

log-rank test を、生存期間の差の検定には Mann-Whitney U test を用い、両側検定で P 値が 0.05 未満となった場合を統計学的に有意と判断した。

### C. 研究結果

#### 1) ドナーマウスの NIMA への接触が GVHD に与える影響の検討

レシピエント B6D2F1 に、8 週齢の NIMA 接触マウス、NIMA 非接触マウス、B6D2F1(同系コントロール)をドナーとして移植を実施した(ドナー: H-2<sup>b/b</sup>→レシピエント:H-2<sup>b/d</sup>)。NIMA 接触マウスをドナーとした場合の GVHD スコアの平均値は、移植後一過性の上昇の後、第 7 週目頃を 2 番目のピークとして、以後は低下していったのに対して、NIMA 非接触マウスがドナーの場合には、スコアの平均値が移植後時間を経るごとに増加し続ける傾向にあった。また、この移植条件(同系マウスのすべてが生存)下での移植後 10 週予測生存率は NIMA 接触マウスがドナーの場合 72%、NIMA 非接触マウスでは 16%であり、有意な差が見られた(P<0.01)。

次に、レシピエントを B6C3F1(H-2<sup>b/k</sup>)に変更して、同様の移植実験を行った。この場合には、NIMA 接触マウスをドナーとした場合と、NIMA 非接触マウスをドナーとした場合の移植後生存率に有意な差は観察されなかった。

#### 2) ドナーマウスの IPA への接触が GVHD に与える影響の検討

出産後 8 週目の IPA 接触母マウス・非接触母マウスおよび同系マウスをドナー、B6D2F1 をレシピエントとして同様の条件で骨髄移植を行った。IPA 接触マウスがドナーの場合と非接触マウスがドナーの場合の間で、GVHD の重症度・移植後の生存率ともに有意な差は認められなかった。

#### 3) NIMA への寛容効果に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞

が与える影響の検討

NIMA 接触マウスがドナーである場合の GVHD 抑制効果発現における CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の関与を検討するため、1)の実験と同様に、8 週齢の NIMA 接触マウス、NIMA 非接触マウス、B6D2F1(同系コントロール)をドナーとして B6D2F1 に移植を行う際に、脾 CD4<sup>+</sup>T 細胞から CD25 陽性分画の除去を行ったところ、CD4<sup>+</sup>T 細胞をそのまま移植した場合と異なり、NIMA 接触マウスからの移植と NIMA 非接触マウスからの移植の間で、生存率に有意な差は認められなかった。

#### 4) NIMA への寛容効果が移植片対腫瘍効果に与える影響の検討

NIMA への接触により獲得された免疫効果が、NIMA を発現する腫瘍の拒絶に不利に働く可能性を検討するため、1)と同様の条件で BDF1 に移植を実施する際に H-2<sup>d</sup>を発現する P815 細胞 2.5x10<sup>4</sup>個あるいは 5x10<sup>5</sup>個の経静脈的接種を行い、それぞれの平均生存日数を比較した(表1)。いずれの接種細胞数の場合にも、NIMA 接触マウスがドナーである場合のレシピエントの生存期間は NIMA 非接触マウスがドナーである場合と同等であり、ドナーが同系マウスの場合よりも有意に延長していた。

### D. 考察

これまで NIMA や IPA に対する獲得免疫寛容効果の成立機序に関する検討は十分に行われてこなかったが、最近となって、動物モデルを用いた研究が開始され、(1)造血系多系統における母子間長期マイクロキメリズムの成立、(2) NIMA に対する type I サイトカイン産生 T 細胞頻度の減少、(3) NIMA 結合免疫グロブリンのアフィニティの相違による NIMA 反応性 B 細胞の活性の調節機構、(4)母親の胎児由来同種抗原に

対する免疫寛容維持における制御性 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞の役割、などの知見が報告されている。今回のわれわれの検討は、NIMA への免疫寛容が、生後も長期間にわたって維持されていることをあらためて確認するとともに、NIMA への免疫応答の制御に CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞が関与している可能性を初めて明らかにしたものである。すでに、複数の研究グループにより、レシピエント特異的な CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞はGVHDの抑制効果を有しているにもかかわらず、移植片対腫瘍効果を阻害しない、とする報告がなされており、NIMA への寛容効果の多くが CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に依存していると仮定した場合、P815 の接種実験結果はその知見を支持するものと考えられた。

一方で、特にマウスを用いた実験での限界としては、複数の H-2 が相違するような実験条件の設定が行いにくいことや、得られた結果が特定の H-2 の組み合わせ(人の移植にたとえると純系同士での移植実験は1組のペアでの移植1件に対比される)においてのみ観察される特殊な現象である可能性を常に否定できないことなどがあげられる。造血細胞移植における NIMA や IPA の意義を明らかにしていくために今後も重要と考えられることは、単純ではあるが、やはり臨床データの十分な蓄積であり、それを可能とするためのインフラストラクチャを一層整備していくことが求められている。

#### E. 結論

マウス骨髄移植モデルを用いた検討により、胎仔期における NIMA への接触が、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞依存的に持続的な NIMA 特異的免疫寛容効果を誘導することが示された。一方、母親側の IPA への接触は、今回の移植条件で検出できるような寛容効果をもたらさなかった。母子間免疫

寛容理論に基づいた組織適合性の評価をより客観的な基準に基づいて実施することを可能とするためにも、今後、母子間における双方向的な免疫寛容が、特に妊娠終了後にどのような細胞生物学的・分子生物学的機構を介して維持されるのかあるいは破綻するのかに関して、より詳細な検討が行われることが望まれる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

Matsuoka K, Ichinohe T, Hashimoto D, Asakura S, Tanimoto M, Teshima T.: Fetal tolerance to maternal antigens improves the outcome of allogeneic bone marrow transplantation by a CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cell-dependent mechanism. *Blood* 2006;**107**:404-409.

Ichinohe T, Teshima T, Matsuoka K, Maruya E, Saji H.: Fetal-maternal microchimerism: impact on hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol* 2005;**17**:546-552

Kodera Y, Nishida T, Ichinohe T, Saji H.: Human leukocyte antigen haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: indications and tentative outcomes in Japan. *Semin Hematol.* 2005;**42**:112-118.

Narimatsu H, Wake A, Miura Y, Tanaka H, Matsumura T, Takagi S, Kato D, Myojo T, Kusumi E, Masuoka K, Miyakoshi K, Morinaga S, Hiroh S, Ichinohe T, Taniguchi S.: Successful engraftment in crossmatch-positive HLA-mismatched peripheral blood stem cell

transplantation after depletion of antidonor cytotoxic HLA antibodies with rituximab and donor platelet infusion. Bone Marrow Transplant 2005;**36**:555-556.

Kojima R, Kami M, Kanda Y, Kusumi E, Kishi Y, Tanaka Y, Yoshioka S, Morishima S, Fujisawa S, Mori S, Kasai M, Hatanaka K, Tajima K, Kasai M, Mitani K, Ichinohe T, Hirai H, Taniguchi S,

Sakamaki H, Harada M, Takaue Y.: Comparison between reduced-intensity and conventional myelo-ablative allogeneic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies aged between 50 and 59. Bone Marrow Transplant 2005;**36**:667-674.

