

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)  
新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究  
平成 20 年度～21 年度総合研究報告書

「新しい骨髄移植方法の安全性と有効性に関する研究」

研究分担者 一戸辰夫 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学  
研究協力者 三浦康生 大阪赤十字病院 血液内科

**研究要旨：** 灌流法により採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植法では、従来の経静脈的骨髄移植法を用いた場合と比較して間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells, MSC)の骨髄への生着が促進されることによって、移植後に出現する組織障害や免疫学的合併症が軽減することが期待されている。本研究の初年度には、MSC の骨髄内移植によって期待される有効性を薬理学的的方法によって増強することを目的として、実際の臨床使用が考慮可能な薬剤の中から MSC の機能を賦活化する物質を探索することを試みた。正常ヒト骨髄由来 MSC の *in vitro* における骨形成能を指標として検討を行った結果、エリスロポエチンが MSC の機能の賦活化を促進することが判明した。今後、このような薬理的な MSC の機能賦活化が実際の造血幹細胞移植後の合併症の軽減化にどのように寄与し得るかを明らかにするため、動物モデルを用いてさらなる検討を行っていく必要がある。

また灌流法によって採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植法では、従来型の骨髄移植法と比較して GVHD 発症リスクの低下が期待されることから、現在その HLA 不一致血縁者間移植への応用が検討されている。しかし、レシピエントが HLA 抗体を有する場合における生着不全のリスクに関しては、現在指標となる知見が得られていない。そこで日本骨髄移植推進財団の検体保存事業に提供された試料を利用して、レシピエントが移植前に保有する HLA 抗体が従来型骨髄移植後の生着不全に及ぼす影響の検討を試みたところ、ドナー側不一致抗原との反応性を有さない HLA 抗体の存在は、生着不全発症への寄与危険度が低いことが判明した。一方、今回の検討では、ドナー抗原に反応する HLA 抗体が生着不全に与える影響を評価することは困難であったため、灌流法により採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植法の臨床応用を目指す場合、当面は host-versus-graft 方向の HLA 抗体を保有しない例を適格とする方針が妥当と考えられた。

**A. 研究の背景と目的**

世界諸地域の中で最も早く「超高齢社会」の到来を迎えたわが国では、今後しばらくの間、骨髄性白血病・悪性リンパ腫など中高年期以降に好発する難治性造血器悪性腫瘍の粗罹患率が経年的に増加していくことが推測されて

いる。これらの疾患の多くは既存の化学療法のみでは長期生存が困難である上に、生活習慣への介入などによる予防可能性も知られていないため、医療資源に持続的負荷を与えていくことが予測され、分子標的薬などの新規薬剤の導入による治療法の革新が待望されてい

る。一方、長期生存が目指される場合には、現時点においても同種造血幹細胞移植が有力な治療手段であり、実際、1990 年後半以降、プリンアナログを用いた前処置法の普及を通じて、移植適応年齢の上限も 60-70 歳程度にまで拡大されている。また、移植に対するニーズの増大に対応するために幹細胞ソースも多様化し、臍帯血移植や HLA 複数抗原不一致血縁者からの造血幹細胞移植が行われるようになってきている。しかしながら、このような移植適応の拡大に伴う帰結として、前処置関連死亡、生着不全、重篤な移植片対宿主病 (GVHD) などの移植後合併症への危惧がますます重要な問題として認識されるに至っており、臨床現場においては、より安全性の高い移植方法の開発が切実に希求されている。このような中で、池原らによって確立された「灌流法により採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植」は大型実験動物の系においては、早期の造血回復や GVHD の軽減効果もたらされることが示されており、そのヒトへの臨床応用が期待されている。

灌流法によって採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植法では、同所性に造血幹細胞と間葉系幹細胞 (以下 MSC) が移植されるというユニークな特徴を有している。MSC は多分化能を示す組織幹細胞であるが、その経静脈的投与により同種造血幹細胞移植後の生着が促進される事や難治性急性 GVHD に伴う臓器障害が改善する事が、最近、ヒトを対象とする臨床試験において示されている。また、マウス放射線モデルにおいては、MSC が腸管粘膜などの臓器障害の改善に関与するという知見も得られている。このような背景から、本分担研究では、骨髄内骨髄移植の実施に際して MSC を薬理的に機能賦活する事によって、

移植前処置に伴う臓器障害や GVHD、生着不全などの合併症の発症を抑制することが可能となり、安全かつ有効な同種移植が施行できるのではないかと仮説に基づき、既存の臨床で使用されている薬物の中から MSC を機能賦活する候補物質を探索することを試みた。

また、このような灌流法による骨髄採取と骨髄内骨髄移植を組み合わせた新しい造血幹細胞移植の臨床応用に向け、移植片の生着効率に影響を与え得る因子として、レシピエントが移植前に有する HLA 抗体の臨床的意義についても検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

以下の研究のうち動物を対象とする実験は、実験実施機関における動物実験倫理規定を遵守して行われた。また骨髄移植推進財団の保存検体を用いた研究は、文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」(平成 20 年 12 月 1 日改正版)に準拠して実施された。

## B. 研究方法

### 1) マウスモデルを用いた *in vivo* での MSC 機能の評価および EPO 刺激による MSC 機能賦活の検討

骨髄由来 MSC の *in vitro* での培養方法は既報 (Miura Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 14022) の如く行った。また、マウスモデルを用いた MSC の骨組織形成能 (分化能) ならびに骨髄組織誘導能の *in vivo* での機能評価を既報 (Miura Y, et al. Stem Cells 2006; 24: 2428) に基づいて行った。

次いで MSC の機能賦活物質としてエリスロポイエチン (EPO) が関与している可能性

を想定し、ヒト MSC における EPO レセプター (EPO-R) の発現をフローサイトメトリー法 (FCM) およびウエスタンブロットィング法 (WB) により検討した。メッセンジャーRNA の発現は RT-PCR 法により検討した。MSC を 0.1 U/ml の濃度のリコンビナントヒト EPO (rhEPO) で刺激し、STAT5 のリン酸化を指標として細胞内シグナル伝達経路について検討した。さらに EPO で刺激された MSC の間葉系幹細胞マーカーの発現を FCM で検討し、さらに先のマウスモデルを用いてヌードマウス皮下に移植することにより *in vivo* での骨組織形成および骨髄組織誘導を検討した。

