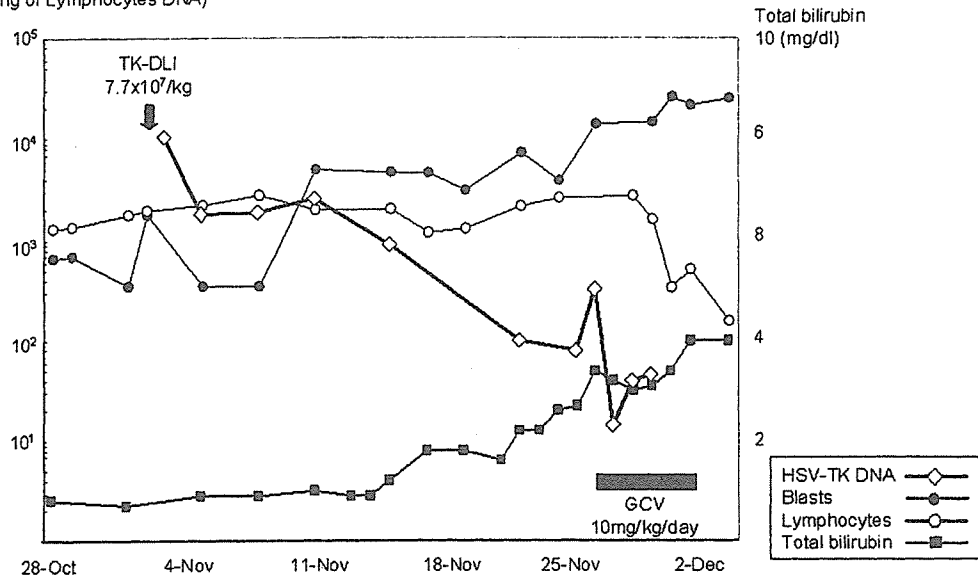


経過表

Blasts and Lymphocytes
(cells/ μ l)
HSV-TK DNA
(copies/300ng of Lymphocytes DNA)



適応症例 (概要)

CML：染色体解析または FISH にて異常クローンを検出する。

Ph1+ALL：染色体解析、FISH、PCR の何れかの方法で異常クローンを検出する。

その他の疾患：異常芽球の増加が光顕上明らかである。

* 分子レベルでの再発 (WT1 など) でも TK-DLI が行えるよう、現在、厚生労働省にプロトコール改訂を申請中である。

筑波大学遺伝子細胞療法チーム、ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/public/celltherapy/index.html>

連絡先：筑波大学血液内科

Tel/Fax: 029-853-3127

E-mail: hematol@md.tsukuba.ac.jp

「マイナー抗原を標的とした養子免疫療法」

愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部 赤塚美樹

1. 新規マイナー抗原の同定

同種移植後に GVL 効果のみを有効に引き出すためには造血系細胞に特異的に発現するマイナー抗原を標的にすることが重要であることが示されている。これまでに我々は HLA-A*2402、-B44、A*3303 および -A*3101 よって拘束されるマイナー抗原エピトープ ACC-1、ACC-2 (*BCL2A1* 上)、ACC-3 (*TMSB4Y* 上)、ACC-4、ACC-5 (*Cathepsin H* 上) を同定してきた。*Cathepsin H* の発現は造血細胞特異的でないが、組織染色で上皮系の固形腫瘍において強発現していることが報告されており、GVT 効果が期待できないか検討をしている。また HLA 一致、HLA-A*3101 および HLA-A*3303 陽性例のドナー・患者検体を DNA タイピングして GVHD 等との相関があるかどうか検討しつつある。以上のマイナー抗原が全て養子免疫療法に応用可能としても、患者のカバー率は 30% 前後であり、さらに 2～3 種類の造血系細胞に特異的に発現するマイナー抗原の新規同定が必要と考えられる。

現在 HLA-B*4403 拘束性のマイナー抗原特異的 CTL について抗原遺伝子の同定を進めている。リンケージ解析だけでは遺伝子の同定に至らなかったため、抗原陽性および陰性者の DNA をプール化し、リンケージ解析で絞り込まれた領域に存在するマイクロサテライトマーカーで 2 群に分布の片寄りが出現する場所がないか比較検討した。この結果血液細胞で発現の強い遺伝子が候補に上がった。この遺伝子のエクソン 3 の SNP と細胞傷害パターンが完全に一致したため、現在同 SNP 付近に存在するエピトープの同定を行っている。

2. 養子免疫療法の臨床試験の進捗状況

平成 16 年 6 月に臨床細胞調整施設 (総面積 48m²) が竣工し、その後装備等の整備を順次続け、本年 5 月にほぼ完了した。入退室や清掃等の管理関係と消耗品管理の文書体系が終了し、細胞処理の手順書と記録書等の整備を現在進めつつある。

新規症例のリクルートについては、クローン化 T 細胞の増幅時に必要なフィーダー用の血清および末梢血単核球の準備 (5～6 名の健常人よりプールする) が整い次第、再開する予定である。

今後並行して前臨床試験を進め、*ex vivo* 培養中にも memory phenotype を維持できるような OKT3 等の抗原刺激を用いない培養条件の決定と、白血病移植マウスへの移入モデルを構築してゆく。

分担研究者：村田 誠

HLA-B44 分子上に提示される UGT2B17 遺伝子由来マイナー抗原

<はじめに>

HLA 一致ドナー造血幹細胞移植において、患者マイナー抗原を標的としたドナー由来細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) による免疫応答は、GVHD や GVL 効果を誘導する。これまでに十数個のヒト・マイナー抗原が分子レベルで同定されており、我々も HLA-A29 分子上に提示される *UGT2B17* 遺伝子由来の 10mer ペプチドを同定し、その抗原機序がドナー細胞における *UGT2B17* 遺伝子の全長欠損に基づくことを報告した。今回我々は上記マイナー抗原を同定した移植患者の末梢血単核球から別の CTL クローン PL10 (HLA-B44 拘束性) を分離し、その標的遺伝子を同定したので報告する。

<方法>

細胞傷害性試験は Cr 遊離試験法を用いて、また IFN γ 放出能は ELISA を用いて調べた。遺伝子導入は電気穿孔法で行い、続いて puromycin により遺伝子導入細胞の選択を行った。

<結果>

多数の EBV-LCL に対する細胞傷害性試験の結果から、PL10 は *UGT2B17* 遺伝子陽性の HLA-B*4403 陽性 LCL を選択的に傷害することが分かった。*UGT2B17* 欠損 HLA-B*4403 陽性 LCL に *UGT2B17* cDNA を遺伝子導入すると、PL10 はこれを傷害した。また *UGT2B17* 陽性 HLA-B*4403 陰性 LCL に HLA-B*4403 cDNA を遺伝子導入すると、PL10 はこれを傷害した。以上より、PL10 は HLA-B*4403 分子上に提示される *UGT2B17* 由来のペプチドを認識していることが証明された。さらに *UGT2B17* cDNA の deletion mutant を作製し解析を行ったところ、PL10 は以前報告した A29 分子上に提示されるペプチドと同じペプチドを認識していることが分かった。またこのペプチドは B*4402 に対しても B*4403 とほぼ同程度の結合能を示すことが分かった (ペプチド結合試験)。

<考察>

少なくとも 2 つの異なる CTL クローンが *UGT2B17* 遺伝子を標的としていたことから、この遺伝子は移植後免疫応答において重要な役割を果たしていると考えられる。また HLA-B44 は日本人で比較的頻度が高いことから、移植後免疫応答における *UGT2B17* マイナー抗原の役割についてさらに詳細な解析を加えることは意義深いと考える。

AML の同種移植後再発に対する樹状細胞療法

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 門脇 則光、北脇 年雄、内山 卓

急性骨髄性白血病および高リスク骨髄異形成症候群に対する同種造血幹細胞移植後の再発
における、WT1 ペプチド提示ドナー樹状細胞による細胞免疫療法
(臨床第 I 相/前期第 II 相試験)

