

20000426

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した
治療法の開発と普及に関する研究

平成12年度総括・分担研究報告書

主任研究者 小寺良尚

平成13(2001)年8月

厚生科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

Health Sciences Research Grants, Research on Human Genome,
Tissue Engineering Food Biotechnology, Ministry of Health, Labor and Welfare

造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した
治療法の開発と普及に関する研究

平成12年度総括・分担研究報告書

主任研究者 小寺良尚

名古屋第一赤十字病院第四内科、骨髄移植センター

緒言

2000年度(平成12年度)から複数省庁横断予算に基づく所謂ミレニアム研究が開始され、その中の厚生労働省系事業として「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」が発足したが、当「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究班」は、従来の造血細胞移植こそ再生医療を最も具現したものであるとの認識から、この中に位置づけられたものである。即ち、血液・骨髄系の細胞はもともと再生能力を有し、その特質を利用した同種ならびに自己造血細胞移植療法(同種骨髄、末梢血、臍帯血、自己骨髄、末梢血幹細胞移植ならびに同種リンパ球系細胞輸注-DLI)は、それまで不治の病とされてきた各種疾患、病態を有する患者に高い確率で治療と良好なQOLをもたらしてきたので、本研究班はこれら多様な同種、自己造血細胞移植を一体的に捉え、そのさらなる成績向上、適用範囲の拡大、ならびにドナーの負担の軽減を、同種又は自己由来の血液・骨髄系細胞の、自己修復、再生能力を最大限に引き出すことにより実践することを目的とした。そしてこれらを実践するための研究計画策定に当っては、ミレニアム研究に相応しい可能性と展望を含みつつも、今までのこの分野における研究成果を正しく継承するものにする事を心がけ、具体的には10の分担研究課題を3つのテーマに大別し、テーマ内では臨床研究などに関し共通プロトコルを定め、研究協力施設を一定数募ることによって効率の良い研究を進めることとした。以下にその概要を示す。

テーマー I 造血細胞移植から細胞治療へ。

- 1. DLI と細胞治療：** 血縁、非血縁者間造血幹細胞移植後の白血病再発例における DLI の実施、至適細胞数、投与スケジュールの確立。エフェクター細胞と認識抗原の同定 (NK 細胞と HLA-C 座抗原、T 細胞とマイナー抗原、BCR/ABL 遺伝子産物等腫瘍関連抗原との関係に特に重点を置く)。抗白血病作用を持ったエフェクター細胞 (特に T 細胞) の Ex vivo 増幅、Dendritic Cell によるエフェクター作用の増幅法の確立、治療応用。
- 2. 同種末梢血幹細胞移植。**： 血縁者間における実施と、それに基づく移植成績の評価、ドナーの短期、長期安全性の評価。非血縁ドナーへ本法を適応するための骨髄バンクシステムの整備。非血縁者間への本法の適用、成績、安全性の評価。骨髄移植との比較と本移植法の適応の確定。
- 3. 自家造血幹細胞移植並びに海外ドナーからの移植の推進。**： 我が国における自家造血幹細胞移植の、種類別、疾患別、病態別成績の評価、前治療法の評価。海外ドナーからの移植成績の人種別解析。成績向上に必要な要因の検討。共通プロトコルの策定。共通プロトコルの実施。
- 4. ミントランスプラント。** ミントランスプラントに最適な前治療法 (Fludarabine を中心とする非照射レジメ、TBI の減量等) の検討、第 I、II 相試験の実施。ミントランスプラントの共通プロトコルの策定。それに基づく臨床試験の実施と評価。上記移植法の適応の確定。
- 5. 成分移植。**： CD-34+精製造血細胞移植の生着に必要な条件並びに同一検体からの、リンパ球系細胞の再利用法の確立。精製造血細胞とリンパ球の分離移植の実施。上記移植法の適応の確定。

テーマーⅡ ヒト組織適合抗原の解析と応用。6. HLA-C 座抗原の役割の解析： HLA-C 座抗原適合、不適合非血縁者間骨髄移植例の予後をよりラージスケールで解析する。HLA-C 座抗原の NK 細胞に対する役割を検討する。至適造血幹細胞ドナーの選択基準の策定、C 座抗原の差異を利用した細胞治療法の検討（テーマーⅠとの共同作業）。7. HLA-DNA タイピングの意義の確立： HLA Class-I、Ⅱ抗原適合、不適合非血縁者間骨髄移植例の予後をよりラージスケールで解析する。HLA の各抗原の適合、不適合別成績を検討する。各抗原の移植抗原としての意義を確立する。HLA 血清学的タイピング法に代わる簡易な HLA の DNA タイピング法を確立する。8. マイナー抗原の解析： HLA 適合、HA-1 適合、不適合非血縁者間骨髄移植例の予後をよりラージスケールで解析する。HA-1 抗原の HLA を介した T 細胞に対する役割を検討する。至適造血幹細胞ドナーの選択基準の策定、HA-1 抗原の差異を利用した細胞治療法の検討（テーマーⅠとの共同作業）。9. ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索： 骨髄バンクを通じて行われたドナーと患者の DNA を用い、DNA チップによりマイクロサテライト多型を検索する。上記結果と移植成績との相関を検討する。上記遺伝子の中の、GVHD、拒絶等の原因遺伝子を同定する。テーマーⅢ. 膠原病に対する造血細胞移植—対象疾患拡大のモデルとして—。10. 膠原病に対する造血細胞移植： 膠原病における造血細胞移植療法の対象疾患（病態）の検討。同種移植、自家移植の選択に関する検討、情報収集。適応があると思われる膠原病を対象とした自家移植の実施。適応があると思われる膠原病を対象とした同種移植の実施。

