

No.	22-1083	
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・科長）	
研究組織	受入教員	南谷 泰仁（東京大学医科学研究所・教授）
	分担者	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）
	分担者	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・医長）
	分担者	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）
	分担者	井上明威（熊本大学医学部附属病院・血液内科・医員）
	分担者	内丸薫（東京大学大学院新領域創成科学研究科・病態医療科学分野・教授）
	分担者	山岸誠（東京大学大学院新領域創成科学研究科・病態医療科学分野・准教授）
	分担者	南谷 泰仁（東京大学医科学研究所・造血病態制御学分野・教授）

**東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書（年次終了・研究完了）【国内】**

共同研究報告（年次終了）

本研究の目的は、マルチカラーフローサイトメトリー（FCM）を用い、造血器疾患に対する同種造血幹細胞移植（同種移植）後早期の①キメリズム、②免疫再構築、③ATL微小残存病変（MRD）の評価法を確立することである。

2022年度は、2例の臨床検体のMRD解析と、HAS解析パネルにおける標識マーカーの拡充、国立がん研究センター中央病院（NCCH）血液検査室におけるFCMによるMRD解析系（ヒトT細胞白血病ウイルス1型[HTLV-1] analysis system: HAS）の立ち上げを東大医科研臨床フローサイトメトリーラボと共同で行った。

【臨床検体の解析-1】

61歳女性。急性型成人T細胞白血病リンパ腫（ATL）に対して、2021年4月より東京大学医科学研究所（IMSUT）附属病院 血液腫瘍内科にて多剤併用化学療法を実施後、2021年7月にNCCH 造血幹細胞移植科にて非血縁者間末梢血幹細胞移植を行った（IMSUT-NCCの連携診療例）。移植後MRDモニタリングとして、血液検体を用いたHAS解析を行っていたところ、2021年11月（移植後4ヶ月）に陽性化を認めた（HASにてCD4陽性CD7陰性CADM-1陽性[N]分画に細胞集団を検出した）。同細胞集団がATL細胞であることの確証を得るために、HASでソーティングしたCADM-1陽性細胞のターゲットシーケンス（山岸・鈴木・内丸らのグループが、ATLの発症に関わる50遺伝子を含む280のがん関連遺伝子とHTLV-1プロウイルス全長に対するプローブを搭載したATL/HTLV-1パネルを作成し、高深度ターゲットシーケンスプラットフォームを構築したもの[文献1]）を行ったところ、診断時（移植前）と同様の遺伝子発現パターンを認めた（Type II defective virusを12番染色体にもち、TP53遺伝子のhomozygous lossやPLCG1遺伝子変異等をもつ、monoclonalな細胞集団）。以上から、ATL再発と診断し、救援化学療法（mogamulizumab）にて血液中のMRD消失が得られた。2022年6月（移植後11ヶ月）に、血液中のHAS-MRDが再度陽性化。同年8月にかけてMRDが顕在化したため、再度同様のターゲットシーケンスを行ったところ、CD7陰性CADM-1陽性（N）分画に診断時と同様のクローンを認めると共に、CD7陽性CADM-1陽性（D）およびCD7陰性CADM-1陽性（N）分画にドナー由来新規感染細胞が疑われるpolyclonalな細胞集団を認めた。以上から、ATL再発と診断し、救援化学療法（mogamulizumab）を開始した。本例では、移植後MRDモニタリングとしてHASを行い、さらにターゲットシーケンスを併用することで、予後不良なATL移植後再発を早期に高精度で検出でき、早期治療につなげることができた。

文献1：

Yamagishi M, Kubokawa M, Kuze Y, et al. Chronological genome and single-cell transcriptome integration characterizes the evolutionary process of adult T cell leukemia-lymphoma. *Nat Commun.* 2021;12(1):4821.

【臨床検体の解析-2】

70歳女性。2022年1月にHTLV-1キャリアから急性転化した急性型ATLに対して、2022年2月よりIMSUT附属病院 血液腫瘍内科にて多剤併用化学療法を実施後、2022年5月にNCCH 造血幹細胞移植科にて血縁者間末梢血幹細胞移植を行った（IMSUT-NCCの連携診療例）。移植後に初回完全奏効が得られたが、病勢指標である可用性IL-2レセプター（sIL-2R）が持続高値であったため、2022年7月よりtucidinostatによる維持療法を開始した。2022年11月17日にsIL-2Rの上昇、腹腔内・右外腸骨リンパ節腫脹をきたした。11月22日に右外腸骨リンパ節生検にてATL再発と診断。組織学的にATL細胞の一部（10%）がCD30陽性であった。11月24日にHAS解析を実施。CD30標識抗体も併用し、ATLと疑われる細胞の一部（約30%）がCD30陽性であることを確認した。11月25日に救援化学療法として（抗CD30抗体と微小管阻害薬の結合した分子標的薬である）brentuximab vedotinを投与した。本例では、移植後再発をきたしたATLが治療標的となるCD30を発現しているか否かについて、リンパ節標本の免疫染色におけるCD30陽性判定基準が必ずしも確立されていないため、血液検体のHAS解析を併用してCD30陽性を確認し、救援化学療法の決定につなげることができた。

【HAS解析パネルにおける標識マーカーの拡充】

HASにおけるATL細胞の典型的な抗原発現パターンは、CD3弱陽性CD4陽性CD7陰性CADM-1陽性である。しかし、移植例を含む一部の症例では、典型的な抗原発現パターンを呈さないために、ATL細胞集団であるかどうかの判定が困難なケースがある。そこで、HASの解析パネルに、ATL細胞で通常陽性となるCD25およびCCR4の標識抗体を組み込むことで、ATL細胞の検出能の

向上を試みた。CD25およびCCR4を標識する複数の抗体試薬を用いて5例の患者検体を元に基礎検討を行い、既存のHASパネル（CD3/CD4/CD7/CADM-1）にCD25およびCCR4を追加した解析系を確立した。これにより、ATL細胞の同定およびATL細胞におけるCD25とCCR4の発現の程度を同時に評価することが可能となった。今後、移植後のMRD解析における有用性について検証していきたい。

【NCCH 血液検査室におけるHASの立ち上げ】

NCCH 造血幹細胞移植科では、IMSUT-NCC連携診療例を中心に、アグレッシブATLに対する同種移植を積極的に行っている（年間10-15例）。HASによる移植後MRDモニタリングの有用性を効率的に検証するため、IMSUT臨床フローサイトメトリーラボ（FACSコアラボラトリー）と共同で、NCCH血液検査室にHASを導入した。IMSUTのHASパネル（12カラー）を参考に、NCCH（8カラー）では蛍光標識抗体を選別し（CD3, CD4, CD7, CD45, CD45RA, CADM-1, CCR4, FoxP3）、また検査室の業務キャパシティの問題からCADM-1はPEを用いた一次標識とした（IMSUTではより高感度なビオチン/ストレプトアビジンを用いた二次標識を行っている）。サンプル調製、測定細胞数、ゲーティングストラテジーについても、IMSUTのアドバイスを元にNCCHのプロトコルを作成した。ATL患者の血液検体を用い、ATL細胞が検出可能であることを確認した。2022年度（2022/4/01～2023/3/31）は、36症例117検体の移植後HAS解析を行い、うち6例では移植後MRDが検出され早期治療介入につなげることができた。

2023年度以降も、ATLのMRDモニタリングだけでなく、移植後早期のキメラリズムや免疫再構築を評価する臨床検体解析を継続する。