

**キメリズム解析 / HLA-Flow法による  
HLAミスマッチ造血細胞移植後の病態解析**

**渡辺信和**

**東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター**

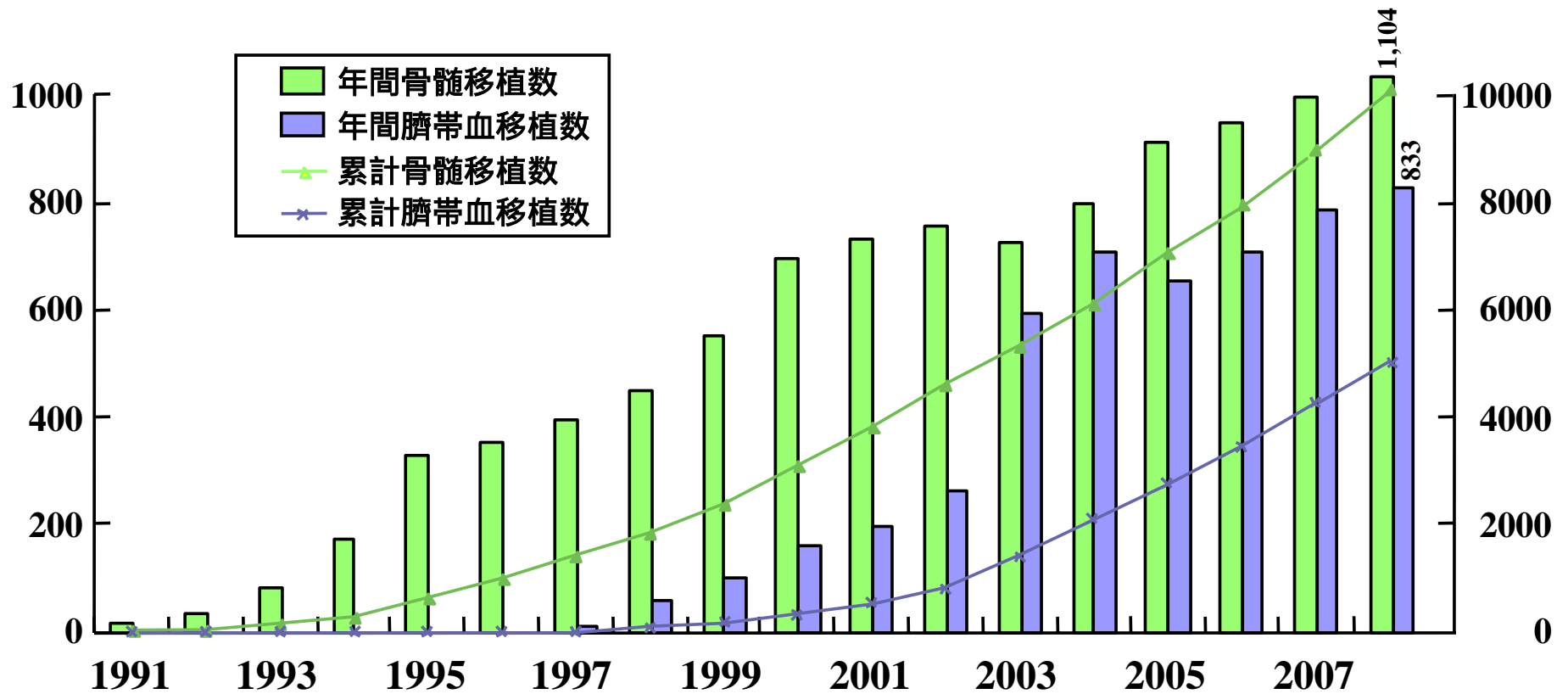
**幹細胞治療分野 病態解析領域**

# 我が国におけるバンクからの造血細胞移植数の推移

2009年3月31日現在  
骨髄移植：10,355例  
臍帯血移植：5,334例

年間移植数

累計移植数



## 臍帯血移植の特徴

### 利点：

1. ドナーに対する負担がない。
2. 必要時に早く移植できる。
3. HLAミスマッチでも移植できる。
4. 急性GVHDが少ない。

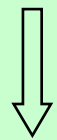
### 欠点：

1. 生着不全が多い。
2. 再発が骨髄移植と同程度起こる。