以上の計画の下に一年間研究を行い、今ここに中間報告書を作成したわけであるが、例えば母児間移植の実施とか、活性化 CD4 細胞による DLI とか、当初の予想を越えて進展したものもあり、この領域における進化の多様性を実感している次第である。本報告書が班員、研究協力者、関係者各位の、今後の研究の指針、参考になれば幸いである。

平成 13 年 8 月
主任研究者 記

目 次

I. 研究事業の概要と分担研究課題	3
II. 研究組織	7
III. 平成12年度総括研究報告書	11
小寺良尚	
IV. 平成12年度分担研究報告書	
テーマ I. <u>造血細胞移植から細胞治療へ</u>	
1) DLTと細胞治療に関する研究	29
小寺良尚	
塩原信太郎	
佐尾 浩	
2) 同種末梢血幹細胞移植に関する研究	46
原田実根	
3) 自家造血幹細胞移植の確立と海外ドナーからの移植の推進に 関する研究	54
岡本真一郎	
小川啓恭	
4) ミニBMTに関する研究	60
高上洋一	
5) 成分移植に関する研究	65
浅野茂隆	
河 敬世	
テーマ II. <u>ヒト組織適合抗原の解析と応用</u>	
1) HLA-C座抗原の役割に関する研究	69
森島泰雄	
2) HLA-DNA タイピングの意義の確立に関する研究	74
笹月健彦	
3) マイナー抗原の解析に関する研究	79
十字猛夫	
赤座達也	
佐治博夫	
4) ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索	90
猪子英俊	
テーマ III. <u>膠原病に対する造血細胞移植 — 適応疾患拡大のモデルとして —</u>	
1) 膠原病に対する造血細胞移植	95
小池隆夫	
江崎幸治	
鳥飼勝隆	

V. 研究班会議発表者報告書

1. 平成12年度第一回研究班会議

平成12年6月3日(土) 午後1時～午後5時

会場 名古屋第一赤十字病院 第二会議室

I. 主任研究者 挨拶

II. 研究計画報告

テーマⅠ. 造血細胞移植から細胞治療へ

- 1) ① EBV-LPD に対する非血縁ドナーからの DLT2 例—細胞治療の初期モデルとして
② 非放射性物質を用いたリンパ球細胞障害活性測定法の検討
小寺良尚 名古屋第一赤十字病院第四内科、骨髄移植センター 106
- 2) ① GVL 効果に関与する mHa の検討—DLI (T) により GVL 効果の得られた
CML 慢性期再発 9 症例の mHa の解析結果—
② 「CML 再発に対する DLI 後の GVL 効果発現に関する臨床研究」の提案
塩原信太郎、近藤恭夫 金沢大学医学部 輸血部 108
- 3) 予後因子としての染色体異常を base にした各種造血幹細胞移植 (自家移植、血縁 BMT、
非血縁 BMT) の治療成績の比較 — 日本造血細胞移植学会、全国データ集計より 110
小川啓恭 大阪大学医学部 第三内科
- 4) 同種末梢血幹細胞移植の問題点と課題 112
竹中克斗、原田実根 岡山大学医学部 第二内科
- 5) 「自家造血幹細胞移植の確立」と「海外ドナーを用いた同種造血幹細胞移植の位置づけ」
—研究計画— 114
岡本真一郎 慶應義塾大学医学部 内科
- 6) 骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植に関する研究 116
神田善伸、高上洋一 国立がんセンター中央病院 内科
- 7) 増幅幹細胞移植の臨床応用に向けて 118
辻 浩一郎、浅野茂隆 東京大学医科学研究所 内科

テーマⅡ. ヒト組織適合抗原の解析と応用

- 8) HLA-C, HLA-E 抗原の役割 120
森島泰雄 愛知県がんセンター病院 血液化学療法部
- 9) HLA-DNA タイピングの意義の確立 122
笹月健彦 九州大学・生体防御医学研究所 遺伝学部門
- 10) 免疫関連分子多型の移植への影響 123
石川善英、十字猛夫 日本赤十字社中央血液センター
- 11) 母児免疫とマイナー組織適合性抗原の視点から SCT を考える 124
佐治博夫 HLA 研究所
- 12) 日本人の HLA 頻度について 報告文書なし
赤座達也 日本赤十字社中央血液センター
- 13) マイクロサテライト多型を用いたゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索 126
猪子英俊 東海大学医学部 分子生命科学 2

テーマ III. 膠原病に対する造血細胞移植—適応疾患拡大のモデルとして—

- 14) 難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植 報告文書なし
小池隆夫 北海道大学医学部 第二内科
- 15) 乳癌に対する自己PBSCT後に慢性関節リウマチの症状の改善を得た1例 127
丸山文夫、江崎幸治 藤田保健衛生大学 内科

