

ウイルス抗原特異的細胞傷害性T細胞による造血幹細胞移植後の難治性感染症の治療

研究分担者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学講座 教授

研究協力者 高橋義行 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学講座成長発達医学 准教授

A. 研究目的

造血幹細胞移植後の患者における難治性ウイルス感染症に対し、臨床応用可能なウイルス特異的 CTL の体外増幅法を開発し、移植後の難治性ウイルス感染症に対して臨床第 1、2 相試験を行う。

B. 研究方法

臨床第 1, 2 相試験として造血細胞移植 HLA-A2 または A24 陽性ドナーの末梢血 50ml から、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基づき 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 細胞に加え閉鎖的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、無菌試験によってウイルス特異的 CTL 製剤の投与基準を評価した。初回投与細胞数 1×10^5 /kg より漸増し、計 3 回の投与を行い、投与前後の末梢血ウイルス DNA の評価を行った。

C. 研究結果

造血細胞移植の HLA-A2 または A24 陽性ドナー末梢血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 17 名で行い、それぞれ 4 名、8 名で初回投与基準を満たす細胞数の増殖が得られた。GCV 耐性 CMV 感染を起こした患者 4 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。特に 2 名の患者で CTL 投与前に GVHD の既往があったが、CTL 投与後に GVHD の再燃は認めなかった。投与 4 名全例で投与前と比較して、投与後に末梢血中の CMV 特異的抗原テトラマー陽性 CTL の比率が増加し、4 名中 3 名の患者で CTL 投与後 CMV-DNA の低下、消失を認めた。1 名は 2 回の CTL 投与後にウイルス DNA の減少が見られなかったため、ホスカピルの投与を行い CMV-DNA は消失した。効果のあった 3 例ではその後の経過でも血液中の CMV-DNA は消失しているが、そのうち 1 例で CMV による脳室炎を発症し、シドフォビルの投与に変更した。現在 5 例めの症例に CTL 投与が行われ、現在のところ急性反応の副作用は認めていない。今後、合併症、効果について引き続き経過観察予定である。

D. 考察

健常人ドナーおよび骨髄移植ドナーから 3-4 週間の培養期間で CMV または EBV 特異的 CTL を臨床応用可能なレベルまで培養増幅することができた。当院倫理委員会での承認後、臨床第 1 相試験が開始され、予定していた難治性 CMV 感染 5 例に投与が終了し、最終患者の観察期間中である。これまでの CTL 投与においていずれも安全に投与でき、投与終了の 4 例中 3 例で効果が見られた。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% であることから、リスクの高い移植患者ではあらかじめドナーより培養し凍結しておくことに加え、第 3 者からの CTL バンクの準備が望ましいと考えられた。

E. 結論

臨床第 1 相試験に予定していた 5 例の投与が終了し、最終患者の観察期間中である。ウイルス特異的 CTL 療法はドナーリンパ球輸注療法に比べて安全性が高く、有効性も期待できる。現在、第 3 者から誘導したウイルス特異的 CTL を培養、凍結保存して CTL バンクを作成し、必要に応じて投与を行う臨床試験の策定中である。

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研究

研究分担者	品川克至	岡山大学病院	血液・腫瘍内科	講師
研究協力者	山筋好子	岡山大学病院	血液・腫瘍内科	客員研究員
	前田嘉信	岡山大学病院	血液・腫瘍内科	助教

A. 研究目的

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-SCT) 後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植 (IBM-SCT) では少ないと考えられる。マウスモデルでは IBM-SCT では IV-SCT よりも GVHD が抑制されることが報告されているが、我々は IBM-SCT では IV-SCT 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 IBM-SCT の影響に関して IV-SCT と比較検討を行った。

B. 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-SCT と IBM-SCT 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経時的に評価、移植 6 週間後に気管支肺胞洗浄 broncho-alveolar lavage (BAL) を行い回収液中の細胞を解析、また肺組織の病理所見を検討した。さらに移植 2 日後の肺組織中ケモカイン CXCL1、CCL2、3、5、8 の mRNA 発現を測定した。次に donor マウスに FVB/N lac⁺、レシピエントに BALB/c を用いた系で、*in vivo* bioluminescence imaging (BLI) 分析により移植後輸注細胞の体内における時間的、場所的推移を IV-SCT 群と IBM-SCT 群で比較検討した。

C. 結果

移植後の体重減少は IBM-SCT 群で IV-SCT 群に比べて少なく ($p < 0.05$)、また GVHD スコアが低かった ($p < 0.01$) ため、IBM-SCT 群で生存率が高かった。また移植 6 週後の BAL 回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は IBM-SCT 群において IV-SCT 群よりも有意に少なく (9.6 ± 3.5 vs. $21.3 \pm 0.5 \times 10^4/\text{ml}$; $p < 0.05$)、組織学的にも IBM-SCT 群において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。BLI 分析では、移植後 1h では IV-SCT 群でほとんどの細胞が肺に取り込まれたが、IBM-SCT 群では輸注下肢にとどまり肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった (3.1 ± 0.7 vs. $16.7 \pm 1.1 \times 10^5$ photons/sec/animal, IBM-SCT vs. IV-SCT, $p < 0.01$)。また移植後 2 日目の各種ケモカイン mRNA 発現は、IV-SCT 群で高い傾向にあり CCL2 では有意であった (0.098 ± 0.020 vs. 0.020 ± 0.003 units/GAPDH mRNA; $p < 0.05$)。以上の 2 つの結果は syngeneic の系においても同様であり (2.4 ± 0.6 vs. $11.6 \pm 1.3 \times 10^5$ photons/sec/animal; $p < 0.01$)、移植早期の輸注細胞の肺へのとりこみは IV と IBM の輸注手技の違いによると考えられた。移植後 5 日目の BLI 分析では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT 群と IBM-SCT 群で差はなかったが (4.8 ± 1.1 vs. $4.6 \pm 2.5 \times 10^7$ photons/sec/animal; $p = 0.94$)、allogeneic の系では移植後 2 日目よりさらに有意に IV-SCT で増加した (50.9 ± 6.6 vs. $16.0 \pm 6.2 \times 10^7$ photons/sec/animal; $p < 0.05$)。以上の結果より移植後 2 日目の各種ケモカイン mRNA 発現増加は allo 免疫反応を誘導していると考えられた。

D. 考察

IPS マウスモデルによる IV-SCT と IBM-SCT の比較研究は過去になく、今回肺局所のリンパ球の集積の差異が経時的に *in vivo* 観察され、その機序がケモカインレベルと BLI による動態解析で証明された意義は大きいと思われる。今後さらに IPS 発症に関与する T 細胞でのサイトカインや細胞表面マーカーの発現変化を明らかにする事が課題である。

E. 結論

今回検討した IPS マウスモデルでは IPS は IV-SCT 群に比し IBM-SCT 群において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の輸注細胞の肺での物理的動態およびケモカイン発現の差異がこれらの現象に関与していると考えられた。

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）

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。

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 講師

A. 研究目的

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安全性と有効性を確認する臨床試験を実施している。

本分担研究を通じて得られる、臍帯血の洗浄・濃縮技術や、骨髄への注入技術の確立、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する。

B. 方法

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注入する。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 年を予定していたが 3 年間の試験期間延長を行った。追跡期間は最終症例の移植後 1 年。

C. 結果

本年は新たに 2 例に対し試験を実施した。いずれも他施設からの登録だったが、臍帯血ユニットの解凍、洗浄・濃縮や、骨髄内への注入などは問題なく実施することができた。2 例とも重篤な有害事象は認めず、また生着不全も認めなかった。これまでの試験実施症例数は計 12 例となった。