## 2) HLA 抗体が骨髄移植片の生着に与える影響の検討

1995 年 9 月から 2001 年 3 月まで日本骨髄移植推進財団の検体保存事業に提供された試料(血漿)を利用して、レシピエントが移植前に保有する HLA 抗体が非血縁者間骨髄移植後の生着不全に及ぼす影響を後方視的コホート内症例対照研究によって検討した。

生着不全群としては、移植後 21 日以上生存が得られているにもかかわらず移植片の生着が一度も確認できなかった例、あるいは一時的に生着が確認されたにもかかわらず移植後 100 日以内に二次生着不全を来たした例を選択した(79 例)。また、その対照群としては、移植後 21 日以上生存し、生着不全を来たさなかった群の中から、年齢階級・原疾患・HLA 適合性・移植細胞数の 4 項目をマッチングさせた例を症例:対照比 1:3 となるように無作為に抽出した(229 例)。これらの移植例を対象として移植前のレシピエント血漿中に存在する HLA 抗体の有無およびその抗原特異性を蛍光ビーズ法で評価し、HLA 抗体保有

者の非保有者に対する生着不全発症の相対危険度(オッズ比)をロジスティック回帰モデルを用いて検討した。

## C. 研究結果

### 1) EPO 刺激は MSC の機能を賦活する。

ヒト MSC の一部の分画は EPO-R を発現し、EPO 刺激により *in vitro* で STAT5 のリン酸化の亢進が認められた。MSC を EPO で刺激する事により STRO-1 や MUC18、ALCAM-1 といった間葉系幹細胞マーカーの発現が増強したが、これらの細胞を担体と混和し、ヌードマウスの皮下に移植すると、MSC による *in vivo* での骨形成が促進されるとともに、骨周囲に誘導される骨髄組織の形成も促進された。骨及び骨髄組織の形成は MSC を EPO-R や STAT5 に対する siRNA で前処理する事により抑制された。以上から EPO 刺激により MSC は機能的に賦活され骨形成能および骨髄誘導能は増強すること、そのメカニズムとして EPOR/STAT5 シグナル伝達経路が一部関与していることが判明した。

### 2) 移植前レシピエントが保有する HLA 抗体はドナー抗原との反応性を有さない場合には生着不全のリスクに対して中立的である。

解析対象となった症例群の移植前血漿における HLA 抗体を蛍光ビーズ法で測定したところ、クラス I 抗体の保有者は生着不全群 14 例(18%)、対照群 41 例(18%)、クラス II 抗体の保有者は生着不全群 2 例(3%)、対照群 12 例(5%)と両群間で HLA 抗体保有者の頻度に有意な差は認められなかった。また、生着不全についての相対危険度はクラス I 抗体が 1.03 (95%CI 0.53-2.02;  $p=0.93$ )、クラス II 抗体が 0.46 (95% CI, 0.10-2.14;  $p=0.32$ )といずれも有

意な影響を認めなかった。なお、ドナー反応性 HLA 抗体の保有者は生着不全群には見出されず、対照群の 1 例において見出されたのみであった。

#### D. 考察

MSC は骨芽細胞へ分化することにより骨形成に関与するが、骨芽細胞は骨表面に存在し、造血幹細胞の骨髓内での存在部位である HSC ニッチの構成細胞であることが明らかとなっている。つまり MSC は生体内で造血幹細胞ニッチの制御を介して造血機能に関与する可能性が示唆されている。また、近年、培養増幅した MSC を同種移植後に全身投与する事によって血球生着の促進や急性 GVHD の抑制が期待可能であることが報告されており、MSC の細胞治療ソースとしての有用性が示されつつある。これらの知見の重要性は、灌流法による骨髓採取(=MSC の採取効率の向上)と骨髓内骨髓移植(=MSC の骨髓内への生着の向上)の組み合わせという MSC の生物学的特質を最大限に期待できる移植技術においてさらに高まるものと考えられる。本研究の結果、EPO が MSC の機能を賦活する事が明らかとなったが、実際の同種造血幹細胞移植において、移植後の EPO の投与が MSC を介する生着の促進や急性 GVHD の軽減といった治療上の有益性をもたらす得るかに関しては、今後 *in vivo* モデルを用いて検討を行っていくことが必要である。

一方、近年では HLA 不一致血縁者間移植や非血縁者間臍帯血移植の実施機会の増加に伴い、造血幹細胞移植においてもレシピエントが保有する HLA 抗体が移植片の生着に負の影響を与える可能性を示唆する報告が徐々に蓄積されつつある。最近では、米国骨

髄バンク(National Marrow Donor Program, NMDP)を介する非血縁者間移植における症例対照研究が行われ、生着不全群においては対照群と比較してドナー特異的な HLA クラス I あるいはクラス II に対する HLA 抗体が検出される頻度が高く、特にドナー HLA-DP に対するクラス II 抗体の存在が生着不全のリスクの増加に強く関連していたことが報告されている。本研究の結果から、わが国における HLA-A, -B, -DR 適合非血縁者間骨髓移植においては、HLA 抗体が拒絶に関与している事例は希少であることが判明したが、今後 HLA 不適合ドナーからの骨髓内骨髓移植の臨床応用に際しては、ドナーの選択時にレシピエントの HLA 抗体のスクリーニングを抗原特異性まで含めて実施しておくことが必須であると思われる、当面、*host-versus-graft* 方向の HLA 抗体を保有しない例を適格とする方針が妥当と考えられた。

#### E. 結論

- 1) EPO は *in vitro* の系において MSC を薬物的に機能賦活する事が確認された。
- 2) 本邦で実施されている非血縁者間骨髓移植を対象とする検討の結果、ドナー・レシピエント間で HLA-A, -B, -DR が適合している場合、移植前のレシピエントが保有する HLA 抗体の骨髓移植片生着不全に対する寄与危険度は低いものと推測された。一方、今回のコホートにおいては、ドナー抗原に反応する HLA 抗体が生着不全に与える影響を評価することは困難であったため、灌流法により採取された骨髓を用いた骨髓内骨髓移植法の実施時には、当面、ドナー特異的な HLA 抗体を保有しない例を適格例とする方針が妥当と考えられた。

