

平成22年度第1回造血幹細胞移植合同班会議(愛知県がんセンター)

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

「造血幹細胞移植の有効性と安全性向上のための薬剤のエビデンスの確立に関する研究」(橋田班)

造血幹細胞移植関連合併症を軽減させるための栄養管理に関する研究

分担研究者 金 成元

独立行政法人国立がん研究センター中央病院
血液腫瘍科・造血幹細胞移植科
skim@ncc.go.jp

Nutritional Management in HSCT

前向き臨床試験の概要

NST 01	脂肪乳剤	ランダム化 第II相	骨髄破壊的 同種移植	進行中 61/80
NST 02	Synbiotics (BioR® + GFO®)	ランダム化 第II相	自家移植	進行中 24/76
NST 03	IRI Cペプチド	モニタリング (NCCH)	幹細胞移植 全般	終了 92
NST 04	低分子ペプチド (ペプチーノ®)	ランダム化 第II相	非血縁者間 ミニ移植	IRB 承認

Nutritional Management in HSCT

NST01の背景

1. 当院での検討では、血糖80-110mg/dLに納める管理は感染症を減少させた(Transplantation 2007, Bone Marrow Transplant 2009)
⇒多施設共同にて前向きに検証する
(主要評価項目: day 100までの感染症発症割合)
2. 日本では脂肪乳剤がほとんど使われてこなかった(静脈経腸栄養 2008)。
脂肪乳剤を用いると血糖管理が容易になる。
⇒脂肪乳剤を用いることの妥当性について、多施設共同にて前向きに検証する

Nutritional Management in HSCT

同種造血幹細胞移植の適応となる造血器疾患患者
骨髄破壊的前処置を施行可能
18歳以上60歳以下、PS 0または1

脂肪乳剤投与の有無のランダム割付
疾患リスク、施設、年齢、TBIの有無

A群: 血糖厳格管理
+
脂肪乳剤非投与群

B群: 血糖厳格管理
+
脂肪乳剤投与群

Nutritional Management in HSCT

NST01の進捗状況

- ✓登録症例数61例(2007/8/13~2010/6/24現在)
- ✓目標症例数80例→2011年上半期中に完遂
- ✓登録可能施設:
国立がん研究センター中央病院
大阪市立大学
横浜市立大学
東北大学
- ✓現時点で、脂肪乳剤使用および低血糖に関連した重篤な有害事象の報告なし
- ✓参加施設を募集しています。ご連絡ください。

Nutritional Management in HSCT

NST01完遂を見込んで

- ✓APBMTにNutrition Working Groupを設立(2010年6月)
- ✓APBMT参加国・地域の施設に対し、栄養管理を含めた造血幹細胞移植時のpracticeのアンケート調査を実施中(2010年6月~7月)
- ✓APBMT参加国・地域における同種移植患者に対する血糖管理に関する臨床第II相試験(案: 空腹時血糖80~110mg/dL vs それ以外)の実施を検討中(2012年からの実施を想定)

Nutritional Management in HSCT

NST02の目的

○グルタミンを用いることで大量化学療法時の消化管毒性が軽減されると報告されている。しかし、その有効性、投与量、投与方法は報告により様々。

○耐性乳酸菌の使用については、大量化学療法時の報告はない。グルタミンとの相乗効果が期待される。

↓
Synbioticsの有効性と安全性を評価する。

○主要評価項目: day 21までのG3以上の消化管毒性

○副次的評価項目: DAO活性、等

Nutritional Management in HSCT

自家造血幹細胞移植の適応となる
悪性リンパ腫もしくは多発性骨髄腫
18歳以上65歳以下、ECOG PS 0または1

↓
synbiotics投与の有無のランダム割付
施設、年齢、疾患、
頸部・腹腔を含む放射線治療の有無

↓
A群: synbiotics非投与群

↓
B群: synbiotics投与群

Nutritional Management in HSCT

NST02の進捗状況

✓登録症例数24例(2008/11/28~2010/6/24現在)

✓目標症例数76例→本年中に研究期間延長申請

✓登録可能施設:

国立がん研究センター中央病院

愛媛県立中央病院

熊本医療センター

虎の門病院

✓現時点で、GFO®およびビオフェルミン®投与による重篤な有害事象の報告なし

✓参加施設を募集しています。ご連絡ください。

Nutritional Management in HSCT

骨髄非破壊的前処置を用いた
非血縁同種造血幹細胞移植の適応となる
造血器悪性疾患
18歳以上70歳以下、ECOG PS 0または1

↓
低分子ペプチド投与の有無のランダム割付
施設、前処置(Bu vs Mel)、
幹細胞源(骨髄 vs 末梢血幹細胞 vs 臍帯血)、
大量化学療法歴の有無

↓
A群: 低分子ペプチド
非投与群

↓
B群: 低分子ペプチド
投与群

Nutritional Management in HSCT

NST04の概要

✓目標症例数76例

✓登録期間2年。2010年7月から登録開始予定。

✓主要評価項目: day 28までのG3以上の消化管毒性

✓副次的評価項目: DAO活性、等

✓参加表明施設:

国立がん研究センター中央病院

虎の門病院

昭和大学

神戸大学

熊本医療センター

✓参加施設を募集しています。ご連絡ください。

Nutritional Management in HSCT

論文進捗状況

移植後消化管毒性評価におけるDAO活性およびGLP-2の後方視的検討

→共著者による校正中

造血幹細胞移植後のLeptinの変化の後方視的検討

→共著者による校正中

造血幹細胞移植後のインスリン分泌・インスリン抵抗性変化についての前方視的モニタリング研究(NST03)

→CRF回収中

Nutritional Management in HSCT

2010年7月3日合同班会議

阪和地区における造血幹細胞移植時の 栄養及び微量元素に関するアンケート

大阪大学医学部附属病院血液腫瘍内科

松井 敬子

Wuerzburg大学

藤 重夫

和歌山県立医科大学 畑中 一生

阪和血液病カンファレンス

背景

造血幹細胞移植においては重度の消化管障害により、中心静脈栄養を選択することが多い。その際、必須微量元素の補充も行っている。また、一方で、その過剰・欠乏が様々な症状や検査結果異常を引き起こしている可能性を見逃していることも考えうる。しかし、その投与時期や投与量に、基準がなく各施設や主治医に委ねられているのが現状である。また、栄養経路も通常は経口摂取不可の場合の第一選択は経腸栄養であるが、血液分野においては、必ずしもそうではない。栄養全般、特に微量元素に関する現状を把握するため、阪和血液病カンファレンスのメンバーリストに参加する医師を対象にアンケート調査を行った。

進行状況と展望

阪和血液病カンファレンスに参加する医師を対象に15施設26人から回答を得た。

集計結果については、今後、全国調査が可能な場合に、バイアスとならないよう、現時点での公表は控えるが、全国調査により、さらなる現状の把握が可能と思われる。

微量元素に関しては、ここ数年間の変化を調査したいと考える。

今後の計画

阪和地区で得られたアンケート結果を全国の移植施設を対象に行い、既に行った当地区との結果を比較検討する。


その内容を吟味し、造血幹細胞移植における微量元素を含んだ栄養管理に関するガイドラインの作成につなげることが出来るよう結果をまとめる。

**同種造血幹細胞移植後のSOSに対する
治療・予後:全国調査案**

神戸大学医学部附属病院 腫瘍・血液内科
薬師神公和
国立がん研究センター中央病院 幹細胞移植科
福田隆浩

日本でデフィブロタイドを使うためには..

- ✓ Gentiumとパートナーになる会社を探索 (現在進行中)
- ✓ 本邦における現在までのDFの使用状況ならびにその効果についての全国調査 (現在準備中)
- ✓ 承認に向けての臨床試験の推進 (現在検討中)



目的と対象

目的
未だ確立した治療法のないSOSに対する治療薬(あるいは予防薬)としてのデフィブロタイドの本邦での使用経験の実態調査を行い、それらが安全かつ有効であるかを検討する。

対象
1999年1月から2009年12月の期間に、造血幹細胞移植を行い、類洞閉塞症候群の治療(あるいは予防)としてデフィブロタイドを使用した16歳以上70歳以下の患者

評価項目

主要評価項目

- 1)デフィブロタイド予防投与による類洞閉塞症候群の発症率
- 2)類洞閉塞症候群の治療薬としてデフィブロタイドの治療効果(寛解率)

副次的評価項目


- 1)デフィブロタイドに起因する有害事象
- 2)全生存率
- 3)急性移植片対宿主病の発症割合
- 4)血栓性微小血管障害の発症割合

本調査の意義

- 現在、SOSに対する有効な治療法、予防法は確立していないが、少なくともデフィブロタイドは欧米での報告を受けて、注目されている。
- 本研究は、全国調査にて現在までの使用状況や有効性、安全性を評価し、今後、日本でもデフィブロタイドを保険承認申請する場合に必要な礎になるデータとなる。

課題

- 班研究ベースではなく、JSHCTのWGとして学会登録データを用いて調査を行う。
<利点>
◆ SOS合併例を幅広く調査することが可能。
◆ DFを用いない場合(対照群)の治療法・予後と比較が可能となる
- デフィブロタイド以外の、遺伝子組み換えトロンボモジュリン(リコモジュリン®)による治療例についても調査を行う。
<利点>
◆ SOS合併例の調査を一括して行うことが可能。
◆ 各治療法ごとの予後の比較が可能となる。