D. 考察

造血幹細胞を用いた臨床研究を行う際には、改訂された厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」との関係を確認した上で、実施の判断をする必要がある。現在、さらに登録症例数を増やすべく、本試験への参加施設の拡大を検討している。

E. 結論

引き続き、安全性に配慮しながら本試験を進める。

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

研究分担者 森尾友宏 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授
研究協力者 清水則夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学分野 准教授
今井耕輔 東京医科歯科大学大学院小児・周産期地域医療学講座 准教授
中谷夏織 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 大学院生

A 研究目的

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することが重要である。本研究は、骨髄内造血細胞移植における免疫学的再構築や移植後合併症の詳細かつ簡便な解析法を開発することを目的とした。

B 方法

1. 検体は東京医科歯科大学医学部附属病院において実施した造血細胞移植患者の血液・尿などを用いた。
2. 高感度多項目迅速微生物測定法：現行の 12 ウイルス・リアルタイム PCR 同時測定系を 96 well フォーマットで実施した。また呼吸器関連ウイルスなどについては Parainfluenza virus, Metapneumovirus, RS virus などのモジュールを追加した。測定については検体調製から測定までの全自動系について企業と共同で開発に当たった。
3. 免疫学的再構築評価法：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 系で測定した。測定結果は μgDNA あたりのコピー数として表し、RNaseP および GAPDH をコントロールとして用いた。(両検査は医学部倫理審査委員会の承認を得て行った)

C 結果

1. 高感度多項目迅速微生物測定法：約 50 検体の測定から今までの capillary PCR: melting curve analysis 法とほぼ同程度の感度が得られることを確認した。また喀痰サンプルからのウイルス検査において実際に Parainfluenza 3 型などの検出が可能になり臨床に有用な情報を提供した。全自動化については引き続き検証を続けている。
2. 免疫学的再構築評価法：117 名の検体にて移植後 1 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月、24 ヶ月時点での解析を行い、移植後感染症（細菌、真菌、ウイルス）、生存との相関について解析した。その結果、単変量解析においては TRECs, KRECs が移植後感染症や生存率と相関することが明らかになりつつある。また TRECs, KRECs の回復に寄与する因子についても解析を加えた。

D 考察

移植後の定量的なモニタリングシステムの開発は新規移植技術評価において極めて重要である。微生物モニタリングシステムは既にいくつかの方法が開発されており、今後は multiplex 化、低価格化、全自動化が課題と考えている。免疫学的再構築評価法については KRECs, TRECs が移植後の感染症や予後を見定めるものとなることを期待している。実際には移植後 1 年後のデータとその後の感染症、合併症の関連なども重要な課題であり、今後症例を蓄積していく必要がある。またこの測定系については、全自動化に載せることにより、さらに簡便かつ低価格に解析ができるようになると思われる。

「制御性 T 細胞治療による
臨床肝移植における
免疫寛容誘導法の開発」
に関する研究

「制御性 T 細胞治療による臨床肝移植における免疫寛容誘導法の開発」に関する研究

研究代表者 藤堂 省（北海道大学・大学院医学研究科・移植外科講座・教授）

研究分担者 奥村 康（順天堂大学大学院医学研究科、アトピー疾患研究センター、教授）
垣生 園子（順天堂大学医学部、免疫学講座、教授）
寺岡 慧（国際医療福祉大学 熱海病院、病院長）
場集田 寿（順天堂大学医学部、免疫学講座、助教）
山下 健一郎（北海道大学大学院医学研究科、移植外科学講座、准教授）
清野 研一郎（北海道大学遺伝子病制御研究所、病態研究部門、教授）
上本 伸二（京都大学大学院医学研究科、移植外科講座、教授）

A. 研究目的

肝臓移植患者は拒絶反応制御の為に、免疫抑制剤を生涯服用しなければならず、副作用等の危険性に常に晒される。免疫抑制剤を軽減させる、或るいわ究極的には免疫寛容の誘導が必須である。本研究は生体肝移植患者を対象とし、ドナー抗原特異的な制御性T細胞を用いた細胞治療により、より安全で確実な免疫抑制軽減および免疫寛容誘導法の確立を目的とする。

B. 方法

対象 成人生体肝移植レシピエントおよびドナー。

制御性T細胞の*ex vivo*誘導：レシピエントおよびドナーより成分採血法にて採取した末梢単核球細胞(PBMC)を、症例4以降はレシピエント脾細胞も、抗CD80抗体および抗CD86抗体存在下に2週間共培養し制御性T細胞を誘導した。培養細胞中のCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺T細胞をFACSにて解析し、免疫抑制能をMLR法にて検討した。培養制御性T細胞を用いた免疫抑制療法 プログラフ(TAC)、セルセプト(MMF)、ステロイド(MPS)の3剤併用で、移植手術翌日からMPS 20 mg/day投与し、MMFは500 mg/day～2000 mg/dayまで増量した。TACは移植後1日2回で開始し、血中トラフ濃度を術後早期は8-12 ng/ml、3ヶ月以降は6-8 ng/mlで維持した。サイクロフォスファミド(CP)を術後4日目に投与し、培養細胞を13日目に輸注した。定期的に血液生化学検査や免疫学的検査および肝生検を行い、グラフト機能、拒絶反応の有無や免疫状態をモニタリングしつつ免疫抑制剤を段階的に減量。MPSは1週間毎5 mg/day減量し、術後5週目に中止。MMFは適宜減量し、術後3ヶ月以内に中止。TACは術後6ヶ月目より1日1回投与とし、以降3ヶ月毎に週3回、2回、1回投与へ漸減し、最終的に中止した。

C. 結果

(1) 制御性T細胞の*ex vivo*誘導 培養開始時の総リンパ球数 $9.3 \pm 2.2 \times 10^9$ 個、レシピエントリンパ球数 $5.9 \pm 2.1 \times 10^9$ 個は2週間後に $1.4 \pm 0.8 \times 10^9$ 個へと減少した。しかし、CD3⁺CD4⁺T細胞およびCD3⁺CD8⁺T細胞は、各々 $30.3 \pm 9.6\%$ から $59.5 \pm 13.5\%$ へ、 $11.8 \pm 8.0\%$ から $17.8 \pm 10.8\%$ へ増加した。また、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞は、 $6.7 \pm 3.8\%$ から $28.1 \pm 17.7\%$ と、培養開始時に比べ2.4～8.8倍増加した。同様に、CD4⁺CD25⁺CTLA4⁺およびCD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺細胞の割合も2週間培養で共に上昇した。培養細胞添加により、ドナー抗原に対するMLRは細胞数依存性的に抑制された。他方、第三者抗原に対する抑制はドナー抗原に比べ弱かった。なお、症例5では、制御性T細胞は誘導されず、ドナー抗原に対するMLR抑制も不良であった。

(2) 肝移植症例における培養制御性T細胞を用いた免疫抑制療法

症例1・39歳、男性。C型肝硬変に対し弟の肝左葉グラフトを用いた。MMF、MPSは術後早期に中止し、術後28日目にはTAC単剤での免疫抑制となった。術後34日目よりCMV感染症のため、免疫抑制を完全に中止した。術後65日目にmild ACRを来し、TACを再開した。術後98日目にC型肝炎再発を認め、IFN+rivabirin治療を開始した。TAC漸減し、術後21ヶ月目より免疫抑制フリーの状態拒絶反応を認めず肝機能は安定している。症例2；63歳、男性。アルコール性肝硬変に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた。術後11日目にMMFを中止し、17日目にはTAC単剤での免疫抑制となった。術後20日目にmild ACRを来したが、so lucortef投与により拒絶反応は制御された。術後6ヶ月目よりTAC減量を開始、19ヶ月目からTACを中止した。TAC中止から約1

