

学位論文題名

Analysis of Donor-type Chimerism in Lineage-specific Cell Populations after Allogeneic Myeloablative and Nonmyeloablative Stem Cell Transplantation

(同種造血幹細胞移植後の末梢血液細胞亜分画におけるキメリズム解析)

学位論文内容の要旨

骨髄非破壊的前処置を用いたミニ移植は高齢者や合併症を有する患者においても安全に施行されており、近年増加している。しかし、混合キメラや拒絶が課題となっており、これらの指標としてドナーとレシピエントの造血細胞比率を定量的に、かつ経時的にとらえることが重要である。そこで造血幹細胞移植後の患者のCD3, CD14.15, CD56の各陽性細胞のキメリズム解析を行い、各細胞亜分画のキメリズムと移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD)、再発、拒絶、生存率との関連性を検討した。

検体は急性白血病、慢性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器悪性腫瘍により conventional myeloablative stem cell transplantation(CST)を施行した36例と nonmyeloablative stem cell transplantation(NST)を施行した34例の計70例で検討した。

方法は患者の末梢血単核球を分離し、 3×10^6 細胞に抗CD14、抗CD15抗体磁気ビーズを加え、Magnetic Cell Sorting (MACS)にてカラム吸着細胞を抗体陽性細胞として、非吸着細胞を抗体陰性細胞として分離した。次に、非吸着細胞に抗CD3あるいは抗CD56抗体磁気ビーズを加えて、同様にCD3陽性細胞、CD56陽性細胞を分離精製した。末梢血単核球をMACSで分離した後、QIA amp DNA mini kitを使用してDNAを抽出した後、4種類のマイクロサテライトプライマー (D3S1359, D6S89, ACTBP2, HGH) を用い、PCRを施行した。ABI 310 Genetic analyzerを用いて泳動されるマイクロサテライトのピークの大きさを定量的に解析し、移植前のレシピエントとドナーの泳動パターンを比較してキメリズム解析を行った。磁気ビーズを用いた分離では80%以上の純度を認め、細胞比率は3%より検出が可能であった。

患者の年齢中央値はCSTが33歳(16-54)で、NSTは53歳(27-65)であり、前処置はCSTではVP-16 + cyclophosphamide + total body irradiation (TBI)、NSTではfludarabine baseが主であった。Grade II-IVの急性GVHDはCSTにおいては18例、NSTにおいては13例で認められた。観察期間はCST

で15ヶ月(1-52)、NSTで11ヶ月(1-61)であり、CSTでは無病生存は19例で15例が死亡しており、原因は再発12例、慢性GVHD3例、治療関連死亡2例であった。NSTでは無病生存18例で14例が死亡しており、原因は再発9例、拒絶2例、急性GVHD3例、治療関連死亡1例で拒絶後生存している症例が2例であった。

CST、NSTそれぞれの症例においてドナーとレシピエントの造血細胞比率とGVHD、再発、拒絶、生存率との関連性を検討した結果、前処置にTBIを施行していない症例において、CSTではCD3陽性細胞で($p=0.02$)、NSTでは全ての分画でday 28での混合キメラ(ドナー細胞90%未満)が有意に多く認められた($p<0.001$, $p=0.0014$, $p<0.001$)。NST後のday 14での解析では、CD3陽性細胞のドナー細胞が51%以上の症例で有意にgrade II-IVの急性GVHDが認められ($p=0.029$)、CD3、CD56陽性細胞が50%以下の症例では拒絶が多く($p=0.016$, $p=0.002$)、CD56陽性細胞が50%以下の症例では再発が多く認められた($p=0.029$)。そしてday 14においてCD56陽性細胞のドナー比率が50%未満の症例は有意に一年生存率が低かった($p<0.001$)。NST後のday 28においてはCD14.15陽性細胞およびCD56陽性細胞のドナー比率が90%未満の症例で有意に一年生存率が低かった($p=0.005$, $p=0.002$)。CSTに関してはday 28のCD3陽性細胞が90%以上の症例において有意に急性GVHDが多く認められ($p=0.009$)、CD14.15陽性細胞のドナー比率が90%未満の症例においては有意に再発が多く($p=0.015$)、一年生存率が低かった($p=0.002$)。

生存率に関しては、検出感度3%を考慮し、ドナー比率90%以上と98%以上の両方で検討してみたが、完全キメリズムの基準を90%以上とした場合、より生存率を反映することがわかった。

今まで造血幹細胞移植後の生着の指標として血液型や性染色体が用いられてきたが、本研究のようにマイクロサテライトによるキメリズム解析は非常に有用であり、とくに細胞を亜分画にわけることによって、生着、拒絶、再発、急性GVHDを早期に予測できることがわかった。これら臨床病態の早期予知に際し、T細胞の有用性は以前から報告されていたが、我々はその他CD14.15, NK細胞も分離し、生着、GVHD、再発、生存率との関係を検討し、早期におけるCD14.15, NK細胞のキメリズム解析が有用であることを初めて示した。今後、造血幹細胞移植後の造血器悪性腫瘍患者における早期のキメリズム解析を行うことによって、免疫抑制剤の調整等を慎重に行うことができ、早期の重症急性GVHD予防、再発予防、そして生存率の向上に貢献する臨床的に非常に有用な情報が得られることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

