

「HLA 不適合移植における免疫反応の *in vitro* 解析」

分担研究者：村田 誠（名古屋大学医学部附属病院血液内科）

日本では同胞間移植が減少し、代わって非血縁者間移植が増加している。非血縁者間移植では可能な限り多くの HLA アリルが一致したドナーを選択することで移植後 GVHD の発症危険率を下げる事が出来るが、実際には全ての HLA アリル（主として A, B, Cw, DRB1, DPB1, DQB1）の一致した非血縁ドナーから移植を行うことは極めて困難である。

このような HLA アリル不適合移植後に発症する GVHD や GVL 効果のメカニズムを解明するためには、不適合 HLA アリル分子に対する T リンパ球応答の解析が不可欠と考えられる。しかしこのことに関しこれまでに行われてきた研究は MHC 不適合マウス間での移植モデルを用いたものが多く、またヒトでの研究も HLA 不一致の二者のリンパ球を試験管内で反応させて解析を行ういわゆる MLC 試験を実験モデルとして用いたものがほとんどであった。すなわち、HLA アリル不一致ドナーから実際に移植を受けた患者体内における反応性 T リンパ球について、その抗原特異性も含め詳細に解析した報告はほとんどない。

最近、愛知県がんセンターの川瀬らは、日本骨髄バンクを介して行われた非血縁者間骨髄移植 5210 例を対象に統計解析を行い、ある特定の不適合 HLA アリルの組み合わせが重症急性 GVHD の発症危険率の高さと相関すること、加えてある特定の部位のアミノ酸相違が同じく重症急性 GVHD の発症危険率の高さと相関することを見出した（Kawase *et al.* Blood 2007）。我々はこの統計学的解析による結果を、生物学的な手法を用いて確認することを試みる。

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)

造血幹細胞移植における遺伝的背景の探索—同胞間移植を中心に—

鬼塚真仁、猪子英俊
東海大学血液内科
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。これまで、小寺班において以下のテーマで研究を施行してきたが、引き続き森島班においても同様のテーマで研究活動を行うこととする。

1. 造血幹細胞移植後合併症と遺伝子多型性

(ア) 対象疾患

- ① 肺合併症
- ② 急性 GVHD
- ③ 慢性 GVHD

(イ) 方法

- ① マイクロサテライトマーカーを利用した疾患関連遺伝子解析
- ② マイクロアレイを利用した網羅的遺伝子多型解析

(ウ) 対象コホート

- ① 同胞間造血幹細胞移植ペア
- ② 非血縁者間骨髄移植ペア

現在検討中の課題

これまでに、我々の施設では移植後合併症に関わる疾患関連遺伝子探索として、おもに、同胞間同種造血幹細胞移植を対象とし、遺伝的背景と候補遺伝子との関係を探索してきた。移植後肺合併症と ACE 遺伝子、慢性 GVHD と FCRL3、CTLA4、IL17F 遺伝子多型性の関連を示してきた。現在、候補遺伝子を扱うピンポイントな解析と同時に、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子多型解析を行っており、HLA 一致同胞間同種造血幹細胞移植症例約 200 ペアについて検討中である。

マイクロサテライトマーカーは約 500 の候補遺伝子を対象に、骨髄移植推進財団を介して行われた同種骨髄移植症例を対象に現在すすめている。

今後の課題

同胞間移植移植症例では HAL の一致度だけではなく、非血縁者間骨髄移植症例に比べて、遺伝的背景が近い。このため、遺伝子多型性をもとにした同種免疫反応の原因遺伝子を絞り込むのに有利であると考えられる。現在、共同研究施設における同胞間移植症例の DNA を収集しつつあり、統計学的パワーを高めることを重要視している。また、マイクロサテライトマーカーや他の遺伝的マーカーを用いて、SNP 情報も含めた詳細な遺伝子解析を行い、造血幹細胞移植後合併症関連遺伝子を探求することとする。

また、遺伝子解析により疾患関連遺伝子候補となった遺伝子の機能解析も、当施設の班研究での重要な課題として位置づけている。

現在機能解析の一環として以下の項目について検討中である。

1. 造血幹細胞移植後肺合併症マウスモデルとレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の関係
2. IL10 プロモータ多型性と産生能の関係

