

「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2回班会議

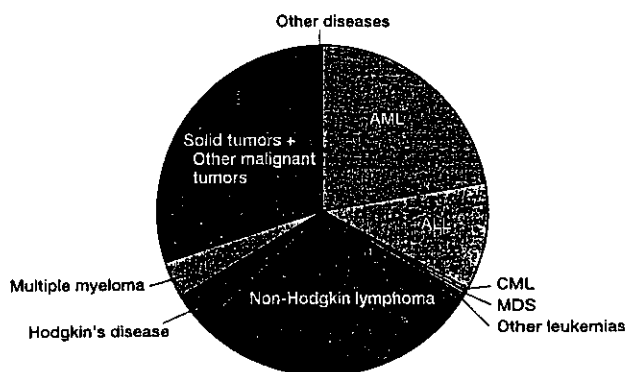
分担研究項目：「自家造血幹細胞移植の確立」

分担研究者：慶應義塾大学医学部血液内科 岡本真一郎

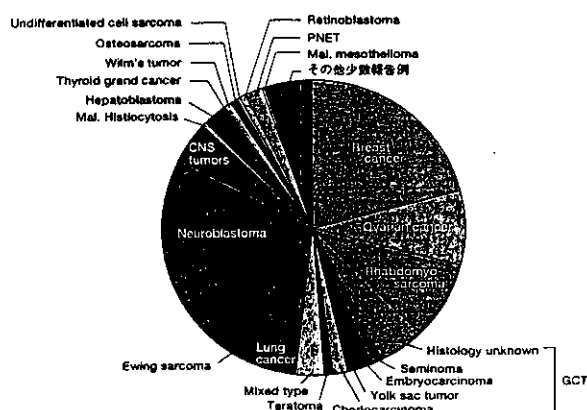
自家造血幹細胞移植の確立

- 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。
- 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。

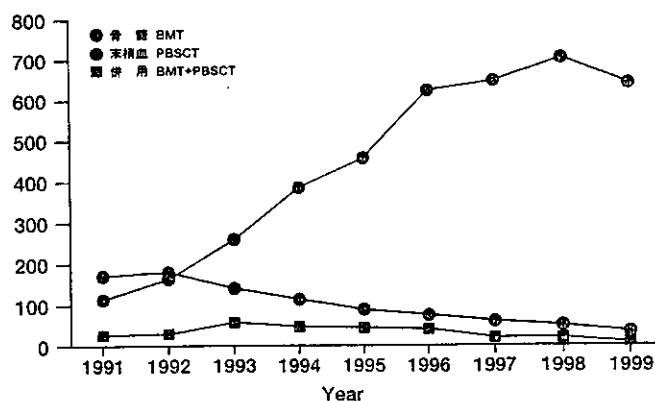
Indication of Autologous SCT by Diseases (N=5214)



Indication of Autologous SCT by Diseases (Non-hematologic malignancies N=1743)



Stem Cell Sources for Autotransplant by Year



Autologous SCT : Bone Marrow (BM) vs. Peripheral Blood (PB)

— Hematologic malignancies : adults —

Disease	Stage	Sources (N)	5y-Survival (%)	p
AML	1CR	BM (20)	78.9	N.S.
		PB (254)	66.0	
ALL	1CR	BM (44)	35.0	N.S.
		PB (117)	41.1	
NHL	1CR	BM (29)	65.5	N.S.
		PB (74)	67.7	
	2CR	BM (22)	54.2	N.S.
		PB (35)	54.7	
NCR	BM (37)	16.2	N.S.	
	PB (67)	24.7		
HD	All	BM (22)	47.5	N.S.
		PB (142)	65.2	

Autologous SCT : Bone Marrow (BM) vs. Peripheral Blood (PB)

— Non-hematologic malignancies : adults —

Disease	Stage	Sources (N)	5y-Survival (%)	p
Breast Ca.	All	BM (269)	35.9	< 0.01
		PB (36)	57.7	
GCT	All	BM (26)	52.8	N.S.
		PB (173)	64.9	
Ovarian Ca.	All	BM (23)	44.5	N.S.
		PB (112)	51.4	

Secondary Malignancy after Autologous SCT Secondary Malignancies after Autologous SCT

- No. of reported cases : 55
- Diagnosis for which autologous SCT was performed

Non-Hodgkin's lymphoma : 31	Myeloma : 4
Hodgkin's disease : 3	Lung cancer : 4
Acute myelogenous leukemia : 5	Ovarian cancer : 1
Breast cancer : 4	
Acute lymphoblastic leukemia : 1	
Germ cell tumor : 4	
- Sources of stem cells

PBSCT : 50
PBSCT + BMT : 3
BMT : 2

(N=55)

- Type of malignancies

MDS / AML : 25	Breast ca : 2
	Rectum ca : 1
Unknown : 8	Esophageal ca : 1
HCC : 5	Tongue ca : 2
Pancrease ca : 1	Uterus ca : 1
Lung ca : 3	Thyroid ca : 1
Stomach ca : 1	NHL : 1
Brain tumor : 1	HD : 2

MDS / AML after Autologous SCT

- No. of reported cases : 25
- Diagnosis for which autologous SCT was indicated

Non-Hodgkin's lymphoma : 14	Lung cancer : 1
Acute myelogenous leukemia : 4	Ovarian cancer : 1
Hodgkin's disease : 4	
Germ cell tumor : 2	
Myeloma : 1	
- Sources of stem cells

PBSCT : 20
PBSCT + BMT : 3
BMT : 2
- Median age : 43 (20 - 67)
- Median time from transplant to secondary malignancy : 4.2 (1-9) (n=9 ; data not available, 16)

Graft Failure after Autologous SCT

- No. of reported cases : 12
- Diagnosis :

Non-Hodgkin's lymphoma (5)	Breast ca. (1)
Hodgkin's disease (1)	
Acute myeloid leukemia (3)	
Acute lymphoblastic leukemia (1)	
Myeloma (1)	
- Sources of stem cells

PBSCT (9)	PBSCT + BMT (1)	BMT (2)
-----------	-----------------	---------
- Purging : yes (1) No (11)
- Type of graft failure ; primary (0) secondary (12)

自家造血幹細胞移植の確立

- 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。
 - JMOP/JSHCT の data base を用いて自家 PBSCT と自家 BMT の比較、およびこれらの造血幹細胞ソースと、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、mobilization の方法、採取までに用いた抗癌剤と 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。

「自家造血幹細胞移植の治療成績」

大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学 小川 啓恭

1985年3月以降、悪性血液疾患や固形腫瘍に対して、阪大病院第三内科で122例、関連の日生病院で40例の合計162例の自家造血幹細胞移植（自家骨髄移植28例、自家末梢血幹細胞移植134例）を施行した。自家移植の悪性疾患の治療戦略における位置付けを明らかにすることを目的として、non-Hodgkin's lymphomaを中心に、retrospectiveに治療成績を解析した。

自家造血幹細胞移植の内訳

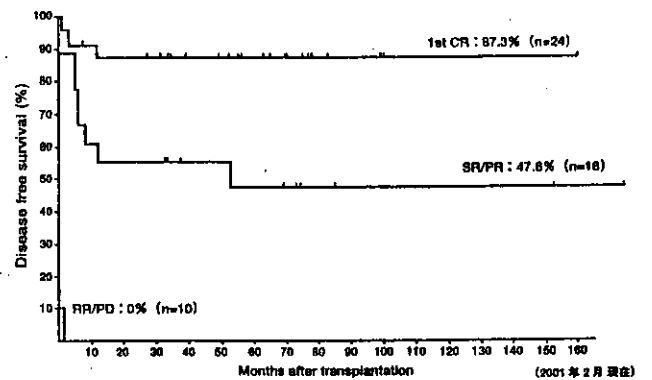
disease	age	median	移植時の病期				autoのみ			relapse → allo				
			N	CR1	PB/SR	RR/PD	CCR	relapse	TRD	N	CCR	relapse	TRD	
NHL	44	83	40	33	10	45	37	1	8	5	1	2		
HD	29	10	1	7	2	7	2	1	1	0	1	0		
breast cancer	42.5	30	21	5	4	15	15	0	0	0	0	0		
myeloma	47	3	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0		
acute leukemia	30	7	4	0	3	0	4	3	0	0	0	0		
germ cell tumor	29	15	2	12	1	6	7	2	1	0	1	0		
sarcoma	31	5	2	3	0	2	3	0	0	0	0	0		
brain tumor	46	4	0	1	3	0	4	0	0	0	0	0		
solid tumor	56	5	0	4	1	1	4	0	0	0	0	0		
			162	70	68	24	76	79	7	10	5	3	2	
			%	(100)	(43.2)	(42.0)	(14.8)	(46.9)	(48.8)	(4.3)	(12.7)	(50.0)	(30.0)	(20.0)

