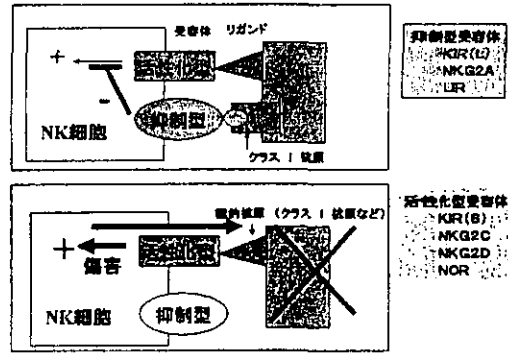


厚生労働科学研究ヒトゲノム、再生医療等研究事業
「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用、
登録と臨床試験体制の確立に関する研究」班
平成15年度第一回研究会開催 平成15年7月12日

NK受容体KIRの移植成績への関与： 活性化型KIR不適合とGVHD発症

東京都赤十字血液センター
屋部登志雄、佐竹正博

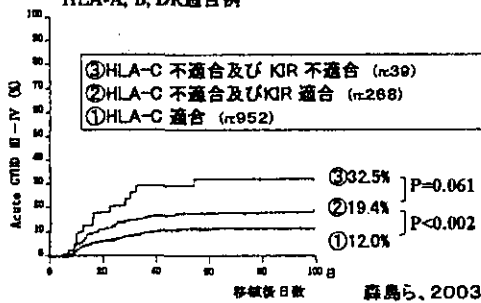
NK細胞の標的認識



KIR エピトープ適合性と急性GVHD(III-IV)

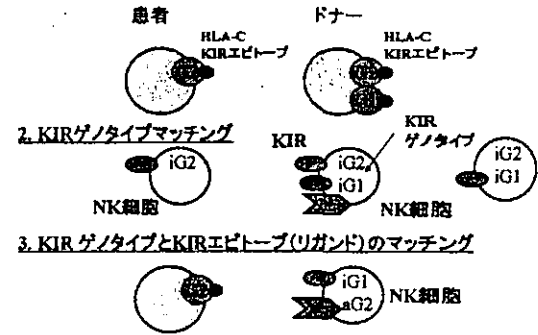
KIR エピトープ不適合:GVHD方向

HLA-A, B, DR適合例



造血幹細胞移植におけるKIR適合性解析法

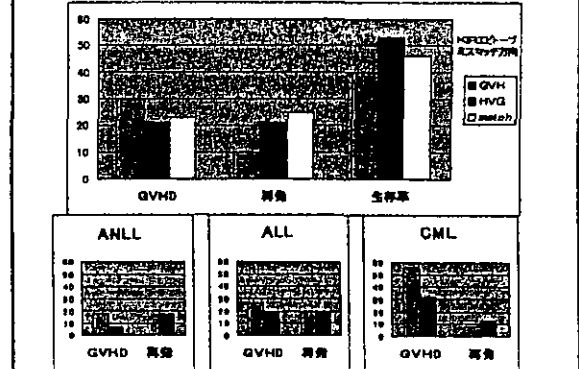
1. KIR エピトープ(リガンド)マッチング

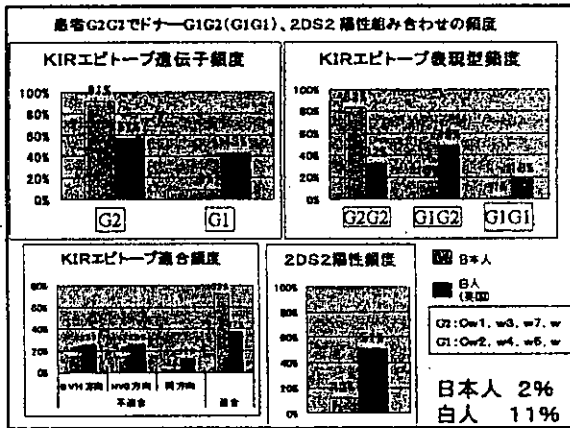
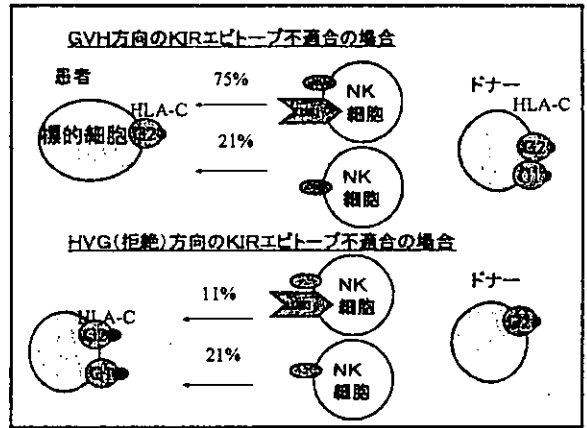
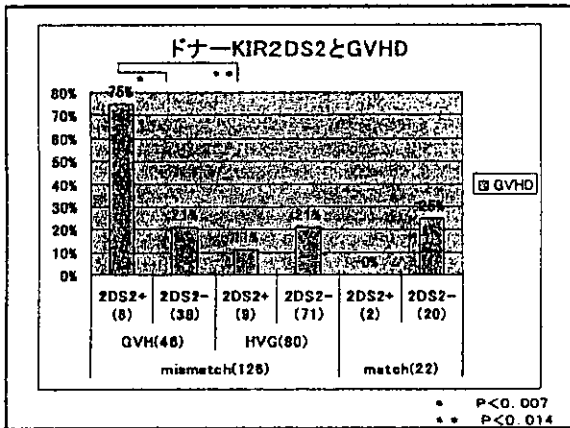
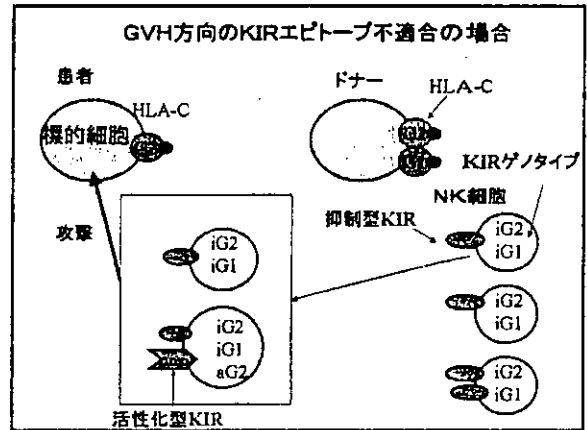
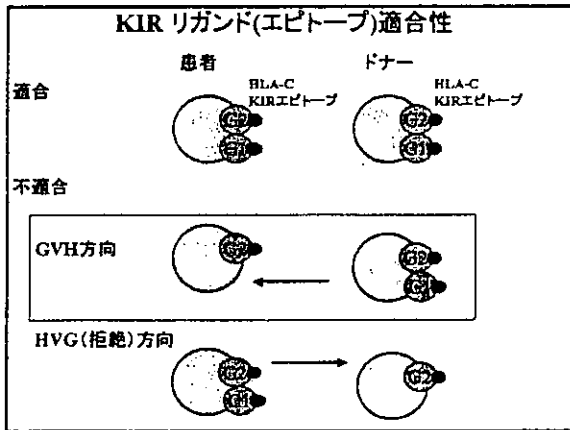


解析189ペア

		ALL 54	NHL 8		
		ANLL 52	SAA 13		
		CML 45	HD 4		
		MDS 13			
KIR エピトープ適合性	患者	ドナー	n	GVHD 再発	生存率
適合	G2G2	G2G2	20		
	G1G2	G1G2	22	22.7%	25.0%
	G1G1	G1G1	0		45.5%
不適合	GVHD 方向				
	G2G2	G1G2	51	29.8%	10.0%
	G1G1	G1G2	2		29.2%
HVG (拒絶) 方向		G1G2	G2G2	86	21.0%
	G1G2	G1G1	4	21.0%	52.9%
相互	G2G2	G1G1	1		
	G1G1	G2G2	3		

KIR エピトープ適合性と成績(189ペア)





