

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08376

研究課題名(和文) 複数回の造血幹細胞移植後にもかかわらず再発した白血病細胞の免疫回避機構の解明

研究課題名(英文) Immune-escape mechanism of relapsed leukemic cells after multiple transplantation

研究代表者

池亀 和博 (Ikegame, Kazuhiro)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：20372609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHLA不適合移植後の再発白血病において、両方のHLAを消失することがあるか、またそうでなければ両HLA不適合移植の優位性が示せるのではないかと、この命題からin vitro実験と臨床試験遂行を計画した。折しもコロナ禍で前者の円滑な解析が困難となり、後者に集中した。両HLA不適合移植は両方のHLAを同時に標的とした移植であり、その再発白血病のHLA発現をみれば前者の解答にもなるからである。両HLA不適合移植の概要では、30症例中、早期死亡の1例を除いて全例で生着し、重度の急性GVHD発症率は16.7%、移植1年後の生存率は30.1%、再発率は38.9%、非再発死亡率は44.3%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA半合致移植は急速に普及してきたが、標的となるHLAを消失して白血病が再発することが知られている。では残ったHLAを標的とする再移植をすれば、両方のHLAを落とすのだろうか。HLA消失機序の解析によれば、一方は落とせても両方は無理なことが予想される。もしそうなら、両方のHLAを標的とする移植を行えば、HLA消失による再発は克服できる。我々は両方のHLAが異なる移植(両HLAハプロタイプ不適合移植)の臨床試験を行い、これが実際に可能であることを示した。これによって、もはやHLAの制約から移植を断念する必要はなくなり、再移植でしか助からない症例に、更なる移植の機会を提供することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We planned in vitro assays and a clinical trial concerning the theses that both HLA haplotypes could be lost after HLA-mismatched transplantations, and if not, 2-HLA-haplotype mismatched transplantation may be beneficial. Since the Corona pandemic led to difficulty in smoothly performing the in vitro assays, we focused on the clinical trial of 2-HLA-haplotype mismatched transplantation.

2-HLA-haplotype mismatched transplantation targets both HLA haplotypes at once, and the analyses of the relapsed leukemic cells after this type of transplantation may be a clue to the former question. In the clinical trial of 2-HLA-haplotype mismatched transplantation, all 30 cases except a case of early death achieved engraftment. The incidence of severe acute GVHD was 16.7%, and the rates of one-year overall survival, relapse, and non-relapse mortality were 30.1%, 38.9%, and 44.3%, respectively.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：HLA不適合造血幹細胞移植 白血病 再発 GVHD

1. 研究開始当初の背景

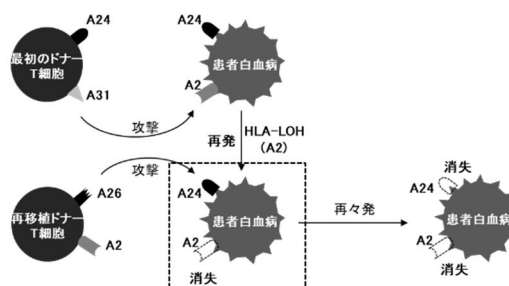
(1) 血縁HLA半合致ドナーからの造血幹細胞移植 (HLA半合致移植) の普及とHLA-LOHによる再発

2本のHLAハプロタイプのうち、1本を共有し、もう一方が異なる血縁ドナーからの移植 (HLA半合致移植) は、いつでも家族内にドナーを見つけられる移植ソースとして普及しつつある。我々はパイオニアグループとしてHLA半合致移植を700例以上施行し、その安全性と有用性を示してきた (Ikegame K, et al. Biol Bone Marrow Transplant. 2015;21:1495-505、他関連論文40編)。このHLA半合致移植では、患者のみがもつ方のHLAを標的抗原として、強力な免疫学的抗腫瘍効果 (GVL効果) を発揮すると考えられるが、それでもある頻度で移植後再発が起こることは避けられない。そして再発後の白血病細胞を調べてみると、標的となる方のHLAハプロタイプを落としている (HLA-LOH) 例が存在することが示された (Vago L et al. . N Engl J Med. 2009;361:478-88)。研究分担者の小川らは造血幹細胞移植後のHLA-LOHの機序として、HLA遺伝子の uniparental disomy (UPD) が起こっていることを報告した (Villalobos, Ogawa S, et al. BLOOD. 2010;115:3158-61)。

