

平成 19 年 6 月 23 日 於：名古屋第一赤十字病院

「同種末梢血幹細胞提供ドナー由来の急性骨髄性白血病を発症した 1 例」

尾関和貴<sup>1</sup>、村田 誠<sup>1</sup>、大橋春彦<sup>2</sup>、寺倉精太郎<sup>1</sup>、直江知樹<sup>1</sup>

- 1) 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学
- 2) 名古屋医療センター 造血幹細胞研究部

造血幹細胞移植後に発症する二次癌として、まれではあるがドナー細胞由来白血病（DCL）がある。1971 年に、HLA 一致同胞間骨髄移植を受けた ALL 女性患者に男性ドナー細胞由来の ALL が発症したとする初の DCL が報告されて以来、これまでにおよそ 40 例の BMT 後 DCL が報告されている。2001 年には、初の非血縁者間 BMT 後の DCL が報告されたことから、DCL の発症は家族内遺伝学的背景によるものだけでは説明できないことが明らかになった。また再生不良性貧血患者にも DCL 発症が確認されたことから、DCL は担癌患者以外でも発症しうる。さらには最近の臍帯血移植後 DCL の報告も記憶に新しい。

国内外で相当数の同種 PBSCT が実施されているにもかかわらず、同種 PBSCT 後 DCL は、2005 年の EBMT の調査報告に含まれている 2 例（詳細な記述なし）のみである。今回我々は、HLA 一致同胞間 PBSCT 患者において DCL の発症を経験したので、貴重と考え報告する。

DCL の診断は、古くは性染色体に着目した染色体分染法の結果に頼るしか無かったが、近年では分子生物学的手法を用いることにより、性差にとらわれることなく診断が可能となっている。我々の施設では、同意が得られた全ての移植例で移植後患者/ドナー間キメリズム解析を行っており（於：名古屋医療センター）、そのことが今回の症例が患者/ドナー間性一致でかつ移植前後の白血病がいずれも AML であったにも関わらず DCL と診断出来たことに寄与した。真の DCL 頻度はこれまでに報告されてきたもの（～0.1%）よりも高い可能性がある。

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 回合同班会議資料

## 非血縁者間骨髄移植における HLA-C 適合の臨床的意義

森島泰雄 川瀬孝和（愛知県がんセンター） 山本 健（九州大学生態防御研）  
 笹月健彦（国際医療センター） 組織適合性部会

HLA-A, B, DR の血清型が適合した JMDP5210 症例につき解析した。T 細胞除去 GVHD 予防法症例で、解析は多変量解析（Cox regression model）を用い、変数として[症例]に示した臨床的な因子と他座の適合度を用いた。  
 [症例] 急性リンパ性白血病 1301 例 急性骨髄性白血病 1405 例、慢性骨髄性白血病 887 例 骨髄異形性症候群 597 例 悪性リンパ腫 453 例 再生不良性貧血 302 例 GVHD 予防法：ATG 使用 400 例 ATG 未使用 4810 例 シクロスポリン使用 2733 例 タクロリムス使用 2437 例 移植前治療：全身放射線照射 4021 例 非照射 1189 例 全例骨髄破壊的全治療実施  
 HLA 座不適合の割合（GVH 方向）  
 HLA-A 13.4% HLA-B 6.4% HLA-C 29.2%  
 HLA-DRB1 19.6% HLA-DQB1 22.5% HLA-DPB1 65.7%.

HLA座適合度	重症急性GVHD(Ⅲ度以上)		死亡	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
A-1 locus mismatch	1.41 (1.20-1.66)	<0.001	1.31 (1.18-1.47)	<0.001
A-2 locus mismatch	1.79 (1.03-3.13)	0.036	1.62 (1.08-2.43)	0.019
B-1 locus mismatch	1.50 (1.22-1.84)	<0.001	1.30 (1.12-1.51)	0.001
B-2 locus mismatch	1.90 (0.58-6.21)	0.282	1.44 (0.52-3.94)	0.476
C-1 locus mismatch	1.93 (1.69-2.21)	<0.001	1.25 (1.14-1.36)	<0.001
C-2 locus mismatch	1.78 (1.27-2.49)	0.001	1.40 (1.11-1.76)	0.004
DRB1-1 locus mismatch	1.08 (0.88-1.32)	0.424	1.03 (0.90-1.18)	0.624
DRB1-2 locus mismatch	1.20 (0.69-2.11)	0.507	0.96 (0.63-1.45)	0.858
DQB1-1 locus mismatch	1.10 (0.91-1.33)	0.315	1.08 (0.95-1.23)	0.195
DQB1-2 locus mismatch	1.61 (1.02-2.54)	0.040	1.33 (0.95-1.86)	0.089
DPB1-1 locus mismatch	1.25 (1.09-1.45)	0.001	1.11 (1.01-1.21)	0.021
DPB1-2 locus mismatch	1.29 (1.08-1.54)	0.005	1.09 (0.97-1.22)	0.127

