

学位論文題名

造血幹細胞移植後の末梢血細胞亜分画のキメリズム
および T cell receptor repertoire 解析の臨床応用

学位論文内容の要旨

〔緒言〕近年、造血幹細胞移植の普及とともに造血器腫瘍をはじめとする様々な疾患に治癒を望める可能性が出てきている。一方で拒絶や生着不全、再発、移植片対宿主病 (GVHD) など未だ解決されない移植後の合併も多い。これらを客観的に判定し予知する方法の一つとして移植後のドナーとレシピエントのmicrosatelliteを応用したキメリズムの解析や、GVHD等の免疫反応の解析にT-cell receptor (TCR) repertoireの解析が有用である。しかしキメリズムの解析についてはpolymerase chain reaction (PCR) を用いるため、その定量性に問題があり、TCR repertoireの解析については、Tリンパ球の細分化が必要と考えられる。本研究では、キメリズム解析に用いるプライマーの定量性の検討とその応用およびTリンパ球をさらに細分化してTCR repertoireを解析する有用性について検討した。

〔方法〕1. 健常人より全血を採取し単核球を分離し、抽出したDNAを3/100、5/100、10/100、30/100、50/100の比率で混合しmicrosatelliteを用いてPCRを行った。これらをキャピラリー電気泳動システムを用いて解析し定量性を検討した。2. 1994～2000に当科および関連病院で造血幹細胞移植を受け30症例を用いて移植前後の様々な因子とキメリズムで統計的有意差を検討した。3. 一度生着後、汎血球減少を呈した移植後の症例より単核球を分離し、DNA、RNAを抽出し、PCRおよびRT-PCRを用いてキメリズムおよびTCR repertoire β chain subfamilies (VB) の解析を行い、その発症幾序について検討した。

〔結果〕1. 今回用いたmicrosatelliteでの解析では3%までの混合キメラを検出可能であった。定量性の検討についてはACTBP2とD6S89の定量性が優れていた。2. 解析率についてはACTBP2とHGHが優れており、非血縁者間移植での解析率が血縁者間移植の解析率より良好であった。3. 今回検討した30症例では急性GVHDの合併症例に完全キメラが多い傾向を認めた。これらを他の移植前後の因子と共に統計的解析を加えると、30歳未満、非照射前処置、再発もしくは生着不全症例、非急性GVHD症例に統計学的有意差をもって、混合キメラが多い傾向を示した。4. 移植後汎血球減少を呈した症例のCD3陽性細胞群に混合キメラを認めた。TCR repertoireの解析を行ったところ全経過中でVB2とVB15が突出したピークを持つことが分かった。このためこれらをCD4、CD8陽性細胞に磁気ビーズを用いて分離し、キメリズムとTCR repertoireについて検討した。その結果VB15の突出したピークはCD8陽性細胞においてレシピエントの

キメリズムの比率と合致した。

〔考察〕1994年頃よりmicrosatelliteを応用しキメリズム解析で移植後の再発の予知が可能か検討されてはいるが、移植後のキメリズムが再発や拒絶を示唆するのか未だ一定の見解が得られていない。実際、末梢血単核球とT細胞のキメリズムが一致せず、拒絶をより反映したのはT細胞であったり、B細胞系のリンパ性白血病ではCD19陽性細胞が再発を示唆する可能性が報告されている。当科でもPCR法を用いて移植後のキメリズムの解析を施行したが、これを定量的に判定することは容易ではなかった。しかし、近年キャピラリー電気泳動法の応用で、キメリズムの解析が短時間でかつ視覚的に捕らえることが可能となった。そこでキャピラリー電気泳動法を用いて4種類のmicrosatelliteの解析率および定量性について検討し、各々のmicrosatelliteの特徴を把握しこれを臨床応用可能なシステムに確立した。

次に、これを用いて同種造血幹細胞移植後30症例の解析を行い様々な移植前後の因子と混合キメラとの関連について解析した。第一に放射線照射前処置を用いた場合に完全キメラが多い傾向があった。照射前処置を用いて完全キメラを認めた症例は10Gy以上の全身照射を施行されていた。第二に急性GVHDを認めた症例に完全キメラが多い傾向を認めた。

同種骨髄移植は30歳未満の症例でより安全に施行可能であり、30歳以上と以下でキメリズムに差があるかを検討したところ、30歳未満の症例でより混合キメラが多い傾向を認めた。さらに30歳以上の症例で混合キメラを認めた場合は多くの症例が再発や生着不全を発症するのに対し、30歳未満では混合キメラであっても必ずしも生着不全や再発症例を認めなかった。これは若年者では免疫寛容が成立しやすいためと考えられ、30歳以上では予後不良因子と考えられる混合キメラが若年者では必ずしも予後不良因子とならないと考えられる。実際、今回の解析では急性GVHDが30歳以上に多く認められ、30歳以上の症例では免疫寛容が成立しにくいことを裏付けるものと考えられた。

