

ヒト臍帯血 T 細胞のケモカインレセプターおよび補体レセプターの発現と遊走能

分担研究者；高橋 恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング研究部門

研究協力者；長山 人三、佐藤 克明、榎本 誠

(1) ケモカインレセプターの発現と遊走能の解析

ヒト臍帯血幹細胞移植において Graft vs. Host Disease (GVHD)の発症頻度が低い理由を明らかにすることを目的とし、ヒト臍帯血 T 細胞 (cord blood T cells: CBT) のケモカインレセプターの発現と遊走能についてヒト末梢血 T 細胞 (peripheral blood T cells: PBT) を対照群として検討した。

①ケモカインレセプターの発現

各種抗ケモカインレセプター抗体を用いたフローサイトメトリーにより、PBT と CBT の違いを調べた。

PBT では CCR (CC chemokine receptor)-1、CCR-2、CCR-5、CCR-6、CXCR (CXC chemokine receptor)-3 及び CXCR-4 の細胞表面上の発現が認められた。CBT では CXCR-3 及び CXCR-4 の発現が認められ、CXCR-3 の発現レベルは PBT と比較して低下、CXCR-4 についてはほぼ同等であった。

②ケモカインレセプター mRNA

各種ケモカインレセプター mRNA の発現を RT-PCR で調べた。これらの細胞集団は共に CCR-1、CCR-2、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CXCR-3 及び CXCR-4 を発現し、CBT では PBT と比較して CCR-1、CCR-2、CCR-5、CCR-6、CXCR-3 の発現は低下していたが、CCR-7 の発現は高く、CXCR-4 の発現はほぼ同等であった。

③遊走能

各種 CC ケモカイン及び CXC ケモカインへの遊走能について Transwell cell culture chamber を用い

て検討を行った。CBT では PBT と比較して MIP (macrophage inflammatory protein)-1a、MCP (monocyte chemoattractant protein)-1、RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted)、MIP-3a、MIG (monokine induced by interferon-g)、IP-10 (interferon-g inducible protein)への遊走能は著しく低下していた。しかし MIP-3bへの遊走能は高く、SDF (stromal cell-derived factor)-1a への遊走能はほぼ同等であった。

④ Memory cell と Naive cell

(1)ケモカインレセプター

PBT と CBT の各細胞亜集団のケモカインレセプターの発現と遊走能の特性を明らかにするために PBT を CD45RO⁺PBT (memory phenotype) と CD45RA⁺PBT (naive phenotype)、CBT を CD45RA⁺CBT (naive phenotype) に分画して解析を行った。CD45RO⁺PBT と CD45RA⁺PBT では CCR-1、CXCR-3 及び CXCR-4 についてはほぼ同等の細胞表面上の発現が認められた。CCR-2、CCR-5 及び CCR-6 については CD45RO⁺PBT ではそれらの発現が認められたが、CD45RA⁺PBT では認められなかった。また、CD45RA⁺CBT では CXCR-3 と CXCR-4 の発現が認められたが、CXCR-3 の発現レベルは CD45RO⁺PBT と CD45RA⁺PBT と比較して低下していたが、CXCR-4 についてはほぼ同等であった。

(2)ケモカイン mRNA

CCR-1 mRNA の発現に関しては CD45RO⁺PBT と CD45RA⁺PBT はほぼ同等で、CD45RA⁺CBT で

はこれらの末梢血 T 細胞亜集団と比較して低下していた。CCR-2 mRNA、CCR-5 mRNA 及び CCR-6 mRNA の発現に関しては CD45RO⁺PBT と比較して CD45RA⁺PBT と CD45RA⁺CBT では低下していた。CCR-7 mRNA の発現に関しては CD45RO⁺PBT と比較して CD45RA⁺PBT と CD45RA⁺CBT では増強されていた。CXCR-3 mRNA の発現に関しては CD45RO⁺PBT と CD45RA⁺PBT はほぼ同等で、CD45RA⁺CBT ではこれらの末梢血 T 亜集団と比較して低下していた。また、CXCR-4 mRNA の発現に関しては CD45RO⁺PBT、CD45RA⁺PBT、CD45RA⁺CBT ではほぼ同等の発現が認められた。

(3)遊走能

MIP-1a、MCP-1、RANTES、MIP-3a、MIG、IP-10 への遊走能に関しては CD45RO⁺PBT と比較して CD45RA⁺PBT では低く、CD45RA⁺CBT では CD45RA⁺PBT と比較して更に低かった。MIP-3b に対しては CD45RA⁺PBT と CD45RA⁺CBT では高い遊走能を示したが、CD45RO⁺PBT ではその遊走能はかった。また、SDF-1a への遊走能はこれらの T 細胞亜集団ではほぼ同等であった。

GVHD ではドナー由来 T 細胞のレピエントの各組織への浸潤が認められることから、PBT と CBT の未刺激あるいは IL (interleukin)-1b と TNF (tumor necrosis factor) -a で刺激した fibroblasts、endothelial cells 及び epithelial cells の培養上清への遊走能について検討した。未刺激のこれら細胞の培養上清に対しては PBT と CBT 共に遊走能を示さなかった。また、IL-1b と TNF-a で刺激したこれら細胞の培養上清に対しては PBT は高い遊走能を示したが、CBT ではその遊走能は低下していた。一方、これら細胞の培養上清に対する T 細胞亜集団の遊走能については、未刺激のこれら細胞の培養上清に対しては各 T 細胞亜集団は遊走能を示さなかったが、IL-1b と TNF-a で刺激し

たこれら細胞の培養上清に対しては CD45RO⁺PBT は高い遊走能を示したが、CD45RA⁺PBT と CD45RA⁺CBT ではそれらの遊走能は低下していた。

④まとめ

以上の結果から、ヒト臍帯血幹細胞移植における GVHD の発症頻度低下の分子機構の一つとして、CBT のケモカインレセプターの発現低下に基づく遊走能の低下が示唆された。

(2) C5a レセプターの発現解析

補体システムの活性化による炎症反応は、アナフラトキシンとして知られる C3a、C4a、C5a が関与している。特に C5a は様々な生物学的活性を持つことが知られている。たとえば、ヒト肥満細胞の脱顆粒作用、血管透過性を高める作用、ヒト白血球からの炎症性サイトカイン産生誘導などの活性があげられる。また、C5a はヒトのリンパ球系細胞、ミエロイド系細胞に対して強力な化学的走化性を持つことも知られている。一方、C5a のレセプター (C5aR) は、ヒトのリンパ球、ミエロイド系細胞、肝細胞や神経細胞などに発現している。最近では PBT においては、未刺激時では C5aR は弱発現であるが、PHA 刺激を行うことにより、強く発現することも報告されている。しかし、CBT に関しては、C5a に対する機能、C5aR の発現に関しては、明らかにされていない。

