

骨髓内骨髓移植とドナーリンパ球輸注法を用いた 癌治療法の開発

関西医科大学 病理学第一講座

同 癌治療センター

池原 進

現在、癌の免疫療法としては、ドナーリンパ球輸注(DLI)が注目を集めているが、DLIの副作用である移植片対宿主病(GvHD)の予防策と治療方法がないため、根治には至っていない。

我々は、最近、骨髓内骨髓移植(IBM-BMT)という新しい骨髓移植(BMT)の方法を開発した(Blood 97: 3292-3299, 2001)。この方法を用いると、ドナーの間葉系幹細胞(MSC)が移植されるので、GvHDが起りにくい(Stem Cells 22:125-134,2004)。これは、MSCから免疫機能を抑制するcytokinesが分泌されることによる。さらに、BMTの際の前処置として用いられる放射線量を減量しても生着不全が生じない。これは、ドナーのMSCが移植されるとドナーの造血幹細胞をnursingすることによって、ホスト側の免疫担当細胞の攻撃をprotectすることによる。従って、放射線量を減量することが可能になり、放射線の副作用が軽減できる。以上の事実に基づいて、この方法を悪性腫瘍の治療に応用することを試みた。

まず、Meth A (線維肉腫)を用いたマウスの実験で、IBM-BMTとCD4⁺ T 細胞を除去した脾細胞をドナーリンパ球輸注(DLI)に用いる(CD4-DLI)ことによって、GvHDのみならず腫瘍の増殖をも抑制できることを発見した(Stem Cells 23:365-370,2005)。次に、この方法が、マウスの系だけでなく、ラットの系でも有効であること、さらに、肝転移の系に関しても適用できるかを明らかにするため、ラットの大腸癌(ACL-15)を用いて解析した。IBM-BMTとCD4-DLIはいずれの系でも腫瘍の増殖を抑制すること、さらに、GvHDは発症せずに、延命効果があることが判明した(Stem Cells 35:385-391,2007)。

さらに、Meth Aを用いて、“IBM-BMT+CD4-DLI”の系に、MethAで抗原刺激した樹状細胞(DC) (骨髓細胞からGM-CSF,IL-3,IL-12,IFN γ によりDCを誘導)を皮下注射すると、強力な腫瘍の増殖抑制効果が発揮できることを見出した(Int.J.Oncol. 30: 1309-1315, 2007)。

我々の開発したIBM-BMTとDLIのプロトタイプに、種々の免疫療法を併用することにより、悪性腫瘍の根治療法を開発し、ヒトへの応用に役立てたい。

2007年6月23日
平成19年度厚生労働科学研究再生医療等研究事業
小寺班 班会議

High-Dose Immune Suppressive Therapy and
Autologous Peripheral Blood Stem Cell
Transplantation for Systemic Sclerosis:
Analysis of Immune Reconstitution

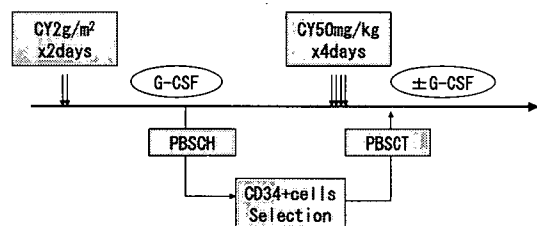
Koji Nagafuji, Hiroshi Tsukamoto,
Takahiko Horiuchi, Mine Harada
Kyushu University, Fukuoka, Japan

Objective

We previously reported the safety and efficacy of high-dose immune suppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation (autologous PBSCT) for systemic sclerosis (SSc).

The objective of this study is to analyze the immune reconstitution after autologous PBSCT in 10 patients with SSc in order to elucidate the mechanism of long-term efficacy.

High-Dose Immune Suppressive Therapy and Autologous PBSCT



CY: cyclophosphamide, PBSCH: peripheral blood stem cell harvest,
PBSCT: peripheral blood stem cell transplantation,
G-CSF: granulocyte colony stimulating factor

Patient profile

Patient No.	Sex	Age (years)	PS	mRSS	IP	anti- Sci-70	Previous Treatment	Follow-up (month)
1	F	54	2	16	+	+	St, CY	55
2	M	55	2	15	+	+	St	47
3	M	58	2	31	+	-	St, CY	44
4	F	54	1	26	+	+	St, CY	42
5	F	53	1	28	+	+	St	39
6	F	48	2	32	+	+	St, CY, CsA	35
7	F	34	1	8	+	-	-	20 (Dead by disease progression)
8	F	61	1	26	+	+	St	19
9	F	61	2	32	+	+	St, CsA	14
10	F	44	2	15	+	+	St, CY	10
Mean ± SD		51.9 ± 8.5	23.0 ± 8.3					32.5 ± 14.7

PS, performance status; mRSS, Modified Rodnan skin score;
IP, interstitial pneumonia; St, Corticosteroid; CY, Cyclophosphamide; CsA, Cyclosporin A

Number of reinfused cells and hematologic recovery

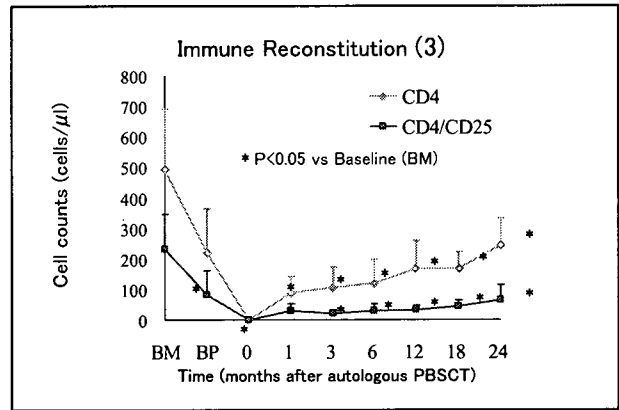
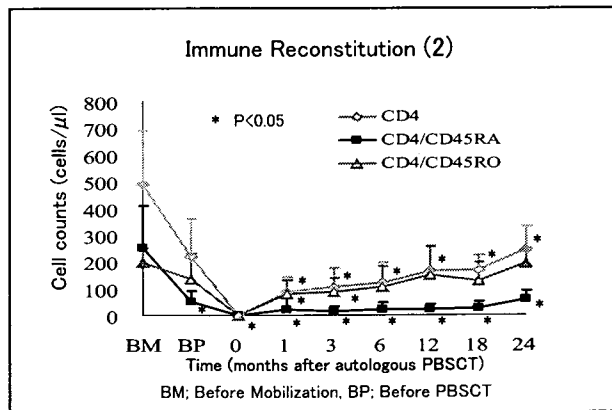
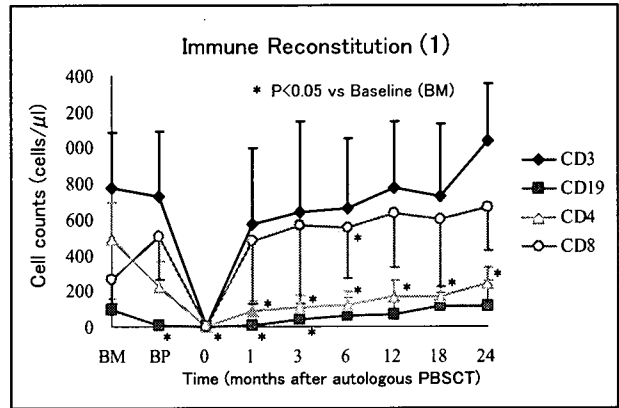
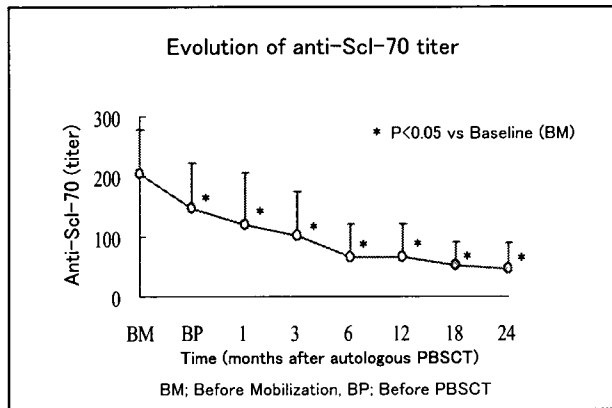
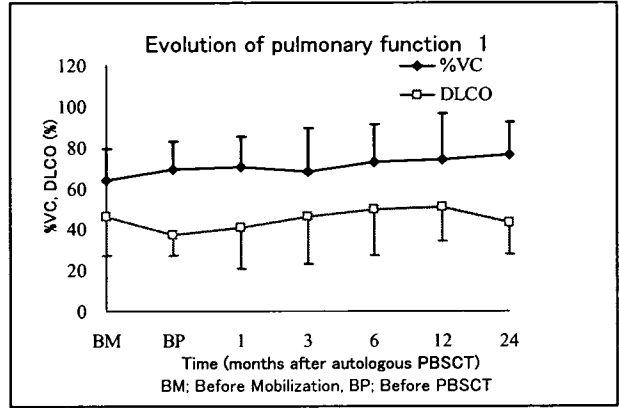
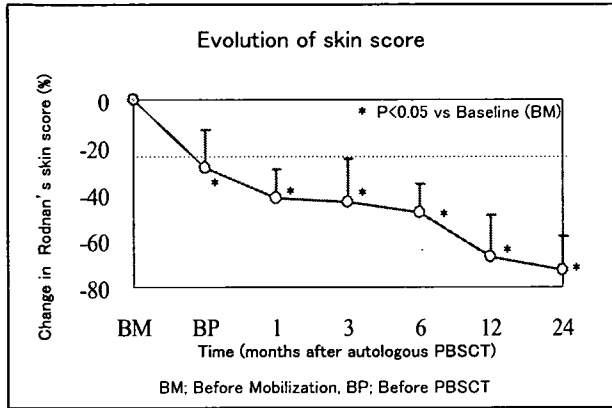
Patient No.	Number of reinfused CD34+ cells (x10 ⁶ /kg)	Number of reinfused CD3+ cells (x10 ⁶ /kg)	ANC >0.5x10 ⁹ /l (day)	Platelet >50x10 ⁹ /l (day)
1	8.4	0.33	9	20
2	4.9	0.27	9	10
3	2.2	2.95	10	12
4	2.1	1.71	11	16
5	7.2	3.00	13 (G-)	9
6	4.0	2.35	11	11
7	9.1	1.03	13 (G-)	14
8	3.0	0.32	17 (G-)	17
9	4.2	0.13	13 (G-)	13
10	4.9	0.0	17 (G-)	10
Mean ± SD	6.5 ± 5.6	1.0 ± 1.1	12.3 ± 2.8	13.2 ± 3.4