小児急性白血病に対する RIST の成績

大阪府立母子保健総合医療センター血液・腫瘍科

井上雅美、河 敬世

はじめに

小児に対する従来型の骨髄破壊的移植においては、移植後成長障害や不妊に代表される晩期合併症の頻度が非常に高い。小児の移植後 QOL を損なわないためには、このような晩期合併症を回避する移植法の開発が急務である。Reduced intensity stem cell transplantation (RIST) は、高齢者や合併症を有するため従来型移植の適応にならない成人を対象とする移植法として開発されたが、小児の移植後 QOL を損なわない移植法としても期待される。大阪府立母子保健総合医療センターにおける小児急性白血病を対象とする RIST の成績を検討した。

対象と方法

2001 年から 2008 年の期間、大阪府立母子保健総合医療センターで RIST を行った小児急性白血病症例は 37 例であった。移植時年齢の中央値は 7 歳 (1 歳—19 歳) で、AML は 14 例 (CR1: 10 例、CR1 以外: 4 例)、ALL は 23 例 (CR1: 9 例、CR1 以外: 14 例、Ph1-ALL: 5 例) であった。37 例中 10 例は移植後再発症例であった。移植前処置の基本骨格は Flu 180mg/m² and LPAM 140 mg/m² で、症例によっては若干の工夫を加えた。移植細胞ソースはまちまちで、HLA 一致同胞間移植は 5 例であり、32 例は alternative donor からの移植であった。GVHD 予防法は基本的に従来型移植を同じ方法を用いた。

結果

37 例中 35 例 (94.7%) に生着を確認した。移植後 100 日以内の移植関連死亡は 3 例 (8.1%) であった。急性 GVHD grade II-IV を 21/35 (60.0%)、grade III-IV を 10/35 (28.6%) に認めた。慢性 GVHD の頻度は 14/28 (50%) であった。37 例中 21 例 (56.8%) が RIST 後中央値 47 ヶ月 (15-94 ヶ月) 生存中である。AML14 例の 7 例 (50%) が生存 (CR1: 5/10=50%、CR1 以外: 2/4=50%) しており、ALL23 例中 14 例 (60.9%) が生存 (CR1: 7/9=77.8%、CR1 以外: 7/14=50.0%) している。

考察

今回の成績から、小児急性白血病に対する RIST は、安全を確保しながら骨髄破壊的移植と同等の成績を期待できることが示唆された。さらなる成績の向上には、MRD が残存する CR1 症例を対象に、初期治療から計画的に RIST を行う必要があると考えられる。

追補

わが国で小児に処方される医薬品の半数以上は適応外使用である。移植医療において用いられる薬剤においても同様で、例えば、フルダラ、エンドキサンの添付文書には「小児に対する安全

性は確立していない」と記述されている。小児に対する移植医療が健全なものであるためには、現状を踏まえて適応外使用薬品が正当に評価されることが求められている。

7月3日(土)

午後

大会議室

7月3日（土）

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：基礎から臨床へ（H22-免疫-一般-009）
研究代表者 池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

14:00-14:15(討論含む)

1. 「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」第Ⅰ相試験実施に向けての問題点

吉原 哲、小川啓恭（兵庫医科大学 内科学講座 血液内科）

森 眞一郎、野村昌作（関西医科大学 内科学第一講座 血液内科）

池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

14:15-14:30(討論含む)

2. 骨髄内臍帯血移植の現状と問題点

村田 誠（名古屋大学医学部附属病院血液内科）

14:30-14:45(討論含む)

3. 移植後肺障害に関するマウスモデルを用いた造血幹細胞の静脈内と骨髄内輸注法の比較
品川克至、前田嘉信（岡山大学）

14:45-15:00(討論含む)

4. 骨髄内造血細胞移植における免疫モニタリング

森尾友宏（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）

15:00-15:15(討論含む)

5. 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）

15:15-15:30(討論含む)

6. HLA 一致同種移植後の抗腫瘍免疫反応の解析

赤塚美樹^{1,2}、山村武史²（¹藤田保健衛生大学血液内科、²愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部）

15:30-15:45(討論含む)

7. 間葉系幹細胞における HLA-G 分子の発現に関する検討

一戸辰夫（京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科）

15:45-16:00(討論含む)

8. ヒト灌流法のマニュアル

中村修二¹、森 眞一郎²、池原 進¹（¹関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学、²同 附属枚方病院 血液呼吸器膠原病内科）

「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」

第 I 相試験実施に向けての問題点

兵庫医科大学 血液内科 吉原 哲、小川 啓恭

関西医科大学 第一内科 森 眞一郎、野村 昌作

関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学 池原 進

「灌流法による骨髄採取+骨髄内骨髄移植」臨床試験については、兵庫医科大学、関西医科大学の倫理委員会においてすでに承認されており、現在、実施に向けて最終的な準備に入っている。

