

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

<背景・目的>

日本列島人の HLA ハプロタイプにみられる連鎖不平衡の成因として、遺伝的選択があり得るかどうかを①各ハプロタイプの遺伝確率（全体の解析）、②homozygote は回避されるか、③KIR リガンドミスマッチの有無の観点から解析した。

<材料・方法>

当研究所で HLA 遺伝子型検査を実施した家族（年齢不問）を対象とした。

① 各ハプロタイプの遺伝確率

HLA-A,B,DR 遺伝子型検査を実施した 4,481 家族（親子 11,011 ペア）に対し、親のもつハプロタイプ（1 家族 4 本）が次世代（=子）に遺伝する割合を算出した。

② homozygote の解析

同一ハプロタイプ（HLA-A,B,DR）を共有している 284 家族（親子 702 ペア）に対し、そのハプロタイプの遺伝割合、次世代が homozygote になる確率を算出した。

③ KIR リガンドの解析

母子ともに HLA-A,B,C 遺伝子型検査を実施した 2,025 家族（親子 4,356 ペア）に対し、KIR リガンドミスマッチの割合を算出した。

<結果・考察>

① 各ハプロタイプの遺伝確率

ハプロタイプの種類に関係なく、遺伝割合はほぼ 50%程度であった。親の世代におけるハプロタイプ top10 の遺伝確率を以下に示す。

順位	A-B-DR	本数(親)	遺伝確率(%)
1	*24:02-*52:01-*15:02	1777	50.6%
2	*33:03-*44:03-*13:02	890	49.7%
3	*24:02-*07:02-*01:01	827	49.9%
4	*24:02-*54:01-*04:05	603	49.6%
5	*02:07-*46:01-*08:03	373	48.9%
6	*11:01-*15:01-*04:06	321	50.3%
7	*24:02-*59:01-*04:05	247	51.4%
8	*11:01-*54:01-*04:05	227	50.6%
9	*24:02-*40:06-*09:01	194	52.4%
10	*26:01-*40:02-*09:01	182	51.0%

② Homozygote の解析

両親が同一ハプロタイプを共有している場合について、homozygote の子供が産まれる理論値を以下、左表に示す。以下、右表は実測値のハプロタイプ top5 を示す。理論値と実測で子供数はほぼ同じであった。

	家族数	homozygote になる確率	合計子供数	homozygote 子供数(理論値)
両親が同じタイプ	4	1/2	10	5
両親のどちらかが homozygote	25	1/2	51	25.5
両親が1本のみ共有	255	1/4	641	160.25
合計				190.75

順位	homozygote子供数(実測) N=193	人数
1	*24:02-*52:01-*15:02	97
2	*24:02-*07:02-*01:01	25
3	*33:03-*44:03-*13:02	25
4	*24:02-*54:01-*04:05	12
5	*02:01-*35:01-*04:03	2

対象ハプロタイプの遺伝割合は全体の遺伝解析と同様、50%程度であった。親の世代におけるハプロタイプ top5 の遺伝確率を以下に示す。

順位	A-B-DR	本数(親)	遺伝確率
1	*24:02-*52:01-*15:02	331	51.8%
2	*33:03-*44:03-*13:02	86	47.5%
3	*24:02-*07:02-*01:01	81	55.1%
4	*24:02-*54:01-*04:05	53	51.0%
5	*02:07-*46:01-*08:03	8	44.4%

③ KIR リガンドの解析

以下の左表はミスマッチのあったペア (N=2,025) の内訳を示す。母子間 KIR リガンドミスマッチは、両親からの遺伝が均等と仮定した理論値とほぼ同じであった。右表は単一ミスマッチにおける母子の KIR リガンドの有無を示す。ミスマッチ方向にも大きな差はみられず、これは複数ミスマッチでも同様であった。

KIRリガンド				ペア数	
Bw4 (3DL1)	A3,A11 (3DL2)	C1	C2	実測値	理論値
x				727	722
	x			377	387
		x		20	27
			x	321	325
x	x		x	45	45
x	x			111	106
x		x		11	14
x			x	103	102
	x	x		13	15
	x		x	154	157
x	x	x		0	1

	実測値		理論値	
	母(+)子(-)	母(-)子(+)	母(+)子(-)	母(-)子(+)
Bw4 (3DL1)	359	368	343	379
A3,A11 (3DL2)	198	179	195	192
C1	16	4	20	6
C2	156	165	159	167

今回の解析結果からは、HLA 遺伝子選択性はなく、これは免疫学的に不利とされる homozygote の淘汰性についても同様の傾向であった。また、年齢不問を考慮にいと、homozygote が寿命に与える影響も少ないかも知れない。

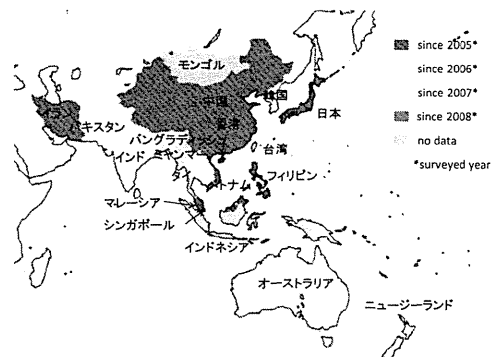
妊娠時に母体の子を異物として認識して NK が働く可能性について、古典的クラス I (HLA-A,B,C) における KIR リガンドミスマッチがあっても不妊に至ることはないと考えられ、NK の調節については非古典的クラス I (HLA-G,E) の役割が大きいと推察できる。

以上から、HLA ハプロタイプの連鎖不平衡には遺伝的選択の要因は低いといえる。

アジア地域の 同種移植データベース構築と その解析

愛知医科大学医学部 造血細胞移植施設講座
飯田美奈子 小寺良尚
名古屋大学医学部 造血細胞移植情報管理・生物統計学
鈴木律樹 船田由子
Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation Group (APBMT)

APBMT参加国



APBMTにおけるデータ収集

- APBMT Transplant Activity Survey: 移植件数調査
2007年より調査開始
 - 疾患
 - ドナータイプ
 - 移植種類
- APBMT Outcome Registry: 患者ごとの移植情報
2010年より調査開始
 - 100日報告
 - 疾患情報
 - 1年のフォローアップ調査

Least Minimum Dataset
(LMD)

