

造血幹細胞移植後再発白血病に対する
自費遺伝子導入ドナーTリンパ球輸注療法

臨床研究
筑波大学遺伝子細胞治療グループ
研究代表者: 長見 俊郎

筑波大学血液内科
No. 10
2006. 6. 3



筑波大学
University of Tsukuba

Cell Processing in TK-DLI

Good Manufacturing
Procedure (GMP)



Lymphocyte apheresis



Cryopreservation



Transduction and separation



Cell expansion

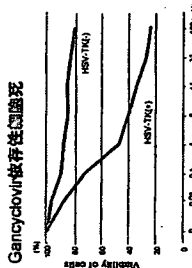


Safety tests

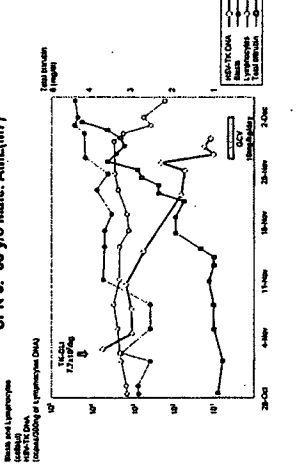
- 目的
 - 同和造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルス・ラシステキナーゼ(HSV-TK)導入リンパ球を用いたドナーTリンパ球輸注療法の安全性および有効性を確認する。
- 対象症例
 - 移植後再発白血病(AML, ALL, CML), MDS
- 評価項目
 - 安全性
 - GVLD効果
 - GVHDに対するgancyclovirの効果

HSV-TKリンパ球投与前検査項目

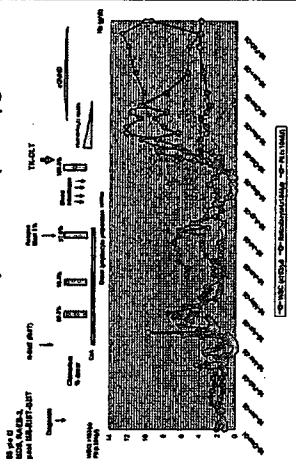
- 培養細胞、増殖上昇
 - 細菌・真菌培養
 - マイコプラズマ染色
 - PCR
 - エンドキシン定価
 - 細胞性レトロウイルス
 - Env-PCR
 - RT活性
 - S-L-アッセイ



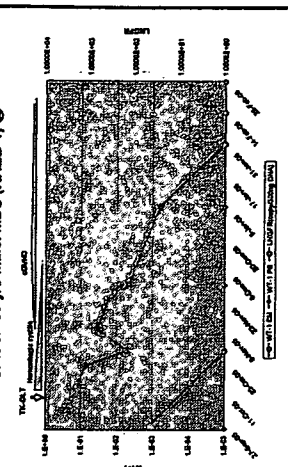
UPN 3. 60 y/o Male. AML(M7)



UPN 6. 58 y/o Male. MDS (RAEB-1)①



UPN 6. 60 y/o Male. MDS (RAEB-1)②

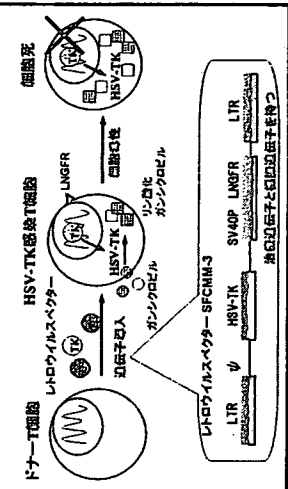


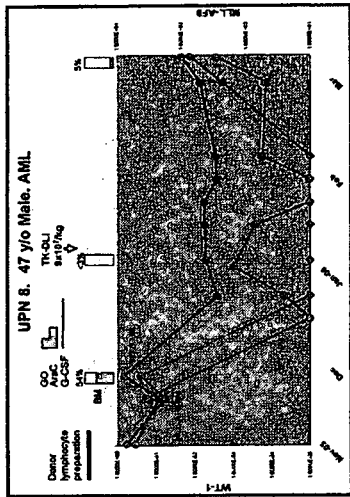
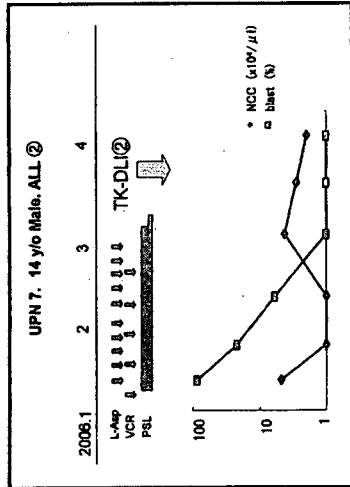
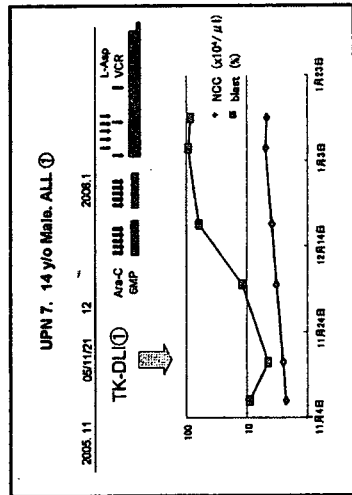
TK-DLI 現在までの投与例

(2006年6月現在)

UPN	Age	Sex	Disease	TK-DLI Number	CD34+ (%)
60	M	AML	2004/1/2	7.7 × 10 ⁷	7.7 × 10 ⁷
58	M	MDS	2005/10/3	9.5 × 10 ⁷	9.5 × 10 ⁷
14	M	ALL	2005/1/21	6.7 × 10 ⁷	6.7 × 10 ⁷
			2006/2/22	17.0 × 10 ⁷	17.0 × 10 ⁷
47	M	AML	2008/1/10	8.5 × 10 ⁷	8.5 × 10 ⁷
			2008/3/24	8.5 × 10 ⁷	8.5 × 10 ⁷
50	M	ALL	2008/4/21	8.6 × 10 ⁷	8.6 × 10 ⁷

HSV-TKを用いた遺伝子治療の原理





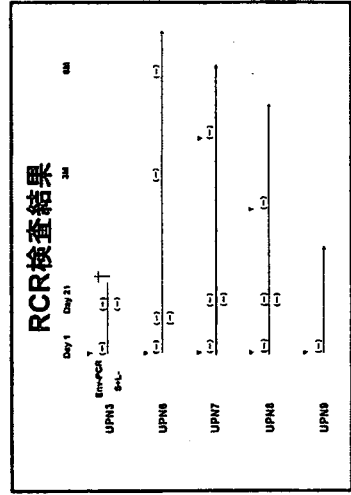
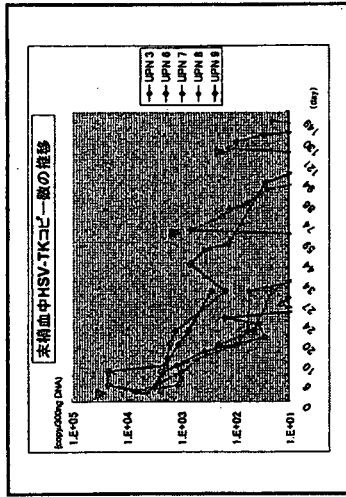
UPN 9. 50 y/o Male. ALL

