

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

同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の
共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野
に入れた成績の向上に関する研究
(H20 - 免疫 - 一般 - 016)

平成20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 谷口 修一

平成23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	
同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーと レシピエントのQOLを視野に入れた成績の向上に関する研究.....	1
	谷口 修一
II. 総合研究報告	
新しいAML腫瘍マーカーの開発に関する研究.....	13
	浜口 功
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	17
V. 研究成果の刊行物・別刷.....	21

I. 総合研究報告

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）

総合研究報告書

「同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究」

研究代表者 谷口 修一 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 血液内科 部長

研究要旨：TRUMP による造血細胞移植登録一元化は定着し、年々登録数も増加し成果を挙げ、懸案であった移植成績の国際間共有もアジア、ヨーロッパ、アメリカをつなぎ、着々と進んでいる。移植を取り巻く血縁ドナーや家族擁護および環境整備のためのデータマネージャー、CLS、移植コーディネーターなどの整備が急務である。同種移植独特の問題点である感染症の管理、GVHD の制御、GVL の強化、ドナーの拡大は依然として取り組むべき大きな課題として残っている。ドナーの拡大を目的に血縁 HLA 不適合移植法を本邦が開発した母子間の免疫学的寛容と免疫抑制強化の 2 点から確立する。GVHD については診断治療のガイドラインを国際標準に合わせて改訂し、リツキシマブやベクロメタゾンを用いた新規治療法の開発研究を行い、その安全性と有効性を確認した。日本が提唱した TMA の概念について、消化器症状を呈し、下部消化管組織検査を行った症例での TMA の関与について研究を継続した。移植後の感染症のモニタリングを多種類の微生物に対して少量の検体、低価格で行い、早期診断早期治療を可能とする高感度多項目迅速低価格微生物検出システムを開発し、他の施設への技術移転も開始した。世界におけるワクチン開発について調査した。新規急性骨髄性白血病（AML）の腫瘍マーカーを血漿レベルで開発した。臍帯血移植において特にサイトメガロウイルス（CMV）に対する抗原特異的な免疫回復について解析するとともに、CMV 再活性化と予後との関連を検討した。移植後再発の制御も大きな問題であり、移植後の腫瘍免疫強化の研究を白血病関連抗原である CDK2 ペプチド特異的 CTL の誘導に焦点を当てて行った。移植後長期生存患者の QOL 調査を行い、移植後急性腎障害と予後の関連を検討した。移植中のリハビリの有用性、眼 GVHD 評価についても検討し、患者家族の QOL についても問題提起した。

研究分担者

鈴木 律朗	名古屋大学医学部 造血細胞移植情報管理・生物統計学 准教授	浜口 功	国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長
土田 昌宏	茨城県立こども病院 病院長	森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院 准教授
秋山 秀樹	東京都立駒込病院 内科 部長	中尾 眞二	金沢大学大学院医学系研究科 教授
原 雅道	愛媛県立中央病院 がん治療センター長	高橋 聡	東京大学医科学研究所 准教授
岡本真一郎	慶應義塾大学医学部 血液内科学 教授	一戸 辰夫	京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学 助教
豊嶋 崇徳	九州大学病院 遺伝子・細胞療法部 准教授	小川 啓恭	兵庫医科大学 内科学講座血液内科 教授

A. 研究目的

我が国の移植症例の登録を移植に関わる異なる団体である学会やバンクが一体となり、その一元化登録を行い、造血幹細胞移植患者情報に関して、移植施設における実施件数・移植成績をより正確に把握するためのシステムおよびツールの確立し、その運用を図る。また国内だけでなく、アジア、米国、欧州で国際間の共有を目指す。移植成績を日本だけでなく特に HLA が近いとされるアジアと共有することにより国内だけでなくアジア全体の移植医療の発展に寄与し、引いては国際的な標準的移植治療の確立に貢献する。ドナーの拡大を目的に血縁 HLA 不適合移植法を本邦が開発した母子間の免疫学的寛容と免疫抑制強化の 2 点から確立する。血縁ドナーについては、患者の家族であるために患者家族と独立した意志決定作業が行いにくく、その権利の擁護、特に小児においては家族の意志決定援助についてのモデルを作成、また患児兄弟に対しても、臨床心理士、チャイルド・ライフ・スペシャリスト（以下 CLS）の立場から、同胞支援チームプロジェクトを行う。同種移植独特の GVHD、TMA、感染症は移植後早期の重篤な合併症で致命率も高い。GVHD について、わが国の GVHD 診断のガイドラインは 1999 年に作成され、現状と合致しない点や、国際基準との相違がみられ、臨床研究遂行に障害となっている面があり、その改定を行った。Rituximab とベクロメタゾンをを用いた新規治療法の開発の臨床研究を行った。日本が提唱した TMA の概念について、消化器症状を呈し、下部消化管組織検査を行った症例での TMA の関与について研究する。移植後の感染症のモニタリングを多種類の微生物に対して少量の検体、低価格で行い、早期診断早期治療を可能とする高感度多項目迅速低価格微生物検出システムを開発する。新規急性骨髄性白血病（AML）の腫瘍マーカーを血漿レベルで開発する。Naïve な T リンパ球が移植される臍帯血移植において特にサイトメガロウイルス（CMV）特異的免疫回復を解析し、リンパ球による免疫再構築を詳細に検討し、CMV 再活性化と夜ごとの関連についても検討する。移植後再

発の制御も大きな問題であり、移植後の腫瘍免疫強化の研究を白血病関連抗原である CDK2 ペプチド特異的 CTL の誘導に焦点を当てて行う。都立駒込病院で移植後長期生存患者の QOL 調査と移植後急性腎障害と予後の関連を検討した。慶応大学において移植中のリハビリテーションの QOL の及ぼす有用性、眼慢性 GVHD に関する NIH 診断基準と重症度スコアの validation study、患者家族の QOL 調査を行った。

B. 研究方法

我が国の移植症例の登録を、日本骨髄バンク、日本臍帯血バンクネットワーク、小児血液学会、造血細胞移植学会の異なる団体が共同作業でその一元化登録実施を開始し、現在はより合理的なシステム、国際間の共有をめざす（鈴木）。

土田らは、小児同胞ドナーを中心に権利擁護について、多職種がチームを組んで、十分な理解の下での提供実現のためのプログラムを実施してきた。特に臨床心理士が、このプロセスを客観的に評価する役割を担う研究を行った。また患児兄弟についても注目し、チャイルド・ライフ・スペシャリスト（以下 CLS）の立場から、同胞支援チームプロジェクトに参加することを通じて、子どもの代弁者としての立場から、プロジェクトを評価し、また自ら関与することの有用性と、病院全体に関する、同胞および家族支援に関する課題について考察する（土田）。

