

ID No.	1033
研究課題名	マルチカラーフローサイトメトリーを用いた同種造血幹細胞移植後のキメリズム・免疫回復・ATL 微小残存病変評価法の開発
研究代表者	福田 隆浩(国立がん研究センター中央病院・造血幹細胞移植科・科長)
研究組織 受入教員 研究分担者	東條 有伸(東京大学医科学研究所分子療法分野・教授) 井上 明威(熊本大学医学部附属病院・血液内科・医員) 伊藤 歩(国立がん研究センター中央病院・造血幹細胞移植科・医員) 内丸 薫(東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授) 稲本 賢弘(国立がん研究センター中央病院・造血幹細胞移植科・病棟医長) 田中 喬(国立がん研究センター中央病院・造血幹細胞移植科・医員)
研究報告書	<p>①キメリズム解析</p> <p>2019年度は、生着不全が疑われた6例に対して、フローサイトメトリーによるキメリズム解析(HLA-Flow)を施行した。HLA-Flowは、解析結果が検体提出当日(～翌日)に得られるため、迅速な生着不全の予測・診断とその後の治療方針決定が可能であり、臨床的に極めて有用であった。6例のうち5例では、生着不全と診断し別のドナーから再移植を行った。2020年度は、白血病再発が疑われた4例に対して、HLA-Flowを施行した。白血病特異的な表面抗原を持つ細胞集団におけるキメリズム解析により、4例のうち3例では白血病再発と診断できた。うち2例では、全白血球の約1%を占める白血病細胞の抗原発現パターンやHLA半合致移植後の患者特異的HLAアレルの消失(loss of heterozygosity: LOH)を高感度で確認でき、その後の治療方針決定(分子標的薬や再移植の適応についての検討)に有用であった。また、後述するATL微小残存病変(MRD)のモニタリング(③)では、HLA不一致移植を行った一部の症例(16例の計32検体)について、HLA-Flowを施行した。うち、2例の3検体では蛍光標識抗体がワークせずchimerismを判別困難であり、また1例の2検体では一次生着不全を認めた。ドナー白血球の生着が確認できた13例の27検体について、HTLV-1 Analysis System-Flow法(HAS-Flow)のみではATLの再発か否か鑑別困難であった細胞集団が、27検体中15検体では患者由来(ATL細胞)、27検体中12検体ではドナー由来(非ATL細胞)と客観的に判定でき、HLA-FlowがATLのMRDの判定の補助に有用である可能性が示唆された。(学会発表済み・論文作成中)</p> <p>②免疫再構築の評価</p> <p>2019年度は、先行研究(ATLコホート研究 附随研究)に登録され同種移植が行われた50例のう</p>

ち、移植前後で血液検体が採取できた45例について、FoxP3染色を含むマルチカラーフローサイトメトリーを用いて制御性T細胞(Treg)の移植後回復をモニタリングした。ATL症例では、ATL細胞とTregの phenotypeが重複するため(CD25陽性、CD127陰性～弱陽性、FoxP3陽性)、血液中にATL細胞を認める場合にはTregとの鑑別が困難であり、HAS-Flowを用いてATL細胞を除外して、naïve Treg (CD45RA陽性FoxP3弱陽性)とeffector Treg (CD45RA陰性FoxP3強陽性)を定義した。一部の症例では、effector Tregの血液中における回復とともに臨床的に重症GVHDの改善を認め、Tregモニタリングの有用性が示唆された。移植背景毎の比較では、臍帯血では骨髄や末梢血幹細胞と比較して移植後早期のTreg回復が良好な傾向を認めた。

### ③ATL微小残存病変の評価

2019-2020年度は、先行研究(ATLコホート研究 附随研究)に登録され同種移植が行われた50例のうち、移植前にMRDが陽性で移植後に血液検体を採取できた41例について、HAS-Flowキメリズム解析も併用してATLのMRDをモニタリングした。HAS-Flowでは、当初CD7陰性TSLC-1強陽性の分画(N分画)に細胞集団を認めた場合にMRD(HAS-MRD)陽性と定義していたが、一部の症例においてN分画の細胞集団が明瞭な集塊状プロットを呈さない場合に、ATL細胞か否かの鑑別が困難であった。そこでHLA-Flow解析を併用することにより、N分画の細胞集団が患者由来(ATL細胞)かドナー由来(非ATL細胞)かを客観的に判定できた。①に記載した通り、HLA-Flow解析を行った16例32検体の検討から、N分画に集塊状の細胞集団を認める場合をHAS-MRD陽性と定義した。一部の症例では、ATLの血液学的再発に先行してHAS-MRDを検出することができ、ATL移植後再発の早期診断および治療介入に有用である可能性が示唆された。全41例のうち21例は移植後に血液学的再発をきたした(観察期間中央値 994日[601-1,362])。うち12例(57%)では血液学的再発に先行または同時にHAS-MRD陽性が確認できたが、残り9例(43%)ではHAS-MRDは陰性のままであった(リンパ節や皮膚での再発が多く末梢血での再発はいなかった)。移植後4週時点でHAS-MRDが陽性の症例(n=11)は、その後の血液学的再発が有意に多かった(73% vs 44% at 1 year; p=0.016)。多変量解析でも、HAS-MRD陽性は、同種移植後のATL進行/再発 (HR, 3.64; 95% CI, 1.34-9.92; P=0.011)および全生存割合 (HR, 5.61; 95%CI, 1.99-15.8; P=0.001)について有意な予後不良因子であった。(学会発表済み・論文作成中)