

造血幹細胞移植後のキメリズム解析

第6回「今後の輸血・細胞治療検査室のあり方を考える」

東海大学医学部附属病院 輸血室

今泉満明

Think Ahead, Act for Humanity

～先駆けであること～

1. キメリズム解析とその有用性
2. キメリズム解析の手法と概要
3. STR-PCR法
4. 症例

キメリズム (chimerism)

キメリズム (chimerism) の語源は、ギリシア神話に登場する頭がライオン、胴体がヤギ、尻尾がヘビの怪物キマイラに由来している

医学生物学の分野では、異なる個体に由来する細胞、すなわち異なる遺伝情報をもつ細胞が一個体内に同時に混在する状態を示す



同種造血幹細胞移植後のキメリズム解析とは

キメリズム解析とは同種造血幹細胞移植後において、末梢血または骨髓液中のレシピエント由来細胞とドナー由来細胞を識別し、その比率を調べる検査である

造血幹細胞移植後は移植前処置及び移植片に含まれるエフェクター細胞の認識によりレシピエント由来の細胞は減少し、やがてドナー由来の造血細胞に置き換わっていくため、移植後早期はレシピエント由来細胞とドナー由来細胞が混在（混合キメリズム）した状態を呈する

同種造血幹細胞移植後のキメリズム解析とは

混合キメリズム

移植後早期や再発時など、レシピエント由来細胞とドナー由来細胞が混在した状態

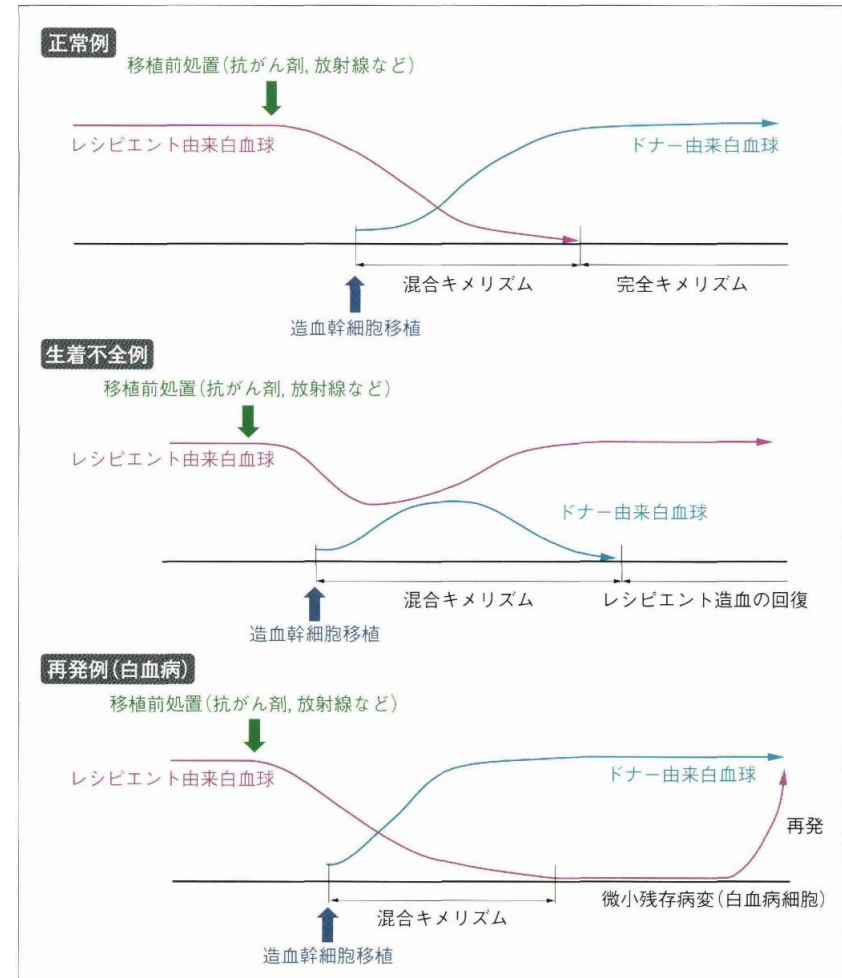
完全ドナーキメリズム (完全キメリズム)

レシピエント由来細胞がドナー由来細胞に置き換わり、レシピエント由来細胞が認められない状態

レシピエントキメリズム

再発によりレシピエント由来の白血病細胞や正常血液細胞が出現すると、レシピエントキメリズムが増加する

移植片が完全に拒絶された場合はレシピエントキメリズムのみの状態となる



キメリズム解析の有用性

① 生着の評価

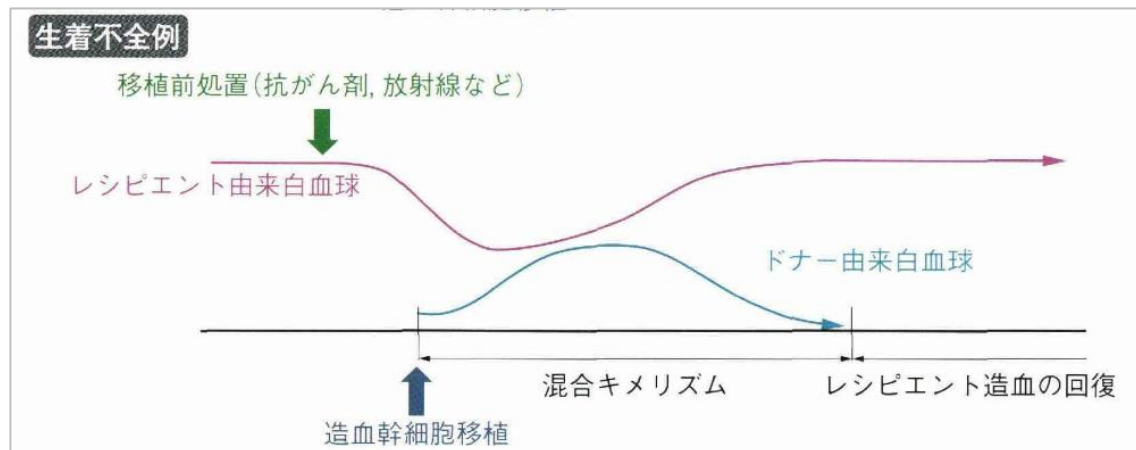
【生着の定義】

好中球数 $>500/\mu\text{L}$ が3日間連続 無輸血で血小板 $>20000/\mu\text{L}$ 無輸血でHb $>8.0\text{g/dL}$