H. 知的財産権の出願状況  
特になし。

ドナー	H-2の関係 (ドナー→レシピエント)	移植後平均生存期間(日)	
		接種P815(H-2d)細胞数 2.5×10 <sup>4</sup>	5.0×10 <sup>5</sup>
B6D2F1(同系)	b/d→b/d	14.2	10.3
NIMA(H-2d)接触マウス	b/b→b/d	51.2*	48.0*
NIMA(H-2d)非接触マウス	b/b→b/d	55.7*	48.3*

\*P<0.005 (BDF1 がドナーの場合との比較)

表 1 : 胎仔時の NIMA への接触が NIMA を発現する腫瘍の拒絶に与える影響の検討

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)

分担研究報告書

活性化 CD4-DLI のための臨床試験体制の確立と実施に関する研究

分担研究者 森尾友宏 東京医科歯科大学大学院・発達病態小児科学分野

同医学部附属病院・細胞治療センター

研究要旨：活性化 CD4-DLI のための臨床試験体制の確立と実施を目的として、平成 17 年度に造血幹細胞移植後難治性 CMV・アデノウイルス (ADV) 感染症に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験を開始した。1 年間のエントリーは 8 名で、CMV 感染症、ADV 感染症それぞれ 4 名であったが、重複感染症の存在、除外基準に含まれる重篤な臓器障害、治療直前のウイルスの減少・消失などから、6 例は試験から外れ、パイロット細胞投与を行った。適格となった ADV 感染症ではウイルス量の減少が認められ、今後効果・副作用評価委員会における検討が行われる予定である。並存するウイルスの同時測定、移植後前後の感染症のモニタリング、細胞製剤の品質保証を目的として、高感度網羅的迅速感染症モニタリングシステムを確立し、同時にウイルス定量を行える体制を整えた。このシステムを用いて 53 名の患者で計 705 検体の測定を行った。移植前後の経時的モニタリングを行った 22 名の患者のうち 16 名で経過中にウイルスが検出され、そのうち 10 名は症状を伴う感染症の原因ウイルスであった。ウイルスの種類としては EBV, CMV, HHV6, ADV, BKV などが比較的高頻度で検出され、検出は移植後 14 日 - 60 日をピークとしていた。ADV、BKV 膀胱炎では、複数ウイルスが検出されることがあり、血液中にも CMV 等のウイルスが検出される率が高かった。複数ウイルス検出率は 17.4% で、喀痰・便などで高頻度であったが、血液からも 11.8% の検体で検出された。特に、CMV が検出された症例では 55.9%、ADV が検出された症例では 68.6% において他のウイルスが同時に存在しているため、臨床試験における「他の症状を伴う感染症の並存」の除外項目については、今後検討する必要がある。さらに、今後の白血病に対する CD4-DLI の臨床試験を視野に入れて、「活性化 CD4-DLI の有効性・安全性評価のためのモデルマウスモデル」を確立し、EBV-LCL を NOG-SCID マウスに移植し、EBV-LCL と同じドナーからの CD4-DLI を行って、治療の安全性と有効性を評価した。

研究協力者

清水 則夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学

伊藤 仁也 先端医療センター再生医療研究部

関根 暉彬 株式会社リンフォテック

## A. 研究目的

ドナーリンパ球輸注(DLI)は(1) EBV-BLPD 及び(2) CML の細胞遺伝学的再発(含:血液学的慢性期)で高価の期待度が高いとされている。

効果の可能性のある状態として DLI は、(1) 急性白血病の再発、(2) CML の移行期・急性転化、(3) MDS の再発、(4) 多発性骨髄腫の再発、(5) その他血縁・DLI で有効例の報告がある腫瘍性疾患の再発、(6) 非腫瘍性疾患の混合キメラ状態、血縁・DLI で有効例の報告があるウイルス感染症、(7) 特異性のある MRD (微小残存腫瘍) マーカーの2回以上の上昇、に対しても用いられている。

一方DLIでは(1) 大量のリンパ球採取が必要なためドナーに負担がかかること、(2) 臍帯血移植ではDLIが行えないことなどの技術的な側面のほかに、(3) 致死性GVHD が7%前後であること、(4) 急性リンパ性白血病に対しては無効であること、などの問題点を内包している。

研究者らが開発した活性化 CD4-DLI は(1) 採血量が10ml前後で良く、(2) 生着したリンパ球からの増幅が可能で、(3) 臍帯血移植にも応用可能な点がメリットであり、固相化 CD3 抗体と IL-2 刺激により、T 細胞を1,000 倍以上に増幅し、活性化して用意することができる。この方法により、効果発現までの時期を短縮し、またDLI で認められる有害事象が軽減されることを目指すことができる。

平成12年度からの本研究班での継続的研究により、GMP 対応施設での品質保証された細胞調製システムが確立し、探索的臨床研究により、(1) 再発白血病・生着不全56例に対するCD4-DLI では重症GVHDの頻度が従来法の50%以下で、36例の日和見感染症に対するCD4-DLI では重症GVHDがゼロであること、(2) 再発白血病に対しては従来のDLIと少なくとも同程度の効果があること、(3) 薬剤抵抗性CMV感染症10例中7例で有効で、治療抵抗性ADV感染症4例中2例でウイルスの消失を認めること、を明らかにした。

今年度は以下のことを目的とした研究を行った。

- (1) 網羅的迅速感染症モニタリングシステムの確立と、それをを用いた移植前後のウイルス感染症の解析
- (2) 造血幹細胞移植後難治性 CMV・アデノウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験
- (3) 活性化 CD4-DLI の有効性・安全性評価のためのモデルマウスの確立

## B. 研究方法

### 1. 高感度多項目迅速ウイルス検出システム

Multiplex PCR 法および蛍光ハイブリダイゼーションプローブを用いて、キャピラリーPCR機にてFRET法-融解曲線分析-を行い、12種類のウイルス(HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BK virus, JC virus, Parvovirus B19, HBV)を2時間以内に20copy以下の感度で検出した。またそれぞれのウイルスについてはリアルタイムPCR系を開発し、定量測定を行えるようにした。さらに Adenovirus, Norovirus, Pneumocystis jirovecii に関しては別途定量系を確立した。このシステムを用いて22名の患者では移植前後の定期的モニタリングを行い、31名の患者では診断のための検査を行った後に、フォローアップを開始した。

### 2. 造血幹細胞移植後難治性 CMV・アデノウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験

プロトコール委員会において臨床試験プロトコールを作成し、平成16年末に臨床試験をopenとした。

参加施設の倫理審査委員会・IRBに承認を得た後、平成17年4月から実質上の登録が開始されている。

臨床試験の概要は以下のとおりである。

対象:

#### A. 造血幹細胞移植後の難治性 CMV 感染症

ガンシクロビル、フォスカルネット、または両者による4

週間の治療後に CMV が一定量以上検出されることを条件とする。

#### B. 造血幹細胞移植後の難治性 ADV 感染症

診断2週後に ADV が検出され、明らかな臨床症状があることを条件とする。

試験薬:

ドナーリンパ球、あるいはレシipientに生着した T リンパ球を固相化抗 CD3 抗体とインターロイキン 2 と共に培養して、T 細胞を活性化増殖させ、さらに CD4 陽性 T 細胞を選択して、増殖させたもの。細胞は、ISO9001 規格に基づいて品質保証された細胞を供給できる、東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターにて調製する。

治療及び評価の概要:

#### A. 難治性 CMV 感染症:

ガンシクロビル(デノシン)、ホスカルネット(ホスカビル)、あるいは両者による 4 週間の治療後に 1) CMV のコピー数 3000/ml 全血以上あるいは 2) CMV アンチゲネミア 10/50,000 以上の患者に対し、活性化 CD4T 細胞 (5x10<sup>6</sup> 細胞/kg) 2 週おきに 2 回投与する。