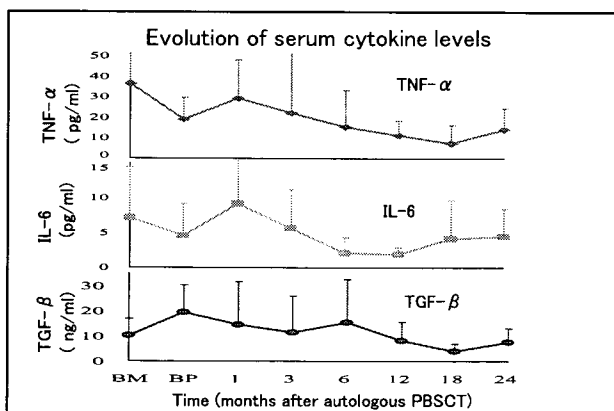
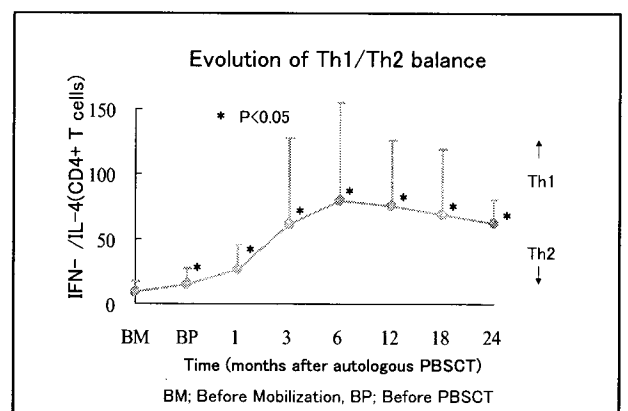
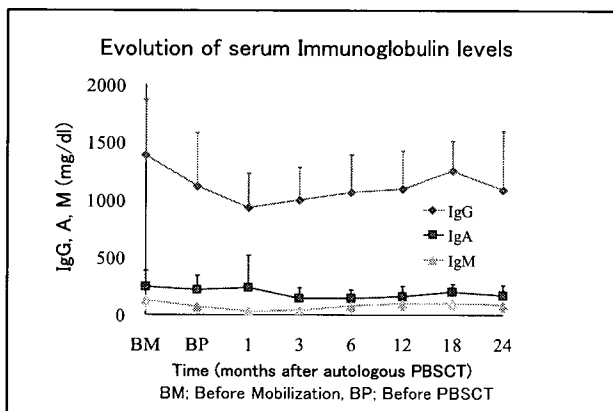
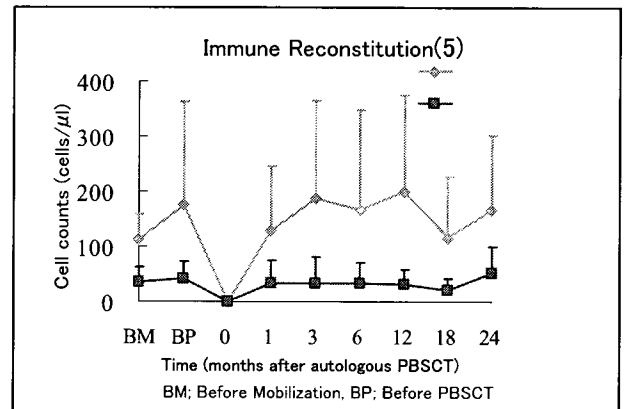
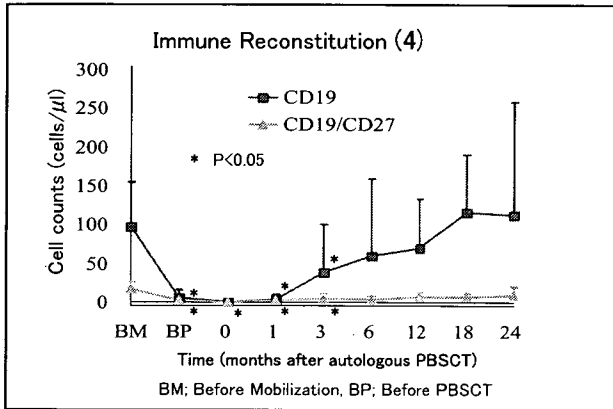
ANC, absolute neutrophil count; G(-), without G-CSF

Toxicity

Toxicity	Number	Grade (NCI)
ADV hemorrhagic cystitis	2/10	3
Herpes Zoster	5/10	2-3
Herpes Simplex	1/10	2
Bacterial pneumonia	1/10	3
Sepsis	1/10	3
CMV antigenemia	6/10	1-2
Cardiovascular	3/10	2-4
Hemorrhage	2/10	3
Pulmonary	1/10	3
Gastrointestinal	10/10	1-2
Hepatic	7/10	1-3

NCI, National cancer institute; ADV, Adenovirus
CMV, Cytomegalovirus





Discussion

1. Recovery of CD4+ T cells was mostly due to the expansion of surviving memory CD45RO+ cells and was suppressed up to 24 months after autologous PBSCT.
2. Recovery of CD4+CD25+ T cells was severely suppressed, indicating that the expansion of regulatory T cells after PBSCT is not the cause of the efficacy of autologous PBSCT on SSc.
3. The shift of the Th1/Th2 balance from Th2 to Th1 might have a favorable effect on SSc.

Conclusion

High-dose immune suppressive therapy with autologous PBSCT improves the disease activity of patients with SSc by suppressing CD4+ T cells and by correcting the cytokine imbalance.

平成19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回研究会議（名古屋）

平成19年6月23日

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 森尾友宏
同・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

対象症例

CMV

造血幹細胞移植*後のCMV感染症で診断時に:

- (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
DHPG (Gancyclovir)及び、またはFoscarnetにて2週間治療した時点で
CMVが検出され、症状が持続する

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法で検査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。
前処置の方法、GVHD予防方法などの種類を問わない。
HLA不一致 座数(適合度)はこれを問わない。

診断時に登録

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・グリブラス 10ml/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。
ステロイドの投与を認める(Prednisoloneとして0.5mg/kgまで)。

感染症

以下の感染症以外の併存は可とする(ウイルスの検出は除外基準としない)。

- 1) 敗血症を含む重症細菌感染症
- 2) 重症真菌感染症(アスペルギルス肺炎、ムコール感染症など)
- 3) EBV-LPD
- 4) 薬剤抵抗性重症水痘感染症
- 5) 重症RSウイルス感染症
- 6) 麻疹

従って、Adenovirus感染症などにおけるBKVの検出は不適格としない。 **重複感染可**
重症Adenovirus感染症や重症CMV感染症の併存は可能とする。

不適格症例はパイロット治療としてピックアップ

2006-11からの登録患者

は2007.1以降

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)	
18	C	Aplastic anemia	CBSCT	CMV	EBV		EBV+, CD4 <5%	
19	C	CAEBV-PTEB-LPD	CBSCT		EBV		CD4増殖不良	
20	H	Panconi anemia	CBSCT	CMV	EBV-AHS			投与検討中
21	A	AML	R-BMT	CMV			CMV感染後 > 18 months	投与 -eGVHD I
22	I			CMV	BKV			投与検討中
23	D	PTCL	CBSCT	CMV		CMV感染後 > 6 months	CD4増殖不良	観察不可
24	C	AML	R-BMT		BKV			照射DLI Ⅱ 投与 -GVHD
25	J	CAEBV/PTCL	R-BMT		EBV			投与検討中
26	K	Aplastic anemia	UR-BMT	CMV				CD4+ 4% Grade IV GVHD
27	L	ALL	UR-BMT	CMV				CD4 10/mm3 steroid