## キメリズムの語源：キマイラchimaira



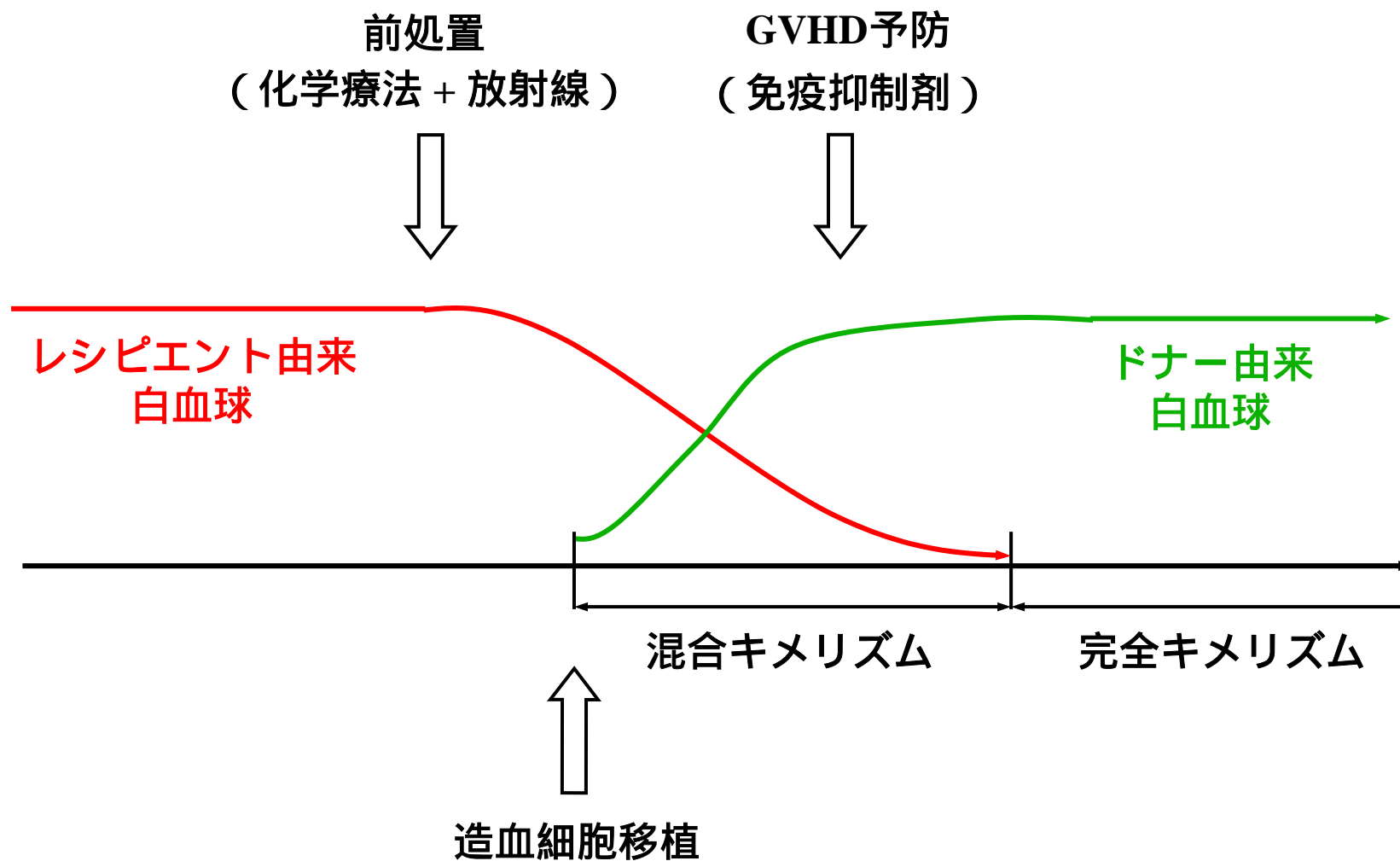
異なる胚由来の臓器・組織・細胞が、一つの個体内に存在すること。



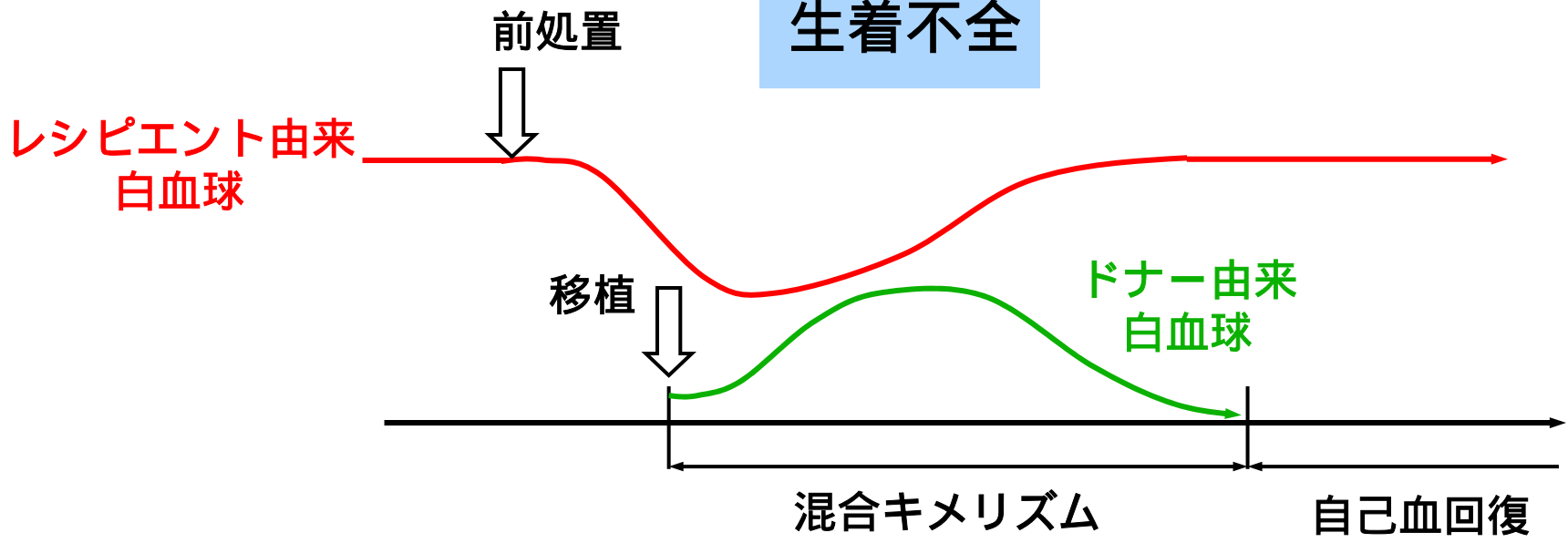
造血細胞移植では

ドナー由来血液細胞とレシピエント由来血液細胞が、レシピエントの体内に同時に存在すること。

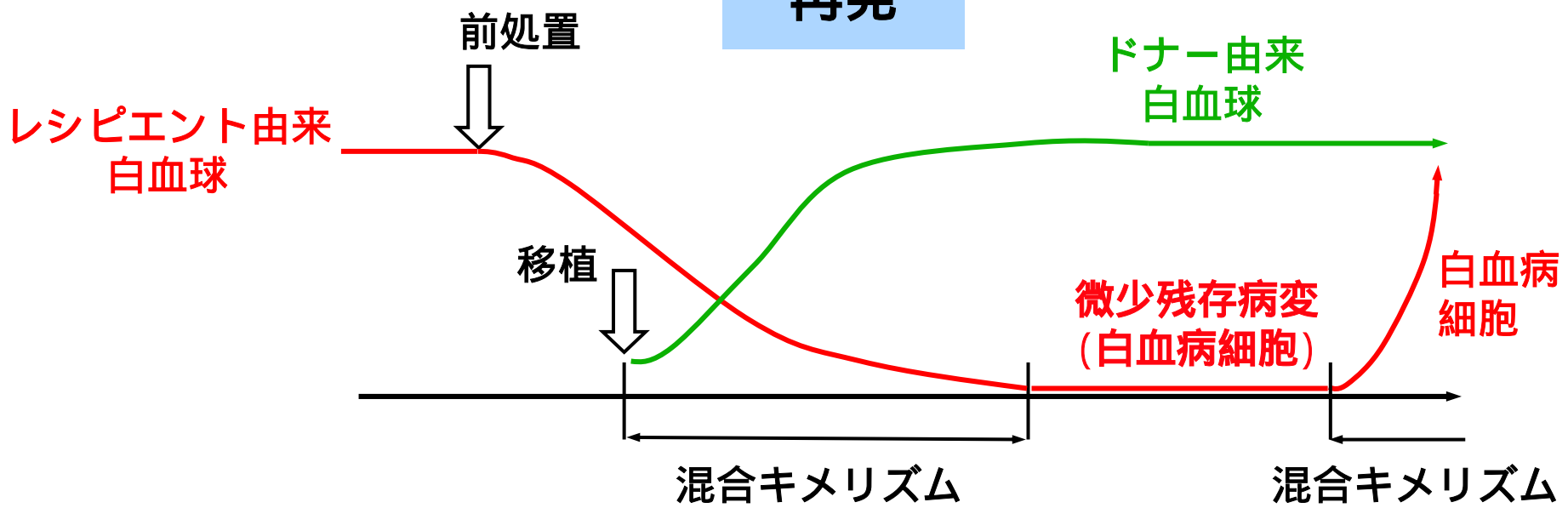
# 造血細胞移植後のキメリズム



# 生着不全



# 再発



## 臨床で汎用されている方法

### 異性間移植



#### X/Y-FISH法

利点:感度 0.1%

定量的

必要細胞数  $10^3$ 個

欠点:異性間移植に限定

解析に5-7日必要

細胞種は不明

### 同性間移植



#### STR-PCR法

利点:95%をカバー

