

末梢血幹細胞移植後のシクロスポリンA投与による自己移植片対宿主病の誘導:自己移植片対宿主病の発症を左右する因子と誘導機序の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9391

末梢血幹細胞移植後のシクロスポリンA投与による 自己移植片対宿主病の誘導： 自己移植片対宿主病の発症を左右する因子と誘導機序の検討

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任：松田 保教授)

三 浦 裕 次

自己移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) は、同種骨髄移植後の急性GVHDに類似した皮膚病変を主徴とする自己免疫症候群である。自家骨髄移植後にシクロスポリンA (cyclosporine A, CyA) を一定期間投与することによって誘導できることが知られている。しかし、近年骨髄移植にかわって自己造血幹細胞移植の主流となった末梢血幹細胞移植 (peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT) 後の自己GVHDについては、誘導効率や発症機序に関する詳細な検討は行われていない。本研究では、これらを明らかにするため、PBSCT後にCyAとインターフェロン- γ を投与した17例の悪性リンパ腫患者について、自己GVHDの発症に影響を与える因子と、自己GVHDの担当細胞である自己傷害性T細胞の特性を検討した。全身X線照射 (total body irradiation, TBI) を含まない移植前処置後に、末梢血幹細胞を含む白血球分画を移植した初期の6症例では、末梢単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 中に自己のリンパ球に対する細胞傷害活性が全例で検出されたが、自己GVHDは発症しなかった。これに対して、末梢血白血球分画から純化したCD34陽性細胞を移植片として用いた4例中2例と、前処置にTBIを加えた9例中6例で自己GVHDが誘導された。これらの症例の滲出性紅斑は、移植後19日目から27日目にかけて出現し、3日から9日で自然消退した。全例で皮膚生検を施行しGVHDの診断を確認した。これらの患者の移植後のPBMCには、移植後11日目から38日目にかけて、自己リンパ球に対する細胞傷害活性が認められた。自己反応性T細胞によるリンパ球傷害活性は、主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) であるヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) のうちHLA-DRに対する抗体またはMHCクラスII関連インバリアント鎖ペプチド (class II associated invariant chain peptide, CLIP) に対する抗体の添加により阻止された。次に、自己GVHDの発症に抗原特異的なT細胞が関与しているか否かを明らかにするため、末梢血T細胞中のT細胞レセプターの β 鎖可変領域 (β chain variable region, BV) で規定される27種類のサブファミリーについて、相補性決定部3 (complementarity determining region 3, CDR3) 長の分布解析を用いて検討した。PBSCT前に多クローン性を示す正常CDR3長パターンを呈していたいくつかのBVサブファミリーは、自己GVHDの発症時には、T細胞のクローン性やオリゴクローン性の増殖を示すCDR3長パターンに変わっていた。なかでも、BV16陽性細胞のクローン性増殖は、検討した3例に共通して認められた。以上の結果から、PBSCT後に効率よく自己GVHDを誘導するためには、CD34陽性細胞を移植片として用いることによって調節細胞を取り除く、または前処置にTBIを加えることによって自己調節性の機構を破壊する、などの処置が有効と考えられた。また、PBSCT後CyAを投与された患者では自己GVHDの発症の有無に関わらず、末梢血に自己のリンパ球を傷害する自己反応性T細胞が誘導され、この自己リンパ球傷害活性は標的細胞上のHLA-DR-CLIP複合体を介して発現すること、また何らかの自己抗原を認識する一部のT細胞がクローン性に増殖し、自己GVHDの発症に関与する可能性が示唆された。

Key words autologous graft-versus-host disease, cyclosporine A, MHC class II associated invariant chain peptide, peripheral blood stem cell transplantation, complementarity determining region 3 size distribution analysis

自己造血幹細胞移植を併用した高用量のX線・化学療法は、悪性リンパ腫に対する根治的治療として盛んに行われ、多くの臨床研究でその有用性が示されている^{1)~3)}。しかし、化学療法に対する反応が遅い例や、悪性度の高いリンパ腫例では、このような造血幹細胞移植療法を寛解期に行っても、必ずしも予後

が改善されないことが最近報告されている⁴⁾⁵⁾。このため、これらの難治性の悪性リンパ腫に対しては、化学療法の量を増やすだけでなく、免疫療法や遺伝子治療などの新しい試みが必要と考えられている。免疫療法は、放射線療法と同様に化学療法に交差耐性を示さないことから、頻回の抗腫瘍治療を受けた

平成10年11月12日受付、平成10年12月25日受理

Abbreviations : BMT, bone marrow transplantation; BV, β chain variable region; CDR3, complementarity determining region 3; CLIP, class II associated invariant chain peptide; CyA, cyclosporine A; DEPC, diethyl pyrocarbonate; FCS, fetal calf serum; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GVHD, graft-versus-host disease;

患者に対しても効果を発揮する可能性がある⁶⁾。

自己の造血幹細胞移植後に一定期間シクロスポリン (cyclosporine A, CyA) を投与すると、同種の造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) に類似した皮膚病変が誘導される。この病変は自己GVHDと呼ばれている^{7)~10)}。同種幹細胞移植後の白血病患者では、GVHDの重症度に比例して白血病の再発率が低下する¹¹⁾¹²⁾。また、悪性リンパ腫患者では、同種幹細胞移植を受けた例の方が、自己幹細胞移植を受けた例より再発率が低い¹³⁾¹⁴⁾。これは、GVHDに伴って発現する免疫学的な抗リンパ腫効果が、自己幹細胞移植では欠如しているためと考えられている。一方、同種幹細胞移植では、重症のGVHDや感染症などの合併症による死亡率が高いため、再発率が低下しても必ずしも生存率は改善されない¹¹⁾¹²⁾。移植後の合併症による死亡率が低い自己幹細胞移植において、同種移植の免疫学的な抗リンパ腫効果を発現させることができれば理想的と考えられる。

自己GVHDは、自家骨髄移植 (bone marrow transplantation, BMT) 後に一定期間CyAを投与することによって、約80%の患者に誘導できるとされている^{15)~17)}。急性白血病や悪性リンパ腫においては、自己GVHDの誘導が再発の予防に有効であることが示されている^{18)~20)}。末梢血幹細胞移植 (peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT) はBMTに比較して、移植後の造血回復が速やかであり、また幹細胞の採取に全身麻酔を必要としないことから、最近では自己の造血幹細胞移

植療法の主流となっている²¹⁾²²⁾。しかし、PBSCT後の自己GVHDの誘導については、誘導効率や機序に関する十分な検討は行われていない。そこで、われわれは予後不良の悪性リンパ腫患者に対して、PBSCT後にCyAとインターフェロン (interferon, IFN)- γ を投与することにより自己GVHDの誘導を試み、その発症を左右する因子を解析した。また、自己GVHDの発症機序を明らかにするため、移植後の末梢血単核細胞について、自己のリンパ球に対する傷害活性を経時的に測定し、自己傷害性リンパ球の特徴を検討した。さらに、自己GVHDの発症に抗原特異的T細胞が関与しているか否かを明らかにするため、自己GVHD発症時の末梢血T細胞レパトアを解析した。

対象および方法

I. 対 象

1996年2月から1998年9月までに金沢大学医学部附属病院第三内科と石川県立中央病院血液免疫内科でPBSCTを受けた予後不良の非寛解期悪性リンパ腫患者9例と、悪性度の高い寛解期悪性リンパ腫患者8例の計17例を対象とした。これらの患者の特徴を表1に示す。

II. 移植前処置

症例1から症例6および症例8, 9の計8症例に対しては、ラムスチン (東京田辺, 東京) 200mg/m²を移植前8日目と移植前3日目、カルボプラチン (プリストルマイヤーズスクイブ,

Table 1. Patient characteristics

Patient number	Age/Sex	Histology	Clinical stage	Disease state	Number of prior regimens	Conditioning regimen prior to PBSCT	Duration of CyA administration (days)
1	44/M	Diffuse large	IV A	CR	1	PB (MCNU-CBCD-VP-CY)	28
2	44/M	Diffuse large	IV A	CR	1	PB (MCNU-CBCD-VP-CY)	28
3	47/M	Angioimmunoblastic	III B	PR	1	PB (MCNU-CBCD-VP-CY)	28
4	36/M	Diffuse large + Hemophagocytosis	IV B	PD	1	PB (MCNU-CBCD-VP-CY)	28
5	52/F	Diffuse large	IV B	PR	1	PB (MCNU-CBCD-VP-CY)	28
6	48/F	Anaplastic large	IV A	PR	2	PB (MCNU-CBCD-VP-CY)	28
7	37/M	Angioimmunoblastic	I B	CR	1	PB (TBI + CY)	28
8	47/F	Follicular medium	III A	PD	1	CD34 (MCNU-CBCD-VP-CY)	21
9	48/M	Follicular medium	III A	PR	1	CD34 (MCNU-CBCD-VP-CY)	21
10	46/M	Follicular mixed	IV A	PR	2	CD34 (TBI + CY + AraC)	21
11	56/M	Diffuse large + Hemophagocytosis	IV B	CR	1	CD34 (TBI + CY)	21
12	35/M	Follicular mixed	IV A	CR	1	PB (TBI + CY + ETP)	21
13	44/M	Follicular mixed	IV A	PR	3	PB (TBI + CY + AraC)	21
14	41/F	Diffuse large	IV A	PR	2	PB (TBI + CY + AraC)	21
15	51/M	Diffuse mixed	IV A	CR	2	PB (TBI + CY + AraC)	21
16	48/F	Diffuse large	IV A	CR	2	PB (TBI + CY + ETP)	21
17	48/M	Angioimmunoblastic	III A	CR	2	PB (TBI + CY + AraC)	21

M, male; F, female; CR, complete remission; PR, partial remission; PD, progressive; PD, progressive disease; PB, peripheral blood stem cell transplantation; CD34, CD34 positive selection; MCNU, ranimustine; CBCDA, carboplatin; VP, etoposide; CY, cyclophosphamide; AraC, cytarabine; TBI, total body irradiation; CyA, cyclosporine A.