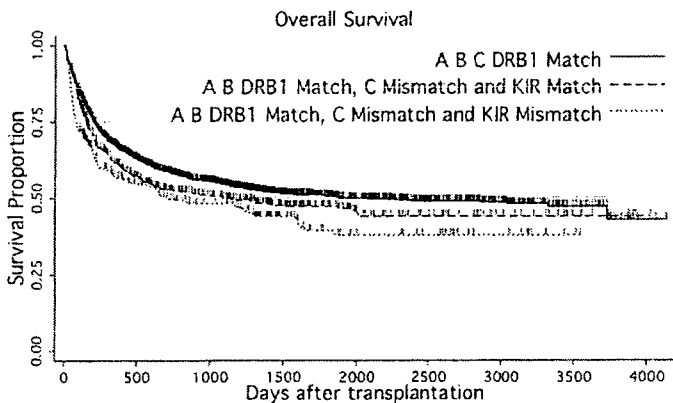
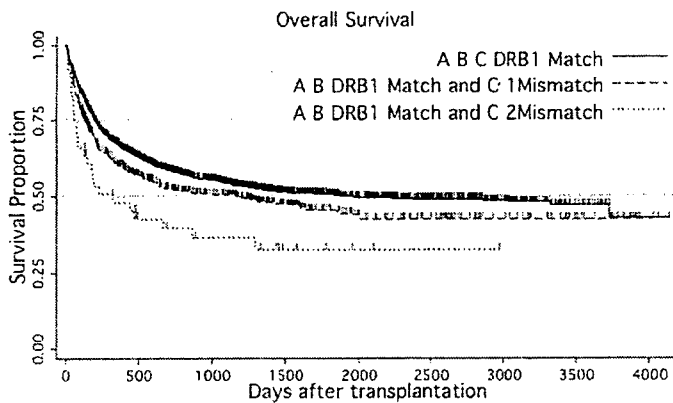
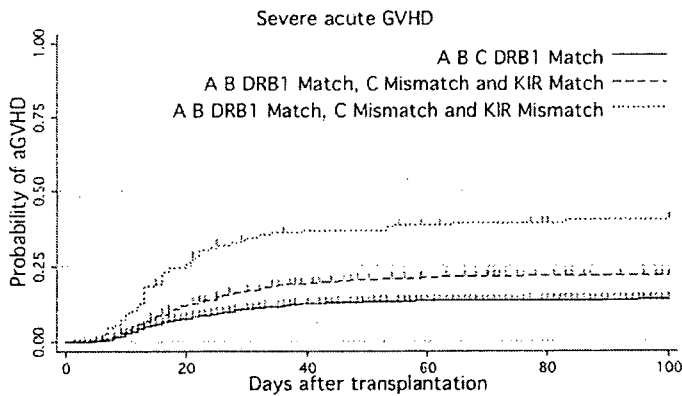
HLA-A B DRB1 遺伝子型適合症例	重症GVHD			死亡		
	N	HR	p	N	HR	p
HLA-C 適合**	2827			2865		
HLA-C 1座 不適合	752	1.97 (1.65-2.37)	<0.001	760	1.26 (1.11-1.42)	<0.001
HLA-C 2座 不適合	44	2.57 (1.44-4.59)	0.001	44	1.84 (1.25-2.70)	0.002
HLA-C 適合***	2761			2799		
HLA-C 不適合 KIR*適合	726	1.68 (1.39-2.04)	<0.001	584	1.21 (1.06-1.39)	0.004
HLA-C 不適合 KIR*不適合	136	3.52 (2.61-4.76)	<0.001	286	1.42 (1.19-1.69)	<0.001
KIR*: NK細胞受容体(KIR2DL)リガンド適合度(GVH方向) **GVH 方向 ***GVH and/or HIVG方向						
参考 1. HLA-A適合度の影響 (HLA-B C DRB1 適合症例)						
A B C DRB1 適合	2827			2865		
A-1座不適合	314	1.59 (1.21-2.08)	0.001	316	1.35 (1.15-1.60)	<0.001
A-2座不適合	14	1.85 (0.58-5.83)	0.292	14	1.39 (0.65-2.94)	0.385
参考 2. HLA-B適合度の影響 (HLA-A C DRB1 適合症例)						
A B C DRB1 適合	2827			2865		
B-1座不適合	50	2.47 (1.46-4.17)	0.001	50	1.36 (0.93-2.00)	0.112
B-2座不適合	-	-	-	-	-	-

2007.5.15 JMDP

HLA-Cw血清型不適合と遺伝子型不適合の重症GVHDと生存に与える影響

	N	severe a GVHD			OS		
		HR	p		N	HR	p
C Geno-match Sero-match	3682				3660		
C Geno-1M Sero-match	78	1.74 (1.11-2.74)	0.015		80	1.09 (0.78-1.52)	0.592
C Geno-1M Sero-1M	1480	1.94 (1.70-2.22)	<0.001		1506	1.26 (1.15-1.37)	<0.001

解説 HLA-Cw遺伝子型不適合症例(1576例)の中で血清型適合で遺伝子型不適合症例(Geno-1M Sero-match) 78例(5%)と、重症GVHDと生存の影響を評価するには症例数が不足しているが、重症GVHDの発症頻度は HLA-Cw遺伝子型適合症例に比べ有意に高かった。



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及びレシピエントの安全確保と QOL 向上に関する研究」班 班会議資料

## 非血縁者間骨髄移植における不適合 HLA 型の組み合わせと aGVHD・GVL の関係

川瀬孝和<sup>1</sup>、柏瀬貢一<sup>2</sup>、松尾恵太郎<sup>3</sup>、森島泰雄<sup>4</sup>、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. 東京都赤十字血液センター検査部、
3. 愛知県がんセンター疫学予防部、
4. 愛知県がんセンター血液細胞療法部

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,DP locus の臨床的重要性が明らかにされ、HLA 一部ミスマッチのドナー選択において有用な情報となっている。また、最近の解析により不適合 HLA 型の組み合わせの臨床的意義が明らかとなり、ドナー選択の新たな選択基準となるものと期待されている。今後さらに移植成績を向上させるために不適合 HLA 型の組み合わせと GVL の関係についても明らかににする事が重要であると考えられた。今回我々は、先の解析(Biol Blood Marrow Transplant. 2007;13:315-328)で再発抑制との関連が深いと考えられた HLA-C、HLA-DP に関して不適合 HLA 型の組み合わせと GVL の関係について解析を試みた。

【方法】1993 年1月より 2005 年末までの期間に JMDF を介し施行された造血器悪性腫瘍(AML、ALL、CML、ML、MM)に対する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 4863 例を多変量解析(Competing Risks Regression model)の手法を用いてレトロスペクティブに解析した。

【結果及び考察】プレリミナリーな結果ではあるが、HLA-C、HLA-DP において再発のリスクを有意に下降させる HLA アリルミスマッチ コンビネーションが明らかとなった。特に HLA-DP では 6 つのコンビネーションが明らかとなった。これらのコンビネーションは aGVHD のリスクを有意に上昇させるコンビネーションとは異なっていたため、aGVHD のリスクを上昇させずに GVL を誘導しうる可能性が示唆され、更なる検証が必要である。今後、アミノ酸置換部位との関係等多面的な解析を検討している。

21 全ゲノム関連解析を用いた移植後合併症に関する遺伝子の探索

全ゲノム関連解析による移植後合併症の発症に関する遺伝子の探索

研究組織

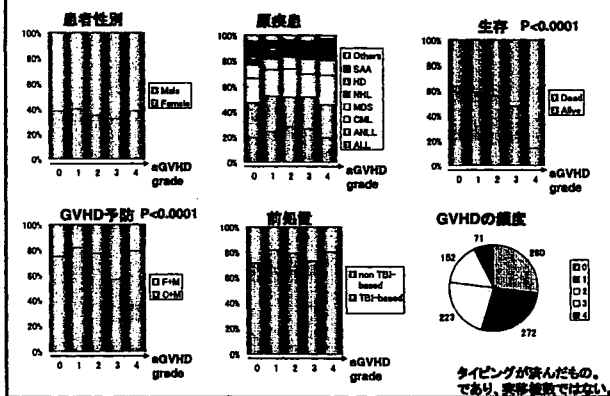
厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム再生医療等研究事業 (主任研究者:小寺良尚)

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 猪子美俊  
 東京大学 小川誠司(研究代表) 須谷泰仁  
 名古屋第一赤十字病院 小寺良尚・宮村謙一  
 日本赤十字東京血液センター 佐竹 正博・柏原 真一  
 2007/06/22-23 小寺班