なお、平成 20 年度の研究は、米国立保健研究所(National Institutes of Health, USA)ならびに米国南カリフォルニア大学(University of Southern California)において S. Shi 博士ならびに T. Yamaza 博士の指導の下に実施された。また平成 21 年度の研究は、日本骨髄移植推進財団データ・試料管理委員会の承認を受け、東海大学・鬼塚真仁博士、NPO HLA 研究所・佐治博夫所長、岡山赤十字血液センター・石丸文彦博士の協力によって実施された。報告の最後にあたり、全ての研究協力者への深謝の意を表すものである。

#### 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(研究分担者)

- 1) Muramatsu H, Kimura S, Ichinohe T, Ashihara E, Ishikawa T, Maekawa T, and Uchiyama T. Consulting clinic for related family donors in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2008;**41**:1073-1075.
- 2) Saito T, Yoshioka S, Iinuma Y, Takakura S, Fujihara N, Ichinohe T, Ishikawa T, Uchiyama T, Ichiyama S. Effects on spectrum and susceptibility patterns of isolates causing bloodstream infection by restriction of fluoro-quinolone prophylaxis in a hematology-oncology unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; **27**:219-216.
- 3) Aoyama K, Koyama M, Matsuoka K, Hashimoto D, Ichinohe T, Harada M, Akashi K, Tanimoto M, Teshima T. Improved outcome of allogeneic bone marrow transplantation due to breast-feeding -induced tolerance to maternal antigens. *Blood* 2009;**113**:1829-1833.
- 4) Kanda J, Ichinohe T, Matsuo K, Benjamin RJ, Klumpp TR, Rozman P, Mehta J, Sohn SK, and Uchiyama T. Impact of ABO mismatching on the outcomes of allogeneic related and unrelated blood and marrow stem cell transplantations for hematologic malignancies: Individual patient data-based meta-analysis of cohort studies. *Transfusion.* 2009;**49**:624-635.
- 5) 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, and Uchiyama T. Mycophenolate mofetil combined with tacrolimus and minidose methotrexate after unrelated donor bone marrow transplantation with reduced-intensity conditioning. *Int J Hematol.* 2009; **89**: 538-545.
- 6) Kanda J, Ichinohe T, Shimazaki C, Hamaguchi M, Watanabe A, Ishida H, Yoshihara T, Morimoto A, Uoshima N, Adachi S, Takeshi Inukai T, Sawada A, Oka K, Itoh M, Masayuki Hino M, Etsuko 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.* 2009;**44**: 327-329.
- 7) 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.* 2009; **84**: 315-316.
- 8) 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.* 2009;**15**:956-962.

- 9) Kanda J, Ichinohe T, Saito T, Kouhei 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.* 2009 Dec. 7 Epub ahead of print.
- 10) 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)

#### 論文発表(研究協力者)

- 1) #Yamaza T, #Miura Y, Bi Y, Liu Y, Akiyama K, Sonoyama W, Patel V, Gutkind S, Young M, Gronthos S, Le A, Wang CY, Chen W, and Shi S. Pharmacologic stem cell based intervention as a new approach to osteoporosis treatment in rodents. *Pros ONE* 2008;**3**:e2615. (#These authors contributed equally to this work)
- 2) #Yamaza T, #Miura Y, Akiyama K, Bi Y, Sonoyama W, Gronthos S, Chen W, Le A, and Shi S. Mesenchymal stem cell-mediated ectopic hematopoiesis alleviates aging-related phenotype in immunocompromised mice. *Blood* 2009;**113**:2595-2604. (#These authors contributed equally to this work)

#### 学会発表

- 1) 一戸辰夫、諫田淳也、丸屋悦子、石丸文彦、平田康司、松尾恵太郎、佐治博夫: 骨髄移植における HLA 抗体の意義. 第 18 回日本組織適合性学会シンポジウム「移植医療における抗体検査の重要性」. 名古屋、2009 年 9 月 27 日.
- 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

本研究で得られた知見に関して、日本国内における知的財産権の出願は行われていない。

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）事後評価資料

研究課題：骨髄内骨髄移植の安全性、有効性の確立に関する研究

課題番号：

研究代表者：所属機関 関西医科大学

氏名 池原 進

研究分担者：所属機関 兵庫医科大学

氏名 小川 啓恭

## 1. 研究目的

関西医科大学、池原らによって考案された「灌流法による骨髄細胞の採取とそれを骨髄内に移植するという新しい骨髄移植法」は、膨大な量の動物実験より、その安全性と有効性が示されている。この新規移植法を臨床に応用し、安全性と有効性を検討することを目的にしている。

## 2. 研究方法

灌流法による骨髄内骨髄移植の治療プロトコールが固定された。そのプロトコールを兵庫医科大学の倫理委員会へ提出し、許可が得られたので、まもなく臨床試験を開始する予定である。

骨髄内骨髄移植では、長管骨内または腸骨内へ直接、移植片を移植する。その際の危惧として、肺への脂肪塞栓などの合併症が考え得る。この問題を検証するため、臍帯血移植において、腸骨内への移植を試み、骨髄内へ造血細胞を投与することの安全性をみる「骨髄内臍帯血ミニ移植」の臨床試験を行った。一方、骨髄内骨髄移植では、灌流法で骨髄細胞を採

取するため、末梢血 T 細胞の混入が少なく、また、骨髄内の T 細胞は、GVHD を起こしにくいとされる。そのため、HLA 不適合ドナーからの移植も許容される可能性がある。骨髄内骨髄移植療法で GVHD の重症度が軽減されるかどうかを検討するためのコントロールとして、静脈内へ輸注する通常方法の「T 細胞非除去 HLA 半合致骨髄移植」を行った。そして、移植片の生着率と GVHD 発生率について、両者で比較検討する予定である。HLA 半合致移植は、造血器悪性腫瘍患者を対象に、fludarabin+cytarabine+cyclophosphamide+TBI 8Gy の前処置を行った後、FK506+MTX+mPSL+MMF で GVHD 予防を行った。

(倫理面への配慮)

コントロールに用いる 2 つの移植に関して、前者は、「骨髄内臍帯血ミニ移植」として、後者は、「HLA 半合致移植」として、当大学の倫理委員会で承認を得た後、現在、臨床試験を施行中である。双方のプロトコールには記載されているように、患者とドナーから、書面に

