

厚生労働科学研究費補助金(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。3 年間でのエントリー打診は 24 名で、CMV 感染症 13 名、ADV 感染症 11 名であった。CMV 感染症のうち、4 例で投与が行われ、3 例は調製中に逝去、4 例は種々の理由で投与を見送った。2 例は細胞調製不能であった。ADV 感染症では 5 例で投与が行われ、4 例では投与が見送られ、1 例は調製中に逝去、1 例は打診のみで調製が行われなかった。18 ヶ月以上 CMV 感染症(不適格)では、投与後に GVHD の増悪が観察され、1 例で grade II GVHD が発症したが、汎血球減少、肝機能障害、その他の臓器障害は認められなかった。

BKV 感染症に対しても前臨床試験として細胞調製および投与が行われ、1 例では BKV の消失と血尿の改善を認めた。また打診のあった総数 34 症例のうち、13 症例で BKV が陽性であったが、BKV が $10E7/ml$ 以上で、血中から BKV が検出されるような、BKV が明らかな病原体と考えられる症例は 3 例であった。

ADV, CMV およびそれ以外の感染症患者におけるウイルス陽性率、同患者に対する活性化 CD4-DLI 調製の問題点についても解析を加えた。34 症例中、9 症例のみが単独ウイルス感染症(単独ウイルスの検出)であり、5 名は不明(細菌・真菌感染症および検出なし)、20 症例では複数以上のウイルスが検出された。

レシipientからの細胞調製の場合、23 例中 15 症例でウイルスが検出され、中間培養産物作成までに至った 15 例中 9 例ではウイルスが陽性であった。一方ドナー 10 症例では 1 例が受け入れ時にウイルス陽性、2 症例が中間培養産物でウイルス陽性であり、ドナーからの細胞調製でも EBV, HHV6, HHV7 は問題となることが明らかになった。

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)でに奏功するとされるが、(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) 致死のGVHDが7%前後と報告されていること、(4)汎血球減少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-20ml 前後で、(2) 生着したリンパ球からの増幅も可能であり、(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、レシピエント体内にすでに存在する特異免疫能(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、単一ウイルスあるいは複数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。

本方法は全般的な免疫学的再構築をはかることにより、当該ウイルス以外の病原体の排除や、生着促進、再発防止などにも効果を発揮することが期待される。

本年度も引き続き、以下を目的とした研究を行った。

- (1) 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
- (2) ドナーおよびレシピエント血液におけるウイルスの混在と、培養時におけるウイルスの増殖に関する検討

ヒト型造血機能を有するマウスの構築と、それを用いた検討も伊藤らを中心に行われている。このマウスにはヒト造血細胞が生着しており、CD4-DLI、DLI の抗ウイルス効果、抗腫瘍効果を検討できる。実際にヒト造血細胞を移入したマウスに、同一検体から調製した EBV-LCL を移植し、マウスにおける EBV 関連悪性腫瘍の発生を経時的に解析することが可能になっている。内容が多岐に渡るため、本報告書においては、触れな

いが、基礎的研究としては重要な部分である。

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. ドナーおよびレシピエント血液におけるウイルスの混在と、培養時におけるウイルスの増殖に関する検討

今までに細胞調製を行った、あるいは打診をうけた移植後感染症 34 症例において、血液受け入れ時および、フラスコにての CD4-T 細胞培養→中間培養産物として細胞保存時のウイルスを検討した。

2. 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

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を以下に示す。

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、ホスカルネット、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(5x10⁶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週後まで行う。

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(5x10⁶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週後まで行う。

(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. ドナーおよびレシピエント血液におけるウイルスの混在と、培養時におけるウイルスの増殖に関する検討

3年間に合計34名からの打診を受け、これらの患者でのウイルス検討結果をまとめた。これらの中には、EBV感染症や真菌感染症患者も含まれる。

23例ではレシピエントから調製され(1例では別の機会に2度調製されている)、10症例ではドナーから調製

された。

1. レシピエントからの調製

1) 検体受け入れ時のウイルス

・ウイルス検出なし	8
・EBV	3
・EBV (trace)	3
・EBV+BKV	2
・EBV+JCV	1
・CMV	2
・CMV+EBV	1
・CMV+BKV	1
・BKV+EBV (trace)	1
・VZV+BKV (trace)	1

ウイルス検出なしの大半はADV感染症である。

2) 培養中間産物

培養を行い細胞凍結に至った症例は15症例である。CD4T細胞でのウイルスは

・ウイルス検出なし	6
・EBV	3
・EBV (trace)	3
・HHV6	2
・HHV6+HHV7	1

であった。

2. ドナーからの調製(10症例)

1) 検体受け入れ時のウイルス

・ウイルス検出なし	9
・VZV+CMV	1

2) 培養中間産物

・ウイルス検出なし	8
・EBV	1
・HHV7	1

VZV+CMVが検出されたドナーの細胞培養において、CD4-T細胞にHHV7が検出された。

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

表に示す34症例の打診をうけた。感染症の内訳を図1に、血液から検出されたウイルスの数を図2に示す。

表： 臨床試験登録患者サマリー

No	施設	原疾患	移植	GVHD	対象感染症	合併感染症	下遷移(1)	下遷移(2)	状態
1	A	AML+AML	UR-BMT	4	CMV	BKV		人工肝装置、ステロイド	△ 発症(投与)
2	C	AL (biphenotypic)	R-BMT	0	ADV cystitis	CMV, BKV			○ ADV, CMV検出感度以下
3	B	NMG	R-BMT	1	ADV cystitis	BKV, HHV6			○ ADV, BKV, HHV6検出感度以下, その他「他」 作にHHV6 検JCV
4	C	CML	UR-BMT	4	ADV cystitis	CMV		HHV6陽性, E. faecalis陽性	△ 12/2のみ, 発ADV陽性・在研CMV陽性
5	C	AML (M0)	UR-BMT	0	ADV cystitis	EBV, BKV	投与前ADV-	HHV6陽性	投与せず
6	C	AL (biphenotypic)	R-BMT	0	ADV	EBV, CMV	投与前ADV-		投与せず
7	A	T-LEL	UR-BMT	0	ADV	BKV	投与前ADV-		投与せず
8	A	AML	R-BMT	0	ADV	CMV			投与(不遷移)
9	A	ALL	R-BMT	0	CMV		投与前CMV-		○ 投与
10	A	AML	UR-BMT	0	CMV	ADV			調製中に退去
11	B	CAESV	R-BMT	0	ADV	BKV, CMV		腎不全	○ CMV陽性, 投BKV陽性
12	D	MDS	UR-PBSCT	3	CMV colitis	BKV	投与前CMV-	ステロイド, EBV陽性	○ 投与
13	C	Ph1-ALL	CBSCT	1	CMV+resistance			HHV6陽性	調製中に退去
14	B	ALL				Cytiditis	no virus		調製せず
15	B	Blau	CBSCT	0		EBV		腎不全	調製せず
16	E	T-ALL	UR-BMT	0	ADV	BKV, VZV		腎不全	○ 退去(VZV, ADV 10E3-10E3)
17	F	CGD	R-BMT	3		VZV, Aspergillus		HHV6陽性	調製不能
18	A	MDS	R-BMT+UR-BMT	1		Aspergillus		CD4<1%	調製不能
19	G	AML	R-PBSCT		ADV			全寛解	調製せず
20	B	Aplastic anemia	CBSCT		CMV	EBV		EBV+, CD4<5%	
21	B	CAESV+PTES-LPD	CBSCT			EBV		CD4増殖不良	
22	H	Fanconi anemia	CBSCT		CMV	EBV-AKS			
23	A	AML(M4)	R-BMT	3	CMV	BKV		CMV感染後 > 18 months	○ 投与→GVHD ↓
24	I				CMV	BKV			投与せず
25	D	PTCL	CBSCT	0	CMV		CMV感染後 > 6M	CD4増殖不良	調製不能
26	B	AML	R-BMT	3		BKV			○ 薬剤DLI X 3 投与→GVHD
27	I	CAESV/PTCL	R-BMT	0(E)		EBV			○ 投与, 神経症状の悪化
28	J	Aplastic anemia	UR-BMT	4	CMV			CD4<4%, Grade IV GVHD	調製せず
29	K	ALL	UR-BMT		CMV			CD4 10/mm3	調製せず
30	B	ALL	R-BMT+G		ADV	BKV, HHV6	HPS		調製中にHPSにて退去
31	L	Ph陽性ALL	CBSCT+UR-BMT	0(E)		JCV		HHV6陽性	○ 腎不全にて退去
32	M	ALL	UR-BMT	0		EBV			△ 1度投与ご外特治療で転院
33	A	ATL	R-BMT	0	CMV	BKV			投与前にCMV検出で退去
34	N	T-ALL	UR-BMT	3		EBV-LPD			LPDにて退去