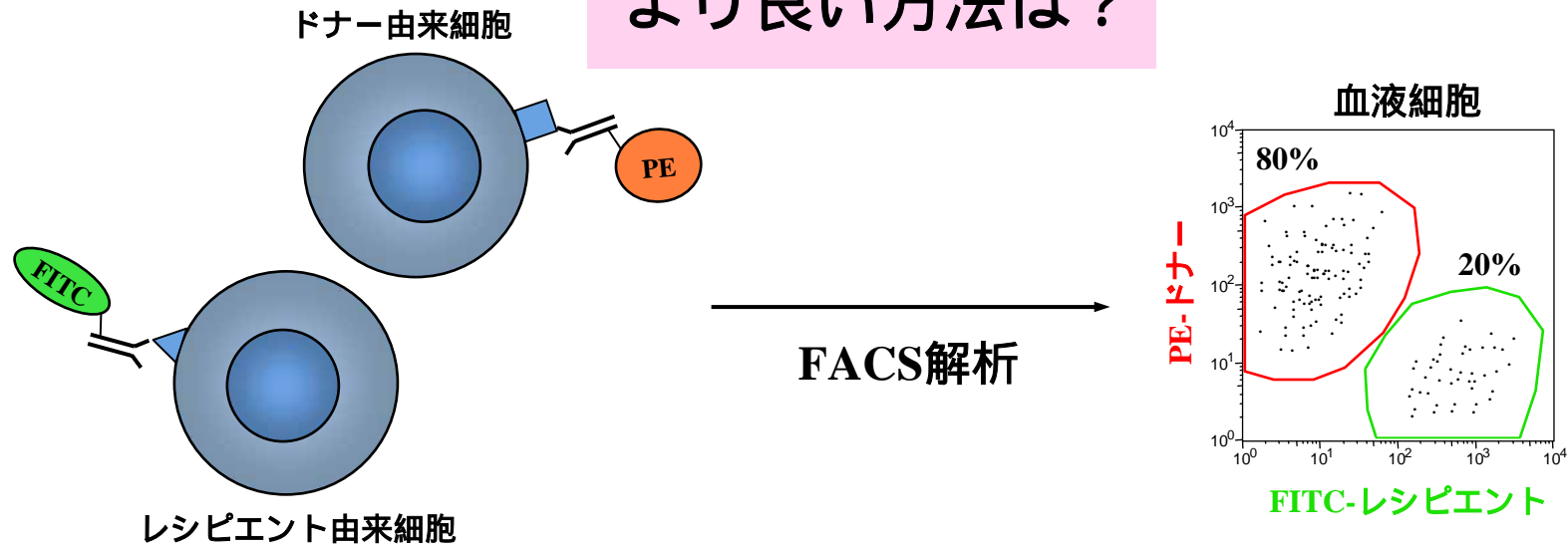
欠点:感度5%

ドナーとレシピエントのDNAが必要

解析に5-14日必要

細胞種は不明

## より良い方法は？



### 利点:

1. 迅速
2. 高感度
3. 定量的
4. 細胞種までわかる
5. ソーティング(分取)後、さらに解析が可能

### 欠点:

1. 特異的マーカーがないとできない
2. 抗体がないとできない



## ドナーとレシピエントのマーカーとしてHLAに注目

### 1. HLAミスマッチ移植の増加

臍帯血移植やHLA半合致移植の普及

### 2. アリル特異的抗HLAモノクローナル抗体の存在

HLAタイピング用の抗体がフローサイトメトリーでも利用可能



## キメリズム解析 / HLA-Flow法の開発

(Biology of Blood and Marrow Transplantation, 14(6): 693-701, 2008.)

