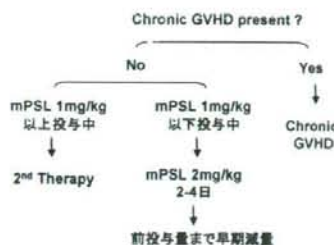


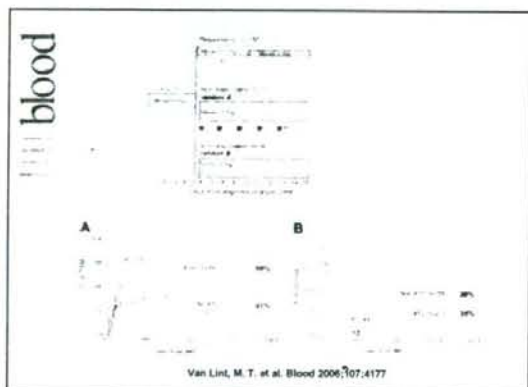
### Algorithm for management of recurrent GVHD (FHRC)



### Therapy for steroid-refractory acute GVHD -physician's choice-

	Adult	Pediatric
ATG/ALG	32%	17%
MMF	20%	13%
Il-2 inhibitors	14%	15%
TNF inhibitors	9%	27%
Steroid-pulse	7%	15%
Others	18%	14%

Lee: J Clin Oncol 2008



### Etanercept + mPSL as initial therapy for acute GVHD

	Steroids alone	Etanercept plus mPSL	P
Overall, no. (%)	33/69 (33)	42/61 (69)	< .001
Skin	32/68 (47)	30/37 (81)	< .001
Liver	3/15 (20)	6/9 (67)	.03
GI	21/44 (48)	29/37 (78)	.005

Levine. Blood 2006;111:3470

### 2nd therapy for acute GVHD

	Skin	Gut	Liver	
Infliximab	70%	75%	25%	Couriel
Etanercept	51%	64%	40%	Busca

#### Infliximab

- IV (腸), 初期治療より15日, 3<sup>rd</sup> (2<sup>nd</sup> pulse), 無効, 6日後死亡
- IV (腸), 初期治療より56日, 4<sup>th</sup> (2<sup>nd</sup> pulse, 3<sup>rd</sup> MMF), 一時下痢減少, 27日後死亡

#### Etanercept

- IV (皮膚, 腸), 初期治療より9日, 3<sup>rd</sup> (2<sup>nd</sup> pulse), Basiliximabと併用, 一時有効, 120日後死亡
- IV (腸), 初期治療より56日, (2<sup>nd</sup> pulse, 3<sup>rd</sup> MMF), 一時下痢減少, 27日後死亡

#### Basiliximab+MMF

- III (皮膚, 腸), 初期治療より13日, 2<sup>nd</sup>, 一時下痢減少, 73日後死亡
- III (腸), 初期治療より22日, 2<sup>nd</sup>, 改善, 1470日生存中
- III (腸), 初期治療より11日, 3<sup>rd</sup> (2<sup>nd</sup> pulse), 無効, 6日後死亡
- III (腸), 初期治療より100日, 3<sup>rd</sup> (2<sup>nd</sup> pulse), 一時改善, 328日後死亡

### Proposal



## 造血細胞移植後の微生物モニタリング:高感度多項目迅速低価格微生物検出システムの開発と臨床研究

東京医科歯科大学大学院・歯学総合研究科・発生発達病態学分野  
同・医学部附属病院・細胞治療センター

森尾友宏

造血細胞移植後二次性免疫不全状態での日和見感染症は、移植の成否に直接関与する重要な合併症の1つである。予防的対策を講じることが何よりも重要であるが、微生物の包括的高感度迅速モニタリングによる病原体の同定→迅速かつ適切な化学療法の開始が肝要である。検出システムはまた、各施設において簡便かつ低価格に実施可能という要件を満たす必要がある。

私たちの施設では、難治疾患研究所ウイルス治療学分野清水則夫先生らが開発した高感度網羅的迅速ウイルス検査システムを用いて、核酸抽出からデータ出力まで2時間以内に、20項目程度のウイルスを、3000円以内で測定するシステムを用いて、移植後ウイルス解析を行ってきた。

145名の造血細胞移植後患者の解析では、血液ではEBV, CMV, HHV6, HHV7, BKV, AdVなどが、尿ではBKV>AdV>CMV>JCV>HHV6などが、便ではCMV, AdV, Norovirusなどが問題になることを明らかにしてきた。2種類以上の病原体の検出も稀ではなく、骨髄移植・末梢血幹細胞移植後検体では血液で18.2%、尿で23.3%にて、臍帯血移植後にはそれぞれ5.4%, 11.8%で、複数ウイルスが検出されることが明らかになった。コピー数から実際に病態に関与しているか判定可能な場合もある一方、数種類の微生物が混在する状況ではどの微生物が感染症の主体か判断に迷う場合も経験する。

現在はヘルペス属ウイルス8種類(HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8)、ポリオーマウイルス(BKV, JCV)、ParvovirusB19, HBVに加え、RNAウイルスとしてレトロウイルス4種類とHCVを迅速定性判定できるシステムが稼働しており、検出されたウイルスについてはリアルタイムPCR測定にて定量可能である。ウイルスではさらに、HAV, HEV, GBVなどの肝炎ウイルス、AdV, Norovirus, Metapneumovirus, RS virus, Coxsackie virusなどがラインアップに加わっている。真菌・原虫では*Pneumocystis jiroveci*, *Candida*, *Aspergillus*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium*を測定すると共に、細菌感染及び真菌感染の一時スクリーニングとしての16S rRNA, 18SrRNAの検出系も立ち上げている。

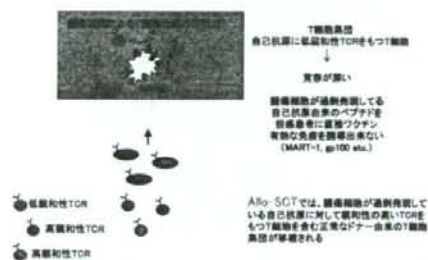
第二世代の微生物検出システムとして、直接半定量化が可能な固相化プレート網羅的PCR法の検証を進めているところであり、さらに共同研究の枠組みの中で、非PCR系であるマイクロビーズ高感度蛍光測定システムの開発にも着手している。