2. 平成12年度第二回研究班会議

平成13年2月10日(土) 午前10時～午後1時30分
会場 東京医科大学 第一研究教育棟第二講堂

I. 主任研究者挨拶並びに報告:

- 造血細胞移植の現状、問題点、将来 131
小寺良尚 名古屋第一赤十字病院第四内科、骨髄移植センター

II. 分担研究報告

テーマ I. 造血細胞移植から細胞治療へ

- 1) HLA 不一致血縁者間骨髄移植後の再発に際し、活性化CD4リンパ球輸注を
施行したAMLの1例 133
加藤剛二 松山孝治 小寺良尚 名古屋第一赤十字病院 骨髄移植センター
山本興太郎¹⁾ 関根 軍彬²⁾ 1) 東京医科歯科大学 2) 株式会社リンフォテック
- 2) 造血幹細胞移植における活性化Tリンパ球のDLIへの応用 135
伊藤仁也 旭川医科大学 小児科
- 3) ① Y染色体特異的マイナー組織適合抗原のGVHDおよびGVL効果への関与 137
② CML再発例に対するDLI後のGVL効果発現に関する臨床研究 138
① 塩原信太郎 ② 中尾眞二 金沢大学医学部 輸血部/第三内科
- 4) 骨髄移植後GVHDにおけるHHV-6の関与 139
工藤寿子 小島勢二 名古屋大学大学院 成長発達医学
- 5) 当科における同種末梢血幹細胞移植の治療成績 141
原田実根 岡山大学医学部 第二内科
- 6) 自家造血幹細胞移植の確立 143
岡本真一郎 慶應義塾大学医学部 内科
- 7) 自家造血幹細胞移植の治療成績 145
小川啓恭 大阪大学医学部 分子病態内科学 血液腫瘍学
- 8) 骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植に関する研究 147
神田善伸、高上洋一 国立がんセンター中央病院 内科
- 9) 多発性骨髄腫に対するミニ移植 報告文書なし
吉田 喬 富山県立中央病院 内科
- 10) 効率的な体外増幅法のためのヒト造血幹細胞の純化に関する研究 149
辻 浩一郎 浅野茂隆 東京大学医科学研究所先端医療研究センター

テーマ II. ヒト組織適合抗原の解析と応用

11) 移植免疫反応とHLA-C, E 抗原	151
赤塚美樹 森島泰雄 愛知県がんセンター 腫瘍免疫部/血液化学療法部	
12) HLA の DNA タイピングの普及に関する研究	152
山本 健 笹月健彦 九州大学・生体防御医学研究所 遺伝学部門	
13) ① TNF 遺伝子多型の移植への影響	154
② 日本人 HLA-A, B, DR の DNA 検査法の改良	156
① 石川善英、② 坂内 誠 赤座達也 十字猛夫 日本赤十字社中央血液センター	
14) マイナー組織適合性遺伝子検索のためのゲノムワイドな多型マイクロサテライトの 収集	報告文書なし
猪子英俊 東海大学医学部 分子生命科学2	
15) 新規に同定されたマイナー抗原 HA-8 とその臨床的意義	158
赤塚美樹 森島泰雄 愛知県がんセンター 腫瘍免疫部/血液化学療法部	
16) 母児免疫寛容の指標としてのマイクロ・キメリズム	160
佐治博夫 丸屋悦子 特定非営利活動法人HLA 研究所	
17) 母子間マイクロキメリズムの HLA 不適合造血細胞移植への応用	162
一戸辰夫 ¹⁾ 玉木茂久 ²⁾ 1) 京都大学医学部附属病院 第一内科 2) 山田赤十字病院 内科	

テーマ III. 膠原病に対する造血細胞移植—適応疾患拡大のモデルとして—

18) 重症強皮症患者への末梢血幹細胞移植	報告文書なし
小池隆夫 北海道大学医学部 第二内科	
19) 自家造血幹細胞移植を用いた難治性若年性関節リウマチの治療	164
河 敬世 大阪府立母子保健総合医療センター 小児血液	
20) 造血幹細胞移植の適応拡大に向けて —膠原病合併症例における現状—	166
深谷修作 鳥飼勝隆 藤田保健衛生大学 感染症・リウマチ内科	