まとめ

活性化型KIR2DS2 陽性ドナーとそのリガンドであるKIRエピトープG2陽性患者間では急性GVHD(3-4度)の発症が有意に高いが、これはドナーにG2型抑制型KIRを発現しないNK細胞が存在する組み合わせ(GVH方向KIRエピトープ不適合の場合)でのみ観察された。

このことは抑制型NK受容体が機能しない場合に、活性化型NK受容体とリガンドのHLA抗原の不適合があるとGVHDが発症することを示唆している。

NK細胞のアロ傷害活性はGVHDを引き起こさずにGVL効果をもつと報告されているが、今回の解析から受容体とリガンドの組み合わせによってはGVHD発症を引き起こすことが示唆された。

考察

HLA適合性に加え、KIRエピトープ同士の適合性およびKIR遺伝子型とエピトープ間の適合性を考慮すると急性GVHD発症を軽減できる可能性がある。

平成 15 年度厚生労働科学研究 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
 「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の
 確立に関する研究」班 第一回会議

マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな組織適合遺伝子の検索

東海大学医学部分子生命科学系
 成瀬妙子、猪子 英俊

従来、造血幹細胞移植における組織適合性については、HLA と限られたマイナー抗原が散発的に調べられている。我々は、ゲノムワイドに設定した約 30,000 個の多型マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子多型解析を行い、レシビエントとドナーの多型の差異と、GVHD レベルを統計学的に解析することで、GVHD に関与すると考えられるマイナー組織適合性抗原遺伝子を同定することを目的として、多型一致度の解析を行い、全染色体レベルにおいて組織適合性に関与する遺伝子をすべて系統的に同定することを試みている。

現在までに骨髄バンクを通じて施行された非血縁者間骨髄移植のうち、HLA-A,B,C,DR,DQ 適合の 321 組について解析を行う予定であるが、現在、その中から DNA サンプルの入手が容易であった 100 組について、第 6 染色体 HLA 遺伝子領域内、および第 22 染色体について解析をすすめている。

まず第 6 染色体については、HLA 領域に設定されたマイクロサテライトマーカーを用いて、急性 GVHD とマーカーの一致率を解析した。

ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索

対象

HLA-A,B,C,DR,DQ 適合の非血縁骨髄移植施行例

急性GVHD	
0 度	94組
I 度	116組
II 度	72組
III 度	24組
IV 度	15組
計	321組

HLA遺伝子領域におけるドナー、レシビエントのマイクロサテライト多型の一貫度についての解析

対象

HLA-A,B,C,DR,DQ 適合の非血縁骨髄移植施行例 計100組

急性GVHD	患者性別	患者年齢	疾患名
0 度 26組	男性 43例	1才-50才	ALL 27例
I 度 25組	女性 57例	(平均年齢24.4才)	ANLL 39例
II 度 25組			CML 54例
III 度 17組			
IV 度 8組			

方法

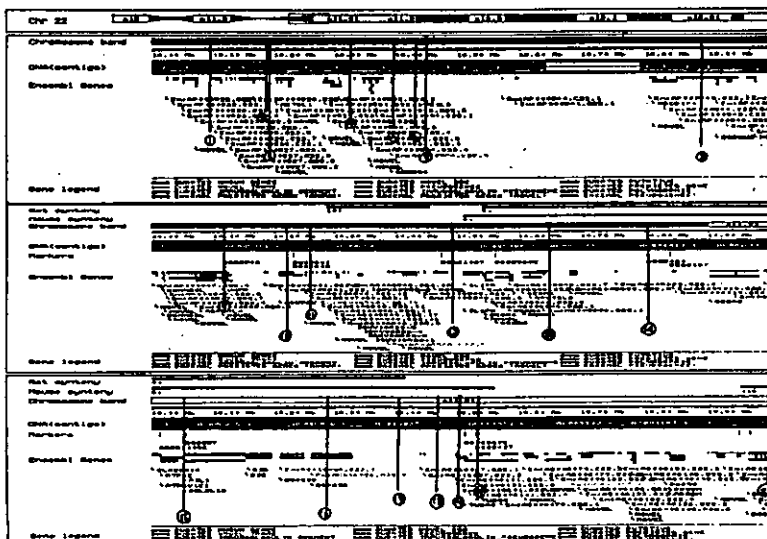
HLA領域に設定された9種のマイクロサテライトマーカーについて多型検索を行い、ドナーとレシビエントの一致度を検索する

HLA遺伝子領域におけるドナー、レシピエントのマイクロサテライト多型の一貫性についての解析

急性GVHD度別マーカー一致率

Marker	AG=0(n=25)	AG=1(n=25)	AG=2(n=25)	AG=3/4(n=25)
DQCAR	24 (96%)	24 (96%)	23 (92%)	25 (100%)
D6S273	14 (56%)	18 (72%)	16 (64%)	16 (64%)
TNFd	18 (72%)	21 (84%)	19 (76%)	16 (64%)
TNFa	17 (68%)	19 (76%)	18 (72%)	19 (76%)
MICA	23 (92%)	24 (96%)	24 (96%)	22 (88%)
MIB	22 (88%)	23 (92%)	21 (84%)	23 (92%)
C1-2-5	19 (76%)	13 (52%)	20 (80%)	18 (72%)
C1-3-1	24 (96%)	23 (92%)	23 (92%)	23 (92%)
G3-2-11	14 (56%)	11 (44%)	8 (32%)	13 (52%)

また、第 22 染色体については、長腕上の 13.0Mb から 15.5Mb の範囲で設定されたマイクロサテライトマーカー 8 種を用いて多型解析を行った。第 22 番染色体には、機能の特定されていない新規遺伝子が多数存在しており、その付近のマイクロサテライトマーカー 4 種(13.0Mb、13.3Mb、14.4Mb、15.0Mb)についての多型解析では、多型一致度と GVHD 発症度との相関は得られなかった。また、15.5Mb 付近のマーカーで、患者と骨髄提供者のマイクロサテライト多型の一貫が多くなるにつれ、GVHD の発症が軽度になる傾向が認められた。しかしながら 15.4Mb 付近のマーカーでは、傾向が異なるため、さらに 15.5Mb からテロメア方向に範囲を拡大し、検討を行っている。



1. はじめに

我々は最近 HLA-A*2402 によって提示されるマイナー抗原エペトープペプチド (ACC-1) を同定し報告した (Akatsuka Y, Nishida T, et al. *J Exp Med.* 197:1489-1500, 2003)。ACC-1 は造血系細胞に特異的に発現する *BCL2A1* の第 19 番目のアミノ酸の多型によって規定され、チロシンの場合に抗原性を有し、システインの場合には抗原性がない。遺伝子の発現パターンから HA-1 マイナー抗原の様に白血病に対する同種造血細胞移植後の養子免疫療法の標的として有望と考えられるが、実際の移植後の GVHD 等の臨床経過に与える影響は不明である。そこで我々は非血縁者間移植を受けた白血病症例中 HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 遺伝子型一致、HLA-A*2402 が陽性の 430 ペアについて、ドナーと患者間の ACC-1 不適合と移植成績の比較解析を行なったので報告する。

2. 方法

骨髄移植推進財団を通じて 1993 年 1 月より 1998 年 4 月までの間に非血縁者間移植を行なわれた 1,090 ペアより小寺班にて集積された DNA 試料のうち上記の条件を満たすペアについて、ACC-1 の遺伝子タイピングを行なった。タイピングには TaqMan PCR による Allelic Discrimination 法を用いた。

