

HLA-loss 参与单倍体相合移植后白血病复发的机制*

韩雪¹ 范圣瑾¹ 赵艳秋¹ 王雨竹¹ 李慧波¹

[关键词] HLA-loss; 单倍体相合造血干细胞移植; 复发; 急性白血病

DOI: 10.13201/j.issn.1004-2806.2022.03.017

[中图分类号] R457.7 [文献标志码] A

The mechanism of HLA-loss participating in leukemia relapse after haploidentical transplantation

Summary The loss of HLA molecule expression on tumor cells is one of the characteristics of immune escape. HLA-loss, genomic loss of a mismatched HLA haplotype, contributes to the escape of residual leukemic cells from immune surveillance and killing effect of donor T cells and thus induces leukemia relapse after haploidentical transplantation. HLA-loss has important clinical significance. It not only invalidates donor lymphocyte infusions used for prevention and treatment of post-transplantation relapse, but also increases the risk of graft versus host disease. This review focus on recent research of HLA-loss involved in relapse after haploidentical transplantation, which provides effective exploration on early diagnosis and treatment strategies for post-transplantation leukemia relapse.

Key words HLA-loss; haploidentical hematopoietic stem cell transplantation; relapse; acute leukemia

单倍体相合造血干细胞移植(haploidentical hematopoietic stem cell transplantation, haplo-HSCT)的快速发展有效解决了供者来源的问题,逐渐成为高危急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者的主要治疗方法之一^[1],可以用于治疗有移植指征但缺乏人类白细胞抗原相匹配或需要紧急移植的恶性血液病患者。与同胞相合造血干细胞移植相比,去除 T 细胞的单倍体相合移植仍然具有相同的移植物抗白血病(graft-versus-leukemia, GVL)效应^[2]。即使植入不良、移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)、感染等并发症发生率及移植后非复发相关死亡率进一步降低,复发仍是造血干细胞移植后死亡的主要原因^[3-4]。肿瘤细胞通过丢失 HLA 分子的表达减弱其免疫原性参与免疫逃逸。HLA-loss, 即受者白血病细胞错配位点上的 HLA 等位基因部分或整体地丢失,是单倍体移植后白血病复发的重要机制^[5]。急性白血病患者诊断时以及接受无关供者来源的全相合异基因移植后发生 HLA-loss 的报道较少,但在接受单倍体相合移植后复发的急性白血病患者中,约 1/3 可检测到 HLA-loss^[6]。尽管供者淋巴细胞输注(donor lymphocyte infusions, DLI)这一经典模式治疗移植后复发疗效肯定,但对于 HLA-loss 复发可能是无效的,甚至增加 GVHD 的发生风险。HLA-loss 复发有其独特的

临床意义,针对这种免疫逃逸机制导致的复发类型进行早期诊断与个体化治疗具有重要意义,本文就 HLA-loss 这一机制参与 haplo-HSCT 后白血病复发的研究现状进行综述。

1 HLA-loss 的发现

HLA-I 类分子的缺失或表达下调是实体肿瘤细胞发生免疫逃逸的特征之一,然而急性白血病患者尤其是诊断时,HLA 分子的表达改变并不常见。Masuda 等^[7]研究发现白血病细胞系 HL-60 存在 HLA 基因组单倍型缺失现象。随后, Vago 等^[5]首次报道在接受单倍体相合移植后复发的 17 例 AML 患者中,有 5 例患者的白血病细胞在与供者不匹配的 HLA 位点上出现了单倍型的基因组丢失,并将这种现象描述为 HLA-loss。研究人员利用微卫星定位和全基因组单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms, SNP)序列对这一现象进行分析,发现在没有拷贝数变异的情况下,6 号染色体短臂上部分区域基因组缺失后被同源性拷贝取代,即染色体 6p 上发生了杂合性缺失,形成了获得性单亲二倍体。而细胞毒性实验显示,供者 T 细胞对发生 HLA-loss 的白血病细胞不再具有同种异体性免疫反应。

Vago 等^[5]的发现阐述了移植后白血病复发的一种新的免疫逃逸机制——错配位点上的 HLA 等位基因部分或整体地丢失,即 HLA-loss。HLA 基因复合体位于人第 6 号染色体短臂 6p21.31 内,由其编码的 HLA 分子通过提呈抗原肽激活并介导 T 淋巴细胞参与免疫应答,清除白血病细胞。在 haplo-HSCT 中,患者与供者之间有一条不完全