CR1; 1st complete remission, PR; partial remission, SR; sensitive relapse, RR; resistant relapse, Re; relapse, PD; progressive disease, TRD; transplant-related death

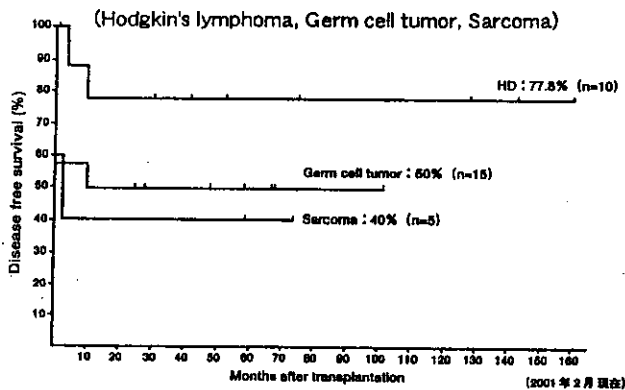
NHLにおける自家造血幹細胞移植（病期別）

病期	N	outcome			relapse → allo			
		CCR	relapse	TRD	N	CCR	relapse	TRD
1st CR	40	30	9	1	1	0	1	0
PR/SR	33	15	18	0	3	2	0	1
RR/Re	4	0	4	0	4	3	0	1
PD	6	0	6	0	0	0	0	0
total	83	45	36	1	8	5	1	2
(%)	(100)	(54.2)	(43.4)	(1.2)	(22.2)	(62.5)	(12.5)	(25)

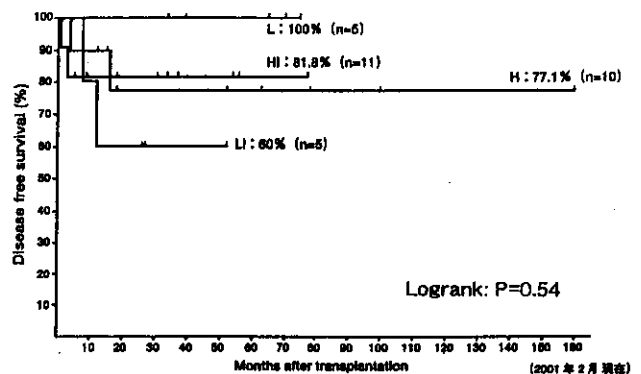
悪性リンパ腫移植時病期別治療成績



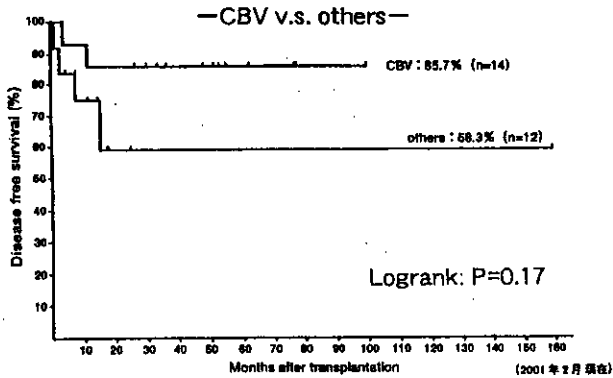
自家造血幹細胞移植



中間悪性度NHL, 第1寛解期に施行した自家造血幹細胞移植治療成績

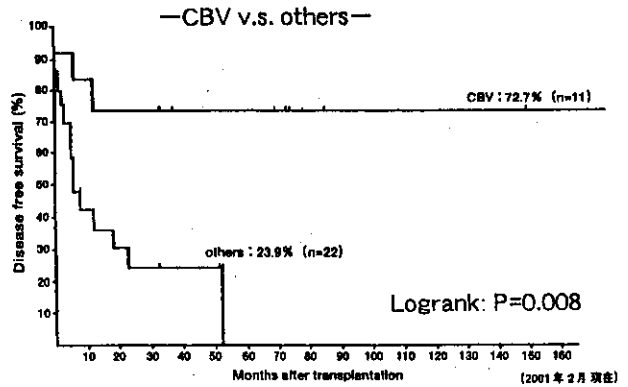


中間悪性度NHL (LI/HI/H), 第1寛解期
自家造血幹細胞移植治療成績



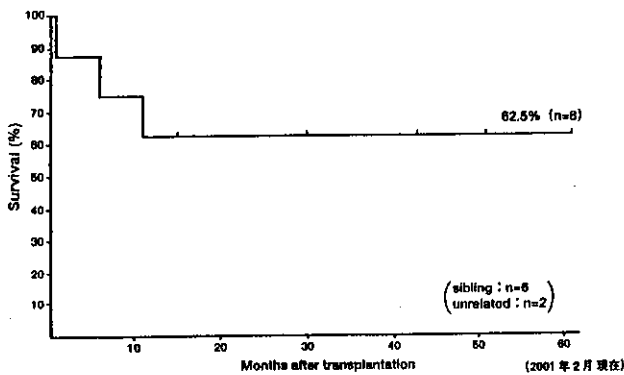
others
MCVC (MCNU, CPA, VP-16, CBDCA): 9
CB/CBDCA: 1, MC/CBDCA: 1
Ara-C/VP-16/CPA: 1

NHL (sensitive relapse/partial remission) に対する
自家造血幹細胞移植治療成績



others
MCVC: 9, MCV: 3, BAV: 2, BCNU/Ara-C: 2
CB/Ara-C, BAVC, CPA/VP-16, CB/CBDCA,
ICE, BuCyCA:各1

自家PBSCT後再発したNHL患者に対する同種移植治療成績



結果

1. transplant-related deathは4.3%であり、自家造血幹細胞移植は十分安全に治療できることを確認できた。
2. 1) NHL, HD, GCT, sarcomaに対しては、curabilityがあったのに対して、brain tumorは否定的であった。
2) breast cancerについての有効性を評価するためには、欧米で行われているように、病期を合わせて、conventional therapyと比較する、randomized trialが必要である。
3) acute leukemia, multiple myelomaについては、症例数が少なく、評価はできなかった。
3. 1) NHLにおける治療成績は、移植時の病期によって異なり、長期無病生存率は1stCR: 87.3%, sensitive relapse/PR: 47.6%, resistant relapse: 0%であった。
2) CBVは、他の前処置に比べて優れていることが示唆された。
3) 中間悪性度NHLの1stCRでの移植では、初診時のIPIは最終的なoutcomeに影響を及ぼさなかった。
4. 自家造血幹細胞移植後の再発36例中8例(22.2%)に対して、allo BMT (血縁6例, 非血縁2例)が行われ、8例中5例(62.5%)が長期無病生存を続けている。

研究報告書

厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「造血幹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」(小寺良尚班長)

「骨髓非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植に関する研究」
班員 高上洋一 (国立がんセンター中央病院)