適格規準

- AML または RAEB-2
- 血縁ドナーからの移植後再発
- WT1 mRNA を発現する
- 患者およびドナーが HLA-A*2402 を有する
- 免疫抑制剤の中止が無効
- RAEB-2 では DLI が無効
- Grade 2 以上の急性 GVHD、広汎型の慢性 GVHD を発症していない

主要エンドポイント

- DC 投与終了後 6 ヶ月までの WT1 および KLH 特異的免疫パラメータの推移

副次的エンドポイント

- 以下の有害事象の発生
 1. DC 投与開始から DC 投与終了後 6 ヶ月以内の II 度以上の急性 GVHD または広汎型慢性 GVHD の発症頻度
 2. DC 投与開始から DC 投与終了後 6 ヶ月以内の NCI-CTC 3 度または 4 度の非血液毒性の発症頻度
- DC 投与終了後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月の時点での部分寛解率および完全寛解率

目標症例数

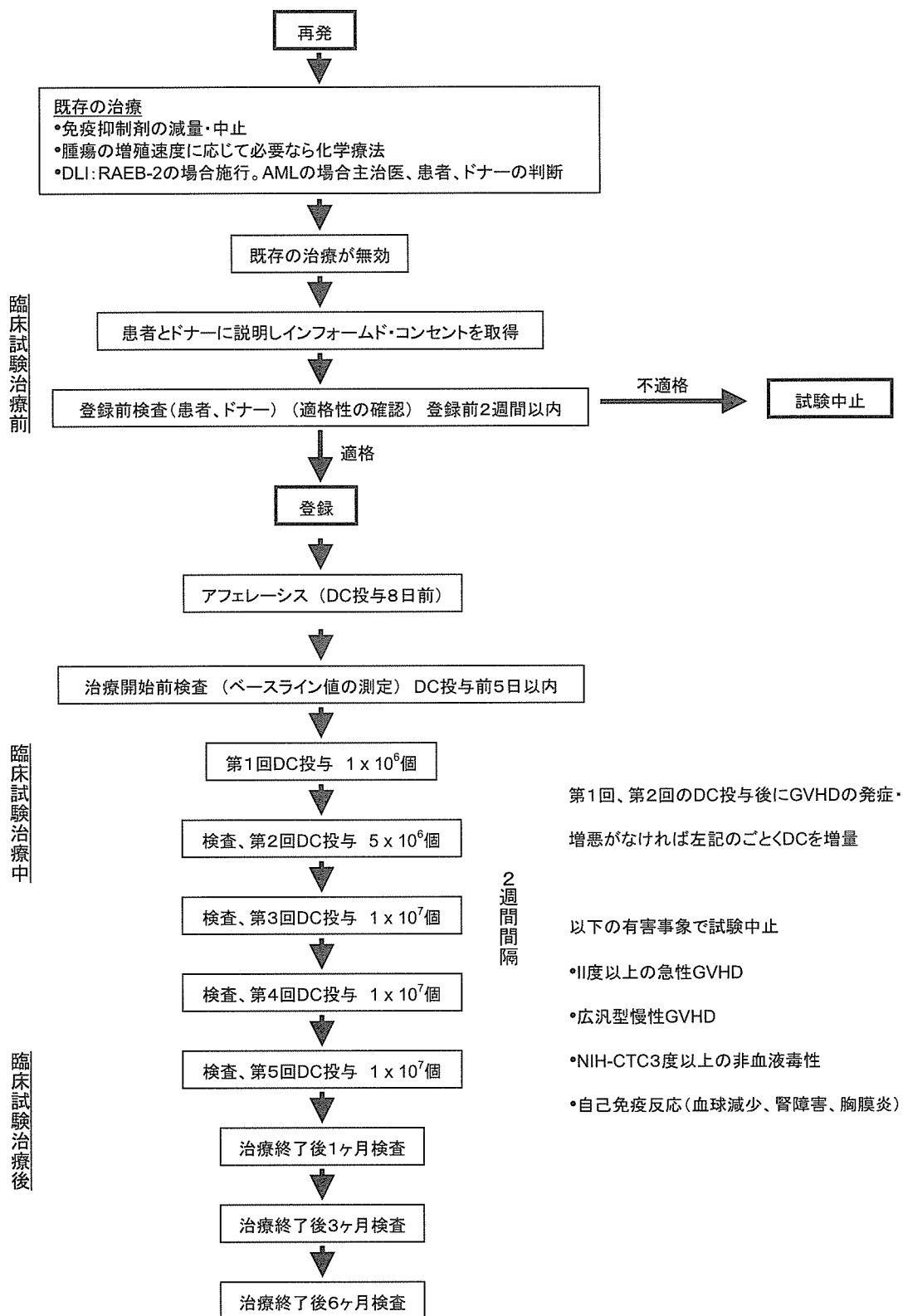
- 5 例

研究期間

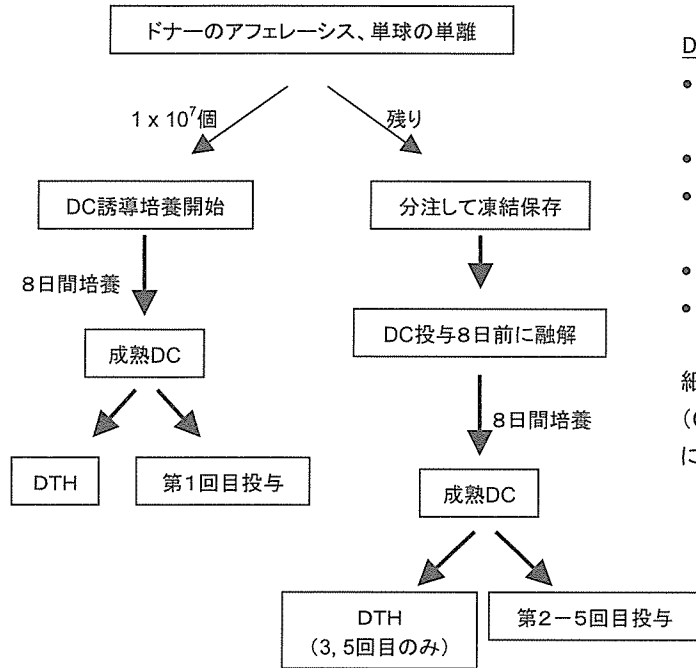
- 登録期間：2005 年 1 月 1 日から 2006 年 12 月 31 日までの 2 年間
- 患者の追跡期間：DC 投与終了後 6 か月
- ドナーの追跡期間：アフエレーシス終了後 1 週間

背景、および患者・家族向け情報は、<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/hematolindex.html>

フローチャート(登録・検査・治療のタイミング)



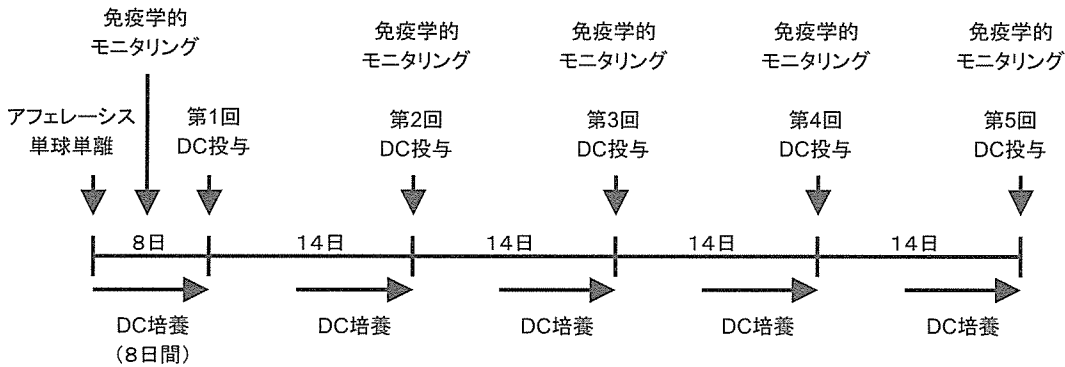
フローチャート(DC培養、DC投与、免疫学的モニタリング)