今までの造血細胞移植後高感度多項目迅速ウイルス測定は、当施設での移植症例のモニタリング及び、検査依頼のあった施設での症例の解析にとどまっており、臨床経過やデータが収集された前向き研究は行われてこなかった。いくつかの条件が揃えば、最終的には臨床研究として進められるべき領域であるが、そのためには移植形態や疾患を勘案した上で、どのシステムでどの程度までの微生物を網羅していくべきかの議論が重要と考えている。

## 白血病関連抗原を標的とした 移植片対腫瘍効果増強の試み

金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学  
近藤恭夫, 中尾真二

### 腫瘍細胞は患者のT細胞性免疫を再構成させる



### 背景

#### GvL効果:

ドナー由来のT細胞が、白血病細胞上の抗原を認識して白血病細胞を傷害する。

#### 標的抗原:

1. 同種抗原 (MHC, nHA)

2. 白血病関連抗原 (LAAs; Leukemia-associated antigens)

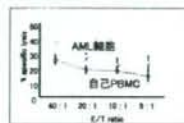
- Shared antigen → LAAsに対して機能的結合性が高いCTL
  - 過剰発現している自己抗原
  - 組織分化抗原
  - CT (cancer-testis) 抗原

2) Unique antigen

・腫瘍特異的抗原ペプチド

### CDK (cyclin-dependent kinase) 2由来 HLA-A2402拘束性ペプチドはLAAsである

- 白血病細胞の80%はCDK2タンパクを過剰発現している。
- CDK2由来の2つの自己抗原ペプチド (CDK2<sub>138</sub>, CDK2<sub>178</sub>) はHLA-A2402分子によって提示される。
- HLA-A2402陽性健康者のPBMCからCDK2ペプチド特異的CTLを誘導出来る。
- HLA一致血縁者同種移植ドナーの末梢血から誘導したCDK2ペプチド特異的CTLは、CDK2タンパクを過剰に発現している患者由来白血病細胞を特異的に傷害する。



Allo-SCTドナーのT細胞は、正常細胞と白血病細胞におけるCDK2由来ペプチド(自己抗原由来LAAs)の発現量の違いを認識して白血病細胞を特異的に傷害するCTLに分化する。

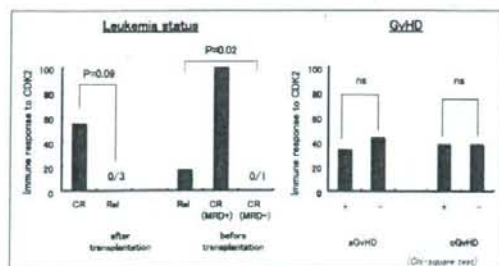
### 患者背景

Characteristic	No. of Patients (n=17)
Median Age (range)	49 yrs (13-67)
Male / female	8/9
<b>Diagnosis</b>	
AML	6
MDS	1
ALL	2
IML	1
MHL	4
NM	1
PLC	2
<b>Donor Status at Transplant</b>	
Remission (CR)	8
Non-CR	9
Partial remission	1
Relapsing in therapy	1
<b>Graft Sources</b>	
BM/PBMC/ CB	8/3/6
Sibling Donor	5
HLA-Matched	5
HLA-Mismatched	0
Unrelated Donor	12
HLA-Matched	7

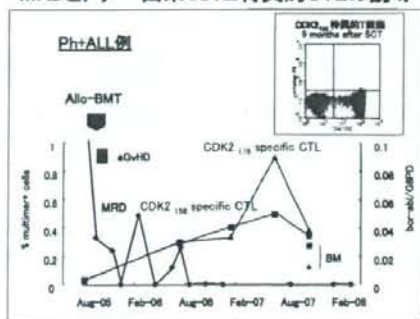
### Allo-SCT後寛解を維持している12例中7例においてドナー由来CDK2特異的CTLが誘導されている

UPN	disease	HLA-A graft	αCDK2 / αGvHD	outcome	estimate time point (after SCT)	% CDK2 <sub>138</sub> -CTL before SCT	% CDK2 <sub>138</sub> -CTL after SCT	% CDK2 <sub>178</sub> -CTL before SCT	% CDK2 <sub>178</sub> -CTL after SCT
1	AML	24/24	CR	CR	NA	0	0	0	0
2	AML	24/24	SR	CR	NA	0	0	0	0
3	AML	24/24	SR	CR	15	0.19	0.48	0	0
4	AML	24/24	SR	CR	28	0.27	0.5	0	0
5	AML	24/24	PR	CR	4	1.08	0	0	0
6	AML-TL2	24/24	CR	CR	13	0	0	0	0
7	AML	24/24	SR	CR	16	0	0	0	0
8	AML	24/24	SR	CR	18	0.13	0.14	0	0
9	Ph-ALL	24/24	PR	CR	10	0.29	0.3	0	0
10	T-ALL	24/24	SR	CR	8	0	0	0	0
11	MCL	24/24	CR	CR	19	0	0	0	0
12	MCL	24/24	CR	CR	4	0	0.1	0	0
13	DLBCL	24/24	SR	CR	14	0	0	0	0
14	DLBCL	24/24	CR	CR	17	0	0	0	0
15	PDCL	24/24	CR	CR	15	0	0	0	0
16	PDCL	24/24	PR	CR	18	0	0	0	0
17	MN	24/24	SR	CR	9	0.87	0.78	0	0

## CDK2特異的CTLの誘導と GvL効果, GvHDとの関係



## MRDとドナー由来CDK2特異的CTLの誘導



### 考察

- Allo-SCT時にMRDを有する血液悪性腫瘍患者では、移植時に残存する腫瘍細胞が健常ドナーナイーブCD8T細胞を刺激して、移植後CDK2ペプチド特異的CTLを誘導している可能性が示唆される。
- 健常ドナー由来のCDK2ペプチド特異的CTL前駆細胞は、移植後早期であってもわずかな抗原提示によってCTLに分化し得る。
- Allo-SCT後にCDK2由来のペプチドをワクチンとして血液悪性腫瘍患者に投与することによって、GvL効果を誘導できる可能性がある。

### 検討課題

- Allo-SCT前にMRDが検出されるHLA-A24陽性血液悪性腫瘍例を対象として、移植後CDK2ペプチド特異的CTLの出現とGvL効果との間に関連があるかどうかを多施設で検討する。
- Allo-SCT前にMRDが検出されないHLA-A24陽性ハイリスク血液悪性腫瘍例を対象として、CDK2ペプチドを用いたワクチン療法の早期臨床試験を行う。