一方、移植後のTCR repertoireの変化について様々な報告があり、従来より我々は移植後の合併症特に生着不全と考えられる一連の疾患群が同一の発症機序によるものか否かの検討を行ってきた。早期の生着不全は早急にキメリズムがレシピエント由来となることを確認している。今回提示した症例は混合キメラが持続しただけでなく、混合キメラを示した細胞群が主にCD3陽性細胞群であったことが特徴である。TCR repertoireの解析では、全経過中でクロナリティを認めたVB2と汎血球減少を認めてからクロナリティを認めたVB15を確認した。VB2に関してはドナーも全く同一のクロナリティを認めたためドナー、レシピエント共に共通の抗原を認識していると考えられた。一方VB15に関しては汎血球減少を認めてからクロナリティを認めたのみならず、クロナリティを認めた細胞群がCD8陽性細胞群であり、その細胞群の占める割合がCD8におけるレシピエントの由来の細胞群が占める割合と一致していた。これは今まで生着不全と考えられた一連の疾患群の中に生着しているものの、特定の細胞群の免疫反応にて造血が阻害されている疾患群が存在していることを示している。キメリズムにTCR repertoireの解析を加えることでより客観的な判断と多彩な治療方針が検討できると考えられた。

〔結語〕 キメリズムの解析は特に30歳以上の症例での予後判定に重要であり、TCR repertoireの解析が移植後の合併症の治療について有益な診断材料の一つであると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 武 蔵 学

学 位 論 文 題 名

造血幹細胞移植後の末梢血細胞亜分画のキメリズム

および T cell receptor repertoire 解析の臨床応用

近年、造血幹細胞移植の発達は目覚ましいものがあるが、生着不全や、移植片対宿主病 (GVHD) など未だ解決されない問題も多い。これらを客観的に判定し予知する方法の一つとして移植後のキメリズムの解析や、T-cell receptor (TCR) repertoireの解析が有用である。本研究では、キメリズム解析に用いるプライマーの定量性の検討と、TCR repertoireの解析の臨床応用を目的とした。方法として、1.抽出したDNAを適当な比率で混合しmicrosatelliteを用いてPCRを行い、キャピラリー電気泳動システムを用いて解析し定量性を検討した。2.造血幹細胞移植を受けた30症例を用いて移植前後の様々な因子とキメリズムで統計的有意差を検討した。3.生着不全症例より単核球を分離し、DNA、RNAを抽出し、キメリズムおよびTCR repertoire β chain subfamilies (VB)の解析を行い、その発症機序について検討した。その結果、1.今回用いたmicrosatelliteでの解析では3%までの混合キメラを検出可能であり、定量性および解析率について優れるものが存在した。2.今回検討した30症例では30歳未満、非照射前処置、再発もしくは生着不全症例、非急性GVHD症例に統計学的有意差をもって、混合キメラが多い傾向を示した。3.生着不全症例のCD3陽性細胞群に混合キメラを認め、TCR repertoireの解析を行ったところ、VB15の突出したピークはCD8陽性細胞においてレシピエントのキメリズムの比率と合致した。

キメリズムの解析は特に30歳以上の症例での予後判定に重要であり、TCR repertoireの解析が移植後の合併症の治療について有益な診断材料の一つであると考えられた。

口頭発表では副査今村教授から年齢とキメリズム関連およびprimerの実用性について質問があった。申請者はキメリズムのprimerは最低4種類必要であり同時に3種類のmicrosatelliteを解析する方法などもあるが定量性の問題があり採用しなかったこと、年齢とキメリズムの関連は年齢と胸腺に関連があり成人の胸腺が若年者に比して退化しているため前処置などで胸腺の機能が低下し免疫寛容が成立しにくいがための表裏一体の結果であることを現在までのキメリズム解析例および他の報告を引用して説明した。次いで副査武蔵教授からT-cellレパートリ

ーとTBIおよびT-cellレパトリー-VB15と生着不全についての質問があった。申請者は他の報告でのT-cellレパトリーの回復よりCD4陽性細胞群でのレパトリーの回復がおくれるであろうことを説明し、生着不全については本症例ではCD8陽性かつVB15細胞群での結果であったが、CD4の症例もあり疾患毎の差がある可能性があり、さらなる検討が必要と考えられると述べた。最後に主査浅香教授より移植ソースでのキメラの経過の違いとT-cellレパトリーによるGVHDの予測について質問があった。申請者は移植ソースでは他の報告からも現在までの解析結果からも末梢血幹細胞移植症例でのドナータイプ完全キメラへの移行が他の移植ソースよりも早いと説明し、T-cellレパトリーでは移植されたリンパ球とレシピエントに残存するリンパ球のため急性GVHDを予測することは難しいが、慢性GVHDの予測および治療に対する反応性や免疫抑制剤減量のタイミングを予測可能であり現在投稿中であると述べた。

本研究は、移植後の合併症を多角的に捕らえられることを可能とした点で高く評価され、今後造血幹細胞移植へのさらなる応用が期待される。

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。