*基金项目:黑龙江省卫生健康委科研课题(No:2020-140); 国家自然科学基金(No:81903966)

¹哈尔滨医科大学附属第一医院血液内科(哈尔滨,150001) 通信作者:李慧波, E-mail: lihuiibo-1985@163.com

匹配的单模标本,而不匹配的 HLA 分子位点是 T 细胞同种异体反应的最主要的免疫靶点。HLA 基因组的丢失可赋予突变的白血病细胞逃脱同种异体反应性 T 细胞监视和免疫杀伤的能力,导致白血病复发。

2 HLA-loss 的发生机制

大样本研究表明不良细胞遗传学特征、FLT3-ITD 突变阳性、移植时存在活动性疾病均与 HLA-loss 风险增加相关,尤其移植时存在活动性疾病明显增加了 HLA-loss 的发生风险^[6]。不良细胞遗传学改变及移植时存在活动性疾病可使患者具有基因组不稳定性并持续产生免疫压力这一特征,更容易发生染色体畸变。

除了基因组不稳定性使得白血病细胞发生获得性单亲二倍体外,也有学者提出其他可能导致 HLA-loss 的机制。Shyr 等^[8]报道了 2 例接受去除 $\alpha\beta$ /CD19⁺ T 细胞的单倍体相合移植及预防性 DLI 输注后发生 HLA-loss 复发的患者。由于输注的 $\gamma\delta$ T 细胞不依赖于经典主要组织相容复合体途径而是通过直接识别细胞表面的非肽类磷抗原产生免疫应答,理论上 $\gamma\delta$ T 细胞过继性外周干细胞输注的移植方式应该具有较低的 HLA-loss 复发风险,然而这 2 例患者仍然移植后早期复发。提示预防性 DLI 输注可能是去除 $\alpha\beta$ /CD19⁺ T 细胞这种移植方式 HLA-loss 复发的免疫驱动因素。

综上所述,HLA-loss 可能是残留的白血病细胞上部分不稳定的基因组在长期且持续的免疫压力下发生突变后形成杂合性缺失的结果,并赋予发生这种突变的白血病细胞优势扩增的能力。

3 HLA-loss 与单倍体移植后复发的关系

据 HLA LOSS 联盟收集到最大规模的合作研究,在进行 HLA-loss 分析的 396 例移植后复发的患者中,检测到 51 例 HLA-loss 复发,占 12.8%。而其中 35 例发生在单倍体移植后,即 HLA-loss 在单倍体移植后复发中占 22.6%。尽管 HLA-loss 也存在于无关供者异基因移植中(12 例发生在不全相合中,4 例发生在全相合中),单倍体半相合移植仍是 HLA-loss 复发最常见的移植方式。Hamdi 等^[9]将 71 例接受 HLA 全相合(80%)和 1~2 个位点不匹配(20%)的异基因移植后复发的患者纳入研究,结果发现除了 1 例患者在移植前有 HLA 区域部分位点基因型丢失,均未在其他样本中观察到 HLA-loss,表明 HLA-loss 并不是 HLA 全相合或是配型接近的异基因移植后复发的主要原因。

Vago 团队的回顾性研究结果显示,高白细胞血症、不良细胞遗传学特征、FLT3-ITD 突变阳性、既往异基因造血干细胞移植史、移植时存在活动性疾病、移植时输注的 T 细胞计数和发生慢性

GVHD 与 HLA-loss 风险增加相关,尤其移植时存在活动性疾病明显增加了 HLA-loss 的发生风险^[6]。并且,不伴有 HLA-loss 的复发时间较早(中位数 88 d),而 HLA-loss 复发大多发生在移植后中晚期(中位数 307 d)^[6]。重要的是,HLA-loss 消除了供者 T 细胞对突变白血病的同种异体反应,因此可以认为对于移植后 HLA-loss 复发患者,治疗性 DLI 这一临床措施不仅无法抵抗白血病细胞,反而可能增加 GVHD 发生风险。因此,对移植后复发的 AML 患者进行治疗性 DLI 前应先排除已发生 HLA-loss。

