

Plerixafor併用患者のCD34弱陽性領域出現細胞に関する検討

竹ノ内博之

Investigation of CD34 weakly positive predictive region appearing cells in patients using plerixafor

Hiroyuki TAKENOUCHI

要旨

造血幹細胞動員薬である plerixaforは、顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) と併用し、造血幹細胞の末梢への誘導を促進する目的で使用している。Plerixafor併用症例では末梢血幹細胞採取時に行うフローサイトメーターを用いた CD34陽性細胞測定時に、CD34弱陽性領域に細胞集団を認めることが多く、造血幹細胞以外の細胞の出現が疑われた。そこで、末梢血幹細胞採取患者を G-CSF単独投与群と plerixafor併用投与群に分け比較検討を行ったところ、plerixafor併用投与群では CD34弱陽性細胞の有意な増加を認め($p<0.01$)、CD34弱陽性細胞集団が plerixaforにより末梢へ動員された2型樹状細胞の前駆細胞(progenitor dendritic cell type 2 ; proDC2)であることを明らかにした。Plerixafor併用症例の採取日の決定及び採取した造血幹細胞数の評価には、適切な CD34ゲーティングによる CD34陽性細胞数測定を行う必要があると考えられる。

Abstract

Plerixafor, a hematopoietic stem cell (HSC) mobilizing agent, is used in combination with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) to promote peripheral induction of HSCs. In patients treated with plerixafor, CD34 positive cells were often detected in the CD34 weakly positive region when CD34 positive cells were measured using a flow cytometer at the time of peripheral blood stem cell harvest (PBSCH), suggesting the presence of cells other than HSCs. We compared the results of the G-CSF alone and plerixafor-treated groups and found a significant increase in CD34 weakly positive cells in the plerixafor group ($P<0.01$), indicating that CD34 weakly positive cells, characterized as progenitor dendritic cell type 2 (proDC2), were mobilized to the periphery by plerixafor. It would be necessary to measure the number of CD34 positive cells by appropriate CD34 gating to determine the collection date and evaluate the number of HSCs collected in patients treated with plerixafor.

キーワード : plerixafor, CD34 陽性細胞, 末梢血造血幹細胞採取, proDC2

Key words : plerixafor, CD34⁺cell, peripheral blood stem cell harvest (PBSCH), proDC2

1. 緒言

造血幹細胞は CD34 抗原を強発現しており、全ての成熟血液細胞への分化能と自己増殖能を有した細胞で、成人では造血の場である骨髄中に存在している。末梢血幹細胞移植では造血幹細胞を十分量採取する事が重要であり、移植に必要な CD34 陽性細胞数は、患者の体重当り $2 \sim 3 \times 10^6/\text{kg}$ とされている。末梢血中への造血幹細胞の動員促進薬として、一般的には顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor ; G-CSF) 製剤を用いるが、自己末梢血幹細胞採取患者の一部に G-CSF 単独での動員不良例が存在する。このような中、2017 年に CXC ケモカイン受容体 4 (CXCR4) 拮抗薬である plerixafor が認可され、自己末梢血幹細胞採取患者の G-CSF 単独での動員不良例や、アフエレーシス回数削減目的で使用されている。Plerixafor は造血幹細胞が発現している CXCR4 と可逆的に結合し、骨髄間質細胞が産生する SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1 ; CXCL12) と CXCR4 との結合を阻害することで、造血幹細胞の骨髄から末梢血中への細胞動員を促進すると考えられている^{1) 2)}。

末梢血幹細胞の採取時期は、G-CSF 投与開始後 4 ~ 5 日目の朝に採血した検体で末梢血中の白血球数と CD34 陽性細胞の絶対数を測定し決定する。末梢血中の CD34 陽性細胞は非常に少ないため、フローサイトメーターを用いて測定する。国内での CD34 陽性細胞の測定法は、日本臨床検査標準協議会 (Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards ; JCCLS) が ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) ガイドラインに準じて作成した「フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLS—H3-A V2.0)」の中で、シングルプラットフォーム法での測定を推奨している³⁾。シングルプラットフォーム法は、総粒子数が既知のラテックス粒子を添加したサンプル調製チューブにサンプルと蛍光色素標識抗体試薬を加え、フローサイトメーターで測定する際にラテックス粒子を含んだサンプルを吸引・測定し、検出したラテックス粒子の数値から 1 マイクロリットル当たりの細胞数を算出する方法である。臨床現場で CD34 陽性細胞を測定する際は、キット化された試薬と専用の解析ソフトウェアを使用して CD34 陽性細胞の絶対数を算出する事が一般的である。専用ソフトでのフローサイトメトリー解析は、細胞分布から CD45 弱陽性かつ CD34 陽性の造血幹細胞領域を自動でゲーティングし算出した数を CD34 陽性細胞絶対数として報告している。

