

原発性免疫不全症に対する臍帯血移植とキメリズム解析

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

原発性免疫不全症の多くは10万人に1人程度の稀少疾患であり、その一部では根治的治療法として、造血幹細胞移植が実施される。対象となる疾患としては、重症複合型免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency: SCID)、ウイスコット・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)、重症好中球減少症 (Severe congenital neutropenia: SCN)、慢性肉芽腫症 (Chronic granulomatous disease: CGD)、などがあげられる。

造血細胞移植の成績は概ね良好 (5年生存率70%程度) であるが、生存率には疾患の種類、前処置法、移植前感染症、HLA合致度などが関係している。それぞれの疾患に特有な問題点があるが、共通した問題を解消する方策が模索されている。まず、前処置としては移植に伴う有害事象や長期予後を考え、骨髄非破壊的前処置が選択される傾向にある。また緊急移植が必要な場合や、感染症のコントロール後速やかな移植が必要な場合があり、ドナーとしては、HLA全合致血縁者に加え、臍帯血が選択されることも多い。長期的な免疫能の再構築・維持に関与する因子の抽出も重要である。その評価のための検査法の充実と確立に期待が寄せられている。原発性免疫不全症の移植症例では、Lineageでキメリズムが異なる混合キメラも稀ではなく、それが長期的な免疫能と関係しているとのデータも散見される。HLA-Flow法によるさらなる解析が期待される。

厚生労働省難治性疾患克服事業「原発性免疫不全症に関する調査研究班」では、SCID, WAS, CGDに対する推奨プロトコールを作成しており、全国規模での詳細なデータの集積を試みているが、その中でもキメリズムの動態を解明することは重要な課題の1つである。ここでは最新の原発性免疫不全症候群に対する臍帯血移植成績データを提示し、移植後の体系的免疫学的モニタリング手法や、SCIDへの臍帯血移植におけるHLA-Flow法によるキメリズム解析臨床試験案を紹介する。また、同手法を用いたSCID臍帯血移植後のキメリズム解析結果について報告する。

臍帯血移植後早期のリンパ球生着動態

松野 直史^{1) 2)}, 山本 久史²⁾, 渡辺 信和¹⁾, 谷口 修一²⁾ ら
東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 病態解析領域¹⁾
虎の門病院血液内科²⁾

【緒言】 臍帯血の特徴の 1 つは、リンパ球の未熟性、すなわち T 細胞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、臍帯血移植後の 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。今回、臍帯血移植後早期におけるリンパ球生着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的に、東大医科研と虎の門病院との共同研究を行った。

【対象・方法】 2009 年 11 月から 2010 年 9 月までに虎の門病院で施行した臍帯血移植 74 症例を登録し、移植後 14 日以内の早期死亡例を除いた 68 例を解析対象とした。臍帯血移植後 1, 2, 3, 4 および 8 週後の末梢血を採取し、単核球分離を行った。HLA-Flow 法による混合キメリズム解析が可能な症例においては、9 カラー FACS 解析システムを用いて CD3⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞 (CD3⁺ CD4⁺)、CD8⁺T 細胞 (CD3⁺ CD8⁺)、NK 細胞 (CD3⁻ CD19⁻ CD56⁺)、B 細胞 (CD3⁻ CD19⁺) について、各々の混合キメリズム解析を行った。T 細胞キメリズムが完全ドナータイプとなった時点で、ドナー T 細胞のナイーブ・メモリーフェノタイプを、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞について、それぞれ CD45RA と CCR7 の組み合わせで解析した。

【結果】 68 例中、HLA-Flow 法でのキメリズム解析が可能であった 41 例 (60%) では、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、NK 細胞および B 細胞の回復は、8 週目で中央値がそれぞれ 97 (4 - 837), 27 (3 - 1950), 242 (39 - 1247), および 1 (0 - 526) / μ l であり、NK 細胞の増加が顕著であった。CD4⁺、CD8⁺T 細胞、および NK 細胞における 1 週目のドナーキメリズムは、それぞれ中央値 88.9% (0 - 100), 93.5% (0.1 - 100), および 96.1% (0.7 - 100) であった。生着不全を除く全例で、3 週目までにリンパ球各分画での完全ドナーキメリズムを認めた。68 例のうち、HLA-Flow 法、STR-PCR 法、あるいは異性間 FISH 法において T 細胞の完全ドナーキメリズムを確認した 63 例において、ドナー由来 T 細胞のナイーブ・メモリーフェノタイプを解析した。臍帯血移植後 2 週目において CD4⁺ および CD8⁺T 細胞でナイーブフェノタイプはそれぞれ 47.2% (6.0 - 90.2), 11.3% (0.0 - 88.0) であり、CD8⁺T 細胞ではナイーブからメモリーフェノタイプへの変化が顕著であった。