## 臍帯血移植後の生着のモニタリング

抗A24抗体- FITC

抗A11抗体- PE

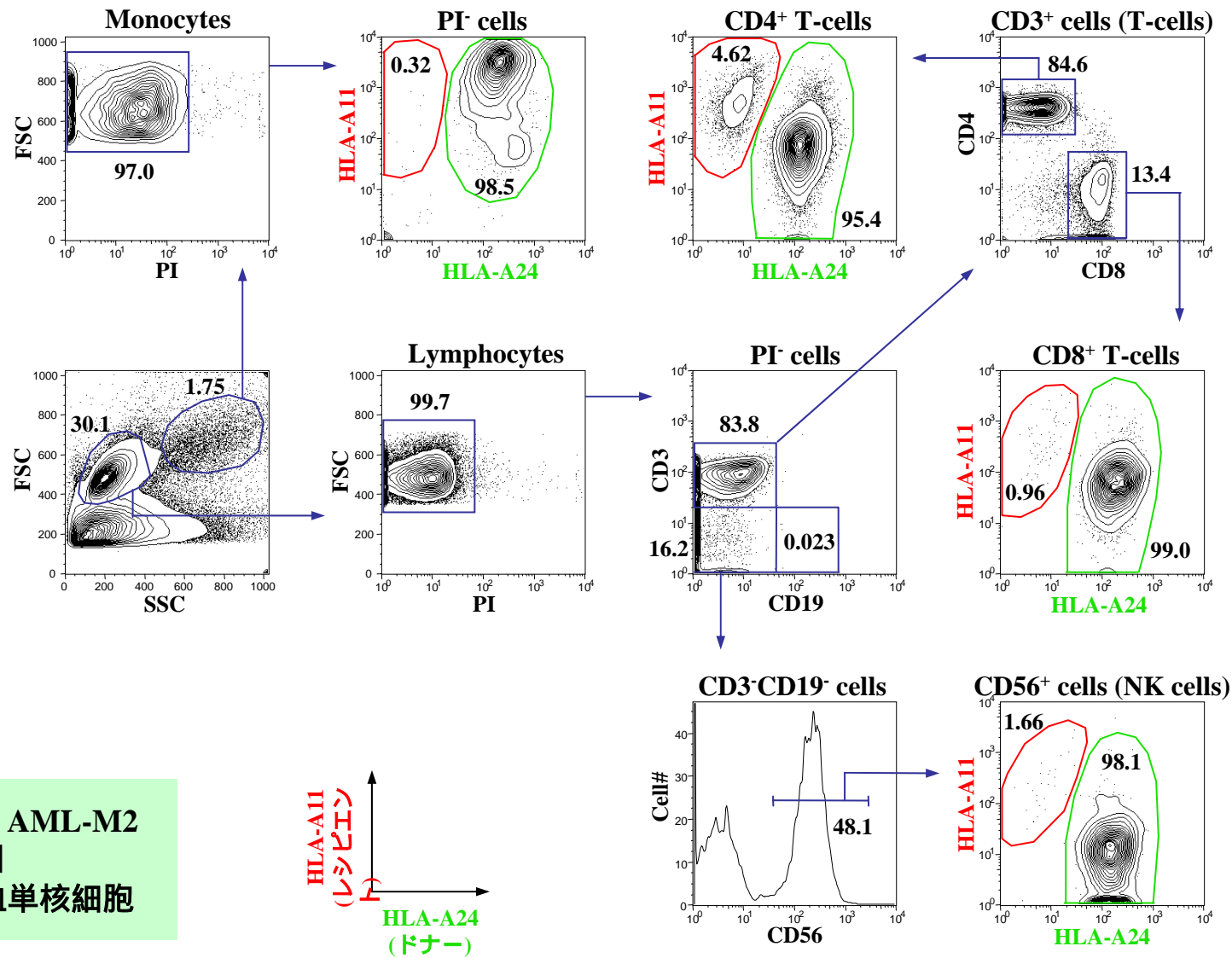
Pt#1	ドナー(臍帯血)	レシピエント
HLA-A	2, <b>24</b>	2, <b>11</b>
HLA-B	52, <b>62</b>	52, <b>67</b>

MHCクラスI: 赤血球以外のすべての血液細胞に発現

HLA-DR	4, 15	4, 15
--------	-------	-------

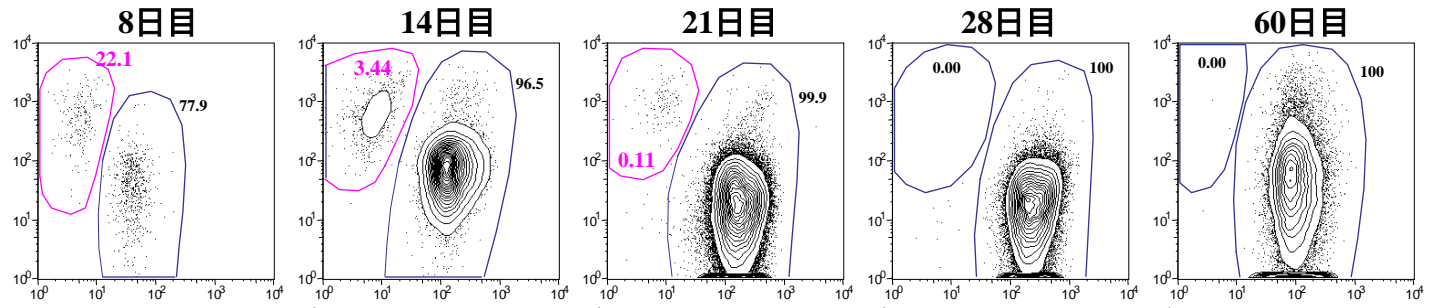
MHCクラスII: 樹状細胞、単球、B細胞に発現

# 臍帯血移植後に無事生着した症例

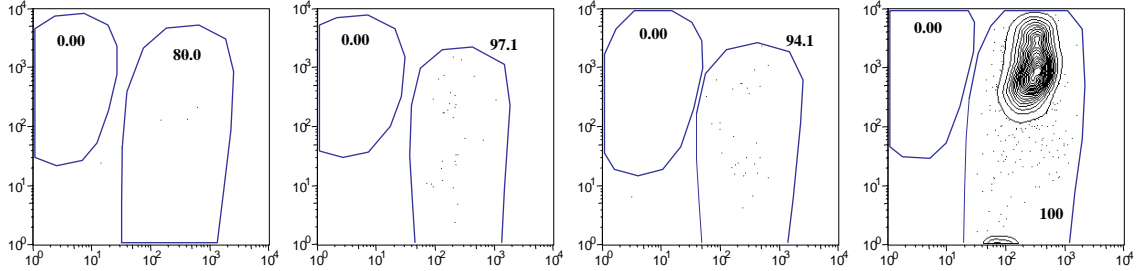


症例1, AML-M2  
14日目  
末梢血単核細胞

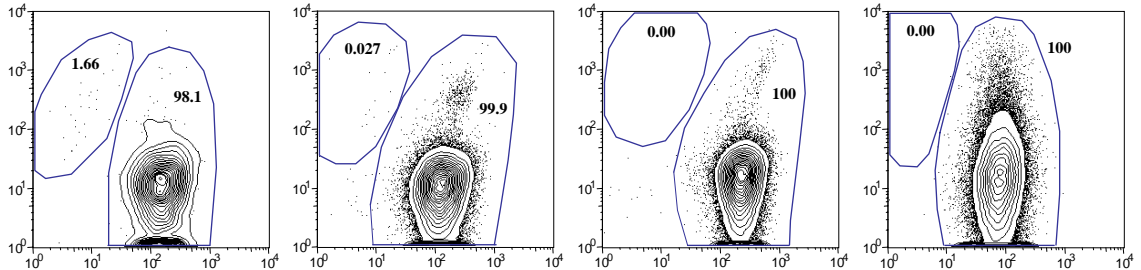
T細胞  
(CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>)