一例目については、HLA 不適合移植血縁者間で行うこととし、採取を関西医科大学、移植を兵庫医科大学で行う予定である。二例目以降は、その他の参加施設を含めて実施する。ただし、灌流法による採取は、従来の吸引法とは全く違った方法であるため、予め手技を充分習得してから実施する。

実施する上での practical な問題点としては、灌流法により、十分な細胞数が得られるかどうか危惧されるが、そのため、第 I 相については、なるべく患者体重が軽く、ドナーの体格が大きい症例を選択する、などの工夫が必要と考えている。

下記に灌流法による骨髄採取、骨髄内骨髄移植の方法についてプロトコルより抜粋する。

➤ 骨髄細胞採取法（灌流法）

- 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30mlを一方より、ゆっくり注入し、同時に対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(約0.5 ml)を含む。
- ③ 採取は、骨髄の有核細胞数 (Nucleic cell count, NCC) $2.0\sim 3.0\times 10^8$ 個/kg (レシピエント体重あたり)以上の細胞数を目標として行う。ただし、 1.0×10^8 /kg (レシピエント体重あたり)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)。

➤ 骨髄細胞投与方法（骨髄内骨髄移植法）

- 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20ml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。
- ③ 脛骨へ投与する場合は、投与前にレシピエントの骨髄から約10ml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)。
- ④ 骨髄細胞浮遊液(約20ml)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(およそ5分程度)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。

本臨床試験に参加希望の施設は、yoshihar@hyo-med.ac.jp まで連絡ください。

「骨髄内臍帯血移植の現状と問題点」

分担研究者：村田 誠（名古屋大学医学部附属病院血液内科）

骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植における生着率向上を目指し、同種造血幹細胞移植の適応でありながら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を対象として、骨髄内臍帯血移植の臨床試験を実施している。

本試験のデザインは臨床第 II 相試験、主要評価項目は移植後 60 日時点での生着かつ生存、予定登録数は 22 例で、登録期間は 4 年、追跡期間は最終症例の移植後 1 年。

これまでに 5 例実施した。骨髄内輸注に伴う重篤な有害事象は発生していないが、1 例で至急報告義務のある有害事象（生着不全）を認めた。登録症例数を増やすべく、多施設共同研究への拡大を計画している。

今回は特に、厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」との関係について考察したい。

移植後肺障害に関するマウスモデルを用い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

【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る肺胞障害により発症する予後不良な肺合併症である。原因として肺への放射線照射の影響や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。マウスモデルでは intra-BMT では iv-BMT よりも GVHD が抑制されることが報告されているが、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、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】

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。移植後に体重、GVHD スコアおよび生命予後を評価、また移植後 6 週間後に気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage (BAL)を行い、回収液中の細胞を解析した。また、肺組織の病理所見を検討した。(図1) さらに donor マウスに FVB/N lac+, レシピエントに BALB/c を用いた系で、IVIS imaging system により移植後輸注細胞の体内分布の時間的、場所的推移に関して iv-BMT と intra-BMT で比較検討した。

【結果】

このモデルでは、intra-BMT で in-BMT に比べて、移植後の体重減少は少ない傾向にあり、また GVHD スコアが低かった。これらの因子が移植後の全身状態に有利に作用したと考えられ、結果として生存率が高かった。また移植 6 週後の BAL による解析では、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。さらに IVIS imaging system による輸注された移植細胞の体内動態解析では、Intra-BMT では iv-BMT に比し移植後早期では輸注された移植細胞の肺へのトラップが軽減されていた。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 を用いてさらに詳細に iv-BMT との比較検討をおこなう予定である。

骨髄内造血細胞移植における免疫モニタリング

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 森尾友宏

骨髄内造血細胞移植後の自然免疫・獲得免疫における免疫学的再構築過程のモニタリングがその有用性の評価に、特異的免疫能の増強手段が治療効果のさらなる増強に重要と考えられる。

造血細胞移植後の免疫学的モニタリングでは、白血球数・リンパ球数、免疫グロブリン値に加えて、リンパ球増殖能やリンパ球表面抗原分析などが一般的な検査項目であるが、新規治療法である IBM-BMT においては、その他の移植との厳密な比較検討が望まれる。

B 細胞の骨髄からの新生能については、Signal joint Kappa deleting recombination circles (sjKRECs)が、B 細胞数全体の指標としては、coding joint KRECs (cjKRECs)が有用であり、また胸腺からの T 細胞新生能については、T cell receptor excision circles (TRECs) が良い指標となる。

間葉系幹細胞・ストローマ細胞が加えられた状態での plasmacytoid DC の数及び type I IFN 産生能、myeloid DC の数と IL-12 などの産生能、IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-22, TGF- β , IL-10 などを産生するヘルパー T 細胞サブセット、ウイルス特異的 T 細胞などの解析も重要な情報を提供する。

