

201114027A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中内 啓光

平成24 (2012) 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	6
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	10
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	16
IV.	研究成果の刊行物・別刷	20

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、HLAミスマッチの臍帯血移植の造血ならびに病態の解析を目的に、フローサイトメトリーとアリル特異的抗HLA抗体（ASHmAb）を使用した新規キメリズム解析法（HLA-Flow法）を考案した。本法は多くの利点を有することから、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、臨床研究の規模が限られ、使用するASHmAb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。そこで中内は新たな方法でASHmAbの作製を試み、染色性の良好な新規抗体の作製に成功した。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、全国規模の臨床研究とASHmAbの作製を柱とした本厚生労働科学研究が企画された。

平成23年度、中内は我が国で最も頻度の高いHLA-A24に対する新規抗体を作製した。渡辺は岡山大学と広島大学における生体肝移植の共同研究に加え、原発性免疫不全症研究班（班長：原寿郎先生）およびATLに対する細胞療法研究班（班長：鶴池直邦先生）の臨床試験の付随研究としてキメリズム解析プロトコールを作成し、共同研究を行なった。渡辺と高橋は虎の門病院と協議し、臍帯血移植後の再発におけるミスマッチHLA欠失の有無について、新たに共同研究を始めた。渡辺は札幌北楡病院と秋田大学でのキメリズム解析を引き続き支援し、済生会前橋病院と虎の門病院における新たな本法の導入に貢献した。高橋と田野崎は第3回キメリズム解析研究会を開催し、HLA-Flow法に関する情報交換を行なった。

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や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。一方、昨年度のASHmAbの作製は1個にとどまり、抗体作製における様々な問題点が浮き彫りとなった。今後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ためには、抗体作製における様々な問題点を解決して、良質かつ多種類のASHmAbの作製を継続して行うことが必要である。

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

HLA-Flow法で使用するASHmAbを作製する。また、全国の移植施設との共同研究を通じて、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ASHmAb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た。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、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った。

また、ASHmAb作製におけ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

所・実験動物研究施設で行なった。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った。

C. 研究結果

平成23年度、中内はHLA-A*24:02のテトラマーでHLA-B51トランスジェニックマウスを免疫して、我が国で最も頻度の高いHLA-A24に対する新規IgG型抗体を10クローン作製した。これらの抗体は、健常人血を混合して作製した人工キメリズム検体の解析で、極めて良好な染色性を示した。しかしながら、同時に免疫を試みたHLA-A11、A33、B5、B60、およびB61に関しては、ASHmAbを産生するハイブリドーマの作製はできなかった。

渡辺は岡山大学・消化器内科の高木章乃夫講師との共同研究で、C型肝炎ウイルスによる肝不全患者に対する生体肝移植後の免疫動態を解析し、C型肝炎の再燃と制御性T細胞数の間に関連があること、原疾患が原発性胆汁性肝硬変の場合には移植後末梢血におけるドナー由来細胞の頻度が高いことなどが判明した。広島大学・消化器外科/移植外科（大段秀樹教授）との共同研究では、肝移植時にドナー肝臓の脈管系を洗浄した際に得られるNK細胞を短時間培養して活性化し、レシピエントに輸注して肝臓癌の再発を抑制する免疫療法で、投与されたNK細胞がどのような体内動態を示すのか、HLA-Flow法により解析した。

原発性免疫不全症研究班（慶応義塾大学・小児科、森尾友宏准教授）の付随研究では、我が国で施行されたSCID患児に対する臍帯血移植後のキメリズム解析を行なった。その結果、T細胞が欠失した患者ではT細胞はドナー、ミエロイド系はレシピエント由来細胞となる

極端なスプリット・キメリズムが移植後長期にわたり継続することなどが判明した。ATL に対する細胞療法研究班（九州がんセンター・血液内科、鶴池直邦部長）の付随研究では、移植後早期の細胞数が少ない状態で、生着動態と残存 ATL 細胞の同時モニタリングが可能なマルチカラー・キメリズム解析のプロトコルを作成し、共同研究を行なった。

虎の門病院・血液内科（谷口修一部長）とは、臍帯血移植後の再発におけるミスマッチ HLA 欠失の有無について、新たに共同研究を始めた。

札幌北楡病院と秋田大学へは抗 HLA 抗体を送付し、それぞれ施設内におけるキメリズム解析を支援した。済生会前橋病院・血液内科（佐倉徹部長）と虎の門病院・臨床検査室（米山彰子部長）では、それぞれ FACS Canto II（Becton Dickinson 社）を導入して担当の臨床検査技師を配置し、HLA-Flow 法の導入を進めている。渡辺は両施設における解析担当者のトレーニングを行ない、解析に必要な抗体を送付した。