評価は、CMV コピー数、臨床症状・所見、血液検査データなどにより行い、最終投与 2 週後の CMV コピー数が 0 となるものを著効とする。フォローは最終投与 8 週間まで行う。

#### B. 難治性 ADV 感染症

診断確定後 2 週後に ADV が検出され、臨床症状がある患者さんに対して、活性化 CD4T 細胞 (5x10<sup>6</sup> 細胞/kg) 2 週おきに 2 回投与する。

評価は、ADV コピー数、臨床症状・所見、血液検査データなどにより行い、最終投与 2 週後の ADV コピー数が 0 となるものを著効とする。フォローは最終投与 8 週間まで行う。

#### 3. 活性化 CD4-DLI の有効性・安全性評価のためのモデルマウスモデルの確立

成人末梢血及び臍帯血から EBV-LCL を樹立し、その細胞を NOG-SCID マウスに移植して、LCL 白血病モデルマウスを作成した。

その後、同一ドナーから活性化 CD4T 細胞を培養し CD4-DLI を行い、CD4-DLI を行わない群との間で、生存率を比較し、体重や病理学的な GVHD 所見などを検討した。またリンパ球亜群解析・LCL の解析を経時的にフォローして、腫瘍及び T 細胞の体内分布を検討した。

(倫理面への配慮)

この研究では、実際に患者に対する細胞投与が行われるため、臨床研究プロトコルに記載された説明書に基づいて、研究内容を説明しインフォームドコンセントを取得した。臨床研究プロトコルは治療を行う各施設の倫理審査委員会・IRB の承認を得た。

#### C. 研究結果

##### 1. 移植前後の感染症モニタリング

53 名の幹細胞移植患者において合計 705 回(検体内容:血液 516, 尿 66, 便 50, 喀痰 18, 腸粘膜生検 11, 肝生検 2 など)の高感度網羅的迅速ウイルス測定を行った。経時的モニタリングを行った 22 名の患者のうち 16 名で経過中にウイルスが検出され、そのうち 10 名は症状を伴う感染症の原因ウイルスであった。

EBV, CMV, HHV6, ADV, BKV などのウイルスが比較的高頻度で検出され、検出は移植後 14 日 - 60 日をピークとしていた。

ADV, BKV 膀胱炎では、ADV+BKV, BKV+JCV など複数ウイルスが検出されることがあり、血液中でも CMV 等のウイルスが検出される率が高かった。

複数ウイルス検出率は 17.4% で、喀痰・便などで高頻度であったが、血液からも 11.8% の検体で検出された。また 3 種類以上のウイルスは主に重症感染症・長期感染症者の喀痰・尿・便から検出された。

##### 2. 造血幹細胞移植後難治性 CMV・アデノウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験

表 1 に示す 8 例の症例に対して活性化 CD4-DLI を行った。初期登録時の感染症としては、CMV 感染症が 4

例、ADV感染症が4例であったが、1例は人工呼吸器管理、ステロイド使用中であり、その時点で不適格と判断されて、パイロット臨床研究に移行した。その他の5例でも(1)初期登録時にはウイルスが検出されるが、投与前確認検査でウイルスの消失あるいは基準値以下、(2)そのほかの重大なウイルス感染症の合併、のいずれかにより不適格と判定され、パイロット臨床研究において細胞投

与が行われた。

ADV感染症の1例では実際に投与及びフォローアップが行われ、ADVの消失を認め、評価委員会の審査対象となっている。効果や有害事象に関しては、今後評価委員会において検討される予定である。

表： 臨床試験登録患者サマリー

患者	原疾患	ドナー	対象感染症	他のウイルス	不適格理由
1.	AML	非血縁骨髄	CMV 感染症	BKV	人工呼吸管理 ステロイド投与
2.	AML	血縁骨髄	ADV 膀胱炎	CMV, BKV	治療前 ADV 陰性
3.	RMS	血縁骨髄	ADV 膀胱炎	HHV6, BKV, JCV, CMV	適 格
4.	CML	非血縁骨髄	ADV 膀胱炎	CMV	CMV 陽性 (培養後 HHV6 陽性)
5.	AML	非血縁骨髄	ADV 膀胱炎	BKV	治療前 ADV 陰性
6.	AML	非血縁骨髄	CML 感染症		CMV 陰性
7.	MDS	非血縁末梢血移植	CMV 腸炎	BKV	血液陰性・便陽性
8.	ALL	非血縁臍帯血移植	CMV 感染症		適 格 (薬剤性腎機能障害→回復待)

RMS: rhabdomyosarcoma (そのほか2例の BKV 感染症に対して治療)

### 3. 活性化 CD4-DLI の有効性・安全性評価のためのモデルマウスモデルの確立

EBV-LCL を NOG-SCID マウスに輸注した群では、移植2週後から骨髄及び末梢血中に LCL が出現し、白血病のような病増を呈した。また同時期より体重減少が進行し、4週後にほとんどのマウスが死亡した。剖検では全例でリンパ節腫大、LCL による肝臓・腎臓への結節

病変が認められた。

一方 EBV-LCL 移植後に CD4-DLI を行ったマウスでは、2、3週後に末梢血及び骨髄で T 細胞が検出されたが、同部位では LCL は検出されなかった。また肝臓や腎臓には結節を形成し、その周囲に T 細胞の集簇が認められた。GVHD の所見はなかったが、生存率の有意な改善は認められなかった。

#### D. 考察

移植前後の感染症モニターに有用な高感度網羅的迅速 PCR システムを確立し、実際に測定を行った。

解析結果では複数以上のウイルスが検出されることも多く、原因ウイルスの特定にはウイルスコピー数、コピー数の経時的測定、血液ウイルス PCR、生検の併用など、総合的判断が必要と考えている。いずれにせよ、個別ウイルスの PCR では計測したウイルスの情報しか得られない。高感度網羅的迅速ウイルス測定は迅速かつ安価な検査であり、定期モニタリング及び症状出現時検査として有用と判断している。

この検査系は、「造血幹細胞移植後難治性 CMV・アデノウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験」においても使用している。重篤な合併症や、治療前のウイルス減少によって、不適格となる症例もあったが、治療前の測定で複数以上のウイルスが数多く同定され、「その他のウイルス感染症」によって不適格になる症例も存在した。

移植後高感度網羅的迅速ウイルス検査からも、2 週類以上のウイルスが並存することが多いことが判明しており、特に CMV が検出された症例では 55.9%、ADV が検出された症例では 68.6%において他のウイルスが同時に存在している。血液検体だけに絞っても CMV 陽性例では 55.2%、ADV 陽性例では 75%で複数ウイルスが検出されている。今後複数ウイルスの存在を「除外項目」から除くことを検討する必要がある。ウイルスとしてはまた、BK ウイルス感染症の増加も目立つ。有効な治療薬のない感染症であり、今後 BKV に対する活性化 CD4-DLI の効果を探索的臨床研究にて検討することを考慮したい。

また GVHD を中心とする様々な合併症から steroid を中止できない症例があることも判明している。これらに対する対応策を探ることも急務と考えられる。

活性化 CD4-DLI は移植後再発白血病や生着不全に対しても、その有効性と安全性を検証する臨床研究

プロトコール作成が進行中である。今回の研究によりはじめて、「活性化 CD4-DLI 有効性・安全性評価のためのモデルマウスシステム」が確立しつつあり、新体制での臨床試験前に、有用なデータを供給してくれるものと考えている。

#### E. 結論

移植前後の高感度多項目迅速ウイルスモニタリングの確立により、移植後 ADV 感染症、CMV 感染症発症時の co-infection, superinfection の状況が明らかになった。

平成17年度には「造血幹細胞移植後難治性 CMV・アデノウイルス感染症に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験」が開始した。8例が初期登録を済ませ、2例の適格者のエントリーが行われている。複数感染症、治療前の(一過性の)ウイルス減少)、重篤な臓器障害などを有する症例では、パイロット的な投与を行い、少なくとも有害事象については追跡可能な状況にしている。今後さらにエントリー数を増やして臨床研究を継続する予定である。

また今後、「造血幹細胞移植後再発白血病に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験」、「造血幹細胞移植後生着不全に対する活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験」などの臨床試験プロトコール案を作成する予定であるが、それに向けての「活性化 CD4-DLI 有効性・安全性評価のためのモデルマウスシステム」が確立された。様々に有用性が高いと考える。

#### F. 健康危険情報

あきらかな該当事項はない。



G.