有害事象

AML←R-BMT: CMV感染症(18ヶ月以上)

慢性GVHD(皮膚)の悪化、慢性GVHD(咳嗽、CT上の間質性陰影)の出現

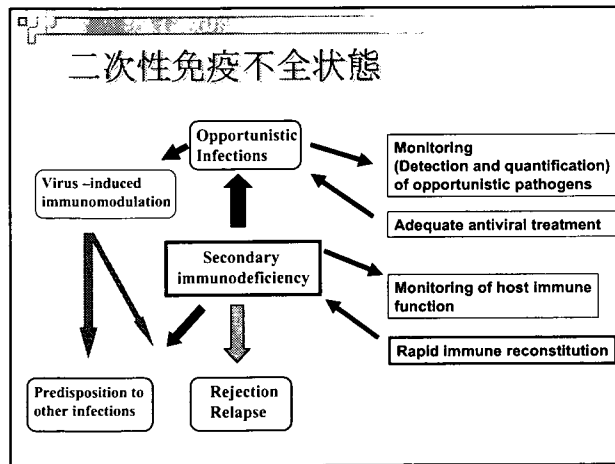
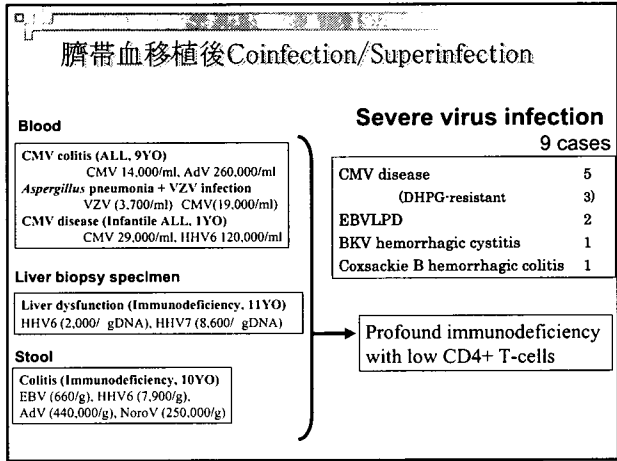
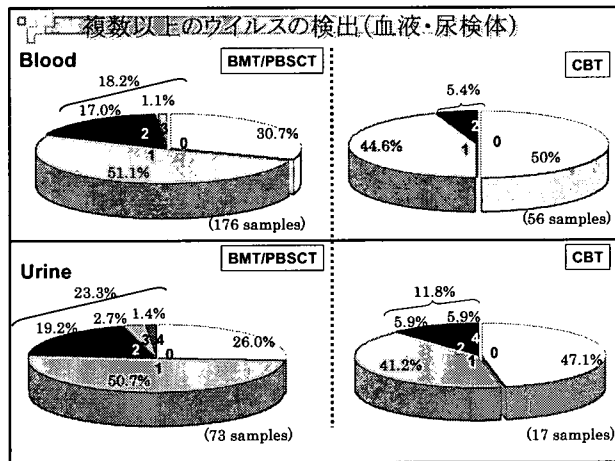
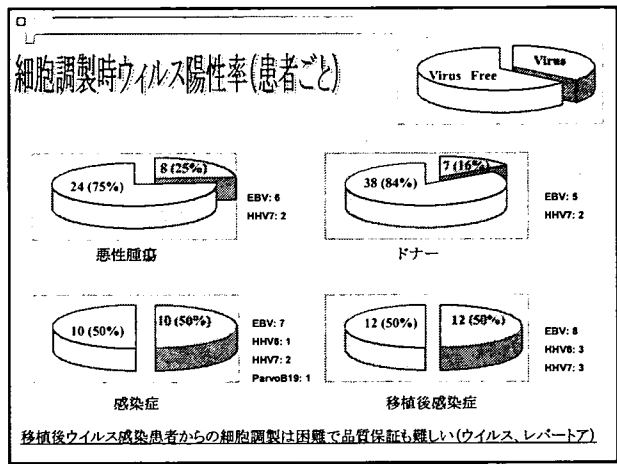
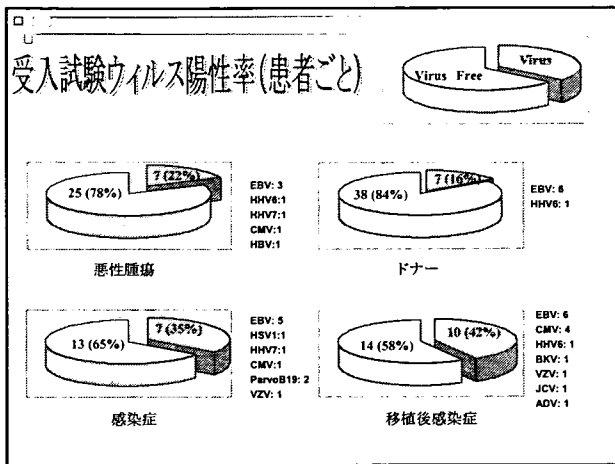
AML←R-BMT: BKV出血性膀胱炎・膀胱内血腫、DLI x 3

急性GVHD grade II, Hemophagocytic syndrome

その他 acute GVHD grade I-II (R-BMT) 2例

基準を満たした細胞を調製できなかった症例

No	施設	原疾患	移植	対象感染症	合併感染症	不適格理由
4	B	CML	UR-BMT	ADV cystitis	CMV	HHV6陽性 E. faecalis陽性
5	B	AML (M0)	UR-BMT	ADV cystitis	EBV, BKV	HHV6陽性
14	C	Blaui	CBSCT		EBV	CD4T増殖不良
16	F	CGD	R-BMT		VZV Aspergillus	HHV7陽性
18	C	Aplastic anemia	CBSCT	CMV	EBV	EBV+, CD4 <5%
19	C	CAEBV-PTEB-LPD	CBSCT		EBV	CD4T増殖不良
23	D	PTCL	CBSCT	CMV		CD4T増殖不良
26	K	Aplastic anemia	UR-BMT	CMV		CD4+ 4% Grade IV GVHD
27	L	ALL	UR-BMT	CMV		CD4 10/mm3 steroid



- ### 臍帯血CD4-DLI
- 臍帯血からのCD4T細胞培養方法の確立
 - 臍帯血バンクネットワークへの臨床研究申請
 - 解凍方法、培地、CD4選択時期などのプロトコル確立
 - 安全性試験・品質試験
 - 臍帯血CD4-DLI臨床試験プロトコル
 - primary endpoint**
 - 安全性/拒絶予防・生着促進/免疫学的再構築
 - 感染症予防/再発予防
 - 治療/再発治療
 - 投与時期**
 - 生着前、生着後
 - ・有事に

活性化 CD4 輸注療法の作用機序の検討

先端医療センター再生医療診療科
先端医療センター血液再生研究グループ

伊藤 仁也、
鹿村 真之

要旨

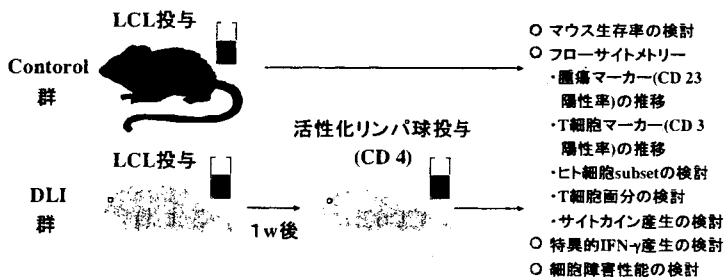
DLI の問題点を解決すべく、活性化ドナー CD4 輸注療法を開発した。期待できる効果として GVHD の軽減、GVL の増強があげられ、これまでの成果として評価可能な 28 例を解析し、寛解導入率は AML で 36%、ALL 36%、CML (AP) 33%であった。また III 度以上の GVHD は 16%であったことを報告してきた。

しかし活性化 CD4 陽性細胞の体内動態、作用機序は不明であった。今回、EBV-LCL を先行輸注して白血化させた NOD/SCID マウスに DLI を行う系を作成し、体内の T 細胞動態、および機能を解析した。活性化 CD4 輸注群では CD8 を主体とする EBV-LCL に対する特異的 CTL が誘導されており、DLI の作用機序として体内で CTL を誘導することが本質であると考えられた。

