

201015039A

厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業

HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法
による臨床診断の有用性に関するエビデンス創出

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中内 啓光

平成23 (2011) 年 5月

目 次

I.	総括研究報告	
	HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による 臨床診断の有用性に関するエビデンス創出 中内 啓光	1
II.	分担研究報告	
1.	キメリズム解析/HLA-Flow法に関する全国の移植施設との共同研究 渡辺 信和	7
2.	全国の移植施設との共同研究におけるプロトコール作成 高橋 聡	11
3.	造血細胞移植後の血小板のキメリズム解析 田野崎 隆二	14
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	17
IV.	研究成果の刊行物・別刷	23

I. 総括研究報告

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 医療技術実用化総合研究事業
総括研究報告書

HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による

臨床診断の有用性に関するエビデンス創出

研究代表者 中内 啓光（東京大学医科学研究所幹細胞治療分野・教授）

研究要旨

我々は、臍帯血移植後の造血ならびに病態の解析を目的に、FACSを使用した新規キメリズム解析法（HLA-Flow法）を考案した。本法は、迅速、高感度かつ定量的で、目的とする細胞を分取して詳細に解析できることから、生着不全と再発の早期診断に極めて有効である。しかしながら、多くの利点にもかかわらず、臨床研究の規模が限られ、使用するアリル特異的抗HLA抗体も染色性が不良かつ種類が不足していたため、本法は臨床検査として広く定着するには至っていない。そこで研究代表者等は新たな方法で抗HLA抗体の作製を試み、染色性の良好な新規抗体の作製に成功し、その臨床診断法としての有効性を医科研病院で確認した。このような背景のもと、我が国におけるHLA-Flow法の臨床検査法としての定着をめざして、本課題は企画された。

平成22年度、新たに抗HLA-B62抗体を作製することに成功したが、HLAテトラマーがないと抗体作製が困難なHLAタイプも多いため、HLAテトラマーに依存しない全く新しい抗体作製法の試みを開始した。虎の門病院との共同研究では70症例を登録し、11月に解析を終了した。1年間にわたる共同研究で、移植後早期のドナー生着動態と白血病細胞を同時にモニタリングすることに成功し、HLA-Flow法が臨床診断において極めて有用であることが実証された。その結果、HLA-Flow法は虎の門病院・臨床検査室への導入が進められている。渡辺は東京医科歯科大学・小児科の森尾友宏准教授、および岡山大学・消化器内科の高木章乃夫助教とプロトコールを作成し、全国規模の共同研究を開始した。また、札幌北榆病院と秋田大学では、医科研からの支援のもと自施設内でキメリズム解析を開始した。平成23年2月には、高橋と田野崎は第2回キメリズム解析研究会を開催した。

平成23年度は引き続き抗体作製と臨床研究を行い、その成果を総括して公開する。また、全国の移植施設に対し、自施設内でのキメリズム解析の導入を支援する予定である。我々はこれらの共同研究を通じ、全国の移植施設でHLA-Flow法がHLAミスマッチ移植の臨床検査と研究の手段として有効であるというエビデンスを確立したい。それにより、HLA-Flow法を我が国におけるHLAミスマッチ移植の標準的な検査法として定着させることが、本研究の最終目的である。

研究分担者

渡辺信和・東京大学医科学研究所病態解析領域・特任准教授

高橋聡・東京大学医科学研究所附属病院・准教授

田野崎隆二・国立がんセンター中央病院・医長

A. 研究目的

我が国における造血細胞移植の安全性の向上を目指し、全国の移植施設でHLA-Flow法がHLAミスマッチ移植の臨床検査として有効であるというエビデンスを確立したい。それにより、HLA-Flow法を我が国におけるHLAミスマッチ移植の標準的検査法として定着させることが、本研究の最終目的である。