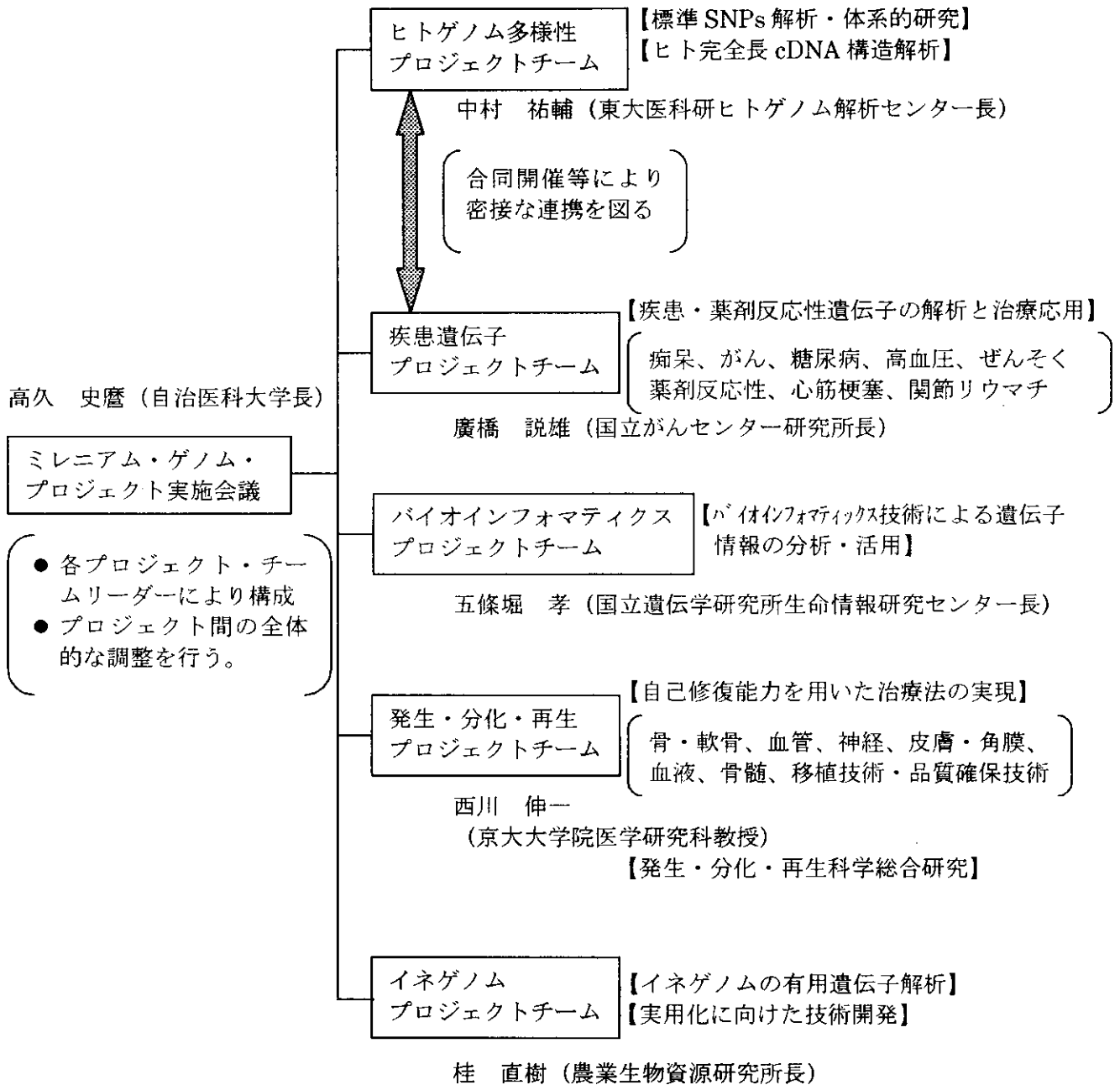
VI. (財)ヒューマンサイエンス振興財団「平成12年度ヒトゲノム・再生医療等研究事業」に 基づく研究班事業報告並びに研究実績報告書	169
VII. 公開シンポジウム記録	175
VIII. 研究班会議記録	179
IX. 資料	
1) 同種末梢血幹細胞ドナー登録システム	183
2) 同種末梢血幹細胞ドナー登録状況	184
3) 海外の同種末梢血幹細胞ドナーにおける死亡事例等に関する文献学的考察	200
4) 日本骨髄バンク患者さん相談窓口 (Patient Advocacy) に関する報告	205

I. 研究事業の概要と分担研究課題

ミレニアム・ゲノム・プロジェクトの推進体制

ミレニアム・ゲノム・プロジェクト評価・助言会議

議長： 井村 裕夫（科学技術会議議員）
 副議長： 豊島 久真男（厚生科学審議会会長）
 委員： 寺田 雅昭（国立がんセンター総長）他10名



- 各プロジェクトチームはチームリーダーの下個別事業毎の研究代表者により構成。
- 各事業間、各実施機関間の連携、進捗調整や研究成果の相互利用等の事業調整、積極的な情報交換を行う。

発生・分化・再生プロジェクト・チーム

リーダー	西川 伸一	京都大学大学院医学研究科 教授 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター グループディレクター
(発生・分化・再生)		
	相澤 慎一	熊本大学発生医学研究センター 教授 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター グループディレクター
	上野 直人	岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所 教授
	勝木 元也	東京大学医科学研究所 教授
	古市 貞一	理化学研究所脳科学総合研究センター発生・分化研究グループ 分子神経形成研究チーム チームリーダー
	中辻 憲夫	京都大学再生医科学研究所 教授
(骨・軟骨)		
	上田 実	名古屋大学医学部 教授
	糸満 盛憲	北里大学医学部整形外科学 教授
(血管)		
	永井 良三	東京大学大学院医学研究科 教授
(神経)		
	高坂 新一	国立精神・神経センター神経研究所 代謝研究部長
(皮膚・角膜)		
	黒柳 能光	北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センター 教授
	島崎 修次	杏林大学医学部 教授
	坪井 一男	東京歯科大学角膜センター 教授
(血液・骨髄)		
	小澤 敬也	自治医科大学医学部 教授
	* 小寺 良尚	名古屋第一赤十字病院 骨髄移植センター長
	齋藤 英彦	名古屋大学医学部 教授
(移植技術)		
	立石 哲也	東京大学大学院工学系研究科(機械工学専攻)再生医工学研究室 教授 通商産業省工業技術院産業技術融合領域研究所 統括融合研究官
	野本 亀久雄	日本移植学会 理事長
	早川 堯夫	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部長

* 厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究
 主任研究者 小寺 良尚
 (名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター)

テーマ1 造血細胞移植から細胞治療へ

- 1-1 DLTと細胞治療に関する研究
小寺 良尚 (名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター)
- 1-2 同種末梢血幹細胞移植に関する研究
原田 実根 (岡山大学医学部 第二内科)
- 1-3 自家造血幹細胞移植の確立と海外ドナーからの移植の推進に関する研究
岡本 真一郎 (慶應義塾大学医学部 内科)
- 1-4 ミニBMTに関する研究
高上 洋一 (国立がんセンター中央病院 内科)
- 1-5 成分移植に関する研究
浅野 茂隆 (東京大学医科学研究所 内科)