さらに移植後の感染症や腫瘍再発に対しては、免疫学的再構築全体を促進する方策、特異的免疫能を促進する方策は共に利用価値があると予想される。間葉系幹細胞存在下における免疫細胞療法では、通常の造血細胞移植における免疫細胞療法と用いるべき細胞や有害事象に差がある可能性があり、標的とする抗原に対する特異的免疫機能のモニタリングとあわせ、詳細な検討が必要である。

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がある。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。我々はウイルス既感染の健常人ドナーより CMV, EBV 特異的 CTL の体外増幅法を開発し臨床第1相試験を行っている。難治性ウイルス感染が起きてからの培養では1ヶ月程度の時間を要するため、HLAハプロ一致移植などハイリスクの症例においてウイルス感染前に培養し凍結保存しておくことも可能とした。【方法】HLA-A2 または A24 陽性健常人の末梢血 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 陽性細胞の濃度により、投与基準を満たしたものを凍結保存し、培養上性中のウイルス、細菌の感染がないことを確認する。【結果】本研究に登録された造血細胞移植の HLA-A2 または A24 陽性ドナー末梢血 30mlよりサイトメガロウイルス (CMV)、EB ウイルス (EBV) に対する CTL を誘導した。培養は CMV が 6 名、EBV が 10 名で行い、それぞれ4名、4名で初回投与基準を満たす細胞数の増殖が得られた。うち培養上清中に含まれるウイルス検査の基準も満たしたのは、3名、2名であった。GCV 耐性 CMV 感染を起こした患者2名に対し CMV-CTL の投与を行った。いずれも投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、他に重篤な合併症も認めなかった。1名の患者で投与後 CMV-DNA の低下、消失を認めた。【結論】ウイルス特異的 CTL による臨床第一相試験を実施し、重篤な副作用は見られていない。臨床スケールにおける培養効率のさらなる改善が必要である。今後移植前処置に抗胸腺グロブリンの使用例が増加すると考えられ、EBV-LPD の発生、さらにリツキサン抵抗性の CD20 陰性 EBV-LPD が起こりうる。海外ではウイルス特異的 CTL 療法が行われており EBV 特異的 CTL をあらかじめ培養凍結しておく CTL バンクの有用性も報告されている。わが国においてもウイルス特異的 CTL バンクを含めた細胞療法の整備が必要である。

「HLA 一致同種移植後の抗腫瘍免疫反応の解析」

赤塚美樹^{1,2}、山村武史²

(¹ 藤田保健衛生大学血液内科、² 愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)

1. 同種移植後に誘導される抗腫瘍免疫エフェクター成分の検討

【研究目的】

同種造血細胞移植は白血病等の血液悪性腫瘍に対する有望な治療法であるが、HLA 一致同胞や、不一致血縁・非血縁者、臍帯血など多様なドナーが存在するため抗腫瘍 (GVL) 効果や移植片対宿主病 (GVHD) の標的となっている抗原も多様と推定されている。HLA 一致同胞の場合はマイナー組織適合抗原と腫瘍関連抗原 (TAA) が主要な標的と考えられるが、HLA 不一致の場合、不適合 HLA とマイナー組織適合抗原、TAA がそれぞれどの程度関与しているかを包括的に検討した研究はない。本研究では、こうした多様な抗原に対する免疫反応の成分を経時的に解析することを目標とする。また、骨髄内移植症例から採血が可能な場合には、同様に解析を行い移植後免疫反応パターンに特徴があるかどうか検討したい。

【方法】

①移植後経時的に収集された末梢血単核球細胞から精製した CD8 陽性 T 細胞を反応細胞として、また移植前の患者末梢血単核球またはドナー活性化 B 細胞ないしは K562 にこれまでに報告された主な腫瘍抗原エピトープ部分を遺伝子導入したものを抗原提示細胞として用い、限界希釈法にて細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の前駆体頻度を測定する。

②限界希釈法で細胞傷害活性を示した培養細胞から CTL クローンを樹立し、この特異性 (マイナー抗原または腫瘍抗原) を検討し、臨床的意義の高いものについては標的抗原分子を同定する。

③HLA 不適合移植の場合は大部分が不適合 HLA への免疫反応と考えられるので、必要に応じて HLA 欠損 721.221B 細胞株もしくはドナー-B-LCL に不適合 HLA 遺伝子を導入したものを細胞傷害性試験の標的とし、免疫反応のどの程度が不適合 HLA 分子に向けられているか検討する。