表 1. 患者背景

	G群	P+G群
症例数	21	20
年齢 (範囲)	53 (21-69)	62 (51-72)
体重 (範囲)	62 (44-98)	59 (40-95)
男性	13	12
女性	8	8
疾患 (化学療法の有無)		
悪性リンパ腫 (あり)	14	8
悪性リンパ腫 (なし)	0	1
多発性骨髄腫 (あり)	0	1
多発性骨髄腫 (なし)	7	9
急性前骨髄球性白血病 (あり)	0	1

動員促進剤に plerixafor を併用した自己末梢血細胞採取患者では、フローサイトメトリー解析時に CD34 弱陽性領域に細胞集団を認めることがある^{4) 5)}。解析時、専用ソフトによる通常のオートゲーティングでは CD34 弱陽性領域の細胞集団を含む CD34 陽性細胞数を算出しているが、この細胞集団が造血幹細胞以外の細胞である場合、算出した CD34 陽性細胞数が検査目的である造血幹細胞数を正しく反映していない事となる。

これまでに、Schroeder らは plerixafor を投与すると CD34 抗原を弱発現する幼若な樹状細胞 (proDC2 : progenitor dendritic cell type 2) が血中に増加することを報告しており^{4) 5)}、その他にも NK 細胞が増加するとの報告もある⁶⁾。しかし、plerixafor 投与により血中に増加するこれらの細胞が CD34 陽性細胞数測定にどの程度影響するのかを調べた報告はこれまでにない。

そこで今回、plerixafor 併用患者検体を用いて CD34 弱陽性領域の細胞集団について解析し、plerixafor 併用患者での造血幹細胞数測定への影響と、CD34 陽性細胞解析時の問題点について考察を行った。

2. 対象および方法

1) 対象症例

2017 年 4 月から 2020 年 7 月までに宮崎大学医学部附属病院で自己末梢血幹細胞採取を行った 20 歳以上の患者 41 例を対象とした。化学療法と動員促進薬の併用が 24 症例、動員促進薬のみで採取を行った症例が 17 症例であった。対象患者は、動員促進薬として G-CSF 単剤で使用した症例 (G 群) と、G-CSF と plerixafor を併用

表 2. フローサイトメトリー解析に使用した抗体一覧

A. CD34陽性細胞測定

抗体名	蛍光色素	Clone	Isotype
CD45	FITC	2D1	Mouse IgG ₁ , kappa
CD34	PE	8G12	Mouse IgG ₁ , kappa

B. proDC2フローサイトメトリー解析

抗体名	蛍光色素	Clone	Isotype
CD45RA	FITC	L48	Mouse IgG ₁ , kappa
CD34	PE	563	Mouse IgG ₁ , kappa
CD123 (IL-3R)	PE-Cy7	7G3	Mouse IgG ₂ , kappa

A. CD34陽性細胞数の測定はキット (BD Stem Cell Enumeration Kit) を使用し、キット同封の抗体カクテル試薬 (BD Stem Cell Reagent;CD45-FITC+CD34-PE) で検体中のCD34陽性造血幹細胞 (CD45^{dim}CD34⁺) をシングルプラットフォーム法で測定した。B. Plerixafor 併用患者の検体でCD34陽性領域に出現する細胞をCD45RA,CD34,CD123抗体試薬で解析し、特にCD34弱陽性領域に出現する細胞集団について解析を行った

した症例 (P+G 群) に分けて比較を行った。

採取時の年齢の中央値は P+G 群が 62 歳、G 群が 53 歳であった。対象の疾患は P+G 群は悪性リンパ腫が 9 症例、多発性骨髄腫が 10 症例、急性前骨髄球性白血病が 1 症例であった。一方 G 群は悪性リンパ腫が 14 症例、多発性骨髄腫が 7 症例であった (表 1)。

採取スケジュールは、G-CSF 投与 4 日目に末梢血中の CD34 陽性細胞数を測定し、主治医の判断で採取を決定した。G-CSF のみでは採取困難であると判断された動員不良症例に対し plerixafor が投与された。

