

腎細胞癌の多発性肺転移に 対し骨髓非破壊的造血幹細胞 移植を行った1例

東北大学血液免疫科 井根 省二, 山田 実名義, 島岡洋一
佐々木 誠
泌尿器科 佐藤 慎
NHLBI Richard Childs
名古屋第一赤十字病院 富村 雄一, 小寺良典
平成15年度 顕成労働科学研究所ヒトゲノム・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富集・登録と臨床試験体
制の確立に関する研究」(第2回会議 2004.12.28)

症例 15歳 男性

〔主訴〕右側腹部痛

〔現病歴〕平成13年4月右側腹部痛が出現し近医受診。
腹部CTにて右腎腫瘍と胸部X線に多発性の結節陰影が認め
られた。6月14日同院にて根治的右腎摘出術+肝部分切除が
行われ、組織所見ではpT4N4M0, Clear cell ca., G2>G3, v+,
肝被膜浸潤と診断された。術後IFN- α 300万単位隔日投与を
開始し、7月29日退院。その後外来にて経過観察となってい
たが多発性の肺転移は増大し10月3日再入院となりIFN- α
に加えてIL-2投与が開始。その後も転移は増大しミニ移植
による治療の可否について当科紹介、12月2日入院となる。

〔入院時現症〕

身長 163 cm, 体重 46 kg
血圧 116/52 mmHg, 脈拍 74 (整)
胸部に心雑音・ラ音を聴取しない。
腹部は平坦・軟、肝及び脾臓は触知しない。
右側腹部に手術痕あり

入院時検査成績

末梢血			血液生化学					
WBC	4000	/ μ l	Na	141	mEq/l	GOT	15	IU/l
RBC	417×10^4	/ μ l	K	4.8	mEq/l	GPT	17	IU/l
Hb	13.0	g/dl	Cl	104	mEq/l	LDH	300	IU/l
Ht	37.2	%	Ca	10.0	mg/dl	T-Bil	0.7	mg/dl
Plt	28.2×10^4	/ μ l	IP	4.5	mg/dl	ALP	354	IU/l
			BUN	10.0	mg/dl	γ GTP	27	IU/l
出血凝固系			Cr	0.7	mg/dl	ChE	415	IU/l
PT	97.0	%	UA	5.7	mg/dl	TP	7.6	g/dl
APTT	32.0	sec.	CRP	0.3	mg/dl	Alb	4.3	g/dl

HLA typing

Father 39y.o.		Mother 37y.o.	
A	0206	A	2603
B	3901	B	3901
C	Cw7	C	Cw7
DR	1501	DR	1406
A	2603	A	0206
B	3901	B	3901
C	Cw7	C	Cw7
DR	1406	DR	1501
Patient 15y.o.		Brother 13y.o.	

入院～移植まで

入院後病理組織学的な再検討を行い、Wilms 腫瘍の可能性
を否定できなかったため、1月21日より化学療法 (NWTS
V, regimen 1) を開始した。しかし肺転移の増大と肝転移
が出現し効果は認められなかった。

この時点で予後は1週間～1ヶ月程度と推定され、腎細胞癌
に対するミニ移植治療について本人・家族に説明し承諾を得
た。倫理委員会の承認を得て2月18日ミニ移植を施行した。

Donor : a sibling with HLA 3 locus mismatch

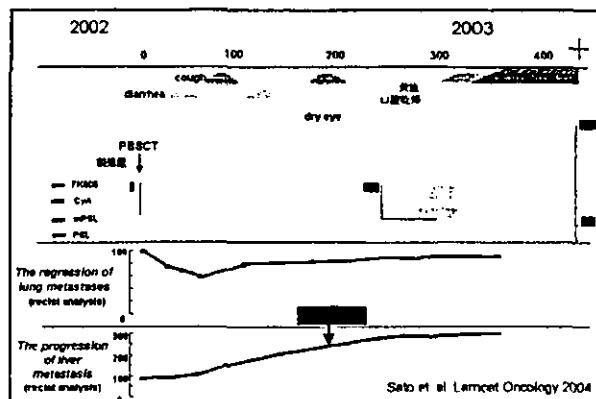
Conditioning : CPA 60mg/kg (day -7,-6)
Flu 25mg/m² (day -5~-1)
ATG 20mg/kg (day -5~-2)
TBI 2Gy (day 0)

GVHD prophylaxis : short term MTX + FK506 + mPSL

CD34陽性細胞数 : 9.0×10^6 /kg

Engraftment : Neutrophil > 500 / μ l day 9

Acute GVHD : 認めず



まとめ(1)

- ・多臓器転移を伴う進行性腎細胞癌症例に対してHLA 3座不適合NIMA相補同胞間ミニ移植を行った。
- ・生着は速やかでDay 30にリンパ球、好中球共に complete chimerismである事が確認された。
- ・明らかな急性GVHDはほとんど認められずNIMA相補同胞間における免疫寛容成立が示唆された。

まとめ(2)

- ・進行性に増大傾向を示していた多発性の肺転移巣は移植後一時期縮小しGraft-Versus-Tumor(GVT)より抑制されたものと考えられた。
- ・移植直前に出現した肝転移巣については一貫して増大を続けており、肺転移に認められたGVT効果は認められなかった。
- ・一時期GVT効果が認められたが最終的にPDで死亡した。

結語

- ・多臓器転移を伴う進行性腎細胞癌症例に対してHLA 3座不適合NIMA相補同胞間ミニ移植を行い、速やかな骨髄の生着が得られ、明らかなacute GVHDは認められず、安全に施行できた。
- ・移植後100までのGVT効果は肺転移巣にのみ示唆された。今後DLI等GVT効果を強める戦略が望まれる。

活性化 CD4-DLI の生着促進効果の検討

先端医療センター再生医療研究部

伊藤 仁也

要旨

本研究班で行なった、移植後拒絶に対する活性化 CD4-DLI の有効率は 50% (2/4) であった。有効例はいずれも早期拒絶であり、晩期の mix chimera から complete chimera への誘導目的で行なった例では有効例はなかった。また一度も生着を認めなかった生着不全例においても有効例はなかった。(0/2)