骨髄移植及び末梢血幹細胞移植では移植後day28までに生着の定義を満たさない状態を一次生着不全、生着後にドナーの造血能が失われる状態を二次生着不全とされる

レシピエント由来細胞がドナー由来細胞に置き換わり造血が再構築されていることを確認する必要がある

好中球数 $>500/\mu\text{L}$ であっても、レシピエントキメリズムが主体の場合（自己造血の回復）があり、キメリズム解析により鑑別が可能である



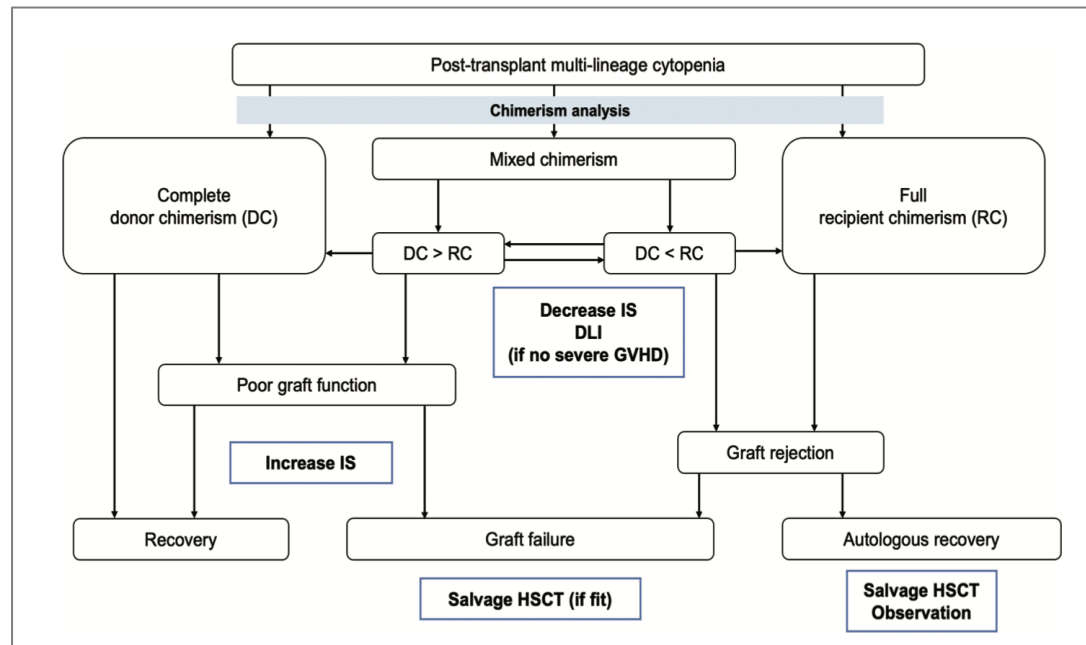
キメリズム解析の有用性

② 生着不全のモニタリング

生着不全（一次生着不全・二次生着不全）には多彩な要因が関係する

移植後早期にドナーキメリズムの増加が認められない場合、一次生着不全となる可能性が高い
 生着後においても、レシピエントキメリズムが優位または増加していく場合は移植片拒絶が、完全ドナーキメリズムまたはドナーキメリズム優位にも関わらず、2系統以上の血球減少がある場合は移植片機能低下が疑われる

免疫抑制剤の調整やDLIの効果判定、再移植の検討などにキメリズムの推移が参考にされることがある



キメリズム解析の有用性

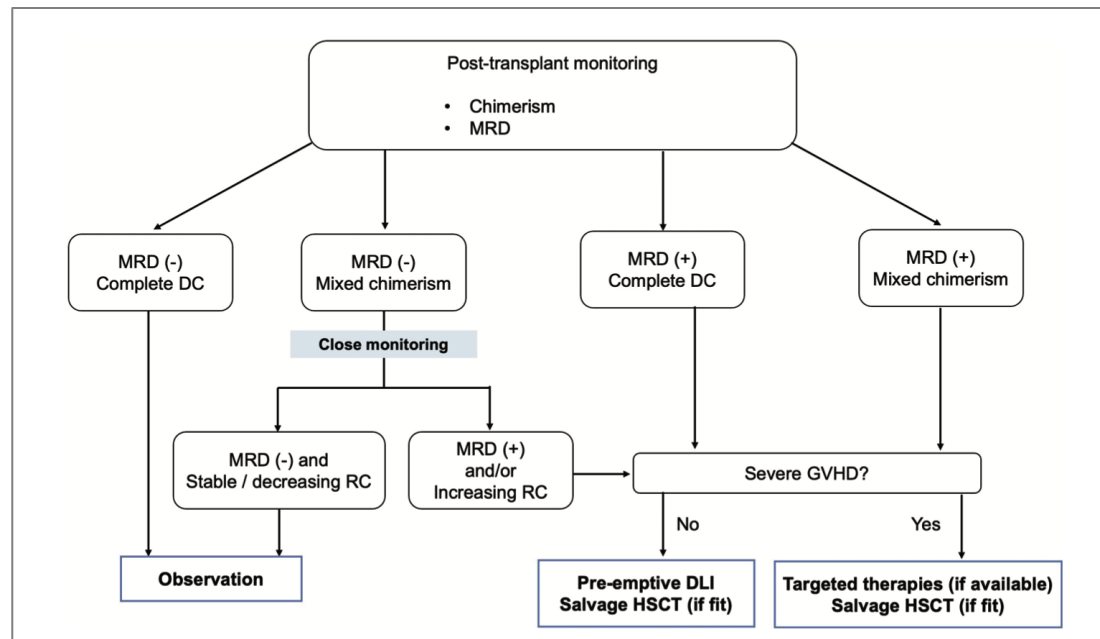
③ 再発の評価

再発時に増加してくる白血病細胞はレシピエント由来の血液細胞由来であることがほとんどであり、完全ドナーキメリズムから混合キメリズムに移行する

レシピエント由来の白血病細胞に先行してレシピエント由来の正常血液細胞が出現することがあり、形態学的な所見よりも遺伝学的な検出法が有用となる

混合キメリズムにおいてレシピエントキメリズムが進行性に増加する場合、再発のリスクが高いとされている

微小残存病変（MRD）の検出法などと合わせてキメリズム解析は再発評価の参考とされる



1. キメリズム解析とその有用性
2. キメリズム解析の手法と概要
3. STR-PCR法
4. 症例

キメリズム解析の手法

測定法	識別マーカー	特徴	検出感度
XY-FISH	XY 染色体	<ul style="list-style-type: none"> 適応は異性間移植のみ適応 X染色体とY染色体に特異的な蛍光プローブを用いて蛍光顕微鏡で観察 保険適応 	0.1-0.2%
HLA-Flow	HLA	<ul style="list-style-type: none"> HLA不適合移植のみ適応 抗HLAモノクローナル抗体を用いてフローサイトメーターで検出 白血球サブセット解析や白血病マーカーとの併用が可能 	—
STR-PCR	マイクロサテライト	<ul style="list-style-type: none"> STR (Short Tandem Repeat) による個人識別 標準化されたキットが市販されている フラグメントの長さの相違をキャピラリー電気泳動装置で検出 半定量的にキメリズムを算出 	2.5-5.0%
qPCR	SNPs、indels	<ul style="list-style-type: none"> Real-time PCR法により高感度な検出と定量 SNPs (一塩基多型) や欠失・挿入型多型(insertion-deletion polymorphisms : indels)が識別マーカーに用いられる 標準化されたキットと解析ソフトが市販されている 	0.05-0.1%

