

# 博 士 論 文

制御性T細胞と白血病細胞との相互作用  
を考慮した数理モデルによる免疫療法  
設計

金沢大学大学院自然科学研究科  
数物科学専攻

学籍番号 1524012006

氏名 西山 義晃

主任指導教員 西山 宣昭

提出年月日 平成 30 年 1 月

## 目次

第1章 序論	1
第2章 方法	6
2-1 モデル	6
2-2 パラメーター推定および数値計算	8
第3章 結果および考察	13
3-1 2重定常状態と吸引域の境界	13
3-2 免疫細胞療法	28
第4章 総括	43
参考文献	45
謝辞	52

## 第1章 序論

細胞あるいは細胞集団は、シグナル分子濃度のダイナミクスにエンコードされた外部環境や細胞内状態の変化を感知し、遺伝子発現系を含む大規模な細胞内化学反応ネットワーク構造の自己組織化や自律的な再編を行うことにより、細胞増殖、細胞分裂、細胞分化、細胞運動の自己制御を行っている。分子生物学の爆発的な発展に基づき、遺伝子発現系や細胞内情報伝達系に見出されたポジティブフィードバック、ネガティブフィードバックを含むネットワークモチーフに対する数理モデルが多数提案され[1]、多重定常状態、振動など非線形ダイナミクスの観点から細胞機能の自己制御を理解しようとする方法論が定着しつつある。すなわち、細胞機能の自己制御が、安定定常状態やリミットサイクルなどのアトラクター間遷移、細胞内ネットワーク構造やパラメーターの変動によるアトラクターの生成・消滅を伴う分岐によって説明しうることを示す研究が行われてきた。細胞分化は一過性の誘導因子濃度上昇によって引き起こされる不可逆過程であるが、細胞内分化決定因子の自触媒生成と1次の消失の仮定に基づく saddle-node 分岐によってその不可逆性が説明され、幹細胞の非対称細胞分裂による細胞分化と幹細胞の再生産の過程については、同様のモデルが示す pitchfork 分岐として理解されうる[2]。細胞増殖因子や細胞分裂促進因子によって駆動される周期的なDNAの複製・分配過程である細胞周期は、複数のサイクリン依存性タンパク質リン酸化酵素とそれらに特異的な阻害因子との間のポジティブフィードバックループ、ネガティブフィードバックループからなる制御反応系に基づいている。この細胞周期は、実験的に明らかにされてきた反応スキームに基づく数理モデルを用いて、細胞サイズの増大に伴う連続する2つの saddle-node 分岐点とそれに続く長周期の振動をもたらす infinite-period 分岐点を経て細胞分裂後の細胞に対応する単一の安定定常状態に戻る過程であると解釈される[3]。酵母の連続する細胞分裂において、細胞周期に位相固定された数千に及ぶ遺伝子の転写の集団振動が観察されており、こ

これらの遺伝子は相互に位相固定された3つのクラスターを形成していることが知られている[4]。このことは、細胞内の複数のネットワークモジュールの活性の時間順序が振動子の位相固定によって規定されていること、複数の位相固定状態（アトラクター）間の遷移による制御が行われていることを強く示唆している。以上のようなアトラクター間遷移やアトラクターの生成・消滅という観点を細胞機能の理解に活用することの帰結として、細胞機能を人為的に創成する、あるいは制御することが考えられる。前者として、saddle-node 分岐や Hopf 分岐を示す人工遺伝子発現系の開発があり[5, 6]、現在合成生物学として数多くの研究成果が出ている。本研究は、後者、すなわち相互作用する細胞集団のダイナミクスをアトラクター間遷移を活用することによって制御することを目指したものであり、細胞集団として白血病細胞と免疫細胞との相互作用系を対象とする。がん細胞に対する現在の標準治療戦略は、遺伝子変異に基づく細胞内情報伝達系や遺伝子発現制御に関わる特定の変異タンパク質をターゲットとする分子標的薬の投与であるが、再発を回避しうる十分な治療効果は得られていない。一方で、がんの発生、進展、再発は遺伝子変異を起点とする細胞内および細胞間ネットワーク構造のエピジェネティックな発展や再編と見なすことができ、治療戦略を立案することは、ネットワークが発現するダイナミクスを制御する方策を見出すことに他ならない。

急性骨髄性白血病 (Acute myelogenous leukemia, AML) は、造血幹細胞あるいは造血幹細胞から細胞分化した前駆細胞における多数の遺伝子変異に起因する細胞増殖・分裂の亢進により、これら変異細胞から分化した白血病芽球細胞が末梢血および骨髄に蓄積し、正常な血液細胞の生成が抑制される血液がんの一種である。急性骨髄性白血病では、正常な造血幹細胞の増殖・細胞分化に関わるチロシンキナーゼ受容体 (FLT3) の変異など、AML を特徴付ける抗原性タンパク質の遺伝子変異が知られているが[7]、染色体転座等による遺伝子変異は 200 以上に及び、細胞ごとに遺伝子変異の程

度が異なるきわめてヘテロな細胞集団と認識されるべきである[8]。AML と診断された大多数の患者は、白血病芽球細胞をターゲットとする誘導化学療法の適用により、末梢血の白血球数が正常値に回復する血液学的完全寛解(Complete remission, CR)を達成し、そのCRを維持するための地固め療法として化学療法が維持されるにも関わらず再発に至り、5年生存率は約27%にとどまっている。化学療法下で生存維持され再発に寄与する細胞集団の抵抗性の一因は、初発段階で抗がん剤に適応的な遺伝子変異のセットをすでに獲得していることによると考えられている一方で[9]、白血病細胞と免疫細胞との相互作用による免疫抑制環境の時間的進展が、病態の進行、再発につながるとの仮説が有力視されつつある。

このような免疫抑制の成立に中心的な役割を担うのが転写因子 FoxP3 の発現によって特定される制御性T細胞(regulatory T cells, Treg)である。Treg細胞は、過剰なアレルギー反応や自己免疫を抑制するといった生理的に重要な役割を持っているが[10, 11]、AML患者ではTreg細胞数の顕著な増加が観察される[12]。AML患者の骨髄および末梢血では、白血病細胞表面に発現している抗原を特異的に認識する細胞障害性T細胞(Cytotoxic T cells, CTL)が観察される一方で、白血病細胞は細胞表面に免疫抑制活性を持つ様々な分子(programmed death-1(PD-1)受容体に対するリガンドであるPD-L1、indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)、細胞膜貫通型糖タンパク質CD200)[13-16]を過剰発現し、これらの分子を介したTreg細胞の前駆細胞への作用によって、Treg細胞の生成が促進され、CTLやナチュラルキラー(NK)細胞など白血病細胞を障害するエフェクターT細胞(Teff)の活性抑制に至ると考えられつつある。

このようにAMLにおける免疫抑制環境の進展とTreg細胞の中心的な関与が認識されつつあり、治療戦略として白血病細胞ではなく、Tregをはじめとする免疫抑制機構の制御が注目されている。化学療法後の再発を防ぐ治療法として、造血幹細胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)の有効性は認知されており、移植

された幹細胞由来の T 細胞が CR において残存している白血病細胞を障害すると考えられている。HSCT の有効性から、細胞障害活性を高めた T 細胞の移植や患者に内在する T 細胞の賦活を目的とするサイトカインの投与などが検討される一方で、免疫抑制に関わる Treg をターゲットとする免疫療法について現在盛んに研究されている。AML の病態が進行したマウスに対して、IL-2 diphtheria toxin (IL-2DH) を先行して投与することにより内在する Treg 細胞を除去した上で CTL 細胞を移植した場合、移植の効果が高まる [17]。Treg 細胞の増殖はサイトカイン IL-2 に依存しているが、IL-2DH は IL-2 受容体に拮抗的に結合して Treg に毒性を発揮する。再発した AML 患者に対して NK 細胞移植とともに IL-2DH の投与を行った場合、CR の維持時間の延長および再発率の低下が観察されている [18]。再発した AML 患者集団を対象とした Treg 細胞を除去した T 細胞移植のフェーズ I 臨床試験では、Treg 細胞除去の有効性が確認されている [19]。このように患者に内在する Treg が AML の治療戦略において注目されつつある。

本研究の目的は、Treg 細胞が関与する免疫抑制機構についての数理モデルを構築し、白血病細胞と免疫細胞との相互作用ネットワーク系が発現する非線形ダイナミクスを明らかにすることにより、免疫抑制機構の破たんを指向する AML 免疫細胞療法プロトコル設計に寄与することである。本研究では、白血病芽球細胞(L)、制御性 T 細胞(Treg)、CTL や NK 細胞など白血病幹細胞および白血病前駆細胞を障害するエフェクター T 細胞(Teff)、以上 3 種の細胞の末梢血における細胞濃度を変数とする常微分方程式モデルを提案する。白血病細胞と免疫細胞との相互作用に注目した先行研究 [20-22] におけるモデルでは、白血病細胞の増殖、白血病細胞による細胞障害性免疫細胞の増殖促進 (immunogenicity)、細胞障害性免疫細胞による白血病細胞の障害、以上のプロセスを共通に含み、白血病病態進行および化学療法の効果についての臨床知見とモデルのダイナミクスとの対応について検討している。慢性骨髄性白血病 (Chronic myelogenous leukemia, CML) におけるチロシンキナーゼを標的とするイマチニブの効

果については、白血病細胞数の増加に伴う細胞障害性免疫細胞の生成速度の減少という免疫抑制進展機構のモデルを用いて検討されている[23, 24]。白血病に限らず、がんの進展とその制御における免疫抑制の動態の重要性が認識されつつあり、がん細胞と免疫細胞との相互作用のモデルにおいて、PD1、CTLA-4 (CTL associated protein 4) など、免疫細胞表面に発現する免疫抑制性分子を考慮して放射線療法と免疫療法の組み合わせの効果を説明しようとする試みがなされている[25]。本研究におけるアイデアは、免疫抑制機構についての新規のモデルに基づき、発現するアトラクターと急性骨髄性白血病の病態との対応付けを行い、完全寛解(CR)や再発などの病態変化をアトラクター間遷移として捉えることにより、多数報告されている臨床知見を力学系の観点から理解し、治療戦略特に免疫細胞療法の設計に寄与しようとするものである。このアイデアは、がん細胞と免疫細胞との相互作用をモデル化した先行研究[26-28]においてすでに提案されている。しかしながら、これらのモデル[SR19-21]も含めて上述したモデルでは、Treg 細胞に基づく免疫抑制機構のモデル化は行われていない。本研究では、Treg 細胞に基づく免疫抑制機構に対する新規のモデルを提案し、そのダイナミクスによって急性骨髄性白血病に関する多くの臨床研究結果を説明することができることを示す。

## 第2章 方法

### 2.1 モデル

白血病芽球細胞(L)、制御性T細胞(Treg)、CTLやNK細胞など白血病幹細胞および白血病前駆細胞を障害するCTLやNK細胞などのエフェクターT細胞(Teff)から構成される免疫抑制モデルを図1に示した。図2に示す通り、CTL、NK細胞、Tregなど免疫細胞を含むすべての成熟血液細胞は、造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)、それぞれの前駆細胞(hematopoietic progenitor cell, HPC)、最終分化細胞という一連の細胞分化の連鎖からなる細胞系譜の末端に位置する。一方、白血病幹細胞(leukemic stem cell, LSC)、白血病前駆細胞(leukemic progenitor cell, LPC)はHSCあるいはHPCに遺伝子変異が蓄積した結果生じる[8]。LSCおよびLPCは高い細胞増殖・分裂能を獲得しており、本モデルに含まれる白血病芽球細胞(L)はLSCからLPCを経由して、あるいはLPCから細胞分化を経て大量に供給される[8]。また、白血病芽球細胞(L)では自発的細胞死(アポトーシス)が抑制されているため、骨髄および

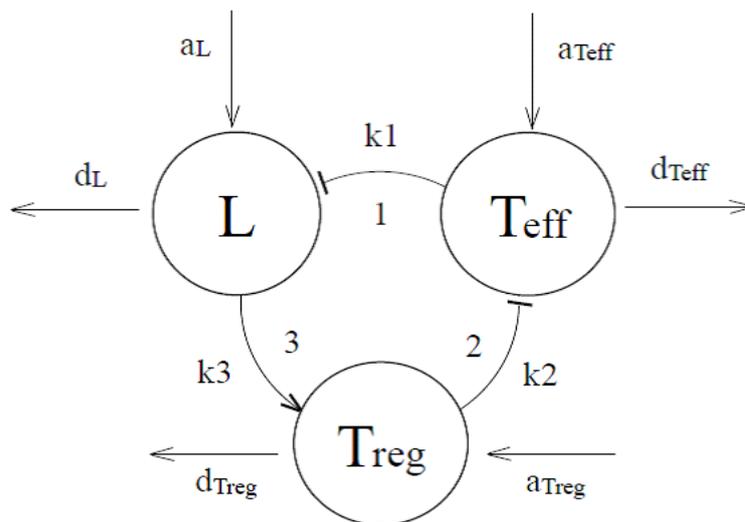


Figure 1. Mechanistic model for crosstalk among leukemic cells and immune cells in AML. The processes of cell-cell interaction are numbered as follows: 1. Leukemic stem cells and progenitor cells targeted by effector T cells, 2. Effector T cell suppression mediated by Treg, and 3. Treg formation promoted by leukemic blast cells (L).

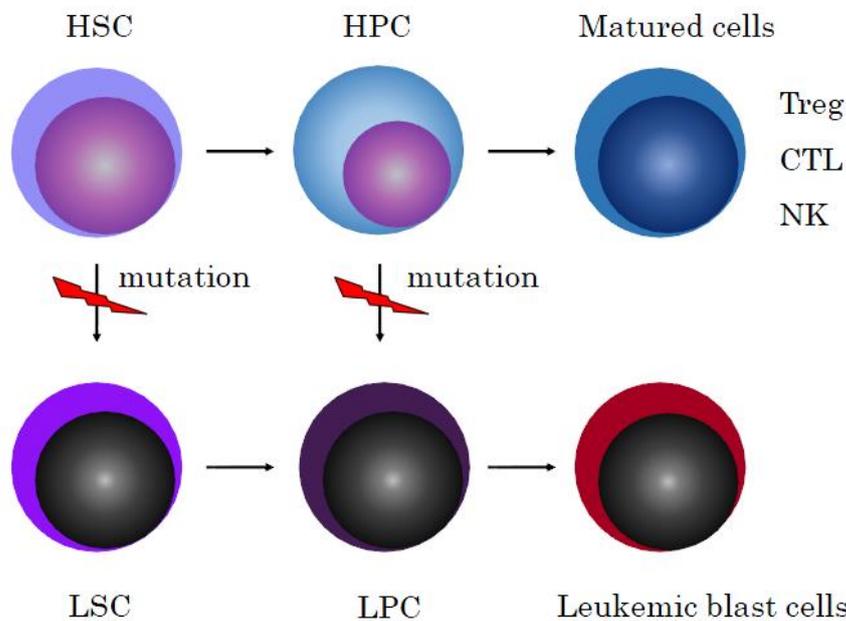


Figure 2. Leukemic and hematopoietic cell lineages. HSC:hematopoietic stem cell, HPC:hematopoietic progenitor cell, LSC:leukemic stem cell, LPC:leukemic progenitor cell.

