

分担研究報告

研究課題 新規リボザイムを用いた難治性白血病に対する遺伝子治療

分担研究者 浅野 茂隆 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・教授

研究協力者 田邊 剛 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部

谷 憲三朗 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・助教授

多比良和誠 東京大学大学院工学研究科・教授

研究要旨：難治性白血病に対する新しい遺伝子治療法開発を目的に、キメラ型発癌遺伝子 mRNA を特異的に切断する活性を持つ新規リボザイムであるマキシザイムの汎用性を示すために、b1a2 type bcr-abl mRNA と PML-RaRα mRNA を標的としたマキシザイムを作製し、それらの効果を検討した。いずれのマキシザイムも作用は非常に特異的で、昨年度報告した b2a2 type bcr-abl mRNA に対してと同様に、融合遺伝子 mRNA のみを正常型 mRNA に影響を与えることなく切断した。さらに患者細胞由来の細胞株にこれらマキシザイムを導入した場合、同細胞の増殖抑制傾向を認めた。マキシザイムは種々の遺伝子異常を持つ難治性白血病に対する遺伝子治療法として有用な可能性が示唆され、今後さらに詳細な検討を重ねていく予定である。

A. 研究目的

難治性白血病に対して化学療法などの既存の治療法には限界があるため、他の革新的な治療法を開発していく必要がある。遺伝子治療はその候補の一つであり、中でもリボザイム法は標的細胞への特異性が高く、副作用も少ないことが予想されることから、悪性腫瘍やエイズの治療法として有望視されている。しかし従来用いられてきたハンマーヘッド型リボザイムの場合、切断部位に GUC の配列を必要とするため、キメラ mRNA の融合部位に GUC 配列が存在しなければならない。今回新規に開発したマキシザイム法ではキメラ型遺伝子の融合領域には必ずしも GUC 配列は必要ではなく、さらに融合領域を認識したときのみ切断活性を示すように設計されている為特異性が高く、副作用も少ないことが期待される。昨年度は慢性骨髄性白血病 (CML) をモデルに b2a2 型 bcr/abl マキシザイムを作製し、細胞及び in vivo レベルでその有効性を確認した。本年度はさらにマキシザイムの汎用性を検討する目的で、b1a2 type bcr-abl mRNA と PML-RaRα mRNA を標的としたマキシザイムを構築し、その効果を検討した。

B. 研究方法

ハンマーヘッド型リボザイムを切断する際に必要のない領域を除去・小型化し、ダイマー構造をとらせることで同時に 2 つの基質に作用できるミニザイム (マキシザイム) を設計した。すなわち、一方の基質結合部位で b1a2 type bcr-abl mRNA と PML-RaRα mRNA の融合部位を認識する。また他方で近傍の切断部位 GUC を認識したときのみ切断活性に必須のマグネシウムを固定でき、異常型 mRNA だけを特異的に切断できる構築にした。

最初に、無細胞系での切断活性の特異性を検討した。(i) 融合部位のキメラ RNA 鎖またはその部位に相当する正常遺伝子の RNA 鎖、(ii) 標識した基質配列、(iii) マキシザイム、の三種の RNA 鎖への作用を検討した。次に細胞レベルでの効果を検討した。b1a2 type CML 患者由来の細胞株である Meg 01 にレトロウイルスベクターを用いてマキシザイムを導入し、増殖抑制効果を検討した。

C. 研究結果

In vitro において、キメラ RNA 鎖に対する部位特異的な切断活性を認めたが、正常 RNA 鎖の切断活性は全く認められなかった。

マキシザイムを導入された細胞を、コントロールのウイルスを導入された細胞を対象群として、NOD/SCID マウスに接種したところ、マキシザイム導入群で、腫瘍増殖が抑制された。

D. 考案

マキシザイム活性の特異性は b1a2 type bcr-abl mRNA と PML-RaRα mRNA を標的分子とした場合にも認められた。マキシザイム法は多種の融合遺伝子に対して有用である可能性が示唆された。今後、白血病細胞に特異的に遺伝子導入できるベクターを作製し、マキシザイム法と併用することで、より安全性と有効性に優れた遺伝子治療法を開発していく予定である。

E. 結論

従来のハンマーヘッド型リボザイムの対象とならなかった 3 種類のキメラ型 mRNA に対し、マキシザイム法は特異的な切断が可能であり、その汎用性も示唆された。本治療法は正常細胞には副作用が無く安全かつ効果的に使用できることが期待できるため、種々の難治性白血病に対する新規治療法として将来的に臨床開発が可能であるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanabe T. Takata I. Kuwabara T. Warashina M. Kawasaki H. Tani K. Ohta S. Asano S. Taira K.: Maxizyme, novel allosterically controllable ribozymes, can be designed to cleave various substrates. *Biomacromolecules* 2000, 1, 108-117

2. 学会発表

- 1) 第 62 回日本血液学会アジア血液学会セッション
GENE THERAPY FOR CML : A NOVEL RIBOZYME, THE MAXIZYME, THAT INDUCE APOPTOSIS TO CML CELLS
- 2) The 2th Annual Meeting 1999 The American Society of Gene Therapy : A novel ribozyme, the Maxizyme, that induce apoptosis to CML cells

HLA 不適合移植並びに自家造血幹細胞移植の評価と適応に関する研究

分担研究者 小川啓恭 大阪大学医学部分子病態内科学助教授

研究要旨

血縁および非血縁に HLA 適合ドナーが見出されない患者において、現状では、自家造血幹細胞移植と血縁および非血縁の HLA 不適合移植という治療法の選択が可能である。日本造血細胞移植学会および日本骨髄バンクからのデータより、HLA 不適合移植は血縁では A, B, DR に関して、HLA1 抗原不適合までが、また非血縁では、DR の DNA type1 座不適合 (AML では class I の DNA1 抗原不適合も許容される可能性がある) までが、それぞれの HLA 適合移植と比べて、差のない成績が得られていた。同種移植を必要としている、より多くの患者に移植という治療法を提供するためには、骨髄バンクにおけるドナープールの拡大とともに、上記に示した HLA 不適合の限界を少しずつ拡大していく必要がある。これには、FK506 などの有効性の高い免疫抑制剤の使用が不可欠である。一方、自家造血幹細胞移植は、日本造血細胞移植学会のデータによると、5 年生存率にして、CR1 58.0%, CR2 54.1%と優れた成績が示されている。しかし、これらの成績は、予後のよいものが選ばれた結果、即ち selection bias がかかっていると考えられる。従って、AML CR1 の intermediate/poor risk 群を中心に、同種移植と比較する、prospective study が必要である。

A. 研究目的

成人急性白血病の第 1 寛解期における、HLA 適合同胞間移植の 5 年生存率は、AML 66.1%, ALL 50.3%, と良好な治療成績を示している (日本造血細胞移植学会、平成 11 年度全国調査報告書)。しかし、同胞間で HLA 適合ドナーが見出される確率は 25-30% と低い。一方、非血縁者間移植は、登録から実際の移植まで、長時間を要するという欠点がある。したがって、移植が急がれる場合、大半の例で、HLA 適合同種骨髄移植を行えない。その場合、現実的には、血縁者からの HLA 不適合移

植あるいは、自家造血幹細胞移植を選択することになる。前者は、GVL 効果は強いが、重症 GVHD や拒絶の危険性も高い。一方、後者は、治療そのものの安全性は高いが、再発の危険性が高い。また、時間的余裕のある患者でも、骨髄バンクに HLA 適合ドナーを見出せない患者が、まだ 30% 近く存在する。このような患者に対して、平成 11 年 1 月より、HLA 1 抗原不適合ドナーよりの移植が本邦でも認可されている。したがって、バンクより HLA 1 抗原不適合移植を行なうべきか、自家造血幹細胞移植を行なうべきかについても、比較検討す

る必要がある。

B. 研究方法

日本造血細胞移植学会，全国データ集計，EBMT，IBMTR などから発表されたデータ，および自験例を基にして，急性骨髄性白血病（成人例）における，現状での stage-specific な最善の治療法について考察した。

（倫理面への配慮）

日本造血細胞移植学会の全国データは，全て匿名で臨床データが入っているので，実名が漏れることはない。当院での全ての造血幹細胞移植に当っては，患者とその家族より，informed consent を取った後，実施している。