都立駒込病院における長期生存例 337 例を対象にした QOL を臨床的特徴の後方視的な調査を行った。また慢性腎臓病（CKD）は同種造血幹細胞移植（HCT）後長期生存者の合併症であるが、その発生率と有病率の推移を長期間経時的に解析した。1990～1999 年に駒込病院で HCT を施行され 10 年以上生存した 77 例のデータベースを後方視的に解析した（秋山）。

研究協力者の所属する各施設にて 2002 年 1 月から 2007 年 12 月までの 6 年間に同種造血幹細胞移植を施行した患者で、移植後 TMA、急性 GVHD II 度以上と診断した症例および移植後、腹痛、下痢、消化

管出血を呈した症例で、下部消化管内視鏡検査にて組織生検を行った症例を対象として、可能な症例では生検材料を用いて新たにHE染色、免疫染色標本を作製し、3名の病理医師のもとで中央診断を行う。組織標本からGVHD、TMA、CMV感染症診断にそれぞれ使われている病理学的項目を検討し、診断、治療に寄与する病理組織学的項目を抽出する。一方臨床データも同時に集積して、臨床所見、検査所見、病理所見から総合的に検討し、病態の層別化を図る。その結果得られた種々の因子から消化管TMAの病態を明らかにする。さらに消化器病変を呈する移植症例の病態別ステロイドの使用法等、治療方針を確立する(原)。

慶應義塾大学移植チームでは同種移植を受けた成人患者(年齢18歳以上)35症例全例に移植前よりリハビリテーションを行い、運動負荷試験を移植前後で評価した。また移植後100日を超えて無再発生存した83症例を対象に、NIH、Classic Dry Eye(CDE)、Dry Eyes Workshop(DEWS)各々の診断基準と重症度スコアを算定し比較を行うとともに、眼GVHDの治療反応性との相関を検討した。眼慢性GVHDに関するNIH診断基準と重症度スコアのvalidation studyを行った。また患者家族に対し、質問票を用いて、心理的問題・介護負担感・生活の質の各側面から評価を行った。心理状態は日本語版Profiles of Mood States(POMS)、生活の質はMOS Short-Form 36-Item Health Survey(SF-36)、介護負担感についてはCaregiver Reaction Assessment(CRA-J)によって評価した。患者の年齢、疾患名などの基礎データは、研究分担者が診療録より情報を得た(岡本)。

豊嶋らは治療抵抗性慢性GVHDに対し、rituximab療法の有用性を検討する臨床試験を行った。また福岡BMTグループで、2008年10月から2010年10月までに同種移植を施行され、消化管GVHDに対して、ベクロメタゾンが投与された14例について検討した(豊嶋)。

サイトメガロウイルスワクチンの国際的な開発状況について調査した。国際的に数社が第1-2相試験に入っており本邦でも導入を目指す。ALLCELL

社より購入したAML患者血漿を用いてHE4 EIA Assayを行った。HE4の測定は、HE4 EIA kit(富士レビオ)を用い、添付の説明書に従って行った(浜口)。

移植後の感染症のモニタリングを多種類の微生物に対して少量の検体、低価格で行い、早期診断早期治療を可能とする高感度多項目迅速低価格微生物検出システムを開発する。他施設での技術移転を進める(森尾)。

移植後再発の制御も大きな問題であり、移植後の腫瘍免疫強化の研究を白血病関連抗原であるCDK2ペプチド特異的CTLの誘導に焦点を当てて行う。CDK2158特異的CTLを誘導し、CDK2+GITRL+骨髄性白血病細胞に対するCDK2-CTLの細胞増殖活性、CDK2158-CTLのCDK2+GITRL+骨髄性白血病細胞に対する細胞傷害活性を検討した。抗GITR抗体添加によるGITR/GITRL結合阻害が、CDK2158-CTLの細胞傷害活性に与える影響を検討した(中尾)。

高橋らは、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。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。また東大医科研病院で生着後から退院までの約3~4ヶ月間、2回/週の頻度でCMV抗原血症をC10/C11法で測定し、陽性の場合にはpreemptive therapyとしてガンシクロビル5mg/kgを投与している。入院中にCMV再活性化(抗原血症陽性)が10回以上認められた群を高頻度陽性群、それ未満の場合は陰性・低頻度陽性群と定義し、臨床経過についての比較を行った(高橋)。

一戸らは、妊娠中の母児間に見られる双方向性の非自己抗原への接触が、妊娠終了後のそれぞれの免疫系に影響を及ぼし得るという知見を背景

に、特に「非遺伝母 HLA 抗原 (non-inherited maternal HLA antigens, NIMA)」に対する獲得免疫寛容機構の存在を前提とする HLA 不一致血縁者間造血幹細胞移植の開発を試みてきた。これまでの研究により、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考えられるため、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。また在胎期間中および出生後の NIMA に対する曝露過程が、以降の NIMA への免疫応答に及ぼす影響を評価することを目的として、マウス骨髄移植モデルを用いた検討を行った。最終年度は血清あるいは細胞培養液・細胞可溶化液中に存在する HLA-G 蛋白の定量的な検出を行うことを目的として、サンドイッチ ELISA 法による測定系の確立を試みた(一戸)。

HLA半合致ミニ移植療法の確立を目的として、多施設共同第I/II相試験を行った(小川)。

(倫理面への配慮)

基本的にすべての臨床試験において、対象となる患者及びドナーに対し研究の全容を説明し文書による同意を得て実施する。研究に参加する各施設において施設倫理審査委員会の承認を得てから実施する。臨床試験のプロトコールを実施するに当たっては、必要に応じ日本造血細胞移植学会臨床研究委員会にも提案し審議を仰ぐこととする

C. 研究結果

血縁移植例に関しては、毎年1月に前年1年間に施行された造血幹細胞移植の「台帳登録」を行った。成人領域施設の登録施設数の推移は2003年度が164施設、2004年度が151施設、2005年度が137施設であった。TRUMPによるデータ収集を始めた2006年度は159施設、2007年度は170施設と増加が認められた。2008年度は180施設と更に増加した。2009年度の177施設であったが、2010年度は201施設と大幅に増加した。小児領域では施設数は2003年度が85施設、2004年度が69施設、