1. 研究の目的

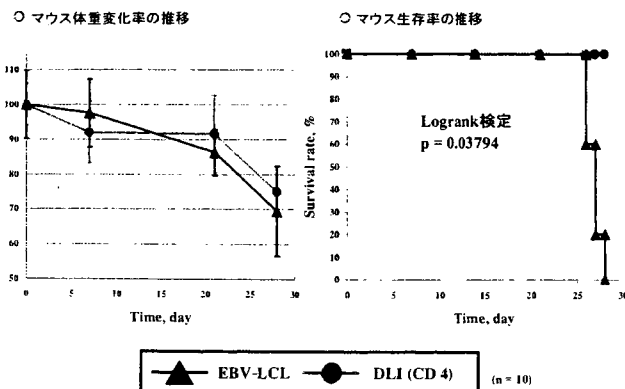
移植後再発白血病に対するドナー活性化 CD4 輸注療法の臨床的意義として①重症 GVHD の軽減②GVL の増強③効果発現までの期間短縮④ドナーの負担軽減があげられるが、実際の CD4 陽性細胞そのものが GVL の effector cell になっているのかどうかといった作用機序に関する知見は得られていない。また LAK 療法や CTL 療法の問題点として、サイトカインを用いて活性化した effector T cell は AICD (Activation induced cell death) や cytokine withdrawal cell death など投与後生体内での T cell の寿命はごく短いことが指摘されており、DLI に用いることが適当かどうかは不明である。今回、NOD/SCID マウスに EBV-LCL を輸注して白血化させたモデルマウスに LCL と同一ドナーより採取した活性化 CD4 輸注を行うことにより、マウス体内での T cell 動態を詳細に検討することにより作用機序の解析を行った。

2. DLI モデルマウス



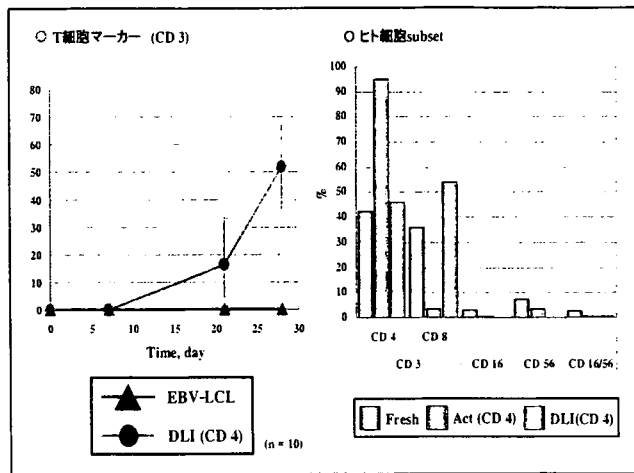
健康人から採血した末梢血より B cell を分離して EBV を感染させて不死化し、EBV-LCL を作成した。これを 6-8 週齢の NOD/SCID マウスに移植すると白血化すると同時にリンパ節、肝臓、脾臓、胸腺、肺、腎臓に腫瘍を形成し、移植後約 1 ヶ月で全例腫瘍死する系を作成した。EBV-LCL で白血化させたマウスに同一ドナーより採取した活性化 CD4 陽性細胞を輸注して DLI の効果を検証するとともに輸注した T 細胞の体内動態および生着した T 細胞機能を検討した。

3. マウスモデルにおける DLI の効果



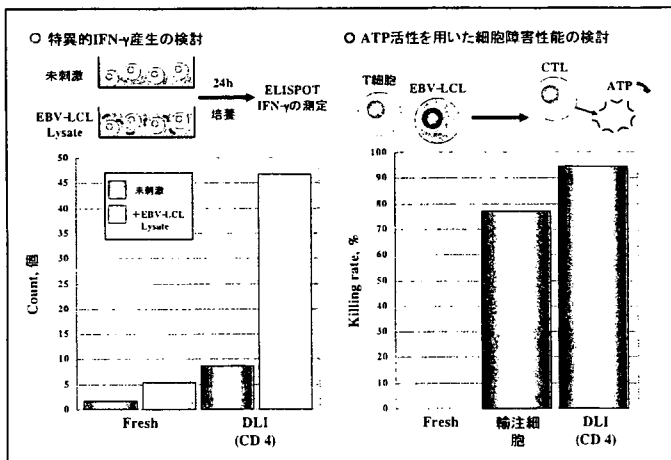
活性化 CD4 陽性細胞輸注群では、マウス末梢血中の LCL (CD23 cell) の割合が減少した。LCL を投与した群に認められた腎臓、肝臓、肺の腫瘍に関しては、肉眼的に DLI 群では明らかに腫瘍形成を抑制した。その結果、生存率を有意に改善させた。GVHD は認めなかった。

4. 輸注 T 細胞の体内動態



EBV-LCL 投与後 1 週目に同一ドナーより作成した活性化 CD4 陽性細胞を 1×10^6 /マウス輸注した。マウスの末梢血を 1 週毎に眼窩採血により採取してフローサイトメトリーによりヒト CD3 陽性細胞および CD4, CD8 陽性細胞を測定した。活性化 CD4 陽性細胞は輸注後 24 時間以内に末梢血中より消失 (FACS 解析での感度以下) するが輸注後 3 週目よりマウス血球に占めるヒト CD3 の陽性率は増加し、4 週目には約 50% にも達した。4 週目にマウスを解剖して、T 細胞分画および臓器分布を解析した。輸注した活性化 CD4 の純度は 97%、CD8 の混入は 1.5% であったが、4 週目のマウス体内で増加した T 細胞は CD8 優位であった。T 細胞の体内分布は末梢血の他、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺で認められた。

5. マウス体内で増幅した T 細胞の機能解析



輸注後 4 週目に体内で増加したヒト T 細胞をマグネットイムノビーズ法で分離して EBV-LCL に対する細胞障害活性を①細胞内サイトカイン測定法②ELISPOT 法③ATP ルシフェラーゼ法を用いた細胞障害試験を行い測定した。

①②に関しては、前処置として EBV-LCL Lyset を 24 時間添加培養してから回収し、EBV-LCL 特異的 T 細胞を測定した。その結果、体内で増幅した T 細胞の大部分は EBV-LCL 特異的に INF- γ を産性し、EBV-LCL に対する CTL であった。これは輸注した活性化 CD4 陽性細胞そのものに比較して有意に増加しており、体内で EBV-LCL に対する CTL を獲得したと考えられた。直接法による細胞障害活性でも高い細胞障害活性が認められ、機能的にも EBV-LCL を破壊する能力があることが確認された。

6. 活性化 T 細胞の体内寿命

IL-2 濃度と培養日数を変化させて、活性化 T 細胞の分画を CD45RO/CD62L の染色性により①Naïve T (CD45RO-/CD62L+)

②Effector T (CD45RO-/CD62L-)③Central memory T (CD45RO+/CD62L+)④Effector memory T (CD45RO+/CD62L-)の割合を測定して Activation induced cell death および IL-2 withdrawal cell death を検討した。また NOD/SCID マウスに輸注して長期に体内で長期に残存する T 細胞を解析した。その結果活性化が強すぎると培養細胞は Effector T 細胞に誘導されて細胞死を起こしやすいことが確認された。またマウス体内で長期に残存する T 細胞は主に CD4-T 細胞であり、memory 分画をとることが確認された。LAK 療法においては細胞輸注後、体内での IL-2 投与が必須であるが IL-2 の後投与なしで CTL を誘導可能であることが確認された。またペプチド刺激で得られる特異的 T 細胞は Effector T 細胞となってしまうことから、体内での寿命は短いことが成果があがらない理由の一つと考えられている。Memory T の状態で投与することが成績改善に役立つものと考えられる。

7. まとめ

活性化 CD4 輸注においては輸注 CD4 陽性細胞は白血病細胞を認識し、CD8 陽性 CTL を誘導しうるということがわかった。また長期にわたり体内で作用を発揮するには Effector T まで培養することは逆効果であり、Memory T 細胞輸注が有用であることが示唆された。今回の EBV-LCL を用いた DLI 実験系では EBV-LCL 自体が強力な抗原提示細胞となりうるため、厳密には実際の作用機序を反映していない。今後、NOG マウスでヒト T 細胞を再構築したマウスモデルにて実験系を組む必要があり、計画中である。

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

平成 19 年 6 月 22-23 日 平成 19 年度第 1 回小寺班・加藤班合同研究会議

於：名古屋第一赤十字病院 東棟 内ヶ島講堂

「免疫療法の対象拡大のための新規マイナー抗原の同定状況」

愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部 赤塚美樹

1. ACC-6 マイナー抗原の臨床応用性の検討（追加所見）

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（mHag）を標的にすることの重要性が示されている。

前回の班会議で、HLA-B44 拘束性の *HMSD* がコードする mHag 特異的 CTL について抗原エピトープが同定され、白血病幹細胞でも該マイナー抗原が発現し CTL で傷害を受けることを報告した。

その後さらに細胞傷害性試験、他の造血器腫瘍での応用性、他のマイナー抗原特異的 CTL 反応との関連を検討した。ヒトの白血病の幹細胞は CD34+CD38⁻に存在するとされているため、FACS Vantage を用いて本分画をソーティングし細胞傷害性試験を行ったところ、全 CD34⁺分画と同様に傷害されることが判明した。また、多発性骨髄腫の患者より得た腫瘍細胞を CD138 抗体でポジティブセレクションし、細胞傷害性試験を試みたところ、抗原陽性の腫瘍細胞は CTL で傷害を受けた。TaqMan PCR でも CD138⁺骨髄腫細胞は *HMSD* 遺伝子を高発現しており、ACC-6 は GVM の標的となりうると考えられた。