図1 感染症の内訳

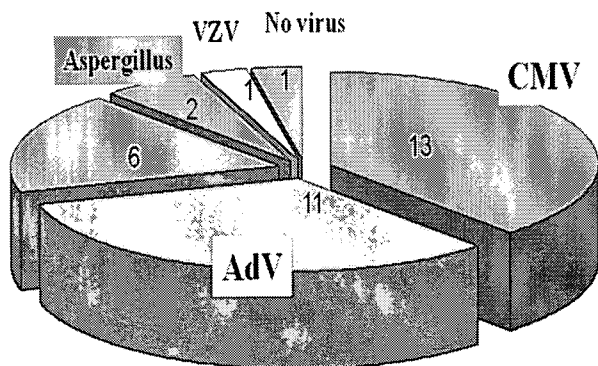
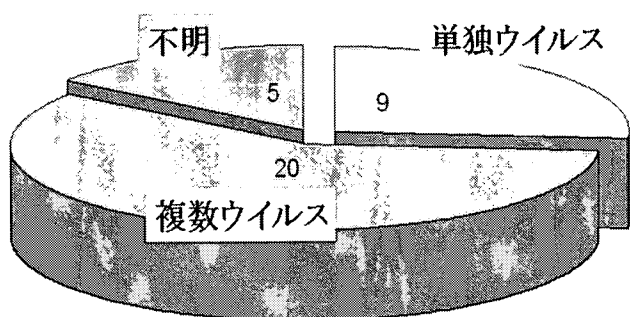


図2 血液から検出されたウイルス数



投与に至った症例は13例で、そのうちCMV感染症が4症例、ADV感染症が5症例である。

打診のみは4例、調製のみが5例、調製前に逝去された症例が6例、種々の理由で調製不能であった症例が6例である。調製が行えなかった理由としては、細胞増殖せず、CD4T細胞がほぼ0、培養後のヘルペスウイルス属の増加などがあげられる。

有害事象としては18ヶ月以上CMV感染症(不適格)では、投与後にGVHDの増悪が観察され、CMV感染者1例でgrade II GVHDが発症した。そのほかの症例では、grade II GVHDが1名、血球貪食症候群の増悪1名、EBVによる中枢神経症状の増悪が1名であったが、汎血球減少、肝機能障害、そのほかの臓器障害は認められなかった。有害事象の大半も、炎症が治まらないところに投与された症例であった。

効果判定は難しいが、2回投与が行われた10症例のうち、ウイルスの消失を認めなかった症例が3例、ウイルスが消失した症例が3例である。2例は投与後まもなく逝去、2例はエントリー時にウイルスが陰性であったが投与後に症状が改善している。

3. 考察

造血細胞移植後の日和見感染症は大きな問題である。本年の研究においても、CMV感染症、EBV感染症(EBV-LPDを含む)症例に対するCD4-DLI療法の打診が多く、またBKV感染症による出血性膀胱炎も大きな問題であることが浮き彫りにされた。一方ADV感染症の打診はなかった。今後BKV感染症に対する体系的な検討も行う必要がある。

細胞調製状況について今回の検討でまとめたが、レシピエントからのCD4T細胞調製ではヘルペス属ウイルス、EBV、HHV6、HHV7が問題になり、今後その増殖を防止する方策の検討が必要である。一方、今までの数百症例に対する活性化T細胞調製のデータから、EBVに関しては、健常人でも陽性となる場合が多く、どこに投与可能(適格)基準を設けるかの議論も開始すべき段階に入ったと考える。実際、ドナーからの細胞調製に

おいても、ヘルペス属ウイルスが検出されることがあった。さらには調製前に逝去に至った患者もあり、調製までの日数、調製開始決定時期などについても検討の余地がある。

治療に関しては、CMV感染症、ADV感染症に対する成績を集計した。CMV感染症のうち、4例で投与が行われ、3例は調製中に逝去、4例は種々の理由で投与を見送った。2例は細胞調製不能であった。ADV感染症では5例で投与が行われ、4例では投与が見送られ、1例は調製中に逝去、1例は打診のみであった。有害事象としては、18ヶ月以上CMV感染症(不適格)では、投与後にGVHDが増悪し、1例でgrade II GVHDが発症したが、汎血球減少、肝機能障害、その他の臓器障害は認められなかった。予定通り2回の投与が行われた患者の中では、CMV感染症で1例、ADV感染症では2症例で、ウイルスの消失を認めた。

本研究は多施設における共同研究であったが、今後も密接に連絡を取りながら治療を行える施設とともに、さらに研究を進展させていくことが、より多くの症例のエントリー、病態および有害事象把握に重要と考えている。

本研究はまた、日和見感染症、特にCMV、ADV感染症に特化した研究であったが、日和見感染症は、移植後の二次性免疫不全症を基盤に発症するものである。本治療法は特異的な細胞傷害活性を増強するのみならず、免疫学的再構築をはかる治療法として、様々な観点から検証されていくべきものとする。

4. 結論

CD4-DLIにおける細胞調製の問題点、検討事項があきらかになった。

さらなるデータの蓄積が必要であるが、本治療法は有害事象も少なく、移植後難治性日和見感染症という危機的な状況の中での治療法としては、継続して評価されてよい効果と安全性を示している。

5. 健康危険情報

あきらかな該当事項はない。

6.