従来の同種造血幹細胞移植は超大量の抗がん剤や放射線照射に伴う治療関連毒性(regimen-related toxicity: RRT)が多く発生する危険を伴う治療であった。しかるに超大量化学療法である同種移植術においては、graft-versus-tumor (GVT)効果やドナー由来リンパ球輸注療法 (DLI)の確立によって免疫療法としての側面が存在する事実が定着し、この同種免疫効果を応用する新たなコンセプトに基づいてミニ移植が開発された。ミニ移植では移植前処置の主目的は腫瘍細胞の壊滅ではなく、むしろドナー由来の造血幹細胞と免疫担当細胞の生着を目指すものである。この目的で行われる強力な免疫抑制療法には移植早期のRRTが少ないために、高齢患者や臓器障害を有する患者にも比較的安全に幹細胞移植を施行することが可能となる。

国立がんセンター中央病院においては、フルダラビンあるいはクラドリピン(2-chlorodeoxyadenosine)とブスルファン(4 mg/kg/day x 2日)及び抗胸腺リンパ球抗体(ATG: 2.5 mg/kg/day x 4ないし2日)を用いたミニ移植前処置療法を開発し、その有効性を確認するための臨床試験を行っている。この第一相臨床試験のエンドポイントは、100日以内の早期死亡である。対象患者は、1) 同種造血幹細胞移植が唯一の有効な治療法であると判断されるにもかかわらず、高齢や臓器障害のために移植を施行できない造血器腫瘍患者、及び2) 既存の治療法が無効な転移巣を有するために、強力な免疫療法を試みるのが妥当と考えられる固形腫瘍患者である。現時点では、HLAの一致した健常な兄弟ドナーを有する患者のみを対象として同種末梢血幹細胞移植を行う。

造血器疾患患者に関しては、現在までに通常の移植を受けることができない高リスク患者18名に対してミニ移植を施行し(全例にクラドリピンを使用)、治療に関連した致命的な急性期の毒性がないことから、その安全性が確認されたと考える。固形腫瘍に関しては、国外ではアメリカを中心に腎がんなどを対象とした小規模の臨床試験が開始されて一部では著効例も報告されている。我が国においてミニ移植の臨床試験を行う場合には、同種移植に伴う副作用である移植片対宿主病(GVHD)が軽度である利点が指摘されている。我々は各種の固形腫瘍患者8名も治療し(6例にクラドリピンを使用)、現在5名が生存中である。腎がんと骨肉腫患者において腫瘍の縮退を、またメラノーマ症例においては腫瘍増殖の鈍化を観察している。今後ミニ移植の対象となる患者数の増大が予測され、国立がんセンター中央病院においても造血幹細胞移植の約25%を占めるまでとなっている。GVT効果の発現には人種差があると思われるため、国内での適正な臨床試験体制の整備を行い、その適応を早急に定める必要がある。

国立がんセンター中央病院におけるミニ移植（造血器と固形腫瘍）

施行理由

臓器機能障害	10名
高齡	8名
固形腫瘍	8名

拒絶もしくは混合キメラ

PBSCT	2/25 (8%)
-------	-----------

急性GVHD

Grade0-I	15名
GradeII	4名
GradeIII	2名
GradeIV	3名

評価可能症例24例

GradeII-IV=9名(37.5%)

GradeIVの2名がGVHDにて死亡

2000年12月現在

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年度分担研究報告書

効率的な体外増幅法開発のためのヒト造血幹細胞の純化に関する研究

東京大学医科学研究所 浅野茂隆

1. 研究目的

すでに我々は、stem cell factor (SCF)、Flk2/Flt3リガンド(FL)、トロンボポエチン(TPO)、IL-6/可溶性IL-6受容体・複合体(IL-6/sIL-6R)を組み合わせて培養することにより、臍帯血中の長期造血再構築能を有する造血幹細胞の増幅が可能であることを報告した(Ueda et al. J Clin Invest, 2000)。そこで、より効率的な造血幹細胞の体外増幅法の開発を目的として、臍帯血中の体外増幅可能な造血幹細胞の純化を試みた。今回我々は、FLの受容体であるFlk2/Flt3に注目した。

2. 方法

- ①臍帯血中のCD34陽性細胞におけるFlk2/Flt3の発現をフローサイトメトリーで解析した。
- ②臍帯血中のCD34+Flk2/Flt3+細胞とCD34+Flk2/Flt3-細胞を各々FACSにてソーティングした後、NOD/SCIDマウスに移植し、その長期造血再構築能を検討した。
- ③臍帯血中のLineage (Lin)-CD34+CD38-Flk2/Flt3+細胞を単一細胞に分離し、SCF+FL+IL-6/sIL-6R+TPO存在下で液体培養を行った。培養細胞を培養1、2週後にNOD/SCIDマウスに移植し、ヒト造血再構築能を検討した。

3. 結果

①Flk2/Flt3は臍帯血中のCD34+細胞の約80%に発現されており（図1）、特に未分化細胞亜分画であるCD34+CD33-細胞、CD34+CD38-細胞中にもFlk2/Flt3発現細胞が認められた。

②蛍光活性化細胞分離装置を用いて、CD34+Flk2/Flt3+細胞、CD34+Flk2/Flt3-細胞をFACSにて分画し、各々 1×10^4 個の細胞を4匹のNOD/SCIDマウスに移植したところ、CD34+Flk2/Flt3-細胞を移植されたレシピエントでは生着は認められなかったが、CD34+Flk2/Flt3+細胞を移植されたレシピエントでは、4匹とも生着が認められた（図2）。このことより、ヒト造血幹細胞はFlk2/Flt3を発現していると考えられた。

③Lin-CD34+CD38-Flk2/Flt3+細胞を単細胞分離し、一個のLin-CD34+CD38-Flk2/Flt3+細胞を、FL、SCF、TPO、IL-6/sIL-6R存在下で培養したところ、61% (34/56)に増殖を認めた。培養1、2週後に増幅した細胞をNOD/SCIDマウスに移植したところ、移植後14-15週目の解析で、37.5% (6/16)でヒト造血再構築能を確認できた。以上の結果より、Flk2/Flt3を発現する造血幹細胞は単細胞レベルでも増幅が可能であることが示唆された。

4. 結語

長期造血再構築能を有するヒト造血幹細胞はFlk2/Flt3を発現しており、Lin-CD34+CD38-Flk2/Flt3+造血幹細胞はより効率的な体外増幅の標的細胞として有用である可能性が示唆された。

図1 CD34+細胞におけるFlk2/Flt3の発現

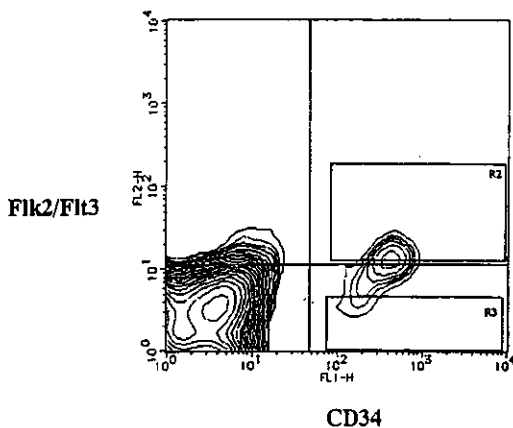
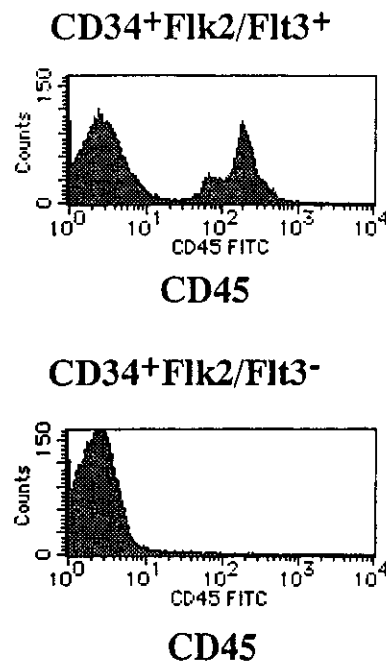


図2 CD34+Flk2/Flt3+細胞及びCD34+Flk2/Flt3-細胞を移植されたNOD/SCIDマウスの移植後12週の骨髄におけるヒトCD45の発現



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(小中班)