2005年度が59施設、2006年度が47施設と減少傾向にあったが、2007年度は74施設に増加した。2008年度は71施設と前年度並みであったが、2009年度80施設から2010年度100施設と大幅に増加し、ともに過去最高の施設数を更新した。TRUMPを使用しない、紙の調査用紙による登録は、2009年度では成人領域1施設のみであった。2010年度の調査(2009年に実施した移植)では全国で4438件の造血細胞移植が行われたと報告された。前年の4306件より増加している。移植片の由来をみると、同種移植が2922件、自家移植が1506件で、いずれも前年度より増加した。また、移植片不明が10件あった。過去には、郵送の過程でのUSBメモリの紛失事故が数件あったが、昨年度に引き続き本年度も事故はなかった。コンピューターウイルスの送付データ媒体への混入も、本年度はなかった。各施設が、データやコンピューターの扱いに習熟してきたためと考えられる。なお、本年度から始めたデータのWeb送信でもトラブルはなく、患者個人情報の漏洩はなかった。本年度はアジアに加えオセアニア地区からも、移植件数情報が寄せられた。日本・韓国・中国をはじめとするアジア13か国とオーストラリア・ニュージーランドの15か国で2008年に行われた造血細胞移植は10,393件で、これまでの累計では95,417件に達した。このうち47,436件(49.7%)が本邦で実施されており、日本の比率は初めて半数を下回った。他にはオーストラリアで16,205件、韓国で12,388件が行われており、フィリピンは27件、ベトナムでは81件と少なく、国によって大きな差が認められた。移植施設数も日本では370施設(内科・小児科は別々にカウント)と多かったが、次に多いのは韓国の42施設であり、その他の国々では少数施設が移植を行っていた。またアジア太平洋造血細胞移植学会(Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group, APBMT)は、米国のCIBMTR(Center for International Blood and Marrow Transplantation Research)およびヨーロッパのEBMT(European Blood and Marrow Transplantation Group)と共同でWBMT

(World-wide Blood and Marrow Transplantation Association)という機構を作り、世界レベルで造血細胞移植データを共有する動きが開始された(鈴木)。

小児の血縁ドナーおよび候補者の権利擁護に臨床心理士がかかわる研究では、従兄弟からの骨髄提供のケースについて詳細に検討した。幼少より兄弟同様に成育されていた従兄弟も小児同胞ドナーの場合と同じような心理的状态であると考えられた。小児の従兄弟からの骨髄提供についても同胞ドナーと同様の説明と同意のプロセス、臨床心理士による理解度や心理状態の評価、同意の有無の評価は重要である。また臨床心理士による評価を行った結果、骨髄提供プロセスにおけるチームアプローチは、これまで疎外されがちであった同胞に目を向け、早期から家族が一体となって闘病することの重要性をあらためて認識するものとなった。CLSの立場から、同胞支援チームプロジェクトに参加することを通じて、1)親を通じた支援：きょうだい児への配慮が必要なことになるべく早く気づいてもらう。治療を通して、きょうだい児の様子を聞く、2)多職種との連携：説明時の内容や伝える方法を一緒に検討する、①病気は誰のせいでもないこと、②うつる病気ではないこと、③入院期間や最初の外泊時期の目安、3)きょうだい児との関わり：①病院やスタッフに親しみを持てる環境作り、②医師の説明に同席。その後、遊びや話を通して理解を促進する、③きょうだい児も頑張っていることを認め、スタッフも心配していることを伝える、④入院生活の様子や変化を知ってもらう、⑤きょうだい児が感じやすいという様々な感情について話す、⑥処置や検査が必要な場合にはプリパレーションを行う(土田)。

秋山らによる都立駒込病院における長期生存例337例を対象にしたQOLを臨床的特徴の調査では、最終的に生存例は290例(86%)、死亡例は47例(14%)であった。晩期合併症として頻度が多い疾患は、糖尿病・高脂血症・高血圧・慢性腎機能障害・移植後肺障害・二次がんであった。腎機能障害例は47例認め、観察終了時点で3例が維持透析を導

入されており、1例では生体間腎移植を施行されていた。糖尿病は26例において診断されていた。死亡原因は、再発19例、移植後肺障害9例、感染症9例(非再発)、二次癌6例、脳出血2例、肝不全1例、心不全1例であった。また約2割で十分な追跡調査ができていない現状も明らかとなった。また新規CKD発症率はHCT後1年目が10%で最も高く、以後は毎年約2%で一定であった。したがって、CKD有病率は観察年数に伴い漸増した(移植5年目22%、10年目33%)。5年目CKDの関連因子は前処置放射線照射(TBI/TLI)(OR, 12)、AKI(OR, 11)、移植時年齢(OR, 1.1)、10年目CKDのそれは移植時年齢(OR, 1.1)、TBI/TLI(OR, 22)、慢性GVHD(OR, 5.4であった(秋山)。

2011年1月現在、TMA研究に登録された症例は145例で、登録症例の病理組織標本作製は完了した。臨床事項登録145例の解析では血縁者間移植49例、非血縁者間移植96例、移植方法別では骨髄移植82例、末梢血幹細胞移植37例、臍帯血移植26例、前処置別では骨髄破壊的前処置施行例92例、骨髄非破壊的前処置施行例53例、GVHD予防はCsA+MTX61例、CsA単独9例、FK+MTX64例、FK単独11例、生検日は移植後12~203日であった(原)。

岡本らのリハビリテーションの有効性に関する研究では、Peak V02変化に関与する因子としては、Hb値および握力の変化、VT変化に関与する因子としては、Peak V022及びAlb値の変化が挙げられた。また、移植前後および退院時で評価した15例で分析を行った結果、Peak V02の変化と他の項目に有意な相関は得られなかった。FACT-BMTスコアは退院へ向けて徐々に改善した。眼GVHDのNIH診断基準のvalidation studyでは、他の診断基準と比較して、軽症例に慢性GVHD以外のドライアイが含まれる可能性と、大多数のGVHD症例が中等症に分類されることが確認された。さらに、NIH重症度スコアで軽症と中等症と診断された症例の治療効果と眼GVHDの予後に関しては明らかな有意差は認められなかった。患者家族のQOL調査は66人(男性29人、女性37人)に対して行われた。POMS

