

造血幹細胞移植後の肝類洞閉塞症候群に対する治療薬の保険適応へ向けて進捗状況

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 造血幹細胞移植科 福田 隆浩

**課題1 「同種造血幹細胞移植後の類洞閉塞症候群に対するデフィブロタイドおよびトロンボモジュリン $\alpha$ 製剤 使用経験に関する研究 (全国調査)」**

【目的】未だ確立した治療法のない類洞閉塞症候群(SOS)に対する治療薬としてのデフィブロタイド (DF) ならびに遺伝子組み換えトロンボモジュリンアルファ (rTM, リコモジュリン®) の本邦での使用経験の実態調査を行い、安全かつ有効であるかを検討する。

【対象】1999年1月1日から2011年12月31日の期間に、造血幹細胞移植を行った患者でSOSの治療としてDFならびにrTMを使用した症例 (全年齢、ただし、JPLSGの研究で登録した小児例は除外)

【主要評価項目】①SOSの治療薬としてDFならびにrTMの治療効果 (寛解率)

【副次的評価項目】①全生存割合 ②DFやrTMに起因するGrade 3-4の有害事象 (CTCAE ver 4) ③急性移植片対宿主病の発症割合

【進捗状況】神戸大学倫理委員会承認済み、調査中

**課題2 「同種造血幹細胞移植後の類洞閉塞症候群の発症割合、リスク因子ならびに治療法に関する研究」**

【目的】同種造血幹細胞移植後、診断基準 (Seattle基準、Baltimore基準) に基づいたSOSの発症頻度、SOSに対する治療法や転帰に関して二次調査を行い、SOSの発症リスク因子、死亡リスク因子などを抽出する。

【対象】1999年1月1日から2010年12月31日の期間に、急性白血病、慢性白血病、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫、再生不良性貧血などの造血器疾患に対して同種造血幹細胞移植を行った全症例 (全年齢)。二次調査対象は一元化データにおいてSOSを発症した症例および死因がSOSであった症例。

【主要評価項目】①診断基準 (Seattle、Baltimore基準) に基づいたSOSの発症割合

【副次的評価項目】①全生存割合 ②SOS発症のリスク因子 ③SOS発症例における死亡リスク因子 ④類洞閉塞症候群の治療とその転帰 (SOSの寛解割合) ⑤急性移植片対宿主病を含めた移植後合併症

【進捗状況】

国立がん研究センター中央病院 倫理委員会→承認済 (2012年5月21日)

神戸大学 倫理委員会→承認済 (2012年6月6日)

JSHCT 倫理委員会 →「変更の勧告」→承認済 (7月6日現在)

2~3月頃、TRUMPデータと連結し、解析開始予定。



## 造血細胞移植合同班会議（厚労科学研究）

1月14日（月）

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）

8:30-8:40（質疑応答含）

### 1. 骨髄間葉系幹細胞の前駆 B 細胞性白血病細胞増殖への影響

三浦康生<sup>1)</sup>、一戸辰夫<sup>2)</sup>（<sup>1)</sup> 京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 助教  
<sup>2)</sup> 佐賀大学医学部内科学講座 血液・腫瘍内科 准教授）

8:40-8:50（質疑応答含）

### 2. 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）

8:50-9:00（質疑応答含）

### 3. 新規造血幹細胞移植技術評価のための新規移植後モニタリングシステムの開発に関する研究

中谷夏織、今井耕輔、森尾友宏（東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野）  
清水則夫（同・難治疾患研究所・ウイルス治療学分野）

9:00-9:10（質疑応答含）

### 4. 同種移植後の再発白血病への細胞治療法の開発

赤塚美樹（藤田保健衛生大学医学部血液内科）、赤堀 泰（同・総合医科学研究所免疫学）

9:10-9:20（質疑応答含）

### 5. 臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発

村田 誠（名古屋大学医学部附属病院 血液内科）

9:20-9:30（質疑応答含）

### 6. 同種造血幹細胞移植後合併症における HMGB1-RAGE 系の関与の検討

前田嘉信、松岡賢市、藤井伸治、品川克至（岡山大学 血液・腫瘍内科）

9:30-9:40（質疑応答含）

### 7. 骨髄内骨髄移植の技術的諸問題の解決に向けて

小川啓恭、相馬俊裕（兵庫医科大学血液内科）

9:40-10:00（質疑応答含）

### 8. 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：総括と今後の展望

池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

## 骨髄間葉系幹細胞の前駆 B 細胞性白血病細胞増殖への影響

三浦康生<sup>1)</sup>、一戸辰夫<sup>2)</sup>

- 1) 京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 助教
- 2) 佐賀大学医学部内科学講座 血液・腫瘍内科 准教授

### 【はじめに】

骨髄は前駆 B 細胞分化の場であり、その分化制御に間葉系幹細胞が関与する。一方、白血病化した前駆 B 細胞への骨髄間葉系幹細胞の影響は不明なことが多い。前駆 B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) 細胞の増殖に対する骨髄間葉系幹細胞の影響を検討した。

### 【結果】

マウス B-ALL 細胞株をマウス骨髄由来間葉系幹細胞と共培養するとその増殖が亢進した。B-ALL 細胞の増殖は転写因子 C/EBP $\beta$  欠損マウス骨髄由来間葉系幹細胞との共培養では抑制された。マウス骨髄由来間葉系幹細胞を薬物的処理により C/EBP $\beta$  の発現を低下させたのち B-ALL 細胞を共培養したところ、C/EBP $\beta$  欠損マウス由来骨髄間葉系幹細胞との共培養と同様に B-ALL 細胞の増殖が抑制された。

### 【考察・結語】

骨髄由来間葉系幹細胞の C/EBP $\beta$  発現レベルを制御することで、B-ALL 細胞の増殖が抑制される可能性が示唆された。

### 【結語】

骨髄由来間葉系幹細胞が B-ALL 細胞の増殖に関与していた。

研究分担者： 一戸 辰夫

研究協力者： 三浦 康生、吉岡 聡、八尾 尚幸、平位 秀世、前川 平

## 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。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。我々は造血幹細胞移植後の患者におけるウイルス感染症に対し、造血幹細胞移植と同一ドナーより 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。今回、CMV 特異的 CTL 療法第 1 相試験が終了したので報告する。