HLA, human leukocyte antigen; IFN, interferon; IL, interleukin; MHC, major histocompatibility complex; MMLV RT RNase H⁻, moloney murine leukemia virus-derived reverse transcriptase without RNase H activity; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBSCT, peripheral blood stem cell transplantation; PHA, phytohemagglutinin; SEB, staphylococcus enterotoxin B; TBI, total body irradiation; TCR, T cell receptor

東京) 300mg/m²を移植前7日目から4日目まで4日間, エトポシド (日本化薬, 東京) 500mg/m²を移植前6日目から4日目までの3日間, およびシクロホスファミド (塩野義, 大阪) 50mg/kgを移植前3日目と移植前2日目に, 経静脈的に投与した. 症例7と症例10から症例17の計9症例に対しては, 移植前7日目から4日目までに分割全身X線照射 (total body irradiation, TBI) 3Gyを4回 (計12Gy) 施行後, シクロホスファミド 50mg/kgを移植前3日目と移植前2日目に経静脈的に投与した. また, 症例10, 13, 14, 15および17に対しては, シタラビン (日本化薬, 東京) 4g/m²を移植前4日目と移植前3日目に追加し, 症例12と症例16についてはエトポシド 15mg/kgを移植前4日目と移植前3日目に追加した.

Ⅲ. 幹細胞採取

化学療法後の造血の回復期に, 顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) を投与することによって末梢血中に造血幹細胞を動員し, 連続血液成分分離装置 COBE Spectra (COBE BCT Inc., Lakewood, USA) を用いて幹細胞を含む末梢血白血球分画を採取した. 化学療法としてエトポシド 500mg/m²を3日間経静脈的に投与したのち, フィルグラスチム (キリンビール, 東京) 50μg/m²/日またはレノグラスチム (中外製薬, 東京) 2μg/kg/日を皮下投与し, 白血球数が1.0×10⁹/lに達した日から2日間連続採取を行った. 採取目標を, CD34陽性細胞数で1.0×10⁶/kg以上とした.

Ⅳ. CD34陽性細胞の分離

濾胞性リンパ腫患者 (症例8から症例10) と, 血球貪食症候群を合併したびまん性リンパ腫患者 (症例11) では, 採取した白血球分画に腫瘍細胞の混入が予想されたため, 造血幹細胞のマーカーであるCD34抗原の陽性細胞を, 末梢血白血球分画から単離し移植に用いた.

連続血液成分分離装置を用いて採取した白血球分画に抗CD34単クローン性抗体 (マウスIgG1) (Nexell Therapeutics Inc. Irvine, USA) を加えて30分間培養後, 二次抗体としてヤギ抗マウスIgG1を付着させた磁気ビーズ Dynal beads (Dynal AS,

Oslo, Norway) を添加した. ビーズが結合したCD34陽性細胞を, 磁気細胞分離装置 ISOLEX 50™ (Baxter Immunotherapy, Irvine, USA) を用いて分離した. その後, 抗CD34抗体と結合性の高いペプチドであるPR34⁺ (Nexell Therapeutics Inc.) を加えることによって, 抗CD34抗体をCD34陽性細胞から解離させた. 純化CD34陽性細胞移植の施行については, すべての患者から同意を得たのち, 金沢大学医学部および石川県立中央病院の倫理委員会で審査を受け承認された.

Ⅴ. 自己GVHDの誘導方法

PBSCT後に自己GVHDを誘導するため, CyA 2.5mg/kg/日を, 初期の症例1から症例6までは移植後1日目から28日目まで, 症例7から症例17では移植後1日目から21日目まで経静脈投与した. 同時にIFN-γ (塩野義) 50万国内標準単位を移植後7日目から28日目まで週一回皮下投与した. この治療プロトコルの実施は, すべての患者から同意を得たのち, 金沢大学医学部および石川県立中央病院の倫理委員会で審査を受け承認された.

Ⅵ. 単核細胞の分離

PBSCT施行前および施行後, 定期的に患者からヘパリン加末梢血を採取した. この末梢血をリンフォブレップ (Nycomed Parma AS, Oslo, Norway) に重層後3000rpmで8分間遠心し, 中間層を回収することにより末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を分離した. PBSCT前に採取したPBMCは, 以下に述べる細胞傷害性試験の標的 (target) 細胞として用いるために, ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide) (和光, 大阪) と10%非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum, FCS) (Flow Laboratories, McLean, USA) を含む培養液に浮遊させ, 複数のチューブに分注後凍結保存した.

Ⅶ. 細胞傷害活性の測定

PBSCT後白血球数が1000/μl以上に回復した時点から3日~7日おきにPBMCを採取し, これを作動 (effector) 細胞とした. 解凍した移植前のPBMCを, フィトヘマグルチニン (phytohemagglutinin, PHA) (Difco laboratories, Detroit, USA)

Table 2. Hematologic and blood chemistry parameters following peripheral blood stem cell transplantation

Patient number	Day to granulocytes >500/μl	Day to platelets >50,000/μl	Day to last platelet transfusion	Day to reticulocytes >1%	Maximun bilirubin level (mg/dl)	Maximun creatinine level (mg/dl)
1	9	11	9	13	0.6	1.0
2	10	11	10	11	0.8	0.9
3	12	15	13	14	0.9	0.9
4	9	11	9	11	0.5	1.3
5	9	14	13	14	1.3	1.3
6	11	11	9	11	0.8	0.7
7	11	13	8	11	0.7	0.6
8	9	9	8	12	0.8	0.9
9	11	18	10	13	0.9	0.9
10	13	32	15	13	0.6	0.7
11	11	28	10	13	0.8	0.8
12	11	13	11	11	0.6	0.8
13	12	21	12	12	0.5	1.2
14	9	11	11	13	0.7	0.5
15	11	11	10	11	0.6	0.8
16	11	13	11	13	1.7	0.6
17	11	13	9	11	0.8	0.7

1%容量/容量とともに4日間培養して得られたPHA芽球を、標的細胞として用いた。

移植後に採取したPBMCを10%FCS添加RPMI-1640液(Gibco Laboratories, Grand Island, USA)中で $1 \sim 8 \times 10^6$ 個/mlに調整し、その100 μ lを96穴丸底型マイクロプレート(Corning Glass Works, Corning, USA)の各ウェルに分注した。5 $\times 10^6$ 個/mlに調整したPHA芽球の浮遊液1mlに、 ^{51}Cr (400 to 1200 Ci/g chromium, Du Pont NEN Products, Boston, USA)100 μ lを加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下で1時間静置した後、0.15Mリン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline)で3回洗浄した。10%FCS添加RPMI-1640液中で 1×10^5 個/ml濃度に再調整したものを標的細胞浮遊液とし、作動細胞液を含む各ウェルに100 μ lずつ加えた。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下で4日間培養した後、各ウェルから上清を100 μ lずつ採取し、上清中の ^{51}Cr 放出量をオートウェルガンマカウンターARC501(アロカ、東京)を用いて測定した。下記の計算式に基づいて ^{51}Cr 放出量を算出し、これを細胞傷害活性とした。

$$\text{細胞傷害活性(\%)} = \frac{{}^{51}\text{Cr 実測値} - {}^{51}\text{Cr 自然放出量}}{{}^{51}\text{Cr 最大放出量} - {}^{51}\text{Cr 自然放出量}} \times 100$$

