

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirosawa T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraishi K, Ito M, Miyamura K, Shibata K, Kikkawa F, Morishima Y, Takahashi T, Emi N, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched HLA class II-restricted CD8(+) cytotoxic T-cells may serve selective GVL effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci*, [Epub ahead of print] (PMID: 21466613)
- 2) An J, Fujiwara H, Suemori K, Niiya T, Azuma T, Tanimoto K, Ochi T, Akatsuka Y, Mineno J, Ozawa H, Ishikawa F, Kuzushima K, Yasukawa M. Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int J Hematol*. 93:176-85, 2011. (PMID: 21229399)

2. 学会発表

- 1) Akatsuka Y, Yamamura Y, Bleakley M, Hikita J, Hamajima T, Nannya Y, Matsubara A, Riddell SR, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S. Identification of novel minor histocompatibility antigens using HAPMAP EBV-LCL panels transduced with restricting HLA cDNA retrovirally. 第16回日本遺伝子治療学会総会 (ポスター #147), 宇都宮 2010年7月1日. The 16th Annual Meeting-JSGT2010, 2010.
- 2) 小川誠司, 松原亜以子, 鬼塚真, 柏瀬貢一, 真田昌, 南谷泰仁, 赤塚美樹, 佐竹正博, 千葉滋, 佐治博夫, 丸谷悦子, 猪子英俊, 森島泰雄, 小寺良尚, 笹月健彦. MHC と疾患 GWAS の手法による同種造血幹細胞移植の遺伝学的背景の探索. 第13回日本組織適合性学会大

会 (口演), 東京 2010年9月18日. *MHC: Major Histo-compatibility Complex* 17巻2号, 141, 2010.

- 3) Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Matsubara A, Hamajima T, Nannya Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. Development of an Online Tool to Scan Single Nucleotide Polymorphisms for Identification of Novel Minor Histo-compatibility Antigens. 第17回 BMT Tandem Meetings (ポスター #508), ハワイ 2011年2月19日. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 17(2) Suppl.1, pp S335, 2011.
- 4) Akatsuka Y. Characterization And Clinical Application of Minor Histocompatibility Antigens. The 15th Annual Winter Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation (Plenary session), Muju Resort, Feb 25, 2011. *The Korean Journal of Hematology* 46 (suppl) pp10, 2011.
- 5) 赤塚美樹. マイナー組織適合抗原の重要性. 第33回日本造血細胞移植学会 (シンポジウム 2), 松山 2011年3月9日. 日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp164, 2011.
- 6) 赤塚美樹, 山村武史, Bleakley Marie, 疋田潤哉, 濱島剛, 南谷泰仁, 松原亜以子, Riddell Stanley, 恵美宣彦, 小寺良尚, 森島泰雄, 小川誠司. HapMap 資源を利用したマイナー組織適合抗原に関わる SNP 同定のためのオンラインソフトの開発. 第33回日本造血細胞移植学会 (ポスター PS2-128), 松山 2011年3月10日. 日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp336, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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

間葉系幹細胞における HLA クラス Ib 分子の発現に関する研究

分担研究者 一戸 辰夫（京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科）
研究協力者 三浦 康生（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部）
石谷 昭子（奈良県立医科大学 法医学教室）
下嶋 典子（奈良県立医科大学 細菌学教室）

研究要旨

灌流法による採取を行った骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植後の同種免疫応答の制御に関与し得る因子として、間葉系幹細胞における HLA-G の発現についての検討を行った。まず高感度の ELISA 法を用いて、骨髄由来間葉系細胞株の培養上清・細胞溶解物中の HLA-G タンパク質の検出を試みたが、いずれの細胞株においても HLA-G の発現を確認することはできなかった。また、通常の RT-PCR 法を用いた検討では、これらの細胞株における HLA-G 及びその可溶性アイソフォームの mRNA の発現も確認できなかった。次いで、HLA-G の発現を亢進させることが報告されている液性因子として IL-10 の存在下で骨髄由来間葉系幹細胞株の培養を行ったが、IL-10 添加後 6 日目までの時点では、HLA-G mRNA、HLA-G タンパク質のいずれも検出することはできなかった。今後、直接骨髄から分離した初代の間葉系幹細胞を用いた検討を行う必要はあるが、体外培養下の間葉系幹細胞の有する免疫調節機構に果たす HLA-G の寄与は少ないものと推測された。

A. 研究目的

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が移植されることなどにより、従来型の骨髄移植法と比較して移植片の生着効率が向上するとともに GVHD の発症リスクも低下することが期待されている。間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells, MSC）は自己複製能と骨細胞・脂肪細胞・軟骨細胞などへの多分化能を有する体性幹細胞であり、骨髄・臍帯血・歯胚・脂肪組織などから比較的容易に分離することが可能である。また、体外で培養されたヒト MSC は T 細胞・NK 細胞・B 細胞・樹状細胞など広範な免疫担当細胞の機能を HLA 非依存的に抑制することが報告されており、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease,

GVHD) の治療・自己免疫疾患の治療・臓器移植片の生着率向上などを目的として MSC の移植を行う前臨床研究や実際の臨床試験がすでに国内外において開始されている。しかし、MSC による免疫調節機構については未知の点が多く、現時点ではこれらの臨床研究の有効性も限定的なものにとどまっている。したがって、今後 MSC による細胞免疫治療の proof-of-principle を確立し、より適切な臨床応用を可能としていくためには、その免疫調節機能にかかわる分子機構を詳細に明らかにしていくことが必須である。

ヒト MSC の免疫調節作用に HLA 分子がどのように関与するかは十分に明らかにされていないが、MSC は細胞表面に HLA-A, HLA-B などの HLA クラス Ia 分子を発現しており、サイトカイン刺激な