C. 研究結果

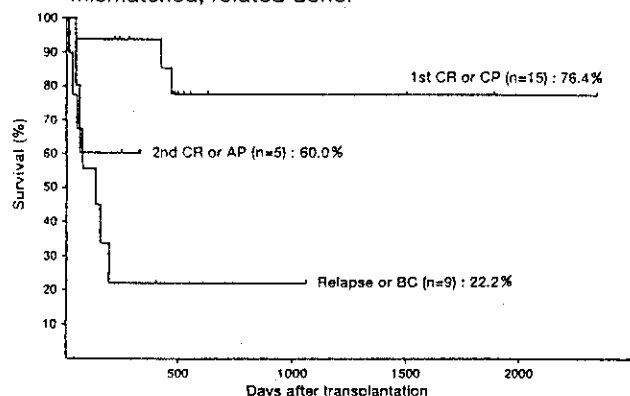
1. T 細胞除去を行わない移植で，HLA の不適合はどこまで許容されるか。

A. 血縁

日本造血細胞移植学会，全国データ集計に，A, B, DR に関する，GVH 方向の HLA1 抗原不適合は，29 例登録されていた。移植時の病期別に解析すると，生存率は①1st CR or CP 群(n=15)で 76.4%，②2nd CR or AP 群で(n=5)で 60.0%，③再発 or BC 群 (n=9) で，22.2% となっており，HLA 適合移植に比べて，差は認められなかった(図 1)。症例数は少ないが，欧米からの成績と同様に，本邦でも，HLA1 抗原不適合移植は，HLA 適合移植と同等に扱ってよいと思われる。また，T 細胞除去を行わない，HLA2 抗原不適合移植は，全て進行期症例(n=6)に対して行なわれ，1 例を除いて，移植後 6 ヶ月以内に死亡

していた(表 1)。しかし，再発 or CML-BC 群で，HLA1 抗原不適合移植を 2 抗原不適合移植に比べると，ほとんど差がない。したがって，HLA2 抗原不適合のために成績が悪いのか，進行期のために悪いのか，現状では不明である。GVL 効果を狙ったためか，HLA2 抗原不適合であるにもかかわらず，GVHD 予防が不十分な症例が多い。

図 1 allogeneic transplantation from HLA one locus-mismatched, related donor



(日本造血細胞移植学会，全国データ集計より)

表 1 血縁者間HLA 2抗原不適合移植

No. 疾患名	年齢性別	病期	ドナー	GVH予防	GVHD		生存期間(日)
					急性	慢性	
1	AML 46 M	初回不応	血縁	CSA+sMTX	4	n.d.	22
2	AML 23 M	4th CR	血縁	CSA+sMTX+ATG	4	n.d.	27
3	CML 40 M	BC	同胞	FK506+sMTX	3	n.d.	98
4	ALL 31 M	不明	同胞	CSA	不明	n.d.	135
5	SAA 13 M	不明	同胞	CSA+sMTX+ATG	2	n.d.	149
6	ALL 23 M	1st CR	同胞	FK506+sMTX	0	+	651

(日本造血細胞移植学会，全国データ集計より)

当科では，血縁にも，非血縁にも HLA 適合ドナーが見い出されない，進行期症例に対して，FK506(0.03 mg/kg) + sMTX+ mPSL(2mg/kg)によって，GVH 予防を強化して，HLA2 抗原不適合移植を 5 例行なった結果，follow up 期間は短いものの 5 例中 4 例(572 日+，362 日+，208 日+，47 日+)で生存してい

る。症例を重ねる必要はあるが、FK506を用いて GVHD 予防を強化することにより、良好な成績が得られる可能性もある。

B. 非血縁

本邦における、骨髄移植推進財団データ利用解析委員会から出された、報告書によると、HLA class I の DNA 不適合は移植後の生存率を有意に低下させる。しかし、AML に関しては、第1寛解期症例、および進行期症例ともに、HLA class I の DNA 不適合は、生存率を低下させる因子となっていない。血清型不適合移植は、本邦でも、1999年1月より、ドナーコーディネートが可能になった。しかし、症例数が少なく、follow up 期間が短いため、今回は解析を行なわなかった。Minnesota 大学のグループは、18歳以下の若い患者において、HLA class I の major 不適合 (serologically noncrossreactive group 抗原) でも、HLA 適合症例に比べて、生存率に有意の差は認められなかった。しかし、18歳以上の患者では、10-15%の長期生存率の低下が認められた。Seattle グループは、36歳以下の患者を対象にして、A, B, DR のうち、1座 minor 不適合 (serologically crossreactive group 抗原) ドナーからの移植を行ない、HLA 適合移植に比べて、移植後の再発は減少するが、急性 GVHD の危険性が増すため、生存率は相殺されて、有意差がなかったことを報告している。

2. 各種造血幹細胞移植の stage 別適応

auto PBSCT と HLA 不適合移植との比較を行なう前に、auto PBSCT と血縁および非血縁の HLA 適合移植との比較をしておく必要がある。日本造血細胞移植学会、平成 11 年度全国調査報告書のデータより、stage 別に 3 つの移植の 5 年生存率を以下に示す(表 2)。これらの成績は、randomized study ではない。また、auto PBSCT では、harvest の中に白血病細胞の混入が確認されれば、施行が見送られたり、予後の悪い症例は主治医の判断で allo BMT に回されたりするため、auto PBSCT の成績が見かけ上、良くなっている可能性がある。

表 2 stage別、各種造血幹細胞移植の5年生存率(成人例)

stage	autoPBSCT	血縁HLA一致BMT	非血縁HLA一致BMT
CR1	58.0% (n=222)	66.1% (n=395)	68.4% (n=52)
CR2	54.1% (n=46)	61.5% (n=129)	45.0% (n=43)
nonCR	5.2%* (n=40)	14.2% (n=153)	10.0%** (n=38)

*:2年, **:3年 (日本造血細胞移植学会, 平成11年度全国調査報告書より)

<初回寛解導入困難例> AML の 20-40%は CR1 に入らないとされている。血縁 HLA 適合移植では、21-43%の DFS、非血縁 HLA 適合移植でも、29-49%の DFS が報告されている。診療時に、患者の HLA 検査を施行しておくことが必要である。非血縁ドナーが間に合わない場合、血縁 HLA 2 抗原不適合移植を考慮すべきである。

<AML, CR1 での移植>欧米では、以前より、化学療法のみ、HD-AraC, auto BMT, alloBMT を比較する、大規模な prospective, randomized study が行なわれ、intention-to-treat の形で解析がなされてきた。AML の CR1 を対象にした多くの報告で、移植群と化学療法群との間に、生存率において、有意の差が得られていない。したがって、AML を予後因子別に層別化して、現状での最善の治療法を解析する必要がある。

① good risk 群 (t(8, 21), t(15, 17), inv(16)など) では、化学療法のみでも、60%以上の高い長期生存率が得られているのに加え、HD-AraC の導入により、治癒率の向上がさらに見込まれるため、移植の benefit は少ない。

② intermediate risk 群 (diploid, hyperdiploid など) と poor risk 群 (5 番, 7 番の deletion, 11q の異常) は、1) HD-AraC, 2) auto PBSCT, 3) 血縁 allo BMT, 4) 非血縁 allo BMT の randomized study が必要である。

<第1再発時>本邦では通常、salvage 療法が行なわれ、CR2 に導入してから移植が考慮されてきたが、Seattle グループは、salvage 療法による chemotherapy death が 25%あり、CR2 への導入率が 30-50%であるという理由から、血縁に 1 抗原不適合までのドナーが存在すれば、すぐに移植を行なうことを勧めている。IBMTR によると、21%の 5 年 DFS (CR2 の 5 年 DFS は 33%) である。再発時に移植を行なうべきか、CR2 に導入してから移植を行なうべきかの randomized study は現在

までない。

<AML, CR2 での移植>本邦では、血縁 allo BMT (HLA1 抗原不適合まで)や非血縁 allo BMT (1 抗原の DNA 不適合まで)で 50%以上の DFS が得られている。これらのドナーが得られない症例では、① auto PBSCT, ② 血縁 HLA2 抗原不適合移植, ③ 非血縁 HLA1 抗原 minor 不適合移植の 3 者を比較検討する必要がある。

D. 考察

血縁では、通常の前処置と GVHD 予防により、HLA 1 抗原不適合移植は、成績を落とすことなく施行することが可能である。HLA 1 抗原不適合により、GVHD が重症化する反面、その GVL 効果により、再発が低下するためと考えられる。HLA2 抗原不適合移植は、GVHD さえコントロールされれば、GVL 効果がさらに高くなることが期待される。血縁、および非血縁に HLA 適合ドナーが見い出されない進行期症例で、FK506 を含む GVHD 予防の強化 regimen を用いて、pilot 試験として、試みる価値があると考ええる。非血縁骨髄移植における、HLA 不適合移植は、DR の DNA 1 座不適合までは、HLA 適合移植と同等の結果が得られる。GVH 予防法を強化しながら、徐々にドナー、レシピエントの HLA disparity を大きくして行くことが望ましいが、DNA type の不適合では、class I の 1 座不適合あるいは DR の 2 座不適合を、HLA 抗原不適合では、DR の 1 抗原不適合から、適応を広げて行くべきと考ええる。AML に対する自家造血幹細胞移植は、本邦でも、CR1, CR2 を中心に行われてきた。