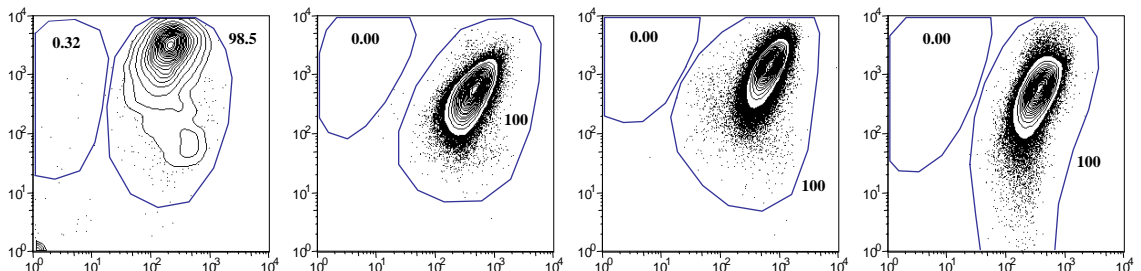
B細胞  
(CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>)



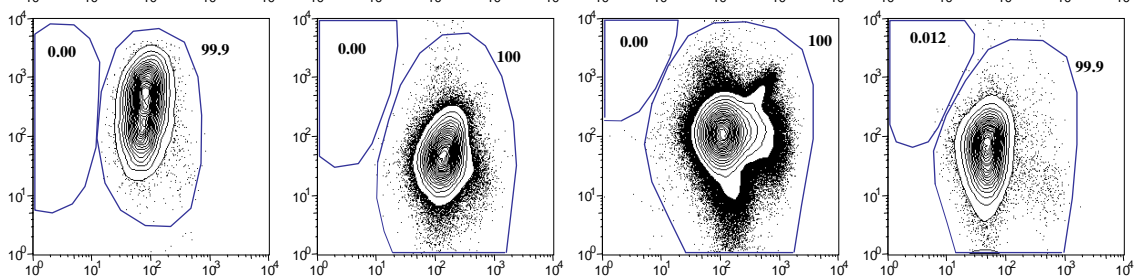
NK細胞  
(CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>)



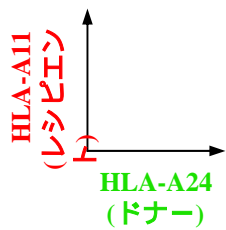
単球  
(CD14<sup>+</sup>)



好中球  
(CD11b<sup>+</sup>)

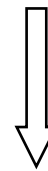
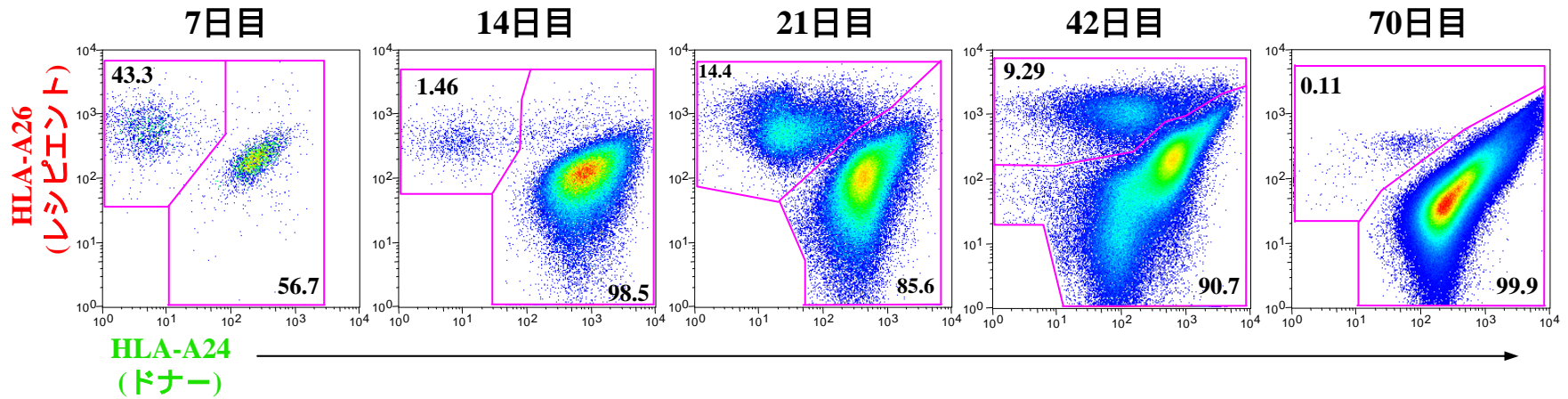