【予備的実験結果】

第一寛解期の悪性リンパ腫に対して HLA 一致性別不一致同胞より骨髄移植

を受けた患者末梢血（移植後 105 日目、180 日目）の CD8 陽性細胞を 96 ウェルプレートで段階希釈を作り、それらを移植前患者末梢血単核球（マイナー抗原検出用）またはドナー由来の活性化 B 細胞または K562 改変人工抗原提示細胞に腫瘍抗原（hTERT、PR1、hTERT、PRAME、BCR-ABL、AuroraA、RHAMM-R3、EpCAM、MAGEA3）を発現させたもの（腫瘍抗原検出用）で 3 回刺激した。最後の刺激より 1 週間目にプレートのレプリカを作成し、各種標的に対する CTL 活性を ^{51}Cr 遊離法で評価、陰性コントロールの平均遊離 + 3 SD をカットオフとして陽性ウェルの数を調べた。その結果、既知の腫瘍抗原に対する反応は全くなく、マイナー抗原に対する CD8+ 陽性細胞の CTL 前駆体頻度は、移植後 105 日目で 47,883 個に 1 個、180 日目で 45,500 個に 1 個の割合であった。

【考察】

WT-1 や hTERT など、造血器腫瘍の免疫療法の標的として有望視されている腫瘍抗原は過剰発現した自己抗原である。もともと高親和性 T 細胞受容体をもった CTL 前駆体の多くは除去されていると考えられるが、担癌患者ではさらに CTL 前駆体が強く除去されているか、アナジーに陥っている可能性が指摘されている。同種移植はそういった状況を打破しうるのではないかと期待されており、実際移植後に腫瘍抗原に対する CTL 前駆体が増えたとの報告も多い。

今回は 1 例のみの検討であり、結論を出すには多数の症例の蓄積が必要であるが、非自己抗原であるアロ抗原に対する免疫反応は明らかに誘導されていた。また寛解期の移植では腫瘍細胞がほとんど存在しないため抗原が乏しいと考えられ、今後は同種移植適応のある MDS を中心とした症例を中心に解析を進める予定である。

2. マイナー抗原ワクチン臨床試験

マイナー抗原ワクチンを投与した 2 患者の臨床試験の経過を昨年度報告した。現在も対象症例のリクルートを行っている。HLA-B44 拘束性 ACC-6 マイナー抗原ペプチドも準備が整ったため、該当しそうな症例の試験参加についてご検討をお願いしたい。

間葉系幹細胞における HLA-G 分子の発現に関する検討

一戸 辰夫 (京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科)

[背景] 同種造血幹細胞移植後の重篤な急性 GVHD の治療を目的として、体外で増幅した骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の輸注療法が試みられているが、MSC による免疫制御機構に関しては不明な点が多い。HLA-G は胎盤のトロホプラストに強く発現する多型性の乏しい非古典的 HLA クラス I 分子であり、細胞膜結合性および可溶性のアイソフォームを有し、抑制性受容体 ILT-2/LILRB1 との結合を介して、T 細胞・NK 細胞の細胞傷害活性を負に調節することが知られている。最近、骨髄由来 MSC から分泌される HLA-G の可溶性アイソフォームが、T 細胞の増殖応答・NK 細胞の細胞傷害活性を抑制するとともに CD4+CD25^{high}Foxp3+制御性 T 細胞の誘導に関与していることが報告された (Selmani Z, Stem Cells 2008; 26:212)。しかし、従来から HLA-G のタンパク発現の検討にあたっては、使用されるモノクローナル抗体の特性等により、非特異的な検出が起り得ることも知られていることから、今回われわれは、ヒト骨髄および歯胚に由来する複数の MSC 株における HLA-G の mRNA およびタンパク発現の確認を試みた。

[方法] 細胞膜表面・細胞内に発現する HLA-G タンパクの発現量はフローサイトメリーおよび細胞可溶化物の ELISA 法により、また HLA-G mRNA の検出は RT-PCR により行った。陽性コントロールには HLA-G を導入した LCL を用いた。

[結果及び結論] 今回検討対象としたヒト骨髄および歯芽に由来する MSC 細胞株の細胞可溶化物および培養上清のいずれにおいても HLA-G のタンパク発現は確認されなかった。また、RT-PCR を用いた検討においても骨髄由来 MSC の一株を除き、細胞膜結合性・可溶性アイソフォームいずれの mRNA も検出されなかった。次いで、トロホプラストにおける HLA-G の発現を亢進することが報告されている IL-10 存在下で MSC の培養を行い同様の検討を試みたが、HLA-G mRNA、HLA-G タンパクの発現を確認できなかった。これらの結果より、今回のわれわれの検討では、既報と異なり、MSC による免疫調節機構に HLA-G が恒常的に関与している可能性は乏しいと考えられた。

研究協力者：三浦 康生(大阪赤十字病院)、三浦 晶子(京都大学大学院医学研究科)、
吉岡 聡(京都大学大学院医学研究科)、下嶋 典子・石谷 昭子(奈良県立医科大学)

(敬省略)