活性化ドナー CD4 輸注後、骨髄中のドナー造血幹細胞が過形成を起こす例を経験し、活性化 CD4-DLI は造血刺激作用があることが推察された。NOD/SCID マウスを用いた臍帯血移植後拒絶モデルにおいて活性化 CD4-DLI の造血の再開を認めた。

作用機序としては活性化 CD4 陽性細胞が産生するサイトカインの中に骨髄 stroma あるいは造血幹細胞を直接刺激するものがあることが考えられ解析を続けている。

1. 生着不全・拒絶に対する活性化 CD4-DLI

1996 年 9 月から 2002 年 12 月までに 6 例の造血細胞移植後の拒絶・生着不全に対する活性化リンパ球輸注を行った。内訳は早期拒絶に対して 2 例、晩期の mix chimera の complete chimera 誘導目的が 2 例、生着不全に対して 2 例行った。臨床効果は早期拒絶の 2 例は 2 例ともドナータイプの造血の回復を認めたが、生着不全例、mix chimera 例に関しては、無効であった。(Table 1)

移植後生着不全・拒絶に対する CD4 ⁺ DLI		
	No of patient	Clinical effect
Rejection	4	2/4 (50%)
complete rejection	2	2/2 (100%)
Aplastic anemia	1	
LCH	1	
mix chimera	2	0/2 (0%)
Aplastic anemia	2	
Graft failure	2	0/2 (0%)
MDS(JMML)	1	
ALL	1	

Table 1

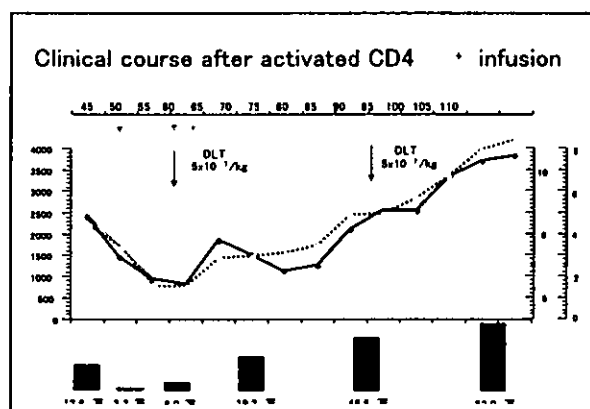


Fig 1

Fig1 は移植後早期の拒絶に対して活性化 CD4 輸注を行なった再生不良性貧血の 8 歳女児例である。

HLA 一致の姉から同種骨髄移植を受け、Day 20 には生着したが、Day 40 頃から汎血球が進行し、再び輸血依存となった。骨髄有核細胞数も著減し、VNTR によるキメリズム解析では、ドナータイプのパンドが消失し、100%レシピエントタイプとなった。この症例に対し活性化 CD4-DLI を行なったところドナー造血は回復し、著効を示した。

2 拒絶に対する活性化 CD4-DLI の作用機序

拒絶に対しての DLI の作用機序としては、ドナー T 細胞を輸注することにより、拒絶の原因となったレシピエントタイプの免疫担当細胞や造血細胞を攻撃し、免疫学的ニッチェを与えることが考えられており、すでに T cell deplete SCT 後の拒絶などに対しての有効であったとする報告がなされている。

ところが、我々は、急性リンパ性白血病の再発例に活性化 CD4-DLI を行なったところ、骨髄有核細胞の過形成を認め、骨髄および末梢血の CD34 陽性細胞が増加している 1 女児例を経験した。活性化 CD4-DLI においては、単に免疫学的機序によるものではなく造血刺激作用があるという仮説を立て、その後、自験例 6 例の骨髄有核細胞数と骨髄中の CD34 陽性細胞数を調べた。(Fig 2)

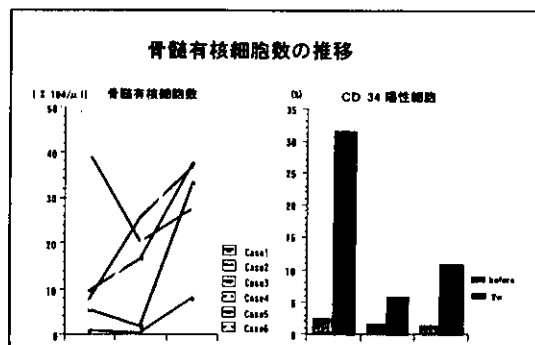


Fig 2

活性化 CD4-DLI を行なった 6 例中 5 例で骨髄有核細胞数の増加を認め、検索し得た 3 例においては、輸注後骨髄中の CD34 陽性細胞数が著増していることが明らかになった。

いずれの例も骨髄中の造血幹細胞は過形成を起こしており、単に免疫学的機序によるものではないことが考察された。

3. 臍帯血移植後拒絶マウスモデルを用いた活性化 CD4-DLI の造血刺激効果の検討

我々は活性化 CD4-DLI の造血刺激効果を検証するために NOD/SCID マウスを用いてヒト臍帯血移植を行ない拒絶させた後に活性化 CD4-DLI と活性化 CD8-DLI を行ない、ヒト細胞出現率を FACS を用いて検討した。