この他にもdigital PCR法やNGS法による高感度なキットが市販されている

XY-FISH（Fluorescence in situ hybridization：FISH）の概要

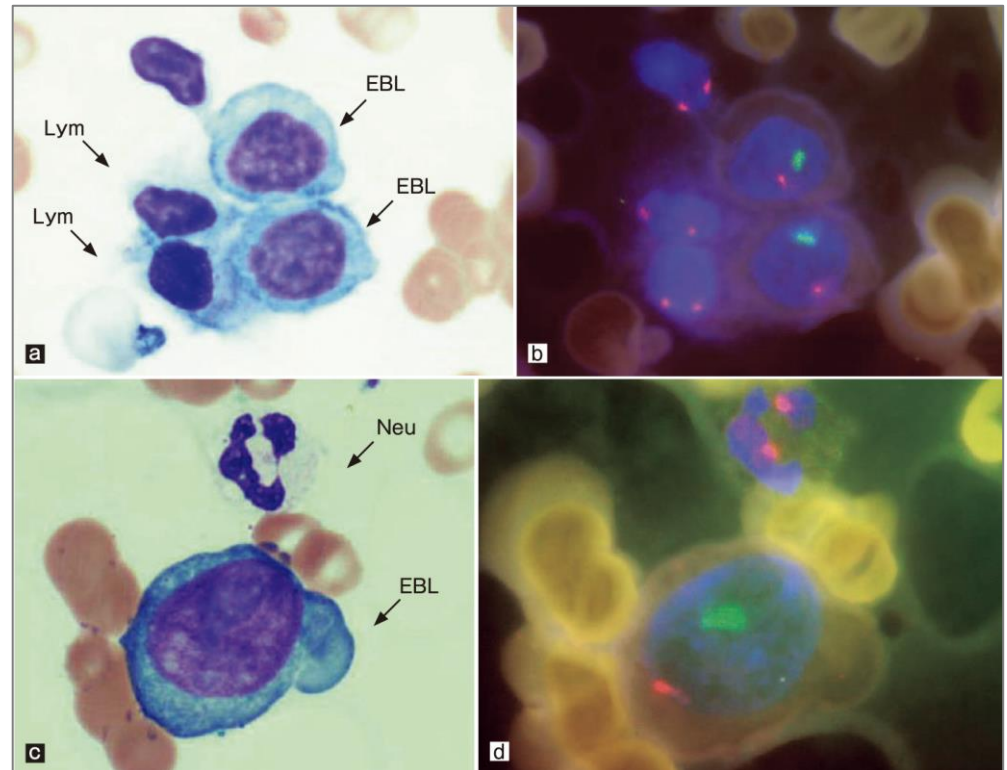
X染色体とY染色体を識別マーカーとしてFISH法にて検出する方法である
 X染色体とY染色体に特有な塩基配列に対して特異的な蛍光標識DNAプローブをハイブリダイゼーションさせ、XXシグナルとXYシグナルを蛍光顕微鏡下で識別する
 別々の波長の蛍光色素を選択することで偽陰性や偽陽性を低減できる。

メリット

- セルカウントは500-1000細胞するため感度は0.1-0.2%程度と高感度
- 間期核でも検査可能
- 保険診療として実施可能

デメリット

- 異性間造血幹細胞移植のみ適応
- 識別率が低い
- 高齢者や腫瘍細胞ではY染色体が欠失することがあるため注意が必要
- 移植後早期などは細胞数が少ない時期の検査には不向き



HLA-Flow法の概要

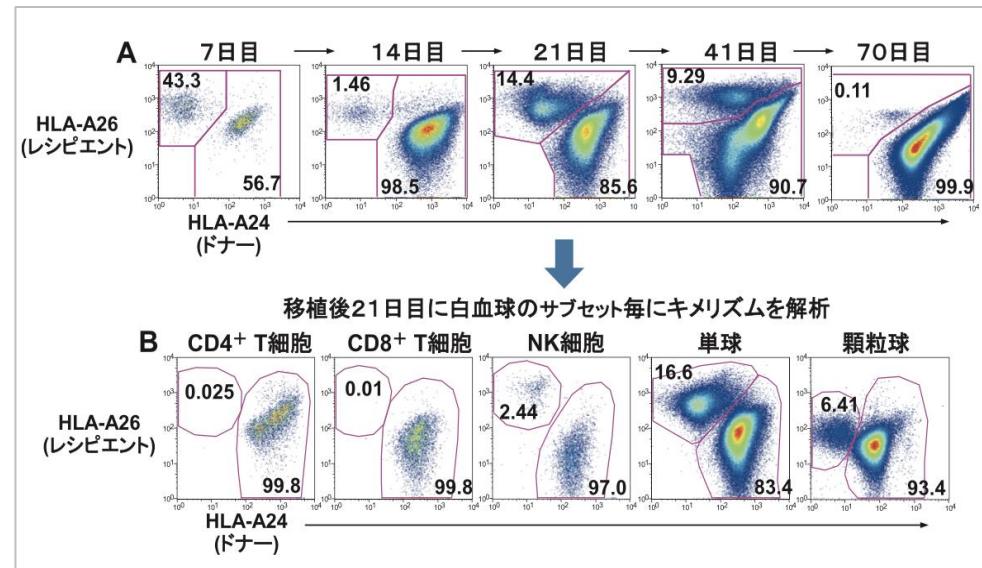
ドナーとレシピエント間での血清学的に不一致なHLAを識別マーカーとして、抗HLAモノクローナル抗体を用いてフローサイトメトリーで検出する方法である

メリット

- マルチカラー解析により白血球サブセットと白血球病マーカーも同時に解析可能
- セルソーターなら目的細胞を他検査に利用可能
- 迅速な結果報告

デメリット

- HLA Class I の血清学的不一致移植症例限定
- 抗HLAモノクローナル抗体はClass I に対する抗体を使用するためClass II の不一致症例も解析不可
- 識別率が低い
- 市販の抗HLAモノクローナル抗体の種類が限られているため識別できる組み合わせが限られる
- 交差反応性を考慮する必要がある



佐藤奈津子、渡辺信和:フローサイトメトリーを使用したキメリズム解析によるHLA不一致造血幹細胞移植後の病態解析Journal of the Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation Vol.4, No.2,2015より引用

PCR-STRの概要

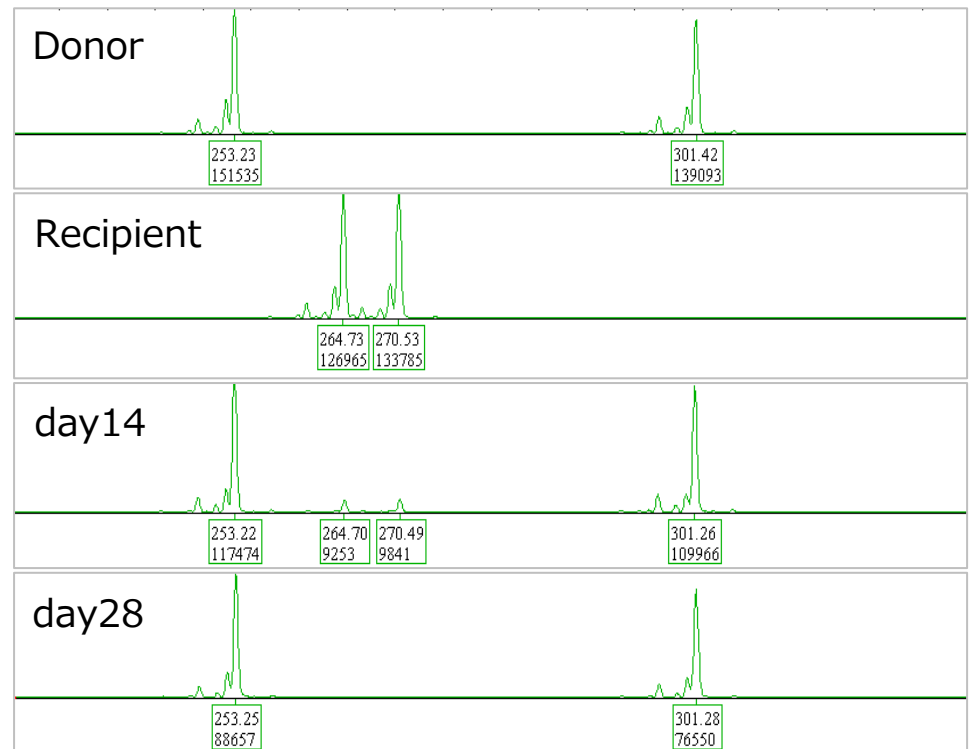
ゲノム上に多数分布しているマイクロサテライトを識別マーカーとした検出法である
 STR (Short tandem Repeat) とは2-6塩基をユニットとする反復配列のことで、個人により繰り返し回数が異なることが知られており、個人識別に利用される
 STR座に特異的な蛍光プライマーを用いてPCR後、キャピラリー電気泳動装置を用いてPCRプロダクトの蛍光の検出とSizingを行い、蛍光のピーク高または面積からドナーとレシピエントの比率を求める (フラグメント解析)

