

第1回 移植後キメリズム解析研究会

近年、臍帯血移植やHLA半合致移植が増え、造血細胞移植の多くがHLAミスマッチで行なわれています。ドナーとレシピエントにそれぞれ特異的なHLAを抗HLA抗体で染色し、フローサイトメーターで解析するHLA-Flow法は、移植後の生着不全や再発の早期診断に有用です。本研究会は、キメリズム解析/HLA-Flow法を造血細胞移植や臓器移植後の様々な病態の診断やメカニズムの解明に役立てることを目指しています。

参加は無料で予約は不要です。みなさんの幅広い参加を歓迎します。

【開催日時】

平成21年12月25日(金)

10:00 - 12:40 講演会(東京大学医科学研究所1号館・講堂)

13:40 - 16:00 実技講習会(同・FACSコアラボラトリー)

— 講演会 —

司会: 高橋聡先生(附属病院・血液腫瘍内科)

田野崎隆二先生(国立がんセンター中央病院・幹細胞移植グループ 臨床検査部)

- 10:00-10:10** 開会挨拶
中内啓光先生(幹細胞治療研究センター)
- 10:10-10:40** 新規坑HLA抗体の作製と適用率の向上
山崎聡研究員(幹細胞治療研究センター・JST)
- 10:40-11:10** 原発性免疫不全症候群に対する臍帯血ミニ移植
森尾友宏先生(東京医科歯科大学・小児科)
- 11:10-11:40** HLA半合致移植-大阪/兵庫医大での現状と展望-
池亀和博先生(兵庫医科大学・血液内科)
- 11:40-12:10** 生体肝移植前後の免疫病態
高木章乃夫先生(岡山大学・消化器内科)
- 12:10-12:40** 臍帯血ミニ移植の免疫病態
松野直史先生(幹細胞治療研究センター・病態解析分野)

— 実技講習会 —

- 13:40-14:00** 抗体の組合せ方、染色法、解析法
渡辺信和(幹細胞治療研究センター・病態解析分野)
- 14:00-16:00** FACS AriaとCaliburによるキメリズム解析
石井有実子、菅原ゆうこ、松野直史;同

【問い合わせ先】

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター
病態解析分野 研究会事務局

Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750、E-mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp



新規抗 HLA 抗体の作製と適用率の向上

山崎 聡

科学技術振興機構 ERATO・中内幹細胞制御プロジェクト

HLA Allele 特異的モノクローナル抗体 (HASmAb) は、その作製が極めて困難であることが知られている。Allele 特異的 HLA 抗体の認識するエピトープは複数の離れたアミノ酸残基が集合して構成される特有の立体構造を有しており、その抗原性はマウス免疫系に認識される異種抗原エピトープと比較して相対的に低いことが原因と考えられる。近年、我々は迅速かつ効率的に HASmAb を作製する技術を開発したことを報告した (Yamazaki *et al.*, 2009)。我々の方法は一般的に知られている免疫方法とは異なり、Human-B51 HLA トランスジェニックマウスに HLA テトラマータンパク質を免疫することにより異種抗原エピトープに対する抗体の産生を抑制した。またハイブリドーマのスクリーニング方法としては、表面に HLA 分子を結合したビーズを用いることにより、HASmAb の迅速かつ効率的なスクリーニングを可能にした。この方法で作製された抗 HLA 抗体は、HLA allele の迅速診断や、HLA ミスマッチの造血細胞移植の患者におけるキメリズム解析を通じて、正着不全や白血病の再発の早期診断に役立つことが期待される。

原発性免疫不全症候群に対する臍帯血ミニ移植

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

造血幹細胞移植は、重症複合型免疫不全症(Severe combined immunodeficiency: SCID), ウィスコット・アルドリッチ症候群 (Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), X連鎖高IgM症候群(X-linked hyper-IgM syndrome: X-HIM)などの原発性免疫不全症の根治療法として用いられ、一定の成績を上げている。一方、慢性肉芽腫症(Chronic granulomatous disease: CGD)などその他の免疫不全症に対する成績は不満足なレベルに留まり、ここ5-10年の間に大きな進歩を認めていない。近年、造血細胞移植後の長期予後を考慮して、これらの疾患に対しては骨髄非破壊的前処置が用いられはじめ、疾患によっては良好な成績を上げている。また乳幼児が多いこと、緊急治療として移植が選択されることがあること、悪性腫瘍などと異なり宿主に対する免疫反応は最小限で良いことなどから、臍帯血移植が選択される症例も多くなっている。これらの観点から、厚生労働省難治性疾患克服事業・原発性免疫不全症調査研究班では、各疾患に対して推奨プロトコル案を策定しており、SCIDに対しては臍帯血ミニ移植の臨床研究が開始されようとしている。

