

臍帶血移植に関する基礎的・ 臨床的研究

「免疫・アレルギー等研究事業」臓器移植部門研究報告

【斉藤班】臍帯血移植に関する基礎的・臨床的研究

総括研究報告

主任研究者 …… 齋藤 英彦 名古屋大学医学部 197
第一内科教授

分担研究報告

〔テーマ1〕臍帯血の生物学的・免疫学的特性と幹細胞

- 1-1 臍帯血の免疫学的特性に関する研究 …… 奥村 康 順天堂大学医学部 209
免疫学の教室教授
- 1-2 臍帯血の生物学的特性に関する研究 …… 高橋 恒夫 東京大学医科学研究所 214
—ヒト臍帯血T細胞のケモカインレセプター及び
補体レセプターの発現と遊走能—
細胞プロセッシング部門教授
- 1-3 成人臍帯血移植と幹細胞増幅に関する …… 原 宏 兵庫医科大学 217
研究— 1. 近畿臍帯血バンクの現状とその
移植成績、2. 臍帯血のex vivo expansion
とplatelet formation(PPF)からみた
血小板産生—

〔テーマ2〕臍帯血移植における免疫応答及び免疫回復

- 2-1 移植後免疫不全に関する研究 …… 齋藤 英彦 名古屋大学医学部 222
①臍帯血移植におけるヘルペスウイルス感染症の
重症化とそのモニタリングに関する研究
②マウスDeltalの骨髄細胞の分化に及ぼす
影響
- 2-2 臍帯血移植とHLAに関する研究 …… 猪子 英俊 東海大学分子生命科学系 227
—HLA-DQ遺伝子の多型性解析に関する研究—
遺伝情報部門教授
- 2-3 移植後免疫学的再編成に関する研究 …… 直江 知樹 名古屋大学医学部 232
難治感染症部助教授

〔テーマ3〕臍帯血移植の臨床研究

- 3-1 小児臍帯血移植の成績向上のための要因 …… 加藤 剛二 名古屋第一赤十字病院 237
に関する研究 小児科副部長
- 3-2 小児臍帯血移植の臨床評価と適応に関する …… 加藤 俊一 東海大学医学部 241
研究 助教授
- 3-3 臍帯血バンクのあり方に関する研究 …… 西平 浩一 神奈川県大和保健所 247
—臍帯血バンクを利用した臍帯血移植の
臨床的研究— 所長

厚生科学研究費補助金 (感覚器障害および免疫・アレルギー等研究事業)

総括研究報告書

臍帯血移植に関する基礎的・臨床的研究

主任研究者 齋藤英彦 (名古屋大学医学部第一内科)

研究要旨 わが国において、非血縁臍帯血移植は99年11月30日までに、165件を数えるに至った。全国さい帯血ネットワークも発足し、非血縁臍帯血移植の社会基盤の整備はかなり整いつつある。これまでの非血縁者間臍帯血移植では非血縁者間骨髄移植と遜色ない成績が得られた。予後因子として患者リスク、移植細胞数、年齢が重要で、非血縁骨髄移植と異なり HLA 一致度は GVHD や予後に影響を及ぼさなかった。しかし、感染症の合併や非腫瘍性疾患における生着不全が問題であった。臍帯血の幹細胞・免疫担当細胞は、成人骨髄や末梢血のそれとは質的に異なり、機能的に未熟であることが明らかになってきた。臍帯血幹細胞の増幅技術は着実に進歩しており、実用化のための安全性が確認中である。

研究組織

齋藤英彦 名古屋大学医学部第一内科
猪子英俊 東海大学医学部分子生命科学
奥村 康 順天堂大学医学部免疫学
加藤剛二 名古屋第一赤十字病院小児科
加藤俊一 東海大学医学部小児科
高橋恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング部門
直江知樹 名古屋大学医学部難治感染症部
西平浩一 大和保健所
原 宏 兵庫医科大学輸血部

を行う。小児での成績向上と成人への適応拡大を目指して、臍帯血幹細胞の増幅を試みる。

3) 臍帯血中の免疫担当細胞の免疫学的・生物学的特性を明らかにし、移植後の免疫機能回復のプロセス・メカニズムについて研究する。また免疫未熟状態からの早期臍帯血のため、ウイルス感染症や白血病に対する免疫誘導を *in vitro* において試み、さらに患者への輸注効果を検討する。

A. 研究目的

1) 臍帯血移植の適応を確立し成績向上を図るため、臍帯血バンクとそれらを結ぶネットワークの一層の充実を図り、臍帯血移植に関するデータバンクを充実させ、移植成績の科学的評価と Quality Control を行う。
2) 生着不全と GVHD は臍帯血移植でも最も重要な合併症である。HLA 抗原と臍帯血移植成績の関連を解析し、臍帯血移植での生着不全・GVHD 発症に関するメカニズムの解明とその臨床的制御について研究

B. 研究方法

1) 臍帯血バンク間のネットワークと相互利用システムの一層の充実を図るため、各臍帯血バンク間での臍帯血保存手順の統一化を図り、各バンクでの臍帯血情報をインターネットを利用して、移植施設に公開する。臍帯血移植に関するデータバンクを充実させ、移植成績の評価と Quality Control を行う。症例背景をそろえた matched-pair analysis を、HLA 不一致血縁者間移植や非血縁者間骨髄移植との間で行い、

臍帯血移植の臨床的特徴を解析する。

2) 現在の非血縁者間骨髄移植での HLA 適合性の解析を、将来、症例が充分増えた段階で、臍帯血でも行うことが重要と考えられるので、患者とドナーの HLA に関し DNA レベルの検査を進め、HLA 不一致度と GVHD の発症や GVL 効果に関する解析のためのデータベースを作成する。minor 組織適合抗原についても HLA 同様の検査を進める。

3) これまでの臍帯血移植の成績から、非腫瘍性疾患に対する生着不全が多いことが指摘されている。移植前処置として国内での臍帯血移植では統一された前処置は行われておらず、ATG の有用性についても議論がわかれている。至適移植前処置について検討するため、移植前の TBI や ATG の使用について臨床的検討を行う。

