

C. 研究結果

AML 患者末梢血中の HE4 タンパク質発現量の検討

AML 患者 (N=3) 血清中の HE4 タンパク質レベルを富士レビオ HE4 EIA キットを用いて測定した。その結果、健常人の血漿 (N=8) の HE4 値は、検出限界以下~46pM (平均値 8pM) であったのに対し AML 患者 (N=3) では 48~211pM (平均値 117pM) と高い傾向にあった (Figure 1)。

D. 考察

AML 患者 (N=3) の血漿中の HE4 タンパク質レベルは、健常人の値より高い傾向にあった。近年、血清 HE4 値は、卵巣がんの優れたマーカーとしても海外で認められつつある。卵巣がん患者血清で約 95% 確定となる HE 値は、150pM 以上とされる。我々が測定した AML 患者血漿の 3 検体のうち 1 検体は 150pM 以上を示し、AML 患者の血漿においても卵巣がんので定められた域値を超えるものもあることが明らかになった。しかしながら、150pM 以下を示した検体も 2 検体あり、AML における域値の設定とその域値での AML の確定率を算出し評価することが AML で HE4 を測定することの有用性を示す上で非常に重要な課題であると考えられた。

今後は、検体数を増加し、HE4 値の域値の設定の違いでの AML の確定率の算出や FAB 型での HE4 値の違い、また治療ステージによる変化、など AML の診断や経過観察にどの程度応用できるか検討する。

E. 結論

これまで、AML の検査は AML の原因である変異遺伝子の定量 PCR や WT1mRNA の定量など、核酸による検査が主流で行われてきた。これは、AML に特異的な血清タンパク質がこれまで不明であったことにも起因すると考えられる。今回の我々の結果は、卵巣がんマーカーとしても知られる分泌タンパク質である HE4 が、AML 患者の血清でも上昇している可能性を示したものであり、AML の診断

や治療経過の観察への応用が期待できると考えられる。よって今後は、患者検体数を増やし、AML 患者での HE4 の上昇が統計的にどの程度有意な上昇であるか算出に取り掛かる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

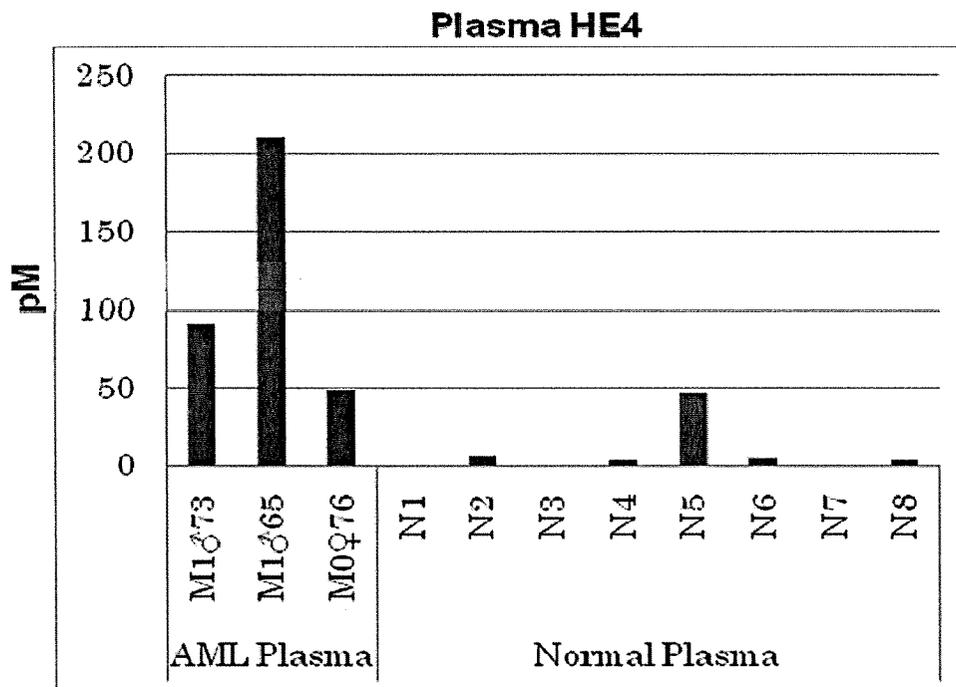


Figure 1 AML 患者血清における HE4 値の測定

AML 患者血漿 (N=3) および健常人血漿 (N=8) での HE4 タンパク質量を HE4 EIA キットを用いて測定した。

AML 患者血漿では、健常人と比較して HE4 値が高い傾向にあった。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

「造血細胞移植後の微生物モニタリング： 高感度多項目迅速低価格微生物検出システムの開発と臨床研究」

研究分担者 森尾 友宏 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野

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

研究要旨：造血細胞移植後における日和見感染症の早期発見、早期治療に向けて、新規微生物検出システムの開発を行った。本年度は 16S, 18S rRNA 測定→遺伝子塩基配列決定による細菌及び真菌の同定、マイコプラズマ属を網羅する PCR 系の確立、Xenotropic murine retrovirus (xmrv) や新型インフルエンザの検出系を立ち上げた。また本検査方法の技術移転をめざし、3 施設にて定性・定量検査系が実稼働する状態となった。

A. 研究目的

造血細胞移植後の微生物を早期に、効率よく、高感度に、安価に多項目測定可能なシステムを開発し、モジュールの追加により、測定可能微生物を順次追加することにより、移植後感染症の早期治療と予後の改善を目指す。また本手法の技術移転により、全国の主要移植施設において病院内検査として実施可能な体制の確立も目的とする。

B. 研究方法

1) 造血細胞移植後検体（血液、分泌物、尿、生検材料など）を用いて、既存の高感度多項目迅速微生物検査を実施すると共に、感度などにつき不断の改良を行う。実際にはキャピラリーPCR による multiplex PCR と融解温度曲線分析による定性試験と、realtime PCR の両者について、改良を行う。

2) 測定可能微生物種類を増やすことを目的として、プライマーデザインと PCR 条件を決定する。実際に本年度においては、16S rRNA による細菌の検出、18S rRNA による真菌の検出、マイコプラズマの同定、xmrv の同定を目的として実験を行う。

3) 技術移転のために、東京医科歯科大学において各施設の技術者の教育訓練を行い、各施設での実施が出来る体制を支援する。

（倫理面への配慮）

本研究は、患者検体を用いて解析を行う。実際には診療に役立つ情報が得られるが、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行う。また遺伝子解析を行うものは微生物のみであるが、その情報の秘匿についても十分な配慮を行う。