ヶ月後にグラフト中肝静脈に血栓を生じ一過性にAST/ALT値上昇を認めたが、現在は肝機能も安定し免疫抑制剤フリーの状態経過している。症例3；56歳、男性。NASH肝硬変に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた。術後TACはtrough 6-9 ng/mlで維持していたが神経毒性が疑われ、術後20日目にTACを中止しMPS単独での免疫抑制に変更した。グラフト脂肪肝認め、術後30日目にMPSを中止し、CyAを開始した。術後6ヶ月目よりCyA減量を開始するも拒絶反応を認めず、術後19ヶ月目にCyAを中止。現在、免疫抑制フリーで2ヶ月経過し肝機能は安定している。症例4；59歳、男性。B型肝炎硬変+HCCに対し、義息子の肝左葉グラフトを用いた。術後25日目より鬱血性心不全を併発。TAC心毒性が懸念され、術後34日目よりMMF単剤で免疫抑制を維持し、37日目からラパマイシン(RAPA) 1 mg/dayを52日目まで併用した。心機能安定し術後55日目からTACを再開、70日目にMMF中止し、術後6ヶ月目よりTAC減量を開始。現在、術後16ヶ月経過し、TAC 3 mgを週1回投与で拒絶反応の兆候なく肝機能は良好で、近々、免疫抑制中止を予定している。症例5；52歳、男性。PBCの診断で、兄の肝左葉グラフトを用いた。術後17日目にMMFを、28日目にMPSを中止した。術後12ヶ月目よりTAC 3 mg/dayを週2回投与まで減量したが、減量2週間後にmild ACRを来し、ステロイドパルス治療およびTACを増量で経過観察中である。症例6，55歳、女性。PSCの診断で、娘の肝左葉グラフトを用いた。術後17日目にMMFを、29日目にMPSを中止し、術後28日目にはTAC単剤での免疫抑制となった。術後6ヶ月目よりTAC減量を開始するも7ヶ月目に腕神経叢炎を併発。TAC副作用を疑い、術後268日目にTACを中止し免疫抑制フリーとした。術後311日目にmild ACRを来し、RAPAを開始。経過中、AST/ALT再上昇認められ、MPSを追加した。肝機能安定し、術後352日目にRAPAをCyAにスイッチした。近日中にMPS中止し、CyA単剤での免疫抑制を予定している。症例7；59歳、女性。NASH肝硬変+HCCに対し、娘の肝左葉グラフトを用いた。術後13日目にMMFを中止、MPSを漸減し、術後28日目にTAC単剤での免疫抑制となった。現在、術後約12ヶ月経過し、TAC 2 mg 週3回投与で肝機能も安定しており、近々更なる減量を予定している。症例8；52歳、男性。アルコール性肝硬変に対し、息子の肝左葉グラフトを用いた。術後13日目にMMFを中止し、培養リンパ球を輸注。同日、AST/ALT値が急上昇し、肝生検にてmod-severe ACRの所見に加え中心静脈周囲広汎の肝細胞脱落を認め、薬剤性肝障害も疑われた。ステロイドパルス+血漿交換を行いAST/ALT値は正常に復した。MPSを術後30日目に中止し、免疫抑制はTAC単剤で維持した。術後52日目にFK脳症(PRES)疑われ、TAC中止しMPSを再開した。術後78日目にmild ACRを来し、RAPAを開始。神経症状は改善傾向を示し、術後93日目にRAPA中止しCyAにスイッチした。現在、術後9ヶ月経過しCyA 100 mg, bid投与で肝機能は安定しており、CyA減量を予定している。症例9；58歳、女性。PBCに対し、息子の肝左葉グラフトを用いた。術後12日目にMMFを中止した。術後13日目に肝動脈再吻合術を要し、14日目に培養細胞を輸注した。拒絶反応なく経過し、術後51日目からTAC単剤での免疫抑制となった。術後6ヶ月目よりTAC減量を開始。現在、TAC 2 mg, qdで肝機能は安定している。症例10；55歳、男性。NASH肝硬変+ HCCに対し、息子の肝左葉グラフトを用いた。術後11日目にMMFを中止し、30日目にはTAC単剤での免疫抑制となった。現在、術後3ヶ月経過し、TAC 3 mg/day, bid (trough 5-7 ng/ml)で全身状態・肝機能共に良好である。

D. 考察

抗CD80抗体および抗CD86抗体を用いた本 *ex vivo* リンパ球培養法により、ドナー抗原に比較的特異性の高い制御性T細胞が高率に誘導された。しかし、症例5では、CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞は6.4%から8.8%と誘導効率が悪く、培養細胞添加によるMLR抑制も得られなかった。この症例は兄弟間の移植症例でHLAもfull match症例であり、このことが制御性T細胞の誘導不良に関係していると考えられた。本臨床試験10症例中5例で経過中に拒絶反応を来したが、その多くはTAC副作用のため免疫抑制剤を早期に完全中止した後に認められており、ステロイド投与及びTAC(CyA)再開で容易にコントロール可能であった。術後1年以上経過して免疫抑制剤減量中に拒絶反応が認められたのは症例5の1例のみで、これは前述の如く *ex vivo* において制御性T細胞が誘導されなかった症例であった。培養細胞輸注後から、末梢血液中CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺、CD4⁺CD127^{lo}Foxp3⁺、CD4⁺CD45RA⁺Foxp3⁺制御性T細胞が上昇し、術後8-10週目まで高値が維持された。制御性T細胞が細胞輸注後どの程度の期間維持され、免疫寛容誘導に寄与するか今後更なる検討と各症例の経過を観察する必要がある。

E. 結論

生体肝移植症例10例において、制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法の臨床試験を施行した。抗CD80抗体および抗CD86抗体存在下にPBMCを共培養することで制御性T細胞は高率に誘導された。培養細胞輸注に伴う副作用を認めず、本治療は安全

である。10症例中、術後6ヶ月以上経過した9症例において、全例で免疫抑制剤の減量に成功し、3症例は現在免疫抑制フリーで経過している。生体肝移植において本制御性T細胞を用いた新しい免疫抑制療法は、免疫抑制剤減量に貢献し有効である。免疫寛容誘導効果も十分期待されるが、その効果判定には本臨床試験症例の更なる経過観察が必要である。

HLA 不適合血縁者間移植の
安全性および有効性向上のための
包括的研究

HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究

研究代表者	神田 善伸	自治医科大学附属さいたま医療センター血液科 教授
研究分担者	小川 啓恭	兵庫医科大学内科学講座血液内科研究分野 教授
	千葉 滋	筑波大学血液内科学 教授
	谷口 修一	国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液内科 部長
	田中 淳司	北海道大学大学院医学研究科内科学講座血液内科学分野 准教授
	平家 勇司	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 医長
	一戸 辰夫	佐賀大学医学部内科学講座造血幹細胞移植 准教授
	高橋 義行	名古屋大学医学部附属病院小児科学 准教授
	前田 嘉信	岡山大学病院血液・腫瘍内科 助教
	森田 智視	横浜市立大学附属市民総合医療センター臨床統計学・疫学分野 教授
	熱田 由子	名古屋大学大学院医学系研究科 造血細胞移植情報管理・生物統計学 講師