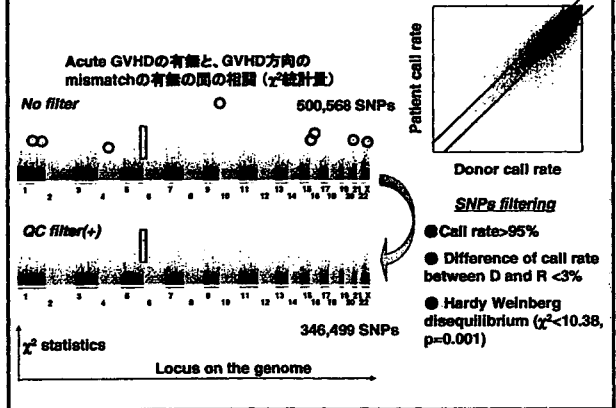
対象症例

- 造血器疾患に対して日本骨髄バンクを通じて非血縁者間骨髄移植を行った。
- *HLA-A, B, Cw, DR, DQ* locusが *genotype level* で完全一致している。
- GVHD予防として *CyA+MTX* もしくは *FK506+MTX* を採用している。
- GVHDについてのデータが存在する。

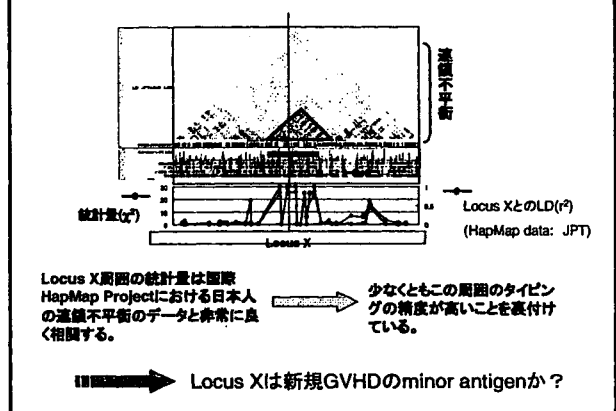
Patient characteristics



Quality control 1

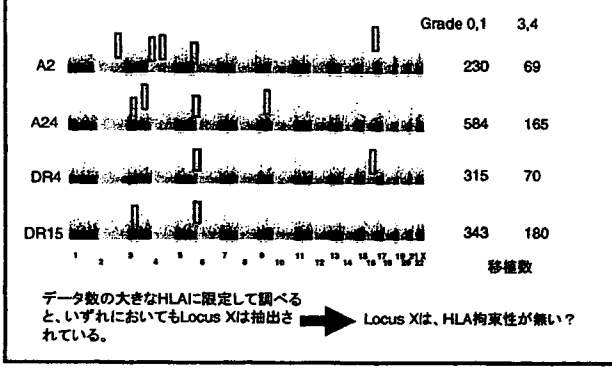


Quality control 2

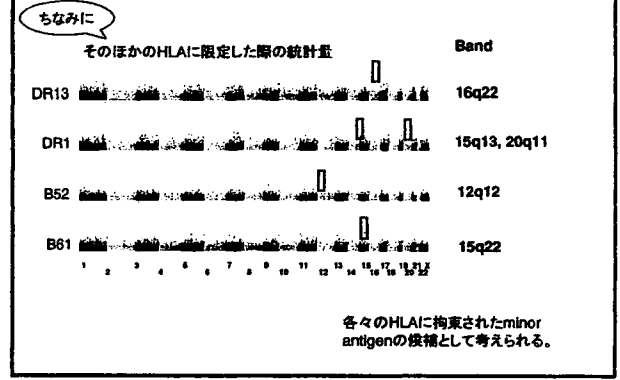


## 21 全ゲノム関連解析を用いた移植後合併症に関する遺伝子の探索

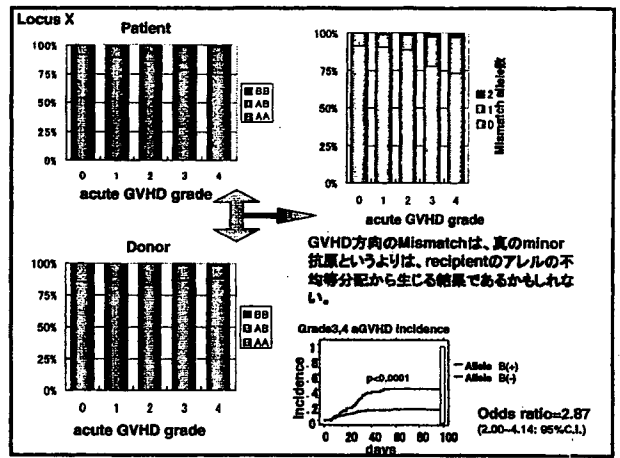
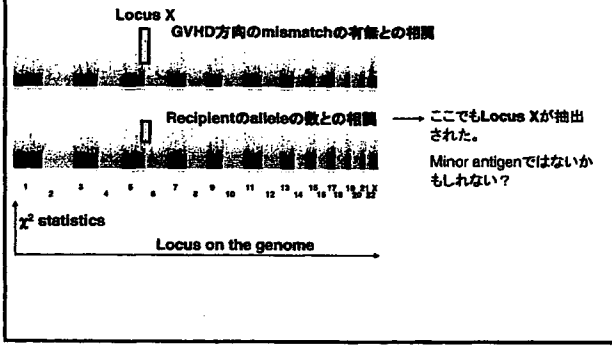
### HLA拘束性を考慮した解析



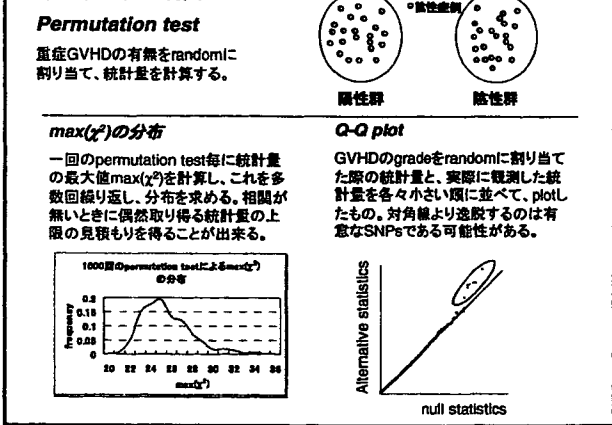
### HLA拘束性を考慮した解析



### Recipientの多型と重症急性GVHD発症の相関



### 結果の有意性の判定



### まとめ

- 重症の急性GVHD発症に関与している遺伝子を探索するために非血縁者間骨髄移植症例のgenome DNAを用いて、whole genome association studyを行った。
- 患者側のアレルの有無と重症GVHDの発症に関与していると思われるlocusが検出された。
- ドナー・患者のGVHD方向のmismatchの有無と重症GVHDの発症が関連していると思われるlocusの候補も複数見つかった。
- これらの候補locusの確認と、生物学的な意味づけを進めていく必要がある。

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の安全確保に関する研究」班  
 平成19年度第1回研究会議 平成19年6月23日

## NK細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型 と非血縁者間骨髄移植成績

東京都赤十字血液センター  
 柏瀬貢一、平安恒幸、屋部登志雄

愛知県がんセンター中央病院 東海大学医学部 HLA研究所  
 川瀬考和、松尾恵太郎、森島泰雄 鬼塚真仁 丸屋悦子、佐治博夫

小寺班組織適合性部会

1

## 平成19年度解析計画

### 1. KIR遺伝子型適合性

KIRリガンド不適合の成績悪化効果へのドナー活性化型KIRおよび患者へのATG投与の影響についてまとめる。

### 2. LILR遺伝子型適合性

LILRはHLAクラスII抗原認識ペプタイド受容体ファミリーである。相同分子のマウスPIR受容体が急性GVHD重症化に関与する。本年度はLILRA3, LILRB2多型と移植成績との関連を解析する。

