

厚生労働科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

Health and Labour Sciences Research Grants, Research on Human Genome,
Tissue Engineering Food Biotechnology, Ministry of Health, Labour 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13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癒と良好な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心をかけた。2001年度には、この内「ミニトランスプラントに関する研究」班が新たに高上洋一主任研究者の下に分離独立したので、それを機会に当班の研究テーマも前年度のものをより具体的に発展させるため一部修正した。具体的には11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ールを定め、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においては、1) これまでのDLIが移植後合併症EBV-LPDや移植後再発CMLに対し有効であること、しかし時に副作用としてのGVHDを合併し患者に悪影響を及ぼすこと、又急性白血病には有効性が低いことが分かってきたので、ドナーリンパ球を、IL-2を含む固相培地でEx vivo培養することによって得られるCD-4陽性細胞を用いた細胞治療の実施に必要な基盤整備を行ないつつ、GVHDの合併が少なく、AMLなど従来のDLIが無効例に対しても効果が期待できる新しい細胞治療の実践、2) 先の移植後EBV-LPDに対しEBウイルス抗原特異的ex vivo培養クローン化T細胞の樹立が可能になってきているので、これらを用いた細胞治療の基盤整備、3) 血縁者間同種末梢血幹細胞移植が急速に普及し、ドナー患者の安全性に関する情報がラージスケールで得られるようになったので、それらを評価する中で非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備、4) 自己修復能を利用した治療法のモデルとしての自家造血幹細胞移植の詳細な後方視的評価、それに基づく同移植法の適応の確立と、造血幹細胞選択肢拡大のための海外ドナーからの移植の推進、5) 血縁内、国内、海外の骨髄、臍帯血バンクでHLA適合ドナーが得られない患者を救済するために、HLA不適合移植の基盤整備、具体的には新しい磁気細胞分離システム(Clini-max)を用いて精製したHLA2-3座不適合ドナーから

の CD-34+細胞移植（成分移植）並びに、患者の HLA に対し免疫学的寛容状態にあることをマイクロキメリズムの存在により証明された母親からの HLA Ⅰハプロ不適合母子間造血幹細胞移植の第Ⅰ、Ⅱ相臨床試験の実施、6) 骨髄・末梢血系造血幹細胞の ex vivo 増幅、を行なう。

テーマⅡ ヒト組織適合抗原の解析と応用では、7) HLA-C、E 抗原の役割を明らかにするために 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、HLA-C 座抗原の NK 細胞に対する役割を検討するとともに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Ⅰとの共同作業）、8) HLA-DNA タイピングの意義の確立では、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し、HLA の各抗原の適合、不適合別成績を検討する中で、抗原の移植抗原としての意義を確立する。又、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。9) マイナー抗原の解析では、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し HA-1 抗原の HLA を介した T 細胞に対する役割を検討する中で、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Ⅰとの共同作業）。10) ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索では、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とともに上記結果と移植成績との相関を検討する中で上記遺伝子の中の、GVHD、拒絶等の原因遺伝子を同定する。

テーマⅢ 造血細胞移植対象疾患の拡張では、11) 膠原病を対象疾患拡張のモデルとして捉え、**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、情報収集を行なうとともに適応があると思われる膠原病を対象とした自家移植を実施更に適応が在るとと思われる膠原病を対象とした同種移植を実施する。

以上の計画の下に 2001 年度一年間研究を行い、今ここに中間報告書を作成したわけであるが、「活性化 CD4 細胞による DLI」並びに「母児間移植」の全国調査結果がまとまり、プロトコールスタディ開始の基盤が作られるとともに、マイナー抗原に対する T 細胞株が樹立され、又、非血縁者間でも HLA Ⅰ座不適合移植が可能であるとする証左が得られる等、この領域における進化の多様性を更に実感することになった。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 14 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13年度総括研究報告書	11
小寺良尚	
IV. 平成13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) DL I と細胞治療に関する研究	33
小寺良尚	
伊藤仁也、関根暉彬、塩原信太郎、赤塚美樹	
2) 抗原特異的 ex vivo 培養 T細胞による細胞治療の基盤整備と実施に関する研究	40
小島勢二	
3) 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備に関する研究	41
原田実根	
3) -1 資料	
同種骨髄並びに末梢血幹細胞ドナーの安全性の比較に関する研究	48
小寺良尚 他 (財) 骨髄移植推進財団末梢血幹細胞移植検討2小委員会	
日本造血細胞移植学会PB SCT小委員会	
4) 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	58
岡本真一郎	
小川啓恭	
5) HLA不適合移植の基盤整備 — 成分移植と母児間移植 — に関する研究	68
峯石 真	
一戸辰夫	
6) 骨髄・末梢血系造血幹細胞の ex vivo 増幅	70
浅野茂隆	
テーマII. <u>ヒト組織適合抗原の解析と応用</u>	
1) HLA-C, E抗原の役割に関する研究	75
森島泰雄	
2) HLA-DNAタイピングの意義の確立に関する研究	82
笹月健彦	
3) マイナー抗原の解析に関する研究	86
石川善英	
4) ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索に関する研究	90
猪子英俊	
テーマIII. <u>造血細胞移植対象疾患の拡張</u>	
1) 膠原病に対する造血細胞移植に関する研究	99
小池隆夫	