最大放出量は標的細胞に2.5%トリトンX-100(Amresco Inc., Solom, USA)100 μ lを加えたときの ^{51}Cr 放出量を、自然放出量は10%FCS添加RPMI-1640液を加えて4日間培養した後の ^{51}Cr 放出量を、それぞれ示している。

Ⅷ. 単クローン性抗体添加による ^{51}Cr 放出の阻止試験

自己のリンパ球に対する細胞傷害活性の発現にヒト白血球抗原(human leukocyte antigen, HLA)分子が関与しているか否かを明らかにするため、単クローン性抗体を用いた細胞傷害活性の阻止試験を行った。単クローン性抗体には、ヒト主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex, MHC)のHLA-クラスIに対する抗体(Dako Corp, Carpinteria, USA)、抗HLA-DR抗体(Becton Dickinson)、コロビア大学のHarris博士より供与を受けた抗MHCクラスII関連インバリエント鎖ペプチド(class II associated invariant chain peptide, CLIP)抗体を用いた。標的細胞のPHA芽球に、各単クローン性抗体を最終濃度が1 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、作動細胞として症例3(移植後25日目)、症例5(移植後22日目)、症例9(移植後28日目)または症例12(移植後28日目)のPBMCを加えた。細胞傷害活性値は、4例の測定値の平均値 \pm 標準偏差($\bar{x} \pm \text{SD}$)で示した。

Ⅸ. T細胞レセプター解析を用いたT細胞レパトアの解析

1. 原理

個々のT細胞の特異性は、T細胞レセプター(T cell receptor, TCR) β 鎖の相補性決定部3(complimentarity determining region 3, CDR3)、すなわちD領域とその前後のN領域およびJ領域のアミノ酸配列より決定される²⁰⁾。このCDR3の多型性によって、T細胞は種々の抗原を認識している²⁰⁾。リンパ球集団から抽出したmRNAを鋳型としてcDNAを作成し、 β 鎖可変領域(β chain variable region, BV)の各サブファミリー27種類に特異的なプライマーと、C領域に相当するプライマーを用いてPCRを行うと、CDR3領域を含む各TCRBVサブファミリーのcDNA断片が得られる。あるT細胞集団内で、一部のT細胞がクローン性に増殖していることを証明するためには、増幅されたcDNA断片をサブクローニングし、無作為に抽出した複数

のcDNAクローン内に、同一のCDR3配列を示すクローンが多数を占めることを示すという必要がある。近年Pannetierら²⁰⁾は、PCRで増幅したTCR β 鎖のcDNAを電気泳動したのち、その長さの分布のパターンを解析することにより、クローン性に増殖している少数のT細胞を検出するという、簡便な方法を開発した。このCDR3長の分布解析(CDR3 size distribution analysis)を用いて、自己GVHD発症時の末梢血T細胞を分析した。

2. RNAの抽出

分離した 1×10^7 個のPBMCにフェノールとチオシアン酸グアニジンを含む均一な液体(アイソジェン、ニッポンジーン、富山)1mlを加え細胞を融解した。0.2mlのクロロホルムを加えて攪拌後、4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000rpmで15分間遠心し上層部を採取した。これにイソプロパノール0.5mlを加え5分間室温に静置し、RNAを析出させた。12000rpmで15分間遠心後、沈殿したRNAを回収し70%冷エタノールで洗浄し、0.1%二炭酸ジエチル(diethyl pyrocarbonate, DEPC)(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)で処理した精製水に溶解させた。吸光度計を用いてRNAの回収量を測定した。

3. cDNAの合成

1 μg のRNAを11 μg のDEPC処理蒸留水に溶解し、65 $^{\circ}\text{C}$ で10分間変性させた後、20ngのオリゴ(dT)12-18(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を加えてアニーリングさせた。このチューブに、200単位のモロニーマウス白血病ウイルス由来の逆転写酵素(moloney murine leukemia virus-derived reverse transcriptase without RNase H activity, MMLV RT RNase H⁻)(Gibco-BRL, Eggenstein, Germany)と4種類のデオキシリシン酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)(Promega, Wisconsin, USA)各20nmol、およびMMLV RT RNase H⁻用の緩衝液を加えて20 μ lとして、45 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させることによりcDNAを合成した。

4. PCRによるcDNAの増幅

CDR3領域を含むTCRBVのcDNA断片をChoiら²⁰⁾の方法にしたがい、PCRで増幅した。5'側のプライマーは27種類のBVファミリーに特異的なオリゴマー²⁷⁾を用い、3'側のプライマーにはC β 領域に相補的な蛍光標識オリゴマーを用いた(Pharmacia)。各プライマーの最終濃度は0.3 μM に調整した。27個のチューブに分注したcDNAに2単位のTaqポリメラーゼ(amplitaq polymerase, Perkin-Elmer, Emeryville, USA)と、4種類のデオキシリシン酸(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)各200 μmol を加え、サーマルサイクラー(Cetus/Perkin-Elmer, Norwalk, USA)を用いてPCRを行った。PCRの反応条件は、95 $^{\circ}\text{C}$ での熱変性を1分、55 $^{\circ}\text{C}$ でのアニーリングを1分、72 $^{\circ}\text{C}$ での伸長反応を1分とし、サイクル数を35サイクルとした。

5. T細胞レセプター β 鎖のCDR3長の分布解析

TCR β 鎖のcDNA各BVサブファミリーのPCR産物は変性ゲルを用いて電気泳動すると、cDNA領域を構成するアミノ酸の数の差によって3塩基ずつ長さの異なる6から12の集団に分けられる。この泳動パターンをシークエンサーを用いて解析すると、あるサブファミリーの中に一部のT細胞のクローン性増殖がなければ、CDR3長の分布は中心部分を頂点とするベル型を呈する。一方、少数のT細胞がクローン性に増殖している場合、ベル型の分布がくずれ突出したピークが目立つようになる。2 μ lの蛍光標識したPCR産物にホルムアルデヒド溶液(80%ホルムアルデヒド、20mM EDTA、0.1%プロロフェノールブルー、pH8.0)を最終濃度が50%となるように加えた後、

96°Cで2分間熱変性した。氷上で急速に冷却した検体を、8% SDS-ポリアクリルアミドゲルで8時間電気泳動し、各バンドの蛍光強度のヒストグラムを373 ABI DNA シークエンサー (Perkin-Elmer) とジーンスキャン ソフトウエア (Applied Biosystems, Foster City, USA) を用いて解析した。

X. 治療効果の判定と統計的分析

日本癌治療学会の“癌化学療法の臨床効果判定基準”²⁸⁾にしたがって、以下のように有効性を評価した。評価可能な腫瘍が消失し1ヶ月以上持続したものを、完全寛解 (complete remission) とした。二方向測定可能な病変の縮小率が50%以下となり、これがすべての測定可能病変で1ヶ月以上持続したものを、部分寛解 (partial remission) とした。1ヶ月以内に測定可能病変が25%以上の増大、または新病変が出現した場合に、進行 (progressive disease) と定義した。1998年10月の時点で病状を評価し、Kaplan-Meier法²⁹⁾によって生存率を解析した。

成 績

I. 血液学的回復と臓器障害

17例の血液学的回復と臓器障害の程度を表2に示す。好中球は移植後9日から12日目に500/ μ lを超え、15日目までに血小板輸血は不要となった。肝腎機能障害や重篤な感染症の合併は認めなかった。

II. CD34陽性細胞の分離

CD34陽性細胞の回収率、純度および各患者の体重当たりのCD34陽性細胞数を表3に示す。CD34陽性細胞の回収率は平均61.7%、純度は平均96.0%であった。採取されたCD34陽性細胞数は、体重当たり 1.5×10^6 /kgから 2.5×10^6 /kgであった。

III. 自己GVHDの誘導

表4に自己GVHD誘導の結果を示す。化学療法のみによる移植前処置後に通常の末梢血白血球分画を移植した症例1から症例6では、臨床的に明らかな自己GVHDは観察されなかった。

前処置にTBIを加えた9例中6例 (症例7, 11, 13, 14, 15, 16) と、CD34陽性細胞を移植片として用いた4例中2例 (症例9, 11) で自己GVHDが誘導された。自己GVHDは、移植後19日目から27日目に四肢伸側または体幹の滲出性紅斑の形で出現し、3日間から9日間で自然消退した (図1)。皮疹が出現した例に対しては、全例皮膚生検を施行し、組織学的にGVHDの診断を確認した (図2)。また免疫組織染色では、皮膚組織中のリンパ球は、検討した2例ともにCD4⁺細胞が優位であった。

