

3. Yoshida I, Matsuo K, Teshima T, Hashimoto D, Tanimoto Y, Harada M, Tanimoto M: Transient respiratory disturbance by granulocyte-colony-stimulating factor administration in healthy donors of allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion* 46: 186-192, 2006
  4. Kim SW, Tanimoto TE, Hirabayashi N, Goto S, Kami M, Yoshioka S, Uchida T, Kishi K, Tanaka Y, Kohno A, Kasai M, Higuchi M, Mori S, Fukuda T, Izutsu K, Sao H, Ishikawa T, Ichimohe T, Takeuchi K, Tajima K, Tanosaki R, Harada M, taniguchi S, Tobinai K, Hotta T, Takaue Y: Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. *Blood* 108: 382-389, 2006
  5. Kawano N, Shimoda K, Ishikawa F, Taketomi A, Yoshizumi T, Shimoda S, Yoshida S, Uozumi K, Shinsuke S, Maehara Y, Harada M: ATL development from an HTLV-I carrier after a living-donor liver transplantation. *Transplantation* 82: 840-843, 2006
  6. Tanimoto K, Sekifuchi N, Yokota Y, Kaneko A, Watanabe T, Maeshima AM, Matuno Y, Harada M, Tobinai K, Kobayashi Y: Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of primary ocular adnexal MALT lymphoma. *BMC Cancer* 6:249, 2006 (online journal)
  7. 平安山知子、宮本敏浩、和泉賢一、沼田晃彦、亀崎健次郎、山崎聡、清島久美、宮本京子、橋本大吾、岩崎潤子、岩崎浩己、長藤宏司、原田実根、稲葉頌一、豊嶋崇徳、赤司浩一：血液型不適合移植での COBE Spectra を用いた骨髄濃縮法の検討、日本輸血細胞治療学会誌 52 : 693-697, 2007
  8. Kato K, Kanda Y, Eto T, Muta T, Gondo H, Taniguchi S, Shibuya T, Utsunomiya A, Kawase T, Kato S, Morishima Y, Kodera Y, Harada M for the Japan Marrow Donor Program: Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated human T-cell leukemia/lymphoma: Retrospective analysis of data from the Japan Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:90-99, 2007
- stem cell and bone marrow transplantation from HLA identical related donors in patients with leukemia-Retrospective analysis of JSHCT registry data. 第 68 回日本血液学会総会, 福岡, 10 月 6 日, 2006
2. Noriyuki Saito, Fumihiko Ishikawa, Kazuya Shimoda, Shuro Yoshida, Yoriko Saito, Noriaki Kawano, Leonard D. Shultz, Koichi Akashi, Mine Harada : Xenotransplantation of Primary CD34+ CD38-Hematopoietic Stem Cells Results in an In Vivo Model of Idiopathic Myelofibrosis. ASH Annual Meeting, Orlando, USA, December 11, 2006
  3. Mitsuhiro Fukata, Fumihiko Ishikawa, Hideki Shimazu, Ryu Nakamura, Kazuya Shimoda, Koichi Akashi, Shultz D. Leonard, Mine Harada: Highly Purified Hematopoietic Stem Cell Can Generate Cardiomyocytes Via myeloid Progenitors through Cell Fusion. ASH Annual Meeting, Orlando, USA, December 11, 2006
  4. Syuro Yoshida, Fumihiko Ishikawa, Reonard D Shultz, Noriyuki Saito, Mitsuhiro Fukata, Kazuya Shimoda, Koichi Akashi, Mine Harada: Expression of CD10 and CD7 Defines Distinct In Vivo Lymphoid Reconstituting Capacity within Human Cord Blood CD34+ CD38-Cells. ASH Annual Meeting, Orlando, USA, December 11, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## 2. 学会発表

1. 長藤 宏司、松尾 恵太郎、原田 実根 : Comparison between peripheral blood

## 厚生科学研究補助金（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

### 平成 18 年度分担研究報告書

|       |      |              |           |
|-------|------|--------------|-----------|
| 分担研究者 | 一戸辰夫 | 京都大学大学院医学研究科 | 血液・腫瘍内科学  |
| 研究協力者 | 内山 卓 | 京都大学大学院医学研究科 | 血液・腫瘍内科学  |
|       | 松岡賢市 | 岡山大学医学部      | 血液腫瘍呼吸器内科 |
|       | 豊嶋崇徳 | 九州大学病院       | 遺伝子細胞療法部  |
|       | 丸屋悦子 | NPO          | HLA 研究所   |
|       | 佐治博夫 | NPO          | HLA 研究所   |

研究要旨：同種造血幹細胞移植の治療成績の向上に伴い、多くの移植後長期生存者が社会復帰を果たしているが、さまざまな遅発性合併症の発症により生活の質 (quality of life, QOL) の低下が見られることが大きな問題とされている。母子間マイクロキメリズムを指標とした非遺伝母 HLA 抗原 (non-inherited maternal HLA antigens, NIMA) 相補的血縁者間移植は、T 細胞除去を用いずに実施される HLA 複数抗原不一致移植であるが、その長期予後や遅発性合併症に対する知見はほとんど得られていない。本研究では、NIMA 相補的血縁者間移植の安全性と有効性を検討する一助とするため、平成 12 年度から平成 15 年度にかけて厚生労働科学研究「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究」班において実施された NIMA 相補的造血幹細胞移植の観察研究に登録された 35 症例のうち、主に移植後 1 年以上の生存が得られた例を対象として、慢性移植片対宿主病 (chronic graft-versus-host disease, cGVHD) や免疫抑制剤の投与状況、臓器合併症の実態などを明らかにするための追跡調査を計画した。従来行なわれてきた QOL 研究においては、広範型の cGVHD の存在や、HLA 不一致ドナーからの移植であることが、移植後の QOL と負の相関を示すことが報告されており、NIMA 相補的血縁者間移植の「質の評価」のために、本調査研究は重要な意義を持つものと考えられる。

#### A. 研究の背景と目的

移植前処置法の緩和化や多様化を通じて、同種造血幹細胞移植の適応年齢・適応疾患は大きく拡大されており、移植実施のために適切なドナーを選択することは、難治性血液疾患の治療方針策定の上で、ますます重要な課題となりつつある。同種造血細胞移植のドナーの選定に当たっては、レシピエントの間における HLA-A, HLA-B, HLA-DR 抗原の適合性

が重要であり、従来、これらの不一致が 1 抗原以内の血縁者、あるいはこれらを規定する遺伝子群 (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1) のアリル型不一致が 1 座以内にとどまる非血縁者が一般的に選択可能なドナーと考えられてきた。一方、原疾患の予後の改善には移植の実施が好ましいと考えられるが、上記の基準を満たすドナー候補者を迅速に見出すことが困難な場合には、HLA-A, -B, -DR の不一致が 2 抗原