日本造血細胞移植学会のデータによると、その5年生存率は、CR1で58.0%、CR2で54.1%とけっしてHLA適合の血縁および非血縁骨髄移植に比べて、劣らない。しかし、これらの成績は、retrospectiveでselection biasがかかったものである。再発の危険性の低い症例は、自家造血幹細胞移植が、また、それが高い症例には、同種移植が選択される傾向が強いように思われる。したがって、自家移植と同種移植をprospectiveに成績を比較検討することが必要である。本邦における、非血縁者間骨髄移植の状況は、急速に変貌しつつある。①ドナーコーディネート期間の短縮、②治療成績の向上につながるdonor selection(HLA DNA typeのdisparityと成績との関係の解明)、③FK506を含むGVHD予防法の進歩などにより、非血縁者間骨髄移植の成績は急速に向上すると同時に、様変わりしつつある。一方、GVL効果の期待できない自家移植は治療法としての能力の限界に達していると考えられる。したがって、成績として固定しているものと、急速に変化しているものを比較することはかなりの困難さが予想される。

E. 結論

血縁および非血縁のHLA不適合移植は、現状では血縁でHLA1抗原不適合まで、非血縁でDR座のDNA1抗原不適合までは、HLA適合移植と変わらない成績が得られている。今後、同種移植を必要としている患者の1人でも多くの人に移植という治療法を提供するためには、HLA不適合を少しずつ拡大していく必要がある。また一方では、HLA不適合移植を可能にする免疫抑制療法の進歩が不可欠であり、

FK506に加え、MMFが有望と考える。

一方、自家造血幹細胞移植は、AML CR1でintermediate/poor risk群を中心にその存在意義を同種移植との比較の上で、問い直す必要がある。両者を比較するprospective studyが不可欠である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogawa H, Tsuboi A, Oji Y, Tamaki H, Soma T, Inoue T, and Sugiyama H.: Successful donor leukocyte transfusion at molecular relapse for a patient with acute myeloid leukemia who was treated allogeneic bone marrow transplantation: Importance of the monitoring of minimal residual disease by WT1 assay. *Bone Marrow Transplantation*. 21:525-527, 1998.
2. Oji Y, Oka Y, Tatekawa, T, Soma T, Matsunashi T, Yamagami T, Tsuboi A, Tamaki H, Kim EH, Sugiyama H, and Ogawa H: Successful treatment of relapsed T cell non-Hodgkin's lymphoma with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with double conditionins. *Int. J. Hematol.*, 69: 263-267, 1999.

2. 学会発表

小川啓恭, 相馬俊裕, 保仙直毅, 藤岡龍哉, 川上 学, 尾路祐介, 玉置広哉, 坪井昭博, 金 義浩, 村上雅樹, 岡 芳弘, 杉山治夫: unmodified marrow を用いた, HLA 2 抗原不適合移植. 第 22 回日本造血細胞移植学会総会, ワークショップ, 広島, 1999.

分担研究報告

同種末梢血幹細胞移植に関する臨床的研究

分担研究者	原 田 実 根	岡山大学医学部第二内科	教授
研究協力者	品 川 克 至	〃	助手
	竹 中 克 斗	〃	助手

研究要旨 同種末梢血幹細胞移植 (allogeneic-Peripheral Blood Stem Cell Transplantation;allo-PBSCT)の確立を目的して臨床的検討を行った。健常人ドナーに対する G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor)投与による PBSC 採取は安全に実施可能であるが、数%の頻度で採取不十分例がみられた。また 55 歳以上の高齢者ドナーに対しても安全に実施可能であった。Allo-PBSCT では、移植後の造血回復は速やかで移植関連死亡は少なく、優れた移植後生存率が得られた。同種骨髄移植との比較では急性 GVHD (II~IV度)の頻度は同様であり、慢性 GVHD の頻度は増加傾向が認められた。Allo-PBSCT の利点から、非血縁者間骨髄移植における骨髄バンクシステムでの allo-PBSCT の実施によるドナーリクルート拡大への発展、および高齢者への移植適応の拡大が期待される。

A. 研究目的

同種骨髄移植に代わる新しい造血幹細胞移植法として、同種末梢血幹細胞移植(allogeneic-Peripheral Blood Stem Cell Transplantation;allo-PBSCT)の確立を目的とする。本研究では、健常人同胞ドナーからの PBSC の至適採取法および、PBSC を用いる同種移植術式を確立する。

昨年度報告書では、1994年12月~97年11月に実施された103例のallo-PBSCT症例に関する第一次全国調査の結果を報告した。これに引き続き、1997年11月~99年11月に実施された症例に関する第二次全国調査を実施した。また第一次全国調査と日本造血細胞移植学会全国調査のデータにより、従来の同種骨髄移植(allo-BMT)とのretrospectiveなmatched-pair analysisにより比較検討を行い、allo-PBSCTの特徴を明らかにする。またPBSCT研究会allo-PBSCT分科会及

び岡山大学第二内科における症例のさらなる集積と長期解析を行った。さらにallo-PBSCTの利点を用いた新しい展開として、非血縁者間PBSCTへの可能性および高齢者への同種移植の適応拡大に関して検討する。

B. 研究方法

①昨年度報告書では、1994年12月~97年11月に実施された103例のallo-PBSCT症例に関する第一次全国調査の結果を報告した。これに引き続き、1997年11月~99年11月に実施された症例に関する第二次全国調査を実施した。解答が得られた275例中primary allo-PBSCT237例について解析した。ドナーはHLA一致同胞の他、HLA不適合移植33例、haploidentical 21例が含まれていた。レシピエントは年齢中央値36.5歳(0.5~70)、疾患は急性骨髄性白血病(AML)69例、

急性リンパ性白血病(ALL) 61 例、慢性骨髄性白血病(CML) 26 例、骨髄異形性症候群(MDS) 27 例、非ホジキンリンパ腫 20 例、その他 33 例であった。白血病に関しては、スタンダードリスク症例が 41 例、ハイリスク症例が 53 例であった。GVHD 予防は大多数の症例で cyclosporin (CSP)/short term methotrexate (sMTX)であった。

②岡山大学医学部第二内科において、1995 年 4 月～1999 年 11 月の間に、ドナーに関しては 30 例が、移植施行症例では 23 例が解析可能であった。ドナーは年齢中央値 36.5 歳(15~64)、全例 HLA 一致同胞であった。レシピエントは年齢中央値 36.5 歳(16~57)、疾患は AML 11 例、ALL 2 例、CML 6 例、NHL 2 例、その他 2 例であり standard risk 13 例、high risk 10 例であった。移植前処置は TBI containing regimen 11 例、non-TBI regimen が 12 例であり、GVHD 予防法は CSP/sMTX または methyl-prednisolone (mPDN)が用いられた。

③PBSCT 研究会 allo-PBSCT 分科会により多施設共同研究が行われ、1996 年 1 月～1997 年 6 月の間にスタンダードリスク白血病を対象に 30 例が登録され、26 例が評価可能であった。ドナーは年齢中央値 34 歳(18~53)、全例 HLA 一致同胞であった。レシピエントは年齢中央値 35.5 歳(16~45)、疾患は AML 11 例、ALL 3 例、CML 12 例であった。移植前処置は BU/CY または CY/TBI を中心とした標準的方法が用いられ、GVHD 予防法は CSP/sMTX が用いられた。

④スタンダードリスク白血病に対する allo-PBSCT と allo-BMT との比較研究を目的として、retrospective な matched-pair analysis をおこなった。対象は、allo-PBSCT 群は PBSCT 研究会での 26 例、allo-BMT 群は日本造血細胞移植学会全国集計データから、HLA 一致同胞間移植で、年齢 46 歳以下、疾患は AML の第 1 および第 2 寛解期、ALL の第 1 寛解期、CML の第 1 慢性期、GVHD 予防は CSP/sMTX のみによる、条件を満たす 100 例を抽出した。

⑤岡山大学医学部第二内科において、高齢者への allo-PBSCT の適応拡大を目的として 55 歳以上のドナーに対する PBSC 採取を検討した。

C. 研究結果

①全国調査：レシピエントに移植された CD34+細胞数は中央値 $5.0(0.3\sim31.7)\times 10^6/\text{kg}$ であり、移植後の造血回復は好中球 $500/\mu\text{l}$ 以上に中央値 11 日(7~53)、血小板 $20,000/\mu\text{l}$ 以上に 14 日(8~304)であった。急性 GVHD は評価可能 172 例中 grade II~IV が 68 例(39.5%)、grade III~IV が 25 例(14.5%)であった。慢性 GVHD は評価可能 105 例中、limited が 35 例(33.3%)、extensive が 33 例(31.4%)にみられた。移植後 day100 以内の早期死亡は 237 例中 30 例(12.7%)であり、調査時の死亡例は 66 例で主な死因は原疾患の再発進行が 21 例(32%)、感染症 15 例(23%)、急性 GVHD 12 例(18%)、VOD 7 例(11%)などであった。Kaplan-Meyer 法による 2 年全生存率(overall survival)は、standard risk 群で 70%、high risk 群で 25%であった。

