

20114027B

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 21 年度～平成 23 年度 総合研究報告書

研究代表者 中内 啓光

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告	
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
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	15
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	23
造血細胞移植後の血小板のキメリズム解析 田野崎 隆二	29
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
III. 研究成果の刊行物・別刷	42

I. 総合研究報告

I. 総合研究報告

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

総合研究報告書

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、迅速、高感度かつ定量的で、目的とする細胞を分取して詳細に解析できることから、生着不全と再発の早期診断に極めて有効である。しかしながら、多くの利点にもかかわらず、臨床研究の規模が限られ、使用する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HLA-A2抗体の作製に成功した。このような背景のもと、中内は我が国における臨床検査法としての定着をめざして、HLA-Flow法の全国規模の臨床研究とASHmAbの作製を柱とした厚生労働科学研究を企画した。

平成21年度、中内は我が国で高頻度のHLA-B35に対する新規抗HLA抗体を複数の蛍光色素で標識し、マルチカラー解析での有用性を高めた。また、大規模な共同研究に対応するため、マルチカラー解析とソーティングの機能を備えた高性能フローサイトメーター（FACS Aria、Becton Dickinson社）を導入した。渡辺は虎の門病院・血液内科（谷口修一部長）と協議して同院の臍帯血ミニ移植に特化したキメリズム解析のプロトコルを作成し、松野直史医師（連携研究者、東大医科研特任研究員）が11月より臨床研究を開始した。高橋と田野崎は第1回キメリズム解析研究会（平成21年12月25日、医科研1号館講堂）を開催し、虎の門病院、原発性免疫不全症研究班（いずれも臍帯血ミニ移植）、兵庫医科大学（HLA半合致移植）、および岡山大学（生体肝移植）から演者を招いた。

平成22年度、中内は新たに抗HLA-B62抗体を作製したが、抗体作製が困難なHLAのタイプも多いため、HLAテトラマーを利用しない新たな免疫法の開発を試みた。虎の門病院との共同研究では70症例を登録し、11月に解析を終了した。1年間にわたる共同研究で、移植後早期のドナー生着動態と白血病細胞を同時にモニタリングすることに成功し、HLA-Flow法が臨床診断において極めて有用であることが実証された。その結果、HLA-Flow法は虎の門病院・臨床検査室への導入が決定した。渡辺は東京医科歯科

大学・小児科の森尾友宏准教授、および岡山大学・消化器内科の高木章乃夫助教とキメリズム解析のプロトコールを作成し、全国規模の共同研究を開始した。また、札幌北榆病院と秋田大学では、医科研からの支援のもと自施設内でキメリズム解析を開始した。高橋と田野崎は平成23年2月1日、第2回キメリズム解析研究会を開催した。

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の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白血病細胞のミスマッチHLA欠失の有無について、新たな共同研究を計画した。渡辺は札幌北榆病院と秋田大学におけるキメリズム解析を引き続き支援し、新たに済生会前橋病院と虎の門病院における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、ASHmAbの作製は4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

我が国における造血細胞移植の安全性の向上を目指し、全国の移植施設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。また、HLA-Flow法で使用するASHmAbを新たに作製する。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。（倫理面および動物実験への配慮）

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審査委員会に提出し、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。個人情報の保護に関しては、各移植関連施設から東京大学医科学研究所へ送られてくる検体およびデータを匿名化して、個人と切り離して管理した。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、ヒトHLA等によるトランスジェニックマウスの免疫は、東京大学医科学研究所・実験動物研究施設で行なった。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21年度、中内は我が国で高頻度のHLA-B35に対する新規抗HLA抗体を複数の蛍光色素で標識し、マルチカラー解析での有用性を高めた。また、大規模な共同研究に対応するため、マルチカラー解析とソーティングの機能を備えた高性能フローサイトメーター（FACS Aria、Beckton-Dickinson社）を医科研に導入した。

渡辺は虎の門病院・血液内科（谷口修一部長）と協力して、同院の臍帯血ミニ

移植に特化したキメリズム解析のプロトコールを作成した。本共同研究では、松野直史医師（連携研究者、東大医科研特任研究員）が平成22年3月末日までに36例の末梢血におけるキメリズムを解析し、その結果を同院のベッドサイドへ還元してその有用性が高く評価された。

高橋と田野崎は虎の門病院、原発性免疫不全症研究班（いずれも臍帯血ミニ移植）、兵庫医大（HLA 半合致移植）および岡山大学（生体肝移植）から演者を招き、第1回キメリズム解析研究会（12月25日、医科研1号館講堂）を開催した。