以内の臍帯血を用いた移植や、最近では、研究的な治療法として HLA-A, -B, -DR に 2 抗原以上の不一致が存在する血縁者からの移植も試みられている。

「非遺伝母 HLA 抗原 (non-inherited maternal HLA antigens, NIMA) 相補的血縁者間造血幹細胞移植」は、妊娠中の母子間に成立する非自己 HLA に対する双方向性の免疫寛容が、妊娠の終了後も持続し得るという仮説に基づき、HLA の一組のハプロタイプを遺伝的に共有している HLA 2 抗原以上不一致の血縁者をドナーとして選択する実験的な HLA 不一致移植方法である。初期のパイロット臨床試験の結果を受けて、2003 年以降、本邦からその実施可能性を示す症例報告が相次いでなされたものの、その後実施された厚生労働科学研究「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究」班の観察研究 (Blood 2004;104:3821) や、現在実施中の前向き臨床試験の結果からは、一定の頻度で比較的重篤な移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) が見られることも明らかにされている。造血幹細胞移植後の生活の質には GVHD の存在が強い負の影響を与えることが知られており、今後、より安全性の高い造血幹細胞移植の提供を可能としていくために、HLA 不一致血縁者間移植後の慢性 GVHD の状況およびそれが移植後の生活に与える影響を詳細に把握することは非常に重要な課題であると考えられる。そこで今回、NIMA 相補的造血幹細胞移植後の長期生存例を対象として、慢性 GVHD を含む遅発性合併症の実状を調査することを計画した。

## B. 研究方法

平成 12 年度から平成 15 年度までに厚生労働

科学研究「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究」班における NIMA 相補的血縁者間移植の観察研究 (以後、「2000-2004 観察研究」) に登録された 35 症例のうち、解析終了時点 (2004 年 2 月 29 日) において生存が確認されていた 15 例を対象として、移植後 1 年以降の原疾患の状態、慢性 GVHD の特徴および免疫抑制剤の必要投与期間、GVHD 以外の遅発性合併症の有無に関する追跡調査を行なうことを計画した (資料参照)。なお、この調査は文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」(平成 17 年 4 月 1 日) に準拠して実施する。

## C. 研究結果

2000-2004 調査研究の解析終了時点で生存中であった 15 例を対象とした予備調査により、2006 年 12 月 31 日までに、4 例が死亡しており、残る 11 例中 10 例では移植後 3 年以上の寛解生存が得られていることが確認された。

## D. 考察

NIMA 相補的血縁者間移植のように複数の HLA 抗原に GVH 方向の不一致が存在するドナーから T 細胞除去を用いずに実施された造血幹細胞移植の経験は世界的にも稀少なものと考えられるが、今回の予備調査により移植後 3 年以上の無病生存が得られている例が少なからぬ頻度で存在していることが判明した。これまでの経験から、NIMA 相補的血縁者間移植を一般的な代替移植法として位置づけるためには、移植後早期において重篤な GVHD が経験されるリスクが高いことを含めて多くの課題が存在することが指摘されている。今後、このような長期生存例が、HLA 一致血縁

者あるいは HLA 一致非血縁者から移植を受けた場合と同等の生活の質を得ることができているのかを明らかにしていくことは、現在実施されている前向き臨床試験の結果と並んで、本移植法の効果安全性を正確に評価していくためにきわめて重要と思われる。

#### E. 結論

「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究」班の観察研究に登録された NIMA 相補的血縁者間移植例のうち少なくとも 10 例が 3 年以上の長期寛解生存を得ており、今後 NIMA 相補的血縁者間移植後の遅発性合併症の調査を行うことは可能かつ有意義であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

Teshima T, Matsuoka K, Ichinohe T: Impact of fetal-maternal tolerance in hematopoietic stem cell transplantation. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2006;**54**:165-172.

Kim SW, Tanimoto TE, Hirabayashi N, Goto S, Kami M, Yoshioka S, Uchida T, Kishi K, Tanaka Y, Kohno A, Kasai M, Higuchi M, Kasai M, Mori S, Fukuda T, Izutsu K, Sao H, Ishikawa T, Ichinohe T, Takeuchi K, Tajima K, Tanosaki R, Harada M, Taniguchi S, Tobinai K, Hotta T, Takaue Y: Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. Blood. 2006;**108**:382-389.

Arimoto K, Kadowaki N, Ishikawa T, Ichinohe T, Uchiyama T. : FOXP3 expression in peripheral blood rapidly recovers and lacks correlation with the occurrence of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. Int J Hematol. 2007;**85**:154-62.

一戸辰夫: HLA 不一致移植における NIMA 効果の意義. 臨床血液. 2006;**47**:618-625.

#### H. 知的財産権の出願状況

特になし。

資料：「NIMA 相補的血縁者間造血幹細胞移植後の遅発性合併症に関する調査（案）」

ver1.0(22DC-06)

NIMA相補的血縁者間移植・遅発性合併症調査票(1/4)

|         |  |        |           |
|---------|--|--------|-----------|
| 施設名     |  | 症例登録番号 |           |
| 調査票記入医師 |  | 調査票記入日 | 200 年 月 日 |

|  |   |  |
|--|---|--|
| 最終観察日までの移植後経過日数  | 日   |  |
| 最終観察日における原疾患の状態  | <input type="checkbox"/> 寛解維持 <input type="checkbox"/> 再発後寛解 <input type="checkbox"/> 再発後非寛解                                      |  |
| 最終観察日における転帰  | <input type="checkbox"/> 生存中  |  |
|  | <input type="checkbox"/> 死亡    主な死因; <input type="checkbox"/> 再発 <input type="checkbox"/> GVHD<br><input type="checkbox"/> その他( ) |  |
| 最終観察日におけるKarnofsky performance scale (KPS) (16歳未満の場合はLansky scaleに置き換えてご評価下さい) | <input type="checkbox"/> 正常の生活が可能   | <input type="checkbox"/> 100% 問題となる自覚症状を有さず、正常な活動が可能.<br><input type="checkbox"/> 90% 症状はあるが、正常の活動が可能.<br><input type="checkbox"/> 80% 努力をすれば正常の活動が可能.       |
|  | <input type="checkbox"/> 自宅での生活が可能であるが、労働は不可能   | <input type="checkbox"/> 70% 自分のことはできるが、労働は不可能.<br><input type="checkbox"/> 60% 時々援助を受ければ自分の身の回りの世話は可能.<br><input type="checkbox"/> 50% 相当の生活援助と頻繁な医学的管理が必要. |
|  | <input type="checkbox"/> 自宅での生活が不可能   | <input type="checkbox"/> 40%以下   |
|  |   |  |

|         |   |
|---------|---|
| 慢性GVHD* | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> 限局型 <input type="checkbox"/> 広範型 <input type="checkbox"/> 評価不能 |
|         | <input type="checkbox"/> de novo <input type="checkbox"/> quiescent <input type="checkbox"/> progressive            |