本研究では、CBT の免疫学的特性を明らかにし、ヒト臍帯血幹細胞移植における GVHD の発症頻度低下の分子機構に、C5a が関与するかどうかを調べるための基礎的検討として、C5aR に着目し、まず CBT における C5aR の発現状態について PBT 対照群として解析を行った。

C5aR に対する抗体と T 細胞に対する抗体 (CD3) を用いて、FACS により、末梢血単核球細胞、臍帯血単核球細胞をそれぞれ二色解析を行った。その結果、未刺激の状態では C5aR は、PBT

では弱発現していたが、CBT ではほとんど発現していないことがわかった。また PHA (10_g/ml)による72時間の刺激後は、PBT では C5aR の発現が上昇したが CBT では変化無く発現がほとんどなかった。今後は、更にPBTとCBTの各細胞亜集団、すなわち memory phenotype、CD45RO⁺T細胞と naive phenotype でCD45RA⁺T細胞について、C5aRの発現を明らかにして、臍帯血T細胞の特徴を調べ、またC5aのT細胞に対する化学走化性に注目して、これらのT細胞についてC5aの機能を調べる予定である。

発表論文

Nagayama, H., Sato, K., Kawasaki K., Enomoto, Morimoto C., Tadokoro K., Juji, T., Asano S. and Takahashi, T. A.

IL-12 responsiveness and expression of IL-12receptor in human peripheral blood monocyte-derived cells.

J. Immunol., in press.

Enomoto, M., Nagayama, H., Sato, K., Xu, Y., Asano, S. and Takahashi, T.A.

In vitro generation of dendritic cells derived from cryopreserved CD34 positive cells mobilized into peripheral blood in lymphoma patients.

Cytotherapy, in press

Sato, K., Kawasaki, H., Nagayama, H., Enomoto, M., Morimoto, C., Tadokoro K., Juji, T., and Takahashi T.A.

TGF- β 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors.

J. Immunology, 164, 2285-2295, 2000.

Kashiwakura I., Kuwabara M., Inanami, O., Murakami, M., Hayase, Y., Takahashi, T.A., and Takagi, Y.

Radiation sensitivity of megakaryocyte colony-forming cells in human placental and umbilical cord.

Radiation Research, 153, 144-152, 2000.3.18

Sato, K., Nagayama, H., and Takahashi, T.A. Aberrant CD 3- and CD28mediated signaling events in cord blood T cells are associated with dysfunctional regulation of Fas ligand-mediated cytotoxicity. J. Immunol. 162, 4464, 1999.

Sato, K., Kawasaki, H., Nagayama, H., Serizawa, R., Ikeda, J., morimoto, C., Yasunaga, K., Yamaji, N., Tadokoro, K., Juji, T. and Takahashi, T. A.

Cochemokine receptors, CCR-1 and CCR-3, are potentially involved in antigen presenting cell function of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. Blood 93, 34, 1999

Sato, K., Nagayama, K., Tadokoro, T., Juji, T. and Takahashi, T.A.

Interleukin 13 is involved in functional maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. Exp. Hematol. 27, 326, 1999.

Sato, K., Nagayama, H., Tadokoro, T., Juji, T., and Takahashi, T.A.

Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38^{max} are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF- α -induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells.

J. Immunol 162. 3865, 1999.

分担研究報告

研究課題； I 近畿臍帯血バンクの現状とその移植成績
II. 臍帯血の ex vivo expansion と platelet formation
(PPF)からみた血小板産生

分担研究者	原 宏	(兵庫医科大学 輸血学 教授)
研究協力者	甲斐 俊朗	(兵庫医科大学 輸血部助教授)
	山口 雅生	(兵庫医科大学 輸血部)
	陳 明修	(兵庫医科大学 輸血部)
	緒方 肇	(関西医科大学 小児科講師)
	小川 啓恭	(大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学 助教授)
	河 敬世	(大阪府立母子健康総合医療センター 小児内科部長)
	迫 正廣	(大阪市立総合医療センター 小児内科部長)
	藺田 精昭	(京都府立医科大学衛生学 助教授)
	藤村 吉博	(奈良医科大学 輸血部教授)
	山本 益嗣	(兵庫医科大学 小児科助教授)
	横山 繁樹	(京都府赤十字血液センター 所長)

研究要旨 近畿臍帯血バンクを介した臍帯血移植の成績を報告すると共に、そのサブセンターの1つであり日本さい帯血バンクネットワークに参加している兵庫臍帯血バンクの活動を報告した。27例29回の移植成績の解析によると、HLA不適合移植が多数を占めるに係わらず重症GVHDの合併頻度は低く、移植有核細胞数と悪性疾患における移植病期が生存率の向上に有意の影響を及ぼしていた。CD41陽性細胞からのproplatelet formationにより血小板産生を検討すると臍帯血単核細胞をG-CSF・EPO・TPO・SCFの存在下で10日間液体培養することによりproplateletの産生の亢進が見られ、臍帯血移植後の血小板回復の遅延がex vivo expansionにより回避できる可能性が示唆された。

I. 近畿臍帯血バンクの現状とその移植成績

(1) 近畿臍帯血バンクの現状

1995年に地域臍帯血バンクの1つとして設立された近畿臍帯血バンクは6カ所の臍帯血バンク(奈良、関西医科大学、兵庫医科大学、京都府血液センター、京都府立医科大学、大阪大学)と各サブバンクに属する採取施設から構成されている。各サブバンクはそれぞれに臍帯血を採取・保存し、その臍帯血情報は兵庫医科大学輸血部に集積され、HLA等一部のデータはインターネット上で公開され、臍帯血移植認定病院の主治医が容易に検索出来るようなシステムが構築されている。そし

て、平成12年1月31日現在、既に31標本が移植に供給され、488標本が凍結保存(提供可能標本数は211標本、保存期間が6カ月未満で出生児の健康状況調査表が回収されていない仮登録標本が277標本)されている。

その間、1999年7月に臍帯血移植体制の整備を図り、全国的見地から公平かつ安全な臍帯血移植の推進を図ることを目的として、日本さい帯血バンクネットワークが発足した。この日本さい帯血バンクネットワークの発足に先立ち、厚生省の主導により各地域臍帯血バンクの査察が行われた。近畿臍帯血バンクにおいても種々の指導がなされ、現時点では

兵庫臍帯血バンクが日本さい帯血バンクネットワークを構成する8カ所の地域臍帯血バンクの1つとして認定され、兵庫臍帯血バンクとして参加し、年間400標本の臍帯血保存を目標に活動している。