研究成果

論文発表

1. Shinohara M, Koga T, Okamoto K, Sakaguchi S, Arai K, Yasuda H, Takai T, Kodama T, **Morio T**, Geha RS, Kitamura D, Kurosaki T, Ellmeier W, Takayanagi H. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. *Cell*, **132**: 794-806, 2008.
2. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyanaga M, Miyata K, Shimizu N, **Morio T**, Mochizuki M. Association of varicella-zoster virus (VZV) load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *Br J Ophthalmol*. 2008 Feb 1; [Epub ahead of print]
3. Takahashi N, Morio T. Common variable immunodeficiency. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. **31**:9-16, 2008.
4. Suzuki K, Tsugawa K, Oki E, **Morio T**, Ito E, Tanaka H. Vesical varices and telangiectasias in a patient with ataxia telangiectasia. *Ped. Nephrol*. 2008 Jan 12; [Epub ahead of print]
5. Sugita S, Iwanaga Y, Kawaguchi T, Futagami Y, Horie S, Usui T, Yamamoto S, Sugamoto Y, Mochizuki M, **Shimizu N**, Watanabe K, Mizukami M, **Morio T**. [Detection of herpesvirus genome by multiplex polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR in ocular fluids of patients with acute retinal necrosis] *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. **112**: 30-8, 2008.
6. **Morio T**, Kim H, Ku, Artemis, and Ataxia-Telangiectasia-Mutated: Signaling Networks in DNA Damage. *Int J Biochem Cell Biol*. **40**:598-603, 2008.
7. Hasegawa D, Fukushima M, Hosokawa Y, Takeda H, Kawasaki K, Mizukami T, Nunoi H, Ochiai H, **Morio T**, Kosaka Y. Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. **87**:88-90, 2008.
8. **Morio T**. Strategy to Combat Opportunistic Infections after Umbilical Cord Blood Transplantation (UCBT) - Monitoring of Multiple Pathogens with a Novel Multiplex PCR System and Infusion of Ex-vivo Expanded CD4 T-Cells (CD4-DLI). *Biol Blood Marrow Transplant*. **13**: 1400-01, 2007.
9. Horibe S, Takagi M, Unno J, Nagasawa M, **Morio T**, Arai A, Miura O, Ohta M, Kitagawa M, Mizutani S. DNA damage check points prevent leukemic transformation in myelodysplastic syndrome. *Leukemia*. **10**: 2195-8, 2007.
10. Tono C, Takahashi Y, Terui K, Sasaki S, Kamio T, Tandai S, Sato T, Kudo K, Toki T, Tachibana N, Yoshioka T, Nakahata T, **Morio T**, Nishikomori R, Ito E. Correction of immunodeficiency associated with NEMO mutation by umbilical cord blood transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. **39**:801-4, 2007.
11. Okamoto H, Arai C, Shibata F, Toma T, Wada T, Inoue M, Tone Y, Kasahara Y, Koizumi S, Kamachi Y, Ishida Y, Inagaki J, Kato M, **Morio T**, Yachie A. Clonotypic analysis of T cell reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with severe combined immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol*. **148**:450-60, 2007.
12. Kanno H, Watanabe D, Shimizu N, Sawai D. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 151(3):519-27, 2008
13. Kawaguchi T, Sugita S, **Shimizu N** and Mochizuki M. Kinetics of aqueous flare, intraocular pressure and virus-DNA copies in a patient with cytomegalovirus iridocyclitis without retinitis. *Int Ophthalmol* 7:383- 386, 2007
14. Watanabe S, Ohta S, Yajima M, Terashima K, Ito M, Mugishima H, Fujiwara S, Shimizu K, Honda M, **Shimizu N** and Yamamoto N. Humanized NOD/SCID/IL2R γ null mice transplanted with hematopoietic stem cell under non-myeloablative condition show prolonged life spans and allow detailed analysis of HIV-1 pathogenesis. *J Virol*, 81:13259-13264, 2007
15. Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, **Shimizu N**, Imadome K, Yajima M, Fujiwara S. The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of

the putative oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor-kappaB. *Virus Res.* 131(2):170-9, 2008.

総説:

1. 清水則夫、渡邊健、渡辺哲 再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性 第3章3. ウイルス検査 シーエムシー出版 51-62: 2007年6月
2. 清水則夫、渡邊健、水上美樹、渡辺哲 リアルタイムPCR最新活用マニュアル「実践編: ウイルスゲノムの定性的検出」および「ウイルスゲノムの定量的検出」
3. 伊藤仁也、Ex vivo 増幅臍帯血移植の進展 感染・炎症・免疫 37:p254-257, 2007
4. 田中 紘一、伊藤仁也 わが国の移植医療における臓器・組織・細胞供給 医学のあゆみ 222: p109-112, 2007

学会発表

1. **Morio T.** Strategy to combat opportunistic infection after umbilical cord stem cell transplantation. The 5th Annual International Umbilical Cord Blood Transplantation Symposium, May 2007, California, USA
2. K. Terashima, Y. Mochimaru, K. Watanabe, **T. Morio**, I. Matumoto, S. Watanabe, K. Ohba, M. Taruishi, C. Kishi, N. Yamamoto and **N. Shimizu** : Follicular dendritic cells (FDC), expressing ependymin related protein (ERP) and GM1, are of pluripotent mesencymal stem cells (pMSC) interfacing immune system and nerous system 13th International congress of immunology, 2007, Rio-Dejaneiro
3. 伊藤仁也、森尾友宏 造血幹細胞移植におけるクオリティーコントロール 細胞治療における品質管理と問題点 活性化リンパ球療法を中心に、第55回日本輸血・細胞治療学会、2007年5月31日-6月2日、名古屋
4. 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19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ipientの安全確保とQOL向上に関する研究」班 第1回研究班会議、2007年6月23日、名古屋
5. 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦: ヒト臍帯血幹細胞移植NOGマウスを用いたEBウイルス感染モデルの作製 第4回EBウイルス研究会 2007年6月 東京
6. 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、中川温子、寺嶋一夫、中村浩幸、伊藤守、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦: ヒト化マウスモデルにおけるEBウイルス特異的免疫応答 第4回EBウイルス研究会2007年6月 東京
7. 山本紗也香、杉田 直、岩永洋一、臼井友香、菅本良治、望月 學、清水則夫、森尾友宏: 急性網膜壊死(ARN)の眼内液のPCR法を用いたヘルペスウイルス遺伝子同定 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京
8. 宮永 将、川口龍史、杉田 直、望月 學、清水則夫、森尾友宏、宮田和典: 経時的に前房水ウイルス量を測定したサイトメガロウイルス前部ぶどう膜炎の1例 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京
9. 木戸さやか、杉田 直、川口龍史、岩永洋一、望月學、清水則夫、森尾友宏、宮永 将、宮田和典: VZV虹彩毛様体炎における前房水中のVZV-DNAコピー量と臨床所見との関連性 第41回日本眼炎症学会 2007年7月 東京
10. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、岩永洋一、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、森尾友宏: 経過中に上皮型ヘルペスを合併した角膜内皮炎の4症例 第61回日本臨床眼科学会 2007年10月 京都
11. 鴨居功樹、杉田 直、木戸さやか、堀江真太郎、菅