V. 研究班会議発表者報告文書

1. 平成 13 年度第一回研究班会議

平成 13 年 6 月 9 日 (土) 正午 12 時～午後 5 時

会 場 名古屋第一赤十字病院 古川講堂

I. 主任研究者挨拶並びに報告 111

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) DL I と細胞治療

① Ex vivo 培養による CD4 陽性細胞を用いた細胞治療の基盤整備と実施 114

伊藤仁也 中畑龍俊 京都大学大学院医学研究科 発達成長医学

山本興太郎¹⁾ 関根暉彬²⁾ 1) 東京医科歯科大学 2) 株式会社リンフォテック、感染症細胞治療研究会

2) 抗原特異的 ex vivo 培養 T 細胞による細胞治療の基盤整備と実施

① 同種幹細胞移植後再発白血病に対するドナー由来 CTL 誘導及びその臨床応用について 116

土屋貴秀 加藤俊一 堀田知光 東海大学医学部 血液・リウマチ内科/小児科

② 血液系細胞に特異的なマイナー抗原を認識する CTL の樹立 118

③ マイナー抗原の適合性と臨床への影響を検索するための DNA バンクの設立についての提案 119

②③赤塚美樹 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫部

④ H - Y 抗原を標的とした難治性白血病細胞に対する CTL の樹立: in vivo における
GVL 効果担当細胞の可能性 120

高見昭良 塩原信太郎 金沢大学大学院 細胞移植学/金沢大学医学部附属病院 輸血部

⑤ WT1 を標的とした造血器悪性疾患に対する抗腫瘍免疫療法 122

坪井昭博 小川啓恭 大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科

⑥ 樹状細胞を用いた腫瘍特異的 CTL の誘導とその臨床応用 124

古川達雄 新潟大学医学部附属病院 高密度無菌治療部

⑦ Mantle cell lymphoma における腫瘍抗原の同定 126

加藤光次 原田実根 九州大学大学院医学研究院 病態修復内科

⑧ 造血幹細胞移植におけるウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球の検討 128

高橋義行 木村 宏 小島勢二 名古屋大学大学院医学研究科 成長発達医学/小児科学

3) 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備

① 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植のための基盤整備 129

北折健次郎¹⁾ 原田実根²⁾ 小寺良尚¹⁾ 1) 名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター

2) 九州大学医学大学院医学研究院 病態修復内科

4) 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

① 自家造血幹細胞移植後の長期造血能・造血障害 (sMDS/AML) 131

岡本真一郎 慶應義塾大学医学部 血液内科

② 小児急性白血病に対する自家骨髄移植の治療成績 133

加藤剛二 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

5) HLA 不適合移植の基盤整備 —— 成分移植と母児間移植 ——

① 免疫寛容の指標としての母児間マイクロ・キメリズム 134

佐治博夫 丸屋悦子 特定非営利活動法人 HLA 研究所

② FK506 をGVHD予防に用いた母子間・非遺伝母HLA抗原 (NIMA) 相補的同胞間造血幹細胞移植に関する臨床第Ⅱ相試験の提案	136
一戸辰夫 ¹⁾ 玉木茂久 ²⁾ 丸屋悦子 ³⁾ 佐治博夫 ³⁾ 1) 京都大学大学院医学研究科 血液病態学 2) 山田赤十字病院 内科 3) 特定非営利活動法人HLA研究所	
③ HLA 2座不一致母親から骨髄移植を施行した骨髄異形成症候群の一例	138
西田徹也 ¹⁾ 北折健次郎 ¹⁾ 小寺良尚 ¹⁾ 丸屋悦子 ²⁾ 佐治博夫 ²⁾ 1) 名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター 2) 特定非営利活動法人HLA研究所	
④ HLA不適合母子間移植の3例	139
濱口元洋 国立名古屋病院 血液内科	
⑤ CD34 陽性細胞純化による同種 haploidentical 移植の検討とプロトコール提案	141
峯石 真 国立がんセンター中央病院 内科	
⑥ 非血縁者間骨髄移植後8か月に再発し骨髄非破壊の前処置を用いて父親より末梢血CD34陽性細胞移植を施行したT-NHLの1例	143
安井昌博 河 敬世 大阪府立母子保健総合医療センター 小児血液科	
⑦ HLA遺伝的一致同胞以外からの血縁者間造血細胞移植の成績：一施設の経験	145
井関 徹 浅野茂隆 東京大学医科学研究所 造血細胞移植チーム	
6) 骨髄・末梢血系造血幹細胞の ex vivo 増幅	
① 異種骨髄ストローマ細胞株を利用したヒト骨髄ならびに末梢血幹細胞の ex vivo 増幅	147
川田浩志 堀田知光 東海大学医学部 血液・リウマチ内科	