平成12年度第2回研究班会議(資料) 2001/02/10

移植免疫反応とHLA-C、E抗原

愛知県がんセンター 赤塚典樹 森島崇雄

九州大学 山本 徹 笹月健彦
 東海大学 猪子英俊
 日本赤十字中央血液センター 石川善英 赤座運也 十字猛夫
 愛知県赤十字血液センター 国島伸治
 名古屋大学 恵美直彦

解析症例(1298例)

- HLA-A, B, DR血清型完全適合初回移植症例
- HLA-A, B, C, DR, DQ DNA型タイピング実施1298例
- HLA-E DNA型タイピング実施430例
- 移植日 1993年1月~1998年4月
- 年齢 中央値23才(0~51才)
- 疾患 急性骨髄性白血病 304例 急性リンパ性白血病 353例
 慢性骨髄性白血病 367例 骨髄異形成症候群 99例
 悪性リンパ腫 39例
 再生不良性貧血 101例 遺伝性疾患 35例
- スタンダードリスク
 :急性白血病第1寛解期+慢性骨髄性白血病第1慢性期 480例
 ハイリスク:スタンダードリスクより進んだ病期の白血病 544例
- GVHD予防法 T細胞除去法16例
 Cyclosporine based 1145例 Tacrolimus based 148例

HLA-Cと急性GVHD(III度以上)

	C適合(n)	C不適合(n)	p
全症例	14.9%(862)	30.4%(426)	<0.0001
ABDRDQDNA型適合症例	11.8%(561)	20.6%(336)	<0.004
ABDRDQDNA型不適合症例	20.9%(301)	36.1%(270)	<0.0001

生着不全の発症率

HLA座	不適合	(n)	p
すべて適合	1.7%	(554)	
クラスI抗原(A, B, C)だけ不適合	6.6%	(369)	0.007
Cだけ不適合	4.1%	(141)	0.085
A, Bだけ不適合	4.8%	(106)	0.226
クラスII抗原(DR, DQ)のだけ不適合	5.3%	(121)	0.134

HLA-Cの白血病再発への関与

HLA座	移植後3年再発率%(n)	p
すべて適合症例	26.2 (442)	
HLA-Cだけ不適合	19.6 (122)	0.191
HLA-A, Bだけ不適合	31.5 (94)	0.709
HLA-DR, DQ不適合	23.4 (118)	0.733

生存率 クラスI抗原の関与

HLA適合度	3年生存率	症例数	p
すべて適合	55.6%	(539)	
HLA-Aだけ不適合	37.3%	(97)	<0.0001
HLA-Bだけ不適合	27.6%	(13)	0.0394
HLA-Cだけ不適合	54.0%	(158)	0.3276

HLA-E

- アミノ酸置換を伴う多型性 1個所のみ
 exon 3, alpha 2 domain (382nt A → G)
 107^{aa} Arg(AGG) → Giv(GGG)

表現型 A/A G/A G/G

- KIR:CD94/NKG2受容体のリガンド
- HLA-A B C G抗原のシグナル配列由来のペプチドを結合、提示

HLA-Eと急性GVHD(III度以上)

	Eのアロタイプ	症例数	GVHD頻度	p
患者	G/G	200	15.1%	0.043
	G/A or A/A	227	23.2%	
ドナー	G/G	197	8.3%	0.665
	G/A or A/A	230	11.8%	

HLA の DNA タイピングの普及に関する研究

— 班会議用報告書 —

分担研究者 笹月 健彦（九州大学生体防御医学研究所・教授）

研究要旨

骨髄移植の予後に対する HLA クラス II 遺伝子 (HLA-DRB1、DQB1) の寄与を検討する目的で、これまでに HLA DNA タイピングが終了した、血清学的に HLA-A、B、DR が一致した移植例 1370 組に関して、DRB1 および DQB1 の不一致が生存および GvHD 発症に与える影響を解析した。その結果、HLA-A、B が DNA レベルで一致した症例において、DRB1、DQB1 不一致は生存において有意差に到らず（各々 $p=0.086$ 、 0.068 ）、若干の差を認めたのみであったが、GvHD 発症に関しては、DRB1、DQB1 不一致が有意差（各々 $p=0.0001$ 、 0.0016 ）を示し、GvHD 発症の危険因子となることが示唆された。

A. 研究目的

骨髄移植は、造血系の悪性腫瘍および遺伝性疾患の有効な治療法である。しかし、骨髄移植においては、しばしば致死性 GvHD を発症することから、GvHD を中心とした予後に対する HLA の寄与を詳細に把握することが最重要である。我々はこれまでに公的骨髄バンクを利用した非血縁者間骨髄移植が行われた、血清学的に HLA-A、B、DR が一致した移植例 440 組に関して HLA 型の DNA レベルでの解析を行い、死亡に関して HLA クラス I、特に HLA-A の DNA レベルでの不一致が死亡に関して重要な危険因子となることを明らかにした。これに対し、HLA-DRB1、DQB1 の不一致は有意差には到らなかったが、若干の差を認めた。本年度は新たに DNA レベルでの解析が終了した計 1370 組について、HLA クラス II の DNA レベルでの不一致が生存および GvHD 発症におよぼす影響を検討することを目的とした。

B. 研究方法

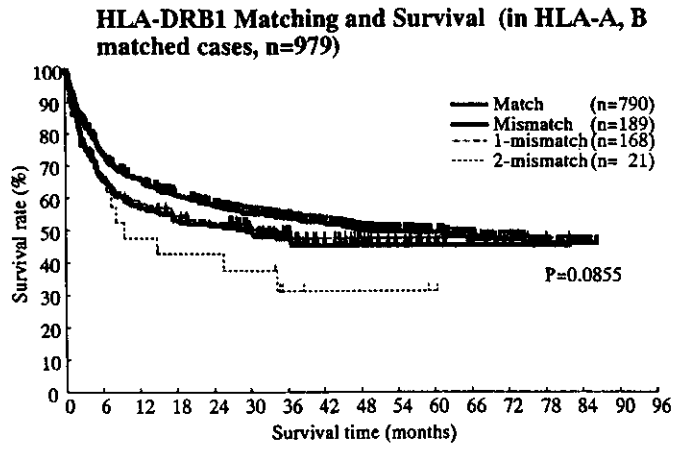
これまでに集積した 1370 組の移植例の HLA-A、B、DRB1、DQB1 の DNA レベルでの解析結果に関し、HLA-A、B とともに DNA レベルで一致する

症例を対象として、DRB1、DQB1 の不一致が生存および GvHD 発症に及ぼす影響を検討した。

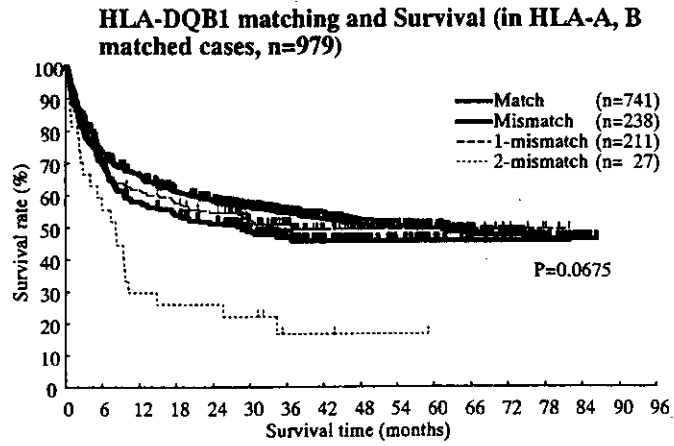
C. 研究結果・考察

前回までの解析により、生存および GvHD 発症に HLA クラス I の DNA レベルでの不一致が危険因子となることを明らかにした。これにより、骨髄バンクにおいても 1996 年 8 月以降 HLA-A、B の DNA レベルでのタイピングが始まり、より適合度の高い移植が行われている。今回、1370 組において HLA-A、B 一致症例における DRB1、DQB1 不一致が生存および GvHD 発症におよぼす影響を Kaplan-Meier 曲線によって検討したが、図 1、2（裏面）に示すように、生存においては DRB1、DQB1 の不一致は有意差を示さなかった（各々、 $p=0.086$ 、 $p=0.068$ ）。一方、GvHD 発症に関しては DRB1 不一致が $p=0.0001$ 、DQB1 不一致が $p=0.0016$ （図 3、4：裏面）であり、DRB1、DQB1 不一致が危険因子となることが示唆された。このことより、HLA-A、B の DNA レベルでの一致症例間における GvHD 発症に関する DRB1、DQB1 マッチングの重要性が示唆された。