本良治、望月 學、清水則夫、森 浩士、宮永 将、
宮田和典：皮膚症状を伴わない水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) 虹彩毛様体炎の3例 第61回日本臨床眼科学会 2007年10月 京都

12. 今留謙一、矢島美彩子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、清水則夫、本多三男、山本直樹、藤原成悦：ヒト化NOGマウスモデルにおけるEBウイルス特異的免疫応答 55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月 札幌

13. Imadome K, Yajima M, Watanabe S, Nakagawa A, Terashima K, Nakamura H, Ito M, Honda M, Shimizu N, Yamamoto N, Fujiwara S: Epstein-Barr virus-specific immune response in the humanized NOG mouse model. 第37回日本免疫学会学術集会 2007年11月 東京

14. 寺嶋一夫、持丸葉子、渡邊健、森尾友宏、松本一朗、渡辺哲、大場賢治、垂石みどり、岸千絵子、山本直樹、清水則夫：Follicular dendritic cells (FDC), expressing ependymin related protein (ERP) and GM1, are of pluripotent mesenchymal stem cells (pMSC) interfacing immune system and nervous system BMB2007 (日本生化学会、日本分子生物学会学術集会) 2007年12月 横浜

15. 森尾友宏、清水則夫 造血幹細胞移植後の活性化CD4DLI療法 平成19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、2008年1月27日、東京

16. 森尾友宏、清水則夫、伊藤仁也 関連学会合同シンポジウム「細胞移植・再生医療における品質管理のあり方」細胞移植の立場から(増殖リンパ球治療を中心として) 第30回日本造血細胞移植学会 2008年2月29日-3月1日大阪

17. 森尾友宏、清水則夫、梶原道子、落合央、峯岸志津子、伊藤仁也、土田昌宏、加藤剛二、小寺良尚、大隅一興、関根輝彬 造血幹細胞移植後難治性感染症に対するCD4-DLI療法(臨床I-II相試験) 第30回日本造血細胞移植学会 2008年2月29日-3月1日大阪

7. 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

同種移植において、ドナーと患者間における遺伝子多型（主に SNP）の違いがアロ抗原（マイナー抗原）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）効果を引き起こす。我々は本年度、日本人の6割がもつ HLA-A24 分子によって提示される、GVL/GVT 効果誘導に有用な新規マイナー抗原を BCL2A1 蛋白質上に同定した。これは過去に我々が同定した ACC-1Y マイナー抗原をコードする BCL2A1 と同一であるが、抗原多型部位の Tyrosine が Cysteine に置き換わったものであった。今回の遺伝子同定は、従来の免疫学的手法と全ゲノム解析手法の融合、を本研究班を通じた共同研究で行った成果である。本マイナー抗原の免疫療法への応用可能性は全移植例の 10%以上であり、過去に同定した 4 抗原を含めると 4 割の患者をカバーしうるに至った。さらに迅速にマイナー抗原を同定するための、より Public なリソースを用いた簡便な方法もほぼ開発を終了しつつある。また、マイナー抗原を標的とした DLI に先行し、ワクチン療法の臨床試験を開始しているが、これまでに 48 例の検査が終了、9 例で適応例があり、このうち再発リスクの特に高い症例についてはワクチン投与を実施する予定である。これと平行し、DLI に用いる T 細胞を簡便に純化・増幅する技術も引き続き改良中である。

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 20～50%と高率であるため、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と WT1 などの腫瘍関連抗原であるが、前者はドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来する蛋白質断片（ペプチド）が患者の HLA 分子に提示されて

抗原物質となったものである。腫瘍細胞を含む血液系細胞に特異的に発現する蛋白質（すなわち分化抗原）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選択的免疫療法の標的抗原として有用である。

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ため、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ことから、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、過去にクローニングした HLA-A24 拘束性の細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が認識する新規マイナー抗原を、免疫学的手法と全ゲノム解析法を組み合わせた新手法を開発することで同定に成功したことを中心に報告する。また、ワクチン療法の臨床試験の進捗状況についても報告する。

B. 研究方法

① 新規マイナー抗原の同定： HLA-A24 拘束性の 1B9-CTL は急性骨髄性白血病に対し HLA 一致同胞から移植を受けた患者末梢血より、クローニングした。ACC-1Y マイナー抗原の同定に用いた連鎖解析法や、ACC-4, -5, -6 の同定に用いた cDNA ライブラリ発現クローニング法では遺伝子の同定に至らなかった。そこで昨年度報告した ACC-6 の同定過程で試みた DNA プールを用いたマイクロサテライト解析法を、SNP アレイを用いた全ゲノム解析法として改良し、同定を試みた。具体的には健康人末梢血 B 細胞から樹立した EBV 不死化細胞株 (B-LCL) に必要に応じて拘束性 HLA-A24 遺伝子を導入し、細胞傷害性試験により 1B9-CTL による傷害の有無を決定した。1B9-CTL により傷害された、傷害されない B-LCL がそれぞれ 40~50 検体収集出来たところで、各 B-LCL よりゲノム DNA を抽出し、抗原陽性群、陰性群毎にプール化した。このプール DNA を制限酵素で消化した後、100K と 500K の SNP アレイで SNP タイピングを行い、2 群間で SNP のゲノタイプに有意に偏りがある部分を統計学的に同定した (東京大学医学部附属病院血液腫瘍内科・小川誠司博士との共同研究)。ついで、候補に挙げられた領域に存在する遺伝子上の SNP 付近のアミノ酸配列について、1B9-CTL のエピートプとなる部分を決定した。

② ペプチドワクチン療法臨床試験：HLA-A24 拘束性 ACC-1Y、HLA-B44 拘束性 ACC-2、HLA-A*0201/A*0206 拘束性 HA-1H のペプチドが GMP グレードで準備済みであるため、これらの HLA を有する患者について、マイナー抗原タイピングを HLA 研究所 (京都) で行い、ワクチン療法の対象症例をリクルートし、適応例に臨床試験を行う体制を取っている。

(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ヒトゲノム・遺伝子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。以上の厳格な遵守により、本研究は倫理面で問題が無かったものとする。

C. 研究結果

① HLA-A24 拘束性新規マイナー抗原の同定： HLA-A24 拘束性の CTL クローンは造血系細胞を強く傷害し、標的として利用でき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。従来法では遺伝子の同定に至らなかったため、「B.方法」に記載したごとく、まず DNA プール (プール1：陽性 57 例、陰性 38 例；プール2：陽性 75、陰性 34) を作成し、その後全ゲノム SNP 解析を実施した。この結果2つのプールとも、染色体 15q25.1 領域に 1 つだけ強い相関を示す SNP (rs1879894) が認められ、これはわずか 26kb という linkage disequilibrium (LD) 領域に存在