A. 研究目的

HLA 型は自己と非自己を認識する最も重要な抗原であり、同種造血幹細胞移植に最も適したドナーは HLA 適合同胞である。次いで優先すべきは HLA 適合非血縁者と HLA 一抗原不適合血縁者であり、両者の移植成績が同等であることを、以前に研究代表者の神田らが明らかにした (Kanda Y, Blood 2003)。しかし、近年は遺伝子型での適合度を重視したドナー選択によって非血縁者間移植の成績が向上している。また、これらのドナーが得られない場合には、HLA 二抗原以上不適合血縁者間移植と非血縁者間臍帯血移植が候補となる。臍帯血中の造血幹細胞数は限られているため生着不全の危険性が高い。一方、二抗原以上不適合血縁者間移植では、移植片対宿主病(GVHD)のコントロールが重要である。海外では体外でドナー幹細胞液から T 細胞を除去して移植する方法が一般的であるが、拒絶や感染症が多発する。そこで、日本国内では体外での T 細胞除去を行わない(非 T 細胞除去)独自の HLA 不適合移植方法として、研究分担者の一戸らの母子間免疫寛容に基づいた移植法(Ichinohe T, Blood 2004)や、研究分担者の小川らによるタクロリムス、ステロイド併用の強力な GVHD 予防法を用いた移植法(Ogawa H, Biol Blood Marrow Transplant 2006)、研究代表者の神田らの抗 CD52 モノクローナル抗体アレムツズマブを用いた移植法(Kanda Y, Transplantation 2005)などが開発され、非 T 細胞除去 HLA 不適合移植の分野においては世界の最先端の開発研究が行われている。

しかし、HLA 不適合移植の開発は個々の施設単位での研究にとどまり、国際的に高い評価を受けているにもかかわらず、国内普及が進まなかった。そこで本研究では全国規模での研究組織によって様々な方法で行われている HLA 不適合移植の利点、欠点を明確にするとともに、臍帯血移植との優劣についても評価し、さらに HLA 不適合移植の治療成績を改善するための基礎的な研究、医療費、薬剤の保険適応外使用の対策、ガイドラインの発表を含め、包括的な研究を行う。

B. 方法

● 平成24年度に実施中の臨床試験

本邦から世界に発信されている様々な体外T細胞非除去HLA二抗原以上不適合移植法の開発と、海外の標準的手法であるCD34陽性細胞移植について、以下の臨床試験を実施している。さらに、既に日常診療として行われているHLA一抗原不適合移植の治療成績の向上や、移植後の免疫回復の促進をめざした臨床試験の計画を進めている。

(a) 研究分担者の一戸らによる母子間免疫寛容を利用したHLA不適合移植

【移植方法】標準的前処置にサイモグロブリン 2.5mg/kgをday -3、-2に加え、GVHD予防としてタクロリムスを用いる。【目標症例数】15例【主要評価項目】移植後100日目までの非再発死亡

(b) 研究分担者の小川らによる強力免疫抑制剤を併用したHLA不適合移植

【移植方法】減弱移植前処置にゼットブリン 2mg/kgをday -4~-1に加え、GVHD予防としてタクロリムスとメチルプレドニゾロンを用いる。【目標症例数】25例【主要評価項目】移植後100日の時点での生存率

(c) 研究代表者の神田、研究分担者の千葉らによるアテムツズマブを用いたHLA不適合移植(アテムツズマブの減量を試みる自主臨床試験)

【移植方法】標準的前処置加えるアテムツズマブの投与総量を0.5mg/kgに減量する。GVHD予防としてシクロスポリンとメトトレキサートを用いる。【目標症例数】18例【主要評価項目】移植後60日目までの生存、生着、グレードIII以上の急性GVHDの発症

(d) 研究分担者の千葉らによる移植後シクロホスファミドによってGVHDを予防するHLA不適合移植

【移植方法】造血幹細胞移植後のDays 3, 5にシクロホスファミド 50 mg/kg/dayを投与する。【目標症例数】15例【主要評価項目】移植後100日時点での生存率

(d) 研究分担者の平家らによる体外でCD34陽性細胞を選択したHLA不適合移植およびHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法の臨床試験

【移植方法】標準的な移植前処置後にCD34陽性細胞選択造血幹細胞を輸注した後にHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法による免疫回復促進を図る。【目標症例数】10例【主要評価項目】免疫系再構築並びにGVHD発症頻度および制御能

(e) HLA一抗原不適合移植の至適化

【移植方法】標準的前処置にサイモグロブリン 1.25mg/kgをday -4、-3に加え、GVHD予防としてタクロリムスを用いる。【目標症例数】39例【主要評価項目】移植後1年の死亡、再発、グレード3以上の急性GVHDの発症、NIH 基準による重度の慢性GVHDの発症

■ 平成24年度に実施中の臨床研究(非介入)

研究代表者が委員長を務める日本造血細胞移植学会「HLAと移植成績ワーキンググループ」と連携し、造血細胞移植学会のデータベースや各施設のHLA不適合移植症例データベースを用いて、HLA不適合移植の成否にかかわる様々な因子の影響について調査する。

1. HLA不適合が移植成績に与える影響の検討

(a) HLA不適合の影響に関する学会データベースを用いた後方視的解析のアップデート

(b) 母子間免疫寛容の影響に関する学会データベースを用いた後方視的解析

(c) 移植片拒絶に対する再移植におけるHLA不適合移植と臍帯血移植の有用性の比較

2. 抗HLA抗体と生着不全の関係

(a) HLA不適合移植後の抗HLA抗体力価の経時的変化

(b) 抗HLA抗体と生着不全、GVHD、再発率との関連

◎ 平成24年度に実施中のHLA不適合移植の成績向上のための基礎研究

HLA不適合移植後の最大の問題である免疫回復の遷延について、移植後に問題となりやすい病原微生物や、腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。

(a) HLA不適合移植後の免疫不全状態における抗原特異的抗腫瘍・抗感染症療法の開発

(b) ELISPOTおよびFACSによる抗HLA抗体産生細胞の定量

(c) HLA不適合に伴うNK細胞の活性化と細胞傷害能の解析

C. 結果

研究分担者の一戸らによる母子間免疫寛容を利用したHLA不適合移植は佐賀大学における臨床試験として標準的前処置にサイモグロブリン 2.5 mg/kgをday -3、-2に加え、GVHD予防としてタクロリムスを用いるデザインで進行している。研究分担者の小川らによる強力免疫抑制剤を併用したHLA不適合移植は減弱

移植前処置にゼットブリン 2 mg/kgをday -4~1に加え、GVHD予防としてタクロリムスとメチルプレドニゾロンを用いた臨床試験は症例登録が完了した。現在は体内T細胞除去薬をサイモグロブリンに変更し、その投与量を徐々に減量する臨床試験に移行している。研究代表者の神田らによるアテムツズマブを用いたHLA不適合移植(アテムツズマブの減量を試みる自主臨床試験)は、医師主導治験が2010年度に登録終了、2011年6月に観察期間も終了した。本研究においてアテムツズマブの投与量と免疫回復の有意な相関が認められたため、引き続きさらにアテムツズマブを減量した自主臨床試験を開始した。研究分担者の千葉らによる移植後シクロホスファミドによってGVHDを予防するHLA不適合移植は米国で主流になりつつある移植方法であり、国内での応用が期待される。研究分担者の平家らによる体外でCD34陽性細胞を選択したHLA不適合移植およびHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法の臨床試験は、国立がん研究センター中央病院で臨床試験が進行し、実際にHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注が2症例に行われた。現在のところ、輸注に関連する有害事象はみられず、一例では安定した免疫回復が得られている。