【対象と方法】造血幹細胞移植後ガンシクロビル抵抗性 CMV 感染患者を対象とし、CMV 既感染かつ HLA-A2 または A24 陽性である造血幹細胞移植ドナーの末梢血 50ml から単核球を分離し、CMV 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、培養上清を用いて細菌培養、真菌・ウイルス検出試験を行ったあと対象患者に CTL を初回量  $2 \times 10^5$ /kg 輸注し、Grade3 以上の副作用が見られなければ 1 週間後に 2 回め CTL を  $6 \times 10^5$ /kg、さらに 1 週後に 3 回めを  $1.8 \times 10^6$ /kg 投与した。

【結果】ガンシクロビル耐性 CMV 感染患者 5 名の年齢中央値 15 歳 (5-66)、男性 2 例、女性 3 例。HLA ハプロ一致移植 3 例、HLA 一致同種骨髄移植 2 例。前治療として全例ガンシクロビル、5 例中 4 例にフォスカビルが投与されていた。CMV-CTL 投与日は移植後中央値 91 日 (28-507 日)、拘束性 HLA は A2 が 4 例、A24 が 1 例であった。CTL 輸注後の急性副作用として 1 例で Grade3 の肝障害を認め、無治療で 2 週間後に軽快した以外には重篤な副作用を認めなかった。5 例中 4 例に CTL 投与後に血液中から CMV-DNA が消失し、5 例中 4 例で体内の CMV 特異的テトラマー陽性細胞が増加した。1 例で血液中から CMV-DNA 消失後に CMV 脳室炎を発症したため、倫理委員会承認のもと CMV-CTL の髄腔内投与を行ない少なくとも髄腔内投与に伴う副作用は認めなかった。

【結論】CMV 特異的 CTL 療法臨床第 1 相試験予定の 5 症例を終了した。ウイルス特異的 CTL はいずれも安全に投与可能であり、明らかな効果の見られた症例も認めている。培養に 3-4 週間かかること、投与基準をみたく CTL が得られる確率が約 50% であること、ウイルス未感染ドナーからの CTL 培養ができないことなどが本治療法の適応を制限している。今後は海外で進められているウイルス特異的 CTL 療法による予防投与や、第三者から培養凍結しておく CTL バンクからの治療を目的とした臨床第 2 相試験を計画している。

## 新規造血幹細胞移植技術評価のための新規移植後モニタリングシステムの開発に関する研究

東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野 中谷夏織、今井耕輔、森尾友宏  
同・難治疾患研究所・ウイルス治療学分野 清水則夫

造血細胞移植では、原疾患の再発に加えて、早期・晩期拒絶、混合キメリズム、GVHD、感染症、長期的免疫不全症、晩期合併症などが短期・長期予後を規定している。骨髄内造血細胞移植などの新しい造血幹細胞移植技術においては、生命予後や移植関連合併症に加えて、その効果及び安全性を多角的にかつ科学的に検証し、比較することが重要である。

私たちは免疫学的再構築の簡便な解析法を開発することを目的とし、signal joint T-cell receptor excision circles (sjTRECs), signal joint kappa deleting recombination excision circles (sjKRECs), coding joint KRECs (cjKRECs)をリアルタイム PCR 系で測定する系を立ち上げ、後方視的解析を行った。

対象は造血細胞移植を行った 117 名の患者 (70 : 悪性腫瘍、47 : 免疫不全症、年齢 : 0-62 歳) である。実際には患者によりデータの欠落のある中、移植後 1, 3, 6, 12, 24 ヶ月後の sj/cjKRECs, TRECs を解析し、生存率、移植後 (細菌、真菌、ウイルス) 感染症などとの相関を解析した。また sj/cjKRECs, TRECs の回復に寄与する因子として、ドナー年齢、レシピエント年齢、ドナーソース、前処置法、HLA 一致度、ステロイドの使用などをあげて、単変量・多変量解析を行った。

特定時期の sjKRECs, TRECs の回復は生存率と相関し、また sjKRECs, cjKRECs は臍帯血において有意に早期に回復した。一方骨髄移植においてはレシピエント年齢が若いほど sj/cjKRECs, TRECs の回復が良いことが明らかになった。

まだ症例数は少ない中、一定の傾向が明らかになりつつあるが、今後は前方視的な大規模解析が必要である。その実現にあたり体系的ウイルス検査との共通プラットフォームでの自動化リアルタイム PCR 系を立ち上げているところである。

## 同種移植後の再発白血病への細胞治療法の開発

分担研究者：赤塚美樹 藤田保健衛生大学医学部血液内科 准教授

研究協力者：赤堀 泰 藤田保健衛生大学医学部・総合医科学研究所免疫学 助教

### A. 研究目的

同種造血細胞移植は白血病等の難治性造血器腫瘍の根治法として開発されてきた。しかし GVHD と移植後の再発は裏腹の関係にあることから、GVHD を軽減しようとするれば GVL 効果が減弱して再発につながる可能性がある。移植後徐々に、アロ反応性の T 細胞が寛容を獲得するか、その deletion が起こることが予想される。これによる GVL 効果減弱を克服するために、体外で増幅したマイナー抗原反応性の T 細胞受容体 (TCR) もしくは腫瘍抗原特異的抗体で特異性を付与した T 細胞 (CAR-T) を用いた養子免疫細胞療法の開発を平成24年度の研究目標とした。

### B. 方法

①レトロウイルスベクターによる遺伝子治療に使われているパッケージング細胞である PG13 に ACC-1Y および ACC-1C マイナー抗原特異的 TCR (それぞれ CTL-1B3、CTL-1B9 由来) エコトロピックウイルスを感染させてプロウイルスにしたのち、限界希釈法にてクローンを複数個得て、マスターセルバンクを作成する。これを健常人から得た末梢血 T 細胞に感染させて EBV 細胞株や白血病細胞株を標的に細胞傷害性試験を行い、機能評価を行う。