B. 研究方法

本研究計画は、中内が新たに開発した抗HLA抗体の作製法により染色性の良好な抗体を作製すること、および全国規模でのキメリズム解析の共同研究を進めることの2つからなる。それぞれ各研究分担者を中心として計画が立案され、実施された。

(倫理面への配慮)

本研究では、多施設共同臨床研究を計画している。臨床研究を開始する前に、研究計画書をそれぞれの機関に設けられた倫理委員会に提出し、審査を受けて許可を得てから研究を開始する。実施に際しては、それぞれの機関において、ヘルシンキ宣言および厚生労働省が定めた『臨床研究に関する倫理指針』に従って研究計画を被験者に説明し、研究への参加を文書で同意を得てから検体を採取する。個人情報の保護に関しては、各移植関連施設から東京大学医科学研究所へ送られてくる検体およびデータを匿名化して、個人と切り離して管理する。データの保存は、研究所へ申請した場所において、パスワードをかけたコンピュータと施錠した保管庫で行う。

また、ヒトHLA等によるトランスジェニックマウスの免疫は、東京大学医科学研究所・実験動物研究施設で行なう。これらの実験は同

施設の実験指針に従い、動物愛護上の十分な配慮を持って行なう。

C. 研究結果

中内はHLA-B62に対する新規IgG型抗体を作製し、今までに作製したHLA-A2およびB35に対する抗体とともに複数の蛍光色素で標識した。抗体作製に成功したHLAは、すべてHLAテトラマーでマウスを免疫した場合であり、抗体作製ができなかったA11、A33、B60、およびB61はHLAモノマーでマウスを免疫した場合であった。そこで、抗体作製ができなかったHLAモノマーをHLAテトラマーに作製し直し、抗体作製の準備をした。また、抗体のできにくいHLAに関しては、抗体産生細胞を遺伝子導入で不死化することにより、ハイブリドーマ作製を経ずに抗体作製する方法の開発を始めた。平成22年度は本法に使用するBcl-x1/Bcl-6の遺伝子導入に必要な遺伝子ベクターの準備を行なった。平成22年度、原発性免疫不全症・研究班はSCIDに対する臍帯血移植のガイドラインを発表したが、渡辺は同・研究班の森尾友宏医師とともに本ガイドラインにそった移植におけるキメリズム解析のプロトコルを作成し、共同研究を開始した。また、岡山大学の高木章乃夫医師と生体肝移植後のキメリズム解析のプロトコルを作成し、共同研究を開始した。虎の門病院との1年間にわたる共同研究は、51症例を解析して11月に終了した。その結果、生着不全と再発の早期診断に有用であることが確認され、同院・臨床検査室への導入の準備が進められている。また、札幌北楡病院と秋田大学へは抗HLA抗体の送付と実技講習を通じてキメリズム解析法の導入を支援し、これらの移植施設における本法の実

用化に貢献した。平成23年2月、高橋と田野崎は第2回キメリズム解析研究会を開催し、昨年度の講演者に加えて済生会前橋病院からの講演者も招待した。

D. 考察

抗体作製に成功したHLAは、すべてHLAテトラマーでマウスを免疫した場合であり、抗体作製ができなかったHLAは、すべてHLAモノマーでマウスを免疫した場合であった。抗体作製が困難である原因として、HLAモノマーによる免疫を多く試みたことが考えられた。今後はHLAテトラマーによる免疫のみ行なうことにする。一方でBcl-x1/Bcl-6の遺伝子導入により抗体産生細胞を不死化することが可能になれば、抗HLA抗体を産生するヒト末梢血B細胞より、ダイレクトに抗体を作製することができる可能性がある。HLAテトラマーによる免疫とともに、Bcl-x1/Bcl-6の遺伝子導入法の準備も進めていく。