細胞採取に用いた血液成分採取装置は、2018 年 5 月までは COBE Spectra (Terumo BCT) を、2018 年 6 月からは Spectra Optia (Terumo BCT) を使用した。

本研究は宮崎大学医学部附属病院の倫理委員会より承認下実施した (承認番号: O-0452)。

2) 検体

検体は採取 1 日目の幹細胞採取直前に採血した末梢血と、採取バッグの残余検体を使用した。細胞表面抗原の測定には BD FACSCanto II (BD Biosciences 社) を使用した。

3) CD34陽性細胞測定

CD34 陽性細胞の測定は、Stem Cell Enumeration キット (BD Biosciences 社) を使用した。対象検体は有核細胞数が 1000/ μ L 以下になるように PBS で調製し、キット同封の蛍光 beads 添加 Tube (BD Trucount

Tube) に検体 100 μ L を加え、CD45-FITC (2D1) と CD34-PE (8G12) のカクテル試薬 (BD Stem Cell Reagent) と 7-AAD をそれぞれ 20 μ L 添加し、混和後室温暗所で 20 分反応した (表 2A)。反応後、塩化アンモニウム系溶血剤 (1x BD Pharm Lyse lysing buffer) を 2mL 加え、室温暗所 15 分反応後に測定した。CD34 陽性細胞の測定・および解析は、BD FACSCanto Clinical Software を使用した。

4) proDC2フローサイトメトリー解析

proDC2 解析は Schroeder らの報告を参考に行った⁴⁾。有核細胞数が 1000/ μ L 以下になるように PBS で調製した対象検体に CD34-PE (563)、CD45RA-FITC (L48)、CD123 (7G3) (すべて BD Biosciences 社) を 20 μ L ずつ添加し、混和後室温暗所で 30 分反応した (表 2B)。反応後、塩化アンモニウム系溶血剤 (1x BD Pharm Lyse lysing buffer) を 2mL 加え、室温暗所 15 分反応後に BD FACSCanto Diva Software で測定した。測定結果の解析は FlowJo (Tree Star 社) を使用した。

5) 統計

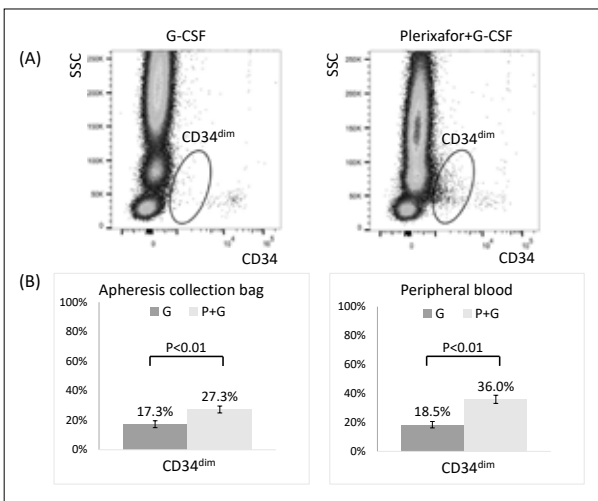
各群の測定結果はエクセル統計ソフトを使用して平均値 \pm 標準偏差で示し、2 群のデータは両側 Student's t-test で検定した。また、有意水準を 5% とした。

3. 結果

1) CD34弱陽性 (CD34^{dim}) 領域の解析

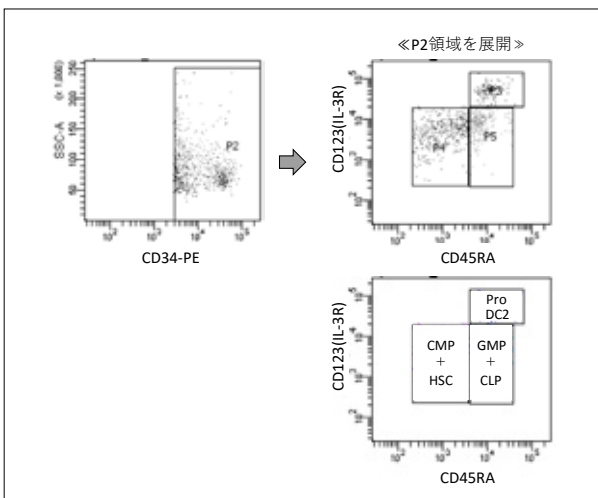
フローサイトメーターを用いた CD34 陽性細胞の解析により, plerixafor を使用した症例の多くに, CD34^{dim} 領域に細胞集団の出現を認めた (図 1A). G 群と P+G 群の CD34 陽性細胞中の CD34 弱陽性細胞の割合を比較

