

201023039A

厚生労働科学研究費補助金

免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業

純化自己幹細胞移植術による難治性自己免疫疾患治療時の

免疫再生メカニズムに関する研究

(H22-免疫-一般-008)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 赤司浩一

九州大学大学院病態修復内科学

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
純化自己幹細胞移植術による難治性自己免疫疾患治療の免疫再生メカニズムに関する研究.....	1
	赤司浩一
II. 分担研究報告	
1. 全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後のサイトカインの変化に関する研究.....	6
	堀内孝彦
2. 難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植の安全性と有効性に関する研究.....	9
	宮本敏浩
3. 全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後のTh1/Th2バランスの変化に関する研究.....	12
	新納宏昭
4. 全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後のリンパ球亜分画の変化に関する研究.....	15
	塚本 浩
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	18
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	20

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)
総括研究報告書

純化自己幹細胞移植術による難治性自己免疫疾患治療の免疫再生メカニズムに
関する研究

研究者代表者 赤司浩一
九州大学大学院 病態修復内科学 教授

研究要旨

自己免疫疾患の中には進行性の間質性肺炎や皮膚硬化を呈し、治療抵抗性で予後不良の疾患群が依然として存在し、その克服が重要な課題となっている。このような症例に対する新規治療法としてわれわれは、難治性自己免疫疾患23例に対し自己造血幹細胞移植(自己HSCT)を施行した。対象症例の内訳は全身性硬化症(SSc)19例、皮膚筋炎3例、ウェゲナー肉芽腫症1例で、治療関連死は認めず、自己HSCT後、皮膚硬化、間質性肺炎、皮膚潰瘍の改善や自己抗体の低下等多くの症例で劇的な臨床的寛解が得られ、その効果は少なくとも3年間持続した。有効性のメカニズムを明らかにするためCD34純化自己HSCTを施行したSSc11例について自己HSCT後の免疫学的再構築を検討したところ、CD8+T細胞は自己HSCT1ヶ月後より回復したが、CD4+T細胞の回復は自己HSCT36ヶ月後まで抑制されていた。予想に反し、CD4+T細胞のうちナイーブT細胞の回復は、メモリーT細胞の回復に比較し著しく遅延した。一方、自己HSCT後36ヶ月間Th1/Th2バランスはTh1優位が持続し、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。難治性自己免疫疾患患者に対する自己HSCTは安全かつ有効な治療法であると考えられたため、難治性SSc及び皮膚筋炎を対象とした臨床第II相試験のプロトコールを作成し、学内倫理委員会の承認を得た。

研究分担者

堀内孝彦 九州大学大学院
病態修復内科学 准教授
宮本敏浩 九州大学病院
血液腫瘍内科 講師
新納宏昭 九州大学病院
免疫・膠原病・感染症内科 助教
塚本 浩 九州大学病院
免疫・膠原病・感染症内科 助教

(自己HSCT)が臨床応用されており、特に全身性硬化症(SSc)や多発性硬化症について現在臨床第III相試験が実施中で、試験終了後にはこれらの疾患における標準治療となることが予想される。本邦においてわれわれは、難治性自己免疫疾患23例(SSc19例、皮膚筋炎3例、ウェゲナー肉芽腫症1例)に対し自己HSCTを施行した。驚くべき事に、多くの症例において劇的な寛解が得られ、移植後2-5年間、臨床的寛解が継続している。しかし現時点で、この治療効果が造血幹細胞からの正常免疫再構築を得た結果であるのか、移植前療法としての大量化学療法による免疫抑制効果が継続しているものか等、有効性の鍵とな

A. 研究目的

自己免疫疾患の中には進行性の間質性肺炎や皮膚硬化を呈し、治療抵抗性で予後不良の疾患群が依然として存在し、その克服が重要な課題となっている。これらの病態への新規治療法として、欧米では自己造血幹細胞移植

るメカニズムが不明である。本年度の研究では、1) 既移植症例について長期間にわたる安全性と有効性を評価する、2) これら既移植症例における再構築リンパ球分画の経時的変化を詳細に解析することにより、本治療法の有効性とリンパ球機能変化との関連を明らかにする3) 臨床第II相試験のプロトコールを作成し学内の倫理委員会の承認を得、新たな症例において自己 HSCT を続行し、その治療結果から本療法が効果を示す病態を明確にする、事を目的とする。

B. 研究方法

1) 自己HSCTの対象症例はSSc19例、皮膚筋炎(DM)3例、ウェゲナー肉芽腫症(WG)1例の計23例であった。末梢血幹細胞の動員はCY4g/m²に引き続きG-CSFを投与し、アフエレーシスによって末梢血幹細胞採取した。SSc11例、DM2例、WG症例では末梢血幹細胞採取後、CliniMACSを用いてCD34陽性細胞に純化した。移植前治療としてはCY200mg/kgを投与し、移植当日に2x10⁶/kg以上のCD34陽性細胞を輸注した。SSc8例、DM1例ではCD34陽性細胞への純化を行わなかった。