虎の門病院・血液内科との共同研究では、臍帯血ミニ移植に特化したキメリズム解析のプロトコールにより、平成22年11月末日までに51例の患者で移植後早期の生着動態を解析した。その結果、HLA-Flow法は生着不全や再発の早期診断に極めて有用であることが実証された。虎の門病院では、計画がやや遅れて、平成23年度よりキメリズム解析/HLA-Flow法をミスマッチ移植の標準的臨床検査として導入することを計画している。我が国で最も臍帯血移植数の多い虎の門病院（年間70例以上）で本解析法が導入されれば、全国の臍帯血移植施設における本解析法の実用化の促進に大きく寄与することが予想されて、極めて有意義である。

E. 結論

平成22年度、新たに作製した抗HLA-B62抗体も、キメリズム解析に極めて有効であることが判明した。

また、虎の門病院との共同研究として開始したキメリズム解析の臨床研究では、その有用性が移植医の間で確認・認識され、同院への導入が進められている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, Miyoshi M, Sakamoto N, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Feb 12. [Epub ahead of print]
2. Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011, 8(2): 177-187.
3. Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol*. 2010 Dec 24. [Epub ahead of print]

4. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, Furuta B, Umemura Y, Nakajima Y, Ikehara Y, Kobayashi T, Segawa H, Takayasu S, Sato H, Motomura K, Uchida E, Kanayasu-Toyoda T, Asashima M, Nakauchi H, Yamaguchi T, Nakanishi M. Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem.* 2011, 286(6): 4760-4771.
5. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One.* 2010, 5:e14099.
6. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med.* 2010, 207(13): 2817-2830.
7. Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, Takayanagi S, Haruyama E, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nakauchi H, Nagashima H. Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 402: 14-18.
8. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell.* 2010, 142: 787-799.
9. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in Mice. *Hepatology.* 2010, 52: 1111-1123.
10. Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H. Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol.* 2010, 17(4): 271-275.
11. Mashima R, Honda K, Yang Y, Morita Y, Inoue A, Arimura S, Nishina H, Ema H, Nakauchi H, Seed B, Oda H, Yamanashi Y. Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Lab Invest.* 2010, 90(9): 1357-1364.
12. Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res.* 2010, 16: 3825-3831.
13. Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to

- resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Oncogene*. 2010, 29: 4157-4169.
14. Hirabayashi M, Kato M, Sanbo M, Kobayashi T, Hochi S, Nakauchi H. Rat transgenesis via embryonic stem cells electroporated with the Kusabira-orange gene. *Mol Reprod Dev*. 2010, 77: 474.
 15. Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med*. 2010, 207: 1173-1182.
 16. Sugawara T, Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, Yokosuka O, Nakauchi H, Iwama A. FET family proto-oncogene Fus contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2010, 38: 696-706.
 17. Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle*. 2010 Mar 23. [Epub ahead of print]
 18. Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, Iwama A. Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell*. 2010, 6:279-286.
 19. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B, Hattori K. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood*. 2010, 115: 4302-4312.
 20. Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J Clin Invest*. 2010, 120: 179-190.
 21. Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, Ito K, Yasuda N, Kudo Y, Yamamoto R, Ozasa Y, Fujimoto M, Wang P, Nakauchi H, Nakaya H, Komuro I. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest*. 2010, 120: 242-253.
 22. Hirabayashi M, Kato M, Kobayashi T, Sanbo M, Yagi T, Hochi S, Nakauchi H. Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimerac at high efficiency. *Mol Reprod Dev*. 2010, 77: 94. No abstract available
2. 学会発表
 1. Naofumi Matsuno, Hisashi Yamamoto, Nobukazu Watanabe, Kazuya Ishiwata, Nobuaki Nakano, Masanori Tsuji, Yuki Asano-Mori, Naoyuki Uchida, Atsushi Wake, Madoka Narita, Hirimitsu Nakauchi, Shuichi

Taniguchi, Engraftment kinetics of donor-derived lymphocytes early after reduced-intensity cord blood transplantation in adults. The 8th Annual International Umbilical Cord Blood Transplantation Symposium, Poster, June 5, 2010, San Francisco.

