

Ny studie ger hopp om att förutspå återfall av **blodcancer** efter en stamcellstransplantation **tidigare**

Forskare vid Karolinska Institutet har i en ny studie visat att det går att förutspå återfall av blodcancer efter en stamcellstransplantation tidigare genom att söka efter mutationer i framrenade stamceller. I dagsläget används oftast ofraktionerad benmärg, som är en blandning celltyper, för att analysera förekomsten av sjukdomsorsakande mutationer, men den nya studien visar att känsligheten i metoden kan förbättras nästan 100-faldigt genom att rena fram stamcellerna och istället analysera dessa för mutationerna. Studien publicerades i slutet av 2023 i tidskriften *Blood* och här beskriver doktoranden **Madeleine Lehander**, som är en av medförfattarna till artikeln, studien mer i detalj.



Tyvärr drabbas omkring 30% av transplanterade patienter av återfall, inte sällan med en aggressivare sjukdom, till exempel akut myeloisk leukemi (AML).

Myelodysplastiskt syndrom (MDS) är ett samlingsnamn för olika blodcancerar som kännetecknas av cytopenier och dysplasi i benmärgen. Sjukdomarna kan i många fall härledas till muterade hematopoietiska stamceller¹. Behandling mot MDS inkluderar symtomlindrande stimulering av frisk blodbildning och blodtransfusioner men den enda botande behandlingen är i dagsläget en stamcellstransplantation från en frisk donator. Tyvärr drabbas omkring 30% av transplanterade patienter av återfall, inte sällan med en aggressivare sjukdom, till exempel akut myeloisk leukemi (AML). Det är därför viktigt att hitta metoder som kan förut-

spå ett framtida återfall, eller möjliggöra tidigare upptäckt av återfallet, så att förebyggande behandling kan sättas in.