3. 結果

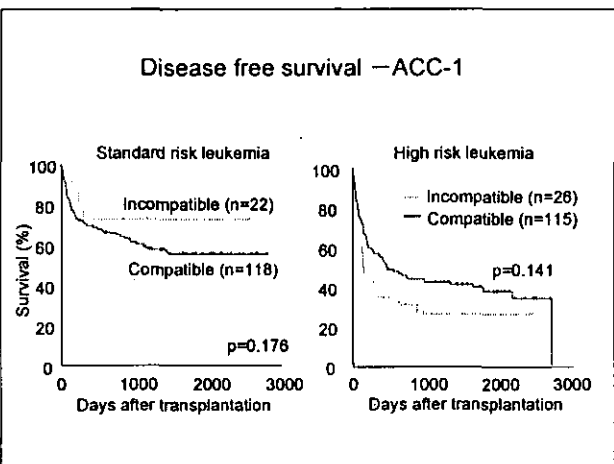
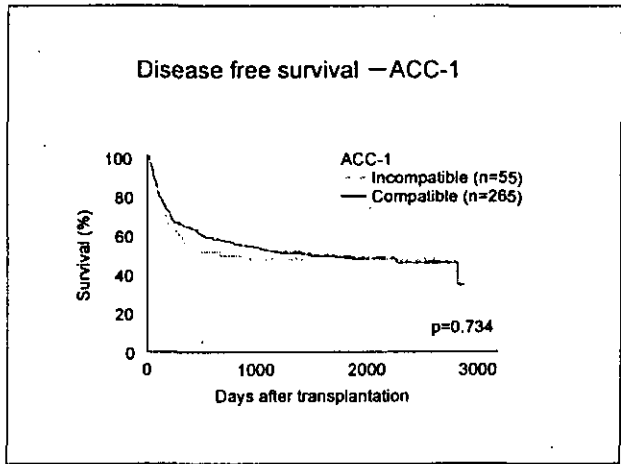
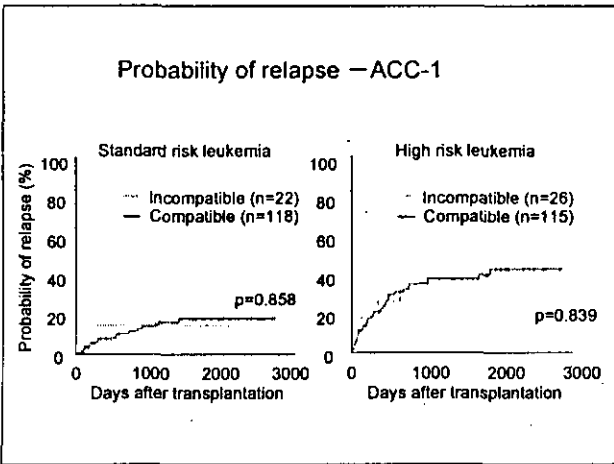
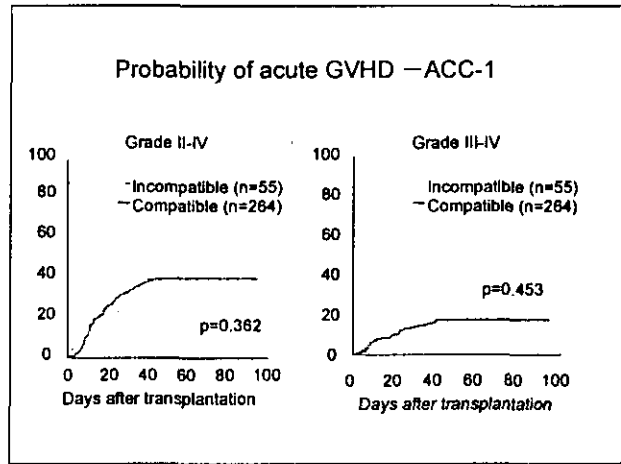
重症急性 GVHD の発症、再発率、無病生存率、生存率とも、患者およびドナーの ACC-1 の不適合による有意差を認めなかった。Standard risk の白血病に対する移植では Kaplan-Meyer 法による無病生存率が不適合群でやや良好な傾向が認められたが、有意差はなかった。また、多変量解析では ACC-1 不適合は予後因子とはならなかった。

4. 考察

多数の臨床研究が施行されている HLA-A*0201 陽性例の同種造血細胞移植後における HA-1 の不適合の影響は、重症急性 GVHD の発症に寄与するとする報告と、関係がないとする報告が半々程度である。今回の研究では、より遺伝的背景は異なるが症例数の豊富な非血縁者間移植における ACC-1 の不適合の影響を検討したが、現在までのところ ACC-1 の不適合が有意に GVHD を増加するという結果は出ていない。また造血系の細胞に特異的に発現する *KIAA0223* 遺伝子にコードされる HA-1 が GVHD の発症の標的となりうることは、患者の抗原提示細胞が多数残存する移植後早期では、たとえ造血系細胞に特異的に発現するマイナー抗原であっても GVHD の標的となる可能性を示唆している。HA-1 を養子免疫療法の標的とした臨床研究が既にライデン大学でなされており、ACC-1 を標的とした養子免疫療法も、投与時期に注意することで（すなわち移植後早期には投与しない）GVHD を惹起することなく抗腫瘍効果を利用することができると考えられる。

Patients Characteristics -ACC-1			
	ACC-1 Compatible	ACC-1 Incompatible	p-value
Total No. of patients	285	55	
Median age (range)	25 (1-50)	26 (7-50)	.404
Gender (donor / patient)			.987
F / F	38 (14%)	8 (15%)	
F / M	59 (22%)	11 (20%)	
M / F	66 (25%)	14 (26%)	
M / M	102 (39%)	22 (40%)	
Disease			.825
Standard risk leukemia*	118 (45%)	22 (40%)	
High risk leukemia*	115 (43%)	26 (47%)	
Others (MDS, NHL)	32 (12%)	7 (13%)	
Preconditioning regimen with TBI	224 (85%)	50 (83%)	.862
GVHD prophylaxis			.274
CyA base	232 (88%)	51 (93%)	
FK base	33 (12%)	4 (7%)	

* : ALL 1st CR, AML 1st CR, CML 1st CP # : more advanced status than standard risk



Multivariate analysis for factors affecting clinical outcome – ACC-1 –

Outcome and factor	Hazard risk (95%CI)	p-value
Grade II-IV acute GVHD		
ACC-1 disparity	0.906 (0.520-1.577)	.726
Relapse		
ACC-1 disparity	1.041 (0.506-2.143)	.914
Risk of leukemia	3.165 (1.781-5.623)	<.001
Disease free survival		
ACC-1 disparity	1.001 (0.648-1.546)	.996
Risk of leukemia	2.127 (1.507-3.002)	<.001
Patient age	1.019 (1.005-1.033)	.006
Donor age	1.026 (1.005-1.047)	.017

HLA-A24 拘束性マイナー組織適合性抗原 (ACC-1) の適合性と GVL/GVH との相関

丸屋悦子¹、赤塚美樹²、一戸辰夫³、西田徹也²、森島泰雄⁴、高橋利忠²、佐治博夫¹

HLA 研究所¹、愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部²、京都大学医学部附属病院

血液腫瘍内科³、愛知県がんセンター病院 血液・細胞治療部⁴

日本人に最も頻度の高い HLA-A*2402 拘束性のマイナー組織適合性抗原 (ACC-1) が赤塚らにより同定され、養子免疫療法への応用の可能性が示唆されている。前回の研究会で ACC-1 の簡便な DNA typing 法とその遺伝子頻度および非血縁間・親子間・同胞間での不適合確率を報告した (裏面に再掲)。今回、HLA-A24 を保有する HLA-identical sibling 間造血幹細胞移植例 (45 例) での、ACC-1 適合性と acute GVHD (\geq grade III) 発症率および再発率との相関を調べた。

解析対象

HLA-A24 を保有する HLA-identical sibling 間造血幹細胞移植で CyA+MTX を GVHD 予防法とした全造血器腫瘍症例 (N=45) を解析対象とした。

解析方法

症例数が 45 例と少ないため、年齢・性別・病期をとわず解析した。統計学的処理は GVH 方向の適合・不適合群で grade III 以上の GVHD 発症率および再発率を比較した。

解析結果

◆ Acute GVHD (\geq grade III) との相関

ACC-1 が GVH 方向適合群 39 例、不適合群 (IC 群) が 6 例あり、acute GVHD (\geq III) の発症率は C 群で 7.7% (3/39)、IC 群で 16.7% (1/6) であった。両群間に有意差はなかった。

◆ GVL 効果との相関

両群での再発率と無病生存率を比較した。

GVH 方向不適合群は 6 症例ではあるが、全例再発は無かった。一方適合群では 39 例中 9 例に再発が見られた。

全造血器腫瘍症例 (N=45)	再発率	無病生存率	a-GVHD (\geq III)
GVH 方向不適合群 (6)	0%	83%	16.7% (1/6)
GVH 方向適合群 (39)	23% (9/39)	69.2%	7.7% (3/39)