どによる機能の腑活化に伴いクラス II 分子も発現する。一方、クラス Ib 分子（非古典的クラス I 分子）と呼ばれている HLA-E, HLA-F, HLA-G の三種類の HLA 分子は、古典的 HLA 分子と異なり多型性に乏しく、抗原非特異的なユニークな免疫調節機能を有することが示唆されているが、それらの MSC における発現についての知見はきわめて乏しい。特に、これらのうち、HLA-G に関しては、その受容体とみなされている ILT2 や ILT4 への結合を介してリンパ球の増殖応答や樹状細胞の抗原提示機能を抑制することが報告されており、最近では固形臓器移植片に対する免疫寛容の成立維持に HLA-G が関与することを示唆する報告もなされている。そこで、今回、われわれはヒト骨髄に由来する MSC 株を用いて、定常状態および IL-10 存在下における HLA-G の mRNA・タンパク質レベルでの発現についての検討を行った。

B. 研究方法

ヒト骨髄由来 MSC 株は Lonza 社より、IL-10 は Peprotech 社より入手した。RT-PCR 法による HLA-G mRNA の検出は国際ワークショップで規定された方法に準拠し、すべてのスプライシングフォームを増幅可能なプライマーと、可溶性アイソフォームの cDNA のみを増幅可能なプライマーを用いて行った。HLA-G の ELISA 法による HLA-G の測定には、HLA-G に対する単クローン抗体として、MEM-G/9 および G233（いずれも EXBIO 社）を使用し、種々の濃度に調整した精製 HLA-G 分子を含む検体により検量線の作成を行った。また、精製 HLA-G 分子、可溶性 HLA-G cDNA を導入した B 細胞株(721.221Gs)の培養上清からアフィニティカラムを用いて調製した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるトランスフェクタントを用いた実験は京都大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

RT-PCR 法による検討では、今回、用いた MSC 株のいずれにおいても HLA-G あるいはその可溶性アイソフォームの mRNA を検出することはできなかった。また、ELISA 法による HLA-G タンパク質の検出可能濃度の下限は 0.05 ng/ml 程度であったが、定常状態の骨髄由来 MSC 株の培養上清・細胞溶解物中のいずれにおいても HLA-G のタンパク質発現を確認することはできなかった。次いで、HLA-G の発現を亢進させることが報告されている液性因子として IL-10 の存在下で骨髄由来 MSC 株の培養を行ったが、IL-10 添加後 3 日目、6 日目の時点における検討では、HLA-G mRNA、HLA-G タンパク質のいずれも検出することはできなかった。

D. 考察

これまで胎盤トロホブラスト以外に 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るが、再現性が確認されているものは少ない。その中でも間葉系幹細胞についての発現については、複数の研究グループによる検討がなされており、細胞表面への発現は見られないものの可溶化アイソフォームを分泌しているとするものや、プロゲステロン存在下で細胞表面への発現が誘導されるとする報告が存在する。しかし、今回われわれが用いた MSC 細胞株ではいずれにおいても全く発現が認められなかったことより、HLA-G の発現量が継代によって低下していた可能性も推測される。今後は、骨髄から分離した初代の MSC を用いた検討も必要と思われる。

E. 結論

ヒト骨髄由来 MSC 株を用いて HLA-G mRNA、HLA-G タンパク質の検出を試みたが、いずれも発現を確認することはできなかった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda J, Ichinohe T, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Ichiyama S, Uchiyama T. Impact of discontinuing fluoroquinolone prophylaxis after allogeneic marrow or peripheral blood SCT with myeloablative conditioning. Bone Marrow Transplant. 2010; 45(8):1369-1371.
- 2) 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. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. Blood. 2010; 116(8):1369-1376.
- 3) Ichinohe T. Long-term fetal-maternal microchimerism revisited: microchimerism and tolerance in hematopoietic stem cell transplantation. Chimerism. 2010; 1(1):39-43.
- 4) Nagafuji K, Matsuo K, Teshima T, Mori S, Sakamaki H, Hidaka M, Ogawa H, Kodera Y, Kanda Y, Maruta A, Mori T, Yoshihara F, Ichinohe T, Kasai M, Takatsuka Y, Kubo K, Sao H, Atsuta Y, Suzuki R, Yoshida T, Tsuchida M, Harada M. Peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors in patients with leukemia: a propensity score-based comparison from the Japan Society for Hematopoietic Stem Cell Transplantation registry. Int J Hematol. 2010; 91(5): 855-864.
- 5) 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. 2011; 46(2):208-216.

- 6) Sato T, Ichinohe T, Kanda J, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Clinical significance of subcategory and severity of chronic graft-versus-host disease evaluated by National Institutes of Health consensus criteria. Int J Hematol. (in press)

2. 学会発表

- 1) 下嶋典子、吉岡 聡、菱澤方勝、大森勝之、Geraghty DE、一戸辰夫、石谷昭子. 成人 T 細胞白血病ウイルス感染細胞株における HLA-F の発現解析. 第 19 回日本組織適合性学会、東京、2010 年 9 月 17-19 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