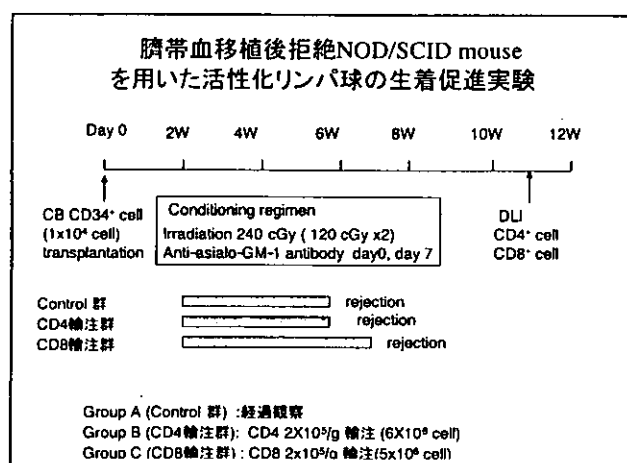


Fig 3

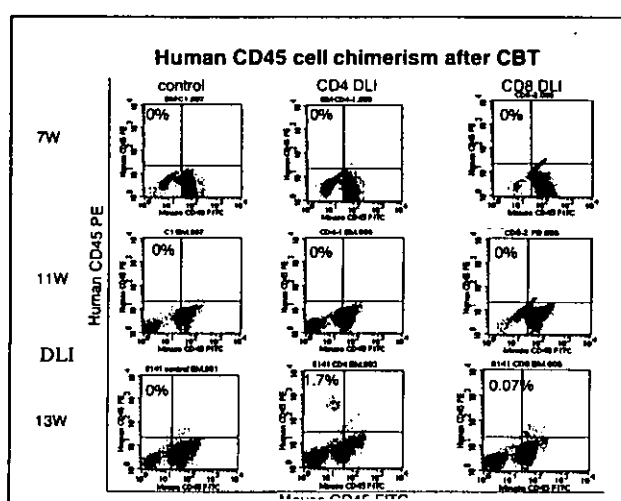


Fig 4

臍帯血移植後拒絶したマウスを 3 群に分け、A: Control 群 B: 活性化 CD4-DLI 群 C: 活性化 CD8-DLI 群に分類し、それぞれ 2 匹づつを実験に用いた。結果を Fig 4 に示すが、活性化 CD4-DLI を行なった群では 2 匹中 2 匹がヒト細胞の造血が再開し、2 カ月以上生着を続けた。活性化 CD8 群では 2 匹中 1 匹がヒト細胞の造血を認めたが 2 カ月後に再び拒絶した。また CD-8 群ではマウスの体重減少、脱毛など GVHD 様の変化を認めたが CD-4 群には副作用は認めなかった。

CD4 群では骨髄、脾、リンパ節、肝臓にヒト血液細胞を認めた。Lineage 解析では造血幹細胞(CD34)、B 細胞(CD19)、顆粒球系細胞(CD33)、赤芽球(GPA)、単球(CD14)、巨核球(CD41)が確認されたが T 細胞は生着しなかった。

また両群とも DLI 後、末梢血、骨髄に輸注した CD4,CD8 陽性細胞は認めなかった。

活性化 CD4-DLI の造血刺激作用の作用機序として、免疫学的効果の他に活性化 CD4 陽性細胞が産生するサイトカインによる作用が考えられ、解析を続けている。

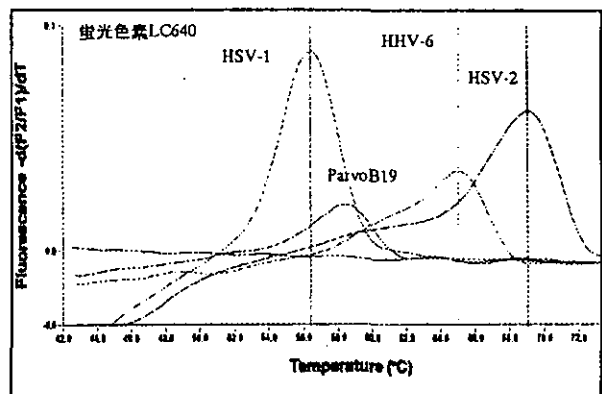
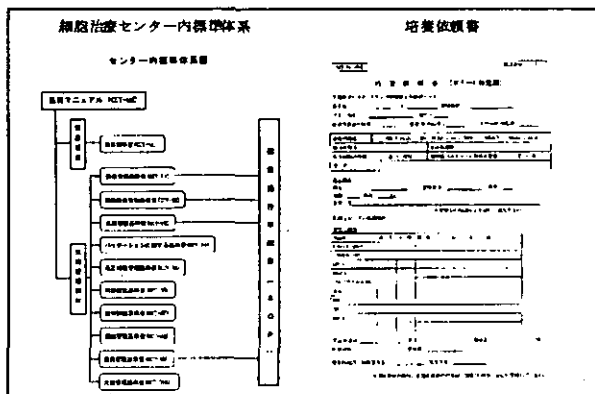
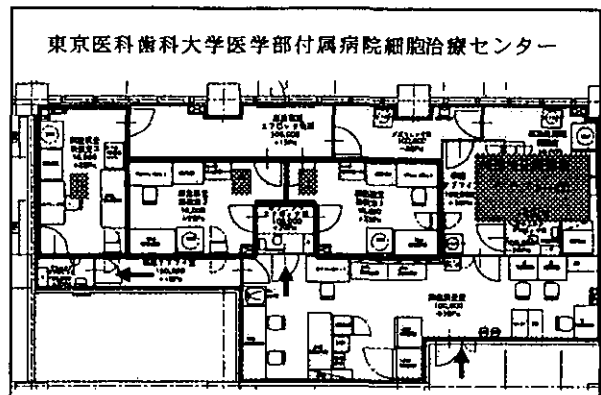
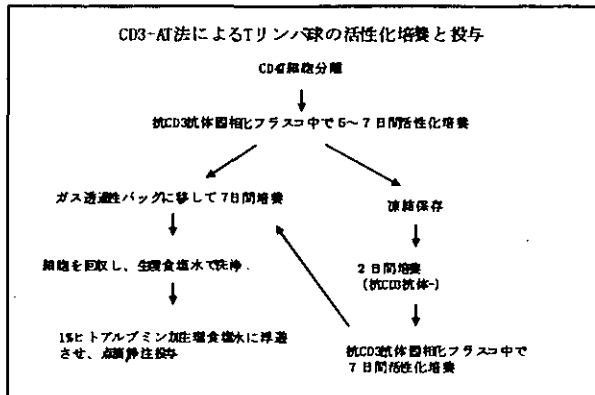
東京医科歯科大学細胞治療センターにおける 活性化 T 細胞培養と細胞の安全保証