していた (図 1)。この LD に存在する既知の遺伝子は *BCL2A1* の Exon 1 のみであった。次いで *BCL2A1* の全長 cDNA を患者およびドナー-B-LCL から作成し、HLA-A24 発現 293T 細胞に導入したところ、患者型のみ 1B9-CTL からの IFN- γ の放出を促したため、*BCL2A1* をマイナー抗原遺伝子として確定した (図 2A)。本遺伝子上のアミノ酸のうち、SNP を含み、かつ HLA-A24 結合性モチーフをもつものは、我々が 2003 年に同定した ACC-1Y エピトープ部位のみであった。そこで今回の患者型 Cysteine (C) を含むペプチドを合成し、Y 型のペプチドと共に 1B9-CTL を用いた細胞傷害性試験を施行した。その結果、C 型の DYLQCVLQI をパルスした細胞のみが傷害を受けたため、DYLQCVLQI を 1B9-CTL が認識するマイナー抗原エピトープ (ACC-1C と命名) と決定した (図 2B)。1B9-CTL と同じ T 細胞受容体 β 鎖の CDR3 配列をもつ T 細胞の患者末梢血中での動態を、定量 PCR 法にて検討した。CTL は移植後半年をピーク (末梢血 CD3 陽性細胞の 1%) に上昇し、以後漸減した。この症例は移植後微少残存白血病を認めなかったため、GVL 効果との関連は不明であるが、少なくともこの患者が併発した慢性 GVHD の病勢とは相関しなかった (図 2C) (川瀬孝和・南谷泰仁、Blood, in press)。

② ペプチドワクチン療法臨床試験：

HLA-A24 拘束性 ACC-1Y、HLA-B44 拘束性 ACC-2、HLA-A*0201/A*0206 拘束性 HA-1H ペプチドは GMP グレードで合成された後、当センターの細胞調製施設にて無菌的に溶解・分注後、 -30°C で凍結保存された。

本臨床試験に適応のある患者の検索は、研究協力に同意した施設にて HLA-A2、A24、B44 のいずれかをもつ症例が同種移植を受けた際に、マイナー抗原の遺伝子型もタイピン

グすることで行った。集計の結果、平成 20 年 1 月末の段階で 48 例がタイピング検査を受け、うち 36 例がそのドナーとペアで結果判定が可能であった。この中で 9 例 (25%) が 3 種類のマイナー抗原のうち、少なくとも 1 つについて GVL 方向の不適合を有していた。3 例が移植後再発を経験しており、うち 1 例は合併症のため適応外、2 例は化学療法単独で再寛解に至ったため、ワクチン接種には至っていない。しかし、平成 19 年 10 月より、当センターのヒトゲノム・遺伝子倫理審査委員会で移植後 30%以上の再発ハイリスク例では再発予防投与実施も認められたため、今後、本人の意思の確認後に予防投与を行うか、慎重に決定する予定である。

D. 考察

今回同定した ACC-1C マイナー抗原は、以前同定した ACC-1Y マイナー抗原の抗原性を決定づける SNP の対側アリルにコードされるものであった。HLA-A24 の日本人における陽性頻度は 60~65%、ACC-1C 陰性：陽性者が 8 : 2であることを考慮すると、ACC-1C の GVL 方向不適合は 11%の確率で発生することとなり、過去に報告されたマイナー抗原の中では ACC-1Y と同等で、もっとも利用頻度が高い。従って、今回の発見は日本人患者におけるマイナー抗原を標的とした免疫療法の臨床試験遂行に貢献すると考える。また、今回開発したマイナー抗原同定法は免疫領域とゲノム解析領域の最先端技術の融合により完成したもので、異分野の協調の重要性を示唆するものである。

BCL2A1 は抗アポトーシス機能を有した蛋白質であり、腫瘍が抗癌剤や放射線、細胞傷害性のサイトカインにさらされた場合に誘導されることが知られている。従って、*BCL2A1* 由来のエピトープは、GVL 効果誘導において

きわめて有用な標的抗原である。

マイナー抗原ペプチドワクチンによる免疫療法は、移植後白血病の再発や、予防に有用な選択的 GVL を引き起こすことができると推測され、我々はその安全性、有用性について臨床試験を開始している。WT1 などの腫瘍関連抗原と異なり、非自己抗原に対するアロ免疫を誘導することで強い GVL 効果が期待できる反面、移植が必要であることと、ドナー患者間で利用可能なマイナー抗原の GVL 方向不適合が必要な点などの制約もある。これが、本試験の遂行を遅らせている理由であるが、これまでの 36 例の移植ペアの検査では対象の 3 抗原で 9 例と、ほぼ統計的に予想される頻度で不適合ペアが見つかっている。現時点では、残念ながらまだワクチン接種を実施できていないが、今後さらに症例をリクルートし、早急に本免疫療法の有用性を確立していく予定である。

E. 結論

造血器腫瘍に特異的に発現する BCL2A1 遺伝子にコードされる HLA-A24 拘束性の新規マイナー抗原 (ACC-1C) を同定した。この結果、ACC-1 抗原を利用できる日本人患者集団は両方向の GVL 不適合を合わせて 2 倍となった。また、今回の抗原同定は新たな技術開発により成功したもので、ほとんどの CTL に応用でき、マイナー抗原の同定が加速されると考えられた。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawase T, Nanya Y, Ogawa S, Akatsuka Y, et al. Identification of human minor histocompatibility antigens based on genetic association with highly parallel genotyping of pooled DNA.

Blood. 2008, *in press*.

- 2) Akatsuka Y, et al. Minor histocompatibility antigens as targets for immunotherapy using allogeneic immune reactions. *Cancer Sci*. 98: 1139-1146, 2007.

2. 学会発表

- 1) 川瀬孝和、赤塚美樹、鳥飼宏基ら。HMSD 遺伝子に由来する新規マイナー抗原 ACC-6 の同定と白血病幹細胞における ACC-6 の発現。第 11 回基盤のがん免疫研究会総会、東京 2007 年 7 月
- 2) 鳥飼宏基、赤塚美樹、谷田部恭ら。BCL2A1 にコードされる血液細胞特異的マイナー組織適合抗原のメラノーマにおける異所性発現。第 66 回日本癌学会総会、横浜 2007 年 9 月
- 3) 川瀬孝和 南谷泰仁 赤塚美樹ら。遺伝子連鎖解析による HLA-A*2402 拘束性の新規マイナー組織適合性抗原の同定。第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、横浜 2007 年 10 月
- 4) 赤塚美樹。GVHD を増強せずに GVL 効果 を高める治療法の可能性 (シンポジウム)。第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、横浜 2007 年 10 月
- 5) 赤塚美樹。造血器腫瘍に対する細胞免疫療法 の今後 (教育講演)。第 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、横浜 2007 年 10 月
- 6) 赤塚美樹。マイナー組織適合抗原を標的とした免疫療法。第 55 回日本輸血学会総会 (教育講演)、名古屋 2007 年 5 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 免疫学的タイピングおよび全ゲノム SNP 解析融合法による 1B9-CTL が認識するマイナー抗原遺伝子領域