骨髄内骨髄移植の安全性、有効性の確立に関する研究

分担研究者 小川 啓恭（兵庫医科大学）

研究要旨

「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植法」は、灌流法で骨髄採取することで、T細胞の低い混入率（移植後のGVHDの軽減）、骨髄内へ移植することで、ドナー幹細胞の骨髄への高い到達率（高い生着率）など、数多くの有用性が動物実験で証明されている。これを受けて、ドナーの腸骨から、灌流法で骨髄細胞を採取し、遠心で volume を減らした後、前処置を施した患者の腸骨に直接移植するプロトコールを作成し、関西医科大学と兵庫医科大学の倫理委員会で承認を得た後、臨床研究を実施した。実際には、関西医科大学でドナーから灌流法による骨髄採取を行い、兵庫医科大学で患者に移植するという協力体制で行った。2例実施した結果、灌流法で採取した骨髄細胞は、吸引法で採取した骨髄細胞と比較して、T細胞の混入率、CD34陽性細胞数において、有意差が認められなかった。さらに、灌流法で採取された骨髄液は、赤血球の灌流率が有意に高く、遠心だけでは、骨髄内へ移植できる容積にまで、減らすことができなかった。今後、灌流法による骨髄採取法の改善、採取骨髄液から赤血球を除去する方法の確立が必要であることが判明した。さらに、本研究の後半部分、すなわち骨髄内に移植を行うステップの研究を並行して進める必要があることから、吸引法により採取した骨髄細胞を骨髄内へ移植する研究も並行して行う予定である。

A. 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データより、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。

B. 研究方法

何度も議論を繰り返した後、灌流法による骨髄内骨髄移植の治療プロトコールが決定された。そのプロトコールは、関西医科大学と兵庫医科大学の倫理委員会へ提出され、それぞれで承認が得られた。最初の数例は、ドナーからの灌流法による骨髄採取は、関西医科大学で、池原の指導の下、採取を行い、

それを兵庫医科大学に運び、患者に移植するものとした。

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。

C. 研究結果

灌流法による骨髄採取を2例施行した。骨髄細胞の採取に際しては、左右の腸骨で、採取される細胞成分に関して、灌流法による骨髄採取と通常吸引法による骨髄採取を比較検討した。その結果、CD34 陽性細胞率、T 細胞の混入率において、両者の間で差を認めなかった。さらに、灌流法による骨髄採取においては、赤血球の混入が多く、プロトコールにあるように、遠心分離法による血球成分の濃縮だけでは、骨髄内移植に用いることができなかった。このため、同時並行で、前処置を行っていた患者に対しては、吸引法で採取した骨髄を、通常の方法に準じて、静脈内へ輸注することにより、移植を行った。

「骨髄内臍帯血ミニ移植」は、第 I 相試験 (10 例) を終了した。骨髄内への臍帯血の輸注に関して、脂肪塞栓などの合併症は起こらず、安全に施行可能

であった。また、移植片の生着に関して、10 例中 9 例で、ドナータイプの生着を得た。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。

D. 考察

2 例の灌流法による骨髄採取の経験から、採取される細胞成分において、灌流法と吸引法とで、差を認めなかったことから、灌流法による骨髄採取の手技において、改良を加える必要があることが判明した。また、赤血球の混入が多いことから、灌流法で採取した後、赤血球を除去する行程が必要なが判明した。骨髄内骨髄移植の是非についても、並行して研究を進める必要があると考えられた。

「骨髄内臍帯血ミニ移植」を実施した 10 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た。生着に関しても、10 例中 9 例で、移植片由来の生着を得ており、問題はな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。

「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。

E. 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」のプロトコールを完成した後、灌流法による骨髄採取を2名行い、灌流法による骨髄採取の手技上の改良が必要であること、赤血球を除去する必要があることが明らかになり、それらを克服するための新たなプロトコールの作成を準備している。「骨髄内臍帯血ミニ移植」については、骨髄内へ臍帯血を移植することの安全性は確認されたものと考えている。今後、第II相試験において、骨髄内へ臍帯血を移植することで、生着率および生着の速さを検討する。

F. 健康危険情報

灌流法による骨髄採取に関して、問題となる合併症は全く認められなかった。臍帯血の骨髄内移植においても、問題となる合併症は、全く認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satake A, Inoue T, Kubo S, Taniguchi Y, Imado T, Fujioka T, Horiuchi M, Xu Y, Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Tamaki H, Okada M, Okamura H, Ogawa H. Separation of antileukemic effects from graft-versus-host disease in MHC-haploidentical murine bone marrow transplantation: participation of host immune cells. *International Journal of Hematology*, 91: 485-497, 2010.
- 2) Nagai Y, Ikegame K, Mori M, Inoue D, Kimura T, Shimoji S, Togami K, Tabata S, Kurata M, Imai Y, Matsushita A, Nagai K, Ogawa H, Takahashi T. Hepatosplenic alphabeta T cell lymphoma. *Int J Clin Oncol*, 15: 215-219. 2010.

- 3) Nishiwaki S, Inamoto Y, Sakamaki H, Kurokawa M, Iida H, Ogawa H, Fukuda T, Ozawa Y, Kobayashi N, Kasai M, Mori T, Iwato K, Yoshida T, Onizuka M, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Miyamura K. Allogeneic stem cell transplantation for adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia: comparable survival rates but different risk factors between related and unrelated transplantation in first complete remission. *Blood*, 116; 4368-4375, 2010.
- 4) Asakura M, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi S, Mori T, Etoh T, Takami A, Yoshida T, Fukuda T, Hatanaka K, Kanamori H, Yujiri T, Atsuta Y, Sakamaki H, Suzuki R, Ogawa H. Use of foscarnet for cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a related donor. *International Journal of Hematology*, 92; 351-359, 2010.
- 5) 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 for adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first remission who have an HLA-matched sibling donor. *Leukemia*, 25; 259-265, 2011.