(2) 兵庫臍帯血バンクの現状

兵庫臍帯血バンクにおける臍帯血採取から臍帯血標本としてバンクへ正式登録されるに至るまでの過程を表1に示した。

平成12年1月現在、10カ所の臍帯血採取施設があり、1995年のバンク設立以来平成12年1月末現在まで、臍帯血の受け入れ総数は780標本である。処理開始可能であった臍帯血標本数は375標本であり、その内凍結保存が可能であったものは341標本で、165標本が正式登録(14標本が移植に提供)され141標本が仮登録中、また35標本が廃棄された。処理開始ができなかった理由は採取量不足・書類の不備が多くそれに続いて、羊水混濁や家族歴の問題、24時間以上の経過などであった。凍結保存が可能であった標本の内、約90%が一旦仮登録され、9%(31標本)が仮登録前に廃棄された。仮登録前廃棄の原因としては表2に示したように母体血HBc抗体陽性、HLA判定不能が多くみられた。臍帯血採取後6カ月時の出生児健康状況調査票の回収率は約90%であり、そのうち2%は児に何らかの異常が認められたため廃棄処分になった。従って凍結保存標本のうち正式登録に至るのは約80%と考えられる。よって、年間400標本の保存のためにはその1.25倍の500標本を凍結保存する必要がある。最近2カ月の受け入れ臍帯血標本の内凍結保存に至るのは約70%と増加しているため、年間700~800標本を受け入れれば400標本以上の保存が可能となり、そのためには土、日、祝日を除いて1日に平均3標本を受け入れていく体制を作らねばならない。

(3) 近畿臍帯血バンクにおける臍帯血移植成績

A. 研究目的

近畿臍帯血バンクから提供された臍帯血標本を用いた非血縁者間臍帯血移植症例を対象として生着不全・GVHDの発症並びに生存率について検討した。

B. 研究方法

1997年9月から1999年11月15日までに、全国13カ所の移植施設において実施され近畿臍帯血バンクに報告された非血縁臍帯血移植27症例(29回)を対象として解析した。臍帯血は、奈良臍帯血バンク、兵庫臍帯血バンク、京都赤十字血液センター臍帯血バンクからそれぞれ12、12および5標本が提供された。

対象症例の内訳は表3に示した。造血器悪性腫瘍18例、非悪性疾患9例(移植回数;11回)である。造血器悪性腫瘍症例の移植病期別にみた予後良好群(初回寛解および第2寛解期移植)が9例、それ以外の病期の移植の予後不良群が9例であった。年齢、体重、輸注細胞数の中央値はそれぞれ4歳、17kg、 $3.8 \times 10^7/\text{kg}$ であった。急性移植片対宿主病(AGVHD)の予防法は表5に示した。シクロスポリン(CSA)が投与された症例が16例、タクロリムス(FK-506)が投与された症例が13例あった。前処置には種々の抗腫瘍剤・免疫抑制剤が投与されているが、放射線照射が併用された移植が15回、またATGが併用された症例が6例あった。

レシピエントと臍帯血のGVHDおよびHVG両方向のHLA適合度は、図1に示した。

移植後好中球絶対数が $500/\mu\text{l}$ 以上に回復し3日以上持続した最初の日を生着日とした。45日以上生存し好中球数が $500/\mu\text{l}$ 以上に到達しなかった例、および自己造血回復例を生着不全例とし、また、45日以降に好中球が $500/\mu\text{l}$ 以上に到達した例を生着遅延例とした。

死亡、白血病再発、生着不全、自己造血回復をeventとし、Kaplan-Meier法によりevent free survival(EFS)を求めた。

C. 研究結果

1) 輸注細胞数と感染症の合併及び生着不全・拒絶

移植後1ヶ月以内に細菌・真菌感染症を合併したかどうかを輸注細胞数との関係でみたのが図2である。細菌・真菌感染症合併例は非合併例に比較して有意に輸注細胞数が少なかった($3.7 \pm 1.5 \times 10^7/\text{kg}$ vs $6.6 \pm 3.7 \times 10^7/\text{kg}$, $p < 0.05$)。

生着の判断ができずに早期死亡した症例が3例(13、16および30日)、45日以上生存し好中球数が $500/\mu\text{l}$ 以上に到達しなかった例が7例でその内4例に再移植が行われている。また、好中球の回復が遅延し45日以降に $500/\mu\text{l}$ 以上に到達した例は1例あった。

生着不全は、造血器悪性腫瘍18例中3例(早期死亡3例は含まず)、非悪性疾患9例、11回の移植中4回に認められた。

生着不全・早期死亡群とそうでない群とで輸注細胞数を比較すると前者では有意に輸注細胞数が少なく($3.76 \pm 1.9 \times 10^7/\text{kg}$ vs $5.94 \pm 3.5 \times 10^7/\text{kg}$, $p < 0.05$)が(図3)、また生着不全とHLA適合度との間には関連を認めなかった。

2) 急性および慢性GVHDの発症頻度(表5)

急性GVHDの評価可能症例は21例で1度が8例、2度9例、3度1例であり、2度以上のGVHDが48%にみられたが3度以上の重症GVHDは5%であった。HLA-A,B血清学的検査、DR high resolution DNA typingによる6/6および5/6一致移植例と4/6および3/6一致移植例を比較しても2度以上のAGVHDの発症頻度には有意差を認めなかった。

慢性GVHDの発症頻度は評価可能症例16例中3例(19%)であった。

3) 生存率

造血器悪性疾患および非悪性疾患、HLA-A,B血清学的検査、DRB1 high resolution typingにおける6/6あるいは5/6一致移植群と4/6あるいは3/6一致移植群、2度以上の急性GVHD合併群および急性GVHD 0-1度群、造血器悪性疾患のstandard risk群とhigh risk群および輸注有核細胞数・CFU-GM数・CD34陽性細胞数の多寡により生存率を比較検討すると表6に示したように、造血器悪性疾患のstandard risk群とhigh risk群の間および輸注有核細胞数が $3.8 \times 10^7/\text{kg}$ 以上および未満の群の間のEFSに有意差を認めた。

D. 考察

臍帯血移植では一般に、骨髓移植と比較

して生着不全の頻度が高いといわれている。今回の集計結果でも早期死亡3例を除いた26回の移植中7回(27%)に生着不全が認められており、非悪性疾患に対する移植では11回の移植のうち4回(36%)と高かった。生着不全には、輸注細胞数・輸注幹細胞数、HLA適合度、移植前処置、輸血歴など種々の因子が関係していることが考えられるが、今回の検討ではHLA不一致数とは関係がなく、非悪性疾患に対する移植前処置も悪性腫瘍に対する移植前処置と同様強力な前処置が行われていた。輸注細胞数との関連を見ると、生着不全や早期死亡例は生着例に比較して有意に輸注細胞数が少なく、生着例においても輸注細胞数の少ない症例に死亡例が多くその死因の多くは感染症であった。