検査日 Day Day

HSV-TK/DLI投与結果

(2006年5月現在)

病名	病期	投与時期	副作用	GVHD (GVHDなし)	GVHD (GVHDあり)
AML	急性・急性寛解期	一回的にあり	なし	なし	なし
MDS	寛解期が寛重	何度もあり	なし	なし	なし
ALL	寛解期が寛重	何度もあり	なし	なし	なし
AML	慢性寛解期 (分子生学的寛解)	一回的にあり	なし	なし	なし
ALL	寛解期が寛重	何度もあり	なし	なし	なし



結語

5例、のべ7回の自殺遺伝子組み込みドナーリンパ球輸注を行った。
 一時的効果を含め3例に抗白血球効果が認められた (最終効果については今後の観察が必要)。
 1例で投与後のGVHD発症がみられ、genecylovir投与により沈静効果が得られた。
 特記すべき有害事象はなく、現時点まで増殖能を獲得したウイルス (RCR) も確認されていない。
 2回目の投与では遅やかな導入リンパ球の減少が認められ、導入遺伝子特異的な免疫応答が誘起された可能性がある。
 今後、DLI併用再移植療法などを検討している。

- ### Staff and Contributors
- 東京大学医学部内科
小倉隆光
東京大学小児科
松井昭
 - 京都府立医科大学
工藤昭弘
小池信彦
京都府立医科大学
日村文一
 - 京都府立医科大学
京都府立医科大学
京都府立医科大学
京都府立医科大学
 - 京都府立医科大学
京都府立医科大学
京都府立医科大学
京都府立医科大学
 - 京都府立医科大学
京都府立医科大学
京都府立医科大学
京都府立医科大学
 - Hospital San Raffaele
Claude Bergamoni
Claire Donati
Molteni
Singapore Tan
 - 独立行政法人水戸臨床センター
米野瑞貴

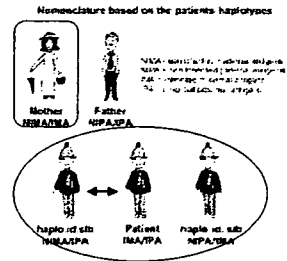
厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
 「骨髓、末梢血等を利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立
 並びにドナー及びレシピエントの安全確保とQOL向上に関する研究班」
 平成18年度第一回研究会会議 2006年6月3日 於・名古屋第一赤十字病院 内ヶ島講堂

FK506をGVHD予防に用いた
 NIMA相補的血縁者間造血幹細胞移植
 ～第II相臨床試験～

一戸 辰夫
 京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

試験実施の目的

進行期白血病に対して、HLAに2抗原以上の不一致が存在する非遺伝母HLA抗原
 (NIMA)相補的血縁者をドナーとして行なう、T細胞非除去同種造血幹細胞移植の安全性
 と有効性の検討(臨床第II相試験)。



なおNIMA相補的血縁者とは、HLAのひ
 とつのハプロタイプを遺伝的に共有し、非
 共有ハプロタイプについては妊娠時に相
 互に免疫寛容を成立させていたような関
 係にある血縁者のことであり、具体的
 に、本試験の対象は母子間、あるいは父
 由来ハプロタイプを共有する同胞(NIMA
 相補の同胞)間で行われる移植である。

試験の進捗状況

- 2002年7月 試験プロトコルをリリース
- 2002年11月 第1回プロトコル改訂(レシピエント適格条件)
- 2003年2月 第1相登録開始
- 2004年6月 第2回プロトコル改訂(対象疾患の追加)
- 2005年1月 第1相登録終了
- 2006年2月 第II相登録開始

対象疾患

- 3-1-1 急性骨髄性白血病(ICD-O 9861/3) : (9例)
 2コース以上の初回寛解導入治療または初回再発後の治療で完全寛解に
 導入できないか、第二回目の再発期以降の症例。骨髄異形成症候群から移
 行した症例をも含む。
- 3-1-2 急性リンパ性白血病・リンパ芽球性リンパ腫(ICD-O 9835/3, 9728/3,
 9837/3, 9729/3) : (4例)
 2コース以上の初回寛解導入治療で完全寛解に導入できないか、あるいは
 初回再発期以降の症例。
- 3-1-3 慢性骨髄性白血病(ICD-O 9875/3) : (1例)
 Imatinib mesilate(ST1571)による治療で血液学的寛解が得られない第二復
 性期・加速期以降の症例。急性転化期の症例を含む。
- 3-1-4 成人T細胞白血病・リンパ腫(ICD-O 9827/3) : (1例)
 初回化学療法によって部分寛解以上の治療効果を得ることができないか、
 再発期以降の急性型・リンパ腫型の症例。

()第I相における仮登録+本登録の件数

適格条件

- 3-2-1 登録時の年齢が10歳以上55歳以下。
- 3-2-2 本試験への参加に関して、文書による本人(本人が未成年者の場合には、
 本人および代諾者)の同意が得られていること。
- 3-2-3 HLA-A, B, DR血清型一致またはGVH方向に1抗原以内不一致の血縁ドナー
 が見い出されていないこと。
- 3-2-4 骨髓バンクにおいて、血清型でHLA-A, Bが一致しており、遺伝子型でHLA-
 A, B, DRB1の不一致が1座以内の非血縁ドナーが見い出されていないか、
 迅速なコーディネートの成立が困難と考えられること。
- 3-2-5 骨髓または末梢血幹細胞のドナーとして健康状態に問題をもたないHLA-A,
 B, DR血清型2抗原以上不一致(GVH方向)のNIMA相補的血縁者(10歳以上
 65歳以下)が見い出され、当該血縁者の末梢血単核球分画中にレシピエント型
 HLAを有する細胞のマイクロキメリズムが検出されていること。

第II相試験のprimary endpoint

FK506+MTXをGVHD予防に用いたNIMA相補的血縁者間造血幹細胞移
 植時における移植後1年以内における死亡

必要症例数設定の根拠

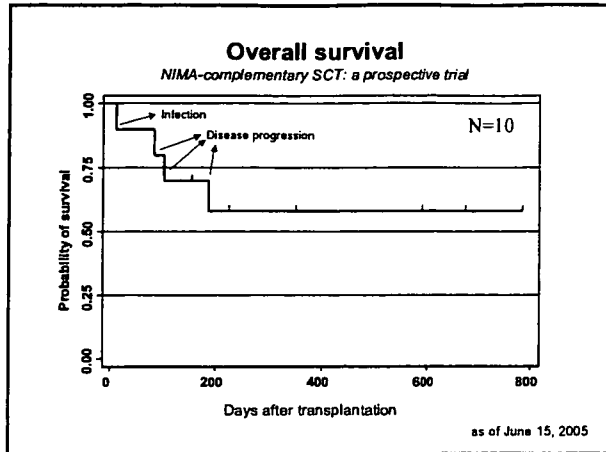
Primary endpointである1年生存(生存または死亡)を2区分変数と見なして、1年生
 存率の期待値(P)を40%、信頼区間の幅(W)を±15%、信頼水準(1-α)を95%(両
 側)、また移植前処置開始後の症例はすべて1年生存の解析対象にするものとし
 て(intention-to-treat analysis)中止・脱落症例を見込まず、41例と設定した。