末梢血での蓄積が進行する。本モデルでは、L、Teff、Treg の濃度の時間変化は、それぞれ一定の流入速度( $a_L$ ,  $a_{Teff}$ ,  $a_{Treg}$ )と1次のアポトーシス速度(速度定数  $d_L$ ,  $d_{Teff}$ ,  $d_{Treg}$ )によって決まる。L は LSC および LPC の細胞分化に基づき流入する。一方、Teff と Treg はともに最終分化した成熟細胞であり、これらは HSC およびそれぞれの HPC の細胞分化に基づき流入する。これらの流入速度( $a_L$ ,  $a_{Teff}$ ,  $a_{Treg}$ )は、それぞれの前駆細胞濃度には依存せず一定であると仮定される。L, Teff, Treg の間の相互作用は、相互作用の強度を示すしきい定数( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ )と Hill 係数  $p$  を用いて Hill 関数によって定式化した。細胞間の相互作用は、以下の実験研究報告に基づいている。

1) Teff による LSC および LPC のターゲッティング ([Teff] の増加に伴う  $a_L$  の減少) ; 慢性骨髄性白血病のマウスから単離された LSC は CTL によって認識され、LSC の細胞数が少ない条件下では CTL は LSC を殺傷することができる[29]。また、リンパ球を移植された AML 患者および CML 患者では、LSC および LPC を認識し殺傷する CTL が誘導される[30]。

2) Treg による成熟 Teff の抑制 ([Treg] の増加に伴う aTeff の減少) ; CD8(+)T 細胞の増殖・分裂とエフェクターT 細胞への分化は、IL-2 のオートクリン生成によるが、Treg 細胞が IL-2 を競合的に消費することによって間接的に Teff の生成が抑制される [31]。さらに、CD8(+)T 細胞によりオートクリン生成された IL-2 が Treg の生成を促進して Teff の生成が加速するループが存在する [32]。

3) L による Treg 生成の促進 ([L] の増加による aTreg の増加) ; 白血病芽球細胞が発現する免疫抑制活性を持つ分子 (programmed death-1 (PD-1) 受容体に対するリガンドである PD-L1、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)、細胞膜貫通型糖タンパク質 CD200) を介した Treg 細胞の前駆細胞への作用によって、Treg 細胞の生成が促進される [13, 14, 33, 34]。以上より、図 1 のモデルは、以下の常微分方程式で表される。

$$\frac{d[L]}{dt} = a_L \left( \frac{k_1^p}{k_1^p + [T_{eff}]^p} \right) - d_L [L] \quad (1.1)$$

$$\frac{d[T_{eff}]}{dt} = a_{T_{eff}} \left( \frac{k_2^p}{k_2^p + [T_{reg}]^p} \right) - d_{T_{eff}} [T_{eff}] \quad (1.2)$$

$$\frac{d[T_{reg}]}{dt} = a_{T_{reg}} \left( \frac{[L]^p}{k_3^p + [L]^p} \right) - d_{T_{reg}} [T_{reg}] \quad (1.3)$$

## 2.2 パラメーター推定および数値計算

式(1.2)および(1.3)に含まれるパラメーター(aTeff, aTreg, dTeff, dTreg)については、Kanakry ら [35] が報告している AML 患者に対する誘導化学療法後のリンパ球数の回復の時系列データから Teff と Treg の細胞数の時間変化を推定し、この推定値を再現するパラメーターの分布を MCMC (Markov chain Monte Carlo) 法を用いて推定し

た。SAS v. 9.4(SAS Institute. Carv. NC)のPROC MCMC を用いてパラメーター推定を行った。PROC MCMC では、式(1.2)および(1.3)の数値解を尤度関数の構成に用いて、 $\exp(\beta + \alpha)$  ( $\beta$  は固定効果、 $\alpha$  はランダム効果)としてモデル化した未知パラメーターを推定する。4つの未知パラメーターの $\beta$ の事前分布として $N(0, 10)$ を用い、MCMC ステップ数は20000回とした。

Kanakry らは、誘導化学療法を適用した患者における化学療法直後のリンパ球回復のタイムコースを測定し、またフローサイトメトリ法を用いてリンパ球のサブセット解析を行っている[35]。回復してくるリンパ球の平均73%がCD3(+)細胞であった。さらに、CD3(+)の16.7%がCD3(+)CD4(+)、66.4%がCD3(+)CD8(+)であった。CTLはCD3(+)CD8(+)に対応する。一方、Tregは、FoxP3を発現しているCD3(+)CD4(+)のサブグループであるが、CD3(+)CD4(+)の10.5%がこのTregとして同定された。Kanakry らは、全リンパ球数の回復曲線とともに上記のリンパ球のサブセットの内訳を報告しているため、リンパ球の回復過程においてサブセットの割合が変化しないと仮定して、各タイムポイントでのCTLとTregの細胞数を算出した。図3にその結果を示した。

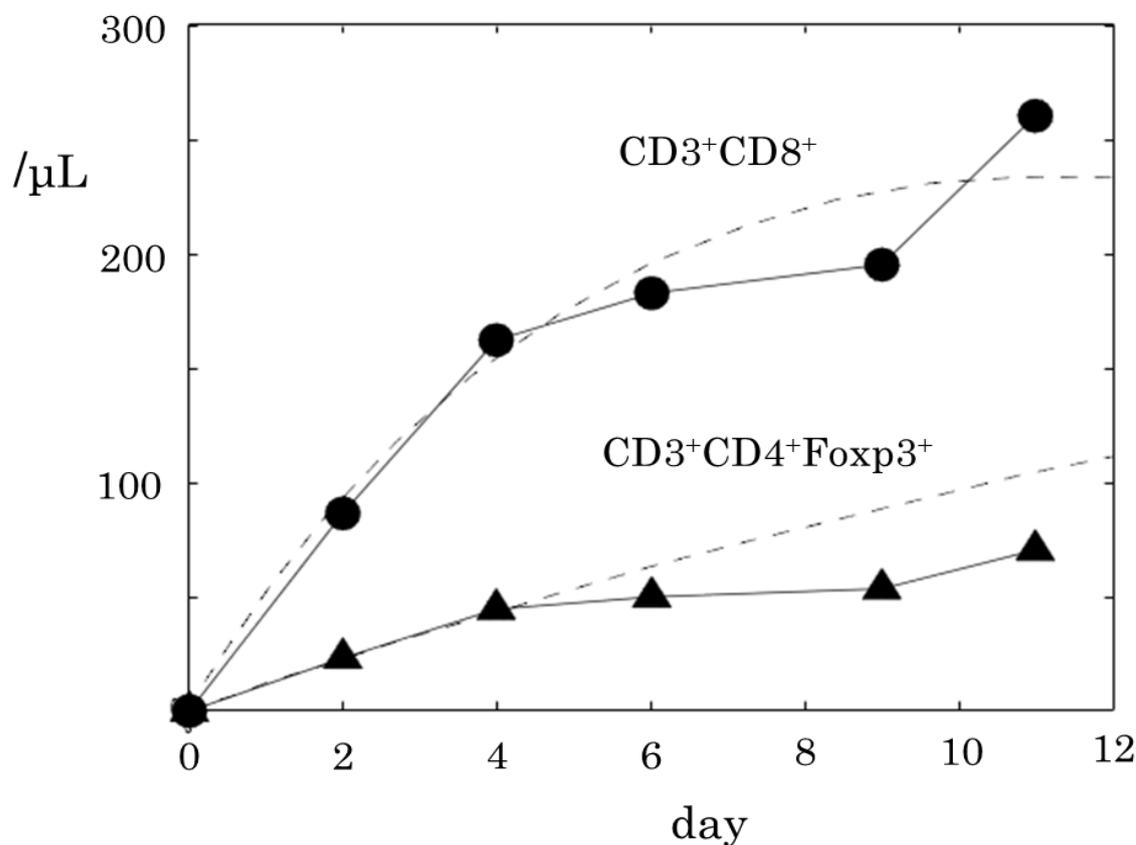


Figure 3. Time courses of counts of CD3+CD8+ cells (CTLs, closed circles) and CD3+CD4+Foyp3+ cells (regulatory T cells, closed triangles) estimated from lymphocytes recovery after induction chemotherapy reported by Kanakry et al.[37]. Dashed lines show time courses of [Teff] and [Treg] obtained by numerical integration of eqs (1.2) and (1.3) with  $a_{Teff}=56.53$ ,  $a_{Treg}=198.2$ ,  $d_{Teff}=0.2$  and  $d_{Treg}=0.04$  estimated by MCMC method.

Kanakry らが注目した誘導化学療法直後のリンパ球回復過程は、末梢血における白血球数が正常範囲に戻った完全寛解(complete remission, CR)に入った時期であると解釈される。CRにおける[L]は準定常状態([L]<sub>ss</sub>)にあると仮定し、図3におけるTeff および Treg の回復データと式(1.2)および式(1.3)に基づき、MCMC法を用いてパラメーター( $a_{Teff}$ ,  $a_{Treg}$ ,  $d_{Teff}$ ,  $d_{Treg}$ )の推定を行った。AMLにおける完全寛解(CR)は、骨髄において白血病芽球細胞(L)が全有核細胞の5%以下である状態と臨床的

に定義されているが、CRにおける末梢血でのLの占有率についての明確な定義は行われていない。CRでの末梢血におけるLが白血球数の0-5%の範囲では、再発までの時間 (relapse free survival, RFS)に有意差がないとの報告[36]に基づき、末梢血での正常白血球数 $10000/\mu\text{L}$ 、CRでのLが1%と仮定して、 $[L]_{ss}=100/\mu\text{L}$ としてパラメータ一推定を行った。その結果、4つのパラメーターの $\beta$ の平均値と標準偏差は、 $\beta(a_{\text{Teff}})=4.03\pm 0.47$ 、 $\beta(a_{\text{Treg}})=5.29\pm 1.08$ 、 $\beta(d_{\text{Teff}})=-1.06\pm 0.78$ 、 $\beta(d_{\text{Treg}})=-3.23\pm 2.74$ であった。この平均値から、 $a_{\text{Teff}}=56.53$ 、 $a_{\text{Treg}}=198.2$ 、 $d_{\text{Teff}}=0.2$ 、 $d_{\text{Treg}}=0.04$ とした。本研究で用いたパラメーターの値を表1に示した。

Symbol	Value
<b>cell influx</b>	
$a_L$	$0.1 \cdot 1000 \mu\text{L}^{-1}\text{day}^{-1}$
$a_{\text{Teff}}$	$56.53 \mu\text{L}^{-1}\text{day}^{-1}$
$a_{\text{Treg}}$	$198.2 \mu\text{L}^{-1}\text{day}^{-1}$
<b>cell decay</b>	
$d_L$	$0.0001 - 1.0 \text{day}^{-1}$
$d_{\text{Teff}}$	$0.2 \text{day}^{-1}$
$d_{\text{Treg}}$	$0.04 \text{day}^{-1}$
<b>cell interaction</b>	
$k_1$	$1 - 1000 \mu\text{L}^{-1}$
$k_2$	$160 \mu\text{L}^{-1}$
$k_3$	$200 \mu\text{L}^{-1}$
<b>hill coefficient</b>	
$p$	1-10

Table 1: Parameter Values Used in the Simulation

式(1)の3つのヌルクライン ( $d[L]/dt=0$ ,  $d[\text{Teff}]/dt=0$ ,  $d[\text{Treg}]/dt=0$ )の交点である定常状態は、nleqslv R-package [37]を用いてニュートン法で数値的に求めた。

式(1)の常微分方程式については、MATLAB Ver. 7.13 (The Mathworks, Inc.) の

ode23 を用いて数値解を求めた。

$a_L$ 、 $d_L$ 、 $k_1$  については表 1 に示す広い範囲でダイナミクスを探索し、単一の安定な定常状態または安定な 2 つの定常状態が存在することが判明したが、本モデルがリミットサイクルなど他のダイナミクスを持つことを否定はできない。 $k_2$ 、 $k_3$ 、 $p$  については安定な 2 つの定常状態が生じる値に固定した。

薬剤投与時間における体内での薬剤濃度は一定とし、薬剤による  $L$ 、 $T_{eff}$ 、 $T_{reg}$  の消失速度は、それぞれの細胞濃度に比例すると仮定すると、薬剤の効果はアポトーシスによる消失速度定数に含めることができるため、誘導化学療法は、薬剤投与時間における  $d_L$ 、 $d_{T_{eff}}$ 、 $d_{T_{reg}}$  の増大としてモデル化した。 $T_{eff}$  の細胞移植および  $T_{reg}$  のターゲティングは、 $[T_{eff}]$  および  $[T_{reg}]$  の瞬時増加および瞬時減少としてモデル化した。

### 第3章 結果および考察

#### 3.1 2重定常状態と吸引域の境界

図4は、パラメーター $k_2$ 、 $k_3$ 、 $p$ の値に対する $L$ 、 $T_{eff}$ 、 $T_{reg}$ の定常濃度の依存性を示している。2つの安定な定常状態と1つの不安定な定常状態が広いパラメーター範囲で認められる。

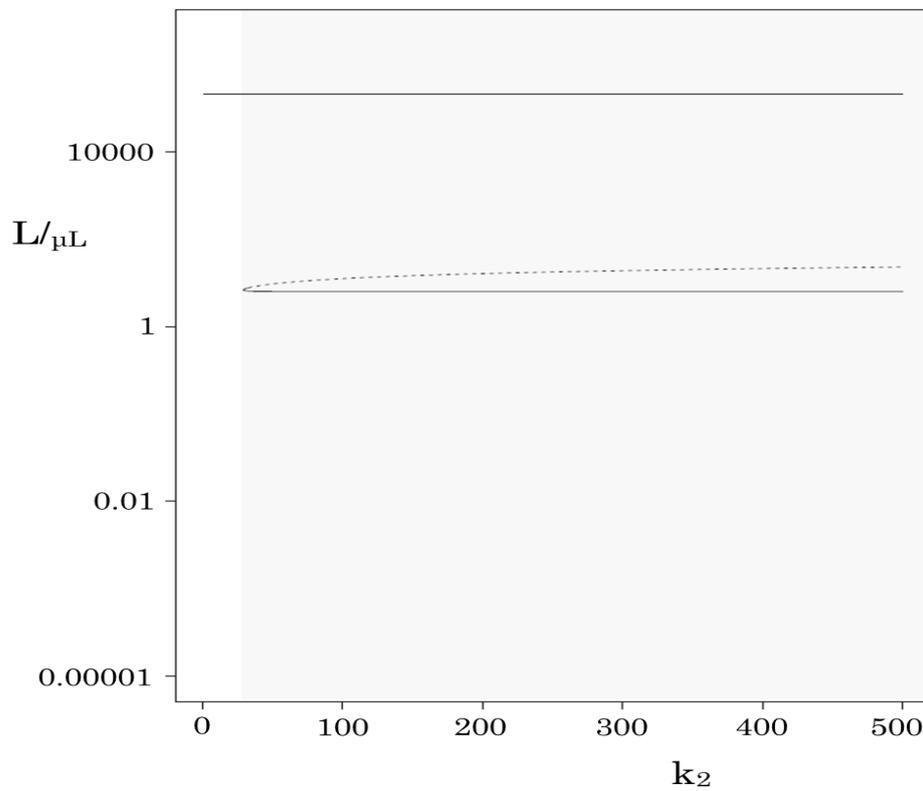


Figure 4(a).

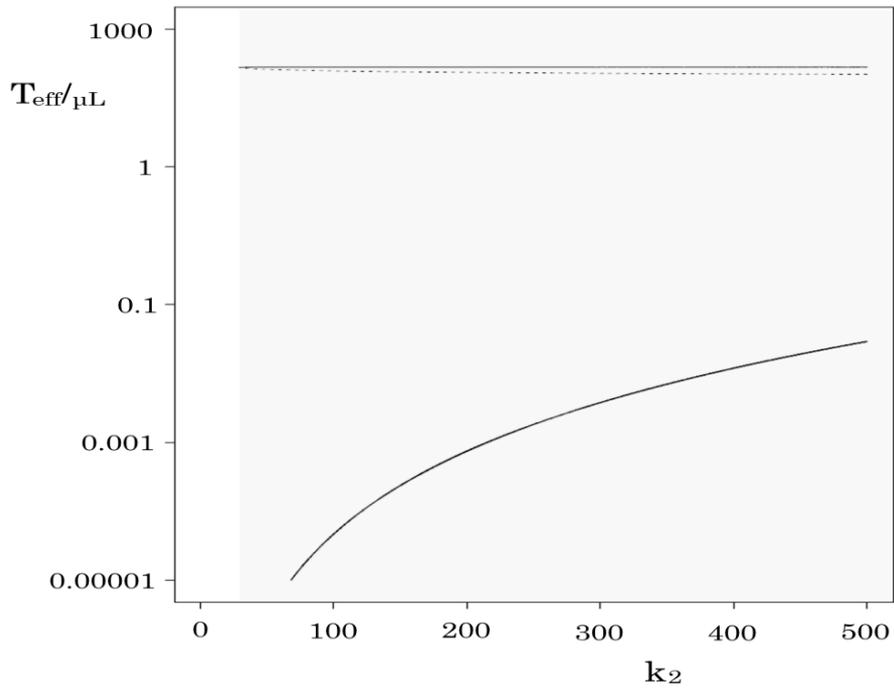


Figure 4(b).