DC の培養法

- 単球を GM-CSF + IL-4 の存在下で6日間培養し、未熟 DC を誘導
- ヘルパー蛋白(KLH)を添加
- TNF- α , IL-1 β , IL-6, PGE₂ の存在下で 24 時間培養し、成熟 DC を誘導
- WT1 ペプチドを添加
- 患者の鼠径部皮内に投与

細胞培養は、京大病院分子細胞治療センター (Center for Cell and Molecular Therapy; CCMT) にて行う。



免疫学的モニタリング

時期

- 治療前5日以内
- 第2回DC投与前日または当日投与前
- 第3回DC投与前日または当日投与前
- 第4回DC投与前日または当日投与前
- 第5回DC投与前日または当日投与前
- DC投与終了1ヶ月後

項目

- 全般的な免疫能の回復(末梢血T細胞分画、免疫グロブリン)
- WT1テトラマー陽性細胞数(末梢血・骨髓)
- テトラマー陽性細胞の機能解析(末梢血・骨髓)
(表面マーカー、IFN- γ 細胞内染色、パーフォリン染色)
- IFN- γ ELISPOT(末梢血・骨髓)
- 細胞傷害試験(末梢血・骨髓)
- TCR spectratyping(末梢血・骨髓)
- WT1ペプチドおよびKLHに対するDTH

研究組織

主任研究者

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 教授 内山 卓

副主任研究者

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 講師 門脇 則光

〒 606-8507 京都市左京区聖護院川原町 54

Tel: 075-751-4964 Fax: 075-751-4963 E-mail: kadowaki@kuhp.kyoto-u.ac.jp

共同研究者

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 COE 特別研究員・助手 北脇 年雄

講師 堀 利行、講師 石川 隆之、助手 高折 晃史、助手 一戸 辰夫、助手 近藤 忠一、助手
山下 浩平、助手 錦織 桃子

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授 前川 平、講師 木村 晋也

京都大学医学部附属病院 腎臓内科 講師 深津 敦司

京都大学医学部附属病院 感染制御部 教授 一山 智、助教授 飯沼 由嗣

京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部 教授 福島 雅典

プロトコル作成委員

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 講師 門脇 則光

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 COE 特別研究員・助手 北脇 年雄

京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部 教授 福島 雅典

助手 手良向 聡、研究生 多田 春江

独立データモニタリング委員

京都大学医学部附属病院 消化器内科 教授 千葉 勉

三重大学医学部附属病院 第二内科 教授 珠玖 洋

東京大学医科学研究所附属病院 外科 教授 田原 秀晃

統計解析責任者

京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部 助手 手良向 聡

登録・データセンター

京都大学医学部附属病院探索医療センター検証部 研究生 多田 春江

研究事務局

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

Tel: 075-751-4964 Fax: 075-751-4963 E-mail: kadowaki@kuhp.kyoto-u.ac.jp

臨床試験実施チーム

試験責任医師

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 教授 内山 卓

試験分担医師

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 講師 門脇 則光、COE 特別研究員・助手 北脇 年雄

末梢血単核球細胞分離

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授 前川 平、講師 木村 晋也、技官 笠井 泰成

京都大学医学部附属病院 腎臓内科 講師 深津 敦司

投与細胞検査および感染予防

京都大学医学部附属病院 感染制御部 教授 一山 智、助教授 飯沼 由嗣、技官 前田 重隆

京都大学医学部附属病院 中央検査部 技官 大森 勝之

樹状細胞の誘導

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 講師 門脇 則光、COE 特別研究員・助手 北脇 年雄、

技術補佐員 福永 桂子

免疫学的解析

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 講師 門脇 則光、COE 特別研究員・助手 北脇 年雄、

技術補佐員 福永 桂子、技術補佐員 岸畑 雅子

厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「骨髄、末梢血等を利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立並びにドナー及びレシピエントの安全確保とQOL向上に関する研究」班

Alloantigen Expression on Both Antigen Presenting Cells and Tumor Is Required To Elicit an Effective GVL Response after Experimental Allogeneic BMT

岡山大学医学部付属病院 血液・腫瘍内科
前田嘉信、谷本光音

Graft versus Host Disease (GVHD) and Graft versus Leukemia (GVL)

- Allogeneic BMT is a potentially curative therapy against many hematologic malignancies
- The GVL effect mediated by donor T cells after allogeneic BMT is responsible for the potent immunotherapeutic efficacy
- GVL is tightly linked to acute GVHD, the major complication of allogeneic BMT

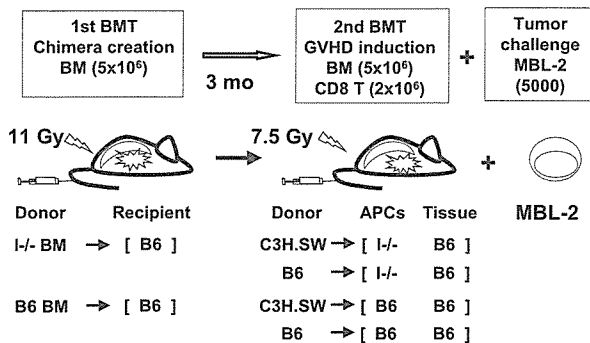
Antigen Presenting Cells (APCs), alloantigen expression and GVHD

- Donor T cell interaction with host APC is critical for induction of GVHD
- Alloantigen expression on APCs alone is sufficient for causing GVHD
- Donor T cell interaction with donor APCs exacerbates the severity of GVHD
- The interactions between donor T cells, APCs and the role of alloantigen expression in GVL are not known