研究成果

論文発表

1. Tsuji Y, Ito S, Isoda T, Kajiwara M, Nagasawa M, Morio T, Mizutani S. Successful nonmyeloablative cord blood transplantation for an infant with malignant infantile osteopetrosis. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2005; 27: 495-498.
2. Okano M, Kawa K, Kimura H, Yachie A, Wakiguchi H, Maeda A, Imai S, Ohga S, Kanegane H, Tsuchiya S, Morio T, Mori M, Yokota S, Imashuku S. Proposed Guidelines for Diagnosing Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *Am. J. Hematol.* 2005; 80: 64-69.
3. Yu JH, Lim JW, Kim KH, Morio T, Kim H. NADPH oxidase and apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar AR42J cells. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39: 590-602.
4. Imai K, Zhu Y, Revy P, Morio T, Mizutani S, Fischer A, Nonoyama S, Durandy A. Analysis of class switch recombination and somatic hypermutation in patients affected with autosomal dominant hyper-IgM syndrome type 2. *Clin. Immunol.* 2005; 115: 277-85.
5. Chen L, Morio T, Minegishi Y, Nakada S, Nagasawa M, Komatsu K, Chessa L, Villa A, Lecis D, Delia D, Mizutani S. Ataxia-telangiectasia-mutated dependent phosphorylation of Artemis in response to DNA damage. *Cancer Sci* 2005; 96 (2):134-41.
6. Tomizawa D, Aoki Y, Nagasawa M, Kajiwara M, Sekine T, Shimizu N, Kato M, Yachie A, Mizutani S, Morio T. Adopted immunotherapy for mixed

chimerism after unrelated cord blood transplantation using reduced-intensity conditioning in Omenn disease. *Eur. J. Haematol.* 2005; 75: 441-444.

7. Nagasawa M, Zhu Y, Isoda T, Tomizawa D, Itoh S, Kajiwara M, Morio T, Nonoyama S, Shimizu N, Mizutani S. Analysis of serum soluble CD40 ligand (sCD40L) in the patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: Platelet is a major source of serum sCD40L. *Eur. J. Hematol.* 2005; 74:54-60.

総説:

1. 田中聡, 伊藤仁也 Ex Vivo 増幅培養にともなう臍帯血造血幹細胞の FACS 解析 *Cytometry Research* 15: 21-25, 2005. 田中宏和, 伊藤仁也 臍帯血移植】臍帯血造血幹細胞の体外増幅 血液・腫瘍科 51: 148-153, 2005.
2. 中畑龍俊, 伊藤仁也 【血液疾患 state of arts】治療法をめぐる最近の進歩 臍帯血造血幹細胞の体外増幅システムとその応用 医学のあゆみ別冊 卷血液疾患-state of arts Ver.3: 559-563, 2005
3. 伊藤仁也, 中畑龍俊 幹細胞の臨床応用 ここまで来ている再生医療 ex vivo 増幅造血幹細胞を用いた臍帯血移植 *実験医学* 24: 274-285, 2006.

学会発表

1. 森尾友宏, 青木由貴, 磯田健志, 富澤大輔, 長澤正之, 水谷修紀, 馬場憲三, 水上美樹, 渡邊健, 清水則夫 日和見感染症の的確な早期診断を目指した高感度迅速網羅的微生物検出システムの開発 第108回日本小児科学会学術集会 東京 2005年4月22日~24日
2. 清水則夫, 水上美樹, 渡邊健, 熊谷麻理, 森尾友宏, 馬場憲三, 山本興太郎, 梶原道子 再生医療をサポート

- トする網羅的ウィルス検査システムの開発 第 53 回日本輸血学会総会 2005 年 5 月 26-28 日
3. 伊藤仁也 造血幹細胞移植 輸血部門での対処, 取り扱い 造血幹細胞を用いた細胞治療における cell processing と documentation 第 53 回日本輸血学会総会 2005 年 5 月 26-28 日
4. 森尾友宏、清水則夫「造血幹細胞移植後難治性感染症に対する活性化 CD4DLI 療法-治療の背景と臨床試験経過報告-」平成 17 年度 厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業 「骨髄、末梢血等を利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立並びにドナー及びレシピエントの安全確保と QOL 向上に関する研究」班 第 1 回班会議 2005 年 7 月 01 日、02 日(名古屋)
5. 富澤大輔、青木由貴、磯田健志、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀 原発性免疫不全症に対する Reduced-intensity stem cell transplantation. 第 47 回小児血液学会、宇都宮、2005 年 11 月 26 日
6. 梶原道子、青木由貴、佐藤隆介、磯田健志、富澤大輔、今井耕輔、辻陽一郎、長澤正之、森尾友宏、野々山恵章、水谷修紀. 原発性免疫不全症 30 例に対する造血細胞移植に関する臨床的検討. 第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会合同総会、横浜、2005 年 9 月.
7. 清水則夫、森尾友宏: 新しいドナーリンパ球輸注療法(DLI)の実用化を目指して、平成 17 年度厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業六研究班合同公開シンポジウム、東京、2006 年 1 月 28 日
8. 森尾友宏、清水則夫: 造血幹細胞移植前後の微生物モニタリングと活性化 DC4-DLI 平成 17 年度厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「骨髄、末梢血等を利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立並びにドナー及びレシピエントの安全確保と QOL 向上に関する研究」班第 2 回班会議、2006 年 1 月 27 日
9. 森尾友宏、小野敏明、青木由貴、佐藤隆介、富澤大輔、長澤正之、水谷修紀、梶原道子、海老沢美穂、落合央、峯岸志津子、水上美樹、渡邊健、清水則夫、大隈一興、関根暉彬 高感度迅速網羅的ウィルス測定法による造血幹細胞移植前後の感染モニター、第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006 年 2 月 24-25 日
10. 初山麻子、伊藤仁也、田中宏和 NOD/SCID マウス移植モデルにおける臍帯血及び増幅臍帯血の長期体内動態、第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006 年 2 月 24-25 日
11. 丸山京子、伊藤仁也 臍帯血由来 ex vivo 増幅 CD34 陽性細胞からの樹状細胞誘導、第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006 年 2 月 24-25 日
12. 高田のぞみ、田中宏和、丸山京子、初山麻子、鹿村真之、槻木裕志、伊藤仁也 ex vivo 増幅臍帯血移植における臍帯血選択基準についての検討、第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006 年 2 月 24-25 日
13. 鹿村真之、伊藤仁也、清水則夫 免疫不全マウスを用いた活性化 CD 4 輸注療法の有効性、安全性の評価、第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006 年 2 月 24-25 日
14. 戸上勝仁、藤田晴之、田中康博、倉田雅之、橋本尚子、松下章子、前田明則、伊藤仁也、永井謙一、高橋隆幸 同種造血幹細胞移植後アデノウイルス性出血性膀胱炎を発症した 6 例、第 28 回日本造血細胞移植学会総会、2006 年 2 月 24-25 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 造血幹細胞移植後の生着安定組成物、該組成物を得るためのキット、造血幹細胞移植後の生着安定方法、ならびにヒトモノクローナル抗体あるいはヒトポリクローナル抗体の製法(特願 2004 - 138468、出願日 H16.5.7). 出願人: 黒岩保幸(株)リンフォテック. 発明者: 関根暉彬、森尾友宏、清水則夫他.

