

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	小川誠司
愛知医科大学	小寺良尚
愛知県がんセンター	森島榮雄・赤塚英樹
九州大学	山本優
東海大学	猪子英俊
名古屋第一赤十字病院	宮村耕一
日本赤十字東京血液センター	佐竹 正博・柏瀬 真一
日本科学技術推進財団	戦略的創薬研究推進事業(CREST)

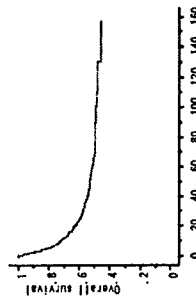
Analysis Overview

- 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

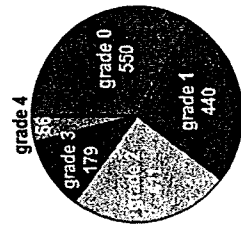
Demographic Features (genotyped cases)

Sex	Male	Female
All	963	569
Age		
<10	214	
10%	235	
20%	284	
30%	312	
40%	329	
50%	158	
>60	20	
Disease		
ALL	370	
AHL	400	
CHL	287	
MDS	164	
HO/NHL	178	
SAA	87	
MH	26	
others	50	
Conditioning Regime		
non-TBI based	372	
TBI100y	154	
TBI<100y	1008	
GVHD prophylaxis		
CyA+MTX	985	
FK506+MTX	535	
rejection		
*	37	
-	1431	
unknown	64	

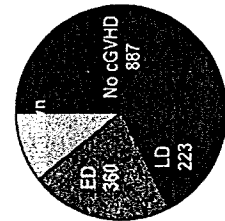
Overall survival



Relapse free survival



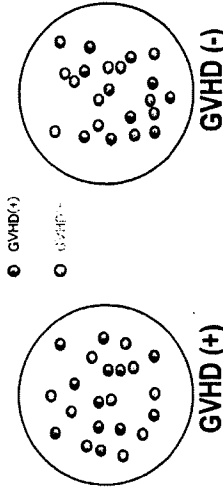
aGVHD



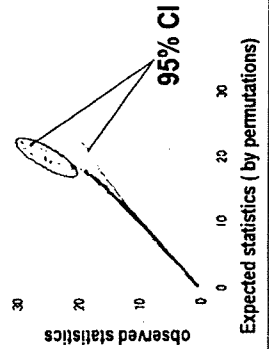
cGVHD

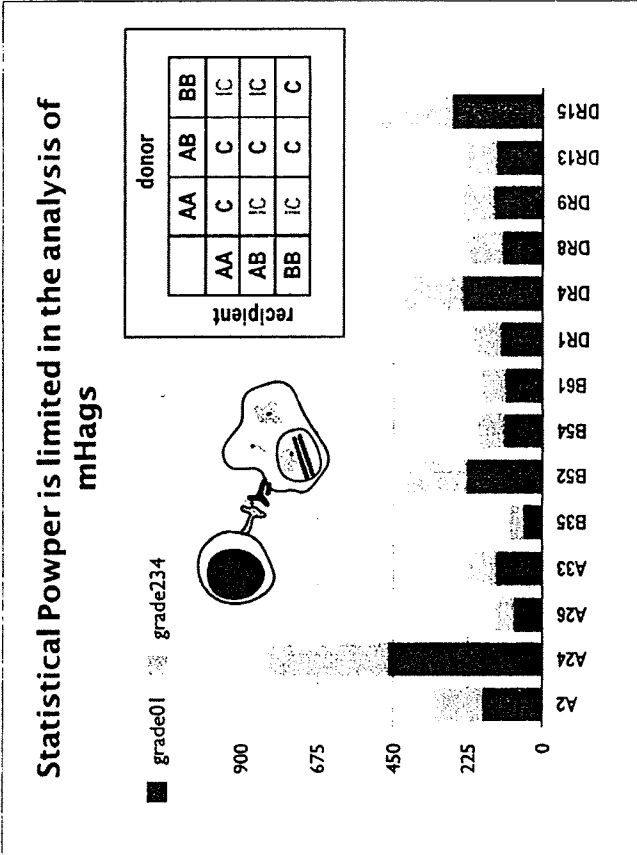
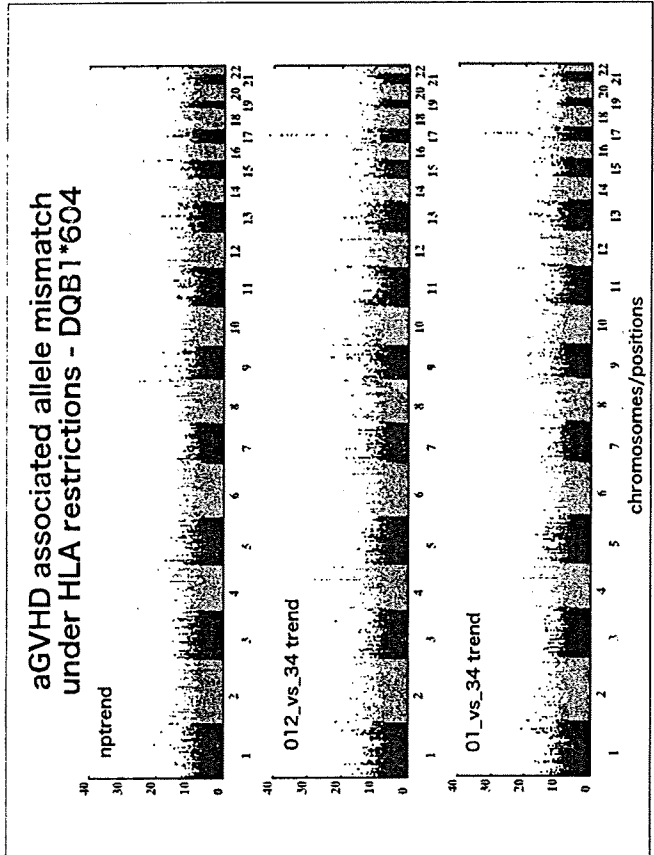
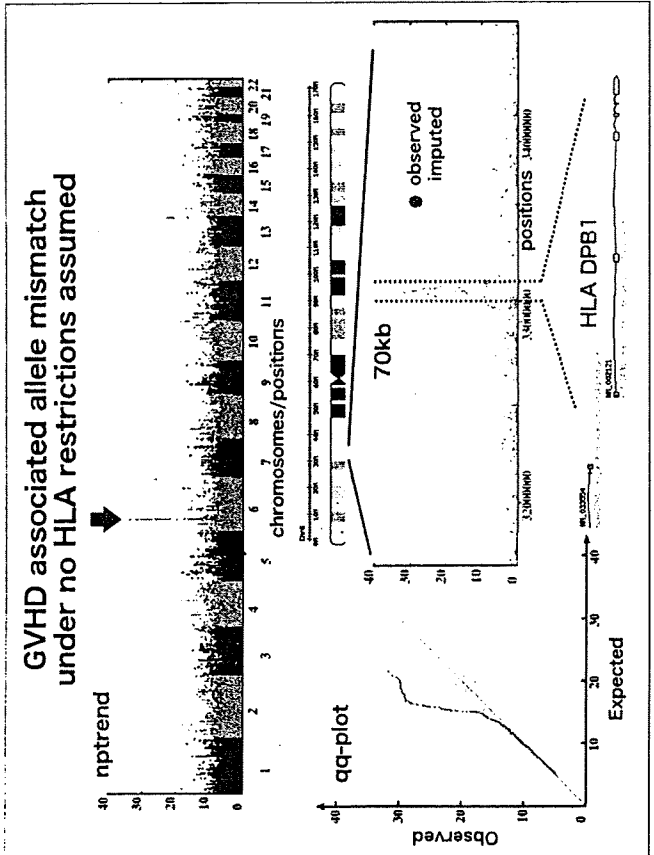
Evaluation of multiple hypothesis testing