\*慢性GVHDは最終観察日の状態ではなく、全経過を通じて出現した症状にてご評価下さい。

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| 最終観察日における免疫抑制剤の使用                 | <input type="checkbox"/> なし (最終投与日: 200 年 月 日)  |
|                                   | <input type="checkbox"/> あり 使用薬剤:<br><input type="checkbox"/> Cyclosporin <input type="checkbox"/> Tacrolimus <input type="checkbox"/> Mycophenolate mofetil<br><input type="checkbox"/> Prednisolone ( <input type="checkbox"/> 0.5 mg/kg未満 <input type="checkbox"/> 0.5 mg/kg以上)<br><input type="checkbox"/> その他( ) |
| 最終観察日における慢性GVHD以外の医療介入を要する移植関連合併症 | <input type="checkbox"/> なし   |
|                                   | <input type="checkbox"/> あり (概要を以下にご記載下さい)  |

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

NIMA相補的血縁者間移植・遅発性合併症調査票(2/4)

慢性GVHD調査票(1)

| 標的臓器  | 重症度評価  |
|---|--|
| 皮膚<br><br>組織学的診断 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし  | <input type="checkbox"/> なし<br><input type="checkbox"/> 全体表面積の18%未満で硬化性皮膚病変なし<br><input type="checkbox"/> 全体表面積の19-50%、あるいは指でつまめる程度の硬化性病変が存在する<br><input type="checkbox"/> 全体表面積の50%を越えている、あるいは指でつまめない程度の硬化性病変が存在する                                      |
| 口腔<br><br>組織学的診断 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし  | <input type="checkbox"/> なし<br><input type="checkbox"/> 軽度の症状があるが、経口摂取への影響はほとんど認めない<br><input type="checkbox"/> 中等度の症状があり、経口摂取への影響が認められる<br><input type="checkbox"/> 重篤な症状があり、経口摂取が大きく制限されている  |
| 眼<br><br>組織学的診断 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし   | <input type="checkbox"/> 無症状<br><input type="checkbox"/> ADLに影響を与えない程度のドライアイ(一日に必要な点眼回数が3回以内)<br><input type="checkbox"/> ADLに中等度の影響が見られるが、視力障害は認めない程度のドライアイ(一日に必要な点眼回数が3回を超える)<br><input type="checkbox"/> ADLに重篤な影響が認められるドライアイ/眼症状のため労働不能/乾燥性角結膜炎による失明 |
| 消化管<br><br>組織学的診断 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし | <input type="checkbox"/> 無症状<br><input type="checkbox"/> 嚥下困難、食欲低下、嘔気、腹痛、下痢などの症状があるが体重減少は5%未満<br><input type="checkbox"/> 上記の症状があり、5-15%の体重減少を伴う<br><input type="checkbox"/> 15%を越えた体重減少を伴い、栄養補給のための医学的介入が必要である  |

NIMA相補的血縁者間移植・遅発性合併症調査票(3/4)

慢性GVHD調査票(2)

| 標的臓器   | 重症度評価  |
|--|--|
| 肝<br><br>組織学的診断 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし                    | <input type="checkbox"/> 肝機能検査に異常を認めない<br><input type="checkbox"/> 正常上限2倍以内のT-Bil, ALP, AST, ALTの上昇<br><input type="checkbox"/> 3 mg/dlを越えるが正常上限5倍以内のT-Bilの上昇; 正常上限の2倍を越えるが5倍以内のALP, AST, ALTの上昇<br><input type="checkbox"/> 正常上限の5倍を越えるT-Bil, ALP, AST, ALTの上昇  |
| 肺<br><br>組織学的診断 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし<br>(調査日直近の呼吸機能検査:) | <input type="checkbox"/> 無症状<br><input type="checkbox"/> 階段を登った後に息切れを自覚する<br><input type="checkbox"/> 平地を歩いた後でも息切れを自覚する。<br><input type="checkbox"/> 安静時にも息切れを自覚する<br><input type="checkbox"/> FEV1(1秒率) 80%以上<br><input type="checkbox"/> FEV1(1秒率) 60-79%<br><input type="checkbox"/> FEV1(1秒率) 40-59%<br><input type="checkbox"/> FEV1(1秒率) 39%以下<br><input type="checkbox"/> 未施行 |
| 関節・筋膜<br><br>組織学的診断 <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> なし                | <input type="checkbox"/> なし<br><input type="checkbox"/> ADLに影響を与えない程度の四肢の伸展不良<br><input type="checkbox"/> ADLに中等度の影響を与える程度の四肢の伸展不良または関節の拘縮または筋膜炎による紅斑<br><input type="checkbox"/> ADLに高度の影響を与える拘縮(靴紐を結べない、自分では着衣が不可能)  |

NIMA相補的血縁者間移植・遅発性合併症調査票(4/4)

慢性GVHD調査票(3)

|                |   |
|----------------|---|
| 食道狭窄・ウェブ       | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 心のう水           | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 胸水             | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 腹水             | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| ネフローゼ症候群       | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 末梢神経障害         | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 重症筋無力症         | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 多発性筋炎          | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 心筋症            | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 心筋伝導障害         | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 冠動脈病変          | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり(治療介入を要さない程度) <input type="checkbox"/> あり(治療介入が必要) <input type="checkbox"/> 評価不能 |
| 好酸球増多(>500/μ)  | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> 評価不能   |
| 血小板減少(10万/μ未満) | <input type="checkbox"/> なし <input type="checkbox"/> あり <input type="checkbox"/> 評価不能   |

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ビエントの安全確保とQOL向上に関する研究」班

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

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 16 年 10 月から「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、平成 17 年 4 月からエントリーを開始した。2 年間でのエントリーは 17 名で、CMV 感染症 7 名、ADV 感染症 10 名であったが、重複感染症がなかったものは 4 例のみであった。またウイルスの一過性の消失を認めたものが 5 症例、ステロイド、腎不全症例がそれぞれ 2 症例あり、いずれも不適格となった。より幅広い症例を受け入れるために、平成 18 年 9 月にプロトコール改訂を行った。主な改訂点は以下の通りである。(1) 特定の感染症をのぞき複数ウイルスの検出は除外とされない。(2) CMV 感染症は発症時に登録し、2 週後にウイルスが検出され症状が継続すれば投与を行う。(3) 一過性のウイルス消失はフォローアップし、ウイルス再検出時に再登録可とする。(4) ステロイドは prednisolone 0.5mg/kg まで可とする。(5) HLA の一致度は問わない。今回の改訂により、より広い患者層の受け入れが可能になるものと考えられる。