後方視的研究については、昨年度のHLA一抗原不適合血縁者間移植とHLA適合非血縁者間移植の比較に続き、HLA一抗原不適合血縁者間移植と非血縁者間臍帯血移植の比較を行い、現状のHLA一抗原不適合血縁者間移植の問題点としてGVHDの発症頻度が高いこと、そして抗ヒト胸腺細胞抗体を用いることで生存率が改善する傾向にあることを見いだした。この研究に基づいてHLA一抗原不適合血縁者間移植における至適なGVHD予防方法を模索する前方視的臨床試験を立案し、日本造血細胞移植学会主導研究として計画を進めている。

統計ソフトウェア開発についてはマウス操作だけで一般的な名義変数、連続変数、生存期間の解析に加えて、移植領域の統計解析で必須となる時間依存性変数を扱う解析や競合イベントを扱う解析が実行できるソフトウェア(EZR)が完成し、さいたま医療センターのホームページで無料公開している。

特異的免疫能の評価系についてはサイトメガロウイルスおよびEBウイルスに特異的に働く細胞傷害性T細胞をテトラマーによって同定する系が確立された。さらに細胞傷害性T細胞を単一細胞に分離した上でT細胞受容体レパトアの解析を行ったところ、ドナー由来の細胞傷害性T細胞がサイトメガロウイルス再活性化の抑制に貢献していることや、細胞傷害性T細胞の形質によって抗ウイルス能が異なることが示唆された。また、研究分担者の前田らの研究ではマウス慢性GVHDモデルにおいてIL-17欠損マウスをドナーに用いると慢性GVHDの発症は有意に抑制された。レチノイン酸を投与することにより慢性GVHDが抑制され予防・治療効果を認め、Th17細胞の慢性GVHDへの関与が明らかとなった。

D. 考察

様々な方法を用いた体外T細胞非除去HLA二抗原以上不適合移植法の臨床研究の進捗状況は良好である。日本造血細胞移植学会データベースを用いた解析についても日常診療にすぐに還元される成果が得られ、統計ソフトウェアの開発により、今後はさらに解析が促進されることが期待できる。

基礎的研究についてはHLA不適合移植において鍵をにぎるGVHDの制御と免疫回復の両面において新たな知見が得られた。

E. 結論

本年度も前方視的臨床試験、後方視的臨床研究、基礎的研究のいずれにおいても順調な進捗を示している。HLA二抗原以上不適合の血縁ドナーは95%以上の患者が有するため、本研究でHLA不適合移植の有用性を明らかにすることで、将来的には骨髄バンク、さい帯血バンクのドナープール拡大の負担を軽減することが期待できる。また、様々なHLA不適合移植法の利点、欠点を明確にするとともに、臍帯血移植との優劣についても評価し、診療現場での治療選択に役立つ情報を提供する。医療経済的な観点からも比較することによって、社会と適合した健全な移植医療の発展が期待される。多彩な造血幹細胞移植のソースが使用可能となり、移植適応についてもより明確にしていく必要があるため、ガイドラインを作成することによって幅広く情報を発信する。不必要な移植医療の削減は、倫理的観点のみならず、医療費の観点からも重要である。

本研究班の基礎的な研究成果は、HLA不適合移植のみならず、同じくHLA不適合の存在が前提となっている臍帯血移植の治療成績の改善にも応用することができる。また、HLA不適合移植における薬剤の適応外使用の現状についても把握することで、将来の治験のあり方、有害事象の解析方法についても展望する。

アレムツズマブを用いたHLA不適合移植の開発および腫瘍・感染症特異的免疫の研究

研究代表者 神田 善伸 自治医科大学附属さいたま医療センター血液科 教授

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植を必要としながらも、HLA 適合同胞、HLA 適合非血縁者、HLA 一抗原不適合血縁者などの一般的なドナーが得られない患者のために、抗 CD52 モノクローナル抗体アレムツズマブを用いた HLA 不適合移植の開発を行っている。また、HLA 不適合移植はしばしば高度な免疫抑制状態を生じ、感染症や腫瘍の再発の増加につながっている。そこで、病原微生物や腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。

並行して研究代表者は日本造血細胞移植学会「HLA と移植成績ワーキンググループ(HLA-WG)」委員長を務めており、この研究班を通して HLA-WG の研究を支援するとともに、データベースを効率的に利用するプログラムを作成することによって造血幹細胞移植領域のエビデンス構築の促進を図る。

B. 方法

標準的な移植前処置にアレムツズマブを加えることによって重篤な GVHD を予防する HLA 不適合移植方法の医師主導治験を遂行し、さらに臨床試験として継続する。アレムツズマブの投与総量は治験で用いられた投与量からさらに減量して 0.50 mg/kg とし、主要評価項目は移植後 60 日目までの生存、生着、グレード III 以上の急性 GVHD の発症とする。HLA 不適合移植後の最大の問題である免疫回復の遷延について、病原微生物や、腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。また、データベースの効率的利用のために、無料の統計ソフトである R を基盤として Tcl/Tk 言語でプログラムを作成し、複雑なスクリプトの入力を必要とせずマウス操作だけで簡単に統計解析が可能になる統計ソフトウェアの開発を行う。

C. 結果

医師主導治験については 2011 年 6 月に観察期間が終了し、データ固定も完了した。2013 年の申請を予定している。自主臨床試験についても倫理審査の承認を受けて実施を開始した。既に 2 症例の移植が行われた。特異的免疫能の評価系についてはサイトメガロウイルスおよび EB ウイルスに特異的に働く細胞傷害性 T 細胞をテトラマーによって同定する系が確立された。さらに細胞傷害性 T 細胞を単一細胞に分離した上で T 細胞受容体レパトアの解析を行ったところ、ドナー由来の細胞傷害性 T 細胞がサイトメガロウイルス再活性化の抑制に貢献していることや、細胞傷害性 T 細胞の形質によって抗ウイルス能が異なることが示唆された。

統計ソフトウェア開発についてはマウス操作だけで一般的な名義変数、連続変数、生存期間の解析に加えて、移植領域の統計解析で必須となる時間依存性変数を扱う解析や競合イベントを扱う解析が実行できるソフトウェア(EZR)が完成し、さいたま医療センターのホームページで無料公開するとともに、HLA-WG で同ソフトを共有することによって統計解析の活性化を図っている。

D. 考察

アレムツズマブを用いた HLA 不適合移植は 2013 年の承認申請、2015 年頃の承認を目標としている。それまでに本研究班の自主臨床研究においてこの移植方法の安全性、有効性に関するエビデンスをさらに蓄積する。ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞のレパトアを同定することは将来の免疫療法の開発につながる。

E. 結論

本研究によってアレムツズマブを用いた HLA 不適合移植法の利点、欠点を明確にすることができる。同時に HLA-WG の研究を推進し、HLA 不適合移植を本当に必要とする患者層を同定し、ガイドラインを作成することを目標とする。

