

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2022
課題番号：19K17861
研究課題名（和文）成人T細胞白血病リンパ腫における予後予測モデルおよび微小残存病変の評価法の開発

研究課題名（英文）Development of a new prognostic model and a method of assessing minimal residual disease for adult T-cell leukemia/lymphoma

研究代表者
井上 明威（Inoue, Yoshitaka）
熊本大学・病院・医員

研究者番号：50790268
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）：本研究において成人T細胞白血病リンパ腫患者の臨床情報と検体を収集し、ウイルス由来抗原であるTaxの発現能に基づく新たな予後予測モデルを構築した。Taxが発現できる症例と比較し、Taxを発現できない症例では診断からの全生存率が不良であり、また抗CCR4抗体薬に対する治療反応性も劣ることが分かった。

また私たちはフローサイトメトリーとマスサイトメトリーを使用した移植前後の微小残存病変（MRD）の評価を行い、陽性的中率 80.0%、陰性的中率 85.7%という結果であった。このMRD評価法を基に、早期に再発を予測し治療介入を行うことが可であることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞白血病リンパ腫はHTLV-1感染に起因する、極めて予後不要な末梢性T細胞リンパ腫である。種々の治療開発が行われてきたが、現時点で治癒が期待できる治療法が同種造血細胞移植のみであり、いかに適切な症例に、最適な移植法を提供するかが重要である。

本研究で構築したTaxの発現能に基づく新たな予後予測モデルは、適切な移植症例の選択に有用であり、また本研究で検討したフローサイトメトリー・マスサイトメトリーを使用した同種移植前後の微小残存病変の評価法は、移植後再発抑制に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we collected clinical information and specimens from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and developed a new prognostic model based on the ability to express Tax, a virus-specific antigen. We found that compared to patients who can express Tax, those who cannot express Tax have inferior overall survival and response to anti-CCR4 antibody drugs.

We evaluated minimal residual disease by using flow cytometry and mass cytometry before and after allogeneic transplantation. Our flow cytometry method had a positive predictive value of 80.0% and a negative predictive value of 85.7%. The results also suggest that this method can be used to predict recurrence and provide therapeutic intervention at an early stage.

研究分野：血液、腫瘍内科学

キーワード：成人T細胞白血病リンパ腫 同種造血細胞移植 予後予測モデル 微小残存病変

1. 研究開始当初の背景

成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)はヒトT細胞白血病ウイルス1型(HTLV-1)の感染により発症する末梢性T細胞由来悪性腫瘍である。様々な治療研究が行われてきたが、ATLの約8割を占める急性型・リンパ腫型ATL(アグレッシブATL)に対する多剤併用化学療法のみでの生存期間中央値は1年未満であり、予後は極めて不良である。アグレッシブATLに対して唯一治癒が期待できる治療として同種造血細胞移植(同種移植)があるが、30-40%と高い移植関連死亡率や30%前後の移植後再発率が問題となっており、適切な移植適応症例の選択、最適な移植時期の決定、移植後再発の抑制といった点が重要となる。

適切な移植適応症例の選択、最適な移植時期を明らかにするため、我々はATL診断時の臨床データに基づく予後予測モデルを構築した(Fuji S, Inoue Y, et al. Haematologica, 2017)。このモデルによる解析では、いずれのリスク群においても移植施行例が非移植施行例に比べ成績は良好であったが、低リスク群では非移植施行例でも30%前後の長期生存例が存在し、また高リスク群では移植施行率が他のリスク群に比べ低く、また移植施行例でも移植後再発が多かった。つまり低リスク群では合併症リスクの高い移植を受けなくても長期生存が期待される症例が存在すること、逆に高リスク群では診断後早期に治療抵抗性となり移植が実施できない症例や移植を受けても再発するリスクが高い症例が多く存在することが明らかになった。しかし臨床データに基づく解析ではこれ以上のリスク分類は困難であった。

一方でATLは免疫原性の高い疾患であり、HTLV-1由来抗原であるTaxやHBZが標的分子となり得る。特にTaxは非常に免疫原性が高く、同種移植後の長期生存例の一部ではTax特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の増加を認めており、宿主の抗腫瘍免疫において重要な因子と考えられている。しかしATL患者の約半数では、tax遺伝子のナンセンス変異、5'側LTRのDNAメチル化、5'側LTRの欠失などにより、Taxが発現できない変化がみられることが報告されている。Taxの高い免疫原性を考慮すると、Taxを発現できない症例では、宿主免疫からの回避が可能となり、腫瘍細胞の増殖が速く予後が不良であることとTaxに依存しない腫瘍のために細胞側遺伝子の変異が蓄積していることが推測されるが、実際にTax発現、遺伝子変異と予後を検討した報告はない。また近年、CCR4遺伝子変異を有する症例では抗CCR4抗体が非常に有効であり移植成績を上回ることが報告されている。これら抗腫瘍免疫の標的となる分子の発現解析と先に述べた臨床データに基づく予後予測モデルを組み合わせることで、より最適な予後予測モデルが構築できる可能性がある。

