

学位論文題名

造血幹細胞移植後の末梢血液細胞亜分画の分離と
キメリズムの検討及びその臨床応用

学位論文内容の要旨

〔緒言〕：近年、骨髓非破壊的前処置を用いた造血幹細胞移植などの普及に伴い、造血幹細胞移植後の再発や拒絶などの指標としてキメリズムの解析の重要性が増している。その一方で、全血のキメリズムの解析だけでは満足な結果が得られない事例が時折散見される。このためCD3陽性細胞やCD14陽性細胞などの分画に分離した細胞を用いてキメリズムの解析を行う必要性が増してきている。しかし、フローサイトメトリーを応用した分離法は煩雑で時間もかかり現実的ではない。そこで今回は、比較的簡便な磁気ビーズ(Magnetic cell sorting system)を利用し、その有用性を検討した。次に、実際の臨床症例に応用して、移植後の細胞亜分画のキメリズムと移植片対宿主病や拒絶反応との関連を検討した。

〔方法と結果〕：健常人ドナー及び患者より全血を採取しFicoll-Hypaqueにて単核球に分離し、 $3 \cdot 10 \times 10^6$ の細胞に抗体磁気ビーズ(Miltenyi Biotec, Germany)を加え、 4°C で15分間培養し、洗浄後、1mlのPBSバッファーを加え検体とした。次に検体をカラムに通して、カラムに付着する抗体陽性細胞とカラムに付着しない抗体陰性細胞を得た。再度他の種類の抗体磁気ビーズを用いて検体を作成し、抗体磁気ビーズが陽性な細胞分画の分離を繰り返した。得られた細胞の純度をフローサイトメトリー(FACS Calibur, Becton Dickinson)にて計測した。実際の造血幹細胞移植臨床症例22例より75検体を採取し、末梢血単核球を抗体磁気ビーズ法にて各細胞亜分画に分離した。次にQIAmp DNA Blood mini kit (QIAGEN, Germany)を用いてDNAを抽出し、4種類のmicrosatellite primerを用いてPCRを施行し、ABI310 Genetic analyzer(ABI PRISM310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer, USA)を用いて泳動されるmicrosatelliteの大きさとその量を定量的に解析し、移植前の患者とドナーの泳動パターンを比較してキメリズムの解析を行った。またStudent's *t* testを用いて統計学的解析を行った。

解析した75検体では全ての細胞亜分画で80%以上の純度が得られた。 $3 \sim 10 \times 10^6$ の範囲内では分離にかかる時間や、分離した細胞の純度には大きな相違は認められなかった。採血後の検体提出から分離にかかる時間の比較では、分離までの時間が長い症例でCD56陽性細胞の純度に有意な低下を認めた($p=0.002$)。CD14.15陽性細胞の分離を先に行った方が他の系列(CD3陽性細胞)の分離の純度が良好となる傾向はあったが統計学的な有意差はなかった。移植後1ヶ月ではtotal body irradiation(TBI)が含まれる前処置を施行した症例のCD56陽性細胞に混合キメラが有意($P=0.040$)に多く認められた。

一方で、移植後2ヶ月、移植後3ヶ月ではTBIを施行されていない症例に混合キメラが多い傾向はあったが、有意差を認めなかった。CD56陽性細胞分画が完全キメラの症例に慢性のGVHDが多く（ $P=0.0014$ ）、CD56陽性細胞分画に混合キメラを認める症例では、拒絶が有意に多く認められた（ $P=0.047$ ）。造血の回復が比較的遅く、汎血球減少が認められた症例について、day 35にキメリズムの解析を行うとCD3陽性細胞に高度な混合キメラが認められた。この結果から軽度の拒絶反応が生じていると考え、免疫抑制剤を減量した。免疫抑制剤を減量後、造血が順調に回復し、混合キメラからドナータイプの完全キメラに移行し、day 104に全ての系統で完全なドナー型となった。

〔考案〕：近年、同種造血細胞移植後の末梢単核球におけるキメリズムの変化について解析されるようになってきた。しかし、移植後の混合キメラが再発や拒絶を意味するのかどうかは、未だ一定の見解が得られていない。同種造血細胞移植後のキメリズムと再発や拒絶との相関が諸家の報告で必ずしも一致していないのは、末梢血液細胞亜分画でのキメリズムの解析が適切に行われていないためと考えられた。そこでMagnetic cell sorting systemを用いて、末梢血単核球を細胞亜分画に分離しそれぞれのキメリズムをキャピラリー電気泳動法で定量的に解析した。今回の検討では $3\sim 10 \times 10^4$ の範囲内では分離にかかる時間や、分離した細胞の純度には大きな相違は認められなかった。採血後分離までの時間経過について解析すると、CD3では傾向のみであったが、CD56では明らかに時間経過の長い検体程、純度が低下していた。これは時間経過で表面抗原の発現が低下したり、時間経過が長い検体ほど細胞のviabilityが低下していくことによるものと推測されたが、明確な機序は不明である。また、大型の細胞を分離してから小型の細胞を分離した方が純度が高いかどうかを、CD14.15陽性細胞の分離の有無で判定したが、CD14.15陽性細胞の分離を行った症例がよりCD3の純度が高い傾向はあったものの、統計学的な有意差を認めなかった。今回は 3×10^4 細胞を用いてまずCD14.CD15陽性細胞を分離し、次にCD3陽性細胞、CD56陽性細胞という順序で細胞亜分画を分離するという手順で21症例75検体の解析を施行した。前処置とキメリズムの関係では移植後1ヶ月の症例では混合キメラがTBI施行症例に多く認められたが、その後のTBI施行症例に混合キメラが少ない傾向が認められることから、移植後1ヶ月の時点では症例毎の個人差が影響しやすいためと考えられる。現在末梢血単核細胞の混合キメラが予後に影響するかどうかは議論のあるところであるが、Tsumuraらは全血、単核球および顆粒球のキメリズムを検討し、何れかに混合キメラを認める症例に、予後不良例が多く、完全キメラに急性のGVHDが多いことを示している。今回の検討ではCD56陽性細胞分画に混合キメラを認めると、拒絶症例が多い可能性があることが示された。一方、CD56陽性細胞がドナー型の完全キメラであることと慢性GVHDに関連があることが示された。このように当科では末梢血液細胞亜分画毎のキメリズムの解析を実際に臨床応用し、免疫抑制剤の投与量やDLIのタイミングの決定に利用し、良好な結果を挙げつつある。