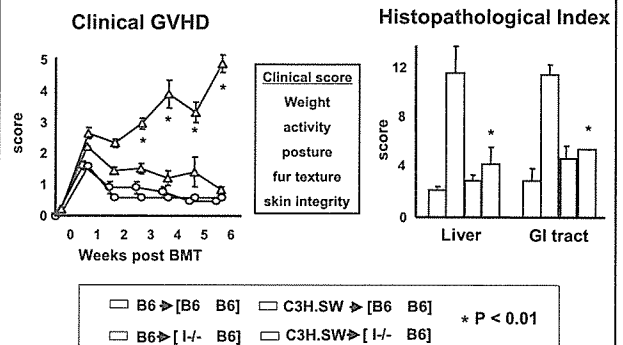
Hypothesis

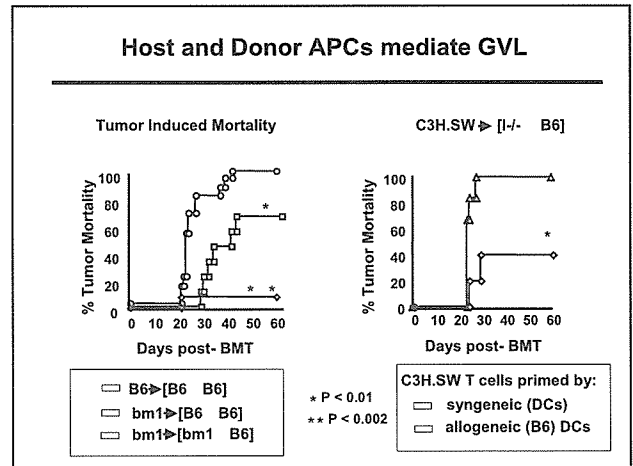
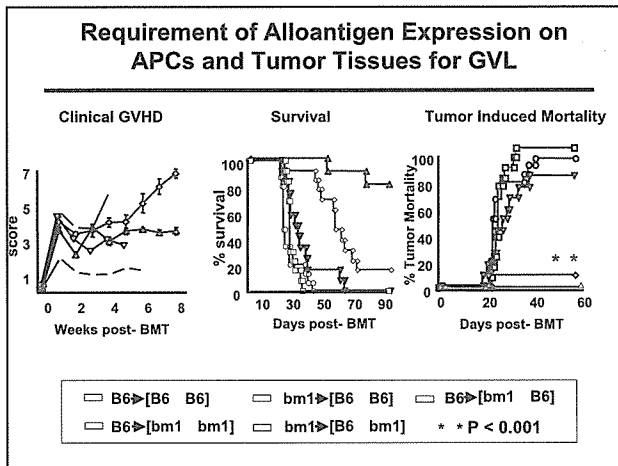
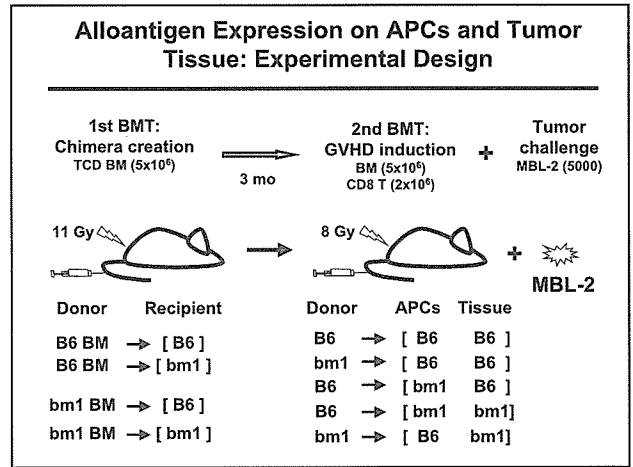
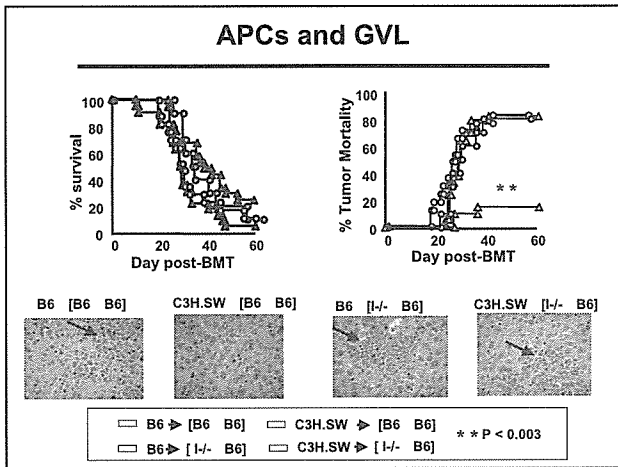
Presentation of alloantigen and / or tumor associated antigens by antigen presenting cells is critical for GVL after experimental allogeneic BMT

Experimental design



APCs and GVHD





Conclusion

- APCs are an absolute requirement for GVHD and GVL
- Alloantigen expression on APCs alone is insufficient to induce GVL
- Expression of alloantigen on both APCs and tumor tissues is required to elicit maximal GVL
- Host APCs mediate a more robust GVL response than donor type APCs

Acknowledgements

Reddy Pavan
 James L.M. Ferrara
 Blood and Marrow Transplantation Program
 Division of Hematology-Oncology
 University of Michigan Comprehensive Cancer Center
 Ann Arbor, MI

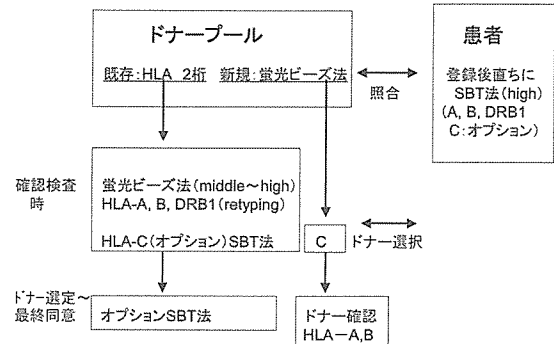
2005年7月2日

II. 造血幹細胞移植と組織適合性抗原

14. JMDPにおけるHLA検査法とコーディネイトの変更

森島泰雄
 愛知県がんセンター中央病院
 血液・細胞療法部

JMDPにおけるHLA検査とコーディネイト



・ドナーの確認検査時のオプション検査はしたほうがよいのか。

HLA-Cは必要か

HLA-A B DRB1のSBT法は必要か

ドナー選択におけるHLA座優先順位とその成績(1)

順位	A	B	C	DR B1	n	3年生存	6年生存	P	A-GVHD (grade3,4)	P
1	○	○	○	○	1128	58%	52%	-	13%	-
2	○	○	○	×	219	55	53	0.745	14	0.536
3	○	○	×	○	371	54	45	0.052	20	0.001
4	○	○	×	×	172	49	48	0.011	28	<0.0001

○適合 ×不適合(1又は2抗原) *血清型適合
 同一座2抗原不適合はデータなし(A4例、B1例、C10例、DRB1 5例)

ドナー選択におけるHLA座優先順位

順位	A*	B*	DRB1*	C
1	○	○	○	○
2	○	○	×	○
3	○	○	○	×**
4	○	○	×	×**
5-a	×	○	○	○
5-b	○	×	○	○
6	2座不適合(4を除く)			
7	3座不適合			

○適合 ×不適合(1又は2抗原) *血清型適合 **KIR

ドナー検索時の評価点 未検査 C 300点

A*	B*	DRB1	点数	C*	最終点数	ドナー 選択 順位
適合800点	適合800点	適合300点		適合400点		
○	○	○	1900	○	2300	1
○	○	○	1900	×	1900	3
○	○	×	1600	○	2000	2
○	○	×	1600	×	1600	4
×	○	○	1100	○	1500	5
○	×	○	1100	×	1100	6
×	○	×	800	○	1200	6
○	×	×	800	×	800	7
×	×	○	300	○	700	6
×	×	○	300	×	300	7
×	×	×	0	○	400	7
×	×	×	0	×	0	8

抗原	N=	遺伝子 頻度	蛍光ビーズ法 高頻度アリル	SBT法 確定アリル	N=	抗原型内 頻度
A1	67	0.38%	0101	0101	14	100.00%
A2	4,274	24.35%	0201	0201	1,818	43.88%
			0201	0275	1	0.02%
			0203	0203	4	0.10%
			0205	0205	1	0.02%
			0206	0206	1,548	37.36%
			0207	0207	700	16.90%
			0207	0215N	3	0.07%
			0210	0210	51	1.23%
			0211	0211	1	0.02%
			0218	0218	10	0.24%
			0228	0228	5	0.12%
			0242	0242	1	0.02%

抗原	N=	遺伝子 頻度	蛍光ビーズ法	SBT法	N=	抗原型内 頻度
A24	6,971	39.72%	2402	2402	2,473	97.67%
			2402	2425	1	0.04%
			2402	2449	1	0.04%
			2408	2408	2	0.08%
			2420	2420	55	2.17%
A26	2,225	12.68%	2601	2601	1,391	64.97%
			2601	2624	1	0.05%
			2602	2602	350	16.35%
			2603	2603	384	17.94%
			2605	2605	14	0.65%
			2606	2606	1	0.05%
A31	1,320	7.52%	3101	3101	509	99.80%
			3101	3111	1	0.20%

Effect of HLA genotype mismatching on survival

Genotype mismatch	n	死亡数	平均生存期間(日)	p value
Full match	916	406	1915	
A0201-0206	69	42	1216	p<0.001
A0201-0207	16	10	1491	p=0.19
A0206-0207	15	6	1923	p=0.62
A2601-2603	10	7	450	p=0.003
A1101-1102	15	5	1743	p=0.61
C0801-0803	14	7	1751	p=0.89
DQ0302-0303	17	6	1443	p=0.38

Total n=2469

Effect of HLA-A genotype mismatching on aGVHD

Genotype mismatch	n	AG2度以上 (%)	p value	AG3度以上 (%)	p value
Full match	916	42.4		22.9	
A0201-0206	69	56.9	p=0.007	38.5	p=0.001
A0201-0207	16	43.8	p=0.9	18.8	p=0.71
A0206-0207	15	53.3	p=0.25	26.7	p=0.62
A2601-2603	10	60.0	p=0.19	50.0	p=0.019
A1101-1102	15	33.3	p=0.37	20.0	p=0.77