2) 免疫学的再構築の解析対象はCD34純化自己HSCTを施行したSSc11例である。治療開始前、自己HSCT直前、自己HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36ヶ月後にフローサイトメトリーを用いて、リンパ球亜分画の実数を算出した。また同時期のTNF- α 、IL-6、TGF- β 、可溶性IL-2受容体(sIL-2R)、VEGF、MCP-1の血中濃度をELISAにて測定した。Th1/Th2バランスはCD4⁺T細胞内のIFN- γ 、IL-4を染色し、フローサイトメトリーを用いてIFN- γ ⁺IL-4⁺(Th1)CD4⁺細胞数とIFN- γ ⁻IL-4⁺(Th2)CD4⁺細胞数の比を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ている。本療法の施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

自己 HSCT を施行した SSc19 例では合併症として、アデノウイルス膀胱炎 2 例(10.5%)、帯状疱疹 5 例(26.3%)、サイトメガロウイルス抗原血症 8 例(42.1%)等を認めた。移植関連死は認めなかったが、1 例が原疾患に伴う間質性肺炎の進行のため自己 HSCT 後 20 ヶ月で死亡した。原疾患に対する効果では、スキンスコアが 12 ヶ月後には約 50%、36 ヶ月後には約 70%の改善を示した。間質性肺炎について胸部 CT 上の改善が認められ(図 1)、%VC の上昇傾向を認めた。抗 Scl-70 抗体価は、自己

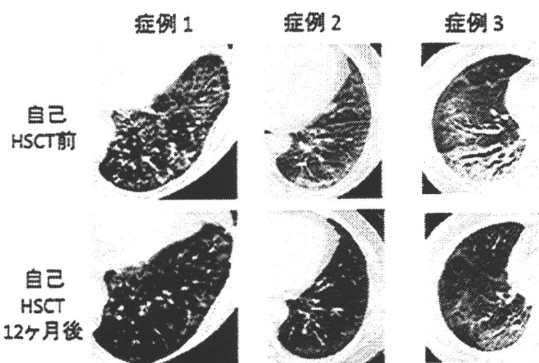


図 1. SScにおける自己HSCT後の間質性肺炎の改善

HSCT 後継続して低下し、36 ヶ月後には治療前の 1/4 まで低下した。皮膚筋炎 3 例のうち 2 例は筋症状が乏しく(Clinically amyopathic dermatomyositis, CADM)、進行性の間質性肺炎を有していたが、自己 HSCT 後間質性肺炎は改善した。1 例は左前腕に難治性の巨大皮膚潰瘍を伴っていたが、自己 HSCT 後に治癒した(図 2)。

自己HSCT後の免疫学的再構築の検討では、

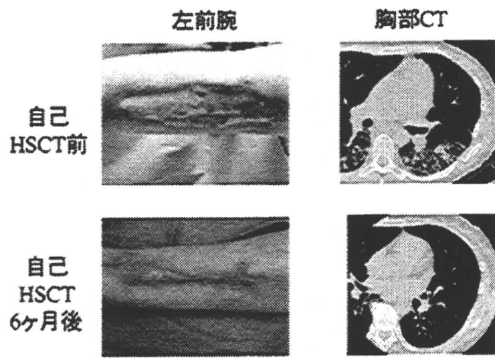


図2.皮膚筋炎における自己HSCT後の皮膚潰瘍と間質性肺炎の改善

CD8+T細胞は自己HSCT1ヶ月後より回復したが、CD4+T細胞の回復は自己HSCT36ヶ月後まで抑制されていた(図3)。CD4+T細胞のう

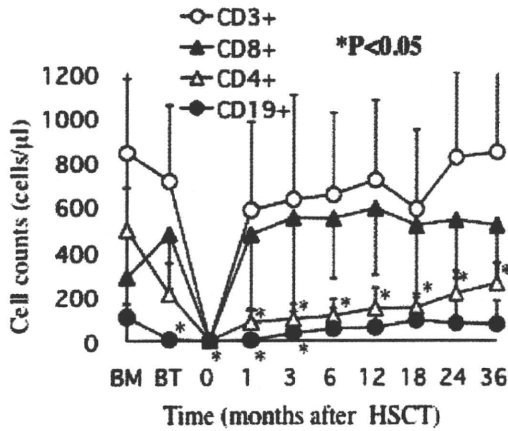


図3.自己HSCT後の免疫学的再構築
BM:末梢血幹細胞採取前 BT:HSCT前

ちナイーブT細胞の回復は、メモリーT細胞の回復に比較し著しく遅延した。B細胞は自己HSCT12ヶ月後に治療前値まで回復した。治療前よりメモリーB細胞に比しナイーブB細胞が多かったが、自己HSCT後もメモリーB細胞の増加は認められなかった。

炎症性サイトカインTNF- α 、IL-6、免疫パラメーターsIL-2Rは自己HSCT後に有意に低下した。Th1/Th2バランスは自己HSCT1ヶ月後より有意に上昇後、36ヶ月後までTh1優位が持続した(図4)。