メリット

- 複数のプライマーを用いることにより識別率をほぼ100%にすることが可能
- 性不一致移植やHLA不一致移植といった組み合わせに左右されない
- 磁気免疫ビーズの併用で白血球分画ごとのキメリズム解析が可能
- 標準化されたキットが市販

デメリット

- 半定量的である
- 検出感度が2.5-5.0%程度である
- Stutter peak (アーチファクト) を考慮する必要がある



1. キメリズム解析とその有用性
2. キメリズム解析の手法と概要
3. STR-PCR法
4. 症例

STRの検査法

① サンプル前処理

② DNA抽出

③ PCR

④ PCR産物増幅確認

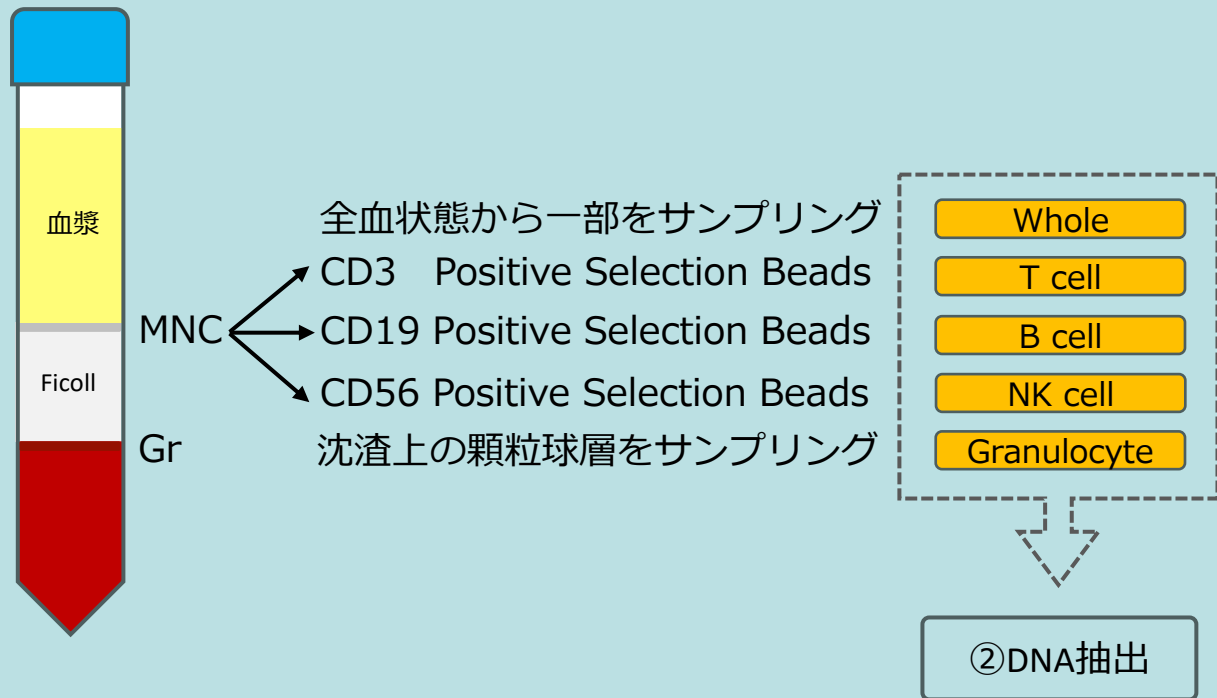
⑤ PCR産物の調整

⑥ 泳動

⑦ 解析

① サンプル前処理

白血球分画ごとにキメリズム解析を行う場合は、磁気免疫ビーズを用いた細胞分離を施してからDNA抽出を行う



白血球分画毎のキメリズム

生着不全発症のメカニズムとして、ドナー移植片に含まれる造血幹細胞の質・量、リンパ球（特にT細胞、NK細胞）を主体とした細胞性免疫・液性免疫、レシピエントの骨髄微小環境など様々な要因が関与する¹⁾とされている

同種造血幹細胞移植後早期のキメリズムがGVHDの発症（T細胞）や拒絶（T細胞、NK細胞）を予測する（リスクが高い）とされている²⁾³⁾

GVHD予防の免疫抑制剤の調整や、再発や混合キメラに対する治療介入の判断と効果判定など、白血球分画ごとのキメリズムを検査し定期的にモニタリングすることがある

・ 非腫瘍性疾患の場合

造血能や免疫能の再構築、代謝異常では酵素・蛋白の補充が目的のため、ある程度の混合キメリズムでも治療効果が維持でき、完全ドナーキメリズムの達成は必須でない⁴⁾

造血能、免疫能、酵素産生を担当する細胞のキメリズムの確認に白血球分画毎のキメリズム検査が実施されることがある

	骨髄不全症候群	原発性免疫不全	先天代謝異常
移植目的	造血能再構築	免疫能再構築	酵素・蛋白補充
治療に貢献する細胞	造血幹細胞	免疫担当細胞（T細胞、B細胞、樹状細胞など）	白血球、骨髄外組織では単球、マクロファージ
保因者ドナー	治療効果不変	治療効果不変	治療効果減弱
混合キメラの治療効果への影響	先天性再不貧では不変、後天性再不貧では時に骨髄不全の再燃	治療効果不変	治療効果減弱
混合キメラによる合併症	ファンconi貧血では本人由来MDS/AMLのリスク、自己免疫性疾患	自己免疫性疾患	自己免疫性疾患

矢部晋正：非腫瘍性疾患に対する造血幹細胞移植より引用

- 1) 神田善伸：みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床
- 2) 今村雅寛 他：骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植におけるキメリズム解析に関する研究
- 3) 同種造血幹細胞移植ポケットマニュアル
- 4) 池田和彦：同種造血幹細胞移植後キメリズム解析の意義と解析法