2. Stephanie C. Napier, Satoshi Yamazaki, Nobukazu Watanabe, Naofumi Matsuno, Satoshi Takahashi, Akinobu Takaki, and Hiromitsu Nakauchi, Flow cytometric analysis of donor-recipient chimerism using anti-HLA antibody after HLA-mismatched hematopoietic cell and organ transplantation, ICI 2010, Aug. 26th, 2010, Kobe
3. Tadanori Yamochi, Yohei Morita, Toshiko Yamochi, Yosuke Sasaki, Nobukazu Watanabe, Seisi Ogawa, Atae Utsunomiya, Isao Hamaguchi, Kaoru Uchimaru, Hiromitsu Nakauchi, Toshiki Watanabe, Search for cancer stem cells in ATL. 第72回日本血液学会、優秀ポスター、平成22年9月25日（横浜）
4. Hiromitsu Nakauchi, TGF- β induces hematopoietic stem cell hibernation as a BM niche signal SFB Symposium at Univ of Ulm, Oct 14-16, 2010. Ulm, Germany.
5. Hiromitsu Nakauchi, Generation of platelets from pluripotent stem cells. The 14th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference. Feb 24, 2011. NIH, Bethesda, Maryland
6. Satoshi Yamazaki and Hiromitsu

Nakauchi, Non-myelinating Schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF- β signaling Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Big Sky, Montana. March 27- April 1, 2011.

H. 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
なし

II. 分担研究報告

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 医療技術実用化総合研究事業 分担研究報告書

HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による 臨床診断の有用性に関するエビデンス創出

研究課題：キメリズム解析／HLA-Flow 法に関する全国の移植施設との共同研究
研究分担者 渡辺 信和（東京大学医科学研究所病態解析領域・特任准教授）

研究要旨

平成22年度、渡辺は虎の門病院をはじめとする全国の移植施設とキメリズム解析／HLA-Flow 法に関する共同研究を進めた。

研究要旨

平成 22 年度、渡辺は原発性免疫不全症候群・研究班および岡山大学とキメリズム解析のプロトコールを作成し、共同研究を開始した。虎の門病院との 1 年間にわたる共同研究は、70 症例を登録して 11 月に終了した。その結果、HLA-Flow 法が生着不全と再発の早期診断に有用であることが実証され、現在同院・臨床検査室への導入が進められている。また、済生会前橋病院における HLA 半合致移植症例のキメリズム解析を通じ、HLA-Flow 法が同移植後の特異な生着動態を明らかにした。済生会前橋病院においても、院内での HLA-Flow 法の導入準備が進められている。一方、札幌北楡病院と秋田大学に対しては、自施設内での HLA-Flow 法の運用を支援したが、これらの移植施設では本法が臨床検査として行われている。

A. 研究目的

虎の門病院をはじめとする全国の移植施設

との共同研究を通じて、HLA-Flow法による生着不全と再発の臨床診断を試みる。それにより、HLA-Flow法がHLAミスマッチ移植の臨床検査の手段として有効であるというエビデンスを確立し、本法を我が国におけるHLAミスマッチ移植の標準的な検査法として定着させることが、本研究の最終目的である。

B. 研究方法

平成22年度、渡辺は原発性免疫不全症候群・研究班および岡山大学とキメリズム解析のプロトコールを作成し、共同研究を開始した。虎の門病院との1年間にわたる共同研究は、70症例を登録して11月に終了した。また、済生会前橋病院から依頼されたHLA半合致移植症例のキメリズム解析を行った。札幌北楡病院と秋田大学に対しては、自施設内での HLA-Flow法の運用を支援した