一信頼水準が1-αの時の両側αに対する標準正規偏差をZαとすると、1年生存率
 Pの検出に必要な最低症例数nは、

$$n = 4Z_{\alpha}^2 P(1-P)/W^2$$

で与えられるN以上の最低の整数で与えられる。α=0.05の時Zα=1.96であり、
 P=0.4, W=0.3とすると

$$40 < N = 40.97 \dots < 41$$



第11相登録例(2006年2月~5月)

Recipient	Diagnosis		Age Sex		Donor		HLA disparity	
					Relationship	Age Sex	GVH vector	HVG vector
R-101	ALL	CR>1	14	F	Mother	41 F	B, DR	A, B, DR
R-102	LBL	Refractory	45	M	NIMA-sib.	44 M	A, DR	A
R-103	ALL	CR>1	11	F	NIMA-sib.	14 M	B, DR	B, DR

「マイナー抗原特異的 DLI のための新規抗原の同定」

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 5 種類のマイナー抗原エピトープ (ACC-1~5) である BCL2A1/A24、BCL2A1/B44、TMSB4Y/A33、CTSH/A31、CTSH/A33 を同定してきた。また先の研究会議では HA-1 遺伝子上の SNP 部分が日本人に比較的多い HLA-A*0206 によって提示されるマイナー抗原をコードしていることも示した。しかし、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、患者のカバー率は依然 30%前後であり、さらに数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る。

前回の研究会議で報告した HLA-B44 拘束性のマイナー抗原特異的 CTL について抗原エピトープが同定された。当初、リンケージ解析、次いでプール化 DNA をマイクロサテライトマーカーのアリル分布パターン比較解析を行ったが遺伝子の同定に至らなかった。そこで CTSH マイナー抗原の同定に用いた cDNA ライブラリを用いて発現クローニングを行ったところ、18 番染色体の q21.33 に存在する既報の EST (Expressed Sequence Tag) のスプライスバリエーションと考えられる mRNA が同定され、これがコードする 53 アミノ酸のポリペプチド上にエピトープを見出した (ACC6、特許申請済)。この遺伝子の発現は活性化した一部の血液系細胞と急性骨髄性白血病に強く、その他の臓器では精巣と肺にやや弱く発現しているのみであった。以上より、このマイナー抗原は主に AML に対する免疫療法に有効と考えられる。この 53 アミノ酸には他の HLA への結合モチーフも存在するため、今後新たなエピトープの同定も行う予定である。

2. 養子免疫療法の臨床試験の進捗状況

当センターの臨床細胞調整施設における、養子免疫療法に必要なクローン化 T 細胞の樹立と増幅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が整い、適格症例のリクルートを 5 月より再開した。

今後並行して前臨床試験を進め、白血病細胞を移植した NOG マウスへのクローン化 T 細胞輸注モデルを作成しつつある。また本モデルを使用して、ペプチドワクチンの可能性を検討する予定である。

平成 18 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、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（小寺班）

平成 18 年 6 月 3 日 於：名古屋第一赤十字病院

「同種造血幹細胞移植における遺伝子多型の与える影響に関する研究」分担研究者：村田 誠

「非自己 HLA を認識する T リンパ球クローン」

名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

村田 誠、寺倉精太郎、直江知樹

近年、非血縁者間臍帯血移植が増加し、また HLA 1 座不適合非血縁者間骨髄移植や HLA 不適合血縁者間移植なども試みられていることから、HLA 不適合移植数は増加しつつある。HLA 不適合移植において T リンパ球の標的となる抗原は主要組織適合性抗原（不適合 HLA 分子）であり、その認識機構として 1) 非自己 HLA タンパクが一旦細胞内に取り込まれプロセスされてペプチド断片となり自己 HLA 上に提示される、2) 非自己 HLA そのもの（実際にはペプチドとの複合体）が直接認識される、のいずれかと考えられている。

今回我々は、HLA 1 座不適合の母から骨髄移植を受けた急性白血病患者の移植後末梢血から、患者細胞を傷害しかつドナー細胞を傷害しない CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球（CTL）クローンを分離し解析を行った。この CTL クローンは HLA-B*5101 を持つ計 8 種の細胞全てに対し傷害活性を示し、B*5101 cDNA のみを遺伝子導入した COS 細胞により IFN 放出能が亢進した。さらには B*5101 cDNA を遺伝子導入したドナー細胞に対しても傷害活性を示した。以上よりこの CTL クローンは B*5101 分子そのものを標的としていると考えられた。

T リンパ球が HLA 分子を直接認識する際、その上に提示しているペプチド特異的に認識する場合（peptide-dependent recognition）とペプチド非特異的に認識する場合（peptide-independent recognition）とがある。そこで現在この CTL クローンがいずれの方法で B*5101 を認識しているのか解析を行っている。また本患者はコントロール不良な全身性 GVHD（皮膚、肝、腸）を発症した。果たして GVHD 発症にこの CTL クローンは関与していたのか、採取した皮膚、肝、胃、大腸などの生検組織を用いて解析することも検討している。

平成18年度厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「骨髓、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
第一回班会議(2006年6月3日)

造血幹細胞移植における Vδ1陽性 γδT 細胞の役割

廣川 誠^①、藤島 眞澄^①、藤島 直仁^①
山下 順助^②、澤田 賢一^①
①秋田大学医学部内科学講座 血液・腎臓内科学分野
②バイオサイエンス教育・研究センター

研究の背景

- 同種造血幹細胞移植後、約半数のレシピエントにおいて Vδ1+ γδT細胞の oligoclonal expansion が観察されること、そしてそのクローンはドナー成熟T細胞プール由来であることを既に報告した(ASH 2004)。
- γδT細胞は健康人末梢血中の成熟 T 細胞のうち数%にすぎない。
- γδT細胞はTCR 可変部領域の構造から Vδ1, Vδ2, Vδ3 の3つの subset に大きく分けられる。健康人末梢血中 γδT 細胞の大部分は Vδ2+γδT細胞であり、Vδ1+ γδT細胞は主に腸管や生殖器等の上皮組織に存在する。
- ヒトにおけるVδ1+ γδT 細胞の機能はよくわかっていない。

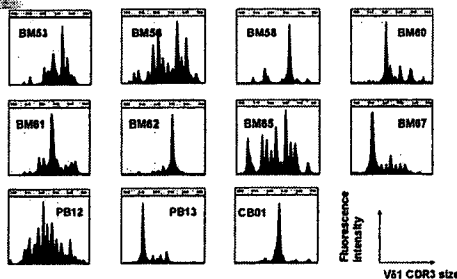
研究の目的

- 同種造血幹細胞移植後 クローナルに再生するVδ1+ γδT 細胞の抗原特異性とその機能を明らかにする。

Table 1 Patient Characteristics (N=44)

Age, years	Number of patients	
	Median	Range
	32	18-58
Sex	Male	22
	Female	22
Disease	AML	15
	ALL/LBL	18
	CML	8
	MDS	3
	Atypical CML	1
	Aplastic anemia	1
Graft	Bone marrow	35
	Blood stem cell	7
	Cord blood	2

CDR3 size distribution patterns of Vδ1-Cδ transcripts of blood γδ T lymphocytes from recipients of allogeneic HSC grafts.