〔結語〕：Magnetic cell sorting systemは簡便で短時間で施行でき、同一検体から3系統の末梢血液細胞亜分画までの分離が可能であることを確認した。この方法によって造血細胞移植症例22例の末梢血液細胞亜分画のキメリズムを解析したところ、移植後のCD3陽性細胞だけでなく、CD56陽性細胞のキメリズムが移植片対宿主病や拒絶反応において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、このような末梢血液細胞亜分画の定量的キメリズムの解析は造血幹細胞移植後に免疫抑制剤の増減、ドナーリンパ

球輸注(Donor lymphocyte infusion, DLI)の時期の決定、再発、拒絶の経過観察に応用できるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 小 野 江 和 則
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

造血幹細胞移植後の末梢血液細胞亜分画の分離と キメリズムの検討及びその臨床応用

造血幹細胞移植後の白血病再発や移植片拒絶などの指標として、末梢血液細胞亜分画のキメリズムの解析は重要である。申請者は本研究において、比較的簡便な磁気ビーズ (Magnetic cell sorting system : MACS) を利用し、臨床症例に応用して、移植後の細胞亜分画のキメリズムと移植片対宿主病(GVHD)や拒絶との関連を検討した。

健康人ドナーおよび22例の患者より全血を採取し、 3×10^6 細胞をMACSにてCD14、CD15、CD3、CD56各細胞亜分画に分離精製した。次に、DNAを抽出し、4種類のmicrosatellite primerを用いてPCRを施行し、ABI310 Genetic analyzerを用いてキメリズムの解析を行った。解析した22症例75検体では全ての細胞亜分画で80%以上の純度が得られた。採血から分離までの時間が長い症例でCD56陽性細胞の純度に低下を認めた。移植後1ヶ月ではtotal body irradiation(TBI)施行症例のCD56陽性細胞に混合キメラが多く認められた。CD56陽性細胞分画が完全キメラの症例に慢性GVHDが多く、CD56陽性細胞分画に混合キメラを認める症例では、拒絶が有意に多く認められた。MACSにより、同一検体から3系統の末梢血液細胞亜分画までの分離が簡便かつ短時間内で施行でき、移植後のCD3陽性細胞だけでなく、CD56陽性細胞のキメリズムがGVHDや拒絶において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。造血幹細胞移植後に細胞亜分画ごとのキメリズムを解析することがその病態を把握するうえで臨床的にも重要であると考えられた。

公開発表にあたって、副査小野江和則教授より、CD14、CD15、CD56を発現している細胞の意義と比率、ドナー型完全キメラにおけるT細胞と移植片対宿主反応(GVHR)の関連性、サイトカインバランスとGVHRについて質問があった。CD14発現細胞は単球、CD15発現細胞は単球および骨髄球、CD56はNK細胞に発現しており、CD14に関しては単球に特異性が高いため、信頼度が高いものと思われるが、CD14

及びCD15のdouble positiveの細胞が存在していた場合、明確に区分することは難しいと回答した。次に、副査浅香正博教授より、細胞亜分画の純度と採取後の時間経過との関連、TBI施行とCD56陽性細胞の混合キメリズムの関連、CD56陽性細胞のキメリズムとGVHDの関連について質問があった。各々の質問に対し、申請者は細胞のviabilityが低下している可能性、CD56陽性細胞は放射線に対して抵抗性であり、レシピエントの細胞が残存している可能性、CD56でドナー型キメリズムを示す場合は、CD3、特にCD8もそうなっている可能性が高く、これがホストに特異的なマイナー組織適合抗原を認識して特異的なHLA class Iが発現しているとそれを認識して免疫反応が起こり、これらの現象が総体として慢性GVHDを起こすと回答した。最後に、主査今村雅寛教授より、他の細胞亜分画の解析意義、キメリズムの解析時期、NK細胞の細胞障害機序について質問があった。これらの質問に対し、申請者は細胞に関しては回収できる細胞数が多ければ他の分画も検討すべきであるが、CD3、CD56、CD14、CD15で十分であると回答し、解析時期は移植後定期的に最低月1回、拒絶やGVHD等が出現した場合には回数を増やすべきであると回答した。また、細胞障害機序に関しては、Fas/FasL、perforin/granzyme Bの関与について回答した。

本研究は、移植後末梢血液細胞亜分画のキメリズムの解析により、キメリズムと拒絶やGVHDの関係を明らかにした点に意義を有し、臨床的有用性が高いと評価できる。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。