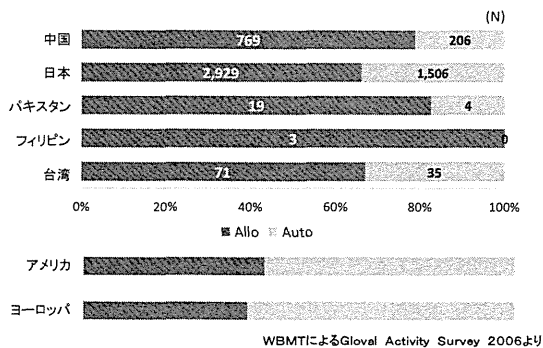
データのまとめ

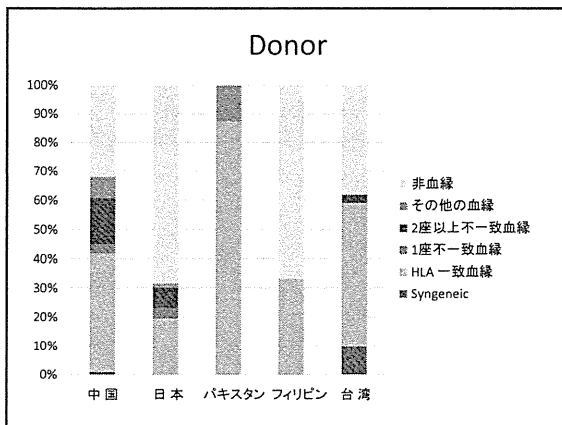
国名	Activity Survey			Outcome Registry	
	1986年から2010年まで 累積移植数	2010年 移植施設数	2010年 移植数	登録数	移植年
オーストラリア	18,921	40	1,389	0	
中国	8,360	48	1,732	991	2010
香港	2,295	2	160	0	
インド	2,131	22	599	0	
イラン	3,303	7	491	0	
日本	56,668	366	4,807	4,438/4,438	2009
韓国	15,833	43	1,773	0	
マレーシア	(1,703 until 2009)	-	-	0	
ニュージーランド	2,080	6	205	0	
パキスタン	312	2	44	23	2010
フィリピン	33	1	4	3	2010
シンガポール	1,396	4	155	0	
台湾	3,808	17	467	106/388	2009
タイ	1,517	6	131	0	
ベトナム	96	3	4	0	
Total	118,456	567	11,961	5,561	

年齢中央値

Country	Median age
中国	27
日本	49
パキスタン	21
フィリピン	22
台湾	40
全体	45

移植種別



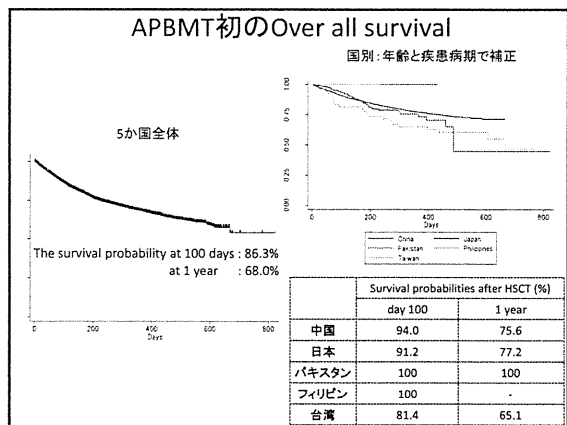


Acute GVHD Grade II-IV(%)

	中国	日本	パキスタン	フィリピン	台湾	合計
HLA一致血縁	15.8	33.2	14.3	0	42.9	29.0
1座不一致血縁	18.8	39.4	-	-	-	36.7
2座以上不一致血縁	25.6	31.3	-	-	100	30.2
その他の血縁	22.2	35.9	0	-	-	28.9
非血縁	23.4	36.1	-	0	40.7	35.2
合計	20.6	38.6	13.3	0	47.5	

Acute GVHD Grade III-IV(%)

	中国	日本	パキスタン	フィリピン	台湾	合計
HLA一致血縁	6.9	10.8	0.0	0.0	17.1	10
1座不一致血縁	18.8	20.2	-	-	-	20
2座以上不一致血縁	11.5	16.9	-	-	100	16
その他の血縁	11.1	7.7	0.0	-	-	9.2
非血縁	10.1	12.2	-	0.0	7.4	12
合計	10.2	13.7	0	0	16.4	



まとめ

- APBMTでは2007年より移植件数調査であるActivity Surveyを行ってきたが、2010年から個々の詳細な移植情報を収集すべくOutcome Registryを開始した。
- 現在までのAPBMTにおけるOutcome Registryへのデータ提出状況はAPBMT参加19か国中5か国と少なく、また、移植年も単年である。このため、今回の解析結果はあくまでpreliminaryな背景因子で補正されていない単変量での集計結果となっているが、これらはActivity Surveyでは得ることのできないデータとして初めて示された。

まとめ

- 今回の解析結果は、結果そのものより、参加各国にデータ提出の必要性を理解してもらいデータ提出を促すことに主眼を置いている。今後のデータの集積が、アジア地域内における国別の特色を明らかにしたり、アジアと欧米との比較検討を可能にすることが期待される。
- 2010年のマレーシアからのActivity Surveyの提出が遅延しているが、現在のデータ提出は各国のScientific Committeeを中心とした有志の協力で成り立っており、それぞれの国の事情によってはデータ提出が滞りかねない危険をはらんでいる。現在APBMT事務局では、各国からのデータ提出の利便性を高めるため、CIBMTRとのデータの共有や、提出方法を従来の紙ベースや電子媒体(Excel形式)だけでなく、インターネット経由の直接入力方式を模索するなど、さまざまな手段を検討中である。

「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（H23-免疫一般-010）」班
平成24年度第2回班会議（平成25年1月13-14日国立がんセンター）

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

臍帯血移植組織適合性共同研究グループ

1. 研究目的と研究組織

【目的】臍帯血移植は非血縁者間骨髄移植に比べて臍帯血中に存在するリンパ球のアロ反応性が弱いこと、HLA 一座、または二座不一致の臍帯血まで移植可能ではあるが、HLA 遺伝子型や HLA 以外の遺伝子多型の移植成績への影響に関しては十分に明らかになっていない。本研究では HLA 遺伝子型とこれらの遺伝子多型の臍帯血移植成績への影響について解析し、移植成績が向上する患者、ドナー間の多型遺伝子型組み合わせを特定することを目的として、全国共同研究を実施する。

【研究組織】（平成25年1月現在）

厚生労働科学研究費補助金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）H23-免疫一般-010「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」班 臍帯血移植組織適合性共同研究グループ