症例1, AML-M2  
8-60日目  
末梢血細胞

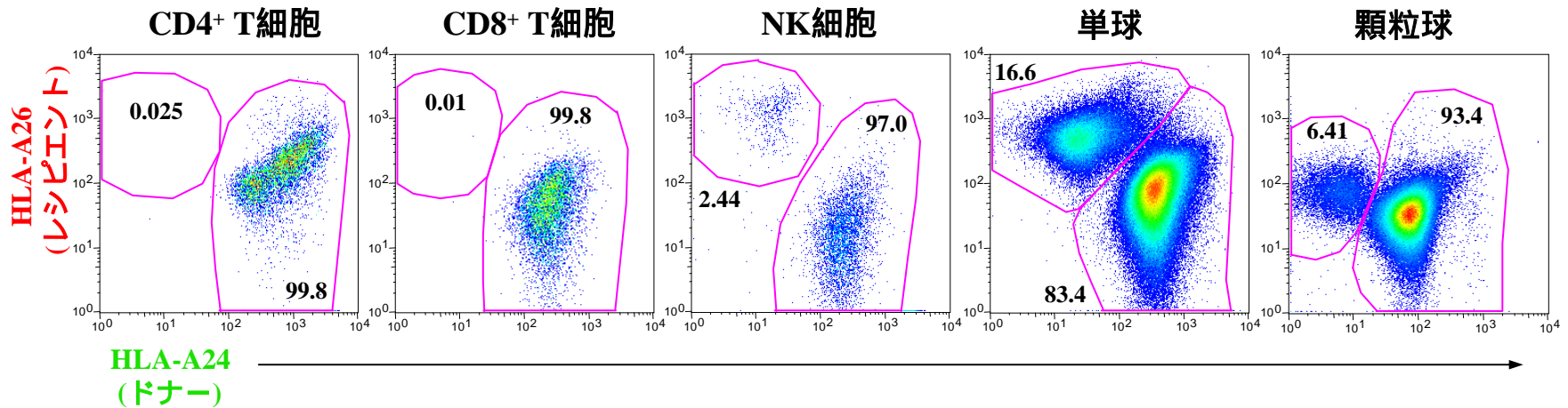


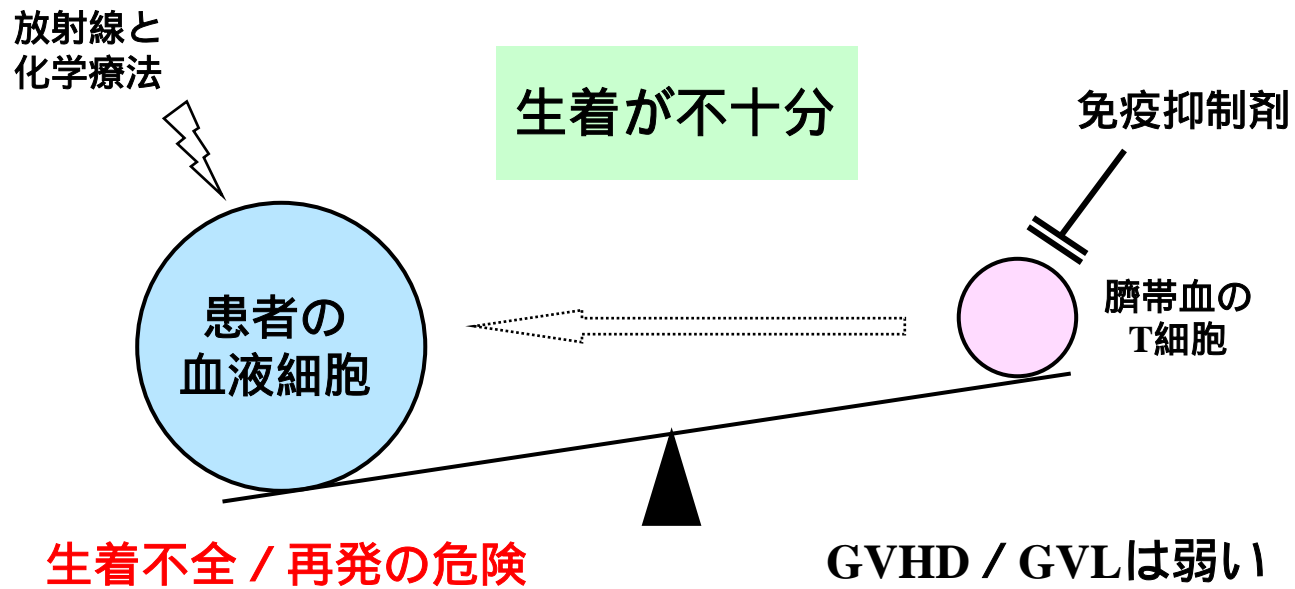
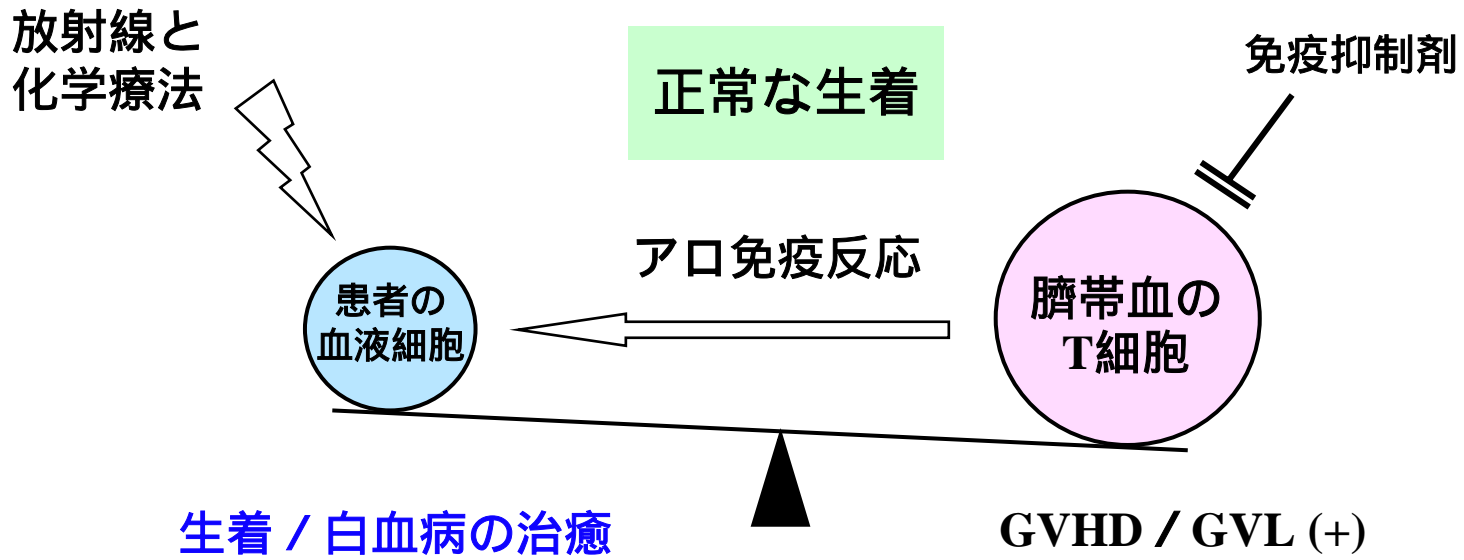
# 臍帯血移植後早期にキメリズムが遷延した症例

