

HLA遺伝的一致同胞以外からの血縁者間造血細胞移植の成績

— 一施設の経験 —

東京大学医科学研究所：井関 徹、大井 淳、友成章、浅野茂隆、造血細胞移植チーム

【緒言・目的】ドナー、移植細胞ソースの拡大、新たな移植方法の開発により造血細胞移植(HCT)の形態は極めて多様化している。多数の方法の中から症例毎に最適の移植方法を選択することが可能かつ必要となってきたが、その選択基準は必ずしも明らかでない。特に本邦におけるHLA一致同胞以外の血縁者間造血細胞移植には不明な点が数多く残されており、適切な造血細胞移植のドナーと方法の選択のためには、その成績の十分な評価が必要と考えられる。

今回東大医科研における成人造血器腫瘍症例に対するHLA一致同胞以外の血縁者間造血細胞移植の成績を報告し、問題点と今後の課題を検討する。

【対象・方法】 Table 1 ~ 3

【結果】 Table 4 ~ 5, Fig. 1 ~ 7

【考察】重症急性GVHD、慢性GVHDともHLA一致同胞からの移植に比較して高頻度であったが、予後の低下に関与した例は4例(12.5%)であった。再発腫瘍死が6例(18.8%)に見られたが、無病生存率は標準riskグループで87.5%、highriskグループで41.3%であり、最終的な移植成績は一致同胞や非血縁者からの移植と同等であった。また、親子、同胞以外の血縁者ドナーからの移植成績も良好であった。

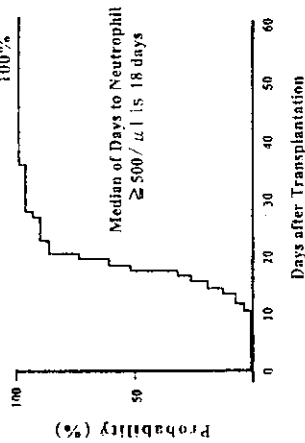
今後(特に母子間で)、2抗原不一致、あるいはhaplo-identicalの血縁者間移植に関する検討が必要であり、HLA DNA typingのもつ意味も検討する必要があると考えられる。また、十分な家族外血縁者ドナー検索がなされないまま非血縁者間骨髄移植や臍帯血移植が選択されている症例が多いことから、HLA一致同胞以外の血縁者間造血細胞移植の成績の詳細を検討し、ドナー選択の基準を作成する必要があると考えられる。

Characteristics of Patient	
Total Number	32
Male	18
Female	14
Age (y)	18~51(29)
Diagnosis	AML 15
	MDS(RA) 3
	ALL 8
	NHL 1
	CML 5
Disease Status at HCT	
Standard Risk Group	7
(AL-CR 1/2, CML-CP, MDS)	
High Risk Group	25
(AL/NHL-CR3 ≤ /Relapse, CML-AP/BC)	

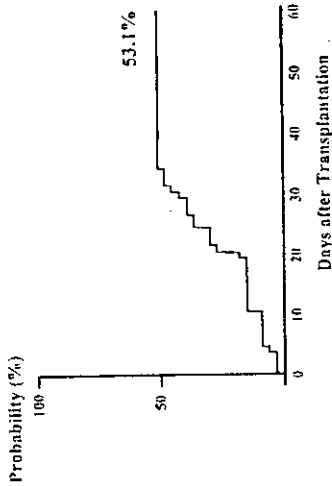
Relationship between Donor and Recipient				
n = 32				
Consanguinity	Sibling	13		
	Parent	12		
	Others	7		
HLA disparity		GVH vector	HVG vector	
	Serum typing	0AMM	9	8
		1AMM	22	22
2AMM		1	2	
+ DNA typing	0AMM	6	6	
	1AMM	21	20	
	2AMM	5	6	

Regimen of HCT	
n=32	
Conditioning	
TBI + G-CSF/AraC + CY	20
TBI + G-CSF/AraC	1
TBI + G-CSF/AraC + ATG	1
TBI + CY	10
GVHD prophylaxis	
CyA + sMTX	29
CyA + sMTX + TCD	2
FK506+ sMTX	1
Stem Cell Source	
BM	29
PBSC	3

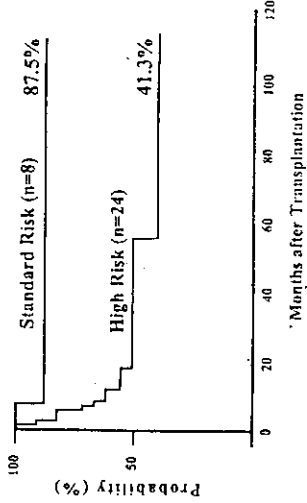
Neutrophil Engraftment



Cumulative Incidence of Grade II to IV Acute GVHD

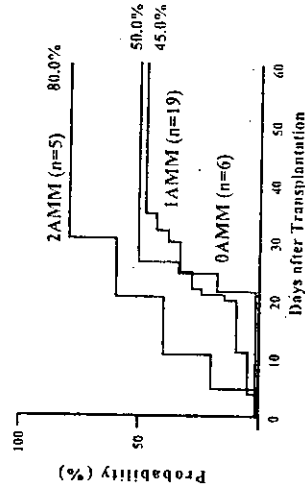


Disease Free Survival according to Disease Status

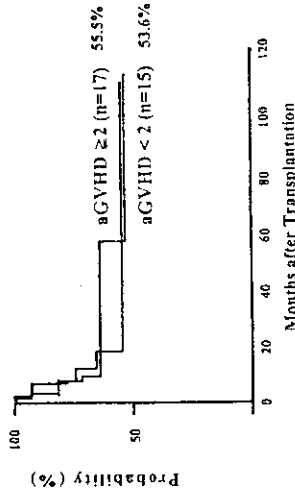


GVHD		n=32
Acute GVHD		
Grade 0	5 (16%)	
Grade I	10 (31%)	
Grade II	8 (25%)	
Grade III	2 (6%)	
Grade IV	7 (22%)	
Chronic GVHD		
Absent	4 (17%)	
Present	20 (83%)	

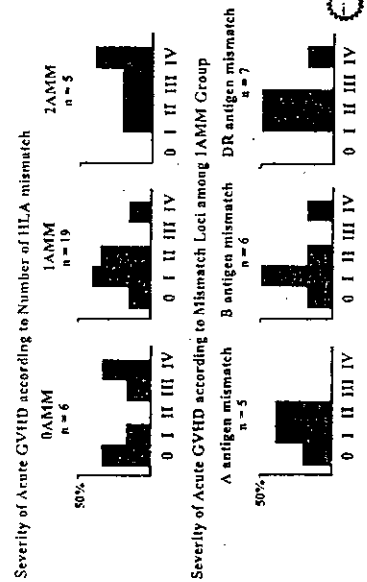
Cumulative Incidence of Grade II to IV Acute GVHD according to HLA Disparity



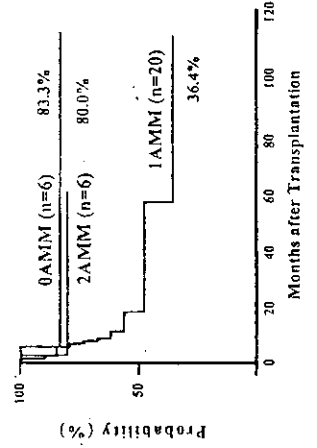
Disease Free Survival according to Acute GVHD



Acute GVHD and HLA Disparity



Disease Free Survival according to HLA Disparity



Outcome

n=32	
Disease Free Survivor	20
(3~114 (26) months after HCT)	
Cause of Death	(n=12)
Relapse	6
Acute GVHD	3
Chronic GVHD	1
Others	2