難治性SSc及び皮膚筋炎を対象とした臨床第II相試験のプロトコールを作成し、学内倫

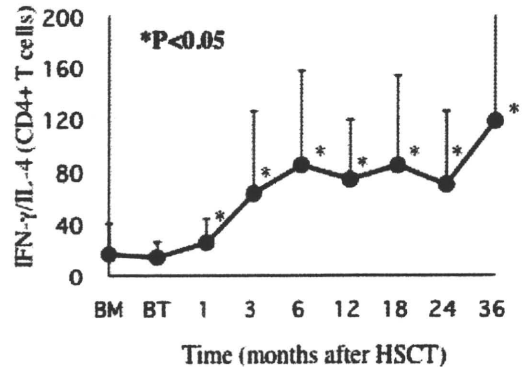


図4.自己HSCT後のTh1/Th2バランスの変化
BM:末梢血幹細胞採取前 BT:HSCT前

理委員会の承認を得た。SScのプロトコールは現在欧州にて進行中の臨床第III相試験の適格基準や評価項目を参考にした。

D. 考察

当施設における難治性自己免疫疾患に対する自己HSCTでは、23例中治療関連死を1例も認めず、本療法の安全性が確認された。SScに対する自己HSCTでは皮膚硬化化に対して、著明な改善効果が認められ、間質性肺炎の進行も抑制しその効果は3年間持続した。CADMに合併する進行性の間質性肺炎で従来の免疫抑制療法に抵抗性のものは、予後が極めて不良であるが、自己HSCTは本病態に対しても劇的な改善効果を示した。

自己HSCT36ヶ月後でもCD4+T細胞の回復は抑制されており、長期間SScに対する効果が持続している一因になっている可能性がある。多発性硬化症ではナイーブT細胞優位な回復が疾患の改善と関連していたとの報告があるが、本研究ではメモリーT細胞が優位に回復していた。SScではメモリーB細胞数の低下が指摘されているが、自己HSCT36ヶ月後でもメモリーB細胞数の増加は認められず、B細胞亜分画の異常は是正されなかった。

IFN- γ は抗線維化作用、一方IL-4は線維化促進作用を有し、また、SScのモデルマウスにおいてTh1主体の免疫反応の誘導による皮膚硬化の抑制が報告されていることより、本研究における自己HSCT後のTh1優位のCD4+T細胞の回復とSScの皮膚硬化の改善との関連が示唆される。

現在、フローサイトメトリーを用いてSSc患者のリンパ球を亜分画ごとにソーティングし、遺伝子発現プロファイリングを行なっている。

E. 結論

難治性自己免疫疾患患者に対する自己 HSCTは安全かつ有効な治療法である事が示された。SScに対する自己 HSCT 後 36 ヶ月間 Th1/Th2 バランスは Th1 優位が持続し、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。今後、リンパ球亜分画ごとの遺伝子発現プロファイリングを行なうことにより、より詳細に本療法の有効性のメカニズムを明らかにする予定である。

F.健康危険情報 特になし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 708-17, 2010
2. Mori Y, Miyamoto T, Nagafuji K, Kamezaki K, Yamamoto A, Saito N, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Abe Y, Teshima T,

Akashi K. High incidence of human herpes virus 6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1596-602, 2010

3. Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150:334-44, 2010
4. Mori Y, Nagasaki Y, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Miyamoto T, Abe Y, Shimono N, Akashi K, Teshima T. High incidence of false-positive Aspergillus galactomannan test in multiple myeloma. *Am J Hematol* 85:449-51, 2010
5. Asakura S, Hashimoto D, Takashima S, Sugiyama H, Maeda Y, Akashi K, Tanimoto M, Teshima T. Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice. *J Clin Invest* 120:2370-8, 2010
6. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, Akashi K, Teshima T. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med* 208:285-94, 2011
7. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niuro H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+

stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. Rheumatology 50: 944-52, 2011

8. Kamimura T, Miyamoto T, Nagafuji K, Numata A, Henzan H, Takase K, Ito Y, Ohno Y, Fujisaki T, Eto T, Takamatsu Y, Teshima T, Gondo H, Akashi K, Taniguchi S, Harada M. Role of autotransplantation in the treatment of acute promyelocytic leukemia patients in remission: Fukuoka BMT Group observations and a literature review. Bone Marrow Transplant (in press)
9. Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Sunami S, Kamitani T, Sakai S, Hatakenaka M, Nagafuji K, Horiuchi T, Harada M, Akashi K, Honda H. Correlation between pretreatment or follow-up CT findings and therapeutic effect of autologous peripheral blood stem cell transplantation for interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis. Eur J Radiol (in press)

2. 学会発表

1. 赤司 浩一：白血病幹細胞を考える。第 72 回日本血液学会総会、2010 年 9 月 24 日、横浜
2. 赤司 浩一：造血幹細胞からの骨髄球系細胞の分化。第 60 回日本アレルギー学会、2010 年 11 月 25 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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