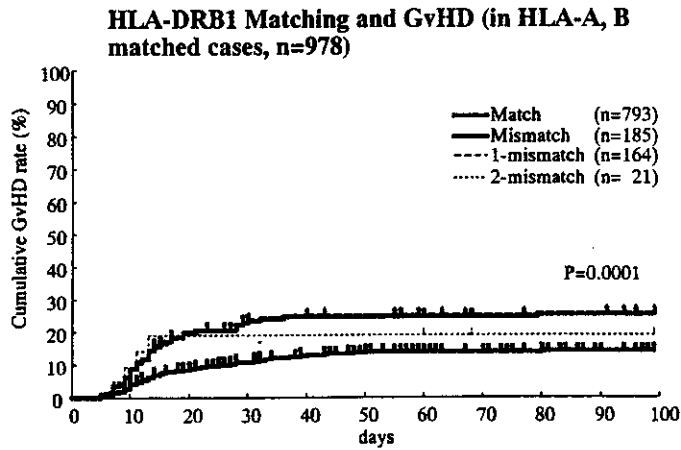
☒ 1



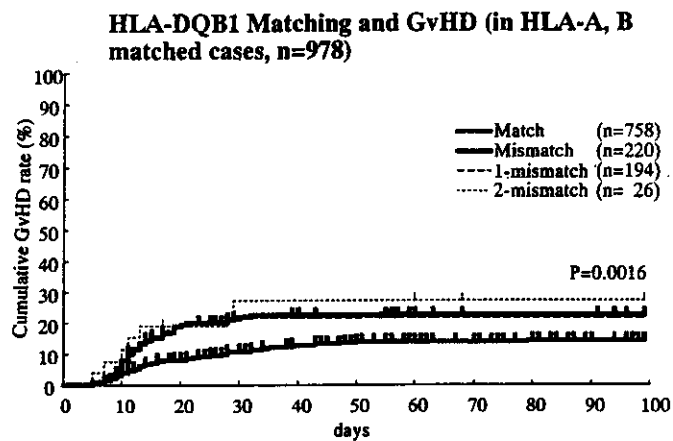
☒ 2



☒ 3



☒ 4



2001年2月14日

「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」 研究資料

TNF遺伝子多型の移植への影響

日赤中央血液センター
石川善英、赤座達也、十字猛夫

Table 1 *TNFA*-allele Frequency

allele	nucleotide position			Frequency	
	-1031	-863	-857	R	D
U01	T	C	C	620 593	0.66 (0.66) *
U02	T	C	T	146 150	0.16 (0.18)
U03	C	A	C	127 148	0.15 (0.14)
U04	C	C	C	15 25	0.02 (0.03)

*Matsuzita et al. Tissue Antigens 1999, 54:478-484

Fig.1 *TNFA* polymorphism and GVHD (grade=3,4)

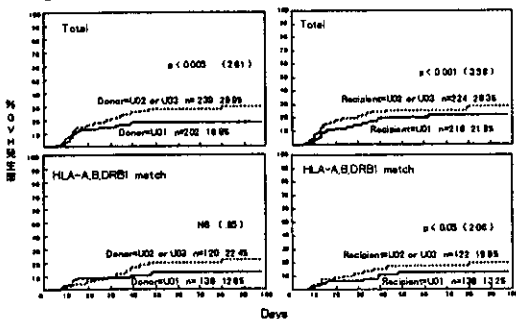


Fig.2 *TNFA* polymorphism and Relapse

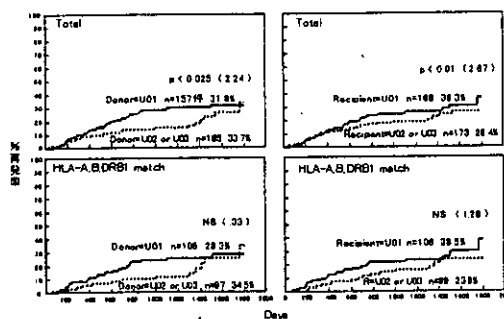
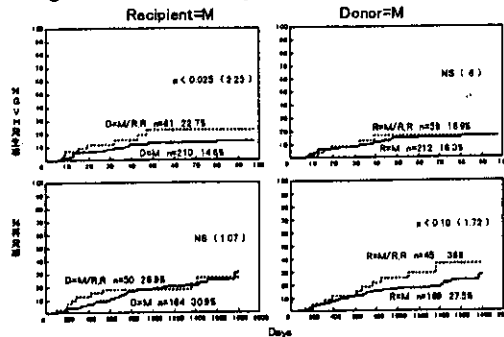


Table 2 *TNFR2*-allele Frequency

	R	D	Frequency
196M	799	790	0.88 (0.9) *
196R	107	116	0.12 (0.1)

*Kosaka T et al. Tissue Antigens 1999, 53: 527-533

Fig.3 Effect of *TNFR2* polymorphism (HLA match)



TNFA, TNFR2 polymorphismの
移植への影響

- HLAと独立に影響する。
- TNFa-U02, U03はGVHD, GVL共に強める。
- Donor TNFR2-RはGVHD, GVL共に強める。
- Recipient TNFR2-Rは再発率を高める。
- 生存率には影響しなかった。

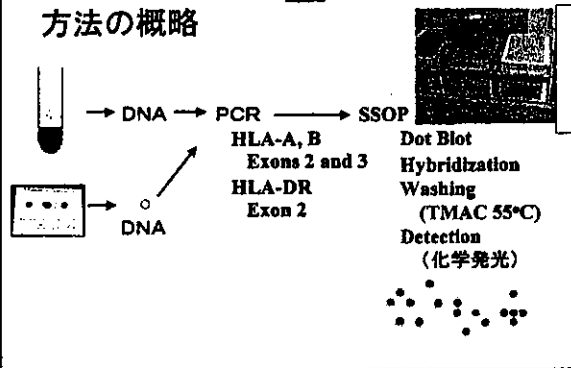
日本人 HLA-A, B, DR の DNA検査法の改良

日本赤十字社中央血液センター
坂内 誠、赤座達也、十字猛夫

HLAタイピング法(今回の目的)

- ◆HLA-A, B, DR
- ◆血清学レベル(二桁)の判定
- ◆SSOP法を選択(多数検体を目的とする)
- ◆日本人で頻度0.1%以上のアリル
- ◆ほぼすべてのヘテロ組み合せを判定
-
- ◆フィルター採血サンプル

方法の概略



プローブの設計

日本人で頻度0.1%
以上のHLAアリル
Tanaka et al. 1997,24

HLA-A	HLA-B	HLA-DR
15	35	30

対象アリル数

HLA-A 15
HLA-B 35
HLA-DR 30

設計した Probe

	Probe数	Allele数	Group数	判定不能なヘテロ
HLA-A	13	15	12	0%
HLA-B	24 (23)	35 (35)	29 (29)	0.17% (1.01%)
HLA-DR	17	30	17	0.67%