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（主任研究者 小寺良尚）

第1回班会議（2001.06.09 名古屋第一赤十字病院、3階古川講堂、12時～17時）

異種骨髄ストローマ細胞株を利用したヒト骨髄ならびに末梢血幹細胞の ex vivo 増幅

東海大学血液リウマチ内科
川田浩志、安藤潔、岸賢治、堀田知光

【はじめに】我々は以前よりマウス骨髄線維芽細胞株を用いてヒト臍帯血中の造血幹細胞を ex vivo 増幅するシステムを考案し、臨床応用への準備を進めてきた(ref. 1)。本システムを用いることにより、臍帯血中の幹細胞を5日間で10倍以上に増幅することができた。懸念された安全性にも問題がなかったことから臨床試験を計画し、学内倫理委員会の承認を得、現在適応症例を待機中である(ref. 2)。今回は、本システムを用いてヒト骨髄(BM)ならびに末梢血(G-CSF-mobilized PB:GmPB)中の幹細胞の増幅を試みたので、その結果について報告する(ref. 3)。

【方法】健康ドナーよりインフォームド・コンセントを得て採取したBM(n=4)とGmPB(n=4)より、免疫磁気ビーズ法によりCD34陽性(CD34+)細胞を分離後、これを凍結保存し、必要時解凍して実験に用いた。図1に示した培養システムを用いて、CD34陽性細胞をマウス骨髄線維芽細胞株の HESS-5と各種のヒトサイトカイン(thrombopoietin (TPO), flk-2/flt-3 ligand (FL-2), IL-3, stem cell factor (SCF), IL-6)の存在下に、5日間の無血清培養を行った。培養中のヒト造血細胞増殖動態をPKH26でペリクレーションすることにより観察した。さらに、培養前後の細胞を用いて、細胞増幅倍率やコロニー形成率の検討を行うとともに、severe-combined immunodeficient mouse-repopulating cell (SRC) assayで長期的造血維持能を評価した。

【結果】HESS-5の存在下にTPO, FL-2, IL-3を添加し培養することで、GmPBならびにBMのCD34⁺/CD38⁻細胞数は、それぞれ60倍ならびに10倍増加した(Table 1)。しかしながら、臍帯血を用いた増幅結果(113.9 ± 21.7)に比して低い増幅効率であり、コロニー(CFU-C, CFU-mix)形成率の増加は、ともに10倍未満であった。そこで、さらにサイトカインとしてSCFとIL-6を加えた。その結果、CD34⁺/CD38⁻細胞増幅倍率は90倍ならびに40倍と有意に上昇し、コロニー形成率も、それぞれ20倍、10倍に増加した(p<0.001)。次に、PKH26を用いて培養中のヒト造血細胞増殖動態を検討した結果、本培養システムを用いて培養した場合、HESS-5非存在下での培養に比し、有意に細胞分裂が亢進してCD34⁺細胞の増幅がはやく進み、かつ細胞分裂していないPKH26^{low}細胞はほとんど認められなくなることがわかった(図2)。以上より、本培養システムでの培養後に得られる細胞は、ほとんどすべてex vivo増幅された細胞であると考えられた。最後に、培養前後の細胞を用いてSRC assayを行った。GmPBならびにBM由来CD34⁺細胞を本システムでの培養群(A群)、HESS-5非存在下での培養群(B群)、非培養群(C群)の3群に分けて、それぞれをsublethal irradiation 施行後のNOD/SCIDマウスに移植し、6週間後にヒト造血細胞の生着の有無を検討した。2 × 10⁴個のGmPB由来CD34⁺細胞を用いた検討では、A群のみに生着が認められた(Table 2)。8 × 10⁴個のBM由来CD34⁺細胞を用いた検討でも、B群・C群に比して、A群で高い生着率が認められた。

【考案】マウス骨髄線維芽細胞株とヒトサイトカインを用いた本培養システムは、BMやGmPB由来の造血幹細胞の ex vivo 増幅をも支持し得ることがわかった。とはいえ、造血細胞リウスによって幹細胞や前駆細胞が、異なるサイトカイン依存性/増殖動態を示すことや、幹細胞のphenotypeがagingやG-CSF-mobilizationなどによって代わりうる可能性(ref. 4,5)、さらにはCD34陰性幹細胞の存在(ref. 6)などから、各造血細胞リウスごとに至適なサイトカインコンビネーションや増幅ターゲットの更なる検討を行っていく必要があると考えられる。臍帯血のみならず、BMやGmPB由来の造血幹細胞の ex vivo 増幅によって造血幹細胞バンクと移植医療の一層の発展が期待できるが、stem cell plasticityの研究から、さらに新しい造血幹細胞リウスの存在する可能性がでてきており、今後はこれらについても合わせて検討を進めていく予定である(ref. 7)。

図 1

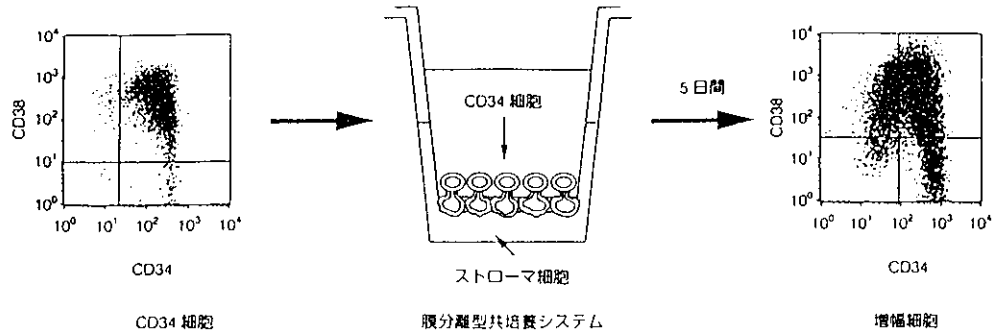


Table 1: Effects of HESS-5 cells and human cytokines on the fold expansions of human PB and BM after five days of culture.

Cell population or colony		Stroma-free			With HESS-5 cells		
		Cytokine (-)	TPO/FL/IL-3	TPO/FL/IL-3/IL-6/SCF	Cytokine (-)	TPO/FL/IL-3	TPO/FL/IL-3/IL-6/SCF
Total number of cells	PB	0.8 ± 0.1	5.0 ± 0.3	18.9 ± 1.2*	0.8 ± 0.1	8.8 ± 0.5	25.7 ± 0.3*
	BM	0.5 ± 0.0	3.6 ± 0.2	8.1 ± 1.7*	0.6 ± 0.0	5.6 ± 0.3	12.6 ± 0.6*
CD34 ⁺ cells	PB	0.4 ± 0.0	2.2 ± 0.1	4.3 ± 0.3*	0.6 ± 0.0	4.9 ± 0.3	9.6 ± 0.1*
	BM	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.0	2.3 ± 0.5*	0.4 ± 0.0	1.6 ± 0.1	4.4 ± 0.2*
CD34 ⁺ /CD38 ⁺ cells	PB	0.4 ± 0.0	1.5 ± 0.1	3.5 ± 0.2*	0.6 ± 0.0	4.0 ± 0.2	8.4 ± 0.1*
	BM	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.3 ± 0.3*	0.3 ± 0.0	1.1 ± 0.1	2.6 ± 0.1*
CD34 ⁺ /CD38 ⁻ cells	PB	1.1 ± 0.1	44.6 ± 2.7	60.2 ± 3.9*	4.0 ± 0.3	59.6 ± 3.7	87.4 ± 1.1*
	BM	0.8 ± 0.1	6.5 ± 0.3	20.7 ± 4.3*	1.3 ± 0.1	10.6 ± 0.6	37.7 ± 1.9*
CFU-C	PB	0.1 ± 0.0	3.6 ± 0.0	13.9 ± 0.1*	0.1 ± 0.0	6.3 ± 0.1	19.6 ± 0.6*
	BM	0.2 ± 0.0	3.1 ± 0.3	11.7 ± 0.2*	0.3 ± 0.0	5.3 ± 0.2	13.5 ± 0.1*
CFU-Mix	PB	0.0 ± 0.0	3.6 ± 0.4	12.1 ± 0.0*	0.3 ± 0.1	7.2 ± 1.3	21.0 ± 3.0*
	BM	0.1 ± 0.1	1.2 ± 0.0	5.7 ± 1.1*	0.3 ± 0.1	3.7 ± 0.0	11.0 ± 1.4*

Fold expansion was shown by mean ± SE (n = 4). *p < .01; *p < .001 versus T/F/3; *p < .01; *p < .001 versus T/F/3.