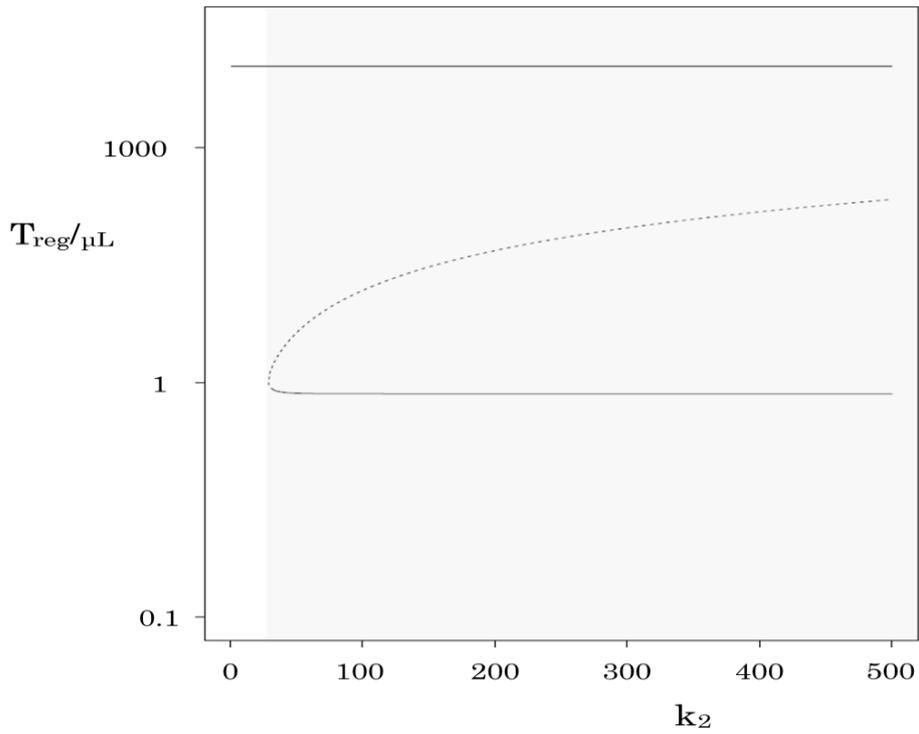


Figure 4(c)

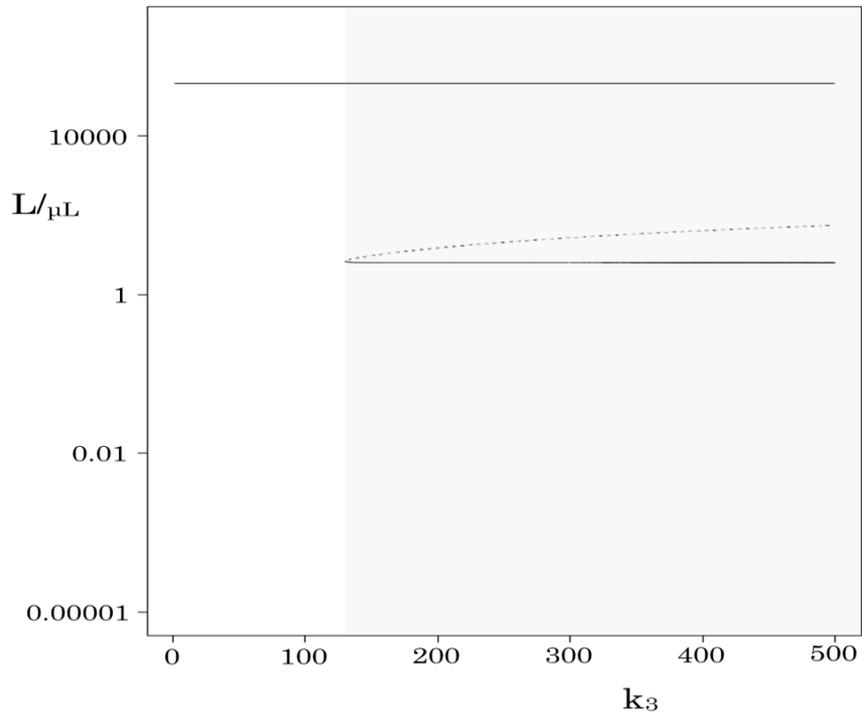


Figure 4(d)

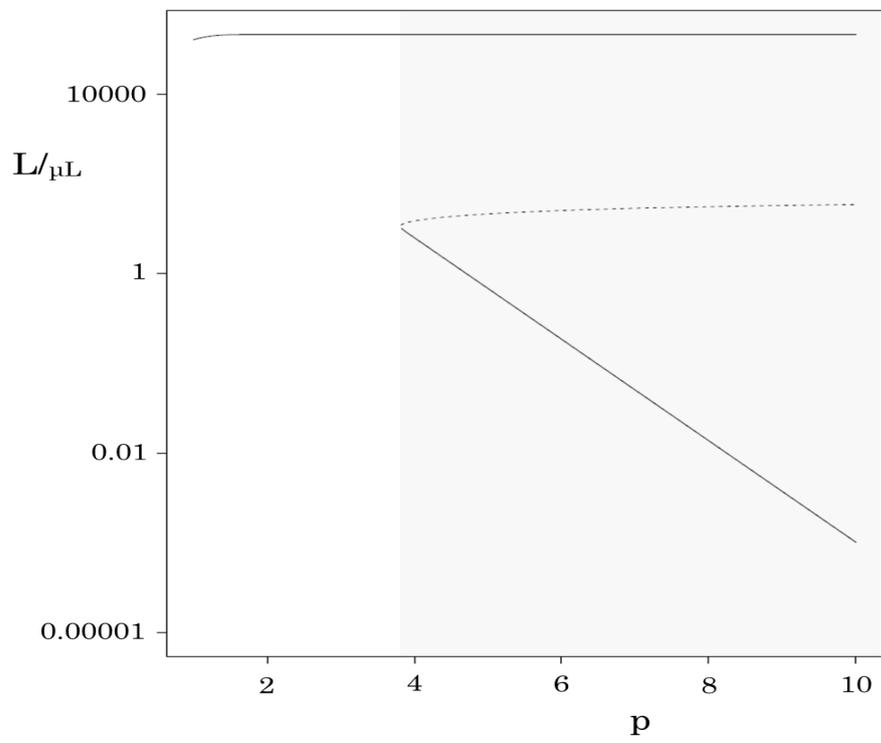


Figure 4(e).

Figure 4. Steady states as a function of the threshold constant  $k_2$  of a) leukemic blast cells (L), b) mature effective T cells (Teff), and c) mature regulatory T cells (Treg), and of the threshold constant  $k_3$  of d) leukemic blast cells (L), and of the Hill coefficient  $p$  of e) leukemic blast cells (L). Steady states along the solid lines are stable and steady states along dashed lines are unstable. Parameter ranges characterized by the existence of two stable steady states separated by an unstable fixed point are marked by gray backgrounds. Parameter values are  $a_L=1000$ ,  $a_{Teff}=56.53$ ,  $a_{Treg}=198.2$ ,  $d_L=0.01$ ,  $d_{Teff}=0.2$ ,  $d_{Treg}=0.04$ ,  $k_1=40$ ,  $k_3=200$ ,  $p=4$  for a), b), c) ,and  $a_L=1000$ ,  $a_{Teff}=56.53$ ,  $a_{Treg}=198.2$ ,  $d_L=0.01$ ,  $d_{Teff}=0.2$ ,  $d_{Treg}=0.04$ ,  $k_1=40$ ,  $k_2=160$ ,  $p=4$  for d), and  $a_L=1000$ ,  $a_{Teff}=56.53$ ,  $a_{Treg}=198.2$ ,  $d_L=0.01$ ,  $d_{Teff}=0.2$ ,  $d_{Treg}=0.04$ ,  $k_1=40$ ,  $k_2=160$ ,  $k_3=200$  for e).

図5は、[L]が高い安定定常状態にある系に対して、化学療法を適用した時の[L]、[Teff]、[Treg]のタイムコースを示している。過渡的な完全寛解(CR)を経て、再び元の安定定常状態に戻っており、AMLの再発に対応している。図4で認められる2つの安定定常状態は、白血病芽球細胞(L)が増大している状態(SShigh)と[L]が低い状態(SSlow)が長期間にわたり維持される long-termCR と見なすことができる。

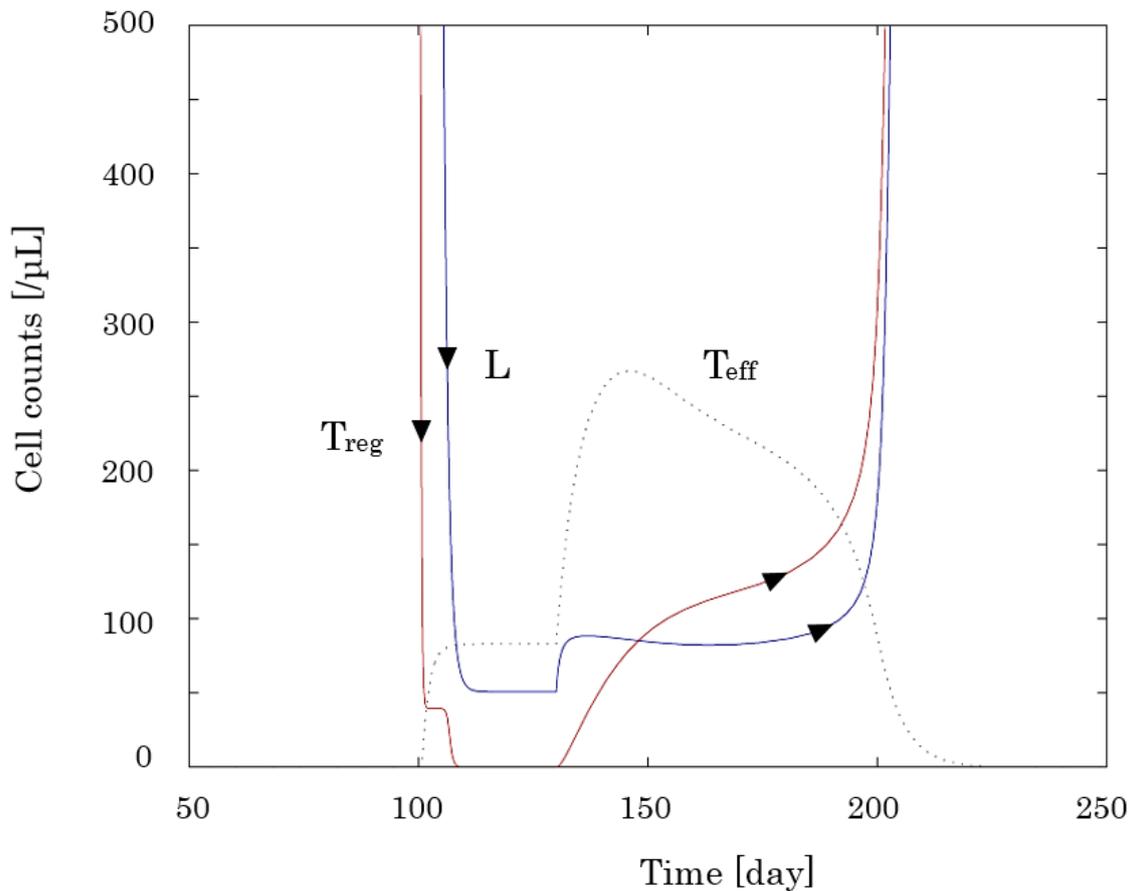


Figure 5. Time courses of [L], [Teff] and [Treg] after chemotherapy applied for the system staying at SShigh. Solid lines are for [L] (blue) and [Treg] (red) and dots are for [Teff]. Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aTeff=56.53$ ,  $aTreg=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dTeff=0.2$ ,  $dTreg=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ . The chemotherapy was applied with enhanced apoptosis rate constants ( $dL=1.0$ ,  $dTeff=0.68$ ,  $dTreg=5.0$ ) during 30 days. The system goes towards the original SShigh after the chemotherapy with transient increase of [Teff], which corresponds to the state of CR.

図 6 aは、SShigh([L]=100000/ $\mu$ L、[Teff]=0.00031/ $\mu$ L、[Treg]=4955/ $\mu$ L、濃度空間内の位置は図外)にある系に対して、化学療法を適用した場合の軌道を示している。Lに対するアポトーシス速度定数 dL の値を増加させることにより、化学療法により到達する状態点が移動する。到達した状態点に依存して、再び元の SShigh に戻る (再発する) か、[L]が低い安定な定常状態 SSlo([L]=40/ $\mu$ L、[Teff]=283/ $\mu$ L、[Treg]=8/ $\mu$ L)に到達する (long-term CR となる)かに分かっている。これは、SShigh と SSlo のそれぞれの吸引域 (basin) とその境界 (basin boundary) の存在を示している。

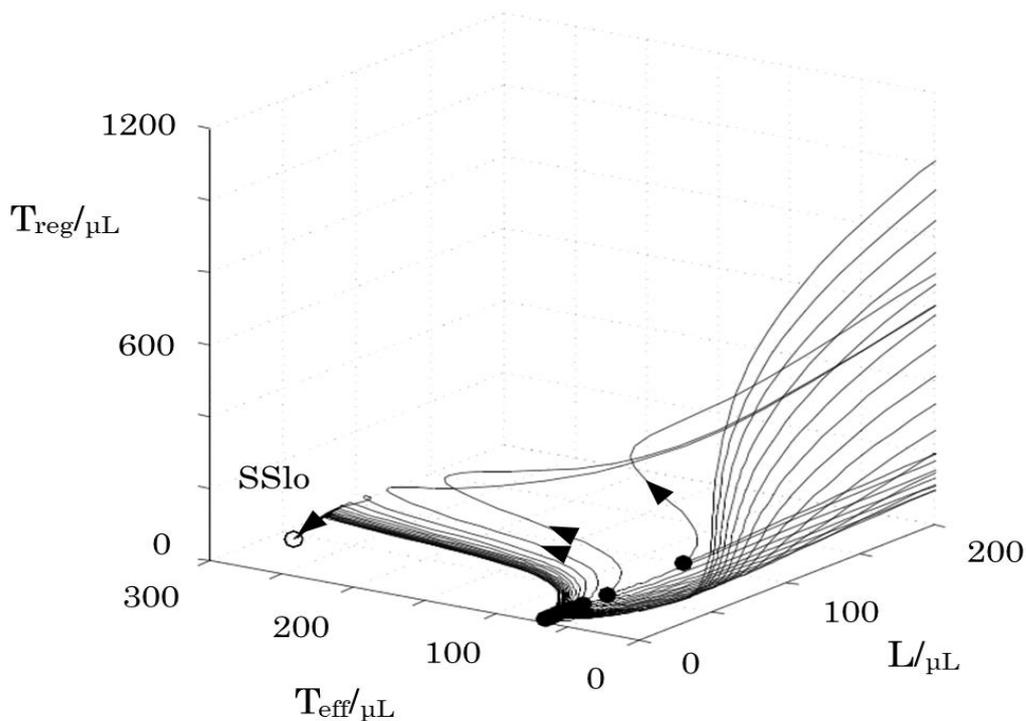


Figure 6(a). The trajectories from SShi (not shown in figure) after chemotherapy with different values of dL. The locations of the state produced by chemotherapy are denoted by closed circles. For higher dL, the trajectories with dL beyond a critical value change direction from returning to SShi to converging to SSlo, suggesting two basins of attraction. SShi ([L], [Teff], [Treg] = 100000/ $\mu$ L, 0.00031/ $\mu$ L, 4955/ $\mu$ L, out of figure) and SSlo ([L], [Teff], [Treg] = 40/ $\mu$ L, 283/ $\mu$ L, 8/ $\mu$ L, open circle in figure) were calculated with dL=0.01. Other parameter values are aL=1000, aTeff=56.53, aTreg=198.2, dTeff=0.2, dTreg=0.04, k1=40, k2=160, k3=200, p=4. For the chemotherapy duration of 10 days, decay rate constants were dTeff=0.8, dTreg=5.0 and dL was changed from 1.0 to 20.0.

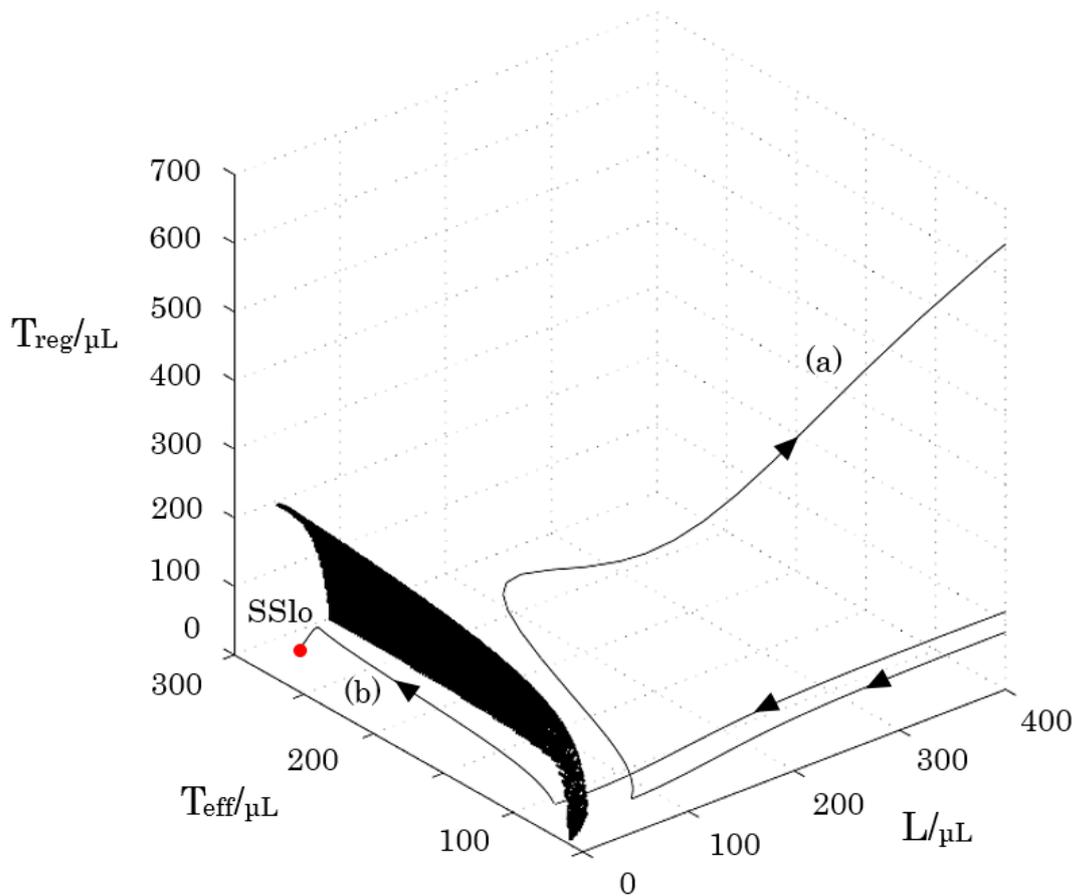


Figure 6(b). The basin boundary denoted by a dotted plane and two trajectories from SShigh (out of figure). Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aTeff=56.53$ ,  $aTreg=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dTeff=0.2$ ,  $dTreg=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ . Two trajectories from SShigh by applying chemotherapy during (a) 10 days and (b) 30 days were calculated with  $dL$ ,  $dTeff$ ,  $dTreg$  of the values of (a)  $dL=1.0$ ,  $dTeff=0.75$ ,  $dTreg=5.0$  and (b)  $dL=1.0$ ,  $dTeff=0.6$ ,  $dTreg=5.0$ .