【結語】 虎の門病院における臍帯血移植では、移植後早期にリンパ球のキメリズムスイッチがおこること、またナイーブフェノタイプである臍帯血由来リンパ球は、移植後速やかにメモリーフェノタイプへ変化することが明らかとなった。今後は、これらのリンパ球動態と、臨床病態との関連を解析していく予定である。

キャンパスマップ



地図中 番号	建物名	地図中 番号	建物名	地図中 番号	建物名
①	臨床研究 A 棟		総合研究棟	⑮	アムジェンホール
②	臨床研究 B 棟	⑨	1号館	⑯	旧ゲノム解析センター
③	研究棟(別館)(旧 SNPs 棟)	⑩	2号館	⑰	クレストホール
④	合同ラボ棟	⑪	3号館	⑱	国際交流会館
⑤	附属病院 C 棟 (旧 MRI 棟)	⑫	4号館	⑲	看護婦宿舎
⑥	附属病院 B 棟 (診療棟)	⑬	ヒトゲノム解析センター	⑳	白金ホール
⑦	附属病院 A 棟 (新病院棟)	⑭	動物センター	㉑	近代医科学記念館



【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

病態解析領域 研究会事務局

Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750

E-mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

厚生労働科学研究・医療技術実用化総合研究事業
HLAミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による
臨床診断の有用性に関するエビデンス創出
研究代表者：中内啓光

第3回 移植後キメリズム解析研究会



平成24年2月2日(木)

東京大学医科学研究所 1号館講堂

第3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、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。

【日時と場所】

平成24年2月2日(木)

13:00 - 17:20 講演会(東京大学医科学研究所・1号館講堂)

17:30 - 19:30 懇親会(東京大学医科学研究所・近代医科学記念館)

司会：高橋聡先生(東京大学医科学研究所附属病院 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 臨床検査科)

13:00-13:10 開会の挨拶

中内啓光先生(幹細胞治療研究センター)

13:10-13:55 原発性免疫不全症候群に対する造血細胞移植療法

森尾友宏先生(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)

13:55-14:25 SCID に対する臍帯血移植後のキメリズム解析

渡辺恵理特任研究員(幹細胞治療研究センター 病態解析領域)

14:25-14:55 同種移植後早期再発症例に対する血縁者間HLA半合致移植の検討

清水啓明先生(済生会前橋病院 血液内科)

14:55-15:25 新規アリル特異的抗HLA抗体の作製とその性質を利用した
新たな治療モデルの確立

中内祐介先生(幹細胞治療研究センター 病態解析領域)

15:25-15:45 コーヒーブレイク

15:45-16:15 ATL に対する臍帯血移植後のキメリズム解析

渡辺信和先生(幹細胞治療研究センター 病態解析領域)

16:15-17:15 招待講演：ダブルユニット臍帯血移植の現状 ～国内外の知見から～

和氣敦先生(虎の門病院分院 血液内科)

17:15-17:20 閉会の挨拶

中内啓光先生(幹細胞治療研究センター)



17:30-19:30 懇親会(近代医科学記念館-医科研正門よこ)

【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 病態解析領域 研究会事務局

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

原発性免疫不全症候群に対する造血細胞移植療法

森尾 友宏

東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野

原発性免疫不全症の原因遺伝子は 220 を越える。患者では疾患により、感染症のみならず、自己免疫疾患や悪性腫瘍などを合併する率が高い。抗体産生不全を主体とする原発性免疫不全症の治療では、 γ グロブリン補充を主体とするが、T 細胞の量的あるいは質的異常を呈する免疫不全症、好中球系の異常、あるいは多系統にわたる免疫異常を示す免疫不全症では、根治的治療を必要とする。重症複合型免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency: SCID)、Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)、慢性肉芽腫症(Chronic granulomatous disease: CGD)などの限られた疾患では遺伝子治療が適用されつつあるが、未だに first line の治療とはなっておらず、造血細胞移植が選択されることが多い。