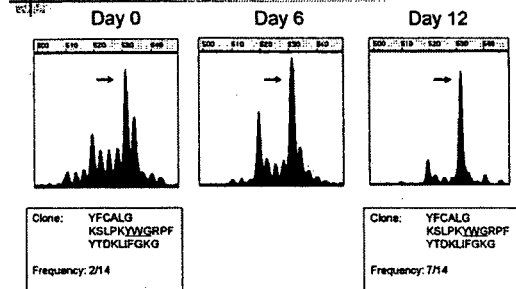
Expansion of donor-derived mature Vδ1+ γδT lymphocyte clones

Sample	Colony	Vδ1	N-D-N	Jδ1
Donor	3/16	YFCALGE	GIPYYAGGYPF	TDKLIFGKG
	1/16	YFCALG	KSLPKYWGRRF	YTDKLIFGKG
	1/16	YFCALGE	LXGKGGYQVS	DKLIFGKG
Recipient Before BMT	3/8	YFCALG	ASLPYWGISSG	KLIFGKG
	1/8	YFCALG	VPYSSLGNN	VPYSSLGNN
	1/8	YFCALG	NPPSRWGITGGP	NPPSRWGITGGP
Post-BMT BM	5/13	YFCALG	KSLPKYWGRRF	YTDKLIFGKG
	2/13	YFCALGE	GIPYYAGGYPF	TDKLIFGKG
26M	10/12	YFCALG	KSLPKYWGRRF	YTDKLIFGKG
92M	3/9	YFCALG	KSLPKYWGRRF	YTDKLIFGKG

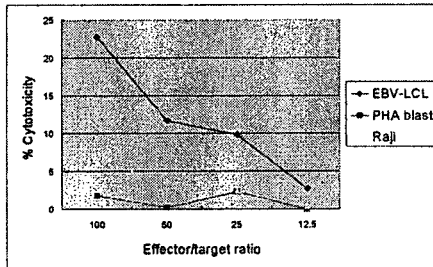
作業仮説: Vδ1+ γδT lymphocyte は何を認識しているのだろうか？

- ドナー成熟T細胞プール由来のクローンがレシピエント体内で長期間存在していることから、ドナーとレシピエントに共通する何らかの抗原を認識している可能性がある。
- ヒトに広く潜在するウイルス等の抗原を認識している可能性がある。

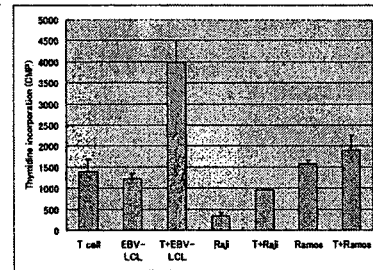
Skewing of Vδ1+ T cell repertoires in response to autologous EBV-LCL



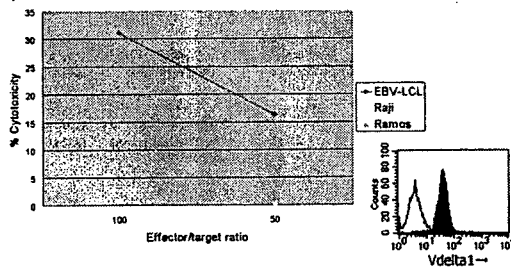
Vδ1+ T cells can kill autologous EBV-LCLs



Vδ1+T cell clone の増殖反応



Vδ1+ T cell clone の killer 活性



結果と考察

- Allo-HSCT後に peripheral expansion したVδ1+ γδT lymphocyte は、EBV等ヒトに広く普遍的に潜在するウイルス抗原等を認識して増殖している可能性がある。
- これらの Vδ1+ γδT lymphocyte はウイルス感染細胞に対して細胞障害活性を有する。

難治性サイトメガロウイルスおよびアデノウイルス感染症 に対する活性化 CD4+DLI を試みた 6 例

神戸市立中央市民病院 免疫血液内科

戸上勝仁、藤田晴之、田中康博、倉田雅之、松下章子

先端医療センター再生医療研究部

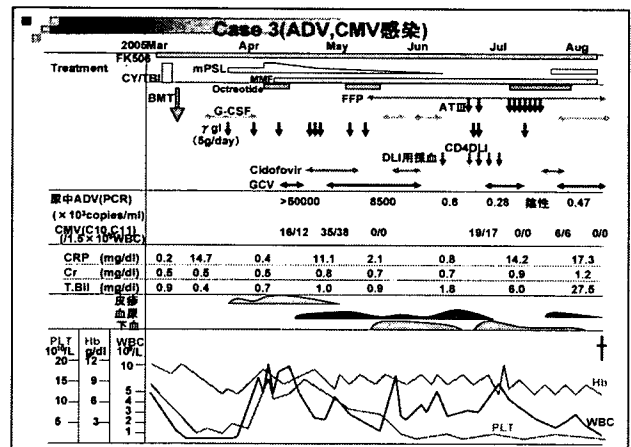
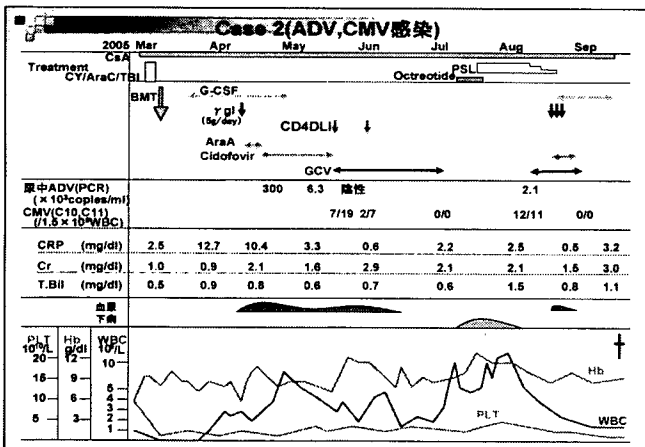
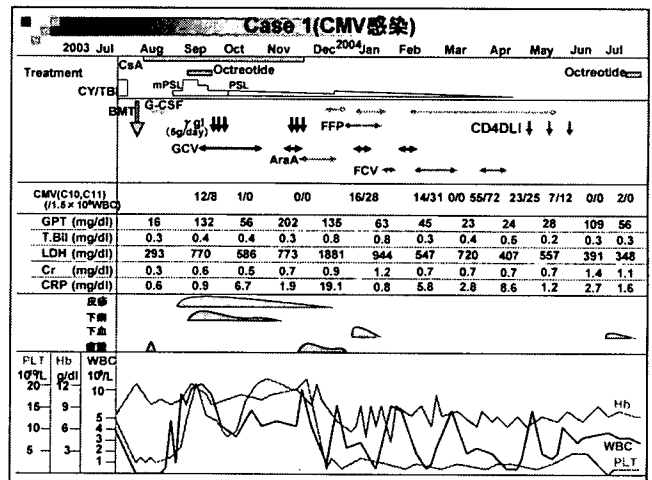
前田明則、永井謙一、高橋隆幸