骨髄系腫瘍症例 (AML, MDS, CML; N=27)	再発率	無病生存率	a-GVHD (\geq III)
GVH 方向不適合群 (3)	0%	100%	33% (1/3)
GVH 方向適合群 (24)	25% (6/24)	62.5%	4% (1/24)

考察

ACC-1 の GVH 方向不適合群で GVL 効果が得られる傾向がみられた。しかしながら今回の解析では不適合症例数が少なく十分な解析には至らなかった。今後症例を増やし GVL/GVH との相関を解析する必要がある。

平成 15 年 7 月 12 日

ALLELE TYPE	# OBSERVED	ALLELE	ALLELE FREQ.	PHENOTYPE FREQ.	ACC-1 PHENOTYPE
A/A	22	A	0.516	80.2%	ACC-1 (+)
G/G	19	G	0.484	77.1%	
A/G	55	(G/G)		19.8%	ACC-1 (-)
Total	96		1.000		

ACC-1 の遺伝子頻度・表現頻度 (日本人パネル 実測値) n=96

ACC-1 不適合確率

Pair	ACC-1(-) donor versus (+) Recipient
Un-related Pair	0.179 (17.9%) incompatible
Parent/Offspring	0.121 (12.1%) incompatible
Sibling Pair	0.105 (10.5%) incompatible

計算式:

X: allele frequency, Y= incompatibility

- ◆ Unrelated Pair : $Y=X^2(1-X^2)$, (Max: X=0.31, Y=0.249)
- ◆ Parental/ Offspring : $Y=X^2(1-X)$, (Max: X=0.33, Y=0.148)
- ◆ Sibling pair : $Y=X^2(1-X)(3+X)/4$, (Max: X=0.31, Y=0.136)

ACC-1 を標的とするアロ免疫療法は、A*24 の表現頻度を 45.8% とするとき、
 非血縁間で 8.2% の患者さんに、
 親子間で 5.5%、
 同胞間で 4.8% の
 ペアに適用可能である。

ドナー欠損型マイナー抗原UGT2B17の同定およびその臨床的意義に関する検討 名古屋大学大学院 血液内科 村田 誠、寺倉精太郎、恵美宣彦、直江知樹

**ドナー欠損型マイナー抗原UGT2B17の同定
およびその臨床的意義に関する検討**

名古屋大学大学院 血液内科 村田 誠

Introduction

マイナー組織適合性抗原 (mHAg)
・細胞内タンパク由来
・遺伝子多型により患者とドナー間で異なる
・アミノ酸配列を持つ
・MHC上に提示されるペプチド

同種造血幹細胞移植におけるGVHDあるいは
GVLD効果の標的とならう

Molecularly Defined Human mHAg 2003.7.17

Gene	Accession	HLA	Start position	Stop position	Sequence
UGT2B17	AF127188	B*42:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN
UGT2B17	AF127188	A*23:01	148	228	YLLADAVN

CD8⁺ Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Clone PL8

- HLA-1致同能造血幹移植を受けた患者の移植後末梢血単核球から抽出
- 患者EBV-transformed B cells (LCL) に対しては細胞傷害活性を示すが、ドナーEBV-LCLに対しては細胞傷害活性を示さない
- HLA-A29に拘束性を示す
- 白人人種より抽出した24のHLA-A29陽性EBV-LCLのうち、21(88%)に対し細胞傷害活性を示す

cDNA Expression Cloning of mHAg

Recipient EBV-LCL → cDNA → cDNA Library → Plasmid Vector Encoding HLA-A29

HLA-B*42:01 Peptide (YLLADAVN) → COS Cells → Cotransfection of cDNA Pool with HLA-A29 into COS Cells

PL8 CTL Clone

Isolation of cDNA Clones that Confer Antigenicity

Location of the Antigenic Region of UDP Glycosyltransferase 2 Family, Polypeptide B17 (UGT2B17)

Doned cDNA: 298, 393, 2318, 2318

Genebank: UGT2B17 cDNA: 1-2112, 2112-2318

UGT2B17 protein: 1-2112, 2112-2318

Full-length construct (52-1844) (+)

Construct I (52-1515) (+)

Construct II (493-953) (+)

Construct III (493-953) (-)

Antigenic Epitope Recognized by PL8 CTL

VLLADAVN P C G E L L A E L L N I P F L Y

In Vitro Cytotoxicity Assay of Donor LCL
Preactured with Synthetic Peptide

Antigenic Epitope: A E L L N I P F L Y

Antigenic Epitope is Unique Compared with All Other UGT2B Family Members

Members	GI numbers	Homology	Peptides
UGT2B17	47507820	...	AELLNIPFLY
UGT2B15	476758	97.6% (1355/1593)	AELFNIPFLY
UGT2B11	450782	85.9% (1136/1593)	AELLNIPFLY
UGT2B10	450781	85.2% (1358/1593)	AELFNIPFLY
UGT2B7	450784	85.6% (1363/1593)	AELFNIPFLY
UGT2B4	19863940	85.2% (1357/1593)	AELLNIPFLY
UGT2B28	16546679	84.2% (1342/1593)	AALLNIPFLY
UGT2B3P	6979423	87.8% (1565/682)	not available
UGT2B7P	687423	83.6% (1531/683)	not available
UGT2B25P	6974422	82.5% (1539/650)	not available
UGT2B25P	6378421	82.6% (1508/724)	not available
UGT2B23P	6979420	82.3% (1596/724)	not available

Synthetic peptides homologous sequences of other UGT2B17 family members are not recognized by PL8 CTL

Immunogenicity of UGT2B17 Results from Differential Transcription in Recipient versus Donor Cells

Northern Blot Analysis of Total RNA

Cytotoxicity Assay

Absence of UGT2B17 Transcription is Due to a Gene Deletion

UGT2B17 gene (1-2783)

SSP-PCR Primers for exon 1 (a)

SSP-PCR Primers for exon 1 (b)

PCR Primers for 5'-UTR

SSP-PCR for gDNA: Recipient Donor EBV-transformed LCL (LCL #1-4), LCL (LCL #5), LCL (LCL #6)

UGT2B17

GAPDH

UGT2B17 mRNA is Selectively Expressed in the Organs That are Targets for GVHD

Heart, Brain, Pancreas, Lung, Liver, Skeletal muscle, Kidney, Pancreas, Spleen, Thymus, Prostate, Testis, Ovary, Small intestine, Colon

UGT2B17

GAPDH

Recipient Antigen Presenting Cells Stimulate PL8 CTL

SSP-PCR for UGT2B17 RNA

IFN-γ Release Assay

Discussion

- 新規にドナーマイナー抗原UGT2B17はGVHD関連マイナー抗原であることが明らかにされた
UGT2B17欠損ドナーから移植を受けたUGT2B17保有者におけるGVHDの発症性や発症頻度は別々について検討
- 日本人において欠損することが知られている遺伝子

Gene	Deletion Type	Frequency
CYP2A6	CYP2A6*4	~5%
CYP2D6	CYP2D6*5	~5%
GSTM1	GSTM1*1	~52%
GSTT1	GSTT1*1	~38%

患者とドナー間で免疫的寛容なことを証明するマイナー抗原は他にもあるかもしれない

Acknowledgments

Fred Hutchinson Cancer Research Center, WA
University of Washington, WA
Stanley R. Riddell
Edus H. Warren
Marc A. Gavn

Aichi Cancer Center Research Institute
Yoshiki Akatsuka

Nagoya University School of Medicine
Tomoko Nabe
Nobuhiko Emi

CD34+ purified autologous peripheral blood stem cell transplantation for refractory rheumatic diseases

Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

Koji Nagafuji, Mine Harada

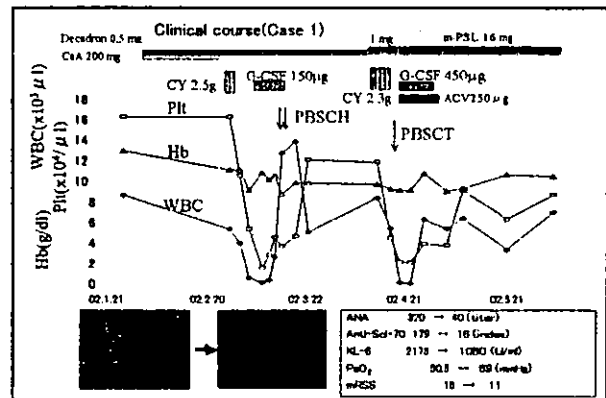
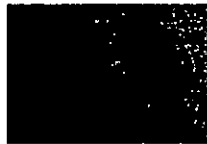
Introduction

Autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) has recently been developed as a potential treatment for refractory rheumatic disease in the light of the evidences such as remission of coincidental rheumatic disease after HSCT for hematological disease and the effect of HSCT for animal models of rheumatic disease. Here we report the results of CD34+ purified autologous peripheral blood stem cell transplantation (auto-PBSCT) against 4 cases with refractory rheumatic diseases.