プローブの検証

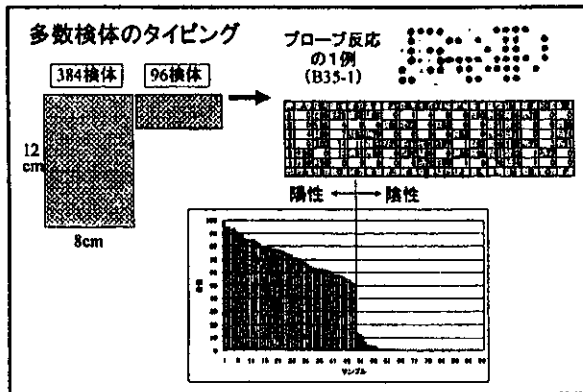
A プローブ

B プローブ

DR プローブ

DRB1001
DRB1002
DRB1003
DRB1004
DRB1005
DRB1006
DRB1007
DRB1008
DRB3705
DRB3703
DRB5704
DRB5708
DRB7001
DRB7003
DRB7004
DRB7007
DRB7003R

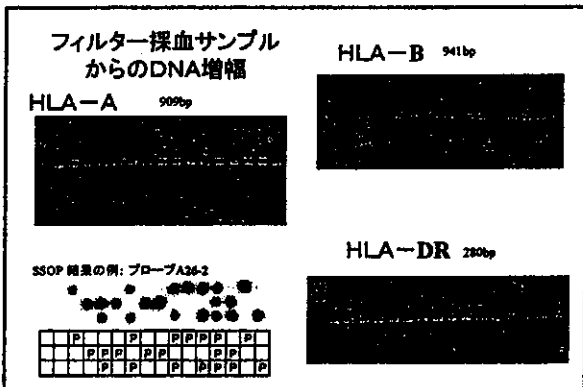
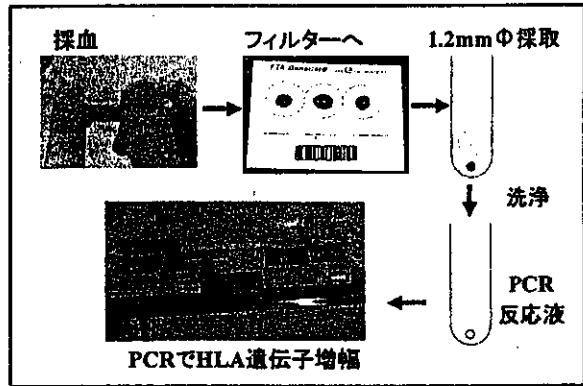
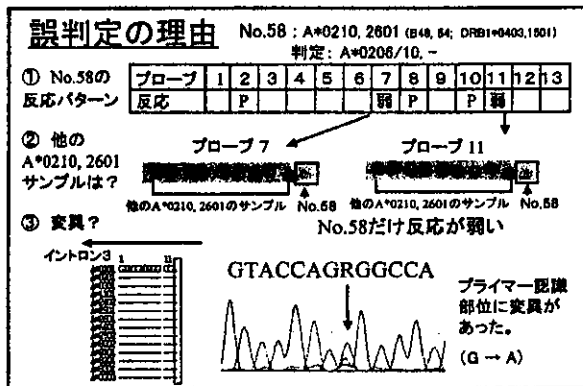
洗浄温度はすべて
55°C



SSOPタイピングの判定精度

	サンプル数	判定可能数	誤判定	判定保留
HLA-A	90 (87)	88	1	1
HLA-B	95 (95)	95	0	0
HLA-DR	95 (95)	95	0	0

()内はアレル組み合わせの数



まとめ:今回可能となったこと

- ◆多数検体を目的とするHLA-A, B, DRタイピング法を開発した。
- ◆日本人で頻度 0.1% 以上のアレルに対し、血清学レベル (二桁~四桁) の判定が可能。
- ◆フィルター採血サンプルからのタイピング可能。

今後の課題

- ◆多数検体で確認 (プライマー認識部位の変異など)
- ◆ソフトウェアの開発
- ◆作業性の向上

新規に同定されたマイナー抗原HA-8とその臨床的意義

愛知県がんセンター 赤塚美樹 森島泰雄

はじめに

マイナー(組織適合)抗原(mHA)は主要組織適合抗原(MHC, ヒトではHLA)一致臓器移植において拒絶を引き起こす抗原として認識されてきた。しかしながらヒトにおいてはまだ数種の抗原遺伝子が同定されたにすぎず、その広がり未知数である。造血幹細胞移植においてHA-1のように血液細胞に特異的に発現するmHAは、移植後の残存白血病細胞を含む患者の血液細胞を駆逐する腫瘍抗原のように機能するので、免疫療法の良い対象となる。今後ミトランスプラントが普及するにつれ、ドナーリンパ球輸注(DLI)に代わって移植片対宿主病(GVHD)を起こさず腫瘍細胞を排除できるような特異的T細胞療法が必要になってくると思われる。

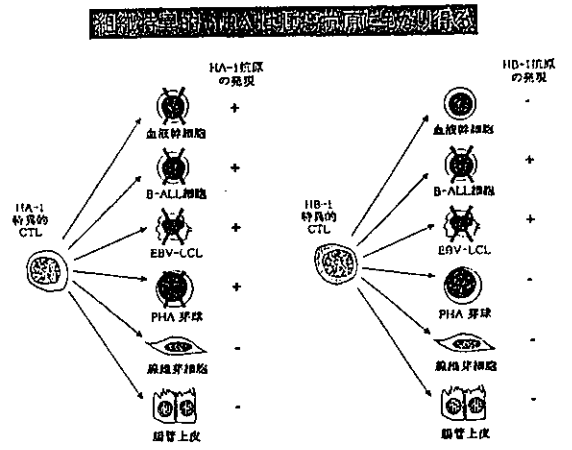
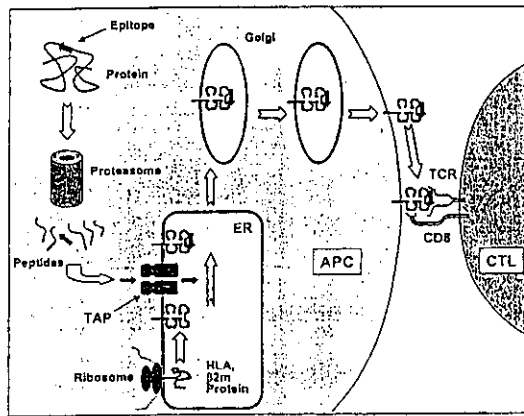
今回我々はHLA一致同種移植後の患者末梢血よりHLA-A*0201拘束性の未知のmHAに特異的な細胞傷害性T細胞クローン(CTL)を樹立し、そのmHA遺伝子の同定をした。この抗原特異的CTLはテトラマーとPCRによって、患者末梢血中に存在することが示された。このmHAの不適合と臨床所見との関連等から、この抗原が免疫療法の標的となりうるかについても検討する。

マイナー抗原(mHA)とは

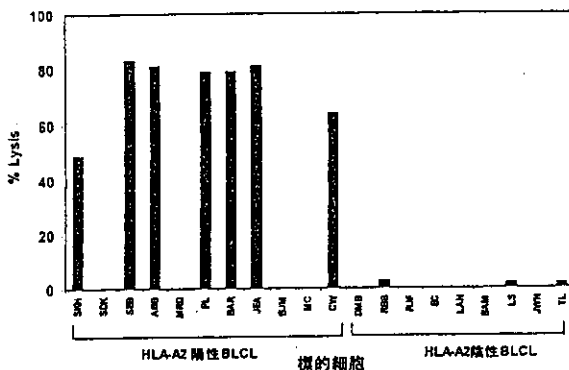
同種間での発現が異なるタンパク質に由来し、その相違が主要組織適合抗原(MHC)上に提示されるため、T細胞レセプターを介してT細胞により非自己として認識されるもの。

この相違は、1塩基置換(SNP)による遺伝子多型や、性差、遺伝子欠失等に由来する。

常染色体、性染色体、ミトコンドリア染色体のいずれもmHAをコードしうる。特に性染色体は男女間で著しく異なるので、多数のマイナー抗原をコードしている。



SKH13 CTL 細胞傷害性試験

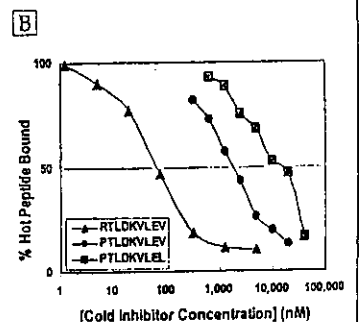


HA-8 の多型性(A)と、各ペプチドのHLA-A*0201への結合度(B)