の各尺度について、基準となる一般人口の標準値と比較すると、標準値以下（平均値-1標準偏差以下）はそれぞれ緊張-不安：6人（9.1%）、抑うつ-落込み：9人（13.6%）、怒り-敵意：8人（12.1%）、活気：11人（16.7%）、疲労：13人（19.7%）、混乱：10人（15.1%）であった。いずれの尺度でも標準値以下とならなかったのは17人（25.8%）のみで、残りの49人（74.2%）は少なくとも一項目以上について標準値以下を示していた。SF-36の各尺度について標準値と比較すると、標準値以下の者は身体機能：6人（9.1%）、日常役割機能（身体）：14人（21.2%）、体の痛み：6人（9.1%）、全体的健康感：3人（4.5%）、活力：7人（10.6%）、社会生活機能：10人（15.1%）、日常役割機能（精神）：12人（18.2%）、心の健康：9人（13.6%）であった。いずれの尺度でも標準値以下とならなかった者は39人（59.1%）だった。CRA-Jについては標準値が存在しないため、3点をカットオフ値として解析した。カットオフ値以下は、日常生活への影響：10人（15.1%）、他の家族からのサポート：2人（3.0%）、経済的な影響：5人（7.6%）、健康状態への影響：10人（15.1%）、ケアに対する受け止め：14人（21.2%）であった（岡本）。

従来のがが国でのGVHD診断ガイドラインが上梓されて9年経過しており、国際的なコンセンサスと合致しない点が多々みられ、専門家のヒヤリングを行い、ほぼ欧米の基準と合致したものを作成した。豊嶋らの研究で、わが国におけるGVHDのrituximab療法への反応は欧米より報告されている奏功率に比べ低いことが判明した。その原因を検討したところ、欧米では不可逆的と考えられる病変を評価対象から除外したり、非進行性であれば有用と判定したり、治療効果判定基準を弾力的に運用していることがわかった。ベクロメタゾン投与した14例の内訳は骨髄移植10例、臍帯血移植4例であった。GVHDはグレードIIaが11例、それ以上が3例であった。臍帯血移植では50%に有効、骨髄移植では80%に有効であった。グレードIIaでは91%に有効であった。重篤な有害事象はみられなかった（豊嶋）。

浜口らは世界でのCMVワクチンの開発の調査を行った。ワクチン名ALVAC-CMVは現在第2相臨床試験に入っており、骨髄提供前にドナーにワクチン（ALVAC-CMV）接種を行った後に、NIHの骨髄移植プロトコールに従い移植を行い、患者のCMV感染および症状の評価を行うものである。また、CMVタンパク質pp65、gB、IE1に対するDNAを用いたDNAワクチンの開発も進んでいる。米国における第2相臨床試験では、DNAワクチンがレシピエントのみに接種された場合にも、CMV抗原に反応するT細胞の誘導が図られ、有効であることが中間報告された。CMV特異的な免疫回復移植前にCMV抗体陽性33名の中で31名では移植後4ヶ月以内にCMV抗原血症の陽性化を認め、抗ウイルス療法を受けた。この31名中30名（94%）でCMV抗原反応性CD4陽性細胞が検出された（移植後1ヶ月目：57%；2ヶ月目：81%；3ヶ月目：79%；4ヶ月目：84%）。また、14名（42%）ではCMV抗原反応性CD8陽性細胞が検出された（移植後1ヶ月目：15%；2ヶ月目：19%；3ヶ月目：33%；4ヶ月目：32%）。これらは、CMVメモリー細胞がグラフト中に存在する骨髄・末梢血移植の場合とほぼ同等（CMV抗原反応性CD4陽性細胞は18/21（86%）で検出、CMV抗原反応性CD8陽性細胞は12/21（57%）で検出）の免疫再構築であった。またAML患者（N=7）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、健康人の血漿（N=5）のHE4値は、22-82pM（平均値40pM）であったのに対しAML患者（N=7）では46-255pM（平均値132pM）と高値であることが明らかになった（浜口）。

HSV1, HSV2, EBV, VZV, CMV, HHV6, HHV7, ParvovirusB19, BKV, JCV, ADVの12種類のウイルスについて96ウェル（12X8）対応のマルチプレックスPCR ready 試薬分注済みプレートを開発した。さらに陽性ウェルに対しては、個別のPCR（半定量）を行えるようなプレートを用意した。本試薬は凍結タイプであり、融解凍実験において、その耐用性を実証した。本方式の安定性は高いが、-80℃保存という問題点があり、以前作成した室

温にて保存可能な固相化 PCR ready プレートを改良して、耐用性試験を実施した。その結果、室温にて最低 3 ヶ月は安定であることが明らかになった。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。上記のリアルタイム PCR 系は、詳細な手順について SOP を作成した。また同システムは、日本国内の 5 施設に技術移転した(森尾)。

中尾らの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研究では、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、sGITRL および GITR+exosome によって T 細胞増殖が抑制される事を示した。また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ン (Kyn) は濃度依存性に T 細胞の増殖を抑制し、GITR/GITRL 結合は白血病細胞内 IDO 活性を上昇させ、kyn 生成を誘導した。移植後 CDK2 ペプチド特異的 CTL が検出される機序として、移植前に残存する白血病細胞由来樹状細胞 (leukemic dendritic cell: LDC) がドナーの naiveCD8T 細胞を刺激して CDK2 ペプチド特異的 CTL を誘導すること、②LDC は抑制性シグナル分子の一つである GITR (Glucocorticoid-induced TNFR-related protein) のリガンド (GITRL) を発現しており、GITR/GITRL 結合が naiveCD8T 細胞から CDK2 ペプチド特異的 CTL の誘導を抑制していることを明らかにした。GITR/GITRL 結合阻害によって、CDK2-CTL の細胞増殖および傷害活性が増強した。CDK2+GITRL+骨髄性白血病細胞と共培養後、CDK2158-CTL の 5.3% が IFN γ 陽性であったが、共

培養の際に抗 GITR 抗体を添加することによって IFN γ 陽性細胞は 9.1% に増加した。一方、CDK2158-CTL のみの培養では IFN γ 産生細胞は 2.2% であった(中尾)。