SCID, WAS, CGD などではそれぞれ造血細胞移植の戦略や問題点がそれぞれ異なっているが、いずれも血縁 HLA 合致ドナーがいなければ、臍帯血移植が汎用されるようになっている。臍帯血移植の 5 年生存率は 70%前後にまで至っているが、当然のことながら、移植前の感染症管理・合併症管理が移植の成否に大きく影響する。移植に至らない症例があることも問題である。

これらの疾患においてはまた、今のところ HLA 一致度が高い方が、移植成績が良く、移植後の混合キメラリズムは GVHD、易感染性など様々な問題を惹起する。生存後の生活の質が特に問題になる疾患でもある。

ここでは様々な免疫不全症に対する移植プロトコール、移植成績、合併症に加え、その新生児スクリーニング、診断、移植後の免疫学的再構築などにつき話題を提供したい。

SCID に対する臍帯血移植後のキメリズム解析

渡辺 恵理

東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター
幹細胞治療分野・病態解析領域

重症複合免疫不全症 (Severe combined immunodeficiency、SCID) は、細胞性免疫と液性免疫の両方を欠損する重篤な先天性疾患である。その根治療法として造血細胞移植が行われているが、SCID 患児には T 細胞や NK 細胞が存在しないにもかかわらず、移植後に生着不全や拒絶が起こることが報告されている。

また、移植に使用する細胞資源や前処置の選択に関しても、未だに多くの問題が残されている。我が国では 2010 年、厚生労働省・難治性疾患克服研究事業『原発性免疫不全症候群に関する調査研究』班が、現時点で最良と考えられる移植法のガイドラインを提示した。

2011 年、本研究班はガイドラインに沿った臍帯血移植の臨床試験の登録を開始したが、我々はその付随研究として SCID に対する臍帯血移植後のキメリズム解析のプロトコールを作成した。本プロトコールで使用するキメリズム解析/HLA-Flow 法は、アリル特異的抗 HLA 抗体とフローサイトメーターを使用し、白血球サブセット毎の詳細なキメリズム解析や特定の細胞分画のソーティングが可能である。本プロトコールでは HLA-Flow 法を使用して、生着不全と拒絶の早期診断、さらにはそのメカニズムの解明をめざしている。

発表では、付随研究におけるキメリズム解析のプロトコールを紹介し、それに基づいて行ったプレリミナリーな症例解析の結果についても報告する。

同種移植後早期再発症例に対する血縁者間 HLA 半合致移植の検討

清水 啓明

済生会前橋病院・血液内科

同種移植 (allo-HSCT) 後早期再発症例に対しては、唯一の救済可能な手段として再移植が検討されるが、ドナーの確保や前処置強度の制限などが問題となる。一方、血縁者間 HLA 半合致移植 (Haplo-HSCT) はドナーの availability が高く、また強力な graft-versus-leukemia (GVL) 効果が期待できることから難治性造血器腫瘍に対して有望な移植方法である。当院で施行した allo-HSCT 後早期再発症例に対する Haplo-HSCT の安全性と有効性の検討、並びに多次元フローサイトメーターによる Haplo-HSCT 後のリンパ球動態の解析結果を報告する。

初回 allo-HSCT 後 1 年以内の早期再発に対して Haplo-HSCT を施行した 7 例 (29~63 歳) を対象とした。原疾患は AML4 例、MDS1 例、ALL2 例、細胞資源は凍結保存した PB を用いた。前処置は移植時 CR の 2 例には Flu180mg+ivBU8+ATG-F8mg/kg を、non-CR の 5 例には TBI3Gy+Flu180mg+AraC4g+Mel140mg+ATG-S2mg/kg を用い、GVHD 予防は FK506+mPSL1mg/kg にて行った。

臨床経過を以下に示す。全例で day8~13 の早期に生着し、HLA-Flow 法により complete chimera が確認された。合併症は Grade II-IV の acute GVHD を 3 例、sinusoidal obstruction syndrome (SOS) を 1 例、thrombotic microangiopathy (TMA) を 3 例、BK ウイルス出血性膀胱炎を 2 例、post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) を 1 例が発症し、非再発死亡 (PTLD、GVHD、細菌性肺炎) を 3 例で認めた。全例で初回移植後を上回る寛解期間を達成し、再発は 1 例のみであった。Historical control として、初回 allo-HSCT 後 1 年以内の再発に対して、他の細胞資源を用いて allo-HSCT を行った 7 例を設定し比較を行った。初回移植から再移植までの期間が Haplo 群で有意に短いにも関わらず、再移植後 OS は、Haplo 群が control に対し有意に良好であった ($p=0.04$)。