図 2

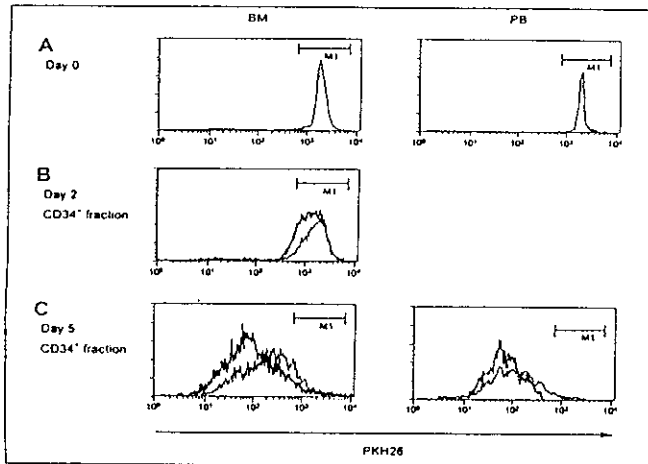


Table 2: Determination of human hematopoietic reconstitution in NOD/SCID mice six weeks after transplantation.

Cell dose	Cell source	Culture condition		
		Control	HESS ⁻	HESS ⁺
2 × 10 ⁴	Peripheral blood	0/3 (0)	0/4 (0)	2/4 (50.0)
	bone marrow	ND	ND	ND
8 × 10 ⁴	Peripheral blood	3/3 (100)	2/3 (66.7)	3/3 (100)
	bone marrow	1/6 (16.7)	3/6 (50.0)	5/6 (83.3)

Twenty thousand and/or 8 × 10⁴ CD34⁺ cells were transplanted into NOD/SCID mice before (control) and after five days of culture in the presence of T/F/3/6/S with (HESS⁺) or without HESS-5 cells (HESS⁻). The ratios indicate the number of engrafted mice/number of transplanted mice. The numbers in the parentheses denote percentages of engrafted mice. ND = not determined.

[参考文献]

1. Kawada H, Ando K, Tsuji T, Shimakura Y, et al. Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. *Exp Hematol* 27 (1999) 904-915.
2. 安藤潔、堀田知光. 造血幹細胞の増幅 ~臨床応用に向けて~. *分子細胞治療* 1 (2000) 383-389.
3. Shimakura Y, Kawada H, Ando K, Sato T, et al. Murine stromal cell line HESS-5 maintains reconstituting ability of ex vivo-generated hematopoietic stem cells from human bone marrow and cytokine-mobilized peripheral blood. *Stem Cells* 18 (2000) 183-189.
4. Ito T, Tajima F, Ogawa M. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 28 (2000) 1269-1273.
5. Tajima F, Sato T, Laver JH, Ogawa M. CD34 expression by murine hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 96 (2000) 1989-1993.
6. Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, et al. Ex vivo generation of CD34⁺ cells from CD34⁺ hematopoietic cells. *Blood* 94 (1999) 4053-4059.
7. Kawada H, Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood*, in press.

非血縁者間骨髄移植における HLA-C抗原の役割

愛知県がんセンター	森島泰雄	尾山 卓
	浜島信之	赤塚美樹
九州大学	笹月健彦	木村 健
中央赤十字血液センター	十字猛夫	赤座達也
東海大学	猪子英俊	
名古屋第1赤十字病院	小寺良尚	

① Effects of HLA-allele matching to other HLA locus matching on the occurrence of severe acute GVHD.

HLA genotype compatibility	Incidence(%) of severe acute GVHD		p
HLA-C	match	mismatch	
HLA-A, B, DR and DQ match	11.8 (561*)	20.6 (156)	0.0047
HLA-A, B, DR, DQ and/or DQ mismatch	20.9 (301)	36.1 (270)	<0.0001
HLA-A	match	mismatch	
HLA-B, C, DR and DQ match	11.8 (561)	24.9 (95)	0.0002
HLA-B, C, DR and/or DQ mismatch	24.4 (480)	33.9 (152)	0.0354
HLA-B	match	mismatch	
HLA-A, C, DR and DQ match	11.8(561)	44.0 (14)	0.0001
HLA-A, C, DR and/or DQ mismatch	24.5(592)	34.1 (121)	0.0338
HLA-DR	match	mismatch	
HLA-A, B and C match	11.4 (602)	19.7 (100)	0.0157
HLA-A, B and/or C mismatch	27.5 (454)	33.8 (132)	0.1614
HLA-DQ	match	mismatch	
HLA-A, B and C match	12.0(595)	15.4 (127)	0.2335
HLA-A, B and/or C mismatch	27.8 (427)	32.0 (159)	0.2383

② Additive effects of HLA-C allele mismatch to other HLA locus mismatch on the occurrence of severe acute GVHD.

Additive mismatch locus	No. of cases analyzed	Incidence (%) of severe acute GVHD	p*
HLA-C mismatch			
none	156	20.6	-
HLA-A	55	34.1	0.045
HLA-B	47	36.2	0.020
DRB1 and/or DQB1	90	30.9	0.042
HLA-A mismatch			
none	95	24.9	-
HLA-B	6	33.4	0.557
DRB1 and/or DQB1	29	21.4	0.688
HLA-B mismatch			
none	14	44.0	-
DRB1 and/or DQB1	12	16.7	0.229

③ Influence of HLA allele mismatch on engraftment failure.

HLA compatibility	No. of cases	Incidence (%) of cases engraftment failure
HLA-A B C DR and DQ match	554	1.7
Class I (HLA-A, B and/or C) mismatch*	369	6.6 0.007
HLA-A and/or B mismatch*	106	4.8 0.226
HLA-C mismatch*	141	4.1 0.085
Class II (HLA-DRB1 and/or DQB1) mismatch*		
Class I mismatch + Class II mismatch	121	5.3 0.134
Class I mismatch	191	7.9 0.009

* other HLA antigens were matched. ** p value compared with HLA-A B C DR and DQ matched cases.
Multivariate analysis : transplanted cell number, CML vs ALL, (p<0.05) HLA class I mismatch vs match.

⑤ Effects of HLA-C allele compatibility on leukemia relapse as assessed by disease and risk of relapse in HLA-A, B, DR and DQ antigen matched cases.

Disease or Risk of relapse	3-year relapse rate (%)		p
	HLA-C match	mismatch	
Acute lymphoblastic leukemia	33.5 (151*)	20.8 (46)	0.193
Acute non-lymphoblastic leukemia	31.1 (150)	20.9 (34)	0.243
Chronic myelocytic leukemia	14.4 (141)	17.1 (42)	0.665
Standard risk	13.3 (218)	11.3 (60)	0.665
High risk	40.3 (224)	30.0 (62)	0.213

* no. of cases analyzed.
Multivariate analysis in acute leukemia cases high risk of relapse (1st CR vs more advanced stage) hazard ratio 3.08 p<0.001
HLA-C (match vs mismatch) P=0.115

④ Influence of HLA allele mismatch to leukemia relapse.

HLA compatibility	No. of cases analyzed	3-year relapse rate	p**
HLA-A B C DR and DQ match	442	26.2	-
HLA-A and/or B mismatch*	94	31.5	0.709
HLA-C mismatch*	122	19.6	0.191
HLA-DRB1 and/or DQB1 mismatch*	118	23.4	0.733

* other HLA antigens were matched.
** p value compared with HLA-A B C DR and DQ matched cases.

⑥ Correlation of leukemia relapse with HLA-C allele incompatibility by the degree of acute GVHD in high risk leukemia cases.