②岡山大学医学部第二内科；ドナーへの G-CSF 投与は $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の 5 日間であり、投与開始 4 または 5 日後に採取を行い、得られた CD34+細胞数は $7.3(1.3\sim23.7)\times 10^6/\text{kg}$ であった。採取不十分と考えられる CD34+細胞数 $3\times 10^6/\text{kg}$ 以下の例は 30 例中 5 例(16%)に見られた。採取のためのアフレーシス回数は中央値 2 回であった。G-CSF 投与に伴う副作用は骨痛が 30 例中 27 例(90%)であり、白血球増加の最高値は投与開始後 5 日目で中央値 $41,000/\mu\text{l}$ (22,200~90,700)であった。また血小板減少の最低値は投与開始後 7 日目で中央値 $122,000/\mu\text{l}$ (41,000~213,000)であった。いずれの副作用も G-CSF 投与終了後一週以内に回復した。移植された CD34+細胞数は中央値 $5.91(1.26\sim19.7)\times 10^6/\text{kg}$ であり、移植後好中球 $500/\mu\text{l}$ 以上の回復は中央値 12(9~35)日、血小板 $20,000/\mu\text{l}$ 以上の回復は 14(12~128)日と速やかな造血回復を示し、全例遺伝子レベルで生着が確認された。急性 GVHD は Grade II~IV が 19 例中 7 例(37%)、III~IV が 19 例中 2 例(11%)であり、慢性 GVHD は extensive type が 16 例中 7 例(46%)に見られた。Kaplan-Meyer 法による 3 年全生存率(overall survival)は、standard risk 群で 72%、high risk 群

で 39%であった。③PBSCT 研究会；ドナーへの G-CSF 投与は $10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の 5 日間であり、得られた CD34+細胞数は $6.4(0.4\sim 26.5) \times 10^6/\text{kg}$ であった。採取のためのアフエレーシス回数は 2 回以内が 25 例中 22 例(88%)であった。採取不十分と考えられる CD34+細胞数 $3 \times 10^6/\text{kg}$ 以下の例が 25 例中 2 例(8%)に見られた。G-CSF 投与に伴う副作用は、骨痛が 25 例中 17 例(68%)、白血球増加 ($50,000/\mu\text{l}$ 以上) が 25 例中 8 例(32%)にみられ、最高値は投与開始後 5 日目で中央値 $43300/\mu\text{l}$ ($24,200\sim 66,300$) であった。また血小板減少 ($100,000/\mu\text{l}$ 以下) が 25 例中 19 例(76%)にみられ、最低値は投与開始後 6 日目で中央値 $79,900/\mu\text{l}$ ($43,000\sim 212,000$) であった。いずれの副作用も G-CSF 投与終了後一週以内に回復した。移植された CD34+細胞数は中央値 $7.3(2.4\sim 26.5) \times 10^6/\text{kg}$ であり、移植後好中球 $500/\mu\text{l}$ 以上の回復は中央値 12.5(9~20)日、血小板 $20,000/\mu\text{l}$ 以上の回復は 13(9~27)日と速やかな造血回復を示し、遺伝子レベルでも全例に生着が確認された。急性 GVHD は、Grade II~IV が評価可能 25 例中 9 例(36%)、III~IV が 25 例中 2 例(8%)であり、慢性 GVHD は limited type が 25 例中 3 例(12%)、extensive type が 25 例中 16 例(64%)に見られた。

④スタンダードリスク白血病に対する allo-PBSCT と allo-BMT の比較検討により、両群の GVHD の頻度をロジスティック解析により年齢、性別、疾患、病期で補正したオッズ比(Odd's ratio)を求めて解析した。Grade II 以上の急性 GVHD は、allo-PBSCT 群で 36%、allo-BMT 群で 31%であり、ロジスティック解析から求めたオッズ比では Grade II 以上の急性 GVHD は allo-PBSCT 群で 1.26 倍多いという結果が得られたが、有意差は認めなかった。慢性 GVHD は allo-PBSCT 群で 76%、allo-BMT 群で 51%であり、同様の解析で allo-PBSCT 群で 2.98 倍多く有意差が認められた。慢性 GVHD 症例の PS は、PS0 の症例が 65%、PS3~4 の症例は 4%であり、重症例は少ないものと思われた。

⑤岡山大学医学部第二内科において、55 歳以

上のドナー 5 例に対して PBSC 採取を検討した。1 例はレシピエントの再移植の必要性から 2 度の採取を実施した。年齢は平均 59 歳、白血球最高値は平均 $38,300/\mu\text{l}$ 、血小板最低値は平均 $98,000/\mu\text{l}$ であり、骨痛などの副作用も若年者と同様であった。採取された CD34+細胞数は、平均 $3.3(1.3\sim 6.1) \times 10^6/\text{kg}$ と良好であったが、1 例において血管の脆弱性によるブラッドアクセスの問題からアフエレーシスが不十分であった。G-CSF 投与による二度の動員採取を実施した例では、一度目と二度目の間隔は 6 か月であり、二度目の採取量及び副作用ともに初回と同様であった。

D. 考察

Allo-PBSCT において骨髄移植より有利な点は、①ドナーに関して全身麻酔や骨髄採取に伴うリスクがなく、骨髄移植に比しより安全に造血幹細胞が採取可能である、②好中球、血小板の早期回復により、感染症や輸血量の減少による移植安全性が向上する、③骨髄採取に比し多量の造血幹細胞及びリンパ球が得られるため、これを用いた免疫療法及び遺伝子治療などの細胞療法への応用が用意である、等があげられる。これらの利点から、非血縁者間骨髄移植におけるドナーリクルート拡大への発展や高齢者への移植適応の拡大が期待される。米国では NMDP 規約において、再移植が必要な場合にはドナーの意志によって骨髄採取または PBSC 採取の選択が可能になっている。また従来、同種骨髄移植の適応年齢の上限は約 50 歳であったが、移植後の生着が迅速で早期死亡の少ない allo-PBSCT ではより高齢者への実施が可能と思われる。

一方解決すべき課題として、ドナー側では①PBSC 採取不十分例に対する対策の確立、②ドナーの安全性確保のため、ドナー登録システムによりドナー全例の短期的および長期的副作用追跡調査を実施すること、が重要であり、レシピエント側では③長期の造血能並びに免疫能の維持の確認、④急性および慢性 GVHD に関して重症度と治療反応性及び予後に与える影響に関す

る検討、⑤疾患および病期別の長期的な抗白血病効果、に関してさらに症例を集積し検討する必要がある。

E. 結論

①健常人ドナーに対する G-CSF による PBSC 動員法により、移植に必要な CD34+細胞を十分採取可能であることが示されたが、少数例で動員不十分例がみられた。②G-CSF による PBSC 動員は、血小板減少が高率にみられるが、いずれも一時的であり他の副作用も可逆的で、安全に施行可能と考えられた。③移植後の好中球及び血小板の回復は速やかであった。④HLA 一致同胞間の allo-PBSCT と骨髄移植の retrospective analysis では、急性 GVHD(Grade II~IV)の頻度は有意差はなく、慢性 GVHD の頻度は骨髄移植に比し有意に増加傾向が認められたが、重症例の頻度は少なかった。

以上の成績から、非血縁者間移植 allo-PBSCT が期待される。非血縁者間 allo-PBSCT において予想される有利な点は、①ドナーに関しては、全身麻酔や骨髄採取に伴うリスクがなく、より快適で安全な造血幹細胞採取法と考えられるため、骨髄バンクのドナーリクルート拡大が期待できる、②移植後の速やかな造血回復により、感染症や輸血量が減少し、移植成績の向上が期待される、ことがあげられる。