主任研究者： 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター； 屋部登志雄

共同研究者： 東海大学さい帯血バンク；加藤俊一、矢部普正、 中部さい帯血バンク；加藤剛二、森島泰雄、 兵庫さい帯血バンク；甲斐俊朗、 日本赤十字社北海道さい帯血バンク；折原武、高本滋、 同関東甲信越さい帯血バンク；高梨美乃子、橋本正美、 同近畿さい帯血バンク；松本加代子、 同九州さい帯血バンク；清川博之、森鉄男、 同近畿ブロック血液センター；福森泰雄、同九州ブロック血液センター；永吉裕二、 同関東甲信越ブロック血液センター；柏瀬貢一、東史啓、佐竹正博

研究事務局： 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター検査開発課

研究実施施設：日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターおよび共同研究者所属施設

2. 今年度の進捗状況

検体DNAの収集、核酸増幅（WGA）、HLAタイピングおよび保存

追加検体として633症例DNAを収集した。昨年度分と合計し 1969症例ペアの検体を保存した。これらのうちで初回移植、造血系悪性疾患症例について移植成績データがすでに得られているものは約1300症例であった。現在までに約半数の検体の全ゲノム増幅(WGA)処理を終えている。今後は残り症例のWGA処理および蛍光ビーズ法によりHLAアレルタイピングを順次行っていく予定である。A, B, C, DRについては同一タイピング法による再タイピングおよび新規のタイピング、DQ, DPについては新規にタイピングを行う。またKIRをはじめとしたNK細胞関連遺伝子および組織適合性抗原、サイトカイン遺伝子などのSNP解析を行っていく予定である。

NK細胞受容体 KIR解析

これまでに得られた667症例のKIR遺伝子型タイピング結果を用いて、臍帯血移植成績との関連解析を行っている。

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）

8. 「薬物代謝遺伝子多型と造血細胞移植」および「レニン・アンギオテンシン系と造血細胞移植後肺合併症」

「薬物代謝遺伝子多型と造血細胞移植」

森島班統合解析；409 ペアの非血縁者間骨髄移植症例について、生存と急性 GVHD の発症について、**Confirmative** な遺伝子多型 49 SNP（34 遺伝子）を検討。東海大学血液腫瘍内科から CYP3A5 の 3 つの SNP を提案し、解析を行った。

背景；CYP3A5 にはイントロンに存在する遺伝子多型によりスプライシングバリエーションが生じ、機能が欠損することが知られている。おもに、CYP3A4 で代謝されるカルシニューリンインヒビターの代謝に CYP3A5 も関与しており、機能が欠損数多型を保有する移植症例においては、サイクロスポリン、タクロリムスの血中濃度が高値になることがわかっている（Onizuka et al, Bone Marrow Transplantation 2010）。免疫抑制剤の血中濃度に影響する遺伝子多型であるが、移植後の経過に与える影響はわかっていないため、今回の統合解析により詳細を明らかにすることとした。

方法；CYP3A5 (rs4646450, rs776746, rs15524)について、II-IV および III-IV 急性 GVHD 発症率と生存に関して検討した。

結果；SNP rs4646450 C/T において、生存率で有意差を認めた。すなわち、TT；CT+CC では CT+CC の生存率が有意に高かった(HR 0.39, $P=0.037$)。しかし、この有意差はドナー側の遺伝子多型についており、レシピエント側ではなかった ($P=0.8$)。その他の遺伝子多型においてもレシピエント側で有意な所見は認められなかった。

「レニン・アンジオテンシン系と造血細胞移植後肺合併症」

背景；造血幹細胞移植後の非感染性移植後肺合併症におけるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の関与を明らかにし、予後不良な造血幹細胞移植後合併症における発症のメカニズム、予防法、治療法との関連を検討する。これまでの我々の研究結果から、移植後肺合併症にレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の関与が強く示唆される結果が得られているが、これらの結果の意味を特発性肺線維症 (IPF) におけるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の意義と比較し、マウスモデルにおいて裏付ける。今回の班会議ではパイロット研究としてのマウスモデルでの結果を示す。

方法；移植後肺合併症と造血細胞移植と無関係の特発性肺線維症 (IPF) の両者を比較し、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の肺繊維化に与える影響を推察する。また、マウスにおける肺レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の発現解析を行う。

結果；レシピエントでは AGT 領域における 6 つの SNP が IPS 発症と有意に相関していた。また、これらの IPS high risk な SNP 群は血漿中の angiotensinogen が有意に低値であった。このことから我々は *AGT*^{-/-}、*AGT*^{+/-}、*AGT*^{+/+} の各マウスにおいて、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の遺伝子 mRNA の発現量を評価した。この結果、*AGT*^{-/-}、*AGT*^{+/-} マウスでは ACE2 の発現量が低値であることが判明した。

考察；ACE2 は急性肺障害モデルにおいて、肺繊維化を防ぐ役割を果たしている。*AGT*^{-/-}、*AGT*^{+/-} マウスにおいて ACE2 の発現量が低値であることは、潜在的に肺繊維化に対して防御する力が弱い可能性が示唆される。

結論；移植後肺合併症発症の高リスク遺伝子多型は angiotensinogen の血漿中濃度が低値であることと関連する。これは、防御因子である ACE2 の発現量が低値であることに由来するものと考察する。

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）

1. 目的

NLRP3 は、IL-18 など炎症性サイトカイン発現を制御する免疫調整遺伝子で、感染防御やアポトーシス誘導に関与している。NLRP3 遺伝子の下流非翻訳領域(3'UTR)には 1 塩基多型(SNP; rs10754558; +29940G>C)があり、自己免疫疾患やアレルギー反応の疾患感受性との関連が報告されている。今回、NLRP3 SNP と同種造血幹細胞移植後転帰の関連を検証するため、臨床および機能解析を行った。

2. 対象と方法

(1) 臨床解析

対象は、HLA 12/12 アリルー一致非血縁者間骨髄移植を受けた前移植歴のない血液がん患者とそのドナー392組(133 AML, 83 ALL, 59 MDS, 64 CML, 49 ML, 4 MM)。患者・ドナー NLRP3 SNP を TaqMan SNP 遺伝子多型解析法で決定し、臨床転帰との関連を統計学的に解析した。

(2) 機能解析

健常人 34 名(男性 10 名、女性 24 名、20 歳から 38 歳)から末梢血を採取した。Whole blood culture system を用いて NLRP3 リガンド刺激し、上清中の IL-18 産生量を測定した。