（倫理面への配慮）

臨床研究を開始する前に、研究計画書をそれぞれの機関に設けられた倫理委員会に提出

し、審査を受けて許可を得てから研究を開始した。実施に際しては、それぞれの機関において、ヘルシンキ宣言および厚生労働省が定めた『臨床研究に関する倫理指針』に従って研究計画を被験者に説明し、研究への参加を文書で同意を得てから検体を採取した。個人情報保護に関しては、各移植関連施設から東京大学医科学研究所へ送られてくる検体およびデータを匿名化して、個人と切り離して管理した。データの保存は、東京大学医科学研究所病態解析領域実験室（1号館2階）において、パスワードをかけたコンピュータと施錠した保管庫で行なった。

C. 研究結果

平成22年、原発性免疫不全症候群・研究班はSCIDに対する臍帯血移植のガイドラインを公表したが、渡辺は同・研究班の森尾友宏医師と本ガイドラインにそった移植におけるキメリズム解析のプロトコールを作成し、共同研究を開始した。また、岡山大学の高木章乃夫医師と生体肝移植後のキメリズム解析のプロトコールを作成し、共同研究を開始した。虎の門病院との1年間にわたる共同研究は、51症例を解析して11月に終了した。その結果、生着不全と再発の早期診断に有用であることが実証され、同病院・臨床検査室への導入が進められている。また、札幌北楡病院と秋田大学へは抗HLA抗体の送付と実技講習を通じてキメリズム解析法の導入を支援し、これらの移植施設における本法の実用化に貢献した。

D. 考察

全国規模での共同研究を通じ、キメリズム解析/HLA-Flow法が臨床検査法として極めて有用であることが認識された。計画の進行が

やや遅れたものの、平成23年度には虎の門病院、済生会前橋病院、および今村病院では、本法をミスマッチ移植の臨床検査として導入することを計画している。我が国で最も臍帯血移植数の多い虎の門病院（年間70例以上）で本解析法が導入されれば、全国の臍帯血移植施設における実用化の促進に大きく寄与することが予想されて、極めて有意義である。

E. 結論

虎の門病院をはじめとする全国の移植施設との共同研究で、HLA-Flow法はその有用性が移植医の間で認識された。現在、多くの移植施設への導入が完了、あるいは準備されるに至っている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suguro H, Mikami Y, Koshi R, Ogiso B, Watanabe E, Watanabe N, Honda MJ, Komiyama K, Asano M. Novel approach for transient protein expression in primary cultures of human dental pulp-derived cells. *Protein Expr Purif.* 2011 Feb 13. [Epub ahead of print]
2. Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimar K. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3(dim) CD7(low) subpopulation of CD4(+) T cells in

- acute-type adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 2011, 102(3): 569-77.
3. Mikami Y, Senoo M, Lee M, Yamada K, Ochiai K, Honda MJ, Watanabe E, Watanabe N, Somei M, Takagi M. Inhibitory Effects of a Tryptamine Derivative on Ultraviolet Radiation-Induced Apoptosis in MC3T3-E1 Mouse Osteoblasts. *J Pharmacol Sci.* 2011, 115(2): 214-220. Epub 2011 Jan 26.
 4. Yoshikazu Mikami, Yumiko Ishii, Nobukazu Watanabe, Tetsuo Shirakawa, Shinnosuke Suzuki, Seiko Irie, Keitaro Isokawa, Masaki J. Honda, CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells and Development*, 2010 [Epub ahead of print]
 5. Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Honda MJ, Ishii Y, Watanabe N, Ohshima H. Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. *Histochem Cell Biol.* 134(3): 227-241, 2010.
 6. Mizuno D, Agata H, Furue H, Kimura A, Narita Y, Watanabe N, Ishii Y, Ueda M, Tojo A, Kagami H., Limited but heterogeneous osteogenic response of human bone marrow mesenchymal stem cells to bone morphogenetic protein-2 and serum. *Growth Factors*, 28(1): 34-43, 2010.
 7. Agata H, Asahina I, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H., Characteristic change and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage. *Tissue Eng. Part A*, 16(2): 663-73, 2010.
2. 学会発表
 1. Naofumi Matsuno, Hisashi Yamamoto, Nobukazu Watanabe, Kazuya Ishiwata, Nobuaki Nakano, Masanori Tsuji, Yuki Asano-Mori, Naoyuki Uchida, Atsushi Wake, Madoka Narita, Hiromitsu Nakauchi, Shuichi Taniguchi, Engraftment kinetics of donor-derived lymphocytes early after reduced-intensity cord blood transplantation in adults. The 8th Annual International Umbilical Cord Blood Transplantation Symposium, Poster, June 5, 2010, San Francisco.
 2. 渡辺信和, 『HLA-Flow 法による造血細胞移植後早期の生着動態解析における骨髄系細胞解析の重要性』、厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班、平成 22 年 7 月 4 日（愛知がんセンター）
 3. Stephanie C. Napier, Satoshi Yamazaki, Nobukazu Watanabe, Naofumi Matsuno, Satoshi Takahashi, Akinobu Takaki, and Hiromitsu Nakauchi, Flow cytometric analysis of donor-recipient chimerism using anti-HLA antibody after HLA-mismatched hematopoietic cell and organ transplantation,