全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後のサイトカインの変化に関する研究

研究者分担者 堀内孝彦
九州大学大学院 病態修復内科学 准教授

研究要旨

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己HSCT)の効果が長期間持続する事が明らかになったが、その機序については不明の点も多い。本研究では有効性の機序を解明するため、SScにおける自己HSCT後の血中サイトカイン濃度、免疫パラメーターの変化を明らかにする事を目的とした。対象はCD34純化自己HSCTを施行したSSc11例で、治療開始前、自己末梢血幹細胞採取後、自己HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36ヶ月後にTNF- α 、IL-6、TGF- β 、可溶性IL-2受容体(sIL-2R)、VEGF、ケモカインMCP-1の血中濃度をELISAにて測定した。炎症性サイトカインTNF- α 、IL-6、線維化誘導サイトカインTGF- β 、免疫パラメーターsIL-2R、血管新生因子VEGF、ケモカインMCP-1の血中濃度は治療前いずれも異常高値を示した。TNF- α は自己HSCT12, 18, 36ヶ月後、IL-6は12ヶ月後、sIL-2Rは24, 36ヶ月後に有意に低下した。TGF- β 、VEGF、MCP-1も自己HSCT後低下傾向を示した。血中の炎症性または線維化誘導サイトカイン等の濃度低下も本療法の有効性に関連していた可能性がある。

A. 研究目的

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己HSCT)の効果が長期間持続する事が明らかになったが、その機序については不明の点も多い。本研究では有効性の機序を解明するため、SScにおける自己HSCT後の血中サイトカイン濃度、免疫パラメーターの変化を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

対象はCD34純化自己HSCTを施行したSSc11例で、内訳は男性3例女性8例、平均年齢は52.3歳である。治療開始前、自己末梢血幹細胞採取後、自己HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36ヶ月後にTNF- α 、IL-6、TGF- β 、可溶性IL-2受容体(sIL-2R)、VEGF、ケモカインMCP-1の血中濃度をELISAにて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得、施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

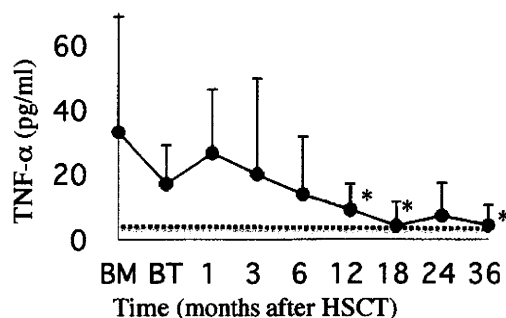


図1.血中のTNF- α の推移。
BM:末梢血幹細胞採取前
BT:HSCT前 *P<0.05

炎症性サイトカインTNF- α 、IL-6、線維化誘

導サイトカインTGF- β 、免疫パラメーターsIL-2R、血管新生因子VEGF、ケモカインMCP-1の血中濃度は治療前いずれも異常高値を示した(図1-4)。TNF- α は自己HSCT12, 18, 36ヶ月後、IL-6は12ヶ月後、sIL-2Rは24, 36ヶ月

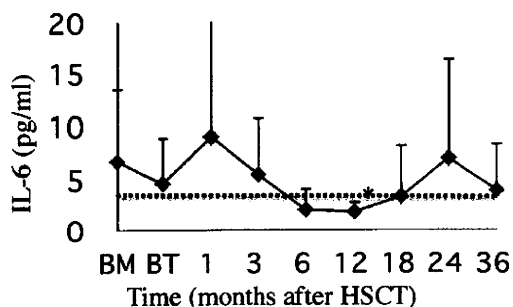


図2.血中IL-6の推移

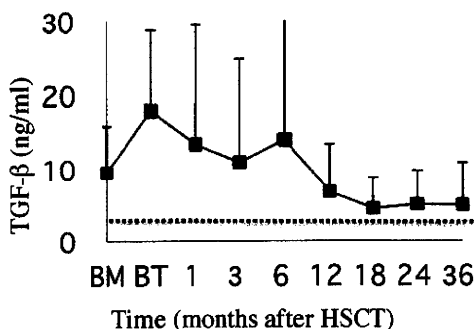


図3.血中TGF- β の推移

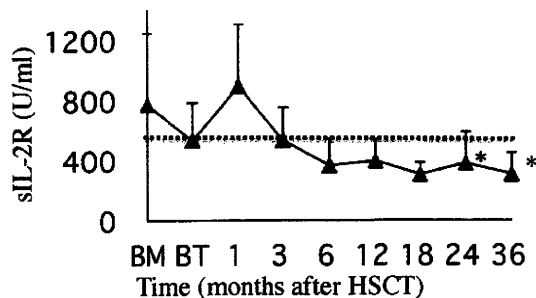


図4.血中sIL-2Rの推移

月後に有意に低下した。TGF- β 、VEGF、MCP-1も自己HSCT後低下傾向を示した。

D. 考察

SScにおいて種々のサイトカインの産生異常が報告されている。TNF- α 、IL-6、TGF- β 、

MCP-1は線維芽細胞からの細胞外マトリックスの産生を刺激する。また、組織での虚血は血管新生因子VEGFの産生を促進する。またsIL-2RはT細胞の活性化を反映する。われわれは初めて自己HSCT後の血中サイトカインの変化について検討した。今回の検討では、これらのサイトカイン、ケモカイン、免疫パラメーターの血中濃度はいずれも治療前異常高値を示したが、自己HSCT後低下した。血中の炎症性または線維化誘導サイトカイン等の濃度の低下も疾患活動性低下の一因となった可能性がある。