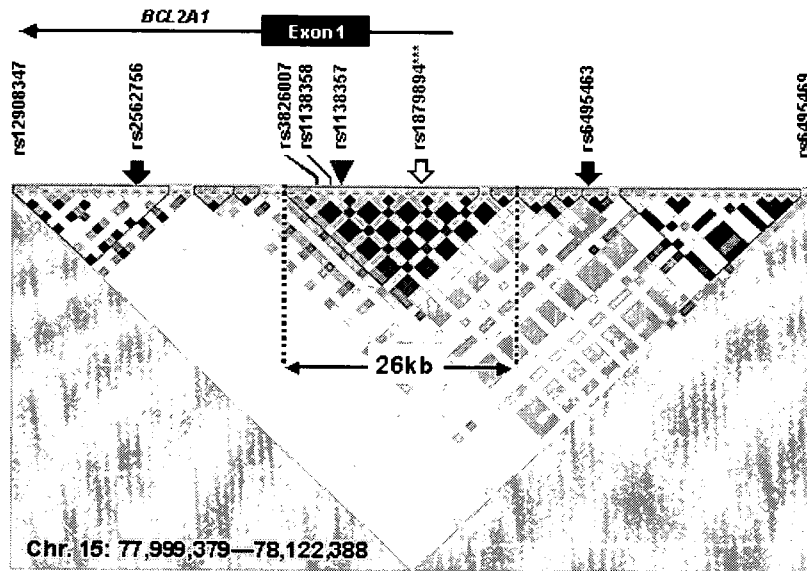
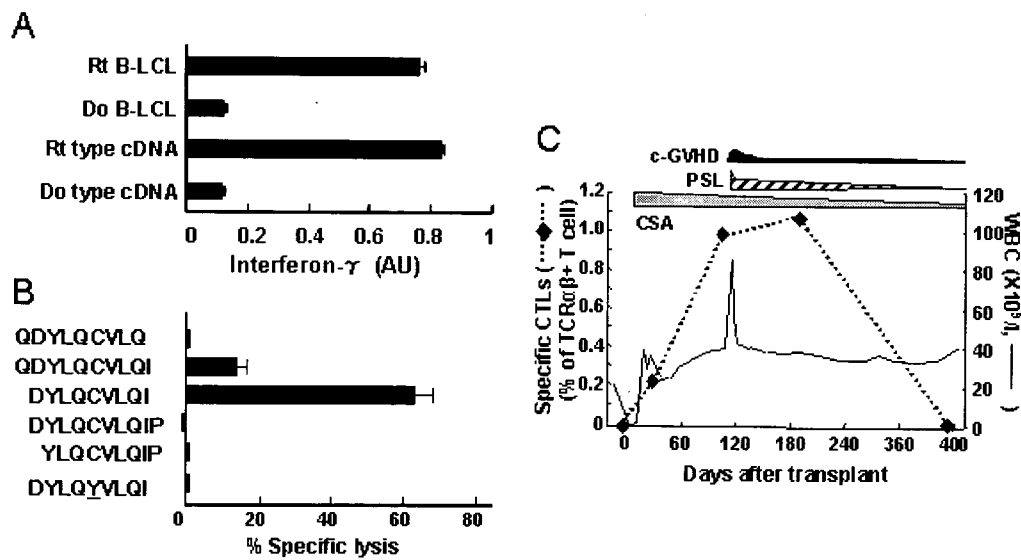


図2 1B9-CTL が認識するマイナー抗原の同定。(A) 患者およびドナー型 BCL2A1 cDNA 導入 293T 細胞に対する 1B9-CTL の INF- γ 産生、(B) 1B9-CTL が認識する最小エピートプの決定、(C) 1B9-CTL と同じ T 細胞受容体 β 鎖 CDR3 配列をもつ T 細胞反応の移植後経時的変化。



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。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・有効性を実証した。さらに、IBM-BMTとドナーリンパ球輸注(DLI)の組合せが、GvHDを抑制するが、腫瘍の増殖を抑制することを見出した。

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。小動物としては、難病のモデル動物(マウス, ラット等)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、申請者ら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)自己免疫疾患自然発症モデル動物のMRL/lprマウスを用いて、neural cell adhesion molecules (NCAM)の異常が、造血幹細胞(HSC)の異常な増殖に関与していることを見出した(文献①参照)。
- 2)マウスの系で、我々が発見した、新しい癌治療法(IBM-BMT+ドナーリンパ球輸注:DLI)がラットの大腸癌の系でも有効であること、さらには、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②参照)。
- 3)IBM-BMTとDLIに、さらに樹状細胞(DC)の脉冲療法を加えた癌の治療法を開発した。マウスのMeth A(線維肉腫)の系で、皮下移植腫瘍のみならず、静脈内注射による肺転移モデルでも、この方法により、腫瘍の増殖抑制と延命効果を認めた(文献③参照)。
- 4)IBM-BMTでは、従来の静脈内骨髄移植(IV-BMT)と比較して、造血系の早期回復が認められるが、これは、ドナー由来の間葉系幹細胞(MSC)と造血幹細胞(HSC)とのdirect interactionが骨髄内で効率良く行われるためであることを明らかにした(文献④参照)。
- 5)老人性骨粗鬆症マウス(SAMP6)の骨髄細胞(BMC: HSCとMSCを含む)を正常マウスにIBM-BMT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。従来のBMT(静脈内骨髄移植: IV-BMT)では、MSCが置換されないため、病気もtransferできず、骨粗鬆症の原因が、MSCの異常に起因することを、明らかにした重要な発見と考える(文献⑤参照)。以上の結果に基づいて、我々はMSC disordersという新しい概念を提唱している(Ikehara S J. Autoimmunity 30: 108, 2008)。
- 6)これまでに、我々は、IBM-BMTをする時DLIをしてもGvHDが発症しにくいことを見出している(Nakamura K et al. Stem Cells 22: 125, 2004)が、さらに、大量のT細胞を骨髄内に注入しても、GvHDが発症しないことを発見した。その理由として、i)IBM-BMTによって、Treg(制御性T細胞)が増加すること、ii)Th-2 typeへのT細胞のsubsetのpolarization(偏向)が見られること、iii)MSCによりTGFβやHGFの産生が亢進すること等が考えられる(文献⑥参照)。
- 7)BALB/cマウスとMeth Aの系を用いて、骨髄腔内にDCを注入することによって、腫瘍特異抗原を提示することのできるDCを効率良く活性化し、強力な抗腫瘍効果が発揮できることを見出した(文献⑦参照)。
- 8)AdultのC57BL/6マウスの卵巣を摘出し、3か月後にBLAB/cマウスのBMCをIBM-BMTし、BALB/cマウスの卵巣を腎被膜下に移植した。移植3か月後に、estrogenの濃度と骨密度を測定し、hypogonadismとosteoporosisの発症が予防できることを明らかにした(文献⑧参照)。
- 9)C3H/HeNマウスにstreptozotocinで糖尿病を誘導し、C57BL/6マウスのBMCをIBM-BMTし、in vitroでBMCから分化・誘導したβ細胞を門脈から移植することによって、糖尿病が治療できることを見出した(文献⑨参照)。
- 10)ヒトの臍帯血をSCIDマウスのsub-retinal spaceへ直接注入することによって、retinal nerve cellsへの分化が誘導できることを明らかにした(文献⑩参照)。
- 11)HSCのin vivoのassay系として、serial BMTによるlong-term reconstituting ability(LTRA)を調べる方法が知られているが、これはBMCを静脈内へ注入(IV-BMT)するため、より未熟なHSC(CXCR4等のhoming receptorを欠除している細胞)を見失っている可能性が考えられる。我々は、serial BMTの際、IV-BMTとIBM-BMTで比較し、IBM-BMTの方法がLTRAを有する細胞の同定に優れていることを明らかにした(文献⑪参照)。
- 12)ラットでIBM-BMTと心移植を同時に行い、長期間に亘ってドナー特異的免疫寛容を誘導し、免疫抑制剤を使用せずに、長期間(1年以上)のアロ心移植に成功した(文献⑫参照)。