HLA compatibility	No	3-year relapse rate (%)	p**
Cases with grade II-III GVHD			
HLA-A B C DR and DQ match	70	34.9	-
HLA-A and/or B mismatch*	13	71.9	0.334
HLA-C mismatch*	24	6.3	0.035
HLA-DRB1 and/or DQB1 mismatch*	17	29.1	0.845
Cases with grade 0 - I GVHD			
HLA-A B C DR and DQ match	143	43.0	-
HLA-A and/or B mismatch*	27	45.2	0.945
HLA-C mismatch*	32	47.5	0.804
HLA-DRB1 and/or DQB1 mismatch*	44	44.1	0.829

* other HLA antigens were matched.
** p value compared with HLA-A B C DR and DQ matched cases

マイナー抗原および免疫関連遺伝子の解析

日赤中央血液センター
石川善英、赤座達也、十字猛夫

1

TNFα, TNFR2 polymorphismの移植への影響

- HLAと独立に影響する。
- TNFα-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。

2

Polymorphisms in the IL-10 promoter

position	substitution
-1082	G A
-819	C T
-592	C A

3

CD6

	codon				n
	169	197	205		
Com.	Thr	Thr	Arg		68
M1	-	-	Trp		6
M2	-	Met	-		7
M3	-	-	Trp		15

4

BMTにおけるNK受容体の関与

日赤中央血液センター
屋部登志雄、赤座達也、十字猛夫

解析目的

非血縁者間骨髄移植におけるNK細胞の関与を検討する。

計画

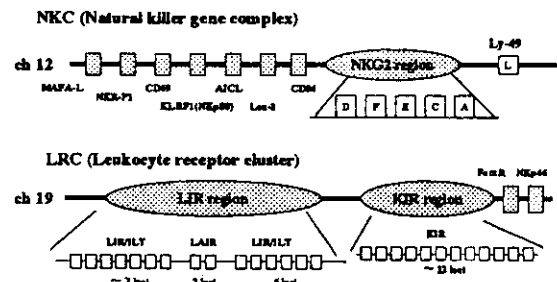
代表的NK受容体のKIRについて移植患者およびドナーの遺伝子型レパートリーを決定し、リガンドHLA型との関係及び移植成績、GVHD発症率、腫瘍の再発率との関係調べる。

予想結果

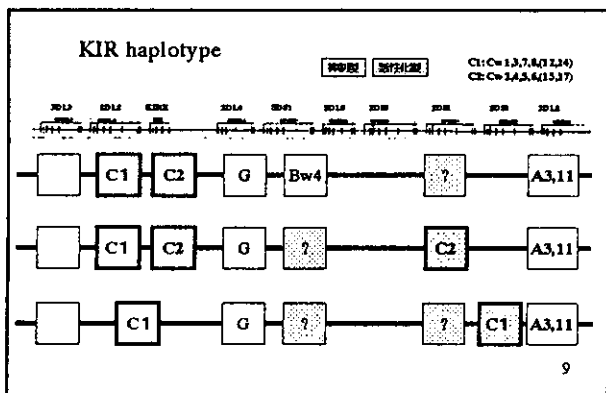
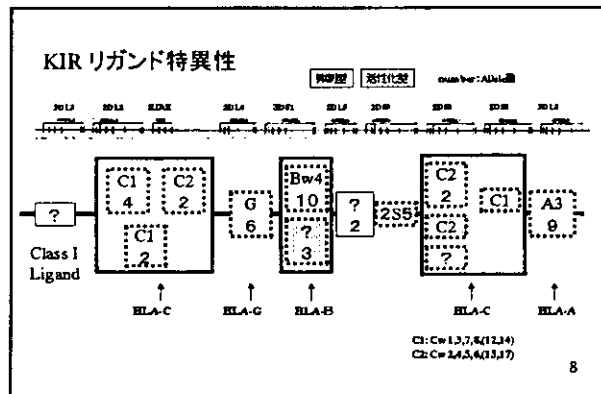
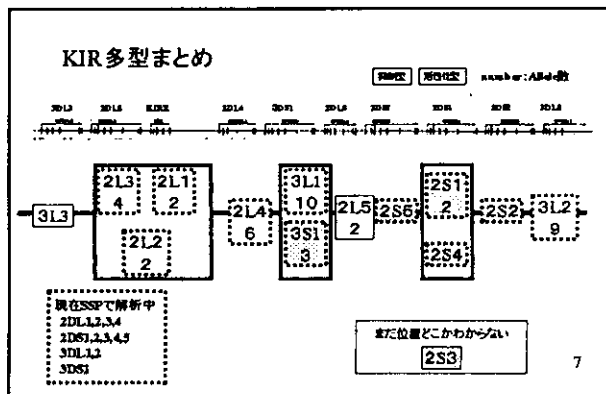
受容体型の一致は移植成績の向上、GVHDの減少をもたらす。不一致はGVL効果による再発率の低下を導く可能性が考えられる。

5

NK受容体遺伝子複合体



6



1. 研究の目的

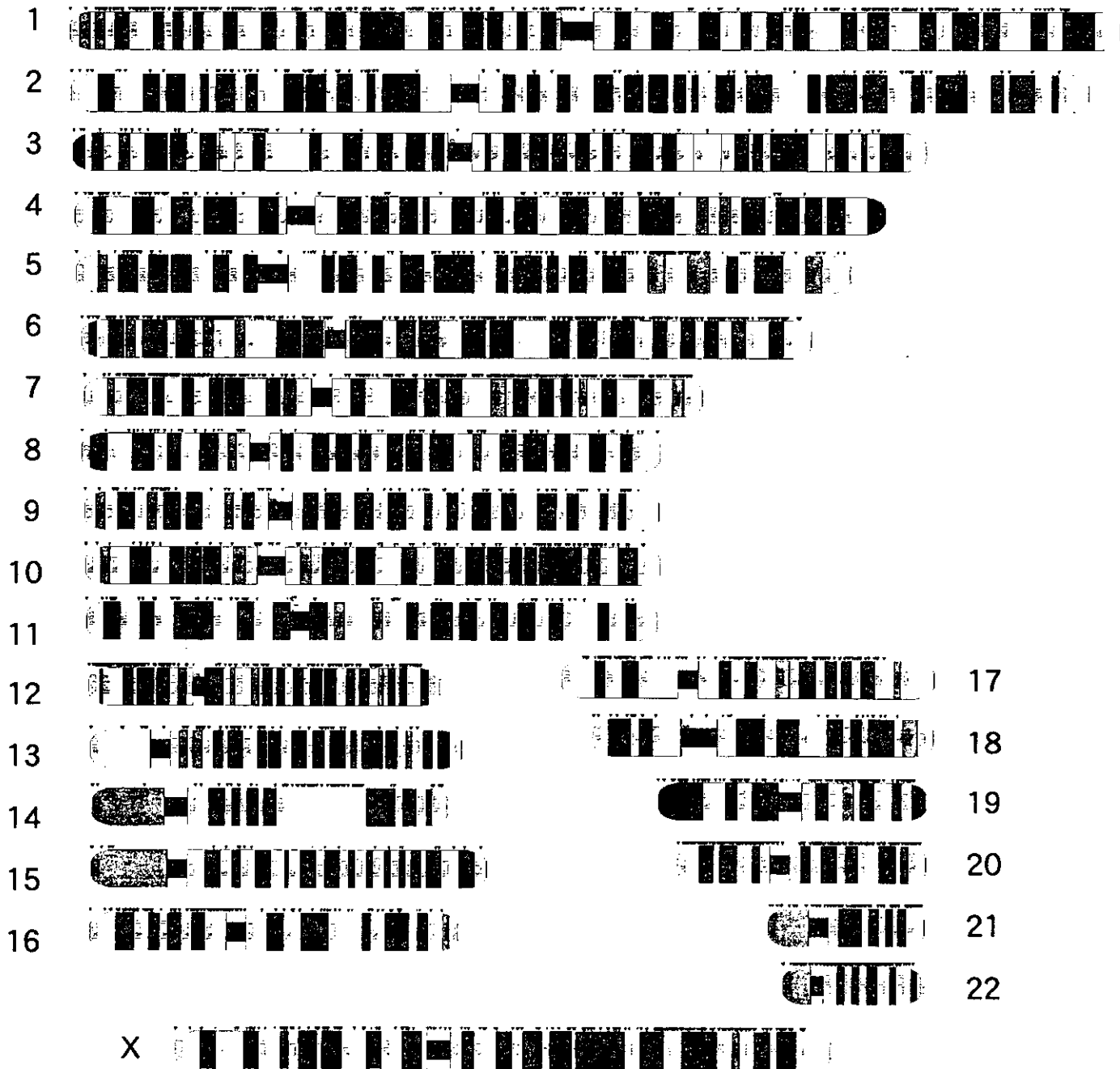
HLA一致の同種骨髄移植におけるGVHD発症の要因として、レシピエントの細胞上に発現しているマイナー組織適合抗原(mHags)の関与が挙げられる。現在までにHA-1~HA-5, H-Yなど、数種のmHagsやその候補抗原が同定されているが、これらのmHagsはHLA、特にクラスI拘束性CTLの標的となることが知られており、すでにHLA-A2, -B7など特定のHLA抗原特異的拘束性CTLクローンも複数樹立されている。しかしながら、mHagsに関する解析は20年以前より行われているにもかかわらず、未知の抗原に対するCTLクローンの同定は容易ではなく、従って従来の造血細胞移植における組織適合性に関しては、HLAとHA-1など限られたマイナー抗原のみが、散発的に調べられているのみであった。そこで本研究は、ゲノムワイドな組織適合遺伝子の探索法として、約30,000個の多型マイクロサテライトを遺伝マーカーとして用いたマッピング法により、ゲノムワイドレベルで骨髄移植の組織適合に関与する遺伝子を系統的に同定することを試みる。