平成22年度、中内はHLA-B62に対する新規IgG型抗体を作製し、今までに作製したHLA-A2およびB35に対する抗体とともに複数の蛍光色素で標識した。抗体作製に成功したHLAは、すべてHLAテトラマーでマウスを免疫した場合であり、抗体作製ができなかったA11、A33、B60、およびB61はHLAモノマーでマウスを免疫した場合であった。そこで、抗体作製ができなかったHLAモノマーをHLAテトラマーに作製し直す準備をした。また、抗体のできにくいHLAに関しては、抗体産生細胞を遺伝子導入で不死化することにより、ハイブリドーマ作製を経ずに抗体作製する方法の開発を始めた。すなわち、B細胞に対するBcl-x1/Bcl-6の遺伝子導入に必要な遺伝子ベクターの準備を行なった。

原発性免疫不全症研究班はSCIDに対する臍帯血移植のガイドラインを発表したが、渡辺は同・研究班の森尾友宏医師とともに本ガイドラインにそった移植におけるキメリズム解析のプロトコールを作成し、共同研究を開始した。また、岡山

大学の高木章乃夫医師と生体肝移植後のキメリズム解析のプロトコールを作成し、共同研究を開始した。虎の門病院との1年間にわたる共同研究は、51症例を解析して11月に終了した。その結果、生着不全と再発の早期診断に有用であることが確認され、同院・臨床検査室への導入が決定した。また、札幌北榆病院と秋田大学へは抗HLA抗体の送付と実技講習を通じてキメリズム解析法の導入を支援し、これらの移植施設における本法の実用化に貢献した。平成23年2月1日、高橋と田野崎は第2回キメリズム解析研究会を開催し、昨年度の講演者に加えて済生会前橋病院からの講演者も招待した。

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、同時にテトラマーで免疫を試みたHLA-A11、B5、B62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、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、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。

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

ASHmAbの作製に関しては、HLA-A2に引き続き、B35、B62、およびA24に対する新規IgG型抗体が作製された。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。しかしながら、ハイブリドーマを凍結保存する過程で、B35とB62に対する抗体産生能は低下した。一方、HLA-A2およびA24に対するASHmAbの産生は良好であることから、今後は複数の蛍光色素で標識し、全国規模での臨床研究に供給する予定である。ところで、抗体作製に成功したHLA (A2、A24、B35、B62) は、すべてHLAテトラマーでマウスを免疫した場合であり、抗体作製ができなかったHLA (A11、A33、B5、B60、B61) はすべてHLAモノマーでマウスを免疫した場合であった。抗原エпитオプの立体構造の違い、あるいは免疫後の体内動態の違いによることが予想され、今後の免疫にはテトラマーを使用する必要がある。

虎の門病院・血液内科との共同研究では、臍帯血ミニ移植に特化したキメリズム解析のプロトコールにより、平成21年11月から平成22年11月までに51例の患者で移植後早期の生着動態を解析

した。これらの結果は、翌日までに同院・移植病棟へ伝達され、生着不全や再発（非寛解期移植では、再発は移植後早期でもみられる）の早期診断に極めて有用であることが実証された。平成23年度、虎の門病院の臨床検査室では、キメリズム解析／HLA-Flow法をミスマッチ移植の標準的臨床検査として導入することを計画し、現在もその準備が進められている。我が国で最も臍帯血移植数の多い虎の門病院（年間70例以上）で本解析法が導入されれば、全国の臍帯血移植施設における本解析法の実用化の促進に大きく寄与することが予想されて、極めて有意義である。