### 3. サイトカイン遺伝子多型

血縁者間HLA一致移植において患者IL-10、IL-10R遺伝子型と急性GVHD発症との関連が報告されている(Linら、2003、佐治ら、平成17、18年度研究班)。本研究では非血縁者間骨髄移植を対象として、IL-10プロモーター領域およびIL-10R多型について移植成績との関連を解析する。

2

## IL-10プロモーター領域多型と移植成績の関連 解析症例

### IL-10多型解析

: 非血縁者間骨髄移植検体 (6073ペア)

### 移植成績との関連解析 (341ペア)

: HLA-A, -B, -C, DR, -DQ, DP一致  
 C+M, No T-cell depletion, No ATG

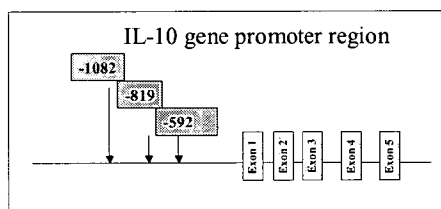
### 解析方法

蛍光ビーズ法を用いたIL-10プロモーター領域SNPsのPCR-SSO解析

統計解析: カプランマイヤー法

3

## 各SNP頻度



ハプロタイプ	-1082	-819	-592	N	JMDP	佐治ら	Seattle
U01	G	C	C	1,251	5.1%	6.6%	45.0%
U02	A	C	C	6,714	27.6%	28.1%	28.0%
U03	A	T	A	16,326	67.2%	65.3%	28.0%
novel	A	C	A	1	0.0%		
total				24,292	100%		

## -592と急性GVHD発症 血縁者間HLA一致移植

FHCRC group (2003) (n=993)

-592	No.	aGVHD% III-IV	HR	95%CI	P value for Trend
A/A	86	9	0.4	(0.2-0.9)	0.001
A/C	382	15	0.7	(0.5-0.9)	
C/C	525	21	Reference		

A/AあるいはTCATAハプロタイプでは急性GVHD重症化少ない

佐治ら (2004) (n=101)

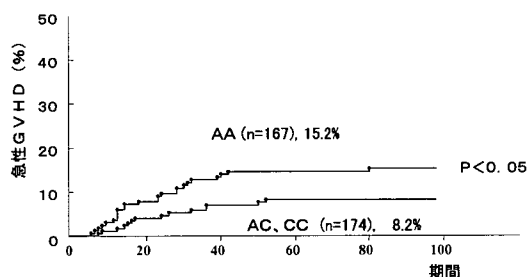
-592	No.	aGVHD% III-IV	aGVHD% II-IV
A/A or A/C	89	3.4%	18%
C/C	12	25.0%*	33%

\* P<0.05

C/Cで急性GVHD重症化していた

5

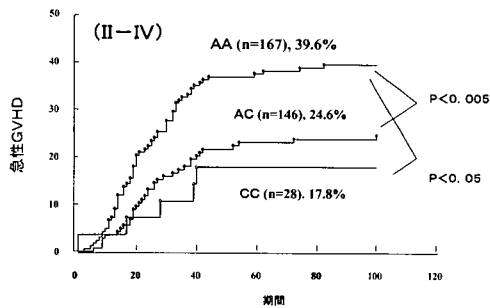
## -592SNPと急性GVHD (III-IV)発症



血縁者間移植でみられたII-IV急性GVHDがAAで発症率が低いあるいはCCで高いという結果は得られなかった。逆にA/Aは他に比べて発症率が高い

6

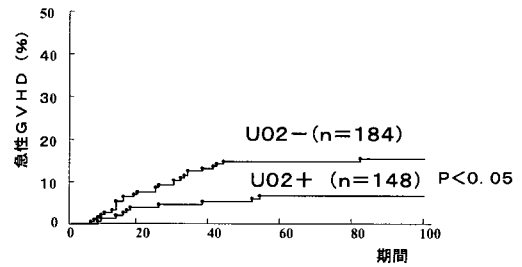
### -592SNPと急性GVHD (II-IV)発症



II-IVの急性GVHDのみでもA/Aは他に比べて発症率が高い  
Seattleグループと反対の結果である。

7

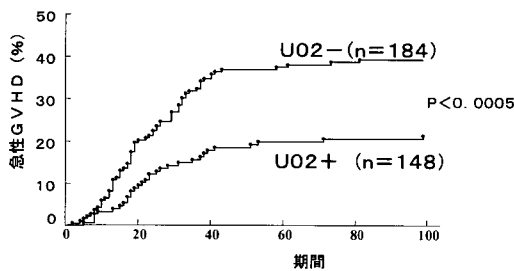
### プロモーターSNPハプロタイプU02 (ACC)と急性GVHD (III-IV)発症



U2+だと急性GVHD (III-IV)の発症率が低い

8

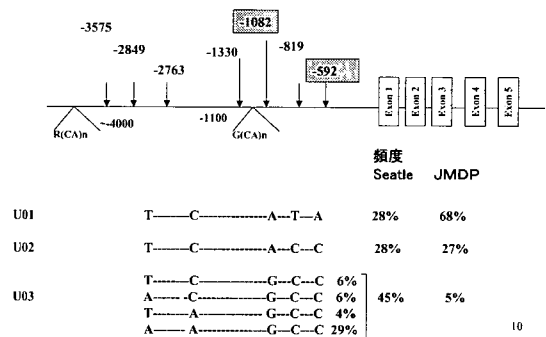
### プロモーターSNPハプロタイプU02 (ACC)と急性GVHD (II-IV)発症



II-IVの急性GVHDでもU2 (ACC)では発症率低い

9

### IL-10プロモーター領域上流



10

### まとめ

非血縁者間骨髄移植においても患者IL-10プロモーター多型と急性GVHDの重症化とで関連が見られた。

関連するSNP、SNPハプロタイプは異なっていた。

### 今後の予定

マイクロサテライト多型解析および多変量解析と

ドナーのIL-10受容体多型を解析を予定している。

11



## 造血幹細胞移植後合併症関連遺伝子の探求

鬼塚真仁<sup>1</sup>、島田誠子<sup>1</sup>、猪子英俊<sup>3</sup>

1. 東海大学血液内科、2. 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。

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. 非古典的 HLA と造血幹細胞移植
4. 造血幹細胞移植後合併症関連候補遺伝子解析

今回の班会議では、4. の造血幹細胞移植後合併症関連候補遺伝子解析の一環とする、慢性 GVHD と自己免疫疾患関連遺伝子との関係を報告する。また、今年度から予定するマイクロサテライトマーカーを用いた、移植後合併症関連遺伝子候補解析について紹介する。