高橋らは、まず IFN- γ 産生細胞の検出による CMV 反応性 CD4 陽性 T 細胞の移植後 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%) であることを示した。テトラマー法を用いた CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞では、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。また、血清型あるいはアレル型を用いた 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。臨床所見との関連も検討したが、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。CMV 再活性化と HLA 一致度について検討したが、HLA 適合度による影響は認めなかった。好中球および血小板回復についてみると、CMV 抗原血症高頻度陽性群で造血回復が不良である傾向がみられた。グレード III あるいは IV 度の急性 GVHD および全身型慢性 GVHD の発症率は、それぞれ高頻度陽性群で 29% と 65%、陰性・低頻度陽性群で 9% と 26% と、単変量解析では有意に高頻度陽性群で高かった。3 年生存率は、高頻度陽性群で 61%、陰性・低頻度陽性群で 73% であったが群間に有意な差は認めなかった。入院期間について解析を行ってみると、陰性・低頻度陽性群 105 日に比べて高頻度陽性群では中央期間は 161.5 日と有意に長期にわたっており、この入院期間の長期化は多変量解析でも有意であった (P = 0.037) (高橋)。

Mold らは、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。また、van Halteren らは、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。また NIMA に対する免疫寛容の成立機構の検討は、遺伝的な背景が類似し、NIMA : H-2d への曝露経路が異なる 3 群の H-2b/b ドナー ([in utero+oral] 群、[in utero] 群、[oral] 群) から B6D2F1 : H-2b/d への HLA 半合致な骨髄移植を比較すると、[in utero+oral] 群において GVHD スコアが最も低く、生存率も最も高いという結果が得られた。一方、[in utero] 群、[oral] 群をドナーとする移植においても NIMA に曝露されていないコントロール H-2b/b ドナーからの移植と比較すると、GVHD スコアは有意に低く生存率もすぐれていた。また、このような NIMA への寛容が長期間維持される可能性を検討するため、28 週齢の [in utero+oral] 群をドナーとして同様の移植実験を行ったところ、週齢を一致させたコントロール H-2b/b マウス (NIMA への曝露歴なし) をドナーとする移植時と比較して、GVHD スコアは低く、生存率も有意にすぐれていた。[oral] 群における NIMA 寛容の成立・維持機構への CD4+CD25+制御性 T 細胞の関与が示唆された。MEM-G/9 あるいは G233 を用いたサンドイッチ ELISA 法により、1%BSA-PBS を HLA-G の溶解に用いた場合と同様に、細胞可溶化バッファー中に存在する種々の濃度の精製 HLA-G 蛋白を定量的に検出することが可能であった。MEM-G/9 を用いた測定系では 1~20 ng/ml の範囲で、G233 を用いた測定系では 0.05~1.0 ng/ml の範囲で線形の検量線を作成することが可能であった(一戸)。

HLA 半合致ミニ移植療法第 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 20 例の登録があり、試験が進行中である(小川)。

D. 考察

疫学情報・人口統計学的情報は臨床研究を行う上での土台となるものであり、それらの情報収集体制の整備は極めて重要である。登録形態の変更や調査項目数の増加などから、登録率の低下が危惧されたが、TRUMP 導入前を上回る数の施設から登録があり、増加傾向は続いている。電子登録の採用を行わなかった施設は 301 施設中 1 施設 (0.3%) であり、電子登録の定着状況は良好であった。今後、登録データのチェック・クリーニングにより、欠損データの収集など質の向上に務めると同時に、収集データを集計解析して社会還元するシステムの構築が必要であると考えられる。アジアおよび世界における造血細胞移植データの共有化に関しては端緒についたばかりであるが、着実な進歩がある。アジア各国の研究者も同様の考えであるが、各国の医療体制や集計補助体制の整備状況も様々であり、今後の体制構築が望まれる。特にアジアにおいては、日本の体制構築における役割が各国より期待されており、それに応えて行くことが我が国の使命であると考えられる。

土田らは臨床心理士や CLS を含む小児血縁ドナーに対するチームアプローチの重要性を確認した。また病院ですごく子どもたちよりも、取り残されやすい立場にいるのが「きょうだい児」である。兄弟姉妹の入院で、突然生活環境が変わり不安定になるきょうだい児も少なくない。当院においても、きょうだい児の登園拒否や不登校などの

不適応事例を経験している（H21年度研究報告）。不適応の背景には様々な要因があるが、兄弟姉妹の入院がきっかけとなっていることもある。きょうだい児にとっても、理解に応じた説明を受ける権利があり、親や兄弟姉妹と過ごす権利があり、非日常的な出来事に対応するために専門のスタッフからサポートを受ける権利がある。当院では、長期入院の場合できるだけ入院当初にきょうだい児に来院してもらい、スタッフから病気や病院での兄弟姉妹の様子を説明している。一方でCLSの立場から見ると、きょうだい児が来院しやすい環境についてはまだ検討の余地が残っている。面会時のスペースや待ち時間の「見守り者」の不在は、きょうだい児をつれてくるのをためらわせている。現在ある保育のボランティアをさらに充実させ、ハード面での設備の充実させることが求められている。小児血液腫瘍疾患患児は長期の入院治療が中心となるため、家族全体を対象とする援助が必要である。その1つのプロジェクトとして、同胞や家族支援チームにおけるCLSは子どもの代弁者として、また客観的評価者として大きな役割を持つと考えられた。

移植後長期生存例において、臓器障害や二次癌・代謝異常など様々な疾患が問題になっており、QOLの低下の原因になっている可能性が示唆された。東京都立駒込病院では、造血幹細胞移植後の患者の約4割は、院外（主に紹介元）に通院しており、毎年主治医にフォローアップの資料を送付して、現状や結果を収集している。主治医より返事が得られない場合には、患者本人に郵送して病状や健康上の問題点・採血結果も可能な範囲で送付してもらっている。しかし、2008年度のフォローアップデータの調査における回収率は、主治医への調査では82%、患者本人への調査では66%であった。今回検討した移植後長期生存例に限ると約2割で十分な追跡調査が出来ていない。また回収されたデータや、院内でフォローアップしている症例に関しても、血圧や代謝異常項目などについて、定期的にフォローされておらず、データの欠損が目立った。今後長期生存例のQOLに関わる因

子の抽出を行う上で、施設内はもちろんのこと、施設間でも統一したフォローアップ体制を構築する必要があると考えられた。同種移植後の急性腎障害の頻度は骨髄破壊的前処置とミニ移植ではほぼ同等であり、これらは自家移植に比して明らかに高いものであった。腎障害の程度と同種移植後の非再発死亡が関連していることを示した。10年目CKD有病率（33%）は欧米の既報（4.5-10%）に比べ高かったが、後者は継時的な解析による結果ではない。移植後AKIは5年目CKDの関連因子であるが、10年目CKDの因子ではなかったことは、AKIのCKDに対する影響は移植後早期に強く関わりますが、長期の経過で減弱していくことを示唆する。HCT後CKDの有病率は経年的に増加し5年目で22%、10年目で33%である。移植後AKIは5年目CKDのみに有意に関連するが、移植時年齢とTBI/TLIは両CKDに共通した関連因子である。