3. 結果

(1) 臨床解析

NLRP3 SNP の多型頻度は、患者が CC 31%・CG 51%・GG 18%、ドナーが CC 31%・CG 47%・GG 22%。GG 型レシピエントへの移植は、CC または CG 型レシピエントへの移植に比べ、有意に生存率が低く(5 年生存率 34% vs. 50%, $P=0.006$, Fig 1)、

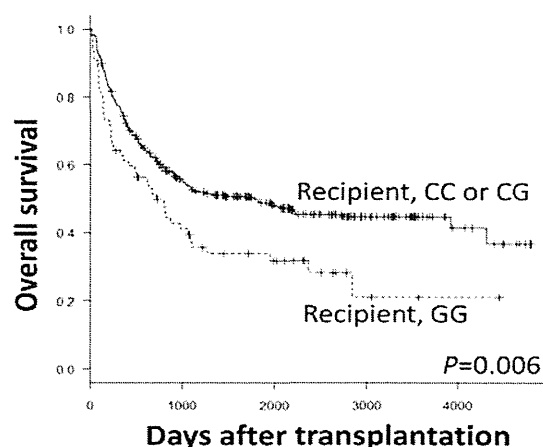


Fig 1. Kaplan-Meier analysis of overall survival according to the recipient NLRP3 genotype

移植関連死亡率も高い傾向がみられた(5年移植関連死亡率 39% vs. 27%, $P=0.09$)。これらは多変量解析でも裏付けられた。一方、GVHD や再発へ有意な影響はなかった。なお、ドナーの NLRP3 遺伝子多型は、移植後転帰へ有意な影響を及ぼさなかった。

(2) 機能解析

健常人の白血球を NLRP3 リガンドで刺激後、上清中の IL-1 β を測定したところ、NLRP3 GG 型の IL-1 β 誘導能は CC 型、CG 型より有意に高かった (Fig 2)。

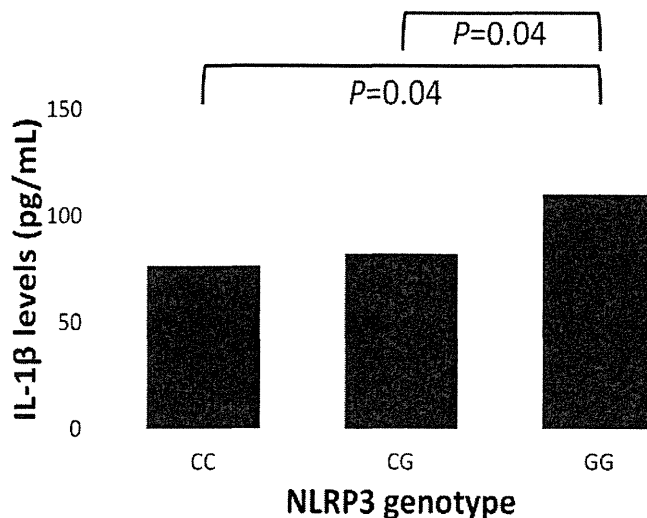


Fig 2. The influence of the NLRP3 genotype on IL-1 β secretion by *in vitro* stimulated leukocytes

4. 考察

血液がんへの HLA 一致非血縁者間骨髄移植において、NLRP3 SNP (+29940G>C) GG 型レシピエントは有意な予後不良因子であった。さらに、NLRP3 SNP は機能性多型で、GG 型白血球は、CC 型または CG 型に比べ IL-1 β 誘導能が高かった。したがって、GG 型レシピエントでは IL-1 β が産生されやすく、臓器障害の誘発により生存率が低下する可能性が示唆された。NLRP3 遺伝子多型解析は、移植予後推測だけでなく、NLRP3 SNP を標的とした治療戦略開発にもつながるかもしれない。

第2日目：平成25年1月14日（月）午前

平成25年1月14日（月）

11：30～12：00 高橋班

「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」
(H23-免疫-一般-008)

研究代表者 高橋 聡

11：30～11：40

本研究の概要と進捗状況

高橋 聡 （医科研）

11：40～11：50

低分子化合物によるヒト造血幹細胞の体外増幅の可能性

岩間 厚志 （千葉大）

11：50～12：00

骨髄内臍帯血ミニ移植 臨床 II 相試験

岡田 昌也、小川 啓恭 （兵庫医大）

「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」の概要と進捗状況

高橋 聡 東京大学医科学研究所先端医療研究センター分子療法分野

本研究グループは、臍帯血移植の安全性・成績向上と適応拡大を目指して移植合併症に対する新たな治療法の臨床開発を主目的として、グラフト生着・造血回復の促進、免疫抑制剤を用いない GVHD 治療、ウイルス特異的免疫再構築、などの課題について取り組んでいる研究者が各テーマについての臨床研究を効率的に進めるために課題横断的に議論の場の提供も含めたプラットフォームになることを目指している。従来のアプローチとは全く異なる視点によるこれらの研究の有効性が確認されれば、これまでの治療法との相乗効果が期待でき、加えて造血器疾患患者の中で多数を占める高齢患者に対する安全性の向上につながるため、その適応拡大が期待できるのみならず、日本発の新たな創薬につながることを期待できる。

各研究課題の進捗状況の概要については、以下の通りである：

- ① 生着不全・造血回復遅延に対する新規対応策の開発：
 1. 線溶系制御薬剤の開発(安藤潔、宮田敏男)：新規 PAI-1 阻害剤のマウス移植モデルへの投与により移植後の迅速で効率よい末梢血での造血回復反応が誘導されると共に、骨髄での造血幹細胞の増幅の促進効果も明らかにした。
 2. TNF- α シグナル遮断による移植前処置後に投与されたグラフト内造血幹細胞保護による造血回復促進法の開発 (大津真)：動物モデルを用いて炎症骨髄環境での造血幹細胞機能に対し負に影響する候補因子として TNF- α を同定し、その作用機序についても確認を行った。
 3. 新規低分子化合物を用いた臍帯血造血幹細胞増幅法の開発 (岩間厚志)：本抄録・次項を参照。
- ② HLA 近似第三者ドナーからの多ウイルス抗原特異的 CTL 療法の開発(森尾友宏、高橋聡、小島勢二、高橋義行)：複数ウイルス特異的 CTL 療法の技術を検証しており、予定通り本法で抗原特異的 T 細胞の誘導が確認され、10 日間の培養で 1-3log の増幅が確認された。
- ③ 新規プラスミン阻害剤による炎症性サイトカイン抑制を介した GVHD に対する新規分子療法の開発(服部浩一)：急性 GVHD マウスモデルにおいて YO-2 の効果を確認するとともに、GVHD 患者検体から血液凝固・線溶系因子の動態が MMP 活性、炎症性サイトカイン分泌を通じ、その重症度や病勢に深く関与していることを確認中である。