よる informed consent を得た後、試験は実施される。移植の前処置が開始されるまでであれば、いつでも患者の自由意思で撤回することも可能である。また、試験結果が公表される際は、患者個人が特定できないように、匿名化がなされるなど、ヘルシンキ宣言に基づいて、試験は実施されている。

### 3. 研究結果

「骨髄内臍帯血ミニ移植」は、第 I 相試験(10 例の予定)を行っている。現在、8 例施行したが、骨髄内への輸注に際して、脂肪塞栓などの重大な合併症は起こっていない。また、移植片の生着に関して、現在のところ、全例ドナータイプの生着を得ている。GVHD の発症率とその重症度に関して、やや高い可能性があるものの、この点に関しては、第 II 相試験において、明らかにする予定である。

「T 細胞非除去 HLA 半合致フル移植」を行った 30 例の retrospective な解析では、生着率 96.2%であり、生着した症例の顆粒球の回復 (>500)は day 13、血小板の回復 (>2 万)は day 30 であった。2 度以上の GVHD 発症率 36.7%であった。

### 4. 考察

「骨髄内臍帯血ミニ移植」を実施した 8 例の経験より、骨髄内への移植片の投与は、安全性の面では問題ないものと考えられる。生着に関して、8 例全例

で、移植片由来の生着を得ており、問題は無いものと考えられる。しかし、この問題については、第 2 相試験として解析する予定である。引き続き、当初の計画通り、第 1 相試験 10 例を完遂する予定である。

「T 細胞非除去 HLA 半合致フル移植」の成績は、満足のいくものであったが、個人差が大きく、順調に免疫抑制剤の減量が可能な患者と、それが困難な患者が存在した。この差異が何によるものか、移植後のリンパ球分画、FACS 解析、さらには cytokine の解析を進めるなどして、明らかにする必要がある。これらの data の集積は、灌流法による骨髄内骨髄移植の GVHD の重症度を検討する際の重要な data となる。

### 5. 評価

#### 1) 達成度について

昨年度から、分担者として、「灌流法による骨髄細胞の採取とそれを骨髄内に移植するという新しい骨髄移植法」の研究に参加している。非常に困難であったが、本邦の主要移植施設のコンセンサスを得る形で、プロトコルを固めることができた。「骨髄内臍帯血ミニ移植」については、順調に症例数を重ねている。ほぼ当初の予定通りである。主要評価項目である骨髄内への移植に関しても、ほぼその安全性が確認された。「T 細胞非除去 HLA 半合致フル移植」については、安全性および



GVL 効果を含めた有効性については、一定の結果を得ている。今後は、多施設共同研究の形で、臨床試験を進めたい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

「灌流法による骨髄細胞の採取とそれを骨髄内に移植するという新しい骨髄移植法」は、世界で唯一無二の移植法である。この移植法が定着すれば、1) 少量の造血幹細胞で移植が可能、2) 幹細胞の採取に、ドナーに全身麻酔をかける必要がない、3) HLA ミスマッチ移植において、GVHD の克服が容易になるなどのメリットが予想される。「骨髄内臍帯血ミニ移植」により、臍帯血移植の生着率の向上が認められたなら、臍帯血移植の最大の問題点の克服となり、安全性、有効性が著しく改善することになる。「T 細胞非除去 HLA 半合致フル移植」の特徴は、その GVL 効果の高さにあり、難治性悪性血液腫瘍の治癒指向性治療に関して、大きな貢献をすることが期待できる。

3) 今後の展開について

それぞれの移植は、ドナーへの負担軽減、生着率の向上、GVL 効果の増強を目指したものである。今後の造血幹細胞移植の発展を考慮する上で、それぞれ、避けられない重要な課題である。これらの移植の多くが、HLA 不適合ドナーからの移植である。即ち、最近の GVHD の研究から、GVHD が予防可能、制御可能な病態であることが明らかになりつ

つあり、そのため、今後の同種造血幹細胞移植は、従来の HLA 適合ドナーからの移植から、HLA 不適合、さらには高度にミスマッチの HLA 半合致移植へと変化して行くと考えている。

4) 研究内容の効率性について

厚生労働科学研究費は、当初の研究計画を進めるに当たり、効率よく使われ、一定の結論を得ることができたと考えている。

6. 結論

「灌流法による骨髄細胞の採取とそれを骨髄内に移植するという新しい骨髄移植法」については、プロトコールの完成を見た。全国的 study として、開始することが可能になった。「骨髄内臍帯血ミニ移植」では、臍帯血を骨髄内へ輸注することに安全性が、ほぼ確認された。「T 細胞非除去 HLA 半合致フル移植」では、GVL 効果の高さを証明することができた。

7. 研究発表

1) 国内

口頭発表	27 件
原著論文による発表	3 件
それ以外(レビュー等)の発表	1 件
そのうち主なもの	

論文発表

1. 森下慎一郎、島田真一、眞淵 敏、田中隆史、梶原和久、児玉典彦、海田勝仁、小川啓恭、道免和久：造血幹細胞移植患者の移植前後の身体機

能に関する研究、理学療法学、36: 120-126, 2009.

2. 森下慎一郎、島田真一、眞淵 敏、田中隆史、梶原和久、若杉樹史、児玉典彦、海田勝仁、小川啓恭、道免和久、造血幹細胞移植患者に対する無菌室内での運動療法の安全性について、臨床理学療法研究、26: 35-38, 2009.
3. 松本友寛、笹子三津留、藤原由規、小石健二、日笠 聡、澤田暁宏、徳川多津子、海辺展明、岩井孝史、小川啓恭、富田尚裕、胃全摘出術を行った先天性第 XI 因子欠乏症の 1 例、癌の臨床、55: 211-214, 2009.