図 1 造血幹細胞動員剤の違いによる CD34 弱陽性領域 (CD34^{dim}) 出現細胞の比較



(A) Plerixafor+G-CSF 併用投与群では CD34 弱陽性細胞集団の出現を認める。(B) Plerixafor+G-CSF 併用投与群 (P+G) は採取バッグ・末梢血ともに G-CSF 単独投与群 (G) と比べ CD34 弱陽性細胞集団が有意に増加していた (P<0.01).

図 2 proDC2 解析



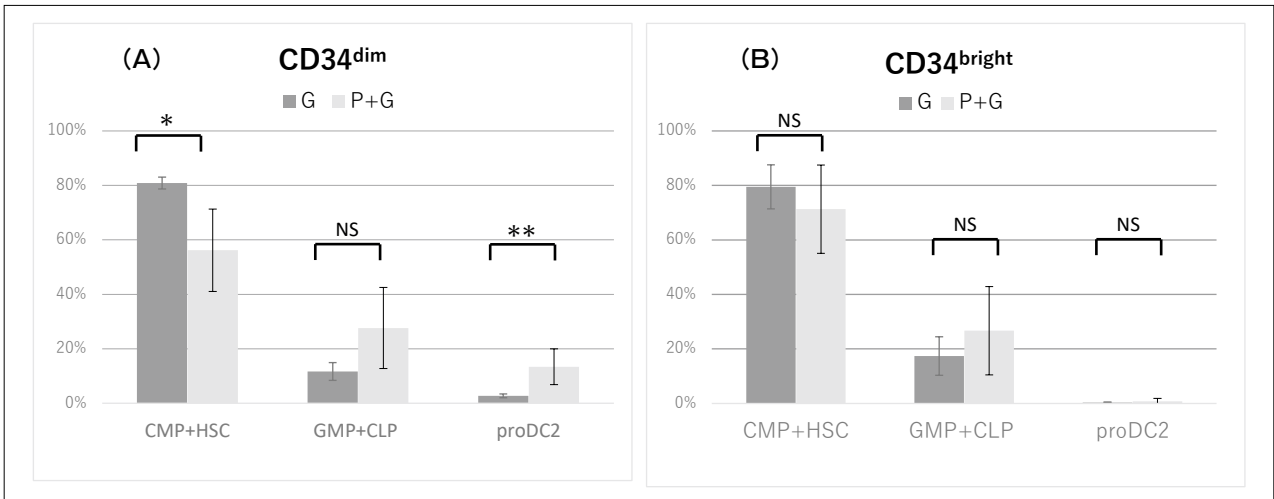
Plerixafor 併用患者の採取バッグを検体に, CD34 陽性領域 (P2) を CD45RA と CD123 (IL-3R) で展開すると, CD34+CD45RA+CD123⁺⁺ 領域 (P3), CD34⁺CD45RA⁻CD123⁺⁺ 領域 (P5), CD34+CD45RA-CD123^{+/+} 領域 (P4) の 3 領域に分類され, それぞれ異なる細胞集団が出現する. proDC2, progenitor dendritic cell type 2; CMP, common myeloid progenitors; HSC, hematopoietic stem cell; GMP, granulocyte/macrophage progenitors; CLP, common lymphoid progenitors

したところ, 末梢血は G 群 17.3 ± 10.4% に対して P+G 群が 27.3 ± 10.6%, 採取バッグ検体では G 群 18.5 ± 10.0% に対して P+G 群が 36.0 ± 12.6% と, 共に G 群と比べ P+G 群の CD34 弱陽性細胞が増加していた (p < 0.01) (図 1B).