ここでは日本の原発性免疫不全症候群に対する臍帯血移植成績、SCIDに対する臍帯血ミニ移植の自験例を提示し、原発性免疫不全症候群に対する臍帯血ミニ移植の問題点と今後の展望について討論したいと考えている。

HLA 半合致移植の現状 ～大阪/兵庫医大での現状と展望～

兵庫医科大学 血液内科

池亀和博、藤岡龍哉

臍帯血幹細胞や血縁 HLA 半合致ドナーといった **alternative donor** からの移植は、HLA 不適合移植として捉えることができる。当科（兵庫医科大学 血液内科）では、HLA 半合致移植と臍帯血移植を中心としたハイリスク移植を、臨床および研究のテーマとしている。HLA 半合致移植は、前処置の強さにより、骨髄破壊的 HLA 半合致移植 (**haplo-full**) と、HLA 半合致ミニ移植 (**haplo-mini**) との 2 つがあり、全く違った移植としての様相を呈する。**haplo-full** は御し難い竜神のごとく、その勢いは良くも悪くも激烈であり、それだけに **full blast leukemia** や **terminal lymphoma** でも、起死回生のチャンスをもたらす。一方 **haplo-mini** は安全性を第一とし、頻回移植 (≥3 回) を可能にした。現在は移植後再発や非寛解例を主な対象としているが、寛解期に **haplo-mini** を行えば、他の移植種と同等の成績が得られている。HLA 半合致移植において、一般的に危惧されている生着や GVHD の頻度は、HLA 適合移植のそれとかわらない。また欧米で行われている T 細胞除去の HLA 半合致移植と対比し、本邦で行われている T 細胞を除去しない (**unmanipulated**) HLA 半合致移植では、**lymphoid** 系を含めた種々の造血器腫瘍に対して有効性を示す。

ハイリスク移植を行っていく中で、従来 HLA 適合移植では想定しなかったような臨床的問題に直面することが多々ある。当科においては、**lab. team** を充実させ、臨床検体を用いた様々な解析を自前で行えるよう努力している。本会ではそのいくつかをご紹介します、諸先生方のご意見をいただくことを通して、我々のチームの雰囲気をお伝えできればと思う。

生体肝移植前後の免疫病態

岡山大学消化器内科¹⁾, 肝胆膵外科²⁾

高木章乃夫¹⁾, 八木孝仁²⁾, 内海方嗣²⁾, 岩崎良章¹⁾, 貞森裕²⁾, 小池和子¹⁾, 榎田祐三²⁾,
松田浩明²⁾, 白羽英則¹⁾, 小橋春彦¹⁾, 山本和秀¹⁾