E. 結論

血中の炎症性または線維化誘導サイトカイン等の濃度低下も本療法の有効性に関連していた可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Kiyohara C, Mitoma H, Uchino A, Furugo I, Yoshizawa S, Ueda A, Harashima S, Sawabe T, Tahira T, Hayashi K, Yoshizawa S, Shimoda T, Akashi K, Harada M. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatology* 49:1346-53, 2010
- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49:1215-28, 2010
- Uchino A, Tsukamoto H, Nakashima H, Yoshizawa S, Furugo I, Mitoma H, Oryoji K, Shimoda T, Niuro H, Tada Y, Yano T, Nonaka

T, Oishi R, Akashi K, Horiuchi T. Tacrolimus is effective for lupus nephritis patients with persistent proteinuria. Clin Exp Rheumatol 28:6-12, 2010

2. 学会発表

1. 堀内孝彦: 抗 TNF 製剤の作用機序—その共通点と相違点—第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成 22 年 4 月 22 - 25 日、神戸
2. 堀内孝彦: 抗 TNF 製剤の作用機序—その共通点と相違点そして臨床効果との関連—第 31 回日本炎症・再生医学会、平成 22 年 8 月 6-7 日、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

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(免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植の安全性と有効性に
関する研究

研究者分担者 宮本敏浩
九州大学病院 血液腫瘍内科 講師

研究要旨

難治性自己免疫疾患患者に対する自己造血幹細胞移植(自己HSCT)の移植後3年間の安全性と有効性を検討することを目的とした。対象は全身性硬化症(SSc)19例、皮膚筋炎(DM)3例、ウェゲナー肉芽腫症(WG)1例の計23例である。末梢血幹細胞の動員はCY4g/m²に引き続きG-CSFを投与し、アフエレーシスによって末梢血幹細胞採取した。移植前治療としてはCY200mg/kgを投与し、移植当日に2x10⁶/kg以上のCD34陽性細胞を輸注した。自己HSCTを施行したSSc19例では合併症として、ウイルス感染症を高頻度に認めたが、移植関連死は認めなかった。原疾患に対する効果では、スキンスコアが36ヶ月後には約70%の改善を示した。間質性肺炎については%VCの増加傾向を認めた。抗Scl-70抗体価は、自己HSCT後継続して低下した。皮膚筋炎3例のうち2例は筋症状が乏しく、進行性の間質性肺炎を有していたが、自己HSCT後間質性肺炎は改善した。1例は左前腕に難治性の巨大皮膚潰瘍を伴っていたが、自己HSCT後に治癒した。難治性自己免疫疾患患者に対する自己HSCTは安全かつ有効な治療法であると考えられたため、難治性SSc及び皮膚筋炎を対象とした臨床第II相試験のプロトコールを作成し、学内倫理委員会の承認を得た。

A. 研究目的

難治性自己免疫疾患患者に対する自己造血幹細胞移植(自己HSCT)の移植後3年間の安全性と有効性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象は全身性硬化症(SSc)19例、皮膚筋炎(DM)3例、ウェゲナー肉芽腫症(WG)1例の計23例である。末梢血幹細胞の動員はCY4g/m²に引き続きG-CSFを投与し、アフエレーシスによって末梢血幹細胞採取した。SSc11例、DM2例、WG症例では末梢血幹細胞採取後、CliniMACSを用いてCD34陽性細胞に純化した。移植前治療としてはCY200mg/kgを投与し、

移植当日に2x10⁶/kg以上のCD34陽性細胞を輸注した。SSc8例、DM1例ではCD34陽性細胞への純化を行わなかった。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ている。本療法の施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

自己HSCTを施行したSSc19例では合併症として、アデノウイルス膀胱炎2例(10.5%)、帯状疱疹5例(26.3%)、サイトメガロウイルス抗原血症8例(42.1%)等を認めた。移植関連死は

認めなかったが、1例が原疾患に伴う間質性肺炎の進行のため自己HSCT後20ヶ月で死亡した。原疾患に対する効果では、スキンスコアが12ヶ月後には約50%、36ヶ月後には約70%の改善を示した(図1)。間質性肺炎について