4) 移植後の血液学的回復の遅延の問題については、回復に影響する臍帯血側の要因を解析し、G-CSF の至適用法や臍帯血解凍における洗浄の必要性など臨床における改善点について検討する。GVH 予防のため骨髄移植と同様の MTX+CsA を用いることが多いが、欧米では回復遅延の原因になるとの理由で Steroid+CsA あるいは ATG が一般的である。またこれまで臍帯血移植においては FK506 は試みられていないので、これを含めて臍帯血移植における GVHD 予防法についてその至適薬剤と投与量について検討する。

5) 臍帯血リンパ球は、未だ抗原刺激を受けていないナイーブなリンパ球であり、分化レベルや機能面においても未成熟と考えられる。したがって臍帯血移植では、免疫不全状態が持続し GVHD が少ない反面、ウイルス感染症と GVL 効果の欠除による原病の再発などの問題を伴う。このメカニズムについて解析するため、分化マーカー、活性化抗原マーカー、補助シグナル分子などの発現を測定

し、増殖能、サイトカイン産生能、抗体産生能、細胞障害活性を明らかにする。臍帯血 T リンパ球は allo 抗原刺激に対し、細胞障害活性を誘導しにくいとされているが、これが allo 抗原に対するレパトアの欠除によるものか、あるいは細胞内シグナルの伝達機構の不活性化によるものかについて検討する。

6) 臍帯血には、サイトカインに反応し LAK 活性有する NK 細胞や、強力な抗原提示能を有する樹状細胞も含まれていることが明らかになっているので、それらの免疫学的特性を明らかにする。さらに臍帯血リンパ球による養子免疫の可能性を探るため、ウイルスや白血病に対する免疫誘導に関する基礎研究を行う。また、臍帯血中の造血幹細胞の増幅を *in vitro* で行い、生着不全の防止や造血回復の促進さらには成人への適応拡大を目指す。

C. 結果と考察

本研究では、非血縁者間臍帯血移植の症例についての全国調査を小寺班から引き継ぎ、4ヶ月に1度の調査(月例報告)および1年に1度の詳細調査を行った。本年度は1997年から1999年11月までに施行された165件の移植成績について解析した。その結果、腫瘍性疾患においては、移植時の病期(スタンダードリスク以下)、ついで年齢(5才以下)、移植細胞数(4×10^7 /Kg以上)が予後良好因子であったが、HLAの適合度は予後やGVHDとは関連しなかった。さらに、非腫瘍性疾患の中では免疫不全での生存は良好であったが、血液疾患と代謝異常疾患では生着不全が多く、特に移植細胞数と予後は関連が強かった(齋藤、加藤俊)。

各個研究においては非血縁者間臍帯

血移植において、非血縁者間骨髄移植と比較し予後が同等であること、また神奈川臍帯血バンクでの保存臍帯血の利用度は10%と高いこと(西平)、HLA不適合でも重症GVHDの合併頻度が低く、移植細胞数と移植病期が予後因子であること(原)、移植後感染症とりわけウイルス感染対策が極めて重要であること(加藤剛)などの臨床研究が行われた。

また臍帯血の特性を生かしつつその弱点を克服するため、臍帯血造血幹細胞の体外増幅、幹細胞生着の促進、免疫システムの早期再構築に関する技術開発に関する研究が行われた。加藤俊らはマウス骨髄線維芽細胞株を feeder layer としたユニークな膜分離型共培養系を開発した。この培養系では未分化前駆細胞である CD34+/CD38-細胞を5日間で約100倍に増幅することが可能であり、NOD/SCID マウスに移植後の long term repopulating cell (SRC)の存在も確認した。高橋らは、臍帯血移植におけるGVHD頻度の低さを明らかにするため、臍帯血T細胞のケモカインリセプターと遊走能を末梢血T細胞と比較検討し、ケモカインリセプター発現低下に基づく遊走能の低下を明らかにした。齋藤らは、臍帯血移植例において、real-time PCRを用いて、4種類のヘルペスウイルスDNAをモニターし、臍帯血移植におけるヘルペス属ウイルス感染症の発症増加の危険性を指摘した。直江らは臍帯血CD34陽性細胞ならびにそのin vitro培養細胞において、免疫グロブリン遺伝子再構成とB細胞分化関連分子の発現を末梢血G-CSF動員CD34陽性細胞と比較解析し、より幼弱な傾向があることを明らかにした。奥村らは、臍帯血幹細胞からT細胞を分化誘導するため、胸腺ストローマ細胞との再凝集培養法を開発し、効率よく成熟したT細胞の分化誘導に成功した。猪子らは、HLA-DO遺伝子の多型性解析を

通じて、その生物学的意義について考察した。HLAのDNA多型性とGVHDの関連については将来の問題である。

今後、研究成果の一部は、安全で公平な臍帯血移植耐性の整備に向けて発足した「さい帯血バンクネットワーク」の発足ならびに、臍帯血の採取・分離・検査・保存・運搬・移植に関する具体的手順や、Quality controlのための査察や評価に生かされてきた。今後、非腫瘍性疾患で問題となった生着不全に関しては、移植前処置の工夫(たとえばフルダラビンの使用)を検討中である。臍帯血移植全般で問題となった血小板回復遅延については移植後トロンボポエチン(TPO)使用の可能性を打診中である。HLAとGVHDの関連に関しては、データベースが整ってきたので、早急に患者とドナーの検体の収集システムを作る必要がある。さらに、臍帯血幹細胞の増幅に関しては、実用化に向けて安全性のチェックが行われつつある。班研究で得られた情報は、公開シンポジウムや報告書等によって、医療関係者のみならず患者、ボランティア、行政にも広く公開してきた。今後はインターネットでも公開してゆきたい。

D. 研究発表

- 1) Kida M., Souri M., Yamamoto M., Saito H. and Ichinose A.: Transcriptional Regulation of Cell Type-specific Expression of the TATA-less A Subunit Gene for Human Coagulation Factor XIII. *J. Biol Chem* 274:6138-6147, 1999
- 2) Emi N., Abe A., Kasai M.,