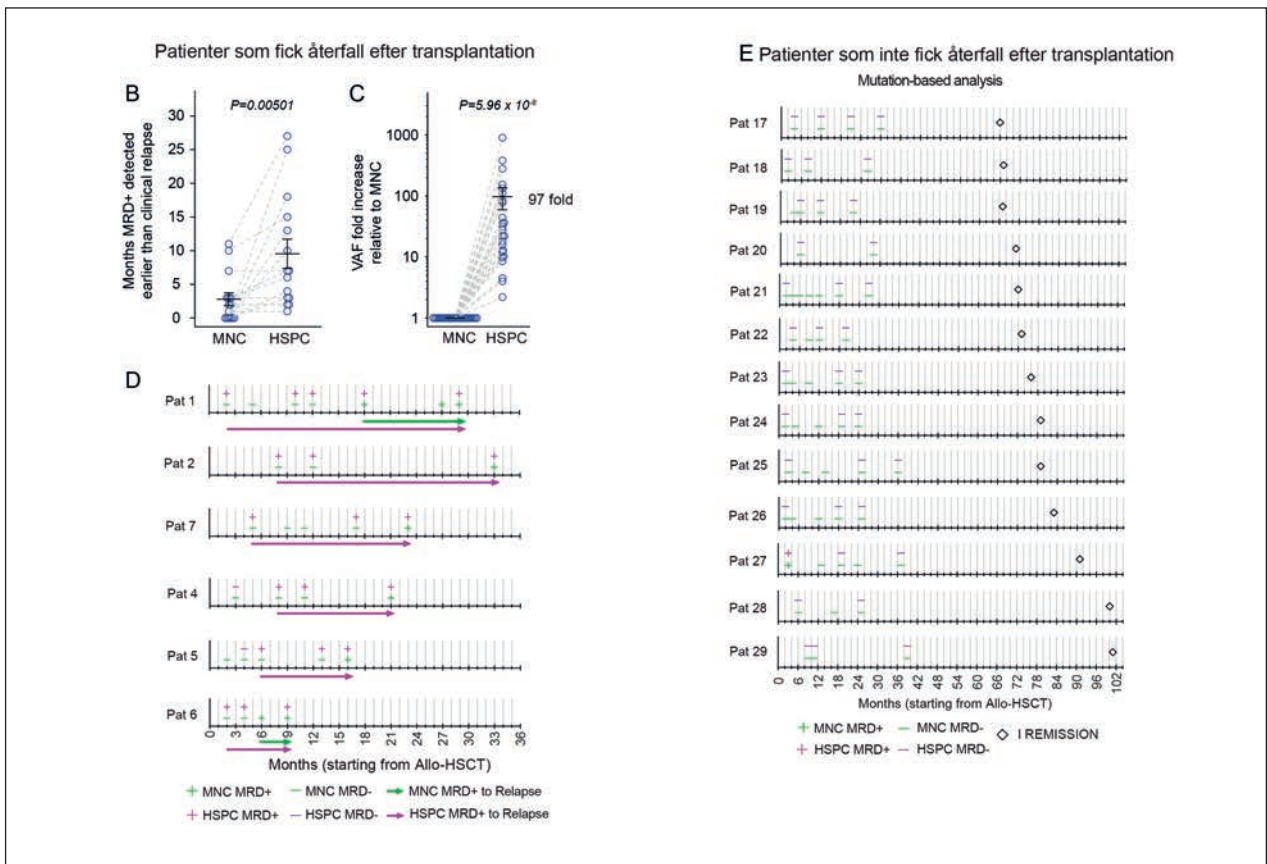
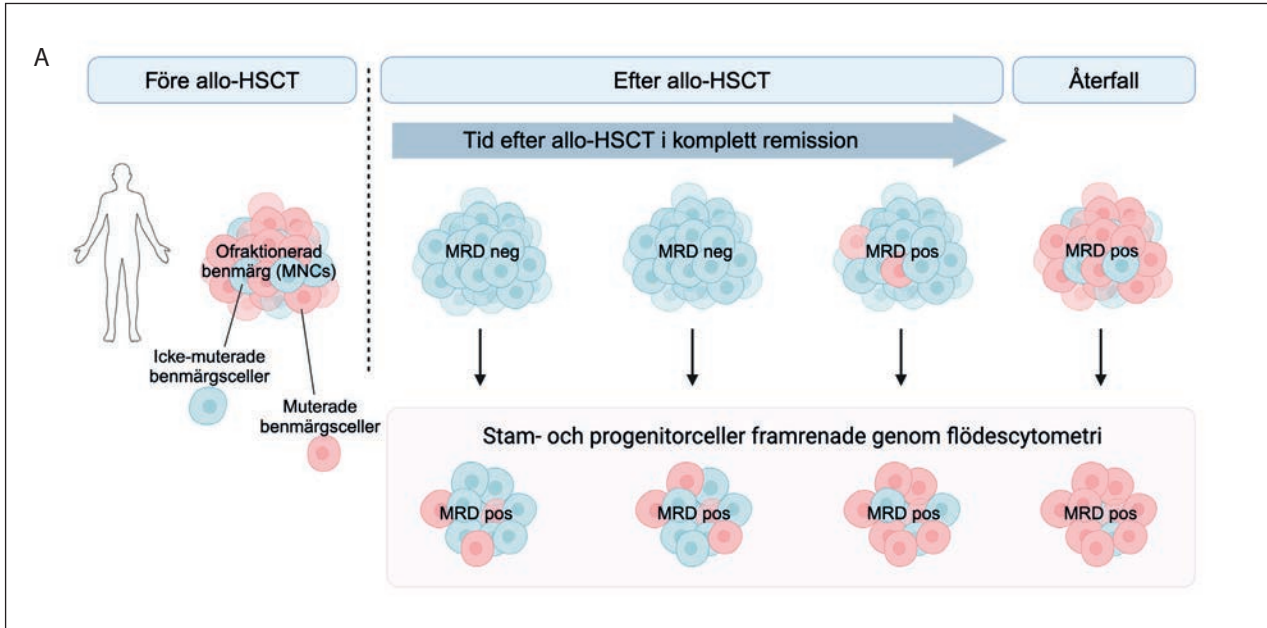
ÅTERFALL EFTER TRANSPLANTATION ÄR DET STÖRSTA HOTET FÖR PATIENTEN

När patienter får återfall av MDS efter transplantation är det oftast de ursprungliga sjukdomsorsakande mutationerna som patienterna hade redan innan transplantationen som är involverade i sjukdomsförloppet². Därför har det föreslagits att återfall kan upptäckas tidigare om man riktar analysen mot just dessa mutationer. I en nyligen publicerad studie har benmärgsprover (ofraktionerad benmärg) analyserats och resultaten

har visat att metoden är lovande men att den kliniska nyttan kan ifrågasättas eftersom runt 20-30 % av proverna var falskt positiva och negativa gällande korrelation mellan positivt utfall för mutationer och återfall³. Vår hypotes var att känsligheten kunde förbättras genom att rena fram stamcellerna ur benmärgsprovet och genomföra analysen för sjukdomsorsakande mutationer på dem, eftersom det är i dessa celler som mutationerna uppstår.