### 対象

- Allo-SCTが予定されている血液悪性腫瘍患者。
- HLA-A24陽性。
- Allo-SCT前に評価可能なMRDを有する。

### 方法

ドナー末梢血単核細胞と、移植前及び移植後3, 6, 9, 12ヶ月後の末梢血単核細胞中のCDK2ペプチド特異的CTLをmultimer assayを用いて検出し、MRDの推移と移植後CDK2ペプチド特異的CTLの出現との間の関連性を明らかにする。

## 新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

6月7日(土)

14:15~15:15

- 
1. マウスモデルを使った造血幹細胞の静脈内と骨髄内輸注法の比較..... 14:15-14:25  
岡山大学 血液・腫瘍内科  
品川克至、前田嘉信
  2. 同種造血幹細胞移植後において生じる難治性 CMV 感染症に対する.....14:25-14:35  
CMV 抗原特異的 CTL を用いた治療の安全性に関する臨床第 I 相試験  
名古屋大学医学部大学院医学系研究科小児科学  
高橋義行、谷ヶ崎博、小島勢二
  3. 骨髄内造血細胞移植後の生着・免疫学的再構築促進等を目的とした、.....14:35-14:45  
ex vivo 増殖ドナー活性化 T 細胞輸注療法(活性化 CD4-DLI など)の開発  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野  
同・医学部附属病院・細胞治療センター  
森尾友宏
  4. 選択的移植片対腫瘍反応(GvTR)の誘導.....14:45-14:55  
愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部  
赤塚美樹・鳥飼宏基
  5. 新しい骨髄移植方法の安全性と有効性に関する検討.....14:55-15:05  
京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科  
一戸辰夫(4分間)  
大阪赤十字病院 血液内科  
三浦康生(6分間)
  6. 新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究計画.....15:05-15:15  
関西医科大学病理学第一講座  
池原 進

## マウスモデルを使った造血幹細胞の静脈内と骨髄内輸注法の比較

岡山大学 血液・腫瘍内科 品川克至、前田嘉信

### 1、臍帯血移植後の血球回復に対する影響

臍帯血移植(CBT)は、HLA が不一致でも移植可能でありことから、同胞あるいは骨髄バンクに適切なドナーが存在しない患者への第三の移植細胞源として急速に拡大しつつある。一方、生着不全が多いことと血球回復までの期間が長期化することが臨床的に克服課題として重要である。近年、Ikehara らの骨髄内移植 (IBM・BMT) は、生着率の向上と GVHD 抑制の両面から注目されている。我々は、CBT の欠点を骨髄内移植 (IBM-CBT) によって克服可能であるかをマウスモデルを使って検討したい。

我々は late fetal and newborn mice を用いたマウス CBT モデルにて、通常の BMT に比べ血球回復までの期間が長期化することを確認しているが、このマウスモデルを使い IBM-CBT によって

1) 血球回復までの期間が従来の静脈内へ輸注 (iv-CBT) より短期化するか

2) 造血に必要な細胞数が iv-CBT より少なくてすむか

を検討したい。評価には可能な限り IVIS imaging system を使って定量化したい。

### 2、Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)に対する影響

IPS は、移植後に広汎な肺胞障害を生じて発症する予後不良な肺合併症の総称である。原因として感染症は否定的であり、ドナー免疫担当細胞の関与が考えられている。ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内輸注 (iv-BMT) 後、多くが肺へ一旦トラップされる。それに対し骨髄内移植 (intra-BMT) は肺へトラップされるドナー免疫担当細胞が少ないと考えられる。

我々は、マウス BMT モデルにて、通常の iv-BMT に比べ intra-BMT 後の IPS 発症が抑制されるかを検討したい。

## 同種造血幹細胞移植後において生じる難治性 CMV 感染症に対する CMV 抗原特異的 CTL を用いた治療の安全性に関する臨床第 I 相試験

名古屋大学医学部大学院医学系研究科小児科学  
高橋義行、谷ヶ崎博、小島勢二

1. 目的：造血幹細胞移植後の免疫抑制状態において生じる難治性 CMV 感染症に対する CMV 抗原特異的 CTL を用いた治療の安全性を評価すること。

2. CMV 抗原特異的 CTL の増殖（名古屋大学医学部附属病院内細胞調整室にて行う）

1) 造血幹細胞移植ドナーより 20-50ml 採血し、末梢血単核球(PBMC)の分離を行う。

2) 1) で調整した PBMC に CMV 抗原ペプチド、IL-2 添加し培養用バッグにて CMV 抗原特異的 CTL の誘導を行う。

3) 1) で調整した PBMC の一部に OKT3、IL-2 添加し、末梢血 T 細胞 (抗原提示 T 細胞) の調製を行う。

4) 3) で調整した抗原提示 T 細胞にエピトープペプチドを加えペプチドパルス抗原提示 T 細胞を調整する。

5) 2) で誘導した CMV 抗原特異的 CTL を回収し、等量のペプチドパルス抗原提示 T 細胞を加え、培養する。MHC-tetramer 陽性細胞数が  $2 \times 10^7$  個を下回る場合、3)4) の過程を繰り返す。

3. 対象患者選択基準

・血縁者間造血幹細胞移植後の CMV 感染症で

1) 肺炎、胃腸炎、網膜炎、脳炎、あるいは肝炎の症状・所見を有し、PCR あるいは CMV アンチゲネミアが検出されるもの、あるいは、

2) 持続する発熱があり、PCR あるいは CMV アンチゲネミアが検出され、その他の病原体による感染症が否定的であるもの

・上記感染症に対し、Ganciclovir 及び・または Foscarnet にて 2 週間治療した時点で

1) CMV コピー数が 3000 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あるいは

3) CMV コピー数または CMV 抗原陽性細胞数が 1/10 以下に低下したものの CMV 感染症の症状が改善しない場合

4. 投与方法、投与量、投与期間

・ CMV 抗原特異的 CTL  $2 \times 10^5$ /kg から投与を開始する。重篤な有害事象が見られなければ、1 週間おきに 1 回の割合で 3 倍ずつ増量し、合計 3 回まで投与する (2 回目:  $6 \times 10^5$ /kg, 3 回目:  $18 \times 10^5$ /kg)。抗 CMV 効果がみられた場合は投与細胞数を増量せず、その細胞数を 3 回目まで継続投与する。