2. 腫瘍・感染症および自己免疫疾患の予防・治療用 HLA 一致他人由来活性化リンパ球および該リンパ球を主成分とする製剤ならびに該製剤の製造方法、該製剤調製用キット(特開 2004-2312) 出願人: 黒岩保幸(株)リンフォテック. 発明者: 関根暉彬、森尾友宏、清水則夫他.

3. 標的核酸の検出法(特願 2003-164799) 出願人: 清水則夫. 発明者: 関根暉彬、黒岩保幸、森尾友宏他.

4. 臍帯血由来活性化リンパ球及び該リンパ球を主成分とする製剤ならびに該製剤の製造方法、該製剤調製用キット(特開 2002 - 171966) 出願人: 黒岩保幸(株)リンフォテック. 発明者: 関根暉彬、森尾友宏、清水則夫他.

マイナー抗原特異的 T 細胞による DLI のための臨床試験体制の  
確立と実施に関する研究

分担研究者 赤塚美樹（愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部）

研究要旨

マイナー抗原は同種移植において、ドナーと患者間における遺伝子多型の違いによって移植片対宿主病（GVHD）や移植片対白血病／リンパ腫（GVL）／腫瘍（GVT）効果の標的となる抗原である。我々は同定した血液系細胞に特異的に発現する遺伝子 *BCL2A1* にコードされる HLA-A24 拘束性エペトープを用いた養子免疫療法の臨床試験を開始している。さらに対象症例を増やすために、新規のマイナー抗原の同定も継続している。本年度は昨年度に引き続きカテプシン H（*CTSH*）遺伝子上の遺伝子多型に由来するマイナー抗原の組織特異性を詳細に検討した。また、HLA-B44 拘束性新規マイナー抗原をコードする遺伝子を同定した。さらに HLA-A\*0206, A24, B\*4006 拘束性の CTL クローンを樹立した他、GVL の標的として有望な HA-1 が HLA-A\*0201 以外の HLA アリルでも抗原提示されることを見いだした。養子免疫療法に関しては、ドナーの成分採取等の負担を軽減する目的で、ドナースクリーニングを行った健常人数名から得た単核球と血漿を用いて CTL を増幅する系を確立した。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する有用な治療法として確立されてきた。しかし、難治性造血器腫瘍に対する移植成績は移植後の再発のため、まだ満足できるものではない。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対腫瘍（GVT）効果が期待できるが、その効果が原病の悪性度を克服できないと再発が起ると考えられる。GVT 効果の主要な標的はマイナー抗原であるが、これはドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来する蛋白断片（ペプチド）が患者の HLA 分子に提示されて抗原性を持ったものである。腫瘍細胞を含む血液系細胞に特異的に発現する遺伝子にコードされるマイナー抗原は、移植後の再発腫瘍に対する免疫療法に有用である。今回我々は、昨年

度報告した HLA-A\*3101 および A\*3303 によって提示される *CTSH* マイナー抗原（ACC-4, 5）の組織特異性を詳細に検討した他、HLA-B44 拘束性のマイナー抗原（ACC-6）を同定し、さらに Goulmy らが報告した HA-1 が他の HLA アリルによっても提示されることを見いだしたので、養子免疫療法の臨床試験の準備状況とともに報告する。

B. 研究方法

① HLA-A\*3101 および A\*3303 拘束性の CTL クローンが認識するマイナー抗原遺伝子 *CTSH* を昨年度同定したが、この *CTSH* 翻訳産物の各種臓器・組織での発現を共焦点レーザー顕微鏡で検討した。さらに入手し得た正常腎尿細管上皮細胞と腎癌細胞が CTL で傷害を受けるかどうかを検討した。

② HLA-B44 拘束性の CTL が認識する遺伝子の局在をまず連鎖解析法および DNA プールを用いたマイクロサテライト解析法で検討した。以上により染色体上の遺伝子座位は決定できたが、遺伝子の同定には至らなかったため、発現クローニング法で遺伝子の同定を行った。

### C. 研究結果

① HLA-A\*3101 および A\*3303 拘束性の CTL クローンは造血系細胞を強く傷害し、非造血組織由来の細胞に対する傷害は軽度か無かった。連鎖解析法では遺伝子の同定に至らなかったため、マイナー抗原陽性である患者の LCL より作製した cDNA ライブラリーを用いて発現クローニングを実施し、マイナー抗原遺伝子としてカテプシン H (CTSH) を同定した。この遺伝子の発現は比較的 ubiquitous であるが、CTL に対する標的細胞の感受性は必ずしも一致しなかったため、マイナー抗原をコードしている isoform a (ライソゾーム局在型) が造血系細胞でユニークに発現していないか、HLA-DM と CTSH に対する抗体を用い、共焦点レーザー顕微鏡で解析した (図 1)。結果として、非造血細胞も isoform a を大量に発現していることが分かった。次に HLA-A\*3101 陽性、CTSH マイナー抗原陽性の腎がん患者から得た正常腎尿管上皮と腎がん細胞株 (ともに CTSH 蛋白質を強発現) が CTL で傷害を受けるか検討した。IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  で前処置しても傷害されず (図 2A)、またこれは細胞内抗原プロセッシング装置をコードする mRNA の発現量の違いでも説明できなかった (図 2B) (論文投稿中)。以上の機序は不明であるが、非造血組織で発現している CTSH は認識されない可能性が高く、GVL を期待した養子免疫療法への応用が期待できる。

② HLA-B\*44 拘束性の CTL クローンは造血系

細胞を強く傷害し、標的とし得た非造血組織由来の細胞に対する傷害は認められなかった。従来の連鎖解析法では遺伝子の同定に至らなかったため、同様にマイナー抗原陽性である患者の LCL より作製した cDNA ライブラリーを用いて発現クローニングを実施し、機能未知の EST を同定した。この遺伝子は一塩基多型の有無によりスプライシングパターンが異なるために、患者では exon 2 が存在せず、結果としてフレームシフトを起こした部分のポリペプチドがマイナー抗原をコードしていることを見いだした (ACC-6)。現在、定量 PCR を用いて各種組織での発現分布パターンを検討しつつ、臨床検体を用いて本マイナー抗原の意義付けを行っている (川瀬孝和、未発表データ、論文執筆中)。

③ マイナー抗原を標的とした養子免疫療法の臨床研究には 2 症例がエントリーした。第 1 例目は CTL クローン樹立中に腫瘍死した。第 2 例目は ACC-1 の不適合が存在したため、移植後 100 日前後の末梢血をペプチド刺激後に ACC-1 テトラマーを用いて検討したところ 20-50% の細胞がテトラマー陽性となり、CTL の誘導が可能であることが分かった (図 3)。現在、仮エントリー中の多発性骨髄腫再発症例に対して CTL の樹立を試みている。

