

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17869

研究課題名（和文）進行期造血器腫瘍に対するHLA不適合移植後予防的ドナーリンパ球輸注による再発予防

研究課題名（英文）Prophylactic donor lymphocyte infusion (DLI) after HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation for advanced hematological malignancy

研究代表者

賀古 真一（KAKO, SHINICHI）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90458274

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アテムツズマブを用いたハプロ移植後の治療成績向上に対する取り組みとして、ハプロ移植後の地固め療法としてドナーリンパ球輸注(DLI)を行う研究とハプロ移植後再発時に腫瘍細胞のHLAハプロタイプの同定を行う研究を行った。前者は当初非寛解期移植患者のみを対象としたが、ハプロ移植症例の後方視的解析を行い、移植時血液学的寛解であるが微小残存病変陽性の患者こそDLIによる再発予防が有効性を発揮できると判断され、プロトコル改定を行い現在も研究を遂行中である。腫瘍細胞のHLAハプロタイプの同定については検査方法を確立することができた。こちらもその後の治療経過への影響も検討するために現在も症例蓄積中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハプロ移植の施行数は増加している。ハプロ移植の方法としてはドナー造血幹細胞輸注後に大量シクロホスファミドを投与するPTCY法が最も行われている。しかしこの方法では輸注後のサイトカイン放出症候群や心毒性の問題がある。アテムツズマブを移植前処置に用いる我々のハプロ移植ではこのような問題は生じない。しかし免疫抑制効果が高い分、再発リスクが高いことが問題となる。その問題を克服するための研究を施行し、まだ現在進行形ではあるが今後の研究の柱となるプロトコルや検査方法を確立した。さらに症例数を増やして有効性を示すことにより、安全で再発率も少ないハプロ移植方法の確立につながると考えている。

研究成果の概要（英文）：To improve the outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from haploidentical donor (haplo-HSCT) using alemtuzumab, we performed the consolidative donor lymphocyte infusion (DLI) after haplo-HSCT and the identification of HLA haplotype of tumor cells at relapse after haplo-HSCT. In the former study, consolidative DLI was performed for the patients who underwent haplo-HSCT in non-remission, at first. However, through the retrospective study regarding haplo-HSCT, the consolidative DLI was considered to be most effective for the patients who underwent haplo-HSCT in hematological remission but the positive status of minimal residual disease. We changed the protocol, and are still continuing the study. In the latter study, we established the way of the identification of HLA haplotype of tumor cells. This study is also still continuing to evaluate the influence of the result on the treatment course after relapse.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：進行期造血器腫瘍 ハプロ移植 ドナーリンパ球輸注 ハプロタイプ

1. 研究開始当初の背景

進行期造血器腫瘍において、同種造血幹細胞移植が治癒を目指せる唯一の治療方法となる。特にハプロアイデンティカルドナーからの HLA 不適合移植(ハプロ移植)は、HLA 不適合からくる強力な抗腫瘍効果により有効な治療法となり得ると考えられていた。ただし重篤な移植片対宿主病(GVHD)の発症頻度が高くなる可能性があり、それを抑制するための移植方法の工夫が必要とされている。我々は抗 CD52 モノクローナル抗体であるアレムツズマブを用いてハプロ移植を行ってきた(Kanda et al. Am J Hematol 2013;88:294-300)。アレムツズマブは半減期の長い薬剤であり、移植前処置として投与することでドナーとレシピエント双方のリンパ球を強力に抑制し、ハプロ移植を可能としてきた。しかし非寛解期移植や同種移植後再発などの高リスク移植においては再発率が高く、我々はアレムツズマブの用量をできるだけ低用量とし、重篤な GVHD の発症を認めない範囲で抗腫瘍効果を最大限発揮できるように試みてきた(Kako et al. Eur J Haematol. 2019;102:256-264)。さらに移植後 GVHD 予防のシクロスポリン、メトトレキサートの減量にも前向き臨床研究として取り組んでいた(UMIN000018283, UMIN000018298)。しかし高リスク移植における再発率を思うように下げることができなかった。