IV. 末梢血幹細胞移植後の自己リンパ球傷害活性

PBSCT後に採取したPBMCの、自己PHA芽球に対する細胞傷害活性を経時的に検討した。化学療法のみによる移植前処置後に通常のPBSCTを施行した初期の6症例における、自己リンパ球傷害活性の推移を図3に示す。作動細胞のPBMCと標的細胞のPHA芽球を80:1で反応させたと、全例で自己リンパ球傷害活性が観察された。この自己リンパ球傷害活性は、PBSCT後11日目から35日目までに採取したPBMCには認められたが、36日目以降のPBMCではみられなかった。また、自己リンパ球傷害活性の程度は、添加するPBMCの量に比例して増強した (図4)³⁰⁾。このような移植後PBMCの自己リンパ球傷害活性は、PBMC後CyAを投与せず経過をみた悪性リンパ腫の一例では全く認められなかった (図3)³⁰⁾。

Table 3. Result of CD34⁺ cell selection

Patient number	Purity (%)	Yield (%)	Number of cell infused ($\times 10^6$ /kg)
8	99.2	40.9	1.7
9	97.8	64.2	2.5
10	98.0	70.5	2.1
11	89.1	71.0	1.5

Table 4. Treatment outcomes

Patient number	Development of GVHD		Response to PBSCT	Current Status
	Day of onset	Duration of illness		
1	—	—	CR	Alive, NED. 31 m
2	—	—	CR	Alive, NED. 25 m
3	—	—	CR	Alive, NED. 27 m
4	—	—	PD	Died of disease, 27 d.
5	—	—	CR	Alive, NED. 12 m
6	—	—	PR	Alive, with disease. 10 m
7	19	5	CR	Alive, NED. 14 m
8	—	—	NR	Alive, with disease. 19 m
9	24	6	CR	Alive, NED. 14 m
10	—	—	CR	Alive, with disease. 8 m
11	27	5	CR	Alive, NED. 10 m
12	—	—	CR	Alive, NED. 9 m
13	25	7	CR	Alive, NED. 5 m
14	26	9	PR	Alive, with disease. 4 m
15	23	3	CR	Alive, NED. 3 m
16	25	6	CR	Alive, NED. 2 m
17	—	—	CR	Alive, NED. 1 m

GVHD, graft-versus-host disease; PBSCT, peripheral blood stem cell transplantation; CR, complete remission; PR, partial remission; PD, Progressive disease; NR, no response; NED, no evidence of disease. — indicate that GVHD did not develop.

これらの6症例では、移植後21日目までに自己リンパ球傷害活性が検出されたにもかかわらず自己GVHDが発症しなかったことから、移植後22日目以降のCyAの投与は、自己GVHDを引き起こす自己傷害性リンパ球の働きを抑制する可能性が考

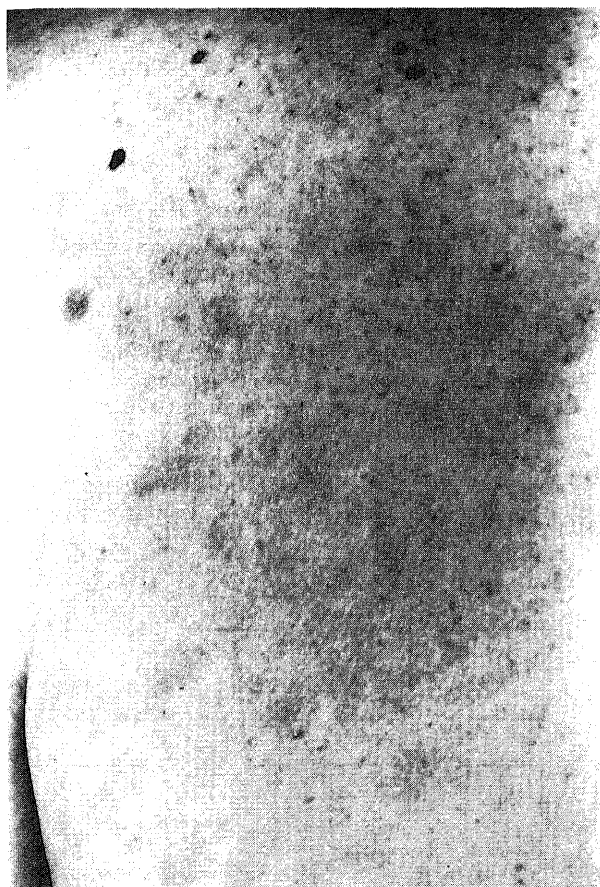


Fig. 1. Macropapular erythema on the back of patient 7 that appeared on day 28 after autologous peripheral blood stem cell transplantation.



Fig. 2. Histology of the biopsy specimen of patient 7. A skin biopsy was performed on day 28 after peripheral blood stem cell transplantation. There is diffuse intraepidermal infiltration of lymphocytes with vacuolation of basal cells and ballooning degeneration of squamous cells (Hematoxyline-Eosin stain, $\times 250$).

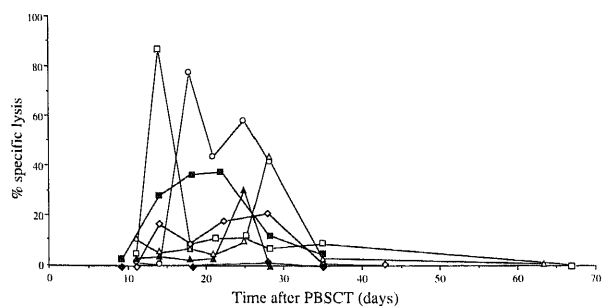


Fig. 3. Changes in cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells for autologous phytohemagglutinin (PHA)-stimulated lymphoblasts after peripheral blood stem cell transplantation (PBSTC). The cytotoxicity for autologous PHA-stimulated lymphoblasts obtained at different time points after PBSTC was determined using the standard ^{51}Cr release assay with an effector/target ratio of 80. \square , patient 1; \triangle , patient 2; \circ , patient 3; \diamond , patient 4; \blacksquare , patient 5; \blacktriangle , patient 6; \blacklozenge , a patient who did not receive cyclosporine A and interferon- γ .

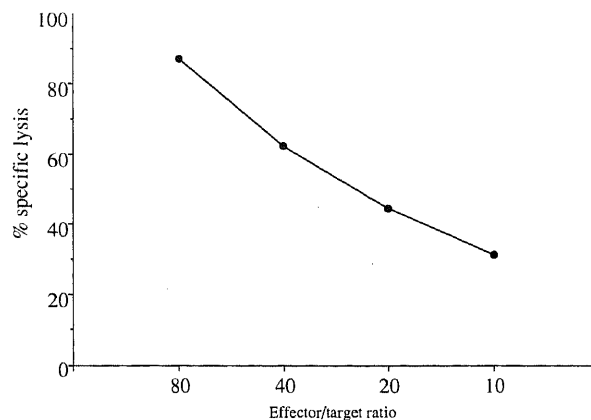


Fig. 4. Cytotoxicity for autologous lymphoblasts of peripheral blood mononuclear cells obtained after peripheral blood stem cell transplantation. Phytohemagglutinin-stimulated lymphoblasts (10^4) were incubated with varying numbers of mononuclear cells obtained from patient 3 on day 13 after transplantation.

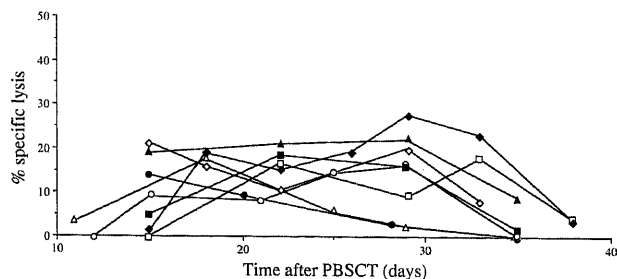


Fig. 5. Changes in cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells for autologous phytohemagglutinin (PHA)-stimulated lymphoblasts after peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT). The cytotoxicity for autologous PHA-stimulated lymphoblasts obtained at different time points after PBSCT was determined using the standard ⁵¹Cr release assay with an effector/target ratio of 80. □, patient 7; △, patient 8; ○, patient 9; ◇, patient 10; ■, patient 11; ▲, patient 12; ●, patient 13; ◆, patient 14.

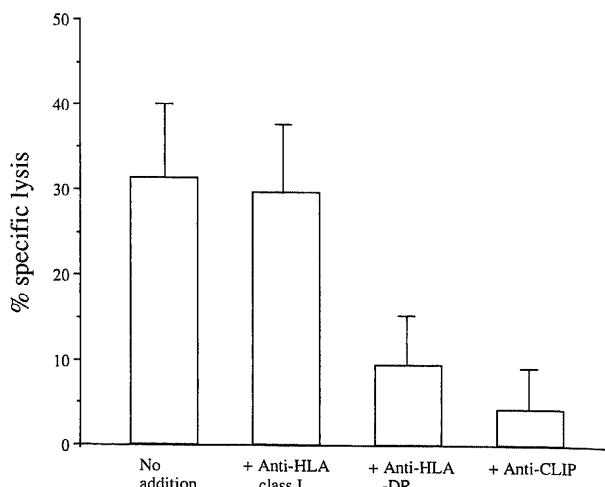


Fig. 6. Blocking of cytotoxicity against autologous phytohemagglutinin-stimulated lymphoblasts by peripheral blood mononuclear cells with monoclonal antibodies. Lysis of the target cells was measured using a standard ⁵¹Cr release assay at an 80:1 effector to target ratio. Cytotoxicities are presented as $\bar{x} \pm SD$ of 4 patients. CLIP, class II associated invariant chain peptide; HLA, human leukocyte antigen; MHC, major histocompatibility complex; PHA, phytohemagglutinin.