Haplo-HSCT 後のリンパ球動態の解析結果を以下に示す。下記に示す 2 例を除く 5 例では、5 週目での全リンパ球数は 150~300 前後で、NK-cell dominant (48~91%) の回復が見られた。T-cell は ATG を用いているにも関わらず 3 週目には 100 前後までの回復が見られ、CD8⁺ T-cell dominant (CD4:CD8=1:3~10) であった。1 例目は Grade4 の acute GVHD を day23 に発症した症例では、先行して著明な lymphocytosis (max 3240) を認めた。その際に特定の lineage の増加は認めなかった。2 例目は重症 BK virus 出血性膀胱炎、PTLD を発症した症例では、NK-cell の回復が不良であり、絶対数、割合ともに他の 6 例を下回っていた。

Haplo-HSCT はウイルス感染や TMA などの克服すべき課題はあるものの、本検討のような high risk 症例に対しても再発の抑制による OS の延長が期待できる。リンパ球動態の解析からは、移植後早期の lymphocytosis は acute GVHD の前兆の可能性があり、NK-cell の回復が不良な症例は、virus infection の high risk であることが示唆された。今後非再発死亡を減らすべく、ATG やステロイドの投与方法に関して至適化を行っていく。

当院では H23 年 11 月に FACS (Canto-II, 5-color) を導入、HLA-Flow 法によるキメリズム解析を in-house で行うべく準備を進めており、この試みについても報告する。

新規アリル特異的抗 HLA 抗体の作製と その性質を利用した新たな治療モデルの確立

中内 祐介

幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野 病態解析領域

我々は、従来の方法では作製困難であったアリル特異的抗 HLA モノクローナル抗体（Allele-Specific Anti-HLA monoclonal Antibodies : ASHmAb）を迅速かつ効率的に作製する技術の開発に成功した（Yamazaki et al., 2009）。ASHmAb の作製が極めて難しい理由として、本抗体の認識するエピトープは HLA 分子表面の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想を有しており、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考えられる。そこで我々は、従来知られている方法とは異なり、HLA トランスジェニックマウスに異なるタイプの 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することでこの難題を解決できた。

本講演では ASHmAb の新規作製方法に加え、当研究室で今まで実際に ASHmAb を用いてキメリズム解析を行った際の臨床データを基に、キメリズム解析／HLA-Flow 法が生着不全や白血病の再発などにおける早期診断にどのように利用されているかを報告したい。

また、新たに ASHmAb の killing activity に注目し、造血細胞移植後の再発で問題となる微少残存病変 (minimal residual disease) や、致命的な急性 graft versus host disease (GVHD) などの治療モデルの開発を紹介する。病態解析や臨床検査としてだけでなく、新たな治療法としても期待される抗 HLA 抗体の可能性についても考えてみたい。

ATL に対する臍帯血移植後のキメリズム解析

渡辺 信和

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 病態解析領域

成人T細胞白血病(ATL)に対する化学療法ではLSG15などが用いられているが、3~4コース終了する4ヶ月以降には再発して、治療抵抗性になることが多い。造血細胞移植も行われており、血縁および非血縁者間骨髄移植では比較的良好な成績が報告されている。しかし、血縁ドナーは見つかりにくく、バンクからの移植は時間がかかり、その間にATL細胞が増加してしまう。そこで、2~3週間で移植可能な臍帯血移植が注目されたが、再発時に緊急避難的に行われたものが多く、その成績は不良であった。

厚生労働省『成人T細胞白血病(ATL)の根治を目指した細胞療法の確立およびそのHTLV-1抑制メカニズムの解明に関する研究』班(鵜池班)では、化学療法後の最適と思われる時期での移植をめざし、臍帯血移植の臨床試験を計画した。このような臨床試験では、移植のタイミングの判断や、生着不全や再発の早期診断のため、ATL細胞と免疫細胞動態の解析は重要である。

東大医科研・血液腫瘍内科では、形態学的検査に頼らないATL細胞の定量的解析をめざし、フローサイトメーターを使用した解析法(HAS-Flow法)を考案した[Cancer Sci., 102(3): 569-77, 2011]。本方法で急性型ATLの末梢血を解析すると、ATL細胞の主要なフェノタイプはCD3^{dim}CD7⁺CD4⁺であった。そこで、HAS-Flow法により造血細胞移植後のATL細胞の解析を試みたが、HTLV-1に感染していないドナー由来CD4⁺T細胞でもCD7の著明なダウンレギュレーションが起こるため、ATL細胞の同定には利用できなかった。