テーマ2 ヒト組織適合抗原の解析と応用

- 2-1 HLA-C座抗原の役割に関する研究
森島 泰雄 (愛知県がんセンター病院 血液化学療法部)
- 2-2 HLA-DNA タイピングの意義の確立に関する研究
笹月 健彦 (九州大学生体防御医学研究所 遺伝学部門)
- 2-3 マイナー抗原の解析に関する研究
十字 猛夫 (日本赤十字社中央血液センター)
- 2-4 ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索
猪子 英俊 (東海大学医学部 分子生命科学2)

テーマ3 膠原病に対する造血細胞移植—適応疾患拡大のモデルとして—

- 3-1 膠原病に対する造血細胞移植
小池 隆夫 (北海道大学大学院医学研究科 第二内科)

II. 研究組織

平成12年度 厚生科学研究「造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した
治療法の開発と普及に関する研究」班

研究組織

	氏名	所属
主任研究者	小寺良尚	名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター
分担研究者	原田実根	岡山大学医学部 第二内科
	岡本真一郎	慶應義塾大学医学部 内科
	高上洋一	国立がんセンター中央病院 薬物療法部
	浅野茂隆	東京大学医科学研究所 分子療法研究分野
	森島泰雄	愛知県がんセンター病院 血液化学療法部
	笹月健彦	九州大学生体防御医学研究所 遺伝学部門
	十字猛夫	日本赤十字社中央血液センター
	猪子英俊	東海大学医学部 分子生命科学2
	小池隆夫	北海道大学大学院医学研究科 第二内科
研究協力者	小川啓恭	大阪大学医学部 分子病態内科学
	河敬世	大阪府立母子保健総合医療センター 小児血液科
	佐治博夫	HLA研究所
	濱口元洋	国立名古屋病院 血液内科
	赤座達也	日本赤十字社中央血液センター 研究部
	佐尾浩	名鉄病院 血液内科
	江崎幸治	藤田保健衛生大学 内科
	鳥飼勝隆	藤田保健衛生大学 感染症リウマチ科
	塩原信太郎	金沢大学医学部附属病院 輸血部
	加藤俊一	東海大学医学部 小児科
	宮村耕一	東北大学医学部 免疫・血液病制御学
	赤塚美樹	愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫部
	伊藤仁也	旭川医科大学 小児科
	小島勢二	名古屋大学大学院医学研究科 発育加齢医学
	土肥博雅	広島赤十字・原爆病院 第四内科
	松山孝治	名古屋第一赤十字病院 小児医療センター血液腫瘍科
	森下剛久	愛知県厚生連昭和病院 内科
	恵美宣彦	名古屋大学大学院医学研究科 病態内科学
	浜島信之	愛知県がんセンター研究所 疫学部
	吉田喬	富山県立中央病院 内科
	鈴木律朗	愛知県がんセンター研究所 化学療法部
	玉木茂久	山田赤十字病院 内科
	一戸辰夫	京都大学大学院医学研究科 血液病態学
	関根軍彬	リンフォテック株式会社

Ⅲ. 平成12年度総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

造血細胞の自己修復能力、再生能力を利用した治療法の開発と普及に関する研究

主任研究者 小寺良尚 名古屋第一赤十字病院 骨髄移植センター長

研究要旨 Ex vivo で活性化した CD4 陽性細胞を用いた DLI の有用性を示した。同種末梢血幹細胞移植ドナー・患者の短、中長期安全性を 100% フォロウアップする体制を構築した。自家造血幹細胞移植 5,000 余例を後方視的に解析し同移植法の適応を確立するための基礎データを得た。ミニ トランスプラントの第 1 相試験を行ない、その安全性を確認した。HLA-C 座抗原の不適合が移植後の白血病再発を抑止することを確認した。SSOP 法による HLA-DNA タイピング結果と従来の血清学的タイピング結果との整合性を確認した。造血幹細胞移植後の膠原病の転帰に関する全国調査を実施するとともに、それを背景として成人強皮症に対する自家末梢血幹細胞移植を実施し、症状の著明な改善を得た。

分担研究者

小寺良尚 名古屋第一赤十字病院骨髄
移植センター長
原田実根 岡山大学医学部第二内科教授
岡本真一郎 慶應義塾大学内科学講師
高上洋一 国立がんセンター中央病院
薬物療法部医長
浅野茂隆 東京大学医科学研究所病院長
森島泰雄 愛知県がんセンター病院
血液化学療法部部長
笹月健彦 九州大学生体防御医学研究所
遺伝学部門教授
十字猛夫 日本赤十字社中央血液
センター所長
猪子英俊 東海大学医学部教授
小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科
第二内科教授

A. 研究目的

血液・骨髄系の細胞はもともと再生能力を有し、その特質を利用した同種ならびに自己造血細胞移植療法(同種骨髄、末梢血、臍帯血、自己骨髄、末梢血幹細胞移植ならびに同種リンパ球系細胞輸注;DLI)は、それまで不治の病とされてきた各種疾患、病態を有する患者に高い確率で治癒と良好な QOL をもたらしてきた。本研究はこれら多様な同種、自己造血細胞移植を一体的に捉え、日本人の人種的均質性に支えられた良好な同種造血細胞移植成績に基盤を置きつつ、そのさらなる成績向上、適用範囲の拡大、ならびにドナーの負担の軽減を、同種又は自己由来の血液・骨髄系細胞の、自己修復、再生能力を最大限に引き出すことにより実践することを目的とする。