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

我々が独自に開発した作製法で得られた新規ASHmAbは、抗HLA-A2抗体、抗HLA-A24抗体、抗HLA-B35抗体、および抗

HLA-B62抗体の4つであるが、そのうち抗HLA-B35抗体と抗HLA-B62抗体はハイブリドーマの樹立に失敗した。

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2つの共同研究など、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、全国規模での臨床研究により十分な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, Koefler 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..
16. Hayashi Y, Chan T, Warashina M, Fukuda M, Ariizumi T, Okabayashi K, Takayama N, Otsu M, Eto K, Furue MK, Michiue T, Ohnuma K, Nakauchi H, Asashima M. Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One*. 2010 Nov 23; 5(11): e14099.
 17. Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, Yamaguchi T, Otsu M, Nishimura K, Nakanishi M, Sawaguchi A, Nagai R, Takahashi K, Yamanaka S, Nakauchi H, Eto K. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med*. 207(13): 2817-2830, 2010.
 18. Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, Takayanagi S, Haruyama E, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nakauchi H, Nagashima H. Knockout of exogenous EGFP gene in porcine somatic cells using zinc-finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun*. 402: 14-18, 2010.
 19. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Iбата M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*. 142: 787-799, 2010.
 20. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in Mice. *Hepatology*. 52: 1111-1123, 2010.
 21. Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H. Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol*. 17(4): 271-275, 2010.
 22. Mashima R, Honda K, Yang Y, Morita Y, Inoue A, Arimura S, Nishina H, Ema H, Nakauchi H, Seed B, Oda H, Yamanashi Y. Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Lab Invest*. 90(9): 1357-1364, 2010.
 23. Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M. Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms. *Clin Cancer Res*. 16: 3825-3831, 2010.
 24. Nakahata S, Yamazaki S, Nakauchi H, Morishita K. Downregulation of ZEB1 and overexpression of Smad7 contribute to resistance to TGF-beta1-mediated growth suppression in adult T-cell

- leukemia/lymphoma. *Oncogene*. 29: 4157-4169, 2010.
25. Hirabayashi M, Kato M, Sanbo M, Kobayashi T, Hochi S, Nakauchi H. Rat transgenesis via embryonic stem cells electroporated with the Kusabira-orange gene. *Mol Reprod Dev*. 77: 474, 2010.
 26. Morita Y, Ema H, Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J Exp Med*. 207: 1173-1182, 2010.
 27. Sugawara T, Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, Yokosuka O, Nakauchi H, Iwama A. FET family proto-oncogene Fus contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 38: 696-706, 2010.
 28. Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP. Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms. *Cell Cycle*. 9(6): 1051-1056, 2010.
 29. Oguro H, Yuan J, Ichikawa H, Ikawa T, Yamazaki S, Kawamoto H, Nakauchi H, Iwama A. Poised lineage specification in multipotential hematopoietic stem and progenitor cells by the polycomb protein Bmi1. *Cell Stem Cell*. 6:279-286, 2010.
 30. Ohki M, Ohki Y, Ishihara M, Nishida C, Tashiro Y, Akiyama H, Komiyama H, Lund LR, Nitta A, Yamada K, Zhu Z, Ogawa H, Yagita H, Okumura K, Nakauchi H, Werb Z, Heissig B, Hattori K. Tissue type plasminogen activator regulates myeloid-cell dependent neoangiogenesis during tissue regeneration. *Blood*. 115: 4302-4312, 2010.
 31. Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K. Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J Clin Invest*. 120: 179-190, 2010.
 32. Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, Ito K, Yasuda N, Kudo Y, Yamamoto R, Ozasa Y, Fujimoto M, Wang P, Nakauchi H, Nakaya H, Komuro I. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest*. 120: 242-253, 2010.
 33. Hirabayashi M, Kato M, Kobayashi T, Sanbo M, Yagi T, Hochi S, Nakauchi H. Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimerae at high efficiency. *Mol Reprod Dev*. 77: 94, 2010. No abstract available
 34. Sugawara T, Oguro H, Negishi M, Morita Y, Ichikawa H, Iseki T, Yokosuka O, Nakauchi H, Iwama A. FET family proto-oncogene Fus

- contributes to self-renewal of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 38(8): 696-706, 2010
35. Hirabayashi M, Kato M, Kobayashi T, Sanbo M, Yagi T, Hochi S, Nakauchi H. Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimerae at high efficiency. *Mol Reprod Dev.* 77(6):474, 2010.
 36. Nishino T, Miyaji K, Ishiwata N, Arai K, Yui M, Asai Y, Nakauchi H, Iwama A. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by a small-molecule agonist of c-MPL. *Exp Hematol.* 37:1364-77, 2009.
 37. Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, Nakauchi H, Tojo A. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol.* 90:261-69, 2009.
2. 学会発表
1. Invited Speaker:Keystone Symposia. March 27-April 1,2011.Keystone, USA. "Non-myelinating schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF-beta signaling"
 2. Invited Speaker: Hematopoietic Stem Cell Hibernation, May 18, 2011. Uulm, Germany "Bone Marrow Niche Signaling that regulates"
 3. Invited Speaker: 3rd Else Kröner-Fresenius Symposium on Molecular Mechanisms of Stem Cell Aging, May 20, 2011.Uulm, Germany
 4. Invited Speaker: Seminar Series on Stem Cells, May 24, 2011. Uulm. "Generation of functional organs from ES/iPS cells"
 5. Invited Speaker: ESHG Symposium, May 29, 2011. Amsterdam "Generation of Rat Pancreas in Mouse: toward the next generation of regenerative medicine"
 6. Invited Speaker: The Oklahoma Center for Adult Stem Cell Research (OCASCR), June 14, 2011. Oklahoma City. "Non-myelinating Schwann cells in the mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF-b signaling"
 7. Invited Speaker: 12th International Congress on Reproductive Biomedicine & 7th International Congress on Stem Cell Biology and Technology, Sep 7, 2011.Tehran, Iran "Generation of functional organs from iPS cells"
 8. Invited Speaker: 12th International Congress on Reproductive Biomedicine & 7th International Congress on Stem Cell Biology and Technology, Sep 9, 2011. Tehran, Iran. "Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment"