橋本尚子、伊藤 仁也

要旨

難治性 CMV, ADV 感染症に対する活性化 CD4+DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験へ 6 例登録を行い、①治療完遂・脱落率およびその理由②副作用の評価③効果の検討を行った。対象ウイルス外のウイルスおよび細菌による混合感染のため全例不適格となった。CMV+ADV 感染症 (3/6) に関しては、参考試験として活性化 CD4 の投与およびウイルス学的解析を施行した。非血縁者間移植後の症例 4 例に関しては、培養前血液あるいは、培養細胞中より HHV-6 および細菌が検出され、投与出来なかった。投与した 3 例では、発熱などの急性の副作用は認めなかった。評価可能な 2 例で輸注後 II 度の GVHD が出現したが、治療反応性は良好であった。投与例においては、輸注後 4 週までにウイルスの消失および臨床症状の改善を認めた。移植後免疫不全状態においては、ウイルスの混合感染を認める例が多く、プロトコルの適格基準の再検討が必要と考えられた。

case	年齢	疾患	移植前処置	Donor	aGVHD (grade)	対象ウイルス	症状	DLI ソース
1	32	AML M5	CY/TBI	血縁 HLA 完全一致	III	CMV	抗腫血症の遷延	血縁ドナー
2	48	AML 非寛解期	CY/AraC/TBI	血縁 HLA 完全一致	II	ADV	出血性膀胱炎	血縁ドナー
3	36	CML (CP1)	CY/TBI	非血縁 HLA-DR1 座不一致	IV	ADV	出血性膀胱炎	自己
4	51	M4, 非寛解期	CY/AraC/TBI Whole Brain	非血縁 HLA 完全一致	I	ADV	出血性膀胱炎	自己
5	43	Ph1 ALL	LPAM/TBI	非血縁 HLA-B1 座不一致	-	CMV	網膜炎	自己
6	38	M5, 非寛解期	CY/AraC/TBI	非血縁 HLA 完全一致	-	ADV	出血性膀胱炎	自己



【除外理由】

case	年齢	疾患	Donor	対象ウイルス	DLIソース	除外理由
1	32	AML,M5	血縁	CMV	血縁ドナー	プロトコール開始前
2	48	AML 非寛解期	血縁	ADV	血縁ドナー	混合感染
3	36	CML(CP1)	非血縁	ADV	自己	混合感染、培養中にE.faecalis検出
4	61	M4,非寛解期	非血縁	ADV	自己	培養中にP.aeruginosa検出
5	43	Ph1ALL	非血縁	CMV	自己	培養中にHHV6検出
6	38	M5,非寛解期	非血縁	ADV	自己	培養中にHHV6検出

【混合感染】

移植免疫不全患者には混合感染が多い

	Primary	Secondary*
Case1	CMV	HHV6
Case2	ADV	CMV,BK,HHV6
Case3	ADV	CMV,E.faecalis
Case4	ADV	P.aeruginosa
Case5	CMV	HHV6
Case6	ADV	HHV6

* PCRにて陽性であったウイルス、血液培養や培養中に検出された細菌。

【副作用】

・発熱 : 0/3

・SIRS : 0/3

・血小板減少 : 1/3

・aGVHD

	移植後	輸注前	輸注後	治療
Case1	III	0	II	Octreotide使用のみで軽快
Case2	II	0	II	PSL0.5mg/kgで軽快
Case3	IV	0	評価困難	

【臨床効果】

	対象ウイルス	臨床症状	ウイルス	転帰
Case1	CMV	抗原血症改善	消失	軽快
Case2	ADV	血尿改善	消失	肺炎で死亡
Case3	ADV	血尿改善	消失	敗血症(緑膿菌)で死亡
Case4	ADV			敗血症(緑膿菌)で死亡
Case5	CMV			肺炎(MRSE)で死亡
Case6	ADV			AML再発し死亡

【結果】

- 移植後難治性ウイルス感染6例に対し活性化CD4+DLIを試みたが、複数回投与できた症例は2例(血縁ドナー)、単回投与が1例(自己)であった。プロトコール終了、解析まで完遂できた症例は0/6例。
- 非血縁者移植症例においては、全例で培養中に細菌(緑膿菌、腸球菌)、ウイルス(HHV6)が検出され投与できなかった。
- 投与例ではウイルスの陰性化、症状消失、T cellの増加、IgMの上昇を認めた。
- DLI後にGVHDの増悪が2/3例にみられた。

平成18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、末梢血等を利用した効率的な造血幹細胞移植の適用・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 第1回研究会議（名古屋）

造血幹細胞移植後CMV感染症、 Adenovirus感染症に対する 活性化CD4DLI療法 に関する臨床第I-II相試験

東京医科歯科大学・院・発達病態小児科学分野
同・医学部附属病院細胞治療センター
同・難治疾患研究所・フロンティア研究室ウイルス治療学
森尾友宏
清水則夫

臨床研究の目的

血縁者間・非血縁間造血幹細胞移植後の難治性(薬剤抵抗性)CMV、Adenovirus
感染症に対する治療としての活性化CD4DLI療法の有効性、安全性を評価する。

主たる評価項目

CMV・Adenovirus リアルタイムPCR定量（主評価項目）
CMV抗原、(アデノウイルス抗原)
臨床症状
臨床所見
有害事象

治療目標、登録数

(治療目標)
全症例の30%が最終投与2週後にCMVコピー数0、Adenovirusコピー数0となること。

(登録数)
・血縁間造血幹細胞移植後の難治性CMV、アデノウイルス感染症 それぞれ10症例
・非血縁間造血幹細胞移植後の難治性CMV、アデノウイルス感染症 それぞれ10症例

対象症例

CMV

造血幹細胞移植後のCMV感染症で:

DHPG (Gancyclovir)及び/またはFoscarnetにて4週間治療した時点で

- (1) CMVコピー数が3,000コピー/ml全血以上 あるいは
- (2) CMV抗原血症が10 / 50,000細胞以上、かつCMVコピー数が測定限界以上

Adenovirus

造血幹細胞移植後のAdenovirus感染症で:

診断後2週間経過した時点で

- (1) AdenovirusがPCR法で検量線範囲内に検出され、かつ
- (2) Adenovirus感染症の症状・所見が存在

*骨髄移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植のいずれかを問わない。
また前処置の方法、GVHD予防方法などの種類を問わない。

活性化CD4DLI療法
(5x10⁶/kg、2週ごとに2回)

被験者の除外基準 制限事項

臓器機能(臨床検査値)

AST/ALT	施設基準値上限の20倍以下
総ビリルビン	6mg/dl未満
クレアチニン/クリアランス	20ml/min以上
EF	50%以上
PaO2	60mmHg以上
PaCO2	60mmHg以下