テーマ II. ヒト組織適合抗原の解析と応用

7) HLA-C, E抗原の役割	
① 非血縁者間骨髄移植における HLA-C抗原の役割	149
② Non-myeloablative hematopoietic transplantation 全国調査の経過報告	報告文書なし
② 田地浩史 ①森島泰雄 愛知県がんセンター病院 血液化学療法部	
8) HLA-DNAタイピングの意義の確立	
① HLA-DNAタイピングの意義の確立	報告文書なし
笹月健彦 九州大学生体防御医学研究所 遺伝子学部門	
9) マイナー抗原の解析	
① マイナー抗原および免疫関連遺伝子の解析	151
② BMT における NK 受容体の関与	151
① 石川善英 ② 屋部登志雄 十字猛夫 日本赤十字社中央血液センター 研究部	
10) ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索	
① 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探索	153
猪子英俊 東海大学医学部 分子生命科学部門	

テーマ III. 造血細胞移植対象疾患の拡張

11) 膠原病に対する造血細胞移植	
① 全身性皮膚硬化症に対する純化CD34陽性細胞選択移植	155
澤田賢一 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科 分子病態制御学	
② 臨床用細胞プロセッシング室の設置と自己骨髄細胞筋注による血管再生療法	157
室井一男 小澤敬也 自治医科大学 輸血・細胞移植部	
③ 強皮症に対する末梢血幹細胞移植の適応	159
深谷修作 江崎幸治 藤田保健衛生大学 感染症・リウマチ内科/血液内科	