2. 学会発表

- 1) 2011 BMT Tandem Meetings. 2011.2.17-21, Honolulu Hawaii. Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Taniguchi K, Kato R, Nakata J, Okada M, Tamaki H, Taniguchi Y, Fujioka T, Satake A, Inoue T, Soma T, Ogawa H. Unmanipulated haploidentical stem cell transplantation using myeloablative or reduced-intensity preconditioning regimen.
- 2) The 52th annual meeting of the American Society of Hematology, 2010 12.4-7, Orlando USA. Inoue T, Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Taniguchi K, Tamaki H, Fujioka T, Okada M, Kato R, Yamamoto Y, Soma T, Ogawa H. Mechanism of marked reduction in the severity of graft-versus-host disease by reduced-intensity conditioning in murine MHC-haploidentical BMT model.
- 3) The 15th Congress of Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation, 2010, 10. 29-31, Phuket, Thailand. R. Kato, H. Tamaki, K. Ikegame, S. Yoshihara, K. Kaida, T. Inoue, J. Nakata, K. Taniguchi, T. Fujioka, M. Okada, H. Ogawa. One-HLA-antigen-mismatched related hematopoietic stem- cell transplantation using graft-versus-host disease prophylaxis with methylpredonisolone.
- 4) Yoshihara S, Maruya E, Kaida K, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Ikegame K, Tamaki H, Okada M, Soma T, Kusunoki K, Hayashi Y, Saji H, Ogawa H : High risk of graft rejection in cases with HLA antibodies undergoing haploidentical SCT without TCD、第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 25 日 (plenary)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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

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
難治性サイトメガロ、EB ウイルス感染症の治療

分担研究者 小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

研究協力者 高橋 義行（名古屋大学医学部附属病院小児科 講師）

研究要旨

ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞による臨床第 1,2 相試験を行った。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 を誘導した。培養は CMV が 8 名、EBV が 17 名で行い、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、他に重篤な合併症も認めなかった。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。

B. 研究方法

造血細胞移植 HLA-A2 または A24 陽性ドナーの末梢血 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。初回投与細胞数、 $1 \times 10^5/\text{kg}$ 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 の評価を行う。

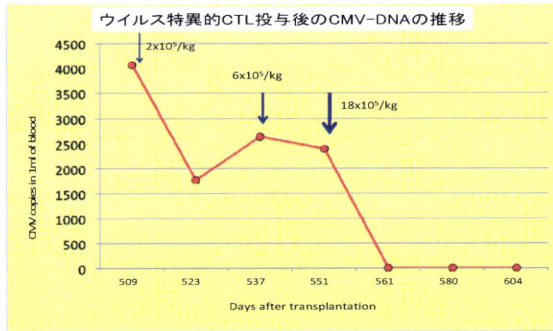
(倫理面への配慮)

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う。

C. 研究結果

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 を誘導した。培養は CMV が 8 名、EBV が 17 名で行い、それぞれ 5 名、7 名で初回投与基準を満たす細胞数の増殖が得られた。うち培養上清中に含まれるウイルス検査の基準も満たしたのは、3 名、3 名であった。細胞培養上清中に EBV ウイルスを認めた 3 例中 3 例で生細胞中の EBNA 陽性細胞は感度以下であったことから、細胞上清中のウイルス定量 PCR 法が既に傷害されたウイルス DNA を同定していると考えられたためウイルス検査基準の見直しを行なった。

GCV 耐性 CMV 感染を起こした患者 2 名に対し CMV-CTL の投与を行った。いずれも投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、他に重篤な合併症も認めなかった。1 名の患者で投与後 CMV-DNA の低下、消失を認めた。



別の1名は2回のCTL投与後にウイルスDNAの減少が見られなかったため、ホスカビルの投与を行いCMV-DNAは消失した。

D. 考察

骨髄移植ドナーから3-4週間の培養期間でCMVまたはEBV特異的CTLを臨床応用可能なレベルまで培養増幅することができた。

当院倫理委員会での承認後、臨床第1,2相試験が開始された。2名の投与はいずれも安全に投与でき、うち1名で効果が見られた。培養に3-4週間かかること、投与基準をみたらCTLが得られるのはCMV特異的CTLで約50%、EBV特異的CTLでは約20%であることから、EBV特異的CTLの誘導ペプチドリストの追加が必要と考えられ、またリスクの高い移植患者ではあらかじめドナーより培養し凍結しておくことが望ましいと考えられた。

E. 結論

臨床第1,2相試験が開始された。まだ投与例が少なく、今後さらにCTL培養条件を改善し、症例数を増やす必要があるものの、いずれも安全に投与可能であり、明らかな効果の見られた症例も認めた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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 resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3158-61.
- Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, Horibe K, Kato K, Kojima S. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Jul 29. [Epub ahead of print]
- Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*. 2010 Nov;116(22):4631-4638.
- Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Mar;17(3):291-9.
- Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M,

Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. Blood. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]

第 52 回日本小児血液学会総会、2010 年 12 月 18 日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

2. 学会発表

- 1) Takahashi Y. Adoptive transfer of allogeneic natural killer cell in neuroblastoma model. Recent Advances in the Treatment of High-risk Neuroblastoma. Apl. 10, 2010. Seoul, Korea
- 2) Kojima S. Unmanipulated haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Haploidentical Transplantation-Asia Pacific Meeting Seminar 2010. Jul. 23, 2010. Seoul, Korea
- 3) Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. Haploidentical Transplantation-Asia Pacific Meeting Seminar 2010. Jul. 24, 2010. Seoul, Korea
- 4) Takahashi Y, Bustos I, Doisaki S, Muramatu H, Shimada A, Hama A, Kojima S.. Increase in NK-cell lysis of leukemic blasts due to loss of mismatched HLA haplotype after haploidentical stem cell transplantation. 52nd ASH annual meeting. Dec. 4, 2010. Orland, U.S.A.
- 5) 西田てつや、鈴木進、村田誠、高橋義行、小島勢二、直江知樹：Generation of CMV antigen specific CTL using closed culture system. 第 72 回日本血液学会学術集会、2010 年 9 月 24 日、横浜
- 6) 高橋義行、小島勢二：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と臨床第 1 相試験。