また CTL の増幅法については、昨年度、移植ドナーの血清・単核球をフィーダーとする方針を示したが、ドナーの負担軽減と、より迅速で増殖効率の高い培養系を得るために、日本赤十字血液センターの採血基準を満たすような篤志健常人ドナー数名より成分採取を行い、血漿から培養用血清を、単核球からフィーダー細胞を得る方法を採用し、6 名のプールを作製した。CTL の増幅効率は良好であることが分かったため、今後はこの方法で養子免疫療法を施行する予定である。

## D. 考察

HLA-A\*3101、A\*3303 によって提示される新規マイナー抗原は、組織発現パターンが ubiquitous であったが、単球系細胞に多く発現しており、また細胞傷害性試験では検討し得た非造血系細胞では CTSH の発現にもかかわらず全く傷害されないことより、単球性白血病を中心とした造血器腫瘍の免疫療法に応用できる可能性が十分ある。現在、テトラマーを使って患者末梢血中での CTL の動態等の解析を行っている。

この他にも3種類の新規 CTL を樹立した他、HA-1 マイナー抗原の3番目の拘束性 HLA アリルを同定しており（論文執筆中）、臨床応用に向けてさらなる基礎研究を進める必要がある。

クローン化した CD8<sup>+</sup> CTL は、bulk の CD4<sup>+</sup> 細胞と異なり、容易に増幅されない。そのためフィーダー細胞が必要となるが、今後厚生労働省から示される「ヒト幹細胞を持ちいる臨床研究に関する指針」等に準拠しつつドナースクリーニングをすすめる、アロのフィーダーで安定的な CTL の増幅が可能になるようにさらなる培養条件の検討が必要と考えられる。

## E. 結論

比較的 ubiquitous に発現している CTSH 遺伝子多型にコードされる HLA-A\*3101、A\*3303 に拘束されるマイナー抗原特異的 CTL が、造血系細胞を特異的に傷害することを示した。また HLA-B44 拘束性の新規マイナー抗原を同定し、その詳細な解析を進めており、臨床応用について今後検討する意義があると考えられた。また、より効率的で安全な CTL クローンの増幅法がほぼ確立出来たので、今後養子免疫療法の対象となる症例の蓄積をはかりたい。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Demachi-Okamura A, Ito Y, Akatsuka Y, et al. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1-specific cytotoxic T lymphocytes targeting EBV-carrying natural killer cell malignancies. *Eur J Immunol.* 36: 593-602, 2006 .
- 2) Terakura S, Murata M, Nishida T, Emi N, Akatsuka Y, Morishima Y, Kodera Y, Naoe T. Increased risk for treatment-related mortality after bone marrow transplantation in GSTM1-positive recipients. *Bone Marrow Transplant.* 37: 381-386, 2006.
- 3) Ito Y, Kondo E, Demachi-Okamura A, Akatsuka Y, et al. Three immunoproteasome-associated subunits cooperatively generate a cytotoxic T-lymphocyte epitope of Epstein-Barr virus LMP2A by overcoming specific structures resistant to epitope liberation. *J Virol.* 80: 883-890, 2006.
- 4) Terakura S, Murata M, Nishida T, Emi N, Akatsuka Y, Riddell SR, Morishima Y, Kodera Y, Naoe T. A UGT2B17-positive donor is a risk factor for higher transplant-related mortality and lower survival after bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 129: 221-228, 2005.

### 2. 学会発表

- 1) 鳥飼宏基, 赤塚美樹, 宮崎幹則, 辻村朱音, 伊藤嘉規, 辻村邦夫, 元吉和夫, 森島泰雄, 小寺良尚, 葛島清隆, 高橋利忠 HLA-A\*3101 及び-A\*3303 拘束性の CTSH 遺伝子

上の同一多型部位にコードされる 2 つの新規マイナー組織適合抗原の同定：基盤的癌免疫研究会第 9 回総会 東京 2005 年 6 月

2) 森島聡子, 赤塚美樹, 那波明弘, 清野透, 鳥飼宏基, 伊藤嘉規, 辻村邦夫, 葛島清隆, 高橋利忠：HPV16 型 E6 上の HLA-A24 拘束性 CTL エピトープの同定と bortezomib, INF- $\gamma$  の併用効果：基盤的癌免疫研究会第

9 回総会 東京 2005 年 6 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

「Cathepsin H タンパク質由来の CD8+細胞傷害性 T リンパ球 mHA エピトープペプチドおよびその用途」を申請中である（特願 2004-325328）