多剤併用 GVHD 予防による HLA 不適合移植の開発・不適合移植後の HLA 抗体の解析

研究分担者 小川 啓恭 兵庫医科大学 内科学講座血液内科 主任教授

研究協力者 池亀 和博 兵庫医科大学 内科学講座血液内科 講師

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、化学療法抵抗性の悪性血液疾患患者を治癒に導く唯一の治療法である。しかし、移植を必要とする患者で、HLA 適合同胞が存在するのは 25%程度に過ぎず、さらに昨今の少子化の影響もあり、今後、ますます血縁で HLA 適合ドナーが見つかる可能性は低くなると考えられる。このドナー不足を補うため、骨髄バンクや臍帯血バンクが設立されているが、それぞれ、ドナーのコーディネート期間が長い、拒絶の頻度が高いといった問題点が存在する。

一方、HLA が半分だけ合っているドナー(HLA 半合致ドナー)は、ほぼ血縁内に存在するので、このような HLA 半合致ドナーからの移植が安全に施行可能になると、同種移植においてドナーの問題が解消されることになる。この HLA 半合致移植の問題点は、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease=GVHD)である。GVHD は、移植時の幹細胞とともに入るドナーリンパ球が、host の正常組織を免疫学的に攻撃する反応である。海外からは、HLA 半合致移植後の GVHD を回避する手段として、3つの方法が報告されている。1) CD34 純化移植 (イタリア Perugia 大学) 移植片から CD34(+)造血幹細胞を濃縮し、T 細胞を、 $1 \times 10^4/\text{kg}$ 以下に減らし、さらに megadose の CD34(+)細胞($> 1 \times 10^7/\text{kg}$)を移植することで、生着率 91%、GVHD 発症率 8%と報告、2) 高容量 ATG による in vivo purging 法 (中国北京大学) サイモグロブリン 10 mg/kg を使用し、CSP+MTX+MMF で GVHD 予防を行うことで、生着率 100%、GVHD 発症率 40%と報告、3) post-transplant cyclophosphamide 法 (米国 Johns Hopkins 大学) 移植直後に cyclophosphamide の大量療法 (50 mg/kg x 2)を行い、GVH および HVG 反応を抑制することで、免疫学的寛容に入る。以上の3つの方法は、いずれも、寛解期症例に対しては満足できるものであるが、非寛解期症例に対しては、長期生存率 10%程度と低く、このように、T 細胞を purging するだけの方法では、GVH だけでなく、GVL 効果も削いでしまい、HLA 半合致移植片の高い GVL 効果は温存できない。

我々は、以前から、低 cytokine 環境下の GVH 反応が、GVHD を伴わない GVL 効果の発現を引き出すことを提唱してきた。このため、少量のステロイドを GVHD 予防 regimen に組み込むことで、炎症性 cytokine の乏しい環境を演出し、この環境下、ATG 量投与量を減らすことで、意図的に、HVG に対して、GVH 反応が優位になるような条件設定にして、HLA 半合致移植の regimen を組んでいる。今回、フル移植の setting での HLA 半合致移植の成績を報告する。

B. 方法

対象 2008 年 4 月から 2012 年 6 月までの間に、兵庫医科大学病院で、HLA 半合致フル移植を受けた 23 人の患者を解析した。年齢の中央値は 34 歳 (17-46 歳)で、疾患は、AML 8 名、ALL 9 名、NHL 5 名、CMML 1 名であった。病期は、CR1 2、CR 2 2、CR3 1、induction failure 5、resistant relapse 13 であった。非寛解期症例は、high tumor burden を有する例が多く、白血病患者の移植前の芽球%は、中央値で 66%(10.6%-97%)であった。移植前処置は、fludarabine + high-dose cytarabine + cyclophosphamide + TBI 8 Gy + thymoglobulin 2 mg/kg で、GVHD 予防は、FK506 と mPSL 1 mg/kg で行った。

C. 結果

1 名は、day 3 に肺炎のため、早期死亡した。評価可能な 22 名中 21 名でドナー由来の生着が得られた。拒絶に至った患者は、high titer の donor specific HLA antibody (DSA)が移植前に検出されており、この DSA によるものと考えられた。好中球回復の中央値は day 11 であった。GVHD の発症は、grade 0 11、grade I 1、grade II 2、grade III 6、grade IV 1 であった。6 名が再発を来したが、3 年時点での生存率 61%である。

D. 考察

23 例と比較的少数の解析であったが、大半の患者が移植前に non-CR であり、high tumor burden を有していたことを考慮すると、3 年生存率 61%は良好な成績と考えられた。GVHD 発症率 42.9%はやや高く、thymoglobulin の投与量の増量が必要かも知れない。しかし、逆に重症の免疫不全に陥る症例もあり、thymoglobulin の血中濃度の測定を行い、それに合わせて、GVHD 予防の individualization が必要と考えられた。移植前に非寛解期であった 7 例で、GVHD を発症することなく、長期に CR が維持している。これらの患者では、目標とする、GVHD を伴わない GVL 効果の誘導に成功したといえる。今後、GVHD を伴わない高い GVL 効果の発現が、さらに高い確率で得られるようにするため、GVH 予防の個別化をはかりたい。

E. 結論

少量ステロイド剤を GVH 予防に用いる、HLA 半合致移植法は、約 1/3 の例で、理想とする、GVHD を伴わない GVL 効果の発現をもたらした。GVH 予防法を最適化、さらには個別化することによって、その確率を高めることができると考えられ、この approach は将来有望と思われる。

造血幹細胞移植後にシクロフォスファミドを用いた HLA 半合致移植に関する研究

研究分担者 千葉 滋 筑波大学医学医療系血液内科 教授

HLA 半合致移植（以下、ハプロ移植）は、HLA 合致血縁ドナーがいない場合やタイミングよく非血縁ドナーが得られない造血器疾患患者における有望な選択肢のひとつである。ハプロ移植では、生着不全、重篤な GVHD、免疫再構築遅延による感染症の克服が課題であり、種々の方法が試みられている。近年、移植後早期のシクロフォスファミド投与（以下、移植後 CY）を組み合わせたハプロ移植が試みられている。Luznik らは骨髄非破壊的前処置後に 68 名に対してこの方法を用いて移植を行なったところ、重症 GVHD (III-IV) は 6%、TRM は 15%と許容範囲であったが、生着不全が 13%に生じた(BBMT、2008)。一方、Bacigalupo らは骨髄破壊的前処置との組み合わせで 18 例に対して行ない、全例で生着し（好中球生着中央値：24 日）、重症 GVHD (III-IV) はなく、1 年生存率も 60%と良好な成績であった(EHA 学会、2011)。すなわち、骨髄破壊的前処置と移植後 CY を用いたハプロ移植は、(1)移植した造血幹細胞への悪影響を生じない、(2)生着不全を予防できる、(3)重篤な GVHD を予防できる、(4)移植後の免疫再構築に優れる、などの利点を有することが示唆されている。2012 年 12 月に行なわれた米国血液学会には、類似の方法を用いた移植の成績が複数報告されていた。

そこで今回、Bacigalupo らが用いている方法を、我が国で施行しやすいように変更して実施することとした。対象患者は、同種造血幹細胞移植適応のある造血器腫瘍患者で、8/7 または 8/8 の HLA アレル一致の血縁および非血縁ドナーを有さず、4/8-6/8 の HLA アレル一致の血縁ドナーを有する場合である。幹細胞ソースは末梢血幹細胞、骨髄のいずれも許容する。前処置は、(1)全身放射線照射 (12 Gy/6 Fr)、リン酸フルダラビン (150 mg/m²) または (2) 静注ブスルファン (12.8 mg/kg)、リン酸フルダラビン (150 mg/m²)、全身放射線照射 (2 Gy) のいずれかを症例および疾患背景により選択する。シクロフォスファミドを day 3 および day 5 に 50 mg/kg ずつ 2 日間投与することとし、免疫抑制剤としてはシクロスポリン (day -1 から持続静注) および MMF (day -1 から day 30 まで) 2000 mg/日を用いる。