ACC-6 特異的 CTL と ACC-4 特異的 CTL の患者体内での動態と、白血病細胞量（WT1）、GVHD との経時的関連をみたところ、ACC-6 特異的 CTL がより GVL 効果を反映している結果を得た。以上より、ACC-6 は白血病幹細胞および多発性骨髄腫でも発現し、CTL の標的抗原となりうることが示された。

2. 新規マイナー抗原の同定状況

①HLA-A*0206 拘束性の *UGT2B17* 由来マイナー抗原エピトープを同定した。

②HLA-A*2402 拘束性の ACC-1^Y アリルの反体側アリルもマイナー抗原（ACC-1^C）をコードする可能性があることを見出し、現在テトラマーを作成し、確認を行っている。なお、ACC-1^C が利用できれば、さらに 10%の日本人患者が免疫療法の対象となる。

③HLA-B*4002 拘束性の新規マイナー抗原遺伝子を 19q13 座に同定した。現在、エピトープマッピングと遺伝子の発現パターン、患者体内における動態解析（テトラマー使用予定）を実施中である。

3. 養子免疫療法の基礎的再検討

当センターにおける、養子免疫療法は昨年5月より再開したが、過去に登録された1例を除き新規症例はリクルートされていない。mHag の応用可能性は 40%前後まで増加したが、CTL クローンの生育不良および症例のリクルートが困難であることが原因と考えられる。

クローン化後の CTL の成育がとくに本質的な問題であるために、クローン化せずに CTL 株のまま養子免疫が出来ないかを検討しつつある。

①CTL クローンのソースについては、移植後のマイナー抗原に感作された末梢血だけでなく、入手できれば骨髄細胞も考慮する。これは ACC-1^Y 特異的 CTL が特に移植後1年以上経過した後は主に骨髄に存在し、その表現型も Central memory (T_{CM}) が主体であるという preliminary な所見による。

また、既に開始したマイナー抗原ペプチドワクチン後に増加してくる CTL を *ex vivo* にて以下のように増殖することも検討する。

②マイナー抗原特異的 CTL の誘導はこれまでと同様に抗原ペプチドを用いるが、MoDC 等の培養操作が煩雑なものを避け、できるだけ分離・凍結しておいた単核球細胞そのものを抗原提示細胞とする。また、反復刺激により CTL が分化してしまい増殖能を失ってくるので、早期にポジティブセレクションを行う。この方法として、テトラマー、CD107 抗体、IFN- γ キャプチャー法なども考えられるが、CTL の刺激・アポトーシス防止効果のある CD137 抗体を用いたポジティブセレクション法を考慮する (BioMedCore 社、MBL と共同研究中)。HLA-A24 拘束性 CMV pp65 ペプチド刺激に引き続いて CD137 抗体を用いたポジティブセレクション法はテトラマーで染まる細胞純度も高く、生存率も保たれていた。ポジティブセレクション後にどの方法で、どの程度まで *ex vivo* で増幅するのが妥当かは、今後は実際に臨床試験で用いるマイナー抗原エピートプを用いて検討する予定である。

非遺伝母HLA抗原(NIMA)相補的血縁者間移植後の 遅発性合併症に関する調査

一戸 辰夫、諫田 淳也

1/18

CASE REPORT

Graft rejection and hyperacute graft-versus-host disease in stem cell transplantation from non-inherited maternal antigen complementary HLA-mismatched siblings

Hirokazu Okumura¹, Masaki Yamaguchi², Takeharu Kotani², Naomi Sugimoto³, Chiharu Sugimori¹, Jun Ozaki¹, Yukio Kondo¹, Hirohito Yamazaki¹, Tatsuya Chuhjo², Akiyoshi Takami¹, Mikio Ueda³, Shigeaki Ohtake⁴, Shinji Nakao⁵

¹Department of Leukemia Transplantation, ²Osaka University Graduate School of Medical Science, ³Department of Internal Medicine, ⁴Osaka Prefecture Central Hospital, ⁵Department of Internal Medicine, NTT West Japan Kansai Hospital, ⁶Department of Laboratory Science, ⁷Osaka University Graduate School of Medical Science, Suita, Osaka, Japan

Case 1: 27M, CML, BC after UBM—Grade 3 aGVHD

Case 2: 15F, SAA, refractory to IST—Graft rejection

Case 3: 32M, Ph-ALL, refractory—Grade 4 aGVHD

5/18

Lessons learned from animal models

Robustness of tolerogenic “NIMA effect” appears to be dependent on

- the degree of in utero exposure to NIMA (Billingham 1953, Zhang & Miller 1993, Andrassy 2003, Matsuoka 2006)
- the degree of exposure to NIMA via breastfeeding (Campbell 1984, Andrassy 2003, Aoyama in preparation)
- the amount of maternal cell microchimerism (Andrassy 2003,)
- particular MHC combinations between mother and offspring (Vernochet 2004, Molitor in preparation)

6/18

NIMA相補的移植後の長期生存者

2000-2004 小寺班研究の追跡調査

05/2000-06/2003の期間にHLA-A, -B, -DR の不一致がGVH方向に2抗原以上存在するNIMA相補的血縁者からT細胞除去を用いない移植を受けた35例を登録。

02/2004時点における生存例は15例。



03/2007時点における転帰

4例 死亡(原疾患増悪2例, BO 2例)

10例 寛解生存中

1例 調査中

3年以上の寛解生存例12例を確認。

9/18

調査参加施設

大阪市立大学医学部附属病院 血液内科 (日野 雅之)
大阪府立母子保健総合医療センター 血液・腫瘍科 (澤田 明久、河 敬世)
川崎医科大学附属病院 血液内科 (伊藤 満)
京都大学医学部附属病院 小児科 (足立 壮一)
京都府立医科大学病院 血液内科 (島崎 千尋)
鈴鹿厚生総合病院 内科 (岡 宏次)
中通総合病院 小児科 (渡辺 新)
名古屋医療センター 血液内科 (濱口 元洋)
松下記念病院 小児科 (吉原 隆夫)
松下記念病院 内科 (魚嶋 伸彦)
山梨大学医学部附属病院 小児科 (犬飼 岳史)

(五十音順、敬省略)

10/18

主な調査項目

- * 最終観察日における転帰・原疾患の状態
- * 最終観察日における免疫抑制剤投与の有無
- * 生存例のKPS(16歳未満の場合 Lansky scale)
- * 慢性GVHDによる臓器障害の程度をNIH consensus development projectによって提唱されているスコアリングシステム (Filipovich AH, et al. BBMT 2005;11:945)に準拠して、皮膚・口腔・眼・消化管・肝臓・肺・関節/筋膜の最重症時の状態をscore 0からscore 3までの4段階で評価。
- * 慢性GVHD以外の医療介入を要する移植関連合併症の有無。

11/18

Long-term survival after NIMA-complementary SCT

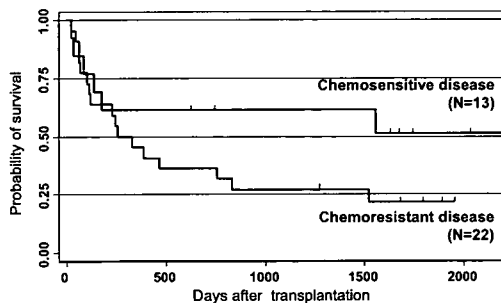
12 pts had been alive w/o recurrent disease >3 yrs.

Age at entry	Dx	Status at SCT	Donor type	Graft	GVH mismatch	gGVHD (grade)	cGVHD	IS therapy @last F/U	OS	Current status (RPS/APS)
3M	AML	Refractory	NIMA-sib.	BM	A+B	1	E	FK506+PSL<0.5+MMF	3Y5M	Alive in CR (80%)
3M	AML	Refractory	Mother	BM	A+B	2	E	PSL>=0.5	4Y2M	Died of BO in CR
44M	ALL	CR	NIMA-sib.	PB	ABDR	3	E	off (day 587-)	4Y3M	Died of BO in CR
11M	ALL	CR	Mother	BM	A+DR	1	N	off (day 1285-)	4Y5M	Alive in CR (100%)
17M	NHL	Refractory	Mother	PB	ABDR	2	E	PSL<0.5	4Y7M	Alive in CR (80%)
2M	CML	CP	NIMA-sib.	BM	ABDR	2	E	off (day 943-)	4Y7M	Alive in CR (100%)
37F	AML	CR	NIMA-sib.	PB	B+DR	0	E	FK506+PSL<0.5	4Y3M	Alive in CR (80%)
31F	AML	Refractory	NIMA-sib.	PB	ABDR	2	E	off (day 88-)	4Y10M	Alive in CR (80%)
16F	ALL	Refractory	Mother	PB	B+DR	1	E	off (day 168-)	5Y2M	Alive in CR (80%)
56F	CML	CP	Daughter	PB	B+DR	1	E	PSL<0.5	5Y4M	Alive in CR (100%)
32M	CML	CP	Mother	PB	B+DR	0	E	FK506+PSL<0.5	5Y7M	Alive in CR (80%)
13F	AML	CR	NIMA-sib.	PB	B+DR	1	E	off (day 574-)	6Y	Alive in CR (100%)