2. 平成12年度第二回研究班会議

平成14年2月15日(金) 午後1時~午後5時

2月16日(土) 午前9時~12時

会場 東京医科大学教育棟講堂・第一研究教育棟第二講堂

I. 主任研究者挨拶並びに報告

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. 厚生労働省挨拶

日下英司

厚生労働省健康局疾病対策課臓器移植対策室臓器移植指導官

III. 分担研究報告

テーマ I. 造血細胞移植から細胞治療へ

1) DLIと細胞治療

- ① 造血細胞移植後再発白血病に対する活性化ドナーCD4輸注療法 163

伊藤仁也

京都大学大学院医学研究科 発達成長医学/感染症細胞治療研究所会

- ② 難治性感染症に対する活性化CD4 T細胞輸注療法 165

森尾友宏 清水則夫 東京医科歯科大学医学部附属病院総合診療部/難治疾患研究所ウイルス感染学分野

- ③ 同種造血幹細胞移植後の再発に対して活性化CD4リンパ球輸注を施行したAMLの3例 167

加藤剛二 松山孝治 山本興太郎 関根暉彬 名古屋第一赤十字病院小児血液腫瘍科/感染症細胞治療研究会

- ④ マイナー組織適合抗原の不一致と抗白血病効果: CD62Lの不一致と再発率の検討 169

塩原信太郎

金沢大学医学部附属病院 輸血部

- ⑤ 白血病における骨髄中の未分化間葉系幹細胞の分離解析 171

岡田邦彦

恵美宣彦 名古屋大学医学部組織工学/病態内科学

- ⑥ 合成腫瘍ペプチドまたは酸溶出腫瘍抗原でパルスした樹状細胞を用いた抗腫瘍免疫療法 172

阿部 崇 古川達雄 成田美和子 高橋益広 新潟大学大学院医歯学総合研究科第一内科/無菌治療部

2) 抗原特異的 ex vivo 培養T細胞による細胞治療の基盤整備と実施

- ① 造血幹細胞移植後の Perforin 陽性リンパ球の動態 174

吉見礼美

小島勢二 名古屋大学大学院医学研究科小児科/成長発達医学

3) 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備

- ① 成人白血病に対するHLA一致同胞ドナーからの同種骨髄移植と同種末梢血幹細胞移植の臨床

第Ⅲ相非盲検無作為割付比較試験 176

原田実根

九州大学大学院医学研究院 病態修復内科

4) 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

- ① 海外ドナーからの移植成績の解析 178

- ② 自家移植に関するアンケート調査の提案 報告文書なし

岡本真一郎

慶應義塾大学医学部 血液内科

5) HLA不適合移植の基盤整備 — 成分移植と母児間移植 —

- ① HLA2,3 抗原不一致血縁者間同種造血幹細胞移植に関する研究 180

峯石 真

国立がんセンター中央病院 内科

- ② 母子間非遺伝母HLA抗原(NIMA)相補的同胞間HLA不一致造血細胞移植に関する

第一次後方視的調査の報告 182

一戸辰夫¹⁾ 内山 卓¹⁾ 玉木茂久²⁾ 丸屋悦子³⁾ 佐治博夫⁴⁾

1) 京都大学大学院医学研究科 血液病態学

2) 山田赤十字病院 内科

3) HLA研究所・京都大学医学部附属病院 輸血部

4) 特定非営利活動法人HLA研究所

- ③ 血清型HLA1抗原ミスマッチ非血縁者間骨髄移植の成績 197

加藤俊一

東海大学医学部小児科/ (財) 骨髄移植推進財団医療委員会

④ Unmanipulated marrow を用いたHLAミスマッチ移植	199
小川啓恭 大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学	
⑤ 小児科領域に於ける両親をドナーとする造血細胞移植実施例 467 例のまとめ —— 小児造血細胞移植全国集計より ——	201
田中竜平 田淵 健 渡辺 新 矢部晋正 気賀沢寿人 日本小児血液学会造血細胞移植委員会	
⑥ 単一施設におけるマイクロキメリズムを指標としたHLA不一致血縁者間骨髄移植の経験 寺倉精太郎 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	報告文書なし
6) 骨髄・末梢血系造血幹細胞の ex vivo 増幅	

テーマ II. ヒト組織適合抗原の解析と応用

7) HLA-C, E抗原の役割	
① HLA-DNA 抗原と非血縁者間骨髄移植	203
森島泰雄 愛知県がんセンター病院 血液化学療法部	
8) HLA-DNAタイピングの意義の確立	
① 非血縁者間骨髄移植におけるHLAクラスIIマッチングの意義	205
笹月健彦 国立国際医療センター研究所	
9) マイナー抗原の解析	
① 非血縁者間骨髄移植におけるNK受容体の関与：サイトカイン遺伝子多型の移植成績への影響…	206
屋部登志雄 石川善英 東京都赤十字血液センター 技術部研究一課	
10) ゲノムワイドな組織適合性遺伝子の検索	
① PCR自動検出機による簡便なHLAクラスI 遺伝子DNAタイピング法の開発	208
成瀬妙子 猪子英俊 東海大学医学部 分子生命科学系	
② HLA-A24 拘束性マイナー抗原を認識するCTLの樹立	210
赤塚美樹 愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫部	
11) 膠原病に対する造血細胞移植	
① 難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植療法に関する研究	212
天崎吉晴 小池隆夫 北海道大学大学院医学研究科 分子病態制御学	
② 難治性血管炎及びアミロイドーシスに対する造血細胞移植	報告文書なし
宮村耕一 東北大学大学院医学系研究科 免疫血液病制御学	

VI. 公開シンポジウム記録	217
----------------------	-----

VII. 研究班会議記録	221
--------------------	-----

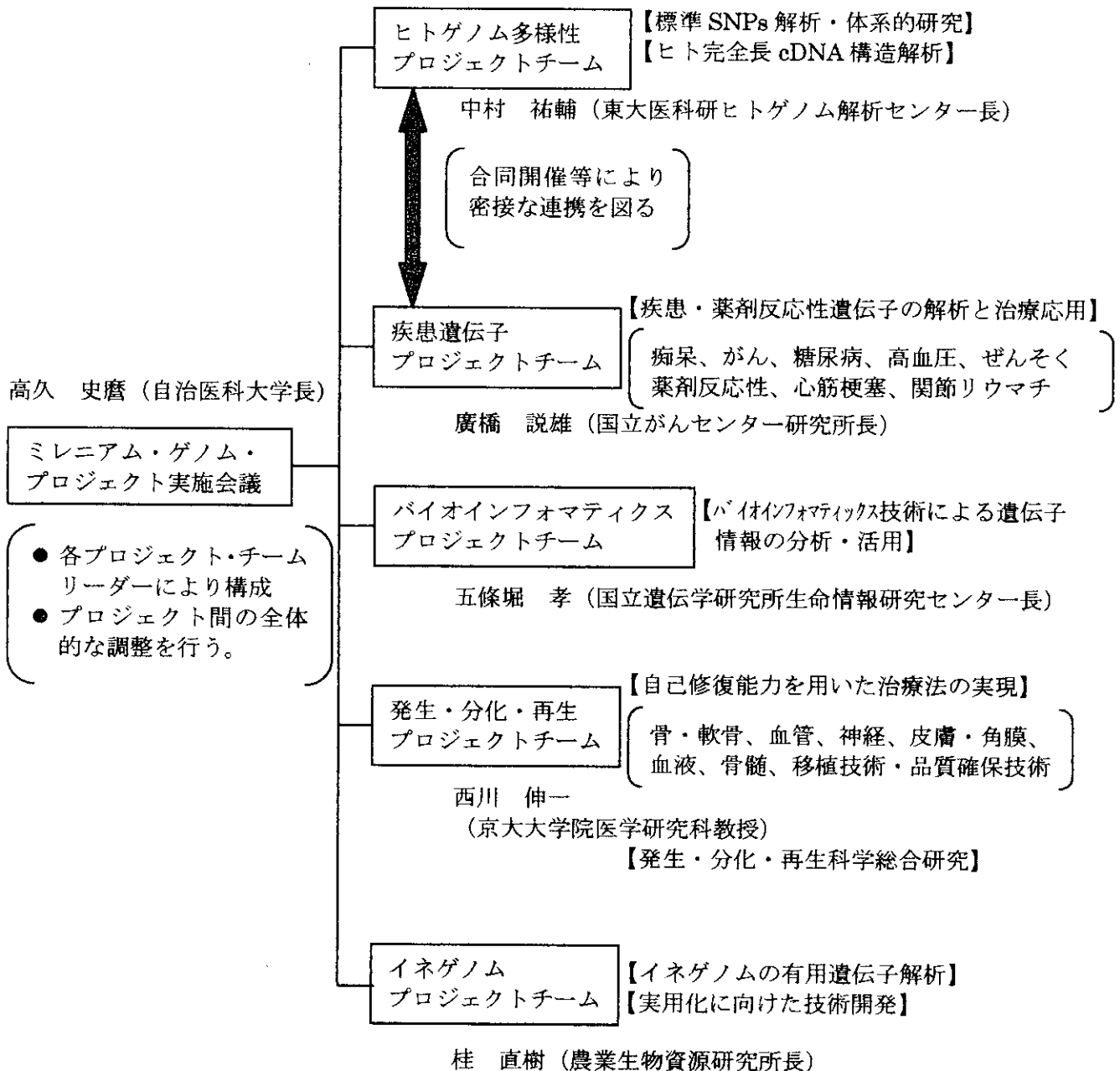
VIII. 研究成果の刊行に関する一覧表	225
----------------------------	-----