同方法により 1 名に対し移植を行ない、良好な生着が得られた。

今後さらに症例数を重ねる必要がある。

臍帯血移植におけるドナー非特異的抗 HLA 抗体の臨床的意義に関する研究

研究分担者 谷口 修一 国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液内科 部長
研究協力者 山本 久史 国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液内科 医員

A. 研究目的

2010年にTakanashi高梨らが、ドナーHLA特異的抗HLA抗体(donor specific anti-HLA antibodies; DSA)の存在が、臍帯血移植(Cord blood transplantation; CBT)後の生着不全に強く関与することを報告し、同様の知見が海外からも続いている。これら新知見に基づき、CBT施行前には抗HLA抗体を測定し、陽性の際にはその抗体が標的とする抗原を有する臍帯血(Cord Blood; CB)を避けて移植することが日常臨床として急速に普及しているが、ドナー抗原を標的としない抗HLA抗体(Non-DSA)の臨床的意義は十分には評価されていない。本研究では、Non-DSAの存在および抗体の数、強度、種類が臍帯血生着に与える影響を検討する。

B. 方法

当院において2008年1月から2011年6月までにCBTを施行した175例を対象とした。全例でCBT施行前に抗HLA抗体を測定し、陽性の際にはその抗体が標的とする抗原を有する臍帯血を避けてCBを選択しCBTを施行した。抗HLA抗体は当院輸血部において、LAB Screen PRA and Single Antigen (One Lambda)を用いて測定し、Median fluorescence intensity (MFI) ≥ 1000 を抗体陽性と定義した。

C. 結果

対象175例の年齢中央値は59(17-74)歳で、155例(88.5%)が非寛解期移植であった。166例(94.9%)において、Fludarabine-basedの前処置、144例(81.7%)においてGVHD予防法としてTacrolimus+MMFが用いられた。患者・ドナー間のHLA適合度(HLA-A/B/DR抗原:拒絶方向)は、6/6一致:4例(2.2%)、5/6:48例(27.4%)、4/6:113例(64.5%)、3/6:10例(5.7%)であった。69例(39.4%)で抗HLA抗体が陽性であった。陽性抗体数の中央値は2(1-73)、最高MFI値の中央値は2150(1004-16402)であった。陽性抗体の種類として、(1)40例はHLA-A/B/DRに対する抗体のみ、(2)10例はHLA-C/DP/DQに対する抗体のみ、(3)19例はHLA-A/B/DRおよびHLA-C/DP/DQに対する抗体を有していた。患者および臍帯血は原則的にHLA-A/B/DR抗原のみ測定するため、(1)は純粋なNon-DSAとしてGroup A、(2)(3)はHLA-C/DP/DQに対する抗体がDSAである可能性がありGroup Bと2群に分けて、解析を進めた。175例中143例で、移植後19(11-60)日で好中球生着が得られた。抗体陽性群における好中球生着率は79.7%、陰性群では83%と、抗HLA抗体の存在は好中球生着に影響を与えなかった($p=0.44$)。血小板生着においても同様であった(陽性群:50.7%、陰性群:55.2% $p=0.53$)。また抗HLA抗体の数(≥ 5 vs < 5)および強度(MFI ≥ 2000 vs < 2000)も生着に影響は与えなかった。本解析では、HLA適合度(5-6/6 vs 3-4/6)が、統計学的に有意な差をもって好中球生着に影響を与えていた(5-6/6群:86.5%、3-4/6群:79.7% $p=0.02$ 、HR=0.82, 95% CI, 0.68-0.99, $p=0.03$)。HLA不適合群(3-4/6, n=123)におけるサブグループ解析では、抗体陽性群の好中球生着率は、陰性群と比べ、低い傾向がみられた(陽性群:71.4%、陰性群:84% $p=0.07$)。抗体陽性群における、Group Aの生着率は88%、Group Bの生着率は47.9%であり($p=0.03$)、HLA不適合群では、Group B、つまりHLA-C/DP/DQに対する抗体を有する患者で好中球生着が低下することが示された。

D. 考察

本研究では、抗HLA抗体(Non-DSA)の存在は、臍帯血生着に有意な影響を与えなかった。特に、HLA-A/B/DRに対する抗体陽性群の生着率は、HLA不適合患者においても、抗体陰性群と同等であった。一方でHLA-C/DP/DQに対する抗体陽性群では、特にHLA不適合患者において、低い好中球生着率がみられた。HLA不適合群(A,B,もしくはDR不適合)においては、HLA連鎖不平衡によりHLA-C/DP/DQ抗原が不一致である確立が高く、HLA-C/DP/DQに対する抗体がDSAとなり、拒絶に関与した可能性が示唆された。現在、国内の臍帯血バンクではHLA-C/DP/DQ抗原はルーチンでは測定していない。より多数例で抗HLA-C/DP/DQ抗体が関与した拒絶の可能性を検討し、臍帯血HLAタイピングの適正化が必要と思われる。

E. 結論

Non-DSAの存在は、臍帯血生着に有意な影響を与えなかった。抗HLA-C/DP/DQ抗体がの生着不全の原因となる可能性が示された。臨床的意義に関しては、より多数例での検討が必要である。

T細胞除去を用いない母子間移植と父子間移植の比較

研究分担者 一戸 辰夫 佐賀大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 准教授

研究協力者 諫田 淳也 自治医科大学附属さいたま医療センター 血液科 講師

A. 研究目的

母親からその子供への造血細胞移植においては、妊娠中に胎児同種抗原に曝露された際の免疫学的記憶が、移植後の合併症や原疾患再発のリスクに影響を与えている可能性が報告されている。

われわれは、昨年当班会議において、本邦で実施された T細胞除去を用いない母子間移植と父子間移植の成績を比較し、母親をドナーとする移植の生存率が良好な傾向が見られたことを報告した。今回は、その要因を明らかにすることを目的として、HLA 適合移植例も含めて新たな解析を行うとともに、特に移植後に II 度以上の急性 GVHD を発症した例に限定して、母ドナー群と父ドナー群の移植成績の比較を行った。

B. 方法

日本造血細胞移植学会の一元化造血細胞移植登録データベース (TRUMP) に登録が行われている血縁者間移植で、1) 原疾患が急性骨髄性白血病・急性リンパ性白血病・慢性骨髄性白血病・骨髄異形成症候群のうちいずれか; 2) 移植の実施期間が 1999 年から 2009 年までの間、3) ドナーが患者の母親あるいは父親、の条件を満たす移植例の中で、*ex vivo* あるいは *in vivo* での T細胞除去が用いられた例を除外した 429 例を解析対象とした。

C. 結果

全例を対象とする解析では、母ドナー群(n=274)と比較して父ドナー群 (n=155) の移植後死亡リスクが高い傾向が見られたが(多変量解析にて HR=1.31, 95%CI: 0.99-1.73, P=0.056)、II 度以上急性 GVHD の発症率、再発率については両群間で有意な差を認めなかった。また HLA-A, -B, -DR 抗原に GVH 方向の不適合が存在しない場合には、父ドナー群 (n=66) と母ドナー群 (n=89) の間に有意な移植後死亡リスクの差は認められなかったが、GVH 方向に不適合が存在する場合には、父ドナー群 (n=89) において、母ドナー群 (n=185) よりも移植後の死亡リスクが高かった (HR=1.45, 95%CI: 1.04-2.04, P=0.031)。また、移植後に II 度以上の急性 GVHD を発症した群のみを対象として、父ドナー群、母ドナー群における GVHD 発症後の生存率、移植関連死亡率、再発率の比較を行ったところ、生存率・再発率は同等であったが、移植関連死亡率は父ドナー群において高い傾向が確認された。