#### 学会発表

1. 池亀和博、吉原 哲、海田勝仁、加藤るり、井上貴之、中田 潤、藤岡龍哉、谷口裕紀、沖川佳子、中島利幸、高塚広行、川上 学、佐竹敦志、藤盛好啓、岡田昌也、玉置広哉、小川啓恭：当科における HLA 半合致移植の治療成績 (update)、第 31 回日本造血細胞移植学会総会、札幌、2009 年 2 月 5 日
2. 岡田昌也、中田 潤、加藤るり、海田勝仁、井上貴之、佐竹敦志、吉原哲、谷口裕紀、藤岡龍哉、玉置広哉、池亀和博、藤盛好啓、甲斐俊朗、小川啓恭：成人骨髄内臍帯血ミニ移植を施行した 3 例の検討、第 31 回日本造血細胞移植学会総会、札幌、2009 年 2 月 5 日
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. 玉置広哉、中田 潤、吉原 哲、海田勝仁、加藤るり、谷口裕紀、藤岡龍哉、井上貴之、佐竹敦志、藤盛好啓、甲斐俊朗、岡田昌也、池亀和博、小川啓恭、HLA 不適合血縁移植、臍帯血移植 54 例における HHV-6 血症の解析、第 71 回日本血液学会学術集会、京都、2009 年 10 月 23 日

#### それ以外(レビュー等)の発表

1. 吉原 哲、小川啓恭、同種造血幹細胞移植における拒絶・移植片対宿主病の制御薬とその適応-抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリン(ATG)、血液フロンティア、18: 43-51, 2008.

#### 2) 海外

口頭発表	4 件
原著論文による発表	11 件
それ以外(レビュー等)の発表	0 件
論文発表	

1. Taniguchi Y, Yoshihara S, Hoshida Y, Inoue T, Fujioka T, Ikegame K, Kawakami M, Masuda T, Aozasa K, Kawase I, Ogawa H. Recovery from established graft-versus-host disease achieved by bone marrow transplantation from a third-party allogeneic donor. *Experimental Hematology*, 36:1216-1225, 2008.
2. Okada M, Fujimori Y, Misawa M, Kai S, Nakajima T, Okikawa Y, Satake A, Itoi H, Takastuka H, Itsukuma T, Nishioka K, Tamaki H, Ikegame K, Hara H, Ogawa H. Unrelated umbilical cord blood transplantation using a TBI/FLAG

conditioning regimen for adults with hematologic malignancies. Biol Blood Marrow Transplant, 14; 896-903, 2008.

3. 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.
4. 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.

#### 学会発表

1. Yoshihara S, Ikegame K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Taniguchi Y, Satake A, Tamaki H, Okada M, Ogawa H. Role of FDG-PET/CT in the diagnosis of extramedullary relapse of leukemia after allogeneic stem cell transplantation. The 13th Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation Meeting. 2008, 6. Taipei,
2. Satake A, Imado T, Taniguchi Y, Ogawa H. Allogeneic MHC-haplomismatched hematopoietic stem cell transplantation may be able to separate graft-versus-leukemia effects from graft-versus-host reaction. The 50th annual

meeting of the American Society of Hematology, 2008, San Francisco.

3. 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. The 14th congress of the European Hematology Association, 2009.6.4-7, Berlin.
4. 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 The 36th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2010. 3.21-24, Vienna.

8. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

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

### 新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

ウイルス抗原特異的細胞傷害性T細胞による造血幹細胞移植後の難治性感染症の治療

研究分担者 小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学講座 教授）

**研究要旨：** ウイルス特異的ペプチドで刺激後、IL-2 添加培地で 3 週間培養することで、臨床応用に必要な  $10^8$  個以上のウイルス特異的 CTL の増幅が可能であった。臨床第 1, 2 相試験として造血細胞移植の HLA-A2 または A24 陽性ドナー末梢血よりサイトメガロウイルス (CMV)、EB ウイルス (EBV) に対する CTL を 16 回誘導した。うち CMV-CTL の投与を 2 名で行った。投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、他に重篤な合併症を認めなかった。1 名の患者で投与後 CMV-DNA の低下、消失を認めた。

#### A. 研究目的

造血幹細胞移植後の患者における難治性ウイルス感染症に対し、臨床応用可能なウイルス特異的 CTL の体外増幅法を開発し、移植後の難治性ウイルス感染症に対して臨床第 1、2 相試験を行う。

移植 HLA-A2 または A24 陽性ドナーの末梢血 30ml から上記の方法により培養した。初回投与細胞数、 $1 \times 10^5$ /kg より漸増し、計 3 回の投与を行い、投与前後の末梢血ウイルス DNA の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部バイオ先端臨床研究審査委員会の承認後、ドナーから文書による同意を得ておこなった。

#### B. 研究方法

1、HLA-A2 または A24 陽性健常人 9 人の末梢血 20-30ml から単核球を分離し、ウイルス特異的ペプチドで刺激後、IL-2 添加培地で 1 週間培養し、その後我々の開発した方法に基づき CD3 で刺激した T 細胞に抗原ペプチドをパルスしたものを抗原提示細胞とし T 細胞に加え閉鎖的培養無菌バッグにより培養した。増幅した CTL の細胞数、MHC-tetramer 陽性細胞の濃度、特異的 CTL の細胞障害活性を評価した。

#### C. 研究結果

1、30ml の末梢血より 21 日間の培養で MHC-tetramer 陽性率は平均 54.7% (22.6-84.7%)、ウイルス特異的 CTL としていずれも  $10^8$  個以上に増幅が可能であった。体外増幅された CTL は特異的ペプチドをパルスした T2 細胞に対して強い細胞障害活性を示した。