### ①. 造血幹細胞移植後合併症関連候補遺伝子解析

#### 1) ; 自己免疫疾患関連遺伝子と慢性 GVHD

FCRL3 は FcR のホモログでありそのリガンドは不明であるが、自己免疫疾患の疾患関連遺伝子としてその関連性が示された。最も強く自己免疫疾患発症と関連性が見いだされた遺伝子の -169C/T 多型性について慢性 GVHD の発症に関して検討した。HLA 一致同胞間造血幹細胞移植症例 112 症例について検討した。レシピエントが C/C を持つ症例では 7/27 (25.9%) の慢性 GVHD 発症率であったのに対し、レシピエントが C/C 以外の遺伝子型では 47/85 (55.3%) と有意に高率に慢性 GVHD を発症していた (Fig, 1, Table 1, 2)。リウマチにおける疾患関連遺伝子である PADI4 遺伝子多型性に関しても、同様に慢性 GVHD との関連を検討したが、遺伝子多型性と慢性 GVHD 発症に関連を見いだすことはできなかった (Table 2)。

FCRL3 は Immunoglobulin like receptor の一種であり、同様の receptor である Paired immunoglobulin-like receptor (PIR) や KIR が移植後 GVHD に関連していることが既に報告されている。同様の構造を持つ FCRL3 が、ほとんど解明されていない慢性 GVHD 発症のメカニズムに関係している可能性があり、現在、さらに領域を広げた連鎖不平衡解析を行っている。

2) ;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。候補遺伝子を Table3 に示す。対象症例は急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病とし、1200 症例程度を予定している。

Table 1. Genotype distribution of FCRL3 -169C/T polymorphism in cGVHD patients and others

	cGVHD Patients		non-cGVHD Patients		P
	n	%	n	%	
R-Genotype					
C/C	7	13.0	21	36.2	0.016
C/T	22	40.7	19	32.8	
T/T	25	46.3	18	31.0	
D-Genotype					
C/C	11	27.3	15	20.7	0.31
C/T	17	40.0	22	32.1	
T/T	25	32.7	18	47.2	

R- indicates recipient; D-, donor; cGVHD, chronic GVHD.

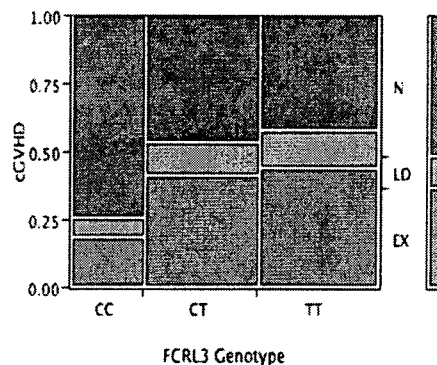


Fig 1 慢性 GVHD 頻度と FCRL3-169 多型

Table 2. Odds ratio for chronic GVHD with the FCRL3 C/C genotype, allele frequency and PADI4 susceptible haplotype

	cGVHD Patients		non-cGVHD Patients		P	Odds ratio	95% CI
	n	%	n	%			
R-FCRL3-169SNP							
C/C	7	13.0	20	34.5	0.0086	0.28	0.11 - 0.74
C/T+T/T	47	87.0	38	65.5			
D-FCRL3-169SNP							
C/C	11	20.8	15	27.3	0.50	0.70	0.29 - 1.70
C/T+T/T	42	79.2	40	72.7			
R-Allele							
C	36	37.1	72	56.7	0.0046	0.45	0.26 - 0.77
T	61	62.9	55	43.3			
D-Allele							
C	39	36.8	52	47.3	0.13	0.65	0.38 - 1.12
T	67	63.2	58	52.7			
R-PADI4 haplotype							
-GTGT-	42	38.9	39	33.6	0.49	1.12	0.85 - 1.48
Others	66	61.1	77	66.4			
D-PADI4 haplotype							
-GTGT-	43	40.6	36	32.7	0.26	1.18	0.90 - 1.55
Others	63	59.4	74	67.3			

Odds ratio was cGVHD vs non-cGVHD. CI indicates confidence interval.

<b>Group of genes</b>	<b>examples</b>
MHC/HLA related	KIR, minor Hags, MICA, MICB, HLA D-G
Innate immune response, danger signals	TLR, NOD, lectin-like receptors, HSP, MBL, Dectin1, inflammasome, cyclo-oxygenase, iNOS
Cytokines	Interleukins, TNF, IFN, TGFb, leukotrienes, VIP, MIP, MIF
Chemokines	CCL, CCR, CXCR, CXCL
Inflammatory mediators	Prostaglandins, histamin, bradykinin, complement
Immune receptors	FcR, LILR, SOCS, TREM
APC activation and homing	DC-SIGN, CCR7, integrins
Drug metabolism	MDR1, GST, MTHFR, cytochromes
T-cell activation	TCR, B7, CD28, CTLA4, ICOS
Adaptive immune cell surface molecules	CD45, CD62L, CD18, CD38, OX40/OX40L
Intracellular signalling	Tyrosine kinases, MAPK, SHIP, STAT, Slam, NFkB, DAP12
Transcription factors	NFAT, T-bet
Cell cycle genes	Cyclins, cdk
T-regulatory cell activity	CD25, FOXP3
Hormones and receptors	Haematopoietic and tissue growth factors, thymic hormone, GITR, CHCR2, VEGF
T-cell homing and adhesion	VLA, VCAM, ICAM, MMP
Apoptosis	Fas and perforin/granzyme pathways, PD1
B-cell activation	BCR
Autoimmunity	BTNL2, HLA
Cancer regulatory genes	SCL
Other	Osteopontin, NHE

Table 3 The candidate genes

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

骨髄移植推進財団を介した、造血幹細胞移植  
ドナー・レシピエントの検体保存研究について

東海大学医学部分子生命科学: 猪子英俊、鬼塚真仁  
骨髄移植推進財団

### 概要

- 2006年4月より、骨髄移植推進財団を介した、造血幹細胞移植症例の検体保存が再開された
- ドナー・レシピエントから7.5ml×2本の全血を東海大学分子生命科学教室へ宅急便にて搬送
- DNA抽出、リンパ球不死化を目的にそれぞれ保存

### 昨年度の報告

- 2006年4月～12月: 879検体(月間100検体弱)
  - # ゴム止め無し: 9検体
  - # 記名検体: 9検体
  - # 検体番号違い: 6検体
  - # 7.5ml未満(小児): 2検体
  - # クールで配達: 1検体

### 既に保存されている過去の検体

- 2001年までに保存されている検体数
  - ① リンパ球: 3496検体(1995/09/06～2000/02/17)
  - ② パプファイコート: 4899検体(1995/09/06～2001/05/24)
  - ③ 血漿: 4899検体(1995/09/06～2001/05/24)
  - ④ 笹月班・小寺班研究にて使用後のDNA: 約2400検体
- 2001年以降に保存されている検体数
  - ① HLA検査に使用後のDNA: 7200検体