G-CSF 投与による PBSC 採取は 55 歳以上のドナーにおいても、若年者と同様に実施可能であったが、高齢者の身体的特性に留意する必要がある。

急性および慢性 GVHD に関しては米国で進行中の allo-PBSCT と allo-BMT の prospective randomized study の中間報告ではいずれの発症頻度にも有意差は認められていない。今後我が国においても骨髄移植との詳細な比較検討が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M Harada, et al: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation is coming of age. *Int J Hematol.* 62:1-5, 1995
- 2) M Harada, et al: G-CSF-induced mobilization of peripheral blood stem cells from healthy adults for allogeneic transplantation. *J Hematotherapy* 5(1):63-72,1996
- 3) M Harada, et al: Mobilization of peripheral blood stem cells for autologous and allogeneic transplantation. *Vox Sang* 70 (suppl. 3):71-73, 1996
- 4) M Harada, et al: Clinical results of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: Japanese survey 1995. *Bone Marrow Transplant* 17(suppl. 29): S47-S50, 1996
- 5) T Yano, et al: G-CSF-induced mobilization of peripheral blood stem cells for allografting: comparative study of daily single versus double dose of G-CSF. *Int J Hematol* 66:169-178,1997
- 6) T Teshima, et al: Mobilization of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation. *Cytokines, Cellular and Molecular Therapy* 3:101-104,1997
- 7) Y Nawa, et al: Responses of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells to alloantigen stimulation. *Blood* 90:1716-1718, 1997
- 8) Y Katayama, et al: Bone marrow necrosis in a patient with acute myeloblastic leukemia during administration of G-CSF and rapid hematologic recovery after allotransplantation of peripheral blood stem cells. *Am J Hematol* 57:238-240, 1998
- 9) M Harada, et al: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for standard-risk leukemia. A multicenter pilot study: Japanese experience. *Bone Marrow Transplant* 21(suppl 3):S54-S56, 1998
- 10) R Masuda, et al: allogeneic peripheral Blood Stem Cell 1 transplantation for treatment of refractory follicular lymphoma. *Internal Medicine* 37-1050-1054, 1998

- 11) M Naira, et al: Analysis of circulating hematopoietic pro-genitor cells after peripheral blood stem cell Transplantation. *Int J Hematol* 69:36-42, 1998
 - 12) Y Katayama, et al: Hematopoietic progenitor cells from allogeneic bone marrow trans-plant donors circulate in the very early post-transplant period. *Bone Marrow Transplant* 23:659-665, 1999
 - 13) Y Maeda, et al: Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 105:295-302, 1999
 - 14) Y Nawa, et al: Successful treatment of advanced natural killer cell lymphoma with high-dose chemotherapy and syn-geneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 23:1321-1322, 1999
 - 15) S Nakao, et al: Early establish-ment of hematopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in comparison with allogeneic bone marrow transplantation *Eur J Haematol* 62:265-270, 1999
 - 16) 原田実根、他：本邦における血縁者間同種末梢血幹細胞移植の全国調査：現状と問題点 *臨床血液* 40:1160-1167, 1999
2. 学会発表
- 1) 豊嶋崇徳、品川克至：G-CSF による末梢血幹細胞移植の現状と問題点. 第 38 回日本床血液学会シンポジウム. 1996 年 10 月
 - 2) 品川克至、原田実根：同種末梢血幹細胞移植の現状と非血縁者間末梢血幹細胞移植への可能性. 第 39 回日本臨床血液学会シンポジウム. 1997 年 10 月
 - 3) 竹中克斗、原田実根：同種末梢血幹細胞移植の現状と問題点. 第 40 回日本臨床血液学会シンポジウム. 1998 年 10 月
 - 4) 原田実根：同種末梢血幹細胞移植の現況と将来、平成 10 年度厚生科学研究「造血細胞移植と免疫応答に関する研究」班公開シンポジウム、東京都、1999 年 2 月 6 日
 - 5) 原田実根：同種末梢血幹細胞移植、第 9 回九州・山口骨髓移植研究会、福岡市、1999 年 2 月 12 日
 - 6) 原田実根：末梢血幹細胞移植の現状と問題点、第 60 回山口県医師会生涯研修セミナー、山口市、1999 年 2 月 14 日
 - 7) 原田実根：固形がんに対する幹細胞移植（シンポジウム「新しいがんの治療戦略」）、第 25 回日本医学会総会、東京都、1999 年 4 月 2 日
 - 8) 原田実根、小寺良尚：シンポジウム司会「造血幹細胞移植」、第 25 回日本医学会総会、東京都、1999 年 4 月 4 日
 - 9) 島崎千尋、原田実根：急性骨髄性白血病の治療戦略. 造血幹細胞移植の立場から（シンポジウム「急性白血病の治療戦略」）、第 61 回日本血液学会総会、東京都、1999 年 4 月 19 日
 - 10) Wu Y, Harada M : Chairman, Asian Session 2 “Treatment for hematological malignancies”, 第 61 回日本血液学会総会、東京都、1999 年 4 月 20 日
 - 11) Kawano F, Harada M, Shimazaki C, Sonoda Y, Ogawa M, Takaku F for Japan Blood Cell T4ansplant Study Group(JBCTSG) : Autologous blood cell transplantation with acute myeloblastic leukemia in first remission. Asian Session 2 “Treatment for hematological malignancies”. 第 61 回日本血液学会総会、東京都、1999 年 4 月 20 日
 - 12) Kawano F, Harada M, Shimazaki C, Sonoda Y, Ogawa M, Takaku F for Japan Blood Cell T4ansplant Study Group(JBCTSG) : Autologous blood cell transplantation with acute myeloblastic leukemia in first remission. 10th Aniversary of the Symposium on Autologous PBSCT, September 5-8,1999, Muhouse, France
 - 13) Harada M, Takenaka K, Shinagawa K, Kawano F, Kasai M, Sawada H, Nakao S, Aotsuka N, Ogawa M, Takaku F, Kodera F:Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in Japan. 10th Aniversary of the Symposium on Autologous PBSCT, September 5-8,1999,

Muhouse, France

- 14) Harada M, Chou T, Ishiguro T, Shinagawa K, Imajo K, Kawano F, Gondo H, Kasai M, Ogawa M, Takaku F for Japan Blood Cell transplantation Study Group: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in Japan. 10th Anniversary of the Symposium on Autologous PBSCT, September 5-8, 1999, Muhouse, France
- 15) 原田実根、M. Körbling : ワークショップ座長「凍結保存造血幹細胞の移植における安全性と効果」、第 26 回日本低温医学会総会、福岡市、1999 年 11 月 18 日
- 16) 竹中克斗、原田実根、小寺良尚 : 同種末梢血幹細胞移植における造血幹細胞の凍結保存の移植に及ぼす影響 (ワークショップ「凍結保存造血幹細胞の移植における安全性と効果」)、第 26 回日本低温医学会総会、福岡市、1999 年 11 月 18 日
- 17) 原田実根、Körbling : シンポジウム座長「幹細胞移植」、第 7 回日本輸血学会秋季シンポジウム
- 18) 河野嘉文、原田実根 : シンポジウム司会「同種 PBSCT」、第 22 回日本造血細胞移植学会、広島市、1999 年 12 月 16-17 日
- 19) 村田 誠、原田実根、小寺良尚 : 健常人ドナーからの PBSC 動員・採取之安全性 (シンポジウム「同種 PBSCT」、第 22 回日本造血細胞移植学会、広島市、1999 年 12 月 17 日
- 20) 竹中克斗 : HLA 一致同胞からの同種 PBSCT—成人における成績. 第 22 回日本造血細胞移植学会シンポジウム. 1999 年 12 月

同種末梢血幹細胞移植における血球および免疫学的再構築—骨髓移植との比較

分担研究者 堀田 知光 東海大学血液リウマチ内科教授

研究協力者 岸 賢治、吉場史朗、笹尾 保、小川吉明、渡邊茂樹

(東海大学血液リウマチ内科)

研究要旨

同種骨髓移植(BMT)と同種末梢血幹細胞移植(PBSCT)における血球回復と免疫学的動態について、当施設における成績を継時的に比較した。移植造血前駆細胞数が明らかに多い PBSCT 群で3血球系の再構築までの時間が明らかに短縮し、感染症の頻度・輸血総数ともに少なかった。CD4+T 細胞サブセットの検討では両群に差を認めず、リンパ球幼弱化試験では、PBSCT 群において水痘ウイルス抗原への反応性の低下が軽減する傾向であった。

PBSCT により、同種造血幹細胞移植後の輸血総数・感染予防の軽減が期待できる。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植における幹細胞ソースとして、全身麻酔下に穿刺採取される骨髓に代わり G-CSF 等により動員される末梢血造血幹細胞を用いる移植が注目を集めている。この移植法の功罪について明らかにするためには、ドナーと患者の両面からの詳細なプロスペクティブな検討が必要であるが、その前段階として、これまでに行った同種骨髓移植(BMT)と同種末梢血幹細胞移植(PBSCT)における臨床効果、特に、血球(免疫能)回復について比較検討した。

B. 研究方法

過去3年間に行った兄弟ドナーからの造血幹細胞移植を、造血幹細胞ソースとしての骨髓と末梢血を比較した。(表1)