II. サルを用いた実験結果

ヒト臨床応用のためのトランスレーショナル・リサーチとして、100匹以上のカニクイザルを用いて、灌流法並びにIBM-BMTの安全性を確認した。また、灌流法で採取したBMC中には、T細胞は10%以下で colony-forming unit in culture (CFU-C) assay でも、従来の吸引法より、骨髄中の未熟な造血細胞が濃縮されていることが明らかとなった（文献⑬参照）。

<ヒト臨床応用へ向けてのこれまでの経過と今後の方針>

・平成18年2月24日、第一回“骨髄内骨髄移植研究会”を東京で開催し、灌流法の安全性を確認する Phase I Studyを実施することが承諾された。

・平成18年12月25日、悪性リンパ腫(ML)で Poor Mobilizerの患者に対して関西医大にて灌流法を安全に実施した。

・平成19年2月16日(福岡)、第二回“骨髄内骨髄移植研究会”を開き、対象者をMLの全般に拡大しても良いとの安全性委員からの承諾が得られた。

・平成20年2月29日(大阪)、第三回の“骨髄内骨髄移植研究会”を開催し、今後の方針に関して議論が交わされ、とりあえず、Phase I Studyをあと2例終了して、次の段階へstep upするよう提言を頂いた。

G. 研究発表

1. 論文発表 (国内)

①池原 進: 骨髄内骨髄移植. 血液・腫瘍科 特別増刊号. 2. 基礎編 55:82-86, 2007.

(国外)

①Wang, X, Hisha H, Cui W, Song C, Mizokami T, Okazaki S, Li Q, Feng W, Kato J, Jiang S, Fan H, and Ikehara S: The characteristics of hematopoietic stem cells from autoimmune-prone mice and the role of neural cell adhesion molecules in abnormal proliferation of these cells in MRL/lpr mice. *Haematologica* 92: 300-307, 2007.

②Koike Y, Adachi Y, Suzuki Y, Iwasaki M, Koike-Kiriyama N, Minamino K, Nakano K, Mukaide H, Shigematsu A, Kiyozuka Y, Tubura A, Kamiyama Y, and Ikehara S: Allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus donor lymphocyte infusion suppresses growth of colon cancer cells implanted in skin and liver of rats. *Stem Cells* 25: 385-391, 2007.

③Mukaide H, Adachi Y, Koike-Kiriyama N,

Suzuki Y, Minamino K, Iwasaki M, Tsuda M, Nakano K, Koike Y, Shigematsu A, Kamiyama Y, and Ikehara S: Immunotherapy for malignant tumors using combination of allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation, donor lymphocyte infusion and dendritic cells. *Int. J. Oncol.* 30: 1309-1315, 2007.

④Li Q, Hisha H, Yasumizu R, Fan TX, Yang GX, Li Q, Cui YZ, Wang X, Song CY, Okazaki S, Mizokami T, Cui WH, Guo K, Li M, Feng W, Katou J, and Ikehara S: Analyses of very early hemopoietic regeneration after bone marrow transplantation: Comparison of intravenous and intrabone marrow routes. *Stem Cells* 25: 1186-1194, 2007.

⑤Ueda Y, Inaba M, Takada K, Fukui J, Sakaguchi Y, Tsuda M, Kushida T, Iida H, and Ikehara S: Induction of senile osteoporosis in normal mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation from osteoporosis-prone mice. *Stem Cells* 25: 1356-1363, 2007.

⑥Fukui J, Inaba M, Ueda Y, Miyake T, Hosaka N, A-H K, Sakaguchi Y, Tsuda M, Mariko Omae, Kamiyama Y, and Ikehara S: Prevention of graft-versus-host disease by intra-bone marrow injection of donor T cells. *Stem Cells* 25: 1595-1601, 2007.

⑦Koike-Kiriyama N, Koike Y, Adachi Y, Mukaide H, Minamino K, Shigematsu A, Kamiyama Y, Matsumura M, and Ikehara S: Intra-bone marrow injection of dendritic cells for treatment of malignant tumor in mice. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 26: 337-342, 2007.

⑧Feng W, Cui Y, Song C, Zhan H, Wang X, Li Q, Cui W, Guo K, Maki M, Hisha H, and Ikehara S: Prevention of osteoporosis and hypogonadism by allogeneic ovarian transplantation in conjunction with intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Transplantation* 84: 1459-1466, 2008.

⑨Li M, Inaba M, Guo K, Hisha H, Abraham NG, and Ikehara S: Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in mice by intra-bone marrow bone marrow transplantation plus portal vein injection of β cells induced from bone marrow cells. *Int. J. Hematol.* 86: 438-445, 2007.

⑩Koike-Kiriyama N, Adachi Y, Minamino K, Iwasaki M, Nakano K, Koike Y, Yamada H, Mukaide H, Shigematsu A, Mizokami T,

Matsumura M, Ikehara S: Human cord blood cells can differentiate into retinal nerve cells. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* in press.

①Omae M, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Miyake T, Fukui J, Iwai H, Yaamashita T, and Ikehara S: Long-term maintenance of donor-derived hemopoiesis by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Stem Cells and Development* in press.

②Guo K, Inaba M, Li M, An J, Cui W, Song C, Wang J, Cui Y, Sakaguchi Y, Tsuda M, Omae M, Li Q, Wang X, Feng W, and Ikehara S: Long-term donor-specific tolerance in rat cardiac allografts by intrabone marrow injection of donor bone marrow cells. *Transplantation* 85: 93-101, 2008.

③Inaba M, Adachi Y, Hisha H, Hosaka N, Maki M, Ueda Y, Koike Y, Miyake T, Fukui J, Cui Y, Mukaide H, Koike N, Omae M, Mizokami T, Shigematsu A, Sakaguchi Y, Tsuda M, Okazaki S, Wang X, Li Q, Nishida A, Ando Y, Guo K, Song C, Cui W, Feng W, Katou J, Sado K, Nakamura S, and Ikehara S: Extensive studies on perfusion method plus intra-bone marrow-bone marrow transplantation using cynomolgus monkeys. *Stem Cells* 25: 2098-2103, 2007.

<図書>Susumu Ikehara. A novel method of bone marrow transplantation (BMT) for intractable autoimmune diseases. In: *The Use of Bone Marrow Transplantation to Treat Autoimmune Diseases*. M. Eric Gershwin, Yehuda Shoenfeld, J.-F. Bach, eds.) ELSEVIER Amsterdam, Boston, Jena, London, NewYork, Oxford, Paris, Philadelphia, SanDiego, St.Louis. 108-115, 2008.