STRの検査法

① サンプル前処理

② DNA抽出

③ PCR

④ PCR産物増幅確認

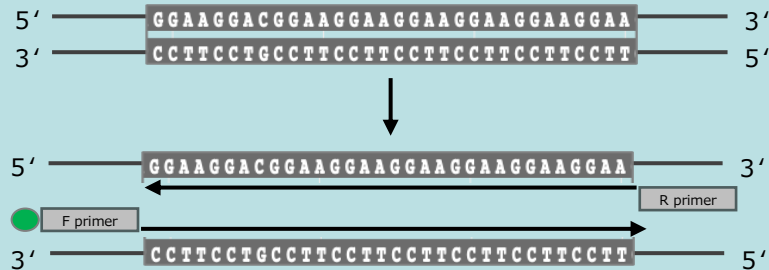
⑤ PCR産物の調整

⑥ 泳動

⑦ 解析

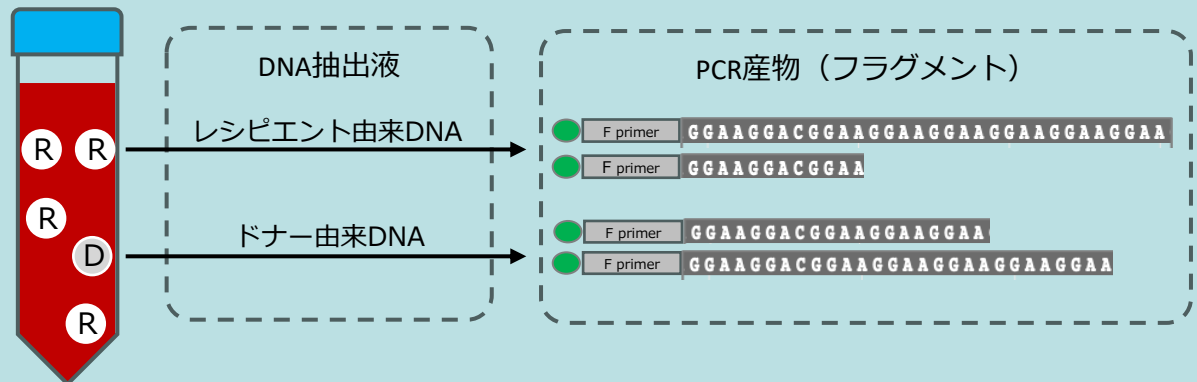
③ PCR

1. 蛍光標識プライマーを用いて目的のSTR座の遺伝子領域を増幅



25サイクル：3000万倍
30サイクル：10億倍
40サイクル：1兆倍

2. PCR増幅産物を得る



STRの検査法

① サンプル前処理

② DNA抽出

③ PCR

④ PCR産物増幅確認

⑤ PCR産物の調整

⑥ 泳動

⑦ 解析

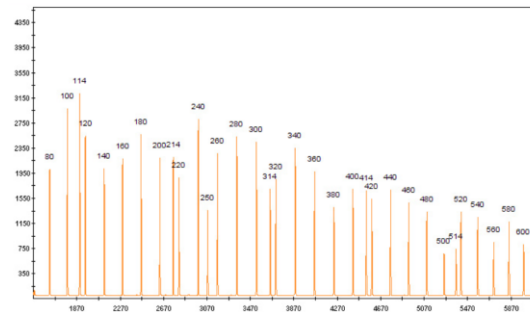
⑤ PCR産物の調整

1. 希釈したPCR産物	1.0 μ L	} 混合 (1サンプル当たり)
Size Standard	0.2-0.5 μ L	
Hi-Di Formamide	12.4 μ L	

↓

2. Heat Shock 95 $^{\circ}$ C 5分	} 2本鎖DNA → 1本鎖DNA
↓	
3. 急冷 4 $^{\circ}$ C Hold	

Size Standardの役割



PCR産物の塩基長（フラグメントサイズ）を決定するための標準物質

- プライマーとは異なる蛍光標識
- 塩基長の異なる複数のフラグメント
- サンプルと同一条件で泳動する
- 検量線を作成

STRの検査法

① サンプル前処理

② DNA抽出

③ PCR

④ PCR産物増幅確認

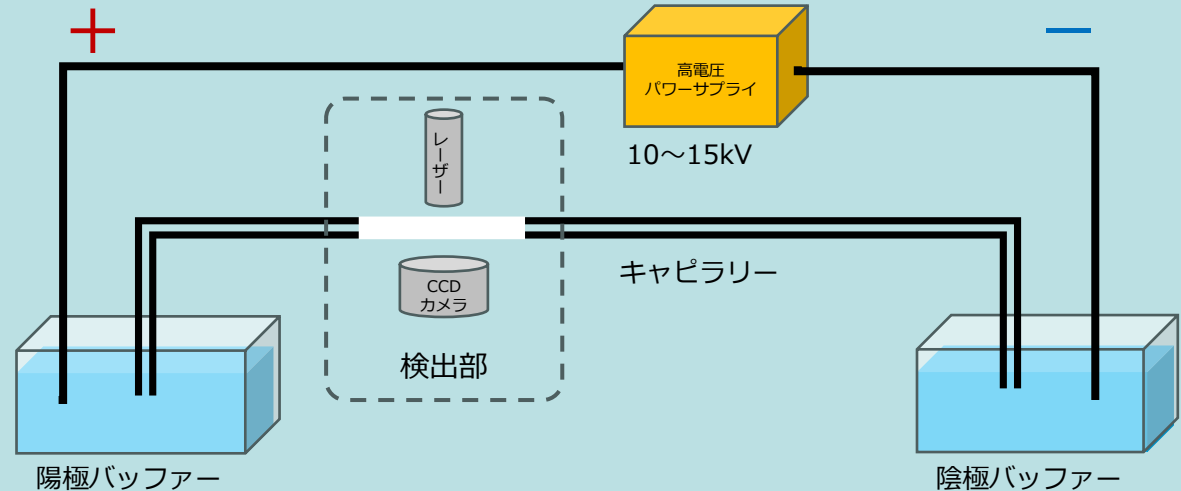
⑤ PCR産物の調整

⑥ 泳動

⑦ 解析

⑥ 泳動

1. キャピラリー電気泳動装置の概要図

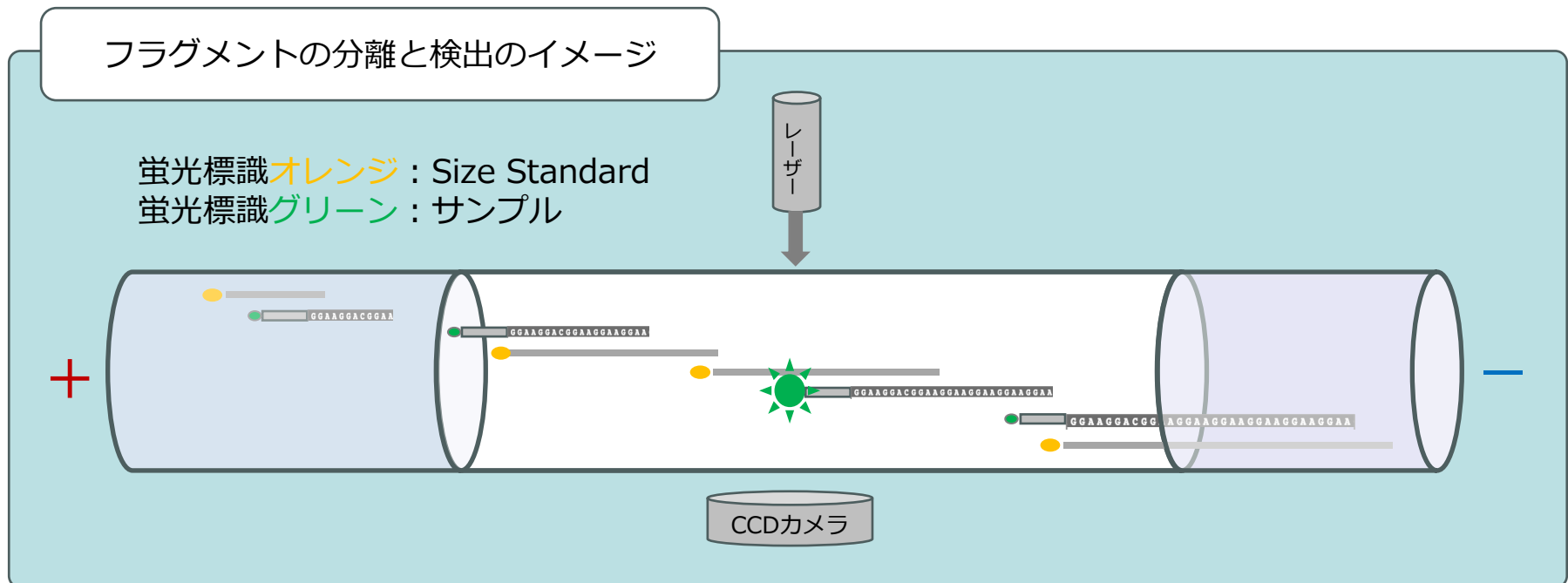


2. PCR産物とSize Standardの泳動と蛍光の検出

PCR産物とSize Standardはキャピラリー内を陰極側から陽極側に向けて移動するポリマーによりフラグメントサイズごとに分離しながら泳動され、レーザーにより励起された蛍光波長をCCDカメラにて検出する