造血幹細胞移植後合併症関連SNPs -非血縁間移植の予後推定へ-

佐治博夫、丸屋悦子、Milena Ivanova¹⁾、松下正毅²⁾

特定非営利活動法人 HLA研究所
¹⁾Central Laboratory of Clinical Immunology University
Hospital "Alexandrovská", Sofia, Bulgaria
²⁾ 清永製薬株式会社

GVHD risk/ GVL effects

- IL-10: anti-inflammatory and immunosuppressive properties. (Yabeら)
- IL-10 Receptor:
- IL-6: pleiotropic cytokine, predominant pro-inflammatory and anti-inflammatory and immunosuppressive properties.
- CD31: Donor/ Recipient mismatch
- CD62L: Donor/ Recipient mismatch
- CD49b: Donor/ Recipient mismatch

Infection risk and/or GVHD

- MBL2: Mannose-binding lectin:
 - A factor of innate immunity, and collectin family that binds to repeating carbohydrate moieties on a broad range of bacterial, viral, fungal, protozoan pathogens directly or via complement activation opsonizes pathogens for phagocytosis. 鎌倉GVHD?
- TLR4: Toll like receptor 4:
 - A factor of innate immunity. GVHD risk?
- NOD2/CARD15: nucleotide-binding oligomerization domain containing 2/ caspase recruitment domain family, member 15 (CARD15)
 - linked to inflammatory diseases, GVHD and TRM risk

Pharmacogenomics

- CYP3A5:
 - 免疫抑制剤(FK506)などの血中濃度維持
 - 副作用の予防
- CYP2B6:
 - 抗がん剤(エンドキサン)などの血中濃度維持
 - 副作用の予防
- その他、ALDHなど

SNPs	予後因子	SNP position			検査法
LI-10	aGVHD	-1082	-819	-592	Luminex
LI-10 R β	aGVHD	c238			Luminex
IL-6	aGVHD	-174	-572		Luminex
TLR-4	aGVHD/感染	399			Luminex予定
NOD2	a-GVHD, TRM	8	12	13	Luminex予定
MBL2	移植後感染	-619	-290	-66	Luminex
MBL2 exon	移植後感染	52	54	57	PHFA/ Luminex
CYP3A5	免疫抑制剤	6986			Luminex
CYP2B6	抗がん剤	-2320	-750	18492	Luminex予定

Minor histocompatibility antigens

- HA-1
- ACC1 Luminex
- ACC2
 - GVL効果/GVHDの予測
 - ワクチン療法の適応の可否

IL-6 promoter SNPs (-174, -572) polymorphism

position	nucleic acid	Japanese n=108	Caucasian n=45	position	nucleic acid	Japanese n=77	Caucasian n=45
-174	G/G	1.00	0.40	-572	G/G	0.05	0.95
	G/C	0.00	0.42		G/C	0.45	0.05
	C/C	0.00	0.18		C/C	0.49	0.00
	G-allele	1.00	0.61		G-allele	0.28	0.98
	C-allele	0.00	0.39		C-allele	0.72	0.02

• Kidney transplant recipients carrying the IL-6GGG/GGG^{-597/-572/-174} genotype have superior graft survival. (Michael Muller-Steinhardt et al, American Journal of Transplantation 2004; 4:402-406)

• The -597(G/A) and -174(G/C) polymorphism are in tight-linkage disequilibrium. (Michael Muller-Steinhardt et al, American Journal of Transplantation 2004; 4:402-406)

• GGG/GGG individuals showed a lower IL-6 secretion upon lipopolysaccharide-stimulation versus all others (P=0.039). (Michael Muller-Steinhardt et al. Clinical and Experimental Immunology 2006; 147:339-345)