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

分担研究者 品川 克至（岡山大学医学部 血液・腫瘍内科 講師）

研究要旨

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS) は、移植後に肺胞障害により発症する予後不良な肺合併症であり、肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与などが想定されている。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(1-6 時間)の肺への移植細胞の集積が少なかった。また肺に存在するドナー細胞は移植後 6 時間まで低下(肺から流出)するが、その後肺におけるドナー細胞は同種移植群にのみ増加し続け、アロ免疫反応によると考えられた。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、移植後早期の移植細胞の肺へのトラップがこれらの現象に関与していると考えられた。

A. 研究目的

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS) は、移植後に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、肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与などが考えられている。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 O₂ 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こり、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

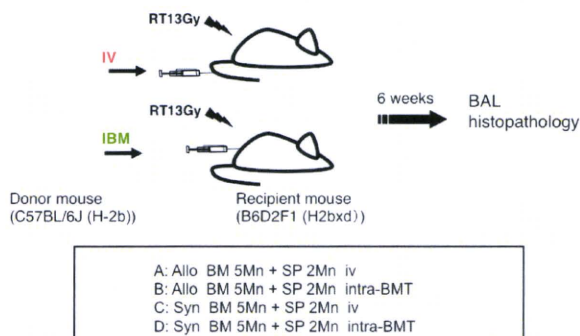
れることを報告している。我々は intra-BMT では iv-BMT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立て、マウスモデルを用いて IPS に関して intra-BMT と iv-BMT との比較検討を行った。

B. 研究方法

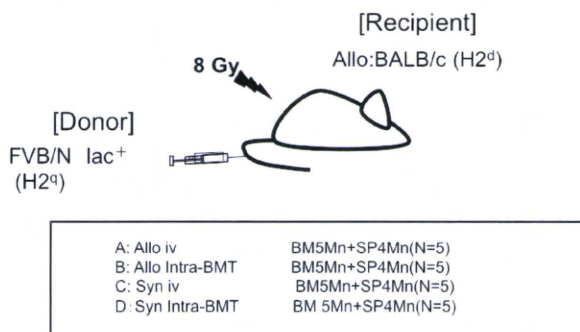
ドナーマウスに C57BL/6J を用い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に iv-BMT と intra-BMT を行い比較検討した。

移植後の、体重および GVHD スコア、生存率を評価した。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) 次にドナーマウスに FVB/N lac⁺、レシピエントに 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 2)

(図 1)



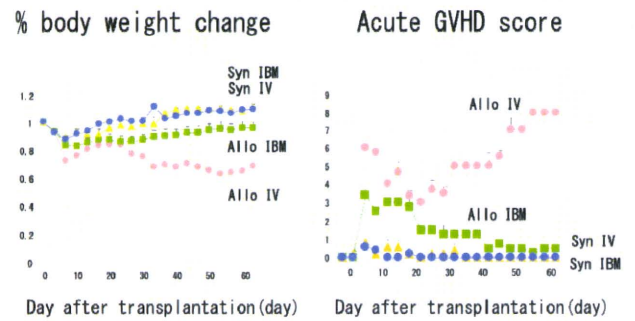
(図 2)



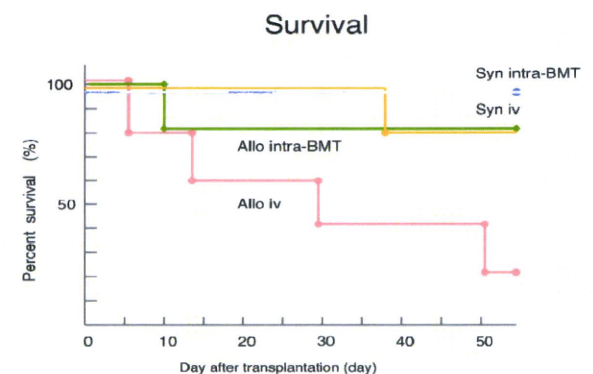
C. 研究結果

このモデルでは、intra-BMT で GVHD スコアが低く生存率が高かった。(図 3,4)

(図 3)



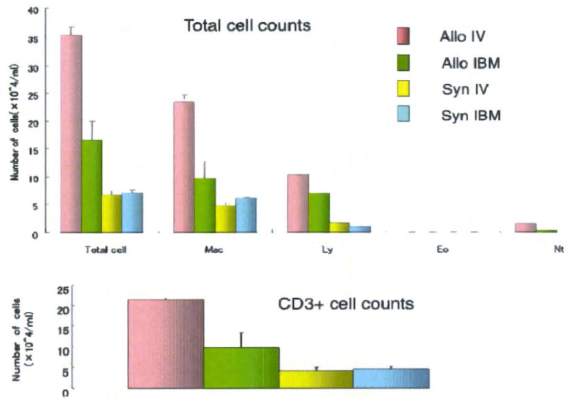
(図 4)



また移植 6 週後の 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)

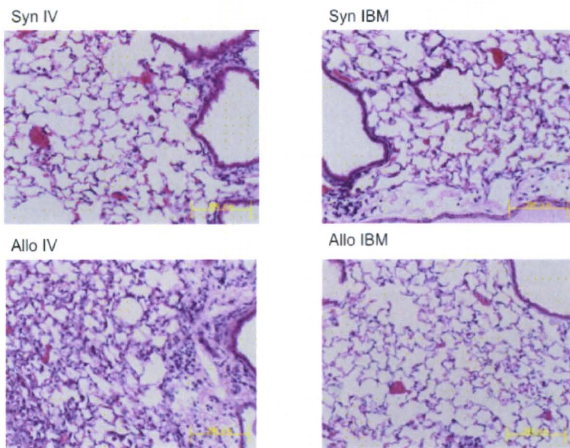
(図 5)