ドナーリンパ球輸注(DLI)はドナーのリンパ球を移植後に患者に投与することで、混合キメラの改善、原病の再発に対する抗腫瘍強化の強化などを目指す治療方法である。ハプロ移植後の DLI については輸注 CD3 陽性リンパ球数、タイミングなどについて確立した方法はないが、我々はハプロ移植後再発に対する DLI の経験を多く有していた(賀古真一ほか、第 80 回日本血液学会学術集会 口演 2018)。この検討ではレシピエント由来の腫瘍細胞などが微小残存病変(MRD)レベルで残存しているような状況では有効性が期待できるが、明らかな血液学的再発の状況では効果が得られにくいことが示されていた。一方で、移植後早期の予防的/地固め療法的 DLI 施行が高リスク進行期白血病患者の再発を予防し、予後を改善するという報告があり(Yan et al. Biol Blood Marrow Transplant, 2017;23:1311-1319)、抗腫瘍免疫の強いハプロ移植後ではより有効である可能性が考えられた。

なお、実際にハプロ移植後再発が認められた場合、再発時の腫瘍細胞を分析してみると、ハプロアイデンティカルドナーにとって攻撃対象となり得る不適合の HLA が消失している症例があることが知られてきた(Vago et al. N Engl J Med 2009;361:478-88, Villalobos et al. Blood 2010;115:3158-3161)。この場合には腫瘍細胞においてドナーと共有している HLA ハプロタイプがホモ接合している状態となっており、DLI の効果はあまり期待できない。残存している HLA を有さない初回とは別のハプロアイデンティカルドナーから再移植を行うことが有効な治療方法となる可能性がある。再発時に腫瘍細胞の持つハプロタイプを同定し、それに基づいて移植後の治療として DLI を行うべきか、残存しているハプロタイプを攻撃対象とできるような新たなドナーを選択しての再移植を行うべきかを選択して治療を進めていく臨床的検討が必要と考えられた。

2. 研究の目的

ハプロ移植は施行数が増加しているが、ドナー造血幹細胞輸注後に大量シクロホスファミドを投与する PTCY 法が最も行われている。しかしこの方法では輸注後のサイトカイン放出症候群や心毒性の問題がある。アレムツズマブを移植前処置に用いる我々のハプロ移植ではこのような問題は生じないこと、重症 GVHD 発症頻度が低いことから、安全なハプロ移植が施行できる方法と考えている。よってアレムツズマブを用いたハプロ移植において、再発率の低下、また再発をしてしまった場合でもその後の治療選択を適切に行うことで治療成績を向上させ、この治療方法を確立させることを目的とした。

3. 研究の方法

研究は(1) ハプロ移植後予防的/地固め療法的 DLI についての検討、(2) 再発時腫瘍細胞のハプロタイプ分析の 2 つからなる。

(1) ハプロ移植後予防的/地固め療法的 DLI についての検討

アレムツズマブを用いたハプロ移植後、30 日を目安に骨髓検査を施行する。MRD マーカーが存在する場合には提出する。悪性リンパ腫患者などでは CT などによる評価も行う。血液学的寛解が得られ、その他 Grade 2 以上の GVHD がないなどの適格基準を満たしていれば研究参加が可能と判断する。(この時点で血液学的に非寛解であれば DLI を行っても治療効果は限定的であるため適格外とする。)移植後 45-60 日を目安に初回 DLI を行う。輸注 CD3 陽性細胞数は $1 \times 10^5/\text{kg}$ とする。初回 DLI 後 30 日を目安に骨髓検査を再度行い、原病の評価を行う。Grade 2 以上の GVHD(DLI 後の GVHD は急性 GVHD として評価する)など研究の除外基準となるような全身状態でないことを確認の上、30 日程度の間隔を空けて DLI の再試行を考慮して良いが、研究としての規定はしない。輸注する CD3 陽性細胞数は $5 \times 10^5/\text{kg}$ 、 $1 \times 10^6/\text{kg}$ というように段階的に増やしても良い。原疾患の明らかな増悪がなければ、初回 DLI を起点として 30 日ごとを目安に評価を続ける。なお対象患者については研究開始時、ハプロ移植時血液学的非寛解期の造血器腫瘍患者の

みを対象としていたが、2023 年に対象患者としてハプロ移植時血液学的寛解期だが MRD 陽性の細胞遺伝学的/分子生物学的非寛解期造血器腫瘍患者も含めるようにプロトコルを改定した。

(2) 再発時腫瘍細胞のハプロタイプ分析

ハプロ移植後に血液学的再発が疑われた場合には腫瘍細胞の HLA を同定するため、患者より腫瘍細胞を含む骨髓液、もしくは末梢血を採取し、単核球分離を行う。その上でフローサイトメトリーを用いて、腫瘍細胞特異的な表面抗原で染色した後、セルソーター(FACS AriaII)を用いて腫瘍細胞のみの分離を行う。その後、腫瘍細胞より DNA を抽出するが、必要に応じてゲノム DNA の増幅を行う。HLA 同定は外注検査にて行う。なお、腫瘍細胞 HLA がもとの患者 HLA から変化がない場合には、その後の治療として DLI や同ドナーからの再移植を考慮する。腫瘍細胞がドナーにとって攻撃対象となり得る不適合の HLA を消失していることが判明した場合には、残存しているハプロタイプを攻撃対象とできるような新たなドナーを選択しての再移植を積極的に考慮する。