2、臨床第 1, 2 相試験として造血細胞



- 2) Yoshida N, Yagasaki H, Xu Y, Matsuda K, Yoshimi A, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Watanabe N, Matsumoto K, Kato K, Ueyama J, Inada H, Goto H, Yabe M, Kudo K, Miyama J, Kikushi A, Manabe A, Koike K, Kojima S. Correlation of clinical features with the mutational status of GM-CSF signaling pathway-related genes in juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Res.* 2009;65(3):334-340
- 3) Watanabe N, Matsumoto K, Yoshimi A, Horibe K, Matsuyama T, Kojima S, Kato K. Outcome of bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donor in children with hematological malignancies using methotrexate alone as prophylaxis for graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* 2008; 88: 575-582
- 4) Yoshimi A, Kojima S, Tanigushi S, Hara J, Matsui T, Takahashi Y, Azuma H, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network. Unrelated cord blood transplantation for severe aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008; 14: 1057-1063
- 5) Fujita A, Ihara M, Suzuki R, Enomoto Y, Sugiyama H, Sugata K, Suga S, Asano Y, Tagasaki Y, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T. Elevated serum cytokine levels are associated with human herpesvirus 6 reactivation in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *J Infect.* 2008; 57: 241-248
- 6) Yoshida N, Yagasaki H, Takahashi Y, Yamamoto T, Liang J, Wang Y, Tanaka M, Hama A, Nishio N, Kobayashi R, Hotta N, Asami K, Kikuta A, Fukushima T, Hirano N, Kojima S. Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria -type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2008; 142: 427-435
- 7) Muramatsu H, Kato K, Watanabe N, Matsumoto K, Nakamura T, Horikoshi Y, Mimaya J, Suzuki C, Hayakawa M, Kojima S. Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukaemia. *Br J Haematol.* 2008; 142: 610-615
- 8) Yabe M, Sako M, Yabe H, Osugi Y, Kurosawa H, Nara T, Tokuyama M, Adachi S, Kobayashi C, Yanagimachi M, Ohtsuka Y, Nakazawa Y, Ogawa C, Manabe A, Kojima S, Nakahata T; Japanese Childhood MDS Study Group. A conditioning regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan for allogeneic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Transplant.* 2008; 12: 862-867
- 9) Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Nishio N, Muramatsu H, Yoshida N, Tanaka M, Hidaka H, Watanabe N, Yoshimi A, Matsumoto K, Kudo K, Kato K, Horibe K, Kojima S. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) in children: a comparison of AMKL with and without Down syndrome. *Br J Haematol.* 2008; 140: 552-556

1 0) Kosaka Y, Yagasaki H, Sano K, Kobayashi R, Ayukawa H, Kaneko T, Yabe H, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Morimoto A, Otsuka Y, Ohga S, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem-cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia. *Blood*. 2008; 111: 1054-1059

1 1) Muramatsu H, Kojima S, Yoshimi A, Atsuta Y, Kato K, Nagatoshi Y, Inoue M, Koike K, Kawase T, Ito M, Kurosawa H, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Hotta N, Watanabe A, Morishima Y, Kawa K, Shimada H. Outcome of 125 children with CML who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program (JMDP). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Feb;16(2):231-8.

1 2) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Feb 1. [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

- 高橋義行、鈴木進、村松秀城、西尾信博、谷ヶ崎博、石屋聡美、白数昭雄、石田高司、恵美宣彦、小島勢二 同種造血幹細胞移植後の難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性T細胞 (CTL) の体外増幅法の開発 第31回日本造血細胞移植学会総会、2009年、2月5、6日、札幌
- 村松秀城、小島勢二、他：非血縁者間同種骨髄移植後にリツキシマブ不応性のCD20陰性EB-LPDを発症した再生不良性貧血の一例。第51回日本小児血液学会総会、千葉、2009.11.14

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・研究事業）  
総合研究報告書  
新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究（H20-免疫-一般-019）  
研究代表者 池原 進

マウスモデルを使った造血幹細胞の静脈内と骨髄内輸注法の比較に関する研究

研究要旨 移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に感染症以外の原因による肺胞障害により発症する予後不良な肺合併症であり、病態の解明と治療法の開発が必須である。原因として肺への放射線照射の影響やドナー免疫担当細胞の関与が考えられている。ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内骨髄移植 (iv-BMT) 後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植 (intra-BMT) では少ないと考えられ、Ikehara らはマウスモデルを用いて intra-BMT では iv-BMT よりも移植片対宿主病(GVHD)が抑制されることを報告している。我々は intra-BMT では iv-BMT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮設のもとに、IPS のマウスモデルにより intra-BMT と iv-BMT を比較検討した。Intra-BMT 群では GVHD の重症度が低く、生存率が優れていた。また移植 6 週後の気管支肺胞洗浄では、回収液中の総細胞数および T 細胞数は、intra-BMT において iv-BMT よりも少ない傾向にあり、組織学的にも intra-BMT において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。さらに IVIS imaging system による解析では、intra-BMT では iv-BMT に比し移植後早期の肺への移植細胞の集積が少なかった。以上から IPS は intra-BMT において軽度である可能性が示唆された。

分担研究者 品川克至  
岡山大学医学部 血液・腫瘍内科 講師

A. 研究目的

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に感染症以外の原因により広汎な肺胞障害を生じて発症する予後不良な肺合併症の総称であり、病態の解明と治療法の開発が必須である。原因として肺への放射線照射の影響やドナー免疫担当細胞の関与が考えられている。診断基準は、a) 広範な肺胞障害の存在、b) 下気道感染症の否定、である。胸部 X-P、CT 上の多発浸潤影の出現、肺炎の臨床症状、肺機能障害（低 O<sub>2</sub>血症、拘束性肺機能障害）が見られる。また、気管支鏡検査により、細菌、真菌、ウイルス感染を否定することが必要である。頻度は、同種移植では再生不良性貧血など非腫瘍性疾患では

3~7%、白血病など腫瘍性疾患では 7~10%、自己移植後では 6%といわれており、悪性腫瘍に対する同種移植後に多い。発症時期は移植後、中央値で 21 日といわれているが、2 ヶ月以降の発症もある。死亡率は 60~82%であり予後はきわめて不良である。発症に関与する危険因子として、前述の悪性腫瘍に対する同種移植の他、高齢、全身放射線照射 (TBI)、移植片対宿主病 (GVHD) などが推定されている。

病態メカニズムは明らかでないが、TBI による組織障害によりサイトカインの誘導や、肺上皮細胞での MHC、補助シグナル、接着因子の発現上昇などが発生し、肺局所へのドナー細胞の流入と活性化がおり、肺胞上皮とドナー T 細胞の接触による免疫反応、および RT による肺障害の両者により発症することが推定されている。

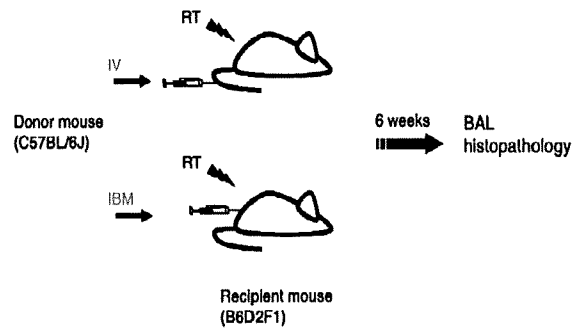


ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内骨髄移植 (iv-BMT) 後では多くが肺へトランプされるが、骨髄内骨髄移植 (intra-BMT) では少ないと考えられる。Ikehara らは、マウスモデルを用いて、intra-BMT では iv-BMT よりも GVHD が抑制されることを報告しているが、我々は intra-BMT では iv-BMT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立てた。マウスモデルを用いて、IPS に対する intra-BMT の影響に関して iv-BMT と比較検討を行った。