2. 現在までの成果

多型マイクロサテライトをゲノムワイド収集するため、すでに明らかにされているヒトのドラフトゲノム塩基配列より、多型をしめすと期待されるマイクロサテライト、すなわち2塩基繰り返しは繰り返し数10回以上、3~5塩基繰り返しは繰り返し数5回以上のマイクロサテライトをまずを選別した。続いて、100名の日本人健常者DNAをプールしたDNAを用いて、各マイクロサテライトをPCR増幅し、繰り返し回数について多型をしめすものを選択した。このような方法により、現在までに24,000個の多型マイクロサテライトを収集し、それぞれのヒト染色体上での位置を決定することができた(図-裏面)。目標の30,000個の多型マイクロサテライトの収集は、7月頃完了する予定である。現在までに収集した多型マイクロサテライトを用いて、尋常性乾癬について相関解析によるゲノムワイドなマッピングを行ったところ、いくつかのゲノム領域について、感受性候補領域がみいだされており、多型マイクロサテライトの有効性を確認している。

多型マイクロサテライトの収集が完了し、また骨髄移植患者とドナーのDNAが使用可能であれば、直ちに多型マイクロサテライトによるゲノムワイドなマイナー組織適合遺伝子のマッピングを実行したい。すなわち、ドナー、レシピエント間でマイクロサテライト多型に相違がみられた領域を中心に、マイナー組織適合遺伝子の候補領域を約100kb以内に絞り込む。この候補領域内に存在する発現遺伝子について多型解析を行い、多型がみられるマイナー組織適合抗原遺伝子候補を選択する。さらに、骨髄移植後の臨床経過とこれらの候補遺伝子多型との相関を比較することにより、候補領域内に存在する骨髄移植の組織適合に関与する遺伝子を同定する。

新規マイクロサテライトマーカの概要



Ⅲ. 造血細胞移植対象疾患の拡張
11. 膠原病に対する造血幹細胞移植

全身性皮膚硬化症に対する純化 CD34 陽性細胞選択移植

北海道大学大学院医学研究科
分子病態制御学講座(第二内科) 分担研究者 小池隆夫

【はじめに】自己免疫疾患は自己の組織に反応してこれを障害する自己反応性リンパ球や自己抗体によって生じ、その症状は多彩である。その生命予後は一般に良好であるが、多くの症例で恒久的な機能障害や臓器障害が進行し生活の質のレベルに重大な障害をもたらす。本研究は、難治性の自己免疫疾患々々者に対して、超大量免疫抑制療法を行ない、引き続く純化造血幹細胞(CD34 陽性細胞)自家移植による正常な免疫機能の再構築を行い、疾患の進行の抑制ならびに治癒を導くことを目的とする。今回、倫理委員会と判定委員会の承認を得て、2例の全身性皮膚硬化症(SSc)に対し、純化 CD34 陽性細胞選択移植を併用した超大量免疫抑制療法を行った。移植後の経過を含めて報告する。

【対象と方法】症例は、移植適応基準(表1)を満たす57歳の男性(症例1)と19歳の女性(症例2)。末梢血造血幹細胞の動員は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF) 5 μ g/kg/体重/日の投与を4日間行ない、5日目以降のG-CSF投与量は血中CD34陽性細胞濃度に応じて増量した。採取細胞からCD34陽性細胞を純化して凍結保存した。症例1はG-CSF単独、症例2はcyclophosphamide(CY) 2g/m²/日(2日間)+G-CSFで行った。移植前処置はCY 50mg/kg/日(4日間)で行い、Day1から血球回復までG-CSFを投与した。

【結果】CD34陽性細胞の純度と移植細胞数は、95%/2.96 \times 10⁶/kg(症例1)、96%/5.21 \times 10⁶/kg(症例2)、白血球数500/ μ l以上、血小板数5万/ μ l以上に要した日数は、11日/15日(症例1)、9日/21日(症例2)であった。症例1では移植2週目よりサイトメガロウイルス抗原血症が認められ gancyclovir 500mg/日、2週間の投与で沈静化した。症例2では移植後3日目より血球貪食症候群が認められ、prednisolone 2mg/kgの投与で沈静化した。Modified Rodnan total skin thickness score(TSS)は38/51 \rightarrow 26/51(症例1:移植3ヶ月後)26/51 \rightarrow 19/51(症例2:移植1ヶ月後)と改善が認められた。

【考案】2例のSScを対象として純化CD34陽性細胞選択移植を併用した超大量免疫抑制療法を施行した。血球回復は順調でTSSの改善が得られており有効な治療法であると考えられる。一方、移植後合併症として日和見感染、血球貪食症候群などに注意が必要である。造血幹細胞採取法と移植前処置法については、現在一定の見解はなく、移植後のG-CSF使用の可否も含め今後の課題である。

表 1. 移植適応基準

全身性びまん性強皮症で、原則として発症 3 年以内であり、つぎの症状を呈する場合とする

1. 末梢循環不全により皮膚潰瘍をくり返す場合
2. 胸部エックス線検査により肺線維症と診断され、呼吸器感染の合併のない状態で呼吸機能検査によって努力肺活量(FVC)が 80%未満または一酸化炭素拡散能(DLCO)が 70%未満である場合
3. 他の原因によらず血清クレアチニン値が持続的に正常範囲を上回るかまたは 500mg/日以上の尿蛋白が持続する場合
4. 他の原因によらず不整脈、心肥大を呈する場合

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年度第一回研究会議（2001年6月9日）

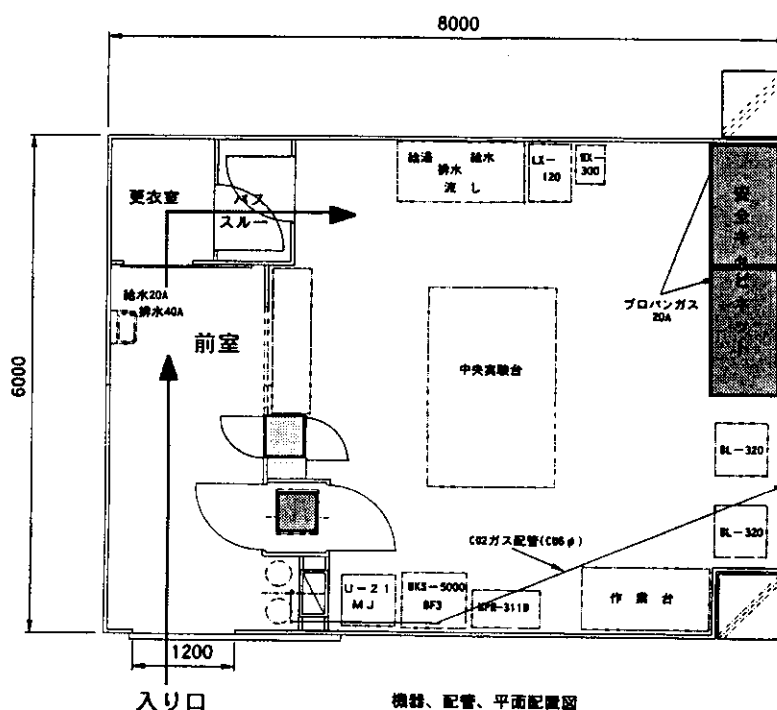
臨床用細胞プロセッシング室の設置と自己骨髄細胞筋注による血管再生療法
自治医科大学輸血・細胞移植部 室井一男、永嶋貴博、山本千鶴、小澤敬也
内科学講座循環器内科 池田宇一、島田和幸