- ④ **臨床試験の支援**（谷口修一、宮村耕一、山口拓洋、小川啓恭、岡田昌也、長村文孝）：現在の行われている臍帯血移植において前処置法の検討を行った。さらに成人患者への移植の安全性と効果を確認するための前方視的臨床試験を進めるとともに、統計解析の手法に関する検討を進めた。
- ⑤ **臍帯血バンク支援**（高梨美乃子）：将来にわたっての安定的な臍帯血の供給を実現するために、現在の臍帯血バンクの課題整理を行い、議論を進めた。

低分子化合物によるヒト造血幹細胞の体外増幅の可能性

岩間厚志 千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学

造血幹細胞を操作し治療に用いる上で、造血幹細胞の体外増幅の実現化は大きな課題である。その臨床的な有用性としては、臍帯血造血幹細胞のように十分量の造血幹細胞が得られない供給源からの造血幹細胞増幅や、造血幹細胞を用いた遺伝子治療への応用等があげられる。これまでに、サイトカインによって増幅された造血前駆細胞・分化細胞を移植に併用することにより、造血抑制からの早期回復が得られることが示されている。近年では、低分子化合物を用いた増幅法が試みられつつあり、DNA メチル化酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、低分子銅キレート化合物、アリル hidrocarbon 受容体 (AhR) 阻害剤などの有用性が報告されている。われわれは、トロンボポイエチン受容体の低分子化合物アゴニストをトロンボポイエチンの代わりに用いることにより、造血幹細胞を 3 倍に増幅することに成功した。このアゴニストはトロンボポイエチンと比較して STAT5 を持続的に活性化するものの、トロンボポイエチンで活性化される STAT3 を活性化しないなど、蛋白製剤とは異なるシグナル制御を行うことが明らかとなった。この知見は低分子化合物によるサイトカインシグナル操作の可能性を示唆するものである。さらに、天然化合物ガルシノールがそのヒストンアセチル化阻害活性を介して造血幹細胞の増幅を促進することを見だし、造血幹細胞のエピジェネティック操作の可能性も見えてきた。新規の有効な低分子化合物も開発中であり、AhR 阻害剤 (SR-1) に匹敵する効果が得られつつある。これらの化合物を併用することにより造血幹細胞増幅効率のさらなる向上が期待される。細胞治療に向けた造血幹細胞操作の状況を報告したい。

平成24年度第2回合同班会議 (厚労科学研究)
「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」班

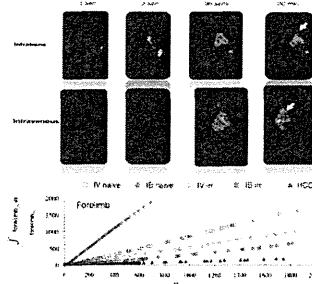
骨髓内臍帯血ミニ移植 臨床Ⅱ相試験

兵庫医科大学 内科学講座血液内科
岡田昌也、小川啓恭

2013. 1. 14

Contact with the bone marrow microenvironment readresses the fate of transplanted hematopoietic stem cells

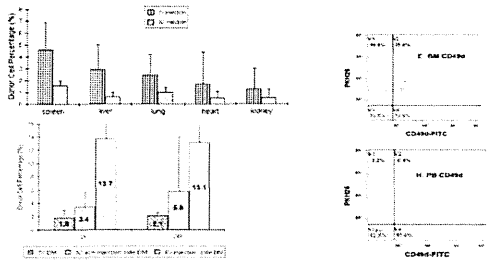
Michela Masello¹, Marina Podesta², Cecilia Marini¹, Silvia Morelli¹, Clara Cavarini¹, Valerio Pizzo¹, Gianluca Uberti¹, Giovanni Curni¹, Antonio Locelli^{1,2}, Francesco Frasson^{1,2}, and Gianmarco Sambucetti^{1,2}



Experimental Hematology 2013, 39:464-477

Nonhuman primate allogeneic hematopoietic stem cell transplantation by intrasosseus vs intravenous injection: Engraftment, donor cell distribution, and mechanistic basis

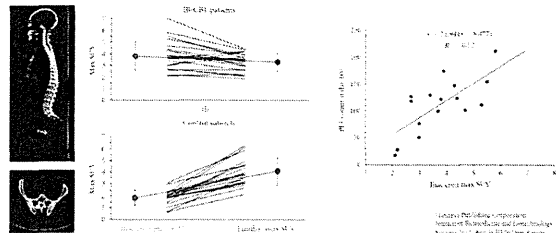
Qi Liang¹, Peter K. H. Chow^{1,2}, Francesco Frasson¹, Cristó ML. Pinheiro¹, Peik K. Tai¹, Anon Pizutti¹, and William Yong-Khee Heang^{1,2,3,4}



Experimental Hematology Volume 36, Issue 11 2008 1556 - 1566

Intrabone Transplant of Cord Blood Stem Cells Establishes a Local Engraftment Store: A Functional PET/FGD Study

Cecilia Marini¹, Marina Podesta², Michela Masello¹, Selene Capitano¹, Francesco Itri¹, Silvia Morelli¹, Massimo Brignone¹, Andrea Balgalupo¹, Michele Piana¹, Francesco Frasson¹ and Gianmarco Sambucetti^{1,2}



Journal of Cellular Biochemistry 2013, 107:100-108

骨髓内臍帯血ミニ移植Ⅱ相試験

主要評価項目

ドナー型生着率をprimary endpointとする。
「ドナー型生着」は、好中球数が3ポイント以上の連続した検査日においてに回復し、かつキメリズム解析において移植後60日以内にドナー由来細胞が90%以上になることと定義する。

目標症例: 第Ⅱ相試験30例
参加施設: 多施設共同前方向試験

骨髓内臍帯血ミニ移植Ⅱ相試験

主要評価項目

ドナー型生着率をprimary endpointとする。
「ドナー型生着」は、好中球数が3ポイント以上の連続した検査日においてに回復し、かつキメリズム解析において移植後60日以内にドナー由来細胞が90%以上になることと定義する。