今年度はまた、高感度網羅的迅速感染症モニタリングシステムを用いた造血細胞移植後患者のウイルス検査結果について解析を加えた。129 名の移植後患者からの 898 検体の解析の結果、血液からは CMV, EBV, HHV6 の検出頻度が高く、また血液では 13.5%で、尿検体では 21.1%の検体で、2 種類以上のウイルスが検出された。特に尿では BKV の検出率が高く、 $10^6$ /ml 以上のウイルス量、血液で BKV が検出された場合などでは、BKV による膀胱炎の可能性が高いと考えられる。一方 AdV 膀胱炎でのコピー数は高くないが、AdV 陽性 18 名中 11 例で他のウイルスが検出された。複数ウイルスの存在は稀でないことは明らかで、結果は臨床研究プロトコールに反映されている。

今後は BKV 感染症に対するパイロットスタディなども組み入れつつ、また DLI を行えない臍帯血移植での検討を積極的に組み込みつつ、検討を継続する予定である。



## 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)で効果が高いとされている。

一方 DLIは (1) 大量のリンパ球採取のために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) 致死的GVHD が7%前後と報告されていること、(4)汎血球減少も稀でないこと、などの有害事象が問題となっている。

研究者らが開発した活性化 CD4-DLI は(1) 採血量が 10ml 前後で、(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が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。効果はおそらく間接的であり、レシピエント体内での特異免疫能(T細胞機能、抗体産生能など)を強化することが、第一の作用と考えられる。作用機序ではこの点で、単一ウイルスに対する特異的キラー細胞療法に勝り、また有害事象も軽微であることが期待される。本年度も引き続き、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

またデータの多さから、今回の報告書では提示しないが、ヒト造血細胞が生着し、CD4-DLI、DLI の抗ウイルス効果、抗腫瘍効果を検討できる汎用性の高いモデルマウスを作成し、作用機序をヒト型マウスにて検証することも、この研究の目的である。

基礎・臨床データを統合することにより、CD4-DLI を現実的な治療となるかどうかの評価を行なうことが、本分担研究の最終的な目的である。

## 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、定量測定を行った。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移植後 129 名の患者から 898 検体で解析を行った。検体は血液、尿、便、骨髄、分泌液、口腔スワブ、気管支洗浄液、脳脊髄液、生検材料(肝臓、胃、腸管など)などであった。

### 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平成 18 年 9 月にプロトコール改訂が行われ、現在の臨床試験の概要は以下のとおりである(下線は変更事項)。

対象:

#### I. 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 2 週間の治療後に CMV が一定量以上検出され、臨床症状を呈することを条件とする。

#### II. 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、あるいはレシピエントに生着した 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：

#### I. 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2週間の治療後 CMV が検出され、CMV 感染症症状を呈する患者に対し、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。

#### II. 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。

除外規準(改訂部分)

I. 特定の感染症をのぞき複数ウイルスの検出は除外としない。

II. CMV 感染症は発症時に登録し、2 週後にウイルスが検出され症状が継続すれば投与を行う。

III. 一過性のウイルス消失はフォローアップし、ウイルス再検出時に再登録可とする。

IV. ステロイドは prednisolone 0.5mg/kg まで可とする。

V. HLA の一致度は問わない

上記改訂によっても primary endpoint に変更を行わず、secondary endpoint として、高ウイルス薬の総投与日数 (CD4DLI 後中止までの日数) を加えることにした。

(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、また患者検体を解析するため、臨床研究プロトコー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。臨床研究プロトコー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

129 名の幹細胞移植患者において合計 898 回(検体内容:血液 640, 尿 127, 便 59, 喀痰 24, 生検材料 17, 脳脊髄液 16 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患者は 51 名で、78 名では臨床的にウイルス感染症が疑われた。

血液ではウイルス感染症が疑われた 78 名・208 検体の解析で CMV>EBV>HHV6 の順でウイルスが検出され、検出された数は(カッコ内は高コピー数)にて検出された数はそれぞれ、68(57), 51(30), 37(32)検体であった。CMV が高コピー数で検出された 57 名中 17 例では他のウイルスが共に存在し、HHV6 陽性の 32 例の中 8 例で、他のウイルスが検出された。

尿では膀胱炎症状を呈した 37 名 90 検体の内、35 名で何らかのウイルスが捕まえられた。BKV が 42.2% と圧倒的に多く、次いで AdV(20%)であった。BKV による膀胱炎では 10<sup>6</sup>/ml 以上の高コピーで検出される場合が多く、AdV や他のウイルスがメインである場合には 10<sup>5</sup>/ml 以下であることが多かった。BKV が検出された 42 検体中 16 検体で混合ウイルスが陽性となった。一方 AdV 感染症 18 例の尿中コピー数は 4 例をのぞき 10<sup>5</sup>/ml 以下であり、BKV との差が認められた。18 例中 11 例で BKV, CMV, HHV6 などが共に検出されることも特徴的である。

そのほか、Toxoplasma 感染症+EBV-LPD, CMV 腸炎での血液中 AdV 高コピー数、BKV 膀胱炎での 10<sup>10</sup>/ml の JCV など様々な重複ウイルス感染例が再確認された。

##### 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20症例が仮登録された。実際に投与に至っているものは4症例のみであり、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が、重篤な有害事象は発生していない。一方現時点での仮登録患者はプロトコル改訂前の患者であり、重複

感染症が除外項目となっているため、解析が加えられていない。今回の適応外規準の緩和により、今後登録症例が増加することが期待されるが、BKV感染症や臍帯血移植後のEBV感染症など、本研究の対象外の疾患についてもできるだけ、パイロット試験として協力する予定である。

表： 臨床試験登録患者サマリー

| NO | 疾患名             | 移植       | 登録感染症          | 合併感染症              | 適応外1   | 適応外2                      |
|----|-----------------|----------|----------------|--------------------|--------|---------------------------|
| 1  | MLL+AML         | UR-BMT   | CMV            | BKV                |        | 人工呼吸器 ステロイド               |
| 2  | AL              | R-BMT    | ADV cystitis   | CMV                |        |                           |
| 3  | RMS             | R-BMT    | ADV cystitis   | BKV, HHV6          |        |                           |
| 4  | CML             | UR-BMT   | ADV cystitis   | CMV                |        | HHV6 陽性<br>E. faecalis 陽性 |
| 5  | AML (M0)        | UR-BMT   | ADV cystitis   | EBV, BKV           | 前 ADV- | HHV6 陽性                   |
| 6  | AL              | R-BMT    | ADV            | BKV, CMV           | 前 ADV- |                           |
| 7  | T-LBL           | UR-BMT   | ADV            | BKV                | 前 ADV- |                           |
| 8  | AML             | R-BMT    | ADV            | CMV                |        |                           |
| 9  | ALL             | R-BMT    | CMV            |                    | 前 CMV- |                           |
| 10 | CAEBV           | R-BMT    | ADV            | BKV, CMV           |        | 腎不全                       |
| 11 | MDS             | UR-PBSCT | CMV colitis    | BKV                | 前 CMV- | ステロイド                     |
| 12 | Ph1-ALL         | CBSCT    | CMV+ retinitis |                    |        | HHV6 陽性                   |
| 13 | Blau            | CBSCT    |                | EBV                |        | 調製不能                      |
| 14 | T-ALL           | UR-BMT   | ADV            | BKV, VZV           |        | 腎不全                       |
| 15 | CGD             | R-BMT    |                | VZV<br>Aspergillus |        | HHV7 陽性                   |
| 16 | AML             | R-PBSCT  | ADV            |                    |        | 非寛解                       |
| 17 | Aplastic anemia | CBSCT    | CMV            | EBV                |        | EBV+, CD4 <5%             |
| 18 | CAEBV-PTEB-LPD  | CBSCT    |                | EBV                |        | CD4 増殖不良                  |
| 19 | Fanconi anemia  | CBSCT    | CMV            | EBV-AHS            |        |                           |
| 20 | AML             | R-PBSCT  | ADV            |                    |        | 非寛解                       |