骨髓採取は全身麻酔下に100回以上の腸骨穿刺により800-1200mlの骨髓液を採取した。末梢血幹細胞採取は、ドナーに有効性と副作用について説明し承諾を得た後、G-CSF (nartograstim) 5-10ug/kg/day (1X1 or 2X1) を皮下注射し、4~6日目にCobe Spectraによるアフエレーシス(8-12L)を行い、患者体重(kg)あたり 3×10^6 個以上のCD34細胞数を目標に採取した。

免疫学的経過は、リンパ球芽球化現象・既報によるCD4+T細胞のサブセットを検討した。

C. 研究結果 (表 2、図 1-2)

移植総有核細胞数は PBSCT で BMT の約 3 倍以上で、 $5.8 \pm 2.2 \times 10^6/\text{kg}$ の CD34+細胞が投与された。移植後の各血球回復は有意に PBSCT で速く、PC 輸血の頻度も少なかった。急性・慢性 GVHD の頻度・重症度ともに両群に差を認めなかった。

移植後の細胞免疫学的動態は、IL-2 刺激によるリンパ球幼弱化現象では両群に差を認めなかったが、水痘ウイルス抗原に対する反応性では、PBSCT においてより少ない低下に止まった。CD4+T 細胞サブセットの検討では、免疫抑制療法等の影響・移植後時期などにより異なるが両群に差は認めず、TH2 は低値をとり、TH1 は GVHD 等の影響により大きなばらつきを示した。

D. 考察

BMT に代わる PBSCT は、ドナーの全身麻酔を必要とせず、自己血輸血の必要が無い点で、短期的に見るとドナーの危険が回避できる利点がある一方、投与する G-CSF の長期的副作用が明らかでない現時点では、依然、問題を残している。

一方、末梢血幹細胞による同種移植が患者に及ぼす影響は、多量の造血幹細胞と同時に多量のリンパ球が輸注され、これに伴う免疫反応が予想されてきた。しかし実際に PBSCT 後には急性 GVHD の頻度・重症度とも BMT と差は見られず、一部に慢性 GVHD の頻度の増加が報告されている。

今回、当施設における BMT と PBSCT の比較では、3 血球系統の回復が促進する利点を示し、T 細胞系の免疫状況に大きな差はないことを示した。さらに、有意差はないが、注入されたリンパ球による水痘ウイルスへの反応性が比較的保たれている点が認められた。この点は、PBSCT の際にウイルスなどによる感染症を起こしにくいことを示唆し、更に臨床例で比較検討する価値があることを伺わせた。

現在 BMT 後には無菌治療・抗ウイルス剤の予防投与・免疫グロブリン投与等が行われており、長期にわたる嚴重な入院管理が必要とされているが、PBSCT の導入により、これらの期間の短縮が期待される。

E. 結論

PBSCT 後の血球回復は BMT に比較して明らかに早い一方、GVHD 等の移植細胞に由来する免疫反応が著しく高い傾向は見られなかった。慢性 GVHD については更に注意が必要であるが、PBSCT は BMT に比較して優位な点が多く認められた。

F. 研究発表

笹尾 保、岸 賢治：同種 PBSCT と同種 BMT の比較. 第 22 回日本造血細胞移植学会総会シンポジウム II、1999.

G. 知的所有権の取得状況 特になし

表 1 移植症例の概要

		BMT	PBSCT
age	mean \pm SD	33 \pm 12	34 \pm 9
sex	M/F	8/8	8/5
Diag	ANLL	2	0
	ALL	7	5
	CML	4	5
	NHL	1	2
	AA	2	
	MDS (RA)		1
Stage	1CR/1CP	8	9
	MT above	6	3
HLA matching	6/6	14	13
HLA matching	5/6	2	
Donor	age	35 \pm 11	35 \pm 11
	sex M/F	6 / 10	9 / 4
ABO major mismatch		3	1
Preconditioning			
	CY+Etop+TBI	11	9
	AraC+Etop+TBI	1	1
	CY+TBI	2	1
	CY+AraC+TBI		1
	CY+TAI	2	
	Bus+Etop+L-PAM		1

表 2 移植後の血球回復とGVHD

		BMT	PBSCT
transplanted cells (mean \pm SD)			
	NCC 10 ⁸ /kg	2.4 \pm 0.9	9.3 \pm 4.1
	CD34 10 ⁶ /kg		5.8 \pm 2.2
G-CSF		16/16	13/13
day ANC>500/ul (d)		15	11
day WBC>1000/ul (d)		16	12
day PL>50000/ul (d)		29	15
day Ret>2.0% (d)		25	16
total PC (x10U)		13	5
day last PC (d)		24	13
aGVHD grade			
	I	7	2
	II	5	2
	III	3	
	IV		1
cGVHD	-	5/11	3/8
	Limited	1/11	1/8
	Extensive	5/11	4/8