副次的評価項目

- 2-1 急性GVHDの頻度と重症度
- 2-2 慢性GVHDの頻度と重症度
- 2-3 移植後1年の時点での生存率
- 2-4 移植後1年の時点での無病生存率
- 2-5 移植後1年以内の治療関連死
- 2-6 感染症(細菌・真菌・ウイルス・その他)の発生頻度
- 2-7 移植後の免疫回復

研究期間および目標登録数

研究期間

本試験の登録期間は、2011年1月1日から 2015年12月31日までとし、追跡期間は移植実施後1年とする。

第II相試験の目標登録数

第II相試験における目標登録症例数は、30例とする。

本邦における造血幹細胞移植学会の平成18年度調査報告で、臍帯血移植の生着率71.9%をもとに、本試験のプロトコルによって、ドナー型生着率が95%程度まで改善されることが期待される。そこで、期待成功率95%、閾値成功率70%として、成功率70%以下の治療を $\alpha=0.05$ 、95%以上の治療を $\beta=0.20$ の過誤の確率で棄却する条件下で、二項累積分布関数に基づいて必要症例数を計算すると36例となる。すでに終了した第I相部10例を第II相部の解析に組み入れるため、第II相部の必要症例数は26例となり、脱落例を勘案し設定した。

患者選択基準（抜粋）

- (1) 従来の治療では治癒が望めない造血器悪性腫瘍患者
急性骨髄性白血病:初回寛解期以外
急性リンパ性白血病:初回寛解期以外
極めて予後不良の初回寛解期急性白血病(寛解導入に複数コースの化学療法を要した初回寛解急性白血病、Ph陽性急性白血病など)を含む
慢性骨髄性白血病:第一慢性期以外
治療抵抗性悪性リンパ腫
骨髄異形成症候群、int-2以降、寛解後再発
- (2) 初回造血幹細胞移植
- (3) 55歳以上、70歳未満の成人患者
55歳未満で臓器障害などにより骨髄破壊的前処置が適応と成らない患者
- (4) 非血縁者にHLA一致ドナーが得られない患者、あるいはHLA一致ドナーがいても、患者の病態から早急に移植を必要とする患者

前処置

	Day -6	-5	-4	-3	-2	-1	0
TBI (3Gy / day)							1
Fludarabine (40 mg/m ² /day)		1	1	1	1	1	
CY (50 mg/kg/day)		1					

GVHD予防

シクロスポリン

移植3日前(day -3)よりシクロスポリン3mg/kgを24時間持続点滴する。目標血中濃度は、250~450 μ g/mlとする。生着後、内服が可能であれば経口投与に切り替え(持続投与時の2.5倍量を分割投与)、GVHDがなければ漸減する。

ミコフェノール酸モフェチル

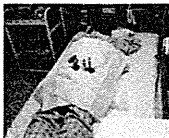
移植前3日(day -3)より、移植後30日まで、30 mg/kg/day (分2ないし分3)で経口投与する。

支持療法

G-CSF

移植後day 1ないしday5よりG-CSFを投与する。

骨髄内臍帯血移植法

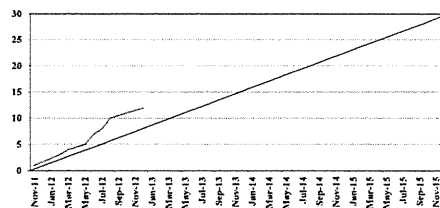


移植前投薬
移植前投薬として、ヒドロコルチゾン100mg、塩酸ヒドロキシジン25mg等の投与を行う。移植時に必要に応じてミダゾラム等による鎮静を行う。

移植手技
臍帯血を37°Cの恒温槽で解凍後、通常の骨髄穿刺と同様の手技で腸骨の1-2ヶ所に穿刺を行い、臍帯血を注射する。臍帯血の注入口は、消毒の法を厳格に守る。
予防的抗生剤投与
手技に伴う骨髄炎を予防するため、移植日には抗生剤を経静脈投与する。



進捗状況



興味のある方は下記まで、ご連絡ください
masaya@hyo-med.ac.jp

成田赤十字病院 血液内科7例
兵庫医大 血液内科4例
川崎医大 血液内科1例
計12例

第2日目：平成25年1月14日（月）午前

平成25年1月14日（月）

12：00～12：30 鷓池班

「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」(H22-がん臨床-一般-028)

研究代表者 鷓池 直邦

- 1) 成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)に対する骨髄非破壊的移植前処置を用いた非血縁臍帯血移植の安全性検討試験(7分)
九州がんセンター 血液内科 崔 日承
- 2) 成人T細胞性白血病リンパ腫の同種造血細胞移植後の再発・再燃に対する治療における免疫モニタリング(8分)
九州がんセンター 血液内科 崔 日承
- 3) ATLに対するHTLV-1 Tax特異的T細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた免疫療法(15分)
九州がんセンター 血液内科 末廣 陽子

研究班による臨床試験

試験		幹細胞源	対象病型	前処置	進捗状況
第1期 (NST-1)	第1相	同胞末梢血	急性型リンパ腫型	Fludara BU ATG	終了 (2001-02) <i>(Blood, 2005, BMT 2011)</i>
第2期 (NST-2)	第1相	同胞末梢血	急性型リンパ腫型	Fludara BU	終了 (2003-06) <i>(BBMT, 2008, BMT 2011)</i>
第3期 (NST-3)	第2相	血縁末梢血	急性型リンパ腫型	Fludara BU	追跡中 (新規登録終了) (2006.9-2011.9)
第4期 (NST-4)	第1相	非血縁骨髓	急性型リンパ腫型	Fludara BU TBI	追跡中 (新規登録終了) (2009.2-2011.4)
免疫療法 (ATL-DC-1)	第1相	(自家樹状細胞 + ペプチド)	全病型 (既治療例)		九州大学 東京医科歯科大学
第5期 (NST-5)	第1相	非血縁臍帯血	急性型リンパ腫型	Fludara Mel TBI	登録中

成人T細胞白血病リンパ腫 (ATL) に対する 骨髄非破壊的移植前処置を用いた非血縁臍帯血移植の 安全性検討試験

ATL-NST-5 (UMIN-CTR UMIN000007927)