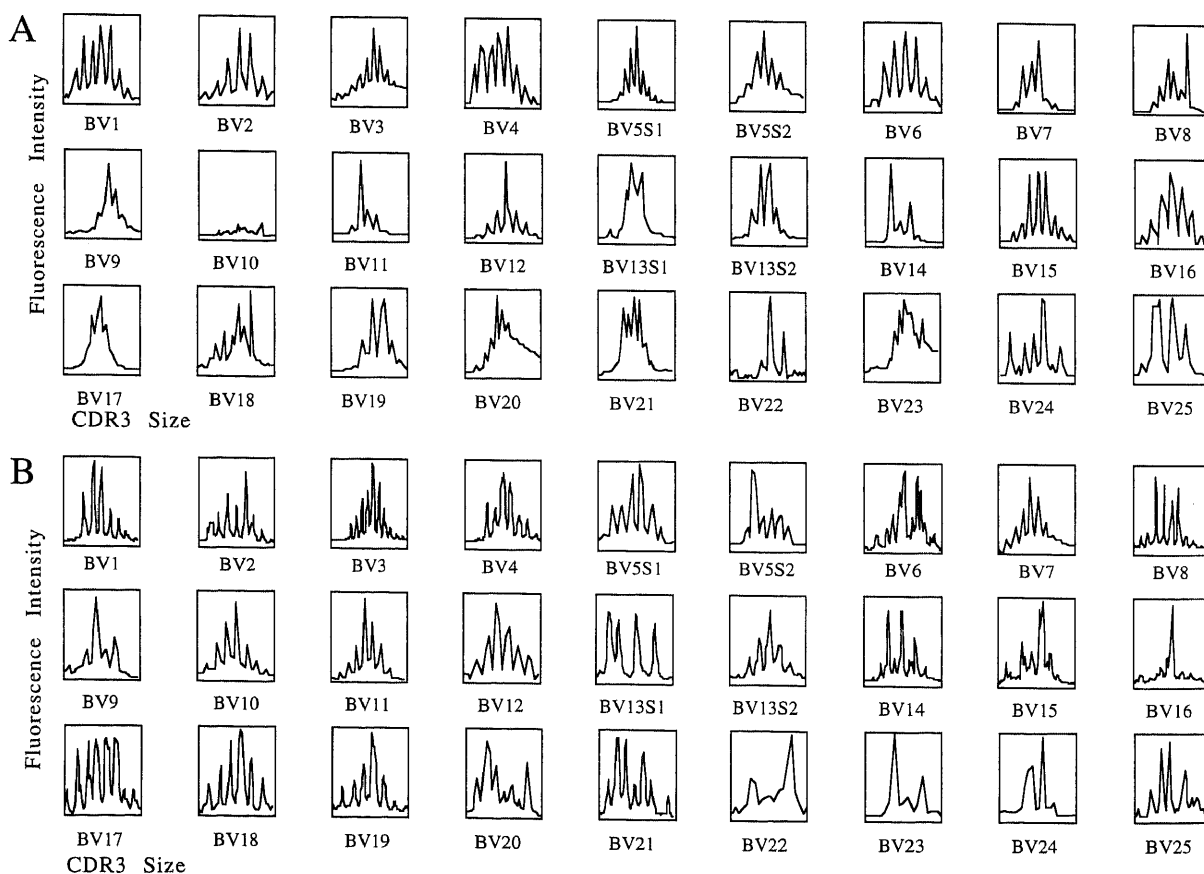


Fig. 7. Complimentary determining region (CDR3) size distribution analysis of peripheral blood T cells of patient 9. The cDNA amplified using primers specific to 27 different BV subfamilies coupled with a fluorescent C β primer was analyzed for their size with an automated DNA sequencer and the Genescan software. Fluorescence intensity (y-axis) is plotted against CDR3 size (x-axis). A, peripheral blood mononuclear cells before transplantation; B, peripheral blood mononuclear cells obtained at day 32 when the patients developed autologous graft-versus-host disease. BV, β chain variable region.

えられた。このため、症例7から症例17ではCyAの投与期間を21日間とした。また、自己GVHDが誘導できなかった原因として、前処置が弱かったために自己反応性リンパ球を抑制する患者の調節機構が残存した可能性や、移植片として末梢血幹細胞を用いたため、移植片中に大量に含まれる単球や調節性T細胞などが自己GVHDを抑制した可能性、などが考えられた。そこで、症例7と、症例10から症例17までの9症例に対しては前処置にTBIを加え、症例8から症例11ではCD34陽性細胞を移植片として用いた。図5は、症例7から症例14までの8症例について、PBSCT後の自己リンパ球傷害活性の推移を見たものである。全例で最大時18~31%の自己リンパ球傷害活性を認めた。この自己傷害活性は、移植後11日目から38日目までの間に持続的に認められた。通常の白血球分画を移植片として用いた症例1から症例6では、PBSCT後の自己リンパ球傷害活性の出現は一過性のことが多かったのに対し、これら8症例で

は、傷害活性が比較的長期間続く傾向がみられた。

V. 単クローン性抗体添加による ^{51}Cr 放出の阻止試験

図6は、症例3(移植後25日目)、症例5(移植後22日目)、症例9(移植後28日目)と症例12(移植後28日目)の計4症例のPBMCについて、自己PHA芽球に対する細胞傷害活性が、単クローン性抗体の添加によって抑制されるか否かを検討したものである。自己リンパ球傷害活性は、抗HLA-DR抗体または抗CLIP抗体の添加によりほとんど完全に抑制された。しかし、抗HLA-I抗体の添加では抑制は見られなかった。したがって、移植後のPBMCによる自己リンパ球の傷害は、PHA芽球上のHLA-DRまたはCLIPを介するものであることが示唆された。

VI. T細胞レセプター β 鎖のCDR3長の分布解析

図7は、症例9のPBSCT施行前後のPBMCについて、各BVサブファミリーのCDR3長分布を表したものである。PBSCT施

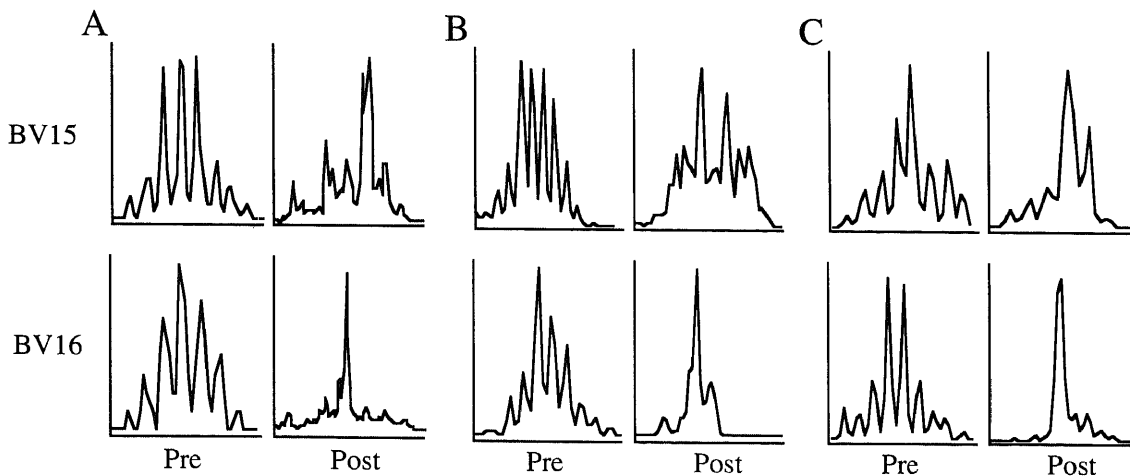


Fig. 8. Changes in the complementarity determining region 3 size distribution pattern of b chain variable region (BV) 15 cDNA and BV16 cDNA associated with development of autologous graft-versus-host disease. A, patient 9; B, patient 11; C, patient 15. BV, β chain variable region.