#### 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、造血細胞移植後患者にて実際に測定を行い、解析を加えた。

複数以上のウイルスが検出された場合に、原因ウイルスを特定することが肝要であるが、臨床症状、検査所見、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、総合的判断が必要であろう。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が、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、移植後の定期モニタリング及び症状出現時検査として有用と考える。

今回上記解析結果も考慮して、「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」におけるエントリー規準、除外基準に改訂を行った。これにより多くの登録患者数が集積することを期待している。特に、最近臍帯血移植が急増している現状からも、DLI が行えない臍帯血移植における CD4-DLI の有用性を検証することは大切である。その点で、今回のウイルス感染症に対する CD4-DLI から発展し、移植後生着不全・混合キメラなどに対する同治療法の有用性・安全性も検証されていくべきものと考えている。

活性化 CD4-DLI 臨床研究は平成 19 年 9 月 30 日を一応の区切りとしているが、資金状況により平成 20 年 3 月 31 日までは延長して研究を進めたいと考えている。

なお、平成 18 年度は、共同研究者の伊藤仁也らにより、NOD / Ltz / SCID を用いて、ヒト細胞をマウスに生着させ、HLA 拘束性免疫反応を見ることが出来る汎用性の高い動物モデルを作製されている。伊藤らは、このモデルマウスを用い、成人末梢血活性化 T 細胞の抗腫瘍効果等の評価を行い、活性化 CD 4-DLI の実現に向けた in vivo での T 細胞の性質、動態を解析し、DLI の作用機序についての検討が行った。膨大なデータが蓄積しており、研究成果については次回に詳細に報告したい。

基礎、臨床研究が関連しながら、今後の研究が進展させていく予定である。

#### 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、移植後の co-infection, superinfection の状況が明らかになった。

「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、重複ウイルス検出の問題などから、今回プロトール改訂を行った。

#### 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. Watanabe S., Terashima K, Ohta S, Horibata S, Yajima M, Shiozawa Y, Dewan Md Z, Yu Z, Ito M, **Morio T**, Shimizu N, Honda M, and Yamamoto N. Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOD/SCID/IL2R $\gamma^{\text{null}}$  Mice Develop Human Lymphoid System and Induce Long-Lasting HIV-1 Infection with Specific Humoral Immune Responses. *Blood* **109(1)**: 212-28, 2007.
2. Ohnuma-Ishikawa K, **Morio T**, Yamada T, Sugawara Y, Ono M, Nagasawa M, Yasuda A, Morimoto C, Ohnuma K, Dang NH, Hosoi H, Verdin E, and Mizutani S. Knockdown of XAB2 enhances All-Trans Retinoic Acid-Induced Cellular Differentiation in All-Trans Retinoic Acid-Sensitive and -Resistant Cancer Cells. *Cancer Research*. **67(3)**:1019-29, 2007.
3. Koga SY, Kumaki S, Ichinohasama R, Munakata M, Haginoya K, Ohashi Y, Tanaka Y, Sakamoto O, Minegishi M, **Morio T**, Inuma K, Tsuchiya S. The First Infant Case With Hepatosplenic gammadelta T-cell Lymphoma After Acute Disseminated Encephalomyelitis (ADEM)-like Exacerbation. *J Pediatr Hematol Oncol*. **28**:741-45, 2006.
4. Minegishi Y, Saito M, **Morio T**, Watanabe K, Agematsu K, Tsuchiya S, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Kaneko H, Kondo N, Tsuge I, Yachie A, Sakiyama Y, Iwata T, Bessho F, Ohishi T, Joh K, Imai K, Kogawa K, Shinohara M, Fujieda M, Wakiguchi H, Pasic S, Abinun M, Ochs HD, Renner ED, Jansson A, Belohradsky BH, Metin A, Shimizu N, Mizutani S, Miyawaki T, Nonoyama S, Karasuyama H. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity*. **25**: 745-55, 2006.
5. Kobayashi R, Ariga T, Nonoyama S, Kanegane H, Tsuchiya S, **Morio T**, Yabe H, Nagatoshi Y, Kawa K, Tabuchi K, Tsuchida M, Miyawaki T, Kato S. Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan. *Br. J. Haematol*. **135(3)**:362-66, 2006.
6. Nagasawa M, Isoda T, Itoh S, Kajiwara M, **Morio T**, Shimizu N, Ogawa K, Nagata K, Nakamura M, Mizutani S. Analysis of serum granulysin in patients

with hematopoietic stem-cell transplantation: its usefulness as a marker of graft-versus-host reaction. *Am. J. Hematol*. **81**: 340-8, 2006

7. Tsuji Y, Imai K, Kajiwara M, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Imai M, Ito S, Maeda H, Minegishi Y, Ohkawa H, Yata J, Sasaki N, Kogawa K, Nagasawa M, **Morio T**, Nonoyama S, Mizutani S. Hematopoietic stem cell transplantation for 30 patients with primary immunodeficiency diseases: 20 years experience of a single team. *Bone Marrow Transplant*. **37**: 469-77, 2006
8. Zhang Y, Ohyashiki JH, Takaku T, **Shimizu N**, Ohyashiki K. Transcriptional profiling of Epstein-Barr virus (EBV) genes and host cellular genes in nasal NK/T-cell lymphoma and chronic active EBV infection. *British Journal of Cancer* **94(4)**:599-608, 2006
9. Sugita S, **Shimizu N**, Kawaguchi T, Akao N, **Morio T**, Mochizuki M Identification of human herpesvirus 6 variant A in a patient with unilateral panuveitis.. *Archives of Ophthalmology*, in press.
10. Tanaka H, Matsumura I, Itoh K, Hatsuyama A, Shikamura M, Yusuke S, Heike T, Nakahata T, Kanakura Y. HOX Decoy Peptide Enhances the Ex Vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood CD34+ Hematopoietic Stem Cells/Hematopoietic Progenitor Cells. *STEM CELLS* **24**:2592-2602, 2006