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。

（平成 12 年作成）

発生・分化・再生プロジェクト・チーム

(血液・骨髄以外は平成12年度参考)

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 糸満盛憲	名古屋大学大学院医学研究科 教授 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 島崎修次 坪井一男	北里大学医療衛生学部人工皮膚研究開発センター 教授 杏林大学医学部 教授 東京歯科大学角膜センター 教授
(血液・骨髄)	小澤敬也 * 小寺良尚 齋藤英彦 堀田知光 高上洋一	自治医科大学医学部 教授 名古屋第一赤十字病院 骨髄移植センター長 国立名古屋病院 病院長 東海大学医学部 教授 国立がんセンター中央病院 医長
(移植技術)	立石哲也 野本亀久雄 早川堯夫	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 日本移植学会 理事長 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 DLI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 抗原特異的 ex vivo 培養T細胞による細胞治療の基盤整備と実施に関する研究

小島勢二 (名古屋大学大学院医学研究科 小児科)

1-3 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備に関する研究

原田実根 (九州大学大学院医学研究院 病態修復内科)

1-4 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)

1-5 HLA不適合移植の基盤整備 ―成分移植と母子間移植― に関する研究

峯石真 (国立がんセンター中央病院 造血幹細胞移植部)

1-6 骨髄・末梢血系造血幹細胞の ex vivo 増幅に関する研究

浅野茂隆 (東京大学医科学研究所 先端医療センター)

テーマ2 ヒト組織適合抗原の解析と応用

2-1 HLA-C,E 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 (国立国際医療センター研究所)

2-3 マイナー抗原の解析に関する研究

石川善英 (東京都赤十字血液センター 技術部・研究一課)

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 造血細胞移植対象疾患の拡張

3-1 膠原病に対する造血細胞移植に関する研究

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13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	小島勢二	名古屋大学大学院医学研究科 成長発達医学
	原田実根	九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学
	岡本真一郎	慶應義塾大学医学部 内科
	峯石真	国立がんセンター中央病院 造血細胞移植部
	浅野茂隆	東京大学医科学研究所附属病院 先端医療研究センター
	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
	石川善英	東京都赤十字社中央血液センター 技術部・研究一課
	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 分子病態制御学
研究協力者	小川啓恭	大阪大学大学院医学系研究科 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	特定非営利活動法人 HLA研究所
	濱口元洋	国立名古屋病院 血液内科
	十字猛夫	日本赤十字社中央血液センター
	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
	深谷修作	藤田保健衛生大学 感染症・リウマチ内科
	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	東北大学大学院医学系研究科 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	京都大学大学院医学研究科 発生発達医学
	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 血液化学療法部
	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
	関根暉彬	株式会社リンフォテック
	古川達雄	新潟大学医学部附属病院 高密度無菌治療部
	坂野章吾	名古屋市立大学医学部 第二内科