(2) 一方のHLAハプロタイプ発現が落ちてしまった白血病に対して、残りのHLAを標的とする移植をすると、両方のHLAを消失した“のっぺらぼう”の白血病細胞になるのだろうか。

UPDとは一方の遺伝子を鋳型として、もう一方の遺伝子も同じものにする機序を指す。もしHLA-LOHの機序がすべてUPDであるなら、一方のHLAハプロタイプの発現を落とすことはできるが、両方のHLA発現を消失することはできないはずである。もし両方の、すなわちすべてのHLAを欠失した細胞を得ることができれば、その分子機序を明らかにしたいと考えた (図1)。

図1 HLA-LOHをきたした白血病に対して、残ったHLAを標的とした移植をすると、両方のHLAを落とすことはあるのか？



(3) 両HLAハプロタイプ不適合移植の試み

仮に、一方のHLAは落とすことができても両方のHLAを落とすことはできないという説の方が正しければ、両方のHLAハプロタイプとも不適合のドナーから移植を行えば、HLA-LOHによる再発は克服できることになる。そして実臨床においては、同種移植後再発でHLA半合致ドナーも見つからないとき、HLAの制約を考えずにドナーを選択することができれば、患者に新たな再移植のチャンスを提供できるという明確なメリットがある。本研究では、両HLAハプロタイプ不適合移植が実現可能かどうかを、前向き臨床第I/II相試験として行った。これまでの議論に即して言い換えれば、この移植は両方のHLAを同時に標的とする移植にほかならず、もしこの移植後に再発するとすれば、再発した白血病細胞上のHLA発現を検索することは、上記の仮定に対する直截的な解答となりうる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 両方のHLAを標的とした移植後に再発してきた白血病細胞では、両方のHLAを消失することはあるのか、2) 両HLAハプロタイプ不適合移植は可能か、ということに集約された。もし一方のHLA発現を落とすことは可能であるが両方は無理という結論であれば、両HLAハプロタイプ不適合移植の優位性を示す rationale となる。一方そうではない (両方のHLAを発現しなくなることはある) 場合は、両HLAハプロタイプ不適合移植後に再発した白血

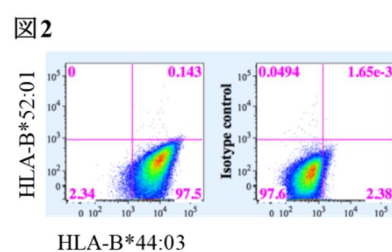
病細胞を調べれば、両方の HLA ハプロタイプを欠失した細胞が手に入る可能性があり、その後の解析につながる。

### 3. 研究の方法

(研究の概要) 一方の HLA の発現が落ちている症例に対して、残った HLA が不適合(標的)となるドナーから再移植を行う。あるいは、両方の HLA が不適合(標的)となる移植(両 HLA ハプロタイプ不適合移植)も対象とする。この2つは、順次ないし同時に、両方の HLA を標的とした移植を行うことを意味し、これを行っても再発してきた白血病細胞を検体として、その細胞表面上の HLA 発現をフローサイトメトリーを用いて確認する。両方の HLA ハプロタイプの発現がない、すなわち HLA を全く発現していない細胞が得られた場合には、その後の詳細な解析に用いることとした。

今回、候補となった1例を示す。症例は51歳の男性であり、他院で急性骨髄性白血病の診断となった。化学療法が行われたが寛解導入不能の状態であり、敗血症、心不全、腎不全を合併していた。血縁者内に HLA の適合するドナーはおらず、原病の病勢が激しいことから臍帯血および骨髄バンクからの移植は困難と考えられたため、HLA 半合致移植目的で当院に紹介となった。