HTLV-1感染細胞、ATL細胞は制御性Tリンパ球と比較して細胞接着分子であるCADM1発現が高く鑑別が可能である。我々は最適な移植時期の決定および移植後再発の早期診断を目的とし、フローサイトメトリーを使用した移植前後の微小残存病変(MRD)の評価を行ってきた。この方法を用いた検討により臨床学的診断前に再発徴候を検出した症例を経験した。しかし一部の症例ではMRDの検出と臨床学的再発診断がほぼ同時期となり有効性を示せなかった症例を経験し、また一部の症例ではCD4+CADM1+CD7-という表面マーカーのみでは感染細胞とATL細胞を正確には区別できない場合がある。本研究ではHTLV-1プロウイルスの組み込み部位を解析し、ウイルス学的解析を加え、同時にマスサイトメトリーにより多数の抗体を使った解析により、感染細胞とATL細胞を正確に鑑別できるマーカーを同定する。これらの測定が移植前後のMRD評価として最適な方法であるかを検証し、最適な移植時期の決定および移植後再発抑制のための介入に繋げていく。

2. 研究の目的

本研究ではATL症例におけるHTLV-1プロウイルス、Tax発現、CCR4遺伝子などの細胞遺伝子変異解析を行い、予後との関係を明らかにすることを目的とする。さらに臨床データに基づく予後予測モデルにTax発現および細胞遺伝子変異の情報を組み込み、より良い予後予測モデルを構築し、適切な移植適応症例および最適な移植時期を明らかにすることを目的とする。また本研究ではATL症例において経時的にマスサイトメトリー測定と次世代シーケンサーを用いたHTLV-1組み込み部位の測定を行い、これらが最適な移植時期の決定および移植後再発を予測するためのMRD評価法として最適かを検証する。さらにマスサイトメトリー測定により抗腫瘍免疫およびATL細胞のそれら抗腫瘍免疫からの逃避機構を評価する。

3. 研究の方法

本研究ではATL患者から検体を採取し、以下の点を明らかにする。

HTLV-1プロウイルスにおけるTax発現解析

: HTLV-1プロウイルスの構造(完全型、1型欠損型(LTRは保存され内部に欠損)、2型欠損型(5'側LTRと内部が欠損))を解析し、inverse PCRにより組み込み部位も明らかにする。また、sodium bisulfite法を用いて5'側LTRのDNAメチル化を解析する。CD8陽性細胞をMACSで除去し、培養した後に、Tax発現をFACSで解析する。

細胞遺伝子(CCR4, IRF4, p53, 2MG, HLA, PD-1, PD-L1, CD58)変異解析

: ATL 患者の約 1/3 で CCR4 遺伝子の C 末端、細胞内領域に遺伝子変異を認めることが報告されている。検体より DNA を抽出後、PCR にて CCR4 および予後との相関や抗腫瘍免疫からの逃避機構に関連する IRF4, p53, 2MG, HLA, PD-1, PD-L1, CD58 などの遺伝子変異解析を行う。

マスサイトメトリーを使用した微小残存病変の評価

: マスサイトメトリーを使用し HTLV-1 感染細胞、ATL 細胞、Treg を正確に分離して、ATL 細胞の推移を明らかにする。ATL 細胞、HTLV-1 感染細胞では制御性 T リンパ球と比較して CADM1 が高いため鑑別が可能であるが、感染細胞と ATL 細胞を正確に区別する方法は確立されていない。様々な表面抗原 (CCR4, TIGIT) 細胞内抗原 (IRF4, p53) を解析し ATL 細胞を同定する。さらに予後との相関や抗腫瘍免疫からの逃避機構に関連する p65, HLA, PD-1, CD58 など発現を評価する。