9. The 12th Royan International Research Award 受賞, Sep 8. 2011. Tehran, Iran
10. Invited Speaker: Cold Spring Harbor Conferences Asia & ISSCR, Oct 26, 2011. 蘇州, 中国. “Replicative senescence of hematopoietic stem cells after single cell transplantation”
11. Invited Speaker: SFB 497 Symposium. October 14-16, 2010. Ulm, Germany. “TGF- β induces hematopoietic stem cell hibernation as a BM niche signal.”
12. Invited Speaker: Seminar at Erasmus Medical Center. Oct 11, 2010. Rotterdam, Holland. “Glial cells in mouse bone marrow niche maintain hematopoietic stem cell hibernation through TGF- β signaling”
13. Invited Speaker: American Society of Hematology. May 15-17, 2010. Baltimore, USA. “Hematopoietic Stem Cell Signature”
14. Invited Speaker: The Marcus Wallenberg Foundation Conference on Hematopoiesis in Health and Disease. May 15-17, 2010. Lund, Sweden. “The Stem Cell Niche”
15. 東工大声明GCOEシンポ、平成22年9月10日、Generation of blood from pluripotent stem cells
16. 京都賞ワークショップ、平成22年11月、「iPS細胞研究の進展と新しい医療への期待: iPS細胞から臓器を作る
17. Progress of iPS cell research and prospect for future medicine: generation of organs from iPS cells」, Generation of functional organs from iPSCs, Univ of Chieti, May, 2010
18. Recent progress in stem cell research and future perspectives for stem cell therapy (for graduate students), Univ of Chieti, May, 2010
19. International Congress of Immunology, Cytometry technologies for analysis of very small numbers of cells, August, 2010, Kobe
20. Invited Speaker: 34th Lorne Conference on Protein Structure and Function. Feb 8-12, 2009. Lorne, Australia
21. Invited Speaker: USA-Japan Cooperative Cancer Workshop. Mar 27-29, 2009. Hawaii, USA
22. Invited Speaker: Symposium on Molecular Mechanisms of Adult Stem cell Aging. May 21-24, 2009. Reims, Germany
23. Invited Speaker: International PhD Program in Immunology, Cell Biology and Biochemistry 2008-2009 Lecture Course “Molecular regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and dormancy”. May 28, 2009 Switzerland

24. Invited Speaker: 7th Catholic Int. Stem Cell Symposium in Seoul. June 10-12,2009. Seoul, Korea
 発明者 (敬称略) : 佐野進弥、江藤浩之、高山直也、中内啓光
 出願人 : 国立大学法人東京大学 テルモ株式会社
25. Invited Speaker: Korean Association for Laboratory Animal Science. Aug 26-28,2009. Chungnam Cheonan-si, Korea
 出願日 : 2011/9/9
 出願番号 : PCT/JP2011/070563
 出願国 : 世界知的所有権機関 (WIPO)
26. Invited Speaker: The 2009 ISEH Donald Metclaf Lecture Award. Sep 9-12,2009. Athens, Greece (ISEH: International Society for Experimental Hematology)
 発明の名称 : 血小板の機能を維持するための組成物
 東大知財部管理番号 : 25B09X001-1
 発明者 (敬称略) : 江藤浩之、大西棕子、中内啓光、村田隆彦
 出願人 : 国立大学法人東京大学 科研製薬株式会社
27. Invited Speaker: Abcam Stem Cells 2009. Nov 19-22,2009. Antigua, Antigua and Barbuda
 出願日 : 2011/9/16
 出願番号 : PCT/JP2011/071190
 出願国 : 世界知的所有権機関 (WIPO)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