Analysis of Donor-type Chimerism in Lineage-specific Cell Populations after Allogeneic Myeloablative and Nonmyeloablative Stem Cell Transplantation

(同種造血幹細胞移植後の末梢血液細胞亜分画におけるキメリズム解析)

造血幹細胞移植後のドナーとレシピエントの造血細胞比率を定量的に、かつ経時的にとらえることは再発、拒絶、移植片対宿主病 (GVHD) の制御に重要である。申請者は本研究において造血幹細胞移植後の患者の CD3、CD14.15、CD56 の各表面抗原陽性細胞のキメリズム解析を行い、各細胞亜分画のキメリズムと移植片対宿主病 (GVHD)、再発、拒絶、生存率との関連性を検討した。

症例は造血器悪性腫瘍に対して造血幹細胞移植を行った 70 例 (conventional stem cell transplantation: CST 36 例、nonmyeloablative stem cell transplantation: NST 34 例) で、患者の末梢血単核球を MACS にて各細胞亜分画に分離後、DNA を抽出し、4 種類のマイクロサテライトプライマーを用いて PCR を施行し、キメリズム解析を行った。

結果は前処置に全身放射線照射 (TBI) を施行していない場合、CST では CD3 陽性細胞で、NST では全ての分画で day 28 での混合キメラが多かった。NST 後の day 14 では、CD3 陽性細胞のドナー比率が 51%以上の症例で有意に grade II-IV の急性 GVHD が多く、50%以下の症例では拒絶が多かった。CD56 陽性細胞のドナー比率が 50%以下の症例では拒絶、再発が多く、有意に一年生存率が低かった。NST 後の day 28 では CD14.15 および CD56 陽性細胞のドナー比率が 90%未満の症例で有意に一年生存率が低かった。CST に関しては day 28 の CD3 陽性細胞が 90%以上の症例において有意に急性 GVHD が多く、CD14.15 陽性細胞のドナー比率が 90%未満の症例では有意に再発が多く、一年生存率が低かった。以上より、今回の研究によって早期の CD14.15、CD56 陽性細胞のキメリズム解析が非常に有用であることがわかった。

公開發表にあたって、副査浅香正博教授より、CD3、CD14.15、CD56 各陽性細胞のキメリズムの解析の意義、一番の強調点は何か、NST でも TBI は必要であるのか等の

質問があった。CD3 は T 細胞、CD14. 15 は骨髄球、単球、CD56 は NK 細胞の表面抗原であり、それらのキメリズムは種々の臨床病態と密接に関連しており、今回の研究では特に移植後早期の NK 細胞のキメリズム解析を行うことによって、再発、拒絶、一年生存率を予測できる点が重要であると回答した。また、NST にて TBI を施行した場合は一年生存率 72%であったのに対し、TBI を施行していない場合は 40%と有意差が認められ、TBI は必要であると回答した。次いで、副査今村雅寛教授より、ドナー細胞の比率の設定基準について、より早期でもキメリズム解析は可能か、CST における TBI の必要性について質問があった。NST の day 14 に関しては臨床的に 50%と設定し、解析を行ったところ、より種々の臨床病態を反映する結果が得られた。Day 28 の 90%に関しては検出感度が 3%であったので、ドナー細胞 98%から解析を始めたが、有意差が認められなく、95%、90%と解析を行って見たが、90%で一番有益な結果が得られたため、それに決定したと回答した。Day 7 のキメリズム解析に関しては、患者の細胞数が非常に少ない時期であり、現在の方法では分離することは難しいこと、他の方法で分離することは可能と思われるが、現在そのデータはなく、今後は是非検討していきたいと回答した。また、CST では TBI 施行症例は 1 年生存率 60%であったのに対し、TBI 未施行症例は 40%で有意差はでなかったものの、生存率向上には TBI は有効であると回答した。最後に、主査小野江和則教授より、造血幹細胞移植における NK 細胞の役割、day 14 と day 28 で解析する必要性についての質問があった。NK 細胞の役割として、graft-versus-leukemia (GVL) 効果増強、GVHD 効果抑制が言われており、今回の研究で GVL 効果増強が示唆されたと回答した。また、CST と異なり、NST の場合は混合キメラの期間が長く、day14 でキメリズム解析を行うことによって、発症しつつある種々の臨床病態に速やかな対策を図ることができ、生存率の改善に向けて非常に重要な時期であると回答した。

本研究は造血器悪性腫瘍患者における造血幹細胞移植後の各細胞亜分画の早期キメリズム解析を行うことによって、種々の臨床病態に迅速かつ適切な対策を図ることができること、その結果、生存率の向上に寄与し得ることを示した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。