また、非悪性疾患の内、生着不全を来した症例は骨髓造血不全症および慢性肉芽腫症5例(7回)の内4回であり、免疫不全症4例は全例生着をみている。これらのことから、臍帯血移植の生着不全・拒絶対策としてHLA不一致度よりも、より多くの細胞を含む標本を選択し、移植前の免疫抑制に工夫を凝らす必要がある。

2度以上の急性GVHDが48%にみられたが3度以上の重症GVHDは5%であった。HLA6/6および5/6一致移植例と4/6および3/6一致移植例を比較しても2度以上の急性GVHDの発症頻度が若干増加するものの有意差は認めず、欧米の諸報告と比較して重症GVHDの発症頻度は低かった。

症例数が少ないこともあり単変量解析であるが種々の因子が生存率に及ぼす影響を検討したところ(表6)、悪性疾患におけるstandard risk群とhigh risk群、および輸注細胞数が $3.8 \times 10^7/\text{kg}$ 以上および未満の群の間のEFSに有意差を認め、悪性疾患と非悪性疾患、HLA不適合度、GVHD予防法、2度以上の急性GVHDの合併の有無、輸注CD34陽性細胞数やCFU-GM数の多寡はEFSに有意な影響は及ぼしていなかった。今後の症例の蓄積の解析を待つと同時に、多変量解析による解析が必要であると考えられる。

E. 結論

1、HLA不適合移植が多数を占めるに係わらず重症GVHDの合併頻度は低かった。

2、非悪性疾患、悪性疾患の EFS(2年)は 51%および 44%であり、悪性疾患では standard risk 群が high risk 群より有意に EFS が高かった(86% vs 20%; $p < 0.001$)。

3、 3.8×10^7 /kg 以上の有核細胞が輸注された症例はそれ未満の症例に比較して有意に EFS が高かった(65% vs 23%; $p < 0.05$)。

4、臍帯血有核細胞数が充分ある症例、特に予後不良因子を持つ白血病症例では初回あるいは第 2 寛解期に移植することにより成績の向上が期待できる。

II. 臍帯血の ex vivo expansion と platelet formation (PPF) からみた血小板産生

A. 研究目的

臍帯血移植後は血小板の回復が遅延する。臍帯血の ex vivo expansion により血小板産生の亢進がみられるかどうかを、巨核球コロニー形成細胞(CFU-Meg)の増幅および proplatelet formation から検討した。

B. 研究方法

臍帯血の ex vivo expansion の方法は図 4 に示した。凍結臍帯血を解凍後 2 回洗浄し、シリカ処理し単球を除去、得られた単核細胞を 30%AB 血漿、stemPro 34 にて 2×10^5 /ml に調整、G-CSF 20ng/ml、EPO 5U/ml、TPO 100ng/ml、SCF 100ng/ml の存在下で細胞培養バッグ内で 21 日間培養、随時、生細胞数、CFU-Meg を、また CD3、CD4、CD8、CD34、CD41 陽性細胞の比率を flow cytometer で測定した。

PPF の測定は、上記液体培養の day0 および day10 に CD41 陽性細胞を分離回収し、 4×10^3 個/200 μ l (20%AB 血漿、TPO 10ng/ml、1%BSA α -medium) の濃度で 96 穴マイクロプレートで培養、経日的に proplatelet を光学顕微鏡下で観察しその数を測定した。

C. 研究結果

臍帯血の ex vivo expansion の実験では、バッグ内の生細胞は図 5 に示したように day7 に最大 7 倍の増幅が得られた。フローサイトメトリーによる培養増幅細胞の表面抗原の解析から、day7 に増幅が得られた細胞は、CD41 陽性細胞、CD3 陽性細胞、CD4

陽性細胞でありそれぞれ 5.5 倍、2.5 倍、1.8 倍に増幅されたが、CD34、CD8 陽性細胞の増幅は認められなかった。

バッグ内で液体培養した細胞を経日的に採取し、巨核球コロニー形成細胞(CFU-Meg)を測定すると day10 に CFU-Meg 数はピークに達しその数は培養開始時の約 5 倍に増幅されていた(図 6)。

液体培養の day0 および day10 に分離回収した CD41 陽性細胞からの proplatelet formation(PPF)をみると、10 日間の培養により PPF 数のピークは 9 日から 7 日へとその時期が早くなりその数も増加した(図 7)。

D. 考察

凍結保存臍帯血を解凍しシリカ処理した単核球を G-CSF、EPO、TPO、SCF の存在下で培養したところ、day7 に最大 7 倍の増幅が得られた。また細胞表面抗原の解析から CD34 陽性細胞の増幅は認められず CD41 陽性細胞は 5.5 倍に増幅されていた。一方 CFU-Meg は day10 に培養開始前の約 5 倍に増幅されていた。day7 では施行しなかったが液体培養開始後 day10 の CD41 陽性細胞からの PPF を day0 の CD41 陽性細胞からの PPF と比較検討したところ PPF は 10 日の培養により早くなりその数も増加した。in vitro の実験成績であり、また血小板産生の直接的な証明ではないが、in vivo における血小板産生の亢進が期待できる結果である。

欧米では ex vivo expansion した臍帯血を無処理の臍帯血とともに移植する臨床応用が既に始まっている。今後、わが国においてもその臨床応用が待たれる。

E. 結論

G-CSF、EPO、TPO、SCF の存在下で 10 日間培養した臍帯血から分離した CD41 陽性細胞からの proplatelet の産生は、培養前のそれと比較して早くなっており、その絶対数も増加していた。

F. 研究発表

1、論文発表

1) 甲斐俊朗(1999)成人の臍帯血移植.臨床病理,臨時増刊(110),48-53.

- 2) 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.
 - 3) 原 宏(1999)おわりに-遺伝子治療を含めた未来への展開.臨床病理,臨時増刊(110),134-138.
 - 4) 甲斐俊朗,原 宏(1999)わが国の臍帯血移植の現状と展望.医学のあゆみ,190(5),536-539.
 - 5) 王 紅心,西岡啓介,五熊丈義,山口雅生,三澤真人,甲斐俊朗,原 宏(1999)造血幹細胞におけるテロメラーゼ活性の検討.兵庫医科大学医学会雑誌,24(1),43-48.
 - 6) 甲斐俊朗,原 宏(1999)臍帯血バンクの現状と未来像.日本輸血学会雑誌,45(4),549-552.
- 2、学会発表
- 1) 西岡 啓介,五熊丈義,三澤真人,甲斐俊朗,原 宏,辻野吉昭(1999)臍帯血よりのCD34+Lin-とCD34-Lin-中のSRC(SCID repopulating cells)の検討.第61回日本血液学会総会
 - 2) 甲斐俊朗,原 宏,河 敬世(1999)HLA-2抗原不一致非血縁臍帯血移植の臨床