患者のHLA検査を早期に実施する理由は

1. 患者HLA4桁とドナー4桁の照合で直ちにド

ナー選択

2. 稀な遺伝子型の場合には適合ドナーが見

出される可能性が少ないことが判り、他の移植法などの選択が早期に可能。

患者のHLA検査をSBT法で検査する理由は

1. 海外ドナー検索がNMDPコードで可能
2. 市販の蛍光ビーズ法での精度が不十分

HLA-DNAタイピングの意義に関する研究

分担研究者: 笹月 健彦 (国立国際医療センター)

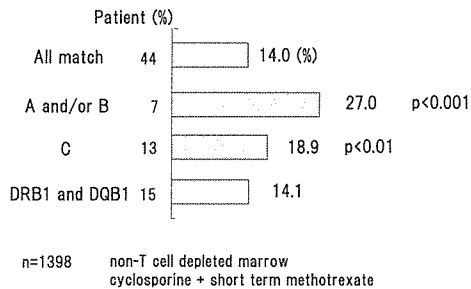
研究協力者: 山本 健 (九州大学生体防御医学研究所)

これまでの研究活動

- 1) HLAクラスII、特にHLA-DQB1タイピングとクラスIIミスマッチが急性GVHD、生存に与える影響の検討
- 2) HLAクラスII、DPB1タイピングの分担とミスマッチが急性GVHD、生存に与える影響の検討

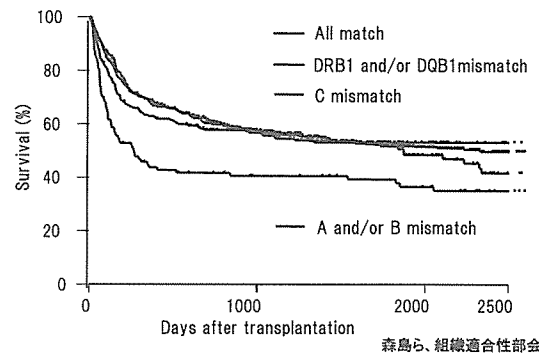
(組織適合性部会における共同研究)

HLA allele matching and incidence of acute GVHD (grade III-IV)



森島ら、組織適合性部会

HLA single locus mismatch and survival



Summary

Acute GVHD	class I HLA-A, B, C single mismatch
	class II DRB1, DQB1, DPB1 mismatch は単独では有意な危険因子として採択されない
Chronic GVHD	class I HLA-A and/or B mismatch
Engraftment failure	class I HLA class I mismatch
Leukemia relapse	HLA mismatch は有意な危険因子として採択されない
Survival	class I HLA-A, B single mismatch
	class II C, DRB1, DQB1, DPB1 mismatch は単独では有意な危険因子として採択されない

森島ら、組織適合性部会

17年度の方針(案)

- 1) 組織適合性部会の研究活動に則ったHLAタイピングの実施
- 2) HLAクラスIIのアレルレベル(DRB1-DQB1ハプロタイプレベル)でのミスマッチの組み合わせと急性GVHD、生存についての解析

ゲノムワイドな マイナー組織適合抗原の探索

東海大学医学部
分子生命科学
菊地智樹 猪子英俊

新たなマイナー抗原探索のアプローチ

- 現在までに報告されている約10種類のヒトマイナー抗原の同定には、すべてマイナー抗原を認識するCTLを樹立する方法がとられていた。
- 今回マイナー抗原新規同定への新たなアプローチは、「マイクロサテライトマーカーを用いたマッピング」を応用し新規マイナー抗原を探索しようとするものである。

マイナー組織適合抗原 (minor histocompatibility antigens, mHa)

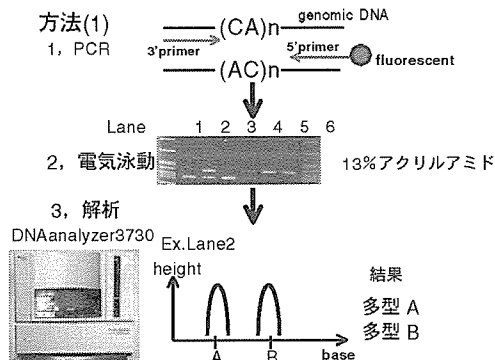
- HLA一致同胞間の造血幹細胞移植においてもGVHD (graft versus host disease) が発症しうる。
- その背景としてHLA以外にも免疫応答に関与する抗原があると考えられ、それらをマイナー組織適合抗原 (mHa) という。
- 現在までにマイナー抗原の多くは、donorとrecipientの間のsingle nucleotide polymorphism(SNP) に由来することが明らかにされ、造血幹細胞移植および悪性腫瘍に対する免疫療法での役割が注目されている。

マイクロサテライト多型

- 2~7塩基を単位とするDNAの繰り返し配列
- SNPよりも豊富な多型が認められる (多いものでは10種類以上)
- 高いヘテロ接合性

Ex. AAGTCACACACAGTTG (CA)4
AAGTCACACACACAGTTG (CA)6
AAGTCACACACACACAGTTG (CA)7

マッピングに適した良好な遺伝マーカーである



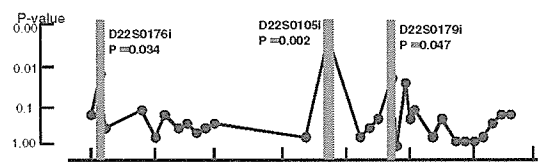
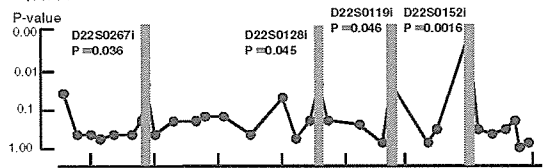
対象

- JMDPが管理しているHLA-A,B,C,DR,DQ locusが一致した同種造血幹細胞移植例0例

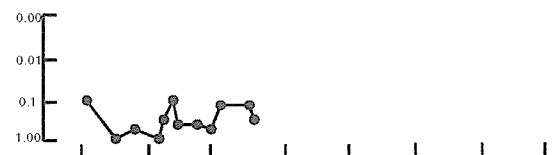
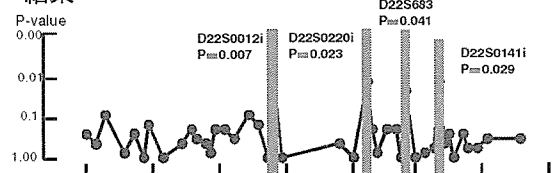
- 対象疾患
急性骨髄性白血病症例 20 pairs
急性リンパ性白血病症例 10 pairs
慢性骨髄性白血病症例 20 pairs

GVHD 頻度別
grade 0 25例
grade III+IV 25例(III 17例+IV 8例)

結果



結果



考察

- GVHD発症例 (gradeIII+IV群) に「不一致」が多いマーカー
D22S0267i D22S0128i D22S0176i D22S0179i
D22S0220i D22S683 D22S0141i
→マーカー近傍にmHa候補遺伝子の存在が示唆される
GVHD未発症例 (grade0) に「不一致」が多いマーカー
D22S0119i D22S0152i D22S0105i D22S0012i
→今後の検討が必要

まとめ

- ゲノムワイドなマイナー組織適合抗原探索において、ヒト22番染色体長腕にGVHD発症と関連が示唆される遺伝マーカーが10種同定された。
- 今後は今回同定されたマーカーの近傍領域のSNP検索を行いたい。

「NK細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型と非血縁者間造血幹細胞移植成績」

東京都赤十字血液センター技術部、検査部

柏瀬貢一、平安恒幸、屋部登志雄

愛知県がんセンター病院血液・細胞療法部

森島泰雄

1、HLA-C抗原KIRリガンド適合性

本研究班では血縁者間骨髄移植においてHLA-C抗原不適合は単独で急性重症GVHD発症、さらに他抗原不適合と複合すると生存率低下を引き起こすことを報告してきた（笹月ら、NEJM 1998）（森島ら Blood 2002）。HLA-C抗原はNK細胞受容体KIRからも認識され（KIRリガンド特異性と呼ばれる）、GVH方向KIRリガンド不適合では急性重症GVHD発症が高く生存率が低下し、拒絶方向不適合では移植片生着率が低下するという結果が得られ、ドナー選択にKIRリガンド特異性を考慮してHLA-C抗原を適合させることが重要であることが判明した。