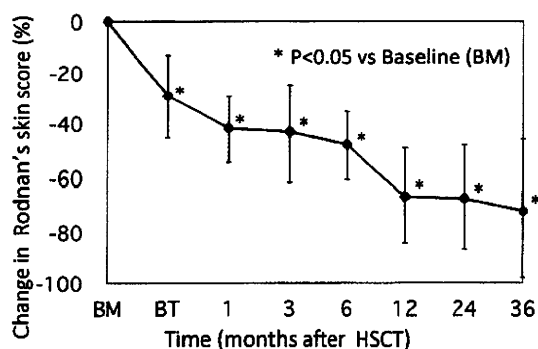


図1.スキンスコアの変化 *P<0.05
BM; Before Mobilization, BT; Before HSCT

は%VCの上昇傾向を認めた(図2)。抗Scl-70抗体価は、自己HSCT後継続して低下し、36ヶ月後には治療前の1/4まで低下した(図3)。

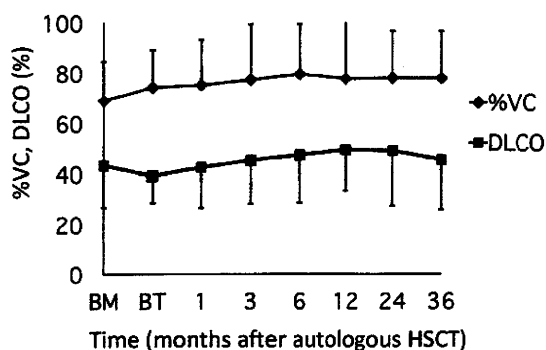


図2.肺機能の推移

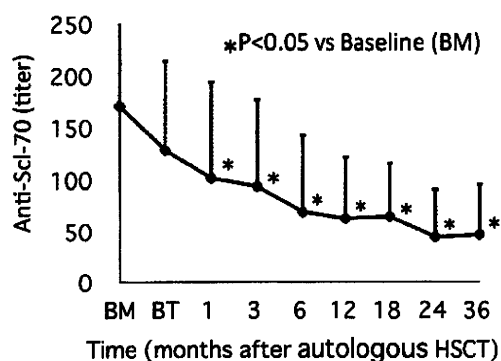


図3.抗Scl-70抗体価の推移

皮膚筋炎3例のうち2例は筋症状が乏しく(Clinically amyopathic dermatomyositis,

CADM)、進行性の間質性肺炎を有していたが、自己HSCT後間質性肺炎は改善した。1例は左前腕に難治性の巨大皮膚潰瘍を伴っていたが、自己HSCT後に治癒した。

難治性自己免疫疾患患者に対する自己HSCTは安全かつ有効な治療法であると考えられたため、難治性SSc及び皮膚筋炎を対象とした臨床第II相試験のプロトコールを作成し、学内倫理委員会の承認を得た。SScのプロトコールは現在欧州にて進行中の臨床第III相試験の適格基準や評価項目を参考にした。

D. 考察

難治性自己免疫疾患に対する自己HSCTについて、欧米では全身性硬化症(SSc)や多発性硬化症について現在臨床第III相試験が進行中で、試験終了後にはこれらの疾患における標準治療となることが予想される。我々の研究では、23例中治療関連死を1例も認めず、本療法の安全性が確認された。

SScに対する自己HSCTでは皮膚硬化に対して、著明な改善効果が認められ、間質性肺炎の進行も抑制した。CADMに合併する進行性の間質性肺炎で従来の免疫抑制療法に抵抗性のものは、予後が極めて不良であるため、本療法は治療の選択枝となりうる。

E. 結論

難治性自己免疫疾患患者に対する自己HSCTは安全かつ有効な治療法である事が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K.

- TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 708-17, 2010
2. Mori Y, Miyamoto T, Nagafuji K, Kamezaki K, Yamamoto A, Saito N, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Abe Y, Teshima T, Akashi K. High incidence of human herpes virus 6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1596-602, 2010
 3. Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150:334-44, 2010
 4. Mori Y, Nagasaki Y, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Miyamoto T, Abe Y, Shimono N, Akashi K, Teshima T. High incidence of false-positive Aspergillus galactomannan test in multiple myeloma. *Am J Hematol* 85:449-51, 2010
 5. Kamimura T, Miyamoto T, Nagafuji K, Numata A, Henzan H, Takase K, Ito Y, Ohno Y, Fujisaki T, Eto T, Takamatsu Y, Teshima T, Gondo H, Akashi K, Taniguchi S, Harada M. Role of autotransplantation in the treatment of acute promyelocytic leukemia patients in remission: Fukuoka BMT Group observations and a literature review. *Bone Marrow Transplant* (in press)

2. 学会発表

1. 宮本敏浩：CLLの幹細胞. 第50回日本リンパ網内系学会、2010年6月18-19日、新潟
2. Miyamoto T: Human leukemia stem cells. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22-24日、大阪

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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(免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後の Th1/Th2 バランスの変化に関する研究

研究者分担者 新納宏昭

九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科 助教

研究要旨

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の効果が長期間持続する事が明らかになったが、その機序については不明の点も多い。本研究では有効性の機序を解明するため、SScにおける自己 HSCT 後の Th1/Th2 バランスの変化を明らかにする事を目的とした。対象は CD34 純化自己 HSCT を施行した SSc11 例で、治療開始前、自己末梢血幹細胞採取後、自己 HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 ヶ月後に Th1/Th2 バランスを測定した。Th1/Th2 バランスは CD4+T 細胞内の IFN- γ 、IL-4 を染色し、フローサイトメトリーを用いて IFN- γ +/IL-4-(Th1)CD4+細胞数と IFN- γ -/IL-4+(Th2)CD4+細胞数の比を算出した。Th1/Th2 バランスは自己 HSCT1 ヶ月後より有意に上昇後、6 ヶ月後にピークとなりその後 36 ヶ月後まで Th1 優位が持続した。SSc に対する自己 HSCT 後 36 ヶ月間に及ぶ Th1 優位の持続と、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。

A. 研究目的

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の効果が長期間持続する事が明らかになったが、その機序については不明の点も多い。本研究では有効性の機序を解明するため、SSc における自己 HSCT 後の Th1/Th2 バランスの変化を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