- 成績.第61回日本血液学会総会
- 3) 幸道秀樹,浅野茂隆,甲斐俊朗,原 宏,高梨美乃子(1999)臍帯血バンクのネットワークの試み.第61回日本血液学会総会
 - 4) Hara, H., Kai, S., Fujibayashi Y., Takaki N., Misawa, M., Ogata, H., Ogawa, H., Sonoda, Y., Fujimura, H., Yokoyama, S.(1999)Cord Blood Bank in Japan.10th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion Western Pacific Region.
 - 5) 藤林由佳,高木斉子,国分寺 晃,前田和宏,郡谷哲男,谷脇清助,甲斐俊朗,原 宏(1999)近畿臍帯血バンク・サブセンターとしての兵庫臍帯血バンク.第43回日本輸血学会近畿支部総会
 - 6) 迫 正廣,河 敬世,原 宏.(1999)近畿臍帯血バンクを介して行った臍帯血幹細胞移植の成績.第61回日本血液学会総会
 - 7) 甲斐俊朗(1999)臍帯血移植における合併症:特に生着不全と感染症の合併に関して.第41回日本臨床血液学会総会
 - 8) 甲斐俊朗(1999)臍帯血幹細胞の今後の臨床応用.第43回日本輸血学会近畿支部総会

分担研究報告書

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

主任研究者 齊藤英彦 名古屋大学医学部 第一内科 教授

研究協力者 木村 宏 名古屋大学医学部 小児科学/成長発達医学 助手

小島勢二 名古屋大学医学部 小児科学/成長発達医学 教授

研究要旨；

臍帯血移植 3 症例において real-time PCR 法を用い 4 種のヘルペスウイルス DNA をモニタリングした。臍帯血移植患者では、移植後、高率にヘルペス属ウイルス感染症が発症する可能性があることが示唆された

A. 研究目的

臍帯血移植は、移植片が各種ウイルス抗原に全く感作されていない naive な細胞な為、ウイルス感染症の発生率の高さが危惧されている。我々は臍帯血移植症例において複数のヘルペス属ウイルスの血中 DNA 量を real-time PCR 法により経時的に追跡した。

B. 研究方法

対象は、非血縁者間での臍帯血移植を施行した小児 3 例。定期的に患児より採取した末梢血（白血球と血漿）検体につき CMV、HHV-6、EBV、VZV について PE/ABI の 7700 Sequence Detector System を用いて real-time PCR 法を行いウイルス DNA の定量を経時的に行った。CMV アンチゲネミア法も並行して測定し、比較した。

C. 研究結果

1. CMV, HHV6 は全例に、EBV が 2 例の血液中にウイルス DNA が検出され

た。VZV はいずれの症例からも検出されなかった。

2. CMV は症例 2, 3 ではアンチゲネミアよりも早期に CMV-DNA が検出された。CMV-DNA 量とアンチゲネミアの結果はほぼ相関しており、CMV-DNA 量は抗 CMV 療法に伴い減少した。

3. CMV と HHV-6 の DNA 量のピーク時に各ウイルスと関連あると考えられる臨床症状が観察された。

D. 考察

臍帯血移植患者では、移植後、高率にヘルペス属ウイルス感染症が発症する可能性があることが示唆された。Real-time PCR 法による CMV-DNA 量の測定はアンチゲネミアと同等かそれ以上の意義があると考えられた。本法により、複数のウイルス DNA 量の推移と病状の比較対比、各ウイルス DNA の検出時期、持続期間などを詳細に検討することが可能であり、臍帯血移植におけるウイルス感染

重症化のメカニズム解明に有用であると
考えられた。

E. 結論

臍帯血移植患者では、移植後、高率に
ヘルペス属ウイルス感染症が発症する可
能性があることが示唆された。Real-time
PCR 法はこれらのウイルス感染のモニタ
リング、発症メカニズムの解明に有用と
考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka N, et. al., Monitoring of four
herpesviruses in unrelated cord blood
transplantation, in preparation

2. 学会発表

田中直子 他、臍帯血移植における real-
time PCR 法によるヘルペス属ウイルス
感染症の重症化とそのモニタリング、第
47 回日本ウイルス学会学術集会・総会、
1999.11.9、横浜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告

研究課題	マウス <i>Delta1</i> の骨髄細胞の分化に及ぼす影響	
分担研究者	斎藤 英彦	名古屋大学医学部第一内科
研究協力者	矢崎 信	名古屋市立大学医学部小児科学教室
	水谷 圭吾	名古屋市立大学医学部小児科学教室
	松林 正	名古屋市立大学医学部小児科学教室
	小幡 裕一	愛知県がんセンター免疫学部
	高橋 利忠	愛知県がんセンター免疫学部

【目的】

Delta、*Serrate*と、そのレセプターであるNotchは、無セキツイ動物でもセキツイ動物でもよく保存されており、発生過程における細胞の運命決定に大きな役割を果たしている。*Delta*、*Serrate*は細胞の表面に発現し、隣接する細胞上のNotchを活性化させ、細胞の分化を抑制、あるいは誘導する。これらはショウジョウバエにおいてよく研究されてきたが、セキツイ動物においても4つの*Delta/Serrate*のホモログと、4つのNotchのホモログが同定されている。最近の研究では、マウスにおける*Delta*のホモログである*mDelta1*が、発生の早期の段階で必要不可欠であることがわかっている。また、細胞の癌化に関与していることも報告されている。し

かし、哺乳類の*Delta*の生物学的な働きや、細胞分化の過程で果たしている役割についてはまだ不明のことが多い。本研究では、Notchを発現し、分化能を有する細胞を、*mDelta1*を過剰発現させたL細胞と一緒に培養することにより、*mDelta1*の細胞分化に与える影響を検討した。

【方法】

*mDelta1*の全長cDNAを発現ベクター pCXN（阪大、宮崎純一教授より分与）に、センスならびにアンチセンス（コントロール）の方向に組み込み、遺伝子導入を行ったL細胞株を樹立した。これを用いて、マウスの骨髄細胞をGM-CSFを用いて培養する系で*mDelta1*が骨髄細胞の分化に及ぼす影響を検討

した。

マウスの骨髄細胞を、稲葉らの方法に従って培養するとmyeloid系に分化し、主に顆粒球、マクロファージ、樹状細胞に分化する。この培養を*mDelta1*導入L細胞の層の上で行い、骨髄細胞の分化の様子をフローサイトメトリーで解析した。