Ⅲ. 平成 13 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 による移植後再発白血病並びに拒絶の制御に成功した。マイナー抗原特異的 CTL を樹立した。同種末梢血幹細胞移植ドナーの安全性につき、骨髄ドナーのそれと比較した。海外ドナーからの非血縁者間骨髄移植 91 例の成績が国内ドナーからの移植成績と同等であることを示した。ドナーが患者と不適合であるハプロをマイクロキメリズムとして有している母又は同胞をドナーとした HLA 1ハプロ不適合移植が可能であることを示した。HLA-C 座抗原の不適合が移植後成績に有意差をもって影響を及ぼすことを確認した。HLA Class-II の一座不適合は GVHD の発症頻度は高めるものの、生存率には影響を及ぼさないこと、従って HLA 一座不適合移植が非血縁者間でも可能であることを示した。成人強皮症並びに小児関節リウマチ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
小島勢二 名古屋大学大学院医学研究科
教授
原田実根 九州大学大学院医学研究院
教授
岡本真一郎 慶應義塾大学医学部専任
講師
峯石真 国立がんセンター中央病院
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部長
笹月健彦 九州大学生体防御医学研究
教授
石川善英 東京都赤十字血液センター
課長
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
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、1)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 固相化プラスチックを用い 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。2) 血液系細胞に特異的に表現されるマイナー組織適合抗原 (mHA) に対する CTL を樹立する目的で、骨髄移植後の患者末梢血を移植前の患者単核球で複数回刺激することにより CTL ラインを作成、各種刺激細胞パネルと CTL を ELIPSON 用のプレートで共培養し IFN- γ 産生能を指標にクローニングした。

研究課題: 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備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% フォロウアップする体制を構築し、それに基づいて得られた 2 年間、1,400 例のドナーに発生した有害事象につき、骨髄移植推進財団を介して骨髄提供された骨髄ドナーのそれらと比較した。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、海外ドナーからの移植例 91 例を解析した。研究課題: **HLA 不適合移植の基盤整備**では、ドナー末梢血リンパ球より得た HLA-DNA の内、ドナーと不一致部分の DNA の存在を PCR 法を用いて増幅することにより確認しドナー適格者として選定、そのドナーからの未処理骨髄又は末梢血を用いて移植を行った。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**では、同じく非血縁者間骨髄移植ドナー-患者ペアの HLA Class-II DNA 解析、サイトカイン遺伝子多形、と移植成績との相関を解析するとともに、PCR 自動検出器による簡便な HLA Class-I 遺伝子の DNA タイピング法の開発を試みた。研究課題名: **膠原病に対する造血細胞移植**においては移植対象疾患などに関するプロトコールを設定した上で、成人強皮症患者 3 名に対し自家精製 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ー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。特に非血縁者間骨髄移植患者、ドナーの保存リンパ球等を用いた HLA 並びにその他の移植関連遺伝子解析の実施に当たっては、これら保存検体が B 群資料に該当することを確認した上で、当該施設倫理委員会の承認を得て行った。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、造血幹細胞ドナーの 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並びに拒絶に対する治療を行なった。対象は AML12 例、ALL10 例、CML2 例、MDS1 例、NHL1 例、拒絶 3 例の計 29 例で、再寛解導入

率はAMLで36%、ALLで50%、CMLで50%、拒絶例におけるドナー造血回復率67%であった。Grade-IIIの急性GVHDは16%に併発したがいずれも制御可能であった。急性副作用として発熱(10.3%)、血小板減少(20,000/ μ L以下、17.4%)、好中球減少(500/ μ L以下、8.7%)の他、頭痛、嘔吐、呼吸困難、発疹、間質性肺炎、TMAが各1例に見られた。総じて殊に急性白血病に対しDLIより効果的であり、GVHDの発症率が低いという点でより安全な細胞治療法になる可能性が確認された。又、A*2402、B*4403に拘束されるマイナー抗原を認識するCTLクローンを効率よく多数樹立することが出来、この内、AMLの1症例から樹立した2種類のクローンは、患者自身の白血病細胞を含む血液系細胞を傷害したが、皮膚線維芽細胞、ケラチノサイトを傷害せず、GVL効果を利用する養子免疫療法にコミットしているマイナー抗原を認識しているものと考えられた。

研究課題：非血縁者間同種末梢血幹細胞移植実施のための基盤整備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。2年間に1,400例の同種末梢血幹細胞採取・移植がなされ、ドナーの比較的重篤な有害事象は22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ていない。この内初年度に採取されたドナー683名中20-50歳に属する287名の安全性につき、同時期に骨髄移植推進財団を介して骨髄提供された869名のそれと比較した。その結果、有害事象の種類は末梢血幹細胞採取と骨髄採取とでは大きく異なるものの、総括的安全度では両者は基本的に差がないとの中間総括を得た。

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では、海外ドナーか

らの骨髄移植91例を解析し、海外バンクドナーからの移植はJMDPドナーからの移植とほぼ同等の成績であること、人種は急性GVHD、生存率の危険因子にはならないこと、移植成績を妨げる最も重要な因子は急性GVHDであること、allele mismatch(2座以上)と、GVHD予防法が急性GVHDの危険因子であること、HLA molecular matchのドナーの採用とGVHD予防法の選択により成績向上が期待できることを示した。