当研究室ではHLAミスマッチ移植が増加している点に着目し、フローサイトメーターとアリル特異的抗HLA抗体を使用したキメリズム解析法(HLA-Flow法)を考案した[Biol. Blood Marrow Transplant., 14(6): 693-701, 2008.]。我々は予備研究で、HAS-Flow法にHLA-Flow法を組み合わせることで臍帯血移植後のATL患者の末梢血を解析し、生着とATL細胞の解析に極めて有用であることがわかった。

講演では、鵜池班の臨床試験に参加を予定している付随研究、すなわち治療前後におけるATL細胞数と、移植後の生着およびアロ免疫反応のモニタリングシステムについても紹介する。

ダブルユニット臍帯血移植の現状 ～国内外の知見から～

和氣 敦

国家公務員共済組合連合会 虎の門病院分院 血液内科

ダブルユニット臍帯血移植(dCBT)は、不十分な移植細胞数から単ユニット臍帯血移植 (sCBT) では高い生着不全や生着遅延が危惧される場合に Minnesota 大学で開発された同種移植法である。近年欧米の成人領域では急速に普及しているが、我が国では保険診療として未認可である。DCBT では GVHD 発現率の増加とともに再発率の低下も報告されているが、その前処置法や GVHD 予防法は多様で結果の解釈を困難にしている。このため、厚労科研加藤班 (臍帯血移植班) では、骨髄破壊的前処置法での造血器悪性腫瘍に対する dCBT の臨床第 I/II 相多施設共同試験 (C-SHOT0507) を行い、目標症例数 70 症例 (61 例に dCBT 施行) に至り最終解析をおこなった。

Eligibility は sCB で $TNC < 2.5 \times 10^7 / kg$ の場合とし、HLA2 抗原不一致まで許容し、少なくとも 1CB は $TNC > 1.5 \times 10^7 / kg$ とした。前処置は骨髄系で G-CSF 併用 CY/CA/TBI、リンパ系で CY//TBI の医科研方式で統一し、GVHD 予防は CSA/MTX で行なった。疾患背景は standard (AML CR1/2, ALL CR1, MDS/RA) 27 例、advanced (standard 以外の AML, ALL, CML nonCP, MDS/RAEB, ML nonCR) 34 例で、年齢中央値は 37 歳であった。

好中球回復 ($> 0.5 \times 10^9 / L$) は、移植後 28 日で 67%、50 日で 87%、28 日以内の死亡が 2 例、原病増悪が 1 例に認められた。生着例でのキメラリズムは移植後 14 日から 28 日目までにほぼ完全にいずれかの sCB キメラとなった。本研究では HVG 方向の不一致度が当該 CB が生着片となる唯一の予測因子であった ($p=0.02$)。急性 GVHD は 87.3% (33/55 例)、II-IV 度が 27.3% (15 例)、慢性 GVHD は 36.0% (18/50 例) で認めた。移植後 1 年及び 3 年の EFS は各々 48%、46%、OS は 57%、54% で、疾患背景別 1 年 EFS は standard 群 67%、advanced 群 32% ($p=0.01$) と本邦の骨髄破壊的 sCBT とほぼ同等だった。生着、生着不全に関しては、TNC、CD34 陽性細胞数、HLA 一致度等有意な影響はなく、生存、再発に関しても疾患背景以外に有意な因子は同定されなかった。

今回は生着・生着不全に focus して dCBT 後のキメラリズム結果を紹介し、生着メカニズムや共移植の意義を考える。

キャンパスマップ



地図中 番号	建物名	地図中 番号	建物名	地図中 番号	建物名
①	臨床研究 A 棟	⑧	総合研究棟		アムジェンホール
②	臨床研究 B 棟	⑨	1 号館	⑬	旧ゲノム解析センター
③	研究棟(別館) (旧 SNPs 棟)	⑩	2 号館	⑭	クレストホール
④	合同ラボ棟	⑪	3 号館	⑮	国際交流会館
⑤	附属病院 C 棟 (旧 MRI 棟)	⑫	4 号館	⑯	看護婦宿舎
⑥	附属病院 B 棟 (診療棟)	⑬	ヒトゲノム解析センター	⑰	白金ホール
⑦	附属病院 A 棟 (新病院棟)	⑭	動物センター	⑱	近代医科学記念館



【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

病態解析領域 研究会事務局

Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750

E-mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