B. 研究方法

研究課題:DLI と細胞治療においては、CML 移植後再発例に対し実施した DLI において CDR3 size spectratyping 法により、末梢血および骨髄中の T 細胞レパトアの変化と GVL 効果の発現について解析した。幹細胞ドナー由来の ex vivo 活性化 T 細胞を用いた DLI を実施するために、ドナー末梢血 20mL を Ficoll 比重遠沈法により単核球に分離後、OKT3 固相化フラスコを用い 700U/mL IL-2 添加 RPMI 中にて 3 日間培養、magnet immunobeads 法にて CD4 陽性細胞に分離した後さらに活性化培養を 2 日間継続し、次に CD4 陽性細胞をガス透過性バッグに移し、175U/mL IL-2 添加 AIM 培地にて 6~8 日間培養、輸注細胞数の目安を 5×10^7 /Kg とし約 1000 倍に増幅した。輸注前には安全試験として細菌培養試験およびエンドトキシン定量を行ない、合格したものを投与することとした。

研究課題:同種末梢血幹細胞移植では日本造血細胞移植学会との共同作業により同移植法が 2000 年 4 月健保適用を受けてから行われた全国の症例を対象に、ドナー及び患者の短、中、長期安全性に関し 100% フォロアップする体制を構築し、前方視的比較試験実施のための基盤を整備するとともに、海外におけるドナーの有害事象例について文献学的検討を行なった。

研究課題名:自家造血幹細胞移植並びに海外ドナーからの移植の推進においては、同移植法を自己修復能力に基づく再生医療のモデルとして捉え、今までに我が国において行われた 5214 例の自家造血幹細胞移植例を後方視的に解析した。

研究課題名:ミニ トランスプラントについて

は 26 例の第一相試験を実施し、本移植法が安全に施行し得るか否かを検討するとともに多施設共同研究のプロトコルを検討した。

研究課題名:HLA-C 座抗原の役割の解析においては我が国で行われた非血縁者間骨髄移植のドナー-患者 1298 ペアの HLA を DNA レベルで解析し、HLA-C の適合性と移植後 GVHD、再発、生存との関係をラージスケールで検討した。

研究課題名:HLA-DNA タイピングの意義の確立並びに、マイナー抗原の解析並びに DNA タイピング法の普及では日本人 HLA-A,B,DR 検査法の改良を目的として SSOP 法と血清学的タイピング法の比較を行なった。

研究課題名:膠原病に対する造血細胞移植においては全国 164 施設において行われた 8,667 例の造血幹細胞移植の内、18 例の膠原病の転帰について調査を行なうとともに、これら調査を背景に成人強皮症患者に自家精製 CD-34+末梢血幹細胞移植を実施した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の実施に当ってはプロトコルを定め実施施設の倫理委員会の承認を得るとともに、患者、ドナーの同意を文書で取得した後行なっている。各種造血細胞移植療法の成績等その可能性と限界については、造血細胞移植学会、骨髄移植推進財団等からのデータを逐一情報開示している。

C. 研究結果

研究課題:DLI と細胞治療においては、CML 移植後再発例に対し実施した DLI 後、末梢血、骨髄中の T 細胞レパトアを解析し、BV24 陽性 T 細胞のクローン性増殖が、初め

は末梢血に、その後骨髓に見られる事を明らかにした。このT細胞クローンはPh染色体陽性細胞(腫瘍細胞)がDLI効果により消失するとともに減少し、腫瘍細胞が残存すると持続することから、DLIのエフェクター細胞である可能性が示唆された。ドナーのCD-4陽性T細胞を、IL-2を含む固相培地で6~8日間に1000倍に増幅した活性化T細胞による移植後再発急性白血病の治療が行なわれ、重篤なGVHDを併発する事無く寛解を得る事が出来、DLIより効果的でより安全な細胞治療法になる可能性が示された。

研究課題:同種末梢血幹細胞移植では日本造血細胞移植学会との共同作業により同移植法が2000年4月健保適用を受けてから行われた全国の症例を、ドナー及び患者の短、中、長期安全性を100%フォローアップする体制を構築した。10ヶ月半の間に600例の同種末梢血幹細胞採取、移植がなされ、ドナーの比較的軽微な有害事象は9例報告されたが生命予後に関するものは今のところ見られない。骨髓移植に比べ血液学的回復が速く感染症等のリスクが減る一方、GVHDの頻度が高まること、生存率は等しい事が後方視的な解析で示されたので、両者の適切な実施規準を定める目的で、前方視的比較試験を計画している。海外において同種末梢血幹細胞ドナーの死亡事例があったとの情報に基づき文献学的検討を行なった結果、8例の採取関連死亡例があること、これらドナーは全て何らかの疾病を有しており健常者ではなかったことが明らかになった。

研究課題名:自家造血幹細胞移植並びに海外ドナーからの移植の推進は、自己修復能力に基づく再生医療のモデルであり、今

までに我が国において行われた5214例の自家造血幹細胞移植例を後方視的に解析した。その結果白血病、悪性リンパ腫瘍など血液系腫瘍で骨髓、末梢血幹細胞移植間で差が無いこと、乳癌では末梢血幹細胞移植が優れる事が明らかになった。既に多数例が実施されているこの領域では化学療法など他の治療法と背景因子を併せた後方視的検討を厳密に行ない、本治療法の位置付けを確立する予定である。