症例2, MDS-RAEB  
末梢血細胞

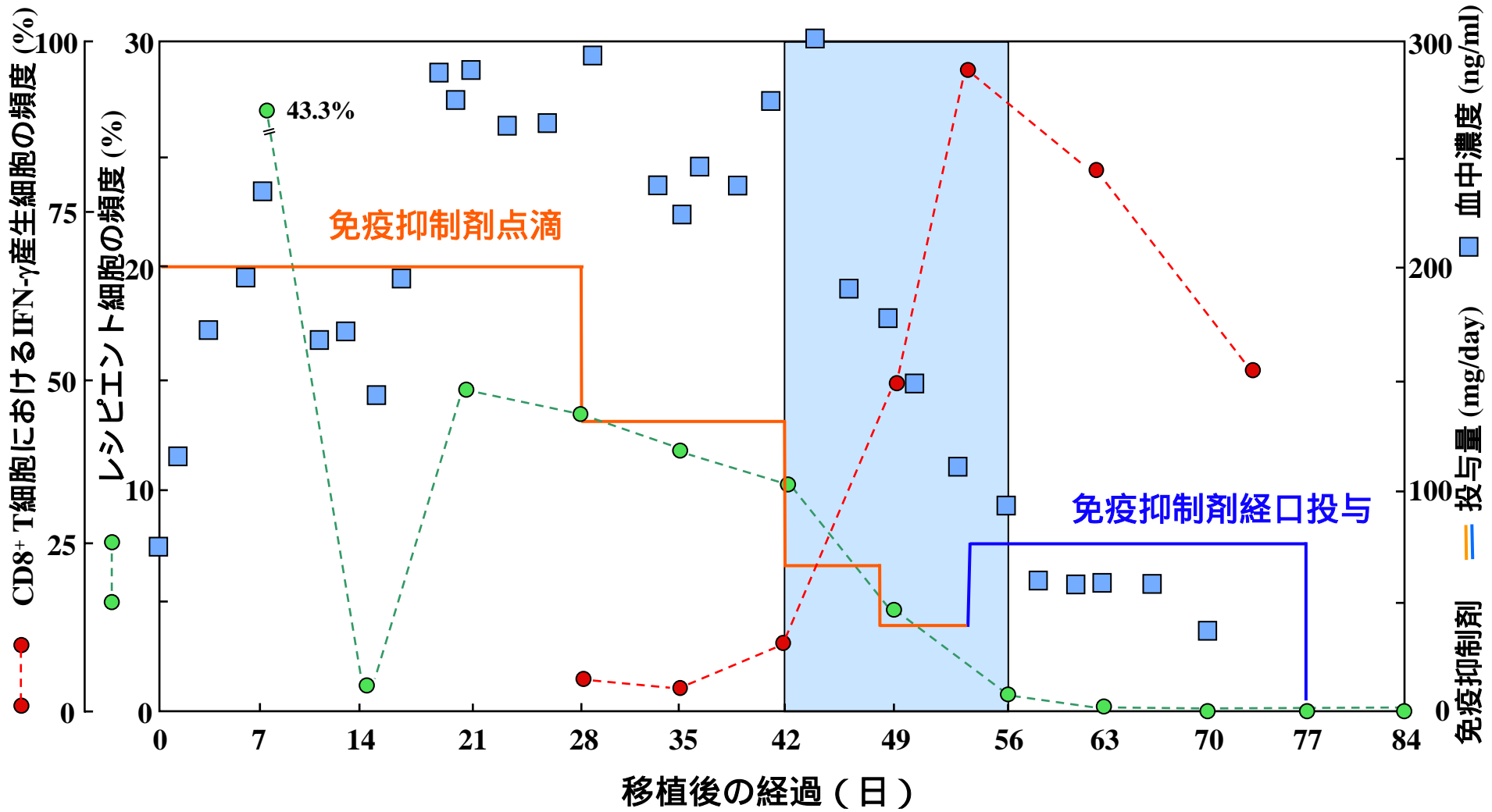


21日目に増加したレシピエント由来細胞は、どの細胞か？



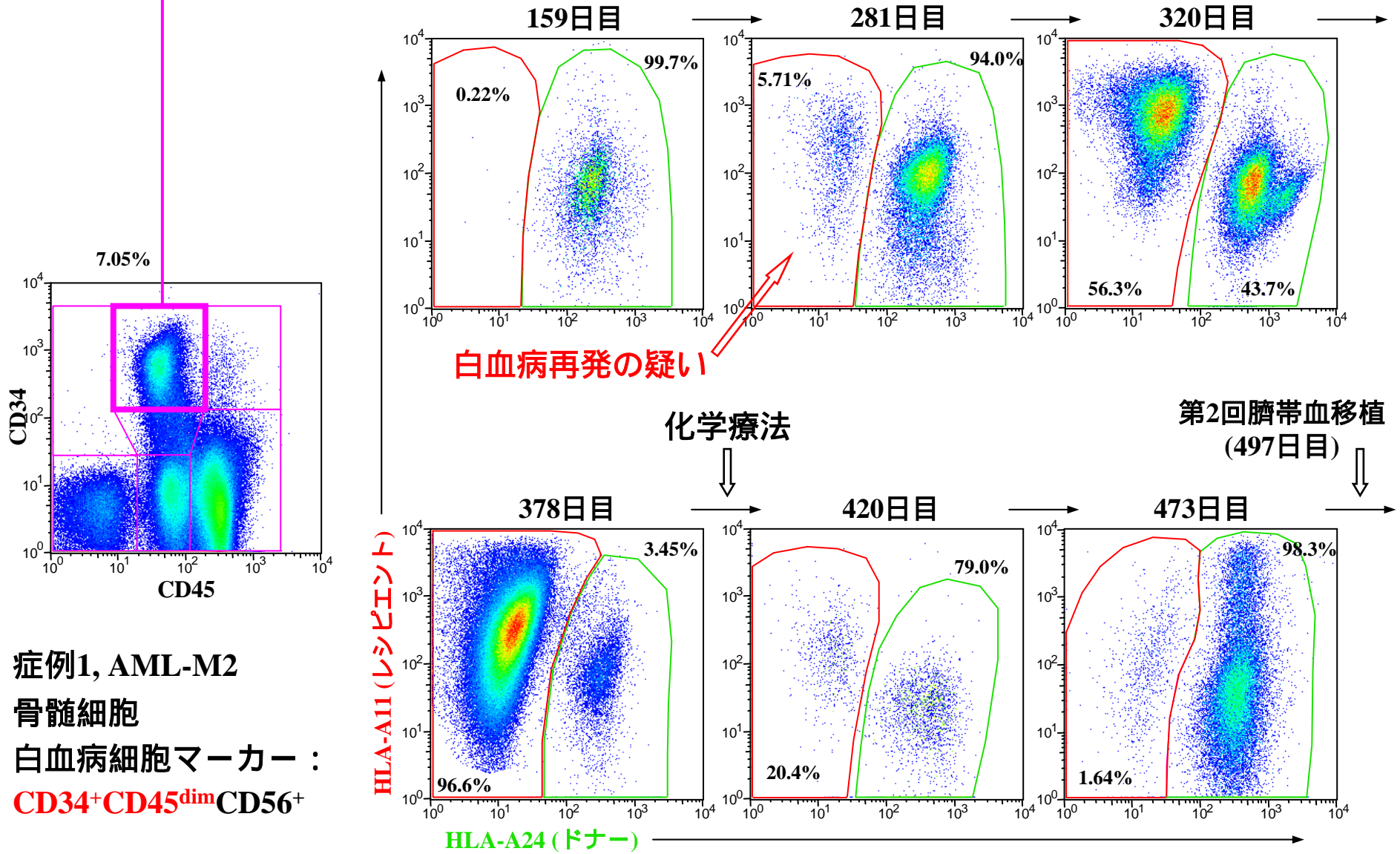


# レシピエント由来細胞を駆逐するために免疫抑制剤を急速に減量



# 臍帯血移植後の再発のモニタリング

造血幹・前駆細胞分画 (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>細胞)



症例1, AML-M2  
 骨髓細胞  
 白血病細胞マーカー：  
**CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>CD56<sup>+</sup>**



CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>分画中のレシピエント由来細胞にのみ  
異常発現マーカーCD56および白血病遺伝子が陽性



白血病細胞で  
あることの確認

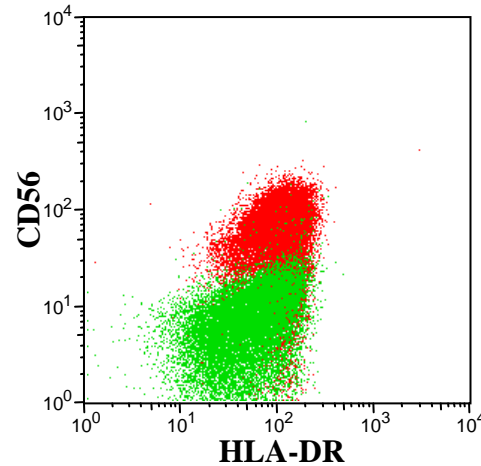
**症例1, AML-M2**

白血病表面マーカー :

CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>CD56<sup>+</sup>

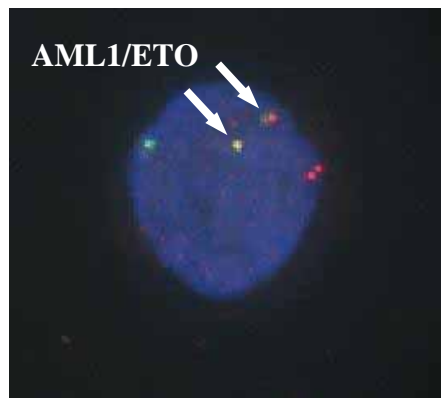