東京医科歯科大学 細胞治療センター 清水則夫 森尾友宏

平成 14 年 4 月に東京医科歯科大学医学部附属病院内にクラス 10,000 の無菌培養室 4 室を備えた細胞治療センターが設置され、同年 7 月より本格稼働を開始した。現在、細胞治療センターでは、活性化 T 細胞療法による感染症治療を主な研究テーマとして、活性化 T 細胞の調製法の開発、取り違い防止・感染因子汚染防止などを含めた細胞の安全管理技術の確立、細胞治療・再生医療の実用化に不可欠な新しいウイルス検査系の開発、培養器具などの医療用具化、培地・自動培養装置の開発、などの取り組みを併せて行っている。

現在のところ、医療機関内で自己あるいは移植ドナー由来の特定個人の治療に使用する細胞を培養するための明確な法規制は定められておらず、さらにロットを形成しない細胞治療用細胞製剤を医薬品製造のための基準である GMP に則って調製することは困難である。当センターでは治療の安全性を担保するため、細胞安全取り扱いに関するセンター内標準の整備を行なっている。具体的には、細胞培養の手順、品質管理基準、製造管理基準、衛生管理基準を含めたすべての作業の明確化と文書化、および記録書とその管理基準の作成などである。一方、細胞治療・再生医療では生きた状態の生体材料の取り扱いが必須であるが、生体には持続・潜伏感染する病原体が多数存在するため、出発材料の段階で無菌性を保証することは不可能である。したがって、細胞製剤の安全性を確保するためには、最終製品の全数検査を行う必要があり、実用化に耐える高感度・迅速・安価な検査システムの開発が不可欠である。我々は、すべての要求を満たす新たなウイルス検査系の開発も併せて行ない、基本的な検査システムの構築を終了している。構築した安全管理体制の客観的な評価を受けるため、当センターでは国際的な品質マネジメントシステム ISO9001 認証取得を目指した運用を行っており、本年 2 月に登録審査機関 JQA から ISO9001 登録施設として認証を取得した。

今般計画されている、活性化 CD4T 細胞投与による移植後難治性ウイルス感染症の治療研究には、上記安全管理体制の基で培養した活性化 T 細胞を使用することになっている。現在、センター内で試験的に培養した活性化 CD4T 細胞の細胞増殖、表面抗原、サイトカイン産生などの基礎データ蓄積を行っている。



開発中のウイルス検査系

A set: HCV, HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HAV (RT-PCR)

B set: HBV, ParvoB19, TP, HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2

C set: HSV-1, HSV-2, VZV, CMV, EBV, HHV-6, HHV-7, HHV-8

品質マネジメントシステムの構築とISO9001の認証取得

- 品質マニュアル、製品標準書、製造管理基準書、品質管理基準書、製造衛生基準書の作成・運用
- 標準操作手順書、製造指図記録書、品質検査指図記録書の作成・運用
- 品質管理責任者、製造管理責任者による作業確認
- 教育訓練による作業者のレベルアップ
- 定期的内部監査およびマネジメントレビューによるシステムの維持と継続的改善

→ ISO9001品質マネジメントシステムの認証取得 (JQA-QMA110479)

難治性 CMV 感染症・アデノウイルス感染症に対する ドナー活性化 CD4 陽性 T 細胞輸注療法

東京医科歯科大学 細胞治療センター 森尾友宏 清水則夫

造血幹細胞移植後の日和見感染症、特に薬剤抵抗性 cytomegalovirus (CMV) 感染症、adenovirus (ADV) 感染症のコントロールには苦慮することが多い。2003 年までに薬剤でコントロールできない幹細胞移植後難治性感染症 30 例に対して、ドナー CD4 細胞輸注療法を行ってきたが、そのうち 16 例が CMV 感染症、4 例がアデノウイルス感染症であった。CMV 感染症に対しては 1-35 回の細胞治療が行われ、解析可能な 10 例のうち、7 例で抗ウイルス剤を中止し、ウイルスの消失（あるいは著名な減少）が認められた。アデノウイルス感染症では全例で、1 回あるいは 2 回の投与でウイルスの消失や、血尿所見の改善を認めた。副作用として全身感染症の 2 例で SIRS を認め、ステロイドの使用を必要としたが、GVHD の増悪（III 度以上の GVHD の出現）は認めなかった。

CMV 感染症で効果が十分でなかった症例は、CMV 感染治療後数ヶ月以上経過しているものが多かった。10 回以上の投与となった症例では、その後 CMV の制圧は困難であった。またその後の解析で、生着リンパ球を増殖させることが困難な症例も出始めている。主に臍帯血幹細胞移植患者で認められている現象であるが、骨髄移植患者と有意な差があるかどうかは今後の検討課題である。

本学細胞治療センター清水からの報告にもあるように、本センターではその品質管理、特に残存ウイルスあるいは混在ウイルスの迅速高感度解析には特に留意した細胞調製を行える体制をしき、2004 年 2 月 20 日に ISO9001 登録認証を取得した。このような体制を元に、今後は本班研究の中で、難治性 CMV 感染症、ADV 感染症に対するドナー CD4 細胞輸注療法の効果と安全性、作用機序を検討する計画を進めている。CMV では p65 antigenemia, CMV realtime PCRなどを指標に、ADV では realtime PCRなどを指標に、統一プロトコルで治療研究を進める予定である。投与細胞数としては $1 \times 10^6/\text{kg}$ から開始し、効果を見ながら 2 週間の間隔をあけて、 $1 \times 10^7/\text{kg}$, $5 \times 10^7/\text{kg}$ まで増量する。

今までの自己活性化 T 細胞輸注の検討から、T 細胞治療により、IFN- γ 産生、NK 活性、芽球化反応が上昇する例があることが判明している。班研究の中では様々な免疫学的パラメータの推移を検討するとともに、CMV に関しては (1) 特異的 CTL の頻度、(2) そのサイトカイン産生能、(3) CD4 memory・CD8 memory サブセット、(4) サイトカイン産生などを指標にその変化について解析を加える予定である。

2003 年度にはまた、難治性非定型抗酸菌症や移植後トキソプラズマ脳炎などの治療も経験している。CMV、アデノウイルス以外の難治性感染症に対する治療についてもモニターする系を確立しながら継続していきたいと考えている。