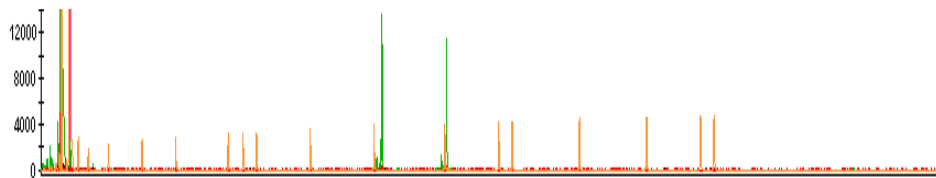
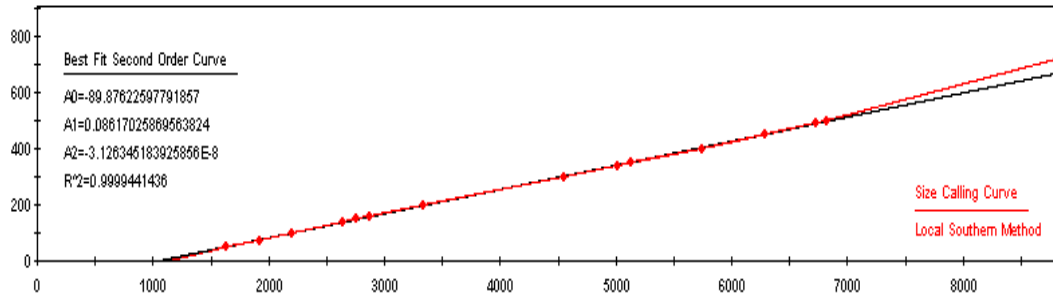
キャピラリー電気泳動の特徴

- ポリアクリルアミドゲル電気泳動と同じ原理である
- キャピラリーとは内径50 μm の細いガラス管である
- キャピラリー内部の流動性のPOP（ポリマー）がネットワーク構造をしており、フラグメントサイズごとに分離しながら泳動する
- 10-15kVの高電圧により陰性に荷電しているDNAを陽極側に泳動する
泳動速度（短いフラグメント > 長いフラグメント）
- プライマーに標識した蛍光色素がレーザーにより励起されCCDカメラにて検出される



蛍光の検出とSizing

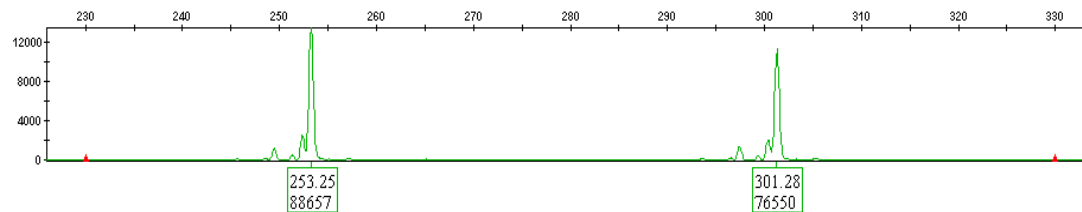
① Size Standardをもとに検量線を作成



オレンジ : Size Standard
グリーン : サンプル

Std 16Fragments : 35,50,75,100,139,150,160,200, (250) ,300,340,350,400,450,490,500

② 検量線に基づき未知のサンプルのフラグメントサイズ (bp) を決定

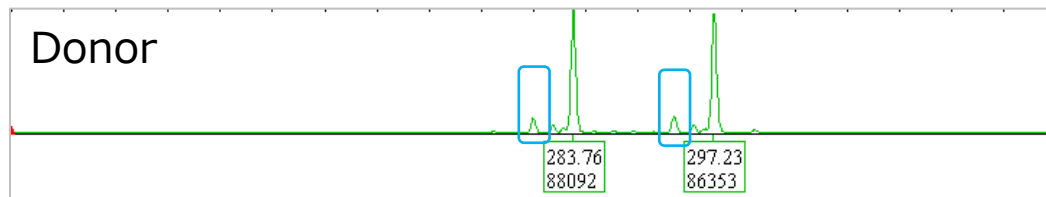


ドナーとレシピエントの比率の計算

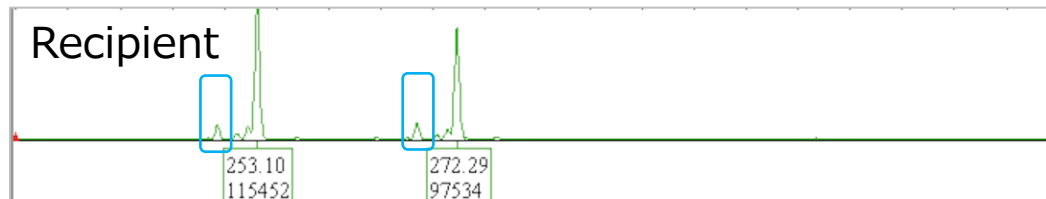
縦軸を相対蛍光強度、横軸は塩基長bpを表す

蛍光の検出で得られた波形の「ピークの高さ」または「面積」を比較して比率の算出を行うが、当院では面積（Area）による算出を行っている

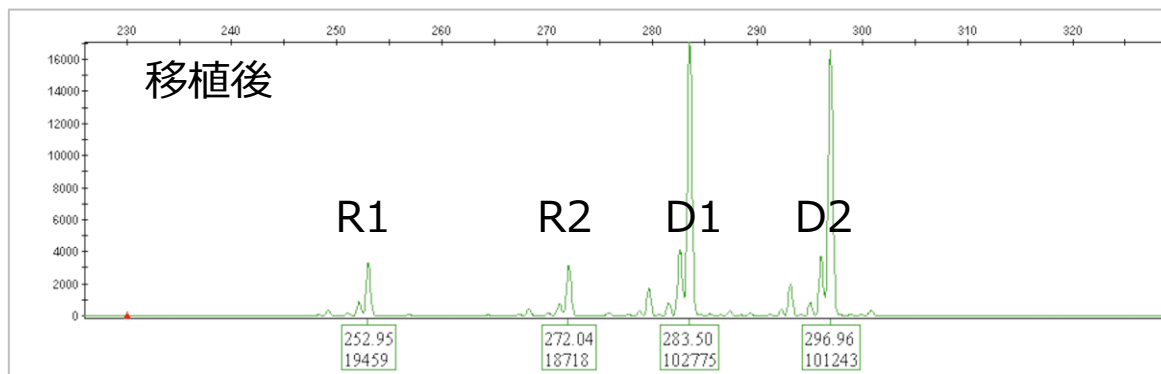
ドナーとレシピエントの識別に用いるSTR座は **Stutter peak** を考慮して選択する