5. 目標症例数：解析可能な難治性 CMV 感染症 5 例とする。

6. 有害事象の評価を行い報告する。

骨髓内造血細胞移植後の生着・免疫学的再構築促進等を目的とした、  
*ex vivo* 増殖ドナー活性化 T 細胞輸注療法（活性化 CD4-DLI など）の開発

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・発生発達病態学分野  
同・医学部附属病院・細胞治療センター  
森尾友宏

骨髓内造血細胞移植においても、治療成績の向上のために様々な工夫がなされている。その1つが、ドナーリンパ球輸注(DLI)の併用であるが、ヒトにおいて生着や移植後再発予防に寄与するリンパ球亜群については未だ明らかではない。また骨髓内臍帯血移植においては、DLIの併用が行えず、生着促進や、移植後日和見感染症、再発などの状態での対応策が必要な状況である。

造血細胞移植後の生着不全、日和見感染症、再発に対しては *ex vivo* 増殖ドナー活性化 CD4T 細胞輸注療法（活性化 CD4-DLI）が有効であることが、探索的臨床研究から明らかになりつつある。この方法は、臍帯血移植にも応用が可能であり、また CD4T 細胞のみならず CD8T 細胞、全リンパ球の増殖も可能である。

本研究では、骨髓内造血細胞移植における *ex vivo* 増殖ドナー活性化 T 細胞輸注療法の役割を明らかにし、最終的にはその安全性と有効性を検証したいと考えている。



## 選択的移植片対腫瘍反応 (GvTR) の誘導

赤塚美樹・鳥飼宏基

(愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)

### 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。日本人に応用可能な mHag として我々がこれまでに同定した ACC-1Y, ACC-2, ACC-6, ACC-1C および新規の拘束性 HLA アリルを同定した HA-1 を含めると、非血縁移植例の約 40% がこれらを標的とした免疫療法の対象となる。同胞間では遺伝的背景の近さから、この 2/3 弱が対象となるに過ぎず、依然として日本人患者へ応用しやすい新規 mHag の同定が必要と考えられる。

昨年度までの研究で、従来の連鎖解析法・発現クローニング法に加えて、HapMap データリソースを応用した新規 mHag 同定法を京大・小川誠司博士との共同研究で開発したので、今後は本法を第一選択として使い、迅速な mHag を同定して行く予定である。

### 2. 免疫療法の基礎的検討

mHag 特異的細胞 T 細胞を用いた免疫療法が本研究課題の最終目標であるが、細胞療法に必要な培養液の確保、医薬品である IL-2 の必要性など、細胞療法ベースの臨床研究を行う環境は必ずしも容易ではない。

ペプチドワクチンは欧米および国内で、固形癌に対する免疫療法として十年以上臨床試験・研究で投与されてきており、その安全性はほぼ示され、またアジュバントの改良などで有効例も報告されつつある。我々は世界でもっとも頻用されているアジュバントとして Montanide を使用した mHag のワクチンの臨床研究を開始しているが、今後さらに効率の良いアジュバント (細胞も含め) 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。

① mHag は MHC 拘束性に提示され、また mHag をコードする SNP に種間で差があるため、ACC-1 の免疫原性は HLA-A\*24 トランスジェニックマウスがあってもテスト出来ない。他方、HA-1 抗原はヒトと同じ場所にマウスでも SNP (ただしコードするアミノ酸はヒトと異なる) があり、HLA-A\*0201 トランスジェニックマウスでモデル実験が可能である。

予備的実験では、Montanide アジュバントを用いた場合、HA-1<sup>H</sup> ペプチド特異的 CTL の誘導が可能であった。HLA-A\*0201 トランスジェニックマウスは繁殖に難があり、現在 C57BL/6 マウスとモデル抗原を用いて、アジュバントの検討を行っている。

また我々は過去に、セントラルメモリー形質をもつ ACC-1 特異的 CTL が末梢血より骨髄中により多く存在することを報告しており、今後マウスを用いて骨髄内にペプチドワクチンを投与する意義について検討する予定である。

② マイナー抗原ワクチン臨床試験の現状：過去 1 年半で、49 症例がマイナー抗原タイピングを受け、うち 34 例がドナーとペアでタイピングを受けた。9 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。これらのうち、再発例と再発ハイリスク例について、ワクチン投与の準備を行っている。

## 新しい骨髄移植方法の安全性と有効性に関する検討

分担研究者 一戸 辰夫 京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

研究協力者 三浦 康生 大阪赤十字病院 血液内科

### 1) 灌流法による骨髄採取の安全性に関する医師・ドナーの意識調査

自動灌流採取装置を用いた骨髄採取がドナーに与える身体的影響に関して、医学的安全性の見地から検討が必要と認識されている事項に関して、日本骨髄移植推進財団認定採取施設を対象とするアンケートにより調査する。また、本研究班の分担研究者が所属する施設において骨髄採取を受ける血縁ドナー候補者を対象として、灌流法による骨髄採取の臨床試験に参加すると仮想した場合の身体的問題に関する意識調査を実施する。

### 2) 間葉系幹細胞の薬物的機能賦活による骨髄内骨髄移植後の生着促進に関する研究

サラセミア症例を対象に実施された骨髄内骨髄移植の経験から (Int J Hematol 2007; 85: 73-77)、本移植法のヒトへの応用時には、造血機能回復の遅延が問題となる可能性が示唆されている。間葉系幹細胞 (以下 MSC) は、骨細胞、脂肪細胞、筋細胞、神経細胞への多分化能を示す組織幹細胞であるが、体外で増幅した自家 MSC の経静脈内投与を行うことにより、大量化学療法後の造血機能の回復が促進される可能性や (Koç ON, J Clin Oncol 2000; 18: 307)、同種移植後の生着不全例に対して、同種造血幹細胞 (HSC) と同一ドナー由来 MSC を同時に移植することによって、生着が促進される可能性 (Le Blanc K, Leukemia 2007; 21:1733) が報告されている。このように、MSC は現在未知の機序により、造血幹細胞の増幅・分化を促進する機能を有している可能性があるが、同種 HSC と同種 MSC の同時移植は再発を増加させるという報告もあり (Ning H, et al. Leukemia 2008; 22:593)、体外で増幅した MSC を臨床応用するに当たっては、他の細胞治療と同様に医学的・倫理的な問題を解決する必要がある。

そこで、本研究においては、移植片中に含まれる MSC の機能を薬物によって賦活化することにより、骨髄内骨髄移植時における同種 HSC の増幅と分化を促進して移植後の生着を促進するとともに、MSC の repairing cell (修復細胞) としての機能を有効に利用することにより、移植前処置後の臓器障害修復の促進も可能とすることを目標とする。