Effect of Donor CD4 T Cell Transfusion for Opportunistic Infection after SCT		
Infection	Cases	Effective
CMV infection	16	7/10
Adenovirus infection	4	4/4
RSV infection	2	0/2
Coxsackie virus infection	1	1/1
Measles	1	1/1
H. Simplex	1	1/1
HHV8	1	1/1
Others	4	0/4
Total	30	15/24

CMV感染症に対する治療内容	
Number of Transfusion :	1 - 35 (1, 1, 1, 3, 3, 6, 6, 10, 17, 35)
Number of T cells transfused:	$5 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^7 / \text{kg}$ ($1 \times 10^7 / \text{kg}$)
CD4+ T cells:	9 cases
CD4+ T/ CD8+ T cells:	1 case

対象症例	
血縁者間及び非血縁者間造血幹細胞移植後(脾蒂血幹細胞移植を含む)の難治性(薬剤抵抗性)CMV感染症患者	
(1) DHPG and/or Forcametで2週間治療した時点で以下のいずれかの状態。	- 血液中CMVコピー数が治療開始前の1/10以下に減少しない - CMVコピー数が3,000コピー/ml blood以上 - CMV antigenemiaが10 / 50,000細胞以上
(2) DHPG and/or Forcametで2週間治療した時点で、	臓器炎、肺炎など明らかな活動性病変が持続する症例。(CMVは検出されること)
(3) DHPG and/or Forcametの副作用によりその継続投与ができない症例、	重症度は問わない。
発症時以降は原則としてCMVに対する新たな薬剤の追加は行わない。(治療開始前にCMV感染状況を再度チェックする)	
除外基準:	
(1) 移植後重症GVHD(III-IV度)がコントロールされていない。	
(2) 重症合併症(VOD, 心不全、呼吸不全など)を有している。	

投与方法、投与量、投与期間	
初期投与量としてCD4 rich fractionを $1 \times 10^6 / \text{kg}$ を使用する。	
2週後の効果判定にて効果が無い場合	
$1 \times 10^7 / \text{kg}$ を追加投与	
2週間後に効果を認めない場合	
さらに $5 \times 10^7 / \text{kg}$ の細胞を投与	
← 生着細胞?	

(1) プライマリーエンドポイント:	
治療終了2週後・4週後に連続して、	
- CMVコピー数が0、 - CMVアンチゲネミアが消失、 - あるいはCMVコピー数が1 / 100以下に減少したもの、	
を著効とする。	

フォローアップデータ	
1.	末梢血T細胞亜群解析 (CD4メモリー、CD8メモリー、細胞障害性CD4・CD8など)
2.	CMV特異的CTLの頻度、及び細胞内IFN- γ 、TNF- α 染色
3.	免疫学的パラメータ (blastogenesis, NK, cytokine production, IgG/M/A, specific antibody, etc)
4.	薬剤耐性遺伝子解析(UL54, UL97領域)
5.	DNA、血清保存

1. 新規 HLA-A*3303 拘束性、H-Y 抗原由来マイナー抗原の同定

女性ドナーより CML に対して HLA 一致同胞間移植を受けた男性患者より、CTL クローンを樹立した。クローンは造血系細胞を強く傷害し、非造血組織由来の細胞に対する傷害は軽度か無かった。B-LCL パネルを用いた検討により、クローンは HLA-A33 拘束性であり、男性由来の細胞のみを傷害することが判明した。Y 染色体部分欠損 B-LCL パネルを用いた検討により、マイナー抗原をコードする遺伝子は Yq11.2 領域に存在することが判明した。この部位に存在する遺伝子の cDNA をクローン化して標的細胞に導入することで遺伝子を同定した。また該当 cDNA の deletion mutant、minigene を用いた実験等により、エピトープは 11mer のアミノ酸からなるペプチドと判明した。この遺伝子は定量 PCR により、比較的造血系細胞に強く発現するが、昨年度報告した ACC-1 をコードする *BCL2A1* 遺伝子のように造血系細胞に限局した発現パターンは認められなかった。現在、造血器腫瘍に対する免疫療法に応用可能かを検討している。

2. ハイリスク造血器腫瘍に対して ACC-1 または HA-1 不適合移植を受ける症例に対する養子免疫療法

造血系細胞に特異的なマイナー抗原は、HLA 一致同種移植後の造血器腫瘍に対する移植片対腫瘍(GVT)効果の標的抗原として有用と考えられ、Fred Hutchinson 癌研究所や Leiden 大学でこれを標的とした養子免疫療法の臨床試験が施行されつつある。これまでに我々は HLA-A*2402 および B*4403 によって提示されるマイナー抗原遺伝子 (*BCL2A1*) の同定とエピトープ (ACC-1、ACC-2) の決定¹⁾と、その不適合が臨床に及ぼす成績²⁾について報告してきた。

既に ACC-1 および HA-1 を標的抗原とした臨床試験のプロトコール（現在、血縁者間移植のみならず非血縁者間移植も対象）は当センターの倫理委員会で承認済みであり、適格症例が見つかり次第、試験を開始する予定である。これまでに 2 症例の照会があったが、ドナー・患者間で ACC-1 の不適合が存在しないことが判明し、まだ適格症例は見つかっていない。

ACC-1 は約 10%の症例、HA-1 は約 5%の症例が適応となると予測される。今後さらに症例のリクルートを行っていく。またマイナー抗原特異的 CTL クローンを用いた養子免疫療法をより多くの症例で施行できるように、現在 Fred Hutchinson 癌研究所で行われている方法（すなわちマイナー抗原は特定せず、造血系細胞のみを傷害する CTL を選別し体外増幅して再発時に投与する）と同様な方法を当センターの倫理委員会に申請中であり、承認され次第症例のリクルートを開始する予定である。

3. 文献

1. Akatsuka Y, Nishida T, et al. *J Exp Med*. 197;1489-1500, 2003.
2. Nishida T, Akatsuka Y, et al. *Br J Haematol*. 124:629-635, 2004.