【結果および考察】

センスの*mDelta1*を導入したL細胞の上では、アンチセンスの*mDelta1*を導入したL細胞の上で培養した場合や、L細胞なしで培養した場合に比べ、

CD11c⁺CD11b⁺CD86⁺MHC classII⁺の樹状細胞への分化が促進された (Fig. 1)。すなわち、通常は培養6日目にCD11c⁺CD11b⁺の細胞は3割から4割にとどまるが、センス*mDelta1*導入L細胞上で培養した場合にはこれが7割をこえ、その多くがCD86⁺MHC classII⁺であることから、樹状細胞が増加したと考えられた。マイクロポアのあいたメンブレンで細胞接触を阻害した場合と、センスの*mDelta1*を導入したL細胞のconditioned mediumを加えて遺伝子導入をしていない通常のL細胞の上で同様に培養した場合には、この効果がみられなかったことから、細胞接触を介して*mDelta1*がGM-CSFの存在下で、樹状細胞への分化を促進させたと考えられた。

Delta/Serrate-Notchの情報伝達系は、細胞の分化を抑制する作用があることが知られているが、最近、分化を誘導することがあることも報告されている。しかし培養細胞を用いたin vitroの実験

では、我々がC2C12筋原細胞を用いて行ったように (第一回班会議で報告済み) Delta/Serrate-Notch情報伝達系によって分化が抑制された例はこれまでも報告されているが、樹状細胞への分化が誘導された例は報告されていなかった。我々の実験は、ほ乳類のDelta/Serrate-Notch情報伝達系の新たな機能を示したものと考えられる。

今後は、他の培養系でも実験を進め、臍帯血幹細胞の体外増殖技術への応用も検討していきたい。

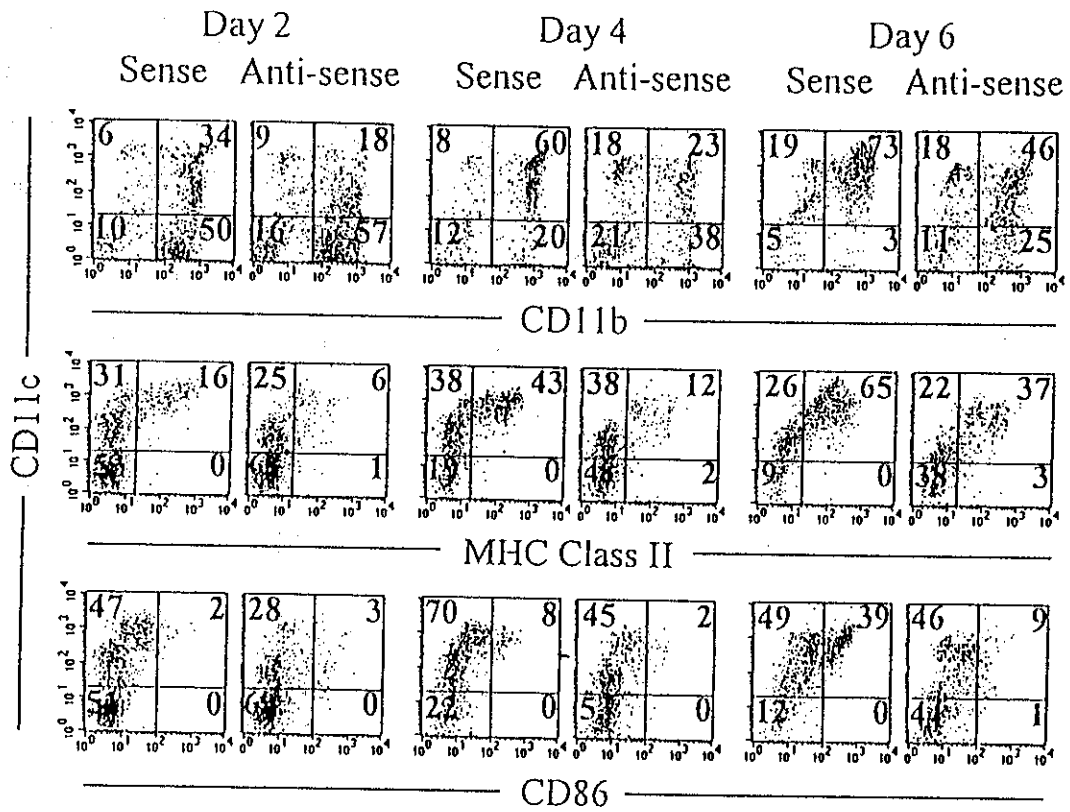


Fig. 1: Flow cytometric analysis of the bone marrow cells cultured on *mDelta1* transfected L cells in the presence of GM-CSF.

FACS profile of the bone marrow cells cultured on the L cells transfected with sense or anti-sense *mDelta1* stained with anti-CD11c, anti-CD11b, anti-MHC Class II, and anti-CD86 antibodies. The analysis was performed at days 2, 4 and 6 of culture.

分担報告書

HLA-DO遺伝子の多型性解析に関する研究

分担研究者 猪子 英俊 東海大学医学部分子生命科学系教授

研究協力者 成瀬妙子、河田寿子 東海大学医学部分子生命科学系

研究要旨

HLA-DO遺伝子は、DOA遺伝子とDOB遺伝子より構成され、これまで機能不明のクラスII様遺伝子とされてきたが、両遺伝子がヘテロダイマーを形成し、クラスII抗原提示機構において、DO-DM-DR分子複合体として機能している可能性が報告された。そこで今回、HLA-DOA、-DOBの両遺伝子について多型性解析を行い、その意義について考察を行った。結果、DOA遺伝子では、8種の多型が存在し、このうち6種が新たな塩基置換を伴う多型であることが明かとなったが、これら8種の多型はいずれもアミノ酸の変化を伴わない同義置換であった。DOB遺伝子では6種の対立遺伝子が発見され、それらのなかで第4エキソンにおいてアミノ酸の置換を伴う多型が認められた。以上の結果より、HLA-DO遺伝子はその機能上、非多型性を保つ淘汰が働いていたと想像される。

A. 研究目的

HLA-DO遺伝子は、DOA遺伝子とDOB遺伝子より構成され、1985年に発見されて以来、機能不明のクラスII様遺伝子とされてきたが、最近、両遺伝子がヘテロダイマーを形成し、クラスII抗原提示機構において、複合体としてDM分子の抗原ペプチド選択能を制御している可能性が報告された。さらに、DO分子はDM分子と共に、選択的にDR分子と複合体を形成し、抗原提示を効率よく機能させていることが推測されている。HLAクラスII抗原の一致は、造血幹細胞移植にとって必須であり、クラスII抗原提示に関わる遺伝子の臨床的意義を解明することは重要である。そこで今回、HLA-DOA、-DOBの両遺伝子について多型性解析を行い、その臨床的意義について考察を行った。