4. 山本久史、松野直史、渡辺信和、成田円、西田彩、島津浩、大田光、五十嵐夏恵、池邊太一、田結庄彩知、石綿一哉、中野伸亮、辻正徳、土橋留美子、森有紀、伊豆津宏二、内田直之、和気敦、米山彰子、牧野茂義、中内啓光、谷口修一、Rapid chimerism-switch of lymphocytes and phenotypic conversion of naïve T cells early after CBT-臍帯血移植後早期のドナー由来リンパ球の生着動態、第 72 回日本血液学会、平成 22 年 9 月 25 日（横浜）
5. Yamin Tian, Seiichiro Kobayashi, Nobuhiro Ohno, Masamichi Isobe, Mayuko Tsuda, Yuji Zaïke, Nobukazu Watanabe, Arinobu Tojo, Kaoru Uchimarū. Combination of CD3 and CD7 in multi-color FACS discriminates malignant cells in adult ATL patients. 第 72 回日本血液学会、平成 22 年 9 月 25 日（横浜）
6. Tadanori Yamochi, Yohei Morita, Toshiko Yamochi, Yosuke Sasaki, Nobukazu Watanabe, Seisi Ogawa, Atae Utsunomiya, Isao Hamaguchi, Kaoru Uchimarū, Hiromitsu Nakauchi, Toshiki Watanabe, Search for cancer stem cells in ATL. 第 72 回日本血液学会、優秀ポスター、平成 22 年 9 月 25 日（横浜）
7. 大野伸広、田垂敏、小林誠一郎、磯部優理、津田真由子、在家裕司、渡辺信和、東條有伸、内丸薫、HTLV-1 キャリア末梢血における Multi-color FACS : CD3 と CD7 の展開によるクローン増殖性リンパ球同定の試み、第 72 回日本血液学会、優秀ポス

H. 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
なし

厚生労働科学研究費補助金 医療技術実用化総合研究事業
分担研究報告書

HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による
臨床診断の有用性に関するエビデンス創出
研究課題：全国の移植施設との共同研究におけるプロトコール作成
研究分担者 高橋 聡（東京大学医科学研究所附属病院・准教授）

研究要旨

高橋と田野崎は第2回キメリズム解析研究会（平成23年2月1日、医科研1号館講堂）を開催し、医科研内外から演者を招いた。高橋は本研究会を基盤として、原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植、およびC型肝炎による肝機能障害に対する生体肝移植において、それらの病態解析に特化したキメリズム解析のプロトコール作成を支援した。

A. 研究目的

全国の移植施設でHLA-Flow法がHLAミスマッチ移植の臨床検査の手段として有効であるというエビデンスを確立するため、キメリズム解析研究会を開催し、全国規模でのキメリズム解析の臨床研究を推進するためのプロトコール作成を支援する。