1. 臨床用細胞プロセッシング室

【はじめに】

輸血は細胞療法の一つと考えられ、PL法と医薬品の製造管理及び品質管理規則（GMP, Good Manufacturing Practice)によって血液製剤の安全性は確保されている。一方、代表的な細胞療法である造血幹細胞移植（採取細胞から単核細胞の分離、CD34陽性細胞の培養等）や、他の細胞治療（培養した樹状細胞の投与等）においても、治療用細胞を製造する場合には、GMPに準じる品質の安全性の確保が必要と言われている。現在行われている造血幹細胞移植と、将来予定されているヒト造血幹細胞遺伝子治療のための臨床用細胞プロセッシング室が平成13年2月当部に完成した。この臨床用細胞プロセッシング室は、「クリーンかつ封じ込め」の機能を有していることが特徴である。

【概要】



臨床用細胞プロセッシング室は、前室、更衣室、パススルー、実験室（クラス10000、P2）から成っている。実験室の内部は陽圧で、HEPAフィルターを通過した空気が循環している。パススルーとオートクレーブ室は陰圧で、HEPAフィルターが付いた吸い込み口から空気は吸い込まれ外部へ放出される。内部の空気が、直接外部に漏れない構造となっており、「クリーンかつ封じ込め」の機能を有している。安全キャビネット（クラス100）2台、インキュベータ4台、血液バック専用の遠心機1台、チューブ用遠心機2台、倒立顕微鏡1台、顕微鏡1台、4℃の冷蔵庫1台、-20℃の冷凍庫1台等を備え、現在骨髄血や末梢血からの単核細胞の分離に常時利用している。

2. 自己骨髓細胞筋注による血管再生療法

【症 例】 72歳、男性

【診 断】 閉塞性動脈硬化症

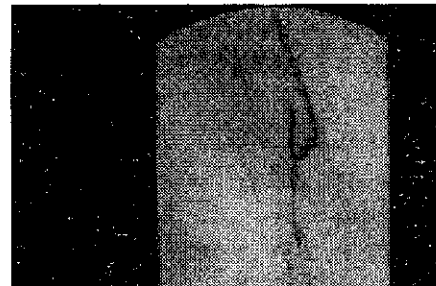
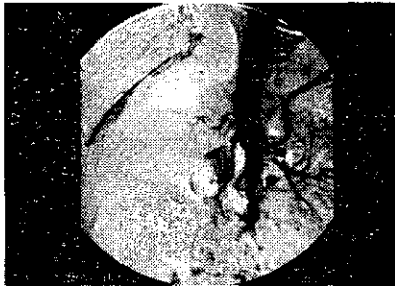
【主 訴】 安静時下肢疼痛

【既往歴】 40年前より糖尿病、1991年脳梗塞左不全片麻痺、1994年右腎梗塞、洞不全症候群でペースメーカー植え込み。

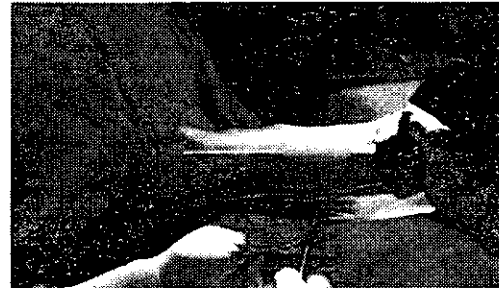
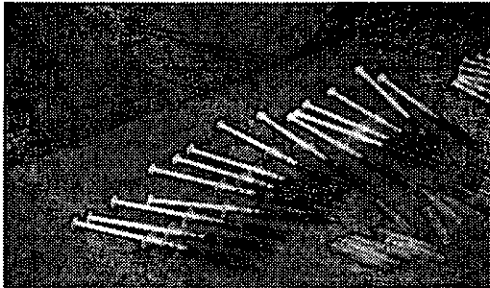
【現病歴】 1994年 100m歩行で両下腿疼痛。右総腸骨動脈の閉塞で大動脈-右外腸骨動脈バイパス、右大腿動脈-右膝窩動脈バイパス術施行。1998年 50mで両下腿疼痛。左右大腿動脈バイパス+左大腿動脈-膝窩動脈バイパス術施行。2000年 左足関節より末梢が壊死し、左膝関節より10cm遠位で切断術施行。右足先端チアノーゼ進行し、12月6日当院入院。

【身体所見】 左膝関節より10cm遠位で切断、右足背浮腫、先端チアノーゼ。両大腿動脈、膝窩動脈、足背動脈触知せず。

【検査所見】 動脈造影では、腹部大動脈は腎動脈分岐部以下が完全に閉塞し（左図）、右下肢では、saphenous veinを介して膝か動脈が淡く造影される（右図）。



【入院後経過】



全身麻酔下に、患者の腸骨から400mlの骨髓血を採取し単核細胞に分離した。得られた 8.6×10^8 個の単核細胞(CD34陽性細胞では、 2.4×10^7 個)を15mlの培養液に浮遊し、1mlの注射器に0.5mlずつ充填し（左図）、患部に筋注した（右図）。

【臨床効果】

	痛み	皮膚温(°C)	経皮的酸素分圧(mmHg)
投与前	10/10	32.5	32
投与2週間後	2/10	34.0	45

【現在までの臨床試験の結果】

症例	年齢	性	診断	骨髓血	単核細胞	CD34陽性細胞	臨床効果
1	72	M	ASO,SSS,DM	400ml	8.6×10^8	2.4×10^7	++
2	38	F	Burger	600ml	15.0×10^8	9.0×10^7	+
3	71	M	ASO,CRF,DM	400ml	14.4×10^8	0.5×10^7	+
4	66	M	ASO,DM	400ml	5.0×10^8	0.14×10^7	ND

【考察】 骨髓細胞中には血管内皮細胞の前駆細胞が存在し、末梢血に動員されたこの前駆細胞は虚血部へ到達し、血管を再生することが報告されている。今回の臨床試験で、自己骨髓細胞を虚血部位へ筋注すると、臨床症状の改善と血流の改善とを認め、虚血部位における血管の再生が示唆された。本療法は比較的安全に行えるため、閉塞性動脈硬化症による虚血に対して有望な治療法である。

強皮症に対する末梢血幹細胞移植の適応

藤田保健衛生大学医学部 リウマチ・感染症内科 深谷 修作
 血液内科 吉田 俊治
 丸山 文夫
 江崎 幸治

強皮症（全身性硬化症）； Systemic Sclerosis

血管病変：内臓肥厚性血管障害

レイノー現象、皮膚潰瘍、悪性高血圧など

線維化病変：皮膚・臓器などに線維化病変を形成する

皮膚硬化、肺線維症、食道病変

浮腫期→硬化期→萎縮期と慢性に不可逆性に進行する
 ADL、QOLの障害が著しい

確立した有効な治療法がない

Severe forms of the disease, and rapidly progressive diff SSs in particular, are associated with a significant mortality (estimated to be 40-50% in 5 years) secondary to pulmonary, cardiac, and renal involvement.