2. 学会発表

(国内)

・2008年2月 Intra-BM Stem Cell Transplantation. 第30回日本造血細胞移植学会総会シンポジウムIII シンポジスト

(国外予定)

・2008年3月 "What do We Learn from Experimental Models?": 34th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) 招聘講演 (イタリア)

・2008年3月 "Stem Cell Transplantation for Autoimmune Diseases and Age-Associated Diseases (including Diabetes Mellitus)

"Pisa University (Prof. Antonio L'Abbate) 招聘講演 (イタリア)

・2008年9月 "A New BMT Method for Stem Cell Disorders": 6th International Congress on Autoimmunity 招聘講演 (ポルトガル)

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

造血幹細胞移植とその組織適合性抗原

厚生労働科学研究費補助金（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型不適合と抗白血病効果—

分担研究者	森島泰雄	愛知県がんセンター中央病院
分担研究者	笹月健彦	国際医療センター
研究協力者	川瀬孝和	愛知県がんセンター研究所
研究協力者	松尾恵太郎	愛知県がんセンター研究所
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	山本 健	九州大学生態防御研究所

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。前年度までにHLA-A, B, C, DPB1の遺伝子型の不適合、およびNK細胞受容体であるKIR2DLのリガンド不適合（GVHD方向）が急性GVHDの頻度を高めること、ならびに重症急性GVHDハイリスクなHLA型不適合の組み合わせを17組同定することができた。今年度は白血病において再発ハイリスクなHLA型不適合な組み合わせをHLA-CとHLA-DPB1において同定することができた。これらの解析結果により、より適切なドナーの選択することにより移植成績の向上が期待される。

A. 研究目的

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子型適合度と臨床成績、とくに白血病再発との関連(GVL 効果)を解析することにより、HLA 型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

本年度までに本研究班で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非血縁者間骨髄移植白血病 4643 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。

統計解析はCox regression modelsによる多変量解析法を使用し、変数として各HLA座におけるHLA型不適合な組み合わせ症例の再発リスク(OR)をHLA型適合な症例と比較した。他のHLA座の不適合度、患者・ドナーの年齢、性、性適合、疾患、移植病期、TBIの有無、GVHD予防法などによりadjustした。Pが0.005以下の組み合わせと有意とし、さらにBootstrapping法により検証した。

C. 研究結果

1) HLA 座の不適合と白血病の再発との関連

Figure 1 に示すように HLA-C あるいは HLA-DPB1 が不適合な症例では有意に白血病の再発は低下していた。一方、HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DQB1 の違いは影響を与えなかった。

2) GVL 効果が生じる HLA 型の組み合わせ。

表 1 に示すように 10 症例以上の症例を有する HLA 型不適合な組み合わせにおいて、有意に ($P < 0.05$) 再発が低率であった組み合わせは 10 組認められた。

4 つの組み合わせは HLA-C であり、KIR 2DL リガンド適合度とは関連していなかった。他の 6 つの組み合わせは HLA-DPB1 であった。

HLA-A, B, DRB1, DQB1 においては有意な組み合わせは見出されなかった。

3) GVL 効果が生じる HLA 分子上の部位とそのアミノ酸

表 2 に示すように HLA-C において 9 番、99 番、156 番のアミノ酸の置換により有意に再発は低下していた。なお、9 番と 99 番のデータはほぼ一致しており、このどちらかが関与していることになる。156 番の Leu(ドナー)と Arg(患者)の組み合わせは重症 GVHD を生じるの組み合わせとは異なっていた。HLA-DPB1 では HLA-C に見られた部位を同定することはできなかった。

D. 考察

4643 ペアという多数例で HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の遺伝子型が本研究班において後方視的に同定されたことと、

さらに多変量解析とその結果の検証を行ったことにより確かな結果を得ることができた。HLA-C と HLA-DPB1 のドナーと患者の HLA 座の違いにより GVL 効果を生じることが明確になった。さらに、HLA-C 型の不適合のなかで 2 組は GVHD ハイリスクな組み合わせであったが、他の 2 組は GVHD のリスクのない組み合わせであり、GVHD を生じることなく GVL 効果を十分に発揮できる組み合わせであった。さらに、HLA-C においてアミノ酸の置換部位を同定できたことは、GVL 効果のメカニズムを考える上で興味深い。また、HLA-DPB1 でアミノ酸置換部位を同定できなかったことは、HLA-DPB1 による GVL 効果の作用機序が異なる可能性を示唆している。

E. 結論

HLA 型不適合の組み合わせと急性 GVHD との関連を 5643 症例につき解析し、GVL 効果としネス組み合わせを 10 組同定することができた。このことにより、より適切なドナーの選択と移植成績の向上する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawase T, Morishima Y, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Kato S, Juji T, Kodera Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donor Program. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute

- graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood.*, 2007 110:2235-41.
2. Yabe T, Matsuo K, Hirayasu K, Kashiwase K, Kawamura-Ishii S, Tanaka H, Ogawa A, Takanashi M, Satake M, Nakajima K, Tokunaga K, Inoko H, Saji H, Ogawa S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y, Morishima Y for the Japan Marrow Donor Program. Donor killer immunoglobulin-like receptor (*KIR*) genotype and anti-thymocyte globulin pre-administration are critical factors in outcome of HLA-C-KIR ligand mismatched T cell-replete unrelated bone marrow transplantation. *Biology Blood Marrow Transplant* (in press)
 3. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Ohshima K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, Nakamura S. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res.*, 2007, 13:5124-32.
 4. Morishima Y, Kawase T, Malkki M, Petersdorf EW; International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation Component. Effect of HLA-A2 allele disparity on clinical outcome in hematopoietic cell transplantation from unrelated donors. *Tissue Antigens.* , 2007, 69(Suppl 1):31-5.
 5. Setterholm M, Morishima Y, Pepperall J, Schmidt A. Strategies for typing new volunteer donors. *Tissue Antigens.*, 2007, 69(Suppl 1):6-7.
 6. Ozawa S, Nakaseko C, Nishimura M, Maruta A, Cho R, Ohwada C, Sakamaki H, Sao H, Mori S, Okamoto S, Miyamura K, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y; Japan Marrow Donor Program. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated donor: incidence, risk factors and association with relapse. A report from the Japan Marrow Donor Program. *Br J Haematol.*, 2007, 137:142-51.
 7. Yamada K, Takahashi M, Ogura M, Kagami Y, Taji H, Kamiya Y, Sugiura H, Morishima Y. High-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transfusion for adult and adolescent patients with small round cell sarcomas. *Bone Marrow Transplant.*, 2007, 39:471-6.
 8. Mizuta S, Kohno A, Morishita Y, Atsuta Y, Sao H, Miyamura K, Sakamaki H, Ueda R, Morishima Y. Long-term follow-up of 14 patients with philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia following autologous bone marrow transplantation in first complete remission. *Int J Hematol.*, 2007, 85:140-5.
 9. Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H,