C. 研究結果

1) 検査の改良とそれを用いた造血細胞移植後検体の解析

本年度までの検査において安定したウイルスの検出が得られていたが、HHV6 などにおいて、時に定量試験のデータが優れている場合があることが明らかになり、HHV6 定性試験の条件の見直しから、さらに漏れのない解析が行えるようになった。定量試験に於いても、現行法よりも鋳型 DNA を 3 倍に増加させることにより、より少量の微生物が安定して検出可能となった。

2) 新規微生物測定系の開発

NCBI (National Cancer for Biotechnology Information) に掲示された H1N1 型ウイルスの塩基配列を基に、プライマー・プローブをデザインし、新型インフルエンザウイルス H1N1 の測定系を構築した。また 2009 年度に慢性疲労症候群の原因

ウイルス候補として注目を集めた xmrV についてもプロウイルスを検出できる系を立ち上げた。

細菌においては、多種類が存在するマイコプラズマをもれなく検出できる PCR システムを立ち上げた。16s rRNA, 18S rRNA については昨年の系を brush up し、実測定において、細菌を捕まえ、同定することができることを確認した。

3) 技術移転

成育医療センター、虎ノ門病院、先端医療センターとの共同作業により、各々の施設の技術者を教育訓練し、微生物測定をリアルタイムで行える体制がほぼ整った。

本研究においては、PCR 用プライマーミックスや、PCR 用 premix 試薬などを安定して供給すべく、その標準化も平行して進めた。

D. 考察

継続した PCR による微生物検出法の改良、測定可能微生物の継続的な追加とその実用性の検証、本技術を用いて微生物検査を行える施設の拡大などから、今後造血細胞移植において、頻回に微生物をモニターすることが可能になることが予想される。また今後の大規模臨床研究の中から、移植後微生物感染症の全貌が明らかになることも夢ではないと予想される。

E. 結論

以前より継続して改良してきた高感度多項目迅速微生物検査系、定量検査系では、細菌・真菌類の測定系が追加され、また重要なウイルス群も測定可能になった。検査実施可能な施設も増えつつあり、今後標準的モニター法として、普及することが期待される。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, hisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Autopsic study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD). *Acta Neuroathologica*. 2010. (in press).
- 2) Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur J Pediatr*. 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]
- 3) Nanki T, Takada K, Komano Y, Morio T, Kanegane H, Nakajima A, Lipsky PE, Miyasaka N. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009 Oct 5;11(5):R149. [Epub ahead of print]
- 4) Miyagawa M, Sugita S, Shimizu N, Morio T, Miyata K, Mochizuki M. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br J Ophthalmol*. 2009 Sep 3. [Epub ahead of print]
- 5) Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* 128:405-419, 2009.
- 6) Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H,

- Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, Morio T, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards. *J. Pediatr.* 155: 829-833, 2009.
- 7) Morio T, Takahashi N, Watanabe F, Honda F, Sato M, Takagi M, Imadome KI, Miyawaki T, Delia D, Nakamura K, Gatti RA, Mizutani S. Phenotypic variations between affected siblings with ataxia-telangiectasia: ataxia-telangiectasia in Japan. *Int. J. Hematol.* 90:455-462, 2009.
- 8) Isoda T, Ford A, Tomizawa D, van Delft F, De Castro DG, Mitsuiki N, Score J, Taki T, Takagi M, Morio T, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 17882-5. 2009.
- 9) Uchisaka N, Takahashi N, Sato M, Kikuchi A, Mochizuki S, Imai K, Nonoyama S, Ohara O, Watanabe F, Mizutani S, Hanada R, Morio T. : Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with lung adenocarcinoma. *J. Pediatr.* 155:435-438, 2009.
- 10) Futagami Y, Sugita S, Fujimaki T, Yokoyama T, Morio T, Mochizuki M. Bilateral anterior granulomatous keratouveitis with sunset glow fundus in a patient with autoimmune polyglandular syndrome. *Ocul Immunol Inflamm.* 17:88-90, 2009.
- 11) Takahashi N, Matsukoto K, Saito H, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Azuma M, Lee S-K, Mizutani S, Morio T. : Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T-cell populations in ICOS deficient patients. *Immunol.* 182:5515-5527, 2009.
- 12) Yoshida H, Kusuki S, Hashii Y, Ohta H, Morio T, Ozono K. : Ex vivo-expanded donor CD4 T lymphocyte infusion against relapsing neuroblastoma: A transient Graft-versus-Tumor effect. *Pediatr Blood Cancer* 52:895-897, 2009
2. 学会発表
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
- 1) 清河信敬、恩田恵子、今留謙一、矢島美佐子、中村宏紀、片桐洋子、森尾友宏、藤本純一郎、藤原成悦：ドナーリンパ球輸注を目的とした臍帯血由来活性化 CD4 細胞の性状解析、第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 2 日～4 日、大阪
- 2) 森尾友宏、水谷修紀：Basic to Clinical: Artemis/Cernunos/Lig4 deficiency、第 51 回日本小児血液学会、2009 年 11 月 27 日～29 日、東京
- 3) 満生紀子、遠藤明史、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：当科における原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的前処置による移植の検討、第 51 回日本小児血液学会、2009 年 11 月 27 日～29 日、東京
- 4) 遠藤明史、満生紀子、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：RIST にて臍帯血移植後、TMA、血球貪食症候群を発症し死亡した X 連鎖重症複合型免疫不全症の 1 例、第 51 回日本小児血液学会、2009 年 11 月 27 日～29 日、東京
- 5) 森尾友宏：ex vivo 増殖臍帯血 T 細胞輸注療法の臨床研究、政策創薬総合研究事業平成 21 年度「臍帯血 DLI の実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ

チ」(研究代表者 藤原成悦)、2009年10月20日、東京

- 6) 満生紀子、大川哲平、高橋考治、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、落合央、峯岸志津子、高木正稔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：RISTによる非血縁臍帯血移植を施行したSCID3例、小児H-SCT研究会、2009年10月9日、東京
- 7) 長澤正之、小野敏明、遠藤明史、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀：当科における同種造血幹細胞移植(1995-2007年)の検討、第112回日本小児科学会学術総会、2009年4月17日～19日、奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

APPLICATION OF SYNOVIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) FOR CARTILAGE OR MENISUCUS REGENERATION (米国国際特許出願中 YCT-1301)
出願人：関矢一郎、発明者：宗田大、森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

