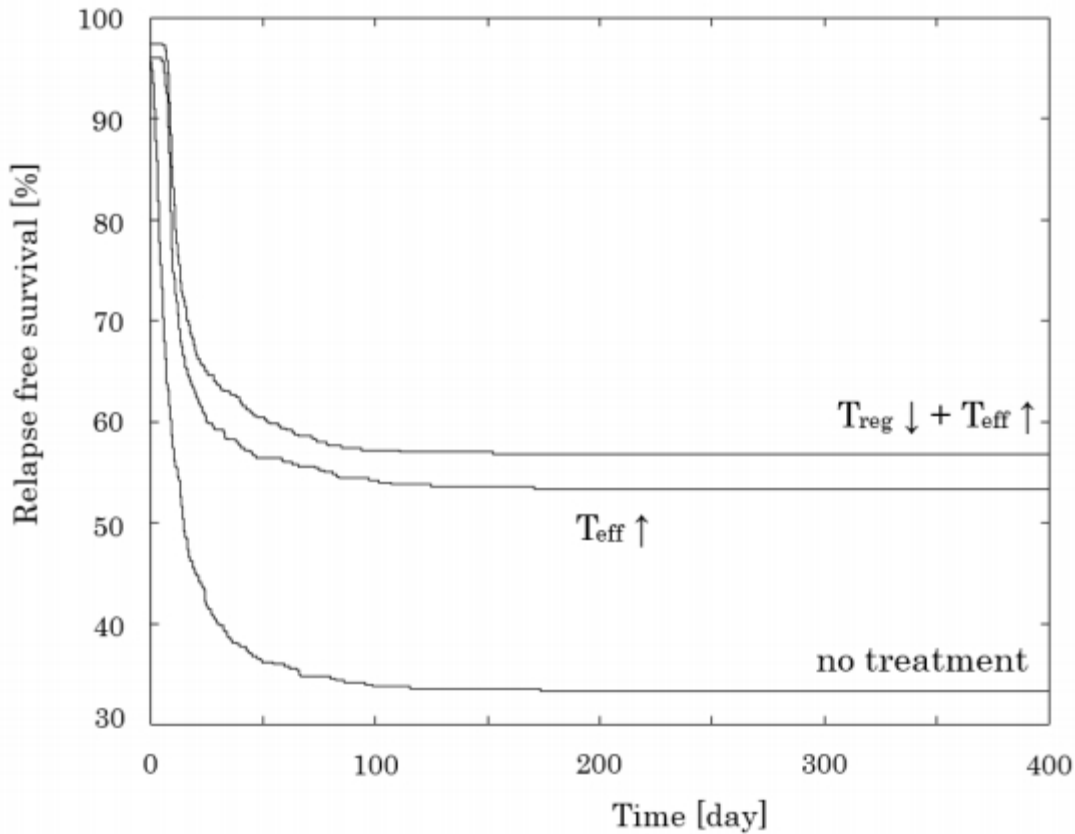


Figure 4. Relapse free survival (RFS) curves in the cases of Teff cells infusion with/without Treg cells depletion and no treatment after chemotherapy. The relapse was defined as the event that the system overrides the threshold of $[L]$ towards SS_{high} from CR states, and the duration of CR as the time from the termination of chemotherapy to the crossing of the threshold. The threshold was set to be $[L]=500/\mu\text{L}$. 500 trajectories from SS_{high} by applying chemotherapy during 30 days were calculated with dL , dT_{eff} , dT_{reg} of the values selected randomly from normal distributions of $N(1.0, 0.33)$, $N(0.75, 0.25)$, $N(5.0, 1.67)$, respectively. Instantaneous $[T_{eff}]$ infusion or $[T_{reg}]$ depletion was applied after 0.0001 days from time point of chemotherapy termination. The instantaneous $[T_{reg}]$ depletion was followed by instantaneous $[T_{eff}]$ infusion with time interval of 0.0002 days. Increment of $[T_{eff}]$ by instantaneous infusion was set to be $200/\mu\text{L}$ and decrement of $[T_{reg}]$ by instantaneous depletion was set to be $100/\mu\text{L}$. Parameter values are $aL=1000$, $aT_{eff}=56.53$, $aT_{reg}=198.2$, $dL=0.01$, $dT_{eff}=0.2$, $dT_{reg}=0.04$, $k1=40$, $k2=160$, $k3=200$, $p=4$. The number of the trajectories without occurring relapse was plotted against the CR duration of the last trajectory with relapse.

平成 30 年 2 月 21 日

学位論文審査報告書（甲）

1. 学位論文題目（外国語の場合は和訳を付けること。）

制御性 T 細胞と白血病細胞との相互作用を考慮した数理モデルによる免疫療法設計

2. 論文提出者 (1) 所 属 数物科学専攻

(2) 氏 名 ^{ふり} ^{がな} にしやま よしあき
西山 義晃

3. 審査結果の要旨（600～650 字）

申請者に対する各審査委員による面接での予備審査を行い、1 月 30 日に行われた口頭発表の審査に基づき、1 月 30 日開催の審査委員会において協議を行った結果、以下の通り判定した。

本論文は、急性骨髄性白血病の病態進行を予測し、免疫細胞療法のプロトコル設計に活用しうる数理モデルの構築を行ったものである。得られた成果は以下の通りである。

1. 急性骨髄性白血病に関する多数の臨床研究知見を精査した上で、白血病芽球細胞による制御性 T 細胞の分化誘導を介したエフェクター T 細胞の活性抑制という間接的免疫抑制機構を初めてモデル化し、広いパラメータ範囲で saddle-node 分岐を経て 2 つの安定な定常状態が出現すること、さらに臨床データに基づき Markov chain Monte Carlo 法を用いてモデルパラメータの推定を行い、2 つの安定定常状態の存在および吸引域境界近傍を通過する解軌道に対応するダイナミクスと急性骨髄性白血病の臨床知見とが整合することを示した。

2. 上記モデルを用いて、臨床で盛んに研究が進められている免疫細胞移植のプロトコルに基づいたモンテカルロシミュレーションを行い、臨床データと直接比較しうる Relapse Free Survival 曲線を求め、臨床知見との定性的な整合を見出した。

以上の成果は、計算論的手法の活用が途上にある臨床医学における数理モデルの有用性を示すものであり、本論文は博士論文に値する。尚、本論文では、細胞分子生物学と分岐理論との接点について解説し、本研究の位置付けについても客観的に評価しており、広い学識を示している。このことから博士の学位授与に値すると判断した。

4. 審査結果 (1) 判 定 (いずれかに○印) ○合 格

(2) 授与学位 博 士 (学術)