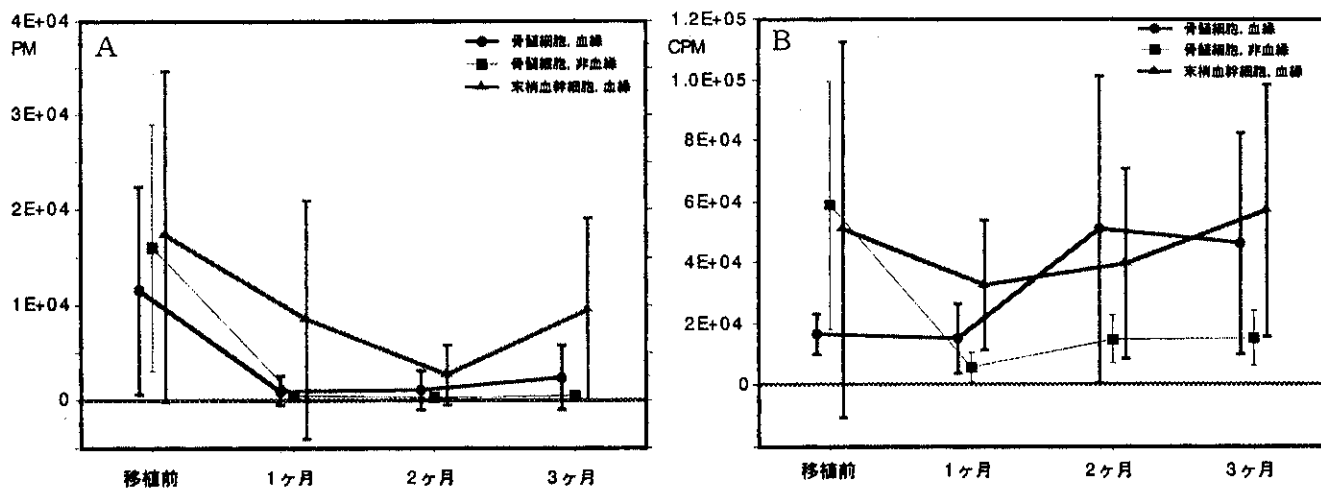


図1 リンパ球幼弱化試験による造血幹細胞移植後の経過
 A. 水痘抗原に対する反応性 B. IL-2に対する反応性

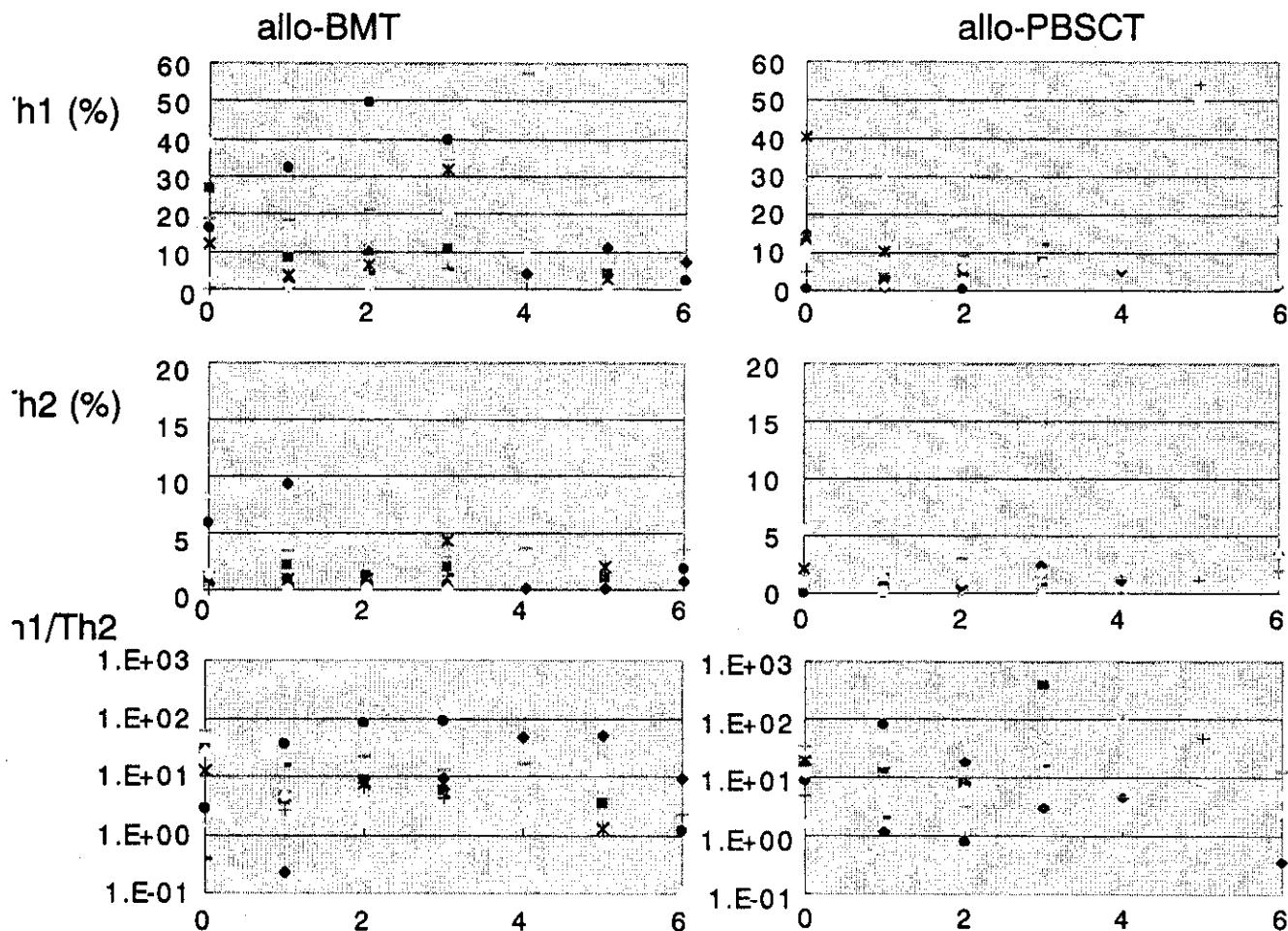


図2 CD4+ T細胞の継時的変化 BMTとPBSCTの比較
 (横軸 移植後月数、0=前)

分担研究報告

研究課題 造血幹細胞のex vivo増幅と臨床応用に関する研究

分担研究者 中畑龍俊 京都大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 ヒト未分化造血前駆細胞上にはgp130、c-Kit、Flk2/Flt3、mpl受容体が発現していた。ヒトCD34+細胞を可溶性IL-6受容体(sIL-6R)/IL-6複合体、SCF、FL、TPO存在下に液体培養すると、NOD/SCIDマウスの骨髄再構築能を持った幹細胞を増幅できることが明らかとなった。培養前のヒトCD34+細胞を移植したNOD/SCIDマウスに比し、sIL-6R/IL-6複合体、SCF、FL、TPO存在下で培養後の細胞を移植したマウスの骨髄、末梢血中にはヒト細胞が著明に増加していた。ヒト造血幹細胞を7日間の培養で約4倍増幅できることが、限界希釈法により確認された。本培養法はex vivo増幅造血幹細胞を用いた新しい臨床応用の可能性を示している。

A. 研究目的

本研究の目的は、臍帯血中の造血幹細胞や造血前駆細胞の特徴を明らかにするとともに、造血幹細胞のin vivo測定法を確立し、造血幹細胞のex vivo増幅法を開発することである。造血幹細胞のex vivo増幅法の確立は、臍帯血移植の適応を成人にまで広げるための緊急の課題と考えられる。また、造血前駆細胞の増幅であっても、これを併用することにより臍帯血移植で問題となっている移植後血球回復の遅延を改善することが期待され、臨床的な貢献度は極めて大きいと考えられる。このような観点から研究を行なった。

B. 研究方法

1. ヒト造血幹細胞上のサイトカイン受容体の解析

臍帯血中のCD34+細胞をG-CSFR, EPOR, IL-6R, IL-3R, GM-CSFR, gp130, c-Kit, Flk2/Flt3, Mplなど種々のサイトカイン受容体抗体を用いて染色後、受容体が発現している細胞と発現していない細胞をソーティングし、NOD/SCIDマウスへの移植、in vitroコロニー法をにより解析した。

2. ヒト造血幹細胞のin vivo定量的測定法の開発

NOD/Shi/SCIDマウスに種々の量の全身放射線照射後、ヒト臍帯血よりイムノビーズあるいはFACSを用いて分離されたCD34+細胞を尾静脈より移植した。移植後経時的にマウスを殺し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺中のヒト細胞の存在をフローサイトメトリーで解析した。フローサイトメトリーには抗ヒトCD45抗体および抗ヒトCD34抗体、抗ヒトCD33抗体、抗ヒトCD13抗体、抗ヒトCD3抗体、抗ヒトCD4抗体、抗ヒトCD8抗体、抗ヒトCD10抗体、抗ヒトCD19抗体、抗ヒトCD41b抗体、抗ヒトGPA抗体、抗ヒトIgM抗体、抗ヒトCD56抗体を用いた。また、移植後一定の間隔で抗アジアロGM1抗体をマウスに投与しその効果を検討した。

3. 臍帯血造血幹細胞のex vivo増幅法の検討

ヒト臍帯血よりイムノビーズあるいはFACSを用いて分離されたCD34+細胞を各種サイトカイン存在下に液体培養前後でNOD/Shi/SCIDマウスに移植し、3カ月経過後のマウス骨髄、末梢血中の各種ヒト細胞の比率をフローサイトメトリーを用いて測定し、ヒト造血幹細胞のex vivo増幅について検討した。

C. 研究結果

1. ヒト造血幹細胞上のサイトカイン受容体の発現に関する検討

造血幹細胞や未分化造血前駆細胞上にはgp130, c-Kit, Flk2/Flt3, Mplが発現していることが明らかとなった。従って現時点ではそれらに対応するサイトカインを組み合わせる方法が理想的と考えられる(表1)。

ヒト造血幹細胞上に発現していると考えられる受容体とサイトカイン

受容体	サイトカイン
c-Kit	stem cell factor (SCF)
Flk2/Flt3	Flk2/Flt3 ligand (FL)
Mpl	トロンボポエチン(TPO)
gp130	IL-6/sIL-6 complex
?	self-renewal factor ?

昨年報告したように未分化ヒト造血前駆細胞はgp130は発現しているがIL-6Rは発現していない。IL-6, sIL-6R, SCFを用いて臍帯血CD34+細胞を液体培養すると、CFU-Mixは培養前の50倍以上に増幅した。このCFU-Mixの増幅は抗gp130抗体添加により完全に抑制されたことから、gp130を介するシグナルによりもたらされていることが証明された。

トロンボポエチン(TPO)の受容体であるMplは臍帯血CD34+細胞の中でも未分化な細胞上に発現が見られた。7日間の培養においてTPOは単独でCFU-Blastを含む各種造血前駆細胞およびLTCICのわずかな増幅作用が明らかとなった。またSCF, IL-6, sIL-6Rの系にTPOを添加するとさらに著明な造血前駆細胞の増幅が得られた。

NOD/SCIDマウスを用いた解析により、ヒト造

血幹細胞(SCID Repopulating Cell: SRC)上にはFlk2/Flt3が発現していることが明らかになりつつある(投稿中)。臍帯血CD34+細胞を用いた検討ではflk2/flt3 ligand(FL)はIL-6+sIL-6Rと著明な相乗効果を示し、種々の造血前駆細胞のex vivo増幅を刺激した。以上のようにFLはSCFと同様に未分化な多能性前駆細胞の増殖に関しても作用を及ぼすと考えられた。

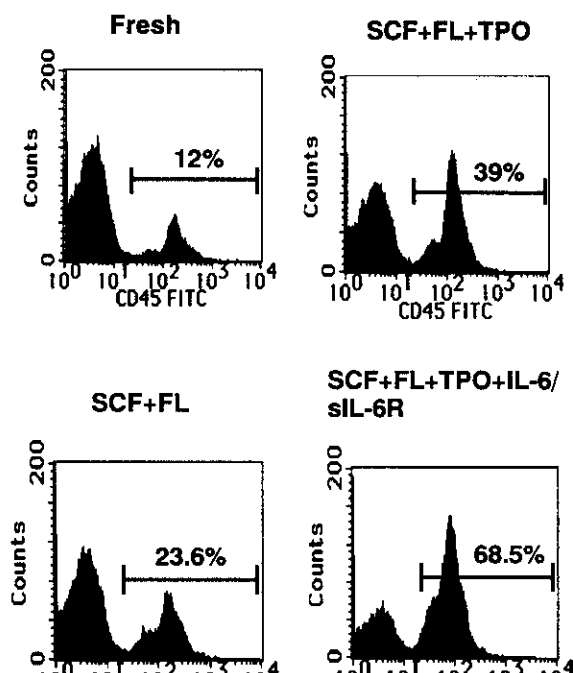
このようにIL-6+sIL-6Rによるgp130の活性化はc-Kit signalやFlk2/Flt3 signalと著明な相乗作用を示し、この系は従来の方法に比し未分化造血前駆細胞の著明な増幅が得られることから、臨床応用が期待される。以上のようにsIL-6/RIL-6複合体とSCF, TPO, FLを組み合わせることにより、未分化ヒト造血前駆細胞が著明に増幅できることが明らかとなった。