豊嶋らは欧米よりGVHDの新たな治療効果判定基準が提唱されたものの、その運用面で問題点があることを指摘した。今後このような問題点について欧米の研究者と意見交換する必要があることを提案している。腸管GVHDに対するベクロメタゾン療法は、少数例での解析であるが上部消化管病変に対し特に有効性が高い傾向を認めた。また安全に投与が可能であった。大規模な試験での評価を実施する価値がある。

TMA、GVHD症例あるいはCMV感染症症例が混在しているが、登録症例は骨髄移植例、非血縁者間移植例、骨髄破壊的前処置症例が多い傾向が見られた。消化管TMAの病態を臨床病理学的に検討した研究はこれまで報告がなく、本研究の結果が期待される。

岡本らの移植中のリハビリテーションの研究により、physical fitnessの低下を最小限に抑えてQOLをより向上させるためには、訓練とともに内科管理上の工夫も有効である可能性があり、症例数を増しての再検討とともに、疾患、移植前処置、合併症の程度、などの要因も加味してさらに構造分析を行っていくことの重要性が示唆された。眼GVHDの新規治療法に関する臨床研究の対象症例の

選定に NIH 診断基準を役立てるためには、BUT などの涙液分泌機能検査などを複数併用して機能的診断を加えた中等症の基準を再検討するとともに、その prospective な validation を行うことの重要性を示した。POMS の結果より、造血幹細胞移植患者の家族ではなんらかの心理的な問題を抱えている割合が高いことがわかった。また、心理的問題を抱えている家族の割合と、移植からの時間や再発の有無とは相関は見られず、今回の調査からは、再発なく移植から数年経過しても家族の心理的問題は残存する可能性が示唆された。SF-36 の結果からは、心理的問題だけでなく身体機能、社会生活機能が低下している家族も多いことがわかった。一方、CRA-J の結果からは、当院で移植を受けた患者は、比較的経済的な問題は少なく、家族間のサポート力も大きいケースが多いと考えられたが、それらの問題が少なくにも関わらず心理状態や QOL が低下している家族が多く認められることより、主治医チームと精神科医や心理士、ソーシャルワーカー等の専門職との連携を図り、介護者である家族に対しても必要なサポートを提供していく体制の構築が重要と考えられた。本研究より、同種造血幹細胞移植において、患者家族の心理的状态、生活の質が一般人口に比べて低下している割合が高いことが示唆された。長期間の闘病生活を支える家族が疲弊することなく患者をサポートできるよう、医療者が患者だけでなく家族にも支援を行っていく必要があると考えた。

CMV ワクチンによる CMV 再活性化の予防は造血幹細胞移植において、新たな方法として期待が持てる。とくに海外において開発が進められている DNA ワクチンには CTL 効果が報告されており、第 2 相の臨床試験においても有効性が認められている。また DNA ワクチン以外にもベクターを用いた組換えワクチンの開発もすすめられており、臨床試験の試験結果が待たれる。こうした新規ワクチンの開発および臨床試験において、ヨーロッパにおいては、国および規制当局がワクチン開発をサポートするシステムが整備されている。また、国毎の製造販売承認のみならず、ヨーロッパ全体で

承認を与える方法など、新規ワクチンの導入にむけたシステムの整備が進んでいることが明らかとなった。AML 患者 (N=7) の血漿中の HE4 タンパク質レベルは、健常人の値より高値であることが明らかになった。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 7 検体のうち 2 検体は 150pM 以上を示し、AML 患者の血漿においても卵巣がん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、5 検体は、150pM 以下を示し、AML における域値の設定とその条件下での 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。

以前より開発を行ってきた 12 種類のウイルス測定系については、30 種類以上のウイルスについてラインアップされており、また以前に報告したように細菌共通、真菌共通 PCR 系やマイコプラズマ検出系も開発している。今回提示したリアルタイム PCR 系は、キャピラリー式からプレート式に移行し、また最終的に凍結型から室温型に変更したことにより、より多くのユーザーがアクセスできるシステムが完成したものと考えている。また、SOP の作成や、医療施設や検査会社への技術移転により、さらに汎用されるようになることが期待される。

同種移植後の GVL 効果を担っているのは主にドナー由来の T 細胞と考えられている。GVL 効果の標的抗原を同定し、同種移植後にその白血病抗原特異的な免疫を誘導することができれば、GVHD のリスクを増やすことなく白血病細胞を特異的に排除することが可能となる。LAAs は白血病細胞が HLA 上に提示している白血病反応性 CTL の標的抗原であるが、そ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る必要がある。健常ドナーの T 細胞免疫が移植され

る同種移植後であれば、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 (functional avidity) の高い CTL が誘導されやすい。我々は白血病細胞が過剰発現している自己抗原の中から、細胞周期調整タンパクである CDK2 由来の A24 拘束性 9mer ペプチドペプチド、CDK2158 が、GvL 効果の標的抗原になりうる LAAs であることを明らかにしてきた。一方で白血病細胞は、HLA や刺激性補助シグナル分子の発現を低下させたり、抑制性補助シグナル分子を発現させたりすることによって LAAs 特異的 CTL の機能的結合性を低下させ、ドナー由来の免疫からもエスケープしようとする。これまで我々は、骨髄性白血病細胞および LDC は、抑制性補助シグナル分子の一つである GITRL を発現しており、白血病細胞表面の GITRL がドナー由来 CDK2-CTL のプライミングを阻害することを明らかにしてきた。また GITRL+白血病細胞は GITRL 分子や exosome として細胞外に可溶性の GITRL を放出し、T 細胞表面上の GITR と結合させることによって T 細胞活性を抑制するのみならず、白血病細胞表面上で GITR と結合した GITRL から逆行性にシグナルが伝達されることによって、白血病細胞内の IDO 活性が亢進し、trp から代謝された kyn を細胞外に分泌する結果、CDK2-CTL の活性化が阻害された。今回の検討では抗 GITRL 抗体、あるいは IDO 阻害剤の投与によって白血病細胞上の GITRL による CDK2-CTL の活性化阻害作用が抑制され、CDK2-CTL の機能的結合性が回復することが示された。また、これまで我々は、抗 GITRL 抗体を投与することによって患者の LDC を抗原提示細胞としてドナー由来のナイーブ CD8+T 細胞から CDK2-CTL の誘導能が増強されることも確認している。以上の結果から、抗 GITRL 抗体、あるいは IDO 阻害剤の投与によって白血病細胞がドナーの免疫からエスケープする機序を解除し、LAAs を標的とした GvL 効果をより効果的に誘導できる可能性が示された。