4. 研究成果

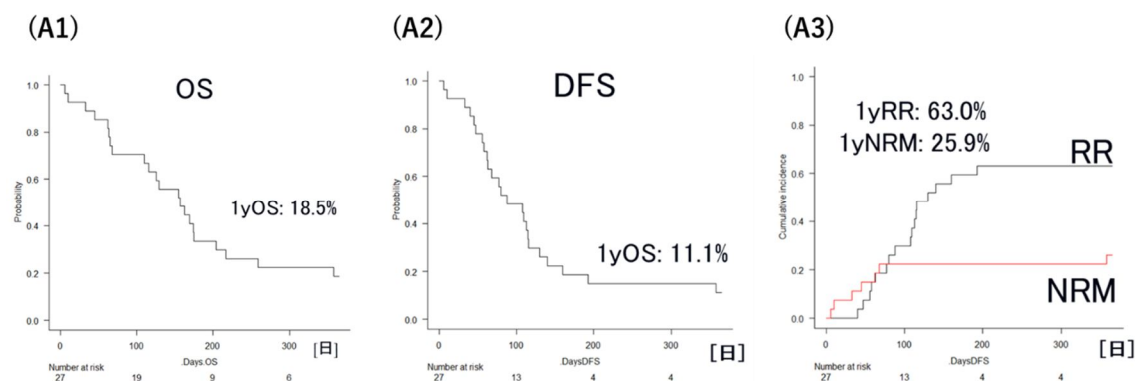
研究開始と同時期に臨床研究法が施行され、当時アレムツズマブは移植前処置の保険適用を有していなかったため、アレムツズマブを用いたハプロ移植そのものを通常の臨床研究として行っていた(UMIN000018283, UMIN000018298)ところから特定臨床研究(jRCTs031180238, jRCTs031180237)に切り替える必要があった。この手続きに時間を要してしまい、ハプロ移植後予防的/地固め療法的 DLI の研究開始が遅れてしまった。2020 年 12 月からはアレムツズマブの移植前処置への適応拡大が承認され、通常臨床としてアレムツズマブを用いたハプロ移植が行えるようになってきている。

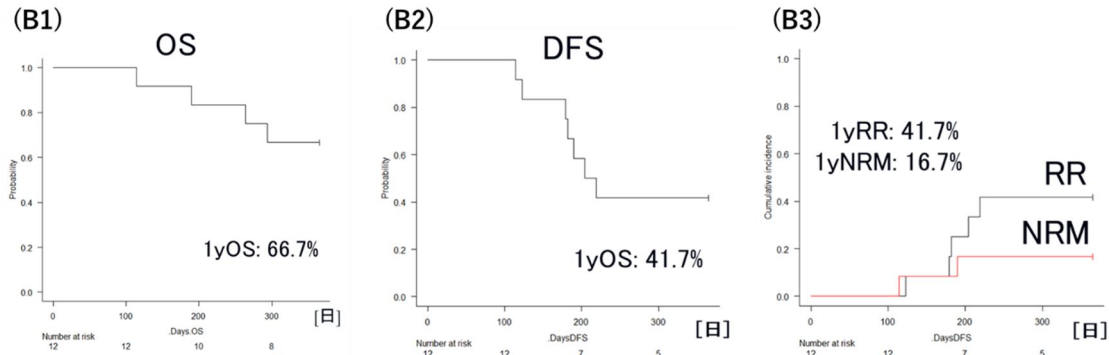
また造血器腫瘍の治療方法は近年格段の進歩を遂げている。例えば急性骨髄性白血病(AML)ではこれまで以上に詳細な遺伝子解析のもとリスク分類の細分化が進み、移植が考慮される患者が限定的となってきた。また急性リンパ性白血病(ALL)では微小残存病変に基づく移植適応の評価が進み、やはり移植が考慮される患者が限定的となってきた。さらに AML, ALL とともに新たな分子標的薬の出現で通常化学療法による治療成績が向上する一方で、移植が必要とされる患者 d では治療抵抗性の度合いが非常に強いことが多くなってきた。そのため今回の研究で主な対象と考えていた移植後再発高リスクの患者はこれまで以上に高度治療抵抗性であり、そのことが研究の大きな妨げとなってしまった。