濃度空間内の任意の状態点から SShigh、SSlow のいずれに到達するかを調べることによって推定した吸引域の境界を図 6 b に示した。図 6 a, b の SShigh に戻る軌道に注目すると、SSlow の方向に吸引されている、あるいは吸引域に巻き付くことがわかる。このことから、吸引域の近傍を通過して SShigh に戻る軌道は、より長い時間を吸引域近傍で使うことが予想される。

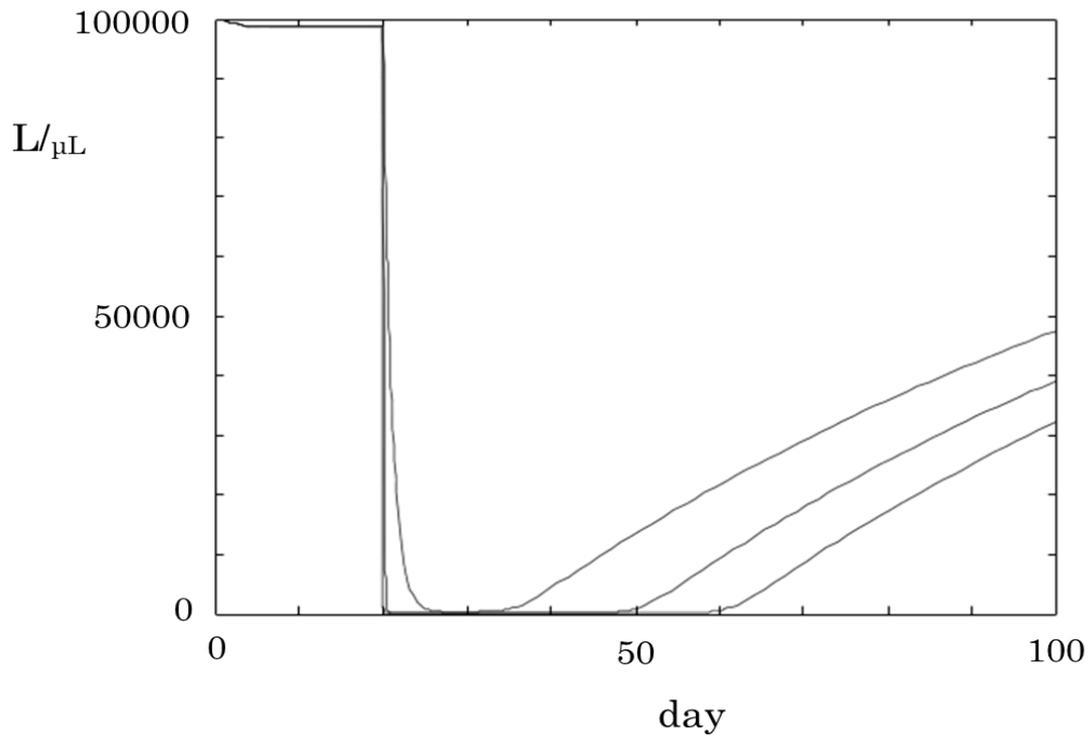


Figure 7. Time courses corresponding to the trajectories returning to SShi. The start of relapse is delayed with increasing  $dL$ . Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aTeff=56.53$ ,  $aTreg=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dTeff=0.2$ ,  $dTreg=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ . For the chemotherapy duration of 10 days, decay rate constants were  $dTeff=1.0$ ,  $dTreg=5.0$  and  $dL$  were 1.0, 10.0 and 100.0.

図7は、 $SS_{high}([L]=100000/\mu L)$ にある系に対して化学療法を適用した場合の $[L]$ のタイムコースを示しており、 $dL$ の値によって $SS_{high}([L]=100000/\mu L)$ に戻るまでの時間が異なり、 $[L]$ の値が低く保たれる過渡的なCRの時間がより長いタイムコースは、吸引域の境界近傍を通過する軌道に対応すると考えられる。図8は、 $SS_{high}$ の吸引域を示しており、吸引域内の各状態点を示す点の大きさが、その状態点から $SS_{high}$ に至るまでの時間に比例している。 $SS_{high}$ と $SS_{low}$ の吸引域の境界近傍に位置する状態点から $SS_{high}$ に到達するまで、より時間を要することがわかる。以上のことから、本研究で用いたモデルにおいて、2つの安定な定常状態( $SS_{high}$ と $SS_{low}$ )と、それら2つの定常状態の吸引域を分ける境界が存在する。さらに、2つの安定な定常状態の吸引域

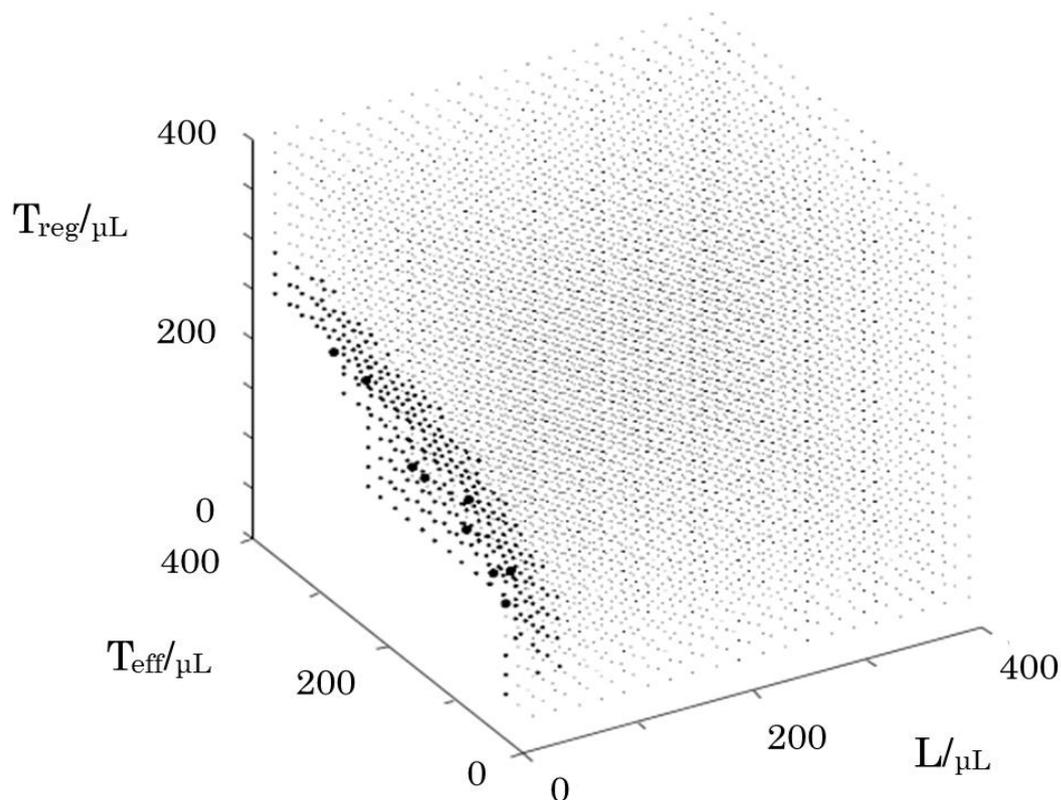


Figure 8. The basin of attraction of SShi. The size of each dot in the basin indicates the time required for the system to arrive at SShi from the state denoted by a dot. It takes longer for the system to arrive at SShi from states distributed along the basin boundary. Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aT_{eff}=56.53$ ,  $aT_{reg}=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dT_{eff}=0.2$ ,  $dT_{reg}=0.04$ ,  $k_1=40$ ,  $k_2=160$ ,  $k_3=200$ ,  $p=4$ .

の境界近傍を通過して SShigh に戻る軌道は、臨床的に観察される長い CR の時間を経て再発に至る場合に対応すると解釈される。

本研究のモデルは、図 4 に示されるように saddle-node 分岐を伴い 2 つの安定な定常状態を持つ。本研究では、 $[L]$  が高い定常状態を AML が進行して安定した状態、 $[L]$  が低い定常状態を long-term CR に対応づける。Kanakry らによる臨床データに基づき一部のパラメータ推定を行い、それらに基づき得られた SShigh と SSlow の  $[L]$  の値は、臨床的に妥当なものである。このように AML の病態を 2 つの安定な定常状態の吸引域とその境界の枠組みから見ると、AML の予後は吸引域の境界を越えて SSlow の

吸引域に系が移動できるかどうかによって決まることになる。2つの安定な定常状態の吸引域の境界をまたぐ系の移動とがんの化学療法・免疫療法の効果とを関連づけるアイデアは de Pillis らによってすでに提案されている [26]。彼らは、がん細胞 (T)、NK 細胞 (N)、CD8 (+) 細胞 (L)、(NK 細胞、CD8 (+) 細胞を除く) リンパ球細胞 (C)、以上 4 つの細胞種の相互作用系についての数理モデルを提案している。本研究で焦点を当てた免疫抑制機構についても考慮しており、がん細胞 (T) とがん細胞障害活性を持つ NK 細胞 (N)、CD8 (+) 細胞 (L) との相互作用により N、L とともに自分自身の濃度とがん細胞の濃度に比例する N、L の 2 次の消失速度を仮定してモデル化している。このモデルでは、[T] に依存する L の生成速度項に含まれる速度定数を分岐パラメーターとして、[T] が高い安定定常状態と不安定定常状態の saddle-node 分岐とともに、[T]=0 の不安定定常状態が同じく [T]=0 の安定定常状態へと transcritical 分岐することを示しており、この結果から、化学療法によって [T] を 0 近傍まで低下させることができたとしても、同時に [L] の濃度が化学療法によって transcritical 分岐点に関連する閾値以下まで低下すれば、[T] が高い安定定常状態に到達するが、免疫療法と組み合わせることによって transcritical 分岐点を越える [L] の増加が可能であれば、[T]=0 の安定な定常状態に到達させることができると予想し、そのことを証拠づけるシミュレーション結果を得ている [26]。Lu らは、がん細胞 (C)、樹状細胞 (D、dendritic cell)、キラー細胞 (K) の相互作用系についての数理モデルを提案している [28]。このモデルでは、細胞障害性 T 細胞 (CTL)、NK 細胞ばかりでなくヘルパー T 細胞など協調してがん細胞を障害する細胞集団を一つの細胞種 (キラー細胞 (K)) としてモデル化している。樹状細胞 (D) は、がん細胞 (C) の抗原を細胞表面に提示してキラー細胞 (K) の増殖・分裂を促す。がん細胞の存在ががん細胞を障害する免疫細胞の増殖・分裂を促す過程は、immunogenicity として知られ、がんと免疫との相互作用に関する多くの数理モデルで共通に考慮されており、de Pillis らのモデルには上記の通りがん細胞 (T) の濃度に依存した CD8 (+) 細

胞(CTL に対応)の生成速度項としてモデル化されている。Lu らは、樹状細胞(D)を導入することによって、この過程の精緻化を行っている。樹状細胞(D)の導入によるもう一つの特徴は、[C]がある閾値以上になった場合はDの生成を抑制する項を導入することであり、Cはこの過程を経て間接的にKの生成を抑制する。このCによるDの抑制とともに、CによるKの生成の直接の抑制を導入しており、これら2つの過程によって免疫抑制機構のモデル化を行っている[28]。Luらのモデルでは、KがCを認識する強度パラメーター( $\rho$ )を分岐パラメーターとして、 $\rho$ の0からの増加に伴い、連続する4つの saddle-node 分岐が起こり、狭いパラメーター範囲に限定されるが、2つの不安定定常状態を伴う3つの安定定常状態([T]が低、中、高)が存在する領域が生じ、放射線療法と免疫療法を組み合わせることによって中程度の[T]の安定定常状態を経由して高い[T]の安定定常状態から低い[T]の定常状態への遷移が可能であることを示すシミュレーション結果を報告している[28]。本研究で作成したモデルでは、de Pillisら[26]やLuら[28]のモデルでは考慮していない免疫抑制機構において中心的な役割を担う制御性T細胞(Treg)を新規に導入した。本研究のモデルは、de PillisらやLuらのモデルと同様に saddle-node 分岐を伴う多重定常状態を生じる一方、de Pillisらのモデルでは認められない白血球芽球細胞(がん細胞)の濃度が0ではない、AMLの病態として重要な長期に及ぶ完全寛解(long-term CR)の状態を再現しており、またその状態での白血球芽球細胞の定常濃度は臨床的に妥当な値を示す。一方、Luらのモデルでは、がん細胞の濃度が0ではない中程度の濃度および低い濃度に保たれる2つの安定定常状態を生じているが、これらについては臨床知見に基づく検証が必要と考えられる。

本研究のモデルでは、AML患者の完全寛解(CR)に入った直後のTeffとTregの回復タイムコースに基づき推定したパラメーター値を用いた結果、臨床的に妥当な[L]の値を持つ2つの安定定常状態とその2つの吸引域の境界の存在が予想される。吸引域

の境界の存在を支持する臨床知見として、再発するかどうかを分ける AML の微小残存病変(MRD、minimal residual disease)の指標の閾値の存在を提案する。誘導化学療法とそれに続く地固め療法等による化学療法の維持によって到達した CR の状態においても、骨髓および末梢血ではわずかな細胞数の白血病芽球細胞(L)が残存しており、この MRD が再発の主要因と考えられている。残存するわずかな白血病芽球細胞を細胞形態学的に同定することは難しいため、細胞表面に発現している抗原と特異的に結合する蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリ法による定量、あるいは白血病芽球細胞で特異的に遺伝子発現している転写産物の RT-qPCR(quantitative real-time polymerase chain reaction)法による定量によって残存する細胞数を同定することができる[38, 39]。Lin Yin らは、CR 状態にある AML 患者の骨髓および末梢血での 2 つの融合転写産物 RUNX1-RUNX1T1 および CBFβ-MYH11 を RT-qPCR 法によって定量し、骨髓および末梢血において細胞形態学的に検出可能なまでに細胞数が再増加する(血液学的再発)かどうかを分ける CR での転写産物数の閾値を報告している[40]。RUNX1-RUNX1T1 については、CR において骨髓でのコピー数 500 以上で血液学的再発率が 100%、500 以下の場合には同再発率は 7%、末梢血ではコピー数 100 以上で同再発率が 100%、100 以下の場合には同再発率は 7%であった。CBFβ-MYH11 については、CR において骨髓でのコピー数 50 以上で血液学的再発率が 100%、50 以下の場合には同再発率は 10%、末梢血ではコピー数 10 以上で同再発率が 97%、10 以下の場合には同再発率は 7%であった。同様に、CR に続いて血液学的再発を予測する MRD の閾値の存在が報告されている[41-43]。2 つの安定定常状態の吸引域の境界の存在は、MRD ばかりでなく T<sub>H</sub>1 の 1 種である NK 細胞の移植の有効性を分ける NK 細胞数の閾値の存在によっても支持される。Curti らは、CR の状態にある AML 患者に対して維持療法として NK 細胞を移植し、移植後に定着したドナー由来の NK 細胞のうち患者の白血病芽球細胞を障害する活性を持つ NK 細胞が 8%以上であれば、48 か月の観察期間での再発を防ぐことができることを示

している[44]。

AMLの予後と2つの安定定常状態の吸引域の境界とそれに伴う軌道との対応付けを行うと、境界を越えずにSShighに戻る軌道では、境界近傍を通過する軌道に対応する病態経過の場合が境界から離れてSShighに戻る場合よりも予後が良いことが予想される。境界近傍を通過している状態は、再発前の過渡的なCRの状態に対応するが、この状態でCRの維持療法として行われる地固め療法としての化学療法あるいは造血幹細胞移植が行われ、[L]のわずかな減少や[Teff]のわずかな増加によって吸引域の境界を越えてSSlowに到達することができると予想される。2つの吸引域の境界近傍を通過する場合は、図6aおよび図8に示した通り、CRの維持時間あるいは再発に至るまでの時間が長く、またSSlowの方向への吸引力的な軌道に対応して[Teff]の過渡的な上昇が予想される。Michelisらは、2回目のCRの状態にあるAML患者について、後方的に誘導療法によって達成した1回目のCR(CR1)の時間と2回目のCR(CR2)の期間に適用された造血幹細胞移植の効果との間の相関について調べた。CR1の時間が6か月以上のグループ(n=188)と6か月以下のグループ(n=39)では、造血幹細胞移植後の5年生存率が53%と23%であり、CR1が6か月以上のグループの生存率が有意に高かった[45]。本研究の結果に基づき、CR1が長い場合は、2つの安定定常状態の吸引域の境界に近い領域を通過してSShighに戻り、再び化学療法によって過渡的なCR(CR2)の状態に入った後も、境界に近い領域を通過することが予想される。境界に近い領域を通過している時間帯(CR2)での造血幹細胞移植による[Teff]の増加に伴い、系が境界を越えてSSlowの吸引域に入る可能性が高まる。このことによりCR2後の生存率の上昇が説明できる。本モデルから予想される吸引域の境界近傍を通過する場合、SSlowに吸引力的な軌道に対応して[Teff]の増加が予想される。吸引域近傍を系が通過することは予後が良いことに対応すると考えられるため、CRでの[Teff]の増加と予後の良さは相関することが予想される。このことは、誘導化学療法後に到達したCRでのリンパ球の回