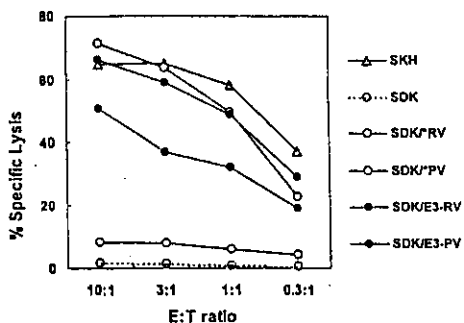
A
Recipient KIAA0020 Allele
HA-8^R (represented in KIAA0020):
CGA ACT CTG GAC AAA GTG TTA GAG GTA
R T L D K V L E V

Donor KIAA0020 Alleles
HA-8^P polymorphism:
CCA ACT CTG GAC AAA GTG TTA GAG GTA
P T L D K V L E V

HA-8^L polymorphism:
CCA ACT CTG GAC AAA GTG TTA GAG TTA
P T L D K V L E L



各ペプチドをミニジーンを使って小胞体内外で強制発現させ、HA-8 特異的CTLによる細胞傷害活性を検討

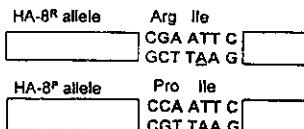


HA-8アレルに対するPCR-RFLP 解析

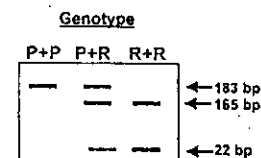
プライマー配列:

5': GGATATACAGCAGAGCTTTC
3': TCTAACACTTTGTCCGAAATT

2つのアレルに対するPCR産物 (全長 183 bp)



Eco RI 消化後のパターン



235例のHLA一致同種移植例 (HA-8適合対不適合)の内訳

Risk Factor	HA-8		P value
	適合 (n=210)	不適合 (n=25)	
Median Age at TX (range)	32.6 (9.8 to 66.3)	29.7 (19.7 to 65.4)	.59
Patient age (n; %)			.09
< 15	25 (12)	0 (0)	
≥ 15	185 (88)	25 (100)	
Advanced malignancy (n; %)	64 (26)	8 (32)	0.5
Donor/recipient gender (n; %)			0.7
Male/male	52 (30)	6 (24)	
Female/female	47 (22)	8 (32)	
Female/female	52 (25)	3 (12)	
Male/female	43 (21)	4 (16)	
Unknown Parity	6 (3)	4 (16)	
BM as stem cell source (%)	203 (97)	24 (96)	0.6
Conditioning (%)			.32
≤ 1200 cGy	80 (38)	13 (52)	
> 1200 cGy	61 (29)	7 (28)	
No TBI	69 (33)	5 (20)	
Transplant year (n; %)			.85
Before 1991	159 (74)	19 (76)	
1991 or later	64 (25)	6 (24)	

急性 GVHDとHA-8適合性との関係

Stage	HA-8		p value	
	適合 (n=210)	不適合 (n=25)		
Skin	0-1	132	14	0.68
	2-4	76 (37%)	11 (44%)	
Liver	0-1	177	23	0.47
	2-4	23 (15%)	2 (8%)	
Gut	0-1	185	25	0.27
	2-4	23 (11%)	0 (0%)	
Overall	0	115	13	0.79
	II-IV	95 (45%)	12 (48%)	

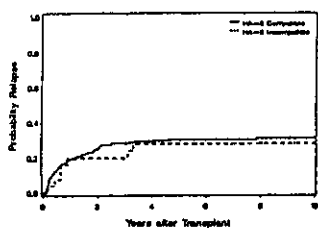
P values for differences in the distribution of skin, liver and gut stages and overall grade were calculated from Wilson rank sum test.

慢性 GVHDとHA-8適合性との関係

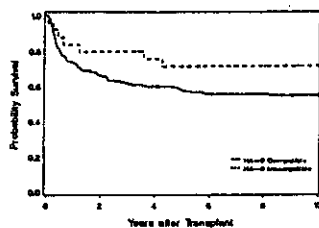
Genotype	Clinical Extensive cGVHD, Multivariable Model ¹		
	Hazard Ratio	95% CI	p-value
適合	1	—	—
不適合	1.1	0.6 to 2.2	0.7
Genotype	Clinical cGVHD, Multivariable Model ⁴		
	Hazard Ratio	95% CI	p-value
適合	1	—	—
不適合	1.3	0.7 to 2.5	0.39
Genotype	Clinical or Subclinical cGVHD, Multivariable Model ¹		
	Hazard Ratio	95% CI	p-value
適合	1	—	—
不適合	1.6	1.0 to 2.7	0.07

¹Adjusted for age, advanced vs. less-advanced disease, donor parity, and TBI.

HA-8 不適合が再発率にもたらす影響

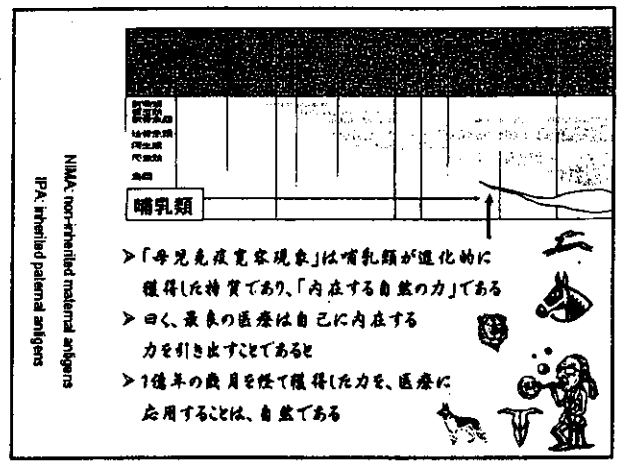
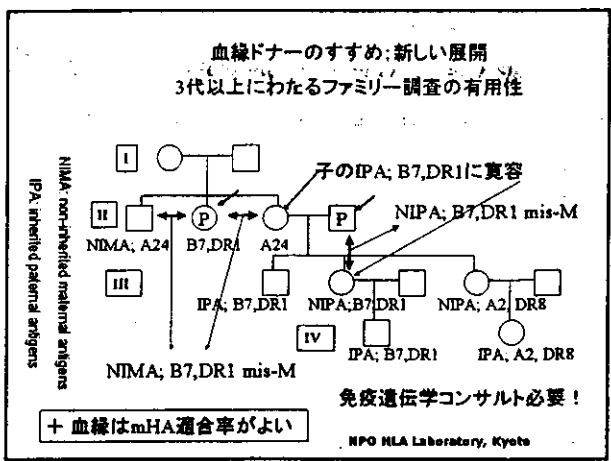
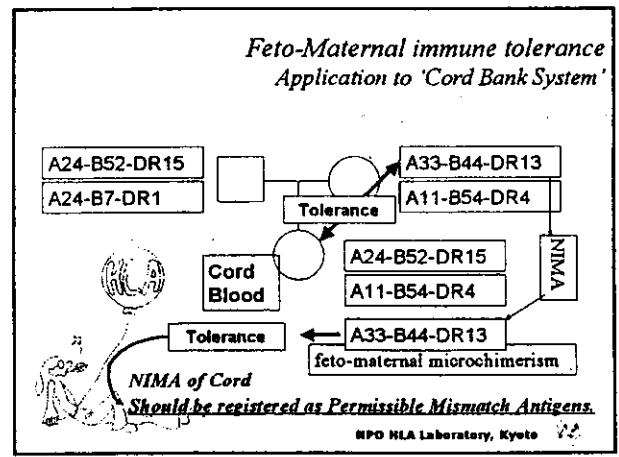
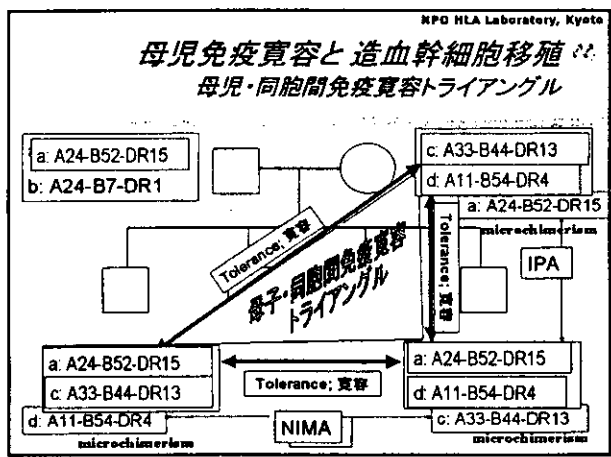
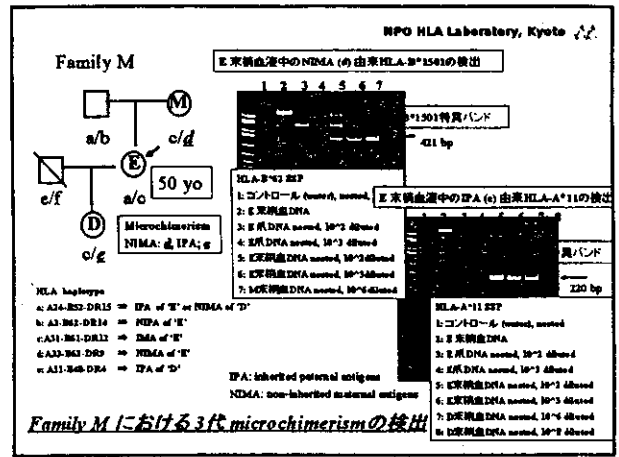
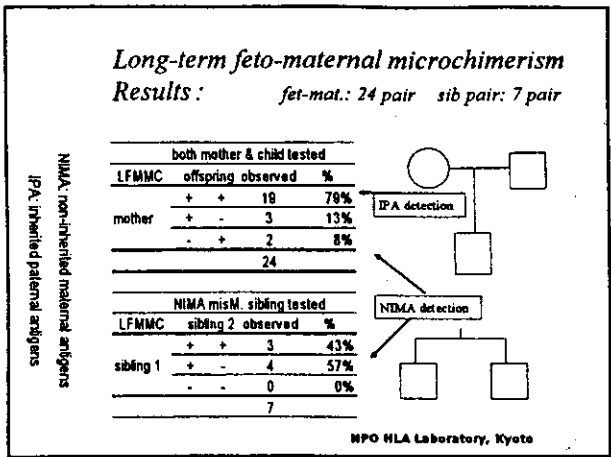