併用薬剤

免疫抑制剤を使用している場合は可能な限り投与までに減量する
副腎皮質ステロイドは中止されていること

感染症

HIV抗体陽性
重症細菌感染症(敗血症)
重症真菌感染症
CMV⇄重症アデノウイルス感染症、ADV⇄重症CMV感染症
EBV-LPD
薬剤抵抗性HSV/VZV感染症
治療を必要とするHHV6、7感染症
RSウイルス感染症
Parvovirus B19感染症
麻疹
BKV: 10³copy/ml未満

不適格症例はパイロット治療としてピックアップ

登録患者一覧

No	施設	原疾患	移植	対象感染症	合併感染症	不適格(1)	不適格(2)	
1	JRCNH	MLL+AML	UR-BMT	CMV	BKV		入江中野之 大野裕子	巻井(1)
2	KCGI	AL(Oligonotypic)	R-BMT	ADV cytistia	CMV			○
3	ONC-HMCH	RMS	R-BMT	ADV cytistia	CMV			○
4	KCGI	CML	UR-BMT	ADV cytistia	CMV		HHV6/7 E. faecalis/ft.	
5	KCGI	AML OMO	UR-BMT	ADV cytistia	EBV, BKV	長谷川ADV	HHV6/7	
6	KCGI	AL(Oligonotypic)	R-BMT	ADV	BKV, CMV	長谷川ADV		長谷川セナ
7	JRCNH	T-LEL	UR-BMT	ADV	BKV	長谷川ADV		長谷川セナ
8	JRCNH	AML	R-BMT	ADV	CMV			
9	JRCNH	ALL	R-BMT	CMV		長谷川CMV		○
10	ONC-HMCH	CAEBV	R-BMT	ADV	BKV, CMV		長谷川	○
11	CUH	MDS	UR-FBSCT	CMV cytistia		長谷川CMV	スズキ	
12	KCGI	Pt+ALL	CBSCT	CMV+ cytistia			HHV6/7	巻井
13	ONC-HMCH	ALL	UR-BMT		Cytistia	no virus		巻井セナ
14	ONC-HMCH	Blaa	CBSCT		EBV		巻井セナ	
15	MDAC	T-ALL	UR-BMT	ADV	BKV, VZV		巻井セナ	巻井
16	KUHP	OGD	R-BMT		VZV Aspergillus		HHV6/7	
17	KUHP	AML	R-PBSCT	ADV				巻井セナ

プロトコルの問題点と修正案

- 複数感染症の除外項目
除外項目の撤廃 (CMV⇄ADV, BKVなど)
- 投与前検査でウイルスが検出感度以下
陰性の場合には連続検査にてフォロー
- ステロイド併用禁
Prednisolone 換算 0.5mg/kgまで可
- HHV6, HHV7陽性
患者のDHPGによる治療? / DHPGと共に培養?
- 参加施設の拡充

今後の取組み

プロトコル改訂

症例エントリーの依頼

UMIN Clinical Trials Registry

パイロットスタディの論文化
(2003年までに治療が行われた症例の追跡調査)

細胞治療センターの資源確保: 高度先進医療申請
培養コスト削減

Contributors

東京医科歯科大学・院・発達病態小児科学分野
森尾友宏 (細胞治療センター)
東京医科歯科大学難治疾患研究所・フロンティア研究室ウイルス治療学
清水則夫 (細胞治療センター)、水上美樹、渡邊 健
東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センター
巖岸志津子、落合 央、舟木麻由美、高村有子
馬場佳子、竹部 礼、梶原道子(輸血部)
茨城県立こども病院小児内科
土田昌宏
名古屋第一赤十字病院
加藤剛二、小寺良尚
神戸先端医療センター・再生医療研究部
伊藤仁也
リンフォテック
馬場憲三、大隅一興、黒岩保幸、関根暉彬

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

第 1 回合同班会議

(平成 18 年 6 月 3 日 (土) 於 名古屋第一赤十字病院)

「HLA-DR1 座不一致非血縁ドナーからの骨髄移植後にみられた急性 GVHD に伴う CD4 陽性リンパ球の増加」

豊嶋崇徳、武石昭一郎、宮本敏浩、長藤宏司、竹中克斗、原田実根
九州大学病院第一内科、遺伝子・細胞療法部

HLA 不適合非血縁ドナーからの骨髄移植が積極的に実施されているが、2005 年度集計の成績ではクラス I, II 不適合とも、またアレル血清型不適合とも grade II 以上の急性 GVHD の頻度が有意に高いことが報告されている。われわれは、最近 HLA クラス II 1 座不適合非血縁ドナーからの骨髄移植において、興味ある症例を経験したので報告する。

【症例 1】31 歳の女性。2005 年 10 月に AML M2 を発症した。同月から IDA+Ara-C で寛解導入療法を行ったが寛解に至らなかった。11 月及び 2006 年 1 月に大量 Ara-C 療法を行い、形態学的寛解の状態です 3 月に HLA-DR1 座不一致非血縁者から骨髄移植を行った。Day9 から下腹部を中心に皮疹が出現し、その後胸部、四肢へと広がり stage3 の GVHD と診断した。Day12 には結膜炎も出現した。Day12 に白血球 $490/\mu\text{l}$ まで上昇したがリンパ球が 77%を占めており、末梢血のフローサイトメトリーでも CD4 リンパ球が 74%を占めていた。ステロイド投与により皮疹は消退し、CD4 リンパ球も減少した。

【症例 2】38 歳の男性。1989 年に CML を発症した。1991 年に同胞からの骨髄移植を行い完全寛解となったが、その後治療を自己中止していた。2005 年 5 月に再発した。化学療法を行い完全寛解の状態です 2006 年 4 月に HLA-DR1 座不一致の非血縁者から骨髄移植を行った。Day12 から下腹部を中心に皮疹が出現し、その後胸部、四肢へと広がり stage3 の GVHD と診断した。Day14 での末梢血のフローサイトメトリーで CD4 リンパ球が 83%を占めていた。

【考察】CD4 リンパ球は HLA クラス II 拘束性であり、HLA-DR1 座不一致により CD4 リンパ球が増加し重症急性 GVHD を来たしたと考えられた。

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およびレシピエントの安全確保と QOL 向上に関する研究」班 平成18年度第一回研究班会議

造血幹細胞移植関連遺伝子の探求

鬼塚真仁、菊地智樹、猪子英俊

東海大学血液内科、札幌医科大学病理学、東海大学分子生命科学

はじめに

我々は、分子遺伝学的手法によりドナーとレシピエントの遺伝子解析を行い、移植成績に影響を与える候補遺伝子の検索をおこなっている。現在、以下のテーマで研究を遂行中であるが、今年度より約600の遺伝子に対して、1500程度のマイクロサテライトマーカーを利用し、造血幹細胞移植関連遺伝子の探索を行う予定である。

1. 造血幹細胞移植後肺合併症と遺伝子多型性
2. HLA 関連分子の遺伝子多型と GVHD
3. IL10 遺伝子のハプロタイプ解析
4. 非古典的 HLA と造血幹細胞移植
5. マイクロサテライトマーカーを用いた造血幹細胞移植関連候補遺伝子解析