対象

化学療法などによって病状がCRまたはPRIにコントロールされており、適切な血縁・非血縁 (JMDF) ドナーを有さない症例。

目標症例数

15例

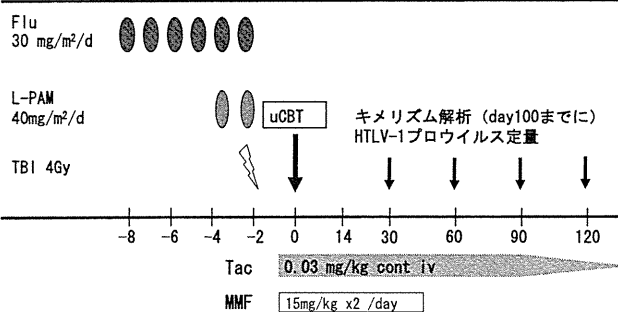
主要評価項目

移植後100日までの生着達成及び100日時点での生存

治療計画

移植前処置

(ATL-NST-5)



ATL-NST-5

施設IRB承認 (15施設)

北海道大学血液内科
 虎の門病院血液科
 国立がん研究センター中央病院
 京都大学血液内科
 大阪市立大学血液内科
 長崎大学原研内科
 大分県立病院血液内科
 大分大学病院血液内科
 佐世保市立総合病院血液内科
 九州大学病院血液腫瘍内科
 浜の町病院血液病科
 久留米大学血液腫瘍内科
 今村病院分院血液内科
 熊本医療センター血液内科
 九州がんセンター血液内科

進捗状況

	本登録	本登録日
九州がんセンター	1	2012. 9. 10
国立がん研究センター中央病院	1	2013. 1. 7
計	2	

移植実施症例数 1例 (1月15日、2例目の移植予定)

ATL-NST-5

症例登録について

施設IRBの承認が得られましたら、まず、データセンター (JCRSU) へ参加施設登録をお願い致します。

症例がございましたら、抗HLA抗体検査をお願い致します。
 (専用伝票、研究費負担)
 抗HLA抗体陽性の場合、特異抗原同定検査を実施します。
 (研究費負担)

抗HLA抗体陰性、抗HLA抗体に反応する抗原のない臍帯血ユニットが得られる場合、ご登録をお願い致します。
 (患者登録票→FAX→データセンター (JCRSU))

登録確認次第、MMFを送付致します。

成人T細胞性白血病リンパ腫の同種造血細胞移植後の再発・再燃に対する治療における免疫モニタリング

研究代表者: 鶴池直邦
 国立病院機構九州がんセンター 血液内科
 〒811-1395 福岡市南区野多目3-1-1
 TEL: 092-541-3231 / FAX: 092-542-8503 E-mail: nuike@nk-

研究事務局: 崔 日承(ちえ いるすん)
 国立病院機構九州がんセンター 血液内科
 〒811-1395 福岡市南区野多目3-1-1
 TEL: 092-541-3231 / FAX: 092-542-8503 E-mail: ilchoi@nk-cc.go.jp

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)成人T細胞性白血病(ATL)の根治を目指した細胞療法確立およびそのHTLV-1抑制メカニズムの解明に関する研究(H22-がん臨床一般-028)

研究の目的

成人T細胞性白血病リンパ腫(ATL)の同種造血細胞移植後の再発・再燃に対する治療における末梢血リンパ球の推移をフローサイトメトリー解析にて、プロスペクティブにモニタリングする(免疫モニタリング)。
 また、HTLV-1プロウイルス量や可溶性IL-2Rを指標とした治療効果、再発後の各種治療法、GVHD等の移植後臨床像と免疫モニタリングとの関連を検討する。

移植後再発・再燃に対して抗CCR4抗体(モガムリズマブ)を投与する例においては、その投与前、後の免疫モニタリングを行う。

研究デザイン

多施設共同で実施する、前方視的観察研究

適格基準

- 1)同種造血細胞移植後に再発・再燃したATL症例
- 2)20歳以上
- 3)本人より本臨床研究について文書による同意が得られている

除外基準

担当医により本臨床研究への参加が不適切と判断される

目標症例数

30例

研究実施期間

総研究実施期間: 2013年2月1日～2016年1月31日(3年間)
 登録期間: 2013年2月1日～2015年1月31日(2年間)

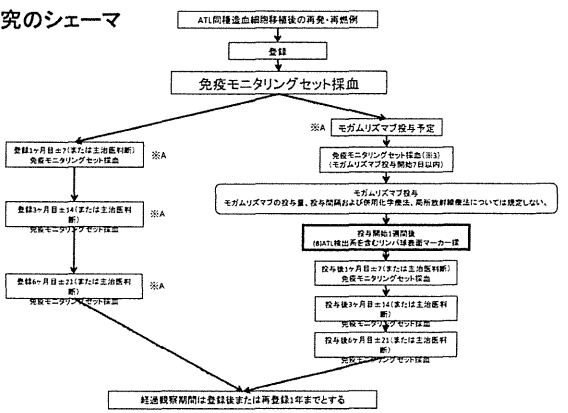
評価項目

主要評価項目:
 末梢血リンパ球(T細胞、NK細胞およびB細胞)の推移、動態。

副次評価項目:

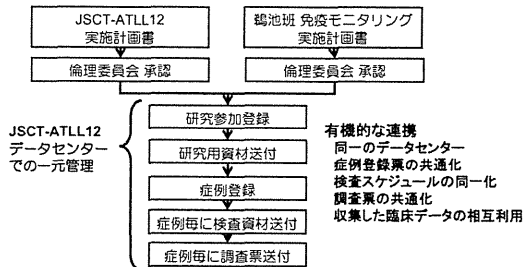
- 1) 移植後再発・再燃に対する治療の効果
 (臨床所見、HTLV-1プロウイルス量、可溶性IL-2Rを含む)
- 2) 移植後再発・再燃に対する治療後の急性および慢性GVHDの発現・増悪の程度
- 3) 全生存期間

研究のシエマ



JSCT ATLL12との連携について

同種造血細胞移植後に再発・再燃した成人T細胞性白血病/リンパ腫患者の治療法および予後に関する前向き観察研究
 本モニタリング研究とJSCT-ATLL12の対象が同一であることから、独立した臨床研究ではあるが、データセンターを共通とさせていただき、Dataの相互利用が可能となるよう、また、参加していただく先生方の負担が増えないように検討した。