復の程度と5年生存率との間で正の相関が認められること[46]によって支持される。

以上の通り、本研究のモデルから予想されるダイナミクスによって、AMLに関する臨床知見をうまく説明することができる。

本研究のモデルが示す2つの安定定常状態(SShigh、SSlow)を、AMLの病態が進行して安定した状態と長期にわたり持続している完全寛解(long-term CR)とに対応させた。この枠組みではAMLの再発は、過渡的な完全寛解を経て元のSShighに戻る過程となる。つまり、モデルパラメーターの値の変化は考慮せずに、AMLの再発を説明している。モデルパラメーターの値が変化する場合、SShighの濃度空間での位置は変化し、再発後に誘導化学療法と同じ化学療法を適用しても同じ軌道を通過することはない。化学療法によって遺伝子変異がさらに進むことによって、白血病芽球細胞の流入速度 $a_L$ などモデルパラメーターの値が増加することはあり得る。この場合は、図9に示すように、 $a_L$ の増加とともに saddle-node 分岐点を通過して[L]が高い安定定常状態に遷移することによって再発を説明することができる。

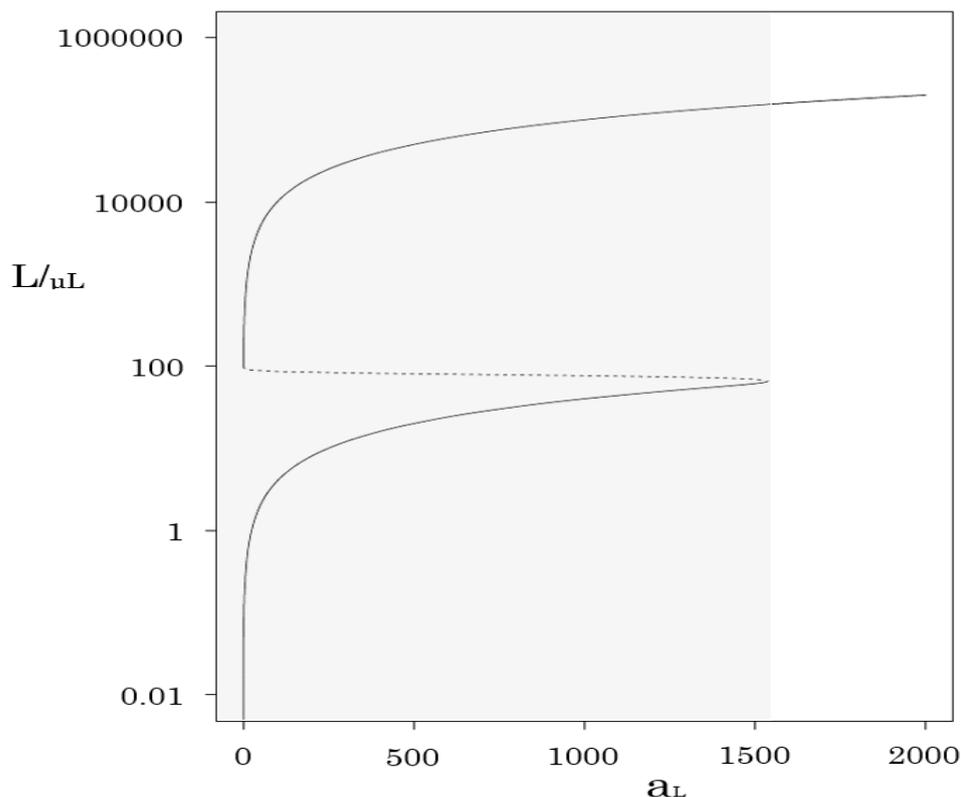


Figure 9. Steady states as a function of the influx rate  $aL$  of leukemic blast cells (L). Steady states along the solid lines are stable and steady states along dashed lines are unstable. Parameter ranges characterized by the existence of two stable steady states separated by an unstable fixed point are marked by gray backgrounds. Parameter values are  $aT_{eff}=56.53$ ,  $aT_{reg}=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dT_{eff}=0.2$ ,  $dT_{reg}=0.04$ ,  $k_1=40$ ,  $k_2=160$ ,  $k_3=200$ ,  $p=4$ .

誘導化学療法とそれに続く過渡的な完全寛解、再発の過程でパラメーターの変化が実際に起こっているかどうか、臨床知見に基づき検討することができる。Hiddemann らは、1 回目の CR (CR1) を経て再発し、再び化学療法 (TAD9、thioquanine+cytosin arabinoside+daunorubicin) によって 2 回目の CR (CR2) に到達する割合が、CR1 の時間が 6 か月以下の場合には 28% (n=38)、6 か月以上の場合には 59% (n=98) であると報告している [47]。同様に、Estey は、化学療法 (HDAC、high-dose cytosin arabinoside) による CR2 の達成率を、11% (CR2 < 12 months n=175)、51% (CR2 12-24 months n=43)、56% (CR2 > 24 months n=25) と報告している [48]。本モデルでパラメーターの値の変化がない場合、誘導化学療法と CR1 後の再発に対して適用される化学療法が同一であれば、CR2 の達成率は 100% である。上記の臨床知見から、化学療法の影響によって白血病細胞の遺伝子変異の進行に対応するパラメーターの値の変化が一部で起こっていると考えられる。Stiehl らは、急性骨髄性白血病の病態進行に対する数理モデルとして、造血幹細胞 (HSC)、造血前駆細胞 (HPC)、成熟血液細胞からなる正常血液細胞の系統と白血病幹細胞 (LSC)、白血病前駆細胞 (LPC)、白血病芽球細胞 (L) からなる白血病細胞の系統、以上 2 系統の細胞系譜のモデルを提案している [49, 50]。このモデルでは、成熟血液細胞と白血病芽球細胞の細胞総数の増加とともに HSC、HPC、LSC、LPC の自己増殖速度定数の値が減少するネガティブ・フィードバックが導入されているが、これは主に白血球芽球細胞の増加に伴う骨髄での幹細胞、前駆細胞の細胞増殖・分裂の抑制をモデル化したもので、本研究のモデルで導入した免疫細胞と白血病細胞との相互作用は考慮されていない。Stiehl らの数理モデルを用いた研究は、急性骨髄性白血病の細胞

数時系列データに基づくパラメーター推定を行った初めての例であり、LSCの自己増殖・分裂の速度定数を各患者の時系列データに基づき推定している。推定された速度定数のばらつきは、各患者の遺伝子変異の差異に基づくと解釈され、生存率を左右する主要因はLSCの遺伝子変異に伴う自己増殖・分裂能であると結論している。実際に、患者ごとに推定された自己増殖・分裂の速度定数の値の大小によって2群に分けて、それぞれの生存曲線のlog-rank testにより有意差を検出している[50]。本研究では、白血病細胞の遺伝子変異は考慮しておらず、本モデルを化学療法、化学療法と免疫細胞療法の組み合わせの設計に活用する場合は、遺伝子変異の程度の差異を考慮したパラメーター値の分布の影響や遺伝子変異の時間的な蓄積に対応したパラメーターの時間変動についても考慮する必要がある。

### 3.2 免疫細胞療法

本研究で提案するモデルは、AMLの病態進行を支配するCTLやNK細胞などエフェクターT細胞(Teff)とともに免疫抑制機構で中心的な役割を担う制御性T細胞(Treg)を考慮したもので、臨床で行われているAMLに対する免疫細胞療法の効果を説明する枠組みとなるかどうか、免疫細胞療法の効果的なプロトコルの設計に寄与しうるかどうか検討を行った。特に、免疫抑制機構の破たんを目的としたTregをターゲットとする免疫細胞療法に注目した。Bachanovaらは、白血病細胞を障害するエフェクター細胞(Teff)であるNK細胞をAML患者に移植する場合、NK細胞の移植に先行してIL2DHを投与することにより内在性のTreg細胞数を減少させるとNK細胞移植単独の場合と比べて治療効果が高いことを報告している[18]。本モデルを用いて、このプロトコルに沿って行ったシミュレーション結果の一例を図10に示している。誘導化学療法後に適用されたTeffの移植およびTregの除去は、 $[Teff]$ および $[Treg]$ の瞬時増加およ

び瞬時減少によってモデル化した。[Teff]の瞬時増加のみの場合は系は SShigh (図外)に戻るのに対して、[Teff]の瞬時増加に先行して[Treg]の瞬時減少を行った場合は系は SSlow に到達する。この差異は、図 6 b に示した SShigh と SSlow の吸引域の境界を系が越えたかどうかによる。

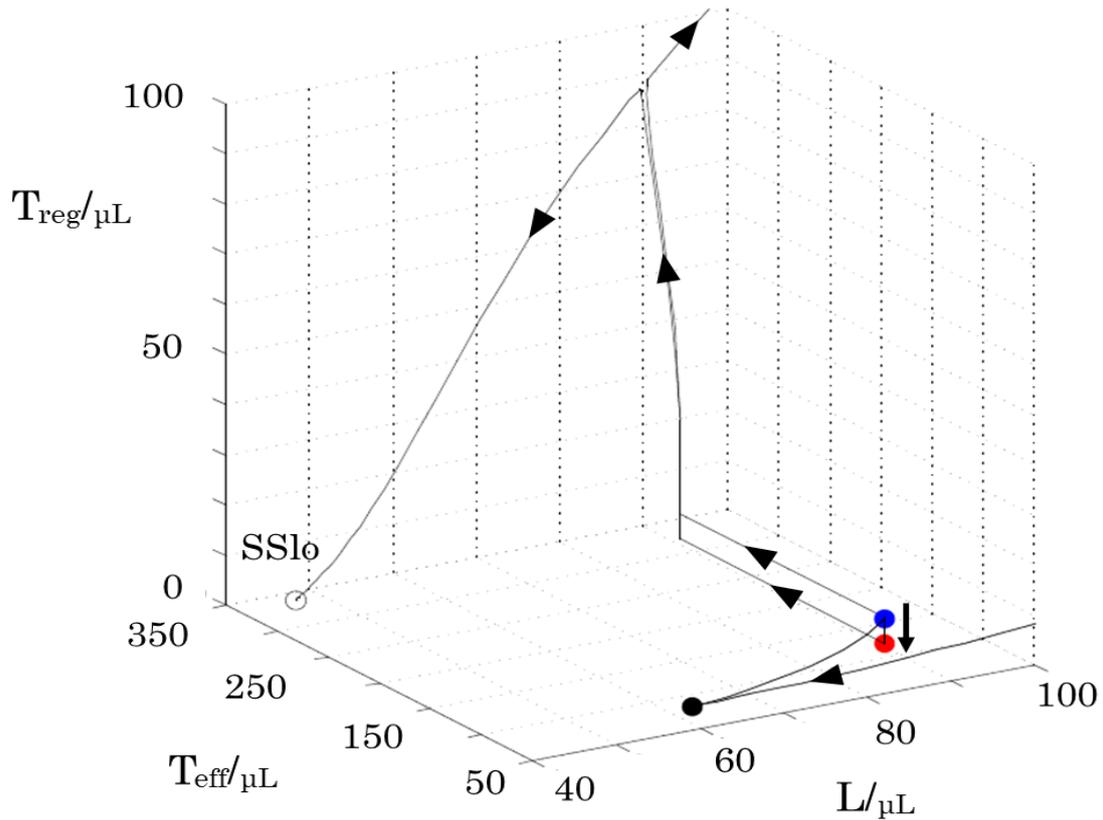


Figure 10. Effects of Teffs infusion only and prior Tregs depletion followed by Teffs infusion for the system on the trajectory returning to SShi in hypothetical immunotherapy. The instantaneous modulations ( $[Teff]+200/\mu l$  and  $[Treg]-5/\mu l$ ) were applied at the point denoted by blue circle. The Tregs depletion forced the system from the point denoted by blue circle to one by red circle. The same Teffs infusions applied to the points denoted by blue and red circles result in two trajectories, which one arrives to SSlo (open circle) and another returns to SShi (out of figure). Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aTeff=56.53$ ,  $aTreg=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dTeff=0.2$ ,  $dTreg=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ . For the chemotherapy duration of 10 days, decay rate constants were  $dL=1.0$ ,  $dTeff=0.7$ ,  $dTreg=5.0$ .

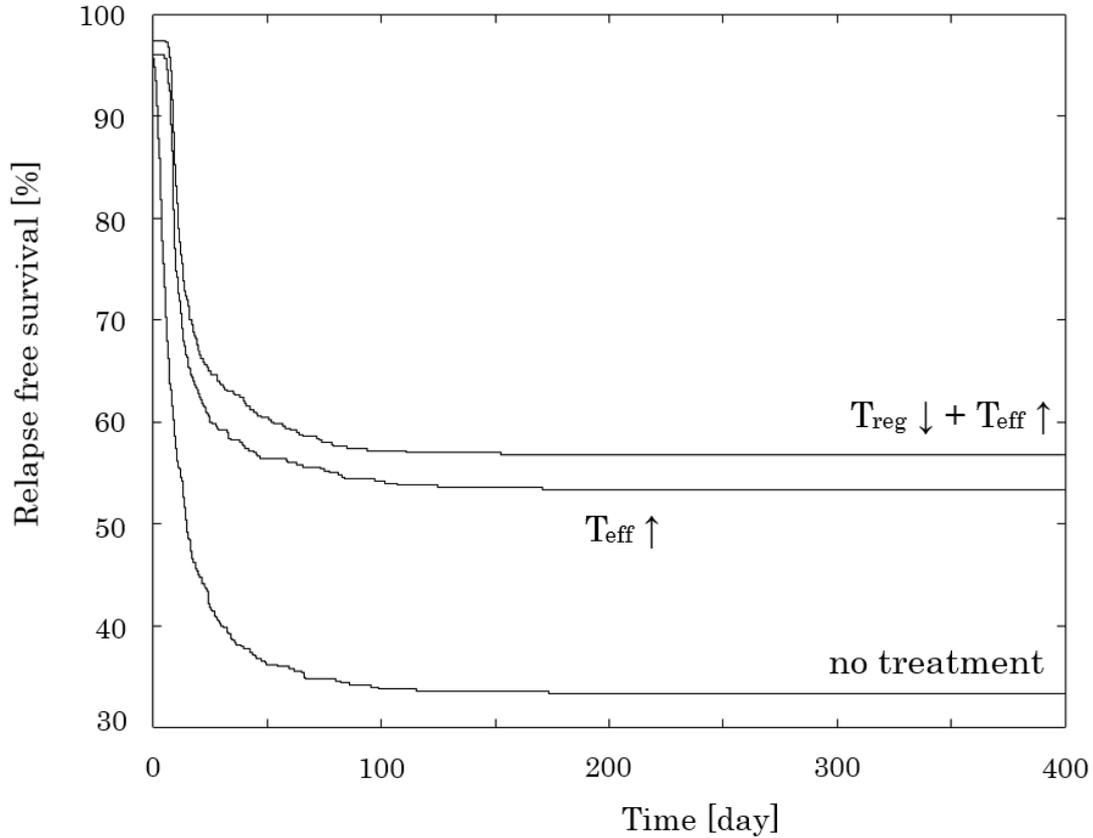


Figure 11. Relapse free survival (RFS) curves in the cases of Teff cells infusion with/without Treg cells depletion and no treatment after chemotherapy. The relapse was defined as the event that the system overrides the threshold of  $[L]$  towards  $SS_{high}$  from CR states, and the duration of CR as the time from the termination of chemotherapy to the crossing of the threshold. The threshold was set to be  $[L]=500/\mu\text{L}$ . 500 trajectories from  $SS_{high}$  by applying chemotherapy during 30 days were calculated with  $dL$ ,  $dT_{eff}$ ,  $dT_{reg}$  of the values selected randomly from normal distributions of  $N(1.0,0.33)$ ,  $N(0.75,0.25)$ ,  $N(5.0,1.67)$ , respectively. Instantaneous  $[T_{eff}]$  infusion or  $[T_{reg}]$  depletion was applied after 0.0001 days from time point of chemotherapy termination. The instantaneous  $[T_{reg}]$  depletion was followed by instantaneous  $[T_{eff}]$  infusion with time interval of 0.0002 days. Increment of  $[T_{eff}]$  by instantaneous infusion was set to be  $200/\mu\text{L}$  and decrement of  $[T_{reg}]$  by instantaneous depletion was set to be  $100/\mu\text{L}$ . Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aT_{eff}=56.53$ ,  $aT_{reg}=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dT_{eff}=0.2$ ,  $dT_{reg}=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ . The number of the trajectories without occurring relapse was plotted against the CR duration of the last trajectory with relapse.