具体的な研究内容としては、

- ①MSC の機能賦活候補分子の同定
- ②MSC の機能賦活候補分子の in vitro での作用の検討
- ③MSC の機能賦活候補分子の動物モデルを用いた作用の検討
- ④機能賦活候補分子によって処理された MSC が HSC の増幅・分化・腫瘍化に及ぼす影響の検討を予定する。

## 新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究計画

関西医科大学病理学第一講座

池原 進

### [I] 新しい骨髄移植方法を用いた難病の病因解析:

IBM-BMT と IV-BMT を用いて、有効性を比較

#### <造血幹細胞異常症>

- 1) 関節リウマチ(RA)のモデル: SKG マウス(Treg↓)  
RA の発症を予防(投稿中)並びに治療可能(投稿予定)
- 2) 自己免疫性膵炎のモデル: WBN/Kob ラットを用いて膵炎を予防(Clin. Exp. Immunol. 152: 1-12, 2008)。
- 3) Crohn 病のモデル(SAM/Yit マウス)
- 4) Amyotrophic lateral sclerosis(ALS)のモデル(G93A mutant SOD1 Tg マウス)
- 5) 心筋症のモデル( $dsg^{-/-}$ : sarcoglycan gene deletion マウス)

#### <間葉系幹細胞異常症>

骨粗鬆症、肺気腫は、MSC disorders(J. Autoimmunity 30: 108-115, 2008)

Age-associated diseases: 動脈硬化症(SAMP1), II 型の糖尿病(db/db),

アルツハイマー病(SAMP10),

Metabolic syndrome (ob/ob)

### [II] 新しい骨髄移植方法を用いた悪性腫瘍の治療

- 1) DLI の併用: CD4<sup>+</sup>細胞除去 DLI(CD4<sup>-</sup>DLI):  
(Stem Cells 23:365-370, 2005; Stem Cells 25: 385-391, 2007)
- 2) 動物とヒトとの比較
- 3) DLI とペプチドワクチン療法等の併用
- 4) 胸腺移植の併用

### [III] 灌流法の改良法の開発: サルとヒトの剖検症例を用いて

### [IV] 骨髄内骨髄移植の改良法の開発

Collagen gel(CG)

[V] 最善の Conditioning regimen の決定：サルからヒトへ

- 1) MSC の補充
- 2) ATG の頻回投与
- 3) CD4<sup>+</sup>-DLI

[VI] 感染症の予防と対策

- ア. 動物実験：サルからヒトへ
- イ. 臨床研究

高感度多項目迅速微生物モニタリングシステムを用いて、日和見感染症の発生頻度、ウイルスの検出頻度、その種類などの基礎的データを集める。

[VII] 新しい骨髄移植方法に関する臨床プロトコルの作成と臨床研究の実施

- 1) Phase I Study：今年中
- 2) Phase I/II Study のためのプロトコール（現在作成中）

骨髄内骨髄移植研究(3)

2月4日

平岡孝雄

免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究」班 (H20-免疫-一般-014)

平成 20 年度 第 1 回班会議 プログラム

2008 年 6 月 7 日 (土) 午後 3 時 15 分～午後 4 時 15 分

会場 愛知県がんセンター国際医学交流センター メインホール

1. 研究班の目的と研究課題 (5 分)  
主任研究者 森島泰雄 : 愛知県がんセンター中央病院
2. 全ゲノム関連解析による造血幹細胞移植の遺伝学的背景の模索 (10 分)  
小川誠司 : 東京大学病院「がんゲノムプロジェクト」
3. 非血縁者間骨髄移植における HLA ハプロタイプ解析 (10 分)  
森島聡子 川瀬孝和 : 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫 疫学予防部  
柏瀬貢一 : 東京都赤十字血液センター  
森島泰雄 : 愛知県がんセンター中央病院
4. NK 細胞受容体およびサイトカイン遺伝子多型と非血縁者間造血細胞移植成績 (10 分)  
屋部登志雄 柏瀬 貢一 : 東京都赤十字センター  
川瀬孝和 松尾恵太郎 : 愛知県がんセンター研究所 疫学予防部  
森島泰雄 : 愛知県がんセンター中央病院
5. HLA 不適合移植における免疫反応の in vitro 解析 (10 分)  
村田 誠 : 名古屋大学 血液内科
6. 造血幹細胞移植における遺伝的背景の検討—同胞間移植症例を中止に— (10 分)  
鬼塚真仁 : 東海大学血液内科  
猪子英俊 : 東海大学分子生命科学
7. 非 HLA 因子と造血幹細胞移植後 GVHD, 拒否、感染、薬物副作用等の関連に関する研究 (10 分)  
佐治 博夫 : NPO HLA 研究所

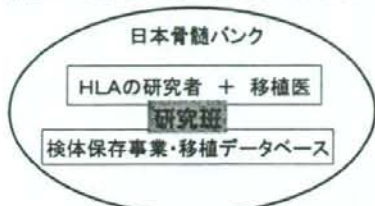
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業  
(H20-免疫一般-014) 第1回研究会議 2008.6.7

**組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究**

主任研究者 森島 雄 (愛知県がんセンター中央病院)  
分担研究者 猪子 英俊 (東海大学医学部 分子遺伝学)  
笹月 健彦 (国立国際医療センター)  
屋部 登志雄 (東京都赤十字血液センター)  
小川 誠司 (東京大学 血液内科)  
村田 誠 (名古屋大学 血液内科)

研究協力者の先生方  
JMDF

日本骨髄バンク発足とともに厚生労働省研究班が発足



当初目的  
患者とドナーのHLA型(遺伝子型)と、移植後の成績との関連を調べることにより、どのHLA適合ドナーを選択した  
らよいかを見出す

**これまでの成果**

日本骨髄バンク 8000症例(H18年まで)  
臨床データ(99%) 保存検体事業 約7000ペアー

- 第1期(440例) : HLA-A, Bの違いが生存を悪くする DRB1は影響しない。  
1996年 → HLA-A,B DNAタイピングの導入 [NEJM]
- 第2期(1298例) : HLA-C+HLA-DRB1の違いも生存を悪くする。  
2000年 → HLA-C(オプション確認検査) [BLOOD]
- 第3期(2423例) : HLA-C不適合の中でもNK細胞レセプターの不適合が生  
2002年 存を悪くする
- 第4期(2500例) : 移植片対白血病効果 [BBMT]  
2006年 急性リンパ性白血病でHLA-C不適合  
慢性骨髄性白血病でHLA-DPB1不適合
- 第5期(5210例) : HLA型不適合の組み合わせのなかに、許容できない組  
2007年 み合わせ(と許容できる組み合わせ)がある [BLOOD]  
→ 選択ドナーが拡大する可能性