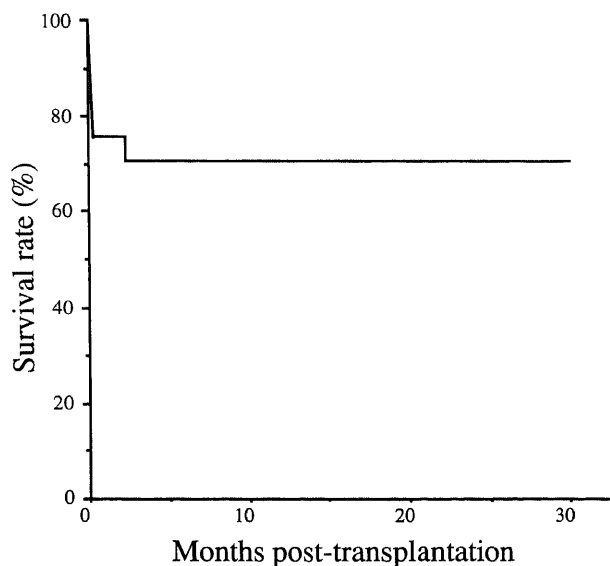


Fig. 9. Kaplan-Meier analysis of disease-free survival in 17 patients with non-Hodgkin's lymphoma treated with autologous peripheral blood stem cell transplantation.

行前の各BVサブファミリーのCDR3長の分布(図7A)は、過去に行われた化学療法や輸血のためか、半数以上のサブファミリーにCDR3長パターンの異常が見られた。一方、自己GVHDを発症した移植後32日目のPBMC(図7B)では、移植前に分布の偏りを示した多くのサブファミリーが、Tリンパ球の再構築を反映して、オリゴクローン性から多クローン性へと変化していた。しかし、PBSCT前に正常パターンを示したBV15やBV16では、逆に単クローン性増殖を示すピークが認められた。

図8は、患者9(A)、11(B)および15(C)について、PBSCT前と、PBSCT後に自己GVHDが発症した際のPBMCにおける、BV15とBV16のCDR3長分布を比較したものである。いずれの例においても両サブファミリーに、CDR3長パターンの著しい変化が認められた。特にBV16では、単クローン性のT細胞の増殖を示唆する単一のピークがみられ、この傾向は検討した3症例のすべてに認められた。これらの所見から、自己GVHDの発症時には、何らかの共通抗原に対応したT細胞のクローン性増殖が末梢血にみられることが示唆された。

Ⅶ. 移植成績(表4)

完全寛解で自己GVHDの誘導を試みた9例は、1カ月から31カ月完全寛解を維持している。部分寛解の6例中4例は移植後完全寛解となったが、1例は4ヶ月目に骨髄再発をきたした。進行期に移植した2例中1例に対しては、PBSCTは無効で移植後27日目に死亡した。残りの1例は無反応であったが、残存腫瘍に対して放射線療法を施行した後に部分寛解となり19ヶ月生存している。

全17症例の無病生存率曲線を図9に示す。観察期間の中央値は11.8ヶ月で、予想無病生存率は71%であった。これは、同じような予後不良症例に行われた自己造血幹細胞移植の成績(41~46%)²⁵⁾に比べて優れた成績と考えられた。

考 察

自己の造血幹細胞移植後に自己GVHDを誘導するためには、CyAを投与することによって自己反応性T細胞を末梢へ誘導するとともに、自己反応性T細胞の働きを抑制する調節性細胞を排除する必要がある³¹⁾³²⁾。胸腺内で正の選択を受けた未分化T細胞は、胸腺上皮が発現する自己抗原と接触することによってインターロイキン(interleukin, IL)-2を産生し、増殖した結果アポトーシスを起こして死滅する³³⁾³⁴⁾。しかし、T細胞の成熟過程でCyAが投与されるとIL2産生が阻害され、自己反応性T細胞にアポトーシスが起こらなくなる³⁵⁾³⁶⁾。その結果、クローン性の除去をまぬがれた自己反応性T細胞が末梢血に流出する。このような自己反応性T細胞の流出が起こっても、末梢に抑制性の調節機構が存在するために、自己の組織に対する傷害は起こらないが、大量の化学療法やX線照射により、自己調節機構があらかじめ破壊されていれば、自己反応性T細胞による組織傷害、すなわち自己GVHDが発症する³⁷⁾³⁸⁾。IFN- γ が同時に投与された場合には、体細胞のHLAクラスIIの発現が高まるため、自己GVHDが増強される³⁹⁾⁴⁰⁾。

自己GVHDは自家BMT後にCyAを投与することによって、約80%の患者に誘導できることが知られている¹⁵⁾¹⁶⁾。本研究では、PBSCT後にCyAを投与した症例1から症例6までの6例全例で自己反応性T細胞が誘導されたものの、明らかな自己GVHDはみられなかった。自己傷害性リンパ球の誘導にもかかわらず自己GVHDが誘導されなかった原因の一つに、移植前

処置療法が化学療法だけの比較的弱いものであったため、自己反応性リンパ球を排除する患者の調節機構が残存したことがあげられる。また、造血幹細胞とともに移植される大量の単球や抑制性のT細胞などが自己GVHDの発症を阻害した可能性も考えられる³⁹⁾⁴¹⁾。大量の化学療法後にG-CSFを併用することにより採取した末梢血単核球分画には、造血幹細胞に加えて単球や成熟したT細胞が含まれている。これらは同種幹細胞移植に用いられた際に、同種抗原に反応するT細胞の反応を抑制することが報告されている⁴²⁾⁴³⁾。Patiら⁴⁴⁾も、PBSCT後にCyAを投与した場合、BMT後と比べて自己GVHDの誘導率が低いことを報告した。

これらの問題点を考慮し、症例7から症例17までの11例のうち、患者の体内に残る調節機構を破壊するため、9例で前処置にTBIを加え、また移植片から単球やT細胞を除くため4例で純化CD34陽性細胞を移植片として用いた。その結果、前処置にTBIを加えた9例中6例と、CD34陽性細胞移植を行った4例中2例に典型的な自己GVHDが誘導された。したがって、PBSCT後であっても、TBIを含めた前処置の施行や、CD34陽性細胞を移植片として用いることによって、効率よく自己GVHDが誘導される可能性が示唆された。

ヒトの自己GVHDの発症機序はまだ十分に解明されていないが、HLAクラスIIを発現する細胞が標的であるにもかかわらず、担当細胞は主としてCD8陽性T細胞であることや^{29)~31)}、皮膚病変中にBV15陽性のT細胞が集積していること⁴⁵⁾、などが示されている。最近では、自己GVHDの標的抗原としてCLIPが注目されている⁴⁶⁾⁴⁷⁾。CLIPは、MHCクラスII $\alpha\beta$ ダイマーからの分離を免れクラスII分子の溝に残ったフラグメントで、MHCクラスII分子と結合している⁴⁸⁾⁴⁹⁾。T細胞のうちBV15を含むいくつかのBVをもつT細胞は、スーパー抗原の一つであるブドウ球菌腸管毒素B(staphylococcus enterotoxin B, SEB)に結合する部位を持っている⁵⁰⁾⁵¹⁾。HLA-DRに結合しているCLIPは、このSEB結合部位を介してスーパー抗原様にT細胞を刺激することにより、MHCクラスII陽性細胞に対する細胞傷害性T細胞を誘導すると考えられている⁴⁶⁾⁴⁷⁾。本研究においても、PBSCT後のPBMCによる自己リンパ球傷害活性は、抗CLIP抗体と抗HLA-DR抗体の添加によって抑制された。したがって、自己反応性T細胞の標的抗原の一つとしてMHCクラスII-CLIP複合体が重要と考えられた。

自己GVHDの担当細胞がすべてスーパー抗原で活性化されたものであるならば、自己GVHD発症時の末梢血にT細胞の抗原特異的な増殖はみられないはずである⁵²⁾⁵³⁾。しかし、自己GVHD発症時の末梢血をCDR3長分布解析法を用いて検討したところ、一部のT細胞ファミリーにクローン性の増殖が検出された。したがって自己GVHDの発症には、スーパー抗原とは別の何らかの自己抗原が関与していると考えられる。特に、自己GVHDを発症した3症例のすべてにおいて、BV16⁺陽性T細胞のクローン性増殖がみられたことから、このT細胞ファミリーを刺激する何らかの共通抗原が自己GVHDの発症を促した可能性が考えられる。現在このT細胞クローンのCDR3塩基配列について相同性の有無を解析中である。

今回、対象とした悪性リンパ腫症例は全例予後不良例であったが、観察期間は短いものの71%の無病生存率が予想された。これらは同様の前処置によって自己造血幹細胞移植を受けたがCyAは投与されなかった群の無病生存率²⁵⁾と比較し、良好な成