2) proDC2フローサイトメトリー解析

Plerixafor 併用患者で増加を認めた CD34 弱陽性細胞集団の解析のため, Blom らの報告に沿い^{7) 8)} proDC2 細胞が強発現している CD45RA と CD123 (IL-3R) に対する抗体を含む蛍光標識モノクローナル抗体試薬のカクテルチューブを準備し, 採取バッグ検体の proDC2 解析を行った. CD34 細胞集団を CD45RA と CD123 で展開すると 3 つの細胞集団に分類でき⁴⁾, 骨髄系前駆細胞 (common myeloid progenitors ; CMP) と造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell ; HSC) が CD34⁺CD45RA⁻CD123^{+/+} 領域に出現し, CD34⁺CD45RA⁺CD123^{+/+} 領域には幼若な顆粒球/巨核球前駆細胞 (granulocyte/macrophage progenitors ; GMP) とリンパ系前駆細胞 (common lymphoid progenitors ; CLP), CD34⁺CD45RA⁺CD123⁺⁺ 領域に proDC2 細胞が出現する (図 2). 今回の解析では CD34 陽性領域を, CD34 弱陽性領域を含む領域でゲーティングした CD34^{dim} と CD34 弱陽性領域を含まない CD34^{bright} に分けて, ゲート位置の違いによる出現する細胞集団の違いを G 群および P+G 群それぞれで調べた. 結果, CD34 弱陽性領域を含む CD34^{dim} ゲートでは, proDC2 領域 (CD34⁺CD45RA⁺CD123⁺⁺) の割合が G 群の 2.7 ± 0.6% に対し P + G 群では 13.4 ± 6.5% であり, proDC2 細胞の出現割合に有意な差を認めた (p < 0.01). 一方, 造血幹細胞を含む CMP+HSC 領域 (CD34⁺CD45RA⁻CD123^{+/+}) では, G 群の方が高い割合となっていた (図 3A). CD34^{bright} ゲートでは, P+G 群の proDC2 が G 群との差が無い事から, CD34 強陽性領域に proDC2 はほとんど含まれていない事が確認できた (図 3B). また, CD34 弱陽性領域を含まない CD34^{bright} ゲートでは proDC2 以外の 2 領域でも差を認めなかった同一サンプルについて, CD34 ゲートの位置を変え CD34 陽性領域の割合を変化させて proDC2 を展開したところ, CD34^{dim} 領域を含む割合の増加とともに proDC2 細胞が増加しており, proDC2 は CD34^{dim} 領域に多く出現することが明らかになった (図 4).

図3 Plerixafor 併用患者検体と C-CSF 単剤使用検体での CD34 弱陽性領域の proDC2 解析の比較



患者検体の CD34 陽性領域 (P2) のゲート位置を CD34 弱陽性を含む CD34^{dim} と、P2 に CD34 弱陽性領域を含まない CD34^{bright} に分け、proDC2 解析での出現細胞数を P+G 群と G 群で比較した。(A) CD34 弱陽性細胞を含む場合は、P+G 群での proDC2 細胞の有意な増加を認めた。(B) CD34 強陽性細胞のみの場合、proDC2 細胞の出現数に 2 群間で差を認めなかった。
 **は p<0.01、*は p<0.05 の p 値を示す、NS: Not Significant

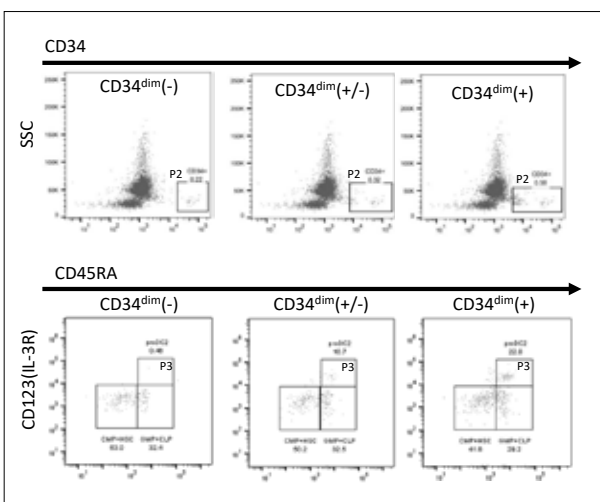
4. 考察

Plerixafor を投与した同種末梢血幹細胞移植ドナーでは、採取した細胞集団中に CXCR4 を高発現している proDC2 が多く動員されるとの報告があり⁴⁾、proDC2 が骨髓から末梢血に動員される機序は、造血幹細胞と同様と考えられる。今回の調査により、plerixafor を投与した自己末梢血幹細胞採取症例で、CD34 弱陽性領域に