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 第二回会議

**MHCテトラマーによるEBウイルス特異的細胞障害性T細胞
(CTL) のモニタリング**

名古屋大学小児科

谷ヶ崎 博、工藤 寿子、小島 勢二

背景

前治療としてATGの投与を受けた同種骨髄移植患者では、

- ・ 約半数でEBV genome copy 数の有意な増加を認める。
- ・ copy数の増加は移植後、2-3ヵ月目に認められ、EBウイルスの再活性化のモニタリングとして有用である。
- ・ 一部はBLPD（Bリンパ球増殖性疾患）に移行する。

(Hoshino Y, et al., 2001)

HLA A-2拘束性EBV tetramer を用いた検討により、移植後のBLPDの発症や予後予測にEBV特異的CTLの検出が有用である。

(Meij P et al., 2003)

我が国においてはHLA A-24のアリル頻度が高い。このため、HLA A-24拘束性のEBV tetramer の開発が進められていたが、移植後の患者での有用性を検討したデータはない。

(Kuzushima K et al., 2003)

目的

- ・ HLA A-24 拘束性の5種類のEBV由来ペプチドtetramer を用いて、EBV特異的CTLが検出できるか検討する。
- ・ 経時的にモニタリングし、EBV genome copy 数及び臨床経過と比較する。

対象と検体

ATGを前治療に用いて非血縁者間骨髄移植を受けた小児血液疾患15症例
移植後約50日から90日を経過した末梢血もしくは骨髄の単核球

抗体 HLA-A24 拘束性EBV tetramer

- | | | |
|--------------|--------|------------|
| 1) IYVLVMLVL | LMP2 | |
| 2) TYPVLEEMF | BRLF1 | |
| 3) DYNFVKQLF | BMLF1 | |
| 4) RYSIFFDYM | EBNA3A | |
| 5) TYSAGIVQI | EBNA3B | (MBL社より提供) |

方法

CD8 (+) / tetramer (+) の細胞をFlowcytometryにより定量化した

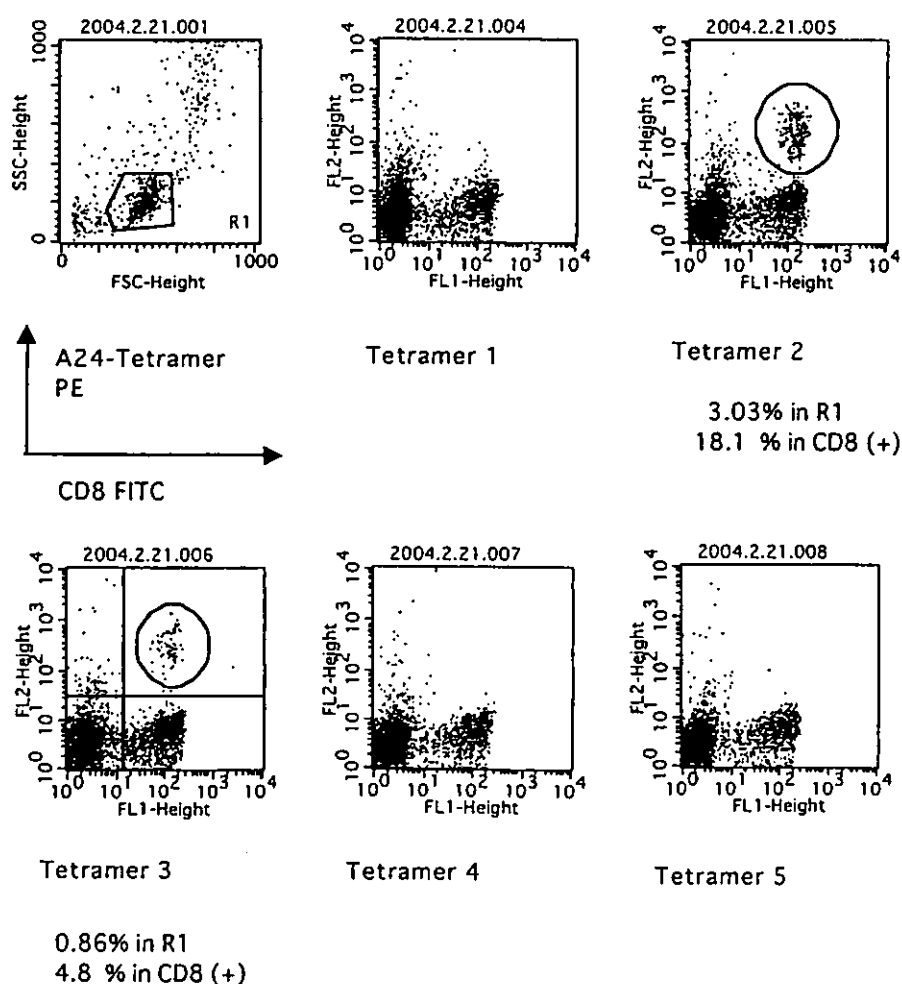
結果と考案 (下図)

- 1 HLA A-24 拘束性 EBV tetramer を認識する抗体を用いて、患者(HLA A-24) 15 検体中 4 検体で特異的 CTL を検出した。
- 2 臨床的に明らかな BLPD を発症した患者において 特異的CTLの経時的変化は、臨床症状およびEBV genome copy 数の変化とよく一致していた。
- 3 5 種類のtetramer を用いての検討では、BRLF、BMLF、EBNA3Aに対する抗体の有用性が確認できた。
- 4 患者によりモニタリングに適した抗体は異なる可能性があり、複数の抗体を組み合わせる必要があるかもしれない。

結語

HLA/tetramer complexによりEBV特異的CTLの検出と分離が可能になった。
現在、ex vivoで増幅する至適条件の検討を行っている。今後、good manufacturing practice(GMP)基準に順守していく形でシステムを確立していく予定である。