研究課題名：HLA不適合移植の基盤整備—成分移植と母児間移植では、血清学的あるいはアリルレベルでHLA-A,B,DRに2抗原以上の不一致が存在する母親あるいは同胞ドナーで、ドナー血液中に患者の不適合HLAがマイクロキメリズムとして存在することを証明されたドナーからの移植が22例に実施された。観察期間中央値135日(10~541日)の時点で12名が生存中、調査結果に基づいて推定された1年予測生存率は62%であり、従来の同種CD34陽性細胞移植に劣らない成績が得られる可能性が示唆された。III度以上の急性GVHDの発症頻度は24%で、同じ不適合でも母より同胞がドナーである場合のほうが重症GVHDの発症率が低い傾向が見られた。Day-100以内の非再発死亡は7例に認められ、死因はGVHD(n=3)、感染症(n=3)、RRT(n=1)であった。又、こうしたマイクロキメリズムが証明されないHLA不適合ドナーからの移植に向け、高純度CD-34陽性細胞を得ることができるClini-macsをもちいた移植のための研究班共通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髄移植のドナー—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 の不適合が再発抑止的に働く傾向をラージスケールで観察し得たが、証明するには至らず、今後は NK 受容体の活性化と C 座抗原不適合との関係につき解析を進めることとした。

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我が国で行われた非血縁者間骨髄移植のドナー-患者 1370 ペアの HLA が DNA レベルで解析され、HLA-A,B が DNA レベルで一致したペアにおいて、DRB1,DQB1 の不一致は GVHD の発症に関して有意差があるものの、生存においては有意差が無いことを示した。又、これまでに我が国において試験的に行われた非血縁者間 HLA 一座不適合移植を retrospective に解析した結果、HLA Class-II の一座不適合は生存に影響を及ぼさないことが明らかとなり HLA Class-II 一座不適合非血縁者間骨髄移植が比較的 safely に実施可能であること、即ちドナープールサイズをこの点においてはエコノマイズ出来る、との理論的根拠を得た。HLA-C 遺伝子の簡便な DNA タイピングを、24 組のプライマーセットと PCR 自動検出器により可能にした。

研究課題名: 膠原病に対する造血細胞移植においては 3 例の成人強皮症患者に、cyclophosphamide 2g / m² x 2 日間を免疫抑制前処置として自家精製 CD-34+末梢血幹細胞移植が実施された。全例で移植後比較的早期より皮膚症状の改善が確認され、従来確立した治療法の無い自己免疫疾患の一部に対し、本治療法の有用性が示唆された。

D. 考察

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に 10cc 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、又それが多くの場合無効であった急性白血病の再発例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。更に本法は移植後の難治ウイルス感染症に対しても短期間で治癒をもたらすことが示されていて、高額な抗ウイルス剤を長期間使う必要が無く、医療経済的にも期待が持てる細胞療法である。同種末梢血幹細胞移植は 2000 年 4 月の健保適用以降 2 年間で 1400 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が確認されつつある。ドナーにおける有害事象は 22 例報告されているが生命予後にかかわるようなものは今のところ無く、日本造血細胞移植学会、日本輸血学会共同の末梢血幹細胞採取ガイドラインを遵守する限りにおいて、本法は先ず安全と考えてよいと思う(海外文献に基づく検討による 8 例のドナー死亡例はいずれも有病者であった)。又、骨髄採取との安全性に関する比較も、中間総括ではあるが差が無いとの結果を得ている。本移植法は高齢者に移植の機会を拡大するミニトランスプラントを可能にする基礎的技術でもあるので、非血縁ドナーへの適用のための基盤整備が急がれる。

海外ドナーからの骨髄移植において、国内ドナーの間(日本人間)では移植可能な HLA 適合ドナーがどうしても得られない患者の救済のため行った異人種間骨髄移植の成績が、日本人間のそれと比べ遜色ないことを比較的多数症例で確認でき、所謂骨髄バンクの国際交流が実質を伴ったものであることが示されたと考える。只、経費が 400 万円ほど必要であるので、公平性を担保するうえでは何らかの措置が必要であろう。HLA-C 座抗原の不適合がそれ自体単独で GVHD の危険度を増すことが明らかになった半面、移植後再発のリスクを減らすことは証明

出来なかった。しかし、今まで C 座抗原は移植成績には無関係と考えられていたことから見ると、これは新しい発見であり、簡便な C 座抗原の DNA タイピング法も開発されたので、今後は C 座抗原情報も加味したドナー選択が行われることになろう。

HLA DNA タイピングの意義に関しては、すでに確立された HLA Class-I 抗原の一致が GVHD の頻度、重傷度を下げることにより生存率を向上させるとする知見に加えて、Class-II 抗原の不一致は予後に影響が無いとする新たな知見が加わり、HLA 一座不適合非血縁者間骨髄移植への道が開かれたと考える。この情報を考慮に入れたドナープールサイズの試算、見直しも又必要であろう。