骨髄の染色体検査で HLA 遺伝子がのっている6番染色体の欠失が判明したため、白血病細胞上の HLA の発現をみた(図2)



本患者および HLA 半合致ドナー候補である子供の HLA を示す。

	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-DRB1	HLA-DRB1
本人	33:03	33:03	44:03	52:01	13:02	15:02
長男	24:02	33:03	44:03	51:01	12:01	13:02
次男	24:02	33:03	44:03	51:01	12:01	13:02
長女	02:01	33:03	15:01	52:01	15:01	15:02

本人の HLA-A 座が A\*33:03 のホモとなっているため、代表して HLA-B 座の発現をみることにした。本来であれば患者の白血病細胞は HLA-B\*52:01 と HLA-B\*44:03 の両方が発現すべきところ、HLA-B\*52:01 の発現が落ちていることがわかる(図2)。この状況では長女をドナーとすべきであると考えられる。なぜなら、長男・次男をドナーとした場合、HLA-B 座については HLA-B\*52:01 が標的となるところ、白血病細胞はそれを発現していない。一方、患者正常細胞は両方の HLA を発現しているので、GVL 効果は HLA 適合移植相当であるが、GVHD は HLA 半合致移植相当の割に合わない移植になってしまうからである (Ikegame K, et al. Transpl Immunol. 2012;27:162-5)。この症例で長女から移植を行えば、残っている HLA-B\*44:03 の発現が落ちるかどうかがわかる。ただ残念ながらこの症例は原病の進行が早く、移植までたどり着くことはできなかった。このような研究計画を行う中で、折からのコロナ禍によって患者リクルートおよび患者検体の搬送や解析を円滑に行うことが困難となってしまった。そこで本プロジェクトのもう一つの課題である両 HLA ハプロタイプ不適合移植の開発に集中することにした。以下にその成果を示す。

### 4. 研究成果

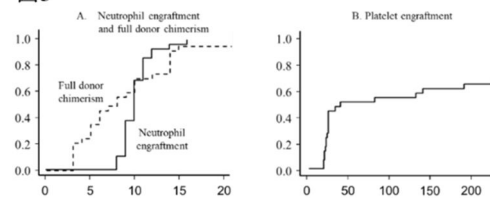
両方の HLA ハプロタイプが異なる血縁ドナーからの造血幹細胞移植(両 HLA ハプロタイプ不適合移植)に関する前向き臨床第 I/II 相試験を行った (Ikegame K, et al. Bone Marrow Transplant. 2021;56:79-83)。HLA 不適合に伴う未知のリスクを勘案して、絶対的予後不良な移植後再発または拒絶の30例を対象とした。実際には試験期間中に拒絶例はなく、全例が移植後再発例であっ

た。対象患者の内訳は、男性 21 例、女性 9 例であり、原疾患は急性骨髄性白血病 18 例、急性リンパ性白血病 11 例、悪性リンパ腫 1 例であった。ドナーは同胞 12 例、いとこ 16 例、はとこ 2 例であった。親子間は HLA 半合致となるため、この試験の対象とはならないことに注意する。30 例中 27 例は非寛解での移植であり、移植回数（この移植が何回目の移植になるか）は、2 回目 15 例、3 回目 8 例、4 回目 5 例、5 回目 1 例、6 回目 1 例となっていた。後述する通り、前回移植時の寛解持続期間は予後因子となるが、6 か月以上維持できていた症例が 12 例、6 か月以内に再発した症例が 18 例であった。HLA 不適合数は、GVH 方向は 3 座不適合 2 例、4 座不適合 4 例、5 座不適合 6 例、6 座不適合 5 例、7 座不適合 12 例、8 座不適合 1 例であり、HVG 方向は 3 座不適合 1 例、4 座不適合 1 例、5 座不適合 7 例、6 座不適合 6 例、7 座不適合 11 例、8 座不適合 4 例であった。共有 HLA は、共有なし 3 例、1 座共有 16 例、2 座共有 4 例、3 座共有 7 例であった。