白血病遺伝子マーカー :

AML1/ETOキメラ遺伝子

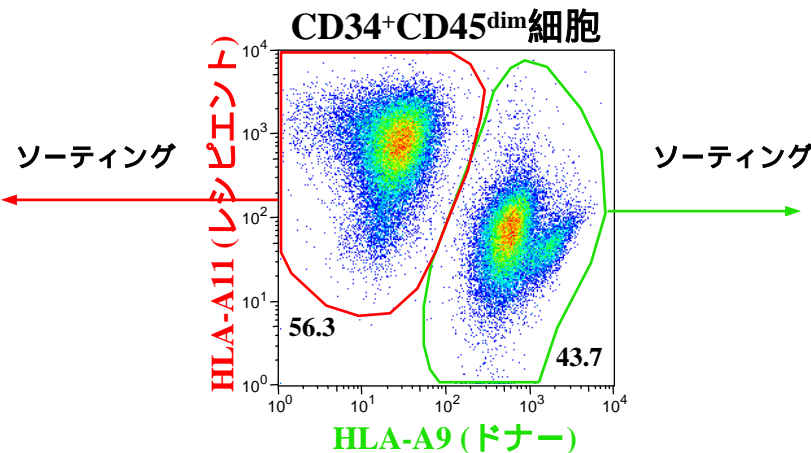


■ レシピエント  
■ ドナー

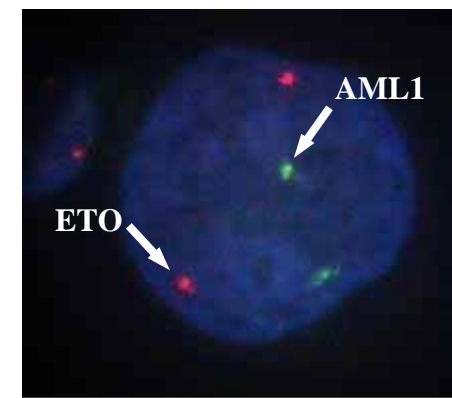
レシピエント由来細胞



Fusion signal (+)  
= 100% (100 cells)



ドナー由来細胞



Fusion signal (+)  
= 0% (100 cells)

## キメリズム解析 / HLA-Flow法の特徴

### 利点:

1. 迅速
2. 高感度
3. 定量的
4. 細胞種までわかる。
5. ソーティング後、さらに解析が可能。

生着不全と再発の診断に極めて有用

研究の手段としても重要

### 課題:

1. 特異的マーカーがないとできない。
2. 抗体がないとできない。

→ HLAミスマッチ移植の増加  
→ 新規抗HLA抗体の作製

## 共同研究者

### 医科研附属病院（臍帯血移植）

高橋聡、大井淳、河北敏郎、  
加藤せい子、中内祐介、東條有伸

### 幹細胞治療研究センター

山崎聡、中内啓光

### 医科研附属病院（ATL化学療法）

小林誠一郎、内丸薫  
今村病院・血液内科  
中野伸亮、宇都宮與

### 東京医科歯科大学・小児科

森尾友宏

原発性免疫不全症研究班

### 病態解析領域

中内祐介、石垣知寛、渡辺恵理、石田礼子、  
ステファニー・ネイピア、渡辺信和