発明の名称 : 血小板産生方法及び血小板産生装置

東大知財部管理番号 : 25B111002-1

発明者 (敬称略) : 江藤浩之、中内啓光、

福田敏男、高松遼、新井史人

出願人 : 国立大学法人東京大学 国立大学法人名古屋大学

出願日 : 2011/6/28

出願番号 : 特願2011-143383

出願国 : 日本

発明の名称 : 多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法

東大知財部管理番号 : 25B0105004-1

発明の名称 : 多能性幹細胞からの巨血球及び／又は血小板の製造方法

東大知財部管理番号 : 25B115005-1

発明者 (敬称略) : 西野泰斗、中村隆典、

岩本俊介、江藤浩之、辻嘉代子、中内啓光

出願人 : 日産化学工業株式会社、国立大学法人東京大学

出願日 : 2011/10/3

出願番号 : 特願2011-219545

出願国 : 日本

発明の名称 : 多能性幹細胞を用いた免疫機能再建法

東大知財部管理番号 : 25B09Z014-1

発明者 (敬称略) : 中内 啓光, 金子 新, 西村 聡修

出願人：国立大学法人東京大学
出願日：2011/02/03
出願番号：PCT/JP2011/052260
出願国：世界知的所有権機関（WIPO）

発明の名称：誘導型多能性幹細胞の製造方法

東大知財部管理番号：25B103002-1
発明者（敬称略）：中内 啓光, 大津 真, 高山 直也, 安 東赫

出願人：国立大学法人東京大学
出願日：2011/06/15
出願番号：PCT/JP2011/063650
出願国：世界知的所有権機関（WIPO）

発明の名称：血小板産生の場構築の為の巨核球細胞の多核化の促進法

東大知財部管理番号：25B112002-1
発明者（敬称略）：江藤 浩之, 中内 啓光, 高山 直也, 中村 壮

出願人：国立大学法人東京大学
出願日：2011/05/13
出願番号：特願2011-108253
出願国：日本

発明の名称：M-C S F を用いた肺胞たんぱく症の治療

東大知財部管理番号：25B115006-1
発明者（敬称略）：中内 啓光, 金子 新, 入口 翔一, 石井 幸雄
出願人：国立大学法人東京大学 国立大学法人筑波大学
出願日：2011/06/01
出願番号：61/491982
出願国：米国仮出願

発明の名称：幹細胞を用いた異種間胚胞キメラ動物の作製法

知財部管理番号：25B08Z002-1
発明者：中内啓光、小林俊寛、山口智之、濱仲早苗、平林真澄、加藤めぐみ
出願人：国立大学法人 東京大学
出願日：2010/01/29
出願番号：PCT/JP2010/051288
出願国：世界知的所有権機関(WIPO)

発明の名称：ウイルス産生細胞
知財部管理番号：25B093006-1・25B093005-1

発明者：中内啓光、大津 真、高山直也、江藤浩之、

出願人：国立大学法人 東京大学
出願日：2010/05/14
出願番号：PCT/JP2010/58220
出願国：世界知的所有権機関(WIPO)

発明の名称：誘導型多能性幹細胞の製造方法

知財部管理番号：25B103002-1
発明者：中内啓光
出願日：2010/06/15

出願番号：61/354848
出願国：アメリカ合衆国

発明の名称：血栓形成を抑制する作用を有する組成物

東大知財部管理番号：25B104004-1
発明者（敬称略）：江藤浩之、西村智、中内啓光、岩倉洋一郎
出願人：国立大学法人 東京大学
出願日：2010/8/12
出願番号：特願 2010-180781