②CAR-T を作成するために、まずマウス背部皮下に HLA-A\*02:01/HA-1H (以下 A2/HA-1H) テトラマーをアジュバントと混合したのち、複数回接種して免疫を行い感作を行う。脾細胞 B 細胞を取り出し、その免疫グロブリン cDNA ライブラリから A2/HA-1H に反応性の抗体を A\*02:01/HA-1H モノマーと陰性コントロールの HLA-A\*02:01/MAGEA3 モノマーでスクリーニングし、前者のみに反応するクローンを得る。次のステップとして HLA-A\*02:01 に提示された HA-1H ペプチドには反応するが、HA-1R ペプチドには反応しない特異性の高いクローンを選択する。さらにこの単鎖抗体断片 (scFv) で作成したテトラマーが細胞上に発現した HLA-A\*02:01 に提示された HA-1H に結合できるか検討し、弱い場合には親和性の向上を行う。有望な scFv が得られた場合、これに (IgG4 ヒンジ部分±) CD28 膜貫通部位—CD3-ζ 鎖を結合して T 細胞上で発現させ、HLA-A\*02:01 陽性 HA-1H 陽性の細胞に対して細胞傷害活性やインターフェロン-γ 放出などが出るか検討する。最終的に白血病細胞に対する傷害活性を *in vitro*, *in vivo* で評価する。

### C. 結果

1B9-CTL から得た β 鎖と発現量の多かった α 鎖の cDNA を用いてレトロウイルスベクターを作成した。Jurkat/MA 株にウイルスを 2 回感染したが、以前別の 1B3-CTL から得られた TCR を用いた場合 (発現効率 40% 以上) と異なり、ほとんど HLA-A\*24:02/ACC-1C テトラマーで染色される細胞は得られなかった。1B9 は 2 種類の α 鎖を発現しているため、発現の少なかったもう一方の α 鎖が本来の β 鎖のペアである可能性があるため、これを用いてベクターの再構築を図っている。

A2/HA-1H を認識する抗体については 7 種類、18 クローンが得られた。このうち最も結合力が強い scFv をコードする cDNA を哺乳類発現ベクターに組み込み 293T など で発現させ、A2/HA-1H テトラマーと反応させたところ、元の CTL に匹敵する良好な染色性を得た。他方テトラマー化した scFv の HA-1H 陽性細胞に対する反応性は陰性細胞に対するそれと比較して 2-3 倍と不十分であった。細胞膜上の HLA-A\*02:01/HA-1H 複合体のコピー数が極めて低いことを考え、この scFv をレトロウイルスベクターに組み込み、活性化した T 細胞に導入した。HLA-A\*02:01 陽性、HA-1H 陰性のドナーが見つからないため、エフェクターとターゲットがアロの組み合わせしか検討できていないが、少なくとも HLA 欠損 K562 に HLA-A\*02:01 を導入したものに HA-1H ペプチドを添加したターゲットは傷害を受けたが、対立アレルである HA-1R (9 アミノ酸中、1 アミノ酸違い) ペプチドや、NY-ESO-1 ペプチドを添加しても全く傷害性は見られなかった。アロの HLA-A\*02:01 陽性 HA-1H 陰性の B-LCL に対しては添加ペプチドの種類に限らず強い細胞傷害性が認められた。

### D. 考察

TCR 遺伝子導入にて ACC-1C マイナー抗原への特異反応性付与を試みたが、特異的テトラマーによる良好な染色性は得られなかった。TCR $\alpha$ 鎖が2種類あったことが原因と思われるが、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の親和性が低く、内在性 TCR とのキメラが導入 TCR の発現を抑えていた可能性も残っており精査を要する。

抗 A\*02:01/HA-1H scFv はマウスに免疫する方法で得ることが出来、特異性も十分得られたが。これをテトラマー化した抗体で細胞を染色した場合、弱い染色性には課題を残したが、これは HLA/HA-1H ペプチド複合体の細胞膜上のコピー数は1~10 と、抗体の標的となる抗原分子に比較して極めて低いのが原因と考えられる。T2 細胞など、Empty な HLA を発現している細胞にペプチドを添加して HLA 分子を飽和させた場合にどうなるか、検討が必要であろう。

scFv-CAR-T ではまだ改善の余地があるものの特異的細胞傷害性が認められた。この方法により上記の内在性 TCR とのキメラを回避できるが、内在性 TCR を介したアロ反応が問題となったので、TCR を Down-regulation を行う追加コンストラクトの開発を開始した。

## E. 結論

MHC に提示されたウイルス抗原エピトープを認識する単鎖抗体の報告はあるが、マイナー抗原のエピトープを認識する単鎖抗体の作成は世界初である。また単鎖抗体が CAR の形で T 細胞上に発現され細胞傷害性を示したという報告も初めてのものである。今後の課題は、MHC に提示されたエピトープペプチドの多くが細胞あたり 1~100 コピー前後と低いため、少なくとも通常のフローサイトメトリーへの応用がテトラマーを含む現状の形態では困難であり、さらに多価とするなどの工夫が必要となろう。また CAR-T についても、endogenous に発現されるエピトープを十分認識しうるまで Affinity maturation の手法を応用する必要がある。



## 臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発

分担研究者：村田 誠

名古屋大学医学部附属病院 血液内科

本分担研究では、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の向上を目的として、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有効性を確認する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。対象は骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者。主として、フルダラビン+シクロフォスファミドによる前治療法と、短期メソトレキセート+タクロリムスによる GVHD 予防法を用いる。解凍した臍帯血を洗浄、濃縮したのち、後腸骨稜から通常の骨髄穿刺針を用いて輸注する。主要評価項目は移植後 60 日時点での生着かつ生存の割合。予定登録数は 22 例。これまでに 13 例が登録され、いずれの症例においても臍帯血ユニットの解凍、洗浄、濃縮や、骨髄内への輸注などは重篤な有害事象を認めることなく実施できている。1 例で生着不全を認めた。当初は単施設で開始したが、厚生労働省から本試験は「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の対象には該当しないとの判断を得て、その後多施設共同研究へ変更した。現在、自施設+5 他施設の多施設共同研究として、安全性に配慮しながら本試験を進めている。