B. 研究方法

材料は、第10回国際組織適合性会議で公認されたHLA-D抗原ホモ接合体細胞と、我々が樹立した日本人由来D抗原ホモ接合体細胞計35種より抽出した高分子DNAを

用いた。ホモ接合体細胞供血者については、本研究により得られた結果及びHLAタイプなどの情報について、人権に配慮し、管理を徹底する旨を採血前に十分説明した上で、本人の同意を得て採血を行った。方法は、HLA-DOA遺伝子の第2～第5エキソン並びにHLA-DOB遺伝子の第1～第6エキソンを増幅するプライマーセット計10組をイントロン部に設定し、PCR (polymerase chain reaction)法にて増幅した。増幅後のPCR産物は簡易カラムにて精製後、蛍光自動シーケンサーを用いた直接塩基配列決定法にて塩基配列を決定した。

C. 研究結果

HLA-DOA遺伝子では、第2エキソンより第5エキソンの計7箇所において、8種の多型が存在し、このうち6種が新たな塩基置換を伴う多型であった。この6種はWHOのHLA命名委員会に公認され、DOA*01011、*0101201、0101202、0101203、01013、0101401、0101402、01015の名称を与えられた。全8種の多型はいずれもアミノ酸の変化を伴

わない同義置換であった。

DOB遺伝子では、第1エクソンより第6エクソンの計6箇所において6種の対立遺伝子が見いだされ、それらのなかで2種は第4エクソンのコドン208が既知の塩基配列のCTTからTTTに変化しており、LeuからPheへと、アミノ酸の置換を伴っていた。

D. 考察

HLA-DOA、-DOB遺伝子が、発見されて以来機能不明とされていたのは、他のクラスII遺伝子のようにA、Bの各遺伝子が隣り合って存在していなかったため、これら2つの遺伝子産物がヘテロダイマーを形成して、DO抗原として存在していることが不明であったことが影響している。また、DOB分子は他のクラスII分子とは異なり、インターフェロン γ (INF- γ)による誘導は完全には証明がなされていないことも一因でもあった。しかしながら、他のクラスII遺伝子と高い相同性を示しており、クラス抗原提示機構において、何らかの役割を担っている可能性が示唆されていた。

最近、DOA、DOB両遺伝子がヘテロダイマーを形成し、クラスII抗原提示機構においてHLA-DM分子の抗原ペプチドの選択能を向上させているという報告がなされ、さらにはDO-DM複合体が、選択的にDR分子を補助し、抗原提示における効率を向上させていることが示唆されている。このように、DO遺伝子がクラス抗原提示において重要な役割を担っているという報告が相次いだものの、DO遺伝子の多型に関する報告はこれまでほとんど無く、臨床的意義に関しても解析は行われていなかった。

我々の行った多型解析の結果、DOA遺伝子では計8種の対立遺伝子が見いだされ、WHOのHLA命名委員会に公認された。これらはいずれもアミノ酸の変化を伴わない同義的な変化であった。DOB遺伝子においては6種の対立遺伝子が見いだされ、特に

第4エクソンにおいてはアミノ酸の多型も認められた。しかしアミノ酸多型としてはDM遺伝子よりも、さらに多型性に乏しいことが明らかになった。

また、DOA、DOB遺伝子の対立遺伝子間や、DMB遺伝子やDRB遺伝子の特定の対立遺伝子との連鎖は認められなかった。

DO遺伝子はラットをはじめとしてウサギ、ヒツジ、ウシ、クジラなどの哺乳類にその存在が認められ、ヒトとの塩基配列レベルでの相同性は80%以上と、相同性が高いことが報告されており、種を超えてこの遺伝子がよく保存されていることが推測される。このことは、HLA-DO遺伝子は、クラスII抗原提示におけるその機能上、非多型であることが重要であると考えられ、進化の過程で現在に至るまで、非多型性を保つ淘汰が働いていたと推測される。

E. 結論

HLAクラスII抗原の抗原提示機構において、DR、DQ抗原分子の抗原提示能を向上させる役割を担っているHLA-DOA、DOB遺伝子は、共に極めて多型性に乏しいという、特徴的な結果がしめされた。このことから、DO遺伝子を構成するアミノ酸配列は、その機能上重要な役割を担っているが故に淘汰、保存されていると推測された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Naruse T K, Kawata H, Anzai T, Takashige N, Kagiya M, Nose Y, Nabeya N, Isshiki G, Tatsumi N, Inoko H. Limited polymorphism in the HLA-DOA region. Tissue Antigens 53 : 359 - 365, 1999.

2) 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.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.

9) Shiina T, Shimizu C, Oka A, Teraoka Y, Imanishi T, Gojobori T, Hanzawa K, Watanabe S, Inoko H : Gene organization of the quail major histocompatibility complex (MhcCoja) class I gene region. *Immunogenetics* 49 : 384-394, 1999.

10) 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 microsattellite mapping. *Am J Hum Genet* 64 : 1406-1410, 1999.

11) 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.

12) 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.

13) 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.
- 14) 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.
- 15) Anzai T, Naruse TN, Tokunga K, Honma T, Baba H, Akazawa T H. Inoko : HLA genotyping of 5,000 and 6,000-year old ancient bones in Japan. *Tissue Antigens* 54 : 53–58 1999.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Baba T, Ando A, Inoko H : Isolation and characterization of the swine MHC SLA-DNA cDNA clones. *Immunogenetics* 49 : 915–917, 1999.
- 19) Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuki 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kakalamani E, 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.

27) 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.

28) 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.

29) 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.

30) Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Shiina T, Inoko H, Kozaki T, Saitou N,

Narimatsu H : Assignment of the human a 1,3-fucosyltransferase IX gene (FUT9) to chromosome band 6q16 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 86 : 329-330, 1999.

31) 成瀬妙子, 猪子英俊. HLA-DMとは *Surgery Frontier* 6: 62-65, 1999.

2. 学会発表

1) 河田寿子, 成瀬妙子, 松澤由美子, 猪子英俊. リアルタイムPCR産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いた新しいHLA DNAタイピング法の開発. 第8回日本組織適合性学会大会. 1999年7月. 京都.

2) 成瀬妙子, 河田寿子, 安西達也, 鍵谷雅彦, 巽典之, 猪子英俊. HLA-DO遺伝子の多型性解析とその意義. 第8回日本組織適合性学会大会. 1999年7月. 京都.

3) 河田寿子, 成瀬妙子, 松澤由美子, 猪子英俊. リアルタイムPCR産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いた2 loci 同時DNAタイピング法の開発. 第29回日本免疫学会. 1999年12月. 京都.

4) 中島舞子, 成瀬妙子, 河田寿子, 安西達也, 鍵谷雅彦, 巽典之, 猪子英俊. HLA-DO遺伝子の非多型性の意義. 第29回日本免疫学会. 1999年12月. 京都.