- 3) Kohno A., Tanimoto M., Kimura H., Kawashima K., Ito M., Mori N. and Saito H.:CD4⁺ and CD56⁺-positive T-cell line, MTA, established from natural killer-like T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Hematol* 69:180-185,1999
- 4) William C. Nichols, Valeri H. Terry, Matthew A. Wheatley, Angela Yang, Ariella Zivelin, Nicola Ciavarella, Caterina Stefanile, Tadashi Matsushita, Hidehiko Saito, Norma B. de Bosch, Arlette Ruiz-Saez, Argimiro Torres, Arthur R. Thompson, Donald I. Feinstein, Gilbert C. White, Claude Negrier, Christine Vinciguerra, Melih Aktan, Randal J. Kaufman, David Ginsburg, and Uri Seligsohn :ERGIC-53 Gene Structure and Mutation Analysis in 19 Combined Factors V and VIII Deficiency Families. *Blood* 93:2261-2266,1999
- 5) Iida M., Towatari M., Nakao A., Iida H., Kiyoi H., Nakano Y., Tanimoto M., Saito H. and Naoe T.:Lack of constitutive activation of MAP kinase pathway in human acute myeloid leukemia cells with N-Ras mutation. *Leukemia* 13:585-589,1999
- 6) Nakano Y., Kiyoi H., Miyawaki S., Asou N., Ohno R., Saito H. and Naoe T.:Molecular evolution of acute myeloid leukaemia in relapse:unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *Brit J Haematol* 104:659-664,1999
- 7) Liu H., Chao D., Nakayama E. E., Taguchi H., Goto M., Xin X., Takamatsu J., Saito H., Ishikawa Y., Akaza T., Juji T., Takebe Y., Ohishi T., Fukutake K., Maruyama Y., Yashiki S., Sonoda S., Nakamura T., Nagai Y., Iwamoto A. and Shioda T.:Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4581-4585, 1999
- 8) Nakahara Y., Suzuki H., Ohashi H., Hatano S., Tomita A., Kinoshita T., Murate T., Saito H and Hotta T.:Clonality analysis of granulocytes and T lymphocytes in healthy females by the PCR-based HUMARA method. *Int. J. Hematol* 69:237-243,1999
- 9) Kishimoto Y., Sampi K., Kuraishi Y., Takemoto Y., Okabe K., Tamura K., Mizoguchi H., Saito H., Masaoka T. and Ogawa M. on behalf of the KRN8602 Leukemia study Group :A phase II Study employing combination regimens containing KRN8602 in drug-resistant acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia. *Anti-Cancer Drugs* 10:267-273,1999
- 10) Miyawaki S., Kobayashi T., Tanimoto M., Kuriyama K., Murakami H., Yoshida M., Minami S., Minato K.(deceased), Tsubaki K., Omoto E., Oh H., Jinnai I., Sakamaki H., Hiraoka A., Kanamaru A., Takahashi I., Saito K., Naoe T., Yamada O., Asou N., Kageyama S., Emi N., Ueda T., Tomonaga M., Saito H., Ueda R. and Ohno R.:Comparison of leukopenia between cytarabine

- and behenoyl cytarabine in JALSG AML-89 consolidation therapy. *Int J Hematol* 70:56-57,1999
- 11) Oht H., Takahashi I., Kojima T., Takamatsu J., Shima M., Yoshioka A., Saito H. and Kamiya T.: Histocompatibility antigens and alleles in Japanese haemophilia A patients with or without factor VIII antibodies. *Tissue Antigens* 54:91-97,1999
 - 12) Ishiguro K., Kojima T., Taguchi O., Saito H., Muramatsu T. and Kadomatsu K.: Syndecan-4 expression is associated with follicular atresia in mouse ovary. *Histochem Cell Biol* 112:25-33,1999
 - 13) Yamamoto K., Shimokawa T., Kojima T., David J. Loskutoff, Saito H.: Regulation of Murine Protein C Gene Expression In Vivo: Effects of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1, and Transforming Growth Factor- β . *Thromb Haemost* 82:1297-1301,1999
 - 14) Yabuki K, Ota M, Goto K, Kimura M, Nomura E, Ohno S, Mizuki N, Katsuyama Y, Makysymowych WP, Bahram S, Kimura M, Inoko H: Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative Caucasian patients with ankylosing spondylitis. *Hum. Immunol.* 60 : 83- 86, 1999.
 - 15) Ando A, Kikuti YY, Abe K, Shigenari A, Kawata H, Ikemura T, Kimura M, Inoko H : cDNA cloning, Northern hybridization and mapping of a putative GDS (guanine nucleotide dissociation stimulator of G proteins)-related protein gene at the centromeric ends of the human and mouse MHC regions. *Immunogenetics* 49 : 354-356, 1999.
 - 16) Ozawa A, Iwashita K, Miyahara M, Sugai J, Iimuka M, Kawakubo Y, Ohkido M, Naruse T, Anzai T, Takashige N, Ando A, Inoko H :HLA-A33 and -B44 and susceptibility to postherpetic neuralgia (PHN). *Tissue Antigens* 53 : 263-268, 1999.
 - 17) Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Inoko H : Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunological Reviews* 167 : 193-199, 1999.
 - 18) Yamazaki M, Tateno Y, Inoko H : Genome organization around the centromeric end of the HLA class I region ; large-scale sequencing analysis. *J. Mol. Evol.* 48 : 317-327, 1999.
 - 19) Shiina T, Oka A, Imanishi T, Hanzawa K, Gojobori T, Watanabe S, Inoko H : Multiple class I loci expressed by the quail Mhc. *Immunogenetics* 49 : 456-460, 1999.
 - 20) Shiina T, Shimizu C, Oka A, Teraoka Y, Imanishi T, Gojobori Hanzawa K, Watanabe S, Inoko H : Gene organization of the quail major histocompatibility complex (MhcCoja) class I gene region. *Immunogenetics* 49 : 384-394, 1999.
 - 21) Naruse KN, Kawata H, Anzai T,