研究課題名:ミニトランスプラントについては26例の第一相試験が実施され、Grade-IVのGVHDが2例に発生し死亡した以外は、移植後早期死亡例は無く本移植法が安全に施行し得ることを確認するとともに多施設共同研究のプロトコールを定めた。

研究課題名:HLA-C座抗原の役割の解析においては我が国で行われた非血縁者間骨髓移植のドナー-患者1298ペアのHLAがDNAレベルで解析され、HLA-Cのみの不適合移植例における移植後3年再発率が19.6%と、HLA全て適合例の再発率26.2%、A又はBのみ不適合例の再発率31.5%、DR不適合例のそれ23.4%に比べ低く、HLA-Cの不適合が再発抑制的に働くことがラージスケールで確認された。

研究課題名:HLA-DNAタイピングの意義の確立並びに、マイナー抗原の解析並びにDNAタイピング法の普及では日本人HLA-A,B,DR検査法の改良を目的としてSSOP法と血清学的タイピング法の比較を行なった結果、良好な相関があることを確認した。

研究課題名:膠原病に対する造血細胞移植においては全国164施設において行われた8,667例の造血幹細胞移植の内、18例の膠原病の転帰について調査がなされ、移

植後7例が軽快、8例が不変、3例が悪化、5例が不明、との結果を得た。これら調査を背景に成人強皮症患者に自家精製 CD-34+末梢血幹細胞移植が実施され、症状の著明な改善が得られた。

D. 考察

DLI は造血幹細胞移植から派生した最もプリミティブな細胞治療法であり造血幹細胞移植後の EBV-LPD 並びに慢性骨髄性白血病慢性期再発に有用であって、健康保険適用医療行為になっているが、移植後再発急性白血病や骨髄異形成症候群には効果が少ない。活性化 CD4 陽性細胞を用いた DLI は、ドナーにおいてはわずか 20ml 程度の採血で済み、患者においては従来の DLI の副作用であった GVHD が少なく急性白血病等にも有効であって、次世代の DLI として位置づけられよう。同種末梢血幹細胞移植は 2000 年 4 月の健保適用以降 2000 年度一年間で 683 例の採取(移植)が実施され、既に血縁者間では骨髄移植に置き換わりつつあり、本移植法がドナー、患者、移植チームにとって骨髄移植より馴染みやすい治療法であることを物語っている。しかしながら他方海外文献に基づく検討により少なくとも 8 例のドナー死亡が確認されており(いずれもドナーは有病者であった)、一定の年齢内にある“健常者をドナーとする”という、同種造血幹細胞移植における鉄則を守るとともに、患者における骨髄移植との前方視的比較検討が急務と思われた。自家造血幹細胞移植は自己修復能力を利用した再生医療を既に具現しているものとして捉える事が出来、化学療法等では再発の危険が高いが、同種移植をするほどではない、とい

た所謂中等度悪性腫瘍に対し、治癒を望み得る治療法として位置づけられる事が予測されるが、対象疾患、移植時病期、前治療法等の適正化についてより詳細な後方視的検討を加えたい。ミニートランスプラントに関しては、プロトコールを定めた上、多施設共同研究を開始する時期に来ていると考える。HLA-C 座抗原不適合ドナーを移植後再発のリスクが高い患者に優先的に仲介する骨髄バンクシステムの構築は非血縁者間骨髄移植の成績向上に貢献するとともに、敢えて C 座不適合ドナーを選ぶ事により、再発のリスクが高い症例に対応する、といった選択も可能になろう。簡便な DNA タイピング法実施システムの整備に基づく HLA タイピング能力の飛躍的な向上は、骨髄ボランティアドナー集団登録を可能にし、非血縁ドナー数の拡大に寄与するものと思われる。膠原病の中でも致死率の高い強皮症、若年性関節リウマチに対し自家 CD34+細胞移植が有用であることが示されたので、症例数を増やし長期観察に備えたい。

E. 結論

多様化した造血細胞移植療法は自己修復能力、再生能力を利用した治療法の具体的事例であり、難治血液病、固型癌、更には膠原病に治癒をもたらしつつあるが、当研究を介して得られた、ドナーリンパ球の利用、末梢血幹細胞の利用、ヒト組織適合抗原の利用に関する新しい情報は、それらにおける成績の更なる向上に貢献しつつある。

F. 健康危険情報

同種末梢血幹細胞ドナーに関する有害事象につき海外情報をも含めた文献学的検討を

行なった結果、海外において少なくとも 8 例の死亡事例が存在する事が明らかになった。ドナーはいずれも有病者であり、肉親を救うためドナーになったものと思われ、同種造血細胞移植ドナーは健常者でなければならないとする原則を逸脱したものであった。我が国で行われた 2000 年度一年間の 683 例の同種末梢血幹細胞ドナーには幸い生命予後に関するような有害事象は報告されていないが、今後我が国でも十分起こり得る事であるのでここに報告する(資料-3)参照)。尚、本件に関しては本年 2 月に、日本造血細胞移植学会から全国約 1,200 の同種末梢血幹細胞移植実施施設(含 実施予定施設)に緊急案全情報として通知された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yokozawa T, Towatari M, Iida H, Takeyama, K, Tanimoto M, Kiyoi H, Motoji T, Asou N, Saito K, Takeuchi M, Kobayashi Y, Miyawaki S, Kodera Y, Ohno R, Saito H and Naoe T for Japan adult leukemia study group : Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27^{kip1} in acute myeloid leukemia. *Leukemia.*, 14 : 28-33, 2000