本分担研究を通じて得られる、臍帯血の洗浄・濃縮技術や、骨髄への輸注技術の確立、またそれらの安全性の確認は、主任研究者の研究課題である「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」の確立に寄与するものと考ええる。

## 同種造血幹細胞移植後合併症における HMGB1-RAGE 系の関与の検討

岡山大学 血液・腫瘍内科 前田嘉信、松岡賢市、藤井伸治、品川克至

同種造血幹細胞移植後の合併症の克服は、移植成績を向上させる上で重要である。Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に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る。近年、Ikehara らの骨髄内移植 (intra-BMT) は、生着率の向上と GVHD 抑制の両面から注目されているが、我々は、従来の静脈内へ輸注 (iv- BMT) に比べ intra-BMT 後の IPS 発症が抑制されるかを検討した。その結果、移植後早期に iv- BMT 群でドナー細胞が肺に集積し、肺におけるケモカインの発現を増強させることが明らかとなった。iv- BMT 後には、移植された細胞によってホストの環境が変化することが示唆されたが、移植後早期に起こる生体内の変化 “danger signal”は、その後の移植合併症を誘発させる可能性がある。

“danger signal”としては、炎症性サイトカインと微生物特有の分子群 PAMP (Pathogen-associated molecular pattern ; 病原体関連分子パターン)の役割が明らかにされている。PAMP を認識するレセプターとして TLR (toll-like receptor)や NLR (NOD-like receptor) などがあり、腸内微生物のグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分 LPS は TLR を介して DC を活性化させる。この LPS-TLR 経路が GVHD 発症に重要であることはマウスモデルにより証明されたが、ヒトにおいても TLR の遺伝子多型が GVHD 重症度に影響すると報告されている。

“danger signal”には、外的要因 (微生物) としての PAMP に対し、内的要因 (細胞障害など) の分子群は DAMP (Damage associated molecular pattern ; ダメージ関連分子パターン) として大別される。High-mobility group box 1 protein (HMGB-1)は、核内において転写調節に重要な核内蛋白質として知られていたが、免疫担当細胞から能動的に細胞外に分泌、または細胞死に伴って受動的に細胞外へ放出される。受容体としては、receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)や TRL が知られている。

今回、我々はこれまで明らかとなっている自然免疫と GVHD の関連を紹介し、マウスモデルを使って DAMP である HMGB1-RAGE 系と同種造血幹細胞移植後合併症の関連についての研究を報告する。

平成24年度第2回合同班会議 (厚労科学研究)

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

### 骨髄内骨髄移植の技術的諸問題の 解決に向けて

研究分担者: 兵庫医科大学血液内科 小川啓恭

研究協力者: 同 相馬俊裕

2013. 1. 14

### 灌流法による骨髄採取の問題点

- 静水圧と陰圧の組み合わせでは十分な量が得られなかった
  - 採取内容もかなり赤血球に偏っていた。
  - ヒト腸骨における圧力分布などの解析が不十分
- 従来法(吸引法)の改善を図る
  - 従来法で採取した骨髄を骨髄内移植に適した量に濃縮する

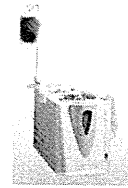
### 骨髄処理の目的と手段

- A→O型移植なので血球を除く
  - Spectra で濃縮し異型赤血球を減らす
  - 洗浄O型赤血球と交換する
- 濃縮し、移植場所1カ所あたり5mlの量にする
  - SEPAXで20mlまで濃縮
- 移植骨髄濃度を正常2倍以下程度にする
  - Spectra で好中球を除き細胞数を減らす

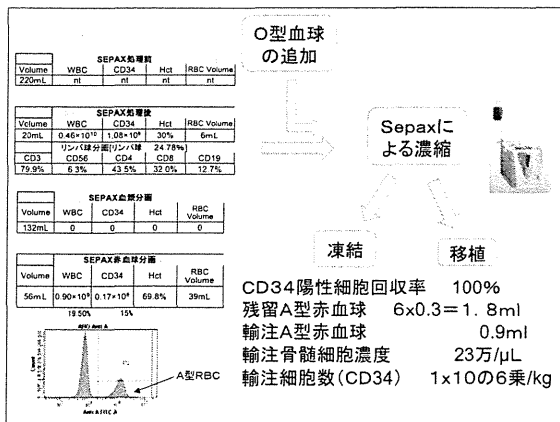
### 濃縮装置



Cobe spectra



Sepax CB concentration



### 採取骨髄のCFU-F(参考値)

- 濃縮前
  - $1 \times 10^4$  の4乗個
- Spectra後
  - $7.7 \times 10^4$  の4乗個
- SEPAX後
  - $3 \times 10^4$  の4乗個

移植部位のCFU-Fを測定したが増殖が得られなかった

**H.A. 65歳F, AML(M7), IF, 血液型 O(+), 体重 54kg**

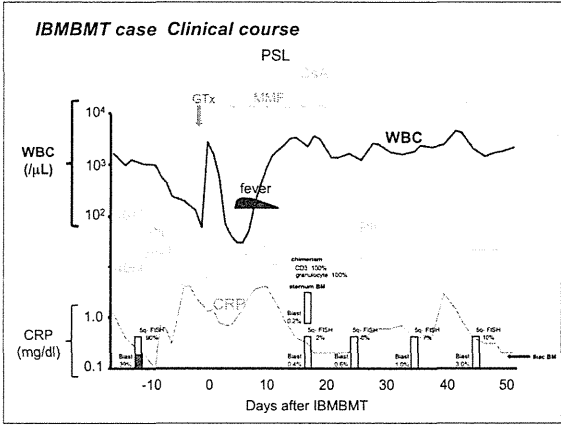
移植前 BM blast 39.2% ドナー娘 (0/3), 血液型 A(+)  
 High titer donor-specific antibody (DSA) (HLA抗体) x 5400  
 前処置: FluMelThy(2.5)TBI(3Gy) GVH予防: CSP+MMF(30 mg/kg)

採取有核細胞数: 2.9 x 10<sup>8</sup>/kg; Spectraで濃縮した後、SEPAで処理し、  
 final volume: 20 ml; 半分凍結 → 10 mlを骨髓内へinjection