- Takashige N, Kagiya M, Nose Y, Nabeya N, Isshiki G, Tatsumi N, Inoko H : Limited polymorphism in the HLA-DOA gene. *Tissue Antigens* 53 : 359-365, 1999.
- 22) Ota M, Mizuki N, Katsuyama Y, Tamiya G, Shiina T, Oka A, Ando H, Kimura M, Goto K, Yabuki K, Ohno S, Inoko H : The critical region for Behcet's disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46 kb segment centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsattelite mapping. *Am J Hum Genet* 64 : 1406-1410, 1999.
- 23) Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Ikehara Y, Nishihara S, Nakagawa S, Sasaki K, Shiina T, Inoko H, Saitou N, Narimatsu H : α 1,3-Fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS letters* 452, 237-242, 1999.
- 24) Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ, Ohno S, Inoko H, Ota O, Mizuki N, Yabuki K, Stephens HA, Kondiatis E, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR, Vaughan RW : Association of MICA alleles with Behcet's disease. *Immunogenetics* 49 : 613-617, 1999.
- 25) Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T : Polymorphism of MICA in Japanese and a MICA-MICB null haplotype. *Immunogenetics* 49 : 620-628, 1999.
- 26) Moribe T, Kaneshige T, Inoko H : Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation : High resolution subtyping of HLA-A2 and -B40 alleles. *Hum Immunol* 60 : 539-549, 1999.
- 27) Adra K, MAo XO, Kawada H, Gao PS, Korzycka B, Shaldon SR, Coull P, Dubowitz M, Enomoto T, Ozawa A, Donato JL, Syed A, Horiuchi T, Khan R, Lin SR, Roberts MH, Flinter F, Beales P, Hagihara A, Inoko H, Shirakawa T, Hopkins M : Chromosome 11q13 and atopic asthma. *Clinical Genetics* 55 : 431-437, 1999.
- 28) Anzai T, Naruse TN, Tokunga K, Honma T, Baba H, Akazawa T, Inoko H : HLA genotyping of 5,000 and 6,000-year old ancient bones in Japan.
- 29) Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kakalamani E, Inoko H : Association of MICA alleles with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 54 : 53-58, 1999.
- 30) Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M : Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody Fab fragment against hepatitis B surface antigen. *J Medical Virology* 58 : 338-345, 1999.

- 1999.
- 31) Kulski, JK, Gaudieri S, Inoko H, Dawkins RL : Comparison between two HERV-rich regions within the major histocompatibility complex. *J. Mol. Evolution* 48 : 675-683, 1999.
 - 32) Baba T, Ando A, Inoko H : Isolation and characterization of the swine MHC SLA-DNA cDNA clones. *Immunogenetics* 49 : 915-917, 1999.
 - 33) Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuku N, Kera J, Bahram S, Nose Y, Inoko H : Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons 2 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54 : 178-184, 1999.
 - 34) Takashige N, Naruse T, Inoko H : Genetic polymorphisms at the tumor necrosis factor loci (TNFA and TNFB) in cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 54: 191-193, 1999.
 - 35) Yabuki K, Ohno S, Mizuki N, Ando H, Tabbara KF, Goto K, Nomura E, Nakamura S, Ito N, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H : HLA class I and II typing of the patients with Behcet's disease in Saudi Arabia. *Tissue Antigens* 54 : 273-277, 1999.
 - 36) Tamiya G, Shiina T, Oka A, Ota M, Katsuyama Y, Tomizawa M, Yoshitome M, Ohtsuka M, Kimura M, Inoko H : New microsatellite markers in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 54 221-228, 1999. Inoko H, Ohno S. Association of MICA gene and HLAB*5101 with Behcet's disease in Greek. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 : 1921-1926, 1999.
 - 37) Mizuki N, Ohno S, Ando H, Chen L, Sato T, Imanishi T, Gojobori T, Ishihara M, Mizuki N, Geng Z, Geng L, Li G, Inoko H : Association analysis between the MICA and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. *Arthritis & Rheumatism* 42 : 1961-1966, 1999.
 - 38) Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T, Nishikawa T, Shirai T, Inoko H : HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. *Tissue Antigens* 54 : 333-340, 1999.
 - 39) Nakanishi K, Kobayashi T, Murase T, Naruse T, Nose Y, Inoko H : Human Leukocyte Antigen-A24 and -DQA1*0301 in Japanese insulin-dependent diabetes mellitus : Independent contributions to susceptibility to the disease and additive contributions to acceleration of b-cell destruction. *J Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 : 3721-3725, 1999.
 - 40) The MHC sequencing consortium (Aguado B, Bahram S, Beck S, Campbell RD, Forbes S, Geraghty D, Guillaudeux T, Hood L, Horton R, Inoko H, Janer M, Jasoni C, Madan A, Milne S, Neville M, Oka A, Qin S, Ribas-Despuig G, Rogers J, Rowen L, Shiina T, Spies T, Tamiya G,

- Tashiro H, Trowsdale J, Vu Q, Williams L, Yamazaki M. Complete structure and gene map of a human major histocompatibility complex (MHC). *Nature* 401 : 921-923,1999.
- 41) Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara C, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S, Inoko H: Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequencing analysis of the 1,796,938 bp HLA class I region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 : 13282-13287, 1999.
- 42) Oka A, Tamiya G, Ota M, Kastuyama Y, Shiina T, Tomizawa M, Yoshitome M, Sugai J, Ozawa A, Ohkido M, Kimura M, Bahram S, Inoko H : Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptible locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric of the HLA-C gene. *Hum. Mol. Genetics* 8 : 2165-2170, 1999.
- 43) Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Shiina T, Inoko H, Kozaki T, Saitou N, Narimatsu H : Assignment of the human α 1,3-fucosyltransferase IX gene (FUT9) to chromosome band 6q16 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 86 : 329-330, 1999.
- 44) Shirakata Y, Ishii K, Yagita H, Okumura K, Taniguchi M, Takemori T. Distinct subcellular localization and substrate specificity of extracellular signal-regulated kinase in B cells upon stimulation with IgM and CD40J *Immunol.* 1999 :15;163(12):6589-97.
- 45) Atsuta R, Akiyama K, Shirasawa T, Okumura K, Fukuchi Y, Ra C. Atopic asthma is dominant in elderly onset asthmatics: possibility for an alteration of mast cell function by aging through Fc receptor expression. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;120 Suppl 1:76-81.
- 46) Morita H, Takeda K, Yagita H, Okumura K. Immunosuppressive effect of leukotriene B(4) receptor antagonist in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 22;264(2):321-6.
- 47) Kawamura T, Azuma M, Kayagaki N, Shimada S, Yagita H, Okumura K. Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymph nodes. *Br J Dermatol.* 1999;141(2):201-205.
- 48) Nakano H, Sakon S, Koseki H, Takemori T, Tada K, Matsumoto M, Munechika E, Sakai T, Shirasawa T, Akiba H, Kobata T, Santee SM, Ware CF, Rennert PD, Taniguchi M, Yagita H, Okumura K. Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 : 17;96(17):9803-8.
- 49) Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H,

- Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okumura K, Yagita H. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol.* 1999;15;163(4):1906-13.
- 50) Ebihara N, Yokoyama T, Kimura T, Nakayasu K, Okumura K, Kanai A, Ra C. Anti VLA-4 monoclonal antibody inhibits eosinophil infiltration in allergic conjunctivitis model of guinea pig. *Curr Eye Res.* 1999;19(1):20-5.
- 51) Hattori K, Hirano T, Ushiyama C, Miyajima H, Yamakawa N, Ikeda S, Yoshino K, Tateno M, Oshimi K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. A metalloproteinase inhibitor prevents acute graft-versus-host disease in mice after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23(12):1283-9.
- 52) Takada T, Kato K, Yagita H, Hamada H, Okumura K. Effects of immunization with tumor cells double transfected with interleukin-2 (IL-2) and interleukin-12 (IL-12) genes on artificial metastasis of colon26 cells in BALB/c mice. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17(2):125-30.
- 53) Akiba H, Oshima H, Takeda K, Atsuta M, Nakano H, Nakajima A, Nohara C, Yagita H, Okumura K. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J Immunol.* 1999;15;162(12):7058-66.
- 54) 加藤剛二. 臍帯血幹細胞移植-現状と展望 *Molecular Medicine* 1999;36:770-775.
- 55) 加藤剛二, 小寺良尚. 臍帯血幹細胞移植. *Annual Review 血液* 1999;1999: 1-9.
- 56) Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kato S et al.:Ex vivo generation of CD34+ cells from CD34-hematopoietic cells. *Blood*, 1999;94:4053-4059.
- 57) Murata M, Harada M, Kato S, et al.:Peripheral blood stem cell mobilization and apheresis:analysis of adverse events in 94 normal donors. *Bone Marrow Transplantation*, 1999;24:1065-1071.
- 58) Kodera Y, Morishima T, Kato S, et al.:Analysis of 500 bone marrow transplants from unrelated donors (UR-BMT) facilitated by the Japan Marrow Donor Program:confirmation of UR-BMT as a standard therapy for patients with leukemia and aplastic anemia. *Bone Marrow Transplantation*,1999;24:995-1003.
- 59) Nishiyama M, Arai Y, Tsunematsu Y, Kato S, et al.:11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes & Cancer*, 1999;26:215-220.
- 60) Miyachi H, Tanaka Y, Gondo K, Kato S, et al.:Altered expression of CD45 isoforms in differentiation of acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*, 1999;62:159-164.
- 61) Matsumoto M, Shinohara O, Ishiguro H, Kato S, et al.:Ovarian function after bone marrow transplantation performed before

- menarch. Archives of Diseases in Childhood, 1999;80:452-454.
- 62) Ida H, Rennert M, Kato S, et al.: Severe complications in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. J Inher Metab Dis, 1999;22:63-73.
- 63) Yabe M, Yabe H, Hattori K, Kato S, et al.: Role of interleukin-12 in the development of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplant patients. Bone Marrow Transplantation, 1999;24:29-34.
- 64) Takahashi T, Ogami K, Ikebuchi K, Tojo A, Tani K, Asano S. IL-2/LAK therapy for refractory acute mo Kawada H, Ando K, Tsuji T, Kato S, et al.: Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. Exp Hematol, 1999;27:904-915.
- 65) 村田誠、林真、加藤俊一、ほか：同種骨髓移植におけるシクロスポリンMEPCの効果および安全性に関する研究。今日の移植、1999;12sup:87-98.
- 66) 岡村純、松山孝治、加藤俊一、ほか：Ph1陽性小児急性リンパ性白血病に対する幹細胞移植：全国登録89症例の解析結果。日本小児血液学会雑誌1999;13:170-177.
- 67) 加藤俊一：臍帯血幹細胞移植。日本小児科医会会報、1999;18:67-70.
- 68) 加藤俊一：ムコ多糖症に対する骨髓移植。小児科、1999;40:1251-1259.
- 69) 加藤俊一：わが国における臍帯血移植。日本輸血学会雑誌、1999;45:553-556.
- 70) 加藤俊一：堀田知光：臍帯血移植の現状と展望。日本臨床血液学会雑誌、1999;40:455-458.
- 71) Nagayama H, Nakayama K, Yasuo K, Tajika K, Dan K, Yamashita N, Asano S, Takahashi TA. Immunological reconstitution after cord blood transplantation for an adult patient. Bone Marrow Transplant. 1999 ;24(2):211-213.
- 72) Nagayama H, Takahashi S, noblastic leukemia relapsing after unrelated allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 1999 ;23(2):183-5.
- 73) Sato K, Nagayama H, Takahashi T. Aberrant CD3 And CD28-Mediated Signaling Events In Cord Blood T Cells Are Associated With Dysfunctional Regulation Of Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. J Immunol . 1999.162:4464-4471.
- 74) Sato K, Nagayama H, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. J Immunol. 1999 ;162(7):3865-72.
- 75) Sato K, Nagayama H, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. Interleukin-13 is involved in functional maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. Exp Hematol. 1999 ;27(2):326-36.
- 76) Sato K, Nagayama H, Takahashi