Analysis of BALF cells; 6 weeks after BMT



(図 6)

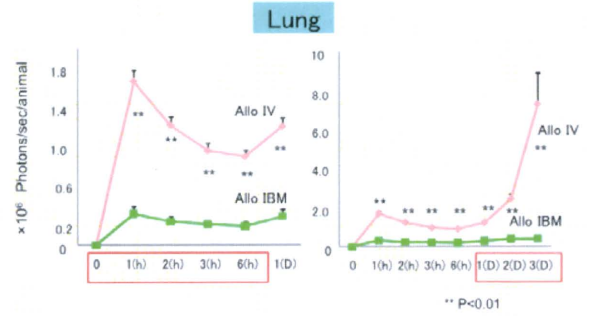
Results Lung of pathology (HE stain)



allogeneic BMT では IV 群が intra-BMT 群に比べ有意に増加を認めた。(図 8)

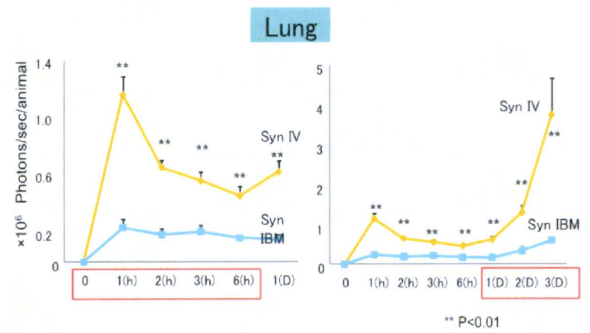
(図 6)

Results (Allogenic)



(図 7)

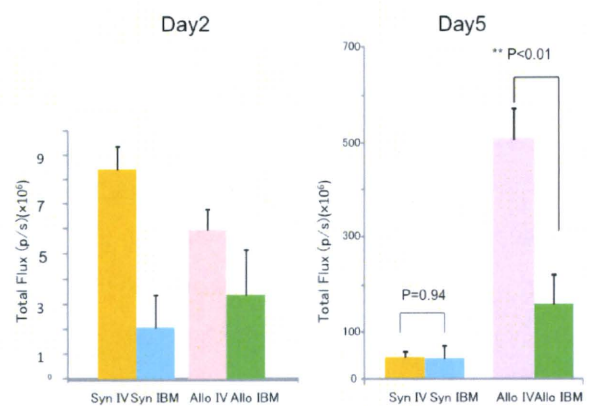
Results (Syngenic)



(図 8)

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(1-6 時間)の肺への移植細胞の集積が少なかった。また肺に存在するドナー細胞は移植後 6 時間まで低下(肺から流出)するが、その後肺におけるドナー細胞は同種移植群にのみ増加し続け、アロ免疫反応によると考えられた。(図 6, 7)

移植後 2 日までは syngenic および allogeneic BMT で、intra-BMT 群は iv-BMT 群に比べ、肺へのドナー細胞のトラップは少なかった。移植後 5 日では syngenic BMT では肺ドナー細胞の増加は intra-BMT 群と iv-BMT 群に差を認めなかったが、



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。また肺障害のメカニズムとして

移植 2 日までのドナー細胞の肺へのトラップに加え、アロ免疫反応の関与が示唆された。

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無く、今回肺局所のリンパ球の集積の差異が経時的に観察された意義は大きいと思われる。さらに 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、をおこなう予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukui J, et al.: Prevention of Graft-Versus-Host Disease by Intra-Bone Marrow Injection of Donor T Cells Stem cells 25: 1595-1601, 2007
- 2) Y Yamasuji, H Nishimori, M Fujii, H Sugiyama, K Kobayashi, S Kadohisa, E Kondo, K Shinagawa, K Mominoki, T Kanekura, M Tanimoto, Y Maeda. Prevention of Idiopathic Pneumonia Syndrome by Intra-bone Marrow Injection of Donor Cells. Biology of Blood and Marrow Transplantation 17(2) Supplement, S323, 2011
- 3) 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. 学会発表

- 1) Y Yamasuji, H Nishimori, M Fujii, H Sugiyama, K Kobayashi, S Kadohisa, E Kondo, K Shinagawa, K Mominoki, T Kanekura, M Tanimoto, Y Maeda. Prevention of Idiopathic Pneumonia Syndrome by Intra-bone Marrow Injection of Donor Cells. 2011 BMT tandem meetings, February 17, 2011, Honolulu, Hawaii
- 2) 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. December 6 2008, American Society of Hematology 50th Annual Meeting and Exposition

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきこと無し

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

臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発

分担研究者 村田 誠（名古屋大学医学部附属病院 血液内科 講師）

研究要旨

骨髄非破壊的前治療を用いた臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者を対象として、解凍した臍帯血を洗浄・濃縮し、直接骨髄内へ輸注する移植法の臨床試験を行っている。厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」には該当しないとの見解を得たのち、本年度は1例に対して試験を実施した。重篤な有害事象は認めず、速やかな生着を確認した。

A. 研究目的

本研究では、骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植における生着率の向上を目指し、同種造血幹細胞移植の適応でありながら、骨髄または末梢血幹細胞提供ドナーが得られない成人血液悪性疾患患者を対象として、骨髄内臍帯血移植の安全性と有効性を確認する臨床試験を実施する。

本試験を通じて得られる、例えば臍帯血の洗浄・濃縮技術や骨髄への注入技術などは、将来の「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法」の確立に必ずや寄与するものとする。

