

渡辺信和

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

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, Yoshiba 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, Uchimaruk 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, Uchimaruk 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.

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, Koderu 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.

III. 研究成果の刊行物・別刷

III. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究・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
研究代表者 中内 啓光

第1回 移植後キメリズム解析研究会

近年、臍帯血移植やHLA半合致移植が増え、造血細胞移植の多くがHLAミスマッチで行なわれています。ドナーとレシピエントにそれぞれ特異的なHLAを抗HLA抗体で染色し、フローサイトメーターで解析するHLA-Flow法は、移植後の生着不全や再発の早期診断に有用です。本研究会は、キメリズム解析/HLA-Flow法を造血細胞移植や臓器移植後の様々な病態の診断やメカニズムの解明に役立てることを目指しています。

参加は無料で予約は不要です。みなさんの幅広い参加を歓迎します。

【開催日時】

平成 21 年 12 月 25 日 (金)

10:00 - 12:40 講演会 (東京大学医科学研究所 1 号館・講堂)

13:40 - 16:00 実技講習会 (同・FACS コアラボラトリー)

—— 講演会 ——

司会：高橋聡先生 (附属病院・血液腫瘍内科)

田野崎隆二先生 (国立がんセンター中央病院・幹細胞移植グループ 臨床検査部)

10:00-10:10 開会挨拶

中内啓光先生 (幹細胞治療研究センター)

10:10-10:40 新規坑 HLA 抗体の作製と適用率の向上

山崎聡研究員 (幹細胞治療研究センター・JST)

10:40-11:10 原発性免疫不全症候群に対する臍帯血ミニ移植

森尾友宏先生 (東京医科歯科大学・小児科)

11:10-11:40 HLA 半合致移植-大阪/兵庫医大での現状と展望-

池亀和博先生 (兵庫医科大学・血液内科)

11:40-12:10 生体肝移植前後の免疫病態

高木章乃夫先生 (岡山大学・消化器内科)

12:10-12:40 臍帯血ミニ移植の免疫病態

松野直史先生 (幹細胞治療研究センター・病態解析分野)

—— 実技講習会 ——

13:40-14:00 抗体の組合せ方、染色法、解析法

渡辺信和 (幹細胞治療研究センター・病態解析分野)

14:00-16:00 FACS Aria と Calibur によるキメリズム解析

石井有実子、菅原ゆうこ、松野直史；同

【問い合わせ先】

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター

病態解析分野 研究会事務局

Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750、E-mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

新規坑 HLA 抗体の作製と適用率の向上

山崎 聡

科学技術振興機構 ERATO・中内幹細胞制御プロジェクト

HLA Allele 特異的モノクローナル抗体 (HASmAb) は、その作製が極めて困難であることが知られている。Allele 特異的 HLA 抗体の認識するエピトープは複数の離れたアミノ酸残基が集合して構成される特有の立体構造を有しており、その抗原性はマウス免疫系に認識される異種抗原エピトープと比較して相対的に低いことが原因と考えられる。近年、我々は迅速かつ効率的に HASmAb を作製する技術を開発したことを報告した (Yamazaki *et al.*,2009)。我々の方法は一般的に知られている免疫方法とは異なり、Human-B51 HLA トランスジェニックマウスに HLA テトラマータンパク質を免疫することにより異種抗原エピトープに対する抗体の産生を抑制した。またハイブリドーマのスクリーニング方法としては、表面に HLA 分子を結合したビーズを用いることにより、HASmAb の迅速かつ効率的なスクリーニングを可能にした。この方法で作製された抗 HLA 抗体は、HLA allele の迅速診断や、HLA ミスマッチの造血細胞移植の患者におけるキメリズム解析を通じて、正着不全や白血病の再発の早期診断に役立つことが期待される。

原発性免疫不全症候群に対する臍帯血ミニ移植

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野

同・医学部附属病院細胞治療センター

森尾友宏

造血幹細胞移植は、重症複合型免疫不全症(Severe combined immunodeficiency: SCID), ウィスコット・アルドリッチ症候群 (Wiskott-Aldrich syndrome (WAS), X連鎖高IgM症候群(X-linked hyper-IgM syndrome: X-HIM)などの原発性免疫不全症の根治療法として用いられ、一定の成績を上げている。一方、慢性肉芽腫症(Chronic granulomatous disease: CGD)などその他の免疫不全症に対する成績は不満足なレベルに留まり、ここ5-10年の間に大きな進歩を認めていない。

近年、造血細胞移植後の長期予後を考慮して、これらの疾患に対しては骨髄非破壊的前処置が用いられはじめ、疾患によっては良好な成績を上げている。また乳幼児が多いこと、緊急治療として移植が選択されることがあること、悪性腫瘍などと異なり宿主に対する免疫反応は最小限で良いことなどから、臍帯血移植が選択される症例も多くなっている。これらの観点から、厚生労働省難治性疾患克服事業・原発性免疫不全症調査研究班では、各疾患に対して推奨プロトコル案を策定しており、SCIDに対しては臍帯血ミニ移植の臨床研究が開始されようとしている。

ここでは日本の原発性免疫不全症候群に対する臍帯血移植成績、SCIDに対する臍帯血ミニ移植の自験例を提示し、原発性免疫不全症候群に対する臍帯血ミニ移植の問題点と今後の展望について討論したいと考えている。

HLA 半合致移植の現状 ～大阪/兵庫医大での現状と展望～

兵庫医科大学 血液内科
池亀和博、藤岡龍哉

臍帯血幹細胞や血縁 HLA 半合致ドナーといった alternative donor からの移植は、HLA 不適合移植として捉えることができる。当科（兵庫医科大学 血液内科）では、HLA 半合致移植と臍帯血移植を中心としたハイリスク移植を、臨床および研究のテーマとしている。HLA 半合致移植は、前処置の強さにより、骨髄破壊的 HLA 半合致移植 (haplo-full) と、HLA 半合致ミニ移植 (haplo-mini) との 2 つがあり、全く違った移植としての様相を呈する。haplo-full は御し難い竜神のごとく、その勢いは良くも悪くも激烈であり、それだけに full blast leukemia や terminal lymphoma でも、起死回生のチャンスをもたらす。一方 haplo-mini は安全性を第一とし、頻回移植 (≥ 3 回) を可能にした。現在は移植後再発や非寛解例を主な対象としているが、寛解期に haplo-mini を行えば、他の移植種と同等の成績が得られている。HLA 半合致移植において、一般的に危惧されている生着や GVHD の頻度は、HLA 適合移植のそれとかわらない。また欧米で行われている T 細胞除去の HLA 半合致移植と対比し、本邦で行われている T 細胞を除去しない (unmanipulated) HLA 半合致移植では、lymphoid 系を含めた種々の造血器腫瘍に対して有効性を示す。

ハイリスク移植を行っていく中で、従来 HLA 適合移植では想定しなかったような臨床的問題に直面することが多々ある。当科においては、lab. team を充実させ、臨床検体を用いた様々な解析を自前で行えるよう努力している。本会ではそのいくつかをご紹介します、諸先生方のご意見をいただくことを通して、我々のチームの雰囲気をお伝えできればと思う。

生体肝移植前後の免疫病態

岡山大学消化器内科¹⁾, 肝胆膵外科²⁾

高木章乃夫¹⁾, 八木孝仁²⁾, 内海方嗣²⁾, 岩崎良章¹⁾, 貞森裕²⁾, 小池和子¹⁾, 榎田祐三²⁾, 松田浩明²⁾, 白羽英則¹⁾, 小橋春彦¹⁾, 山本和秀¹⁾

【背景】生体部分肝移植術は、死体肝移植症例がなかなか増えない我が国において、広く行われている。現在までのところ、死体肝移植と比べて、移植後の生存率は大差ないという報告が多いが、最近、全国で最多の移植を行っている京都大学より、原発性硬化性胆管炎においては生体肝移植術後の10年グラフト生存率は39.7%と低く、特に親子間での移植後の再発率が高いことが報告されている(Egawa H. et al.2009)。また、現在肝硬変及び肝移植適応疾患として最多症例となっているC型肝炎ウイルス(HCV)関連肝疾患に対する肝移植後、ほぼ100%の症例でウイルスが再感染し、生体肝移植後に高率に発症する胆管合併症が併発した症例においてしばしば早期かつ重篤なC型肝炎再燃が生ずることが指摘されている。C型肝炎の病態はウイルス感染細胞に対する免疫応答であると考えられており、移植後においては、免疫抑制剤・キメリズムが病態に関与することが推測される。我々は、特に移植後C型肝炎患者において、ウイルス特異的な免疫応答の推移を観察し、これに対するキメリズムの関与を明らかにしようとしている。本日の発表では、生体肝移植に関する総論と当院で施行した成人生体部分肝移植症例のうち、C型肝炎硬変症例を対象とした、肝移植後の肝病態の再発像とHCV抗原特異的なT細胞応答の術前・術後の変化について報告する。

【対象および方法】当院において成人生体部分肝移植を施行したHCV関連肝疾患40例のうち10例においてHCV抗原特異的なT細胞応答を検討した。10例の内訳は①移植後1年以上持続トランスアミナーゼ正常でインターフェロン未使用例が4例、②インターフェロン治療を行った症例が3例、③現在インターフェロン治療中の症例が3例である。術前、術一ヵ月後、1-2年後に採血を行い、単核球よりCD4陽性細胞、CD14陽性細胞を分離し、CD4陽性細胞は凍結保存した。CD14陽性細胞はGM-CSF,IL4添加メディウムで5日間培養を行い未熟樹状細胞を樹立した。これにHCVリコンビナント抗原(Core,NS3,NS4,NS5A,NS5B)を加え、1日培養後、LPSにて成熟刺激を与え、更に1日培養後CD4陽性細胞と抗原による刺激を加え、インターフェロン γ 産生をELISPOTアッセイにて検討した。【結果】、全例で術前にはスポット数は低値であった。①のうち3例で2年後にスポット数の増加を認めた。②のうち2例でインターフェロン開始後トランスアミナーゼの低下、終了後スポット数の増加を認めた。②と③いずれもインターフェロン開始前にはスポット数は低値であった。【結論】HCV抗原特異的なT細胞応答は生体肝移植後において肝炎活動性が低い状態では強力であることが示された。

臍帯血ミニ移植後早期のリンパ球生着動態の研究

松野直史、渡辺信和

東大医科研 幹細胞治療研究センター・病態解析分野

山本久史、谷口修一

虎の門病院 血液内科

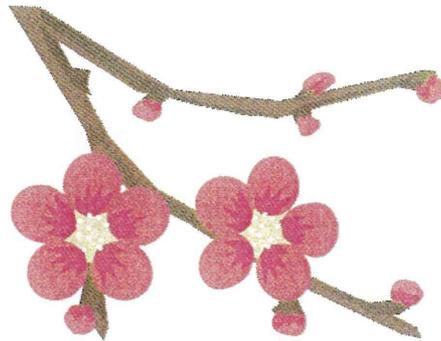
臍帯血の特徴の 1 つは、リンパ球の未熟性、すなわち T リンパ球のほとんどはナイーブ細胞であることにある。このことは、graft-versus-host (GVH) 反応が軽度である理由の一つと考えられるが、骨髄非破壊的移植法においては残存するレシピエント免疫担当細胞による拒絶の原因ともなりうる。一方で、GVHD 予防を軽減した移植法においては、しばしば生着前早期 (day 9 頃) に発熱、皮疹、下痢等の高サイトカイン血症に起因すると考えられる症状が認められ、臍帯血移植特有のアロ免疫反応の存在が示唆されている。これまで臍帯血移植後中後期 (1 ヶ月~1 年) の免疫再構築に関する報告は散見されるが、移植後早期 (生着までの 1 ヶ月以内) のリンパ球動態については未だ明らかにされていない。そこで、東大医科研病態解析分野と虎の門病院血液内科との共同研究で、臍帯血ミニ移植後早期におけるリンパ球動態を詳細に検討し、生着不全や急性 GVHD 等の臨床病態との関連を明らかにすることを目指している。

本研究は、虎の門病院の IRB の承認を得ており、平成 21 年 11 月より虎の門病院における臍帯血移植症例の研究登録が始まっている。臍帯血移植後 1, 2, 3, 4, および 8 週目の末梢血検体をマルチカラーフローサイトメトリーで解析する。混合キメリズム解析 (HLA-Flow 法) が可能なドナー・レシピエント HLA の組み合わせで行われる移植については、9 カラー FACS 解析システムにより、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、B 細胞、NK 細胞および単球の各分画における混合キメリズム検査を行う。T 細胞のナイーブ・メモリーフェノタイプは、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞について、それぞれ CD45RA と CD62L (あるいは CCR7) の組み合わせで解析する。また制御性 T 細胞 (Treg) に発現する細胞内 Foxp3 の解析を行う。これらの解析結果をもとに、臍帯血移植後のリンパ球動態と生着不全や GVHD 等の病態との関わりを明らかにする。移植後早期の免疫病態がその後の免疫再構築に与える影響を明らかにする目的で、造血幹細胞移植後に高頻度に合併するサイトメガロウイルス (CMV) 感染症に対する特異的 T 細胞の獲得について、テトラマー解析を行う。

本研究会では、虎の門病院における臍帯血移植のレビュー、研究計画内容ならびに一部の解析結果について発表する。

厚生労働科学研究・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
研究代表者：中内啓光

第2回 移植後キメリズム解析研究 会



平成23年2月1日（火）
東京大学医科学研究所 一号館講堂

第2回 移植後キメリズム解析研究会

近年、臍帯血移植やHLA半合致移植が増え、造血細胞移植の多くがHLAミスマッチで行なわれています。ドナーとレシピエントにそれぞれ特異的なHLAを抗HLA抗体で染色し、フローサイトメーターで解析するHLA-Flow法は、移植後の生着不全や再発の早期診断に有用です。本研究会は、HLA-Flow法を造血細胞移植や臓器移植後の様々な病態の診断やメカニズムの解明に役立てることを目指しています。参加は無料で予約は不要です。みなさんの幅広い参加を歓迎します。

【日時と場所】

平成23年2月1日(火)

13:00 - 17:20 講演会(東京大学医科学研究所・1号館講堂)

17:30 - 19:30 懇親会(東京大学医科学研究所・近代医科学記念館)

司会：高橋聡先生(東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科)
田野崎隆二先生(国立がんセンター中央病院 臨床検査科)

13:00-13:10 開会の挨拶
中内啓光先生(幹細胞治療研究センター)

13:10-13:40 新規 Allele 特異的 HLA 抗体の作製を目指した試み
山崎聡研究員(科学技術振興機構 ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト)

13:40-14:10 10 カラーFACS 解析システムによるキメリズム解析法
渡辺恵理研究員(幹細胞治療研究センター 病態解析領域)

14:10-14:40 SCID に対する新規造血幹細胞移植法
大津真先生(幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野)

14:40-15:10 肝疾患における末梢血制御性T細胞の頻度の検討
高木章乃夫先生(岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科)

15:10-15:40 移植後早期再発症例に対する血縁者間 HLA 半合致移植の検討
清水啓明先生(済生会前橋病院 血液内科)

15:40-16:10 当科での HLA 不適合移植における HLA-Flow 法の役割
藤岡龍哉先生(兵庫医科大学 血液内科)

16:10-16:40 原発性免疫不全症に対する臍帯血移植とキメリズム解析
森尾友宏先生(東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野、
同・医学部附属病院細胞治療センター)

16:40-17:10 臍帯血移植後早期のリンパ球生着動態
松野直史先生(幹細胞治療研究センター 病態解析領域、虎の門病院 血液内科)

17:10-17:20 閉会の挨拶
中内啓光先生(幹細胞治療研究センター)



17:30-19:30 懇親会(近代医科学記念館-医科研正門よこ)

【問い合わせ先】

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 病態解析領域 研究会事務局
Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750、E-mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

新規 Allele 特異的抗 HLA 抗体の作製を目指した試み

山崎 聡

科学技術振興機構 ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト

Allele 特異的抗 HLA モノクローナル抗体 (ASHmAb) は、その作製が極めて困難であることが知られている。ASHmAb の認識するエピトープは複数の離れたアミノ酸残基が集合して構成される特有の立体構想を有しており、その抗原性はマウス免疫系に認識される異種抗原エピトープと比較して相対的に低いことが原因と考えられる。

近年、我々は迅速かつ効率的に ASHmAb を作製する技術を開発した (*Yamazaki et al., 2009*)。我々の方法は一般的に知られている方法とは異なり、ヒト HLA トランスジェニックマウスに HLA テトラマータンパク質を免疫することにより、異種抗原エピトープに対する抗体の産生を抑制した。

またハイブリドーマのスクリーニング方法としては、表面に HLA 分子を結合したビーズを用いることにより、ASHmAb の迅速かつ効果的なスクリーニングを可能にした。

また、今回の講演では、ASHmAb の開発に向けた我々の新たな試みもご紹介する。

将来的には、我々が樹立した抗 HLA 抗体は HLA allele の迅速診断に利用できるほか、HLA ミスマッチ造血幹細胞移植の患者におけるキメリズム解析を通じて、生着不全や白血病の再発時における早期診断にも役立つことが期待される。

10 カラーFACS 解析システムによるキメリズム解析法

渡辺恵理

東京大学医科学研究所・幹細胞治療センター・幹細胞治療分野・病態解析領域

造血幹細胞移植後早期の末梢血では、ドナー由来の血液細胞とレシピエント由来の血液細胞が混在する混合キメリズム (mixed chimerism) 状態となる。移植後のレシピエントの体内では、移植片に含まれるドナー由来のエフェクター細胞のアロ免疫反応が誘導され、レシピエント由来の血液細胞を他人の細胞と認識して破壊する。やがて血液細胞は、すべてドナー由来細胞に置き換わり、完全キメリズム (complete chimerism) 状態となる。移植後早期のキメリズム動態は、ドナー由来のエフェクター細胞のアロ免疫反応を反映しており、これを経時的に解析することでレシピエントの病態を観察することができる。すなわち、キメリズム動態は生着不全や GVHD (graft versus host disease)、あるいは再発とも密接に関連しており、キメリズムを解析することは移植後早期に起こる重要な病態の早期診断やメカニズムの解明に役立つと思われる。

我々は、近年増加している臍帯血移植や HLA 半合致移植において HLA がミスマッチであることに着目し、アリル特異的抗 HLA 抗体とフローサイトメーターを使用した新たなキメリズム解析法、HLA-Flow 法を開発した。(Watanabe N, et al. Biol. Blood and Marrow Transplant, 14(6):693-701, 2008)。

平成 21 年度より、我々は HLA-Flow 法の実用化を目指して全国の医療機関と共同で臨床研究を進めている。臍帯血移植の臨床結果から、本法は、1) 移植後早期の生着のモニタリング、2) 移植後早期の遷延するキメリズムの解析、3) 微少残存病変の監視、4) 再発後の腫瘍細胞量の変化、などの病態解析に役立つことが明らかとなった。HLA-Flow 法は迅速、定量的かつ高感度であり、白血球サブセットにおける詳細な解析が可能であるため、従来の XY-FISH 法や STR-PCR 法に比べて非常に有用な情報が得られる。一方で、解析の難しさなどの問題もあり、広く普及するためにはいくつかの課題も残されている。

今回の発表では、HLA-Flow 法の原理、および問題点と対策について述べた後、現在我々が進めている新しい試みを紹介する。

SCID に対する新規造血幹細胞移植法

大津 真

東京大学医科学研究所・幹細胞治療センター・幹細胞治療分野

造血幹細胞移植は、先天性免疫不全症等の難治疾患の根治を目的として行われるが、同種移植における拒絶、生着不全、移植片対宿主病 (GVHD) 等が問題となるため、安全かつ有効な治療法の確立が望まれる。近年、移植技術の進歩に伴い骨髄前処置の軽減が可能になりつつあるが、臓器障害等の毒性を伴う前処置を全く必要とせずに、安定したドナーキメラリズムを誘導する方法は未だ確立されていない。

私たちは、マウス同種移植モデルにおいてドナーリンパ球を先行投与するのみでアロ反応によりホストの造血ニッチを空にし、後から移植するドナー造血幹細胞の生着と安定なドナーキメラリズムを実現する新規移植法 DLIST (Donor Lymphocyte Infusion-based conditioning Stem Cell Transplantation) を確立した。アロ T 細胞による造血ニッチの開放は、ただ一個の造血幹細胞の移植でも生着を可能にし、致死量放射線照射に匹敵する前処置効果を示した。DLIST 法により~100% のドナーキメラリズムを獲得したマウスにおいては、GVH 反応は一過性に収束し、免疫寛容の獲得がみられた。安定キメラマウスは長期生存が可能であり、雌個体においては妊娠出産の能力も保持されていた。

次に、重症複合免疫不全症 (SCID) のモデルとして X 連鎖 SCID (XSCID) マウスにおいて DLIST 法の有効性を検討した。結果、ハプロ一致のアロ T 細胞による前処置のみで、造血幹細胞レベルでのドナー造血への置換が誘導され、リンパ球数および免疫グロブリン値の回復、T 細胞増殖能の改善、胸腺組織の再構築等を伴い、疾患の治療を得ることに成功した。以上より、アロ T 細胞の反応のみにより造血を置換することが可能であり、DLIST 法の有用性を示したが、引き続きヒト細胞を用いたモデル化、今後の展開等についても概説したい。

肝疾患における末梢血制御性 T 細胞の頻度の検討

高木章乃夫

岡山大学大学院 消化器・肝臓・感染症内科

高木章乃夫¹⁾、小池和子¹⁾、内海方嗣²⁾、
八木孝仁²⁾、安中哲也¹⁾、三宅康広¹⁾、山本和秀¹⁾
岡山大学大学院消化器・肝臓・感染症内科¹⁾、肝胆膵外科²⁾

【目的】

生体肝移植後において、現在最も問題となっている病態に C 型慢性肝炎の再発が挙げられる。その病態は免疫反応による炎症と考えられており、免疫抑制剤・拒絶反応などが複雑に絡み合って進行していくと考えられている。肝炎の進展にはウイルス特異的な Cytotoxic T cell (CTL) レスポンスが重要である。移植後においてはこれらウイルス特異的な免疫応答は免疫抑制剤により抑制される可能性があるが移植後においてもさまざまな程度の慢性肝炎を発症する。今回我々は、生体肝移植後を含めた慢性肝疾患患者における末梢血制御性 T 細胞の分布と病態の関連について検討した。

【方法】

健常成人 (HV) 5 名、非移植 C 型肝炎患者 (CHC) 4 名、移植後 C 型肝炎患者 (C-LDLT) 4 名を対象に、末梢血リンパ球を分離し、CD4+CD25+CD127lo の CD4Treg、CD4+CD18+CD49b+ の Tr1、の頻度について検討を行った。

【結果】

各頻度は平均して、HV : CD4Treg-8.91, Tr1-2.35、CHC : CD4Treg-6.49, Tr1-3.38、C-LDLT : CD4Treg-6.8, Tr1-0.577 であった。

【まとめ】

CD4Treg については肝移植後においても大きな違いはなかったが、Tr1 の頻度は移植後において低値をとった。移植後の症例は移植後早期や拒絶疑いの症例が含まれており、病態との関連を含めて発表する。

移植後早期再発症例に対する血縁者間 HLA 半合致移植の検討 清水 啓明

群馬県済生会前橋病院・血液内科（白血病治療センター）

血縁者間 HLA 半合致移植は、ドナーの availability が高く、また強力な GVL 効果が期待できることから難治性造血器腫瘍に対して有望な移植方法である。当院では 2010 年 6 月より、同種移植後早期再発の High Risk 症例に対して血縁者間 HLA 半合致移植を行っている。現在までに行った 5 例についての考察と、東京大学医科学研究所に御協力頂いて解析を行った移植後早期のキメリズム推移に関して報告する。

症例 5 例(男 3 例女 2 例、年齢 29~63)は、AML(4 例)または MDS(1 例)の移植後早期再発症例で、全例移植時は非寛解であった。Cell Source は凍結保存した PB を用い、輸注細胞数は $CD34^+$ cell $3.0\sim 4.1\times 10^6/kg$ 、 $CD3^+$ cell $1.4\sim 6.0\times 10^8/kg$ 。前処置は TBI3Gy +Flu30mg/m²×6 +Ara-C2g/m²×4 +Mel70mg/m²×2 +ATG(サイモグロブリン)1mg/kg×2、GVHD 予防は FK+mPSL1mg/kg にて行った。全例 day8~11 の早期に生着が得られた。30~200 日と観察期間は短いものの再発なく生存しており、3 例は初回移植の寛解期間を超えている。acute GVHD は grade1 を 1 例、grade2 を 2 例に認めたが、いずれもステロイドの増量によって control 可能であった。また SOS/VOD を 1 例に、TMA を 2 例に合併し、いずれも血液透析を必要とする腎不全を発症した。TMA を合併した 2 例は FK506 の中止により軽快し、MMF の内服へと切り替えたが acute GVHD の発症はなかった。ウイルス感染は、3 例で CMV 抗原血症を合併し、1 例で BK virus による重症出血性膀胱炎を合併した。また 1 例が day170 で脳内に多発性の PTLD を発症し、現在全脳照射とリツキサンによる治療中である。

キメリズムの解析は多次元フローサイトメーターを用い、HLA ミスマッチ抗原を指標として行った。解析は移植後 day2 または day5 より 7 日ごとに末梢血の検体で、lineage 別($CD4^+$ T-cell, $CD8^+$ T-cell, B-cell, NK-cell, Monocyte, Granulocyte)に行った。以前報告された CBT との比較では、day2 とごく早期より T-cell がほぼドナー由来になっている点、 $CD4^+$ T-cell の回復に先んじて $CD8^+$ T-cell の回復が認められた点、早期に B-cell の回復が認められた点、Ficoll で分離した単核細胞分画にもかかわらず顆粒球系前駆細胞と思われる分画が多数混在している点が異なっていた。特に前処置に ATG を使用しているにも関わらず、ごく早期に T-cell の回復が見られたのは驚きであった。ドナー由来の T-cell が $CD8$ 優位に回復しているのは allo-reactivity の強さを表していると考えられるが、B-cell や顆粒球前駆細胞に関しては graft 内の細胞の影響も考慮すべきと考えられた。従来の移植方法と比較した血縁者間 HLA 半合致移植の特徴としては、生着が非常に早く、移植後 1 週間以内の早期にキメリズムがドナー由来へと入れ替わった点が挙げられる。最大の不安材料であった重症の acute GVHD の発症は見られず、むしろ BK virus 出血性膀胱炎や PTLD といったウイルス感染症に難渋する例や TMA の合併例があり、ATG の投与量やステロイドの減量方法に関して今後検討が必要と考えられた。抗腫瘍効果は非常に強く、移植後早期再発症例で非寛解での移植であるにもかかわらず、全例で再発を認めていない。また PCR による MRD の解析が可能であった 2 例において、いずれも移植後 4 週の時点で molecular CR となっている。この早期の抗腫瘍効果は、ドナー由来 cytotoxic T-cell の早期の回復が関与している可能性がある。血縁者間 HLA 半合致移植は強い抗腫瘍効果を有し、有望な移植方法と考えられる。GVHD 予防法の至適化や適応症例の拡大など、今後さらに検討を行っていく。

当科での HLA 不適合移植における HLA-Flow 法の役割

藤岡龍哉

兵庫医科大学 血液内科

この十数年の間、我々は HLA 半合致移植を行っており、年々その症例数は増加の一途を辿っている。また、臍帯血移植、そしてミニ移植の発展により HLA 不適合移植の適応の幅は飛躍的に広いものとなった。これらにより HLA 適合ドナーが存在しない患者に対しても造血細胞移植を適応できるようになったことは臨床的意義の大きなところである。一方、これらの移植経過においてはそれまでの従来型の移植では見られることのなかったような複雑な曲面を呈することがしばしばある。ミニ移植後の mixed chimerism の遷延や HLA 不適合移植後の再発時における腫瘍細胞に時に認められる HLA 抗原の消失などが新たな問題として出現してきており、それらに対する解析は臨床上非常に必要度の高い検査手技となっている。

- 前半一 当科で実施の HLA 不適合移植の概要について
- 後半一 これらの移植における HLA-flow 法での主な解析例の紹介