高橋と田野崎は第 3 回キメリズム解析研究会を開催したが、本研究会は平成 24 年度より『病態解析研究会』として継続し、引き続き HLA-Flow 法に関する情報交換を行なう予定である。

D. 考察

現在までに行なった HLA-Flow 法で使用した ASHmAb のうち、最も使用頻度が高かったのは抗 HLA-A24 抗体である。本抗体が作製されたことは、市販の高価な抗体を購入する必要がなくなるため、極めて意義深い。

岡山大学との共同研究で、生体肝移植における原疾患が原発性胆汁性肝硬変の場合には、

移植後末梢血におけるドナー由来細胞の頻度が高いことなどが判明した。その理由は不明であるが、原疾患における免疫異常が何らかの役割を果たしている可能性がある。

SCID 患児に対する臍帯血移植後のキメリズム解析で、T 細胞が欠失した患者では T 細胞はドナー、ミエロイド系はレシピエント由来細胞となる極端なスプリット・キメリズムが移植後長期にわたり継続することが判明した。このような現象は成人の移植では見られないが、レシピエントにもともと T 細胞が存在しないことが原因として考えられる。

E. 結論

平成 23 年度、新たに作製した抗 HLA-A24 抗体はキメリズム解析に極めて有効であることが判明したが、それ以外の ASHmAb の作製はできなかった。

一方、岡山大学と広島大学の生体肝移植における共同研究、厚生労働省の 2 つの研究班への付随研究としての参加、および虎の門病院との新たな共同研究など、HLA-Flow 法の臨床研究は全国規模での広がりをみせている。また、その有用性が移植医の間で認識され、医科研以外の 4 か所の病院で HLA-Flow 法の導入が進められている。

すなわち、ASHmAb の作製は十分ではなかったが、HLA-Flow 法による臨床診断の有用性に関するエビデンス創出では、臨床研究により全国規模での成果が得られている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
1. Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Gritli I, Rosenkvist J, Koizumi M, Okaji Y, Yamamoto R, Yagita H, Okumura K, Nishikori M, Wanaka K, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. Plasmin inhibitor reduces T-cell lymphoid tumor growth by suppressing matrix metalloproteinase-9-dependent CD11b(+)/F4/80(+) myeloid cell recruitment. *Leukemia*. 26(2): 332-339, 2012.
2. Suzuki N, Yamazaki S, Ema H, Yamaguchi T, Nakauchi H, Takaki S. Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL. *Exp Hematol*. 40(2): 166-174. 2012.
3. Umemoto T, Yamato M, Ishihara J, Shiratsuchi Y, Utsumi M, Morita Y, Tsukui H, Terasawa M, Shibata T, Nishida K, Kobayashi Y, Petrich BG, Nakauchi H, Eto K, Okano T. Integrin- α v β 3 regulates thrombopoietin-mediated maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 119(1): 83-94. 2012.
4. Saito R, Nakauchi H, Watanabe S. Serine/Threonine kinase Melk regulates proliferation and glial differentiation of retinal progenitor cells. *Cancer Sci*. 103(1): 42-9, 2012.
5. Okada K, Kamiya A, Ito K, Yanagida A, Ito H, Kondou H, Nishina H, Nakauchi H. Prospective isolation and characterization of bi-potent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem Cells Dev*. 21(7): 1124-1133, 2012.
6. Nishino T, Wang C, Mochizuki-Kashio M, Osawa M, Nakauchi H, Iwama A. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24298. Epub 2011 Sep 12.
7. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, Taketo MM, Karlsson S, Iwama A, Nakauchi H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 147(5):1146-58. 2011.
8. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 478(7367): 64-69, 2011.
9. Hamanaka S, Yamaguchi T, Kobayashi T, Kato-Itoh M, Yamazaki S, Sato H, Umino A, Wakiyama Y, Arai M, Sanbo M, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of germline-competent rat induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011; 6(7): e22008. Epub 2011 Jul 15.
10. Kawahara M, Chen J, Sogo T, Teng J, Otsu M, Onodera M, Nakauchi H, Ueda H, Nagamune T. Growth promotion of genetically modified hematopoietic

- progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. *Cytokine*. 55(3): 402-408, 2011.
11. Yokoi T, Kobayashi H, Shimada Y, Higuchi T, Eto Y, Ishige N, Kitagawa T, Otsu M, Nakauchi H, Ida H, Ohashi T. Minimum requirement of donor cells to reduce the glycolipid storage following bone marrow transplantation in a murine model of Fabry disease. *J Gene Med*. 13(5): 262-268, 2011.
 12. 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*. 406(1): 134-140, 2011.
 13. 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*. 8(2): 177-187, 2011.
 14. Morita Y, Iseki A, Okamura S, Suzuki S, Nakauchi H, Ema H. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp Hematol*. 39(3): 351-359, 2011.
 15. 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*. 286(6): 4760-4771, 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

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23年度、岡山大学と広島大学における生体肝移植の共同研究に加え、原発性免疫不全症研究班（班長：原寿郎先生）およびATLに対する細胞療法研究班（班長：鶴池直邦先生）の臨床試験の付随研究としてキメリズム解析プロトコールを作成し、共同研究を行なった。虎の門病院とは、高橋とともに臍帯血移植後の再発におけるミスマッチHLA欠失の有無について、新たに共同研究を始めた。札幌北楡病院と秋田大学でのキメリズム解析を引き続き支援し、済生会前橋病院と虎の門病院における新たな本法の導入に貢献した。

A. 研究目的

全国の移植施設との共同研究を通じて、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することである。

B. 研究方法

岡山大学と広島大学との共同研究では、両大学で生体肝移植を受けた患者の凍結末梢血サンプルを医科研に搬送し、解凍後に染色してFACS Ariaで解析した。原発性免疫不全症研究班とATLに対する細胞療法研究班との共同研究では、移植後のサンプルを常温で医科研に搬送し、翌日までに解析を行なった。

札幌北楡病院と秋田大学ではHLA-Flow法による造血細胞移植後のキメリズム解析を導入しているため、移植症例ごとに必要なASHmAb

を医科研から送付して解析を支援した。HLA-Flow法を導入予定の済生会前橋病院と虎の門病院へは、解析担当者への技術移管を含めた支援を行なった。

C. 研究結果

平成23年度、岡山大学・消化器内科の高木章乃夫講師との共同研究で、C型肝炎ウイルスによる肝不全患者に対する生体肝移植後の免疫動態を解析し、C型肝炎の再燃と制御性T細胞数の間に関連があること、原疾患が原発性胆汁性肝硬変の場合には移植後末梢血におけるドナー由来細胞の頻度が高いことなどが判明した。広島大学・消化器外科／移植外科（大段秀樹教授）では、C型肝炎ウイルスによる肝臓癌患者に対する生体肝移植後に、独自の免疫療法を行なっている。肝移植時にドナ

一肝臓の脈管系を洗浄した際に得られるNK細胞を3日間培養して活性化し、レシピエントに輸注して肝臓癌の再発の抑制をめざすものである(平成24年6月2日、米国移植学会でのプレナリー講演に採択)。我々は、投与されたNK細胞がどのような体内動態を示すのか、HLA-Flow法により解析した。

原発性免疫不全症研究班(慶応義塾大学・小児科、森尾友宏准教授)の付随研究では、我が国で施行されたSCID患児に対する臍帯血移植後のキメリズム解析を行なった。その結果、T細胞が欠失した患者ではT細胞はドナー、ミエロイド系はレシピエント由来細胞となる極端なスプリット・キメリズムが移植後長期にわたり継続することなどが判明した。ATLに対する細胞療法研究班(九州がんセンター・血液内科、鵜池直邦部長)の付随研究では、移植後早期の細胞数が少ない状態で、生着動態と残存ATL細胞の同時モニタリングが可能なマルチカラー・キメリズム解析のプロトコールを作成し、共同研究を行なった。

虎の門病院・血液内科(谷口修一部長)とは、高橋とともに、臍帯血移植後の再発における白血病細胞のミスマッチHLA欠失の有無について、新たに共同研究を始めた。

札幌北榆病院と秋田大学へは抗HLA抗体を送付し、それぞれ施設内におけるキメリズム解析を支援した。済生会前橋病院・血液内科(佐倉徹部長)と虎の門病院・臨床検査室(米山彰子部長)では、それぞれFACS Canto II(Becton Dickinson社)を導入して担当の臨床検査技師を配置し、HLA-Flow法の導入を進めている。渡辺は両施設における解析担当者のトレーニングを行ない、解析に必要な抗体を送付した。