総説:

1. 森尾友宏 :【ヘルペスウイルス学 基礎・臨床研究の進歩】EBV感染症の治療 日本臨床 64(増刊3) pp673-677, 2006

学会発表

1. Morio T. Strategy to combat opportunistic infection after stem cell transplantation. (Luncheon Seminar) 11th Congress of Asia-Pacific Bone Marrow Transplantation, October 27-28, 2006, Nagoya
2. 森尾友宏:わが国の小児科医が提唱し確立した新たな疾患とその現代的意義 先天性免疫不全症候群研究の進歩、第109回日本小児科学会学術集会、2006年4月21日、22日、金沢(シンポジウム)

3. 森尾友宏、清水則夫：造血幹細胞移植後CMV感染症、Adenovirus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 平成18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幹細胞移植の運用・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、2006年6月2日、3日、名古屋
4. 森尾友宏：慢性活動性EBV感染症と造血幹細胞移植、第38回日本小児感染症学会、2006年11月10日、11日、高知(シンポジウム)
5. 佐藤力哉、高橋尚美、水谷修紀、Sang-Kyou Lee、森尾友宏 WASP欠損B細胞株の作成とWASPタンパク導入による表現型の修復、第36回日本免疫学会総会、2006年12月11日～13日、大阪
6. 森尾友宏、加藤俊一 先天性免疫不全症に対する臍帯血幹細胞移植成績 平成18年度 厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班第二回会議2007年1月27日、東京
7. 森尾友宏、清水則夫 難治性感染症に対するCD4-DLI 平成18年度厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業五研究班合同公開シンポジウム 2007年1月28日
8. 森尾友宏、清水則夫 造血幹細胞移植後CMV感染症、Adenovirus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 平成18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幹細胞移植の運用・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回研究班会議(東京) 2007年1月29日、東京
9. 森尾友宏 臍帯血CD4-DLIの臨床応用 政策創薬総合研究事業 研究成果発表会「造血幹細胞移植と感染症対策」 2007年2月3日 東京
10. 森尾友宏、水谷修紀、梶原道子、清水則夫、峯岸志津子、落合央、水上美樹、伊藤仁也、大隅一興、馬場憲三、関根輝彬、土田昌宏、加藤剛二、小寺良尚 造血細胞移植後難治性感染症に対する活性化CD4DLI療法 第29回日本造血細胞移植学会総会 福岡国際会議場 2007年2月16日、17日
11. 鹿村真之、林 正裕、伊藤仁也、清水則夫 免疫不全マウスを用いた活性化CD 4-DLI後の経時的T細胞の性質と動態に関する検討 第29回日本造血細胞移植学会総会福岡国際会議場 2007年2月16日、17日
12. 清水則夫：細胞治療におけるウイルス安全性確保 再生医療とウイルス安全性フォーラム(日本医薬品等ウイルス安全性研究会主催 2006年6月30日、神戸)
13. 渡辺哲、清水則夫、山本直樹：ヒト造血幹細胞移植マウスのエイズ研究への応用. 第18回再生医療・細胞治療研究会 2006年7月28日、東京
14. Satoru Watanabe, Kazuo Terashima, Shinrai Ohta, Misako Yajima, Norio Shimizu, Mitsuo Honda, and Naoki Yamamoto: Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOD/SCID/IL2R $\gamma$ -null Mice Develop Human Lymphoid System and Induce Long-Lasting HIV-1 Infection. 第7回熊本エイズセミナー 2006年9月21日、22日、熊本
15. 渡辺哲、太田信頼、矢島美彩子、寺嶋一夫、渡邊健、本多三男、清水則夫、山本直樹：NOGマウスでみられるHIV-1長期慢性感染とCD4陽性T細胞の減少. 第54回日本ウイルス学会学術集会 2006年11月19日-21日、名古屋
16. 清水則夫：再生医療とウイルス安全性 -- 新指針について日本医薬品等ウイルス安全性研究会第6回シンポジウム 2006年12月1日、東京
17. Satoru Watanabe, Kazuo Terashima, Misako Yajima, Mitsuo Honda, and Naoki Yamamoto: Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOG Mice Develop Human Lymphoid System and Induce Long-Lasting HIV-1 Infection with Specific Humoral Immune Responses. 第36回日本免疫学会総会・学術集会 2006年12月11日-13日、大阪

18. Satoru Watanabe, Kazuo Terashima, Norio Shimizu, et al.: Hematopoietic Stem Cell-Engrafted NOD/SCID/IL-2Rgamma chain -/- Mice (NOG) for Long-lasting Infection Model of both M and T-tropic HIV-1. The American Society for Cell Biology 2006 Summer Meeting on The Cell Biology of HIV-1 and Other Retroviruses, July 20-23, 2006 Atlanta, GA, USA
19. Javeed Iqbal, Ronald J. DeLeeuw, Norio Shimizu, et al.: High resolution genomic mapping and gene expression analysis of chromosomal aberrations in natural killer cell malignancies. The American Society of Hematology 49th Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2006 Atlanta, Georgia

#### 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（SNP）の違いがアロ抗原とな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）効果の標的となるものである。我々は HLA-B44 拘束性の新規マイナー抗原をコードする遺伝子、*HMSD* を発現クローニング法にて同定した。このマイナー抗原の成因は、*HMSD* 遺伝子のエキソン 2 直後のスプライスドナー部位に存在する SNP によりエキソン 2 がスプライスアウトされ、読み枠の異なったポリペプチドが出来ることに起因することが分かった。さらに過去にオランダのグループによって同定された HLA-A\*0201 拘束性の HA-1 が HLA-A\*0206 でも提示されることを見だし、本マイナー抗原を標的とした際に GVL 効果を期待できる日本人患者数がほぼ倍増した。養子免疫療法に関しては、細胞調製施設における細胞の大量培養の再現性が不十分で、改良を行っている。他方、マイナー抗原を用いたワクチン療法の第 I 相臨床試験が施設にて承認され、患者のリクルートを開始した。

**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が高率であるため、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。

マイナー抗原はドナー、患者間の遺伝子多型の差に由来するもので、各移植ペア毎に適応となるマイナー抗原が異なる。しかし、遺伝子タイピングにより移植前（あるいは移植後でも）に不適合の有無が分かるため、各症例にふさわしいマイナー抗原を選択するという、テーラーメイド治療が可能となり、移植後再発腫瘍に対し、適切に対応できると期待される。

本年度は、昨年度見出した HLA-B44 拘束性の新規マイナー抗原遺伝子上にエピトープを同定し、この遺伝子の各種組織での発現パターン、さらに白血病幹細胞での発現を検索した。また HA-1 抗原が日本人に比較的多い HLA-A\*0206 でも提示されうることを見出したので、エピトープおよび臨床応用性について報告する。