「白血病関連抗原を標的とした移植片対白血病効果増強の試み」

研究分担者 中尾 眞二 金沢大学大学院 細胞移植学

研究要旨：同種造血幹細胞移植（allo-SCT）後にはドナー由来の CTL 前駆細胞の中から白血病関連抗原（leukemia-associated antigens; LAAs）特異的 CTL が誘導されうるが、白血病細胞がドナーの免疫監視機構からエスケープする機序を打破しなければ、LAAs を標的とした移植片対白血病（graft versus leukemia: GvL）効果を十分に誘導できない。これまで我々は、骨髄性白血病細胞および白血病細胞由来樹状細胞（leukemic dendritic cell: LDC）が抑制性補助刺激分子の一つである GITR（Glucocorticoid-induced TNFR-related protein）のリガンド（GITRL）を発現しており、LDC 上の GITRL がドナーのナイーブ CD8T 細胞上の GITR と結合することによって、ナイーブ CD8T 細胞から LAAs 特異的 CTL の誘導が抑制されることを報告している。今回我々は、①白血病細胞由来の可溶性 GITRL（sGITRL）が LAAs 特異的 CTL の活性を抑制すること、②GITR/GITRL 結合によって白血病細胞内でインドールアミン酸素添加酵素（Indoleamine 2, 3-Dioxygenase: IDO）活性が高まり、その結果白血病細胞でトリプトファン（trp）から代謝され細胞外に分泌されるキヌレニン（kyn）によって LAAs 特異的 CTL の活性が抑制されることを明らかにした。これらの所見は、移植後に抗 GITR 抗体、あるいは IDO 阻害剤を投与することによって効果的に GvL 効果を誘導できる可能性を示唆している。

A. 研究目的

GITRL の発現によって白血病細胞がドナーの免疫監視機構からエスケープする機序を明らかにするために、T 細胞上での GITR/GITRL 結合が T 細胞の活性化に及ぼす影響と、GITR /GITRL 結合が白血病細胞内での IDO 活性に与える影響を検討した。

B. 研究方法

sGITRL の検出；7 例の急性骨髄性白血病細胞（AML）患者の診断時血清と 4 例の健常人血清および GITRL⁺単球性白血病細胞株 THP-1 細胞上清中の sGITRL を ELISA で検出した。

T 細胞増殖活性；健常人の末梢血単核細胞からマイクロビーズを用いて純化した汎 T 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞の抗 CD3/CD28 ビーズ刺激に対する培養 4 日目の増殖活性を CFSE アッセイで検討した。

白血病細胞由来 exosome 上の GITRL の発現と

exosome の純化；超遠心した THP-1 細胞の培養上清から exosome を分離した。HLA class II マイクロビーズとインキュベーションして HLA class II⁺ exosome をビーズに飽和させた exosome/ビーズ複合体を抗 GITRL 抗体と反応させ、exosome 上の GITRL の発現をフローサイトメトリーで確認した。リン酸バッファーを用いて exosome/ビーズ複合体から GITRL⁺exosome を溶出純化した。

Try 代謝試験；細胞内の IDO の代謝によって培養上清中に蓄積する try 代謝産物の kyn を吸光度法で測定した。培養上清にトリクロロ酢酸を添加後混和遠心し、上清にエールリッヒ試薬を加えてマイクロプレート上で発色させ、マイクロプレートリーダー（492nm）で 0-100 μM の kyn で標準曲線をもとに比色定量した。

C. 研究結果

骨髄性白血病患者の末梢血中には高濃度の

sGITRL が検出される。

AML 患者の初診時血清および THP-1 細胞上清中には健常人血清に比べて高濃度の sGITRL が ELISA で検出された [白血病患者 (0.10-0.76) ng/ml、THP-1 0.52 ng/ml、健常人 0.31-0.21 (0.14-0.25) ng/ml]。

THP-1 細胞上清中の sGITRL は T 細胞の増殖を抑制する。

汎 T 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞を抗 CD3/CD28 ビーズで刺激する際に培養 2 日目の THP-1 細胞上清で培養すると、完全培地で培養した場合に比べてそれぞれ 45.0%、36.4%、34.2% 増殖が抑制されたが、抗 GITR 抗体を添加して GITR/GITRL 結合を阻害すると T 細胞の増殖が回復した。

THP-1 細胞上清中に検出される GITR⁺exosome によって T 細胞増殖が抑制される。

THP-1 由来の exosome には GITRL が検出された。純化した GITRL+exosome は濃度依存性に汎 T 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞の増殖を抑制した (10 μl exosome の増殖抑制はそれぞれ 27.5%、54.1%、27.9%)。

Kyn は濃度依存性に T 細胞の増殖を抑制する。

IDO による trp の代謝産物 kyn は、汎 T 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞の増殖を濃度依存性に抑制した (100 μM Kyn の増殖抑制はそれぞれ 24.5%、12.3%、18.3%)。

GITR/GITRL 結合は白血病患者細胞内 IDO 活性を上昇させ、kyn 生成を誘導する。

THP-1 に sGITR-Fc を添加して細胞表面上の GITRL と結合させたところ、培養 4 日目の上清中に kyn が検出された。この kyn 産生は、sGITR-Fc と共に IDO 抑制剤 1-メチルトリプトファンを添加することによって抑制された (sGITR-Fc; 8.6 μM、GITR-Fc+1MT; 1.0 μM、p<0.05)。AML 患者 5 例の診断時白血病患者細胞に sGITR-Fc を添加して 3 日間培養したところ、sGITR-Fc を添加しなかった場合に比べて高濃度の kyn が検出された (sGITR-Fc+; 2.1 μM、GITR-Fc-; 0.2 μM)。

D. 考察

白血病患者細胞は免疫反応の標的となるいくつかの LAAs を発現しているが、LAAs の多くは組織の分化抗原など腫瘍細胞が過剰発現している自己抗原である。自己抗原由来 LAAs に特異的な免疫を誘導するためには、自己抗原に対する末梢性トレランスを破綻させなければならないが、白血病患者細胞は LAAs に対し機能的結合性が高い CTL にアポトーシスを誘導したり、制御性 T 細胞を誘導することによって抗白血病患者免疫からエスケープしている。正常なドナーの T 細胞免疫が移植される allo-SCT 後には、ドナーのナイーブ T 細胞レパトアの中から LAAs に対して機能的結合性の高い CTL が誘導される可能性が高いと考えられるが、移植後 GvL 効果の誘導は十分とは言えない。白血病患者細胞は、細胞表面に抑制性補助刺激分子を発現して宿主の T 細胞免疫を抑制することが知られている。我々は、骨髄性白血病患者細胞および LDC は抑制性補助刺激分子の一つである GITRL を発現しており、GITRL はドナー T 細胞の中から LAAs 特異的 CTL のプライミングを阻害することを報告しているが、今回新たに、sGITRL や GITRL⁺exosome として GITRL⁺白血病患者細胞から細胞外に放出された GITRL は、T 細胞表面上で GITR と結合して T 細胞の活性化を抑制していることを明らかにした。また GITR を含む TNFR スーパーファミリー分子は、レセプターとリガンドの結合によって両方向性にシグナル伝達されることが知られている。GITRL を細胞表面に発現しているマウス形質細胞様樹状細胞 (pDC) では、GITR/GITRL 結合によって細胞内の IDO 活性が上昇し、IDO 活性が高まった pDC によって CD11c^{high}DC の抗原提示能が低下して同種抗原に対する寛容が誘導されることが報告されている。また一部の AML 患者では血清 trp/kyn 比が低下しており、IFN γ 刺激によって AML 細胞内の IDO 活性が亢進することが報告されている。今回の検討では、GITRL⁺白血病患者細胞は、GITR/GITRL 結合によって細胞内の IDO 活性が高まり、trp から代謝された kyn を細胞外に分泌する結果、LAAs 特異的 CTLs の活性化を阻害する可能性が示唆された。以上の結果から、白