E. 結論

国内の移植施設では、すでに札幌北榆病院と秋田大学でHLA-Flow法を導入しているが、平成24年度から済生会前橋病院と虎の門病院でも実施予定である。厚生労働省の2つの研究班(原班と鵜池班)において、HLA-Flow法によるキメリズム解析が付随研究として採用されたので、平成24年度以降も引き続き全国規模での臨床研究を進める予定である。その他、生体肝移植を行なっている広島大学と岡山大学、臍帯血ミニ移植を行なっている虎の門病院へは、今後も共同研究を通じて本解析法の技術提供と解析技術の向上をめざす。

すなわち、HLA-Flow法による臨床診断の有用性に関するエビデンス創出では、臨床研究により全国規模での成果が得られている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 78(2): 143-148, 2011.
2. Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaru 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.* 102(3): 569-577, 2011.
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.* 115(2): 214-220, 2011.
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*, 20(5): 901-913, 2011.
- ## 2. 学会発表
1. 渡辺信和、高橋聡、『キメリズム解析／HLA-Flow法で使用するアレル特異的抗HLA抗体の特異性 - 実際の解析から判ったこと - 』、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（加藤班）、平成23年1月30日（東京医科歯科大学）
 2. 渡辺信和、中内啓光、『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 厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業 医療技術実用化総合研究 臨床研究推進研究成果発表会、平成 23 年 2 月 24 日（シェーンバッハ・サボー）
 3. Nobukazu Watanabe, Yusuke Nakauchi, Eri Watanabe, Masaya Kakuta, Koji Futamura, Motohiro Furuki, Hiromitsu Nakauchi, Clinical diagnosis of graft failure and relapse of leukemia after HLA-mismatched hematopoietic cell transplantation by chimerism analysis using a spectral analyzer. *CYTO2011*, May. 22th, 2011, Baltimore, MD.
 4. 渡辺恵理、中内祐介、渡辺信和、石田宏之、中内啓光、『11 カラーFACS 解析による造血細胞移植後の生着動態と白血病細胞の同時モニタリング』、第 21 回日本サイトメトリー学会、口頭発表、平成 23 年 6 月 26 日（京都市国際交流会館）
 5. 渡辺信和、石垣知寛、中野伸亮、宇都宮與、小林誠一郎、内丸薫、『ATL 細胞解析／HAS-FACS 法とキメリズム解析／HLA-Flow 法の同時解析による ATL に対する臍帯血移植後の病態解析』、厚生労働科学研究 がん臨床研究事業「成人 T 細胞性白血病 (ATL) の根治を目指した細胞療法確立およびその HTLV-1 抑制メカニズムの解明に関する研究 (H22-がん臨床-一般-028)」班（第 1 回鶴池班班会議）、平成 23 年 7 月 29 日（福岡センタービル）
 6. 石垣知寛、在家裕司、小林誠一郎、大野伸広、内丸薫、渡辺信和、小柳津直樹、東條有伸、中内啓光、『フローサイトメトリーによるフェノタイプ解析を用いた急性型ATLにおける末梢血腫瘍細胞数の新規評価法』、第4回HTLV-1研究会、ポスター発表、平成23年9月18日（東京大学本郷キャンパス）
 7. 石垣知寛、在家裕司、小林誠一郎、大野伸広、内丸薫、渡辺信和、小柳津直樹、東條有伸、中内啓光、『フローサイトメトリーを用いたフェノタイプ解析による ATL の細胞動態の新規評価法』、第58回日本臨床検査医学会、口頭発表、平成23年11月19日（岡山コンベンションセンター）
 8. ○渡辺恵理、渡辺信和、森尾友宏、阿部泰子、原寿郎、中内啓光、重症複合免疫不全症に対する前処置軽減臍帯血移植後の混合キメリズム病態の解析、第 73 回日本血液学会、口頭発表、平成 23 年 10 月 15 日（名古屋国際会議場）
 9. 中内祐介、渡辺信和、高橋聡、中内啓光、HLA 不一致臍帯血移植後の抗原特異的 T 細胞の誘導、第 73 回日本血液学会、口頭発表、平成 23 年 10 月 16 日（名古屋国際

会議場)