D. 考察 E. 結論

昨年の解析と同様に、GVH 方向に不適合が存在する親子間移植においては、母親をドナーとする移植の成績が良好である傾向が確認された。現時点でその原因は明らかではないが、急性 GVHD の発症リスクは同等であるにもかかわらず、GVHD 発症後の移植関連死亡率が父ドナー群と比較して母ドナー群において低い傾向が見られたことは興味深く、母移植片に含まれる免疫調節性の細胞群が何らかの保護的な影響を与えている可能性が示唆される。

マウスモデルを使ったHLA不適合移植後の免疫寛容の誘導に関する検討

研究分担者 前田 嘉信 岡山大学病院 血液・腫瘍内科 助教

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、白血病などの悪性疾患に対する根治的治療として確立しているが、致死合併症である移植片対宿主病（GVHD）は今日なお克服すべき課題である。GVHDは急性GVHDと移植後期に発症する慢性GVHDに大別される。慢性GVHDは急性GVHDと発症時期が異なるだけでなく、その病態も異なると考えられている。急性GVHDの基本的メカニズムは次第に明らかとなっており、急性GVHDのエフェクター細胞がTh1細胞であるのに対し、これまで慢性GVHDについてはTh1/Th2細胞で病態が十分に説明できていない。そこで我々は、まずTh1、Th2細胞に続く第二の免疫担当細胞であるTh17細胞の慢性GVHDへの関与を明らかにする。次に治療薬としてのレチノイン酸（Am80）の効果を検討し、ヒトへの臨床応用の可能性を明らかにすることを目的とする。

B. 方法

ドナーにB10.D2、ホストにBALB/cを使ったマウス慢性GVHDモデルにおいて、IL-17欠損マウスをドナーに用いて慢性GVHD発症が抑制されるかを検討する。次にTh17細胞への分化を抑制するレチノイン酸を投与しGVHDの抑制、治療効果を明らかにする。

C. 結果

慢性GVHD発症マウスでTh1およびTh17細胞が増加、組織浸潤しており、IL-17欠損マウスによって慢性GVHDは、組織学的、臨床的指標でコントロール群と比較し有意に軽減された。Th1およびTh17細胞を抑制するレチノイン酸を投与することにより慢性GVHDが軽減された。

D. 考察

慢性GVHDは従来考えられていたTh2細胞に加え、Th1/Th17細胞が発症に関与していることが示唆された。Am80はヒトで白血病治療薬としてすでに臨床応用され、副作用も軽度であることが確認されているため、今後はこの結果を受けステロイド難治・抵抗性の慢性GVHD患者を対象に有効性と安全性を確認する必要がある。

E. 結論

Th1およびTh17細胞の慢性GVHDへの関与が明らかとなり、治療薬としてレチノイン酸が有効である可能性が示唆された。

同種造血幹細胞移植後の VOD 発症と超音波検査での早期発症予測に関する研究

研究分担者 田中 淳司 北海道大学大学院医学研究科内科学講座血液内科学分野 准教授

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植後の早期非再発死亡の主たる原因のひとつである Sinusoidal obstruction syndrome/veno-occlusive disease (SOS/VOD)は肝類洞の内皮障害から始まり、末梢類洞の非血栓性の閉塞を起こし、最終的に肝静脈の血栓性閉塞、線維性狭窄、肝細胞壊死を引き起こす疾患群である。報告によっては20%以上の死亡率とも言われている。予防、早期発見、早期治療が臨床的に重要であることがわかっており、VOD 診断に超音波検査が有用であるとの報告も数多くされている。我々はVODの早期診断のために超音波検査で評価可能な項目でスコアリングを行い有用な所見が得られたので報告する。

B. 方法

2008年5月から2012年5月までの間に北海道大学病院血液内科で行われた造血幹細胞移植114例を対象に超音波検査を行った。評価は移植前処置前、移植後14日目、移植後28日目に行い、評価項目はBモードで1.肝腫大(右葉・左葉) 2.胆嚢壁厚 3.門脈本幹径 4.腹水の有無 5.傍臍静脈径拡張、Dopplerで1.門脈平均血流速 2.門脈血流方向 3.傍臍静脈径の血流の有無 4.肝動脈RIの10項目13点でスコアリングした。

C. 結果

造血幹細胞移植が施行された114症例のうち、自家移植5例を除いた109例の同種移植症例を対象として解析を行った。年齢中央値は45歳(18-69歳)で50歳未満は64例、男性60例であった。移植前病態が完全寛解だった症例は60例で、非寛解は49例、移植ソースは血縁骨髄が13例、血縁末梢血幹細胞が15例、非血縁骨髄が58例、臍帯血が23例であった。VOD予防はUDCA+LMWHが102例と大半を占めていた。

VOD発症確定例は5例(4.6%)で、Baltimore criteriaを満たした症例は5例(4.6%)、day30以降にBaltimore criteriaを満たした症例は9例(8.3%)、当院のVODエコーで6点以上となった症例は18例(16.5%)であった。

VOD発症確定例はすべてVODエコーで6点以上であったため、VODスコア6点以上で解析すると、18症例認め、その内訳は、VOD確定例5例、GVHD6例、感染症5例、白血病肝浸潤1例、原因不明1例であった。

VOD発症確定例を移植前病態、GO投与歴、B型肝炎・C型肝炎の既往、腹部放射線歴、移植前処置、HLA一致で比較したが有意差はなく、過去に報告されているようなVOD risk factorを満たした症例で多い傾向はみられなかった。また全例で治療には遺伝子組換えトロンボモジュリンが投与され5例中3例でVODは改善し、2例はVODが原因で死亡した。

D. 考察

VODの診断はModified Seattle criteriaとBaltimore criteriaに基づいてなされるが、Seattle criteriaではOverdiagnosisとなる可能性が示唆され、Baltimore criteriaの方が優れていると報告されている。当院の評価でもやはりSeattle criteriaを満たすがVODではない症例が多数認め、Baltimore criteriaの方が診断には優れていた。

VODエコーでスコアリングを行い、VOD発症確定例ではすべて6点以上であったことからVODスコア6点以上で解析を行った。スコアの詳細を検討すると、VOD5症例はすべて傍臍静脈径が拡張し、逆流も認めた。一方、GVHD6例は生着症候群とGVHDとで分けると、生着症候群では傍臍静脈径が拡張しているが逆流所見を認めず、GVHDでは傍臍静脈径の拡張はみられないが、逆流を認めた。感染症5例と白血病肝浸潤1例は傍臍静脈径の拡張は認めず、逆流所見は認める例と認めない例とがみられた。原因不明の1例は傍臍静脈の拡張も逆流も認めなかった。以上のことから、傍臍静脈径の拡張と逆流は、VODの有無を判別するのに非常に有用であるだけでなく、他の肝障害の原因評価にも有用である可能性が示された。

E. 結論

我々がやっている超音波検査でのスコアリングは、6点以上を満たし、かつ傍臍静脈の拡張および逆流を満たす症例は全例VODの診断となっており、偽陽性も認めていない。今後、症例を積み重ねることで、VODの早期診断の判断材料となる可能性が示唆された。