増加を認めた細胞集団は、CD34⁺CD45RA⁺CD123⁺⁺ の proDC2 を多く含む細胞であることが確認できた。

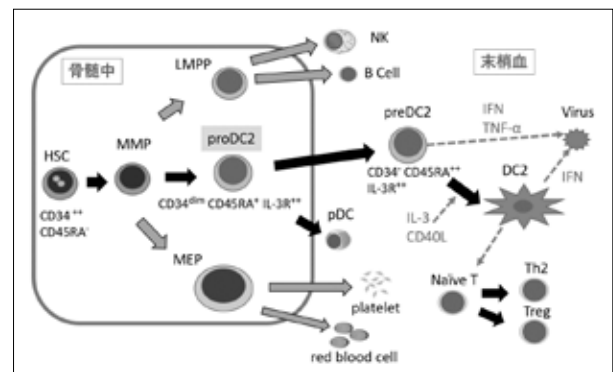
proDC2 は形質細胞様樹状細胞や 2 型樹状細胞に分化する細胞である (図 5)^{4) 7) 8)}。2 型樹状細胞は Th2 細胞の分化を促し、ウイルス感染に対し各種サイトカインを放出するなどの機能を有しておる。Plerixafor の承認前臨床研究では、G-CSF 単独群と plerixafor 併用群に生着率や生着までの期間に差は無かったと報告されているが⁹⁾、plerixafor 併用による proDC2 細胞を含む造血幹細胞移植は、移植後のウイルス感染症の重症化予防など、レシピエントの生体防御に良い影響があることが予想される。実際、CMV 感染に対して有効に働くとの報告も

図4 Plerixafor 併用患者検体での CD34^{dim} 領域の proDC2 解析



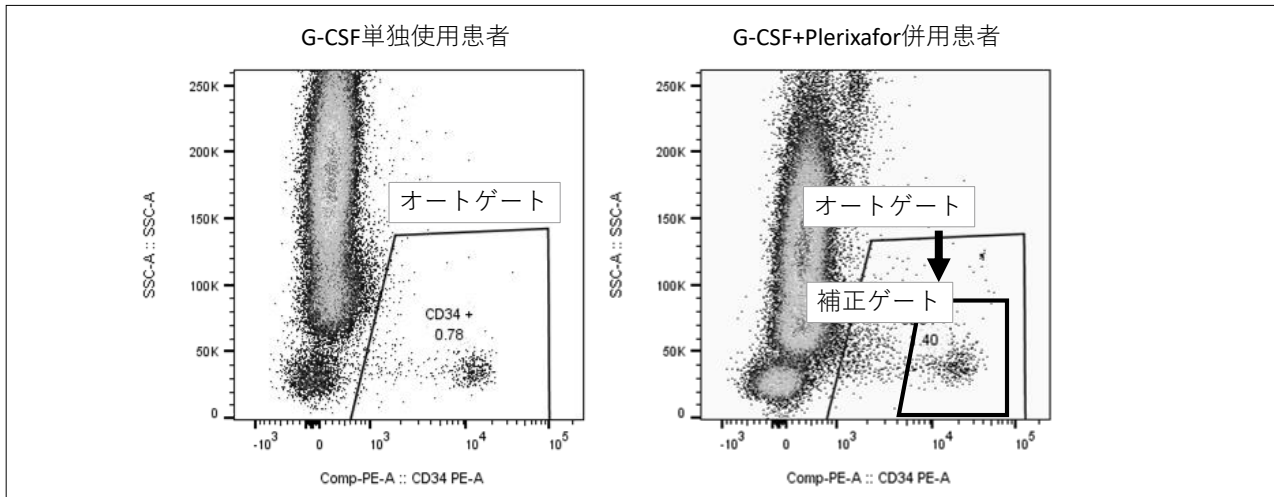
Plerixafor 併用患者検体の CD34 陽性領域 (P2) のゲート位置を、CD34 弱陽性領域を含まない CD34^{dim}(-) と CD34 弱陽性領域を含む CD34^{dim}(+)、中間の CD34^{dim}(+/-) に分け、それぞれについて proDC2 解析を行うと、proDC2 (P3) エリアの出現細胞の割合が CD34^{dim}(+) では CD34 弱陽性領域に比べて多く認めた。

図5. proDC2; progenitor dendritic cell type 2 の分化



proDC2 は末梢でインターフェロン産生能を有する preDC2 を経て、2 型樹状細胞 (DC2) へ分化する。HSC, hematopoietic stem cell; MMP, multipotent progenitor; LMPP, lymphoid primed MPP; MEP, megakaryocyte/erythroid progenitor; pDC, plasma-cytopid dendritic cell