骨髓内移植細胞 NCC: 0.23 x 10<sup>10</sup>/10 ml = 0.43 x 10<sup>8</sup>/kg  
 5.4 x 10<sup>7</sup> CD34<sup>+</sup> cells / 10 ml = 1.05 x 10<sup>6</sup>/kg  
 RBC 3 ml/10 ml 8.85 x 10<sup>6</sup> CD3<sup>+</sup> cells/kg

両側の腸骨の1か所ずつに、5 mlをinjection

On day 56 Neu > 500 day 10 PLT > 2万 未  
 GVHD (-) DSA titer x128に低下 (day 40)  
 BM CR RBCの回復遅延 (抗A抗体 x1-4)



**2例目**

53歳 女性 2011年11月発症のMDS-RAEB  
 2012年3月Azacitidineにて導入を試みるも無効。  
 急性白血病化し移植を検討するも、骨髓バンク1名のみ、広  
 範囲の抗HLA抗体があり臍帯血移植も困難と判断されハブ  
 ロ移植目的で当科紹介となる。  
 抗体価が高いため拒絶予防として抗体吸着と血漿交換およ  
 び骨髓内骨髓移植の適応とした

HLA	A	B	C	DRB1
患者	2601/2603	1501/4001	0303/0304	0405/0803
ドナー	0201/2603	1501/3901	0303/0702	0405/1501

患者の持つ抗HLA抗体  
 抗A2 x19970 抗B39 x20399 抗DR15 x19274

処理 血液型 A→AB

Spectra-DRB					Spectra-DRB (Cryobal-DRB)				
Volume	WBC	CD34	PLT	RBC Volume	Volume	WBC	CD34	PLT	RBC Volume
900ml	1.6 x 10 <sup>11</sup>	37 x 10 <sup>6</sup>	28.7%	253 ml	45ml	7.5 x 10 <sup>11</sup>	1.3 x 10 <sup>7</sup>	8.7%	4.2%

900mlをスペクトラで45mlに濃縮した。  
 有核細胞数が61万に達していたためそのまま  
 4箇所に分けて骨髓内移植した。特に問題なく終了した

**Summary 1**

- 通常の吸引法により、採取した骨髓液 1Lを、SpectraとSEPAを用いて、赤血球を除き、最終volume 20 ml にまで、濃縮できた。
- CD34<sup>+</sup> 細胞の回収率は、ほぼ100%であった。
- 骨髓内へinjectionした、RBC volumeは totalで3 ml(その70%は0(+): 患者 血型)であった。
- 移植細胞は、0.43 x 10<sup>8</sup> NCC/kg, 1.05 x 10<sup>6</sup> CD34<sup>+</sup> cells/kg, 8.85 x 10<sup>6</sup> CD3<sup>+</sup> cells/kgであった。
- 骨髓内移植は、安全に施行可能であった。
- 高齢、非寛解期、DSA high titer, GVH 0Ag/HVG 3 Agと、極めて不利な条件であるにもかかわらず、生着は極めて良好(Neu > 500 on day 10)であった。
- 高抗HLA抗体の症例で骨髓内骨髓移植を行った。(2例目)
- 今後、症例を重ねて、骨髓内骨髓移植の安全性、有用性を検討する。

**Summary 2 今回浮上した技術的諸問題**

- 細胞数の減少なく骨髓を濃縮する方法が見つかった
- 腸骨内骨髓移植の詳細な検討が必要
  - モデル動物で最適骨髓容量を設定する
    - PKHラベルによる、超短時間漏れこみ動態
      - 静脈に漏れこまない最大量
    - 1-2日の動態
      - 移動するのか、しないのか
  - 細胞濃度の上限設定
    - 適切な濃度設定が安全な移植に必要
      - 濃すぎると壊死する?
  - ターゲット症例の設定が必要
    - 拒絶スコアの設定
      - 拒絶ハイリスク症例のリクルート

## 灌流法による骨髄採取の安全性と有用性の検討

研究分担者 野村昌作（関西医科大学附属枚方病院血液腫瘍内科 主任教授）

研究協力者 石井一慶（関西医科大学附属枚方病院血液腫瘍内科 講師）

藤田真也（関西医科大学附属枚方病院血液腫瘍内科 助教）

### A. 研究目的

本臨床試験では、灌流法による骨髄採取の安全性と有用性を検討する（臨床第 I 相試験）。

①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副次的評価項目：灌流法に要した手術時間、骨穿孔、皮膚穿孔数・採取量、採取有核細胞数、ヘマトクリット、CD3(+), CD34(+), CFU-C 及び CFU-F。

### B. 研究対象、方法

#### 1. 対象

①HLA 適合血縁者

②適格条件、除外条件については、非血縁バンクドナーの基準に準ずる。

#### 2. 方法

骨髄採取法（灌流法、並びに吸引法）右腸骨稜全体の1/2に当たる部位から灌流法により骨髄細胞を採取する。次いで、右腸骨稜残り1/2の部位、および左後腸骨稜全体から従来法である吸引法を用いて必要細胞数に達するまで骨髄採取を継続する。

##### 1) 灌流法による骨髄採取法

①ドナーの管理法は日本骨髄バンクの「骨髄採取マニュアル」（第四版）に準ずる。

②骨髄採取は入院下で実施する。

③全身麻酔下で一方の腸骨から 2～4 ヶ所で灌流法採取を実施する。

④2本の骨髄穿刺針を腸骨に 3～5cm の間隔で穿刺し、生理食塩水 30 ml 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、採取側シリンジのみヘパリン（10～30 U/ml とする）加生理食塩液を約 0.5 ml 使用する。

⑤採取時には、採取量、骨髄の有核細胞数（Nucleic cell count, NCC）、ヘマトクリット（HCT%）を計測する。

##### 2) 吸引法による骨髄採取法と採取骨髄細胞の処理

右側腸骨の上後腸骨棘から腸骨稜結節にかけて灌流法で穿刺した残り後半 1/2 の部位、および左後腸骨稜全体から吸引法を用いて必要細胞数に達するまで骨髄採取を施行する。吸引法による骨髄採取は日本骨髄バンクの「骨髄採取マニュアル」（第四版）に準ずる。採取時間は従来の報告通り 3 時間の予定である。吸引法で採取した骨髄細胞をレシピエントへ移植する。吸引法による骨髄採取後、自己血輸血を施行する。