- T. Generation of Dendritic Cells from Fresh and Frozen Cord Blood CD34+ Cells. *Cryobiology*. 1999;37:362-371.
- 77) Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Serizawa R, Ikeda J, Morimoto C, Yasunaga K, Yamaji N, Tadokoro K, Juji T, Takahashi T. CC Chemokine Receptors, CCR-1 and CCR-3, Are Potentially Involved in Antigen-Presenting Cell Function of Human Peripheral Blood Monocyte-Dendritic Cells. *Blood* 1999; 93: 34-42.
- 78) 西平浩一: 臍帯血バンクを利用した非血縁者間臍帯血移植. *小児科* 1999;40(5):469-478.
- 79) Kobayashi M, Nishihira H, et al. Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with chronic neutropenia of childhood: modulation of G-CSF levels by myeloid precursor cell mass. *British Journal of Haematology* 1999;105:486-490.
- 80) Kaneko M, Nishihira H, et al. Treatment results of advanced neuroblastoma with the first Japanese group protocol J *Pediatr Hematol/Oncol* 1999;21(3):190-197.
- 81) 西平浩一. 臍帯血バンクを利用した非血縁者間臍帯血移植の実際. *日本輸血学会雑誌* 1999;45(4): 557-560.
- 82) 石河由佳, 石田裕二, 西平浩一, 他: 造血幹細胞移植後の晩期障害の検討. *日本小児血液学会雑誌* 1999; 13(6):442-447.
- 83) 豊田恭徳, 石川久美子, 西平浩一, 他: L-phenylalanine mustard 単独投与が奏功した再発リンパ系腫瘍の 2 例. *日本小児血液学会雑誌* 1999;13(6):448-453.
- 84) 石河由佳, 豊田恭徳, 西平浩一, 他: 自家骨髄移植後の再発に対し, 計画的 2 回の自家骨髄移植を施行した長期完全寛解を得ている卵黄嚢癌の 2 例. *小児がん* 1999; 36(1):90-94.
- 85) Y. Nakano, H. Kiyoi, S. Miyawaki, N. Asou, R. Ohno, H. Saito, and T. Naoe. Molecular evolution of acute myeloid leukemia in relapse : unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene. *British Journal of Haematology*. 104:659-664, 1999
- 86) H. Kiyoi, T. Naoe, Y. Nakano, S. Yokota, S. Minami, S. Miyawaki, N. Asou, K. Kuriyama, I. Jinnai, C. Shimazaki, H. Akiyama, K. Saito, H. Oh, T. Motoji, E. Omoto, H. Saito, R. Ohno, and R. Ueda. Prognostic Implication of FLT3 and N-RAS Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 93(9):3074-3080, 1999
- 87) Iida M, Towatari M, Nakao A, Iida H, Kiyoi H, Nakano Y, Tanimoto M, Saito H, and Naoe T. Lack of constitutive activation of MAP kinase pathway in human acute myeloid leukemia cells with N-Ras mutation. *Leukemia*. 13(4):585-9, 1999
- 88) Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A, Tobita T, Yano K, Kobayashi M, Terasaki H, Naoe T, Ohnishi K, and Ohno R. Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood

- cells. *Leukemia*. 13(4):542-52,
- 89) Mizuta S, Ito Y, Kohno A, Kiyoi H, Miyamura K, Tanimoto M, Takamatsu J, Naoe T, Morishima Y, Ueda R, and Saito H. Accurate quantitation of residual tumor burden at bone marrow harvest predicts timing of subsequent relapse in patients with common ALL treated by autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 24(7):777-784,1999.
- 90) Naoe T, Kitamura K. Relationship between degradation of PML-RARalpha and differentiation. *Blood*. 15;94(4):1478-9, 1999
- 91) Kosugi H, Towatari M, Hatano S, Kitamura K, Kiyoi H, Kinoshita T, Tanimoto M, Murate T, Kawashima K, Saito H, Naoe T. Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy. *Leukemia*. 13(9):1316-24, 1999
- 92) Miyawaki S, Kobayashi T, Tanimoto M, Kuriyama K, Murakami H, Yoshida M, Minami S, Minato K, Tsubaki K, Omoto E, Oh H, Jinnai I, Sakamaki H, Hiraoka A, Kanamaru A, Takahashi I, Saito K, Naoe T, Yamada O, Asou N, Kageyama S, Emi N, Ueda T, Tomonaga M, Ohno R, et al. Comparison of leukopenia between cytarabine and behenoyl cytarabine in JALSG AML-89 consolidation therapy. The Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol*. 70(1):56-7, 1999
- 93) 甲斐俊朗、原 宏：臍帯血バンクの現状と未来像. 1999 日本輸血学会雑誌,45(4),549-552.
- 94) 坪井 慶太、上紺屋憲彦、和泉正幸、入江美和、武元良整、垣下榮三、甲斐俊朗、原 宏、山本益嗣、谷澤隆邦、中尾宣夫. 全身照射用三次元フィルターの作成と基礎的臨床的研究. 1999、日本医学放射線学会雑誌 59(13),782-787.
- 95) 五熊丈義、原 宏. ヒト血液細胞. 分子生物学研究のための新培養細胞実験法 1999,88-96.
- 96) 谷脇清助、原 宏. (1999) 供血者および骨髄、臍帯血提供者の前検査. 臨床病理,臨時増刊(110)113-123.
- 97) 原 宏. おわりに-遺伝子治療を含めた未来への展開.(1999)臨床病理,臨時増刊 (110),134-138.