13/18

NIMA-complementary SCT: Extended F/U

06/2007 update of a nationwide registry study 2000-2004



14/18

Organ involvement and scoring of chronic GVHD*

	No. of patients affected/examined	score 1 (mild)	score 2 (moderate)	score 3 (severe)
Skin	6/12	2	2	2
Mouth	3/12	3	0	0
Eyes	3/12	2	1	0
GI tract	2/12	2	0	0
Liver	4/12	1	3	0
Lungs	6/12	3	0	3
Joints and fascia	2/12	1	1	0
Genital tract	NE	NE	NE	NE

*according to NIH consensus scoring system

15/18

Number of affected organs and total cGVHD scoring

No. of involved organs	observed/ examined	Total score (0-24) including PS	observed/ examined
0	1/12	0~2	3/12
1~2	7/12	3~4	3/12
3 or more	4/12	5 or more	6/12

16/18

Other late complications related to chronic GVHD

	Incidence	score 1 (mild)	score 2 (moderate)	score 3 (severe)
Esophageal stricture/web	0/12	0	0	0
Pericardial effusion	1/12	0	1	0
Pleural effusion	1/12	0	1	0
Ascites	1/12	0	1	0
Nephrotic syndrome	0/12	0	0	0
Peripheral neuropathy	0/12	0	0	0
Myasthenia gravis	0/12	0	0	0
Cardiomyopathy	0/12	0	0	0
Polymyositis	0/12	0	0	0
Cardiac conduction defects	0/12	0	0	0
Coronary artery involvement	0/12	0	0	0
Eosinophilia	1/12	1	0	0
Thrombocytopenia	0/12	0	0	0

17/18

Summary

* 2000-2004年班研究に登録されたNIMA相補的血縁者間移植例の追跡調査を実施した。

* 登録された35例中、3年以上の無再発生存が得られていた例が12例確認された。

* 12例中6例では免疫抑制剤の中止が可能となっており、移植実施から中止までに要した日数の中央値は581日(範囲88日~1385日)であった。

* 12例中11例に広範型の慢性GVHDを認め、4例では3臓器以上への罹病が見られた。特に皮膚と肺において、比較的重篤な症状の出現頻度が高く、2例では、重篤な肺合併症(BO)が移植後死亡の直接的原因となっていた。

* 今後さらに多数例を対象として調査を行なう必要がある。

18/18

June 23, 2007

厚生労働科学研究ヒトゲノム 医療等事業
 (骨髓、末梢血等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用 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

血縁者間HLA半合致ミニ移植

臨床第 I/II 相試験

兵庫医科大学 内科学講座 血液内科
 吉原哲、池亀和博、小川啓恭
 富山県立中央病院
 吉田喬

移植プロトコル

Flu 30 mg/m² x 6
 BU 4 mg/kg
 rATG (F) 2 mg/kg x 4
 Ara-C 2 g/m² x 4
 FK506
 mPSL 1mg/kg

移植前日 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0

非寛解期例で追加 幹細胞: 2.0 x 10⁹/kg以上の CD34陽性細胞を含むPBSC

PBSC

試験の目的

主要評価項目

1) 第 I 相試験では、移植35日以内の同種移植片生着率(ドナー由来細胞90%以上)をprimary endpointとする

2) 第 II 相試験では、移植後100日の時点での生存率をprimary endpointとする

症例背景

#	病名	病期	年齢・性別	ドナー	HLA mis GvH/HvG	CA	CD34 cells (x 10 ⁹ /kg)
001	MDS	RAEB	45M	Sib (P)	2/3	-	2.87
002	MDS	RAEB	57M	Son	3/3	+	3.95
003	AML M3	1 st Re	54M	Son	3/3	+	3.55
004	AML M1	3 rd Re	32F*	Mother	2/2	+	4.97
006	AML M1	CR1	34M**	Sib (U)	3/3	-	3.99
007	Ph+ALL	CR1	47M	Son	2/3	+	3.62
008	AML	CR2	56F	Daughter	2/2	-	2.47
009	DLBCL	2 nd Re	43F	Sib (P)	2/3	+	4.02
010	MDS	RAEB	50M	Son	2/3	+	6.7
011	MDS	RAEB	53M	Nephew	3/3	+	2.32

* 誘発移植後再発 ** 臓器障害 (肺)
 (005は、登録後にfull blastであることが判明し前処置前にプロトコル・オフ)

症例経過

#	病名	好中球 >500/ l	血小板 >2万/ l	D100 生存	aGVHD	生存日数	転帰
001	MDS	11	11	Yes	0	481+	CR⇒Rel
002	MDS	14	14	Yes	I	163	CR⇒Rel⇒再移植⇒死亡
003	AML	12	14	Yes	0	421+	CR
004	AML	12	12	Yes	0	181	nonCR⇒再移植⇒死亡
006	AML	14	17	Yes	III*	365+	CR
007	ALL	15	低下せず	Yes	I	355+	CR
008	AML	10	22	Yes	0	292+	CR
009	DLBCL	11	26	Yes	0	208+	CR
010	MDS	13	41	Yes	III**	159+	CR
011	MDS	12	12	Yes	I	115	CR, GVHD⇒TMA⇒死亡

*ステロイドの急速減量後に出現、mPSL1mg/kgにてCR
 **mPSL500mgにてCR

第 I 相試験のまとめ

Primary endpointである生着に関し、10例中全例において速やかなドナー型血球回復を認めた

重篤な有害事象は認めなかった

10例中全例が100日以上生存した

今後の計画

効果安全性評価委員に諮った後、第 II 相試験にすすむ

第 II 相では、ivブスルファン(ブスルフェックス)も可とする

試験に参加して下さるご施設がありましたら、ご連絡ください! (E-mail: haplo@hyo-med.ac.jp)

June 23, 2007

厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等事業
 [骨髓、末梢血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

血縁HLA不適合移植における難治性
 GVHDに対する少量ATG療法
 臨床第 I/II 相試験

兵庫医科大学 内科学講座 血液内科
 吉原哲、池亀和博、小川啓恭

背景

- HLA不適合移植後GVHDは、頻度が高いだけでなく、治療抵抗性である。
 - HLA不適合移植後においては、GVHD予防および治療に高用量のステロイドが必要である。しかしながら、TMAなどの合併症により、十分に使用できない症例が存在する。
 - また、ステロイドの減量によりGVHDが再燃し、長期のステロイド投与から合併症を引き起こす症例もある。
- ⇒ステロイド増量が困難、あるいは有効であるが減量できない、などの症例に対する治療法を確立したい(重症のGVHDに対してではなく、やや軽症のものを対象とする)。

少量ATG療法に関する報告

- Bacigalupoらは、急性GVHDに対する治療として、少量ATG (Thymoglobuline, 1.25mg/kg 隔日×3回)が有効であることを報告している (Haematologica 2002)。
- またBacigalupoらは、移植後早期における少量ATG (1.25mg/kg, day 7 and 9)によるGVHDのpre-emptive treatmentが有効であることを報告した (EBMT 2007)。
- Rabbit ATGは、少量においてT細胞のapoptosis、anergyを誘導することが示唆されている。

対象症例

- 血縁HLA不適合(GVH方向に1抗原以上不適合)移植後の症例で、以下の1から3のいずれかを満たすもの。
 - ・ 1. ステロイド抵抗性急性GVHD: mPSL(換算)で1mg/kg以上の治療により3日間の治療で進行 or 5日間の治療で不変 or 7日間の治療で治癒せず(Hsu et al. BMT 2001)。
 - ・ 2. 急性GVHDの明らかな症状があり、TMAなどの合併症によりステロイド増量が不可能な症例。
 - ・ 3. 急性GVHDはステロイドによってほぼCRとなっているが、ステロイド減量により再燃するため、減量できない症例。
- 活動性の感染症を有する症例は除外する。

試験の目的

主要評価項目

- 1)第 I 相試験では、投与開始後100日以内の安全性の検討(重篤なアレルギー、感染症の頻度等)をprimary endpointとする
- 2)第 II 相試験では、投与開始後100日の時点における奏効率をprimary endpointとする

試験開始時に顕性の急性GVHDを認めず、ステロイド減量を目的とした場合は、"steroid sparing effect"として、急性GVHDを再燃させずに減量しえた状態について、ATG治療前後のステロイド量を記載する。1ヶ月以内にステロイドを20%以上減量できた場合、奏功とする。

治療プロトコル

- ゼットプリン注 2mg/kg、週1回投与。
- 効果が不十分であれば、1回の投与量を4mg/kgまで増量可。
- 他の免疫抑制剤は、すでに入っているものは併用も可とするが、増量はしない。可能であれば減量する。
- ゼットプリン注については、無償供与を受ける。

血縁HLAハプロ一致移植にみられる
GVL効果について

名古屋大学大学院 医学系研究科 小児科学
高橋義行 Itzel Bustos 濱 麻人 村松秀城
西尾信博 谷ヶ崎博 小島勢二

Related HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation using in vivo T cell depletion with ATG