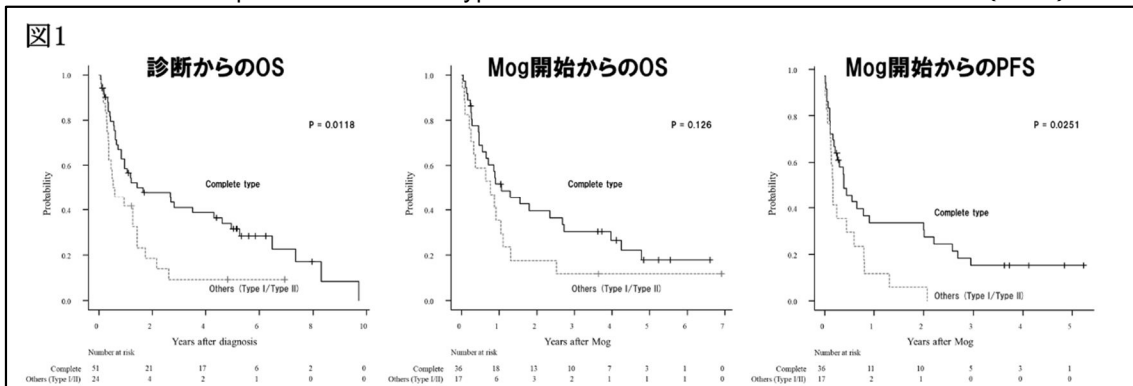
HTLV-1 感染細胞クローンの網羅的解析

: HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を次世代シーケンサーにより網羅的に解析して、腫瘍細胞クローンと非腫瘍の感染細胞クローンの動態を明らかにして、抗ウイルス免疫との関連、再発、予後との相関を解析する。

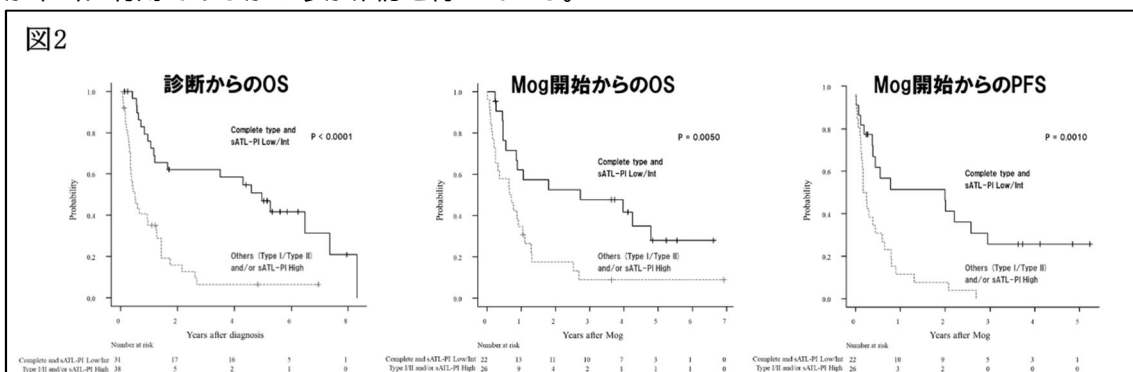
4. 研究成果

Tax の発現能と臨床データを組み合わせた新しい ATL の予後予測モデルを構築

本研究において ATL 患者 75 例の臨床情報・検体を収集し解析を行った。HTLV-1 プロウイルスについて Tax の発現能を有する完全型 (Complete 群、実線) と、Tax の発現能を有さない Type I・Type II (Type I/II 群、破線) で診断からの全生存率を比較したところ、Type I/II 群では有意に予後不良であることが分かった。また抗 CCR4 抗体薬である mogamulizumab (Mog) に対する治療反応性も Complete 群と比較し Type I/II 群では不良であることが分かった (図 1)。



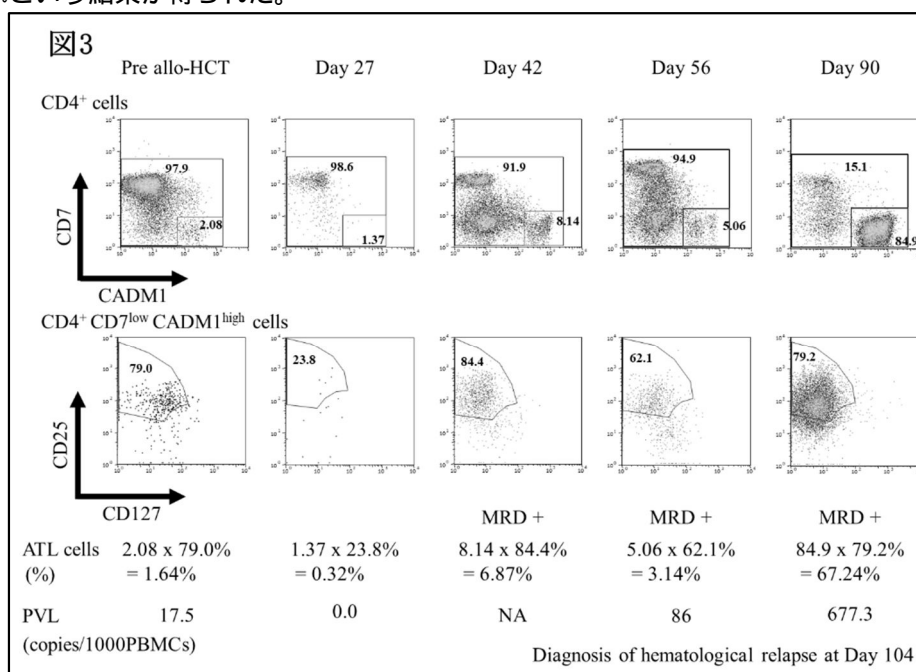
さらに Tax の発現能に基づく予後予測モデルと既報の臨床情報のみを基に構築された予後予測モデル (simplified ATL-PI, Katsuya H, et al. JCO. 2012.) を組み合わせ検討したところ、上述の結果はより顕著であり、より良い予後予測モデルである可能性が示唆された (図 2)。現在さらに症例数を 231 症例まで増やし再検討を行っており、この新しい予後予測モデルが本当に有用であるかどうか確認を行っている。