## 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：

### 総括と今後の展望

関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学 池原 進

#### 総括

われわれがマウスを用いて開発した骨髄内骨髄移植法 (IBM-BMT) は、造血幹細胞 (HSC) の増殖・分化を促進するために必要なドナーの間葉系幹細胞 (MSC) を効率よく補充する方法である。この方法をヒトへ応用するために、従来の吸引法 (AM) にとって代わって灌流法 (PM) をサルを用いて開発した。

この両者 (IBM-BMT+灌流法) の組合せによる新しい移植方法は、移植片対宿主病を発症しないだけでなく、ドナーに対してもレシピエントに対しても負担を軽減する優れたもので、難治性の自己免疫疾患や加齢に伴って発症する種々の難病 (Alzheimer 病や肺気腫など) にも強力な武器となりうるものと確信する。

#### 今後の展望

ヒトへの臨床応用としては、現在、灌流法+IBM-BMT の両技術のコンビネーションにおける安全性を最重点課題として、Phase I Study を開始した。安全性が確認されればただちに Phase II Study が実施できるように、臨床プロトコルを準備中である。新しい BMT の方法がヒトへ応用されるようになれば、骨髄ドナーの負担が軽減される。すなわち、骨髄穿刺針の穿刺部位が 8 ヶ所 (従来の方法では 100 ヶ所以上) ですみ、麻酔から覚醒後には痛みも少なく、歩行可能である。それゆえ、骨髄バンクへの登録者が増加するし、たとえ、HLA が不一致でも新しい移植方法では GvHD も起こらず、生着が促進されるため、前処置も軽減され、患者の負担も少なくなる、新しい技術により、これまで不治の病であった種々の難病が根治されれば、患者にとってこれ以上の福音はない。

現在、ヒトへの応用を目指して本院の救命医学科の中谷教授、津田講師と共同研究中で、脳死患者を用いて PM と AM との間の細胞採取量等を検討中である。

将来は、骨髄バンクとのドッキングも考慮中である。

難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）  
「移植細胞源を異にする非血縁造血細胞移植の組織適合性に基づく成績向上と移植選択  
アルゴリズムの確立に関する研究」森島班（H23-免疫-一般-010）

## 平成24年度第2回研究班会議プログラム

平成25年1月14日午前10時～午後11時30分 国立がん研究センター

### 司会 村田 誠

1. 組織適合性研究班の目標とその進捗状況  
森島泰雄○（研究代表者）
2. 非血縁者間骨髄移植における HLA-DPB1 適合度の慢性 GVHD・GVL 反応への影響  
森島泰雄○・松尾恵太郎（愛知県がんセンター研究所）  
柏瀬貢一・東 史啓・屋部登志雄（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター）
3. 海外ドナーからの移植と国内非血縁造血幹細胞ソースを用いた移植の matched-pair 解析  
一戸辰夫○（佐賀大学医学部内科学講座）  
神田善伸（自治医科大学さいたま医療センター血液科）  
飯田美奈子（愛知医科大学造血細胞移植振興講座）

### 司会 一戸辰夫

4. HLA 適合非血縁者間骨髄移植における HLA ハブタイプ、HLA 型に基づく急性 GVHD の解析  
森島聡子○（藤田保健衛生大学医学部 血液内科）  
小川誠司・佐藤亜以子（東京大学医学部附属病院がんゲノミクスプロジェクト）  
柏瀬貢一（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター）  
笹月健彦（九州大学高等研究院）  
森島泰雄（愛知県がんセンター研究所）
5. HLA に遺伝的選択はあるか？  
小島裕人○・池田奈未・佐治博夫（公益財団法人 HLA 研究所）
6. アジア地域の同種移植データベース構築とその解析  
飯田美奈子○・小寺良尚（愛知医科大学造血細胞移植振興講座）  
鈴木律朗・熱田由子（名古屋大学造血細胞移植情報管理生物統計学講座）  
APBMT 事務局

### 司会 小川誠司

7. 臍帯血移植成績に関与する多型遺伝子に関する研究の進捗状況  
屋部登志雄○  
臍帯血移植組織適合性共同研究グループ
8. 薬物代謝遺伝子多型と造血細胞移植  
レニン・アンギオテンシン系と造血細胞移植後肺合併症  
鬼塚 真仁○（東海大学医学部 内科学系 血液腫瘍内科）
9. 非血縁者間同種骨髄移植における NLRP3 遺伝子多型の機能的役割  
高見昭良○、Jルイス・エスピノーザ、中尾眞二（金沢大学）  
鬼塚真仁（東海大学）  
柏瀬貢一（日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター）  
松尾恵太郎、森島泰雄（愛知がんセンター）

## 研究班の目標と進捗状況

研究代表者

森島泰雄

愛知県がんセンター研究所

1. ドナー・移植細胞源選択に有用なHLAと非HLA遺伝子の同定とその移植選択アルゴリズムへの導入
  - HLA alleleの同定  
HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 ~ 2008年 8000ペア ( UR-BMT)
  - HLA locus mismatch (allele level)の影響  
HLA 6 locus matching  
HLA-DPB1
  - HLA haplotypeとそのblockの同定とHLA haplotype matchingの意義  
HLA領域のmulti-SNPs解析
  - HLA allele, HLA haplotypeそのものの影響(UR-BMT) Blood 2010
  - HLA以外の遺伝子多型の同定とその影響 (UR-BMT) Blood 2012  
70 SNPs validation analysis ( 統合解析 )  
新規SNP Plos One 2011  
Micro satellite多型解析 Submitted
  - KIR遺伝子、KIRリガンドの影響
  