- 1) Infusion of megadose CD34+ stem cells harvested from both BM and PB
- 2) In vivo T cell depletion with ATG
- 3) Virus surveillance: CMV, HHV6, adenovirus, HSV, EBV

Disease: AML, ALL, CML, MDS

	HLA matched sibling (n=158)	Related HLA mismatched (n=135)
Age	37(5-50)	24(3-50)
Disease status	Not significantly different	
Conditioning regimen	Bu/CY	Bu/CY/ATG

Dao-Pei Lu et al. Blood 2006 107. 8. 3065-3073

	HLA matched sibling (n=158)	Related HLA mismatched (n=135)	
2year leukemia free survival	71%	64%	p=0.27
Over all survival	72%	71%	p=0.72
TRM	14%	22%	p=0.1
relapse	13%	18%	p=0.4
Acute GVHD >II	32%	40%	p=0.13
cGVHD	13%	18%	p=0.97
CMV antigenemia	39%	65%	P<0.01
CMV IP	17%	17%	p=0.98
Hemorrhagic cystitis	13%	35%	P<0.01

Dao-Pei Lu et al. Blood 2006 107. 8. 3065-3073

症例 1 : K.S. 3歳 男児

<現病歴>

2005 9月 下肢出血斑出現、近医にて汎血球減少指摘され当院紹介される。

初診時末梢血:

WBC 2700 (N400 blast 53%)、Hb 8.8、Plt 7.1万、ret 4.0%
芽球はMP陰性・表面抗原はCD10,13,15,33,34,41,42,56, DR陽性であり急性骨髄性白血病 (M7) と診断。

染色体検査にて46,XY,t(16;21)(p11;q22)

2005 10/17~ AML-99寛解導入療法にて寛解が得られた。

2005 11/29~ 強化療法3コース行った後、

2006 3/31 BU、L-PAM、Fluで前処置、HLA一致非血縁者間骨髄移植施行。(ドナー: 28歳、女性)

2006 6/23 Skin aGVHD grade 1のみで重篤な合併症なく退院

2006 11月 Pltの減少を認め、マルクにて再発が確認された。

<入院時現症>

眼瞼結膜: 貧血なし
頸部リンパ節腫脹なし
呼吸音: 清、心音: 整、雑音なし
腹部: 平坦軟、圧痛なし、腸音亢進減弱なし
肝臓脾臓: 腫大なし

<検査所見 (12/25) >

WBC 1700/μl (Neut500 Blast18%)、Hb 10 g/dl、Ret 2.2% Plt 29000/μl
TP 6.6g/dl GOT 42IU/l GPT 35 IU/l LDH 441IU/l
TB 0.3mg/dl BUN 12mg/dl Cr 0.24mg/dl CRP 0.22mg/dl

<bone marrow examination (12/26)>

初診時とマーカーが同様のblastの増加

<HLA検査> ドナー: 母 32才 血液型 A+

Recipient: A 0206/2402 B 5101/5201 DR9 0803/1502
Donor: A 11/24 B 62/52 DR9 14/15

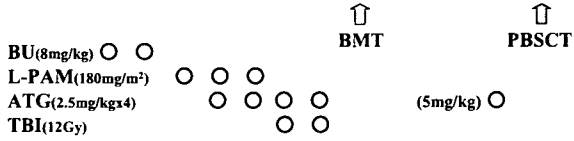
Recipient: C 1202 (CW3group) /1402(CW3group)
Donor: C 0401 (CW4group) /1202 (CW3group)



GVH方向のKIRリガンドミスマッチ

移植前処置、GVHD予防

day-7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4 +5



•GVHD予防: FK506+sMTX

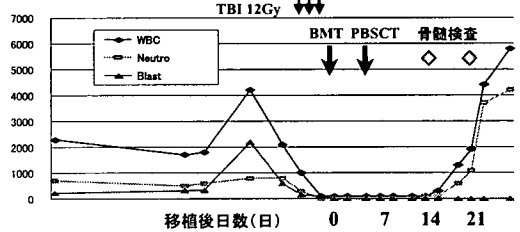
輸注細胞数

NCC 17.7×10^8 / kg
CD34+ 10.6×10^6 / kg

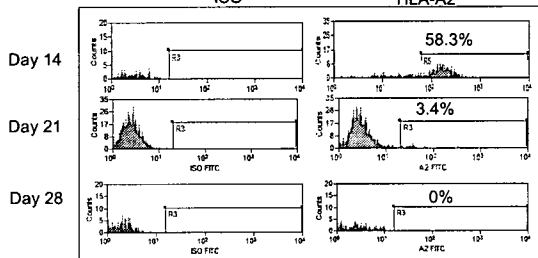
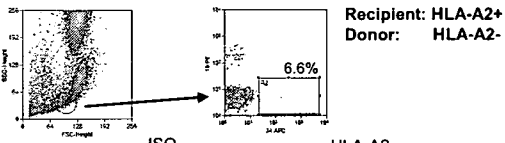
移植後経過

4歳男児、AML (M7) with t(16;21)、UR-BMT8ヶ月後再発
ドナー: HLA3座ミスマッチの母親、KIRリガンドミスマッチ (+)
非寛解期に再移植を施行

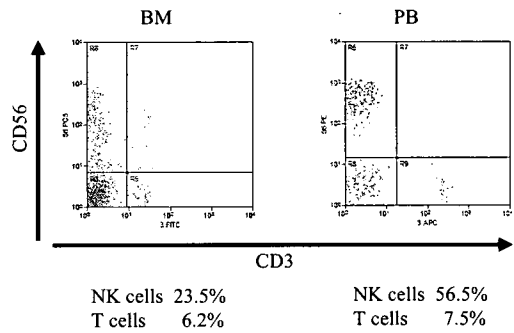
BU 140mg/m²/d × 2d ↓↓
LPAM 60mg/m²/d × 3d ↓↓↓
ATG 2.5mg/kg/d × 4d ↓↓↓↓



ミスマッチHLA座を利用したMRDの解析



Recovery of NK cells and T cells on Day21

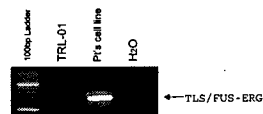


患者から樹立した細胞株

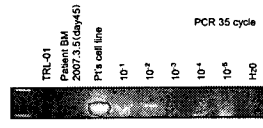
t(16;21)(p11;q22)
TLS/FUS-ERG融合遺伝子陽性

Surface marker (%)

	at the release	cell line
CD2	1	4.1
CD3	1.5	3.2
CD5	1.4	3.5
CD7	1.5	3.1
CD10	2.3	3.8
CD13	50	99.8
CD14	1.2	58.7
CD19	2.2	3.3
CD20	0.4	3.8
CD33	88.5	97.8
CD34	82.2	85.4
CD41	9.9	4.1
CD42b	7.8	3.9
CD58	68.6	65.5
CD117	74.5	54.7
CD44	84.7	3.8



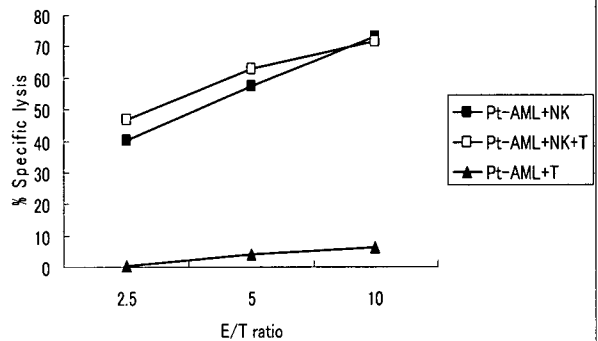
寛解時の患者検体でのMRD検索

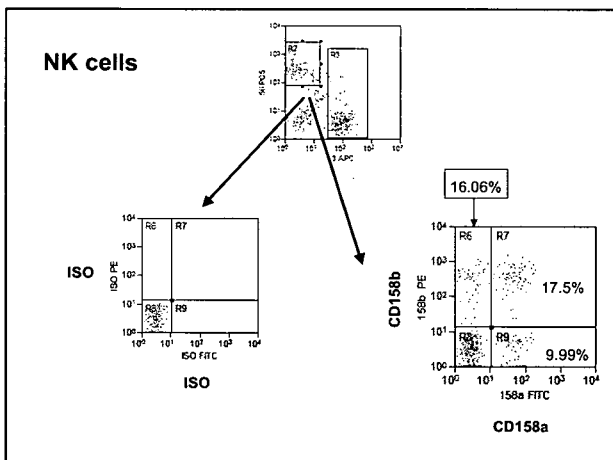
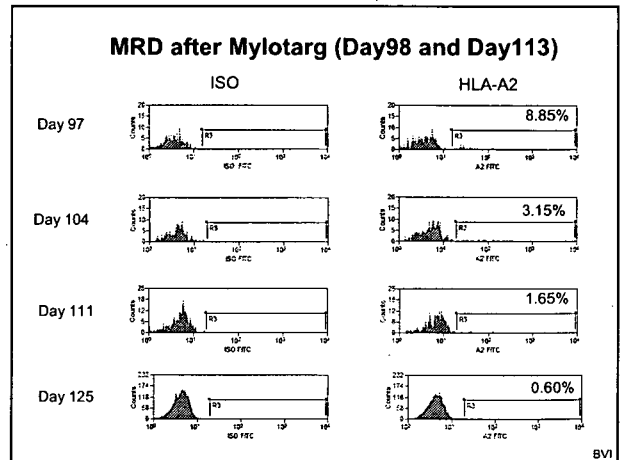
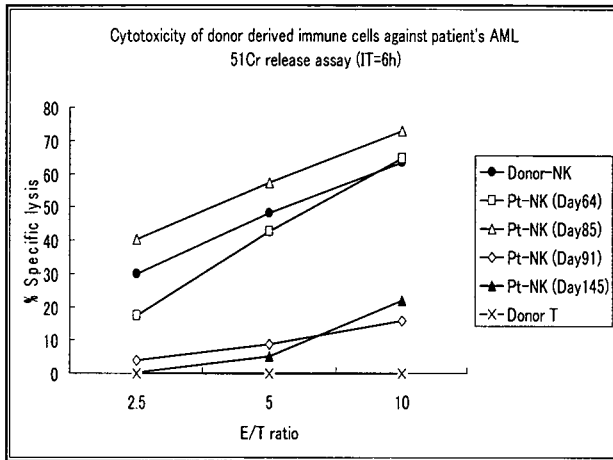