血病細胞はGITRLを発現してLAAs特異的CTLの誘導とCTLの活性化を阻害することによって、ドナーの抗白血病免疫からエスケープしている可能性が示唆された。

E. 結論

LAAsを標的としたGvL効果を誘導する目的でallo-SCT後にLAAsをワクチンする際に、抗GITR抗体とIDO阻害剤の投与はGvL効果の誘導を増強する可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita T, Sugimori C, Ishiyama K, Yamazaki H, Okumura H, Kondo Y, Takami A, Nakao S: Cord blood transplantation using minimum conditioning regimens for patients with hematologic malignancies complicated by severe infections. *Int J Hematol* 89:238-242, 2009.
- 2) Takamatsu H, Espinoza JL, Lu X, Qi Z, Okawa K, Nakao S: Anti-moesin antibodies in the serum of patients with aplastic anemia stimulate peripheral blood mononuclear cells to secrete TNF-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* 182:703-710, 2009.
- 3) Sugimori C, Mochizuki K, Qi Z, Sugimori N, Ishiyama K, Kondo Y, Yamazaki H, Takami A, Okumura H, Nakao S: Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. *Br J Haematol* 147:102-112, 2009.
- 4) Shimizu I, Kobayashi H, Nasu K, Otsuki F, Ueki T, Sumi M, Ueno M, Ichikawa N, Nakao S: Successful engraftment of cord blood following a one-day reduced-intensity conditioning regimen in two patients suffering primary graft failure and sepsis. *Bone Marrow Transplant* 44:617-618, 2009.

- 5) Lu X, Ohata K, Kondo Y, Luis Espinoza J, Qi Z, Nakao S: Hydroxyurea upregulates NKG2D ligand expression in myeloid leukemia cells synergistically with valproic acid and potentially enhances susceptibility of leukemic cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Sci*, 2009.
- 6) Ishiyama K, Takami A, Suzuki S, Konaka H, Namiki M, Ooi A, Nakao S: Relationship between tumor-infiltrating T lymphocytes and clinical response after reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for advanced renal cell carcinoma: a single center prospective study. *Jpn J Clin Oncol* 39:807-812, 2009.
- 7) Ikoma T, Kyo S, Maida Y, Ozaki S, Takakura M, Nakao S, Inoue M: Bone marrow-derived cells from male donors can compose endometrial glands in female transplant recipients. *Am J Obstet Gynecol* 201:608 e601-608, 2009.
- 8) Espinoza JL, Takami A, Onizuka M, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Kanda Y, Ohtake S, Fukuda T, Morishima Y, Kodaera Y, Nakao S: NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica* 94:1427-1434, 2009.
- 9) Espinoza JL, Takamatsu H, Lu X, Qi Z, Nakao S: Anti-moesin antibodies derived from patients with aplastic anemia stimulate monocytic cells to secrete TNF-alpha through an ERK1/2-dependent pathway. *Int Immunol* 21:913-923, 2009.

2. 学会発表

- 1) 近藤恭夫, 大畑欣也, 祁志栄, 中尾眞二. 血病

細胞は抑制性補助刺激分子を発現して LAAs 特異的 CTL の誘導を抑制する. 第 71 回日本血液学会総会, 2009 年 10 月 25 日

2) Kondo Y, Katagiri T, Qi Z, Nakao S. GTR Ligation with GTR Ligand On Leukemic Cells Suppresses Induction of Leukemia-Associated Antigen Specific T Cells by Increasing Indoleamine 2, 3-Dioxygenase (IDO) Activity Leading to Kynurenine Secretion. 第 51 回アメリカ血液学会, 2009 年 12 月 7 日

3) 近藤恭夫, ルイス エスピノーザ, 片桐 孝和, 中尾 眞二. GTR-GTR リガンド結合を介した白血病細胞による CTL の抑制: 白血病細胞内インドールアミン酸素添加酵素 (IDO) の関与. 第 32 回日本造血細胞移植学会総会, 2010 年 2 月 20 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

「造血細胞移植後の抗原特異的免疫回復の研究」

研究分担者 高橋 聡 東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・血液腫瘍内科

研究要旨：臍帯血中の T 細胞は、そのナイーブである性格のみならず、多くの場合は HLA 不一致間での移植であるという特徴をもっているが、移植後の免疫再構築動態に HLA 不一致が与える影響に関してはいまだ不明な点が多い。本研究では、臍帯血移植後に高頻度に再活性化し、その感染症は移植後に重要な意味をもつサイトメガロウイルス (CMV) に対する特異的な細胞性免疫の回復に対して HLA 不一致がどのような影響を与えるかについて検討を行った。2006 年から 2008 年に臍帯血移植を受けた 40 名を対象とし、CMV 反応性あるいは特異的 CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞は、CMV 抗原刺激後の細胞内染色法による IFN- γ 産生細胞の検出、および HLA-A0201, -A0206, -A2402 陽性患者においては、CMVpp65 に対するテトラマー法を用いた。解析の結果、臍帯血中に含まれるナイーブ T 細胞は、移植後早期に抗原特異的メモリーおよびエフェクター機能を獲得し、これらは HLA 一致度に影響されないことが示唆された。

A. 研究背景および目的

臍帯血移植後早期において抗原特異的細胞性免疫が再構築されるかという疑問に対する回答は、臨床的および免疫学的観点からみて非常に重要である。サイトメガロウイルス (CMV) 感染症のコントロールは、同種移植後患者の生存率に極めて大きな影響を与え、また、このウイルス感染症の予防には細胞性免疫が重要な役割を果たしていることが判っている。我々は、これまで臍帯血移植後患者における CMV 再活性化と細胞性免疫再構築の動態を解析してきた。これまでの解析結果では、CMV 再構築は移植後 4 ヶ月で高率に達成できることが確認できた。臍帯血移植後患者 31 人中 30 人において CMV 反応性 CD4 陽性 T 細胞が確認された。移植後 1 ヶ月での陽性患者は 55%、2 ヶ月での陽性率は 85%であった。CMV 反応性 CD8 陽性 T 細胞は 31 人中 14 名で陽性となった。臍帯血移植後 1 ヶ月で 14%、2 ヶ月で 22%が陽性となった。骨髄移植後および末梢血幹細胞移植後における陽性率は CD4 陽性 T 細胞では 21 人中 18 人、CD8 陽性 T 細胞では 21 人中 12 人が陽性であった。