### 生着

30 例中、day 6 に敗血症で早期死亡した 1 例を除いて、全例で好中球の生着をみた（図 3A：好中球生着と完全ドナーキメリズム、B：血小板生着）。生着日の中央値は day 10（範囲 day 6-day 16）であった。血小板生着については 16 例が day 35 までに生着した。血小板生着遅延の原因としては、原病の再発や血栓性微小血管障害による末梢での血小板消費が考えられた。

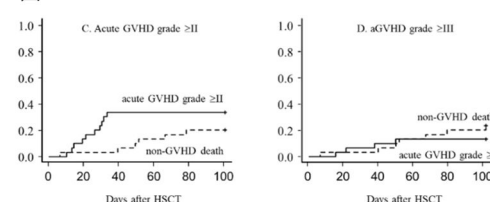
図3



### 急性 GVHD と非 GVHD 死亡

早期死亡と混合キメラの 1 例ずつを除いた解析可能な 28 例中 12 例では急性 GVHD は発症しなかった。Day 100 以内の Grade 別急性 GVHD 発症率は grade II-IV で 36.7%、grade III-IV で 16.7%であった（図 4C：実線が急性 GVHD grade II-IV、破線が非 GVHD 死亡、D：実線が急性 GVHD grade III-IV、破線が非 GVHD 死亡）。いずれの症例においても Day 100 までの慢性 GVHD 発症はなく、Day 100 以降では、皮膚慢性 GVHD が 2 例、肺慢性 GVHD が 1 例認められた。

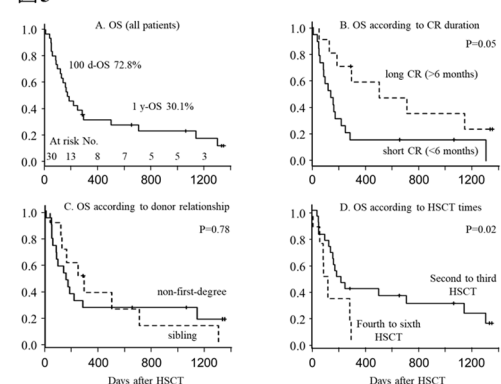
図4



### 生存率

100 日および 1 年の全生存率はそれぞれ 72.8%と 30.1%であった（図 5A）。移植前に寛解が非寛解か、前回移植時に 6 か月以上寛解を維持できたかどうか、原疾患が急性骨髄性白血病か急性リンパ性白血病か、ドナーの血縁関係は何か、何回目の移植か、について単変量解析を行った。一般に信じられていることに反して、移植前に寛解が非寛解かは、もはや有意な因子とはならなかった（図なし）。むしろ前の移植時に 6 か月以上寛解を維持できたかどうかの方が重要であり（図 5B）、原病の病勢を占う意味では直近の腫瘍量よりも前回移植での経過の方が重要であることが示唆された。急性骨髄性白血病と急性リンパ性白血病では差はなく（図なし）、ドナーが同胞かそれ以外（いとこ、はとこ）かでも、生存率に差は見られなかった（図 5C）。移植回数については、2-3 回目移植に比べて、4 回目以上の移植では明らかに生命予後が悪かった（図 5D）。これらの因子を用いた多変量解析

図5



においても、前回移植での寛解維持期間と移植回数が有意な因子として抽出された。

### 再発、非再発死亡、死因

再発率および非再発死亡率はそれぞれ、38.9%と44.3%であった(図6A)。生存率と同様に、前回移植での寛解維持期間は再発率に影響していた( $p=0.09$ , 図6B)が、非再発死亡率には影響していなかった( $p=0.691$ , 図6C)。死因は再発7例、感染症7例、移植関連7例であり、その他に血管イベントが3例であった。感染症死亡の内訳は、市中肺炎1例、敗血症2例、細菌性腸炎1例、真菌性肺炎1例、アデノウイルス感染症1例、カリニ肺炎1例、EBウイルス関連リンパ増殖性疾患1例であった。移植関連死亡の内訳は、急性GVHD2例、特発性肺炎症候群2例、腸管血栓性微小血管障害2例、腎不全1例であった。血管イベントによる死亡の内訳は、くも膜下出血1例と脳出血2例であり、いずれも予期することは困難であった。