なし

10. 中内祐介、朱大勇、高橋聡、岩本愛吉、中内啓光、渡辺信和、HLA ミスマッチ臍帯血移植における抗原特異的T細胞の誘導、第40回日本免疫学会、口頭発表、平成23年11月27日(幕張メッセ)
11. 古木基裕、分光フローサイトメーター開発、第40回日本免疫学会、テクニカルセミナー、平成23年11月28日(幕張メッセ)
12. 渡辺信和、HLA-Flow法による造血幹細胞移植後キメリズム解析への分光フローサイトメーター応用の試み、第40回日本免疫学会、テクニカルセミナー、平成23年11月28日(幕張メッセ)
13. 渡辺信和、石田礼子、石垣知寛、小林誠一郎、内丸薫、『ATL細胞におけるHLAクラスI欠損症例の報告』、厚生労働科学研究 がん臨床研究事業「成人T細胞性白血病(ATL)の根治を目指した細胞療法の確立およびそのHTLV-1抑制メカニズムの解明に関する研究(H22-がん臨床-一般-028)」班(第2回鶴池班班会議)、平成23年12月16日(福岡センタービル)
14. 渡辺信和、『キメリズム解析/HLA-Flow法を使用したHLAミスマッチ造血細胞移植後の病態解析』、第34回日本造血細胞移植学会、ランチョンセミナー8(日本ベクトン・ディッキンソン社)、平成24年2月24日(大阪国際会議場)

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

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

渡辺とともに、虎の門病院・血液内科（谷口修一部長）と協議し、臍帯血移植後の再発における白血病細胞のミスマッチHLA欠失の有無について、新たに共同研究を始めた。また、田野崎とともに第3回キメリズム解析研究会（平成24年2月2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。

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、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し、キメリズム解析研究会を開催する。

B. 研究方法

虎の門病院・血液内科（谷口修一部長）と協議し、臍帯血移植後の再発における白血病細胞のミスマッチHLA欠失の有無について、新たに共同研究を始めた。第3回キメリズム解析研究会（平成24年2月2日、医科研1号館講堂）を開催し、医科研内外から演者を招き、情報交換の場とした。

C. 研究結果

虎の門病院との共同研究では、臍帯血移植後の再発を想定した白血病細胞のマッチおよ

びミスマッチHLAの発現レベルの解析システムを構築した。第3回キメリズム解析研究会では、東大医科研における新規アリル特異的抗HLA抗体の作製について紹介した他、厚労省の二つの研究班との共同研究、すなわち原発性免疫不全症候群に対する臍帯血ミニ移植、およびATLに対する臍帯血ミニ移植におけるキメリズム解析の付随研究の内容を紹介した。また、近年増加しているHLA半合致移植に関しては、済生会前橋病院から症例報告を行なった。招待講演として、虎の門病院分院の和氣敦先生に、我が国におけるダブルユニット臍帯血移植の第II相臨床試験の結果と、世界における複数臍帯血移植の状況をお話しいただいた。

D. 考察

近年、ドナーリンパ球輸注療法を伴うHLA半合致の造血幹細胞移植においては、再発した白血病細胞においてミスマッチHLAが欠損す

る場合があると報告されている (N Engl J Med. 361(5): 478-88, 2009; Blood. 115(15): 3158-3161, 2010)。ほとんどの臍帯血移植は HLAが1、2座不一致で行なわれており、再発例における白血病細胞で同様の現象がみられるのか、未だまとまった報告はなされていない。本現象は、白血病細胞のドナー由来エフェクター細胞からのエスケープ現象と関連も指摘されており、患者の予後に大きな影響を及ぼす。平成24年度から虎の門病院における臍帯血移植患者で本格的な解析が予定されているが、その結果が注目される。

第3回キメリズム解析研究会では、済生会前橋病院からまとまった数の症例報告があり、その良好な移植成績が注目された。HLA半合致の末梢血幹細胞移植において、急性GVHDの発症が軽度かつ予後良好である原因として、移植前処置で使用する抗胸腺細胞グロブリン (antithymocyte globulin) が移植後の同種免疫反応を強力に抑制することが原因と考えられた。しかしながら、ATGを使用したこれらの症例では、ウイルス感染を中心に重篤な感染症を起こしやすいために、今後は感染免疫の角の抑制を防ぐ方策を考える必要がある。