膠原病の中でも予後不良である強皮症 3 例に対し、強力な免疫抑制療法に続く自家 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をすでに一部具現しているものであり、難治血液病、固形癌、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と更なる対象疾患の拡張、そして近未来の各種細胞治療のための基盤整備に貢献しつつある。

F. 健康危険情報

我が国で報告された同種末梢血幹細胞ドナー 1,400 名中 22 例に発症した有害事象につき報告する(添付資料参照)。尚、本件に関しては 2002 年 5 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. Utsunomiya A., Miyazaki Y., Takatsuka Y., Hanada S., Uozumi K., Yashiki S., Tara M., Kawano F., Saburi Y., Kikuchi H., Hara M., Sao H., Morishima Y., Kodera Y., Sonoda S., and Tomonaga M. : Improved outcome of adult T cell leukemia/lymphoma with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation.*,27:15-20, 2001
2. Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., Suzuki R., Kodera Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Nisimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Saito H., Ueda R., Ohno R, and Naoe T., : Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.*,97:2434-2439, 2001
3. 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: Indications and dose Escalation. *Therapeutic Apheresis.*,5:40-45, 2001
4. Niwa N., Watanabe E., Hamaguchi M., Kodera Y., Miyazaki H., Kodama I., Ohono M., : Early and late elevation of plasma atrial and brain natriuretic peptides in patients after bone marrow transplantation. *Ann Hematol.*, 80:460-465, 2001
5. Hiraoka A., Ohashi Y., Okamoto S.,

- Moriyama Y., Nagao T., Kodera Y., Kanamaru A., Dohy H., and Masaoka T., for the Japanese FK506 BMT Study Group : Phase III study comparing tacrolimus(FK506) with cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 28:181-185, 2001
6. Ishikawa Y., Kashiwase K., Okai M., Ogawa A., Akaza T., Morishima Y., Inoko H., Sasazuki T., Kodera Y., and Juji T., : Polymorphisms in the coding region of mtDNA and effects on clinical outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 28:603-607, 2001
- (分担研究者)
7. Kojima S., Inaba J., Yoshimi A., Takahashi Y., Watanabe N., Kudo K., Horibe K., Maeda N., Kato K., Matsuyama T.: Unrelated donor marrow transplantation in children with severe aplastic anemia using cyclophosphamide, anti-thymocyte globulin and total body irradiation. *Br J Haematol.*, 114:706-711, 2001.
 8. Noguchi T., Ikeda K., Yamamoto K., Yoshida I., Ashiba A., Tsuchiyama J., Shinagawa K., Yoshino T., Takata M., Harada M. : Antisense ligodeoxynucleotides to latent membrane protein 1 induce growth inhibition, apoptosis and Bcl-2 suppression in Epstein-Barr virus (EBV) -positive natural killer cell lymphoma cells. *Br J Hematol.*, 114:84-92, 2001
 9. Ueoka H., Tanimoto M., Kiura K., Tabata M., Takigawa N., Segawa Y., Takata I., Eguchi K., Okimoto N., Harita S., Kamei H., Shibayama T., Watanabe Y., Hiraki S., Harada M. : Fractionated administration of irinotecan and cisplatin for treatment of non-small-cell lung cancer : a phase II study of Okayama Lung Cancer Study Group. *Br J Cancer.*, 85:9-13, 2001
 10. Sunami K., Teshima T., Nawa Y., Hiramatsu Y., Maeda Y., Takenaka K., Shinagawa K., Ishimaru F., Ikeda K., Niiya K., Harada M. : Administration of granulocyte colony-stimulating factor induces hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and impairs antigen-presenting function of peripheral blood monocytes. *Exp Hematol.*, 29:1117-1124, 2001
 11. Hiraki A., Ikeda K., Yoshino T., Kaneshige T., Kiura K., Kunisada T., Fujiwara K., Tanimoto M., Harada M. : Tumor-specific cytotoxic T lymphocyte responses against chondrosarcoma with HLA haplotype loss restricted by the remaining HLA class allele. *Biochem Biophys Res Comm.*, 286:786-791, 2001
 12. Honda K., Takenaka K., Shinagawa K., Ishimaru F., Ikeda K., Niiya K., Harada M. : Synergistic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor and granulocyte colony-stimulating factor on mobilization of hematopoietic progenitor and stem cells with long-term repopulating ability into peripheral blood in mice. *Bone Marrow Transplant.*, 28:329-334, 2001
 13. Uno M., Tsutiyama J., Moriwaki K., Noguchi T., Mizoguchi K., Ogino T., Yoshino S., Okada S., Harada M. : In vitro induction of apoptosis for nasal angiocentric NK cell lymphomaderived cell line, NK-YS by etoposide and cyclosporine A. *Br J Haematol.*, 113:1009-1014, 2001
 14. Mannami T., Yoshino T., Oshima K., Takase