2. 組織適合性に基づく骨髄移植、末梢血幹細胞移植ならびに臍帯血移植成績の解析による最適移植法の選択
  - さい帯血移植ペアのHLA allele の同定とmatchingの影響  
さい帯血移植組織適合性共同研究グループ  
HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1の同定 2000ペア ( 予定 )
  - さい帯血移植 ( HLA抗原レベル ) と非血縁者間移植の比較 ( 成人 )  
BBMT 2012
  
3. 非血縁者間移植の人種別比較成績に基づく国際間移植ドナーの効率的運用
  - HLA ( A ~ DPB1 ) 適合非血縁移植のGVHD, GVLの人種間比較  
国際組織適合性WGでの解析 Submitted
  - アジア地区での解析  
APBMT HLA-WG
  - 海外ドナーからの非血縁者間骨髄移植成績



## 非血縁者間骨髄移植における HLA-DPB1 適合度の慢性 GVHD・GVL 反応への影響

森島泰雄○・松尾恵太郎（愛知県がんセンター研究所）

柏瀬貢一・東 史啓・屋部登志雄（日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター）

背景: HLA-DPB1 抗原座はクラス II 抗原である HLA-DRB1 や HLA-DQB1 抗原座よりもセントロメアに位置しており、古くは primed lymphocyte test (PLT) により同定されていた。ドナー・患者間の HLA-DPB1 アリルのミスマッチは非血縁者間造血細胞移植症例の約 3 分の 2 に認められ、移植免疫反応や移植成績への影響が解析されてきた。JMDP の解析では HLA-DPB1 ミスマッチで急性 GVHD の発症頻度が有意に高くなり、(NEJM 339:1177, 1998)、その後 HLA-DPB1 ミスマッチ症例では移植後の白血病再発のリスクが低くなること (graft-versus-leukemia effect (GVL)) を明らかにした (Blood 113:2851,2009)。海外でも、HLA-DPB1 ミスマッチの GVHD や生存への影響が解析され、関与する HLA-DPB1 エピトープも報告されている (Shaw BE et al. Leukemia. 2010 Jan;24(1):58-65. Fleischhauer K et al. Lancet Oncol. 2012 Apr;13(4):366-74.)。

目的: 研究班において後方視的に解析された HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 のアリルデータに基づき、HLA-A~DQB1 アリル適合非血縁移植症例を用いて HLA-DPB1 適合度の移植免疫反応に対する影響を解析した。

症例: 1993 年~2008 年に移植された下記の基準を満たす非血縁骨髄移植症例。

1. 上記 HLA アリル型が判明している HLA-A~DQB1 アリル適合症例。
2. GVHD 予防法として T 細胞非除去法、ATG 未使用例。
3. 白血病再発解析では AML, ALL, CML 症例

方法: Competing risk regression model

結果 Hazard risk of leukemia relapse (移植後 100 日以上生存症例)

	N	HR	[95% Conf. Interval]		P
HLA-DPB1 (GVH direction)					
match	632	1			
1 locus mismatch	777	0.59	0.48	0.73	<0.001
2 locus mismatch	272	0.53	0.38	0.72	<0.001
Chronic GVHD*					
no	902	1			
limited	272	0.95	0.69	1.29	0.733
extensive	421	0.73	0.54	0.97	0.036

\*time dependent covariate analysis

adjusted with patient age, donor age, disease, leukemia relapse risk, conditioning, GVHD prophylaxis, year

考察 バイアスのない多数例の HLA-DPB1 single mismatch 症例を解析することができた。

HLA-DPB1 mismatch は chronic GVHD のリスクファクタではない。

HLA-DPB1 mismatch は強い GVL 効果を生じる。

Chronic GVHD の GVL 効果は限定的。

「移植細胞源を異にする非血縁造血細胞移植の相違適合性に基づく成績向上と移植選択アルゴリズムの確立に関する研究」班(森島班) 平成24年度第2回班会議

### 海外ドナーからの移植と 国内非血縁造血細胞ソースを用いた移植の matched-pair解析

一戸 辰夫<sup>1</sup>, 神田 善伸<sup>2</sup>, 飯田 美奈子<sup>3</sup>, 木村 文彦<sup>4</sup>, 東梅 友美<sup>5</sup>,  
中瀬 浩一<sup>6</sup>, 三田村 真<sup>7</sup>

<sup>1</sup>佐賀大学医学部内科学講座; <sup>2</sup>自治医科大学さいたま医療センター血液科

<sup>3</sup>愛知医科大学造血細胞移植振興講座; <sup>4</sup>防衛医科大学校血液内科;

<sup>5</sup>ミシガン大学がんセンター; <sup>6</sup>愛媛県立中央病院がん治療センター;

<sup>7</sup>骨髄移植推進財団

日本造血細胞移植学会 海外ドナーからの移植WG

## Methods

### ● Study Design:

A matched-pair study within retrospective cohorts of patients who received HCT for acute leukemia or myelodysplastic syndrome facilitated by the Japan Marrow Donor Program (JMDP) or the Japan Cord Blood Bank Network (JCBBN) between 1995 and 2009.

### ● Primary Endpoint:

---Overall survival @5-yr

### ● Other Endpoints:

---Grade 3-4 acute GVHD

---Relapse Incidence

---Non-relapse mortality (NRM).

### Study #1: Overseas Donor HCT vs Domestic Donor BMT

#### ● Data source:

Overseas donor HCT facilitated by JMDP (n=140)

Domestic donor BMT facilitated by JMDP (n=10961)

#### ● Matching methods:

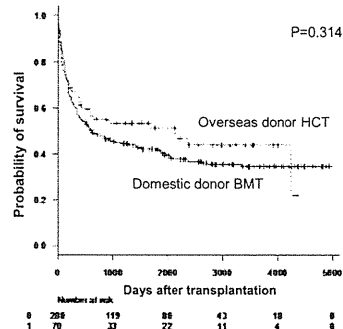
Case: Control=1: 4

Optimal matching using "Optmatch" package of R

#### ● Matching criteria:

SCT year, recipient age, recipient sex, disease, disease risk, HLA-A/B/DR serologic compatibility