(図) 5 種類の tetramer を用いた検討



骨髓内骨髓移植 —小動物からモンキーへ—

関西医科大学第一病理

同 移植センター

同 再生医学難病治療センター

同 癌治療センター

池原 進

我々は、放射線に高感受性であるため、通常のBMTでは、治療できないMRL/lprマウス（SLEとRAを自然発症）を用いて、最近、骨髓内骨髓移植(IBM-BMT)の方法を発見した(Kushida et al. Blood 97:3292,2001)。門脈からの骨髓移植や従来の静脈からの骨髓移植に比較して、IBM-BMTでは低線量放射線(5Gy x 2)でも100%治療できることが明らかになった。この方法では、採取した骨髓細胞（造血幹細胞と間葉系幹細胞を含む）を効率良く、骨髓内へ戻すことが可能であるため、造血の回復も速やかで放射線量を減量しても生着不全が起こらない。従って、この方法は、臓器移植にも、再生治療にも有力な武器となり得る。実際、臓器移植では、皮膚、膵島、下肢の移植で有効性を確認しており、再生医療の面でも老化促進マウス(SAM)の骨粗鬆症の予防並びに治療にも成功している(Ichioka et al. Stem Cells 20:542,2002)。

これら小動物（マウス、ラット等）を用いた結果に基づいて、ヒトへの応用を視野に入れて、モンキーを用いた実験を開始した。まず、従来の骨髓細胞の採取方法を検討し、長管骨を用いた灌流法が末梢血（T細胞）の混入もなく、GvH病も発症しないことを発見した。これは、骨髓穿刺針を長管骨に2箇所挿入し、一方より生食を注入し、他方より骨髓細胞を採取するもので、短時間に大量の骨髓細胞を採取できる。末梢血の混入がないため、T細胞も6%以下で、T細胞を除去しなくてもGvH病が発症しない(Kushida et al. Stem Cells 18:453,2000)。それ故、採取全骨髓細胞を骨髓内へ注入することによって骨髓中のストローマ細胞（間葉系幹細胞を含む）も骨髓内へ効率良く移植が可能となる。さらに、骨髓中のストローマ細胞は胸線へ移住し、positive selectionにも関与していることを見出し（Li et al. Exp.Hematol.28:950,2000）、再生治療を含め、ストローマ細胞の補充の重要性がclose upされて来ている。

この新しい移植方法（灌流法＋骨髓内骨髓移植）は、これまでの移植・再生治療を根本的に変える画期的な方法で、あらゆる難病の治療に役立つものと確信する。

現在、ヒトへの応用を視野に入れて、実験用カニクイザルを用いて実験中であるが、安全で効率良い骨髓細胞の採取と移植のための器具を開発したので紹介する。この器具を用いたモンキーの実際の症例についても提示する。

V. (財) ヒューマンサイエンス振興財団

「平成 15 年度ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業」に
基づく研究班事業報告並びに研究実績報告書

(様式9)

[外国人研究者招へい事業]
(ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業)

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者

所属・職名： アメリカ国立衛生研究所、血液部門、上席臨床研究員
Section Chief, Hematology Branch, NHLBI/NIH

氏 名： リチャード チャイルド博士
RICHARD W. CHILDS, M.D.

2. 招へい申請者

所属・職名： 名古屋第一赤十字病院骨髓移植センター長
氏 名： 小寺良尚

3. 受け入れ研究者

所属・職名： 名古屋第一赤十字病院骨髓移植センター長
氏 名： 小寺良尚

4. 招へい期間： 平成16年3月20日より平成16年3月27日 (8日間)

5. 研究課題： 固形腫瘍に対する造血幹細胞移植対象疾患の拡大

6. 研究活動の概要

22日より23日まで名古屋第一赤十字病院血液内科において

- ①固形腫瘍に対するミニ移植
 - ②病棟回診、症例検討、無菌管理について
- (参加者 100人)

24日より25日まで金沢大学第三内科において

- ①発作性夜間血色素尿症の発症機序と移植
- についての討論が行われた

25日より26日まで京都大学血液内科において

①HLA3座不適合ドナーからの腎がんに対するミニ移植

②HLA多座不適合ドナーからの移植成績

③KIR不適合移植におけるGVT効果

の成果発表討論が行われた。

(参加者40人)

7. 研究課題の成果

当班のテーマである移植対象疾患の拡大および幹細胞ソースの拡大のために名古屋、金沢、京都で専門家を集め研究をおこなった。

テーマ1：固形腫瘍における骨髄移植にういての研究打ち合わせを名古屋第一赤十字病院で行った。参加者は当院の血液内科、血液小児科の医師を中心に10人が参加した。固形腫瘍の移植の実際について、討論がなされた。その後当院の無菌室回診を行い、わが国での無菌管理が厳しいのではないかと指摘を受けた。これに引継ぎ看護師との無菌室管理についての打ち合わせを行い、活発な議論が行われ、細かい患者管理について、米国NIHでのマニュアルをもとに、討論された。とくに移植後のワクチン接種は本邦ではあまり行われておらず、今後の方針をたてる上で参考になった。夜約70人を集めて、学術講演会を行った。ここでは固形腫瘍に対する移植に対する米国での成績を提示した。およそ2割の症例で移植による効果が認められた。成績はGVHDの重症度が高いものほど、抗腫瘍効果が高いことを確認し、ドナーとホストの遺伝的な差がGVHDおよびGVT効果(グラフト対腫瘍効果)に関連することが示された。またGVT効果をNK細胞によっておこさせるべく、現在KIRについての研究を行っていることが述べられた。

テーマ2：金沢大学では発作性夜間血色素尿症についての研究打ち合わせが行われた。この打ち合わせ会には金沢大学関連の複数の病院からも参加があり盛況に行われた。ここでは発作性夜間血色素尿症の原因となるクローンが免疫学的にコントロールされていることが示された。さらにこのクローンは移植後にはドナーの免疫により排除される可能性が示唆された。このことは発作性夜間血色素尿症の発症機序を説明する新しい考え方であり、大きな収穫となった。

テーマ3：京都大学での研究打ち合わせ会は、本邦で積極的に行われているハプロ不適合移植がテーマであり、京都大学関連の複数の病院だけでなく東北大学および大阪大学からも参加があり盛況に行われた。本研究班の班員である一戸よりNIMA相補