対象は CD34 純化自己 HSCT を施行した SSc11 例で、内訳は男性3例女性8例、平均年齢は52.3 歳である。治療開始前、自己末梢血幹細胞採取後、自己 HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 ヶ月後に Th1/Th2 バランスを測定した。Th1/Th2 バランスは CD4+T 細胞内の IFN- γ 、IL-4 を染色し、フローサイトメトリーを用いて IFN- γ +/

IL-4-(Th1)CD4+細胞数と IFN- γ -/IL-4+(Th2)CD4+細胞数の比を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得、施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

多くの症例で自己 HSCT 後 IL-4+CD4+細胞は減少し、IFN- γ +CD4+細胞は著明に増加した(図1)。Th1/Th2 バランスは自己 HSCT1 ヶ月後より有意に上昇後、6 ヶ月後にピークとなりその後 36 ヶ月後まで Th1 優位が持続した(図2)。

D. 考察

IFN- γ は抗線維化作用、一方 IL-4 は線維化促進作用を有し、また、SSc のモデルマウスで

あるタイトスキムマウスにおいてTh1主体の免疫反応の誘導による皮膚硬化の抑制が報告されている。以上より、本研究における自己HSCT後のTh1優位のCD4+T細胞の回復とSScの皮膚硬化の改善との関連が推察される。

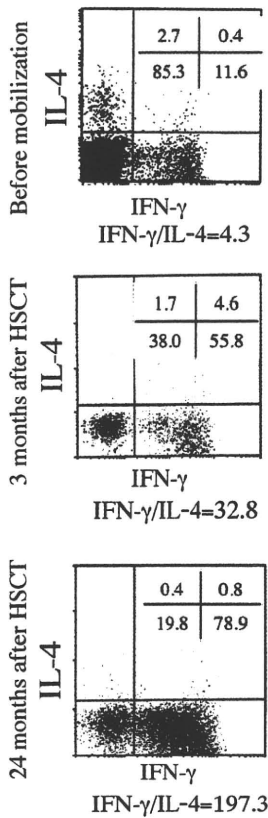


図1. 代表例(61歳、女性)におけるTh1/Th2バランスの推移

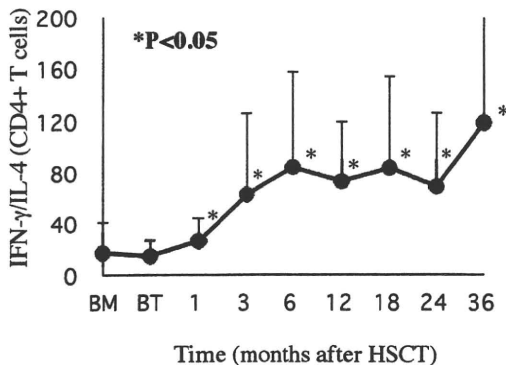


図2. Th1/Th2バランスの変化
BM:末梢血幹細胞採取前 BT:HSCT前

E. 結論

SSc に対する自己 HSCT 後 36 ヶ月間

Th1/Th2 バランスは Th1 優位が持続し、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wakasaki T, Masuda M, Niiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Noda K, Taniyama T, Komune S, Akashi K. A critical role of c-Cbl-interacting protein of 85 kDa in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas through the ras-ERK pathway. *Neoplasia* 12:789-96, 2010
2. Shimoda S, Harada K, Niiro H, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Kikuchi K, Nakanuma Y, Mackay IR, Gershwin ME, Akashi K. CX3CL1 (fractalkine): a signpost for biliary inflammation in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 51:567-75, 2010

2. 学会発表

1. Niiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Noda K, Inoue Y, Arinobu Y, Akashi K: A vital role of CIN85 in Cbl-mediated regulation of B cell survival, growth and differentiation. 2010 Keystone Symposia. February 21-26, 2010, Taos, NM, USA
2. 新納宏昭, Jabbarzadeh-Tabrizi Siamak, 相澤久美子, 上田尚靖, 押領司健介, 三苦弘喜, 井上靖, 有信洋二郎, 塚本浩, 堀内孝彦, 赤司浩一: ヒト B 細胞における IRAK 発現調節と自己免疫疾患におけるその関与. 第 54 回日本リウマチ学会総会, 2010 年 4 月 22-25 日, 神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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(免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後のリンパ球亜分画の変化に関する研究

研究者分担者 塚本 浩

九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科 助教

研究要旨

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の効果が長期間持続する機序を解明するため、SScにおける自己 HSCT 後のリンパ球亜分画の変化を明らかにする事を目的とした。対象は CD34 純化自己 HSCT を施行した SSc11 例で、治療開始前、自己末梢血幹細胞採取後、自己 HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36 ヶ月後にフローサイトメトリーを用いて、リンパ球亜分画の実数を算出した。T 細胞は自己 HSCT1 ヶ月後より回復したが、その大部分は CD8+T 細胞で、CD4+T 細胞の回復は自己 HSCT 後 1~6 ヶ月は著しく抑制されていた。CD4+T 細胞のうちナイーブ CD4+/CD45RA+T 細胞の回復は、メモリーCD4+/CD45RO+T 細胞の回復に比較し著しく遅延した。また制御性 T 細胞を含む CD4+/CD25+T 細胞の回復は CD4+/CD25-T 細胞の回復に比較し著しく遅延した。B 細胞は自己 HSCT12 ヶ月後に治療前値まで回復した。B 細胞亜分画では治療前よりメモリーCD27+B 細胞に比しナイーブ CD27-B 細胞が多かったが、自己 HSCT 後もメモリーCD27+B 細胞の増加は認められなかった。以上、SSc に対する自己 HSCT36 ヶ月後でも CD4+T 細胞数低下が持続しており、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。