図 1 CTSH タンパク質の組織発現と傷害性

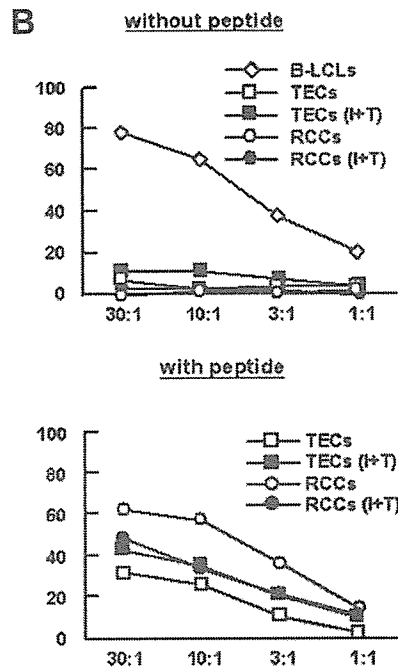
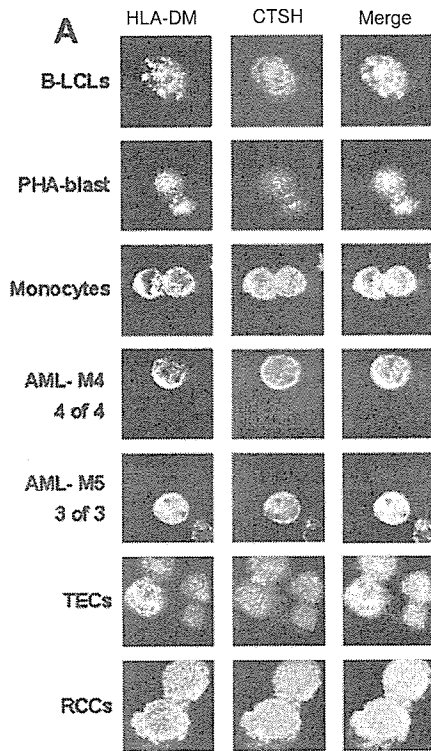
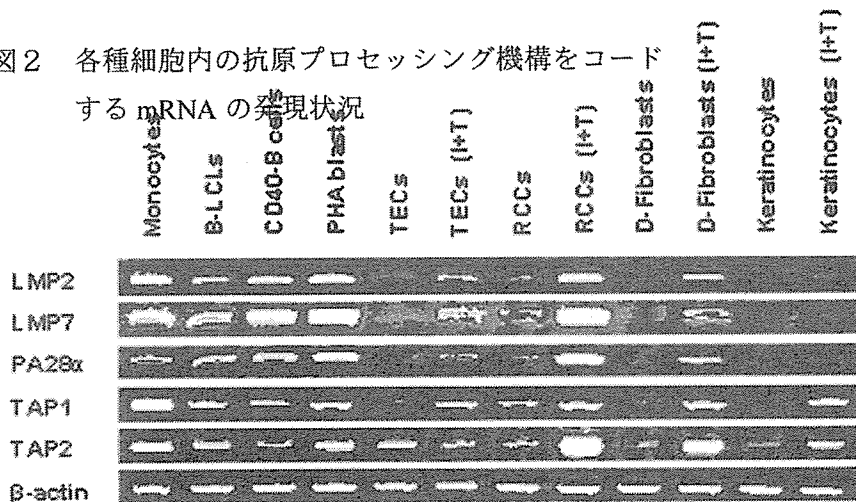
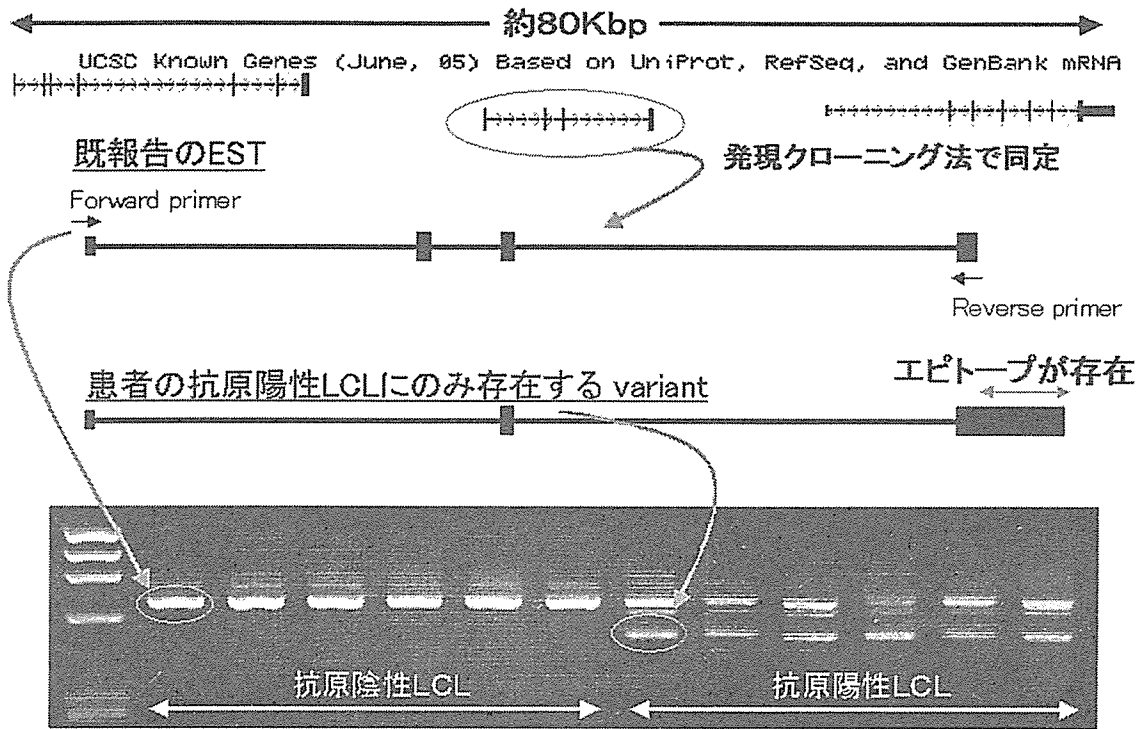


図 2 各種細胞内の抗原プロセッシング機構をコードする mRNA の発現状況



LMP : low molecular weight protein (免疫プロテアゾームの構成成分),  
 TAP : transporter associated with antigen processing,  
 LCL : EBV 株化 B 細胞,  
 PHA : PHA 芽球,  
 TECs : 正常尿管上皮,  
 RCCs : 腎細胞がん株,  
 D : 皮膚  
 I+T : interferon- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  処理

図3 HLA-B44 拘束性マイナー抗原の抗原性決定機構





分担研究報告書

造血幹細胞骨髄内直接移植法の臨床試験体制の確立と実施に関する研究

分担研究者 池原 進 関西医科大学 病理学第一講座教授

**研究要旨** 我々が開発した新しい骨髄移植の技術（“灌流法”＋“骨髄内骨髄移植法”）は、ヒト同種骨髄移植の主要な問題点を解決する革新的技術であり、造血幹細胞の異常に基づく白血病や自己免疫疾患のみならず、幹細胞の加齢に伴って発症する多様な疾患（骨粗鬆症、血管傷害、アルツハイマー病、糖尿病等）の根治療法の開発に直結する。ヒトへの応用を目指して、精力的にサルの実験を実施してきたが、100匹以上のサルを用いた実験の結果、安全性と有効性が確認できたので、ヒトへ応用する。ヒトへの応用に関しては、全国規模の研究会が今年の2月に発足し、今年中に灌流法の安全性を確認するPhase I studyを実施することに決定した。

A. 研究目的

本研究の目的は、小動物並びにモンキーを用いて骨髄内骨髄移植(IBM-BMT)の有効性と安全性を確認し、ヒトへ応用することにある。

B. 研究方法

小動物（マウス、ラット、ウサギ等）を用いて、IBM-BMTと従来の静脈内移植(IV-BMT)の有効性を比較する。小動物は、正常のものから、難病のモデル動物を用いる。ヒトへの応用を視野に入れて、実験用カニクイザルを用いて、灌流法とIBM-BMTの安全性を確認し、最善のconditioning regimenを決定する。

（倫理面への配慮）

実験動物を使用するにあたっては、本学の動物センターの委員会の承認を受け、実施する。サルで、申請者らが新しく発見した方法の妥当性を十分に確認してから、ヒトへ実施する。当大学には倫理委員会が設置されており、将来、ヒトに実施するには、委員会の承認を得るとともに、患者と家族に対するインフォームド・コンセントを得て実施する。

C. & D. 研究結果及び考察

- i) マウスで、IBM-BMTとDLI（特にCD4<sup>+</sup>細胞除去）の併用により、悪性腫瘍の増殖を抑制するシステムを開発した（文献①参照）（特願中）
- ii) M-CSFもG-CSFと同様に血管の再生を促進する作用がある（文献②参照）。
- iii) あらかじめ、G-CSFで骨髄中の前駆細胞を血中に動員しておくこと、シスプラチンによる腎傷害を軽減することができる（文献③参照）。
- iv) ストレプトゾトシンで誘発した糖尿病ラットに脾島の移植とIBM-BMTにより糖尿病が治療できる（文献④参照）。
- v) 臓器移植で、移植の生着率が一番悪い肺の移植に関しても、ラットで、IBM-BMTを併用することによって、生着率を上げる方法を開発した（文献⑤参照）。
- vi) N-CAMが造血幹細胞と間葉系幹細胞の接着、増殖に重要な因子である（文献⑥参照）。
- vii) アドレマイシンで誘発した心筋症（拡張性心筋症のモデル）の治療法を開発した。すなわち、HGFを含んだマイクロバブルを超音波で破壊することにより、HGFを直接、傷害心筋に作用させ、心筋の増殖を促進させ、心筋の機能を回復させることができる（文献⑦参照）。

viii) 間葉系幹細胞をマウス胎仔の骨髄から精製する方法を開発した（文献⑧参照）。

ix) 骨粗鬆症のモデルマウス(SAMP6)を用いて、IBM-BMTにより、骨粗鬆症が治療できる（文献⑨参照）。

x) M-CSFが、虚血肢の血流の改善に有効であるメカニズムを明らかにした（文献⑩参照）。

E. 結論

IBM-BMTと灌流法（長管骨〔上腕骨等〕に2か所、骨髄針を挿入し、片方から生食で骨髄内を灌流する方法）の組み合わせは、GvH反応も生着不全も起らず、最善の移植方法と考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