Permutation test



Q-Q plots





Summary

- ⊙ Using a large JMDP 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

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)

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 grade3-4 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、grade2-4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
 柏瀬貢一 屋部登志雄

1

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 川瀬孝和、松尾寛太郎、森島泰雄)
 KIR, LILR遺伝子型とリガンドHLA抗原型の組み合わせと移植成績
2. サイトカインと受容体遺伝子多型
 (共同研究者:東海大学 丸塚真仁 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 森島泰雄)
 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

2

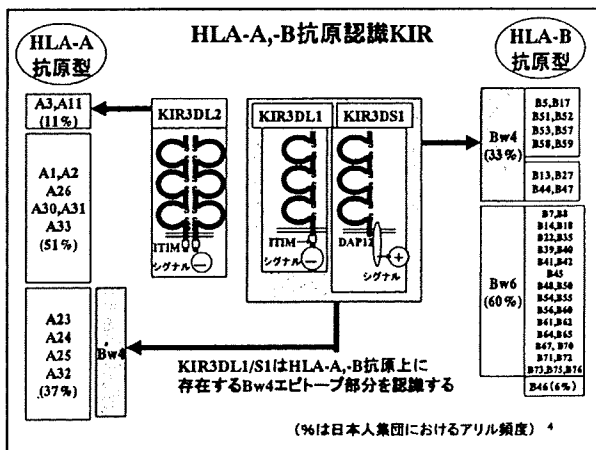
1. NK受容体とリガンド遺伝子型適合性
 昨年度までの解析

HLA-C抗原(C1, C2)認識 KIR 2DL, 2DS
 ・C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II抗原認識) LILRB2, LILRA3, LILRB1
 NKG2(HLA-E抗原, MIC, ULBP認識) NKG2A, C, D

3



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(シアトルグループ、佐治ら)

昨年度までのJMDP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

5

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

6

「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-アンジオテンシン-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

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

position	nucleic acid	Japanese n=109	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	cdn 52	cdn 54	cdn 57	-619	-290	-66	cdn 52	cdn 54	cdn 57	Japanese		Caucasian	
	C/G	C/G	C/T	C/T	G/A	G/A	H/L	Y/X	P/Q	A/D	A/B	A/C	N=57		N=49	
High-producer	C	G	T	C	G	G	L	Y	Q	A	A	A	0.079	0.483	0.163	0.449
	G	G	C	C	G	G	H	Y	P	A	A	A	0.404		0.286	
Intermediate	C	G	C	C	G	G	L	Y	P	A	A	A	0.132	0.132	0.000	0.000
Low-producer	C	C	C	C	G	G	L	X	P	A	A	A	0.105	0.105	0.265	0.265
?	C	G	C	T	G	G	L	Y	P	D	A	A	0.000	0.000	0.010	0.010
Deficiency	C	G	C	C	A	G	L	Y	P	A	A	A	0.263	0.263	0.133	0.255
	C	G	T	C	G	A	L	Y	Q	A	A	C	0.000		0.020	
	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 Granell 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 Mulighan 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 Mulighan 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病棟)
 - 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。

平成20年度厚生労働科学研究(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)
平成21年1月17日(東京)

成人末梢血及び臍帯血より 培養したT細胞の性状解析

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
梶原道子、森尾友宏