Eligibility-criteria(EBMT/EULAR)

- Rapidly progressive scleroderma (<3 years)
- High risk for further progression / mortality
- No severe irreversible organ damage
- Informed consent and local ethical approval

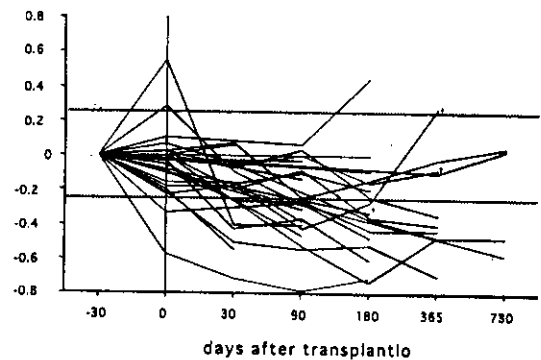
Patients (per September 2000) (EBMT/EULAR)

- 65 patients reported
- 8 mobilised but not transplanted
- 55 autologous PBSCT, 2 BMT
- interim-analysis on 41 patients registered 1996-1999 (*Binks e.a.*)

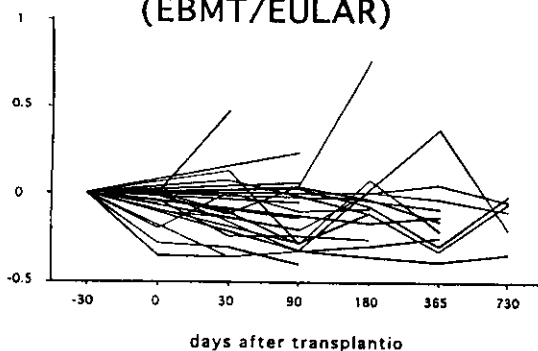
Treatment regimens employed

(EBMT/EULAR)		No. of patients
Priming (n=40)		
CYC + G-CSF		29
CYC alone		1
G-CSF alone		10
Conditioning (n=37)		
CYC 150-200 mg/kg		19
CYC 120 mg/kg + ATG + TBI		9
CYC 200 mg/kg + ATG		4
CYC 200 mg/kg + Campath-1		2
CYC 200 mg/kg + TLI		1
Other chemotherapy		2

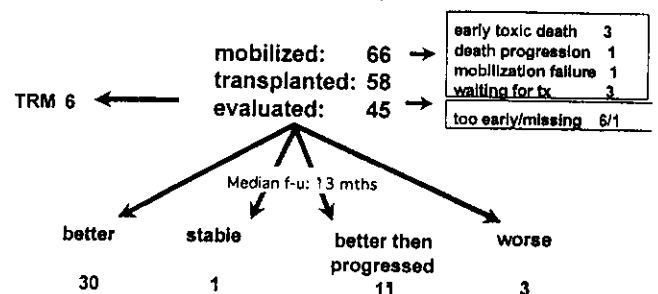
Change in skin score(EBMT/EULAR)



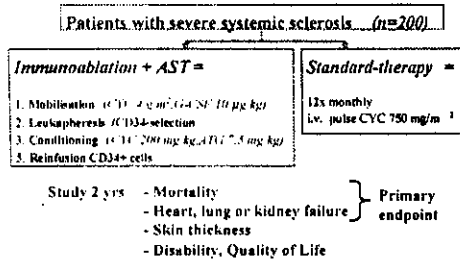
Fractional change in DLco (EBMT/EULAR)



Response SSc (EBMT/EULAR)



'ASTIS'-TRIAL



膠原病合併例疾患別移植法

	同種骨髄	同種末梢血幹細胞	自家	その他	不明
慢性関節リウマチ	2例	・	8(3)例	・	1例 11(3)例
ベーチェット病	2(1)	・	・	1(1)	・ 3(2)
全身性硬化症	1(1)	・	1(1)	・	・ 2(2)
シェーグレン症候群	1	1	・	・	・ 2
計	6(2)	1	9(4)	1(1)	1 18(7)

() : 改善例再掲

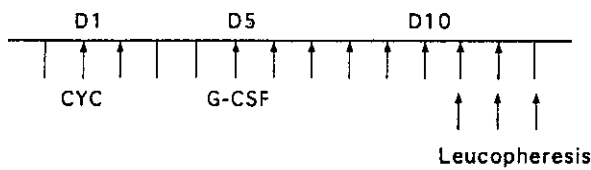
Inclusion criteria

- 年齢 : 16歳~60歳
- SScのACR-criteria を満足する
- 全身型、Rodnan skin score>15、重要臓器病変の存在、最近6ヶ月における急速な進行
 - DLco and/or VC<70%、間質性肺病変の存在
 - 高血圧症 : BP>160/ and/or /110mmHg
持続性検尿異常 (タンパク、血尿、細胞性円柱)、Microangiopathic hemolytic anemia、血清クレアチニが正常上限を超える
 - 可逆性うっ血性心不全、不整脈、頻拍、II度またはIII度の房室ブロック、心膜炎
- インフォームド コンセント

Exclusion criteria

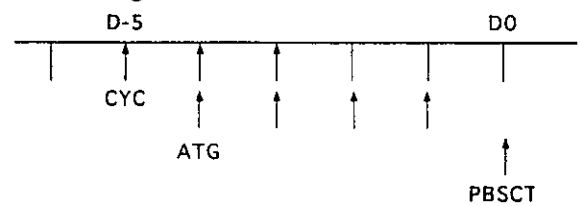
- 妊娠
- Concomitant severe disease
 - 肺動脈圧>50mmHg、DLco<40%
 - クレアチンクリアランス<40ml/min
 - 左室駆出率<45%、抗凝固が必要な慢性の心房細動、コントロールされていない心室性不整脈、心不全に由来する心臓液貯留
 - TransaminaseやBilirubinが正常上限の3倍以上
 - 精神障害
 - 悪性腫瘍、骨髄異形性症候群の存在
 - WBC<4,000/µl、Plts<50,000/µl、Hb<8g/dl、CD4+ T lymphocyte<200/µl
 - コントロールされていない高血圧症
- TLI、TBIまたはシクロフォスファミドを含むアルキル化剤 (経静脈累積5g以上、経口2mg/Kg 3ヶ月以上) の投与歴
- 担当医が不適当と判断したもの

Mobilization



Cyclophosphamid : 2g/m²、2日間
 G-CSF : 5~10 µg/Kg、5日間 (WBC>10,000/µl以上になるまで) +Leucopheresis施行期間
 Leucopheresis : 5×10⁶/Kg
 CD34 selection : +

Conditioning



Cyclophosphamid : 60mg/Kg、3日間
 ATG : 5~10mg/Kg、3~4日間
 G-CSF : 5~10 µg/Kg、D0からWBC>3,000~4,000/µl以上になるまで

(再掲)

2. 平成12年度第二回研究会議

平成14年2月15日(金) 午後1時～午後5時

2月16日(土) 午前9時～12時

会場 東京医科大学教育棟講堂・第一研究教育棟第二講堂

I. 主任研究者挨拶並びに報告

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

II. 厚生労働省挨拶

日下英司 厚生労働省健康局疾病対策課臓器移植対策室臓器移植指導官

III. 分担研究報告

テーマ I. 造血細胞移植から細胞治療へ

1) DLIと細胞治療

- ① 造血細胞移植後再発白血病に対する活性化ドナーCD4輸注療法 163

伊藤仁也 京都大学大学院医学研究科 発達成長医学/感染症細胞治療研究所会

- ② 難治性感染症に対する活性化CD4 T細胞輸注療法 163

森尾友宏 清水則夫 東京医科歯科大学医学部附属病院総合診療部/難治疾患研究所ウイルス感染症学分野

- ③ 同種造血幹細胞移植後の再発に対して活性化CD4リンパ球輸注を施行したAMLの3例 167

加藤剛二 松山孝治 山本興太郎 関根暉彬 名古屋第一赤十字病院小児血液腫瘍科/感染症細胞治療研究会

- ④ マイナー組織適合抗原の不一致と抗白血病効果: CD62Lの不一致と再発率の検討 169

塩原信太郎 金沢大学医学部附属病院 輸血部

- ⑤ 白血病における骨髄中の未分化間葉系幹細胞の分離解析 171

岡田邦彦 恵美宣彦 名古屋大学医学部組織工学/病態内科学

- ⑥ 合成腫瘍ペプチドまたは酸溶出腫瘍抗原でパルスした樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法 172