いずれも検体数はドナー・レシピエントを含む

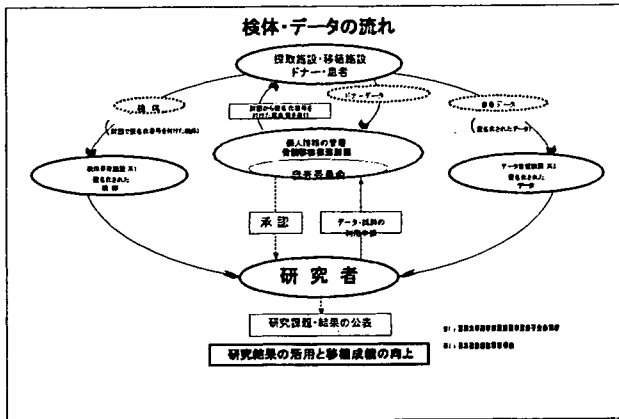
### 骨髄移植推進財団検体の特徴

- 多岐にわたる疾患に対し、多種多様な骨髄移植が行われている、極めてヘテロな集団
- 検体数が著しく多いために、試料利用申請が提出されてから、検体準備を行うのでは膨大な時間を要する
- DNAの利用に関してA群検体である(倫理指針)

### 検体保存研究の目的

- 検体を必要とする研究者への迅速な検体の分配
- 研究効率の良いサンプルセットを作成し、迅速に研究者へ分配する
- 有限である検体をリンパ球不死化、全ゲノム増幅を行い、枯渇しないよう管理する

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



### 経費

- ・ 小寺班からの班研究費を財源とする
- ・ 日々到着する検体からリンパ球を分離し保存する作業のための消耗品台として昨年度450万円程度必要とした
- ・ 現在、リンパ球不活化、全ゲノム増幅を行うまでは困難
- ・ 人件費は一人あたり200～300万円/年

### 現状

- ・ 検体運営(骨髄移植推進財団)
  - サンプルセットの構成や検体利用細則に関して、骨髄移植推進財団内のデータ・試料管理委員会にて協議中
- ・ 保存施設(東海大学)
  - 現時点では保存事業が精一杯
  - データ・試料管理委員会の決定により、サンプルセットの作成開始を行う
  - 一人の技術員が専任となっているが、検体の管理、保存作業、サンプルセットの作成のため、少なくとも三人は必要

### まとめ

- ・ 2006年度から検体保存が再開された
- ・ 基盤研究として
  - ① 保存された検体を有効利用するために、利用頻度が高いと予想されるサンプルセットを準備する
  - ② 有限なサンプルが枯渇しないよう、リンパ球不活化、全ゲノム増幅を行い、さらに厳密な検体管理を行う

### 謝辞

- ・ 検体採取施設の皆様
- ・ 検体提供の意思表示をいただいたドナー・レシピエントの皆様
- ・ 骨髄移植推進財団・移植調整部の方々
- ・ 東海大学分子生命科学の方々

(再掲)

平成19年度 厚生労働科学研究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  
第二回会議

期日:2008年1月26日(土)午後3時~午後5時30分 会場:東京医科歯科大学湯島キャンパス 歯学部外来事務棟4階特別講堂  
27日(日)午前9時~午後1時

プログラム

主任研究者挨拶並びに報告

小寺良尚

名古屋第一赤十字病院 造血細胞移植センター

分担研究報告 一日目 (1月26日)

細胞治療とその適正運用・一日目

( 座長:池原 進 )

- マイナー抗原特異的T細胞による免疫療法のための臨床試験体制の確立と実施に関する研究 ..... 197  
赤塚美樹 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部
  - 骨髄内骨髄移植の改良法 ..... 199  
池原 進 関西医科大学 病理学第一講座/癌治療センター
  - 成人血液悪性疾患に対する減量強度前治療を用いた骨髄内臍帯血移植法の有効性に関する研究 ..... 200  
村田 誠、稲本賢弘 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学
  - 造血幹細胞移植後の活性化CD4-DLI療法 ..... 201  
森尾友宏 東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学
- ( 座長:森尾友宏 )
- 慢性リンパ性白血病に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植後の細胞傷害性T細胞と  
抗腫瘍効果との関連 ..... 203  
西田徹也、村田 誠 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学
  - ハプロ一致移植におけるドナーNK細胞輸注の開発 ..... 204  
高橋義行、谷ヶ崎博、小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学
  - 非遺伝母HLA抗原(NIMA)相補的血縁者間造血幹細胞移植の長期治療成績 ..... 208  
一戸辰夫 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学
  - HLA不適合移植 ..... 210  
吉原 哲<sup>1</sup>、池亀和博<sup>1</sup>、小川啓恭<sup>1</sup>、吉田 喬<sup>2</sup> 1. 兵庫医科大学 血液内科  
2. 富山県立中央病院 内科
  - NMDPをはじめとする海外HSCT情報 ..... 212  
岡本真一郎 慶應義塾大学医学部 血液内科

分担研究報告 二日目 (1月27日)

細胞治療とその適正運用・二日目

( 座長:谷本光音 )

- 非血縁者間末梢血幹細胞移植実施に向けてー日本造血細胞移植学会・当研究班の提言ー(続) ..... 214  
小寺良尚 名古屋第一赤十字病院 造血細胞移植センター
- 造血細胞移植データ登録の一元化:本年度の進捗状況と過去データの返還 ..... 216  
鈴木律朗 名古屋大学大学院医学系研究科 造血細胞移植情報管理学講座
- 移植後のMRDモニター方法の現状と開発状況 ..... 220  
宮村耕一 名古屋第一赤十字病院 血液内科
- 自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植 ..... 222  
長藤宏司<sup>1</sup>、原田実根<sup>2</sup>、

1. 九州大学病院 血液・腫瘍内科
2. 国立病院機構大牟田病院・九州大学大学院医学研究院病態修復内科学

( 座長：宮村耕一 )

14. 慢性 GVHD における TH17 細胞の役割の検討 ..... 224  
 前田嘉信、谷本光音 岡山大学医歯学総合研究科 血液・腫瘍内科
15. 造血幹細胞移植における鉄代謝と Hcpidin の動態 ..... 226  
 諫田淳也<sup>1</sup>、水本智咲<sup>1</sup>、川端 浩<sup>1</sup>、一戸辰夫<sup>1</sup>、石川隆之<sup>1</sup>、土田秀行<sup>2</sup>、友杉直久<sup>2</sup>、内山 卓<sup>1</sup>  
 1. 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学  
 2. 金沢医科大学総合医学研究所 先進医療研究部門/腎機能治療学
16. 慢性 GVHD 発症に関連する遺伝子と遺伝子多型解析 ..... 228  
 鬼塚真仁 猪子英俊 東海大学医学部 分子生命医学

### 造血幹細胞移植と組織適合性抗原

( 座長：森島泰雄 )