【背景】生体部分肝移植術は、死体肝移植症例がなかなか増えない我が国において、広く行われている。現在までのところ、死体肝移植と比べて、移植後の生存率は大差ないという報告が多いが、最近、全国で最多の移植を行っている京都大学より、原発性硬化性胆管炎においては生体肝移植術後の10年グラフト生存率は39.7%と低く、特に親子間での移植後の再発率が高いことが報告されている (Egawa H. et al.2009)。また、現在肝硬変及び肝移植適応疾患として最多症例となっているC型肝炎ウイルス (HCV) 関連肝疾患に対する肝移植後、ほぼ100%の症例でウイルスが再感染し、生体肝移植後に高率に発症する胆管合併症が併発した症例においてしばしば早期かつ重篤なC型肝炎再燃が生ずることが指摘されている。C型肝炎の病態はウイルス感染細胞に対する免疫応答であると考えられており、移植後においては、免疫抑制剤・キメリズムが病態に関与することが推測される。我々は、特に移植後C型肝炎患者において、ウイルス特異的な免疫応答の推移を観察し、これに対するキメリズムの関与を明らかにしようとしている。本日の発表では、生体肝移植に関する総論と当院で施行した成人生体部分肝移植症例のうち、C型肝炎硬変症例を対象とした、肝移植後の肝病態の再発像とHCV抗原特異的なT細胞応答の術前・術後の変化について報告する。**【対象および方法】**当院において成人生体部分肝移植を施行したHCV関連肝疾患40例のうち10例においてHCV抗原特異的なT細胞応答を検討した。10例の内訳は①移植後1年以上持続トランスアミナーゼ正常でインターフェロン未使用例が4例、②インターフェロン治療を行った症例が3例、③現在インターフェロン治療中の症例が3例である。術前、術一カ月後、1-2年後に採血を行い、単核球よりCD4陽性細胞、CD14陽性細胞を分離し、CD4陽性細胞は凍結保存した。CD14陽性細胞はGM-CSF,IL4添加メディアウムで5日間培養を行い未熟樹状細胞を樹立した。これにHCVリコンビナント抗原 (Core,NS3,NS4,NS5A,NS5B) を加え、1日培養後、LPSにて成熟刺激を与え、更に1日培養後CD4陽性細胞と抗原による刺激を加え、インターフェロン γ 産生をELISPOTアッセイにて検討した。**【結果】**、全例で術前にはスポット数は低値であった。①のうち3例で2年後にスポット数の増加を認めた。②のうち2例でインターフェロン開始後トランスアミナーゼの低下、終了後スポット数の増加を認めた。②と③いずれもインターフェロン開始前にはスポット数は低値であった。**【結論】**HCV抗原特異的なT細胞応答は生体肝移植後において肝炎活動性が低い状態では強力であることが示された。

臍帯血ミニ移植後早期のリンパ球生着動態の研究

松野直史、渡辺信和

東大医科研 幹細胞治療研究センター・病態解析分野

山本久史、谷口修一

虎の門病院 血液内科

臍帯血の特徴の1つは、リンパ球の未熟性、すなわちTリンパ球のほとんどはナイーブ細胞であることにある。このことは、graft-versus-host (GVH) 反応が軽度である理由の一つと考えられるが、骨髄非破壊的移植法においては残存するレシピエント免疫担当細胞による拒絶の原因ともなりうる。一方で、GVHD 予防を軽減した移植法においては、しばしば生着前早期 (day 9 頃) に発熱、皮疹、下痢等の高サイトカイン血症に起因すると考えられる症状が認められ、臍帯血移植特有のアロ免疫反応の存在が示唆されている。これまで臍帯血移植後中後期 (1ヶ月~1年) の免疫再構築に関する報告は散見されるが、移植後早期 (生着までの1ヶ月以内) のリンパ球動態については未だ明らかにされていない。そこで、東大医科研病態解析分野と虎の門病院血液内科との共同研究で、臍帯血ミニ移植後早期におけるリンパ球動態を詳細に検討し、生着不全や急性GVHD等の臨床病態との関連を明らかにすることを目指している。

本研究は、虎の門病院のIRBの承認を得ており、平成21年11月より虎の門病院における臍帯血移植症例の研究登録が始まっている。臍帯血移植後1, 2, 3, 4, および8週目の末梢血検体をマルチカラーフローサイトメトリーで解析する。混合キメリズム解析 (HLA-Flow法) が可能なドナー・レシピエントHLAの組み合わせで行われる移植については、9カラーFACS解析システムにより、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、B細胞、NK細胞および単球の各分画における混合キメリズム検査を行う。T細胞のナイーブ・メモリーフェノタイプは、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞について、それぞれCD45RAとCD62L (あるいはCCR7) の組み合わせで解析する。また制御性T細胞 (Treg) に発現する細胞内Foxp3の解析を行う。これらの解析結果をもとに、臍帯血移植後のリンパ球動態と生着不全やGVHD等の病態との関わりを明らかにする。移植後早期の免疫病態がその後の免疫再構築に与える影響を明らかにする目的で、造血幹細胞移植後に高頻度に合併するサイトメガロウイルス (CMV) 感染症に対する特異的T細胞の獲得について、テトラマー解析を行う。

本研究会では、虎の門病院における臍帯血移植のレビュー、研究計画内容ならびに一部の解析結果について発表する。