Case 1

[case1] R.O. 54 y.o. female
[Clinical course until CD34+ purified auto-PBSCT]
She was diagnosed as SLE based on photosensitivity, DLE, positive anti-DNA and positive ANA in 1980. She was also diagnosed as systemic sclerosis due to skin sclerosis, interstitial pneumonia (IP) and positive anti-Scl 70 in 2000.

Since her digital ulcers and IP were not responded to conventional intravenous cyclophosphamide, she received CD34+ purified auto-PBSCT in Feb. 2002.



Summary of 4 cases with SSc

	case1	case2	case3	case4 (day 30)
age/sex	64/F	55/M	68/M	54/F
Complications	Digital ulcer/IP	IP	IP	IP
CD34+	4.14%	4.72%	0.74%	0.13/011%
Yields of CD34+	20.8x10 ⁶ /kg	5.7x10 ⁶ /kg	2.2x10 ⁶ /kg	1.60±0.49x10 ⁶ /kg
purity/recovery	89.3%/68.5%	99.2%/64.0%	84.7%/82.3%	85.4%/112.1%
Infused CD34 cells	8.4x10 ⁶ /kg	4.9x10 ⁶ /kg	2.2x10 ⁶ /kg	2.1x10 ⁶ /kg
Neut>500/μl	Day 9	Day 9	Day 10	Day 11
Plt>5x10 ⁴ /μl	Day 20	Day 10	Day 12	Day 16
Skin score	16→11	15→7	32→17	30→11
ANA(titer)	320→40	40→40	40→0	640→640
Anti-Scl-70	179→16	54→20	(-)	120→74
KL-6 (U/ml)	2175→1080	2650→813	1171→1059	955→890
Post-transplant	CMV emia	(-)	CMV emia	CMV emia
Complication	ADV cystitis			

Case 2

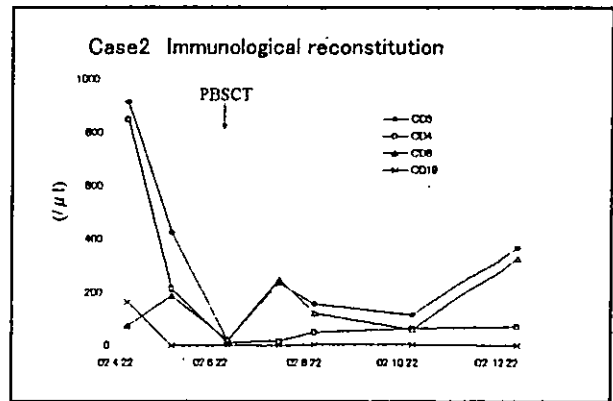
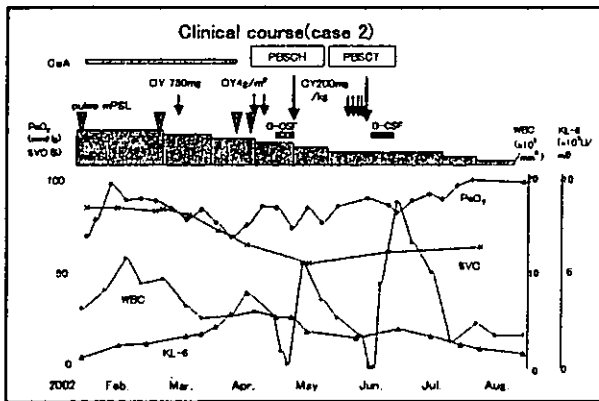
[Case 2] R.M. 54y.O. female

[Clinical course until CD34+ purified auto-PBSCT]

The patient was admitted to our hospital due to fever and skin rash and was diagnosed as amyopathic dermatomyositis (ADM) based on the typical skin rash and interstitial pneumonia (IP) in Jan. 2002.

Since her IP was progressive and refractory to conventional therapy with corticosteroids and immunosuppressants, she received CD34+ auto-PBSCT in Apr. 2002.





Summary of a case with ADM

case		
age/sex	54/F	
Complications	IP	4/10/02
%CD34+	0.72%	Before
Yields of CD34+ purity/recovery	4.9x10 ⁶ /kg 89.1%/70.6%	Mobilization
Infused CD34 cells	4.8x10 ⁶ /kg	
Neut>500/ml	Day 8	
Plt>5x10 ⁴ /ml	Day 10	
ANA(titer)	(-)	9/27/02
PaO ₂ (mmHg)	88.2-93	Post
KL-6(U/ml)	3769-940	Transplant
Complication	CMVantigenemia Listeriae	day 112

- ### Conclusion
1. CD34+purified auto-PBSCT was feasible for refractory rheumatic diseases.
 2. CD34+purified auto-PBSCT improved the skin sclerosis of SSc and the progressive IP of ADM.
 3. The optimal conditioning regimen should be established by large-scale randomized studies.
 4. The anti-viral therapy was necessary for the severe immunodeficient states by T cell depletion.

- ### Discussion
1. CD34+purified auto-PBSCT was feasible for refractory rheumatic diseases.
 2. CD34+cells were highly purified by CliniMACS.
 3. The optimum conditioning regimen should be established by large-scale randomized studies.
 4. The anti-viral therapy was necessary for the severe immunodeficient state by T cell depletion.

Conclusion

CD34+ purified auto-PBSCT is feasible and effective for refractory rheumatic diseases.

厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究」
班 主任研究者 小寺良尚

平成 15 年度第一回研究班会議

日時:平成 15 年 7 月 12 日(土)

場所:名古屋第一赤十字病院古川講堂

同種末梢血幹細胞至適採取時期決定における末梢血 circulating immature cell count の有効性に関する検討

愛媛県立中央病院 血液内科

小塚輝彦 原 雅道

岡山大学病院 輸血部

池田和真 久保西四郎 吉田親正

岡山大学病院 血液・腫瘍・呼吸器内科

品川克至 藤井伸治 豊嶋崇徳 石丸文彦 谷本光音

【緒言】末梢血幹細胞移植術を安全に行う為には十分量の末梢血幹細胞(PBSC)を採取する必要がある。我々は既に自己 PBSC 至適採取時期の決定における末梢血 circulating immature cell (CIC) count の有効性について報告している(Transfusion 42:1514, 2002)。今回我々は、同種 PBSC 至適採取時期の決定における末梢血 CIC count の有効性について検討した。

【対象・方法】1995 年から 2002 年の間に当科で G-CSF を併用して PBSC を採取した健常人ドナー 57 例(男性 27 例、女性 30 例)を対象とした。採取当日の末梢血 CIC、WBC、CD34 陽性細胞数等と採取 CD34 陽性細胞数との関連を retrospective に検討した。統計学的解析には Pearson's rank correlation analysis 等を用いた。

【結果】対象症例の年齢中央値は 39 歳で、apheresis 回数は計 123 回であった。採取当日の末梢血 CIC($\times 10^9/L$)は採取 CD34 陽性細胞数($\times 10^6/L$)と弱い相関を示した($r=0.338$, $p=0.0001$)。必要採取 CD34 陽性細胞数を $20 \times 10^6/L$ と設定した場合、末梢血 CIC count の cut off 値を $1.7 \times 10^9/L$ とすると sensitivity 64.7%、specificity 77.5%であった。

【結語】同種 PBSC 至適採取時期の決定において末梢血 CIC count は比較的有効な指標であると考えられた。

厚生労働省科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「骨髄などを利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床研究体制の確立に関する研究」班