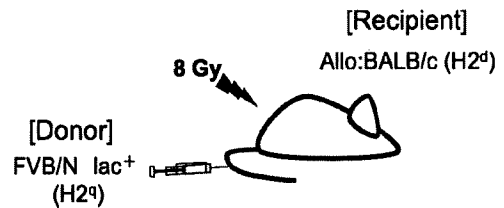
## B. 研究方法

Donor マウスには C57BL/6J を用い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に iv-BMT と intra-BMT を行い比較検討した。移植後の、体重および GVHD スコアを評価し、生命予後を観察した。また移植後 6 週間後に、気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage (BAL) を行い、回収液中の細胞を解析した。また、肺組織の病理所見を検討した。(図 1) また donor マウスには FVB/N lac+, レシピエントには BALB/c を用いた系で、IVIS imaging system により移植後輸注細胞の体内分布の時間的、場所的推移に関して iv-BMT と intra-BMT で比較検討した。(図 1,2)

(図 1)



(図 2)

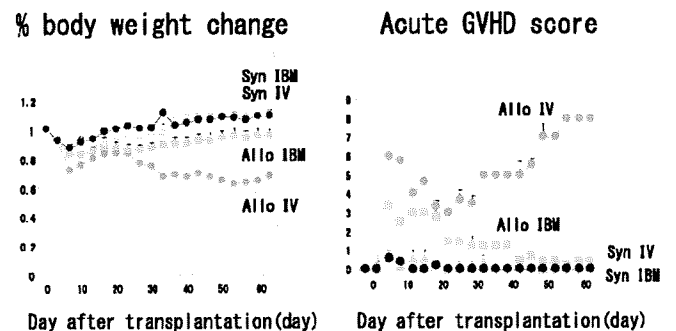


## C. 研究結果

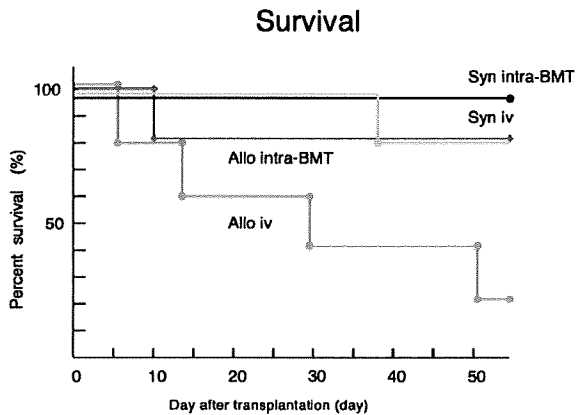
このモデルでは、intra-BMT で in-BMT に比べて、移植後の体重減少は少ない傾向にあり、また GVHD スコアが低かった。これらの因子が移植後の全身状態に有利に作用したと考えられ、結果として生存率が高かった。

(図 3,4)

(図 3)

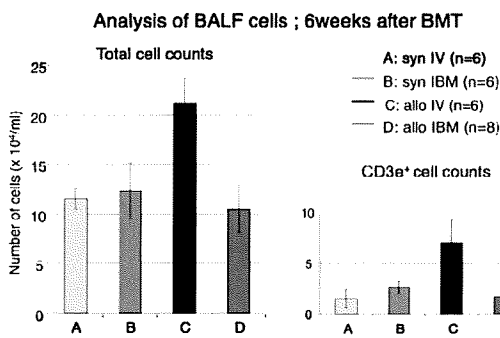


(図 4)

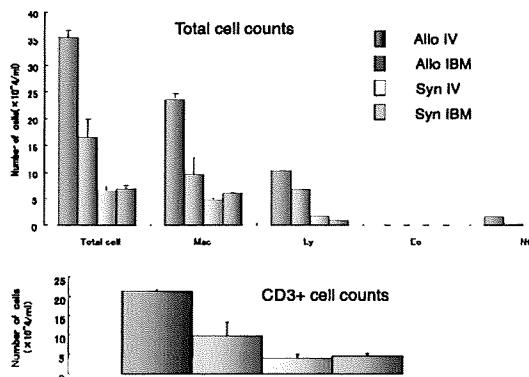


また移植 6 週後の気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage; BAL の解析では、回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は、intra-BMT において iv-BMT よりも少ない傾向にあり、組織学的にも intra-BMT において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。(図 5,6)

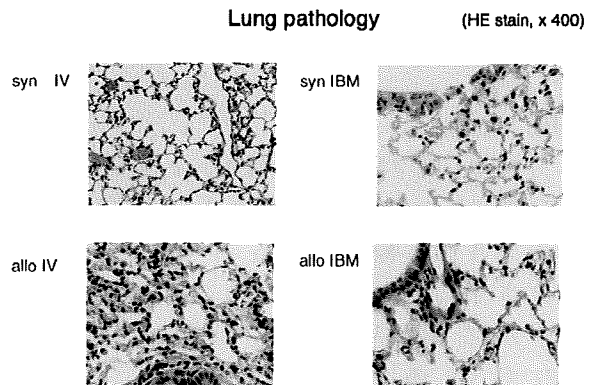
(図 5)



Analysis of BALF cells; 6 weeks after BMT

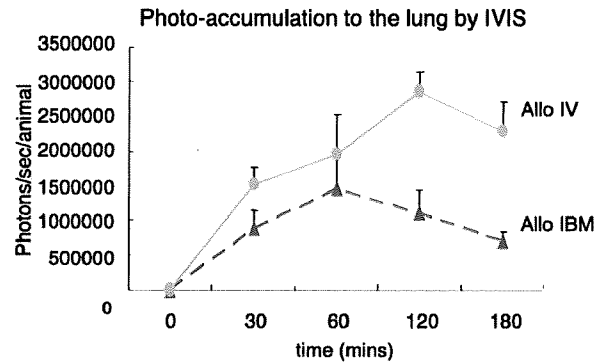


(図 6)