4 HLA-loss 复发的早期诊断

HLA-loss 是参与单倍体相合移植后复发的重要免疫逃逸机制,有效检测、早期诊断 HLA-loss 对及时并正确干预具有重要意义。目前检测 HLA-loss 依赖于通过 HLA 分子配型技术检测复发的白血病细胞上存在 HLA 基因组缺失。聚合酶链反应测序方法(PCR-SBT)在确定 HLA 等位基因方面具有良好的可靠性,是国际公认的 HLA 基因分型金标准。此外,基于二代测序技术的 HLA 分型也是一个切实可行的选择^[8],二代测序方法可对等位基因进行精准分型,不仅能获得高分辨率结果并覆盖所有可能的 HLA 基因组,还能评估 KIR 配体缺失情况^[8,10]。但这两种技术受限于宿主来源亚群计数,如果白血病细胞亚群较小,则结果可能不可靠。利用和免疫磁珠分选技术和流式细胞荧光分选术对白血病起始细胞进行分选和提纯后再进行 PCR-SBT 检测可提高结果的可靠性,但连续、定期地进行磁珠分选和流式细胞分析花费高且不方便临床实施。

Ahci 等^[11]提出一种简便又经济的检测方法——HLA-KMR,这项技术通过结合基于定量聚合酶链反应(qPCR)和造血嵌合体的 qPCR 反应,以嵌合率为参考来评估是否发生 HLA-loss。HLA-KMR 包含 27 个最常见的 HLA-A、C 和 DPB1 位点等位基因组的 10 个 qPCR 反应,可根据不同种族人群 HLA 基因频率进行选择,在一次检测中可灵敏地评估 HLA 基因组是否丢失。

另外,单核苷酸多态性微阵列芯片(SNP array)以及基因芯片可在全基因组范围内确定测试样本中拷贝数变化,提供 SNP 基因分型信息更灵敏地检测出染色体的缺失、单亲二倍体等异常^[12]。

5 HLA-loss 复发的治疗选择与预后

5.1 替代供者的二次移植

移植后复发的 AML 患者预后极差,1 年总生存(OS)率仅为 23%,不接受治疗的患者平均生存期仅为 3~4 个月,接受化疗的患者中位 OS 仅为 6.8 个月^[13-14]。理论上,“替代供者”与患者的正常组织有 50%不相容的优势性,同时与突变的白血

病细胞完全不相容,其 T 细胞可以发挥 GVL 效应。已有临床病例报道,经历了 HLA-loss 复发的 1 例 AML 患者接受了另一供者来源的单倍体相合移植和 1 例淋巴瘤患者接受了无关供者来源的 HLA 10/12 相合的脐血干细胞二次移植后不仅达完全缓解,并且分别在 16 个月和 24 个月未检测到疾病复发^[5,15]。Imus 等^[16]研究发现,二次移植选择与首次移植不同的单倍型半相合供者复发率更低,预后更好。一项对与首次移植来源不同的半相合亲属来源的二次移植治疗移植后复发患者的前瞻性 I/II 期研究显示,在 II~IV 级急性 GVHD 累积发生率为 36.7% 的情况下,1 年生存率、复发死亡率和无复发死亡率分别为 30.1%、38.9% 和 44.3%^[17],说明二次移植选择与首次移植不同的单倍型半相合供者可延长患者的生存,但移植相关并发症带来的高死亡率一定程度上限制了总体预后水平。

然而,Sano 等^[18]报道了 1 例 B 细胞急性淋巴细胞白血病患者接受父亲的单倍体移植后复发并丢失了母亲的 HLA 单倍型基因组,第二次接受母亲的单倍体移植后却因丢失了父亲的 HLA 单倍型基因组再次复发,并在二次移植后 1 年内死于疾病进展。尽管接受了与患者具有不同 HLA 单倍型的替代半相合供者造血干细胞移植仍可能复发,并反复发生 HLA-loss。综合来看,目前针对经历 HLA-loss 复发后进行第二次“替代供者”来源的单倍体移植的患者长期随访的临床证据提示这种方法有一定可行性。