B. 研究方法

本試験のデザインは臨床第 II 相試験。対象は骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者。主として、フルダラビン+シクロフォスファミドによる前治療法と、短期メソトレキセート+タクロリムスによる GVHD 予防法を用いる。解凍した臍帯血を洗浄・濃縮したのち、後腸骨稜から通常の骨髄穿刺針を用いて注入する。主要評価項目は移植後 60 日時点での生着かつ生存。予定登録数は 22 例で、登録期間は 4 年を予定している。追跡期間は最終症例の移植後 1 年。

C. 研究結果

本試験は厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」には該当しない、との見解を得たのち、本年度は1例に対して試験を実施した。重篤な有害事象は認めず、速やかな生着を確認した。もう1例登録されたが、移植日にはまだ至っていない。

D. 考察

造血幹細胞を用いた臨床研究を行う際には、改訂された厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」との関係を確認した上で、実施の判断をする必要がある。

現在、さらに登録症例数を増やすべく、本試験の多施設共同研究への拡大を検討している。

E. 結論

引き続き、安全性に配慮しながら本試験を進める。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murase M, Murata M, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 haplotype correlates with relapse and survival after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 2010 Dec 20. [Epub ahead of print]
- 2) Waki F, Murata M, et al. 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*, 2010 Sep14. [Epub ahead of print]
- 3) Terakura S, Murata M, et al. A prospective dose-finding trial using a modified continual reassessment method for optimization of fludarabine plus melphalan conditioning for marrow transplantation from unrelated donors in patients with hematopoietic malignancies. *Ann Oncol*, 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) Nishida T, Murata M, et al. Generation of CMV antigen specific CTL using closed culture system.
第 72 回日本血液学会総会、横浜、2010 年 9 月.
- 2) Kato T, Murata M, et al. Exhaustion of CMV specific T cells with enhanced PD-1 expression in persistent cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. The 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, in Orlando, Florida. December 2010.
- 3) 村田 誠. 教育講演：造血幹細胞移植. 第 19 回日本組織適合性学会大会、東京、2010 年 9 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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

灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法：基礎から臨床へ
(H22-免疫-一般-009) に関する研究報告書

分担研究者 森 眞一郎（関西医科大学 第一内科，同附属枚方病院血液腫瘍内科）

研究要旨

灌流法による骨髄採取の安全性および有効性を検討した。2 例の健常同胞ドナーを対象に施行した。1 例目：26 歳、男性。9 回灌流法を施行。2 例目：22 歳、男性。3 回灌流法施行。いずれも目標細胞数に到達しなかったため、吸引法による骨髄採取に変更し目標細胞数を得た。規定によりレシピエントに対し骨髄内移植は施行されなかった。ドナーに重篤な有害事象は発生しなかった。

A. 研究目的

灌流法による骨髄採取の安全性と有効性を検討する。

主要評価項目：

灌流法による骨髄採取に伴う安全性を **primary endpoint** とする。

副次的評価項目：

灌流法に要した手術時間、骨穿孔、皮膚穿孔数・採取量、採取有核細胞数、ヘマトクリット、CD3(+), CD34(+), CFU-C 及び CFU-F。

B. 研究方法

対象：HLA 適合または GVH 方向血清 3 抗原以内不適合血縁者。適格条件、除外条件については、非血縁バンクドナーの基準に準ずる。

方法：全身麻酔下にて吸引法（従来法）を実施する前に片側腸骨から灌流法で骨髄採取する。2 本の骨髄穿刺針を腸骨に約 3～5cm の間隔で穿刺し、生理食塩水 30ml を一方よりゆっくり注入し、同時に対側から軽く吸引する。この時、採取側シリンジには、ヘパリン（10～30U/ml とする）加生理食塩液（約 0.5ml）を使用する。灌流法による骨髄採取が終了後、従来法である吸引法を用いて必要細胞数に達するまで骨髄採取を継続する。

C. 研究結果

1 例目は 9 回灌流法を施行し $NCC2.8 \times 10^7$ 、CD34 陽性細胞 1.29%の骨髄細胞が採取された。2 例目は 3 回灌流法を施行し採取量 56ml、 $NCC1.8 \times 10^7$ 、CD34 陽性細胞 1.07%、CD3 陽性細胞 10.0%、Ht23.1%であった。重篤な有害事象は発生せず安全性に問題は発生しなかった。

D. 考察

生食注入による重篤な有害事象は発生しなかった。生食注入圧および骨髄吸引圧が高かったためスムーズに吸引できなかった。灌流と骨髄細胞密度との関係が示唆された。

E. 結論

灌流法の有効性を得るためにはさらなる改善が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

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

骨髄内造血細胞移植に付随する生着不全や日和見感染症に対する新規診断法、
免疫再構築過程評価法、及び免疫細胞療法の開発に関する研究

分担研究者 森尾 友宏（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野）

研究協力者 清水 則夫（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学）

A. 研究目的

骨髄内造血細胞移植は今後の展開が期待される新規治療法であるが、その効果を検証するシステムと補助的治療の有無を決定することが重要である。そのデータを元にはじめて、この治療法の利点と問題点が明らかになり、最適な免疫学的再構築促進手段（薬あるいは免疫細胞療法）を模索することが可能になる。本年度の研究では、骨髄内造血細胞移植における免疫学的再構築や移植後合併症の詳細かつ簡便な解析法を開発することを目的とした。具体的には、今まで行われてきた一般的なリンパ球数測定、B, T, NK, NKT 細胞の同定、NK 活性、芽球化反応などに加えた免疫能評価法を構築することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 対象は今までに東京医科歯科大学及び協力施設にて行われた造血細胞移植検体とした。
- 2) 免疫モニタリングは以下の検討を行った
 - A. T cell receptor excision circles (TRECs) : realtime PCR
 - B. Intra cellular cytokine staining/FACS analysis: IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-17, IL-22, TNF- α
Cytokine capture method (With Peptivator pulse)
 - C. kappa-deleting recombination excision circles (KRECs): signal joint (sj)KRECs and coding joint (cj)KRECs: realtime PCR
 - D: FACS analysis (B cell subsets)
 - E: FACS analysis (DC subsets)