(1) ハプロ移植後予防的/地固め療法的 DLI についての検討(UMIN000043766)

ハプロ移植時血液学的非寛解期の造血器腫瘍患者を対象として研究を開始した。しかし前述のような理由で移植後予防的に DLI を施行する前に血液学的非寛解が確認されてしまう症例が予想より多く、症例登録が進まなかった。そこであらためて標準リスク(移植時芽球 20%未満の骨髓異形成症候群患者を含む)患者、高リスク(移植時非寛解期、同種移植後再発)患者ごとのアレムツズマブを用いたハプロ移植の成績を後方視的に検討した(賀古真一ほか、第 83 回日本血液学会学術集会 口演 2021)。生着は良好で、重症 GVHD 発症率は低かったが、高リスク患者の早期からの再発率が高く、無病生存率は非常に悪かった(図 1(A1-3))。また標準リスク患者の治

図 1

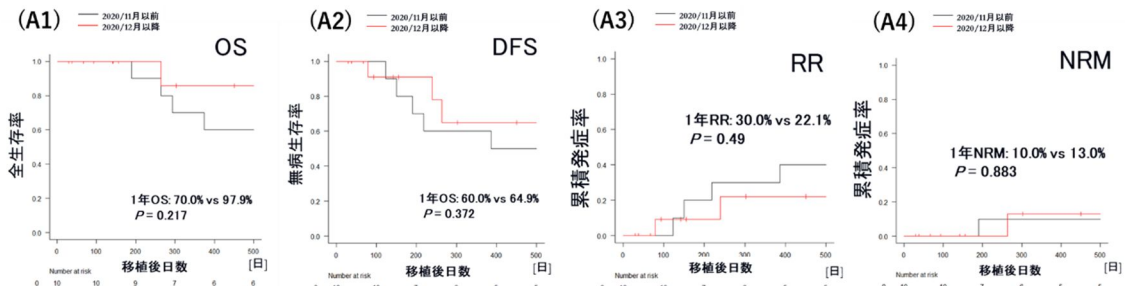




高リスク患者の全生存率(OS) (A1), 無病生存率(DFS) (A2)、再発率(RR)ならびに非再発死亡率(NRM) (A3)と標準リスク患者の OS(B1), DFS(B2), RRならびに NRM(B3)

療成績も十分とは言えなかった(図 2(B1-3))。この結果より移植時非寛解期高リスク患者では早期の疾患コントロールが不十分であるため、予防的/地固め療法的 DLI による再発予防は現在の移植適応疾患に対しては有効な手段となりづらいことが判明した。また登録して DLI を施行した患者もその後、再発をしている。一方で標準リスク患者の治療成績も十分とは言えなかったが、こちらについては移植後 GVHD 予防の修正などを加えつつ、更なる検討が必要と考えられた。そこで標準リスク患者では移植後 GVHD 予防におけるシクロスポリンの早期減量と、メトトレキサート投与量の減量を 2020 年 12 月から行い、これらを後方視的に検討した(賀古真一ほか、第 85 回日本血液学会学術集会 口演 2023)。移植後 GVHD 予防法変更による生着、GVHD 発症率への影響はなく、治療成績は解析時点では同等であったが、長期成績の改善に期待が持てるものであった(図 2(A1-4))。ただし標準リスク患者にて移植時血液学的寛解例のみであるが、MRD 陽性の場

図 2



移植後 GVHD 予防法変更前後での標準リスク患者の治療成績の変化 全生存率(OS) (A1), 無病生存率(DFS) (A2)、再発率(RR) (A3)ならびに非再発死亡率(NRM) (A4)

合に再発が多い傾向があることが判明した。そこでハプロ移植後予防的/地固め療法的 DLI の対象者を 2023 年よりハプロ移植時血液学的寛解期だが MRD 陽性の細胞遺伝学的/分子生物学的非寛解期造血器腫瘍患者も含めるようにプロトコル改定を行い、現在も研究を継続中である。登録症例数は増えている。

なおアテムツズマブを前処置に用いた移植の有効性については、再生不良性貧血患者を対象を限定した解析も行った(賀古真一ほか、第 46 回日本造血・免疫細胞療法学会総会 口演 2024)。これらの研究に基づき、アテムツズマブを用いたハプロ移植に関連する複数の総説発表や学会発表を行ったほか、日本造血・免疫細胞療法学会の HLA 不適合血縁者間移植ガイドライン(第 3 版)作成に執筆者として加わった。さらに移植後 DLI を含めた移植後治療について論文共著者となったほか、総説をまとめた。予定していた研究の完遂はできていないが、現状に応じた修正をした上で継続することができており、アテムツズマブを用いたハプロ移植の標準化に向けた総合的な研究を進めることができています。