2、KIR遺伝子型適合性

KIR遺伝子は遺伝子座の数やアレルの種類が個人で異なるという特殊な多型性を示す。そこで16種類のKIR型遺伝子の有無を検出するPCR-SSPの系で患者、ドナーのKIR型解析を行ってきた。ドナーのKIR遺伝子型と患者KIRリガンド型の組み合わせが急性重症GVHD発症に影響する結果を得ているのでさらに詳細な解析を行う。

3、LILR遺伝子型適合性

LILRはNK, DC, 顆粒球細胞などで発現する活性化型ならびに抑制型の11種類からなるHLAクラス I 抗原認識ペア型受容体ファミリーである。LILRの相同分子であるマウスPIR抑制型受容体のノックアウトで急性GVHDの重症化が報告された。本解析ではLILRの多型及び機能解析を行い移植成績への関与の解明を目指している。

4、サイトカイン遺伝子多型

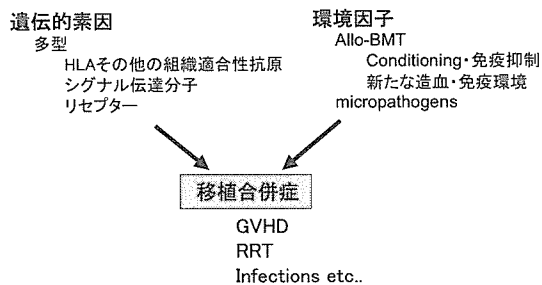
我々は200症例の患者、ドナーのサイトカイン遺伝子多型解析を行い移植成績への影響を報告した（石川ら、平成13-14年度）。その後、血縁者間HLA一致移植において患者のIL-10遺伝子型と急性GVHD発症との相関が示され（佐治ら、16年度報告）またNK細胞受容体発現にIL-10が重要な働きを担うことも報告された。本解析ではIL-10をはじめとしたサイトカイン遺伝子多型性のNK細胞受容体発現への影響と非血縁者間骨髄移植成績の関連について検討を予定している。

大規模SNPタイピングによる非血縁者間移植合併症の遺伝的背景の探索

東京大学医学部造血再生医療寄付講座
日本科学技術推進財団 戦略的創造研究推進事業(CREST)

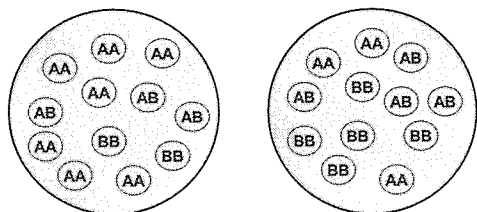
小川誠司

造血幹細胞移植における合併症とその遺伝的背景



⇒ 移植合併症の発症に関与する遺伝的背景を探索する

方法:全ゲノム関連解析を用いた後方的疫学研究

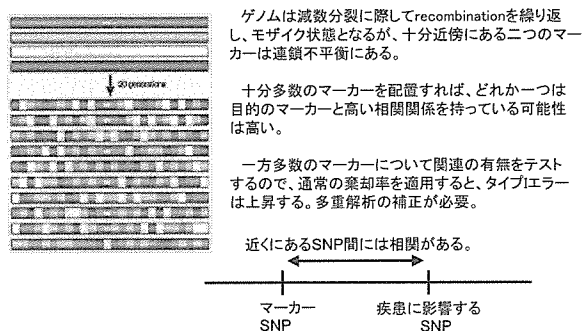


合併症(+)

合併症(-)

疾患群と相関のあるSNPを見いだす。

連鎖不平衡と全ゲノム関連解析



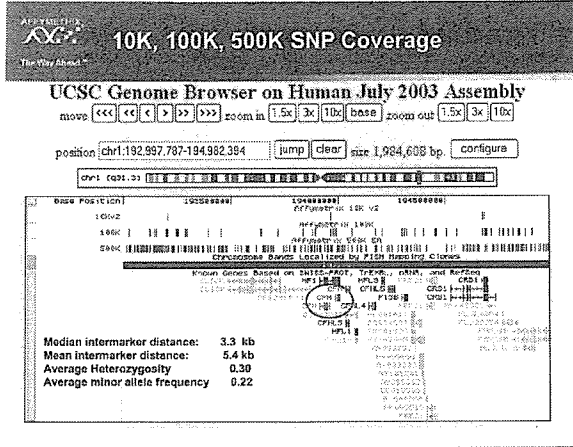
ゲノムは減数分裂に際してrecombinationを繰り返す、モザイク状態となるが、十分近傍にある二つのマーカーは連鎖不平衡にある。

十分多数のマーカーを配置すれば、どれか一つは目的のマーカーと高い相関関係を持っている可能性は高い。

一方多数のマーカーについて関連の有無をテストするので、通常の棄却率を適用すると、タイプエラーは上昇する。多重解析の補正が必要。

近くにあるSNP間には相関がある。

マーカー SNP 疾患に影響する SNP



研究デザイン

対象

日本骨髄バンクを通じて行われた非血縁骨髄移植のドナーおよびレシピエント:1000-1500例
主要な目的は急性GVHDの発症に関与するマイナー抗原その他の多型の同定
層別化はaGVHDの研究に主眼をおいて行われる。

方法

ドナー・レシピエントについて、Affymetrix GeneChip 500Kアレイによる52万SNPsのタイピングを行い、移植合併症に関する全ゲノム関連解析により、関連を示すSNPを同定する。

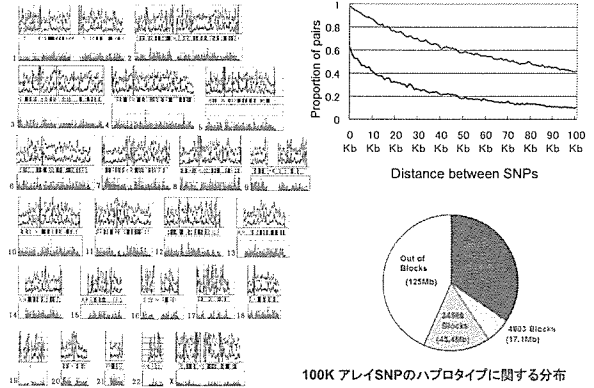
CMV disease, reactivation
Hemorrhagic cystitis
BO
Cataract etc

同定されたSNP近傍のマーカーを用いて標的領域の詳細なマッピングをおこない、責任遺伝子の候補を同定する。

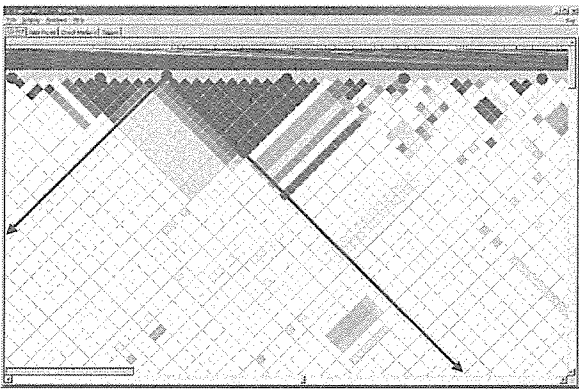
研究の進行状況

Typing systemの検討
 500Kアレイのリリース待ち
 現在EA arrayによる予備検討中
 Call rate ~97-98%
 Reproducibility 99.97%
 9月よりタイピングを開始
 解析パワーの統計的な解析等
 HLA 10座のDNAタイピング
 日本赤十字東京血液センター
 バンク試料のLCL化事業
 愛知県がんセンター
 東海大学