患者検体からは FACS 解析用の細胞を分離し、また全血から核酸を分離して、解析を行った。

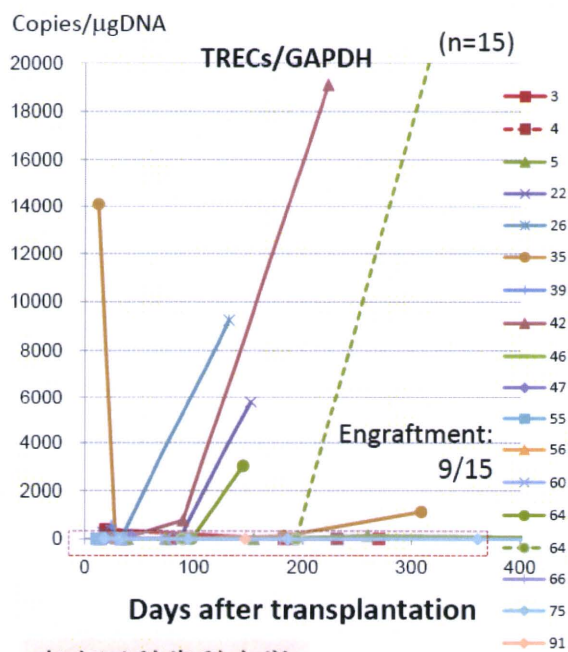
(倫理面への配慮)

本研究は、造血細胞移植後の血液という貴重な資源を用いて行われる研究であり、本学医学部倫理審査委員会の承認を経て研究が行われた。各種指針を遵守して、十分な説明と同意のもとに、最小限の検体量で解析が行えるように配慮をおこなった。

C. 研究結果

A. TRECs (図 1)

臍帯血移植後の TRECs を解析したところ、図 1 に示すように 90 日目を越えたところから増加が認められ、胸腺を経由した T 細胞の新生を示唆するデータをえた。一方生着を認めない症例や、原疾患が再発した症例では長期的に低値となることが確認される。また、TRECs に加えて、T cell receptor Vbeta repertoire の FACS による解析や、V beta CDR (complementary determining region) の ABI 310 による spectratyping 手法も確立した。



東京医科歯科大学

図1 臍帯血移植後の KRECs の推移

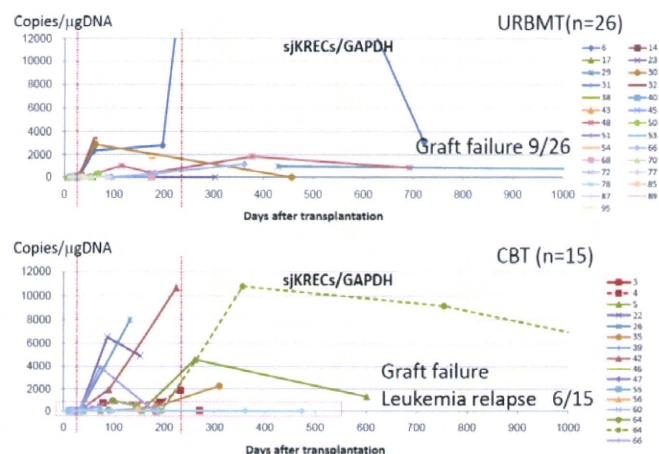


図2 非血縁造血細胞移植及び臍帯血移植後の sjKRECs の推移

B. サイトカイン細胞内染色によるヘルパーT 細胞サブセットの解析

Th1, Th2, Th17, Th22, Treg を検索するために、細胞内染色を行った。T 細胞数が回復し、また芽球化反応が正常化しても、Th1 細胞が回復しない症例などが認められることが明らかになった。また同様に CMV pp65, EBNA1 などのパルス後に、CD4, CD8 からの IFN-g 産生を見ることにより、特異的な T 細胞の回復をみる系 (Miltenyi) についても確認した。

C. KRECs (図2)

造血細胞移植後には、非血縁間骨髄移植、臍帯血移植共に 90 日目以前に sjKRECs が増加に転じることが明らかになった。また臍帯血移植後の KRECs の方が、非血縁間骨髄移植後に比べてコピー数が多い傾向がある。また生着不全や原疾患の再発では KRECs の回復は著しく不良であった。

D. B 細胞サブセット解析

CD20, CD27, CD10, CD24, CD38, IgM, IgD, APCB1 (P-glycoprotein), Propidium iodide を用いて、同時測定により、Transitional B-1, -2, -3, Naïve B, IgM memory, Centroblast, Centrocyte, Memory B, Plasmablast, Plasma Cell サブセットを同定する手法を確立した。

E. DC サブセット解析

Lineage marker, HLADR (+)のうち、CD123 or CD303 (+) CD11c (-) 群を plasmacytoid DC (pDC)、CD123 dull (+), CD303 (-), CD11c(+) 群を myeloid DC (mDC) として同定した。pDC は CpG ODN 刺激 →IFN-α、mDC は LPS →IL-12 産生により機能測定を行えることが明らかになった。

D. 考察

T 細胞新生能、T 細胞機能、B 細胞新生能、B 細胞サブセット、DC サブセット解析及び機能の解析により、より深い免疫能が解析できることが明らかになった。特に TRECs や sjKRECs は拒絶や免疫能回復の早期マーカーになる可能性がある。sjKRECs については従来の検討と同様に末梢血 B 細胞数と相関を示した。T 細胞については CD4, CD8 数や増殖反応が正常化しても、Mycobacterium 感染が遷延