(2) 再発時腫瘍細胞のハプロタイプ分析

既存検体を用いて再発時腫瘍細胞のハプロタイプ分析が計画通りに行うことができるかの検討を行い、方法の妥当性を確認した。しかし前述のように移植後早期で HLA の一方のハプロタイプが消失するには早すぎると思われるタイミングでの再発が多く、実際に分析を行った患者は 2 名にとどまった。どちらも腫瘍細胞における不適合 HLA ハプロタイプの消失は認められず、1 人

で治療目的のDLIを施行した。(もう1人はDLI施行前の化学療法反応性が不良であり、DLIでの疾患コントロールは困難と判断して行わなかった。)現在も研究継続中である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Harada Kaito, Mizuno Shohei, Yano Shingo, Takami Akiyoshi, Ishii Hiroto, Ikegame Kazuhiro, Najima Yuho, Kako Shinichi, Ashida Takashi, Shiratori Souichi, Ota Shuichi, Onizuka Makoto, Fukushima Kentaro, Fukuda Takahiro, Ichinohe Tatsuo, Atsuta Yoshiko, Yanada Masamitsu	4. 巻 101
2. 論文標題 Donor lymphocyte infusion after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 643 ~ 653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-021-04731-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 賀古 真一	4. 巻 10
2. 論文標題 アレルツズマブを用いたハプロアイデンティカルドナーからのHLA不適合移植	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本造血細胞移植学会雑誌	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kako Shinichi	4. 巻 118
2. 論文標題 Prophylactic or pre-emptive therapies to prevent relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 155 ~ 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-023-03631-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 賀古 真一
2. 発表標題 Decreasing GVHD in HLA -mismatched transplantation from haploidentical donor
3. 学会等名 The 12th JSH International Symposium 2021 in Kamakura (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 賀古 真一、藤原 慎一郎、三崎 柚季子、吉村 一樹、松見 信平、後明 晃由美、玉置 雅治、亀田 和明、和田 英則、木村 俊一、仲宗根 秀樹、伊藤 祥子、海野 健斗、皆方 大佑、中野 裕史、山崎 諒子、蘆澤 正弘、畑野 かおる、佐藤 一也、神田 善伸
2. 発表標題 疾患リスクを考慮した低用量アレムツズマブを用いたHLA不適合ハプロアイデンティカル移植
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichi Kako
2. 発表標題 Haploidentical transplantation using alemtuzumab
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 賀古真一、藤原慎一郎、中村侑平、河村匡捷、川村俊人、竹下絢子、吉野望、吉村一樹、三崎柚季子、松見信平、後明晃由美、玉置雅治、楠田待子、木村俊一、大山貴司、小山竣介、村橋類、中島広大、兵頭和樹、戸田由美子、伊藤祥子、皆方大佑、森田薫、蘆澤正弘、山本千裕、畑野かおる、佐藤一也、大嶺謙、仲宗根秀樹、神田善伸
2. 発表標題 標準リスク造血器疾患に対する低用量アレムツズマブを用いたHLA不適合ハプロアイデンティカル移植
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 賀古 真一、藤原 慎一郎、松岡 あかり、石川 拓斗、米野 友啓、中村 侑平、河村 匡捷、川村 俊人、竹下 絢子、吉野 望、三崎 柚季子、後明 晃由美、楠田 待子、木村 俊一、永山 隆史、海野 健斗、皆方 大佑、森田 薫、蘆澤 正弘、山本 千裕、畑野 かおる、佐藤 一也、大嶺 謙、仲宗根 秀樹、神田 善伸
2. 発表標題 低用量アレムツズマブを前処置に用いた再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植
3. 学会等名 第46 回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 福井 次矢、高木 誠、小室 一成 (賀古真一)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2224
3. 書名 今日の治療指針 2022年版 [ポケット判] 10 血液疾患、造血幹細胞移植 (適応と方法)	

1. 著者名 松村到、張替秀郎、神田善伸 (賀古真一)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 342
3. 書名 血液疾患最新の治療2023-2025 V造血幹細胞移植 4. HLA半合致移植	

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本造血・免疫細胞療法学会 ガイドライン HLA不適合血縁者間移植 (第3版) (2023年12月25日発行)において、"IV. アレムツズマブを用いたハプロ移植" (8-10ページ)を執筆した。
--

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------