平成 15 年度第一回研究会議 平成 15 年 7 月 12 日名古屋第一赤十字病院
同種末梢血採取における適正な採取量に関する研究

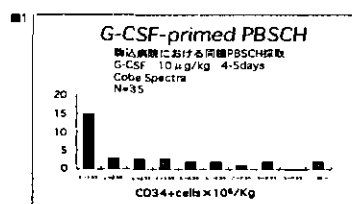
班員 都立駒込病院 造血細胞移植チーム 坂巻壽、比留間潔、奥山美樹、酒井美和

目的：2000 年 4 月の同種末梢血の保険収載以来、我が国での同種末梢血移植は、急速に増加し、瞬く間に骨髄移植を凌駕している。同種末梢血採取では欧米で少なからぬドナーの死亡事故も報告されており、全身麻酔を行わない末梢血採取が必ずしも安全とは言えない。どの位の

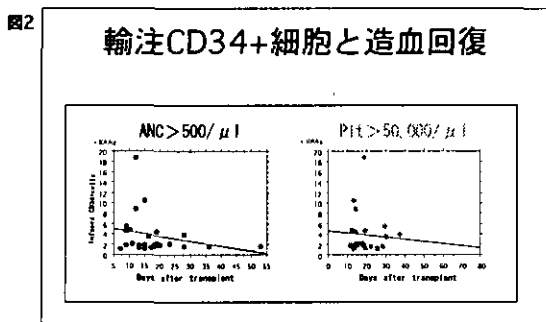
表1

G-CSF-primed PBSCH 駒込病院における同種PBSCH採取 G-CSF 10μg/kg 4-5days Cobe Spectra N=35	
Product	170.0±24.1 ml
MNC	3.91±1.71 ×10 ¹⁰
MNC/Kg	6.76±3.20 ×10 ⁸ /Kg
CD3+cells	1.50±0.51 ×10 ¹⁰
CD3+cells/kg	2.57±1.07 ×10 ⁹ /Kg
CD34+cells	2.46±2.31 ×10 ⁶
CD34+cells/kg	4.18±3.87 ×10 ⁶ /Kg

細胞数を採取するのが、患者にとってもドナーの安全の面からも良いのかの基準が現時点では明確になっておらず、単施設での解析を

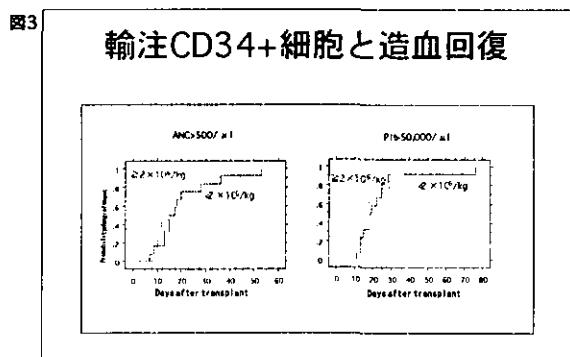


行った。方法：都立駒込病院で行った同種末梢血採取 35 例を retrospective に解析した。G-CSF は 10 μg/kg を 4-5 日間皮下注射し、Cobe Spectra を用いて 100ml-200ml/kg を処理し



て採取した。採取細胞の一部は直ちに CD34, CD3, GM-CSF の測定を行った。結果：単核球数としては $6.76 \pm 3.20 \times 10^8/\text{kg}$ 、CD34+細胞として $4.18 \pm 3.87 \times 10^6/\text{kg}$ の採取が出来た（表 1）。3 日間採取したケースは無く、2 日間採取したのは 10 例、残り 25 例は 1 日で採取が終了した。しかし、採取量の個体差は大きく中央値で $2.36 \times$

$10^8/\text{kg}$ （範囲 $1.21 \sim 18.92 \times 10^8/\text{kg}$ ）であり（図 1）、 $2 \times 10^8/\text{kg}$ 以下のドナーも 15 例存在した。図 2 に示すように、輸注した CD34+細胞数と好中球数 $\geq 5000/\mu\text{l}$ 及び血小板数 $\geq 50000/\mu\text{l}$ との相関では、好中球の回復とに弱い相関が認められた（ $R=0.242$ ）。輸注された CD34+細胞数 $2 \times 10^8/\text{kg}$ 以上と $2 \times 10^8/\text{kg}$ 未満で好中球と血小板の回復速度



に有意差を認めなかった（図 3）。考案：G-CSF 動員による末梢血幹細胞採取では、その採取できる細胞数に個体差が大きい。造血の回復と輸注した CD34+細胞には弱い相関が認められたが、造血の回復速度には差が認められなかった。この結果は 1 施設の少数例の結果であり、今後は移植成績との相関も検討しながら、多施設による多数例での解析が急務である。

平成15年度
厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「骨髄などを利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究」班 班会議

自家造血幹細胞移植と
海外ドナーバンクの適正使用に関する提案

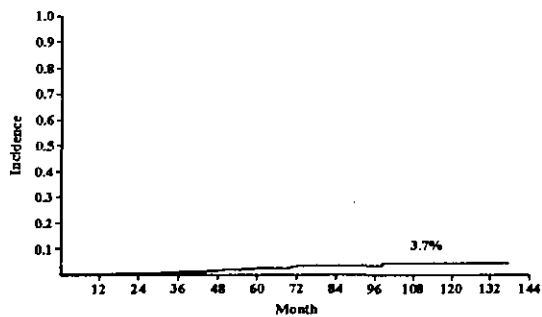
慶應義塾大学医学部血液内科
岡本 真一郎

Secondary Malignancies After Autologous SCT (N=4771)

- Incidence 101 cases 2.08%
- Median time to develop malignancies 38.8M
- Diagnosis of malignancies

Acute myeloid leukemia	23
Myelodysplasia	40
Lymphoma (including ATL)	6
Solid tumors	32

Cumulative Incidence of AML/MDS/MPD After Autologous SCT in Adults



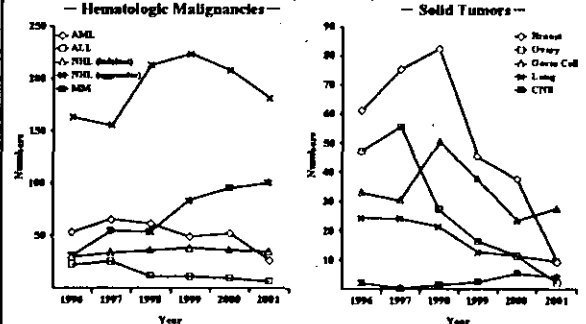
Risk Factors for Developing Secondary MDS/AML After Autologous SCT — Univariate Analysis —

Variables	P values
Age ($15 \leq < 30$, $30 \leq < 45$, $45 \leq$)	0.042
Underlying diseases (lymphoma vs others)	0.041
Source of stem cells (PBSCT vs BMT)	0.011
Time from diagnosis to SCT ($2Y \leq$ vs $2Y <$)	0.001
Time to platelet 50K ($1M \leq$ vs $1M <$)	0.031

Risk Factors for Developing Secondary MDS/AML After Autologous SCT — Univariate Analysis —

Variables	P values
Disease status at transplant (CR vs Not in CR)	0.121
Use of alkylating agents ($3 \leq$) for conditioning	0.671
Use of TBI for conditioning	0.4463
Use of VP-16 for conditioning	0.621
Purging (Yes vs No)	0.462
No of CD34 ⁺ cells infused ($2 \times 10^6 <$ vs $2 \times 10^6 \leq$)	0.071

Numbers of Autologous Transplants per Year (Adults)



Retrospective study for Secondary MDS/AML after Auto SCT

(Proposal)

- To determine the incidence of secondary MDS/AML after high-dose therapy and autologous PBSCT
- Patients with lymphoma, leukemia, and myeloma who received high-dose therapy and autologous PBSCT from 1991 through 2001, and followed without further treatment for underlying diseases

Retrospective study for Secondary MDS/AML after Auto SCT

(Proposal)

- Data will be collected on :
 1. Pretransplant treatment (radiotherapy, alkylating agent dose score : AAD, topoisomerase inhibitor dose score : TID, use of G-CSF)
 2. PBSCs collection (chemotherapeutic agents and cytokines for mobilization, timing of collection)
 3. Current status of hematopoiesis (blood cell counts and karyotypes if available)