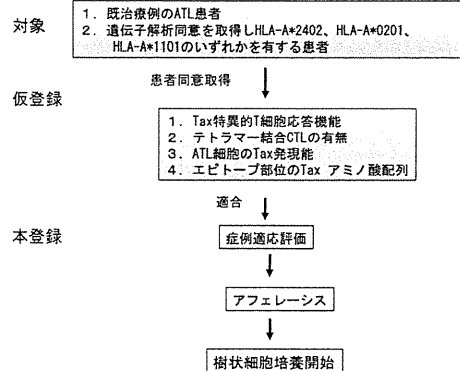
ATLに対するHTLV-1 Tax特異的T細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた免疫療法

目的: ATLの新規治療法の開発を目的とし、ATL患者に対するTaxエピトープペプチドパルス樹状細胞療法の安全性を検討する

試験デザイン: 第1相試験

- ◆対象: 既治療のATL患者
HLA-A*2402、HLA-A*0201、HLA-A*1101を有する患者
- ◆登録期間: 2011年12月から2年間
- ◆追跡期間: 最終症例登録から2年間
- ◆試験デザイン: 樹状細胞2段階投与と漸増試験
- ◆予定登録数: レベル1 (3名)、レベル2 (3名) (計6~12例)
- ◆主要評価項目: 既治療ATL症例におけるペプチドパルス樹状細胞ワクチン投与の安全性の検討
- ◆副次評価項目: ATL患者における樹状細胞製造の実現可能性
Tax特異的T細胞応答の誘導
抗ウイルス (HTLV-1) 効果
抗白血病 (腫瘍) 効果
(実施施設: 九州大学、東京医科歯科大学)

治療開始までのプロセス



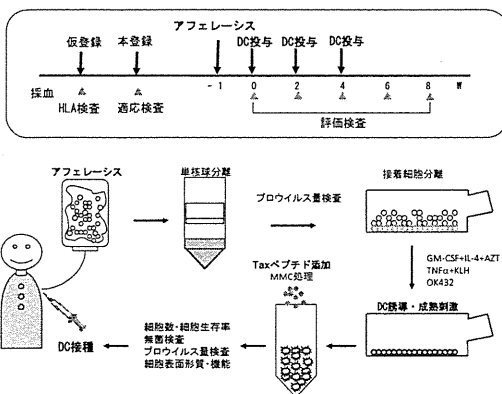
登録患者

	年齢/性別	病型	症登録本登録	臨床試験開始	実施施設
ATL-DC1-L1-1	67/F	急性型	2012. 4. 2	—	—
ATL-DC1-L1-2	70/M	急性型	2012. 8. 7 2012. 9. 15	2012. 9. 20	九大病院
ATL-DC1-L1-3	68/F	急性型	2012. 4. 2 2012. 11. 7	2012. 11. 8	九大病院

患者背景

	ATL-DC1-L1-2	ATL-DC1-L1-3
年齢/性別	70/M	68/F
PS	1	1
ATL病型	急性型	急性型
治療歴	mEPOCH (4) → SD	mEPOCH (4) → PR
	Lenalidomide (2) → SD	Poteligeo (8) + PVP (4) → PR
前治療からの期間	2.5M	1.5M
診断からの期間	14M	11M
HLA-A	24:02	24:02
合併症	アレルギー性皮膚炎	乳癌術後、糖尿病、NASH

臨床試験スケジュール



有害事象 臨床症状

	ATL-DC1-L1-2	ATL-DC1-L1-3
注射部位反応	G1 発赤、硬結	G1 発赤、硬結
発熱	G1 38 ~ 39℃	+ 微熱
皮膚炎/皮疹	G2 痒痒、皮膚炎	G2 皮疹
口内炎	G1	—
下痢	G1	—
膀胱炎	—	G2

有害事象 臨床検査

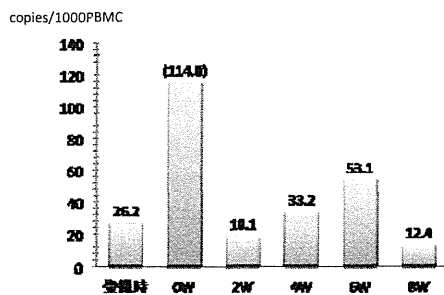
	検査値異常	ATL-DC1-L1-2	ATL-DC1-L1-3
非血液毒性	アルブミン低下	G2	—
	肝機能異常	G2	—
	ALP上昇	G2	—
	AMY上昇	G2	—
	Cr上昇	G2	—
	K上昇	G2	—
	CRP 上昇	G2	—
血液毒性	Hb低下	G3	—
	Pit低下	G2	—

樹状細胞製剤

	ATL-DC1-L1-2		ATL-DC1-L1-3	
無菌検査				
細菌・真菌培養	陰性		陰性	
エンドトキシンテスト	陰性		陰性	
マイコプラズマ検査	陰性		陰性	
細胞数	5X10 ⁶ X 3		5X10 ⁶ X 3	
viability	> 90%		> 90%	
purity	85.5%		79.2%	
表面マーカー	CD11c+CD14-HLA-DR+ CD80+CD83+CD86+CD40+		CD11c+CD14-HLA-DR+ CD80+CD83+CD86+CD40+	
HTLV-1 provirus	PBMC	DC	PBMC	DC
copies/1000cells	114.8	→ 5.9	36.7	→ 5.0

ATL-DC1-L1-2

抗ウイルス効果 末梢血 HTLV-1プロウイルス量



抗腫瘍効果

	ATL-DC1-L1-2		ATL-DC1-L1-3	
	治療前	8W	治療前	5W
ATL cells / μ L	1081.8 (6%)	327.9 (3%)	0 (0%)	0 (0%)
LDH IU/L	473	245	250	236
sIL-2R U/mL	19056	1866	806	1053
LN腫大	PR		評価未施行	

まとめ

- 急性型ATL患者2症例が臨床試験に本登録され樹状細胞ワクチンを投与。有害事象に関しては、臨床症状、検査値異常（非血液毒性）ともに grade 2 までであり、安全に臨床試験を施行できた。
- アフエレーシスによる単核球採取、樹状細胞調製の結果、純度の高い成熟した樹状細胞が得られた。また樹状細胞製剤において、HTLV-1プロウイルス量は培養開始時と比較して低値であり、培養中にHTLV-1の増殖は認めなかった。
- 接種部局所反応、発熱、皮膚症状等、検査値異常を伴った免疫反応様の病態を呈し治療効果との関連性が推察された。
- 経過中一過性のリンパ球数、CD8+細胞数の増加を認めたが、Tax-tetramer陽性細胞数は変化を認めなかった。
- 樹状細胞ワクチン投与により、1症例目はPR、2症例目は途中経過でSDの状態が保たれており臨床的効果が認められている。