### Study #1: Overall Survival



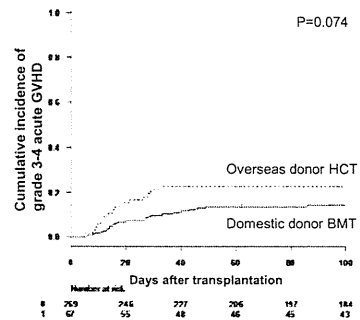
### Study #1: Overall Survival by Disease Risk

Subgroup	OS@5-yrs
Low risk*, overseas donor	0.57 (0.40-0.70)
Low risk, domestic BM	0.50 (0.42-0.58)
High risk, overseas donor	0.42 (0.21-0.61)
High risk, domestic BM	0.29 (0.20-0.37)

P=0.277

\*Low risk=CR1 or CR2 in acute leukemia, MDS/RA

### Study #1: Grade 3-4 Acute GVHD

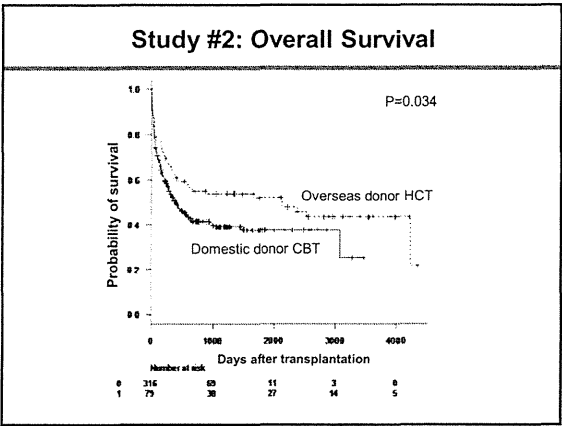


### Study #1: Other Endpoints

	Cumulative Incidence (95%CI)		P
	Overseas	Domestic BM	
Relapse	0.22 (0.12-0.33)	0.29 (0.24-0.35)	0.194
NRM	0.33 (0.21-0.44)	0.31 (0.26-0.37)	0.661

### Study #2: Overseas Donor HCT vs Domestic Donor CBT

- **Data source:**  
Overseas donor HCT facilitated by JMDF (n=140)  
Unrelated CBT facilitated by JCBBN (n=5615)
- **Matching methods:**  
Case: Control=1: 4  
Optimal matching using "Optmatch" package of R
- **Matching criteria:**  
SCT year, recipient age, recipient sex, disease,  
disease risk, time from diagnosis to transplant



### Study #2: Overall Survival by Disease Risk

Subgroup	OS@5-yrs	P=0.012
Low risk*, overseas donor	0.57 (0.40-0.70)	
Low risk, domestic CB	0.53 (0.44-0.62)	
High risk, overseas donor	0.46 (0.29-0.62)	
High risk, domestic CB	0.19 (0.12-0.28)	

\*Low risk=CR1 or CR2 in acute leukemia, MDS/RA

### Study #2: Other Endpoints

	Cumulative Incidence (95%CI)		P
	Overseas	Domestic CB	
Relapse	0.26 (0.23-0.37)	0.22 (0.17-0.37)	0.459
NRM	0.30 (0.20-0.41)	0.34 (0.29-0.40)	0.276

### Summary

**HCT using overseas donors had**

- a similar OS compared with domestic donor BMT
- a higher OS compared with domestic donor CBT
- similar risks of relapse and NRM compared with domestic donor BMT/CBT

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

「移植細胞源を異にする非血縁造血細胞移植の組織適合性に基づく成績向上と移植選択アルゴリズムの確立に関する研究」森島班（H24-免疫-一般-010）

## HLA 適合非血縁者間骨髄移植における HLA ハプロタイプ、HLA 型に基づく急性 GVHD の解析

森島聡子<sup>1)</sup>、小川誠司<sup>2)</sup>、佐藤亜以子<sup>2)</sup>、柏瀬貢一<sup>3)</sup>、笹月健彦<sup>4)</sup>、森島泰雄<sup>5)</sup>

- 1) 藤田保健衛生大学医学部 血液内科学
- 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) 関東甲信越ブロック血液センター
- 4) 九州大学高等研究院
- 5) 愛知県がんセンター研究所

<背景>HLAと移植免疫反応及び移植成績との関係は、これまで患者とドナーのHLA適合性という視点から主に解析され、その重要性が明らかにされてきた。一方、個人の持つ特定のHLA型やHLAハプロタイプと同種移植との関連を解析した報告は少ない。

欧米からは、HLA一致の同胞間移植においてHLA-DR15が移植成績との関連性が単一施設の解析で報告されたが<sup>1,2</sup>、その後の多数例の解析では関連性は認められず<sup>3</sup>、さらなる検証が必要である。我々は、日本人に頻度の高いHLAハプロタイプが非血縁者間でも高度に保存され、特定のHLAハプロタイプを有することがGVHDのリスクと関係する可能性を報告した<sup>4</sup>。HLA領域のアリルや非HLA遺伝子間には、強い連鎖不平衡があり、HLAハプロタイプ上の特定のアリルや遺伝子が移植免疫反応と強く関連する可能性がある。

<目的>日本人の非血縁者間骨髄移植において、個人の所有するHLA型、HLAハプロタイプに由来する遺伝学的背景因子とGVHDの関連性を検証する。

<方法>対象は、1993年～2008年までの間で、JMDFを介してHLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1のアリルが完全一致した非血縁ドナーより移植を施行された患者741例。HLA-AからDPB1の各座において所有率が5%以上のアリルを選択し、各アリルの有無とGVHDとの関連性をcompeting risk regression modelで解析した。

<結果とまとめ>HLA-DRB1\*15:01及びDRB1\*15:02の有無で急性GVHDの発症リスクに有意差は認めなかった。それ以外の座において、アリルの有無が急性GVHDのリスクと関連する可能性のあるものが複数認められた。急性GVHDのリスクと関連する可能性のあるアリルとHLAハプロタイプとの関係も含めて、現在詳細な解析を進めている。

1. Blood 2006;107:1970-3.

2. Biol Blood Marrow Transplant 2006;12:1169-75.

3. Biol Blood Marrow Transplant 2012;18:1302-8.

4. Blood 2010;115:4664-70.