17. 非血縁者間骨髄移植における不適合 HLA の組み合わせと GVL 効果の関係 ..... 230  
 川瀬孝和<sup>1</sup>、山本 健<sup>2</sup>、笹月健彦<sup>3</sup>、森島泰雄<sup>1</sup>  
 1. 愛知県がんセンター 血液・細胞療法部  
 2. 九州大学生体防御医学研究所 遺伝学部門  
 3. 国立国際医療センター研究所
18. NK 細胞受容体 KIR 遺伝子型と非血縁者間骨髄移植成績 ..... 231  
 屋部登志雄<sup>1</sup>、柏瀬貢一<sup>1</sup>、平安恒幸<sup>1</sup>、三好佳名子<sup>1</sup>、松尾恵太郎<sup>2</sup>、川瀬孝和<sup>2</sup>、森島泰雄<sup>2</sup>  
 1. 東京都赤十字血液センター 技術部・研究一課/検査部  
 2. 愛知県がんセンター 疫学予防部/血液・細胞療法部
19. 全ゲノム関連解析による移植合併症の遺伝学的背景の検索 ..... 233  
 南谷泰仁<sup>1</sup>、鬼塚真仁<sup>2</sup>、柏瀬貢一<sup>3</sup>、猪子英俊<sup>2</sup>、赤塚美樹<sup>4</sup>、佐治博夫<sup>5</sup>、森島泰雄<sup>5</sup>、  
 小寺良尚<sup>5</sup>、小川誠司<sup>1</sup>  
 1. 東京大学 21 世紀 COE プログラム
20. 同種造血幹細胞移植時の FK506 血中濃度におよぼす CYP3A5 遺伝子変型の解析 ..... 235  
 小笠原正浩、小林直樹、笠井正晴 札幌北榆病院 血液内科

### QOL

( 座長：土田昌宏 )

21. 骨髄採取におけるヘパリン量について ..... 237  
 秋山秀樹、日野雅之 骨髄移植推進財団ドナー安全委員会・都立駒込病院 血液内科
22. 採取有核細胞数に関わる事項の検討 (移植成績、ドナー健康、採取施設) ..... 239  
 宮村耕一 名古屋第一赤十字病院 血液内科
23. 小児血縁ドナーの権利擁護に於けるチームアプローチ ―総括― ..... 241  
 土田昌宏 茨城県立こども病院 小児科
24. 骨髄バンク骨髄採取…自己血準備量と骨髄採量、採取後 Hb ..... 243  
 中尾康夫 札幌北榆病院 麻酔科
25. 小児ドナー候補者への説明資料 ..... 245  
 渡辺 新<sup>1</sup>、掛江直子<sup>2</sup>、坂本なほ子<sup>3</sup>、加藤俊一<sup>4</sup>  
 1. 中通総合病院 小児科  
 2. 国立成育医療センター研究所 成育保健政策科学研究室  
 3. 順天堂大学医学部 公衆衛生学  
 4. 東海大学医学部 基盤診療学径再生医療科学

総合討論

( 座長：小寺良尚 )

## 「マイナー抗原特異的 T 細胞による免疫療法のための臨床試験体制の確立と実施に関する研究」

赤塚美樹<sup>1,2</sup>・川瀬孝和<sup>3</sup>・鳥飼宏基<sup>1</sup>、<sup>4</sup>小川誠司、<sup>4</sup>南谷泰仁

(<sup>1</sup>愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部、<sup>3</sup>疫学予防部<sup>2</sup>、中央病院・血液細胞療法部、

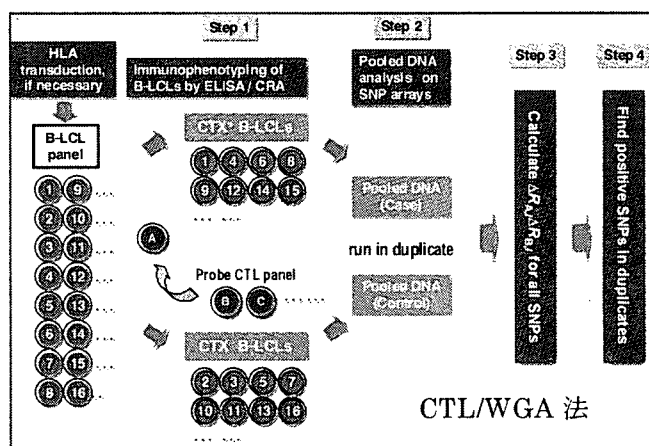
<sup>4</sup>東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科)

### 1. 造血細胞特異的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 (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-A\*2402 拘束性の ACC-1<sup>Y</sup> アリルの反体側アリルもマイナー抗原 (ACC-1<sup>C</sup>) をコードする可能性があることを報告した。今回は、その同定法の詳細について報告する。

これまでは連鎖解析法、発現クローニング法などで遺伝子が同定されない場合は次なる手段がなかった。今回の新手法では、mHag に特異的な CTL をプローブとして、EBV-不死化 B 細胞株を CTL アッセイにて mHag 陽性/陰性の 2 群に分け、その 2 群間において SNP 型の偏りがある遺伝子部分を全ゲノム解析 (WGS) で検索することで mHag をコードする連鎖不均衡 (LD) ブロック (大部分で 100 kb 以下) を決定する (CTL/WGA 法と命名)。



その後のエピトープ同定作業は従来法と基本的に変わらないが、比較的短時間のうちに抗原遺伝子候補を高々 1~4 個に絞ることが可能となった。これにより、遺伝子候補が挙がった際に組織発現分布を検討すれば、選択的 GVL 効果を得るのに有望な抗原かどうか推定でき、その段階でエピトープ同定作業に進む価値があるかどうか判定できるため時間の節約も可能となった。

前回報告した ACC-6 mHag をコードする *HMSD* 遺伝子は、本法を用いた retrospective 解析で候補に挙がった 115kb の LD ブロック内にある 4 遺伝子中の 1 つであることが分かった。さらに、prospective な解析で、HLA-A\*2402 拘束性 CTL を使い、15q25 の 26 kb の LD ブロックを決定したが、ここには ACC-1<sup>Y</sup> および ACC-2 をコードする *BCL2A1* のみが存在していた。詳細なエピトープマッピングの結果、以前に同定した ACC-1<sup>Y</sup> mHag の対側アリルが抗原エピトープをコードしていた。ACC-1<sup>C</sup> の不適合頻度は 16% (UR-HCT) であり、HLA-A24 の頻度 (65%) を考慮すると、さらに 10% の日本人患者が免疫療法の対象となる。現在、ペプチド合成を開始しつつあり、近日中にペプチドワクチン、次いで細胞療法の標的抗原とする予定である。



②CTL/WGA 法には、CTL アッセイで抗原タイピングした B 細胞株から個別に DNA を抽出し、プール化後に SNP アレイで解析を行うため、まだ汎用性に乏しかった。現在、SNP アレイを使用することなく、public な resource を有効活用する新手法を開発し、検証を行っている。

## 2. 免疫療法の基礎的検討

当センターにおける、養子免疫療法立ち上げの遅れにより、mHag ペプチドワクチンを先行して患者のリクルートを行っている。現時点では、アジュバントとして vegetable oil である Montanide を使用するプロトコルを実施しつつあるが、今後より効率の良いアジュバントおよび投与方法を検討し臨床へのトランスレーションを行う予定である。