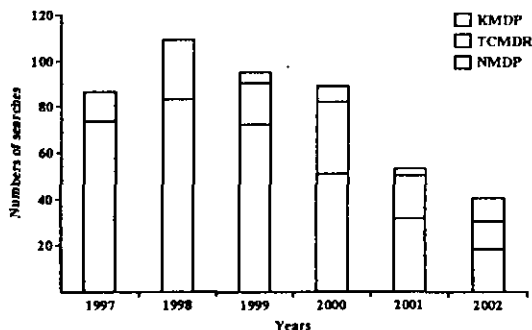
Unrelated SCT using Oversea Donors -Summary-

- The transplant outcome is comparable to the transplants using JMDP donors
- Selection of oversea donors based on HLA allele disparity is recommended
- GVHD prophylaxis using tacrolimus is recommended

Unrelated SCT using Oversea Donors -Summary-

- The transplant outcome is comparable to the transplants using JMDP donors
- Selection of oversea donors based on HLA allele disparity is recommended
- GVHD prophylaxis using tacrolimus is recommended

Numbers of Formal Searches



平成15年度厚生労働科学研究ヒトゲノム、再生医療等研究事業

「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用、登録と臨床試験体制の確立に関する研究」(主任研究者:小寺良尚)班

分担研究課題

非血縁者間造血幹細胞移植と骨髄バンクの効率的運用に関する研究

分担研究者
小寺良尚
研究協力者

宮村耕一、北折健次郎、笠井雅信、大庭拓、稲本賢弘、磯塚八千代、辻村朱音、徳永正浩、名古屋第一赤十字病院内科

平成15年7月12日 於 名古屋

非血縁者間造血幹細胞移植

非血縁者間骨髄移植

新鮮骨髄
一時凍結骨髄

非血縁者間末梢血幹細胞移植

(非血縁者間臍帯血移植)

非血縁者間DLI

従来型
ex vivo操作

---: 研究課題、(): 他班

非血縁者間造血幹細胞移植の需要予測

登録年齢原則0~50歳としての、JMDFにおける年間新規登録患者数
:1,500名(年間実施例数:750例、供給率:50%)、150名/5歳区切り
(この数字は昨年実績であり、既に臍帯血移植、HLA不適合移植、グリベック等の影響は相殺されていると考えられる)

白血病年間発生:0~50歳:3/100,000、50~60歳:6/100,000
登録年齢65歳までが“常態”となると、50~65歳の年間新規登録患者
:150人X3区切りX2倍発生率=900人

骨髄異形性症候群:~50歳のMDS 4人に対し50~65歳は15人
(Wintrobe, 第9版, 1991)

従って50~65歳では現在の4倍の需要、JMDFのMDSに対する移植実績
:70例/年、70例X50%供給率X4=560人

即ち、非血縁者間造血幹細胞移植(主として骨髄移植)の需要は、対象年齢上限
65歳が“常態”になると、900人+560人=1,460人/年増加すると
推測される。

非血縁者間造血幹細胞移植の需要(まとめ)

1,500人(現行)+1,460人(50~65歳)=約 3,000人/年
2002年青髄バンク移植実績:739人
さい帯血バンクネットワーク移植実績:296人、計 1,034人/年

需要の残り2/3を満たすために、

1. 骨髄バンクにおけるドナープールサイズ(現在170,000人)の拡大と患者登録~移植実施期間の短縮(一次検査DNAタイピング化、日程調整のための凍結保存)、末梢血幹細胞採取法の導入
2. 保存臍帯血数(現在約20,000)の拡大
3. HLA Class-Ⅱ一重不適合非血縁ドナーの利用
4. 母児間免疫寛容ドナーの利用
5. CD34+細胞移植
6. 自家造血幹細胞移植

DLIの需要

1. 非血縁者間骨髄移植初期の500例の死因の検討より、
生着不全:13例、拒絶:7例、再発:61例、計81例
を従来型DLIの適応とすると、81/500例=16.2%、
更に活性化CD4細胞によるDLIが難治感染症をも
対象としようと考え、IP:48例、敗血症:38例を
加えて、計167/500例=33.4%が潜在需要と考えられる。

2. 単一施設397例の同種造血幹細胞移植(血縁+非血縁)中、
DLI(従来型+活性化CD4)実施例:28例(7.0%)、
DLI未実施再発:23例、未実施拒絶:14例、
未実施ウイルス感染症死:12例、計49例(12.3%)
総計77/397例=19.3%が潜在需要と考えられる。

DLIの需要(まとめ)

造血幹細胞移植実施例数の15~30%推定される。

DLI(特に非血縁者間造血幹細胞移植において)の
需要を満たすために、

従来型DLI:

- 1) 実施施設から採取施設への費用支払いに関する取り決め
- 2) DLIドナーの保護
- 3) 一時凍結保存

活性化CD4によるDLI:

- 1) 血縁者間における臨床試験(再発並びに感染症)の実施と評価
- 2) 幹細胞採取時に採取したリンパ球は利用できるか、又そのレギュレーション
- 3) 非血縁者間DLIは再発等に対する緊急必要性から保護適用された。
活性化CD4細胞によるDLIもそれに準じた取り扱いが出来ないか。
ドナーの負担は従来型と比べはるかに少なく、又幹細胞採取時に提供
していただければ効率は極めて良くなる。その新にはレギュレーションが
必要。

同種末梢血幹細胞移植の、非血縁ドナーへの適用のために

血縁ドナーの安全性に関する情報

日本造血細胞移植学会同種末梢血幹細胞ドナー
フォローアップ事業レベル-Iのデータより

登録数およびドナー短期調査票回収数

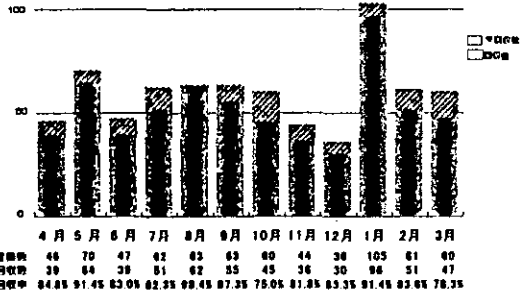
(平成12年度)



(平成15年6月30日現在)

登録数およびドナー短期調査票回収数

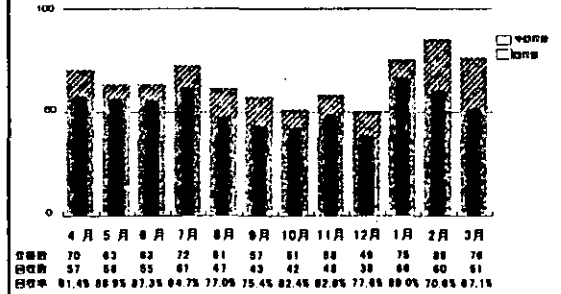
(平成13年度)



(平成15年6月30日現在)

登録数およびドナー短期調査票回収数

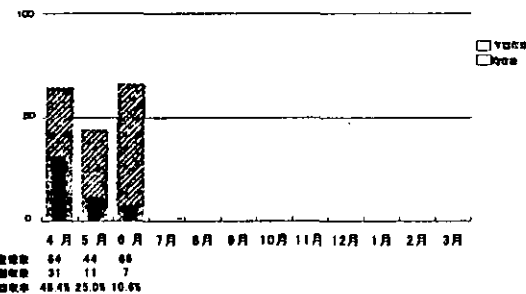
(平成14年度)



(平成15年6月30日現在)

登録数およびドナー短期調査票回収数

(平成15年度)



(平成15年6月30日現在)

同種末梢血幹細胞血縁ドナーにおける安全性に関わる情報
(2003. 6. 30現在)

1. 短期重篤有害事象: 36報告 / 2354総登録 = 1.5%
(採取後3週目のクモ膜下出血並びに一年目の長期フォローアップ報告で判明した採取後2週目の深部肺膿瘍を含む)
2. 中、長期軽微有害事象: 4報告 / 1,088回収(1. 2. 3年目) = 0.4%
(骨髄増殖性疾患、急性白血病、乳がん、肺がん、各1例)