2) Iida H, Towatari M, Iida M, Tanimoto M, Kodera Y, Anthony M. Ford, Saito H: Protein expression and constitutive phosphorylation of hematopoietic transcription factors PU. 1 and C/EBP β in acute myeloid leukemia blasts. *International Journal of Hematology.*, 71: 153-158, 2000

3) Miyamura K, Hamaguchi M, Taji H, Kanie T, Kohno A, Tanimoto M, Saito H, Kojima S, Matsuyama T, Kitaori K, Nagafuj K, Sato T

and Kodera Y : Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplantation.*, 25: 545-548, 2000

4) Motegi M, Yonezumi M, Suzuki H, Suzuki R, Hosokawa Y, Hosaka S, Kodera Y, Morishima Y, Nakamura S, and Seto M: AP12-MALT1 chimeric tInvolved in mucosa-associated lymphoid tissue type lymphoma predict heterogeneous products. *American Journal of Pathology*, 156(3): 807-812, 2000

5) Yano K, Kanie T, Okamoto S, Kojima H, Yoshida T, Maruta A, Dohi H, Morishita Y, Ozawa K, Sao H, Sakamak H, Hiraoka A, Imoto S, Morishima Y, Kodera Y: Quality of life in adult patients after stem cell transplantation. *International Journal of Hematology.*, 71: 283-289, 2000

6) Kato S, Nishihira H, Hara H, Kato K, Takahashi T, Sato N, Kodera Y, Saito H, Sato H and Takanashi M for the Japan Cord Blood Bank Network : Cord blood transplantation and cord blood bank in Japan. *Bone Marrow Transplantation.*, 25: S68-S70, 2000

7) Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, Ino T, Utsunomiya A, Maruta A, Jin-nai I, Kamada N, Kubota Y, Nakamura H, Shimazaki I, Horiike S, Kodera Y, Saito H, Ueda R, Joseph Wiemels, and Ohno R : Analysis of Genetic polymorphism in NQ01, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia¹. *Clinical Cancer Research.*, 6: 4091-4095, 2000

- 8) Shiobara S, Nakao S, Ueda M, Yamazaki H, Takahashi S, Asano S, Yabe H, Kato S, Imoto S, Maruta A, Yoshida T, Gondo H, Morishima Y and Kodera Y: Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improved outcome. *Bone Marrow Transplantation.*, 26: 769-774, 2000
- 9) Yamada H, Murakami T, Kaneda T, Tadachi M, Utsumi M, Minami S, Hamaguchi M, Kasai M, Kodera Y, Ohashi H, Morishita Y, Terasawa T, Yamasaki Y, Kamiya Y, Hattori M, Yamanaka K, Tsushita K and Shimoyama M: Clinical significance of major and minor bcr/abl chimeric transcripts in essential thrombocythemia. *Jpn J Clin Oncol.*, 30(11): 472-477, 2000
- 10) Kato S, Yabe H, Yasui M, Kawa K, Yoshida T, Watanabe A, Osugi Y, Horibe K and Kodera Y: Allogeneic hematopoietic transplantation of CD34⁺ selected cells from an HLA haplo-identical related donor. A long-term follow-up of 135 Patients and a comparison of stem cell source between the bone marrow and the peripheral blood. *Bone Marrow Transplantation.*, 26 : 1281-1290, 2000
- 11) Murata M, Emi N, Hirabayashi N, Hamaguchi M, Goto S, Wakita A, Tanimoto M, Saito H, Kodera Y, Morishita Y, for the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group: No Significant Association between HA-1 incompatibility and incidence of acute graft-versus-host disease after HLA-Identical sibling bone marrow transplantation in Japanese patients. *International Journal of Hematology.*, 72: 371-375, 2000
- 12) Kawano C, Muroi K, Akioka T, Izumi T, Kodera Y and Ozawa K: Cytomegalovirus pneumonitis, activated prothrombin time prolongation and subacute thyroiditis after unrelated allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation.*, 26: 1347-1349, 2000
- 13) Kudo K, Nagai H, Numata S, Ichihara M, Kinoshita T, Horibe K, Kato K, Matsuyama T, Kodera Y and Kojima S: Absence of mutations in the granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) receptor gene in patients with myelodysplastic syndrome / acute myeloblastic leukemia occurring after treatment of aplastic anaemia with G-CSF. *British Journal of Haematology.*, 111 : 656-658. 2000
- 14) Nawa Y, Teshima T, Sunami K, Hiramatsu Y, Maeda Y, Yano T, Shinagawa K, Ishimaru F, Omoto E, Harada M: G-CSF reduces IFN- γ and IL-4 production by T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function. *Bone Marrow Transplant (2000)* 25:1041-1046
- 15) Fujii N, Takenaka K, Hiraki A, Maeda Y, Ikeda K, Shinagawa K, Ashiba A, Munemasa M, Sunami K, Hiramatsu Y, Ishimaru F, Niiya K, Yoshino T, Harada M: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for the treatment of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Bone Marrow Transplant (2000)* 26:805-808
- 16) Matsuo K, Hamajima N, Morishima Y,