ヒト灌流法のマニュアル

中村修二¹、森 眞一郎²、池原 進¹ (1関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学、
²同 附属枚方病院 血液呼吸器膠原病内科)

<背景>

灌流法は末梢血（末梢 T 細胞）の混入が少なく高濃度の造血・間葉両幹細胞を含む骨髄細胞の採取を可能とする。ウサギ、犬、サル、豚などの動物実験での長管骨（一部腸骨）及びヒト剖検例、心臓死患者（学内倫理委員会承認に基づき実施）で腸骨から、灌流法による骨髄採取を実施した。その経験に基づき、*poor mobilizer* の悪性リンパ腫患者から灌流法による骨髄採取試験を実施し、安全に行うことができた（ビデオ紹介）。今回の「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」第 1 相臨床試験においては、必要な骨髄細胞数を安全に採取するために、これまでの経験と日本骨髄バンク・骨髄採取マニュアル（第 3 版）等も参考に灌流法マニュアルを作成したので紹介する。

<手技>

MRI 検査等であらかじめドナーの腸骨の形態などを観察した後、採取はバンク・マニュアルで推奨されている左右腸骨の後上腸骨棘から腸骨稜結節の間でおこなう。マニュアルに従い、ドナーからの灌流法採取は全身麻酔下で実施する。

1. 右側腸骨の後上腸骨棘から腸骨稜結節にかけて 3cm 間隔で、2 本の小型ハンドル・目盛付き仕様の 13G 骨髄針（八光 ボーンニードル Ossiris）を骨髄腔内に深さ約 2cm 穿刺して安定に保持しておく（N1, N2）。針先の血液凝固を防止するため内針は抜かずにそのままにする。骨髄腔内に針が到達したことは感覚的にわかるので、凝固・出血防止のために確認の吸引操作はしない。
2. N1 の内針を抜き 30ml の生食水入りの 50ml 用シリンジを N1 先端部に接続する。次に N2 の内針を抜き、0.5ml のヘパリン添加生食水（10~30u/ml）が入った 50ml 用シリンジを N2 先端部に接続する。
3. ヘパリン入りシリンジ N2 をゆっくり吸引しながら N1 の生食水 30ml をゆっくり注入し、骨髄液の入った N2 シリンジを回収する。以後、3cm 間隔で針を 1 本ずつ追加穿刺し同様に N2→N3, N3→N4 と順次灌流を繰り返す。N2→N3 の灌流の際には、N1 への逆流を防ぐために予備の針で N1 にフタをする。その際、凝血を防ぐためヘパリン加生食水に針を浸しておく。各々採取した骨髄細胞を血液バッグに回収し、細胞数（NCC）を計測する。
4. 次に N4→N3 と逆向きに前記同様に灌流し、N3→N2, N2→N1 と順次繰り返す（逆灌流）。別の血液バッグに骨髄細胞を回収し、NCC を計測する。
5. 全 NCC が分量に達しない場合は、N5, N6 を試みる。

穿刺孔からの漏出防止のため、右側腸骨の採取がすべて終了するまでは各骨髄針は撤去しない。

右側終了後、左側腸骨でも同様の採取を行う。

臍帯血バンクで実施されている方法に準拠してバッグを遠心、骨髄細胞ペレットを 50ml 遠心管に回収する。さらに遠心して濃縮骨髄細胞ペレットを得て骨髄内骨髄移植に用いる。

穿刺部位が従来法（吸引法）の 100 か所以上と比べてはるかに少ないので、短時間（1時間以内）で終了するため、ドナーへの負担が軽減される。腰痛も軽く、その日から歩行可能である。

免疫アリル^{*}-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 22 年度 第 1 回班会議 プログラム
2010 年 7 月 3 日 (土) 午後 4 時～午後 5 時 30 分

座長 笹月健彦

1. 移植に関する組織適合性抗原の統合解析の提案 (10 分)
森島泰雄、松尾恵太郎 愛知県がんセンター
組織適合性研究班 班員・研究協力者
2. Multi-SNP 解析による日本人 HLA ハプロタイプの均一性、およびその適合度と急性 GVHD
との関連 (15 分)
森島聡子¹⁾、小川誠司²⁾、松原亜以子²⁾、柏瀬貢一³⁾、笹月健彦⁴⁾、森島泰雄¹⁾
1) 愛知県がんセンター中央病院血液細胞療法部 2) 東京大学医学部附属病院
がんゲノミクスプロジェクト 3) 東京都赤十字血液センター検査部 4) 九州
大学生体防御医学研究所
3. 日本人の MICA アリル頻度および HLA-B 座・DR 座の連鎖不平衡について (10 分)
楠木靖史、丸屋悦子、佐治博夫 特定非営利活動法人 HLA 研究所
4. HapMap リソースを用いた SNP 同定ソフトウェアのオンライン公開 (10 分)
赤塚美樹^{1, 2)}、山村武史²⁾、松原亜以子³⁾、小川誠司³⁾
1) 藤田保健衛生大学血液内科 2) 愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部、
3) 東京大学医学部付属病院がんゲノム他