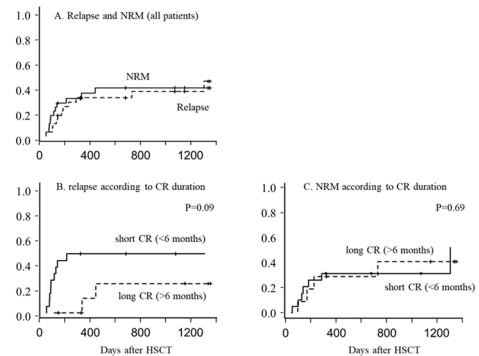
### リンパ球および免疫グロブリンの回復

両 HLA ハプロタイプ不適合移植後の回復では、 $CD4^+$ T 細胞よりも  $CD8^+$ T 細胞優位に回復していることがわかる。免疫グロブリンの回復は通常の移植よりも遅延している傾向があり、IgG に関しては補充療法が適宜用いられた(図なし)。

### 考察

歴史的にみると、両 HLA ハプロタイプ不適合移植の報告は、海外骨髄バンクの手違いで偶発的に起こった1例のみしかない。この例で特筆すべきは、手違いによる両 HLA ハプロタイプ不適合移植後にはさしたる合併症はなかったにも関わらず、手違いを正そうとして HLA 適合ドナーから再移植を行ったところ、重症 GVHD と脳出血を起こして死亡してしまったことである。本研究では、両 HLA ハプロタイプ不適合移植における生着、生存率、再発・非再発死亡・死因、免疫回復に分けて解析を行った。初期の報告によれば、HLA 不適合、特に HVG 方向の不適合は生着に不利に働くことが示されているが、近年のフルダラビンを含む強力な移植前処置の下では、もはや hetero-to-homo の移植でも、生着率は HLA 適合移植と同等であることを報告してきた(Ikegame K, et al. Int J Hematol. 2012;9:101-8, Kanda J, Ikegame K, et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22:2031-7)。本研究においてはさらに HLA がすべて異なっても、現在の移植前処置をもってすれば生着が得られることが初めて示された。また同様に GVH 方向の HLA 不適合は GVHD 発症のリスクとなるが、我々が HLA 半合致移植で開発してきたステロイドを併用する GVHD 予防レジメンを用いれば、HLA が半分以上異なっても、急性および慢性 GVHD の発症は HLA 適合移植と同程度に抑えられることが示された。これに加えて、本研究の主要テーマである HLA-LOH による再発克服を示すことができれば今後の発展に寄与できると考えており、現在、両 HLA ハプロタイプ不適合移植の survival benefit について統計学的な確証を得るための臨床第 II 相試験を進めている(UMIN000044095)。

図6



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikegame Kazuhiro, Kaida Katsuji, Fukunaga Keiko, Osugi Yuko, Yoshihara Kyoko, Yoshihara Satoshi, Ishii Shinichi, Fujino Satoshi, Yamashita Takaya, Mayumi Azusa, Maruyama Satoshi, Teramoto Masahiro, Inoue Takayuki, Okada Masaya, Tamaki Hiroya, Ogawa Hiroyasu, Fujimori Yoshihiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a 2-HLA-haplotype-mismatched family donor for posttransplant relapse: a prospective phase I/II study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 70～83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41409-020-0980-8	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池亀和博
2. 発表標題 Unmanipulated haploidentical stem cell transplantation using low-dose ATG and steroid for high-risk diseases
3. 学会等名 第42回日本造血細胞移植学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	海田 勝仁  (Kaida Katsuji)  (00441254)	兵庫医科大学・医学部・助教   (34519)	
研究分担者	小川 誠司  (Ogawa Seiji)  (60292900)	京都大学・医学研究科・教授   (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	南谷 泰仁  (Nanya Yasuhiro)  (60451811)	京都大学・医学研究科・特定准教授     (14301)	

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