MBL2 SNPs Frequencies and Function

Function	promoter			exon 1			name						Frequency	
	-619	-290	-66	odn 52	odn 54	odn 57	-619	-290	-66	odn 52	odn 54	odn 57	Japanese N=57	Caucasian N=49
	C/G	G/G	C/T	C/T	G/A	G/A	H/L	Y/X	P/Q	A/D	A/B	A/C		
High-producer	C	G	T	C	G	G	L	Y	Q	A	A	A	0.079	0.163
	G	G	C	C	G	G	H	Y	P	A	A	A	0.404	0.449
Intermediate	C	G	C	C	G	G	L	Y	P	A	A	A	0.132	0.000
Low-producer	C	C	C	C	G	G	L	X	P	A	A	A	0.105	0.265
?	C	G	C	T	G	G	L	Y	P	D	A	A	0.000	0.010
Deficiency	C	G	C	C	A	G	L	Y	P	A	B	A	0.263	0.133
	C	G	T	C	G	A	L	Y	Q	A	A	C	0.000	0.255
	G	G	C	T	G	G	H	Y	P	D	A	A	0.000	0.102

• Mannan-binding lectin pathway deficiencies and invasive fungal infections following allogeneic stem cell transplantation. M Granelli et al. Exp Hematol. 2006; 34(10):1435-41.

• MBL2 polymorphism and risk of severe infections in multiple myeloma patients receiving high-dose melphalan and autologous stem cell transplantation. I Molle et al. Bone Marrow Transplant. 2006; 38(8):555-60.

• Mannose-binding lectin and infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. CG Mullighan et al. Leuk Lymphoma. 2004; 45(2):247-56.

• Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with major infection following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. CG Mullighan et al. Blood 2002 15; 99(10):3524-9.

6研究班合同公開シンポジウム

日時:2009年1月18日(日)午後3時~5時

会場:東京医科歯科大学湯島キャンパス歯科外来事務棟4階・歯学部特別講堂

- ★ 開会の挨拶 谷口 修一(虎の門病院・血液科)
- ★ 厚生労働省ご挨拶 峯村 芳樹(厚生労働省健康局疾病対策課臓器移植対策室 室長)

★ 研究代表者報告

- 1.「灌流法と骨髄内骨髄移植法の臨床応用に向けて」(「新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究」班)
研究代表者 池原 進(関西医科大学・第1病理)
- 2.「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班
研究代表者 加藤 俊一(東海大学医学部基盤診療学系・再生医療科学)
- 3.「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
研究代表者 森島 泰雄(愛知県がんセンター・血液細胞療法部)
- 4.「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究」班
研究代表者 谷口 修一(虎の門病院・血液科)
- 5.「同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究」班
研究代表者 宮村 耕一(名古屋第一赤十字病院・血液内科/造血細胞移植センター)
- 6.「移植片対宿主病(GVHD)・感染症治療薬の同種造血幹細胞移植領域での適応拡大を目指して」
(「治療関連合併症を減少させて同種造血幹細胞移植後の生存率の向上を目指す標準的治療法の開発研究」班)
研究代表者 福田 隆浩(国立がんセンター中央病院・幹細胞移植科)

- ★ 閉会の挨拶 加藤 俊一(東海大学医学部基盤診療学系・再生医療科学)

平成 20 年度 厚生労働科学研究 第 2 回合同班会議 プログラム・抄録集

研究班名：

<免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業>

- ・ 新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究
研究代表者 池原 進 (関西医科大学 第 1 病理)
- ・ 組織適合性に基づく非血縁者間造血幹細胞移植の成績向上に関する研究
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)
- ・ 同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究
研究代表者 谷口 修一 (虎の門病院 血液科)
- ・ 同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究
研究代表者 宮村 耕一 (名古屋第一赤十字病院 血液内科/造血細胞移植センター)
- ・ 臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究代表者 加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学)

<がん研究助成金>

- ・ 成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)

日 時:平成 21 年 1 月 17 日(土)・18 日(日)

会 場:東京医科歯科大学湯島キャンパス 歯科外来事務棟4階 歯学部特別講堂

平成 20 年度厚生労働科学研究 第 2 回合同班会議

研究班名：

<免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業>

- ・ 新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究
研究代表者 池原 進 (関西医科大学 第 1 病理)
- ・ 組織適合性に基づく非血縁者間造血幹細胞移植の成績向上に関する研究
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)
- ・ 同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究
研究代表者 谷口 修一 (虎の門病院 血液科)
- ・ 同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究
研究代表者 宮村 耕一 (名古屋第一赤十字病院 血液内科/造血細胞移植センター)
- ・ 臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究代表者 加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学)

<がん研究助成金>

- ・ 成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)

期 日：2009 年 1 月 17 日 (土)