1. 造血幹細胞移植後肺合併症と遺伝子多型性

ACE 遺伝子における Deletion/Insertion の多型と非感染性移植後肺合併症の発症に関連をみとめている。骨髄移植財団を介した非血縁者間の造血幹細胞移植症例での検討では、ドナー・レシピエント両者で D/D を有している症例で肺合併症の発症が高率であった。

2. HLA 関連分子の遺伝子多型と GVHD

6q25 に存在する *RAET1* 遺伝子近傍のマイクロサテライトマーカーにおいて、ドナー・レシピエント間で多型が一致している症例で重症 GVHD の発症率が高率であった。現在ハプロタイプブロックを考慮した周辺の SNP を解析中であり、疾患関連遺伝子の探求をおこなっている。

3. IL10 遺伝子のハプロタイプ

IL10 遺伝子プロモーター領域に存在するマイクロサテライト多型をタイピング中である。都センター屋部先生グループの SNP 情報とあわせて、より細かなハプロタイプ解析を行い、GVHD 発症における IL10 プロモーター領域の遺伝子多型性の与える影響を検討する。

4. 非古典的 HLA と造血幹細胞移植

当施設では、非古典的 HLA class I 分子である HLA-G に関して、蛍光ビーズ法を用いた SSO 法を開発し、現在タイピング中である。HLA-G は臓器移植における拒絶反応を防御する役割が指摘されており、造血幹細胞移植後合併症発症との関連性を検討中である。

5. マイクロサテライトマーカーを用いた造血幹細胞移植関連候補遺伝子解析

当施設ではマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな疾患関連遺伝子の探索を行っている。しかしながら、きわめてヘテロな集団である造血幹細胞移植症例の解析では、その Power を維持するために非常に多数のサンプルが必要であり、また、多額の費用と時間を要する。そこで我々は、これまでに移植免疫学で関連が報告されている遺伝子について、造血幹細胞移植関連候補遺伝子として、今回、約 600 の遺伝子に対して 1500 のマイクロサテライトマーカーを設定し、移植後合併症との関連を検討する事とした。対象症例は平成13年度までに行われた非血縁間同種骨髄移植症例とする。

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

-研究進捗状況の報告-

研究組織

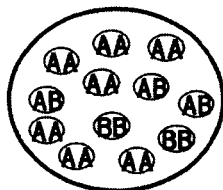
厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム再生医療等研究事業(主任研究者:小寺良尚)

日本科学技術推進財団 戦略的創造研究推進事業(CREST)

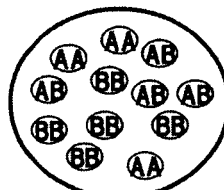
愛知県がんセンター	森島泰雄・赤塚美樹
九州大学	山本健
東海大学	猪子英俊
東京大学	小川誠司(研究代表)
名古屋第一赤十字病院	小寺良尚・宮村耕一
日本赤十字東京血液センター	佐竹 正博・柏瀬 貢一

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 第一回班会議

Affymetrix GeneChip 500Kアレイを用いた全ゲノム関連解析

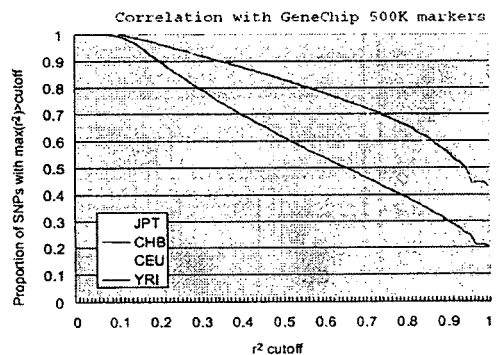
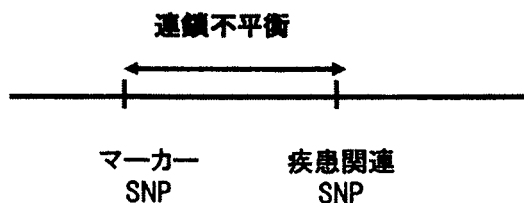