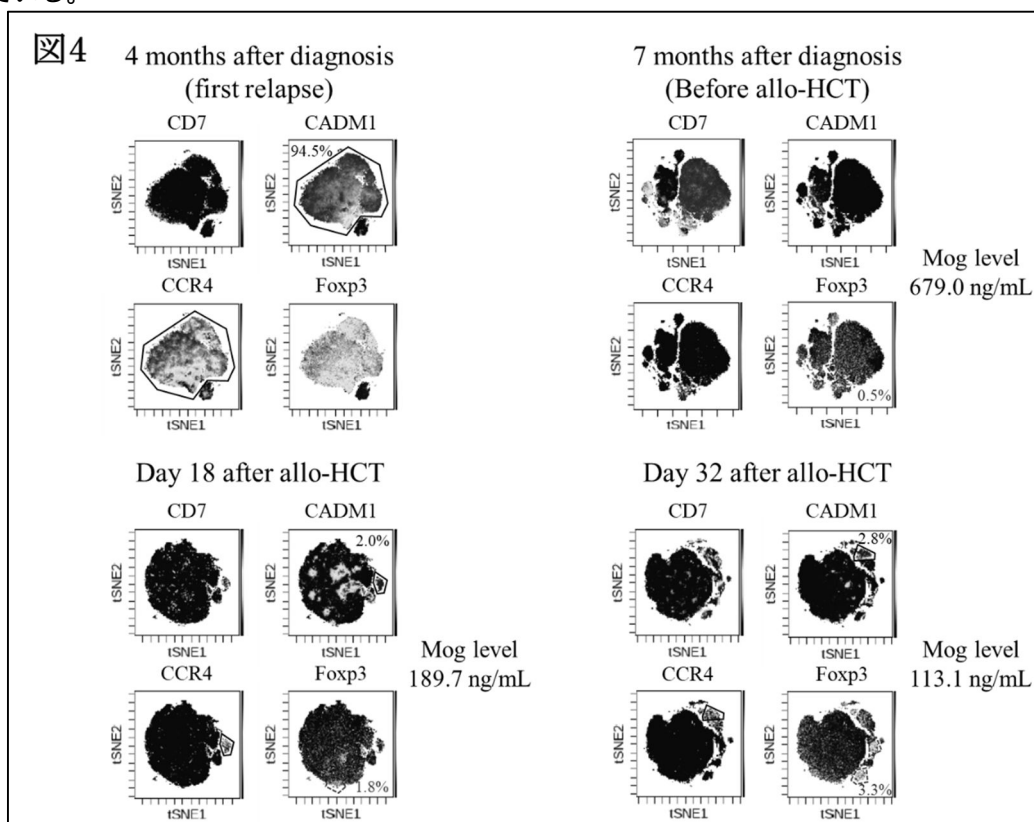
フローサイトメトリー・マスサイトメトリーを使用した微小残存病変の評価

本研究において、ATL 患者におけるフローサイトメトリー・マスサイトメトリーを使用した移植前後の微小残存病変の評価を行った。図 3 に示すようにこの症例では移植直前に CD4⁺CD7^{low}CADM1^{high}CD25⁺の表現型を有する ATL 細胞と思われる CD4 細胞中 1.6% 認めていたが、移植後早期 (Day 27) にはほぼ消失した。しかし移植後 42 日目に同表現型の細胞集団の増加を認め、その後この細胞集団は増加し、同時に HTLV-1 プロウイルス量も上昇を認めた。最終的には移植後 104 日目に臨床学的再発と診断されたが、このフローサイトメトリーを用いた微小残存病変の評価法では臨床学的再発より約 2 か月前に再発の徴候を捉えることが可能であった。本研究では ATL 患者の移植前後の検体を用い、このフローサイトメトリーを用いた微小残存病変の評価を行い、最終的には 25 例と少数例の検討ではあったが、陽性的中率 80.0%、陰性的中