績と考えられた。したがって、CyAによる自己GVHDの誘導は、難治性悪性リンパ腫の移植後再発を予防する可能性があると思われた。特に、純化CD34陽性細胞移植や、移植前処置にTBIを必要とするような予後不良の悪性リンパ腫患者に対しては、今後積極的に試みるべき免疫療法と考えられた。

結 論

1. 17症例の悪性リンパ腫患者に対して、自己GVHDを誘導するためPBSCT後にCyAとIFN- γ を投与した。血液学的回復は速やかで、肝腎機能障害などの臓器障害や、CyA投与による易感染性の明らかな増強はみられなかったことから、自己GVHDの誘導は安全に施行できると考えられた。

2. 検討した全症例で、移植後のPBMCに自己リンパ球傷害活性が検出されたが、実際に自己GVHDが発症したのは一部の例のみであった。

3. PBSCT後に効率よく自己GVHDを誘導するには、CD34陽性細胞を移植片として用いることによって自己調節性T細胞を抑制する、または移植前処置にTBIを加えることによって自己調節性の機構を破壊するなどの処置が有効であった。

4. PBSCT後に自己GVHDを誘導するためのCyAの投与期間は、21日間で十分で、移植後22日目以降のCyA投与は、自己反応性リンパ球の働きをむしろ抑制する可能性があると思われた。

5. 自己GVHDの担当細胞は、MHCクラスII-CLIP複合体を介して自己のリンパ球を攻撃する可能性が示唆された。また、自己GVHDの発症には、何らかの自己抗原を認識するT細胞のクローン性増殖が関与している可能性が示唆された。

6. CyAによる自己GVHDの誘導は、難治性悪性リンパ腫患者の再発を防ぐうえで有用な免疫療法と考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田 保教授に深甚なる謝意を捧げます。さらに、終始、直接御指導、御助言をいただきました金沢大学医学部附属病院第三内科講師、中尾眞二先生に厚くお礼申し上げますとともに、本研究の遂行に際し多大な御協力をいただきました金沢大学医学部附属病院第三内科骨髄移植グループの各位に感謝の意を表します。

なお本研究の要旨は、第20回日本造血幹細胞移植学会総会(1997年、東京)および第59回日本血液学会総会(1998年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330: 827-838, 1994
- 2) Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, van der Lelie H, Bron D, Sonneveld P, Gisselbrecht C, Chan Y, Harousseau L, Coiffier B, Biron P, Mandelli F, Chauvin F. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 333: 1540-1545, 1995
- 3) Nademanee A, Schmidt GM, O'Donnell MR, Snyder DS, Parker PA, Stein A, Smith E, Lipsett JA, Sniecinski I, Margolin K, Somlo G, Niland JC, Blume KG, Forman SJ. High-dose chemoradiotherapy following by autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy during complete remission in adult patients with poor-risk aggressive lymphoma:

A pilot study. *Blood* 80: 1130-1134, 1992

- 4) Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, Coiffier B, Bosly A, Tilly H, Morel P, Nouvel C, Herbrecht R, D'Agay MF. Comparison of autologous bone marrow transplantation with sequential chemotherapy for intermediate-grade and high-grade non-Hodgkin's lymphoma in first complete remission: A study of 464 patients. *J Clin Oncol* 12: 2543-2551, 1994
- 5) Verdonck LF, van Putten WLJ, Hagenbeek A, Schouten HC, Sonneveld P, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Raemaekers JMM, van Oers RHJ, Haak HL, Schots R, Dekker AW, de Gast CG, Lowenberg B. Comparison of CHOP chemotherapy with autologous bone marrow transplantation for slowly responding patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 332: 1045-1051, 1994
- 6) Fuchs EJ, Bedi A, Jones RJ, Hess AD. Cytotoxic T cells overcome BCL-ABL-mediated resistance to apoptosis. *Cancer Res* 55: 463-466, 1995
- 7) Glazier A, Tutschka PJ, Farmer ER, Santos GW. Graft-versus-host disease in cyclosporine treated rats after syngeneic autologous bone marrow reconstitution. *J Exp Med* 158: 1-8, 1983
- 8) Glazier A, Tutschka PJ, Farmer ER. Studies on immunobiology of syngeneic and autologous graft-versus-host disease in cyclosporine treated rats. *Transplant Proc* 15: 3035-3041, 1983
- 9) Hess AD, Horwitz L, Beschorner WE, Santos GW. Development of graft-vs.-host disease-like syndrome in cyclosporine-treated rats after syngeneic bone marrow transplantation. I. Development of cytotoxic T lymphocytes with apparent polyclonal anti-Ia specificity, including autoreactivity. *J Exp Med* 161: 718-730, 1985
- 10) Jones RJ, Vogelsang GB, Hess AD, Farmer ER, Mann RB, Geller PB, Piantadosi S, Santos GW. Induction of graft-versus-host disease after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 333: 754-756, 1989
- 11) Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 300: 1068-1073, 1979
- 12) Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kolb H-J, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM. Graft-versus-leukemia reaction after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555-562, 1990
- 13) Ratanatharathorn V, Uberti J, Karanes C, Abella E, Lum LG, Momin F, Cummings G, Sensenbrenner LL. Prospective comparative trial of autologous versus allogeneic bone marrow transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 84: 1050-1055, 1994
- 14) Kersey JH, Weisdorf D, Nesbit ME, LeBien TW, Woods WG, McGlave PB, Kim T, Valleria DA, Goldman AI, Bostrom B, Hurd D, Ramsay NKC. Comparison of autologous and allogeneic bone marrow transplantation for treatment of high-risk refractory acute lymphoblastoid leukemia. *N Engl J Med* 317: 461-467, 1987

- 15) Hess AD, Thoburn CJ. Immunobiology and immunotherapeutic implications of syngeneic/autologous graft-versus-host disease. *Immunol Rev* 157: 111-123, 1997
- 16) Kennedy MJ, Vogelsang GB, Beveridge RA, Farmer ER, Altomonte V, Huelskamp AM, Davidson NE. Phase I trial of intravenous cyclosporine to induce graft-versus-host disease in women undergoing autologous bone marrow transplantation for breast cancer. *J Clin Oncol* 11: 478-484, 1993
- 17) Kennedy MJ, Vogelsang GB, Jones RJ, Farmer ER, Hess AD, Altomonte V, Huelskamp AM, Davidson NE. Phase I trial of interferon gamma to potentiate cyclosporine-induced graft-versus-host disease in women undergoing autologous bone marrow transplantation for breast cancer. *J Clin Oncol* 12: 249-257, 1994
- 18) Carella AM, Gaozza E, Congiu A, Carlier P, Nati S, Truini M, Castellaneta A, Viale M. Cyclosporine-induced graft-versus-host disease after autologous bone marrow transplantation in hematological malignancies. *Ann Hematol* 62: 156-159, 1991
- 19) Yeager AM, Vogelsang GB, Jones RJ, Farmer ER, Hess AD, Santos GW. Induction of cutaneous graft-versus-host disease by administration of cyclosporine to patients undergoing autologous marrow transplantation for acute myeloid leukemia. *Blood* 79: 3031-3035, 1992
- 20) Gruhn B, Hafer R, Kosmehl H, Fuchs D, Zintl F. Cyclosporin A-induced graft-versus-host disease following autologous bone marrow and blood stem cell transplantation for hematological malignancy of childhood. *Bone Marrow Transplant* 21: 901-907, 1998
- 21) Schmitz N, Lin DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, Demuynck HMS, Link H, Zander A, Barge A, Borkett K. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 347: 353-357, 1996
- 22) Hartmann O, Le Corroller AG, Blaise D, Michon J, Philip I, Noron F, Janvier M, Pico JL, Baranzelli MC, Rubie H, Coze C, Pina A, Meresse V, Benhamou E. Peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for solid tumors and lymphomas: Hematologic recovery and costs. *Ann Intern Med* 126: 600-607, 1997
- 23) Moss PHA, Rosenberg WMC, Bell JI. The human T cell receptor in health and disease. *Annu Rev Immunol* 10: 71-96, 1992
- 24) Jorgensen JL, Esser U, de St. Groth BF, Reay PA, Davis MM. Mapping T-cell receptor-peptide contact variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 355: 224-230, 1992
- 25) Pannetier CM, Cochet S, Darche A, Casrouge M, Zoller M, Kourilsky P. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T cell receptor β chain vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4319-4323, 1993
- 26) Choi Y, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrck P, Kappler J. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "Superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8941-8945, 1989
- 27) Yoshioka T, Matsutani T, Iwagami S, Tsuruta Y, Kaneshige T, Toyosaki T, Suzuki R. Quantitative analysis of the usage of human T cell receptor α and β chain variable regions by reverse dot blot hybridization. *J Immunol Methods* 201: 145-155, 1997
- 28) 日本癌治療学会. がん化学療法の臨床効果判定基準. *日本癌治療会誌* 21: 929-953, 1986
- 29) Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481, 1958
- 30) Nakao S, Miura Y, Zeng W, Takami A, Sugimori N, Yamazaki H, Yachie A, Shiobara S, Matsuda T. Induction of autotoxic T cells with cyclosporine and interferon- γ for patients with non-Hodgkin's lymphoma after transplantation of peripheral blood stem cells. *J Allergy Clin Immunol* 100 [Suppl.]: 65-69, 1997
- 31) Vigelsang GB, Hess AD. Graft-versus-host disease: New directions for a persistent problem. *Blood* 84: 2061-2067, 1994
- 32) Hess AD, Fischer AC, Beschorner WE. Effector mechanisms in cyclosporine A-induced syngeneic graft-versus-host disease. Role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subsets. *J Immunol* 145: 526-533, 1990
- 33) Kappler JW, Staerz U, White J. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49: 273-280, 1987
- 34) Aguilar LK, Aguilar-Cordova E Jr., Cartwright J, Bermont JW. Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis. *J Immunol* 152: 2645-2651, 1994
- 35) Jenkins MK, Schwartz RH, Pardoll DM. Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science* 241: 1655-1658, 1988
- 36) Gao EK, Lo D, Cheney RT, Kanagawa O, Sprent J. Abnormal differentiation of thymocytes in mice treated with cyclosporine. *Nature* 332: 176-179, 1989
- 37) Fischer AC, Beschorner WE, Hess AD. Requirements for the induction and adoptive transfer of cyclosporine-induced syngeneic graft-versus-host disease. *J Exp Med* 169: 1031-1041, 1989
- 38) Hess AD, Fischer AC, Horwitz L, Bright EC, Laulis MK. Characterization of peripheral autoregulatory mechanisms that prevent development cyclosporine-induced syngeneic graft-versus-host disease. *J Immunol* 153: 400-411, 1994
- 39) Geller RB, Esa AH, Beschorner WE, Frondoza CG, Santos GW, Hess AD. Successful in vitro graft-versus-tumor effect against an Ia-bearing tumor using cyclosporine-induced syngeneic graft-versus-host disease in the rat. *Blood* 74: 1165-1171, 1989
- 40) Noga SJ, Horwitz L, Kim H, Laulis MK, Hess AD. Interferon- γ potentiates the antitumor effect of cyclosporine-induced autoimmunity. *J Hematother* 1: 75-84, 1992
- 41) Miura Y, Nakao S, Zeng W, Takami A, Sugimori N, Yamazaki H, Shiobara S, Matsuda T. Induction of autologous graft-versus-host disease with cyclosporine and interferon- γ after transplantation of peripheral blood CD34⁺ cells in non-Hodgkin's lymphoma. *J Allergy Clin Immunol* [in press]
- 42) Mielcarek M, Martin PJ, Torok-Storb B. Suppression of

- alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14⁺ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 89: 1629-1634, 1997
- 43) Kusnierz CR, Still BJ, Amano M, Zukor JD, Negrin RS, Blume KG, Strober S. Granulocyte colony-stimulating factor induced comobilization of CD4⁻ CD8⁻ T cells and hematopoietic progenitor cells (CD34⁺) in the blood of normal donors. *Blood* 89: 2586-2595, 1997
- 44) Pati AR, Godder KT, Abhyanker SH, Gee AP, Henslee-Downey PJ. Cyclosporine-induced autologous graft-versus-host disease following autologous blood stem cell transplantation for lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 17: 1081-1083, 1996
- 45) Ruvolo PP, Bright EC, Kennedy MJ, Morris LE, Fischer AC, Vogelsang GB, Jones RJ, Hess AD. Cyclosporine-induced autologous graft-versus-host disease: Assessment of cytolytic effector mechanisms and V β T cell receptor repertoire. *Transplant Proc* 27: 1363-1365, 1995
- 46) Hess AD, Bright EC, Thoburn C, Vogelsang GB, Jones RJ, Kennedy MJ. Specificity of effector T lymphocytes in autologous graft-versus-host disease: Role of the major histocompatibility complex class II invariant chain peptide. *Blood* 89: 2203-2209, 1997
- 47) Hess AD, Thoburn C, Horwith L. Promiscuous recognition of major histocompatibility complex class II determinants in cyclosporine-induced syngeneic graft-versus-host disease: Specificity of cytolytic effector T cells. *Transplantation* 65: 785-792, 1998
- 48) Cresswell P. Assembly, transport and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12: 259-293, 1994
- 49) Freisewinkel IM, Schenck K, Koch N. The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9703-9706, 1993
- 50) Gold DP, Surh CD, Sellins KS, Schroder K, Sprent J, Wilson DB. Rat T cell response to superantigens. II. Allelic differences in V β 8.2 and V β 8.5 β chains determine responsiveness to staphylococcal enterotoxin B and mouse mammary tumor virus-encoded proteins. *J Exp Med* 179: 63-69, 1994
- 51) Lundin KEA, Brinchmann JE, Hansen T. Interactions between staphylococcal superantigens and human T-cell clones are predominantly but not exclusively governed by their T-cell receptor V β usage. *Scand J Immunol* 38: 387-394, 1994
- 52) Gorski J, Yassai M, Zhu X, Kissella B, Keever C, Flomemberg N. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping: Correlation with immune status. *J Immunol* 152: 5109-5119, 1994
- 53) Yassai M, Newton-Nash D, Gorski J. Bacterial toxin superantigens stimulate all members of susceptible VB gene families. *Ann NY Acad Sci* 756: 110-112, 1995

Induction of Autologous Graft-Versus-Host Disease (autologous GVHD) with Cyclosporine A after Transplantation of Peripheral Blood Stem Cells: Analysis of Factors Affecting the Development of autologous GVHD and the Mechanism of its Induction Yuji Miura, Third Department of Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **107**, 554 — 566 (1998)

Key words autologous graft-versus-host disease, cyclosporine A, MHC class II associated invariant chain peptide, peripheral blood stem cell transplantation, complementarity determining region 3 size distribution analysis

Abstract

Autologous graft-versus-host disease (GVHD), an autoaggression syndrome that mainly affects the skin in a way resembling the skin changes found in cases of acute GVHD in allogeneic bone marrow transplant recipients, is inducible in recipients of autologous bone marrow by administration of cyclosporine A (CyA) for a short period following the transplant. However, its inducibility and underlying mechanisms have not been studied well in the setting of peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT), which is now the main modality of autologous hematopoietic stem cell transplants. To analyze factors affecting the development of autologous GVHD and the autocytotoxic T cells that mediate autologous GVHD, 17 patients with malignant lymphoma were treated with PBSCT followed by administration of CyA and interferon- γ . Autologous GVHD did not develop in the first 6 patients whose conditioning regimens contained no-total body irradiation (TBI) segments and were transplanted with unmanipulated peripheral blood stem cell (PBSC) grafts, although cytotoxic activities against autologous lymphocytes were detectable in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained post-transplant from all of them. In contrast, autologous GVHD developed in 2 of 4 patients who had been transplanted with CD34⁺ stem cells enriched from the peripheral blood leukapheresis product as well as in 6 of 9 patients conditioned with TBI containing regimen. Macropapular erythema developed on days 19 to 27 after PBSCT in these patients and disappeared in 3 to 9 days without treatment. Skin biopsies confirmed a diagnosis of GVHD in all patients. Autocytotoxic activities of post-transplant PBMC were detected between days 11 and 38 in all cases. The specific lysis of autologous lymphocytes by the PBMC was blocked by the addition of either anti-human leukocyte antigen (HLA)-DR antibody or anti-major histocompatibility complex (MHC) class II associated invariant chain peptide (CLIP) antibody. To determine whether antigen-driven T-cell responses are involved in the development of autologous GVHD, 27 subfamilies defined by the β -chain variable regions (BV) of the T cell receptor of peripheral blood T cells were studied using complementarity determining region 3 (CDR3) size distribution analysis. The CDR3 size pattern of several BV subfamilies that had been normal before PBSCT changed to abnormal patterns suggestive of clonal or oligoclonal expansions in a limited number of T cells. Among these BV subfamilies, clonal expansions within BV16⁺ T cells were shared by all three patients studied. It may be concluded that either depleting the regulatory cells of the PBSC graft by enriching the CD34⁺ cells, or abolishing the autoregulatory mechanisms by including TBI in pretransplant conditioning regimens are effective in inducing autologous GVHD after PBSCT followed by CyA administration. Autocytotoxic activities can be detected for a limited period after PBSCT in the PBMC of patients treated with CyA, regardless of the development of auto GVHD. The cytotoxicities are mediated by the HLA-DR-CLIP complex on the target cells. The development of autologous GVHD is associated with clonal expansion of a limited number of peripheral blood T cells that may recognize some autoantigens.