↓  
直ちに移植の臨床(ドナー選択, GVHD予防)とバンクのHLA検査に導入

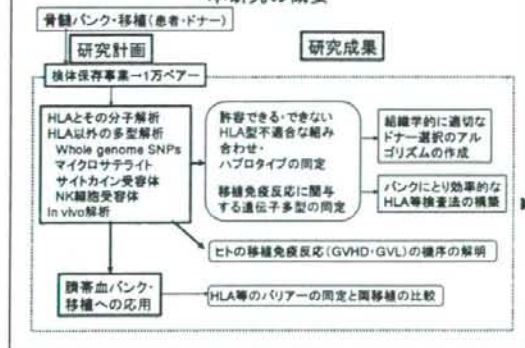
**HLA座不適合と移植成績**

Cox hazard modelによる多変量解析

不適合HLA座*	%	重症GVHD		移植後の死亡	
		起こり度	P	起こり度	P
HLA-A **	13	1.41倍	<0.001	1.31倍	<0.001
HLA-B **	6	1.50倍	<0.001	1.30倍	0.001
HLA-C	29	1.93倍	<0.001	1.25倍	<0.001
HLA-DRB1**	20	1.08倍	0.424	1.03倍	0.824
HLA-DQB1	23	1.10倍	0.315	1.08倍	0.195
HLA-DPB1	66	1.25倍	0.031	1.11倍	0.021

\*\*HLA血清型適合

**本研究の概要**



**研究テーマ(1) 組織適合性に基づくドナー選択**

リスク(A-GVHD, 生存)

- +++ HLA-A HLA-B HLA-Cw(KIR2DLリガンド)
- ++ HLA-Cw(KIR2DLリガンド適合)
- +(+) HLA-DR(血清型)
- HLA-DRB1

+++ GVHD許容できないHLA型不適合組み合わせ 16組

↓  
- ~ + 許容できるHLA型組み合わせ  
許容できるHLAハプロタイプ

GVL(白血病再発抑制) 効果

- + + HLA-Cw HLA-DPB1 HLA型不適合な組み合わせ?
- HLA-A HLA-B HLA-DRB1

↓  
非血縁者間末梢血幹細胞移植・調剤血移植での検証

**研究テーマ(2) 移植免疫反応に関する遺伝子(多型)の解明**

マイクロサテライト解析 サイトカイン(受容体) Whole genome SNPs 解析  
↓  
ドナー選択

移植後の患者リンパ球を用いたGVHD・GVLのin vitro解析  
→ 許容できないHLA/GVHD GVLのメカニズムの解明

**研究テーマ(3) HLA適合度に基づく移植法の選択**



**予想される研究成果**

**移植・行政への貢献**

許容できる・できない  
HLA型不適合な組み  
合わせ・  
ハプロタイプの同定

組織学的に適切な  
ドナー選択のアル  
ゴリズムの作成

移植免疫反応に関与  
する遺伝子多型の同定

バンクにとり効率的な  
HLA等検査法の構築

ヒトの移植免疫反応(GVHD・GVL)の機序の解明

HLA等のバリアーの同定と同移植の比較

移植免疫反応の軽減と生存率の向上

組織適合性に基づく  
両移植法の適応の  
明確化

骨髄バンク  
臍帯血バンク  
資源の有効活用

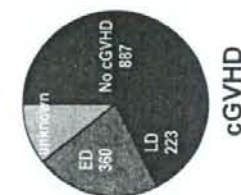
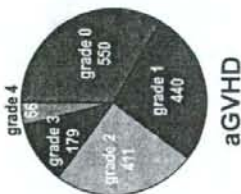
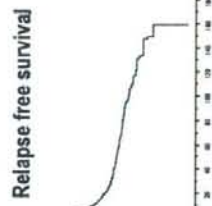
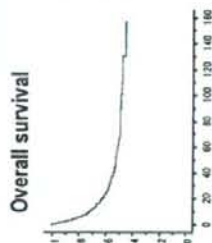
## 組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する班

### 全ゲノム関連解析によるGVHD関連多型の探索

東京大学	小川隆司
慶応義塾大学	小寺長尚
慶応義塾がんセンター	藤島繁雄・新塚英樹
九州大学	山本優
東海大学	金子英優
名古屋第一赤十字病院	宮村幹一
日本赤十字東院血液センター	佐竹 正博・松浦 貴一
日本科学技術推進財団 戦略的創造研究推進事業(CREST)	

### Demographic Features (genotyped cases)

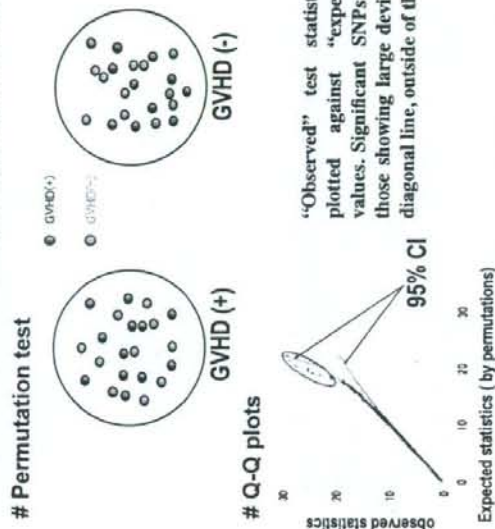
Sex	Male	Female
Age	963	685
<10	214	179
10's	335	224
20's	284	212
30's	312	229
40's	329	188
50's	168	100
>60	20	20
Disease	ALL 370	
	AHL 400	
	CML 257	
	MDS 164	
	HD/MHL 178	
	SAA 87	
	MM 24	
	others 50	
Conditioning Regimen		
non-TBI based	372	
TBI<100y	154	
TBI>=100y	1008	
GVHD prophylaxis		
Cy+MTX	895	
Flu+MTX	538	
relaxation	37	
*	1431	
unknown	64	