臍帯血グラフト中の成熟ナイーブ T 細胞は移植後早期に、抗原特異的なメモリーおよびエフェクター機能を獲得することが示唆された。臍帯血中の T 細胞は、そのナイーブである性格のみならず、多くの場合は HLA 不一致間での移植であるという特徴をもっており、移植後の免疫再構築動態に HLA 不一致が与える影響に関してはいまだ不明な点が多い。本研究では、臍帯血移植後に高頻度に再活性化し、その感染症は移植後に重要な意味をもつサイトメガロウイルス (CMV) に対する特異的な細胞性免疫の回復に対して HLA 不一致がどのような影響を与えるかについて検討を行った。

B. 患者と研究方法

2006 年から 2008 年に臍帯血移植を受けた 40 名を対象とした。これらの患者は、全員 12Gy の全身放射線照射と 120mg/kg のサイトキサンを含んだ前処置とシクロスポリンとメソトレキセートによる GVHD 予防を用いた。

CMV 反応性あるいは特異的 CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞は、CMV 抗原刺激後の細胞内染色法に

よる IFN- γ 産生細胞の検出、および HLA-A0201, -A0206, -A2402 陽性患者においては、CMVpp65 に対するテトラマー法を用いて解析を行った。IFN- γ 産生細胞は 0.03%以上、テトラマーアッセイでは 0.01%以上を陽性とした。

C. 結果および考察

1. 臍帯血移植後早期における抗 CMV 細胞性免疫再構築動態

(1) IFN- γ 産生細胞の検出による CMV 反応性 CD4 陽性 T 細胞

移植後 1 ヶ月目の陽性者は 20/31 (65%)、2 ヶ月目の陽性者は 30/34 (88%)、3 ヶ月目の陽性者は 23/25 (92%)、4 ヶ月目の陽性者は 23/25 (92%)、6 ヶ月目の陽性者は 19/20 (95%) であった。

(2) テトラマー法を用いた CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞

移植後 1 ヶ月目の陽性者は 1/19 (5%)、2 ヶ月目の陽性者は 11/25 (44%)、3 ヶ月目の陽性者は 6/15 (40%)、4 ヶ月目の陽性者は 10/20 (50%)、6 ヶ月目の陽性者は 9/16 (56%) であった。

2. HLA 一致度と抗 CMV 細胞性免疫再構築動態との関連

(1) HLA-DR の一致度と CMV 反応性 CD4 陽性 T 細胞血清型あるいはアリル型を用いた HLA 一致度と陽性細胞頻度 (%) あるいは陽性細胞数 (個/mL) との間に相関関係は認めなかった。

(2) HLA-A および B の一致度 (血清型・アリル型) と CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞血清型あるいはアリル型を用いた HLA 一致度と陽性細胞頻度 (%) あるいは陽性細胞数 (個/mL) との間に相関関係は認めなかった。

3. 抗 CMV 細胞性免疫再構築動態が臨床成績に与える影響

(1) CMV 抗原血症

CMV 反応性 CD4 陽性 T 細胞および CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の回復と CMV 抗原血症との間に相関関係は認めなかった。

(2) CMV 感染症

解析症例において、観察期間中に CMV の感染症は発症しなかった。

D. 結論

臍帯血中に含まれるナイーブ T 細胞は、移植後早期に抗原特異的メモリーおよびエフェクター機能を獲得し、これらは HLA 一致度に影響されないことが示唆された。

E. 倫理面への配慮:

研究参加は自由意思によるものであること、研究の全ての過程でプライバシーは厳重に守られること、等などについて説明を行ったうえで同意を得て、解析を行った。

F. 研究危険情報

特になし

G. 発表

- 1) Takahashi S, M. Ishige, N. Watanabe, T. Yamaguchi, J. Ooi, N. Tsukada, S. Kato, A. Sato, F. Monma, R. Yamazaki, A. Fujita, N. Toki, H. Tanaka, T. Uehara, K. Fujimaki, K. Oshima, Y. Aisa, K. Motohashi, R. Hyo, Y. Najima, H. Kanamori, Y. Nannya, R. Sakai, S. Takada, T. Kobayashi, T. Hoshino, K. Matsumoto, K. Hideyuki, J. Kato, A. Yokota, N. Nakamura, M. Tanaka, T. Mori, H. Sakamaki, S. Okamoto on behalf of Kanto Study Group for Cell Therapy (KSGCT). Prospective analysis for antigen-specific cellular immune reconstitution after cord blood transplantation: immune response to CMV is not affected by HLA disparity. Bone Marrow Transplant. 43: S105, 2009. (Abstr. #959)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

「母児間免疫寛容に立脚した HLA 不適合造血幹細胞移植の 臨床試験体制の確立と適正運用に関する研究」

研究分担者 一戸 辰夫 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科

研究要旨：妊娠中の臍帯血を介する体細胞の交流や、授乳などの機序を介して、子供は非遺伝母組織適合性抗原（non-inherited maternal histocompatibility antigens, NIMA）に対する免疫寛容を獲得することが知られている。また同様に一部の母親は妊娠中に曝露される配偶者由来組織適合性抗原（inherited paternal histocompatibility antigens, IPA）に対する免疫低応答性を獲得していることが示唆されており、HLA 不適合造血幹細胞移植においては、母子間免疫寛容を考慮したドナー選択を行うことにより移植成績の改善がもたらされる可能性がある。本年度は、このような母子間免疫寛容に立脚した HLA 不適合造血幹細胞移植の安全性・有用性の確立を目指し、母子間免疫寛容の成立を検出するためのアッセイ法の探索を行うとともに、低用量抗胸腺細胞免疫グロブリンを移植前処置に用いた新たな臨床試験の計画に着手した。

A. 研究の背景と目的

難治性造血器腫瘍の治療成績向上を目的として、分子標的治療薬や腫瘍抗原を標的とするペプチドワクチンなど毒性の低い新規治療法がすでに実用化されているにもかかわらず、同種造血幹細胞移植への需要は依然として増加の一途を辿っている。1990年代以降の公的な造血幹細胞バンクの整備を背景とする非血縁者間造血幹細胞移植の急速な普及は、これらの需要に対する最終的な解決をもたらすものと期待されているが、質の高い造血幹細胞バンクの維持には多くの経費と人的資源の持続的な確保が必要であり、その将来に向けて運営規模の適正化が課題とされている。