阿部 崇 古川達雄 成田美和子 高橋益広 新潟大学大学院医歯学総合研究科第一内科/無菌治療部

2) 抗原特異的 ex vivo 培養T細胞による細胞治療の基盤整備と実施

- ① 造血幹細胞移植後の Perforin 陽性リンパ球の動態 174

吉見礼美 小島勢二 名古屋大学大学院医学研究科小児科/成長発達医学

3) 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備

- ① 成人白血病に対するHLA一致同胞ドナーからの同種骨髄移植と同種末梢血幹細胞移植の臨床
第Ⅲ相非盲検無作為割付比較試験 176

原田実根 九州大学大学院医学研究院 病態修復内科

4) 自家造血幹細胞移植の確立と海外ドナーからの移植の推進

- ① 海外ドナーからの移植成績の解析 178

- ② 自家移植に関するアンケート調査の提案 報告文書なし

岡本真一郎 慶應義塾大学医学部 血液内科

5) HLA不適合移植の基盤整備 — 成分移植と母児間移植 —

- ① HLA2,3 抗原不一致血縁者間同種造血幹細胞移植に関する研究 180

峯石 真 国立がんセンター中央病院 内科

- ② 母子間非遺伝母HLA抗原(NIMA)相補的同胞間HLA不一致造血細胞移植に関する
第一次後方視的調査の報告 182

一戸辰夫¹⁾ 内山 卓¹⁾ 玉木茂久²⁾ 丸屋悦子³⁾ 佐治博夫⁴⁾

1) 京都大学大学院医学研究科 血液病態学 2) 山田赤十字病院 内科

3) HLA研究所・京都大学医学部附属病院 輸血部 4) 特定非営利活動法人HLA研究所

- ③ 血清型HLA1抗原ミスマッチ非血縁者間骨髄移植の成績 197

加藤俊一 東海大学医学部小児科/(財)骨髄移植推進財団医療委員会

④ Unmanipulated marrow を用いたHLAミスマッチ移植	199
小川啓恭 大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学	
⑤ 小児科領域に於ける両親をドナーとする造血細胞移植実施例 467 例のまとめ —— 小児造血細胞移植全国集計より ——	201
田中竜平 田淵 健 渡辺 新 矢部晋正 気賀沢寿人 日本小児血液学会造血細胞移植委員会	
⑥ 単一施設におけるマイクロキメリズムを指標としたHLA不一致血縁者間骨髄移植の経験 寺倉精太郎 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	報告文書なし
6) 骨髄・末梢血系造血幹細胞の ex vivo 増幅	

テーマ II. ヒト組織適合抗原の解析と応用

7) HLA-C, E抗原の役割	
① HLA-DNA 抗原と非血縁者間骨髄移植	203
森島泰雄 愛知県がんセンター病院 血液化学療法部	
8) HLA-DNAタイピングの意義の確立	
① 非血縁者間骨髄移植におけるHLAクラスIIマッチングの意義	205
笹月健彦 国立国際医療センター研究所	
9) マイナー抗原の解析	
① 非血縁者間骨髄移植におけるNK受容体の関与：サイトカイン遺伝子多型の移植成績への影響...	206
屋部登志雄 石川善英 東京都赤十字血液センター 技術部研究一課	
10) ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索	
① PCR自動検出機による簡便なHLAクラスI 遺伝子DNAタイピング法の開発	208
成瀬妙子 猪子英俊 東海大学医学部 分子生命科学系	
② HLA-A24 拘束性マイナー抗原を認識するCTLの樹立	210
赤塚美樹 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫部	
11) 膠原病に対する造血細胞移植	
① 難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植療法に関する研究	212
天崎吉晴 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科 分子病態制御学	
② 難治性血管炎及びアミロイドーシスに対する造血細胞移植	報告文書なし
宮村耕一 東北大学大学院医学系研究科 免疫血液病制御学	

造血細胞移植後再発白血病に対する活性化ドナー CD4 輸注療法

京都大学小児科 伊藤 仁也、感染症細胞治療研究会

1. はじめに

ドナーリンパ球輸注療法(DLI)は、移植後再発慢性骨髄性白血病の治療に対してはその効果も確認されすでに標準的治療となりつつあるが、依然 GVHD が致死的になる例が存在する点、CML 慢性期以外は効果が疑問視されていること、ドナーの負担などが問題となっている。我々はこれらの問題点を解決するため、ドナー活性化 CD4 輸注療法を開発し、

すでに当班会議で報告してきた。

今回は、これまで感染症細胞治療研究会を通じ行ってきた多施設による治療研究の結果を後方視的に解析したので報告する。

2. 方法

1996 年 9 月から 2001 年 7 月までに DLI としての活性化リンパ球輸注療法を行った施設に対し、アンケート調査を行った。調査票の回収率は 80%であった。今回の解析の主目的は活性化リンパ球療法の安全性の確認で、その他効果の指標には寛解導入率を調べた。

調査項目は、患者基本情報、移植形態、ドナー情報、投与細胞数、急性副作用、GVHD 骨髄芽球の割合、寛解の有無、転帰とした。回収された 31 例中記載不備の 2 例を除き、29 例の解析を行った。再発予防を目的とした症例では治療効果の解析からは除外したが、副作用の解析には含めた。

3. 対象患者

対象患者の特徴としては表に示すように、通常の DLI では効果が低い急性白血病あるいは慢性白血病においても慢性期以外ということである。また、HLA ミスマッチ例は 29 例中 14 例である。

	AML	ALL	CML	MDS	NHL	Reject
No. of patient	12(3)	10(2)	2	1	1	3(1)
Male/Female	4/8	4/6	2/0	1/0	1/0	1/2
Median age	7Y (2-15)	12Y (10M-37)	16Y (13-19)	54Y	6Y	6Y (1-13)
Stage at DU	CR 1 MRD 2 overt 8	CR 2 MRD 2 overt 6	AP 2 CP 0	leukemia MM合併	CR 1	AA 2 LCH 1
HLA						
6/6	8	3	2	0	0	2
5/6	2	2	0	1	0	1
4/6	2	2	0	0	0	0
3/6	3	3	0	0	1	0

4. 副作用

急性毒性	
発熱	3/29 (10.3%)
頭痛	1/29 (3.4%)
嘔吐	1/29 (3.4%)
呼吸困難	0/29 (0%)
発疹	0/29 (0%)
血小板減少症 (Plt<20,000)	4/23 (17.4%)
好中球減少症 (Neutro<500)	2/23 (8.7%)
間質性肺炎	1/29 (3.4%)
TMA	1/29 (3.4%)

GVHD		
	CD4(23)	Activated T(6)
Acute GVHD		
0	17/23 (73.9%)	5/6 (83.3%)
I	1/23 (4.3%)	0/6 (0%)
II	1/23 (4.3%)	0/6 (0%)
III	4/23 (17.4%)	0/6 (0%)
IV	0/23 (0%)	1/6 (16.7%)
Chronic GVHD		
なし	13/17 (76.5%)	1/2 (50%)
limited	2/17 (11.8%)	0/2 (0%)
extensive	2/17 (11.8%)	1/2 (50%)

5. 寛解導入率

寛解導入率は AML で 36.3%,

ALL で 50%であった。

CML は症例数が少ないが Acute phase であるにもかかわらず、2 例中 1 例が寛解を得た。

拒絶に対しての効果はいずれも自己造血の再開によるドナー細胞の廃絶例であったが、3 例中 2 例がドナー細胞に置き変わった。

Clinical effect			
	寛解導入率	Sever GVHD (>III)	寛解までの期間 (中央値)
AML	4/11 (36.3%)	1/11 (9.1%)	6W (3-15)
ALL	4/8 (50.0%)	2/8 (25.0%)	2.5W (2-3)
CML	1/2 (50.0%)	0/2 (0%)	47W
MDS	0/1 (0%)	1/1 (100%)	—
拒絶*	2/3 (66.7%)	0/3 (0%)	—

* complete chimeraへの誘導

6. 細胞数との関係

投与細胞数と GVL および GVHD の出現率を検討した。

多数回投与の患者では GVHD および GVL が出現した直前の細胞数を採用した。

GVHD と GVL の相関は認められなかった。

投与細胞数と GVL, GVHD			
Infused cell dose (Number of cell/kg)	Case	GVL	GVHD () >III
5 x 10 ⁵ —1 x 10 ⁶	2	1	1(1)
1 x 10 ⁶ —5 x 10 ⁶	2	0	0
5 x 10 ⁶ —1 x 10 ⁷	4	1	1(1)
1 x 10 ⁷ —5 x 10 ⁷	12	6	2(1)
5 x 10 ⁷ —1 x 10 ⁸	4	1	1(1)
>1 x 10 ⁸	5	1	1(1)

GVLを認めた例でGVHDを合併したのは3/11例