B. 研究方法

第2回キメリズム解析研究会（平成23年2月1日、医科研1号館講堂）を開催し、医科研外からは虎の門病院、原発性免疫不全症研究班（いずれも臍帯血ミニ移植）、兵庫医大、済生会前橋病院（いずれもHLA半合致移植）、および岡山大学（生体肝移植）から演者を招いた。

（倫理面への配慮）

本研究では、多施設共同臨床研究を計画している。臨床研究を開始する前に、研究計画書をそれぞれの機関に設けられた倫理委員会に提出し、審査を受けて許可を得てから研究を開始する。実施に際しては、それぞれの機

関において、ヘルシンキ宣言および厚生労働省が定めた『臨床研究に関する倫理指針』に従って研究計画を被験者に説明し、研究への参加を文書で同意を得てから検体を採取する。個人情報の保護に関しては、各移植関連施設から東京大学医科学研究所へ送られてくる検体およびデータを匿名化して、個人と切り離して管理する。データの保存は、研究所へ申請した場所において、パスワードをかけたコンピュータと施錠した保管庫で行う。

C. 研究結果

本研究会を基盤として、原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植、およびC型肝炎による肝機能障害に対する生体肝移植において、それらの病態解析に特化したキメリズム解析のプロトコール作成を支援した。

D. 考察

ひとくちにキメリズム解析と言っても、その意義や至適解析法は、各移植法で大きく異

なっている。したがって、それぞれの移植の問題点をよく理解し、それらの病態解明に特化したプロトコールを作成することが、本解析法の有用性を示す上で重要と考えられる。

E. 結論

キメリズム解析研究会は、全国規模でのキメリズム解析の臨床研究を進める上で、有効な機能を果たしている。すなわち、本研究会を基盤として、原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植、およびC型肝炎による肝機能障害に対する生体肝移植に特化したプロトコールが作成された。平成23年度に入り、これらのプロトコールに基づいた臨床研究が進められている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakasone H, Kanda Y, Takasaki H, Nakaseko C, Sakura T, Fujisawa S, Yokota A, Yano S, Usuki K, Maruta A, Abe D, Hoshino T, Takahashi S, Kanamori H, Okamoto S; Kanto Study Group for Cell Therapy. Prophylactic impact of imatinib administration after allogeneic stem cell transplantation on the incidence and severity of chronic graft versus host disease in patients with Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia*. 24 (6): 1236-9, 2010.
2. Sato A, Ooi J, Takahashi S, Tsukada N, Kato S, Kawakita T, Yagyū T, Nagamura F, Iseki T, Tojo A, Asano S. Unrelated cord

blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with advanced myelodysplastic syndromes. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Apr 19. [Epub ahead of print]

3. Waki F, Masuoka K, Fukuda T, Kanda Y, Nakamae M, Yakushijin K, Togami K, Nishiwaki K, Ueda Y, Kawano F, Kasai M, Nagafuji K, Hagihara M, Hatanaka K, Taniwaki M, Maeda Y, Shirafuji N, Mori T, Utsunomiya A, Eto T, Nakagawa H, Murata M, Uchida T, Iida H, Yakushiji K, Yamashita T, Wake A, Takahashi S, Takaue Y, Taniguchi S. Feasibility of Reduced-intensity Cord Blood Transplantation as Salvage Therapy for Graft Failure: Results of a Nationwide Survey of 80 Adult Patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. Sep 14. [Epub ahead of print] 2010
4. Kako S, Morita S, Sakamaki H, Ogawa H, Fukuda T, Takahashi S, Kanamori H, Onizuka M, Iwato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kyo T, Sakura T, Jinnai I, Takeuchi J, Miyazaki Y, Miyawaki S, Ohnishi K, Naoe T, Kanda Y. A decision analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first remission who have an HLA-matched sibling donor. *Leukemia*. 25:259-65, 2011