座長 小川誠司

5. 同種造血幹細胞移植後合併症と遺伝子多型解析-非血縁者間骨髄移植症例のマイクロ
サテライト多型解析と HLA 一致の同胞間移植における移植後肺合併症疾患関連遺伝子
の報告 (10 分)
Christian Harkensee^{1, 3)}、鬼塚真仁²⁾、岡晃¹⁾、猪子英俊¹⁾、安藤潔²⁾、宮村耕一⁴⁾
1) 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 2) 東海大学医学部内科学系血液腫瘍内
科 3) Newcastle University 4) 名古屋第一赤十字病院血液内科
6. NK細胞受容体、サイトカイン遺伝子多型の造血幹細胞移植成績への影響及び検体保
存事業協力 (15 分)
屋部登志雄 平安恒幸、中本貴之、東史啓、峯元睦子、柏瀬貢一
東京都赤十字血液センター製剤部、検査部
7. 造血幹細胞移植における NKG2D 遺伝子多型解析 (10 分)
高見昭良・Jルイス・エスピノーザ・中尾眞二 金沢大学附属病院
8. HLA タイプ & スクリーンの提案：移植のロジスティックスのために (10 分)
佐治博夫、楠木靖史、丸屋悦子 特定非営利活動法人 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)

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

森島泰雄 (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 (九州大学 生体防御医学研究所)

屋部登志雄 (東京都赤十字血液センター)

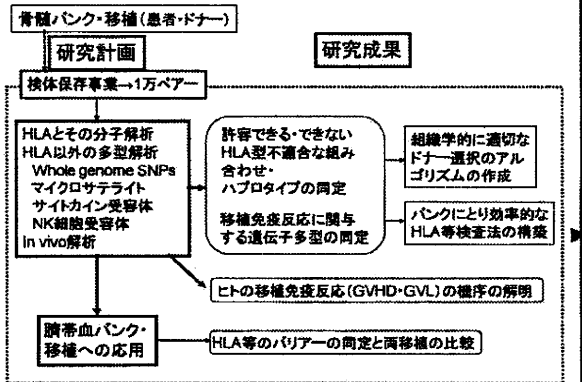
小川誠司 (東京大学 血液内科)

村田 誠 (名古屋大学 血液内科)

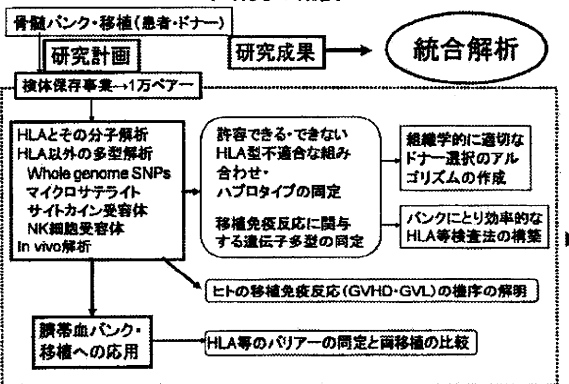
高見昭良 (金沢大学 輸血部)

研究協力者の先生方 JMDP

研究班の概要



本研究の概要



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22年度 第1回班会議

1. 非血縁者間造血細胞移植に関する組織適合性抗原の統合解析(案)

森島泰雄、松尾恵太郎 (愛知県がんセンター)

組織適合性研究班 班員・研究協力者

背景と目的

JMDPを介したUR-BMTにおける移植成績とドナー・患者の組織適合性との関連解析により、移植免疫反応に関与するHLA抗原、HLA領域の非HLA遺伝子、HLA領域以外の遺伝子とその多型が明らかになってきた。

しかしながら、同定された個々の遺伝子とその多型が、全体の遺伝子とその多型と比較してどの程度の影響を与えているかは明らかでない。このため、HLA抗原と一部の遺伝子(KIRなど)を除いては組織適合性に基づくドナー選択に用いられていない。

本研究は、共通のデータベース・試料に基づき個々の遺伝子とその多型の影響度を明らかにすることを目的とする。

研究計画

Study-I (HLA適合非血縁移植)

1) 症例・試料

以下の1から4の条件を満たす1000ペア(UPN順)

1. HLA-A~DQB1適合UR-BMT症例。
2. 白血病・MDS症例
3. GVHD予防法: non-T cell depletion, CSP+MTX法またはTAC+MTX法
4. GWAS解析結果が得られているペア。
5. Whole genome amplification (WGA)試料が保存されているペア。

Validation 群

1. 2. 3. 5を満たす上記を除く1000ペア(UPN順)。