①HLA-A\*0201 トランスジェニック (Tg) マウスに HA-1<sup>H</sup> ペプチドを Incomplete Freund Adjuvant (IFA) と混ぜて3回皮下接種し、取り出した脾細胞を *in vitro* で再刺激することで HA-1<sup>H</sup> に特異的 (HA-1<sup>R</sup> には反応しない) CD8<sup>+</sup> T 細胞を誘導できた。

②まだ予備実験段階ながら、HLA-A\*0201 Tg マウスを3群に分け、HA-1<sup>H</sup> ペプチドを IFA と混ぜて皮下接種、DC に添加して皮下接種、DC に添加して腹腔内投与して免疫した後、取り出した脾細胞を *in vitro* で再刺激し、HA-1<sup>H</sup> に特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞の誘導を比較した。その結果 DC の皮下投与がもっとも誘導効率が良かった。

③マイナー抗原ワクチン臨床試験の現状： 過去1年間で、47 症例がマイナー抗原タイピングを受け、うち 33 例がドナーとペアでタイピングを受けた。6 ペアで現在準備の済んでいる mHag ペプチドである ACC-1 (HLA-A\*2402), ACC-2 (HLA-B\*4403/B\*4402), HA-1 (HLA-A\*0201/A\*0206) いずれかの mHag で GVL 方向の不適合を認めた。当初は再発時のみを投与適応例としたが、2007 年 10 月より再発ハイリスク例 (概ね 30%以上の移植後再発率と考えられる病型/病期) の移植後寛解期も投与対象とすることが IRB で認可された結果、適応となる症例が 2 例存在することが分かり、現在投与に向けて準備を進めつつある。

## 骨髓内骨髓移植 (IBM-BMT) の改良法

関西医科大学 病理学第一講座

同 癌治療センター

池原 進

これまでの骨髓移植（静脈内骨髓移植：IV-BMT）は、ドナーの骨髓細胞が肺等に trap されるため、骨髓へ homing できる細胞は、わずか5%程度であると考えられている。この弊害を無くすため、我々は、骨髓内へ直接、ドナーの骨髓細胞を注入する骨髓内骨髓移植 (IBM-BMT) 法を開発した。

IBM-BMT の有効性は、これまでに、我々以外のグループからも確認されているが、imaging system を用いた解析では、この IBM-BMT に於いても、かなりの数の細胞が、血中へ移行することが判明し、IBM-BMT の改良法を開発すべく努力し、この度、collagen gel (CG) matrix を用いた方法を発見したので紹介する。

CG は、4℃では液体であるが、室温に戻すと gel 化するため、ドナーの骨髓細胞 (BMC) を CG matrix (Cellmatrix®) で、suspend し、室温に戻した後、IBM-BMT すると BMC の細胞が血中へ流出することなく、注入骨内に長期間留まり、細胞と細胞の interaction も促進して造血能の、より早期の回復が望めることが明らかになった。

eGFP トランスジェニック (C57BL/6J [B6] background) の BMC をドナーとして、レシピエントは、BMT の前日に <sup>137</sup>Cs で 7Gy から 10Gy の放射線を照射した正常の B6 マウスを用いた。移植後、経時点で sacrifice し、注入局所に留まる細胞数、脾の重量、12 日目の CFU-S 数、ドナー細胞への置換率を比較すると、CG グループで有意に増加することが明らかになった。

さらに、移植後 100 日以上経過しても、ドナー細胞の比率は良好に保たれていた。

このように、CG を用いた IBM-BMT の改良法は、これまでの PBS を用いた IBM-BMT を凌ぐ秀れた方法であることが判明した。現在、サルを用いて安全性を検討中である。

「成人血液悪性疾患に対する減量強度前治療を用いた骨髄内臍帯血移植法の有効性に関する研究」

村田 誠<sup>1)</sup>、稲本賢弘<sup>1)</sup>、寺倉精太郎<sup>1)</sup>、直江知樹<sup>1)</sup>

鈴木律朗<sup>2)</sup>

小寺良尚<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

<sup>2)</sup>名古屋大学医学部 造血細胞移植情報管理学

<sup>3)</sup>名古屋第一赤十字病院 造血細胞移植センター

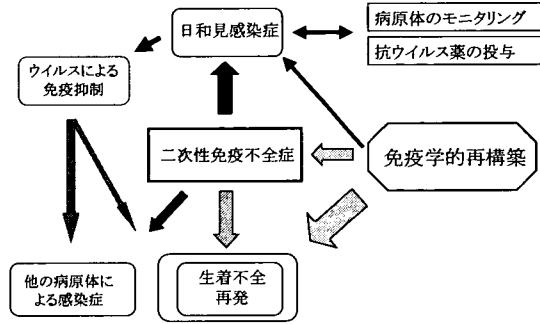
臍帯血移植における生着率を改善する試みとして、臍帯血中 CD34 陽性細胞を体外増幅し移植する方法や、複数臍帯血ユニットを同時に移植する方法が国内外で試みられている。しかし前者については、国外からの報告によれば生着が改善したという結果は得られておらず、また国内では骨髄破壊的前治療と組み合わせた臨床試験が行われているが、現時点でその結果は公表されていない。後者については、国外では Minnesota 大学から 90%を超える好中球回復率が報告されたが、国内においてはやはり骨髄破壊的前治療と組み合わせた臨床試験にその適応は限定されている。今回我々は、同種造血幹細胞移植の適応でありながら適切な時期に適切な骨髄または末梢血幹細胞提供ドナーが得られない成人血液悪性疾患患者で、かつ骨髄非破壊的前治療を用いた同種臍帯血移植の適応となる患者を対象とする、骨髄内臍帯血移植法の臨床試験を考案したので報告する。

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選別・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2回研究班会議（東京）  
 平成20年1月26、27日

## 造血幹細胞移植後の 活性化CD4DLI療法

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

## 二次性免疫不全：日和見感染症



## 移植後日和見感染症に対するCD4-DLI: 探索的臨床研究

感染症	症例数	有効
サイトメガロウイルス	19	8/13
アデノウイルス	5	4/4
RSウイルス	2	0/2
コクサッキーウイルス	1	1/1
麻疹ウイルス	1	1/1
単純ヘルペス	1	1/1
ヒトヘルペス6型	1	1/1
その他(真菌、細菌、不明)	6	0/6
総数	36	16/29

## 有害事象：急性GVHD

	移植後	CD4DLI治療後
0	11	22
I	3	6
II	9	1 (II before T)
III	6	0
IV	1	0

有害事象：血球減少

0/29

有害事象：臓器障害

0/29

## 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 (AdV) 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・AdV リアルタイムPCR定量 (主評価項目)  
 CMV抗原、(AdV抗原)  
 臨床症状、臨床所見、有害事象

HLA不一致率は問わない。  
 複数感染は可。  
 Prednisolone: 0.5mg/kgまで可。  
 2週ごとに5x10<sup>6</sup>/kgを2回投与。

## 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、AdV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、AdV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、AdV感染症 それぞれ10症例

## 対象症例

造血幹細胞移植後のCMV、AdV感染症で診断時に登録。2週後に検出されれば適格。

## 症例内訳(ウイルス)

