

学位論文題名

Influence of conditioning regimens and stem cell sources on donor-type chimerism early after stem cell transplantation

(造血幹細胞移植後早期における移植前処置および
移植細胞源のキメリズム推移に与える影響に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

造血幹細胞移植は血液悪性疾患において根治を期待できる有用な治療法である。移植細胞源として従来は骨髄移植(bone marrow transplantation, BMT)のみであったが、近年は末梢血幹細胞移植(peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT)、臍帯血移植(cord blood transplantation, CBT)が行われるようになってきている。また、移植前処置についても骨髄破壊的前処置による従来の移植(conventional stem cell transplantation, CST)には適応とならなかった高齢者や合併症のある患者にも施行できるよう、前処置の強度を軽減した移植(reduced-intensity stem cell transplantation, RIST)が行われるようになってきている。移植前処置の強度の差や移植細胞源の差が生着に影響を与えることは、よく知られているが、それらのキメリズム(ドナー由来細胞と患者由来細胞の割合)の推移に与える影響について比較した報告は少なく、今回我々は北海道大学病院血液内科において同種造血幹細胞移植を施行した 59 症例を対象とし、移植前処置および移植細胞源のキメリズムに対する影響を解析した。

【対象と方法】

当科にて同種造血幹細胞移植を行い、移植後 1 ヶ月以上生存した 59 症例を対象とし、後方視的な解析を行った。年齢中央値は 46 歳で、BMT 36 名、PBSCT 12 名、CBT 11 名であった。移植前処置に関しては CST が 31 名、RIST が 28 名であり、RIST では 4 例を除いた 24 例で全身放射線照射(total body irradiation, TBI)を併用した。

キメリズム解析は移植後 7、14、21、28 日目に採取した患者末梢血単核球より QIAmp Blood mini Kit (Qiagen, Germany)により DNA を抽出し行った。抽出した DNA をマイクロサテライトプライマー (6FAM、HEX、HED のいずれかで蛍光標識された D3S1359、D6S89、ACTBP2、HG2) を用いた PCR で増幅し、その後、ABI PRISM310 Genetic Analyzer を用いたキャピラリー電気泳動により解析を行った。本解析における検出感度は約 3%であり、ドナー由来のマイクロサテライトが 97%以上認められた場合を完全キメラとした。

【結果】

59 症例中、生着を認めた 55 例全例で生着前からドナータイプキメリズムの増加が認められ、7 日目で $49.2 \pm 29.3\%$ 、14 日目で $81.2 \pm 25.2\%$ 、21 日目で $97.8 \pm 4.7\%$ 、28 日目で $97.4 \pm 6.2\%$ であった。移植前処置の影響に関しては、CST 群と TBI 併用 RIST 群において、TBI 非併用 RIST 群と比較し有意なドナータイプキメリズムの増加を認めた(CST vs TBI 非併用 RIST, 21 日で $97.9 \pm 4.3\%$ vs $87.5 \pm 9.5\%$, $P=0.013$, 28 日で $98.5 \pm 2.9\%$ vs 84.3

±11.5%, P<0.01; TBI 併用 RIST vs TBI 非併用 RIST, 21 日で 98.8±2.3% vs 87.5±9.5%, P<0.01, 928 日で 9.3±2.3% vs 84.3±11.5%, P<0.01)。移植細胞源の差に関しては、生着は PBSCT で中央値 12 日、BMT で中央値 16 日、CBT で中央値 26.5 日に認められ、生着は PBSCT で早く、CBT で有意に遅かった。ドナータイプキメラリズムの推移に関しても同様であり、PBSCT では BMT、CBT と比較して有意に 7 日目でのドナータイプキメラリズムが高値であった (PBSCT vs BMT, 81.5±14.3% vs 43.2±25.6%, P<0.01; PBSCT vs CBT, 81.5±14.3% vs 26.7±24.9%, P<0.01)。一方、CBT では BMT、PBSCT と比較して有意に 14 日目でのドナータイプキメラリズムが低値であった (BMT vs CBT, 84.8±20.2% vs 55.8±34.9%, P<0.05; PBSCT vs CBT, 95.8±6.4% vs 55.8±34.9%, P<0.01)。

4 例の生着不全症例は 1 例が BMT (症例 1)、3 例が CBT (症例 2、3、4) であった。生着を認めた BMT 症例でのドナータイプキメラリズムの平均値は 7 日目で 43.2±25.6%、14 日目で 84.8±20.3% であったが、症例 1 のそれは 7 日目で 0%、14 日目で 61% と低値であった。また、生着を認めた CBT 症例でのドナータイプキメラリズムの平均値は 14 日目で 54.8±34.9%、21 日目で 95.5±5.3% であったが、症例 2 では 14 日目で 27%、21 日目で 43%、症例 3 では 14 日目で 15%、21 日目で 36%、症例 4 では 14 日目で 11%、21 日目で 6% であり、いずれも低値であった。

【考察】

本研究では生着前後の移植後早期のキメラリズムの推移について解析を行った。以前より、RIST に TBI を加えることが生着に有利に働くことが報告されており、本研究でもそのことが確認され、より確実な生着を担保する上でドナータイプキメラリズム高値の重要性が明らかとなった。また、移植細胞源に関しては BMT と比べて PBSCT でより生着が早く、CBT でより生着が遅いことが報告されているが、ドナータイプキメラリズムの推移においても PBSCT でより早期に完全キメラリズムを達成し、CBT では完全キメラの達成が遅いことが示された。CBT においては完全キメラリズムの到達に時間がかかることが CBT における生着不全の多さの一因と考えられる。また、生着不全の 4 例では生着した同じ移植細胞源での症例の平均値と比べてドナータイプキメラリズムが低値であった。現時点ではまだ少数例での解析であるが、本研究から得られた移植細胞源別のドナータイプキメラリズムの平均値 (PBSCT : 7 日目 81.5%、BMT : 14 日目 84.8%、CBT : 14 日目 55.8%) は今後さらに症例を蓄積することで生着不全の早期予測に役立つ可能性が示唆された。