合併症(+)_群



合併症(-)_群

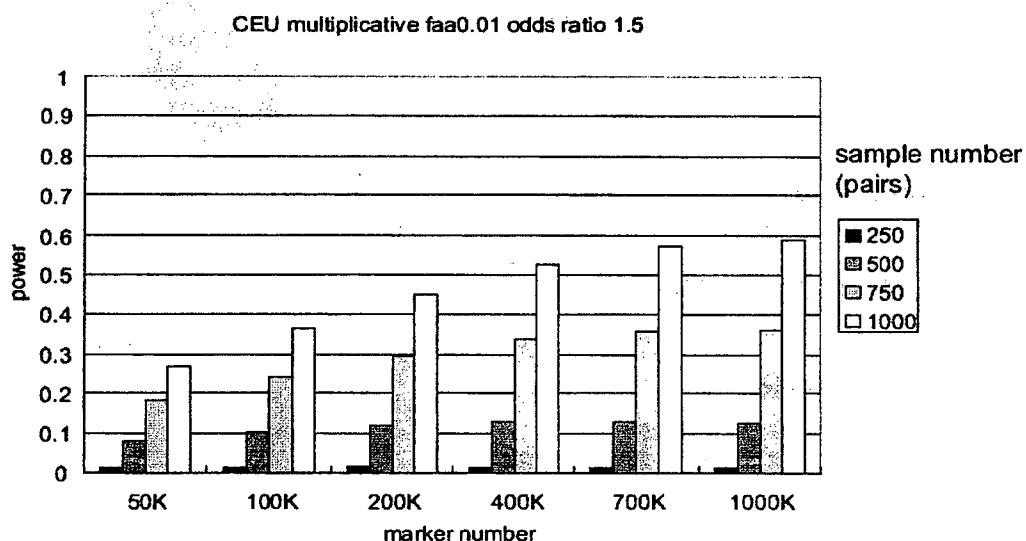
疾患群と相関のあるSNPを見いだす。

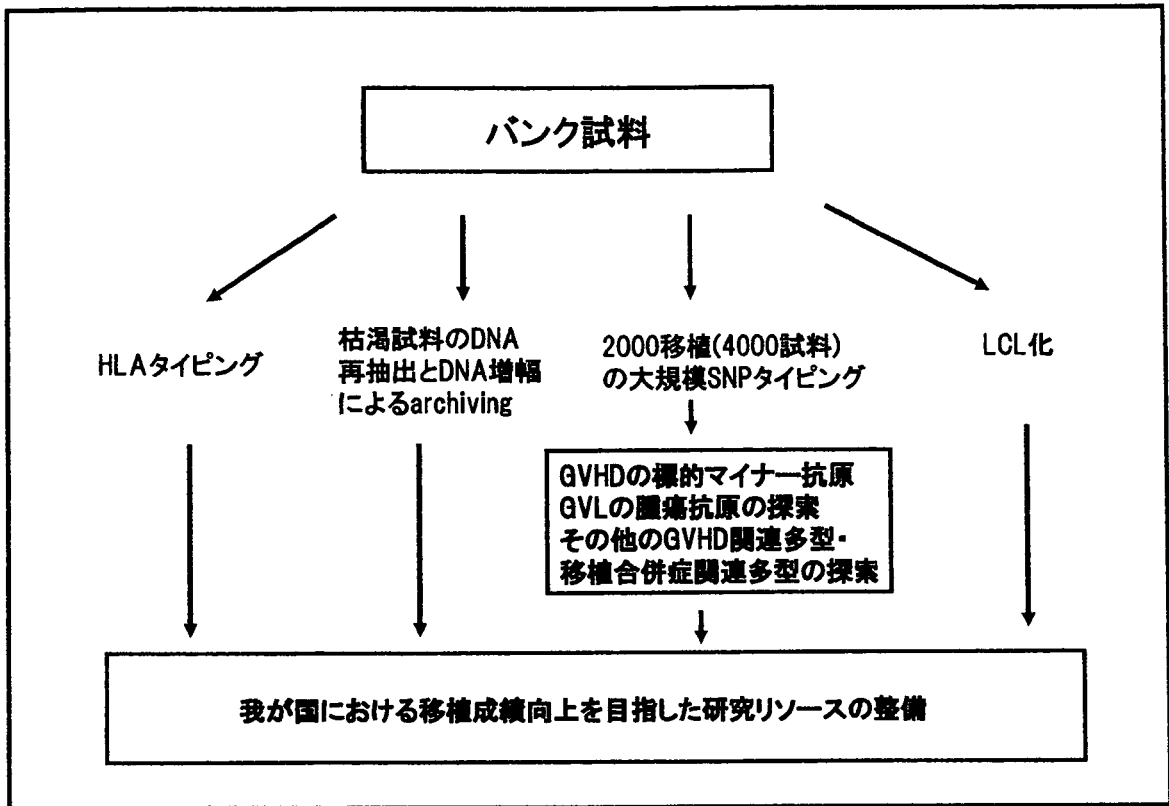


検体の収集と整備

- 解析に用いるDNA試料
 - H13年4月以前にJMDPを通じて行われた非血縁骨髄移植
 - HLA A, B, C, DR, DQがDNAレベルで全て一致
 - GVHD予防としてMTX+CyAを使用
 - 該当移植数=956移植(1912検体)
 - 512移植について50万SNPのタイピングを修了(48 array/day)
 - 保存buffy coatからのDNA再抽出により280移植がrescue可能
 - H13年4月-H16年の移植についてHLA DNAタイピングを実施(東京血液センター)することにより計2000移植の確保が可能な見通し
- WGAによるarchiving事業
 - バンク試料の整備(東海大学)
 - バンク試料の有効利用のためのDNA増幅(東大)
 - 100ng→30 μ gのDNAを増幅(RepliG)
 - バンク試料を用いたLCLの樹立(愛知県がんセンター・東海大学)

研究デザインの最適化の問題





JMDPを介した非血縁者間造血幹細胞移植におけるHLA遺伝子型ミスマッチの検討

川瀬 孝和¹、松尾 恵太郎²、森島 泰雄³
小寺班組織適合性部会

1. 愛知県がんセンター腫瘍免疫学部
2. 愛知県がんセンター疫学予防部
3. 愛知県がんセンター血液細胞療法部

背景・目的

・当研究班の研究により非血縁者間造血幹細胞移植における、HLA-A,B,C,DR,DQ locusの臨床的重要性が明らかにされた。(Sasazuki T et al. N Engl J Med 339:1177,1998 Morishima Y et al. Blood 99:4200,2002)

・2004年6月の当研究班班会議にて我々は非血縁者間造血幹細胞移植における個々の遺伝子型ミスマッチの臨床的重要性を検討するため、JMDPのデータベースを用い、単変量解析にて行ったレトロスペクティブな解析結果を報告した。

・今回我々は多変量解析の手法を応用しさらに詳細な解析を試みた。

方法

・1993年1月より2005年末までの期間にJMDPを介し施行され、T細胞除去を行っていない非血縁者間造血幹細胞移植のうち、HLA-A,B,DR locusの血清型が一致した4866例を多変量解析(Cox regression model)の手法を用いてレトロスペクティブに解析した。

・以下の因子にて補正を行った。

他のlocusの遺伝子型の適合度、性別、患者年齢、ドナー年齢、病型、再発リスク、GVHD予防、ATG、前処置(TBI vs nonTBI)

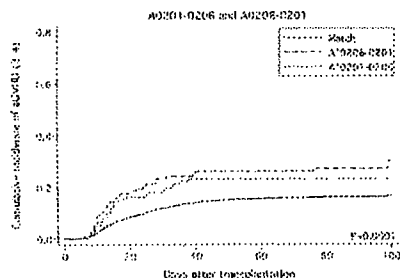
ミスマッチ方向の検討 2

・文献的にミスマッチの方向も考慮して解析すべきであると考えられた。

HLA-A2 J Immunol 1989;143(2):558-64.
HLA-B35 J Exp Med 2005;202(9):1249-60.
HLA-B44 J Exp Med 2003;198(5):679-91.

・今回の解析では、ミスマッチの方向を考慮して解析しうるアリルミスマッチのコンビネーションが多数存在した。

A*0201-A*0206ミスマッチのaGVHD(gradeIII-IV)への影響



考察

・多変量解析の手法を用いる事により個々のアリルミスマッチの解析可能な症例数が増加し有効な解析を行い得た。

・ミスマッチの方向によりaGVHDへの影響が異なる組み合わせが存在する。

・現在個々のアリルミスマッチが移植成績に与える影響を分子生物学的に考察するための解析を進めている。

研究課題

「HLA-DNAタイピングの意義に関する研究」

A2サブタイプ間におけるGvHD発症に関する考察

国立国際医療センター・菅月徹彦
 (代: 九大生医研・山本 俊)
 愛知県がんセンター・川瀬孝和、松尾寛太郎、森島崇雄
 組織適合性学会

HLA-A2サブタイプ間での遺伝的多型性

9 99 番
 HLA-A*0201 F Y
 HLA-A*0206 Y Y
 HLA-A*0207 F C

Negative selection and GvHD

GvHD		T cell Repertoire of Negative selection	
donor	patient	0201	0206
0201	X 0206		
0206	X 0201		
0206	X 0201		
0201	X 0206		

HLA-A2サブタイプ間でのGvHDとnegative selection

GvHD		T cell Repertoire of Negative selection	
donor	patient	0201	0206
0201	O 0206		
0206	X 0201		
0206	X 0207		
0207	O 0206		
0201	O 0207		
0207	O 0201		

愛知県がんセンター・川瀬孝和、松尾寛太郎、森島崇雄
 組織適合性学会

9 99 番
 HLA-A*0201 F Y
 HLA-A*0206 Y Y
 HLA-A*0207 F C

A2 super motif

A*0201: L and M were the preferred.
 I, V, A, T, Q were tolerated.
 A*0206: Q, V, A, T were all well tolerated.
 L and M were less well tolerated.

(Sidney et al 2001, Hum Immun.)

まとめ
 A2サブタイプ間における一方性のGvHD発症は、A2*0206の結合ペプチドレパートリーが*0201あるいは*0207のレパートリーに含まれることに起因している可能性がある。