図 6. Plerixafor 併用時の CD34 陽性細胞解析上の注意点



BD FACSCant II の解析ソフトでは CD34 陽性領域をオートゲーティングし、CD34 陽性細胞の絶対数の自動計算を行う。一方、末梢血幹細胞採取時の細胞動員薬に plerixafor を併用した患者では、CD34 弱陽性領域を含まないように CD34 陽性領域を手動補正する事で、正確な造血幹細胞数を算出する事ができる。

あるが⁴⁾、それ以降報告がない事から今後の検討が必要であると考えられる。

CD34 陽性細胞測定に関する JCCLS のガイドラインでは、CD34 弱陽性細胞は赤芽球系や顆粒球系の細胞、非特異反応産物が含まれるため注意が必要とされている³⁾。一方、plerixafor 併用症例では proDC2 細胞を含む前駆細胞が CD34^{dim} 領域に増える事が多く、CD34^{dim} と CD34^{bright} との境界線が不明瞭となる症例が増える事にも注意が必要となり適切な CD34 ゲーティングが必要である (図 6)。

近年、自動血球分析装置を用いた造血前駆細胞 (Hematopoietic Progenitor cell; HPC) の測定のみで採取タイミングを決定する試みが検討されているが^{10) 11)}、plerixafor 併用患者では造血幹細胞と異なる系統の細胞が出現する事から、plerixafor 併用患者での HPC 測定による採取タイミング決定について今後検討する必要性が有る。

今回の検討により、自己末梢血幹細胞採取患者では動員薬に関する患者情報収集の重要性や、フローサイトメトリー解析時の CD34 陽性領域の的確なゲーティングの重要性が再認識された。CD34 陽性細胞測定は幹細胞採取タイミングの決定や、生着に必要な造血幹細胞数算定など、自己末梢血幹細胞移植患者の移植成績に直接影響する検査項目であり、今後も検査に関する正しい知識や技術向上が必要であると思われた。

5. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、造血幹細胞移植医療に関するご指導ご協力を頂いた久富木庸子医師並びに、測定データ収集に協力頂いた稲田直樹氏に心から感謝するとともに厚く御礼を申し上げます。

6. 文献

- 1) Fricker PS: Physiology and pharmacology of plerixafor. *Transfus Med Hemoth-er.*40:237-245, 2013.
- 2) 中山享之: CXCR4 阻害剤 (プレリキサファー) による造血幹細胞の動員. *日本臨床 (増刊 10)*: 531 - 536, 2016.
- 3) 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS) 血液検査標準化検討委員会フローサイトメトリーワーキンググループ: フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLS H3-A V2.0) .
- 4) Schroeder MA, Rettig MP, Lopez S, et al: Mobilization of allogeneic peripheral blood stem cell donors with intravenous plerixafor mobilizes a unique graft. *Blood.*129 (10) :2680-2692,2017.
- 5) Rettig PR, McFarland K, Ritchey J, et al: Preferential Mobilization of CD34+ Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors by Plerixafor. *Blood.* 114 (22) : 32,2009.
- 6) Wong PCP, Karimina A, Jones D, et al: Plerixafor effectively mobilizes CD56bright NK cells in blood,

- providing an allograft predicted to protect against GVHD. *Blood*.131 (25) : 2863-2866, 2018
- 7) Blom B, Ho S, Antonenko S, al.: Generation of Interferon α -producing Pre-dendritic Cell (Pre-DC) 2 from Human CD34+ Hematopoietic Stem Cells. *J. Exp. Med* 192:1785-1795, 2000.
 - 8) Blom B, Ligthart JWCS, Schotte R, et al.: Developmental Origin of Pre-DC2. *Human Immunology* 63:1072-1080, 2002.
 - 9) サノフィ株式会社: CXCR4 拮抗薬モゾビル® 皮下注 24mg インタビューフォーム, 2017 年 8 月改訂 (第 4 版)
 - 10) Tanaka H, Ishii A, Sugita Y, et al: Impact of Hematopoietic Progenitor Cell Count as an Indicator for Optimal Timing of Peripheral Stem Cell Harvest in Clinical Practice. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*. 56 (3) :150-159,2017.
 - 11) 水村真也, 吉井真司, 水村麻衣子, 他: 末梢血幹細胞採取における Hemato-poietic Progenitor cell (HPC) 測定の有用性. *日本輸血細胞治療学会誌* 64 (1) :50-58,2018.