AMLにおける完全寛解(CR)は、骨髄において白血病芽球細胞(L)が全有核細胞の5%以下である状態と臨床的に定義されているが、CRにおける骨髄と末梢血でのLの占有率が等しく、かつCRにおける白血球数を $10000/\mu\text{L}$ とすると、CRではLが $500/\mu\text{L}$ 以下となる。図5に示す通り、本モデルでは誘導化学療法により急速に[L]が低下した後、過渡的な[Teff]の上昇を経て、再び[L]の増加が起こり、再発に至る。ここで、[L]の閾値を $500/\mu\text{L}$ とし、誘導化学療法直後から閾値以下に[L]が維持される時間としてCR時間を定義する。500名の仮想的なAML患者集団を想定し、シミュレーションを行った。[L]の閾値を $500/\mu\text{L}$ と仮定して得られたCR時間の分布を、臨床研究で多用されているRFS(Relapse free survival)曲線に変換した。各患者に対応するパラメータの値は同一であるとし、したがって濃度空間におけるSShighとSSlowの位置は同一である。各患者の誘導化学療法に対する感受性の差異をモデル化するために、パラメータ(dL、dTeff、dTreg)については、MCMC法で推定した平均値を用いて正規分布からランダムサンプリングを行い、RFS曲線を求めた。その結果を図11に示した。1) 誘導化学療法のみの場合、2) 誘導化学療法に続いてTeff細胞移植を行った場合、3) 誘導化学療法を行った後Teff細胞移植に先行してTreg細胞除去を行った場合、以上3つの処置のいずれにおいても、時間とともに再発が起こらない割合(ratio of relapse free)がほぼ一定になっている。RFS曲線を10回繰り返し計算し、誘導化学療法後から700days後の時点での上記3つの場合の再発が起こらない割合は、1)  $35.6 \pm 2.2\%$ 、2)  $54.8 \pm 2.7\%$ 、3)  $54.8 \pm 2.6\%$ であった。このことから、誘導化学療法に続いてTeff細胞移植を行ったほうが治療効果は良好であるが、Teff細胞移植に先行してTreg細胞除去を行った場合とTeff細胞移植のみの場合とは同等の治療効果であることがわかる。時間とともに一定値となる再発が起こらない割合は、500の軌道うちSSlowに収束する軌道数の割合を示している。図12は、誘導化学療法のみの場合と誘導化学療法に続いてTreg細胞除去・Teff細胞移植を行った場合のSShigh(図外)からの軌道を示

している。図 1 1 と同様に、パラメーター( $dL$ 、 $dTeff$ 、 $dTreg$ )については、正規分布からランダムサンプリングを行った。誘導化学療法に続けて Treg 細胞除去・Teff 細胞移植を行った場合、より多くの軌道が SS1o に収束し、治療効果が高いことを示しており、図 1 1 の結果と整合している。

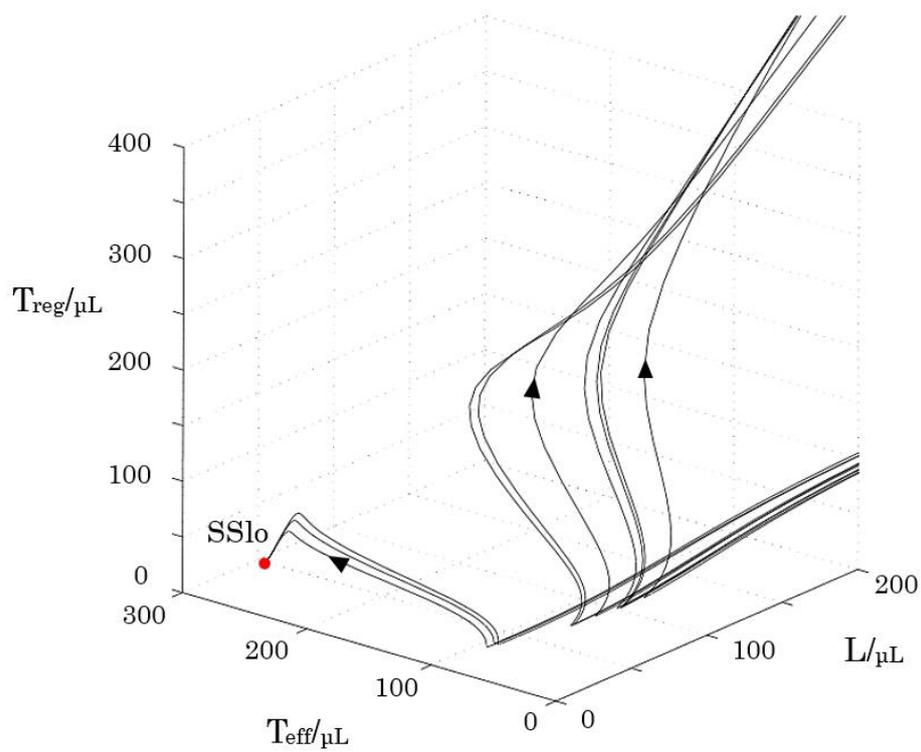


Figure 12(a).

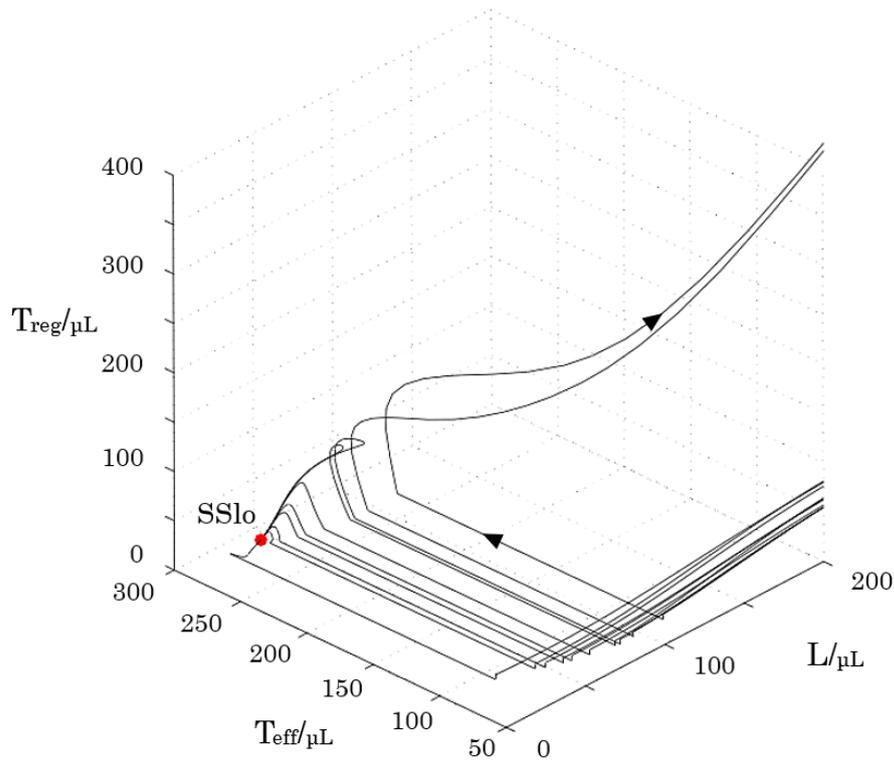


Figure 12(b).

Figure 12. 10 trajectories from SShigh (out of figure) by applying chemotherapy only (a) and chemotherapy with the following [Treg] depletion and [Teff] infusion (b). 10 trajectories from SShigh by applying chemotherapy during 30 days were calculated with  $dL$ ,  $dTeff$ ,  $dTreg$  of the values selected randomly from normal distributions of  $N(1.0,0.33)$ ,  $N(0.75,0.25)$ ,  $N(5.0,1.67)$ , respectively. Instantaneous [Treg] depletion was applied after 0.0001 days from time point of chemotherapy termination. The instantaneous [Treg] depletion was followed by instantaneous [Teff] infusion with time interval of 0.0002 days. Increment of [Teff] by instantaneous infusion was set to be  $200/\mu\text{L}$  and decrement of [Treg] by instantaneous depletion was set to be  $5/\mu\text{L}$ . Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aTeff=56.53$ ,  $aTreg=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dTeff=0.2$ ,  $dTreg=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ .

Curti らは、誘導化学療法によって CR に入った AML 患者を NK 細胞移植群 ( $n=16$ ) とコントロール群 ( $n=15$ 、ドナーが見つからず NK 細胞移植を行わなかった群) とに分けて誘導化学療法後の NK 細胞移植の効果を調べている [44]。両群で年齢、性別、染色体異常のタイプ、遺伝子変異のタイプは同一となるよう対応づけられた。NK 細胞移植後

の 68 か月の時点における NK 細胞移植群 (n=16) での再発が起こらない割合 (ratio of relapse free) は 56%、コントロール群では CR 誘導後の 68 か月の時点での同割合は 25%であった。68 か月の観察期間における再発が起こらない割合の時間変化の有意差は認められなかったが (p=0.138、log-rank test)、NK 細胞移植群 (n=16) から移植後に白血病細胞の殺傷能力を有したドナー由来の NK 細胞がある閾値以上である患者群 (n=11) を抽出し、コントロール群との間での再発が起こらない割合の時間変化を比較すると、NK 細胞移植群のほうが有意に再発が起こらなかった (p=0.03、log-rank test) [44]。この NK 細胞移植群 (n=11) における NK 細胞移植後の 68 か月の時点での再発が起こらない割合 (ratio of relapse free) は 75%であった。Curti らは、CR 状態にある AML 患者を対象としたが、Bachanova らは、再発あるいは誘導療法に反応しない (CR を経験していない) 不応期の患者集団を対象として、NK 細胞移植に先行して行われる Treg 除去の効果について調べている [18]。彼らは、2003 年から 2007 年の期間に NK 細胞移植を適用した再発および不応期の患者群 (n=42) と、2010 年、2011 年に NK 細胞移植に先行して Treg 除去を適用した再発および不応期の患者集団 (n=15) との間で、寛解の達成率および寛解達成後に再発が起こらない割合について比較を行った。Treg 細胞の増殖はサイトカイン IL-2 に依存しており、IL-2 受容体に拮抗的に結合して Treg 細胞に毒性を発揮する IL-2DH を、NK 細胞移植の 1±2days の期間に投与することにより、内在性の Treg 細胞の除去を行い、エフェクター細胞 (Teff) の一つである NK 細胞の移植後の Treg 細胞による抑制を抑えることを意図した。NK 細胞移植のみを行った患者群 (n=42) では、移植後 35 日後に 21%が完全寛解 (CR) または不完全寛解 (CRi、好中球あるいは血小板の回復が不完全な場合) を達成したが、NK 細胞移植に先行して Treg 細胞除去を行った群 (n=15) では、移植後 28 日後に 53%が CR または CRi を達成し、寛解達成率については Treg 除去群が有意に良好であった (p=0.02)。NK 細胞移植後 6 か月の時点での再発が起こらない割合は、NK 細胞移植のみを行った群 (5%) よりも、Treg

細胞除去を先行して行った群(33%)の方がやはり有意に高かった( $p < 0.01$ ) [18]。Curtiらと Bachanova らは、対象とした AML 患者の重症度が相互に異なるが、図 1 1、図 1 2 に示した本研究のモデルによる結果は、誘導化学療法のみよりも NK 細胞移植を組み合わせの方が再発を防ぐことができるとする Curti らの結果と、NK 細胞移植のみよりも先行して Treg 細胞除去を行った方が再発を防ぐことができるとする Bachanova らの結果が、[Teff]の増加および[Treg]の減少との組み合わせによって、2つの安定定常状態の吸引域の境界を系が超えることができるかどうかという観点から定性的に説明できることを示唆している。

造血幹細胞移植やNK細胞、CTL細胞などのエフェクターT細胞(Teff)移植では、一般に移植する細胞数が多い方がより高い治療効果が期待できるが、GVHD(graft versus host disease、移植片対宿主病)の発生率が高まるため、移植細胞数が制限される。Dazzi らは、再発した慢性骨髄性白血病(CML)患者を対象としたリンパ球移植について、移植される総細胞数は同一にして単一回で移植した群と複数回(2-3回、間隔平均20週)に分けて移植した群とで比較し、CRの達成率に有意な差は認められなかったが、GVHDの発生率は複数回に分けて移植した群の方が有意に低かったことを報告している[51]。本研究でのモデルは、[Teff]と[Treg]の濃度変動に基づく免疫細胞療法の設計の枠組みを指向するものであり、[Treg]の減少と[Teff]の増加とを複数回にわたって繰り返した場合の効果について検討を行った。図 1 3 は、シミュレーションで用いたタイムスケジュールを示している。誘導化学療法の適用時間に続いて、一定時間(duration 0)後に、[Treg]の瞬時減少、一定時間(duration1)後の[Teff]の瞬時増加を繰り返し複数回(cycle1、cycle2、cycle3、cycle4、cycle5)行った。

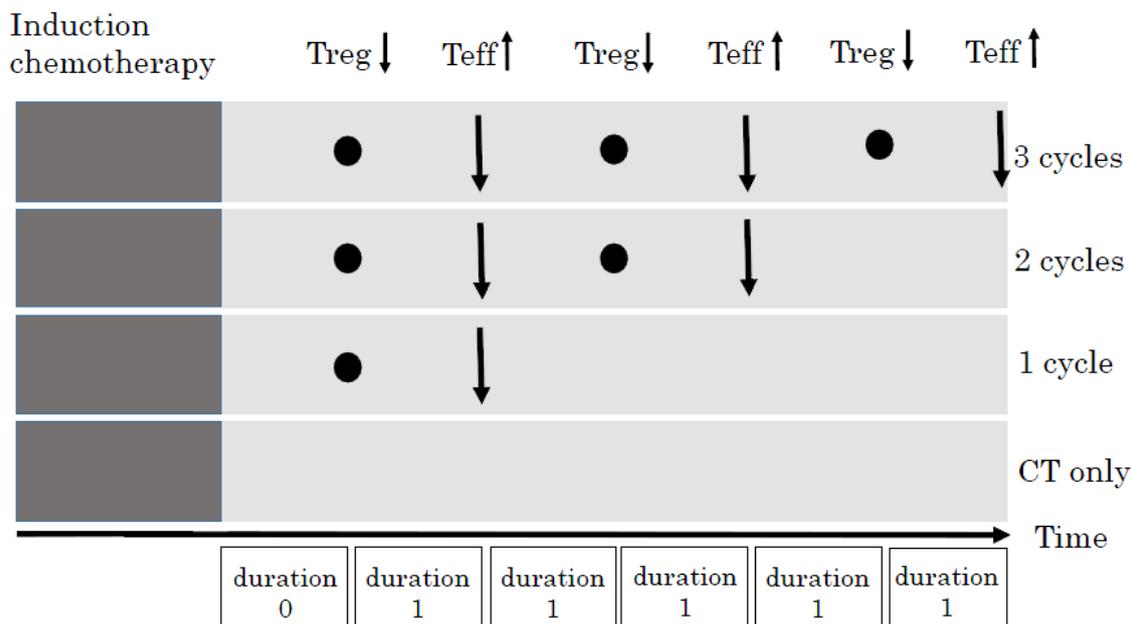


Figure 13. Time schedule of induction chemotherapy followed by consecutive cycles of instantaneous [Treg] depletion followed by instantaneous [Teff] infusion. The first [Treg] depletion was applied with a time interval (duration 0) after chemotherapy. Time intervals between [Treg] depletion and [Teff] infusion were set to be constant (duration 1). Arrows denote the time points of [Teff] infusion and closed circles denote the time points of [Treg] depletion.

図 1 4 は、1) 誘導化学療法のみの場合、2) 誘導化学療法に続いて[Teff]の瞬時増加のみを 5 回繰り返し行った場合、3) 誘導化学療法に続いて[Treg]の瞬時減少と[Teff]の瞬時増加を 5 回繰り返し行った場合、以上 3 つの場合について、再発が起こらない割合 (ratio of relapse free) の時間変化を示している。3 つの場合それぞれ、時間とともに再発が起こらない割合 (ratio of relapse free) がほぼ一定値に収束している。

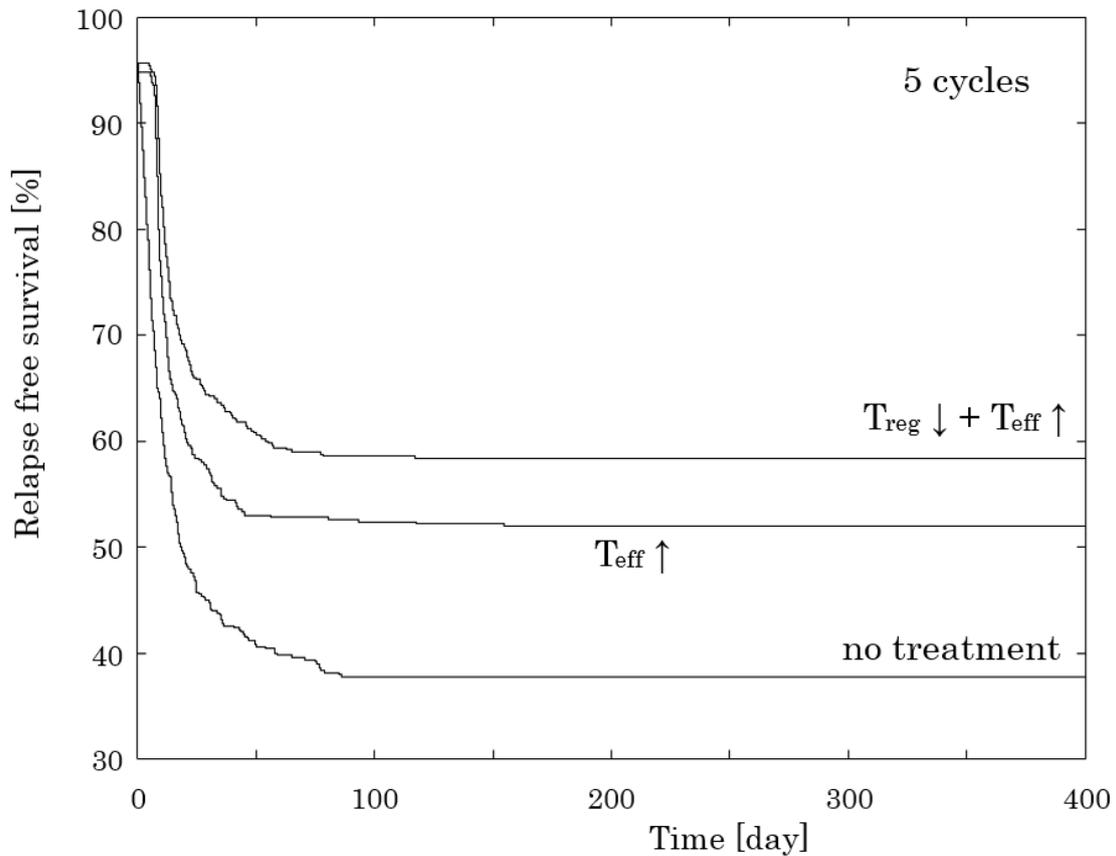


Figure 14. Relapse free survival (RFS) curves in the cases of 5 consecutive cycles of Teff cells infusion with/without Treg cells depletion and no treatment after chemotherapy. The threshold for relapse was set to be  $[L]=500/\mu\text{L}$ . 500 trajectories from SShigh by applying chemotherapy during 30 days were calculated with  $dL$ ,  $dT_{eff}$ ,  $dT_{reg}$  of the values selected randomly from normal distributions of  $N(1.0,0.33)$ ,  $N(0.75,0.25)$ ,  $N(5.0,1.67)$ , respectively. Instantaneous  $[T_{eff}]$  infusion or  $[T_{reg}]$  depletion was applied after 0.0001 days (duration 0 in Fig.13) from time point of chemotherapy termination. The instantaneous  $[T_{reg}]$  depletion was followed by instantaneous  $[T_{eff}]$  infusion with time interval of 0.0002 days (duration 1 in Fig.13). Increment of  $[T_{eff}]$  by each instantaneous infusion was set to be  $40/\mu\text{L}$  and decrement of  $[T_{reg}]$  by each instantaneous depletion was set to be  $20/\mu\text{L}$ . Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aT_{eff}=56.53$ ,  $aT_{reg}=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dT_{eff}=0.2$ ,  $dT_{reg}=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ . The number of the trajectories without occurring relapse was plotted against the CR duration of the last trajectory with relapse.