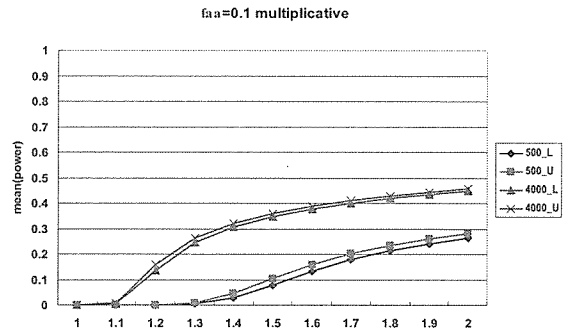
100Kアレイでみた日本人における連鎖不平衡



Phase-I Data from the International HapMap Project

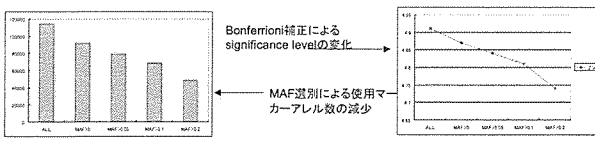
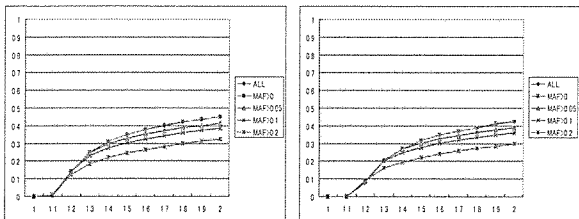


HapMap phase-I data を用いた100Kアレイによる解析powerの評価 (多因子疾患モデル)



MAFによる選別の効果

Mean(MaxPower) Faa=0.1, multiplicative P(MaxPower>0.8)



研究の可能性

- GVHDIに關する多型の解析を目的としてタイピングする集団である
 - バイアスの高いサンプリングになる可能性がある
- 十分な疾患群が得られるか?
- データの信頼性は十分か?
- 結果の確認のための新たな症例は確保できるか?
- タイピングデータの再利用で解析が可能
- 非常に高いリスクを有する多型であれば検出できるチャンスがある
- 今後の新たな試料のリクルートの可能性

平成17年度第1回班会議
移植後肺合併症と遺伝子多型性

東海大学医学部血液内科 鬼塚真仁

東海大学医学部分子生命科学 猪子英俊

1. 研究の背景

移植後合併症としての肺合併症は 30～60%の発症率とされるが、非感染性の肺合併症である Non-infectious pulmonary dysfunction (NIPD) は 7～17%を占める移植後肺合併症である。NIPD の致死率は 70%と極めて高く、移植後患者における死因の3位となっている。しかしながら予防法、治療法が確立されておらず、その発症のメカニズムも多く点で不明である。現在、我々は移植後肺合併症に関わる遺伝子多型性をドナー・レシピエントに関して調査中であり、進捗状況を報告することとする。

2. 対象

骨髄移植推進財団を介して行われた、造血幹細胞移植ドナー・レシピエント774ペアを対象とし、サイトカイン、ACE、angiotensinogen、TGF β における多型性を調査中である。今回は ACE 多型性、IL10 プロモーター領域の多型性と移植後肺合併症に関して報告する。

3. 結果

121症例で移植後肺合併症を認めた。そのうち CMV、カリニ肺炎といった感染症が47症例、NIPD が64症例であった。NIPD 発症群、非発症群の間にACE多型性の有意な偏りは認められなかった。NIPD 発症群では DD < ID < II の順に発症日が有意に遅くなった。つまり、早期の NIPD では DD が、晩発生の NIPD では II が多くなる傾向を示した。

ドナー・レシピエントの関連では、両者が DD を持つ症例では NIPD の発症率が有意に高率であった。IL10 プロモーター領域の多型性に関しては移植後肺合併症と有意な関連を見いだすことはできなかったが、途中経過であり、全症例を施行後再度報告することとする。

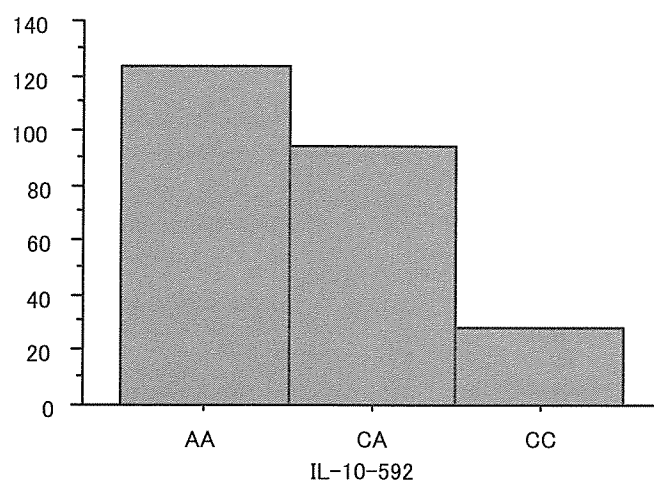
Table.1 全症例を対象とした ACE 解析

		Donor ACE polymorphisms			
		DD	ID	II	
Recipient ACE	DD	21	62	42	125
	ID	61	197	130	388
	II	49	130	80	260
合計		132	389	252	773

Table.2

		Donor ACE polymorphisms			
		DD	ID	II	
Recipient ACE	DD	5	7	6	18
	ID	11	26	27	64
	II	6	20	13	39
合計		22	53	46	121

Table 3



移植前処置経口大量 busulphan の体内動態の解析

- 対象
造血器悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植 (自家・同種)
BU + CY、BU + CY + TBI、BU + L-PAM + CY
- Busulphan
マブリン酸 (100 倍微)
1 mg/kg を 8 時間毎計 16 回 (BU + CY)、または計 8 回 (BU + CY + TBI、BU + L-PAM + CY)
- 採血ポイント
1 回目の投与直前、投与後 15, 30, 45, 60, 90 分、2, 3, 4, 5, 6 時間
個体内変動および蓄積性の検討のため、一部の症例で、13 回目 (BU + CY) の投与直前、投与後 30, 60, 90 分、2, 4, 6 時間
- 測定法
GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry) 法
北里大学薬学部 臨床薬学研究センター 中務部門

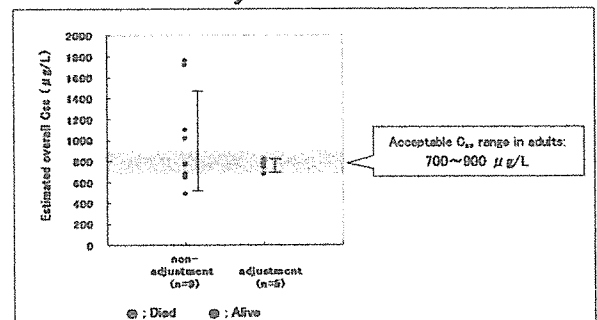
移植前処置経口大量 busulphan の体内動態の解析
～ 患者背景 ～

UPN	Age	Sex	Diagnosis	Status	Donor	Graft	Conditioning
01	32	M	ALL (L2)	1CR	Sibling	BM	BU + CY
02	12	M	AML (M2)	2REL	Unrelated	BM	BU + CY + TBI
03	16	F	ALL (L2)	1REL	Sibling	BM	BU + L-PAM + TBI
04	58	M	MDS (overt)	PIF	Auto	PBSC	BU + CY
05	55	M	AML (M1)	Untreated	Sibling	BM	BU + CY
06	63	F	AML (M3)	2CR	Auto	PBSC	BU + CY
07	52	M	AML (M2)	1PR	Sibling	BM	BU + CY
08	51	M	AML (M5a)	1CR	Sibling	BM	BU + CY
09	29	F	CMMoL	PIF	Twin	PBSC	BU + CY