A. 研究目的

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の効果が長期間持続する事が明らかになったが、その機序については不明の点も多い。本研究では有効性の機序を解明するため、SSc における自己 HSCT 後のリンパ球亜分画の変化を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

対象はCD34純化自己HSCTを施行したSSc11例で、内訳は男性3例女性8例、平均年齢は52.3歳である。治療開始前、自己末梢血幹細胞採

取後、自己HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36ヶ月後にフローサイトメトリーを用いてCD3/CD19, CD4/CD8, CD4/CD45RA, CD4/CD45RO, CD4/CD25, CD19/CS27について、リンパ球亜分画の実数を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得、施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

T細胞は自己HSCT1ヶ月後より回復したが、その大部分はCD8+T細胞で、CD4+T細胞の回復は自己HSCT後1~6ヶ月は著しく抑制され、

36ヶ月後もCD4/CD8比は0.5未満に留まった(治療開始前は1.7)。CD4+T細胞のうちナイーブCD4+/CD45RA+T細胞の回復は、メモリーCD4+/CD45RO+T細胞の回復に比較し著しく遅延した(図1)。また制御性T細胞を含むCD4+/CD25+T細胞の回復は、CD4+/CD25-T細胞の回復に比較し著しく遅延した(図2)。B細胞は自己HSCT12ヶ月後に治療前値まで回復した。B細胞亜分画では治療前よりメモリーCD27+B細胞に比しナイーブCD27-B細胞が多かったが、自己HSCT後もCD27+メモリーB細胞の増加は認められなかった(図3)。

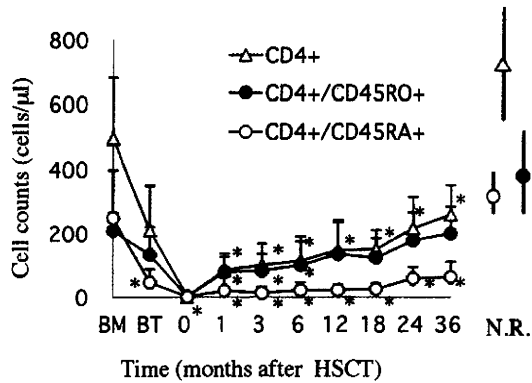


図1. ナイーブCD4+/CD45RA細胞とメモリーCD4+/CD45RO+細胞の推移
BM:末梢血幹細胞動員前 BT: HSCT前
N.R.正常範囲, *P<0.05

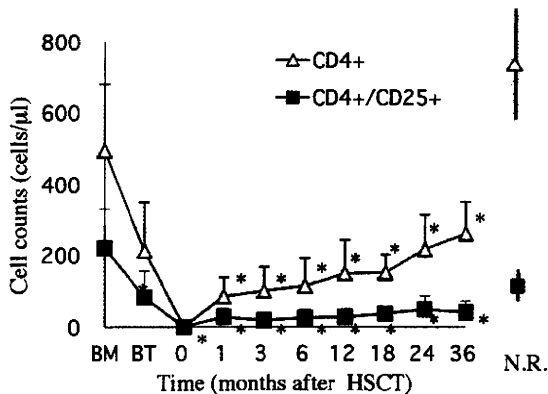


図2. CD4+/CD25+細胞の推移
*P<0.05

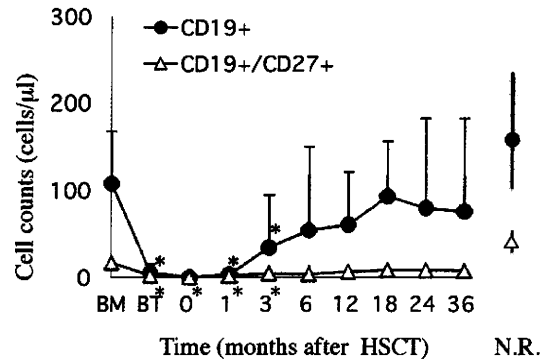


図3. B細胞, CD19+/CD27+B細胞の推移
*P<0.05

D. 考察

自己HSCT36ヶ月後でもCD4+T細胞の回復は抑制されており、長期間SScに対する効果が持続している一因になっている可能性がある。多発性硬化症ではナイーブCD4+/CD45RA+T細胞優位な回復が疾患の改善と関連していたとの報告があるが、本研究ではメモリーCD4+/CD45RO+T細胞が優位に回復していた。SScではメモリーB細胞数の低下が指摘されているが、自己HSCT36ヶ月後でもメモリーB細胞数の増加は認められず、B細胞亜分画の異常は是正されなかった。

E. 結論

SScに対する自己HSCT36ヶ月後でもCD4+T細胞数の低下が持続しており、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niuro H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for