さらに IVIS imaging system により輸注された移植細胞の体内動態を解析した。Intra-BMT では iv-BMT に比し移植後早期では輸注された移植細胞の肺へのトラップが軽減されていた。(図 7)

(図 7)



以上から IPS は intra-BMT において iv-BMT より軽度である可能性が示唆された。

#### D. 考察

IPS マウスモデルによる、iv-BMT と intra-BMT の比較研究は過去になく、今回肺局所のリンパ球の集積が観察された意義は大きいと思われる。IPS 発症に関与する T 細胞でのサイトカインや細胞表面マーカーの発現変

化、また移植造血幹細胞が肺組織にトラップされる時間的経過を明らかにする事が課題である。

#### E. 結論

今回検討した IPS マウスモデルでは iv-BMT に比し intra-BMT において軽度である可能性が示唆された。さらにマウス IPS モデルを用いて、1) 肺組織標本の免疫染色などによる評価、2) BALF 洗浄液中の種々のサイトカイン量を測定、3) 移植後輸注細胞の肺へのトラップに関して、IVIS imaging system を用いてさらに詳細に iv-BMT との比較検討をおこなう予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし。

##### 2. 学会発表

1) H Sugiyama, Y Maeda, H Nishimori, K Kobayashi, M Nishie-Kataoka, T Teshima, and M Tanimoto. Cyclosporine, but Not mTOR Inhibitors, Hampers the Reconstitution of Bone Marrow-Derived Tregs in Long-Term Complete Donor chimeras. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)112:2331. 2008

2) H Nishimori, H Sugiyama, Y Maeda, K Kobayashi, Y Yamasuji, E Kondo, K Shinagawa, K Takeuchi, M Tanimoto and Y Maeda. Synthetic Retinoid Am80 Ameliorates Chronic

Graft-Versus-Host Disease Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 114:4487. 2009

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

##### 1. 特許取得

特になし。

##### 2. 実用新案登録

特になし。

##### 3. その他

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

「新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究」

分担研究(東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 森尾友宏)

研究協力者(東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学 清水則夫)

「骨髓内造血細胞移植後の生着・免疫学的再構築促進等を目的とした、*ex vivo* 増殖ドナー活性化 T 細胞輸注療法(活性化 CD4-DLI など)の開発」

研究要旨

骨髓内造血細胞移植後の諸問題に対応するため、移植後細胞治療法の開発に向けて基礎的検討を行った。臍帯血移植後患者においては 10 例で、臍帯血移植後のバッグから細胞を回収して、固相化 CD3 抗体 + IL-2 の存在下で CD4T 細胞あるいは CD8T 細胞を増殖した。また基礎的な検討として、CD4/CD8T 細胞 subset の増殖培養も行った。さらに、培養した T 細胞の memory/effector サブセット、機能的表面抗原発現、サイトカイン産生を解析し、成人末梢血から培養した CD4T 細胞と、臍帯血から培養した CD4T 細胞にて比較検討を行った。その結果、臍帯血では Th17 細胞の誘導が少なく、制御性 T 細胞の増殖が良いこと、その他のサブセットの増殖は遜色ないことなどが明らかになった。

A. 研究目的

骨髓内造血細胞移植において、治療成績の向上のために様々な工夫がなされている。その 1 つが、ドナーリンパ球輸注(DLI)の併用であるが、ヒトにおいては生着や移植後再発予防に寄与するリンパ球亜群について未だ明らかではない。また骨髓内臍帯血移植においては、DLI の併用が行えず、何らかの方策を講じることが望ましい。

造血細胞移植後の生着不全、日和見感染症、再発に対しては *ex vivo* 増殖ドナー活性化 CD4T 細胞輸注療法が有効であることが、探索的臨床研究から明らかになりつつある。

本研究では、骨髓内造血細胞移植に使用できる可能性のある T 細胞について、増殖後の特定を検討すると共に、個々の細胞集団を増殖可能かどうか検証することを目的とした。

B. 研究方法

1) 輸注後臍帯血洗浄液あるいは成人末梢血から単核球を分離し、固相化 CD3 抗体 + IL-2 存在下に培養を行った。

2) 増殖した細胞においては、表面抗原分析、網羅的遺伝子発現解析、サイトカイン産生能などを測定した。

3) T 細胞サブセットについては FACS にてソーティングして、その細胞集団の増殖を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、臍帯血という貴重な資源を用いて行われる研究であり、倫理審査委員会の承認を経て研究が行われる。また、研究用であるが、培養に当たっては標準作業手順書に従い、細胞培養施設にて行われる。

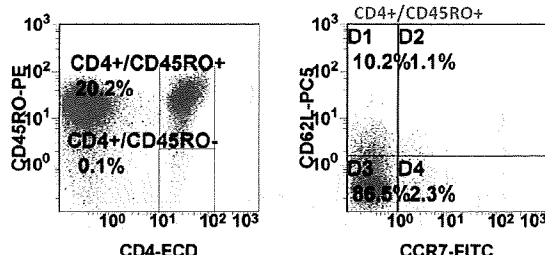
C. 研究結果

1) 成人末梢血及び臍帯血から培養した CD4 陽性細胞の性状解析

1. 表面抗原分析

培養に従い memory 細胞の増加を認め、培養 12 日目には 90% 以上が CD45RO+ CD62L-CCR7-エフェクターメモリー細胞となった。また培養した細胞では様々な共刺激分子の発現を認めた。

CD28, CD40L, ICOS などの costimulatory factor のみならず、CTLA-4 や PD-1 などの inhibitory に働く分子の発現を認め、様々な effector 細胞が混在した細胞集団が得られることが確認された。



CD4+CD25+FoxP3+の制御性 T 細胞については培養初期に増加し、12 日目には減少するという現象が認められた。

図 1: CD45RO+CD62L-CCR7-細胞

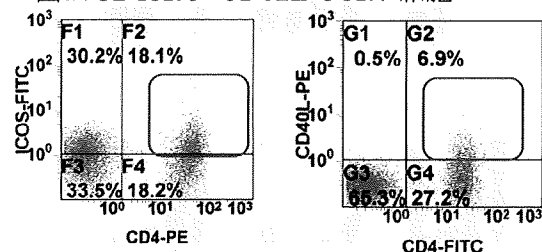


図 2: CD40L, ICOS などの共刺激分子の発現