10:00~11:30 池原班
11:30~13:30 <休憩>
13:30~16:00 加藤班
16:00~18:00 森島班 (組織適合性)
18:00~18:40 森島班 (がん研究)

1 月 18 日 (日)

09:00~12:00 谷口班
12:00~13:00 <昼食>
13:00~15:00 宮村班
15:00~17:00 合同公開シンポジウム

会 場：東京医科歯科大学湯島キャンパス 歯科外来事務棟 4 階 歯学部特別講堂
東京都文京区湯島 1-5-45 (JR、東京メトロ 御茶ノ水駅下車)

事務局：東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学内 TEL：0463-93-1121 (内 2311)

1 日 目

平成 21 年 1 月 17 日(土)

造血幹細胞移植合同班会議（厚労科学研究）

新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究（H20-免疫一般-019）

研究代表者 池原 進（関西医科大学病理学第一講座）（10:00-11:30）

10:00-10:10

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

岡山大学 品川克至、前田嘉信（岡山大学血液・腫瘍・呼吸器内科（第二内科））

10:10-10:20

2. 間葉系幹細胞の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

三浦康生（大阪赤十字病院血液内科）

一戸辰夫（京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科）

10:20-10:30

3. 同種造血幹細胞移植後の難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性T細胞（CTL）の体外増幅法の開発と臨床第1相試験

高橋義行、小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学）

10:30-10:40

4. 成人末梢血及び臍帯血より培養したT細胞の性状解析

森尾友宏（東京医科歯科大学大学院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）

10:40-10:50

5. 選択的移植片対腫瘍反応の誘導—マイナー抗原ワクチンの臨床研究

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）

10:50-11:00

6. 「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた、骨髄内骨髄移植療法（HLA不適合移植）」臨床試験プロトコル案

吉原 哲、小川啓恭（兵庫医科大学内科学講座血液内科）

11:00-11:10

7. 新しい造血幹細胞移植技術（灌流法+骨髄内骨髄移植法）の有用性—ウサギのhaploidentical BMTの系を用いて—

池原 進（関西医科大学病理学第一講座）

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

岡山大学 品川克至、前田嘉信（岡山大学血液・腫瘍・呼吸器内科（第二内科））

【目的】

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に感染症以外の原因により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り、肺への放射線照射 RT と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、静脈内骨髄移植 (iv-BMT) 後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植 (intra-BMT) では少ないと考えられる。Ikehara らは、マウスモデルを用いて、intra-BMT では iv-BMT よりも GVHD が抑制されることを報告しているが、我々は intra-BMT では iv-BMT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立てた。マウスモデルを用いて、IPS に対する intra-BMT の影響に関して iv-BMT と比較検討を行った。

【方法と結果】

Donor マウスには C57BL/6J を用い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に iv BMT と intra-BMT を行い比較検討した。このモデルでは、両群間で生存率、GVHD スコアに有意な差は認められなかった。しかし、移植 6 週後の気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage;BAL を行ったところ、回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は、intra-BMT において iv-BMT よりも少ない傾向にあり、組織学的にも intra-BMT において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。以上から IPS は intra-BMT において軽度である可能性が示唆された。

【展望】

同様のマウス IPS モデルを用いて、1) 肺組織標本の免疫染色などによる評価、2) BALF 洗浄液中の種々のサイトカイン量を測定、3) 移植後輸注細胞の肺へのトラップに関して、IVIS imaging system を用いて iv-BMT との比較検討をおこなう予定である。

2. 演題名：間葉系幹細胞の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

演者：大阪赤十字病院 血液内科 三浦康生

京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科 一戸辰夫

抄録：間葉系幹細胞（以下 MSC）は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事や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、生着が促進される事が報告されている。MSC は HSC 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、MSC を機能的に賦活化することにより、HSC の増幅・分化をより促進し、骨髄内骨髄移植後においても生着を促進する可能性がある。