RIKTAD ANALYS AV STAMCELLER FÖRBÄTTAR KÄNSLIGHETEN AV METODEN

Vi genomförde en retrospektiv studie och analyserade totalt 29 patienter med



Tidigare upptäckt av återfall efter stamcellstransplantation är möjlig om stam- och progenitorceller renas fram och används för riktig analys av sjukdomsorsakande mutationer. (a) Grafisk sammanfattning av studien där benmärgsprover från MDS patienter samlades in innan och efter transplantation (allo-HSCT) både i remission och vid bekräftat återfall. Alla prover analyserades för förekomsten av sjukdomsorsakande mutationer i både ofraktionerad benmärg och framrenade stam- och progenitorceller. MRD; measurable residual disease (påvisbar sjukdom), pos; positiv, neg; negativ. Skapad via BioRender.com. **(b)** Antal månader tidigare än klinisk diagnos av återfall som mutationspositiva celler kunde upptäckas i benmärgen i analys av ofraktionerad benmärg (MNC) och stam- och progenitorceller (HSPC). Prover från enskilda patienter är sammankopplade med streckad linje. **(c)** Förändring av metodkänsligheten vid analys av stam- och progenitorceller (HSPC) i jämförelse med ofraktionerad benmärg (MNC). **(d)** Summering av mutationsanalys i ofraktionerad benmärg (MNC) och stam- och progenitorceller (HSPC) över tid av patienter med MDS som fick återfall efter transplantation. Pilhuvudet indikerar tidpunkten för återfall och pilskäftets längd indikerar antal månader innan återfallet som de analyserade proverna var mutationspositiva med vår metod. **(e)** Summering av mutationsanalys i ofraktionerad benmärg (MNC) och stam- och progenitorceller (HSPC) över tid av patienter med MDS som inte fick återfall efter transplantation. Diamanten indikerar senaste tidpunkten för analys då patienten fortfarande var i komplett remission. All data och figurer är modifierade från Dimitriou et al, Blood, 2023 <https://doi.org/10.1182/blood.2023022851>.

en MDS-diagnos som genomgått en stamcellstransplantation. 16 av de 29 patienterna hade fått återfall efter transplantationen, medan resterande 13 var i så kallad komplett remission och inte visade tecken på återfall mer än sex år efter transplantation, då risken för återfall är låg. Vi renade fram stamceller genom flödescytometri från benmärgsprover som samlats in kontinuerligt efter transplantationen (Figur 1a). Vi identifierade sjukdomsorsakande mutationer i patienterna innan transplantationen och använde sedan dessa mutationer som måltavlor för riktad molekylär analys i stamcellerna efter transplantationen. I femton av de sexton patienter som fick återfall kunde vi identifiera de sjukdomsorsakande mutationerna i stamceller när patienterna fortfarande var i klinisk remission. Detta är en förbättring i jämförelse med att analysera ofraktionerad benmärg, där vi endast kunde identifiera mutationerna i nio av sexton patienter dock alltid med mycket högre känslighet i stamcellerna. Våra resultat visar att känsligheten i metoden förbättras 97-faldigt genom att rena fram stamcellerna och att återfall kan förutspås i snitt tio månader innan klinisk manifestation (Figur 1b-d).

MUTATIONSNEGATIVA STAMCELLER I PATIENTER SOM INTE ÅTERFALLER.

Vi analyserade sedan benmärg från de tretton patienter som aldrig fick återfall och som var i komplett remission i minst 66 månader efter transplantationen. I endast en av dessa patienter kunde vi vid någon tidpunkt efter transplantationen identifiera mutationerna i stamcellerna och detta var i det prov som togs tidigast efter transplantationen (tre månader efter). I alla efterföljande prover (19 och 37 månader efter transplantationen) kunde de muterade cellerna inte längre detekteras. Trots att vi analyserade prover insamlade vid två till fyra tidpunkter efter transplantationen från samtliga patienter i komplett remission kunde vi inte hitta tecken till några muterade celler (Figur 1e), vilket står i kontrast till resultatet från patienterna som *senare fick återfall*. Detta stärker slutsatsen om att molekylär analys av framrenade stamceller för sjukdomsorsakande mutationer är en metod som har prediktivt värde för potentiellt återfall.