（国内）

池原 進：骨髄移植による自己免疫疾患の治療。医学のあゆみ 213: 96-98, 2005

（国外）

1. Suzuki Y, Adachi Y, Minamino K, Zhang Y, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, and Ikehara S: A new strategy for treatment of malignant tumor: Intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus CD4- donor lymphocyte infusion. Stem Cells 23: 365-370, 2005.
2. Minamino K, Adachi Y, Okigaki M, Ito H, Togawa Y, Fujita K, Tomita M, Suzuki Y, Zhang Y, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, Matsubara H, Iwasaka T, Matsumura M, and Ikehara S: Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), as well as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), accelerates neovascularization. Stem Cells 23: 347-354, 2005.
3. Iwasaki M, Adachi Y, Minamino K, Suzuki Y, Zhang Y, Okigaki M, Nakano K, Taketani S, Takahashi H, Iwasaka T, and Ikehara S: Mobilization of bone marrow cells by G-CSF rescues mice from cisplatin-induced renal failure, and M-CSF enhances the effects of G-CSF. J. Am. Soc. Nephrol. 16: 658-666, 2005.

4. Taira M, Inaba M, Takada K, Baba S, Fukui J, Ueda Y, Kwok AH, Hisha H, Kamiyama Y, and Ikehara S: Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats by transplantation of islet cells from two major histocompatibility complex disparate rats in combination with intra bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Transplantation* 79: 680-687, 2005.
5. Kaneda H, Adachi Y, Saito Y, Ikebukuro K, Machida H, Suzuki Y, Minamino K, Zhang Y, Iwasaki M, Imamura H, and Ikehara S: Long-term observation after simultaneous lung and intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *J. Heart Lung Transplant.* 24: 1415-1423, 2005.
6. Wang X, Hisha H, Taketani S, Inaba M, Li Q, Cui W, Song C, Fan T, Cui Y, Guo K, Yang G, Fan H, Lian Z, Gershwin ME, and Ikehara S: Neural cell adhesion molecule contributes to hemopoiesis-supporting capacity of stromal cell lines. *Stem Cells* 23: 1389-1399, 2005.
7. Iwasaki M, Adachi Y, Nishiue T, Minamino K, Suzuki Y, Zhang Y, Nakano K, Koike Y, Wang J, Mukaide H, Taketani S, Yuasa F, Tsubouchi H, Gohda E, Iwasaka T, and Ikehara S: Hepatocyte growth factor delivered by ultrasound-mediated destruction of microbubbles induces proliferation of cardiomyocytes and amelioration of left ventricle contractile function in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Stem Cells* 23:1588-1597, 2005.
8. Wang X, Hisha H, Taketani S, Adachi Y, Li Q, Cui W, Cui Y, Wang J, Song C, Mizokami T, Okazaki S, Fan T, Fan H, Lian Z, Gershwin ME, and Ikehara S: Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. *Stem Cells* In press.
9. Takada K, Inaba M, Ichioka N, Ueda Y, Taira M, Baba S, Mizokami T, Wang X, Hisha H, Iida H, and Ikehara S: Treatment of senile osteoporosis in SAMP6 mice by intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells. *Stem Cells* 24: 399-405, 2006.
10. Nakano K, Adachi Y, Minamino K, Iwasaki M, Shigematsu A, Kiriya N, Suzuki Y, Koike Y, Mukaide H, Taniuchi S, Kobayashi Y, Kaneko K, and Ikehara S: Mechanisms underlying acceleration of blood flow recovery in ischemic limbs by macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). *Stem Cells* In press.

#### Review Articles:

1. Ikehara S: Intra-bone marrow-Bone marrow transplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1051: 1-9, 2005.
12. Ikehara S: A new bone marrow transplantation method for the prevention of graft-versus-host disease. *Curr. Med. Chem., Endoc. & Metab. Agents* 5: 547-554, 2005.

## 2. 学会発表

### (国内)

1. 池原 進：難病の革新的治療法—移植と再生を利用して—  
2005年8月 第4回日本組織移植学会総会「特別講演」
2. 池原 進：難病の革新的治療法—移植と再生を利用して—  
2005年9月 第67回日本血液学会第47回日本臨床血液学会合同シンポジウム「特別講演」

### H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

#### 1. 特許取得

A Method of Inducing  
Immunological Tolerance  
特開2001-172188  
特願09-531891

#### 2. 実用新案登録

骨髓液採取セット及び骨髓針  
特願2001-241586  
平成13年8月9日 (未)  
権利者名：株式会社日本抗体研究所

#### 悪性腫瘍の治療方法

特願2003-49198  
平成15年2月26日 (未)  
権利者名：関西TLO株式会社

### Ⅲ. テーマーⅡ

造血幹細胞移植と組織適合性抗原

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）  
分担研究報告書

造血幹細胞移植における組織適合性抗原の関与に関する研究  
—HLA-C タイピングの重要性：HLA, KIR 適合度と GVHD, GVL 効果—

分担研究者 森島泰雄 愛知県がんセンター  
分担研究者 屋部登志雄 東京都赤十字血液センター  
研究協力者 柏瀬貢一 東京都赤十字血液センター  
研究協力者 松尾恵太郎 愛知県がんセンター

研究要旨：日本骨髄バンクを介した非血縁者間移植においてドナーと患者間の HLA 抗原の違いが移植成績に大きな影響を与えていることが本研究班での解析で明らかになってきた。HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の遺伝子型が同定できた白血病症例につき多変量解析した。HLA-C の不適合と HLA-DPB1 の不適合で白血病再発が低下し、KIR2DL ligand 不適合では白血病再発が高率であった。さらに、KIR ligand 不適合では重症 GVHD が高率に生じ、生存も低下することが明らかになった。これら結果から、日本骨髄バンクを介した非血縁者間骨髄移植における HLA 適合度に基づいたドナー選択として、(1) HLA-C 型の適合、(2) KIR2DL ligand の適合が極めて重要であることが判明した。KIR2DL ligand の適合度は HLA-C 型から判定することができ、骨髄バンクの必須 HLA 検査として従来の HLA-A, B, DRB1 に加えて HLA-C タイピングをドナー登録時検査に導入することにより、コーディネイト期間の短縮と、より最適なドナーの選択が可能になり、移植成績を向上させ得ることが明らかになった。

A. 研究目的

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子型適合度と臨床成績、とくに重症 GVHD、白血病の再発、移植後の生存との関連を解析することにより、HLA 適合度に基づいたドナー選択の基礎データを作り、移植成績の向上に資することを目的とする。

B. 研究方法

現在までに本研究班で HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, dPB1 の DNA タイピングをドナーと患

者の検体を用いてレトロスペクティブに実施した 2423 症例を対象にした。T 細胞除去法を用いた症例と海外ドナー症例は除外した。さらに、NK 細胞受容体である KIR (killer cell Ig-like receptor : KIR) 2DL の ligand 不適合 (GVHD 方向) (KIR-L-MM) を HLA-C 型から推測した。KIR2DL1 は標的細胞の HLA-C の C1 エピトープ (Cw2,4,5,6 に共通) を認識し、この ligand 結合により NK 細胞の活性が抑制されることが判明している。同じく、