

- Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2 protein-1 (CIS1) transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 19:6396-6407,1999.
11. Ui M., Takeda M., Nakahata T., et al.: Retrovirus vectors designed for efficient transduction of cytotoxic or cytostatic genes. *Gene Therapy* 6:1670-1678,1999.
  12. Futaki M., Yamashita T., Yabe M., Kato S., Asano S., Nakahata T.: The IVS4+4A-T mutation of the Fanconi Anemia gene FANCC is not associated with severe phenotype in Japanese patients. *Blood* 95:1493-1498,2000.
  13. Sugiyama H., Nonaka T., Kishimoto T., Komoriya K., Tsuji K., Nakahata T.: Peroxisome proliferator-activated receptors are expressed in mouse bone marrow-derived mast cells. *FEBS Letters* 467:259-262,2000.
  14. Ishii T., Nakahata T., Maekawa T.: Expression of SDF-1/PBSF receptor CXCR4 on CD34+ human bone marrow cells is a phenotypic alteration for committed lymphoid progenitors. *J. Immunol.* in press.
  15. Kajiwara M., Nonoyama S., Nakahata T., et al.: In vitro megakaryocyte differentiation from CD34 positive cells is defective in patients with Wiscott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Brit. J. Haematol.* in press.
  16. Takagi M., Nakamura T., Sawada T., Kaneko A., Nozaki-Ukai M., Nakahata T., Yokota T., Heike T.: Chimeric GM-CSF-leukemia inhibitory factor(LIF) receptor can transduce expansion signals in primitive hematopoietic progenitors lacking IL-6Ra, IL-11Ra and gp130. *Mol. Cell. Biol.* in press.
  17. Ishiguro A., Nakahata T., Matsubara K., Hayashi Y., Kato T., Suzuki Y., Shimbo T.: Age-related changes in serum thrombopoietin in children: high levels in infants by one month of age. *Pediatr. Res.* in press.
  18. Matsuoka S., Tsuji K., Xu M., Yang FC., Kaneko K., Ebihara Y., Manabe A., Kikuchi A., Nakahata T.: CD 34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood* in press.
  19. Sato T., Maekawa T., Watanabe S., Tsuji K., Nakahata T.: Erythroid progenitors differentiate and mature in response to endogenous erythropoietin. *Blood* revised.
  20. Ueda T., Yoshino H., Ebihara Y., Hisakawa H., Mitsui T., Manabe A., Tanaka R., Kobayashi K., Ito M., Tsuji K., Nakahata T.: Ex vivo expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor. *J. Clin. Invest.* in press.
  21. Hayashi Y., Honma Y., Niitsu N., Taki T., M., Tsuji K., Nakahata T.: SN-1, a novel leukemic cell line with t(11;16)(q23;p13): Myeloid characteristics and resistance to retinoids and vitamin D3. *Cancer Res.* in press.
  22. Sugiyama H., Nonaka T., Kishimoto T., Tsuji K., Nakahata T.: Peroxisome proliferator-activated receptors are expressed in human cultured mast cells: a possible role for these receptors in negative regulation of mast cell activation. *Blood* in press.

精製造血幹細胞移植の確立と普及に関する研究

分担研究者 河 敬世 大阪府立母子保健総合医療センター 小児内科部長

研究協力者 安井 昌博、岡村 隆行、坂田 尚己、井上 雅美、八木 啓子

(大阪府立母子保健総合医療センター小児内科)

研究要旨

精製造血幹細胞移植法の確立を目的に HLA 不一致血縁者ドナーからの同種移植例について考察した。今回の検討からより安全に allogeneic haploidentical transplantation が行えることがわかり、今後のさらなる前処置の工夫や精製法の改良により、移植を必要とするすべての患者さんに移植医療を提供することが可能となりつつある。

A. 研究目的

HLA 一致ドナーからの同種移植は、悪性疾患や造血器障害、免疫不全症などの根本的治療法としてすでに定着し、今日では血縁者間のみならず非血縁者間移植が広く行われている。用いられる移植片も骨髓血、臍帯血、末梢血と選択肢が広がり、移植を希望するより多くの患者さんに移植医療の提供が可能になってきている。しかしながら、HLA 一致ドナーがないために同種移植が受けられない患者さんも少なからず存在し、そのような患者さんにおける HLA 不一致間移植が、種々の工夫のもとにこれまで施行されてきた。HLA 不一致間移植の最大の難点は、高い拒絶（生着不全）率と重度の GVHD であり、初期の試みはことごとく失敗してき

た、その後前処置の強化や T 細胞除去が行われるようになり、一定の成績が得られるようになってきているが、決して満足できるものではなく、より安全で確実な移植法の確立が求められる。

B. 研究方法

1995 年 3 月～1999 年 10 月までに同種移植の絶対的適応であるにも関わらず、HLA 適合ドナーが得られなかった 33 例を対象とした（表 1）。疾患の内訳は急性白血病が 19 例（4 例が CR1、15 例が CR2 以上）、神経芽腫 5 例、その他の腫瘍性疾患が 3 例、非腫瘍性疾患が 6 例（2 例の慢性活動性 EBV 感染症を含む）であった。ドナーは同胞の 1 例を除き全例父親で 2～3 座不一致であった。G-

CSF を用いてドナーの骨髄から CD34 陽性細胞を末梢血に動員し、免疫磁気ビーズ法による Isolex system を用い CD34 陽性細胞（造血幹細胞）精製した（PBSC）。体重差のある場合には骨髄血から単核球を分離後、CD34 陽性細胞を精製し（BMSC）、いずれの場合も移植可能細胞数と考えられている  $2 \times 10^6/\text{kg}$  を目標に採取した。

移植前処置は各症例の重症度や移植時の全身状態によって適宜工夫したが、生着率を高める意味からも HLA 適合移植と比べ全体的に強化した。GVHD 予防は FK506 単独で行った。

#### C. 研究結果（表 2-4）

1) 輸注細胞数：PBSC 25 例の平均輸注 CD34 細胞数は、 $5.04(1.24-14.1) \times 10^6/\text{kg}$  で 8 例の BMSC では  $2.89(0.69-5.58) \times 10^6/\text{kg}$  であった。混入している CD3 細胞数は PBSC では  $0.76(0.18-1.77) \times 10^5/\text{kg}$ 、BMSC では  $1.14(0.13-3.20) \times 10^5/\text{kg}$  であった。

2) 造血能の回復と GVHD：好中球 ( $\geq 500/\mu\text{l}$ ) の回復は PBSC が day12、BMT が day14、網状赤血球 ( $\geq 1\%$ ) もそれぞれ day18,25、血小板 ( $\geq 2 \text{ 万}/\mu\text{l}$ ) も day27,37 と既報どおり PBSC が早かった。急性 GVHD は Grade 0 が 5 例、I が 15 例、II が 8 例、III が 3 例、IV が 1 例で、Grade III の 1 例が死亡したが、他はステロイドパルス療法や MTX でコントロール可能であった。長期生存例 7 例を含

む 11 例に慢性 GVHD（限局型 6、全身型 5 例）を認めたが、ステロイド剤の内服で軽快した。

3) 転帰：33 例のうち 12 例が生存中である。全体の 4 年生存率は 31% で、非腫瘍性疾患（6 例）では 67%、悪性疾患の標準リスク（6 例）では 42%、ハイリスク（21 例）では 19%であった。移植後 60 日以内の早期死亡をみると、当初の 1998 年 2 月までの 24 例では 8 例みられたが、1998 年 3 月以降の 9 例では 1 例のみであった。

#### D. 考察

1) 生着不全：6 例（18%）に拒絶あるいは晩期生着不全がみられた（これは HLA 不一致の非血縁者間臍帯血移植とほぼ同等）。自験例では混入 T 細胞や輸注 CD34 陽性細胞数との相関はみられなかったが、十分量の細胞数（これまでの 5 倍以上）を輸注すれば HLA barrier を克服できるという報告もあり、確実に生着を得るためには、免疫抑制の強化と少なくとも PBSC で  $5 \times 10^6/\text{kg}$  以上の CD34 陽性細胞の確保が望まれる。

2) GVHD：Grade III 以上が 4 例（12%）でみられたが、HLA 一致の非血縁者間骨髄移植と比べてもその頻度は低かった。E-rosette やモノクローナル抗体を用いてもう一段階 T 細胞の混入率 ( $10^4/\text{kg}$ ) を下げると、ほとんど GVHD がみられないという報告もあり、その必要性に関しては今後の検討課題である。

3) ウイルスの再活性化と再発率：

T 細胞を除去し免疫抑制を強化することにより生着率は改善するが、免疫能低下による致死感染が問題となる。特に潜伏ウイルスの CMV や EBV の再活性化が問題であるが、DLI (T 細胞数で  $1 \times 10^5/\text{kg}$ ) でコントロール可能であろう。その後の再発予防は MRD (微小残存病変) をモニターしながら可能な治療法 (活性化 T 細胞やモノクローナル抗体などの免疫療法) を今後考慮する必要がある。

4) 適応拡大: 2 例の慢性活動性 EBV 感染症のうち、1 例は化学療法に抵抗性となった段階での移植で VOD で亡くしたが、もう 1 例は VGPR での移植で CR (9 か月) を維持している。移植時期決断の重要性がうかがい知ることができる。

5) ドナーの安全性: G-CSF 投与による副作用としては、全身倦怠感や軽度の骨痛がみられたが重篤なものはみられなかった。

## E. 結論

前処置の工夫や CD34 陽性細胞の精製法が進歩し、生着ならびに GVHD 予防、ウイルス感染対策などが可能となり、より安全に Allogeneic Haploidentical Transplantation が行えるようになってきた。移植を必要とするすべての患者さんに移植医療を提供することが可能となりつつある。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

安井 昌博、河 敬世: 同種 CD34 陽性細胞移植—その適応と展開. *Molecular Medicine* 36: 736-743, 1999.

安井 昌博、河 敬世: CD34 陽性細胞移植の現状と今後の展望. *Biotherapy* (印刷中)

G. 知的所有権の取得状況 なし

(表1) 当科で施行したCD34陽性幹細胞移植例

1995年3月～1998年2月				
UPN	診断	移植時の年齢(歳)	体重(kg)	移植時の状態
72	AML	1	9.2	自家骨髄移植後再発
82-1	SAA	2	12.5	治療に無反応
82-2		3	16.9	移植細胞の拒絶
61	ALL	2	12	自家骨髄移植後再発
88	MDS	4	16	第1寛解期
93	ALL	10	30	第3寛解期
95-1	SAA	1	9.3	治療に無反応
95-2		1	9.7	移植細胞の拒絶
63	NBL	5	16.2	自家骨髄移植後再発
107	ALL	7	26	第2寛解期
108	ALL	1	8.5	第1寛解期
33	NBL	12	30	自家骨髄移植後再発
115	HPS	8	27	治療抵抗性
118	AML	14	56	第2再発期
91	ALL	3	18	自家骨髄移植後再発
125	MDS	4	17	第1寛解期
126	JCML	2	12	第1寛解期
132	ALL	11	38.5	第3再発期
133	AML	2	12.5	第1再発期
111	ALL	2	13.4	自家骨髄移植後再発
143	ALL	3	14	第3寛解期
145	ALL	11	35	第3寛解期
146	CAEBV	11	23.7	治療抵抗性
162	ALL	4	20	第2寛解期
169	AML	1	10	第1寛解期
172	AML	15	51	第2再発期
1998年3月～1999年10月				
163	NBL	5	18	自家移植後PR
186	ALL	4	16	第2再発期
188	Ormenn	0	6.1	-
189	ALL	4	17	第1寛解期
207	NK leukemia	1	12	第1再発期
206	NBL	3	10	自家骨髄移植後生着不全
209	CAEBV	9	24	VGPR
222	ALL	2	10	第1寛解期
223	NBL	15	30	VGPR

**(表2) Grafts' characteristics**

	PB		BM	
	CD34 <sup>+</sup> cells (N = 25)	CD3 <sup>+</sup> cells (N = 23)	CD34 <sup>+</sup> cells (N = 8)	CD3 <sup>+</sup> cells (N = 8)
Purity (%)	88.9 (50.2 - 98.6)		89.7 (63.9 - 98.3)	
infused cells (X10 <sup>5</sup> /kg)	50.4 (12.4 - 141)	0.76 (0.18 - 1.77)	28.9 (6.9 - 55.8)	1.14 (0.13 - 3.2)
yield (%)	42.9 (12.4 - 77.6)		45.6 (26.4 - 61.3)	

**(表3) Recovery of Hematopoiesis ( days )**

	Allo PBSCT ( CD34 <sup>+</sup> cells ) n = 25 median	Allo BMT ( CD34 <sup>+</sup> cells ) n = 8 median
Neutrophils > 500 / $\mu$ L	12 ( 9 - 15 ) n = 24	14 ( 12 - 18 ) n = 7
Reticulocytes > 1 %	18 ( 13 - 55 ) n = 24	25 ( 13 - 34 ) n = 7
Platelets > 2 X 10 <sup>4</sup> / $\mu$ L	27 ( 10 - 52 ) n = 11	37 ( 25 - 53 ) n = 5

**(表4) GVHD**

	<b>Allo PBSCT ( CD34<sup>+</sup>cells )</b>	<b>Allo BMT ( CD34<sup>+</sup>cells )</b>
<b>acute GVHD ( Grade )</b>	<b>N = 25</b>	<b>N = 7</b>
0	4	1
I	11	4
II	8	0
III	2	1
IV	0	1
<b>chronic GVHD ( type )</b>	<b>N = 10</b>	<b>N = 1</b>
limited	5 ( skin 4, skin+liver 1 )	1 ( skin 1 )
extensive	5 ( skin+GI 5 )	NA