5.2 NK 细胞输注免疫治疗

由于单倍体相合移植中需要去除 T 细胞,且 NK 细胞免疫重建比 T 细胞更快,这使得移植后早期 GVL 效应在很大程度上依赖于 NK 细胞。大量研究证实 NK 细胞同种异体反应性可以促进单倍体相合移植后患者植入成功、预防 GVHD,并降低复发和死亡风险^[19-21]。然而,单倍体相合移植后单个 KIR 阳性 NK 细胞活化并具有免疫杀伤功能至少需要 6~8 周,重建成熟的受体谱系至少需要 3 个月^[22]。移植后的 NK 细胞重建首先以未成熟的 CD56^{bright}CD16⁻ NK 细胞亚群为主,同时削弱了 NK 细胞的同种异体反应性^[23]。HLA-loss 复发患者尽管在复发时已经恢复了成熟的 NK 细胞表型,但其 NK 细胞抗肿瘤活性降低并伴随更高的衰竭水平^[24]。安德森癌症中心的临床试验表明,对接受半相合移植的高危髓系白血病患者分别在移植第-2、+7、+28 天使用膜结合白细胞介素 21 (mbIL21)进行体外扩增获得的供者 NK 淋巴细胞输注(每剂 $1 \times 10^5/\text{kg} \sim 1 \times 10^8/\text{kg}$)后,在不影响植入、GVHD、移植相关死亡率的情况下,促进了 NK 细胞免疫重建,增强了 GVL 效应并降低了复发风

险^[25]。一方面,延迟恢复的同种异体反应性解释了 NK 细胞无法发挥及时且有力的 GVL 效应来预防复发的原因;另一方面,直接输注完全成熟的具有同种异体反应性的供者 NK 细胞事实上可以发挥强大的 GVL 效应。总之,NK 细胞免疫疗法在异基因移植后复发的治疗中极具前景,值得进一步探索是否可改善 HLA-loss 复发患者的预后,而供者选择、输注剂量、输注时机、扩增方案等都需要纳入考虑。

5.3 其他免疫治疗

Rovatti 等^[26]利用体外细胞和动物实验发现,抗 CD3/CD33 双特异性抗体可以将供体 T 细胞重新靶向到 HLA-loss 白血病细胞变异体,并诱导杀伤作用。尽管目前没有进入临床试验,但这个发现为未来治疗移植后 HLA-loss 复发提供了新的思路。

IFN- α 可诱导 AML 细胞凋亡和增强白血病细胞的免疫原性,近年来国内外研究也积极探索 IFN- α 在白血病移植后复发领域的安全性和疗效。北京大学血液科对 24 例 DLI 治疗 1 个月无效的 MRD 阳性患者给予挽救性 IFN- α 治疗,2 年累积复发率 35.9%,2 年 OS 率 68.0%,IFN- α 可明显改善常规 DLI 无效的 MRD 阳性患者的预后^[27]。但 IFN- α 治疗用于 HLA-loss 复发患者能否改善患者预后,目前还缺乏临床证据。

6 结语

本文主要讨论一种新的免疫逃逸机制,HLA-loss——受者白血病细胞错配位点上的 HLA 等位基因部分或整体地丢失在单倍体相合移植中的研究现状。HLA-loss 这一机制在单倍体移植后复发中占比较高,并且可导致 DLI 这一移植后复发防治重要策略无效,甚至增加 GVHD 的发生风险。因此,有必要对移植后的患者进行适当的临床与实验室监测,这对早期诊断 HLA-loss 并及时干预有重要意义,进行“替代供者”半相合的二次移植、NK 细胞输注免疫疗法、细胞因子免疫治疗等是具有可行性的治疗方案,但需要大量的研究来评估它们的安全性及疗效。异基因移植后复发的 AML 患者预后较差,深入研究移植后复发的机制,进一步探索移植后复发的防治策略是移植领域未来的发展方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 石威,夏凌辉. 预防急性髓系白血病异基因造血干细胞移植术后复发[J]. 临床血液学杂志,2021,34(9): 618-622.
- [2] Ringdén O, Labopin M, Ciceri F, et al. Is there a stronger graft-versus-leukemia effect using HLA-haploidentical donors compared with HLA-identical siblings? [J]. *Leukemia*,2016,30(2):447-455.

- [3] D'Souza A, Fretham C, Lee SJ, et al. Current Use of and Trends in Hematopoietic Cell Transplantation in the United States[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2020, 26(8): e177-e182.
- [4] Horowitz M, Schreiber H, Elder A, et al. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2018, 53(11): 1379-1389.
- [5] Vago L, Perna SK, Zanussi M, et al. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation[J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(5): 478-488.
- [6] Crucitti L, Crocchiolo R, Toffalori C, et al. Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Leukemia*, 2015, 29(5): 1143-1152.
- [7] Masuda K, Hiraki A, Fujii N, et al. Loss or down-regulation of HLA class I expression at the allelic level in freshly isolated leukemic blasts[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(1): 102-108.
- [8] Shyr DC, Zhang BM, Saini G, et al. HLA-haplotype loss after TCRalpha/CD19-depleted haploidentical HSCT[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2021, 56(3): 733-737.
- [9] Hamdi A, Cao K, Poon LM, et al. Are changes in HLA Ags responsible for leukemia relapse after HLA-matched allogeneic hematopoietic SCT? [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2015, 50(3): 411-413.
- [10] Segawa H, Kukita Y, Kato K. HLA genotyping by next-generation sequencing of complementary DNA [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 914.
- [11] Ahi M, Toffalori C, Bouwmans E, et al. A new tool for rapid and reliable diagnosis of HLA loss relapses after HSCT[J]. *Blood*, 2017, 130(10): 1270-1273.
- [12] Ronaghy A, Yang RK, Khoury JD, et al. Clinical Applications of Chromosomal Microarray Testing in Myeloid Malignancies [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2020, 15(3): 194-202.
- [13] Schmid C, Labopin M, Nagler A, et al. Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2012, 119(6): 1599-1606.
- [14] Rautenberg C, Germing U, Haas R, et al. Relapse of Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Prevention, Detection, and Treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1): 228.
- [15] Hirabayashi K, Kurata T, Horiuchi K, et al. Loss of Mismatched HLA on the Leukemic Blasts of Patients With Relapsed Lymphoid Malignancies Following Bone Marrow Transplantation From Related Donors With HLA Class II Mismatches in the Graft Versus Host Direction [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2016, 63(4): 709-711.
- [16] Imus PH, Blackford AL, Bettinotti M, et al. Major Histocompatibility Mismatch and Donor Choice for Second Allogeneic Bone Marrow Transplantation[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017, 23(11): 1887-1894.
- [17] Ikegame K, Kaida K, Fukunaga K, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a 2-HLA-haplotype-mismatched family donor for posttransplant relapse; a prospective phase I/II study[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2021, 56(1): 70-83.
- [18] Sano H, Mochizuki K, Kobayashi S, et al. Two Occurrences of Leukemia Relapse Due to Mismatched HLA Loss After Haploidentical Stem Cell Transplantation From Different Family Donors With KIR Ligand Mismatch [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2020, 42(2): e104-e106.
- [19] Locatelli F, Pende D, Falco M, et al. NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia[J]. *Trends Immunol*, 2018, 39(7): 577-590.
- [20] Veluchamy JP, Kok N, van der Vliet HJ, et al. The Rise of Allogeneic Natural Killer Cells As a Platform for Cancer Immunotherapy: Recent Innovations and Future Developments [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 631.
- [21] 徐郑丽, 赵翔宇. 造血干细胞移植中 KIR 及其配体影响移植预后的研究进展[J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(1): 71-75.
- [22] Vago L, Forno B, Sormani MP, et al. Temporal, quantitative, and functional characteristics of single-KIR-positive alloreactive natural killer cell recovery account for impaired graft-versus-leukemia activity after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Blood*, 2008, 112(8): 3488-3499.
- [23] Russo A, Oliveira G, Berglund S, et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications [J]. *Blood*, 2018, 131(2): 247-262.
- [24] Gambacorta V, Oliveira G, Zito L, et al. HLA Loss Leukemia Relapses after Partially-Incompatible Allogeneic HSCT As a Prototypical System to Investigate Natural Killer Cell Dynamics [J]. *Blood*, 2015, 126(23): 743.
- [25] Ciurea SO, Schafer JR, Bassett R, et al. Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation [J]. *Blood*, 2017, 130(16): 1857-1868.
- [26] Rovatti PE, Zito L, Draghi E, et al. Exploiting an Anti-CD3/CD33 Bispecific Antibody to Redirect Donor T Cells Against HLA Loss Leukemia Relapses [J]. *Blood*, 2019, 134: 513.
- [27] Mo XD, Wang Y, Zhang XH, et al. Interferon-alpha Is Effective for Treatment of Minimal Residual Disease in Patients with t(8;21) Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Results of a Prospective Registry Study [J]. *Oncologist*, 2018, 23(11): 1349-1357.