1/10⁵以下と推定される。再発系列は細胞株のcDNAをキャリアーを加えつつ10倍希釈して用いた。

Cytotoxicity of donor derived immune cells on Day85

51Cr release assay (IT=6h)





症例2

<症例> 12才 女児
 <主訴> 発熱、頸部腫脹
 <現病歴>
 2005年7月より全身倦怠感、8月下旬より頸部リンパ節腫脹と発熱みとめ、受診。
 <入院時現症>
 両側頸部リンパ節腫脹あり
 肝脾腫なし 発疹なし

入院時検査所見

Peripheral blood		Coagulation test		Surface marker(Bone marrow)	
RBC	201 × 10 ⁴ /μl	PT	14.9 (13.8) sec	CD 2	0.5 %
Hb	6.9 g/dl	APTT	29.0 (27.0) sec	CD 3	5.7 %
Ht	20.9 %	Fib	375 mg/dl	CD 4	1.4 %
Ret	18.0 %	ATIII	112.0 %	CD 5	0.7 %
Plt	2.6 × 10 ⁴ /μl	FDP	0.9 μg/ml	CD 7	36.4 %
WBC	67,800 /μl			CD 8	0.3 %
Lym	5.0 %			CD10	0.3 %
Blast	95.0 %			CD13	82.3 %
				CD14	0.3 %
				CD15	6.6 %
				CD16	11.5 %
				CD19	0.3 %
				CD20	2.6 %
				CD33	23.7 %
				CD34	97.2 %
				CD56	3.7 %
				HLA-DR	94.0 %

Blood chemistry		Bone marrow	
TP	7.6 g/dl	NCC	5.7 × 10 ⁴ /μl
T-bil	0.3 mg/dl	Blast	76.2 %
GOT	12 IU/l	Neutro	
GPT	6 IU/l	Seg	1.0 %
LDH	354 IU/l	Lym	15.8 %
BUN	10 mg/dl	Ery	7.0 %
Cr	0.4 mg/dl		
UA	3.5 mg/dl		
Na	141 mEq/l		
K	3.9 mEq/l		
Cl	105 mEq/l		
Ca	4.7 mEq/dl		
P	3.9 mg/dl		

Serological test		Chromosome	
CRP	1.9 mg/dl	46,XX,del(7)(q?)	
IgG	1,280 mg/dl		
IgA	284 mg/dl		
IgM	162 mg/dl		

骨髓像 (May-Giemsa 染色)
 POX(-)
 EST(-)

初発時治療経過

AML M0の診断で2005/8/26よりAML 99の寛解導入療法を行ったが、寛解導入不能であった。感染症の合併に加え、正常造血の回復は得られず、骨髄バンクドナーは待てないと判断し、緊急処置として、2005/10/27 父からのHLAハプロ一致移植を施行した。

SCTレジメン

HLA					血液型										
recipient	A	B	DR	A (+)											
2/24	60/35	4/12	A (+)												
donor(父)	A	B	DR	O (+)											
/24	46/35	11/12	O (+)												
day	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6	
BU(8mg/kg)	○	○													
L-PAM(180mg/m ²)	○	○	○	○											
TBI(12Gy)				○	○										
ATG(10mg/kg)						○	○								
										(5mg/kg)	○				
-GVHD予防: FK506+sMTX															
		有核細胞数			CD34(+)										
BMT :		5.1 × 10 ⁸ /kg			3.4 × 10 ⁶ /kg										
PBSCT(day+5) :		10.3 × 10 ⁸ /kg			3.1 × 10 ⁶ /kg										
(day+6) :		6.5 × 10 ⁸ /kg			2.6 × 10 ⁶ /kg										
Total :		21.9 × 10 ⁸ /kg			9.1 × 10 ⁶ /kg										

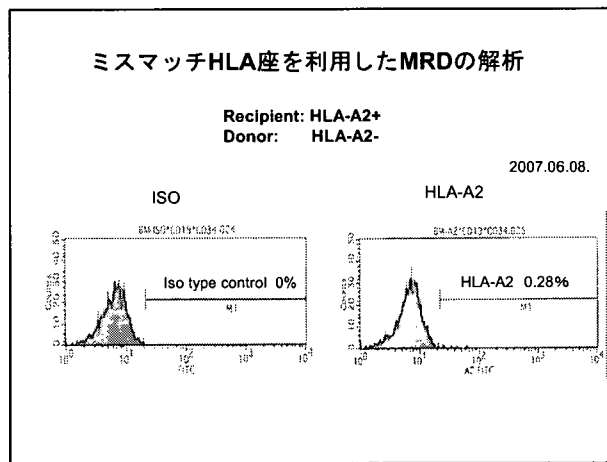
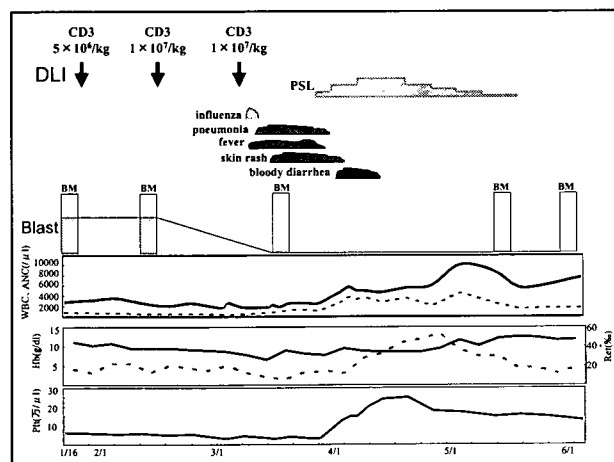
- ### 移植後経過
- ・day13に生着、以後寛解が得られた。
 - ・生着症候群と思われる発熱、発疹を発生したがVP-16 50mg/m²を2日間投与したところ著効した。
 - ・aGVHDはgrade II (skin3)
 - ・cGVHD limited type
 - ・day106に退院となった。

再発時

<年齢> 14才
 <現病歴>
 2007年1月(移植後15ヶ月)の定期採血で、血小板減少あり、骨髓検査で再発と診断。
 <入院時現症>
 表在リンパ節腫脹なし
 肝脾腫なし 発疹なし

Donor lymphocyte infusion after HLA haploidentical stem cell transplantation

- ・HLAミスマッチドナーからのDLIの効果と毒性については、いまだ明らかになっていない。
- ・イスラエルからの報告では、完全寛解は4人/22人(18%)。GVHDはHLA3/6一致の19例中、28%に見られた。
BBMT 2006;12:1295-1301
- ・北京大学からの報告では、15/20(75%)で完全寛解となり、2年のleukemia free survivalが40%と報告している。一方で、Grade III-IVのGVHDが6/20(30%)で起こり、そのうち3人が死亡している。
Haematologica 2007;92:414-7



まとめ

1. HLA不一致座を利用したMRD解析を行い、移植後残存Blastが約1ヶ月かかって徐々に消失したことを観察した。
2. Day21に骨髄、末梢血両方でNK細胞の早期回復が確認できた。
3. 樹立した患者白血病細胞株を用い、ドナー由来NK細胞が患者白血病細胞を殺すことがin vitroで証明された。
4. Day90以後にドナー由来NK細胞の患者AMLに対する障害活性が低下し、MRDの上昇と相関していた。
5. HLAハプロ一致移植後に再発を来たしたAML M0症例にDLIを施行し、寛解が得られた。インフルエンザ、肺炎を契機にInframation induced Immunereactionが起り、その結果GVL反応が得られたと考えられた。

最後に

- Haploidentical transplantationは、緊急的なAlternative donor sourceという位置づけの他に、強力な免疫療法の側面があり、T細胞のみならず、KIRミスマッチNK細胞によるGVL効果が期待できる。今後、GVL効果に適したドナー選択、移植前処置、DLI、Donor NK lymphocyte infusionを含む最適な移植法の検討が必要である。