我々はエリスロポイエチン（以下 EPO）が MSC を賦活化する事を見いだした。ヒト MSC は EPO レセプターを発現し、EPO 刺激により *in vitro* で Stat5 の活性化が認められた。MSC を EPO で刺激する事により STRO-1 や MUC18、ALCAM-1 の発現が増強したが、これらの細胞をハイドロキシアパタイト・リン酸三カルシウムと混和し免疫不全マウスの皮下に移植すると、MSC による *in vivo* での骨形成が促進するとともに、骨周囲に誘導される骨髄組織の形成も促進した。骨及び骨髄組織の形成は MSC を EPO レセプターや Stat5 に対する siRNA で前処理する事により抑制された。以上から EPO 刺激により MSC は機能的に賦活化され骨形成能および骨髄誘導能は増強し、そのメカニズムとして EPO レセプター/Stat5 シグナル経路が一部関与していると考えられた。EPO により骨髄移植後の血球生着が促進する可能性が示唆された。

3. 同種造血幹細胞移植後の難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の体外増幅法の開発と臨床第 1 相試験

名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学
高橋義行、小島勢二

【目的】造血幹細胞移植後の患者におけるウイルス感染症は、移植前処置に ATG を用いた場合や GVHD の治療中など強い免疫抑制下で重篤化しやすく、そのコントロールは移植を成功させるために重要である。現在日本では抗ウイルス薬による治療が行われているが、少数ながら抗ウイルス薬が効かない症例がみられることや、抗ウイルス剤による副作用などの問題から新規治療の開発が望まれる。欧米の一部の施設では造血幹細胞移植後難治性ウイルス感染症に対してウイルス抗原特異的 CTL の臨床応用が行われ優れた効果が報告されている。今回我々は移植ドナーより CMV, EBV を対象に臨床応用可能な特異的 CTL の体外増幅法を開発した。【方法】HLA-A2 または A24 陽性健康人 7 人の末梢血 20~30ml から単核球を分離し、ウイルス特異的ペプチドで刺激後、IL-2 添加培地で 1 週間培養し、その後我々の開発した方法にもとづき CD3 で刺激した T 細胞に抗原ペプチドをパルスしたものを抗原提示細胞とし T 細胞に加え閉鎖培養無菌バッグにより培養した。増幅した CTL の細胞数、MHC-tetramer 陽性細胞の濃度、特異的 CTL の細胞障害活性を評価した。【結果】20-30ml の末梢血より 21 日間の培養で MHC-tetramer 陽性率は平均 54.7%(22.6-84.7%)、ウイルス特異的 CTL としていずれも 10^8 個以上に増幅が可能であった。体外増幅された CTL は、特異的ペプチドの刺激により、MHC-tetramer 陽性細胞選択的に CD107a の細胞膜への表出がみられ、また特異的ペプチドをパルスした T2 細胞、T2-A24 細胞に対して強い細胞傷害活性を示した。【結論】ウイルス特異的 CTL による臨床第一相試験実施に必要な基礎実験が終わり、セルプロセッシングセンターを含めた研究基盤が整備された。当院倫理委員会に承認された臨床第一相試験が開始予定である。

5. 「選択的移植片対腫瘍反応の誘導—マイナー抗原ワクチンの臨床研究」

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. マイナー抗原ワクチン臨床試験

固形癌に対するペプチドワクチンは欧米および国内で十年以上臨床試験・研究で投与されてきたが、本年度になって医薬品化に向けた治験も開始されつつあり、ペプチドワクチンに対する評価体制ができつつある。

マイナー抗原ワクチン臨床試験の現状：過去2年で、56症例がマイナー抗原 (mHag) 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^Y, ACC-1^C (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、1例ずつ実際にワクチンの投与がなされた。

1例目は自家移植後の PTCL-u の第一再発時に HLA-DR 血清1座不一致非血縁移植を受けたものの、13カ月後に右鼠径部に腫瘤として再発した男性。局所照射と VP-16 内服で再寛解導入中に ACC-1^C mHag に GVL 方向に不適合があることが判明し、当院へ紹介となった。「治療投与」適格と判定されたため、30 μ g の ACC-1^C ペプチドをモンタナイド ISA51VG アジュバントとともに隔週で皮下接種を行った。3回接種時点で右鼠径腫瘤が PD となったため投与を中止した。有害事象として、3回目のワクチン接種局所に7cm大の発赤と硬結を認めたが自然消退した。末梢血のテトラマー及び ELISPOT 検査ではワクチン前、ワクチン後ともに ACC-1^C 特異的 CTL は検出されなかった。