分担研究報告書

移植後免疫学的再構成に関する研究

分担研究者 直江 知樹 名古屋大学医学部附属病院難治感染症部助教授
研究協力者 清井 仁 名古屋大学医学部附属病院難治感染症部講師
廣瀬 由佳 名古屋大学医学部附属病院難治感染症部

研究要旨； 臍帯血移植は、移植後の高度な免疫不全状態の招来が問題となっている。我々は、造血幹細胞移植のソースによる、移植後の免疫学的再構築の差異を解析し、臍帯血移植後免疫不全の原因を明らかにすることを目的とした。臍帯血 CD34(+)細胞および G-CSF 動員末梢血 CD34(+)細胞、ならびにそれらの *in vitro* 培養細胞において、IgH CDR3 の構造と B 細胞分化関連遺伝子の発現を比較し、前者において、より幼弱な傾向があることを明らかにした。臍帯血移植後初期には、抗体産生可能な成熟 B 細胞の割合が少ないために、液性免疫の回復が遅延している可能性が示唆された。

A. 研究目的

臍帯血移植は、新たな造血幹細胞移植のソースとして期待され、多くの利点を有する一方で、移植後の高度な免疫不全の招来が問題となっている。造血幹細胞移植後の免疫学的再構築に関して、B 細胞分化の観点からの詳細な検討は、なされておらず、B 細胞が移植後免疫にとって果たす役割についても、明らかではない。我々は、臍帯血中 CD34(+)細胞および *in vitro* で培養して得られた細胞について、IgH CDR3 の解析と、B 細胞分化関連遺伝子の発現の検討を行うとともに、G-CSF で動員された末梢血由来 CD34(+)細胞においても同様の解析を行い、比較検討することで、臍帯血と末梢血移植後の B 細胞の相違を明らかにしようと試みた。

B. 研究方法

1) 臍帯血より、CD34(+), CD5(+)/CD19(+), CD5(-)/CD19(+) B 細胞を分離し、DNA を抽出後、IgH V 領域 3' 末端と J 領域 3' 末端における共通塩基配列に基づいて作成したプライマーにより PCR 法にて IgH CDR3 を増幅後、クローニングを行い、ランダムにクローンをピ

ックアップし、塩基配列を決定した。

2) 臍帯血より、マグネビーズを用いて CD34(+)細胞を分離後、マウスストローマ細胞株 MS-5 上で SCF100ng/ml、G-CSF 10ng/ml 存在下に 6 週間の培養を行い、3 週、4 週、6 週目で得られた細胞において、CD10, CD19 陽性細胞の比率をフローサイトメーターで検討した。

3) CD34(+)細胞、培養 3, 4, 6 週目細胞より、DNA を抽出、上記 1) の方法で、IgH 遺伝子レパトア解析を施行した。

4) 同じく、RNA を抽出し、cDNA を作成。各種 B 細胞分化関連遺伝子の塩基配列を基に作成したプライマーを用いて、PCR 法で増幅し、その発現を検討した。この際、early pre-B から pre-B 段階の形質を示す、急性リンパ性白血病細胞株である HALO1 と UOCB1 を陽性コントロールとして用いた。

5) 化学療法後 G-CSF にて動員された末梢血単核球より、CD34(+)細胞を分離し、上記 2) 3) 4) と同一の手法を用いて、IgH 遺伝子レパトア解析と、B 細胞分化関連遺伝子の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

臍帯血の採取にあたっては、合併症や明らかな感染症を有さず経過した満期出産に際し、研究目的にのみ使用することのインフォームドコンセントを両親から得て行った。動員末梢血については、自家末梢血幹細胞移植目的にて、化学療法とG-CSFを用いて、末梢血に幹細胞を動員し、単核球分画を採取後、分離した単核球、CD34(+)細胞数が、移植に必要とされる数に対し、十分に過剰と思われる数を採取出来た患者に対して、患者本人および家族の同意を得て、その一部を使用した。

C. 研究結果

1. 臍帯血より分離したCD5(+)/CD19(+), CD5(-)/CD19(+)B細胞間におけるIgH遺伝子レパトアー解析の比較検討;

① D, J_H 遺伝子断片の使用頻度、N-nucleotide の長さ、CDR3 の長さには差を認めなかった。

② CD34(+)B細胞においては、D3(DXP)family 遺伝子断片、J6 遺伝子断片の高い使用頻度が特徴的であった(図1~3)。

2. 臍帯血および動員末梢血よりの培養で得られた細胞の、フローサイトメーターによる解析;

① 両者とも培養3週目には、CD10(+)/CD19(+)細胞の出現が認められ、週数を追って、次第にその頻度が増加してきた。

② 末梢血由来細胞においては、臍帯血由来細胞に比較して、CD10(+)/19(+)細胞の比率は、より高い傾向を示した(図4, 5)。

3. 臍帯血および動員末梢血由来培養細胞IgH遺伝子レパトアー解析結果の比較検討;

① 臍帯血および動員末梢血由来培養細胞間でD, J_H 遺伝子断片使用頻度、CDR3の長さには有意差は認められなかった。

② 臍帯血由来細胞間の培養3, 4, 6週目の比較では、特に培養初期の段階では、in frame の再構成頻度が有意に少なく、3週目では、in/out of frame は12/35 (in frame 比率25.5%)、4週目は11/16 (同40.7%)、6週目21/19 (同52.5%)であり、週数を追う毎に、in frame の再構成頻度が有意に増加した(図6)。

③ 動員末梢血においては、培養初期からin frame の再構成頻度が高いまま推移した(3週目; 75.0%、4週目; 58.8%、6週目; 58.3%) (図6)。

④ 臍帯血由来細胞と動員末梢血由来細胞の培養3週目同士でのin frame の再構成頻度は、動員末梢血由来細胞で有意に高かった(P=0.0003) (図6)。

4. B細胞分化関連遺伝子の解析;

① RAG1, RAG2, VpreB, λ5, MB1, PAX5 の発現は、臍帯血と動員末梢血の間で、大きな違いは認められなかった。即ち、

i) RAG1 および RAG2 は培養前のCD34(+)臍帯血細胞、動員末梢血細胞の双方に発現を認めず、培養後、発現を認めるようになった。

ii) VpreB, λ5, MB1, PAX5 は、培養前から発現しており、培養後も発現は変わらなかった。

② TdT は、臍帯血と動員末梢血の間で発現に違いを認めた; 培養前はCD34(+)臍帯血、動員末梢血ともに発現を認めないが、培養動員末梢血では、発現を認めるようになる一方で、臍帯血由来細胞では、6週間の培養期間を通して、発現が確認できなかった。(図7)

5. 培養細胞IgHレパトアーにおけるN-nucleotide数の検討; DNA再構成におけ