## B. 研究方法

① まず HLA-B44 拘束性の CTL が認識する遺伝子の局在を連鎖解析法および 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。次いで候補遺伝子上の SNP と、CTL による細胞傷害性の結果を比較し、マイナー抗原の原因となっている SNP を決定し、エピトープ配列も決定した。また、定量 PCR 法にてマイナー抗原遺伝子の正常組織や、造血器腫瘍での発現パターンを確認したほか、超免疫不全マウスを用いて、本マイナー抗原特異的 CTL が急性骨髄性白血病幹細胞も傷害できるか検討した。

② HA-1<sup>RR</sup> (抗原陰性) のドナーから移植を受けた HA-1<sup>H</sup> (陽性) の患者の末梢血を、HA-1<sup>H</sup> ペプチド配列を含む 29-mer のペプチドで反復刺激し、増えてきた T 細胞をクローニングした。患者が持つ HLA アリルを 1 つずつ HLA 陰性 LCL にトランスフェクションし、拘束性 HLA を決定した。

### (倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、すでに各研究参加施設の倫理委員会の審査・承認を得たものであり、説明と理解を得た後、書面にて同意を得られた場合のみに実施された。さらに、マイナー抗原を標的とした移植後再発造血器腫瘍に対するペプチドワクチン療法、養子免疫療法は、愛知県がんセンターの倫理委員会で承認済みの研究実施書と同意文書に基づいて、書面による同意の得られた場合のみに実施されたものである。

また、実験動物については、愛知県がんセンターの動物委員会にて了承されたプロトコ

ルに基づいて、動物愛護の配慮をしつつ実施した。

## C. 研究結果

① HLA-B\*4403 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ず、cDNA ライブラリーを用いて発現クローニングを実施し、Serpin ドメインを持つ EST を同定した。この遺伝子は HUGO Gene Nomenclature Committee より HMSD と命名された。SNP がエキソン 2 のスプライスドナーに存在し、SNP によってエキソン 2 のスキッピングが起きていた。この新規マイナー抗原 ACC-6 はフレームシフトの起きたエキソン 3 部分にコードされていた。本年度は以上の点を再確認するとともに、特に臨床応用性について以下の検討を加えた。定量 PCR を用いた HMSD の発現パターンの検討では、急性骨髄性白血病と多発性骨髄腫で強い発現を認めた。また正常細胞では一部の活性化した造血系細胞のみに発現を認めたのみであった。ACC-6 に特異的な CTL クローンと共培養した ACC-6 抗原陽性、HLA-B44 陽性の白血病細胞は免疫不全マウスに生着出来ず、ACC-6 が白血病幹細胞にも発現し、CTL の標的となっていることが示された (川瀬孝和、論文投稿中)。

② 28 例の移植症例中 3 例において、HA-1<sup>RR</sup> のドナーから移植を受けた HA-1<sup>H</sup> の患者が見出された。うち 1 例は HLA-A\*0201 陽性であったため、CTL の誘導から除外した。2 症例につき、移植後 2 時点から得られた末梢血を 29-mer のペプチドで刺激したところ、1 検体より患者由来 LCL を特異的に傷害する CTL クローンが複数個得られた。HLA 欠損、HA-1<sup>H</sup> の LCL 株に患者の HLA アリルを 1 つずつ導入して HLA 拘束性を検討したところ、全ク

ローンとも HLA-A\*0206 拘束性であり、かつ A\*0201 拘束性にも LCL を傷害することが分かった。ペプチドマッピングの結果、エピトープは従来 A\*0201 拘束性の HA-1 エピトープとして報告のあった VLHDDLLEA と同等であった。ペプチド結合アッセイでは、VLHDDLLEA は A\*0201 より A\*0206 分子により強く結合した (図2)。さらにこれらの CTL は HA-1<sup>H</sup> をもつ急性骨髄性白血病細胞を良好に傷害した。

#### D. 考察

HLA-B\*4403 よって提示される新規マイナー抗原 ACC-6 は、組織発現パターンが骨髄性白血病と多発性骨髄腫細胞、および一部の正常活性化造血細胞で高く、移植後の再発造血器腫瘍に対する免疫療法の標的として有望と考えられる。また今回は HLA-B\*4403 拘束性のエピトープを同定したが、エキソン2スキッピングの結果として産生されるアリル特異的ポリペプチドは 53 アミノ酸長あり、この中に他の HLA で提示されうるエピトープを含んでいる可能性があり、現在検索中である。

また HA-1 マイナー抗原が HLA-A\*0206 でも提示されうることは、いわゆる HLA/ペプチド結合モチーフから予測出来なかった。このことはリバーシムロジーだけでエピトープの検索をすることは、重要なエピトープを見逃す可能性を示唆している。HA-1 が A\*0206 でも提示されることで、HA-1 抗原の不適合を免疫療法に利用できる日本人患者がほぼ倍増した。今後も同様な方法で、他の HLA アリルが HA-1 ペプチドを提示できないか検討する予定である。

#### E. 結論

骨髄性造血器腫瘍と多発性骨髄腫細胞を特異的に傷害する HLA-B\*4403 拘束性の新規マ

イナー抗原 (ACC-6) を同定し、その臨床応用への可能性が明らかとなった。また新規拘束性アリルの同定で、HA-1 マイナー抗原不適合を利用できる日本人患者集団もほぼ2倍となった。以上をもとに、今後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) Torikai H, Akatsuka Y, Miyazaki M, et al. The human cathepsin H gene encodes two novel minor histocompatibility antigen epitopes restricted by HLA-A\*3101 and -A\*3303. *Br J Haematol.* 134: 406-16, 2006.
- 2) Akatsuka Y, Torikai H, Inamoto Y, et al. Bone marrow may be a reservoir of long-lived memory T cells specific for minor histocompatibility antigen. *Br J Haematol.* 135: 413-414, 2006.
- 3) Naota H, Miyahara Y, Okumura S, Kuzushima K, Akatsuka Y, et al. Generation of peptide-specific CD8+ T cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4+ T cells. *J Immunol Methods.* 314: 54-66, 2006.
- 4) Torikai H, Akatsuka Y (equal contribution), Miyauchi H, et al. The HLA-A\*0201-restricted minor histocompatibility antigen HA-1<sup>H</sup> peptide can also be presented by another HLA-A2 subtype, A\*0206. *Bone Marrow Transplant.* (in press)