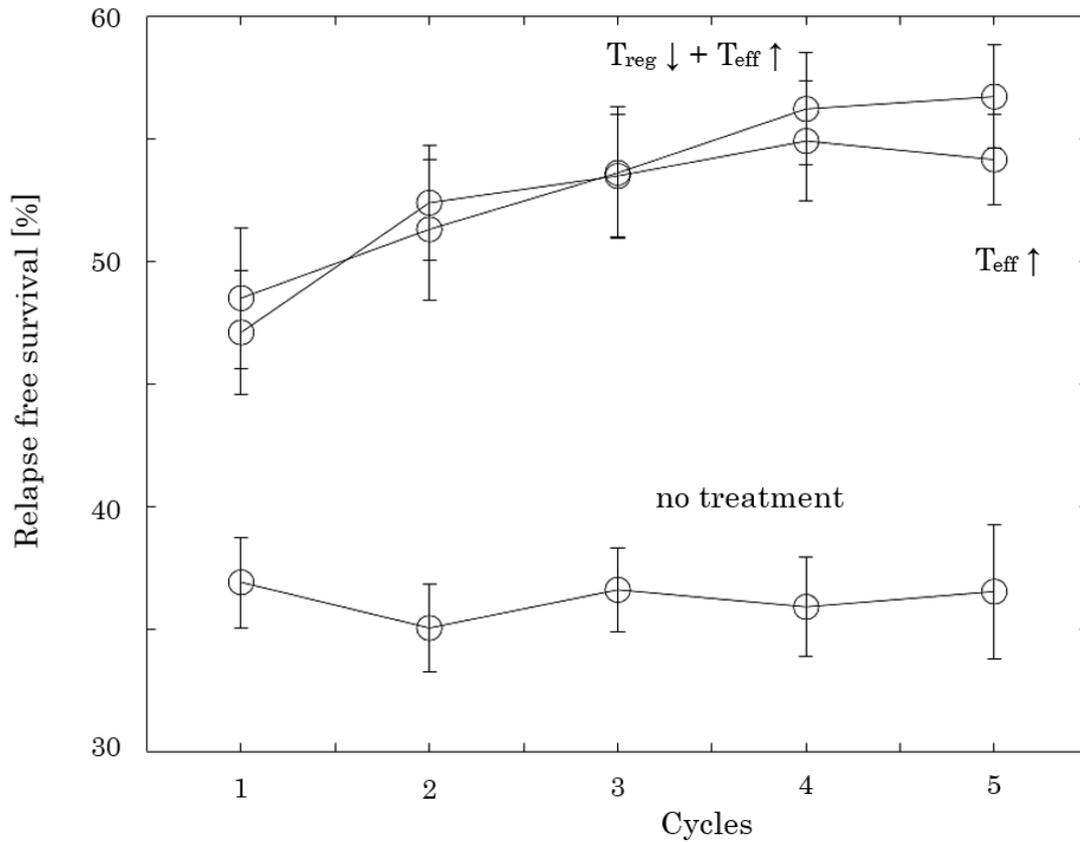


Figure 15. Dependence of relapse free survival (RFS) rate on the number of consecutive cycles of instantaneous [Teff] infusion or instantaneous [Treg] depletion followed by instantaneous [Teff] infusion. The RFS rates after 700 days from the time point of chemotherapy termination are indicated. The RFS rates were based on RFS curves which were estimated from 500 trajectories. Standard deviations in the figure were estimated from 10 RES curves. 500 trajectories from SShigh by applying chemotherapy during 30 days were calculated with  $dL$ ,  $dTeff$ ,  $dTreg$  of the values selected randomly from normal distributions of  $N(1.0,0.33)$ ,  $N(0.75,0.25)$ ,  $N(5.0,1.67)$ , respectively. Instantaneous [Teff] infusion or [Treg] depletion was applied after 0.0001 days (duration 0 in Fig.13) from time point of chemotherapy termination. The instantaneous [Treg] depletion was followed by instantaneous [Teff] infusion with time interval of 0.0002 days (duration 1 in Fig.13). Increment of [Teff] by each instantaneous infusion was set to be  $40/\mu\text{L}$  and decrement of [Treg] by each instantaneous depletion was set to be  $20/\mu\text{L}$ . Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aTeff=56.53$ ,  $aTreg=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dTeff=0.2$ ,  $dTreg=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ .

図 1 5 は、1) 誘導化学療法のみの場合、2) 誘導化学療法に続いて [Teff] の瞬時増加のみを n 回繰り返し行った場合、3) 誘導化学療法に続いて [Treg] の瞬時減少と [Teff] の瞬時増加を n 回繰り返し行った場合、以上 3 つの場合について、誘導化学療法後から 700days 後における再発が起こらない割合 (ratio of relapse free) が繰り返し回数 n とともにどのように変化するかを示している。n=5 の場合は、1)  $36.5 \pm 2.7\%$ 、2)  $54.1 \pm 1.8\%$ 、3)  $56.7 \pm 2.1\%$  であった。図 1 1 と図 1 5 の結果を比較する。図 1 1 は、[Treg] の瞬時減少と [Teff] の瞬時増加を 1 回行った場合で [Treg] の瞬時減少は  $100/\mu\text{L}$ 、[Teff] の瞬時増加は  $200/\mu\text{L}$  であるが、図 1 5 は、n=1-5 すべてで [Treg] の瞬時減少  $20/\mu\text{L}$ 、[Teff] の瞬時増加  $40/\mu\text{L}$  であり、濃度変動は小さいにも関わらず、n=5 の場合は、図 1 1 の場合と同等の効果が認められる。図 1 6 は、n=1、3、5 の場合の濃度空間での軌道であり、繰り返し回数の増加により SSlow に到達することを示している。

図 1 4、図 1 5 は、[Treg] と [Teff] の濃度変動を小さくした上で繰り返し行うことが有効であることを示している。本研究のモデルを用いて行った [Treg] や [Teff] の周期的な濃度変動の効果を評価できる臨床知見はないが、単一回で移植された NK 細胞の活性化を目的として IL-2 の繰り返し投与が標準プロトコルとなっている [18, 44]。Brune らは、誘導化学療法および地固め化学療法によって CR 状態が維持されている AML 患者を 2 群に分け、内在性の CTL 細胞および NK 細胞を活性化するために低用量の IL-2 と HDC (histamine dihydrochloride) の同時投与を複数回にわたって繰り返し行った群 (n=160) と無治療 (コントロール) 群 (n=160) とで、3 年後時点での再発しない割合 (rate of relapse free) の比較を行った [52]。IL-2 単独よりも HDC との同時投与がより有効であることが in vitro および in vivo の実験で明らかになっている。同時投与は 10 回繰り返し行われ、1 回目から 3 回目の各回は 3 週間の投与期間と 3 週間の無投与期間からなり、3 週間の投与期間においては毎日 2 回の投与が行われた。再発

しない割合の3年間の観察期間における時間変化については、IL-2/HDC投与群のほうが有意に再発が抑制された ( $p < 0.01$ , log-rank test)。初回のCR状態にある患者のみに限定して、IL-2/HDC投与群 ( $n=129$ ) と無投与群 ( $n=132$ ) との間で3年後の時点での再発していない割合は、IL-2/HDC投与群 (40%) の方が無投与群 (26%) よりも有意に高かった ( $p=0.01$ ) [52]。低用量でのIL-2/HDCの周期的投与の再発抑制に対する効果は、CRにおけるT細胞の回復の促進[53]やCD8(+)細胞 (エフェクターT細胞) の細胞分化の促進[54]として確認されている。本モデルによるシミュレーションの結果 (図14、図15) と直接の比較はできないが、周期的な[Teff]の濃度増加によって2つの吸引域の境界を越えてSSlowに系が到達するという観点で上記の臨床知見の説明が可能であると考えられる。

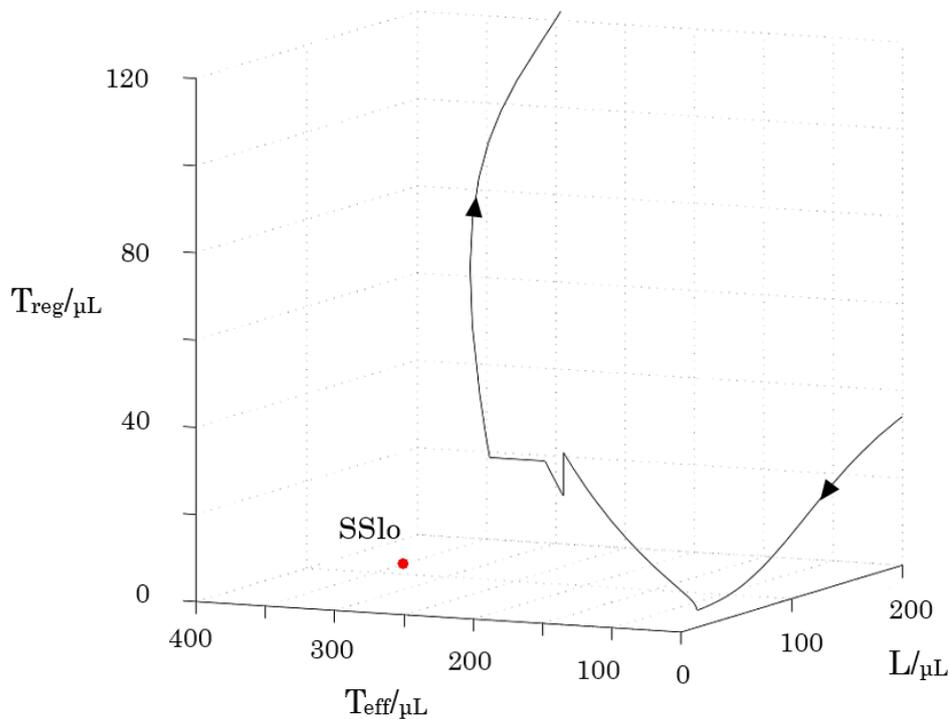


Figure 16(a).

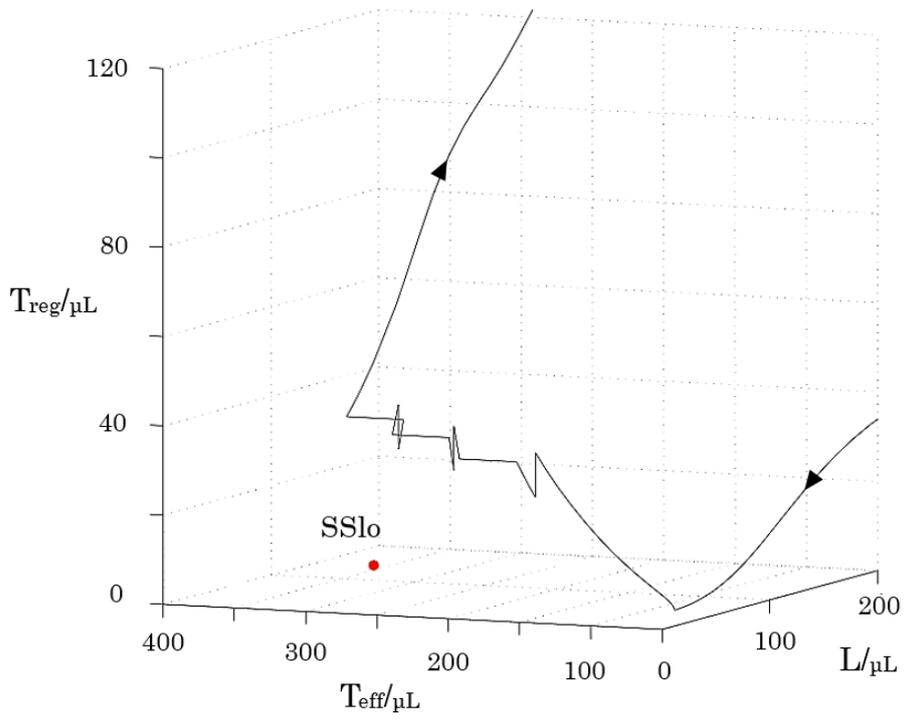


Figure 16(b)

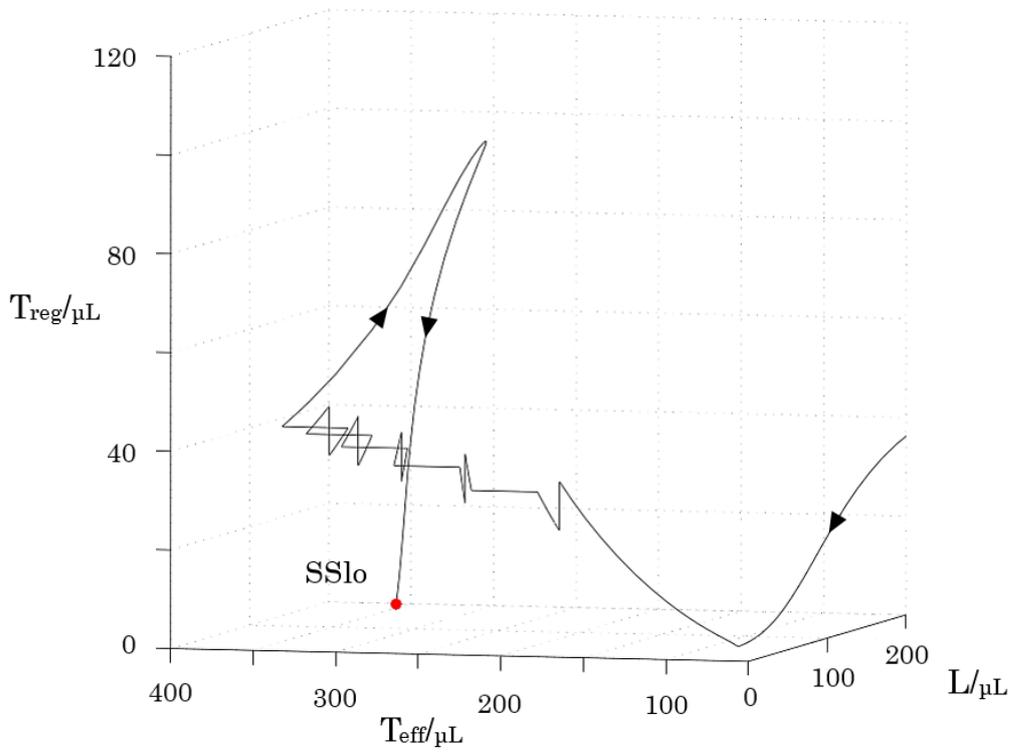


Figure 16(c).

Figure 16. The trajectories from SShi (not shown in figure) after chemotherapy followed by consecutive cycles of [Teff] instantaneous infusion or [Treg] instantaneous depletion followed by [Teff] instantaneous infusion: (a) 1 cycle, (b) 3 cycles, (c) 5 cycles. Parameter values are  $aL=1000$ ,  $aTeff=56.53$ ,  $aTreg=198.2$ ,  $dL=0.01$ ,  $dTeff=0.2$ ,  $dTreg=0.04$ ,  $k1=40$ ,  $k2=160$ ,  $k3=200$ ,  $p=4$ . Chemotherapy during 30 days were applied with  $dL=1.0$ ,  $dTeff=0.69$ ,  $dTreg=5.0$ . Instantaneous [Teff] infusion or [Treg] depletion was applied after 0.0001 days (duration 0 in Fig.13) from time point of chemotherapy termination. The instantaneous [Treg] depletion was followed by instantaneous [Teff] infusion with time interval of 0.0002 days (duration 1 in Fig.13). Increment of [Teff] by each instantaneous infusion was set to be  $40/\mu\text{L}$  and decrement of [Treg] by each instantaneous depletion was set to be  $20/\mu\text{L}$ .