Allele1:283bp Allele2:297bp



Allele1:253bp Allele2:272bp



Donor (%)

$$= \left[\frac{(D1+D2)}{(R1+R2+D1+D2)} \right] \times 100$$

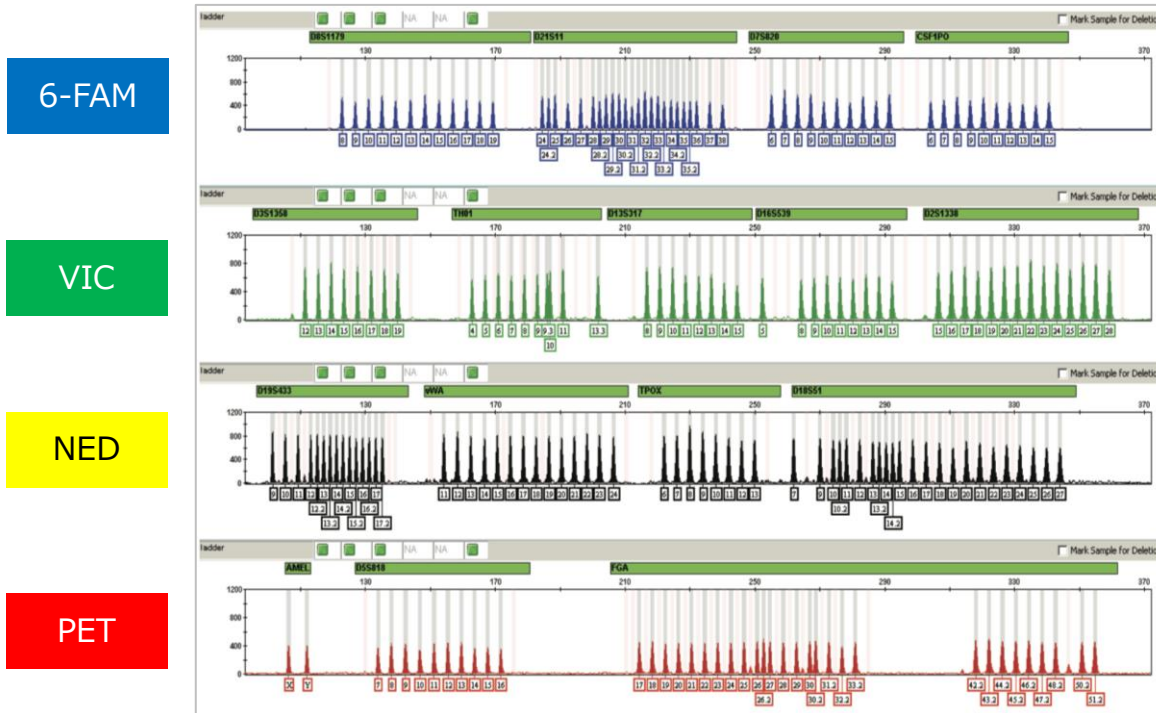
= 84.2%

Multiplex PCR-STR

➤ AmpFISTR Identifiler Plus PCR Amplification Kit

性染色体XYに対するPrimerと常染色体の15STR座のマイクロサテライトを検出できるprimerが混合されており、一度のPCR反応で16箇所のマーカーについて検査できるため高い識別力（日本人4.7兆人に1人の識別力）を有する

波長の異なる複数の蛍光色素により同一のフラグメントサイズでも検査が可能となっている



AmpFISTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification Kit USER GUIDE より引用

個人識別で求められるSTR座の条件

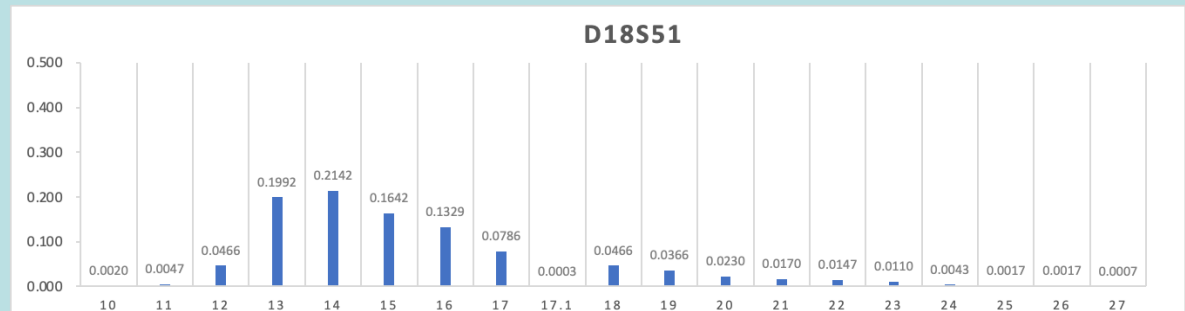
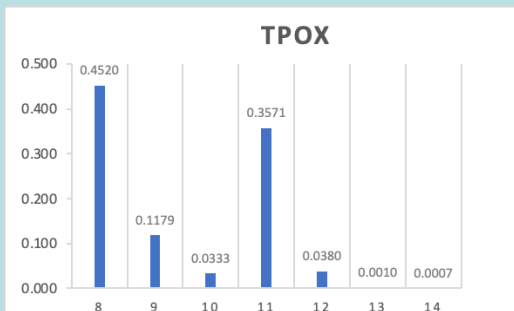
STR座はゲノム中に多数分布しており、反復配列は4塩基 > 5塩基 > 3塩基の順で多いとされているが、個人識別で利用する上である程度の条件が必要である

- ① 多型性に富んでいる (Alleleが多い)
- ② Allele頻度のバラツキが良い
- ③ ヘテロ接合の観察頻度が高い
- ④ 識別に性差が影響しない常染色体に存在する
- ⑤ 特定する人種や集団の識別に適している

同じSTR座でも人種や集団によって観察されるAlleleやその頻度に違いがあるため、個人識別で用いる際には対象とする人種や集団に適したSTR座が望ましい
 ひとつのSTR座では全ての組み合わせを識別できないため、複数のSTR座を組み合わせで検査する

➤ 日本人におけるSTR座TPOXとD18S51のAlleleとAllele Frequency

縦軸 : Allele Frequency
 横軸 : Allele (繰り返し回数)



Allele frequencies for 22 autosomal short tandem repeat loci obtained by PowerPlex Fusion in a sample of 1501 individuals from the Japanese population より作図