一戸らの研究により、NIMA に対する免疫寛容の成立には、従来指摘されてきたような臍帯血に含まれる母親由来有核細胞を介する NIMA への曝露

のみならず、出生後の授乳を介する曝露も関与しており、その成立には授乳を受けている期間中に存在する制御性 T 細胞が関与していることが明らかとなった。乳汁の中には可溶性の MHC 分子や免疫調節性のエクソゾームが含まれることが明らかにされており、今後、これらがどのような機構により経口的な NIMA 寛容の誘導に関与するのかを明らかにしていくことが必要と思われる。また、今後、これらの研究を通じ、NIMA に対する獲得免疫寛容を臨床検体を用いて *in vitro* で評価するシステムが開発されることが望まれる。一部の母子間移植例に出現する GVHD の重篤化が見られるが、これを移植前にドナーの 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。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。本研究においては、既存の方法とは別に、立体構造を保った HLA-G に対する結合特異性が確認されている 2 種類の単クローン抗体と精製 HLA-G 蛋白を用いて、ELISA 法による HLA-G の検出可能性についての再検討を行った。これまでに HLA-G の発現が報告されている細胞には、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、単球、樹状細胞、間葉系幹細胞などがあり、特に心移植や腎移植、肝移植、肺移植などでの検討を通じて、移植組織における HLA-G の発現量や移植患者血清中における HLA-G の多寡が移植片に対する免疫寛容の指標になり得るという報告が目されている。特に、リンパ球混合培養において、レスポナー側の CD4+T 細胞が可溶性 HLA-G を分泌し、分泌された HLA-G がレスポナーの同種免疫応答を抑制することが報告されていることから、造血幹細胞移植においても、移植前後のドナー免疫担当細胞に由来する HLA-G の分泌能の評価がレシピエントに対する同種免疫応答の評価に有用である可能性もある。今後、造血幹細胞移植のドナー候補者とレシピエントの間におけるリンパ球混合培養や、移植前後の血清を用いた HLA-G の測定

および HLA-G を発現する細胞群の同定を試みることにより、造血幹細胞移植における HLA-G の役割を明らかにする。

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。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。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。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。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

TRUMP による造血細胞移植登録一元化は定着し、年々登録数も増加し成果を挙げ、懸案であった国際間の移植成績の共有も着々と進んでいる。移植を取り巻く病院内の環境整備のためのデータマネージャー、CLS、移植コーディネータなどの整備が急務である。同種移植独特の問題点である感染症の管理、GVHD の制御、GVL の強化、ドナーの拡大は依然として取り組むべき大きな課題として残っている。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1) Uchida N, Wake A, Takagi S, Yamamoto H, Kato D, Matsushashi Y, Matsumura T, Seo S, Matsuno N, Masuoka K, Kusumi E, Yuji K, Miyakoshi S, Matsuzaki M, Yoneyama A, Taniguchi S.

Umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning for elderly patients with hematologic diseases. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14:583-590, 2008.

- 2) Takagi S, Masuoka K, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Tsuji M, Yamamoto H, Kato D, Matsushashi Y, Kusumi E, Ota Y, Seo S, Matsumura T, Matsuno N, Wake A, Miyakoshi S, Makino S, Ohashi K, Yoneyama A, Taniguchi S. High incidence of haemophagocytic syndrome following umbilical cord blood transplantation for adults. *Br J Haematol.* 147:543-553, 2009.
- 3) Matsuno N, Wake A, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Kato D, Matsushashi Y, Seo S, Masuoka K, Miyakoshi S, Makino S, Yoneyama A, Kanda Y, Taniguchi S. Impact of HLA disparity in the graft-versus-host direction on engraftment in adult patients receiving reduced-intensity cord blood transplantation. *Blood.* 114:1689-1695, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 分担研究報告

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AML腫瘍マーカーの開発に関する研究

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長
研究協力者 倉光 球 国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員

研究要旨：AML は年間約 7000 人の死亡原因となる重篤な疾患である。我々は、AML 患者の腫瘍細胞で HE4 mRNA が高発現することを見出した。HE4 は分泌タンパク質であることから、HE4 が AML の血清・血漿レベルでの診断マーカーとなる可能性があると考えた。そこで市販の AML 患者血漿（7 例）で HE4 値を測定した結果、健常人の末梢血由来の血漿に比べ、AML で HE4 値が高い傾向にあることが明らかとなった。このことから HE4 の測定は、AML の血清マーカーとなる可能性が期待できると考えられた。今後は検体数を増やし、AML で血清 HE4 の上昇が AML の診断に応用できる程度に有意であるか検討する。

A. 研究目的

急性骨髄性白血病(AML)は、年間 7000 人以上の死者を出し特に高齢者に多く発症する極めて重篤な疾患である。AML は、発見後速やかに治療を開始することが重要であり、早期発見のための診断マーカーの開発が強く期待される。

AML の早期の検出マーカーとして理想的には、AML 細胞に特異的に高発現することに加え、血液中に放出される分泌型の因子であり、血清で簡便に測定ができる因子であることが上げられる。これらの点を踏まえると、白血病細胞特異的な分泌型のタンパク質マーカーを探索し、患者の血清を用いたタンパク質マーカーの検査法の開発することが重要であると考えられる。

これまでに我々は、生殖幹細胞や造血幹細胞などに高発現する mRNA の Transcriptome 解析の中から HE4 (WFDC2) mRNA が骨髄 AML 患者細胞で高発現することを見出した（未発表）。AML 患者の骨髄細胞で HE4 の定量 PCR を行った結果、正常骨髄細胞よりも極めて高い発現が認められた。HE4 は、分泌型のセリンプロテアーゼの仲間であることが 2 次構造より機能予測されている。また卵巣癌細胞で高発現することが知られ、近年 CA125 に並ぶ優れた卵巣ガンの血清マーカーとして注目されている因子である。また卵巣ガン以外にも外陰部ガ

ンや乳がん等のマーカーとなる可能性も指摘されている。HE4 が AML 細胞で高発現するという報告はこれまでにない。HE4 は骨髄 AML 細胞に特異的に発現し、分泌型のタンパク質因子であることから AML の早期診断マーカーとして理想的であると考えられる。そこで、本研究では HE4 が AML 患者の血清で優位な上昇として検出できるか検討し、HE4 を用いて血清レベルで AML の検出方法が確立できるか検討する。