2例目は T-ALL/LBL の第一寛解期に HLA 一致同胞間移植を受けた男性で、HLA-A*0206 拘束性の HA-1^H mHag に GVL 方向に不適合があり、再発ハイリスク症例であったため当院へ紹介となった。「再発予防投与」適格と判定されたため、30 μ g の HA-1^H ペプチドをモンタナイド ISA51VG アジュバントとともに隔週で皮下接種を行った。予定の5回の接種を終了した。有害事象として、4回目以降のワクチン接種局所に5cm大の発赤と硬結を認めたがいずれも1週間程度で自然消退した。末梢血のテトラマー及び ELISPOT 検査については現在検討中である。

いずれの症例も有害事象は局所反応だけであり、今後、2例目の mHag 特異的免疫反応の誘導状況の結果によって初回投与量が不十分と考えられれば、投与量・スケジュールを変更すべきか効果安全評価委員会と検討する予定である。また、拘束性 HLA の存在に加え、mHag の GVL 方向不適合がある症例は20%程度であるので、今後さらなる症例のリクルートを行っていく。

さらに、我々はセントラルメモリー形質をもつ ACC-1^Y 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過去に報告しており、今後機会があれば骨髄中の CTL の増減を検討する他、現行のワクチンの安全性が確認できた後は、ペプチドを添加した樹状細胞を皮下接種ないしは骨髄内投与する可能性について検討する予定である。

2. マイナー抗原特異的 CTL の骨髄へのホーミング法の検討

上述のように骨髄は確かにセントラルメモリーT細胞のリザーバーとして、また残存白血病細胞の存続の場所として、ともに樹状細胞ワクチンを投与する理想的な場所である可

能性がある。しかしながら、ワクチンを骨髄内に（特に再発予防投与として）反復投与する際の合併症も無視できない。そこで SDF-1/CXCL12 を分泌する骨髄へのホーミングレセプターである CXCR4 を、CTL の効率的な骨髄への送達に利用できないか検討を開始した。

マウスと人の CXCR4 はアミノ酸レベルで 89% 相同であることから、まず CXCR4 高発現ヒト骨髄腫細胞株がマウス骨髄に集積しうるか検討した。細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入し安定株を得た後、8 週齢の NOG マウスの尾静脈から 1×10^7 個を投与し経過観察した。6 週目の時点でも末梢血中には骨髄腫細胞が認められなかったため屠殺し、骨髄・脾臓への浸潤をフローサイトメトリー（抗ヒト CD45、CD38 抗体を指標）で検討したところ、骨髄への選択的な生着が認められた。またルシフェラーゼの発光でも同様の傾向が認められた。

以上の予備的結果より、CXCR4-IRES-GFP のコンストラクトをレトロウイルスにてマイナー抗原特異的 CTL に導入し、養子移入を試みた。GFP を指標とした場合、CTL への遺伝子導入効率は 80% 程度と良好であった。実際にこの CTL とマイクロチャンバーを隔てて SDF1 α 濃度勾配を用いた chemotaxis assay を行ったところ、CXCR4 導入細胞で有意な migration が認められた（約 80% vs. 約 35%、単回実験）。

今後 CXCR4 導入 mHag 特異的 CTL またはコントロール CTL を NOG マウスの尾静脈から投与し、骨髄へのホーミング、事前に生着させておいた腫瘍細胞への抗腫瘍効果について検討する予定である。

6. 「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた、骨髄内骨髄移植療法（HLA 不適合移植）」臨床試験プロトコル案

兵庫医科大学 血液内科

吉原 哲、小川 啓恭

灌流法による骨髄採取+骨髄内骨髄移植の有用性については、動物モデルにおいては多数のデータにより示されている。しかしながら、ヒトにおける臨床応用は中国で 1 例行われたのみであり、進んでいない。現在、自家移植の系において、灌流法による骨髄採取の安全性を検討する臨床試験が行われている。本臨床試験では、同種移植の系における、灌流法による骨髄採取+骨髄内骨髄移植の安全性および有効性を検討したい。

試験の目的：「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法（HLA 不適合移植）」の安全性および有効性の検討（臨床第 I/II 相試験）