### Analysis Overview

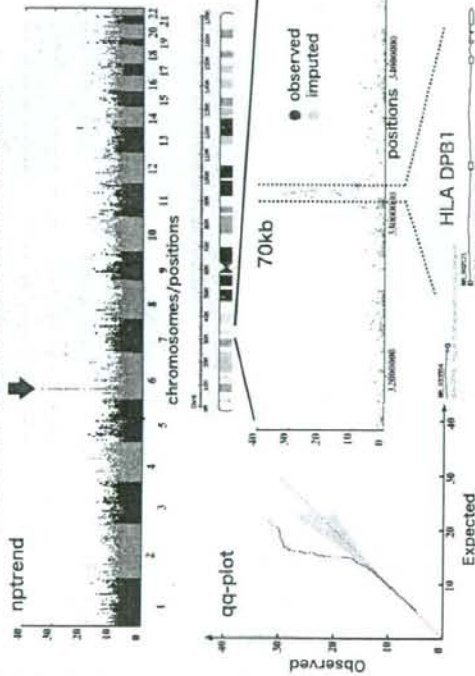
- Microarray analysis
  - 1646 donor/recipient samples using Affymetrix® 500Ks until call rate >90% in DM algorithm for each sample
- Genotyping whole data
  - BRLMM or Chiamo
- Imputation of unobserved genotypes
  - Haplotype data of PhaseII HapMap ➡ ~2,500,000 SNPs
- Filtering low-performance SNPs
  - call rates < 95%
  - deviated from HWE in Donor samples
  - having low MAF values (<5%)
  - showing 3% > difference in call rates between donors and recipients
  - ➡ 1,276,699 SNPs
- Computing test statistics and permuted statistics
  - Detecting associations

### Evaluation of multiple hypothesis testing

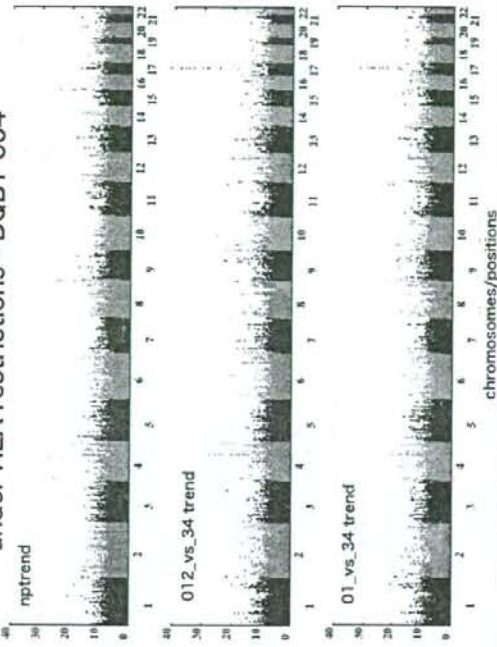




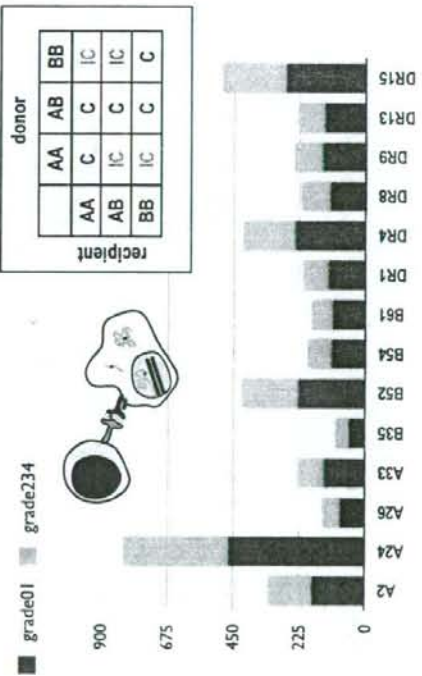
GVHD associated allele mismatch under no HLA restrictions assumed



aGVHD associated allele mismatch under HLA restrictions - DQB1\*604



Statistical Power is limited in the analysis of mHags



Summary

- Using a large JMMP cohort, we are conducting whole genome association studies to identify the genetic factors responsible for the development of GVHD, including GVHD-related mHag locus.
- In preliminary analysis, we have observed some statistical peaks in the analysis of donor and recipient SNPs.
- Some putative minor antigen loci have been detected, which may be associated with an increased risk of the development of GVHD.
- Further evaluations should be absolutely required to confirm these preliminary results, using An independent validation set and/or Combined Studies/Meta analysis

### 3. 非血縁者間骨髄移植におけるHLAハプロタイプ解析

森島聡子 川瀬孝和 森島泰雄 (愛知県がんセンター)  
柏瀬貢一 (東京都赤十字血液センター)

#### 【背景と目的】

非血縁者間骨髄移植において、ドナーと患者の HLA locus のマッチングと移植成績については数多くの報告があり、JMDP の解析においてもその臨床的な重要性が明らかにされてきている。しかし、造血幹細胞移植における HLA ハプロタイプの臨床的な意義については、これまでほとんど解明されていない。HLA 一致同胞間移植では HLA ハプロタイプそのものが一致するが、非血縁者間移植においては確定できない。

最近シアトルのグループにより、HLA-B を probe にして genomic DNA を分離し、同一のハプロタイプ上の HLA-A, B, DR を同定する方法が開発された (PNAS, 103:6964-6969, 2006)。HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 がマッチしたドナーから UR-BMT を施行された患者を、ドナーと患者で同一のハプロタイプ上の HLA-A, B, DR がマッチする群と、ハプロタイプがミスマッチの群に分けて grade 3-4 の急性 GVHD 発症率を比較すると、有意に後者で高くなることが報告されている (PLoS Med, 4: e8, 2007)。

今回、日本人での非血縁者間骨髄移植におけるハプロタイプの臨床的な意義を明らかにすることを目的に解析を行った。

#### 【方法】

1993年1月より2005年末までの期間にJMDPを介し、非血縁者間骨髄移植を施行された5120例の中からHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1のDNAタイピングが全て一致したドナーより移植を受けた712例について、grade 2-4の急性GVHDの頻度を解析した。

HLAハプロタイプの推定は、日本人におけるハプロタイプ頻度を family study で解析したデータ (MHC, vol8, No.1, 2001) に基づいて行った。複数のハプロタイプ候補を認めた場合、候補となった2種類が同一のアリルを用いずに矛盾せず