2. 学会発表

なし

H. 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

なし

厚生労働科学研究費補助金 医療技術実用化総合研究事業
分担研究報告書

HLA ミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による
臨床診断の有用性に関するエビデンス創出
研究課題：造血細胞移植後の血小板のキメリズム解析
研究分担者 田野崎 隆二（国立がんセンター中央病院・医長）

研究要旨

田野崎と高橋は第2回キメリズム解析研究会（平成23年2月1日、医科研1号館講堂）を開催し、医科研内外から演者を招いた。田野崎と渡辺は、造血細胞移植後の血小板のキメリズムを測定する準備を、国立がんセンター中央病院で開始した。

A. 研究目的

国立がんセンターにおける造血幹細胞移植において、本キメリズム解析／HLA-Flow法により自己血小板産生能の検出を試みる。それにより、ドナー由来造血細胞の生着の程度や、血小板輸血の必要性の判断を迅速に行なえるようにすることが、本研究の目的である。

B. 研究方法

国立がんセンターで使用中のフローサイトメーターに対応した蛍光標識抗体を準備し、その染色性を検討する。抗HLA抗体は、市販の抗体を一式購入する。

（倫理面への配慮）

臨床研究を開始する前に、研究計画書を国立がんセンターに設けられた倫理委員会に提出し、審査を受けて許可を得てから研究を開始する。実施に際しては、それぞれの機関において、ヘルシンキ宣言および厚生労働省が定めた『臨床研究に関する倫理指針』に従って研究計画を被験者に説明し、研究への参加

を文書で同意を得てから検体を採取する。個人情報保護に関しては、検体およびデータを匿名化して、個人と切り離して管理する。データの保存は、パスワードをかけたコンピュータと施錠した保管庫で行う。

C. 研究結果

国立がんセンターで使用中のフローサイトメーター（FACS Calibur、Beckton-Dickinson社）では、FITC／PE／PerCP-Cy5.5／APCを標識した抗体の使用が可能である。

田野崎と渡辺は、人工キメリズム検体を作製してキメリズムを解析し、その有効性を確認した。

D. 考察

造血細胞移植後のドナー由来血小板の増加は、その後の血小板輸血の必要量を推定するのに参考になるとと思われる。

E. 結論

国立がんセンターにおいて、造血細胞移植後の末梢血の血小板分画のキメリズム解析を可能とした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fuji S, Kim SW, Mori S, Furuta K, Tanosaki R, Heike Y, Takaue Y, Fukuda T. 2010. Decreased insulin secretion in patients receiving tacrolimus as GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 45:405-406.
2. Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Tomonaga M, Harada M, Yamanaka T, Kannagi M, Okamura J. 2010. Long-term outcomes after hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective trials. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Apr 19. [Epub ahead of print]
3. Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. 2010. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood* 116(8): 1369-76.
4. Kakugawa Y, Kami M, Matsuda T, Saito Y, Kim SW, Fukuda T, Mori S, Shimoda T, Tanosaki R, Saito D. 2010. Endoscopic diagnosis of cytomegalovirus gastritis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *World J Gastroenterol* 16(23):2907-2912.
5. Yokoyama H, Mori S, Kobayashi Y, Kurosawa S, Saito B, Fuji S, Maruyama D, Azuma T, Kim SW, Watanabe T, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y, Fukuda T. 2010. Hematopoietic stem cell transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute leukemia: a single-center analysis of 47 patients. *Int J Hematol* 92(2): 334-341.
6. Imataki O, Kamioka T, Fukuda T, Tanosaki R, Takaue Y. 2010. Cost and effectiveness of reduced-intensity and conventional allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Support Care Cancer* 18(12): 1565-1569.
7. Tanosaki R and Tobinai K. 2010. Adult T-cell leukemia-lymphoma: current treatment strategies and novel immunological approaches. *Expert Rev Hematol*. 3:743-753.

2. 学会発表

なし

H. 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

なし