移植前処置経口大量 busulphan の体内動態の解析
～ 解析結果および患者転帰 ～

UPN	1st dosing		13th dosing		Acute GVHD	Chronic GVHD	Complications	Relapse	Outcome
	AUC _{0-8h} (μg·h/L)	C _{ss} (μg/L)	AUC _{0-8h} (μg·h/L)	C _{ss} (μg/L)					
01	5560	927	8110	1362	-	EX	-	N	Alive 29 mo
02	4628	771	ND	ND	IV	EX	HC (adv)	N	Alive 28 mo
03	10294	1716	ND	ND	III	-	IP (unknown)	N	Died 8 mo (IP)
04	2409	401	3732	622	Auto	Auto	-	Y	Died 3 mo (relapse)
05	3748	624	4501	854	-	EX	-	N	Alive 17 mo
06	3840	640	4233	705	Auto	Auto	-	N	Alive 16 mo
07	12030	2005	9980	1663	III	NE	TMA	N	Died 1 mo (TMA)
08	7516	1263	5173	1139	-	-	HC (adv)	N	Alive 12 mo
09	7244	1207	ND	ND	NE	NE	NE	NE	NE

Dose Adjustment Effects



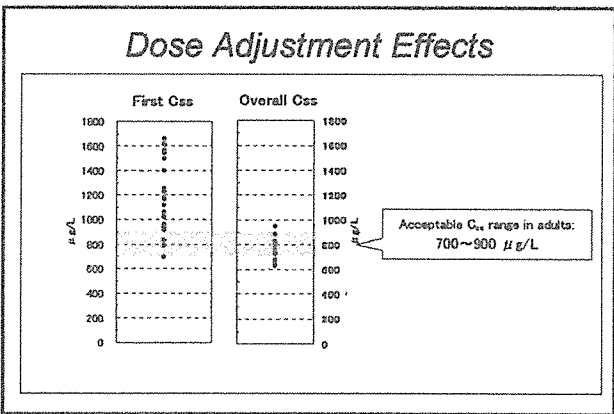
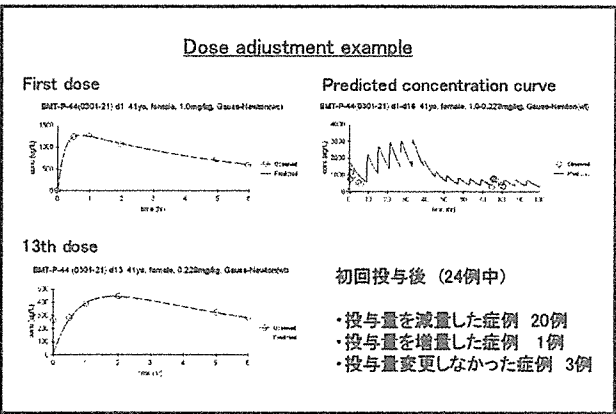
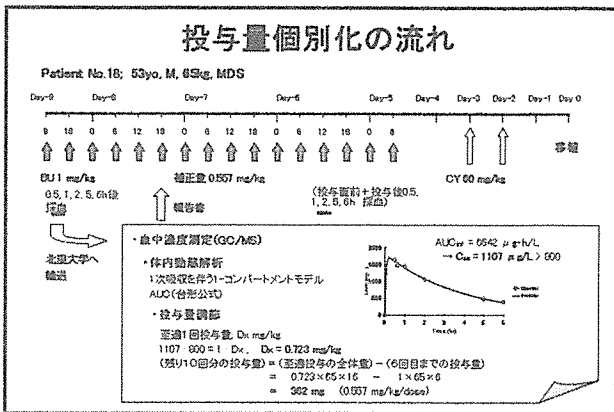
移植前処置経口大量 busulphan の体内動態の解析
～ 結果および考察 ～

- 9 例の経口大量 BU (1 mg/kg) の血中濃度解析において、AUC は 2409 ~ 12030 μg·h/L、C_{ss} は 401 ~ 2005 μg/L と、最大約 5 倍の患者間差を認め、高濃度を呈した 2 例において移植関連死亡を認めた。
- 毒性の出現を最小限に止めるために、患者個々における BU の用量調節が必要であることが明らかとなった。
- 6 ポイントの血中濃度採血によって AUC および C_{ss} を推定する limited sampling model を構築した。
- BU の目標 C_{ss} を設定し、1 回目の BU (1 mg/kg) 内服後の血中濃度解析により推定される C_{ss} から、BU の至適投与量を算出し、途中から BU 内服量を調節する targeted dose adjustment を提案する。

造血器疾患に対するターゲット・ブスルファンとシクロホスファミドを前治療として用いた造血幹細胞移植に関する研究
臨床第 II 相試験

- 対象
- (1) 同種造血幹細胞移植が適応となる、造血器疾患患者。AML、CML、MDS のうちのいずれか。CML (BC) は除く。
- (2) 年齢: 16 歳以上 65 歳以下。
- (3) HLA 適合同胞ないし HLA 表現型適合血縁者ドナーを有する。あるいは HLA 遺伝子型 6 座一致または HLA-A/B 遺伝子型一致 DRB1 遺伝子型 1 座不一致の非血縁ドナーを有する。
- (4) 初回造血幹細胞移植である。
- (5) Performance status (ECOG) が 2 以下である。
- (6) 文書による同意が得られている。

- 前処置: BUマブリン散 (100 倍微) 1mg/kg を 6 時間毎計 16 回投与
CY 60mg/kg/day × 2day 点滴静注
- AUC および C_{ss} 算出のための採血ポイント (6 ポイント)
投与前、1 回目の投与後 30分, 1, 2, 5, 6 時間
- BU の dose adjustment
C_{ss} の目標を 700~900 μg/L として、北里大学での解析結果に基づき、
7 回目 (3 日目午前 0 時) 以降の投与量を調節
- エンドポイント
主要評価項目: 移植後1年での短期的生存率
副次的評価項目: 無病生存 (DFS) 期間、全生存 (OS) 期間、ブスルファンの
薬物動態、急性GVHDの頻度とその重症度、慢性GVHDの頻度とその
重症度、VODの頻度とその重症度、前治療による毒性(移植後28日以内)、
移植後100日以内の全死亡 (day-100 mortality)、造血回復までの
期間、疾患ごとの生存期間と無病生存期間
- 予定症例数: 50例



登録進捗状況

患者ID	登録日時	登録状況
00000001	00000001	0
00000002	00000002	0
00000003	00000003	0
00000004	00000004	0
00000005	00000005	0
00000006	00000006	0
00000007	00000007	0
00000008	00000008	0
00000009	00000009	0
00000010	00000010	0
00000011	00000011	0
00000012	00000012	0
00000013	00000013	0
00000014	00000014	0
00000015	00000015	0
00000016	00000016	0
00000017	00000017	0
00000018	00000018	0
00000019	00000019	0
00000020	00000020	0
00000021	00000021	0
00000022	00000022	0
00000023	00000023	0
00000024	00000024	0
00000025	00000025	0
00000026	00000026	0
00000027	00000027	0
00000028	00000028	0
00000029	00000029	0
00000030	00000030	0
00000031	00000031	0
00000032	00000032	0
00000033	00000033	0
00000034	00000034	0
00000035	00000035	0
00000036	00000036	0
00000037	00000037	0
00000038	00000038	0
00000039	00000039	0
00000040	00000040	0
00000041	00000041	0
00000042	00000042	0
00000043	00000043	0
00000044	00000044	0
00000045	00000045	0
00000046	00000046	0
00000047	00000047	0
00000048	00000048	0
00000049	00000049	0
00000050	00000050	0

- ### まとめ
- BU の目標 C_{ss} を 700~900 μg/L に設定し、初回の BU (1 mg/kg) 内服後の血中濃度解析により推定される C_{ss} から、BU の至適投与量を算出し、途中から BU 内服量を調節する targeted dose adjustment を提案し第 II 相試験を実施している。
 - 本試験において投与量の調節は予定どりに施行されていることが定期モニタリングで確認された。
 - 「造血器疾患に対するターゲット・ブスルファンとシクロフォスファミドを前治療として用いた造血幹細胞移植に関する研究」臨床第 II 相試験に登録・ご協力をお願いします。