非血縁造血幹細胞バンクの利用が困難な場合、最も有力な代替幹細胞ソースは親子・同胞のような HLA ハプロタイプの一組を共有する HLA 部分不適合血縁者である。歴史的には生着不全や重篤な移植片対宿主病（graft-versus-host disease, GVHD）の出現が極端とされてきたが、最近では、抗体医薬品を用いた *in vivo* T 細胞除去技術や、移植後の免疫抑制法の強化などを通じて、HLA 部

分不適合血縁者をドナーとする造血幹細胞移植の成績も HLA 一致血縁者に劣らないレベルまで向上し得ることを示唆する報告もなされるに至っている。

研究分担者らは妊娠中の母子間に成立する双方向性の免疫学的低応答性が一部の個体においては、妊娠の終了後にも長期間持続するという現象に着目し、HLA 部分不適合血縁者間における「非遺伝母組織適合性抗原（non-inherited maternal histocompatibility antigens, NIMA）」や「配偶者由来組織適合性抗原（inherited paternal histocompatibility antigens, IPA）」に対する獲得免疫寛容の存在を前提とする新たなドナー選抜法の開発を試みてきた。しかし、これまでの研究により、獲得維持されている母子間免疫寛容の程度には個体差が存在し、それらの相違が一部の母子間移植例に出現する GVHD の重篤化に関与している可能性が示唆されているため、本年度は NIMA や IPA に対する寛容を検出するアッセイ法の開発可能性を探索するための文献的調査を行った。

B. 研究方法

PubMed を用いて、”maternal-fetal histocompatibility [MeSH] or maternal antigens” x “immune tolerance [MeSH] or transplantation tolerance [MeSH]” 等の用語入力により、2008 年 1 月から 2009 年 12 月までに発表された関連論文の検索を行った。

C. 研究結果

ヒト末梢血を用いて NIMA あるいは IPA に対する免疫寛容の評価を試みている 2 つの報告を抽出した。

1) 末梢血単核球分画を用いた混合白血球反応 (Mold らの方法)

カリフォルニア大学サンフランシスコ校の Mold らは、7 歳から 17 歳の被験者に由来する PBMCs を CFSE で標識し、その母親あるいは父親の PBMCs から分離した CD3 陰性 CD56 陰性分画を抗原提示細胞 (antigen presenting cells, APCs) に用いて、混合白血球反応による T 細胞増殖応答の評価を試みた (Mold JE, *et al.* Science 2008;322:1562)。その結果、APCs が母親由来の場合には父親由来の場合と比較して、増殖応答の抑制が認められる傾向が観察された。しかし、被験者の PBMCs から CD25 陽性細胞を除去した場合には、そのような抑制傾向は観察されなかった。同様に、母親あるいは父親から採取した PBMCs をその子供由来の APCs と反応させると、両者間で CD8 陽性 T 細胞の増殖応答に大きな相違は観察されなかったが、CD25 陽性細胞を除去した場合には、母親由来 CD8 陽性 T 細胞の増殖応答が亢進する傾向が観察された。

2) 末梢血単核球分画を用いた trans-vivo 遅延型過敏症反応 (van Halteren らの方法)

ライデン大学の van Halteren らは、HLA-A2 を共有し、マイナー組織適合性抗原 HA-1, HA-2, HA-8 のいずれかに相違のある 17 組の母子ペア (うち 16 組が男児を含む) から採取した末梢血単核球分画 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)

を用いて、H-Y 抗原並びにこれらのマイナー抗原に反応する CD8 陽性 T 細胞の検出と機能解析を試みた (van Halteren AG, *et al.* Blood 2009; 114:2263)。マイナー抗原特異的な HLA テトラマーを用いた解析では、それらで強く染色される bright 分画と弱く染色される dim 分画を区別することが可能であり、前者は主に細胞傷害性 T 細胞を含んでおり、後者は CD8 陽性の制御性 T 細胞群を含んでいることを示す結果が得られた。ここで、制御性 T 細胞の検出に用いられている方法が van Buskirk らによって開発された trans-vivo delayed-type hypersensitivity (DTH) と呼ばれるアッセイである (Carrodegua L, *et al.* Hum Immunol 1999; 60:640)。Trans-vivo DTH は、特定の抗原に対するヒト T 細胞応答の検出法で、具体的には、破傷風トキソイド・ジフテリアトキソイドと混合した抗原ペプチド (または精製抗原) を被験者の PBMCs あるいは T 細胞分画とともに免疫不全マウスのフットパッドに投与し、24 時間後に肉球に生じる腫脹の程度により、当該抗原に対する免疫応答の強度を半定量的に評価するというものである。彼らの検討では、4 名の母親と 5 名の息子において、お互いの不一致マイナー抗原に対する制御性 T 細胞活性の存在を検出することが可能であった。

D. 考察

Mold らの報告は、これまでマウスモデルを用いて得られていた結果と同様に、ヒトにおける NIMA 寛容も NIMA 応答性の CD4 陽性 CD25 陽性制御性 T 細胞群に依存的に維持されていることを示したものと考えられる。また、van Halteren らの報告から、母親側にも妊娠を介して IPA 特異的な細胞傷害性 T 細胞のみならず、IPA に対する免疫応答を負に制御する細胞群が誘導されていることが推測される。したがって、移植前にドナーの NIMA や IPA への寛容を評価するためには、これらの抗原に対する同種免疫応答を負に制御する細胞群をより簡便に検出する方法の開発が必要と考えられた。また、そのようなアッセイの妥当性を評価す

るためには、実際の移植結果との照合が不可欠であり、現在、低用量の抗胸腺細胞免疫グロブリン(ATG)を前処置に組み込んだ新たな母子間・NIMA相補的同胞間移植臨床試験の実施を計画中である。

E. 結論

末梢血を利用したNIMAあるいはIPAに対する免疫寛容の評価法に関する文献的な検討を行った。Trans-vivo DTHと比較し、CFSE標識PBMCsを用いた混合白血球反応は比較的簡便に実施可能であり、今後、結果の再現性を検証する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

特記すべき内容はない。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Kanda J, Ichinohe T, Shimazaki C, Hamaguchi M, Watanabe A, Ishida H, Yoshihara T, Morimoto A, Uoshima N, Adachi S, Inukai T, Sawada A, Oka K, Itoh M, Hino M, Maruya E, Saji H, Uchiyama T, Kodera Y. Long-term survival after HLA- haploidentical SCT from noninherited maternal antigen- mismatched family donors: impact of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 44(5): 327-329, 2009.
- 2) Kanda J, Ichinohe T, Matsuo K, Benjamin RJ, Klumpp TR, Rozman P, Blumberg N, Mehta J, Sohn SK, Uchiyama T. Impact of ABO mismatching on the outcomes of allogeneic related and unrelated blood and marrow stem cell transplantations for hematologic malignancies: IPD-based meta-analysis of cohort studies. *Transfusion.* 49(4):624-635, 2009.
- 3) Ueda Y, Marusawa H, Ichinohe T, Kadowaki N, Uchiyama T, Chiba T. Effective treatment for de novo hepatitis B with nucleotide analogue

in patients with hematological malignancies. *Am J Hematol.* 84(5): 315-316, 2009.