1) ドナー：灌流法による骨髄採取について評価する

主要評価項目：灌流法による骨髄採取に伴う安全性を primary endpoint とする

2) レシピエント

主要評価項目：第 I 相試験では、骨髄投与方法（骨髄内骨髄移植）の安全性を primary endpoint とする。第 II 相試験では、移植後 100 日の時点での急性 GVHD の頻度と重症度を primary endpoint とする。

対象(レシピエント)：難治性造血器腫瘍（詳細は別に規定）

治療計画：治療計画には、ドナーに対する「灌流法による骨髄採取」と、レシピエントに対する「骨髄内骨髄移植」の 2 つの要素が含まれる。

1) 骨髄採取法

- ① 全身麻酔下で両腸骨から灌流法で採取する。
- ② 2 本の骨髄穿刺針を腸骨に約 3-5cm の間隔で穿刺し、生理食塩液 30 ml を一方よりゆっくり注入し、同时对側から軽く吸引する。この時、採取側シリンジには、ヘパリン（10～30 U/ml とする）加生理食塩液を（約 0.5 ml）を含む。
- ③ 採取は、骨髄の有核細胞数 $2.0\sim 3.0 \times 10^8$ 個/kg 以上の細胞数を目標として行う。ただし、 1.0×10^8 /kg 以上の細胞数が確保できれば、骨髄内骨髄移植法による臨床試験を継続する（ 1.0×10^8 /kg の細胞数が確保できなかった場合は、本臨床試験からは脱落とし、従来の骨髄吸引法など他の方法を施行する）。

2) 移植前処置：Flu+BU+ATG, Flu+MEL+ATGなど

3) 骨髄投与法（骨髄内骨髄移植）

- ① ドナーから灌流法で採取された骨髄細胞は、バッグ遠心法により無菌的に血漿除去を行った後、約20～30mlの生理食塩水に再浮遊させる。
- ② 骨髄細胞を脛骨または腸骨の骨髄内に投与する。
 - 可能であれば、投与前にレシピエントの骨髄から約10ml～15mlの骨髄液を採取する（骨髄内への注入時の圧を減じるため）。
 - 骨髄細胞を半分ずつ2本のシリンジに分け、それぞれを左右の骨髄内に注入する。注入前には、ミダゾラム等による鎮静を行う。穿刺部に対しては、圧迫止血を行い注入した骨髄液が出血と共に漏れないように注意する。

4) GVHD予防

GVHD 予防法については、現在の HLA2-3 抗原不適合移植のものに準ずる（FK+mPSL1mg/kg）。

7. 新しい造血幹細胞移植技術（灌流法+骨髄内骨髄移植法）の有用性 — ウサギの haploidentical BMT の系を用いて —

関西医科大学病理学第一講座
池原 進

われわれは、これまでにマウス、ラット等の小動物を用いて、骨髄内骨髄移植法 (IBM-BMT) の有効性を明らかにしてきたが、ヒトへの応用を視野に入れて、カニクイザルを用いた大規模な研究も実施し骨髄細胞の採取法として灌流法 (Perfusion method: PM) を開発した。この PM を用いると、GvHD が予防できるだけでなく、ドナーの負担を軽減することが明らかになった。

今回、PM + IBM-BMT のヒトへの応用を目指して、haploidentical BMT の系でウサギを用いて、従来の方法との有効性を比較検討した。

<方法>

Conventional JW rabbit (RLA は不一致) を用いて、先ず、放射線量を決定した。ウサギは、放射線に感受性が高く、6Gy × 2 (one shot とすれば 8Gy に相当) を移植前日に 6 時間間隔で γ セル (^{137}Cs) を用いて照射した。予備実験で、従来の BMT の方法 [吸引法 (AM) + 静脈内骨髄移植 (IV-BMT)] では、GvHD のため、移植後 1 か月以内に全例が死亡したので、本実験では、haploidentical BMT (parent → F1) の系に IBM-BMT を用いて、AM と PM の有効性を比較した。骨髄細胞は、長管骨より、AM と PM を用いて採取した (ウサギはサルと同様で、腸骨の発達が悪いので、長管骨を用いた)。IBM-BMT には 2-5 ml の濃厚な骨髄細胞浮遊液を長管骨 (両側の大腿骨) へ注入した。移植細胞数は $1 \times 10^8/\text{kg}$ に統一した。