分担研究報告

研究課題 臍帯血の免疫学的特性に関する研究

—動物モデルを用いたヒトT細胞分化誘導法の開発—

分担研究者 奥村 康 順天堂大学医学部免疫学教授

研究協力者 垣生園子 東海大学医学部生体防御系免疫学教授

A. 研究目的： 免疫系を分化或いは再構築することは臍帯血移植の目的の1つである。免疫系の主役であるT細胞は、胸腺という特殊臓器で分化するため、他の免疫細胞と比較して *in vitro* および *in vivo* の再構築が容易ではない。本研究では、*in vitro* および *in vivo* でT細胞を分化誘導する系を樹立し、T細胞側および胸腺環境細胞側から分化に関連する分子を解明することを目指している。分化誘導系の基礎的開発はマウスを用いておこない、それに基づいて逐次ヒト臍帯血幹細胞からT細胞分化誘導を展開する。本年度は、すでに確立したマウスの系を応用して、ヒト臍帯血由来幹細胞からT細胞への分化誘導を試みた。

B. 研究方法

1)マウス：胎齢15日のC57BL/6マウス胎仔、NK活性の低い免疫不全マウスであるNOD-SCIDマウス、および抗原認識分子を完全欠損したRAG-2遺伝子欠損マウス(RAG-2KOマウス)を用いた。

2)ヒト臍帯血幹細胞の分離：定法に従って、Ficoll-Hypaque (d=1.077; Amersham Pharmacia)にて分離したリンパ球を含む白血球層から、MACS CD34 immunomagnetic isolation kit (Miltenyi Biotec, Glodbach, Germany)とMACS separatorを用いてCD34+細胞をpositive selectionする。この操作を2回繰り返して単離回収したCD34+細胞の純度は95%以上である。

3) reaggretion T cell organ culture (RTOC)：マウス胎仔胸腺をデオキシグアノシン (dGuo) 存在下で臓器培養 (FTOC)してリンパ球と樹状

細胞 (DC) を除去したいわゆる胸腺支持上皮細胞 (ストローマ細胞) を得る。それらをトリプシン処理して得たストローマ細胞をヒト CD34+細胞と混合 (1:4) した後遠心し (200 rpm)、得られた凝集塊 (human/mouse hybrid reaggregate, hu/mhybrid) を millipore filter 上で培養する (図1)。

4) hu/m hybrid の NOD-SCID への移植：2週間 RTOC をおこなった後、hu/m hybrid を NOD-SCID マウスの腎被膜下に移植する。

5) 細胞表面分子による分化度の解析：各種抗体 (対 CD1a, CD4, CD8, CD3, CD45) を利用して、CD34+ 細胞から T 細胞への分化状態を FACSCan にて解析する。

6) T細胞増殖能の解析：hu/m hybrid から回収したT細胞をPMA+IMと36時間培養し、IL-2産生をELISA法で解析する。

7) ウイルス産生細胞の樹立：ウイルスベクター (図2) をリポフェクタミンにより感染させてウイルス産生細胞を作製し、それらに感染したGP+envAM12が産生したアンフォトロピックウイルス培養上清によって、より安定して高力価のウイルス産生細胞—GP+E-86—を作製した。

C. 研究結果

1) マウス胸腺ストローマ細胞はヒトT細胞を *in vitro* で分化誘導できる。dGuo との FTOC で得たマウス胎仔胸腺由来の遊離細胞は、FACSCan の解析の結果、T、B 細胞および DC のマーカーをもつ細胞は検出されず、いわゆる胸腺支持上皮細胞 (ストローマ細胞) のみから構成されて

いた。このマウスストローマ細胞をヒト臍帯血由来の CD34+細胞と再凝集して hu/m hybrid を作製して培養すると、(1) 2 週間で CD4-8-(DN)細胞から CD4+8+(DP) 細胞が分化出現した。さらに長期培養を続けると、CD4/8 のいずれか一方を発現した 4SP と 8SP 細胞が分化した (図 3)。この誘導期間は、マウス同志の凝集培養に比較して、2-3 週間長かった。(2)細胞数は培養 4 週間頃より減少し、8 週目では培養開始時の 1/2 以下であった。この時期の組織学的解析では、殆どストローマ細胞が検出されなかった。(3)少ないながら分化した 4SP 細胞では CD1a の発現は高く、機能的には未熟な細胞と考えられた。また、刺激を加えても IL-2 は産生されなかった。

2) 機能的 T 細胞の分化誘導は RTOC と in vivo 系との組み合わせで可能となる。上記 in vitro 培養を 2 週間までとし、その後 hu/m hybrid を回収して NOD-SCID 腎被膜下に移植して経過を観察した。その結果、(1)移植局所では胸腺組織構築が形成されており、ヒト由来 CD45+細胞数は著しく増加して、7 週間後には開始時の約 45 倍となった。(2) 移植後 7-9 週間の hu/m hybrid 内の CD45+細胞は、ほとんどが DP 細胞と 4SP 細胞に分化していた。しかも、4SP 細胞では CD1a 低発現細胞も増加した。(3) low CD1a+細胞の増加を反映して、PMA/IM 刺激に対して IL-2 産生が著しく亢進した (図 4)。

3) reaggregation culture

法を用いたレトロウイルス感染による未熟 T 細胞への遺伝子導入上記の系は、これまで困難とされていた分化途上の T 細胞に遺伝子導入することを可能とする。今回は基礎データとしてマウス細胞を使用した凝集培養法により、従来低頻度とされていたレトロウイルス感染による未熟 T 細胞系への遺伝子導入を試みた。通常おこなわれているウイルス産生細胞の培養上清を使用する代わりに、ウイルス産生細胞を胸腺ストローマ細胞と未熟 T 細胞を 1:25:5 の割合で混合し、reaggregation culture をおこなった。未熟 T 細

胞としては、TCR 遺伝子の再構成がおこらず DN 細胞レベルで分化が停止した RAG-2 KO マウスの胸腺細胞を使用した。その結果、(1)ウイルスベクターに組み込んであった再構築済みの TCR-b 遺伝子 (Vb8.2)は、6 日間の培養後に高い効率 (~80%) で胸腺細胞に感染した。(2)DN 細胞は導入遺伝子 TCR-b により b selection を受けて、DP 細胞に分化した。ちなみに、ウイルス産生細胞の培養上清を使用した系では、遺伝子導入率は 1%以下であった。