率 85.7%という結果が得られた。



またマスマイトメトリーを使用した解析でも同様に移植前後の ATL 患者検体を使用した解析を行い、臨床学的再発より前に ATL 細胞を同定できることが可能であった（図 4、実線）。さらにこの症例では移植前に Mog を使用しており、移植前後の Mog 血中濃度と制御性 T 細胞（Treg）の推移についてもマスマイトメトリーを用い解析した。この症例では同種移植直前・後の Mog 血中濃度が比較的低く、さらに少数ではあるが Treg が同定でき（図 4、破線）、最終的には重篤な移植片対宿主病を認めることなく経過した。これら結果より同種移植前に Mog を使用した場合は、移植直前・直後の Mog 血中濃度と Treg は相関し、移植直前・後の Mog 血中濃度が低く、少数ではあるが Treg が同定できる症例では、重篤な移植片対宿主病を認めることなく経過する可能性が高いと考えられた。つまり Mog 血中濃度と Treg を評価することで、移植前の患者においても安全で有効な Mog 投与が可能であることが示唆され、この点について現在更なる検討を行っている。



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 0件）

1. 著者名 Inoue Yoshitaka, Nakano Nobuaki, Fuji Shigeo, Eto Tetsuya, Kawakita Toshiro, Suehiro Youko, Miyamoto Toshihiro, Sawayama Yasushi, Uchida Naoyuki, Kondo Tadakazu, Kanda Junya, Atsuta Yoshiko, Fukuda Takahiro, Yoshimitsu Makoto, Kato Koji, ATL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation	4. 巻 56
2. 論文標題 Impact of conditioning intensity and regimen on transplant outcomes in patients with adult T-cell leukemia-lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 2964 ~ 2974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-021-01445-0	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 Inoue Yoshitaka, Nishimura Nao, Murai Masayuki, Matsumoto Miho, Watanabe Miho, Yamada Asami, Izaki Mikiko, Nosaka Kisato, Matsuoka Masao	4. 巻 115
2. 論文標題 Prevention of acute graft-versus-host disease in adult T-cell leukemia-lymphoma patients who received mogamulizumab before allogeneic hematopoietic cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 435 ~ 439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03250-3	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 Inoue Yoshitaka, Morishima Satoko, Kato Koji, Ito Ayumu, Nakano Nobuaki, Kuriyama Takuro, Kawakita Toshiro, Mori Yasuo, Suehiro Youko, Itonaga Hidehiro, Miyazaki Yasuhiko, Imada Kazunori, Tomori Shouhei, Kanda Junya, Ichinohe Tatsuo, Atsuta Yoshiko, Fukuda Takahiro, Yoshimitsu Makoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Impact of HLA-mismatched unrelated transplantation in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-023-02002-7	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上明威、野坂生郷、河北敏郎、渡辺美穂、松本美穂、日高道弘、松岡雅雄
2. 発表標題 HTLV-1キャリアにおける同種造血細胞移植の治療成績の検討
3. 学会等名 第7回日本HTLV-1学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上明威、中野伸亮、衛藤徹也、河北敏郎、宮本敏浩、末廣陽子、澤山靖、諫田淳也、一戸辰夫、熱田由子、福田隆浩、吉満誠
2. 発表標題 成人T細胞白血病リンパ腫におけるHLAミスマッチ移植の影響：ATL-WG 13-21
3. 学会等名 第43回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上明威、河北敏郎、野坂生郷、日高道弘、松岡雅雄
2. 発表標題 成人T細胞白血病リンパ腫患者におけるmodified ATL-PIに基づく移植時期の選択の有用性
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上明威、野坂生郷、松本美穂、渡辺美穂、山田麻美、井崎幹子、松岡雅雄
2. 発表標題 成人T細胞白血病リンパ腫患者におけるモガムリズマブ療法の予後予測因子の検討
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上明威、中野伸亮、藤重夫、衛藤徹也、河北敏郎、内田直之、諫田淳也、熱田由子、福田隆浩、加藤光次
2. 発表標題 ATL患者における移植前処置の強度およびレジメンが移植成績に与える影響
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------