JÄMFÖRELSE MED ANDRA KLINISKT RELEVANTA METODER

Till sist jämförde vi vår metod med andra tillgängliga metoder för att upptäcka återfall. En av dessa metoder innebär att man i stället för att söka efter sjukdomsorsakande mutationer, söker efter patient-unika förändringar, så kallade enbaspolymorfier (SNPs), som kan skilja patientcellerna från donatorcellerna. Vår analys av SNPs visade att de prover som var positiva för mutationer var också positiva för SNPs. Dock var många mutationsnegativa prover samtidigt positiva för SNPs, både från patienter som fick återfall men också patienter som var i komplett remission. Detta tyder på att SNPs-analysen identifierar friska kvarvarande celler från patienten, vilket inte bör räknas som återfall.

En annan vanlig metod är fenotypisk analys genom flödescytometri. Detta är en användbar metod för AML där fenotypen av benmärgen ofta är annorlunda i jämförelse med en frisk person. MDS är dock en mindre aggressiv sjukdom och fenotypen av cellerna går ofta inte att utskilja från en frisk person. Vi jämförde uttrycket av cancer-relevanta antigen på benmärgscellernas yta mellan friska donatorer och MDS patienter innan och efter stamcellstransplantation i komplett remission. Vi såg ingen skillnad i uttrycket av dessa antigen mellan friska donatorer och de fyra MDS patienter vi analyserade vare sig innan eller efter transplantationen, vilket visar att den flödescytometri som finns tillgänglig idag inte är heltäckande eller känslig nog för alla patienter med MDS i jämförelse med vår metod. Detta försvåras även med att cellerna i benmärgen kan ändra fenotyp under återhämtning från cellgiftsbehandling eller transplantation.

Sammanfattningsvis visar vi i denna studie att användandet av screening för mutationer i stamceller är en mycket känslig och specifik metod för detektion av kvarvarande MDS celler efter transplantation, något som kan visa sig ha stor betydelse för upptäckten av återfall. Vi visar att känsligheten av en molekylär analys förbättras signifikant om den riktas specifikt mot stamcellerna som är dri-

vande i sjukdomsbilden. Studien illustrerar också vikten av att fokusera framtida forskning och behandlingar mot just dessa celler.

MER OMFATTANDE STUDIER BEHÖVER FÖLJA UPP RESULTATET

Vår studie är en viktig 'proof of concept' studie, där vi visar att framrening av stamcellerna vid uppföljande analys efter en stamcellstransplantation av patienter med MDS kan nästan 100-faldigt förbättra känsligheten i nuvarande metoder för att tidigare upptäcka potentiella återfall. Vår studie är dock utförd på en relativt liten och heterogen patientgrupp (29 patienter totalt) och den utfördes retrospektivt där det kliniska utfallet redan var känt. Det krävs därför större och mer omfattande studier för att klargöra den kliniska relevansen för patienter. En betydande begränsning med denna typ av analys i dag är att flera studier har visat på att en del av de patienter som har kvarvarande muterade MDS celler efter transplantation inte senare återfaller i sjukdomen. Det kvarstår därför mer arbete för att ta fram en metod som ännu säkrare kan förutspå risken för en patient med kvarvarande muterade celler att få ett återfall. Att rena fram stamceller genom flödescytometri är i dagsläget inte kliniskt implementerat och metoden är både resurs- och kompetenskrävande. Magnus Tobiasson, en av medförfattarna till studien, leder just nu en klinisk interventionsstudie där en förenklad version av metoden används.

Referenser

1. Woll, P. S. et al. Myelodysplastic Syndromes Are Propagated by Rare and Distinct Human Cancer Stem Cells In Vivo. *Cancer Cell* 25, 794–808 (2014).
2. Hong, S. et al. Pattern of somatic mutation changes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Bone Marrow Transplant.* 57, 1615–1619 (2022).
3. Duncavage, E. J. et al. Mutation Clearance after Transplantation for Myelodysplastic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 379, 1028–1041 (2018).

MADELEINE LEHANDER
DOKTORAND, INSTITUTIONEN FÖR MEDICIN,
KAROLINSKA INSTITUTET, HUDDINGE
MADELEINE.LEHANDER@KI.SE