E. 結論

臍帯血移植後の再発時に白血病細胞のミスマッチHLAに欠失が高頻度で認められれば、患者の予後に大きな影響があると考えられる。虎の門病院との共同研究は、今後の結果がとくに注目される。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Kodera Y, Kato S; for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. Biol Blood Marrow Transplant. 18(5): 780-787. 2012
2. Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent and young adult patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. Leuk Res. 36(2): 128-131. 2012.
3. Yokota A, Ozawa S, Masanori T, Akiyama H, Ohshima K, Kanda Y, Takahashi S, Mori T, Nakaseko C, Onoda M, Kishi K, Doki N, Aotsuka N, Kanamori H, Maruta A, Sakamaki H, Okamoto S. Secondary solid tumors after allogeneic hematopoietic SCT in Japan. Bone Marrow Transplant. 47(1): 95-100. 2012.
4. Sato A, Ooi J, Takahashi S, Tsukada N, Kato S, Kawakita T, Yagyu 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.* 46(2):257-61. 2011
5. 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.* 17(6):841-51. 2011
 6. 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
 7. Nakaseko C, Ozawa S, Sakaida E, Sakai M, Kanda Y, Oshima K, Kurokawa M, Takahashi S, Ooi J, Shimizu T, Yokota A, Yoshida F, Fujimaki K, Kanamori H, Sakai R, Saitoh T, Sakura T, Maruta A, Sakamaki H, Okamoto S. Incidence, risk factors and outcomes of bronchiolitis obliterans after allogeneic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 93(3):375-82, 2011
 8. Tanabe T, Yamaguchi N, Matsuda K, Yamazaki K, Takahashi S, Tojo A, Onizuka M, Eishi Y, Akiyama H, Ishikawa J, Mori T, Hara M, Koike K, Kawa K, Kawase T, Morishima Y, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kakamu T, Nakamura Y, Asano S, Fujita Y. Association analysis of the NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. *Int J Hematol.* 93(6): 771-778. 2011.
2. 学会発表
 1. **S. Takahashi**, J. Ooi, S. Kato, T. Kawakita, Y. Nakauchi, M. Monna, T. Nagamura, K. Kato, T. Yamaguchi, S. Asano Japan Cord Blood Bank Network. The role of G-CSF combination in conditioning regimen for CBT patients with AML Bone Marrow Transplant. 46: S123, 2011.
 2. **Takahashi S**, J. Ooi, S. Kato, T. Kawakita, A. Tojo, T. Y. Ebihara, S. Mochizuki, S. Yamamoto, K. Tsuji, Yamaguchi, S. Morishima, Y. Morishima, S. Asano. Matched HLA Haplotype Contributes to Reduce Sever Acute GVHD with Conserving GVL Effect in HLA-Mismatched Cord Blood Transplantation. *Blood* 118 (21): 1771. Abstr.#4140, 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

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

渡辺とともに、造血細胞移植後の血小板のキメリズムの測定を、国立がんセンター中央病院で試みた。また、高橋とともに第3回キメリズム解析研究会（平成24年2月2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。

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（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。それに対応した蛍光標識抗体を準備し、血小板に対する染色性を検討する。造血細胞移植後の患者末梢血を採取し、ミスマッチHLAに対する抗HLA抗体、および血小板マーカー抗体で染色して、キメリズム解析を試みた。

C. 研究結果

造血細胞移植後の患者検体を染色してキメリズムを解析したが、陽性分画と陰性分画の十分な分離ができず、解析は極めて困難であった。

D. 考察

造血細胞移植後の血小板輸血では、HLA-AおよびBをすべて一致させる場合（HLA血小板）以外はドナー由来血小板のHLAは不明である。したがって、血小板キメリズムの解析では、レシピエント特異的HLAに対する抗HLA抗体と、その他の抗HLA抗体をランダムに組み合わせで解析を行なったため、結果の判断が極めて難しくなった。今後洗浄血小板（平成24年4月に保険適応）の導入において、輸注した血小板の寿命をモニターすることが必要となる。その場合は、あらかじめ輸注する血小板のHLAを抗体で調べておき、輸血後のキメリズム解析に使用する至適な組合せで検体を解析することが重要である。

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試みたが、正確な解析ができなかった。今後は輸注する血小板のHLAを抗体で調べておき、輸血後のキメリズム解析に使用する至適な抗HLA抗体の組合せで検体を解析することが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanda J, Hishizawa M, 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. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*. 119(9): 2141-2148. 2012.
2. Fukuhara S, Watanabe T, Munakata W, Mori M, Maruyama D, Kim SW, Kobayashi Y,

Taniguchi H, Maeshima AM, Tanosaki R, Matsuno Y, Tobinai K. Bulky disease has an impact on outcomes in primary diffuse large B-cell lymphoma of the breast: a retrospective analysis at a single institution. *Eur J Haematol*. 87(5): 434-440. 2011.

3. Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Tomonaga M, Harada M, Yamanaka T, Kannagi M, Okamura J. Long-term outcomes after hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective trials. *Bone Marrow Transplant*. 46(1): 116-118. 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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表