## 第4章 総括

本研究では、急性骨髄性白血病における寛解、再発など病態進行を記述する白血病芽球細胞、エフェクターT細胞、制御性T細胞の細胞濃度を変数とする3変数常微分方程式モデルの開発を行った。がんの進展の理解やその制御を目的とした多数の数理モデルが開発されてきたが、臨床データとの整合性についての精緻な検討については不十分なままであり、数理モデルのがん臨床応用は現在も限定的な状態が続いている。一方で、白血病を対象として、臨床データに基づいた臨床応用が可能な数理モデルの開発が現在活発に行われている。本研究では、白血病を対象とした既存のモデルでは注目されていない免疫抑制機構を導入した新規の速度式モデルを開発した。急性骨髄性白血病に関する免疫抑制の進展に関する臨床知見について検討し、白血病芽球細胞による制御性T細胞の細胞増殖・分裂のプロセスを初めてモデル化した。急性骨髄性白血病患者について報告されている誘導化学療法後の寛解状態でのリンパ球数の回復の時系列データに基づき、エフェクター細胞であるCD3(+)CD8(+)細胞と制御性T細胞であるCD3(+)CD4(+)FoxP3(+)細胞の細胞濃度の回復曲線を求め、このデータからMCMC(Markov chain Monte Carlo)法を用いてモデルパラメータの一部の推定を行った。モデルパラメータの推定値を用いて、未知パラメータの空間で本モデルのダイナミクスの探索を行った結果、2つの安定定常状態が広いパラメータ範囲で存在していることが明らかとなった。それぞれの安定定常状態での3つの細胞濃度は、急性骨髄性白血病における完全寛解状態(白血病芽球細胞濃度が低い状態)と病態が進行した状態(白血病芽球細胞濃度が高い状態)での臨床的に妥当な細胞数に対応しており、急性骨髄性白血病の病態進行の理解およびその制御方策を検討するための枠組みとして、本モデルが示す2つの安定定常状態とそれぞれの吸引域の境界を提案した。白血病芽球細胞で特異的に発現している転写産物量を微小残存病変(MRD、minimal residual disease)の指標として、完全寛解から再発するか寛解が維持されるかどうかを予測す

る MRD の閾値が存在することが報告されており、この閾値が本モデルでの吸引域の境界の存在を強く支持することを提案した。また、2 回目の完全寛解に適用された造血幹細胞移植後の生存率が初回の完全寛解の維持時間と正の相関があることや完全寛解におけるリンパ球の回復の程度と生存率との相関など、急性骨髄性白血病に関する臨床知見が吸引域の境界近傍を系が通過する場合に予想される過渡的なダイナミクスによって説明できることを示した。このように臨床知見と整合する本モデルを用いて、エフェクターT 細胞移植の臨床プロトコルに基づいたシミュレーションを行った結果、生存率や再発抑制など臨床アウトカムと定性的に整合することを示した。以上より、本研究で提案したモデルは、急性骨髄性白血病の治療として現在盛んに研究されている免疫細胞療法の設計に寄与する可能性が示された。

## 参考文献

- [1]J.J.Tyson, R. Albert, A. Goldbeter, P. Ruoff, J. Sible, Biological switches and clocks, *J.R.Soc.Interface* 5(suppl 1)(2008)S1-S8.
- [2]J.E.Ferrell Jr., Bistability, bifurcations, and waddington's epigenetic landscape, *Current Biol.* 22(2012)R458-R466.
- [3]J.J Tyson, K.C Chen, B.Novak, Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell, *Current Opinion in Cell Biology* 15(2003)221-231.
- [4]R.R. Klevecz, J. Bolen, G. Forrest, D.B. Murray, A genomewide oscillation in transcription gates DNA replication and cell cycle, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101(5)(2004)1200-1205.
- [5]T.S. Gardner, C.R. Cantor, J.J. Collins, Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli.*, *Nature* 403(2000)339-342.
- [6]M.B. Elowitz, S. Leibler, A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators, *Nature* 403(2000)335-338.
- [7]M. Garg et al., Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse, *Blood* 126(22)(2015)2491-2501.
- [8]C. Riether, C.M. Schurch, A.F. Ochsenbein, Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system, *Cell Death and Differentiation* 22(2015)187-198.
- [9]L.I.Shlush, A.Mitchell, L.Heisler, S.Abelson, S.W. K. Ng, A.Trotman-Grant, J.J.F. Medeiros, A.Rao-Bhatia, I.Jaciw-Zurakowsky, R.Marke, J.L.McLeod, M.Doedens, G.Bader, V.Voisin, C.J.Xu, J.D.McPherson, T.J. Hudson, J.C.Y.Wang, M.D.Minden, J.E.Dick, Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells, *Nature* 547(7661)(2017)104-108.
- [10] S. Lindley, C.M. Dayan, A. Bishop, B.O. Roep, M. Peakman, T.I.M. Tree, Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes, *Diabetes* 54(1)(2005)92-99.
- [11]R.J. DiPaolo, C. Brinster, T.S. Davidson, J. Andersson, D. Glass, E.M. Shevach, Autoantigen-specific TGF $\beta$ -induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells, *J Immunol.* 179(7)(2007)4685-4693.

- [12] M.J. Szczepanski, M. Szajnik, M. Czystowska, M. Mandapathil, L. Strauss, A. Welsh, K.A. Foon, T.L. Whiteside, M. Boyiadzis, Increased Frequency and Suppression by Regulatory T Cells in Patients with Acute Myelogenous Leukemia, *Clin. Cancer Res.* 2009,15(10)3325-3332.
- [13] C. Ustun, J.S. Miller, D.H. Munn, D.J. Weisdorf, B.R. Blazar, Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation? *Blood* 118(19)(2011)5084-5095.
- [14] A. Curti, S. Pandolfi, B. Valzasina, M. Aluigi, A. Isidori, E. Ferri, et al., Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25<sup>-</sup> into CD25<sup>+</sup> T regulatory cells, *Blood* 109(7)(2007)2871-2877.
- [15] L.M. Francisco, V.H. Salinas, K.E. Brown, V.K. Vanguri, G.J. Freeman, V.K. Kuchroo, A.H. Sharpe, PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells, *J.Exp.Med.* 206(13)(2009)3015-3029.
- [16] S.J. Coles, R.K. Hills, E.C. Wang, A.K. Burnett, S. Man, R.L. Darley, A. Tonks, Increased CD200 expression in acute myeloid leukemia is linked with an increased frequency of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells, *Leukemia* 26(9)(2012)2146-2148.
- [17] Q. Zhou, C. Bucher, M.E. Munger, S.L. Highfill, J. Tolar, D.H. Munn, B.L. Levine, M. Riddle, C.H. June, D.A. Valleria, B.J. Weigel, B.R. Blazar, Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia, *Blood* 114(2009)3793-3802.
- [18] V. Bachanova, S. Cooley, T.E. DeFor, M.R. Verneris, B. Zhang, D.H. McKenna, J. Curtsinger, A. Panoskaltsis-Mortari, D. Lewis, K. Hippen, P. McGlave, D.J. Weisdorf, B.R. Blazar, J.S. Miller, Clearance of acute myeloid leukemia by haploidentical natural killer cells is improved using IL-2 diphtheria toxin fusion protein, *Blood* 123(25)(2014)3855-3863.
- [19] S. Nikiforow, H.T. Kim, H. Daley, Carol Reynolds, K.T. Jones, P. Armand, V.T. Ho, E.P. Alyea III, C.S. Cutler, J. Ritz, J.H. Antin, R.J. Soiffer, J. Koreth, A phase I study of CD25/regulatory T-cell-depleted donor lymphocyte infusion

for relapse after allogeneic stem cell transplantation, *Haematologica* 101(10)(2016)1251-1259.

[20] V.A. Kuznetsov, I.A. Makalkin, M.A. Taylor, A.S. Perelson, Nonlinear dynamics of immunogenic tumors: parameter estimation and global bifurcation analysis, *Bull. Math. Biol.* 56(2)(1994)295-321.

[21] K. Roesch, D. Hasenclever, M. Scholz, Modelling lymphoma therapy and outcome, *Bull. Math. Biol.* 76(2)(2014)401-430.

[22] H. Moore and N.K. Li, A mathematical model for chronic myelogenous (CML) and T cell interaction, *J. theor. Biol.* 227(2004)513-523.

[23] P.S. Kim, P.P. Lee, D. Levy, Dynamics and potential impact of the immune response to chronic myelogenous leukemia, *PLoS Computational Biol.* 4(6)(2008)e1000095.

[24] G.D. Clapp, T. Lepoutre, R.E. Cheikh, S. Bernard, J. Ruby, H. Labussière-Wallet, F.E. Nicolini, D. Levy, Implication of the Autologous Immune System in BCR-ABL Transcript Variations in Chronic Myelogenous Leukemia Patients Treated with Imatinib, *Cancer Res.* 75(19)(2015)4053-4062.

[25] R. Serre, S. Benzekry, L. Padovani, C. Meille, N. André, J. Ciccolini, F. Barlesi, X. Muracciole, D. Barbolosi, Mathematical Modeling of Cancer Immunotherapy and Its Synergy with Radiotherapy, *Cancer Res.* 76(17)(2016)4931-4940.

[26] L.G. de Pillis, W. Gu, A.E. Radunskaya, Mixed immunotherapy and chemotherapy of tumors: modeling, applications and biological interpretations, *Journal of theoretical Biology* 238 (2006) 841-862.

[27] L.G. De Pillis, A. Radunskaya, A mathematical tumor model with immune resistance and drug therapy: an optimal control approach, *Journal of Theoretical Medicine*, 3(2001)841-862.

[28] M. Lu, B. Huang, S.M. Hanash, J.N. Onuchica, E. Ben-Jacob, Modeling putative therapeutic implications of exosome exchange between tumor and immune cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 22(2014)E4165-E4174.

[29] C. Schürch, C. Riether, M.A. Amrein, A.F. Ochsenbein, Cytotoxic T cells induce proliferation of chronic myeloid leukemia stem cells by secreting interferon- $\gamma$ , *J. Exp. Med.* 210(2013)605-621.

- [30] W.J. Norde, I.M. Overes, F. Maas, H. Fredrix, J.C. Vos, M.G. Kester, R. van der Voort, I. Jedema, J.H. Falkenburg, A.V. Schattenberg, T.M. de Witte, H. Dolstra, Myeloid leukemic progenitor cells can be specifically targeted by minor histocompatibility antigen LRH-1-reactive cytotoxic T cells, *Blood* 113(2009)2312-2323.
- [31] S. Shen, Yi Ding, C.E. Tadokoro, D. Olivares-Villagómez, M. Camps-Ramírez, M.A.C. de Lafaille, J.J. Lafaille, Control of homeostatic proliferation by regulatory T cells, *J. Clin. Invest.* 115(2005)3517-3526.
- [32] A. McNally, G.R. Hill, T. Sparwasser, R. Thomas, R.J. Steptoe, CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108(2011)7529-7534.
- [33] L.M. Francisco, V.H. Salinas, K.E. Brown, V.K. Vanguri, G.J. Freeman, V.K. Kuchroo, A.H. Sharpe, PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells, *J.Exp.Med.* 206(13)(2009)3015-3029.
- [34] S.J. Coles, R.K. Hills, E.C. Wang, A.K. Burnett, S. Man, R.L. Darley, A.Tonks, Increased CD200 expression in acute myeloid leukemia is linked with an increased frequency of FoxP3+ regulatory T cells, *Leukemia* 26(9)(2012)2146-2148.
- [35] C.G. Kanakry, A.D. Hess, C.D.Gocke, C. Thoburn, F. Kos, C. Meyer, et al., Early lymphocyte recovery after intensive timed sequential chemotherapy for acute myelogenous leukemia: peripheral oligoclonal expansion of regulatory T cells, *Blood* 117(2)(2011)608-617.
- [36] E.H.Estey, P.F.Thall, X.Wang, S.Verstovsek, J.Cortes, H.M.Kantarjian, Effect of circulating blasts at time of complete remission on subsequent relapse-free survival time in newly diagnosed AML, *Blood* 102(2003)3097-3099.
- [37] B. Hasselman, nleqslv: Solving systems of non linear equations, R package version 2.1.1(2014).
- [38] W. Kern, C. Schoch, T. Haferlach, S. Schnittger, Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia, *Critical Reviews in*

Oncology/Hematology, 56 (2005) 283-309.

[39] S. Kayser, A. Benner, C. Thiede, U. Martens, J. Huber, P. Stadtherr, J.W.G. Janssen, C. Röllig, M.J. Uppenkamp, T. Bochtler, U. Hegenbart, G. Ehninger, A.D. Ho, P. Dreger, A. Krämer, Pretransplant NPM1 MRD levels predict outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia, *Blood Cancer Journal* 6(2016)e449.

[40] J.A. Liu Yin, M.A. O'Brien, R.K. Hills, S.B. Daly, K. Wheatley, A.K. Burnett, Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial, *Blood* 120(2012)2826-2835.

[41] W. Zeijlemaker, A. Kelder, Y.J.M. Oussoren-Brockhoff, W.J. Scholten, A.N. Snel, D. Veldhuizen, J. Cloos, G.J. Ossenkoppele, G.J. Schuurhuis, Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia, *Leukemia* 30(2016)708-715.

[42] T. Kohnke, D. Sauter, K. Ringel, E. Hoster, R.P. Laubender, M. Hubmann, S.K. Bohlander, P.M. Kakadia, S. Schneider, A. Dufour, M.C. Sauerland, W.E. Berdel, T. Buchner, B. Wormann, J. Braess, W. Hiddemann, K. Spiekermann, M. Subklewe, Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse, *Leukemia* 29(2015)377-386.

[43] V.H.J. van der Velden, A. van der Sluijs-Geling, B.E.S. Gibson, J.G. te Marvelde, P.G. Hoogeveen, W.C.J. Hop, K. Wheatley, M.B. Bierings, G.J. Schuurhuis, S.S.N. de Graaf, E.R. van Wering, J.J.M. van Dongen, Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol, *Leukemia* 24(2010)1599-1606.

[44] A.Curti et al., Larger size of donor alloreactive NK cell repertoire correlates with better response to NK cell immunotherapy in elderly acute myeloid leukemia patients, *Clin Cancer Res* 22(8)(2016)1914-1921.

[45] F.V. Michelis et al., Duration of first remission and hematopoietic cell

transplantation-specific comorbidity index but not age predict survival of patients with AML transplanted in CR2: a retrospective multicenter study, *Bone Marrow Transplantation* 51(2016)1019-1021.

[46]D. Behl, L.F. Porrata, S.N. Markovic, L. Letendre, R.K. Pruthi, C.C. Hook, et al., Absolute lymphocyte count recovery after induction chemotherapy predicts superior survival in acute myelogenous leukemia, *Leukemia* 20(1)(2006)29-34.

[47] W. Hiddemann, W.R. Martin, C.M. Sauerland, A. Heinecke, T.Büchner, Definition of refractoriness against conventional chemotherapy in acute myeloid leukemia: a proposal based on the results of retreatment by thioguanine, cytosine arabinoside, and daunorubicin (TAD 9) in 150 patients with relapse after standardized first line therapy, *Leukemia* 4(3)(1990)184-188.

[48] E.H. Estey, Treatment of relapsed and refractory acute myelogenous leukemia, *Leukemia* 14(3)(2000)476-479.

[49]T. Stiehl, N. Baran, A.D. Ho, A. Marciniak-Czochra, Clonal selection and therapy resistance in acute leukaemias: mathematical modelling explains different proliferation patterns at diagnosis and relapse, *J.R.Soc.Interface* 11(94)(2014)20140079.

[50]T. Stiehl, N. Baran, A.D. Ho, A. Marciniak-Czochra, Cell division patterns in acute myeloid leukemia stem-like cells determine clinical course: a model to predict patient survival, *Cancer Res.* 75(6)(2015)1-10.

[51]F.Dazzi, R.M.Szydlo, C.Craddock, N.C.P.Cross, J.Kaeda, A.Chase, E.Olavarria, F.van Rhee, E.Kanfer, J.F.Apperley, J.M.Goldman, Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia, *Blood* 95(2000)67-71.

[52]M.Brune, S.Castaigne, J.Catalano, K.Gehlsen, A.D.Ho, W.Hofmann, D.E.Hogge, B.Nilsson, R.Or, A.I.Romero, J.M.Rowe, B.Simonsson, R.Spearing, E.A. Stadtmauer, J.Szer, E.Wallhult, K.Hellstrand, Improved leukemia-free survival after postconsolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and interleukin-2 in acute myeloid leukemia:results of a randomized phase 3 trial, *Blood* 108(2006)88-96.

[53]A.Hallner, J.Aurelius, F.B.Thoren, F.E.Sander, M.Brune, K.Hellstrand, A.Martner,

Immunotherapy with histamine dihydrochloride and low-dose interleukin-2 favors sustained lymphocyte recovery in acute myeloid leukemia, *European J.Haematol.* 94 (2014)279-280.

[54]F.E.Sander, A.Rydström, E.Bernson, R.Kiffi, R.Riise, J.Aurelius, H.Anderson, M.Brune, R.Foà, K.Hellstrand, F.B. Thorén, A.Martner, Dynamics of cytotoxic T cell subsets during immunotherapy predicts outcome in acute myeloid leukemia, *Oncotarget* 7(2016)7586-7596.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、様々なご助言と絶えず激励をいただきましたこと、西山宣昭教授に心より感謝いたします。

また、臨床知見に基づく有益なご助言をいただきました金沢大学国際基幹教育院の大竹茂樹院長および金沢医科大学医学部小児科学講座の犀川太教授に心より感謝いたします。

最後に、長きにわたり見守っていただきました両親にこの場を借りて心より御礼を申し上げます。