

病院（年間100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。

E. 結論

国内の移植施設では、すでに札幌北楡病院と秋田大学で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（原班と鶴池班）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.

5. Ishikawa Y, Ida-Yonemochi H, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, Jung HS, Honda MJ, Ishii Y, Watanabe N, Ohshima H. Mapping of BrdU label-retaining dental pulp cells in growing teeth and their regenerative capacity after injuries. *Histochem Cell Biol.* 134(3): 227-241, 2010.

6. Mizuno D, Agata H, Furue H, Kimura A, Narita Y, Watanabe N, Ishii Y, Ueda M, Tojo A, Kagami H., Limited but heterogeneous osteogenic response of human bone marrow mesenchymal stem cells to bone morphogenetic protein-2 and serum. *Growth Factors*, 28(1): 34-43, 2010.

7. Agata H, Asahina I, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H., Characteristic change and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage. *Tissue Eng. Part A*, 16(2): 663-73, 2010.

8. Hideki Agata, Nobukazu Watanabe, Yumiko Ishii, Noriyuki Kubo, Satoshi Ohshima, Mika Yamazaki, Arinobu Tojo, Hideaki Kagami, Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 382: 353-358, 2009.

9. Yamazaki S, Suzuki N, Saito T, Ishii Y, Takiguchi M, Nakauchi H, Watanabe N. A rapid and efficient strategy to generate allele-specific anti-HLA monoclonal antibodies. *J. Immunol. Method*, 343(1): 56-60, 2009.

2. 学会発表

1. 渡辺信和、高橋聡、『キメリズム解析／HLA-Flow法で使用するアリル特異的抗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・サポー）

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 1 回鵜池班班会議)、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)
 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 回鵜池班班会議)、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）
15. Naofumi Matsuno, Hisashi Yamamoto, Nobukazu Watanabe, Kazuya Ishiwata, Nobuaki Nakano, Masanori Tsuji, Yuki Asano-Mori, Naoyuki Uchida, Atsushi Wake, Madoka Narita, Hiromitsu Nakauchi, Shuichi Taniguchi, Engraftment kinetics of donor-derived lymphocytes early after reduced-intensity cord blood transplantation in adults. The 8th Annual International Umbilical Cord Blood Transplantation Symposium, Poster, June 5, 2010, San Francisco.
16. 渡辺信和、『HLA-Flow法による造血細胞移植後早期の生着動態解析における骨髓系細胞解析の重要性』、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、平成22年7月4日（愛知がんセンター）
17. Stephanie C. Napier, Satoshi Yamazaki, Nobukazu Watanabe, Naofumi Matsuno, Satoshi Takahashi, Akinobu Takaki, and Hiromitsu Nakauchi, Flow cytometric analysis of donor-recipient chimerism using anti-HLA antibody after HLA-mismatched hematopoietic cell and organ transplantation, ICI 2010, Aug. 26th, 2010, Kobe
18. 山本久史、松野直史、渡辺信和、成田円、西田彩、島津浩、大田光、五十嵐夏恵、池邊太一、田結庄彩知、石綿一哉、中野伸亮、辻正徳、土橋留美子、森有紀、伊豆津宏二、内田直之、和気敦、米山彰子、牧野茂義、中内啓光、谷口修一、Rapid chimerism-switch of lymphocytes and phenotypic conversion of naïve T cells early after CBT-臍帯血移植後早期のドナー由来リンパ球の生着動態、第72回日本血液学会、平成22年9月25日（横浜）
19. Yamin Tian, Seiichiro Kobayashi, Nobuhiro Ohno, Masamichi Isobe, Mayuko Tsuda, Yuji Zaike, Nobukazu Watanabe, Arinobu Tojo, Kaoru Uchimarū. Combination of CD3 and CD7 in multi-color FACS discriminates malignant cells in adult ATL patients. 第72回日本血液学会、平成22年9月25日（横浜）
20. Tadanori Yamochi, Yohei Morita, Toshiko Yamochi, Yosuke Sasaki, Nobukazu Watanabe, Seisi Ogawa, Atae Utsunomiya, Isao Hamaguchi, Kaoru Uchimarū, Hiromitsu Nakauchi, Toshiki Watanabe, Search for cancer stem cells in ATL. 第72回日本血液学会、優秀ポスター、平成22年9

月 25 日（横浜）

21. 大野伸広、田亜敏、小林誠一郎、磯部優理、津田真由子、在家裕司、渡辺信和、東條有伸、内丸薫、HTLV-1 キャリア末梢血における Multi-color FACS : CD3 と CD7 の展開によるクローン増殖性リンパ球同定の試み、第 72 回日本血液学会、優秀ポスター、平成 22 年 9 月 25 日（横浜）

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：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

平成21年度、田野崎とともに第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）から演者を招いた。本研究会を基盤として、渡辺とともに原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植、およびC型肝炎による肝機能障害に対する生体肝移植において、それらの病態解析に特化したキメリズム解析のプロトコール作成に着手した。

平成22年度、田野崎とともに第2回キメリズム解析研究会（平成23年2月1日、同上）を開催し、医科研内外から演者を招いた。渡辺とともに原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植、およびC型肝炎による肝機能障害に対する生体肝移植において、それらの病態解析に特化したキメリズム解析のプロトコールを作成した。

平成23年度、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、同上）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する。また、HLA-Flow法に関する情報交換の場として、キメリズム解析研究会を開催する。

B. 研究方法

平成21年度、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、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）から演者を招いた。

平成22年度、第2回キメリズム解析研究会（平成23年2月1日、同上）を開催し、医科研外からは虎の門病院、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、済生会前橋病院(いずれも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23年度、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、同上)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

平成21年度、渡辺とともに原発性免疫不全症研究班の森尾友宏医師(東京医科歯科大学小児科・准教授)と協議し、原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植後のキメリズム解析のプロトコール作成の準備を始めた。本移植においては、移植後後期にlate rejectionと呼ばれる拒絶反応が起こることがあり、その病態の解析に特化したプロトコールの作成をめざした。また、高木章乃夫医師(岡山大学・消化器内科、助教)と協議し、C型肝炎による肝機能不全に対する生体肝移植後の病態解析を目的としたプロトコール作成の準備を始めた。

平成22年度、キメリズム解析研究会を基盤として、原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植、およびC型肝炎による肝機能障害に対する生体肝移植において、それらの病態解析に特化したキメリズム解析のプロトコールを作成した。

平成23年度、虎の門病院との共同研究では、臍帯血移植後の再発における白血

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まとまった症例報告がなされた。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りますと報告されている(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の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可能性がある。平成24年度からの虎の門病院との共同研究では、臍帯血移植後の再発時における白血病細胞のHLA発現レベルの解析が予定されて

おり、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、今後は感染免疫の抑制をどうするか、対応が求められている。

E. 結論

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、有効に機能を果たしてきた。すなわち、本研究会を基盤として、原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植、ATLに対する臍帯血ミニ移植、およびC型肝炎による肝機能障害に対する生体肝移植に特化したプロトコールが作成された。平成23年度以降、これらのプロトコールに基づいた臨床研究が進められている。

一方、臍帯血移植後の再発時に、白血病細胞上のミスマッチHLAで高頻度に欠失が認められれば、患者の予後に大きな影響があると考えられる。平成24年度以降に行われる虎の門病院との共同研究は、その結果がとくに注目される。

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.
 9. Nakasone H, Kanda Y, Takasaki H, Nakaseko C, Sakura T, Fujisawa S, Yokota A, Yano S, Usuki K, Maruta A, Abe D, Hoshino T, Takahashi S, Kanamori H, Okamoto S; Kanto Study Group for Cell Therapy. Prophylactic

- impact of imatinib administration after allogeneic stem cell transplantation on the incidence and severity of chronic graft versus host disease in patients with Philadelphia chromosome-positive leukemia. *Leukemia*. 24 (6): 1236-9, 2010.
10. Takahashi S, M. Ishige, N. Watanabe, T. Yamaguchi, J. Ooi, N. Tsukada, S. Kato, A. Sato, F. Monma, R. Yamazaki, A. Fujita, N. Toki, H. Tanaka, T. Uehara, K. Fujimaki, K. Oshima, Y. Aisa, K. Motohashi, R. Hyo, Y. Najima, H. Kanamori, Y. Nannya, R. Sakai, S. Takada, T. Kobayashi, T. Hoshino, K. Matsumoto, K. Hideyuki, J. Kato, A. Yokota, N. Nakamura, M. Tanaka, T. Mori, H. Sakamaki, S. Okamoto on behalf of Kanto Study Group for Cell Therapy (KSGCT). Prospective analysis for antigen-specific cellular immune reconstitution after cord blood transplantation: immune response to CMV is not affected by HLA disparity. *Bone Marrow Transplant*. 43: S105, 2009. (Abstr. # 959)
 11. Konuma T, Ooi J, Takahashi S, Tomonari A, Tsukada N, Kato S, Sato A, Monma F, Kasahara S, Uchimaruru K, Iseki T, Tojo A, Asano S. Second myeloablative allogeneic stem cell transplantation (SCT) using cord blood for leukemia relapsed after initial allogeneic SCT. *Leuk Res*. 33: 840-842, 2009.
 12. Konuma T, Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Tsukada N, Kato S, Sato A, Monma F, Kasahara S, Nagamura-Inoue T, Uchimaruru K, Iseki T, Tojo A, Yamaguchi T, Asano S. Myeloablative unrelated cord blood transplantation for acute leukemia patients between 50 and 55 years of age: single institutional retrospective comparison with patients younger than 50 years of age. *Ann Hematol*. 88: 581-8, 2009.
2. 学会発表
 1. **S. Takahashi**, J. Ooi, S. Kato, T. Kawakita, Y. Nakauchi, M. Monma, 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

平成21年度、高橋と第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）から演者を招いた。また、渡辺とともに造血細胞移植後の血小板のキメリズムを測定する準備を、国立がんセンター中央病院で開始した。

平成22年度、高橋と第2回キメリズム解析研究会（平成23年2月1日、同上）を開催し、医科研内外から演者を招いた。渡辺とともに、健常人血を混合して作製した人工キメリズム検体を用いて、血小板分画におけるキメリズム解析の予備実験を行なった。

平成23年度、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、同上）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。平成22年度、2名の健常人血を混合した人工キメリズム検体を作製し、血小板分画でのキメリズム解析を行なった。平成23年度は、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

平成22年度、人工キメリズム検体を作製してFACS Caliburによりキメリズム解

析を行なったが、染色性は比較的良好でその有効性を確認した。

平成23年度、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て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。その場合のキメリズム解析では、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抗HLA抗体の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.
4. Fuji S, Kim SW, Mori S, Furuta K, Tanosaki R, Heike Y, Takaue Y, Fukuda T. Decreased insulin secretion in patients receiving tacrolimus as GVHD prophylaxis after allogeneic hematopoietic SCT. Bone Marrow Transplant 45:405-406. 2010.
 5. 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 116(8): 1369-76. 2010.
 6. Kakugawa Y, Kami M, Matsuda T, Saito Y, Kim SW, Fukuda T, Mori S, Shimoda T, Tanosaki R, Saito D. Endoscopic diagnosis of cytomegalovirus gastritis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. World J Gastroenterol 16(23): 2907-2912. 2010.
 7. Yokoyama H, Mori S, Kobayashi Y, Kurosawa S, Saito B, Fuji S, Maruyama D, Azuma T, Kim SW, Watanabe T, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y, Fukuda T. Hematopoietic stem cell transplantation for therapy-related myelodysplastic syndrome and acute leukemia: a single-center analysis of 47 patients. Int J Hematol 92(2): 334-341. 2010.
 8. Imataki O, Kamioka T, Fukuda T, Tanosaki R, Takaue Y. Cost and effectiveness of reduced-intensity and conventional allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. Support Care Cancer 18(12): 1565-1569. 2010.
 9. Tanosaki R and Tobinai K. Adult T-cell leukemia-lymphoma: current treatment strategies and novel immunological approaches. Expert Rev Hematol. 3:743-753. 2010.
 10. Kim SW, Mori SI, Tanosaki R, Fukuda T, Kami M, Sakamaki H, Yamashita T, Kodera Y, Terakura S, Taniguchi S, Miyakoshi S, Usui N, Yano S, Kawano Y, Nagatoshi Y, Harada M, Morishima Y, Okamoto S, Saito AM, Ohashi Y, Ueda R, Takaue Y. Busulfex (i.v. BU) and CY regimen before SCT: Japanese-targeted phase II pharmacokinetics combined study. Bone Marrow Transplant. 44: 105-111, 2009.
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。)	なし
1. 特許取得	3. その他
なし	なし
2. 実用新案登録	

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

中内啓光

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- $\alpha\beta3$ 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..
 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, Ibata 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, Koefler 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.