1. キメリズム解析とその有用性
2. キメリズム解析の手法
3. STR-PCR法の概要
4. 症例

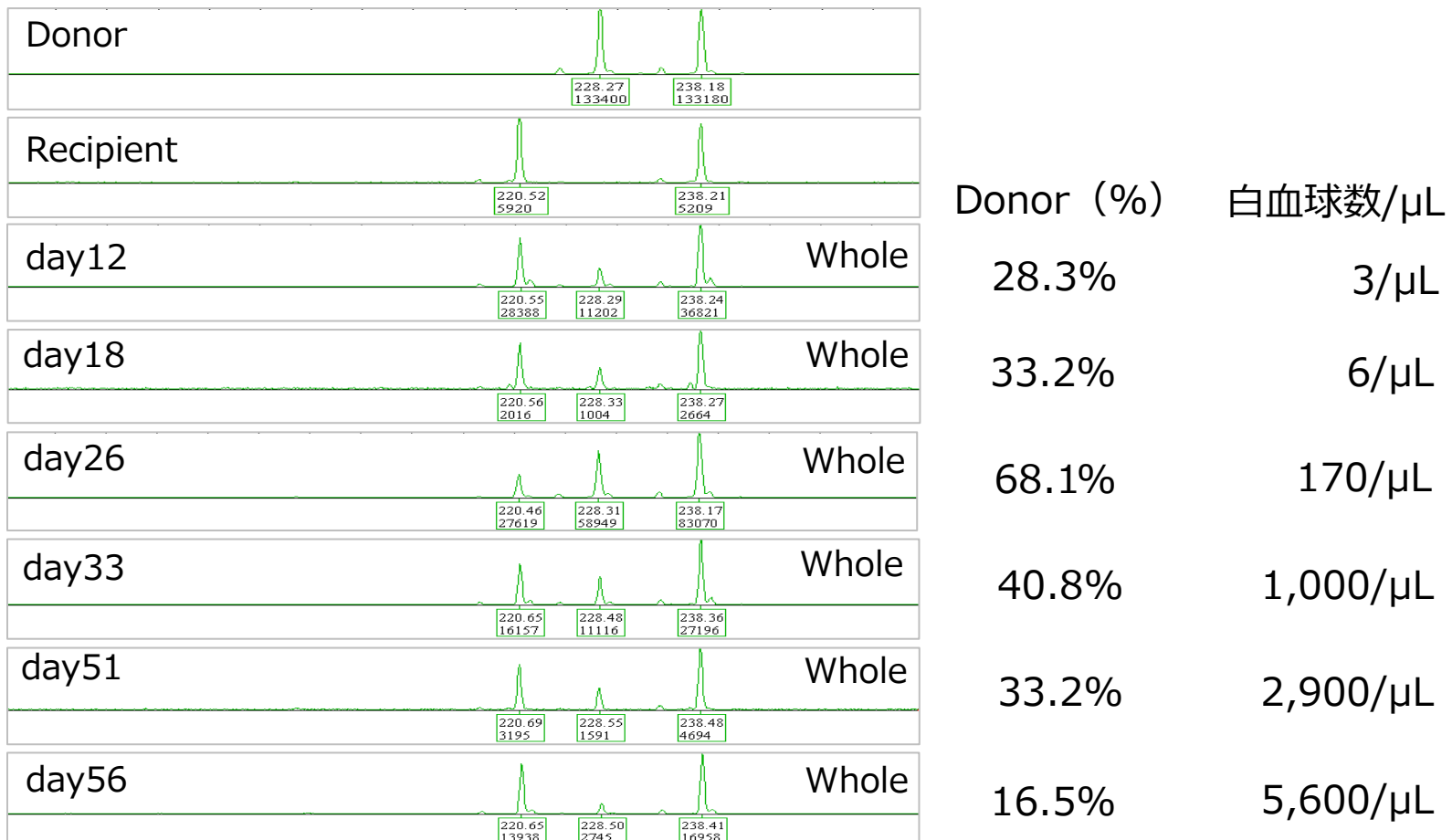
症例1 生着

- 副腎白質ジストロフィー 骨髄移植後
- 生着day16



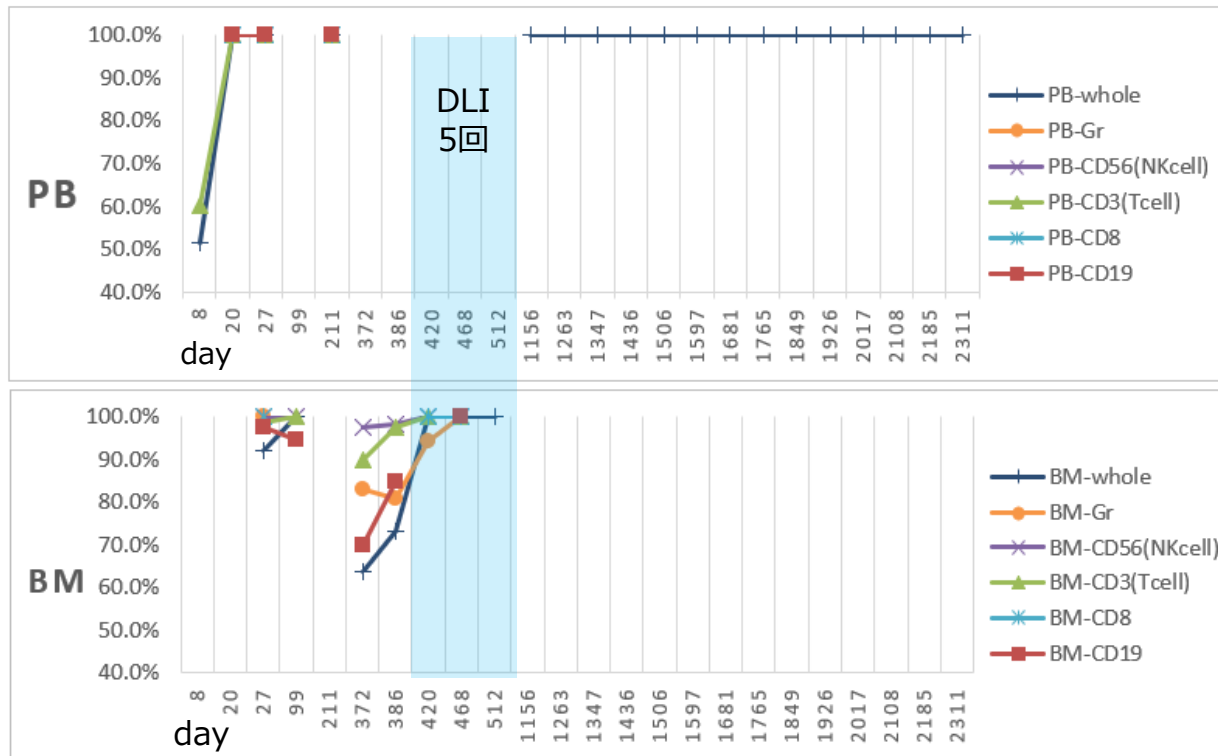
症例2 生着不全

- 骨髓異形成症候群 →肝中心静脈閉塞症／類洞閉塞症候群合併・再発
- 血縁同種末梢血幹細胞移植 抗HLA抗体陽性（DSA陽性）→脱感作実施



症例3 再発後のDLIとキメリズムの推移

- 移植後再発
- レシピエントキメリズムの増加が認められ免疫抑制剤中止
- 化学療法→DLIを実施した症例



DLI (CD3cells/kg)

- ① day421 1.0x10⁶/kg
- ② day442 5.0x10⁶/kg
- ③ day470 5.0x10⁶/kg
- ④ day498 1.0x10⁷/kg
- ⑤ day519 1.0x10⁷/kg

症例4 LOH (Loss of Heterozygosity)

- 再発によるレシピエントキメリズムの増加
- レシピエント由来のAllele1は検出、Allele2がほとんど検出できない
- 染色体検査では各種染色体の異常があり、5番染色体の数的異常 (-5)
- 染色体異常の影響がない別のSTR座によるキメリズム解析にて報告
- 染色体異常の箇所とAlleleの組み合わせによっては、再発していてもレシピエントキメリズムを検出できない場合がある (完全ドナーキメリズムにみえるケースがある)

Primer : ACTBP2 (5番染色体に存在するSTR座)



おわりに

- キメリズム解析は同種造血幹細胞移植後において、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞の比率を求める検査である
- 生着確認、生着不全のモニタリング、再発の評価に利用され、今後の治療方針を決定する上で参考にされている
- 検査法ごとに原理、適応、感度、識別率は異なる

「今後の輸血・細胞治療検査室のあり方を考える」

- XY-FISH以外は保険適応で検査することができないことが課題である
- 院内の実施施設は少なく、外注する場合は報告時間（4-6日）を要する
- 市販のキットも存在するが比較的高価である
- 標準化への課題もあり、施設間差は不明である
- 国内に外部精度管理などが無い、客観的な評価を受けるのが望ましい