同定できる場合を X 群、1つのハプロタイプ候補のみが同定できた場合を Y 群、候補が全くなかった場合を E 群とした。複数の候補を認め、両立しえない組み合わせの場合は、最も頻度の高いハプロタイプ (P1; HLA-A\*2402-Cw\*1202-B\*5201-DRB1\*1502-DQB1\*0601 -DPB1\*0901)と 2 番目のハプロタイプ (P2; HLA-A\*3303-Cw\*1403-B\*4403-DRB1\*1302-DQB1\*0604 -DPB1\*0401)を優先的に定義し、それ以降のハプロタイプで複数の可能性がある場合は、定義できない群(U 群)とした。

#### 【結果】

- (1) 上記 4 つの群における grade 2-4 の急性 GVHD の頻度は X 群 (220 例)で 26.7%、Y 群(354 例)で 33.2%、E 群 (74 例)で 28.6%、U 群(64 例)で 35.8%であり、差は認めなかった。
- (2) 特定のハプロタイプが GVHD 発症頻度に及ぼす影響を解析するため、各々のハプロタイプを持つ群と持たない群に分けて、grade2-4 の急性 GVHD 頻度を比較した。P1 ハプロタイプは 331 例に認め、GVHD 発症頻度は 30.6%で P1 を持たない群と差はなかった。P2 は 111 例に認め、急性 GVHD の頻度は 22.3%と P2 を持たない群の 32.7%に比較して優位に発症頻度が低かった。それ以外のハプロタイプに於いては、差は認めなかった。
- (3) さらに、P1 を持つ群 331 例で解析を行い、もう片方のハプロタイプの組み合わせによる grade 2-4 の急性 GVHD 発症頻度を検討した。Homozygous P1/P1 (36 例)の発症頻度は 16.2%、P1/P2 (25 例)では 12.0%であり、それ以降の頻度の低いハプロタイプを相手にもつ群(P1/PL=88 例)の 37.9%、もう片方のハプロタイプが同定できなかった群 (P1/PU=182 例)の 34.1%と比較すると、有意に発症頻度が低かった。

#### 【考察】

- (1) 結果(1)より、JMDP を介した非血縁者間骨髄移植でのフルマッチの組み合わせにおいては、ハプロタイプが推定できなかった群でも HLA ハプロタイプはドナーと患者で一致している可能性が高いと推察される。
- (2) ハプロタイプ P2 は、それを持つこと自身が急性 GVHD の発症リスクを低くしている可能性が示唆される。
- (3) P1/P1 及び P1/P2 の組み合わせでは GVHD 発症頻度が有意に低く、HLA 一致同胞間の移植に匹敵する結果と思われ、日本人に頻度の高い保存されたハプロタイプであることに起因する可能性があると考えられる。

造血幹細胞移植合同研究会(厚生労働科学研究) 平成20年6月7日  
 厚生労働科学研究 免疫・アレルギー疾患等研究事業  
 「組織適合性に基づく非血縁同種造血幹細胞移植の成績向上に関する研究」班

分担研究課題

NK細胞受容体等の解析及び  
 HLAタイピング法の構築と検証

東京都赤十字血液センター  
 柏瀬 賢一 屋部 登志雄

平成20年度解析計画

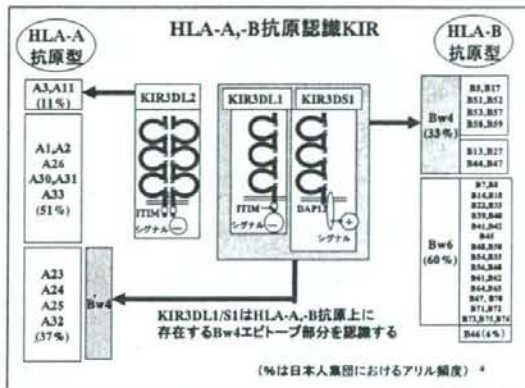
1. NK受容体とリガンド遺伝子型適合性  
 (共同研究者: 愛知県がんセンター 川瀬 幸和, 松尾 寛太郎, 森島 恭雄)  
 KIR, LILR遺伝子型とリガンドHLA抗原型の組合わせと移植成績
2. サイトカインと受容体遺伝子多型  
 (共同研究者: 愛知県大学 鬼塚 真仁 HLA研究所 丸屋 悦子, 佐治 博夫)  
 IL-10等の抑制性サイトカインとその受容体と移植成績
3. HLAタイピング法の構築と検証及び検体保存事業協力  
 (共同研究者: 愛知県がんセンター 森島 恭雄)  
 HLA-C抗原タイピング法の検証, 検体DNAの全ゲノム増幅(WGA)など

1. NK受容体とリガンド遺伝子型適合性  
 昨年度までの解析

HLA-C抗原 (C1, C2) 認識 KIR 2DL, 2DS  
 ・リガンド不適合で成績悪化  
 ・患者ATG投与が影響  
 ・ドナー2DS2患者C1で急性GVHD重症化  
 (Morishima et al. BBMT 2007)  
 (Yabe et al. BBMT 2008)

今年度以降の解析予定

HLA-A抗原, -B抗原認識 KIR KIR3DL1, 3DS1, 3DL2  
 LILR (HLAクラスI抗原認識) LILRB2, LILRA3, LILRB1  
 NKG2 (HLA-E抗原, MIC, ULBP認識) NKG2A, C, D



2. サイトカインと受容体遺伝子多型

急性GVHD発症にはサイトカインが重要な役割を果たしている。炎症性サイトカインが反応を亢進する一方、抑制性サイトカインはアロ反応や炎症反応を抑えGVHDの発症を制御すると推定される。

患者の抑制性サイトカインIL-10遺伝子プロモーター多型およびドナーIL-10受容体遺伝子多型と重症急性GVHD発症の関連が血縁者間HLA一致骨髄移植解析で報告された(シアルグループ, 佐治ら)

昨年度までのJMDF解析では患者のIL-10プロモーター領域SNPハプロタイプと急性重症GVHD発症率との関連が見られた(柏瀬ら)

本年度は患者IL-10受容体遺伝子多型解析を行う。またやはり抑制性のサイトカインであるTGF-β, 受容体遺伝子も同様に解析する予定である

3. HLAタイピング法の構築と検証  
 及び検体保存事業協力

- ★HLAタイピング法の構築と検証
  - ・蛍光ビーズ法によるHLA-C座遺伝子タイピング (SBT法の比較検証)
- ★検体保存事業への協力
  - ・ゲノムDNA抽出
  - ・HLAタイピング (HLA-A, B, C, DQB1, DPB1)
  - ・全ゲノム増幅(WGA)及びセット化