- 4) Mizumoto C, Kanda J, Ichinohe T, Ishikawa T, Matsui M, Kadowaki N, Kondo T, Imada K, Hishizawa M, Kawabata H, Nishikori M, Yamashita K, Takaori-Kondo A, Hori T, Uchiyama T. Mycophenolate mofetil combined with tacrolimus and minidose methotrexate after unrelated donor bone marrow transplantation with reduced-intensity conditioning. *Int J Hematol.* 89(4): 538-545, 2009.
- 5) Kanda J, Mizumoto C, Kawabata H, Ichinohe T, Tsuchida H, Tomosugi N, Matsuo K, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T. Clinical significance of serum hepcidin levels on early infectious complications in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 15(8):956-962, 2009.
- 6) Kanda J, Ichinohe T, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Ichiyama S, Uchiyama T. Impact of discontinuing fluoroquinolone prophylaxis after allogeneic marrow or peripheral blood SCT with myeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant.* Epub 2009 Dec 7.
- 7) Kanda J, Mizumoto C, Ichinohe T, Kawabata H, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Takakura S, Ichiyama S, Uchiyama T, Ishikawa T. Pretransplant serum ferritin and C-reactive protein as predictive factors for early bacterial infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* (in press)

学会発表

- 1) Kanda J, Ichinohe T, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Ichiyama S, Uchiyama T.

Reappraisal of bacterial prophylaxis in allogeneic marrow or peripheral blood stem cell transplantation after myeloablative conditionings. 35th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Göteborg, Sweden, March 29-April 1, 2009.

- 2) Sato T, Ichinohe T, Kanda J, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T. Clinical significance of severity and subcategory of chronic GVHD evaluated by NIH consensus criteria. 51st Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, LA, USA, December 5-8, 2009.
- 3) Ichinohe T, Kanda J, Maruya E, Ishimaru F, Hirata Y, Matsuo K, Kawase T, Morishima Y, Saji H. Clinical significance of preformed antibodies against HLA and MICA in recipients of unrelated bone marrow transplantation: a case-control study. 36th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Vienna, Austria, March 21-24, 2010.

H. 知的財産権の出願状況

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

分担研究報告書

「血縁者間 HLA 半合致ミニ移植の有用性の研究」

研究分担者 小川 啓恭 兵庫医科大学 内科学講座血液内科 教授

研究要旨：T細胞非除去 HLA 半合致ミニ移植に関して、多施設共同で前方向臨床試験を行った。この移植法の安全性と有用性が示されれば、同種造血幹細胞移植において、ドナーの問題がほぼ解消されることになる。生着を主要評価項目とする第 I 相試験では、10 例全員が生着を果たし、十分満足の得られる結果であったので、現在、100 日時点での生存を主要評価項目とする第 II 相試験に進んでいる。現在までのところ、重篤な有害事象は認められておらず、少なくとも安全性に関しては、問題ないものと考えられる。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、化学療法抵抗性の悪性血液疾患患者を治癒に導く唯一の治療法である。しかし、移植を必要とする患者で、HLA 適合同胞が存在するのは、25%程度に過ぎず、さらに昨今の少子化の影響もあり、今後、ますます血縁で HLA 適合ドナーが見つかる可能性は低くなると考えられる。このドナー不足を補うため、骨髄バンクや臍帯血バンクが設立されているが、それぞれ、ドナーのコーディネート期間が長い、拒絶の頻度が高いといった問題点が存在する。

一方、HLA が半分だけ合っているドナー（HLA 半合致ドナー）は、ほぼ血縁内に存在するので、このような HLA 半合致ドナーからの移植が安全に施行可能になると、同種移植においてドナーの問題が解消されることになる。一方、HLA 半合致移植の問題点は、移植後の移植片対宿主病（graft-versus-host disease=GVHD）などの移植関連毒性である。

近年、GVHD の発生 mechanism に関して、移植前後に発生する cytokine storm が、GVH 反応の増幅因子として、重要であることが Ferrara などの研究により、明らかにされている。そこで、私共は、移植前処置の強度を軽減し、炎症性 cytokine の発生を抑えると同時に、移植前後に抗ヒト T リンパ

球抗体と少量のステロイド剤を投与することによって、さらに免疫反応を抑える移植法、即ち、HLA 半合致ミニ移植を開発した。26 例の悪性血液疾患患者に対して、2-3 抗原不適合の HLA 半合致ミニ移植を行ったところ、生着率 96.2%、II 度以上の重症 GVHD の発症率 20%、3 年の event-free survival 55%と極めて良好な成績を得た。本研究の目的は、多施設共同の前方向で、血縁者間 HLA 半合致ミニ移植（第 I/II 相試験）を実施することによって、この HLA 半合致ミニ移植療法が、本邦において、普遍的な治療となり得るかどうかを検証することである。

B. 研究方法

対象：35 歳以上 60 歳以下（18-35 歳未満でも、臓器障害、感染症の既往、自家または同種造血幹細胞移植を受けたなどの理由により、骨髄破壊的前処置による移植の適応とならない症例を含む）で、予後不良の造血器悪性疾患（急性白血病、悪性リンパ腫、骨髄異形成症候群、慢性骨髄性白血病）で、通常と同種移植の適応となる患者。HLA1 抗原不適合までの血縁ドナーが存在しないこと、かつ骨髄バンクで、HLA-DR の allele 検査で 1 座不適合までのドナーが見つからないか、ドナーコーディネートを待つ時間的余裕のない患者。

方法：移植前処置は、fludarabine 30 mg/m² x 6 (day -10 から day -5)、busulfan 4 mg/kg x 2 (day -6 と day -5)、抗ヒト T リンパ球抗体 (ゼットブリン) 2 mg/kg x 4 (day -4 から day -1) を投与する。GVHD 予防は、FK506 と methylprednisolone 1 mg/kg で行った。患者と HLA のハプロタイプを共有し、かつ GVH 方向で 2-3 抗原不適合のドナーを用いた。G-CSF で動員した末梢血幹細胞をドナーから採取し、凍結することなく、day 0 と day 1 に移植した。