【結論】

本研究により、移植前処置および移植細胞源がドナータイプキメラリズムの推移に大きな影響を与えることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学位論文題名

Influence of conditioning regimens and stem cell sources on donor-type chimerism early after stem cell transplantation

(造血幹細胞移植後早期における移植前処置および
移植細胞源のキメリズム推移に与える影響に関する研究)

造血幹細胞移植後のキメリズム解析は、移植後の生着、拒絶、移植片対宿主病の発症、予後の推測に重要である。本研究では、移植後 28 日以内の早期キメリズムを、移植前処置別および造血幹細胞別に解析し、その臨床的意義を検討することを目的とした。59 例の同種造血幹細胞移植症例より、移植後 7、14、21、28 日目に末梢血単核球を採取後、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、RT-PCR 法にてキメリズム解析を行った。その結果、TBI を用いることで移植後 21 日目、28 日のドナータイプキメリズムが有意に高値となること、また造血細胞源別では BMT と比較して、PBSCT でより早く、CBT でより遅くドナータイプキメリズムの増加が確認された。

副査である秋田弘俊教授から、3 つの造血細胞源の中で、特に CBT では他の移植細胞源と比較して生着が遅く、そのキメリズム推移は遅いという結果であったが、その機序についての質問があった。それに対して申請者は、CBT では他の細胞源に比べて幹細胞である CD34 陽性細胞の輸注細胞数が少ないこと、また T 細胞である CD3 陽性細胞の輸注細胞数が少ないことが言われており、量的な問題が原因と考えられるとの回答を行った。さらに、生着不全を早期に予測できる点に臨床的意義があるが、具体的に判定のタイミングやドナータイプキメリズムの数値に関しての質問があった。それに対して申請者は、CBT で比較的高い確率で生着不全が起きることから、特に CBT において早期に生着不全を予測することが臨床的に重要であること、今回は少数例での解析のみであるため今後さらに症例数を蓄積して検討していくことが必要であることを述べた上で、CBT での移植後 14 日目のドナータイプキメリズム 55%、移植後 21 日目のドナータイプキメリズム 96%というのが生着不全の早期予測に役立つ可能性があるかと回答した。

次いで主査である小野江和則教授から、CBT において生着不全が多い原因として CD34 陽性細胞数、T 細胞数のほかに、移植時の HLA 一致度についての質問があった。それに対して申請者は、BMT や PBSCT では原則として HLA6 抗原(A、B、DR)が完全一致で移植を行っているのに対して、CBT では 6 抗原中 4 抗原以上が一致であれば移植可能とされていることを述べた上で、今回の検討での CBT でも多くの症例は 4 抗原の一致で移植を行っており、このことが生着不全やキメリズム推移に影響している可能性も考えられると回答した。さらに、CBT において生着不全率の高さは欠点であるが、GVHD が少ないという点は利点になっているのかという質問があった。それに対して申請者は、HLA6 抗原を完全に一致させて CBT を行えば GVHD はかなり少なくなると考えられるが、6 抗原中 4 抗原の

一致で移植を行うことが実際には多いため期待するほど GVHD は少なくないが、重症化する例は少ないと回答した。また、臍帯血の造血幹細胞は骨髓血や末梢血のそれと比べて性質は同じなのかという質問があった。それに対して申請者は、臨床的には CD34 陽性細胞という観点からのみ幹細胞源を定義しているが、骨髓血、末梢血、臍帯血の造血幹細胞は同一のものでない可能性は十分にあると考えられると回答した。さらに、臍帯血は出産時における低酸素のストレスにさらされている可能性があるが、この点についてはどう評価しているかとの質問があった。それに対して申請者は、その可能性は否定できないがデータとしてはまだないと思われると述べ、少なくとも臍帯血の凍結前に生存率やコロニーの評価はしているため大きなストレスが加わった細胞は除外されるものと考えられると回答した。

最後に、副査である今村雅寛教授から、生着不全を早期に予測することの臨床的意義について質問があった。それに対して申請者は CBT において生着不全を早期に予測することができれば、免疫抑制剤の調整や再移植の準備など行うことができる可能性があり、生着前の好中球減少による易感染の状態で 1 週間から 2 週間の期間を短縮することは生着不全例において大きく予後を改善する可能性があると回答した。さらに、今回の解析で BMT、PBSCT では生着率も高く、キメリズム推移も良好であったが、若年者でも RIST を行っていくことに関してはどのように考えるかとの質問があった。それに対して申請者は、生着という観点では問題ないと思うが、抗腫瘍効果という観点から考えると必ずしも前処置強度を軽減することが予後を改善するとはいえず、原疾患にもよるが現時点で若年者に RIST を行うのは再発のリスクがあると回答した。

この論文は、移植前処置および移植細胞源の違いによりドナータイプキメリズムの推移が異なり、その結果を用いて生着不全を予測できる可能性があることを示した点が高く評価され、今後は臨床的な応用が期待される。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。