当班としての本課題に対する今後の研究方針

1. 本課題に関する学会発表への協力
2. 骨髄バンクドナーとの安全性比較に関するJMDFの作業への協力
3. 海外安全情報の収集
4. 重篤事例を対象とした、本法との因果関係の解明
5. バンクドナーへの適用を想定したシステム改変に関する検討(JMDFを補佐する立場より)

厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と
臨床試験体制の確立に関する研究」班
平成15年度第一回班会議

骨髄バンクを介して行われた
ドナーリンパ球輸注の成績

JMDP医療委員会
堀部敬三、加藤俊一、笠井正晴、岡本真一郎、権藤久司、
坂巻 壽、高橋 聡、平岡 隆、宮村耕一、土田昌宏(委員長)

2003年7月12日

JMDPにおけるDLIの申請および実施件数

2003年7月4日現在

BLPDに対するDLI 1994年7月～1999年7月	実施	11件
適応拡大後 2000年1月～2003年7月	申請 審査・調整中 中止 実施	133件 3件 65件 65件

中止理由

実施日決定前	59件
審査判定不可	13件
ドナーの都合	8件
患者死亡	1件
患者の都合	24件
不明	13件
実施日決定後	6件
血管確保困難	1件
患者死亡	2件
患者の都合	2件
不明	1件

適応拡大後実施例の疾患内訳

成分	全血	輸注中止
BLPD	2例	
CML	19例	1例(移植片拒絶)
AML	20例	
ALL	11例	
MDS	5例	
ATL	1例	1例(FK中止でCR)
ML	1例	
MM	1例	
混合キメラ	1例	2例
麻痺	1例	
計	59例	6例

BLPD

年	原疾患	年齢/性	ATG	発症日 (day)	実施日 (day)	輸注 回数	DLI後 GVHD	効果	転帰
1994	CML	28/M	?	120				輸注中止	当日死亡
1995	CML	31/M	+	80	160(16)	1	-	有効	死亡(360)
1996	WAS	1/M	+	60	77(5)	1	-	有効	生存
1997	AA	24/F	+	39	49(4)	2	+	有効	生存
1998	AML	15/M	+	46	67(7)	2	+	有効	死亡(109)
1998	AA	31/M	+	22	49(2)	1	-	無効	死亡(56)
1998	WAS	13/M	+	48	60(4)	2	+	有効	死亡(259)
1998	ALL	15/M	+	59	89(8)	1	-	NE	死亡(92)
1998	AA	20/F	+	39	57(4)	1	-	有効	生存
1999	MDS	14/F	+	56	64(2)	1	-		
1999	AML	14/F	+	60	71(1)	1			死亡(124)
[Rituximab無効例]									
2000	SAA	16/F	+	59	75(6)	1	-	無効	死亡(86)
2002	CML	41/M	?	180	220(11)	1	+	PR	死亡(335)

* 申請からDLIまでの日数

CML cytogenetic relapse

DLI-年齢/性 ID	実施日輸注 (day)回数	輸注 T細胞数	輸注 GVHD	DLI後 効果(備考)	転帰
14	32/F 304	3 5.0	-	CR	生存
15	19/M 728	3 3.75	-	一過性(再移植)	生存
23	18/M 641	2 4.0	-	無効(再移植)	死亡
24	51/F 481	2 6.0	+	無効(IFNでCR)	生存
36	58/M 176	1 1.0	+	CR (GVHD)	死亡
38	25/F 928	3 3.7	+	CR	生存
52	38/F 588	2 1.0	+	CR (Glivec併用)	生存
55	44/F 815	1 1.2	-	NE (Glivecで消失)	生存
58	46/M 1545	1 6.5	-	CR (Glivec併用)	生存

輸注T細胞数: x10⁷/kg

CML-AP/BC

DLI-ID	年齢/性	実施日	輸注回数	輸注T細胞数	DLI後GVHD	効果(備考)	転帰
(AP)							
51	42/M	786	3	0.74	+	CRp(Gilvec併用)	生存
(BC)							
12	35/M	652	1	0.96	-	CRp(体外再発)	死亡
28	48/M	371	1	5.0(MNC)+	-	NE(再発)	死亡
37	27/M	858	1	10.0	-	CRp(再発再移植)	生存
41	38/M	457	3	1.32	-	無効(治療併用)	死亡
53	43/M	494	2	10.0	-	CRp(Gilvec前投与)	生存

輸注T細胞数: x10⁷kg

AML non-CR

DLI-ID	年齢/性	病型	輸注回数	輸注T細胞数	DLI後GVHD	効果(備考)	転帰
17	27/F	M2	1	0.6	-	無効(治療先行)	死亡
26*	28/M	M2	3	1.3	-	無効(治療CR後DLI)	生存
33	43/F	M5	2	7.22	-	無効	死亡
34	20/F	M4	1	1.0	-	NE(再移植)	死亡
35	15/M	M2	1	8.1	+	無効(再移植)	生存
40	42/M	M3v	1	3.5	-	無効	死亡
42	38/M	M2	3	5.7	-	無効	死亡
43	21/M	M4	2	6.8	+	CR(治療先行)	生存
48	21/M	M4	2	2.96	+	無効	死亡
54	36/F	M4	3	16	+	CR(治療先行)	死亡(肺炎)
56	10/F	M2	1	14.5	+	CR(治療後nadirでDLI)	生存
57	11/F	M4	2	16.0	+	無効	死亡
60	52/F	M1	2	0.5	+	CR	生存
62	17/M	M2	2	2.32	+	CR	生存

*T細胞数: x10⁷kg

ALL

DLI-ID	年齢/性	病型	病期	輸注回数	輸注T細胞数	DLI後GVHD	効果(備考)	転帰(死因)
13	42/M	T	CR	1	4.1	+	NE(再移植)	死亡(肺炎3)
16	35/M	NR	1	1.0	NE	無効	無効	死亡(再発1)
18	51/M	Ph1	CR	2	1.0	+	NE	死亡(再発5)
22	48/M	CR	2	8.0	-	NE	NE	死亡(再発8)
32	27/M	nadir	1	7.4	+	CR(治療併用)	CR(治療併用)	死亡(再発12)
47	35/M	Ph1	CR	1	5.4	+	NE	死亡(肺出血5)

Mixed lineage leukemia

61* 43/M Ph1 CyRp 3 6.8 + PR(Gilvec前投与) 生存

輸注T細胞数: x10⁷kg

MDS

DLI-ID	年齢/性	病型	輸注回数	輸注T細胞数	DLI後GVHD	効果	転帰
30	46/F	RAEB-T	1	5.6	NE	NE	死亡
44	32/M	RAEB-T	1	1.0	NE	NE	死亡(再発)
50	49/F	RAEB-T	1	5.23	-	無効	生存(再移植)
59	4/M	JMML	3	5.0	+	PR	生存

Multiple Myeloma

61 46/M 混合キメラ 1 8.84 + PR 死亡(GVHD/TMA)

輸注T細胞数: x10⁷kg

Mixed chimera

DLI-ID	年齢/性	基礎疾患	輸注回数	輸注T細胞数	DLI後GVHD	効果	転帰
25	3/M	HPS	2	4.0	+	有効	生存
39	2/M	WAS	3	0.5	-	無効	生存
49	4/M	Hurter病	1	1.63	-	有効	生存

Measles

46 2/F Hurter病 1 1.0 + 有効 生存

輸注T細胞数: x10⁷kg

まとめ

1. JMMPを介して今までに76例(輸注中止3例を含む)のドナーリンパ球輸注を行った。その内55例について100日報告書に基づいて成績を解析した。
2. BLPDでのDLI申請が減少しているが、Rituximab無効例ではDLIも無効であった。
3. CMLでは、細胞遺伝学的再発例でGilvec併用例を含め評価可能な8例中5例で着効を示した。急性転化例でも6例中4例で反応が得られているが、効果は短い。
4. AMLでは、DLI単独または化学療法の前処置でCRが得られる例が散見され、有効性が示唆された。
5. ALLとMDSにおいては評価可能な例数が少なく、未だ明らか有効例はみられていない。
6. 非腫瘍性混合キメラに対しては効果が期待できる。