HA-8 不適合が Overall Survival にもたらす影響



結果と考案

- HLA-A*0201上に発現される新規のmHA (HA-8)を認識するCTLを樹立した。一般人口における抗原頻度は約 65%であった。
- 生化学的手法により、ペプチドの配列を決定した。この遺伝子をコードする遺伝子は KIAA0020 と判明した。3種類の遺伝子多型が存在することがわかったが、そのうち第1位のアミノ酸が Pro であるペプチドは ER へ効率よく移行しないことが minigene の実験で示され、TAP への結合度の低さがその理由と考えられた。
- 235例の HLA 一致 A*0201 陽性同種移植の解析から、本 mHA の不適合は急性 GVHD の発症には関与しないが、慢性 GVHD の発症には関与している可能性が示された。
- KIAA0020 は皮膚繊維芽細胞を含む広範な組織で発現しており、免疫療法の標的として用いることは困難と考えられた。



母子間マイクロキメリズムの HLA 不適合造血細胞移植への応用

一戸辰夫¹、玉木茂久²、丸屋悦子³、佐治博夫³

¹京都大学医学部附属病院第一内科、²山田赤十字病院内科、³HLA 研究所

最近 HLA 特異的な高感度 PCR 法により、健常な免疫能を有した成人の末梢血球から母由来の非遺伝 HLA が検出されるという驚くべき現象が明らかにされつつある。一方、妊娠を経験した母末梢血からは出産後数十年以上を経過しても児由来の配偶者型 HLA を検出することが可能であることも判明し、母子間においては妊娠後相当な長期間にわたってお互いの造血細胞のマイクロキメリズムが維持されているものと考えられる。本来<非自己>であるはずの造血細胞がきわめて長期間マイクロキメリズムを成立させているという現象は、これまでの免疫学に大きな問いを投げかけるものであり、その生物学的意義を明らかにしていくことはきわめて重要な課題と考えられる。われわれはこの現象を long-term feto-maternal microchimerism (LT-FMC) と名付け、哺乳動物の妊娠成立に関連する非遺伝 MHC に対する普遍的トレランス機構の一部と考えている。一方で LT-FMC をむしろ一種の免疫異常として理解しようとする考え方があり、Seattle の Nelson らは PSS などの自己免疫疾患発症と母子間マイクロキメリズムの関連を指摘している。しかし、われわれの行った自己免疫疾患を有さない 37 家系の調査では、母子間の 79% において、LT-FMC が確認可能であったことから、検出感度の問題も含めて考慮する時、むしろ LT-FMC はかなり普遍的に認められる現象である可能性が高い。また、われわれは三世代の母子間を対象とした LT-FMC の検討も行ったが、母由来造血細胞は各世代間で伝達されることが確認されている。もし LT-FMC が非遺伝 MHC に対する寛容の indicator であることが明らかとなれば、妊娠を経験した女性は最大で 3 つの HLA ハプロタイプ (母由来のもの 1 種類と配偶者のもの 2 種類) に対する潜在的な寛容誘導機構を秘めていることとなり、移植医療に与えるインパクトはきわめて大きなものになることが推測される。

すでに Claas や Burlingham らによる腎移植例の解析などを通じ、非遺伝母 HLA (NIMA, non-inherited maternal HLA antigens) に対する獲得寛容効果の存在が示唆されているが、われわれは LT-FMC を指標として、そのような母子間の長期免疫寛容をヒト造血細胞移植に応用していくことを検討している。例えば母子間に限らなくても、父由来の HLA ハプロタイプを共有し、不適合ハプロタイプが母由来であるような同胞間 (NIMA 不一致同胞) では、非遺伝母 HLA に対する相互のトレランスの存在が生着不全や GVHD 発症リスクの低下に有利に働く可能性がある。昨年日本造血細胞移植学会ワーキンググループにおいて行われた両親からの造血細胞移植の治療成績に関する解析結果は、このようなわれわれの予想を支持するものであり、retrospective な解析ではあるが、母から移植を受けた群の生存率が父から移植を受けた群より有意に優れていることが判明した。また IBMTR での HLA 部分不適合血縁者間の造血細胞移植の解析でも、NIMA 不一致同胞間における急性 GVHD の発症は NIPA 不一致同胞間よりも有意に低率であることが報告されている。これらの知見に基づき、われわれは NIMA 不一致血縁者をドナーとする造血細胞移植に関する臨床試験を開始しているが、これまで登録された症例では HLA-A, -B, -DR に二座以上の不適合座が存在する例が含まれているにもかかわらず重症 GVHD の出現は見られていない。今後の重要な研究課題は、母子間での相互の造血細胞の traffic の過程における双方向性トレランスの誘導機構を明らかにすることであり、この領域へのさらなる基礎研究者の参画を強く期待している。

(参考資料)

- 1) Ichinohe T, Matsuo K, Tamaki S, et al. : Superior outcome of blood and marrow stem-cell transplantations using maternal grafts over transplants using paternal grafts. Blood 96:208a, 2000.
- 2) 一戸辰夫、丸屋悦子: "Long-term feto-maternal microchimerism":造血細胞移植の新たな可能性を求めて. KAMON No.21, 2001 (印刷中)