主要評価項目：

第 I 相試験では、移植後 35 日以内の生着とし、第 II 相試験では、移植後 100 日時点での生存率とした。

副次的評価項目：

1) 急性 GVHD の頻度と重症度、2) 慢性 GVHD の頻度と重症度、3) 移植後 1 年時点での生存率、4) 移植後 1 年時点での無病生存率、5) 移植後 1 年以内の治療関連死、6) 感染症 (細菌、真菌、ウイルスなど) の発生頻度、7) 移植後の免疫回復

倫理面への配慮：

移植プロコールは、兵庫医科大学倫理委員会承認 (平成 17 年 10 月 18 日) を受けた後、厚生労働省の班研究 (小寺班、谷口班) として、進めている。ドナーとレシピエントに対するインフォームドコンセントの取得に関しては、下記の内容について口頭と文書による説明を行った。

- 1) 治療内容の説明
- 2) 試験への参加は自由意思に基づくこと
- 3) 本治療の代替治療法
- 4) プライバシーの保護

C. 研究結果

第 I 相試験 (10 例) では、主要評価項目の生着に関して、顆粒球系細胞は全例において速やかに完全キメラとなった。T 細胞の chimerism に関して、1 例で混合キメラになったが、免疫抑制剤を中止することで、完全キメラに導入できた。ほとんどの例で、サイトメガロウイルス抗原血症が観察されたが、サイトメガロウイルス感染症は発生

しなかった。急性 GVHD を 5 例に認めたが、II 度以上は 2 例であった。10 例全例が 100 日以上生存した。

第 II 相試験は、現在までに 8 例の登録があり、試験が進行中である。

D. 考察

HLA 半合致 (GVH 方向 2-3 抗原不適合) ドナーからの移植は、前処置の強度を軽減し、抗ヒト T リンパ球抗体と少量のステロイド剤を GVH 予防に用いることにより、移植片から T 細胞を除かなくても、安全に移植が施行可能であることを示す結果が得られつつある。まず、生着に関して、第 I 相試験で、10 例全例でドナー由来の生着が得られたことから、HLA 半合致ミニ移植の本治療レジメンで生着が安定して得られることが確認された。急性 GVHD に関しては、発症率は 50%程度であり、重症の GVHD は 20%程度であることから、非血縁者間骨髄移植に比べて、大差ないものと考えられたが、この点に関しては、第 II 相予定の 25 例と合わせて、評価することとしている。抗ヒト T リンパ球抗体を前処置に使用することから、移植後の免疫不全が心配されたが、重篤なウイルス感染症はなく、サイトメガロウイルス感染症も、現在のところ観察されていない。他の重症感染症に関しては、第 II 相試験の結果と合わせて、解析する予定にしている。第 I 相試験の 10 例全例が 100 日生存を果たしたことから、移植関連死亡が少なく、HLA 半合致とは言え、許容される治療法であることが強く示唆された。

E. 結論

血縁者 HLA 半合致ミニ移植の第 I 相試験の結果は、生着率 100%と良好なものであった。引き続き、第 II 相試験において、この移植法の有用性につき、詳細な解析を行う。

F. 健康危険情報

第 I 相試験 10 例の内、5 例は死亡に至ったが、その内、4 例は原疾患の再発によるものであり、

残りの1例は、カリニ肺炎であったことから、現在のところ、本治療法に伴う特記すべき有害事象は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satake A, Inoue T, Kubo S, Taniguchi Y, Imado T, Fujioka T, Horiuchi M, Xu Y, Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Tamaki H, Okada M, Okamura H, Ogawa H. Separation of antileukemic effects from graft-versus-host disease in MHC-haploidentical murine bone marrow transplantation: participation of host immune cells. *International Journal of Hematology*, in press.
- 2) Tamaki H, Yoshihara S, Fujioka T, Kawakami M, Oka Y, Ogawa H. Molecular detection of AML1-MTG8-positive cells in peripheral blood from a patient with isolated extramedullary relapse of t(8;21) acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 23; 424-426, 2009.
- 3) Kuwatsuka Y, Miyamura K, Suzuki R, Kasai M, Maruta A, Ogawa H., Tanosaki R, Takahashi S, Koda K, Yago K, Atsuta Y, Yoshida T, Sakamaki H, Kodera Y. Hematopoietic stem cell transplantation for core binding factor acute myeloid leukemia: t(8;21) and inv(16) represent different clinical outcomes. *Blood*, 113; 2096-2103, 2009.

2. 学会発表

- 1) The 36th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2010. 3.21-24, Vienna. Ikegame K, Yoshihara T, Kaida K, Taniguchi K, Kato R, Nakata J, Okada M, Tamaki H, Taniguchi Y, Fujioka T, Satake A, Inoue T, Ogawa H. Unmanipulated haploidentical stem cell transplantation

using myeloablative or reduced-intensity preconditioning regimen.

- 2) The 14th congress of the European Hematology Association, 2009.6, Berlin. Kato R, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Fujioka T, Taniguchi Y, Kaida K, Inoue T, Ogawa H. Frequent monitoring of Wilms' tumor gene (WT1) expression levels in peripheral blood for early diagnosis of acute leukemia relapse after allogeneic stem cell transplantation.
- 3) 池亀和博、海田勝仁、吉原 哲、加藤るり、中田 潤、谷口享子、井上貴之、佐竹敦志、藤岡龍哉、谷口裕紀、岡田昌也、玉置広哉、高塚広行、沖川佳子、中島利幸、小川啓恭、Our experience of multiple (three times and more) allogeneic stem cell transplantation、第71回日本血液学会学術集会、京都、2009年10月25日
- 4) 藤岡龍哉、加藤るり、中田 潤、井上貴之、海田勝仁、佐竹敦志、谷口享子、吉原 哲、谷口裕紀、池亀和博、玉置広哉、岡田昌也、小川啓恭、同種造血細胞移植後の急性GVHDと制御性T細胞の動態との関連性-HLA半合致移植を中心とした解析、第71回日本血液学会学術集会、京都、2009年10月25日
- 5) 海田勝仁、井上貴之、池亀和博、岡田昌也、吉原 哲、谷口享子、中田 潤、加藤るり、佐竹敦志、藤岡龍哉、玉置広哉、相馬俊裕、小川啓恭、同種造血細胞移植後における血清可溶性IL-2受容体レベルによる急性GVHDのモニタリング、第32回日本造血細胞移植学会総会、浜松、2010年2月19日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表