##### 2. 学会発表

- 1) 川瀬孝和、赤塚美樹、鳥飼宏基ら. HLA-B\*4403 拘束性の新規マイナー組織適合性抗原の同定と抗原性発現の機序: 第 65 回

日本癌学会総会、横浜 2006年9月

- 2) 渡辺一絵、鈴木進、田路真悟、葛島清隆、高橋利忠、赤塚美樹。抗原特異的 CTL の新たな単離方法：第 65 回日本癌学会総会、横浜 2006年9月
- 3) 鳥飼宏基、赤塚美樹、鬼塚真仁ら。HA-I マイナー組織適合性抗原は HLA-A\*0206 によっても提示される：第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会、福岡 2006年10月
- 4) 川瀬孝和、赤塚美樹、鳥飼宏基ら。HLA-B\*4403 拘束性の新規マイナー組織適合性抗原の同定と抗原性発現のメカニズム：第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨床血液学会総会、福岡 2006年10月
- 5) 赤塚美樹。マイナー抗原を標的とした移植後再発白血病に対する免疫療法の可能性：第 68 回日本血液学会総会・第 48 回日本臨

床血液学会総会、シンポジウム、福岡 2006年10月

- 6) 赤塚美樹。Minor 組織適合抗原を標的とした免疫療法：日本輸血学会東海支部会学術集会特別講演、名古屋 2007年1月
- 7) 赤塚美樹。GVL の標的としての造血細胞特異的マイナー適合抗原：第 29 回日本造血細胞移植学会総会、シンポジウム、福岡 2007年2月

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

「LOC284293 バリエント遺伝子並びに該遺伝子がコードする CD8+細胞傷害性 Tリンパ球 mHA エピトープペプチド及びその用途」(特願 2006-152098、申請中)

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** 難病のモデルマウスを用いて、骨髄内骨髄移植(IBM-BMT)によって、種々の難病が治療できるだけでなく、難病を正常マウスにtransferできることを明らかにした。さらに、実験用カニクイザルを用いて、灌流法とIBM-BMTの安全性・有効性が確認できたので、灌流法に関するPhase I Studyをヒトで開始したので詳細を報告する。

**A. 研究目的**

本研究の目的は、新しい骨髄移植方法が種々の難病の根治療法として有用であることを証明し、ヒトへ応用することにある。

**B. 研究方法**

1)小動物(マウス、ラット等)を用いて、IBM-BMTと従来の静脈内骨髄移植(IV-BMT)の有効性を比較する。小動物は、難病のモデル動物を用いる。2)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。3)灌流法に関するPhase I Studyを実施する。

(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、実施している。さらにサルで、申請者が新しく発見した方法の妥当性を十分に確認している。当大学には倫理委員会が設置されており、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している。

**C. & D. 研究結果及び考察**

**I. 小動物の実験結果**

1)老人性骨粗鬆症のモデルマウスを用いて、正常のマウスの全骨髄細胞(造血幹細胞と間葉系幹細胞を含む)を骨髄内に移植(IBM-BMT)することによって、骨粗鬆症が治療できることを発見した(文献①参照)。

2)肺気腫を自然発症するTskマウスを用いて、正常マウスとの間でIBM-BMTを行い、正常マウスの骨髄細胞(BMC)を移植すると治療ができ、逆に、TskマウスのBMCを正常マウスに移植すると肺気腫が発症することを発見した(文献②参照)。

3)感音難聴を自然発症する老化促進マウスのBMCを正常マウスにIBM-BMTすると感音難聴が発症することを見出した(文献③参照)。

4)昨年、マウスの系で、我々が発見した、新しい癌の治療法(IBM-BMT+ドナーリンパ球輸注)がラットの大腸癌の系でも有効であること、さらに、この方法は、大腸癌の肝転移モデルでも有効であることを見出した(文献④参照)。

5)老人性骨粗鬆症マウスのBMC(造血幹細胞とMSCを含む)を正常マウスに移植することによって、正常マウスに骨粗鬆症を発症させることに成功した(文献⑤参照)。

**II. サルを用いた実験結果**

100匹以上のカニクイザルを用いて、灌流法とIBM-BMTの安全性と有効性を確認した(Submitted to "Stem Cells")。

**III. 灌流法に関するPhase I Studyの結果**

症例は、58才男性

・平成16年9月、非ホジキンリンパ腫

(diffuse large B-cell lymphoma, Stage III B)と診断。病変部位は、頸部、両肺門、左鼠径部。骨髄浸潤なし。国際予後指標 (IPI) は low-intermediate risk。R-CHOP8コース施行しCR。

・平成18年2月、急速に頸部リンパ節腫脹。生検にてdiffuse large B-cell lymphoma再発と診断(病変部位：両側頸部、左鎖骨上窩、右肺門)。骨髄浸潤なし。R-ESHAP3コース施行し2ndCR。

・平成18年7月、R-ESHAP3コース施行後、自家末梢血幹細胞採取するもCD34陽性細胞は $2 \times 10^5/\text{kg}$ と採取不良。CPA  $2\text{g}/\text{ml} \times 2$ 日を前治療として再度、幹細胞採取を試みるも白血球の十分な増加が得られず採取を断念。以上の結果、“Poor Mobilizer”症例と判断。

・平成18年11月、頸部リンパ節腫脹およびsIL-2Rの増加を認め再発と診断。本臨床試験の同意が得られ、患者適格基準に適合したので、12月20日“灌流法”による自家骨髄採取を実施。術後、鎮痛剤は不要。出血も少なく輸血は不要。採取翌日も穿刺部疼痛や、出血もなし。入院中、胸部XP検査、血液検査、臨床所見に著変なく、12月22日退院。

・平成19年1月6日よりサルベージ療法を開始中である。

**<灌流法の手技>**

手術室において全身麻酔下、腹臥位にて被験者の両側腸骨より採取する。骨髄採取針は13Gのディスポーザブル針(シーマン株式会社製)で、側孔のついていないものを用いる。

右側の上後腸骨棘から約1cmの部位に骨髄穿刺針(N1)を刺入する。次にN1から右腸骨稜結節側へ約3cm離れた部位に2本目の骨髄穿刺針(N2)を刺入する。骨髄穿刺針(N1)に生理食塩液30mlを吸引した注入用シリンジを装着する。骨髄穿刺針(N2)に採取側シリンジ(予めヘパリン加生理食塩液0.5mlを吸引)を装着する。

N1のシリンジから生理食塩液30mlをゆっくり注入しながら、もう一方のN2のシリンジより、軽く吸引し骨髄液を採取する。肺塞栓のリスクを減少させるため、注入側シリンジに強く陽圧をかけないように留意する。また、吸引側シリンジに強く陰圧を加えると末梢血の混入が多くなるため、できるだけ軽く吸引する。

次に、骨髄穿刺針(N2)からさらに約3cm右腸骨稜結節側に、あらたに骨髄穿刺針(N3)を刺入する。骨髄穿刺針(N2)に注入用シリンジを、骨髄穿刺針(N3)に採取用シリンジを装着し、同様の操作をおこなう。

このとき骨髄穿刺針(N1)には内筒を挿入し、骨髄液の漏洩を防ぐ。以上の操作をN4まで行う。