ドナーからの移植では、胎児が母親の NIMA（遺伝されないハプロ）を許容されるであろう仮説に基づいた移植が提案されており、現在当班で臨床研究が行われていることが紹介された。次に東北大学より 3 座不一致の兄弟より行われた腎がんの移植が発表された。ここでは 3 座不一致でも GVHD はコントロールされ、さらに腎がんに対する効果も認められことが確認された。また Childs 博士により提唱されたミニ移植の前処置に TBI200 c Gy および ATG を加えることにより、3 座不適合ドナーからも生着する可能性が示唆された。続いて大阪大学より多数例の多座不一致の移植成績が発表され、ATG、MMF、PSLなどを組み合わせて追加した適当な免疫抑制剤が使用されれば重症の GVHD を発症することなく移植が行われることが発表された。この二つの発表に対して Childs 博士からは、HLA 一致の場合腎がんの縮小は移植後 100 日を過ぎてから起こるが、非一致の場合はそれより早くおこることが指摘されたほか、いくつかの重要な指摘を受けた。またハプロ不適合の移植において、HLA-C 座が関与する KIR の適合、不適合による GVT 効果についての基礎的検討の必要性が提唱された。最後に Childs 博士より米国での固形腫瘍に対する骨髄移植の成果が発表された。この会では、Childs 博士が本邦におけるハプロ不適合移植の良好な移植の成績に驚かれ、「これからは日本から移植の情報がもたらせるであろう」と締めくくられた。

8. 外国人研究者のレポートは、別添のとおりである。

Nonmyeloablative transplantation for solid tumor

Richard W. Childs

Hematology Branch / NHLBI / NIH

Over the past decade, considerable advances have been made in the field of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Recognition that transplanted donor immune cells can cure patients with leukemia has led to the development of nonmyeloablative or "low-intensity" conditioning regimens, which have expanded the application of allogeneic transplantation to a growing number of hematological malignancies. The improved safety and preliminary success of this transplant approach have justified applying allogeneic immunotherapy to patients with treatment-refractory solid tumors. However, substantial portion of patients suffered from recurrence disease. New strategies such as expanding tumor specific cytotoxic T cells or natural killer cells are needed to overcome this issue.

固形腫瘍に対する骨髓非破壊的移植

リチャード チャイルド

米国立衛生研究所血液部門

この十年の間に同種造血幹細胞移植においては多くの進歩があった。移植されたドナーの免疫細胞が白血病患者を治癒に導くという事実により骨髓非破壊的なあるいは弱めた前処置の開発がなされ、これによりより多くの血液悪性疾患に対しての同種造血幹細胞移植の適応を拡大しつつある。この移植への試みの安全性と初期の成功により治療抵抗性の固形腫瘍患者に対する同種免疫療法への応用が正当化されている。しかしながら、まだ相当数の患者が移植後に再発を起こしている。sこれを克服するには腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞やNK細胞を増やすなどの戦略が必要である。

[研究支援者活用事業]
(ヒトゲノム・再生医療等研究推進事業)

研究実績報告書

1. 研究支援者氏名 渡邊 健

2. 受入研究者
所 属 : 財団法人 先端医療振興財団
職 名 : 主任研究員
氏 名 : 伊藤 仁也
所在地 : 〒650-0047 神戸市中央区港島南町2丁目2番

3. 研究支援期間
平成15年12月1日 ～ 平成16年3月31日

4. 研究課題
細胞製品の安全保証に関する研究

5. 研究業務実施の概要
平成15年12月 1日より上記2の研究指導者の下において細胞製品の安全保証に関する研究を開始した。
細胞治療、再生医療を実用化するためには、細胞製品の安全性を確保する技術が不可欠で、潜伏、持続感染する病原因子の有無を最終製品について全数検査し、担保する必要がある。そのために多種類の検査が導入された。しかし現状は安全性を十分の確保できているとは言えず、特にHIV, HTLVなどのレトロウィルス、HCV, HBVなどの肝炎ウィルス HSV, EBV, などのヘルペスウィルス類、ParvoB19などのパポバウィルスなどが病原因子をもつ多種類の持続感染、潜伏感染ウィルスとして知られており、これらの中には検出が難しいウィルスも存在する。そこでこれらの全てについて迅速、高精度、安価に検査するシステムを構築することを目的として研究を進めてきた。
概要としては、各細胞製品に対し細胞の入荷段階、出荷前および培養に使用する血漿に対して検査を実施する。
ウィルス、細菌の種類としては、HIV1,2 ,HTLV1,2 ,HAV,HBV,HCV,parvoB19,梅毒、HSV1,2,VZV,CMV,EBV,HHV6,7,8である。方法は高感度であるNAT（核酸増幅検査）を用いて検査を実施する。現在、これらを4本のキャピラリーにおいて検査するマルチプレックスPCRの系を構築中である。原理的には、細胞から核酸を抽出し、RNA ウィルスは逆転写反応によりcDNAにし、DNA ウィルスは直接PCRにより増幅後、プローブを用いて検出および識別を行うものである。同一反応液中に多量のプライマーおよびプローブを

使用するため、各ウイルスや細菌のターゲットとする遺伝子配列およびプライマーの配列がきわめて重要であり、その選択に多くの時間を要した。すでに HIV1,2,梅毒を残して完成しており、全て完成した後は検査を操作が簡単で誰でもマニュアルに従えば、同じ結果が得られるようにシステムとして構築し、導入する予定である。また検出感度は各ウイルス 10 コピー/キャピラリー以下であるようにする。検査時間は 2 時間程度、費用として一検査当たり 2 千円前後に抑えられる見込みである。

ガン治療や感染症治療のため、また開発中の造血幹細胞移植後のドナーリンパ球を体外において活性化培養し、投与する DLI 治療などを目的とした培養におけるウイルス活性を否定する実験を試みる予定である。体外において培養された場合、培養前にもともとウイルスに感染していた場合、培養中および培養後においてウイルス活性が無くても NAT 検査では検出されるため、判定が難しい。よって培養前に試験的に活性のあるウイルスを感染させ培養し、ウイルスが増殖しないこと。またウイルス活性が無いことを確認する必要がある。現在、東海大学医学部生命科学の井原助教授の下において、ウイルス液作成法、PFU 測定法、オーバーレイ、CMV 感染性（スパイク）試験の技術を習得中であり、活性化 T 細胞あるいは造血幹細胞増殖におけるスパイク試験を実施する予定である。

VI. 公開シンポジウム記録