D. 考察

ヒト臍帯血由来幹細胞をマウス胸腺ストローマ細胞との再凝集培養法によって、T 細胞の分化を誘導できることを証明した。T 細胞を in vitro で分化誘導するためには、胸腺環境・組織が必要である。しかも、胎児胸腺がより効率よく誘導することが知られているが、倫理上の問題があって使用できない。また、分化誘導機能をもつとされる胸腺ストローマ細胞の cell line は樹立されていない。そこで、マウスの胎仔胸腺環境を用いてヒト T 細胞の分化誘導が試みられてきた。オランダおよびアメリカのグループは、マウス胎仔胸腺内に骨髓幹細胞を hanging drop 法で入れて、成熟型 4SP と 8SP T 細胞が分化することを報告した。しかし、細胞の回収率は悪く、また誘導された SP T 細胞は刺激に対して増殖機能をもたなかった。今回の我々の研究成果は、次の点でこれまでの方法を凌駕している。

1) 再凝集法を用いることにより、マーカーのみでなく、機能的にも成熟した T 細胞を幹細胞から分化が誘導できた。

2) 分化した T 細胞の数が従来を大幅に上回っている。

3) 従来ウイルス含有液を用いておこなっていたウイルス感染による遺伝子導入法を、ウイルス産生細胞との凝集法を加えることにより、分化途上の T 細胞に初めて効率に遺伝子を導入できた。これら成果を踏まえて、次年度は以下の事項を研究する。

1) 種を越えて胸腺ストローマ細胞が T 細胞の分化を誘導・支持すること明らかとなったので、マウスストローマ細胞を用いて T 細胞分化誘導に関わる分子を同定する。

2) ヒト特異的免疫反応や感染モデルと作製することを目指して、ヒト幹細胞を免疫不全マウスに移植してヒト免疫系を再構築する。そのためには、今回確立した NOD-SCID マウス腎被膜下で分化した hu/m hybrid 内の T 細胞が末梢に分布する系を確立する。

F. 研究発表

Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Etoh, H., Okumura, K., and Yagiita. Type I interferons (IFNs) Regulate Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL9) Expression on Human T Cells: A Novel Mechanism for the Antitumor Effects of Type I IFNs. *J. Exp. Med.*, 189: 1451-1460, 1999

Akiba, H., Oshima, H., Takeda, K., Atsuta, M., Nakano, H., Nakajima, A., Nohara, C., Yagita, H., Okumura, K. CD28-Independent Costimulation of T Cells by OX40 Ligand and CD70 on Activated B Cells *J. Immunol.*, 162: 7058-7066, 1999.

Tsukada, N., Kobata, T., Aizawa, Y., Yagita, H., and Okumura, Graft-versus-leukemia effect and graft-versus-host disease can be differentiated by cytotoxic mechanisms in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 93: 2738-2747, 1999.

図1 レトロウイルスベクター

pMR2/2C-β

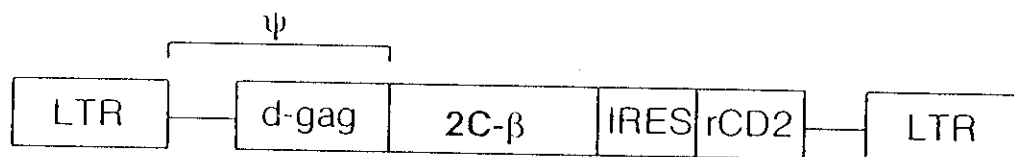


図2 in vitro および in vivo による再凝集培養法

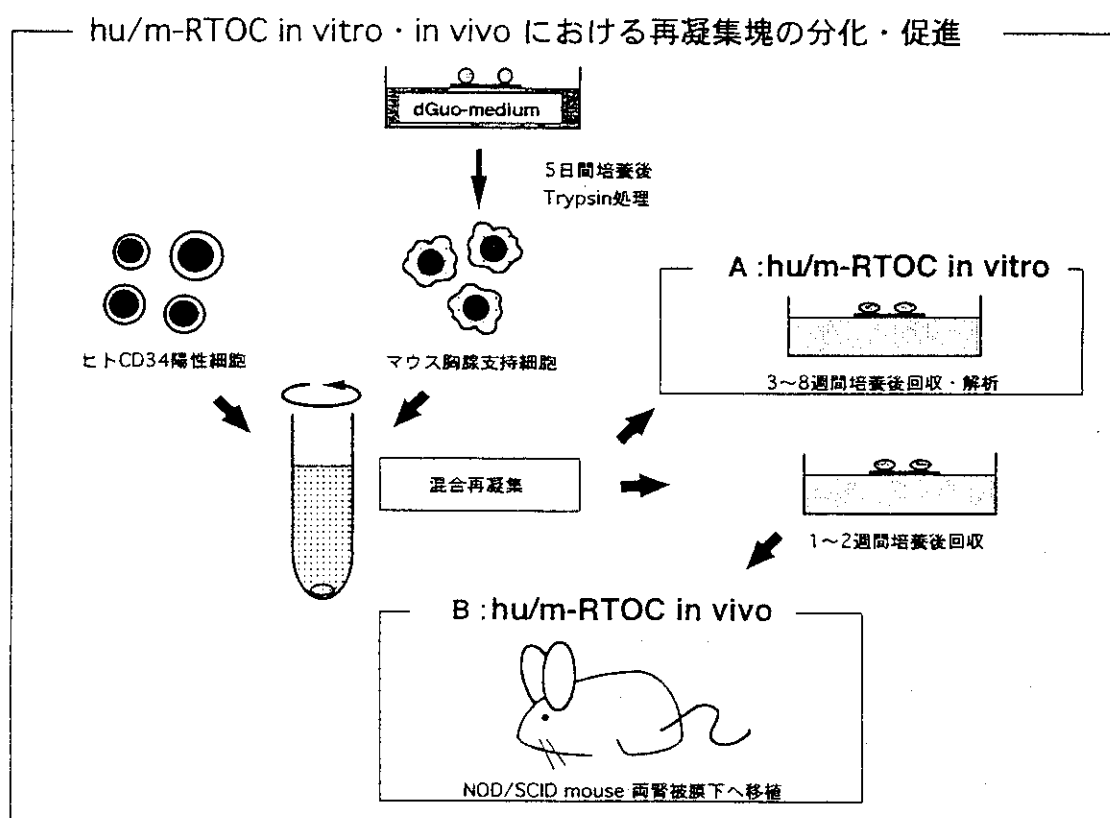


図3 マウス微小環境内におけるヒトT細胞分化