発明の名称：多能性幹細胞からの血液細胞分化に関する培養方法

東大知財部管理番号：25B105004-1

発明者（敬称略）：佐野進弥、江藤浩之、高山直也、中内啓光

出願人：国立大学法人東京大学、テルモ株式会社

出願日：2010/9/10

出願番号：特願 2010-202752

出願国：日本

発明者：中内啓光、紙谷聡英、鈴木奈穂、伊藤慶一、山崎聡

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2010/12/08

出願番号：PCT/JP2010/072044

出願国：世界知的所有権機関(WIPO)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

発明の名称：分化細胞の新規製造法

東大知財部管理番号：25B097002-1

発明者（敬称略）：江藤浩之、高山直也、中村壮、中内啓光

出願人：国立大学法人東京大学

出願日：2010/9/15

出願番号：PCT/JP2010/65903

出願国：世界知的所有権機構（WIPO）

発明の名称：血小板の機能を維持するための組成物

東大知財部管理番号：25B09X001-1

発明者（敬称略）：江藤浩之、大西棕子、中内啓光、村田隆彦

出願人：国立大学法人東京大学、科研製薬株式会社

出願日：2010/9/17

出願番号：特願 2010-210146

出願国：日本

発明の名称：多能性幹細胞からの分化誘導された細胞の生産方法

知財部管理番号：25B099002-1

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
総合研究報告書

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21年度、虎の門病院・血液内科（谷口修一部長）と協議し、同院の臍帯血ミニ移植に特化したキメリズム解析のプロトコールを作成し、11月より臨床研究を開始した。

平成 22 年度、原発性免疫不全症候群・研究班および岡山大学とキメリズム解析のプロトコールを作成し、共同研究を開始した。虎の門病院との1年間にわたる共同研究は、70症例を登録して11月に終了した。その結果、HLA-Flow法が生着不全と再発の早期診断に有用であることが実証され、同院・臨床検査室への導入が決定した。また、済生会前橋病院におけるHLA半合致末梢血幹細胞移植症例のキメリズム解析を通じ、同移植後の特異な生着動態を明らかにした。済生会前橋病院においても、院内でのHLA-Flow法の導入が検討された。一方、札幌北楡病院と秋田大学では自施設内でHLA-Flow法の運用を開始したが、これらの移植施設へは抗体を送付して解析を支援した。

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、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、高橋とともに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法による生着不全と再発の臨床診断を試みる。それにより、

HLA-Flow法がHLAミスマッチ移植の臨床検査の手段として有効であるというエビデンスを確立し、本法を我が国におけるHLAミスマッチ移植の標準的な検査法

として定着させることが、本研究の最終目的である。

B. 研究方法

平成21年度、連携研究者の松野直史医師（東大医科研、特任研究員）は、虎の門病院・血液腫瘍内科の谷口修一部長と協議し、移植後早期の免疫反応と生着不全の病態解析を目的としたプロトコールを作成した。平成21年11月から、本プロトコールに基づいて、虎の門病院で臍帯血ミニ移植を受けた患者の末梢血のキメリズム解析を開始した。

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

平成23年度、広島大学との共同研究では、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に対しては、抗体を送付して自施設内でのHLA-Flow法の運用を支援した。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21年度、虎の門病院との共同研究で、松野直史医師が36例の臍帯血ミニ移植後早期の末梢血におけるキメリズムを解析し、同院の臨床検査として極めて有用な情報をベッドサイドへ提供した。

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

平成23年度、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、肝臓癌の再発阻止を目的として独自の免疫療法を行なっている。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3日間培養して活性化し、レシピエントに輸注して転移した可能性のあるがん細胞の特異的な傷害ををめぐすものである（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。その結果、症例によっては、移植後早期の末梢血で、投与されたNK細胞と思われるドナー由来の細胞集団が少数検出された。

原発性免疫不全症研究班（研究代表者：九州大学・小児科、原寿郎教授）の付随研究では、我が国で施行された4例の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細胞がもともと欠失した患者では、T細胞はドナー由来、ミエロイド系細胞はレシピエント由来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可能性があることが判明した。また、そのようなスプリット・キメリズムが継続する患児において、移植後2ヶ月目で骨髄穿刺を行なったところ、骨髄造血幹・前駆細胞の各分画においてレシピエント由来細胞がドナー由来細胞よりも有意な頻度で存在することが判明した。

ATLに対する細胞療法研究班（研究代表者：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11カラー・キメリズム解析のプロトコルを作成した。プレリミナリーな症例解析では、移植後早期の末梢血におけるドナー細胞の生着動態と残存ATL細胞を同時に解析することが可能であった。

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）、虎の門病院・臨床検査室（米山彰子部長）、および今村病院分院・血液内科（宇都宮與部長）では、それぞれFACS Canto II (Becton Dickinson社)など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。渡辺はこれらの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。

D. 考察

全国規模での共同研究を通じ、キメリズム解析／HLA-Flow法が臨床検査法および病態解析研究の手段として極めて有用であることが立証された。すでに院内でHLA-Flow法を実施している札幌北楡病院と秋田大学に加え、平成24年度には虎の門病院、済生会前橋病院、および今村病院分院で本法をミスマッチ移植の臨床検査として導入することを計画している。我が国で最も臍帯血移植数の多い虎の門