B. 研究方法

・細胞・血清・血漿

AML 患者および健常人の血漿および細胞は、ALLCELL 社および Lonza 社より購入した。

・HE4 EIA Asssay

HE4 の測定は、HE4 EIA kit（富士レビオ）を用い、添付の説明書に従って行った。検出は、iMark microplate reader（BioRad）で 620nm の吸光度を測定した。キットに添付の標準品で検量線を作成し、それぞれの血清・血漿の HE4 濃度を算出した。

（倫理面への配慮）

市販の AML 患者検体については、ALLCELL 社より購入し使用した。また、国立感染症研究所および国立国際医療研究センターの双方で各施設の倫

理審査会の承認を得た上で患者の同意を得られた場合にのみ検体を研究に使用した。

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 患者の骨髄単核球の HE4 mRNA の発現量を定量 PCR で測定した。その結果、AML の M0-M2 において HE4 発現量が健常人（末梢血および骨髄単核球）に比べ、上昇していることが明らかになった (Fig. 1)。

AML 患者 (N=7) 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=5) の HE4 値は、22-82pM (平均値 40pM) であったのに対し AML 患者 (N=7) では 46-255pM (平均値 132pM) と高値であることが明らかになった (Fig. 2)。

D. 考察

AML 患者 (N=7) の血漿中の HE4 タンパク質レベルは、健常人の値より高値であることが明らかになった。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 7 検体のうち 2 検体は 150pM 以上を示し、AML 患者の血漿においても卵巣がん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、5 検体は、150pM 以下を示し、AML における域値の設定とその条件下での 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。

E. 結論

平成 21 年からは、造血幹細胞や生殖幹細胞で認められた HE4 の高発現が AML 患者の骨髄細胞でも高発現することを確認した。また、パイロットスタディーとして数検体の AML 患者血漿を用いて、血漿タンパク質レベルで HE4 が高値である可能性

を確認した。また平成 22 年度では、検体数をさらに増やして検討したところ、同様に健常人に比べて AML 患者の血漿では HE4 値が高く、AML のマーカーとなる可能性が考えられた。

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 患者の血漿でも有意に上昇する可能性が考えられ、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。現在、国立国際医療研究センター血液内科との共同研究にて、双方の施設の倫理審査会の承認を得て、AML の臨床検体の収集を開始したところである。よって今後は、患者検体数をさらに増やし、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。

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。

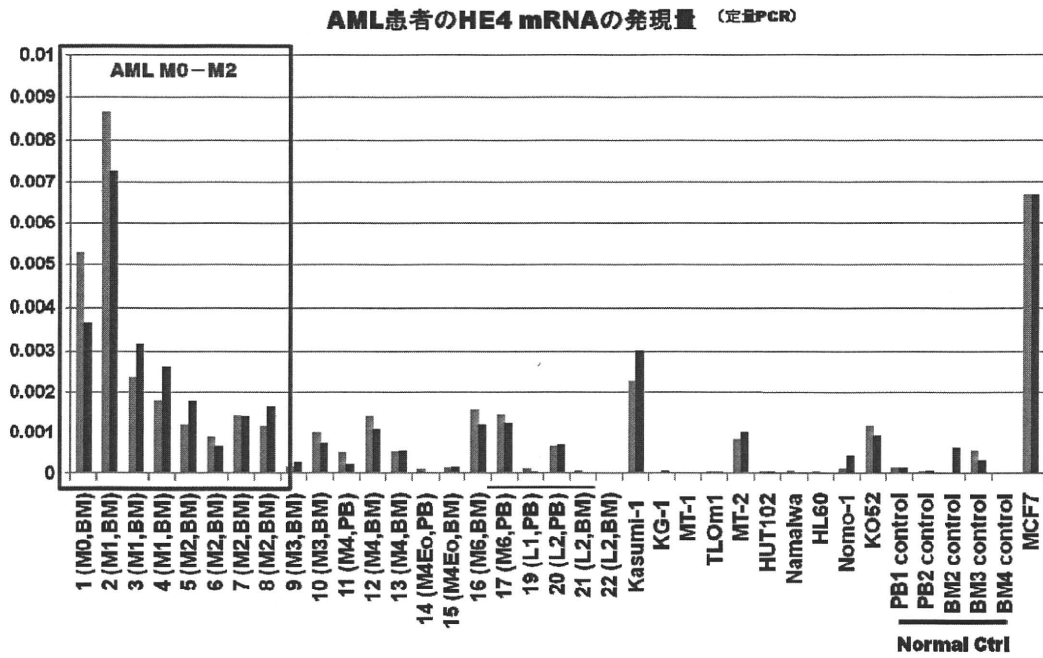


Figure 1

AML患者骨髓細胞および血液由来培養細胞株、または健常人におけるHE4 mRNAの発現量の解析

AML患者血漿中のHE4レベル

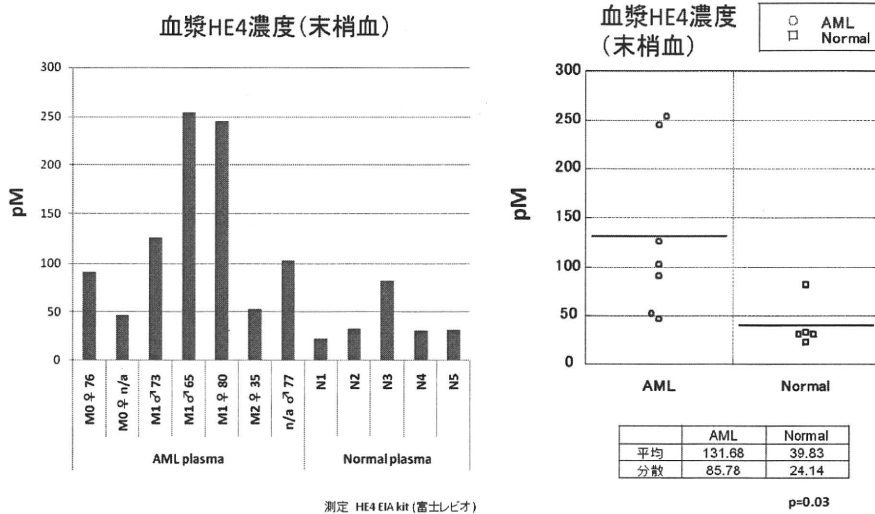


Figure 2

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。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表