2. NOD/SCIDマウスを用いたヒト造血幹細胞の増幅の有効性の検討

種々のサイトカインを組み合わせ培養によりヒト造血幹細胞が増幅できるか否かNOD/SCIDマウスを用いて検討した。臍帯血から分離したCD34+細胞を1週間培養する前後でNOD/SCIDマウスに移植し、3ヶ月以上経過後マウス骨髄、末梢血、脾臓中のヒト細胞の頻度を比較検討した。培養することなく移植したマウスに比し、SCF, FL, TPO, IL-6/sIL-6R存在下で1週間培養後の細胞を移植したマウスの方が明らかにヒトCD45抗体で染色される血液細胞の頻度が高かった(図1)。このマウスの末梢血中にはヒトBリンパ球、好中球、単球、好酸球、赤血球、血小板が多数検出された。多数の実験で常に上記の条件で培養後の細胞を移植したマウスの方がヒト細胞を高頻度に認めた。限界希釈法を用いた検討では、培養前に比べ上記の条件下で培養することにより、約4倍造血幹細胞は増幅できることが示された。

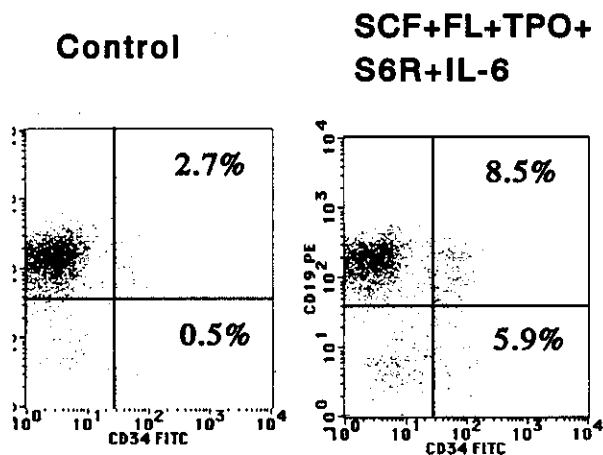
図1

NOD/SCIDマウス骨髄でのヒトCD45陽性細胞の出現



多数の実験で常に上記の条件で培養後の細胞を移植したマウスの方がヒト細胞を高頻度に認めたことから、われわれの開発した培養法はヒト造血幹細胞のex vivo増幅に有効と考えられた。また、興味深いことに、培養後の細胞を移植したマウスの骨髄中にはより多数のヒトCD34+細胞が見られた(図2)。

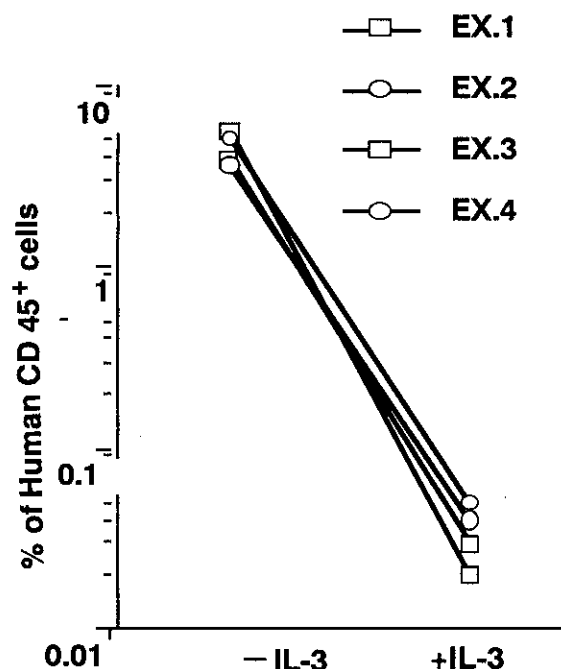
図2



この培養系にIL-3を添加すると常に骨髄再構築能は低下した(図3)

図3

SRCに対するIL-3の作用



D. 考案

ヒト造血幹細胞上に発現しているサイトカイン受容体を解析し、それに対応するサイトカインを組み合わせることで造血幹細胞の増殖を刺激することは最も理論的な造血幹細胞のex vivo増幅法と考えられる。臍帯血中のCD34+細胞を種々のサイトカイン受容体抗体を用いて解析すると、造血幹細胞や未分化造血前駆細胞上にはgp130, c-Kit, Flk2/Flt3, Mplが発現していることが明らかとなった。従って現時点ではそれらに対応するサイトカインを組み合わせる方法が理想的と考えられる。

近年、ex vivoで造血幹細胞や造血前駆細胞を増幅する研究が盛んに行われている。本研究の成果は現在小児に限定されている臍帯血移植の成人への適応拡大、血球回復の遅い臍帯血移植の安全性向上につながる技術として

期待されている。現在までに種々のサイトカインを組み合わせた試みが世界中でなされているが、未だ成功したとは言い難い。一般に標的細胞として臍帯血より分離したCD34⁺細胞またはその亜分画を用い、種々のサイトカインを組み合わせて培養している。様々な組み合わせが用いられているが、いずれが最もよいか解っていない。IL-3, IL-6, SCFを基本とする報告が多いが、未分化な細胞にはIL-6Rは発現していないことからこの組み合わせでIL-6が有効に機能しているとは思われない。今回の検討では、sIL-6/RIL-6複合体、SCF, TPO, FLを組み合わせて1週間培養した後移植したマウスの方が、培養せずに移植したマウスよりも常に多くのヒト細胞が検出できたことから、この培養系で造血幹細胞の増幅が得られる可能性が示唆された。

E. 結論

ヒト造血幹細胞上に発現しているサイトカイン受容体を検討した。その結果に基づきsIL-6R/IL-6複合体とSCF, TPO, FLを組み合わせることにより、ヒト造血幹細胞のex vivo増幅が可能となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sui X., Tsuji K., Ebihara Y., Tanaka R., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T., Nakahata T.: Soluble IL-6 receptor with IL-6 stimulates megakaryopoiesis from human CD34⁺ cells through gp130 signaling. *Blood* 93:2525-2532,1999.
2. Hasegawa S., Pawankar R., Nakahata T., et al.: Functional expression of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon R1) in human platelets and its intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood* 93:2543-2551,1999.
3. Honda H., Suzuki T., Inaba T., Oda H., Tsuji K., Ebihara Y., Ishikawa T., Nakahata T., Yazaki Y., Look T., Hirai H.: Expression of E2a-HLF chimeric protein induced T-cell apoptosis, B-cell maturation arrest, and development of acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 93:2780-2790,1999.
4. Kampuraj D., Saito H., Kaneko A., Kimura H., Nakajima T., Tsuji K., Nakahata T.: Characterization of mast-cell-committed progenitors present in human cord blood. *Blood* 93:3338-3346,1999.
5. Inamitsu T., Nakahata T., Ueda K.: Juvenile chronic myelogenous leukemia: Retrospective analysis in Japan and literature review. *Int. J. Pediatr. Hematology/Oncology* 6:123-129, 1999.
6. Kobayashi M., Ueda K., Kojima S., Nishihira H., Nakahata T.: Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with chronic neutropenia of childhood: Modulation of G-CSF levels by myeloid precursor cell mass. *Brit. J. Haematol.* 105:486-490,1999.
7. Taniguchi T., Nakahata T., et al.: Expression of p21Cip1/Waf1/Sdi1 and p27 Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* 83:4167-4178,1999.
8. Kinoshita T., Sekiguchi T., Xu M-J., Ito Y., Kamiya A., Tsuji K., Nakahata T., Miyajima A.: Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7265-7270,1999.
9. Yang FC., Tsuji K., Oda A., Xu MJ., Watanabe S., Ikeda Y., Nakahata T.: Effects of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) on megakaryopoiesis and platelet function in hG-CSF receptor-transgenic mice. *Blood* 94:950-958,1999.
10. Matsumoto T., Seki Y., Nakahata T., et al.: