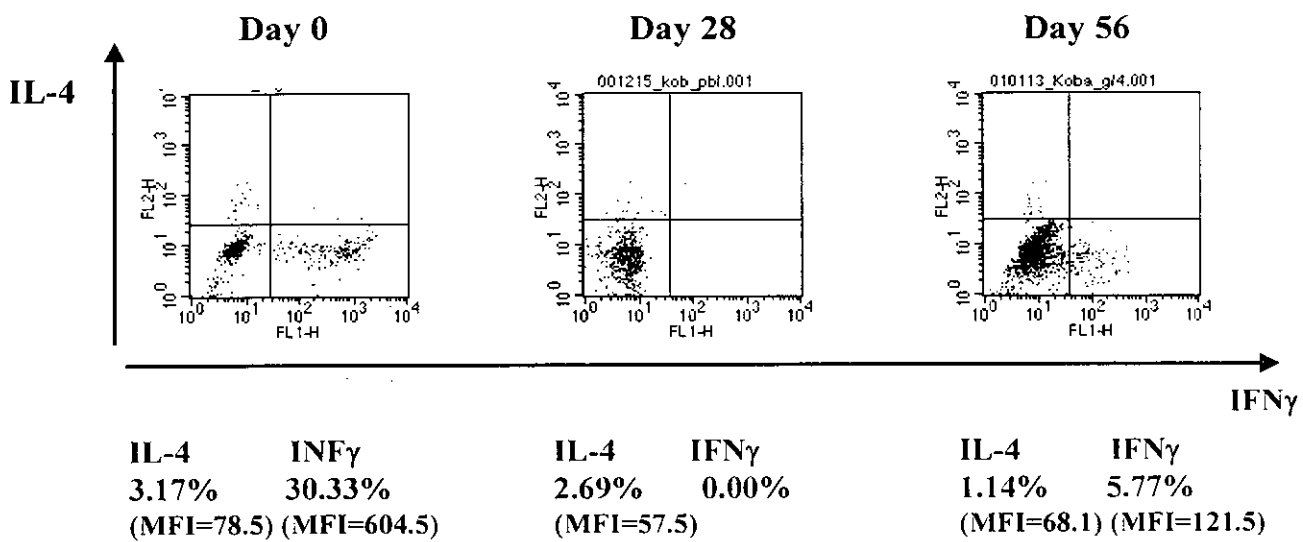


図5

[免疫学の検討2]



V. 研究会議発表者報告書

第一回研究会議 : 平成 12 年 6 月 3 日

第二回研究会議 : 平成 13 年 2 月 10 日

(再掲)

1. 平成12年度第一回研究会議

【タイトル】

I. 主任研究者 挨拶

II. 研究計画報告

テーマⅠ. 造血細胞移植から細胞治療へ

- 1) ① EBV-LPD に対する非血縁ドナーからの DLT2 例—細胞治療の初期モデルとして
② 非放射性物質を用いたリンパ球細胞障害活性測定法の検討
小寺良尚 名古屋第一赤十字病院第四内科、骨髄移植センター 106
- 2) ① GVL 効果に關与する mHa の検討——DLI (T) により GVL 効果の得られた
CML 慢性期再発 9 症例の mHa の解析結果——
② 「CML 再発に対する DLI 後の GVL 効果発現に關する臨床研究」の提案
塩原信太郎、近藤恭夫 金沢大学医学部 輸血部 108
- 3) 予後因子としての染色体異常を base にした各種造血幹細胞移植 (自家移植、血縁 BMT、
非血縁 BMT) の治療成績の比較 — 日本造血細胞移植学会、全国データ集計より 110
小川啓恭 大阪大学医学部 第三内科
- 4) 同種末梢血幹細胞移植の問題点と課題 112
竹中克斗、原田実根 岡山大学医学部 第二内科
- 5) 「自家造血幹細胞移植の確立」と「海外ドナーを用いた同種造血幹細胞移植の位置づけ」
—研究計画— 114
岡本真一郎 慶應義塾大学医学部 内科
- 6) 骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植に關する研究 116
神田善伸、高上洋一 国立がんセンター中央病院 内科
- 7) 増幅幹細胞移植の臨床応用に向けて 118
辻 浩一郎、浅野茂隆 東京大学医科学研究所 内科

テーマⅡ. ヒト組織適合抗原の解析と応用

- 8) HLA-C, HLA-E 抗原の役割 120
森島泰雄 愛知県がんセンター病院 血液化学療法部
- 9) HLA-DNA タイピングの意義の確立 122
笹月健彦 九州大学・生体防御医学研究所 遺伝学部門
- 10) 免疫関連分子多型の移植への影響 123
石川善英、十字猛夫 日本赤十字社中央血液センター
- 11) 母児免疫とマイナー組織適合性抗原の視点から SCT を考える 124
佐治博夫 HLA 研究所
- 12) 日本人の HLA 頻度について 報告文書なし
赤座達也 日本赤十字社中央血液センター
- 13) マイクロサテライト多型を用いたゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索 126
猪子英俊 東海大学医学部 分子生命科学 2

テーマⅢ. 膠原病に対する造血細胞移植—適応疾患拡大のモデルとして—

- 14) 難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植 報告文書なし
小池隆夫 北海道大学医学部 第二内科
- 15) 乳癌に対する自己 PBSCT 後に慢性関節リウマチの症状の改善を得た 1 例 127
丸山文夫、江崎幸治 藤田保健衛生大学 内科

平成12年度分担研究課題
「DLTと細胞治療」

1. EBV-LPDに対する非血縁ドナーからのDLT2例
—細胞治療の初期モデルとして—
2. 非放射線物質を用いたリンパ球細胞障害活性
の検討

分担研究者: 小寺良尚
研究協力者: 寺倉精太郎 熱田由子 西田徹也
笠井雅信 浜口元洋
(名古屋第一赤十字病院内科)
平林紀男(同 病理部)

1. EBV-LPDに対する非血縁ドナーからのDLT2例
—細胞治療の初期モデルとして—

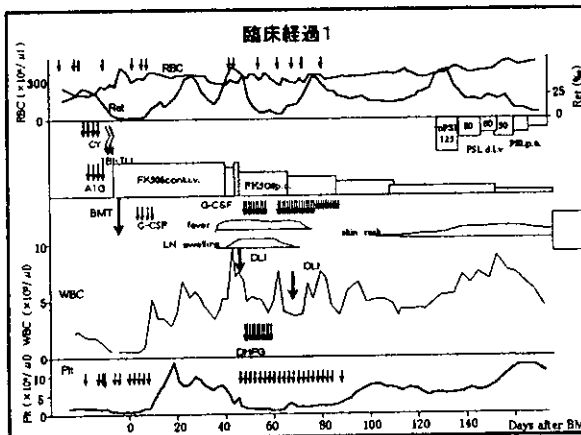
DLTは同種骨髄移植後の再発白血病やEBV-LPDに対し再び治療を望み得る治療法として今年度より健康保険適用医療となった。DLTは骨髄ドナー末梢血中のリンパ球分画を未操作で輸注するという、細胞を用いた治療の最もprimitiveな形のものであるが、それだけに体外操作する際に問題となる様々な規準の枠外にあり、現実的且つcost-benefitの高い治療法になるものと考えられる。ここでは200cc前後の全血提供で済むことから、非血縁ドナーからも同意の得られやすい、EBV-LPDに対するDLTを細胞治療の初期モデルとして位置づけ、その可能性と限界につき検討する。

骨髄移植

24歳 女性
疾患: 再生不良性貧血
ドナー: HLA-DRB1一座不一致非血縁者
前処置: CY(50mg/kg/day × 4days)
ATG(2.5mg/kg/day × 4days)
TLI 5Gy, TBI 5Gy
GVHD予防: 短期MTX+FK506

移植後経過

血液学的回復は順調で、急性GVHDは生じなかった。Day39より、39~40°Cの高熱、頸部リンパ節腫脹、扁桃腫大が生じ、末梢血中に異型リンパ球が出現するようになった。Day42に頸部リンパ節生検を施行し、EBV-LPDと診断した。FK506の減量を開始したが、高熱は持続し頸部リンパ節腫脹も増悪した。Day49にDLI(CD3 0.82 × 10⁶/kg)を施行した。その後、リンパ節腫大は縮小し、LDHも改善した。しかし、38°C前後の発熱が持続し、LDHが再び上昇したため、Day68に2回目のDLI(CD3 1.04 × 10⁶/kg)を行い、解熱とLDHの改善を認めた。Day100頃から顔面に掻痒感を伴う紅色小丘疹が出現し、体幹および四肢に拡大した。皮膚生検にて、GVHDと診断し、m-PSL125mg/dayを投与し改善した。その後EBV-LPDの再発はなく、移植後824日まで「CyA」はoffとしたが慢性GVHDも再燃しておらず良好な経過を取っている。



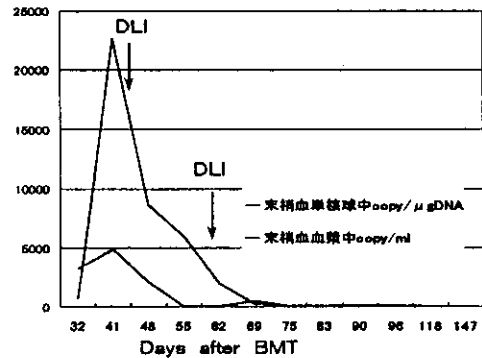
骨髄移植

19歳 男性
疾患: 再生不良性貧血
ドナー: HLA-A B DR遺伝子型レベル一致
非血縁者
前処置: CY(50mg/kg/day × 4days)
ATG(2.5mg/kg/day × 4days)
TLI 5Gy, TBI 5Gy
GVHD予防: 短期MTX+CyA

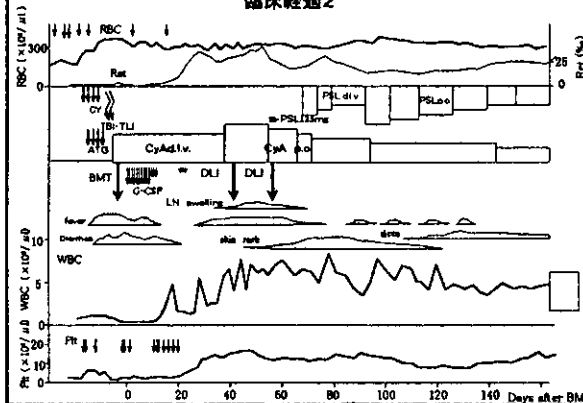
移植後経過

血液学的回復は順調で、急性GVHDは生じなかった。Day26より、39~40°Cの高熱を発するようになった。この時点では臨床症状は乏しかった。EBV-LPDを疑ってCyAの血中濃度をトラフで100前後にコントロールしたが高熱は持続し、day39頃より徐々に頸部リンパ節腫脹、LDH上昇、末梢血中に異型リンパ球が出現するようになった。Day42に頸部リンパ節生検を施行し、EBV-LPDと診断した。(図2) Day45にDLI(CD3 3.3×10^6 /kg)施行した。その後、リンパ節腫大は徐々に縮小したが、38°C前後の高熱が持続したため、day58に2回目のDLI(CD3 1.3×10^6 /kg)を行った。このころ同時に全身に微細な赤色丘疹が出現し病理学的にはGVHDは否定的であるため経過を見ていたところ、胸部CT上 両肺に微細な間質陰影を認め、低酸素を来したため臨床的に慢性GVHD・間質性肺炎と考えm-PSL125mg/dayを投与し改善した。のちに皮疹は病理学的に慢性GVHDと診断された。m-PSL投与にてEBV-LPDは再発を認めなかった。

EBVウイルスゲノム定量



臨床経過2



結語

今回われわれは2例の再生不良性貧血に対して拒絶予防として前処置にATGを使用した移植を行った。拒絶と急性GVHDは生じなかったが、EBV-LPDを発症した。

EBV-LPDに対して日本骨髄バンクを介して施行したDLIによりリンパ腫はコントロールし得た。DLIはリクエスト後 3日および4日を必要としたのみで早期に施行できた。しかしごく少量のリンパ球の輸注を行ったのみであったにもかかわらず、DLI後皮疹・口腔内粘膜病変などの症状を呈し、病理学的に慢性GVHDと診断された。

免疫抑制剤の追加にても再発を認めなかった。

2. 非放射性物質を用いたリンパ球細胞障害活性の検討

はじめに

造血幹細胞移植後のT細胞やNK細胞の細胞障害活性は免疫能の指標のひとつとして重要である。通常、障害活性は $^{51}\text{-Cr}$ release assayで測定されるが、放射性物質を用いるために特別な施設を必要とすることや、放射性廃棄物の問題また安全性にも問題があり非放射性物質を使用する方法が検討されてきた。私たちは、一般病院においても可能な非放射性物質Eu-DTPAを用いた細胞障害活性測定法およびLDH release assayを用いて細胞障害性Tリンパ球(CTL)活性およびNK細胞活性を測定することを検討している。

中間結果

白血病細胞株および状態のよい保存白血病細胞で標識細胞を得ることがLDH release assayにおいて可能であった。また、K562およびRajiにたいするIL2 activated T cellの細胞障害活性を安定して測定できた。

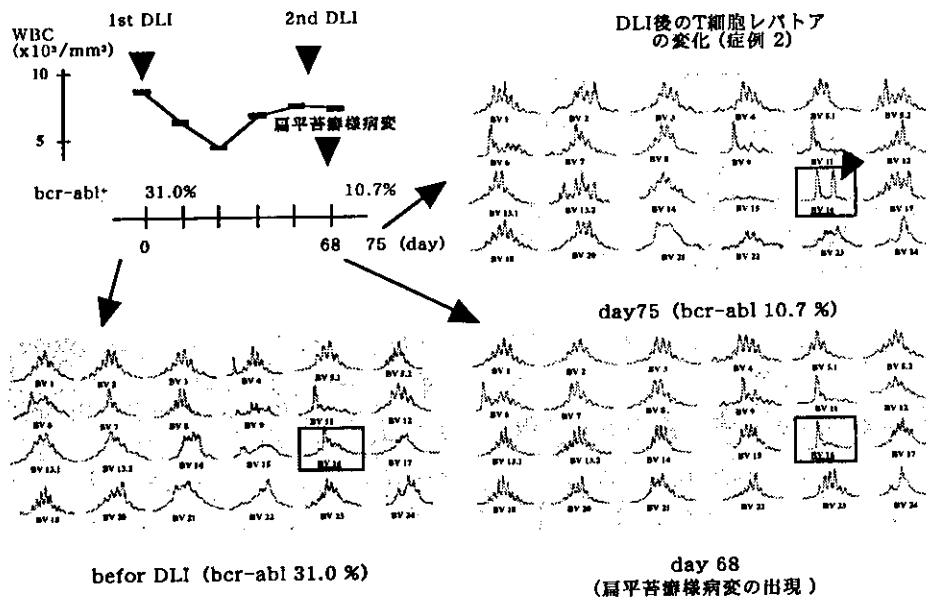
考察

造血幹細胞移植後の末梢血リンパ球の特異的細胞障害活性をベッドサイドでリアルタイムに簡便に測定することが可能となれば、DLTの効果の定量化(EBLPDに対する抗EBウイルス効果の定量化、GVLによる抗腫瘍効果の定量化など)により、疾患別のDLTの至適細胞数の検討が可能となる。また、GVHDの病勢などの定量化によりGVHD治療法選択の基準となりうる。

平成12年度厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究」班
『CML再発例に対するDLI後のGVL効果発現に関する臨床研究』プロトコールの提案

金沢大学第三内科 近藤恭夫、中尾眞二 同輸血部 塩原信太郎

【緒言】DLIは同種骨髄移植後の慢性骨髄性白血病再発例に対して有効な治療法であるが、GVL効果のメカニズムは分かっていない。私達は、DLI後寛解が得られたCML慢性期再発2例を対象として末梢血のT細胞レパトアを経時的に解析することにより、GVL効果の担当T細胞の検出を試み興味深い知見を得た。今回この結果をもとに臨床研究のプロトコールを提案する。【方法】DLI前およびDLI後1~2週毎に得た末梢血単核細胞、DLI前後の骨髄および慢性GVHD発症時の口腔粘膜生検組織からRNAを抽出。cDNAを合成後24種類のT細胞レセプターBVファミリーについてRT-PCRを行い、spectratyping用解析ソフトでCDR3サイズパターンを描出することによりT細胞レパトアを解析した。【結果】症例1、2とも末梢血bcr-abl陽性細胞数の減少時期に一致してそれぞれday132、day75にBV21陽性細胞、BV16陽性細胞に一部のT細胞のクローン性増殖を示すピークが一過性に検出された(図)。症例2においては末梢血に加えて骨髄および口腔粘膜生検組織



についても経時的にレパトアを観察したところ同様のBV16陽性T細胞中のピークはGVL効果発現前の骨髄に加え、GVHD発症時の口腔粘膜組織にも検出された。このようなT細胞のクローン性増殖がGVL効果に関連したものか否かを明らかにするため、寛解後の患者末梢血単核細胞を患者の白血病細胞と14日間培養し同様にT細胞レパトアを解析したところ、BV16ファミリーでのみ同様のピークが認められた。さらに末梢血、口腔粘膜組織およびCML細胞で刺激を受けた患者T細胞中で増殖が確認されたBV16陽性クローンのCDR3領域を含むcDNAをサブクローニング後シーケンシングを決定したところ、各組織の優勢なクローンは-QDR-からなるホモロジーの高いアミノ酸配列を共有していた。

【まとめ】GVL効果の発現時期に一致してDLI3~4ヶ月後、末梢血中に一過性に増殖するT細胞クローンは、GVL効果発現前の骨髄やGVHD発症組織中にも認められた。また*in vitro*で白血病細胞に反応して増殖するT細胞は、同じBVファミリーに属しており、さら

にこれらのクローンのCDR3モチーフには高いホモロジーが認められたことから、これらは同じ抗原を認識している可能性がある。以上の結果から、CML再発例に対するDLI後に末梢血中に一過性に出現するT細胞クローンはGVL効果の担当T細胞であり、その標的抗原は白血病細胞が発現しているマイナー組織適合抗原と考えられた。【提案】同様の手法を用いて、DLI後のGVL効果の発現時期、GVL効果担当T細胞の出現の有無をプロスペクティブに多症例について検討することによりGVL効果を予想するマーカーを見い出せる可能性がある。これによって不必要なDLIによるGVHDの発症を抑えてDLIを安全に施行することが可能になるとと思われる。

マイナー組織適合抗原とGVL効果発現の検討 (平成11年10月の全国調査)

平成11年10月にCMLの慢性期再発例に対するDLI後の予後調査を行い、長期生存が確認された10症例について、ドナーとホストのmHaを検討した。方法は対象症例の爪と末梢血を京都赤十字血液センターの佐治・丸屋先生に郵送し、既に報告している方法で検討した。CML慢性期再発例12例中10例が長期生存しており、CML慢性期に対するDLIの有効性が再確認できた。10例中9症例から協力が得られた。検索した10例中9例のHLAのアリルと5種類のmHaとを表1に示す。症例1と症例4の2症例でD H方向のmHaの不一致が認められた。症例1ではCD31のexon3とexon8に、症例4はCD62Lのcodon213にそれぞれD H方向の多型性の不一致を認めた。さらに症例1はCD31の多型性の提示に必要なHLA-B61を保有し、症例4はCD62Lの多型性の提示に必要なHLA-B61を保有していた。この2症例はいずれもGVL効果を認めているのでCD31やCD62Lなどの血液細胞上に優位に発現しているmHaがGVL効果の標的抗原として働いている可能性が考えられた。一方、bcr/ablキメラペプチドを提示し、CML細胞に対するCTLを誘導することが知られているHLA-A24は9例中の6例が保有していたが3症例は保有していなかった。以上より9例中2例では今回検討したmHaがCMLに対するGVL効果の標的抗原として作用している可能性が示唆された。残りの7例には未知のmHaが標的抗原として関与していた可能性が考えられる。

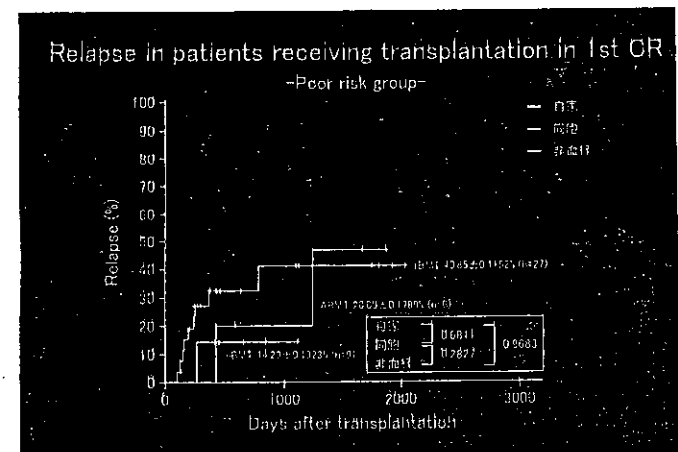
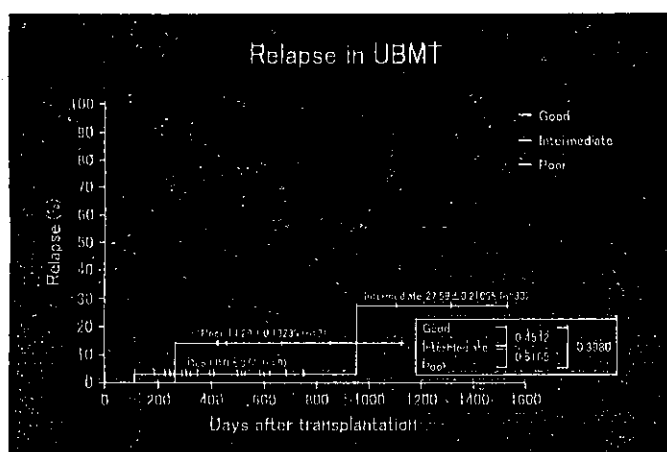
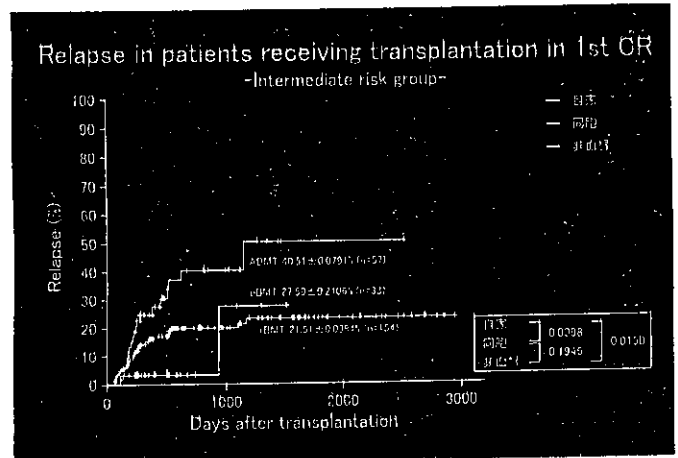
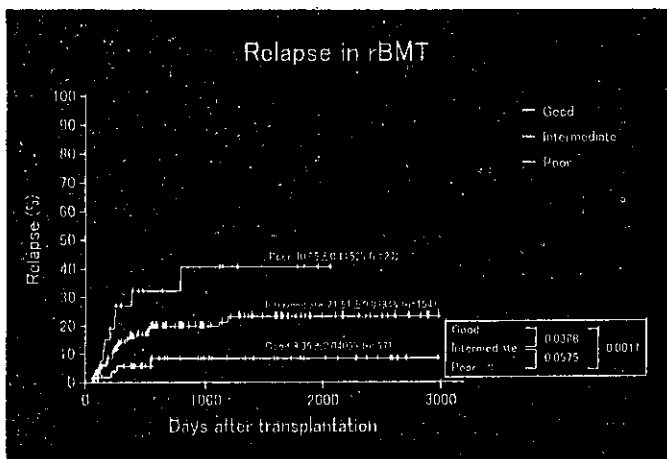
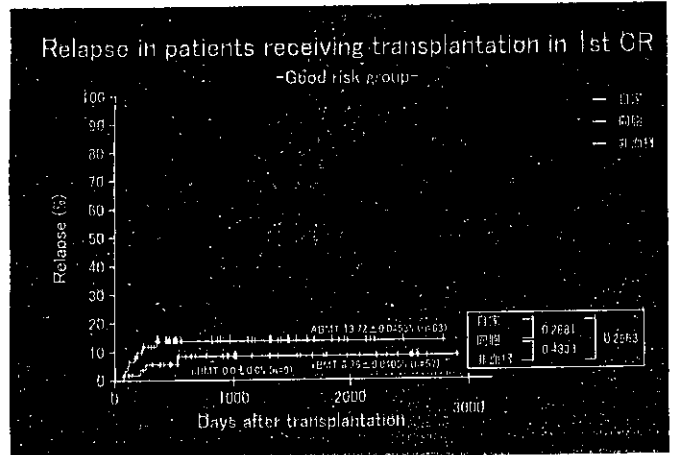
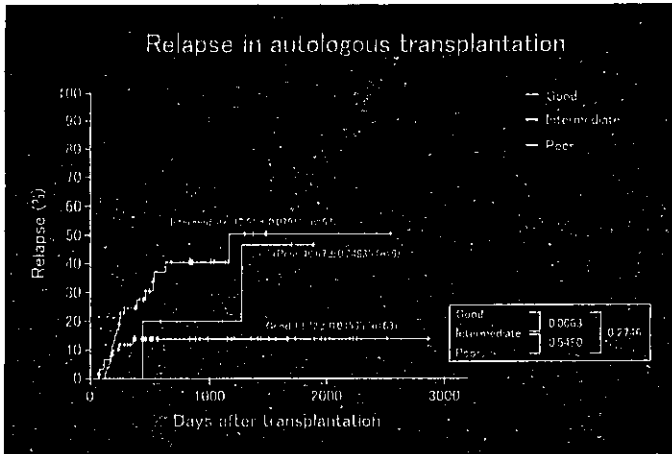
表1 GVL効果が得られた症例のHLA抗原とmHaの多型性

Patient No.		HLA-A	HLA-B	HLA-DR	CD31 exon3	CD31 exon8	CD49b	CD62L	HA-1	急性GVHD
1	Do	24,-	61,54	4,0r9	L	S	E	P/S	H/R	
	Pt	24,-	61,54	4,0r9	V/L	N/S	E	P/S	R	0
2	Do	2,31	35,56	4,-	V/L	S	E	P/S	H/R	
	Pt	2,31	35,56	4,-	V/L	S	E	P	H/R	0
3	Do	2,24	46,52	2,8	V/L	N/S	E	P	H/R	
	Pt	2,24	46,52	2,8	V	N	E	P	H/R	2
4	Do	2,24	61,or13		V/L	N/S	E	P	H/R	
	Pt	2,24	61,or13		V/L	N/S	E	P/S	H/R	0
5	Do	24,-	54,55	4,11	V/L	N/S	E	P	H/R	
	Pt	24,-	54,55	4,11	V/L	N/S	E	P	H/R	0
6	Do	2,31	7,55	1,2	V/L	N/S	E	P/S	H/R	
	Pt	2,31	7,55	1,2	L	S	E	P/S	R	3
7	Do	24,-	61,52	4,15	V/L	N/S	E/K	P/S	R	
	Pt	24,-	61,52	4,15	V	N	E	P	R	0
8	Do	24,19	7,61	2,2	V/L	S	E	P	H/R	
	Pt	24,19	7,61	2,2	V/L	S	E	P	H/R	0
9	Do	11,31	62,39	12,9	V	N/S	E/K	P	H/R	
	Pt	11,31	62,39	12,9	V	N	N	P	H/R	0

予後因子としての染色体異常をbaseにした、第1寛解期AMLに対する、各種造血幹細胞移植(自家移植, 血縁BMT, 非血縁BMT)の治療成績の比較

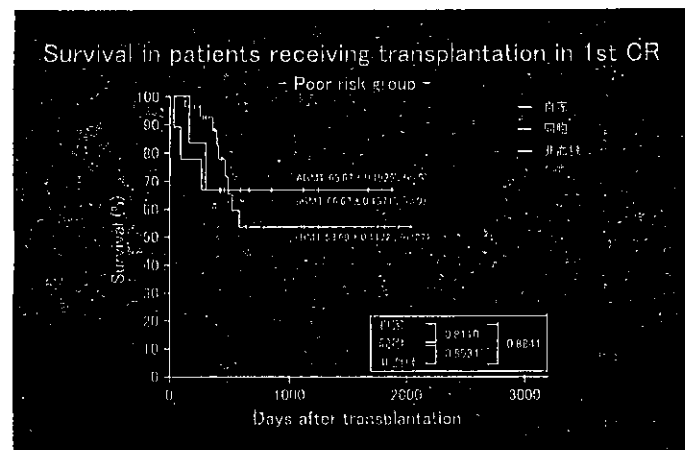
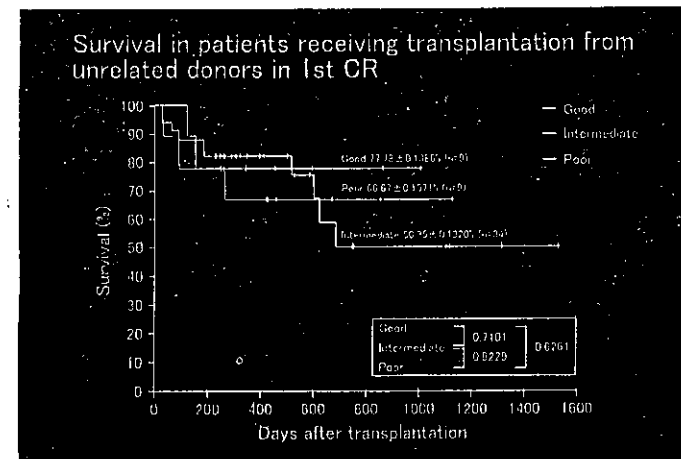
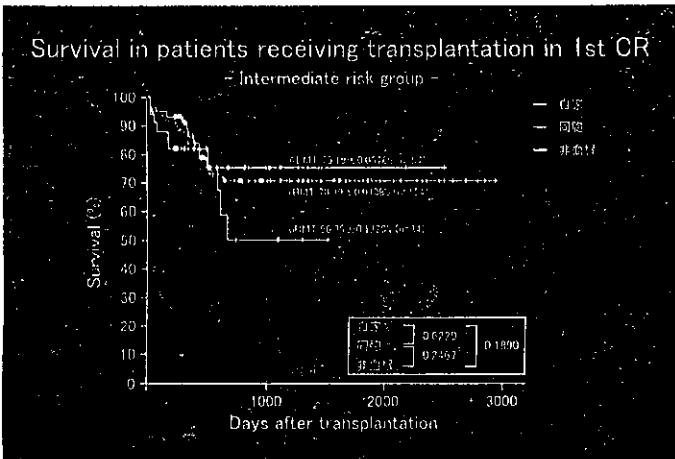
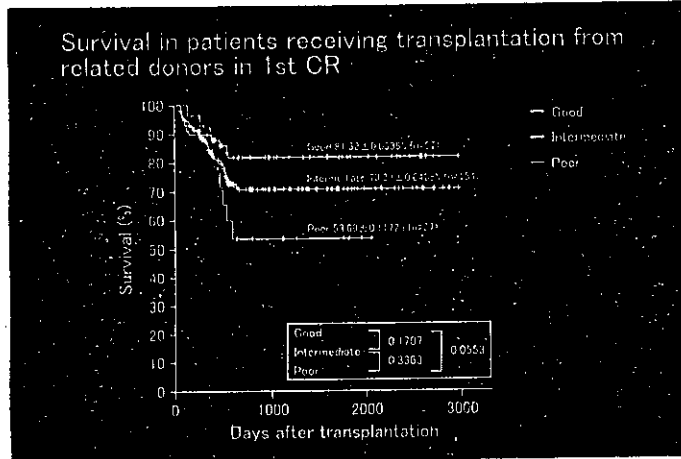
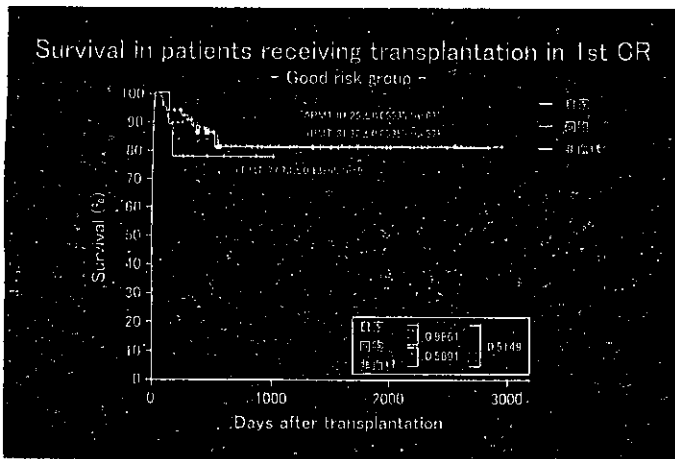
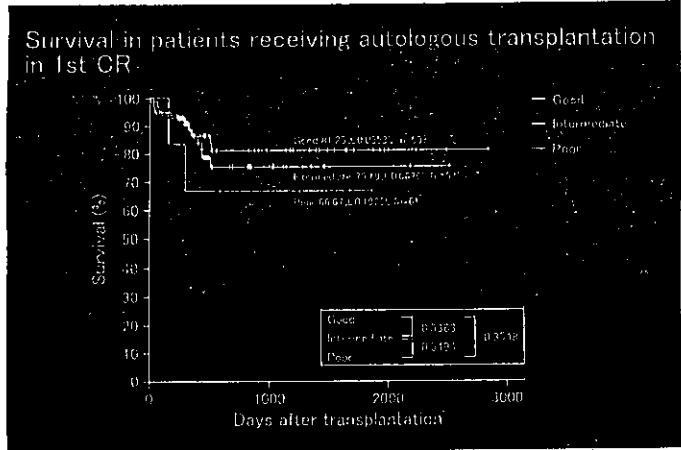
——日本造血細胞移植学会、全国データ集計より——

大阪大学分子病態内科学 小川 啓恭



1st CRで各種造血幹細胞移植を行ったAML症例

	ABMT	rBMT	uBMT	total					
Good	1. abnormal 16	11	8	3	22				
	2. t(15, 17)	18	63 (50.0)	16	57 (23.9)	2	9	36	129 (31.1)
	3. t(8, 21)	34	33	4	71				
Intermediate	4. pseudodiploid	7	30	7	44				
	5. hyperdiploid	8	57 (45.2)	14	154 (64.7)	4	33	26	244 (58.8)
	6. diploid	42	110	22	174				
Poor	7. abnormal 5	1	6	2	9				
	8. abnormal 7	2	6 (4.8)	10	27 (11.3)	1	9	13	42 (10.1)
	9. abnormal 11q	3	11	6	20				
total	126	238	51	415					



結果

- 自家移植のほとんどの症例は、Good or Intermediate risk群に対して、行われていた。同胞移植の65%は、Intermediate risk群を対象としていた。
- 3年再発率の検討では、自家移植でGood risk群(13.7%)とIntermediate risk群(40.8%)の間で、また同胞移植でGood risk群(8.36%)とIntermediate risk群(21.5%)、Good risk群とPoor risk(40.8%)との間で、有意差が認められた。非血縁では、risk別の有意差は認められなかった。
- risk別の3年再発率の検討では、Intermediate risk群の自家(40.5%)と同胞(21.5%)、自家と非血縁(27.6%)との間で、有意差が認められたが、Good risk群とPoor risk群には 有意差はなかった。
- 3年生存率は、3種類の移植を合わせると、Good risk群80.8%、Intermediate risk群69.3%、Poor risk群59.3%となり、Good risk群とPoor risk群との間で有意差が認められた(P=0.0242)。
- 移植別、risk別に、3年生存率を比較したが、有意差は得られなかった。

厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究」班

平成12年度第1回研究打ち合わせ会 平成12年6月3日(土)

「同種末梢血幹細胞移植の問題点と課題」

岡山大学医学部第二内科 ○原田実根、竹中克斗

名古屋第一赤十字病院第四内科 小寺良尚

ドナー側の問題点と課題

Adverse Events in Donors Associated with G-CSF Administration and Apheresis

Adverse events	Phase II study (n=26)	Nationwide survey/1997 (n=94)	Nationwide survey/1999 (n=269)
Bone pain	24%	71%	43%
Lumbago	38%	NA	36%
Fatigue	24%	33%	23%
Fever	8%	2%	6%
Headache	12%	28%	3%
Nausea/Vomiting	4%	11%	2%
LFT abnormality	76%	NA	53%
Thrombocytopenia			
< 100,000/pl	80%	64%	55%
< 50,000/pl	8%	5%	7%

健康人ドナーにおけるG-CSF投与に伴う副作用

	Grade (WHO)				症例数
	1	2	3	4	
骨痛	48	18	1	0	67/94(71%)
全身倦怠感	26	5	0	0	31/94(33%)
頭痛	23	3	0	0	26/94(28%)
不眠	11	2	0	0	13/94(14%)
食欲不振	9	1	0	0	10/94(11%)
悪心嘔吐	5	5	0	0	10/94(11%)

(Murata, et al; Bone Marrow Transplant 24; 1065, 1996)

同種PBSCTドナーの適格基準

- 1) 年齢70歳以上
- 2) G-CSF投与による白血球増多により、脳血管障害や循環器疾患が増悪するおそれのあるドナー(血圧値の既往あるいはリスクのあるドナー)
下記疾患を有している場合、慎重に検討する
脳血管障害、高血圧、冠動脈疾患、糖尿病、静脈血栓症、緑内障、高脂血症、自己免疫疾患、炎症性疾患など
- 3) 活動性の感染症を発生しているドナー
- 4) 脾腫、間質性肺炎を合併あるいは負傷として有するドナー
- 5) 重篤な薬剤アレルギーの既往のあるドナー
- 6) G-CSFに対してアレルギーの既往のあるドナー
- 7) 妊婦あるいは妊娠している可能性および授乳中のドナー
- 8) 骨髄バンク(BMDF)の骨髄採取不適切条件のあるドナー
治療を必要とする心疾患、肺疾患、腎疾患を有するドナー
癌の既往(G-CSFによる腫瘍の再発や新たな発生を否定できないため)

健康人ドナーに対するG-CSF投与による末梢血幹細胞採取

	岡山大学第二内科 (n=22)	PBSCT研究会 (n=28)
年齢	33 (18-61)	34 (18-53)
体重	58 (41-85)	59 (45-78)
アフレーション回数;	2	22 (83%)
	3	3 (12%)
採取経路;	静脈穿刺	4 (28%)
	カテーテル置置	12 (78%)
PBSCT保存;	凍結	6 (26%)
	非凍結	17 (74%)
CD34陽性細胞数(×10 ⁶ /kg)	6.6 (2.0-23.7)	6.4 (0.4-26.5)
採取不十分例(<3×10 ⁶ /kg)	4 (18%)	2 (8%)
白血球数の変化	41,000 (22,000-90,700)	43,300 (24,200-86,300)
血小板数の変化	122,000 (41,000-213,000)	79,000 (43,000-212,000)
骨痛	91%	68%
長期的副作用	なし(28.5ヶ月)	なし(18ヶ月)

Characteristics of Donors with Poor or Good Mobilization at Steady-State

	CD34 ⁺ cells / blood processed		P value
	<10K10 ⁶ (poor)	≥10K10 ⁶ (good)	
No. of donors	5	17	
Age			>0.99
≤55 years	4	15	
>55 years	1	2	
Sex			0.12
Male	1	12	
Female	4	5	
WBC count (K10 ⁹ /L)	6.7 (4.9-8.1)*	5.7 (3.9-8.9)*	0.97
MNC count (K10 ⁹ /L)	2.5 (1.7-3.4)*	2.4 (1.9-4.7)*	0.97
CD34 ⁺ cell count (K10 ⁹ /L)	0.49 (0.47-0.6)*	1.5 (0.4-3.5)*	0.09**
PLT count (K10 ⁹ /L)	219 (180-247)*	229 (142-302)*	0.78
ALP (U/L)	98 (54-127)*	97 (39-202)*	0.84
LDH (U/L)	318 (285-392)*	292 (201-409)*	0.68
UA (mg/dL)	4.0 (2.2-8.2)*	5.6 (2.7-7.9)*	0.17

* Median (range)

** significant difference

同種末梢血幹細胞移植
ドナー側の問題点と課題

1. G-CSF投与の安全性の確立
短期的安全性: ほぼ許容範囲
症例の蓄積が必要
ドナー適格条件の設定
日本造血細胞移植学会によるガイドライン
長期的安全性
長期フォローアップ調査が必要
日本造血細胞移植学会ドナー登録センター
2. Poor mobilization
どのくらいの頻度で存在するか?
Protocol studyによる検証が必要
Poor mobilizationは予測可能か?
移植に必要な最小CD34陽性細胞数の検証

レシピエント側の問題点と課題

Phase II Study / Nationwide Survey of Primary Allo-PBSCT Engraftment (unmodified allo-PBSCT)

	Phase II study (n=26)	Nationwide survey/1997 (n=103)*	Nationwide survey/1999 (n=197)
No. of CD34+ cells infused (X 10 ⁶ /kg)	7.3 (2.4-26.6)	8.3 (1.0-30.4)	5.9 (0.3-31.7)
Days to ANC > 500/pl	12.5 (9-20)	13 (7-49)	11 (7- 55)
Days to PLT > 20,000/pl	13 (9-27)	13 (0-40)	14 (0-304)
Days to PLT > 50,000/pl	17 (11-32)	16 (10-94)	20 (11-306)
Engraftment failure	0/26 (0%)	0/100 (0%)	3/199 (1.5%)

* Included allo-PBSCT from HLA-mismatched donors

Phase II Study / Nationwide Survey of Primary Allo-PBSCT Graft-vs-Host Disease (GVHD)*

	Phase II study	Nationwide survey/1997	Nationwide survey/1999
Acute GVHD			
No. of evaluable	25	85	172
Grade 2-4	9 (36%)	33 (38%)	68 (40%)
Grade 3-4	2 (8%)	14 (16%)	25 (15%)
Chronic GVHD			
No. of evaluable	25	77	105
Limited	3 (12%)	11 (14%)	38 (33%)
Extensive	16 (64%)	44 (57%)	33 (31%)
Total	19 (76%)	55 (72%)	68 (65%)

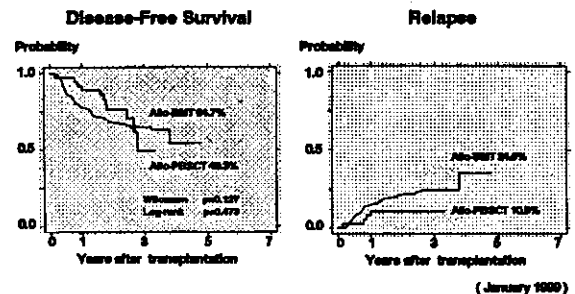
* unmodified allo-PBSCT from HLA-identical sibling donors

Allo-BMT vs Allo-PBSCT for Standard-Risk Leukemia from HLA-identical siblings
Incidence of Acute GVHD and Chronic GVHD

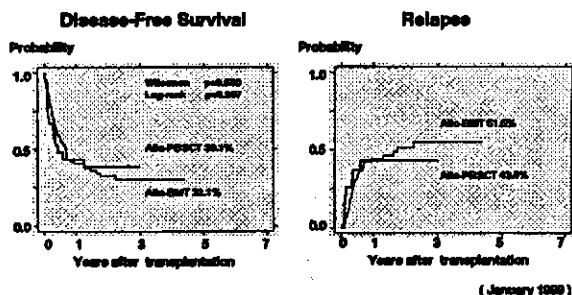
	Allo-BMT	Allo-PBSCT	P value
Acute GVHD			
No. of evaluable	321	37	
Grade 2-4	72 (22.4%)	15 (40.5%)	0.010*
Grade 3-4	17 (5.3%)	5 (13.5%)	0.042*
Chronic GVHD			
No. of evaluable	299	32	
Extensive	65 (21.7%)	18 (56.3%)	< 0.001*

* Fisher's exact test
For Analysis of acute GVHD, patients surviving ≥ 30 days were included.
For Analysis of chronic GVHD, patients surviving ≥ 100 days were included.
(November 1999)

Allo-BMT vs Allo-PBSCT for Standard-Risk Leukemia from HLA-identical siblings



Allo-BMT vs Allo-PBSCT for High-Risk Leukemia from HLA-identical siblings



同種末梢血幹細胞移植 レシピエント側の問題点と課題

1. 造血回復について
allo-BMTと比較して速やかな造血回復が得られている移植後の安全性の向上 (感染症、輸血量の減少) が得られたか?
allo-PBSCT後のG-CSF投与は必要か?
2. GVHDについて
本邦における retrospective study では、allo-BMTと比較して慢性 GVHDの頻度増加がみられている
欧米における prospective randomized study では、allo-BMTと比較してGVHDの頻度に差はみられていない
本邦においても randomized study による検証が必要
3. GVL効果について
本邦における retrospective study では、allo-BMTと比較してDFB、再発率に有意差はみられていない
allo-PBSCTの適応、allo-BMTとどう使い分けていくか?
4. PBSCTの凍結保存について
凍結保存による移植後に及ぼす影響、品質管理

「造血細胞の自己修復能力・再生能力を利用した
治療法の開発と普及に関する研究」班
平成12年度研究計画報告

分担研究項目： 「自家造血幹細胞移植の確立」 「海外ドナーからの移植の推進」
分担研究者： 慶應義塾大学医学部血液内科 岡本 真一郎

1. 海外ドナーからの移植の推進

1-1 背景

日本骨髄バンク (JMDP) では、1997年4月から1999年12月までに北米骨髄バンク (NMDP)、台湾骨髄バンク (TCMDR) から58件の骨髄提供を受けている。HLA型が血清学的に一致する非血縁ドナーが見出される確率はNMDPで65%、TCMDRで12%であり、Asian-Pacific 以外の人種にも約50%以上の確率でドナーが見出されている。58例の移植の約半数は非寛解期の急性白血病、移行期・急性期の慢性骨髄性白血病に対して施行されており、大多数の症例でTBIを含む前処置とCyA or FK506 / MTXによる免疫抑制が用いられていた。生着は評価可能な全例で得られた。

この58例の移植成績を、同時期にJMDPの国内ドナーを用いて施行された移植の成績と比較するために、年齢、性、前処置、GVHD予防、疾患/病期、ドナーの種類、HLA disparity を解析因子として、Cox proportional hazard model を用いた多変量解析を行った。その結果、海外ドナーを用いた移植は、生存率、無白血病生存率、非再発死亡率に有意な負の影響を与えないが、2度あるいは3度以上の急性移植片対宿主病の頻度は、国内ドナーを用いた移植と比較して2.2~2.5倍に有意に増加する傾向が認められた。

1-2 目的

- ・海外ドナーの造血幹細胞を用いた移植の至適利用 (optimal use) を明確にする。
- ・海外ドナー選定のguidelineの作成を検討する。

1-3 研究計画

- ・データベースの充実を図る。
- ・前回と同様の方法によって、JMDPの国内ドナーから移植を受けた症例を対象とし、海外骨髄バンクの非日本人ドナーを用いた移植成績 (生着率、GVHDの頻度、生存率、無病生存率、非再発死亡率) を、ドナーの人種、HLA allele disparityより解析する。

2. 自家造血幹細胞移植の確立

2-1 背景

自家造血幹細胞移植は、白血病、リンパ腫、固型癌等の悪性腫瘍を主な対象として盛んに行われている。JSHCTのデータベースには、1991年～1998年に4445件（PBSCT 3277件、BMT 881件、PBSCT + BMT 285件）が登録され、その内訳は白血病1209件、リンパ腫1349件、固型癌1339件である。このデータベースをもとにその動向と疾患別の成績は示されているが、その至適利用および長期安全性に関しては十分な検討がなされていない。

2-2 目的・研究計画

- ・各疾患面における自家造血幹細胞移植（特に自家末梢血幹細胞移植）の至適利用（optional use）を明確にする。

—JMDP / JSHCTのdata base を用いて自家PBSCTと他の造血幹細胞ソースを用いた移植とを疾患risk別にretrospectiveに比較検討する。固型癌については、比較的施行例数の多い腫瘍を対象として、病期・予後因子等の点から通常の治療（化学療法等）の成績との比較検討ができる様なdata baseの作成を試みる。

- ・自家造血幹細胞移植（特に自家末梢血幹細胞移植）後の長期の造血能、造血障害（MDS）の発症頻度およびその危険因子を明確にする。

—これに関してはJSHCTのdata base の情報のみでは十分な解析は困難と考えられるので、移植前放射線治療、採取時期、採取までに用いた抗癌法とcourse数、輸注CD34陽性細胞数、移植後の経時的なCBCの推移、karyotypeの異常等についてアンケートを施行し解析を行う。

厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究」班

【分担研究項目】

骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植

【分担研究者】

高上洋一、峯石真、田野崎隆二、神田善伸（国立がんセンター中央病院）

【研究の概要】

骨髄移植などの同種造血幹細胞移植術は難治性白血病などに対する有効な治療法ではあるが、同時に多くの重篤な合併症も発生する。特に患者の年齢が 55 歳を超える場合や移植前に既に臓器障害を有する場合には、移植前処置療法と呼ばれる超大量の抗がん剤治療や放射線照射に起因する合併症の頻度と重症度が高まり、早期死亡率が著しく高くなるため禁忌とされてきた。一方最近、移植の抗がん効果は、移植前処置療法に加えて移植後に起こるドナー由来のリンパ球を介した同種免疫反応にもよることが明らかとなった。そこで後者を強調した治療を行うならば、前者を控えめに行って治療関連毒性を減らして移植をより安全に行うことが可能になる。この、いわゆる骨髄非破壊的な前処置療法を用いた新たな同種造血幹細胞移植では、患者の身体的負担も明らかに軽減するので移植適応の拡大が可能となる。本研究ではこの手技を開発し、その有効性を包括的に解析する。

【年次計画】

1 年目： 各施設の倫理審査委員会の承認を受けた後に、高度な造血幹細胞移植技術を有する医療施設を選定して、造血器腫瘍患者を対象とした多施設研究を行い本移植術の基礎的手技を確立する。同時に、その安全性と妥当性を慎重に検討する。2 年目以降： 移植症例を追加登録する。最終的な予定症例数は 100 例であり、これにより本移植術の安全性と有効性を総合的に解析する。

【期待される成果】

がん患者の多くは高齢であったり何らかの臓器障害を有したりため、根治療法である同種造血幹細胞移植を受けることができない。これらの患者に対して、比較的安全で有効な治療法を開発してその多くを救済する。

国立がんセンター中央病院における骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植

day		-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
cladribine	0.11mg/kg/day	↓	↓	↓	↓	↓	↓			
busulfan	4mg/kg/day					↓	↓			
ATG	2.5mg/kg/day							↓	↓	

(GVHD prophylaxis: cyclosporine A + short term methotrexate)

これまでの治療成績(1999年9月～2000年4月時点まで8例)

	Age	Dx	Indication	AGC>0.5	GVHD	Outcomes
1 上原	50	RAEB	Organ dysfunction	14	limited chronic	alive & well
2 工藤	55	AML	Infection	14	none	alive & well
3 横川	16	SAA	Organ dysfunction	13	none	alive & well
4 鈴村	30	SAA	Organ dysfunction	11	none	died of infection
5 佐藤	55	AML	Organ dysfunction	12	none	late graft failure
6 藤井	29	AML	Organ dysfunction	13	only after DLI	alive & well
7 川浦	21	Melanoma	Solid tumor	7	none	alive & well
8 岡田	46	CML	Infection	7	Grade IV	alive with GVHD

「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の 開発と普及に関する研究」班

平成12年度分担研究計画書

東京大学医科学研究所 浅野茂隆

我々は、本研究班において、以下の治療法に関する研究を実施する計画である。

1. 増幅造血幹細胞移植

臍帯血移植は種々の血液疾患や腫瘍性疾患に対する治療法として既に確立したといえるが、臍帯血の採取量に限界があるため必要とされる移植細胞数の確保が困難なことが、適応患者の拡大の大きな障害となっている。この問題を解決するために、臍帯血造血幹細胞の体外増幅法を開発し、その臨床応用を試みる。

我々のこれまでの検討により、stem cell factor、thrombopoietin等のサイトカインの組合せにより、臍帯血造血幹細胞は約4倍に増幅可能であることが示された。これらの結果に基づき、HLA適合度では移植可能な臍帯血ありながら、細胞数が十分でないために移植が受けられない難治性白血病・リンパ腫患者を対象として、完全な閉鎖培養系で増幅された臍帯血造血幹細胞移植を行なう。

2. マキシザイムを用いた遺伝子治療

マキシザイムは、2カ所の基質認識部位の一方でキメラ型遺伝子の融合領域を認識し、他方で近傍の切断遺伝子配列を認識した場合にのみ、切断活性に必須のマグネシウムイオンを取り込める高次構造をとるように構築されている。これまでの検討では、bcr-ablを標的としたマキシザイムは、培養細胞系だけでなく、疾患モデルマウスの系でも、明らかな腫瘍増殖抑制効果を示した。さらにマキシザイムの汎用性を示すために、PML-RaRa mRNAを標的としたマキシザイムの効果を検討したところ、その作用は非常に特異的で、融合遺伝子のmRNAのみを、正常型mRNAに影響せずに切断できた。

今後は実際の遺伝子治療への応用を目指して、さらに有効性と安全性の検討を進めるとともに、腫瘍細胞への特異性かつ高効率な遺伝子導入系の確立する。

3. Th1、Th2細胞分離移注

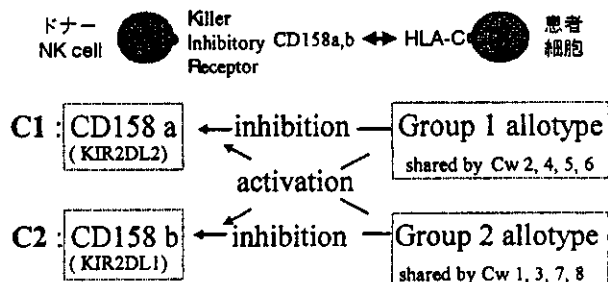
近年、悪性腫瘍、HIV感染症、自己免疫疾患等の患者では、患者末梢血中のTh1、Th2細胞のバランスが大きく変化しており、そのバランスを正常にもどすことにより、病状の改善、治癒する症例が報告されてきている。我々は、これらの患者末梢血からアフエレーシスにより採取された単核球中のTh1、Th2細胞を分離し、必要に応じて増殖させた後、患者にもどすことにより、上記疾患の治療をめざす。

非血縁者間骨髄移植における killer inhibitory receptor (KIR) CD158a,bの発現とその役割

愛知県がんセンター 血液化学療法部

森島 泰雄

HLA-C型とNK細胞の抑制・活性化



Introduction-1

- Natural killer (NK) 細胞はNK細胞受容体を介してその障害性を促進したり、抑制したりしている。
- 抑制性NK細胞受容体にはIg型とレクチン型がある。
Ig型はkiller cell inhibitory receptor (KIR)とよばれ、CD158抗原はその一つである。細胞外部分に2つのIgドメインをもち、KIR2DL2(CD158a)とKIR2DL1(158b)の2抗原が存在する
- NK細胞のCD158aは標的細胞のHLA-C抗原決定基(N77,K80)と結合することによりNK細胞の活性を抑制している。
この決定基はHLA-Cw2, Cw4, Cw5, Cw6, Cw15, Cw17に存在する(group 1 HLA-C allotype)。
CD158bはHLA-C抗原上の抗原決定基 (S77, N80) を有するHLA-Cw1, Cw3, Cw7, Cw8, Cw12, Cw14(group 2 HLA-C allotype)と結合し、NK細胞活性を抑制する。

Matching Pairs (C1, C2) of CD158a,b / Group 1, 2 of HLA-C in unrelated BMT

Compatibility	Patient's type	Donor's type
Match	C1 C1	C1 C1
	C1 C2	C1 C2
Mismatch	●GVHD vector	C1 C1 C2 C2
	●Rejection vector	C1 C2 C1 C2

Introduction 2

- 標的細胞上のHLA-C抗原が消失したり、上記HLA-C抗原のallotypeが異なると、NK細胞の抑制がとれ、活性化される。
- CD3陽性T細胞の一部にもCD158抗原が陽性といわれている。
- 造血幹細胞移植後の移植免疫反応 (GVHD, GVL, rejection など) にNK細胞/T細胞がこのCD158抗原を介して関与している可能性が考えられる。

目的

CD158a/CD158b抗原陽性NK細胞とT細胞が正常人と各種移植後の患者でどのように発現しているかを解析し、NK細胞を介した移植免疫反応を理解するための基礎的データとした。

KIR (CD158a b)/HLA-C

頻度(%)	C2 C2		C1 C2		C1 C1	
	n	%	n	%	n	%
ドナー	9	63	8	5	1	4
患者	9	63	8	6	1	3

急性GVHD (I II度以上)の発症との関連

	適合% (n)	不適合(n)	p
GVHD方向	19. (86)	32. (94)	0.02
拒絶方向	19. (81)	22. (59)	0.61

方法

- 移植前、移植後2週間、1ヶ月、3ヶ月、6ヶ月に末梢血より検体を採取し、Ficoll-Hypaqueにて単核球を分離。
- FACS解析
 - (1) Anti-CD158a 抗体 (EB6)
 - (2) PEラベルanti-CD158b抗体 (GL 183)
 - (3) Per CPラベルanti-CD3抗体 (Leu-4)末梢血単核球を抗体(1)と反応。洗浄後2次抗体 (mouse Ig/FITC) と反応。洗浄後マウス血清と反応させた後に抗体(2),(3)と反応。
- HLA-C DNA typing
HLA class I DNA typing kit (シオノギ製薬) にてタイピング。

結果

正常人におけるCD158a, bの発現

- 正常人においてCD3-細胞及びCD3+細胞の中にCD158a+CD158b+のdouble positiveの細胞が存在することが示された。
- CD3-細胞、CD3+細胞ともにCD158a-CD158b+細胞数が最も多く、CD158a+CD158b+、CD158a+CD158b-の細胞数は少なかった。
- 正常人10人におけるHLA-C allotypeはG1/G1が1人、G1/G2が1人、G2/G2が8人であった(G1: group 1、G2: group 2)。
- G1/G1ではCD3-、CD3+細胞とも、CD158a+CD158b-の細胞が増加しており、CD158a-CD158b+の細胞はG2/G2やG1/G2の人と比較して低値であった。

結果

(2)移植後CD3-細胞におけるKIRの発現

- CD158a-CD158b+、CD158a+CD158b+、CD158a+CD158b-の3つの細胞群の回復傾向がみられた。
- Related allo-BMTにおいては、3つの細胞群とも移植後6ヶ月において移植前値までの回復に留まった。
- unrelated allo-BMTでは、移植後6ヶ月後には移植前値よりも増加していた。
- Auto-PBSCTにおいては、移植後早期からの回復が認められた。

結果

(3)移植後CD3+細胞におけるKIRの発現

- CD158a-CD158b+、CD158a+CD158b+、CD158a+CD158b-細胞とも移植後3~6ヶ月ではnormal controlと同程度の回復がみられた。
- Auto-PBSCTにおいては、移植後1ヶ月での増加が著明であり、normal controlと比較しても高値であった。

結語

造血幹細胞移植後、CD3-細胞及びCD3+細胞中にCD158a-CD158b+、CD158a+CD158b+、CD158a+CD158b-のNK細胞、T細胞が再構築してくることが示された。

再構築の過程は移植の種類によって異なる可能性が示された。

HLA-DNA タイピングの意義の確立

—平成12年度第一回班会議報告書—

分担研究者 笹月 健彦 (九州大学生体防御医学研究所・教授)
代理出席 山本 健

研究要旨

本邦で実施された血清学的にHLA-A、B、DRが一致した非血縁者間骨髄移植例を対象とした、DNAレベルでのHLA各遺伝子座のマッチングとGvHDをはじめとする移植予後に関する解析によって、これまでに、HLAクラスI遺伝子マッチングの重要が示された。一方では、DQB1のマッチングは有意差にはいたらなかったが若干の影響を認めた。本年度は、これらの結果に基づき、HLAクラスI遺伝子のミスマッチを示したアレルの組み合わせとGvHDあるいは生存との関連、および症例数を増やしたDQB1マッチングの解析など、さらなる検討を加えることにより、HLA-DNA型マッチングの影響を総合的に解析し、HLA-DNAタイピングの意義を確立することを目的とする。

A. 研究目的

これまでの、血清学的にHLA-A、B、DRが一致した非血縁者間骨髄移植症例を対象とした、DNAレベルでの各HLA遺伝子座マッチングとGvHDをはじめとする移植予後との関連に関する解析により、本邦においては、HLAクラスI遺伝子(HLA-A、B)のミスマッチがGvHD発症および生存に関する危険因子となることが示された。また、HLA-DQB1のマッチングは有意にはいたらなかったが若干の影響を認めた。本研究では、これまでに集積された約1,000組について、1) HLA-A、B遺伝子座のミスマッチ例におけるミスマッチのアレルの組み合わせの解析、2) HLA-A、B遺伝子座マッチ群、ミスマッチ群各々における予後良好群と不良群を対象としたHLA DNA型マッチングの解析を行い、また、3) 新たにDNAタイピングを行いHLA-DQB1マッチングを解析すること、などにより、非血縁者間骨髄移植におけるHLA-DNA型マッチングの意義を総合的に検討することを目的とする。

B. 研究計画および方法

これまでに集積した約1,000組におよぶ移植症例を対象として、HLA-A、B遺伝子座のミスマッチの

アレルの組み合わせを解析する。初期の440組までの解析では、特にGvHD発症および死亡の重要な危険因子であることが示されたHLA-Aに関して、アレルミスマッチは、HLA-A2あるいはA26サブタイプ間において認められ、その半数以上はA*0201/0206間のミスマッチであった。これらはクラスII遺伝子のマッチングが重要であることが示された欧米のグループにおけるHLA-Aのミスマッチとは大きく異なっており、ミスマッチの両アレル間で差異を認めるアミノ酸残基の部位、数などを明らかにし、これらと移植予後との関連を統計解析(Kaplan-Meier法)することは、欧米の成績との差異を考察する上でも重要であると考えられる。一方、DNAレベルでHLA-A、Bがマッチした症例群におけるGvHD発症、生存率を検討し、予後良好群と不良群に分類して統計解析を加えることにより、他のHLA遺伝子座の関与、およびHLA以外の遺伝子が関与している可能性を検討する。同様の解析をHLA-A、Bがミスマッチした症例群においても行う。一方、HLA-DQB1マッチングの影響を明らかにするために、さらに症例数を増やしてDQB1のタイプを決定し統計解析を行う。これらによって、非血縁者間骨髄移植におけるHLA DNA型マッチングの影響を、分子および集団レベルで総合的に解析する。