

201126018A

厚生労働科学研究費補助金

免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業

純化自己幹細胞移植術による難治性自己免疫疾患治療の

免疫再生メカニズムに関する研究

(H22-免疫-一般-008)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 赤司浩一

九州大学大学院病態修復内科学

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	
純化自己幹細胞移植術による難治性自己免疫疾患治療の免疫再生メカニズムに関する研究	1
	赤司浩一
II. 分担研究報告	
1. 全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植における末梢血リンパ球の遺伝子発現プロファイル解析	7
	堀内孝彦
2. 難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植の有効性に関する研究	10
	宮本敏浩
3. 全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後の T 細胞受容体レパトア多様性の変化に関する研究	13
	新納宏昭
4. 全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後の免疫学的再構築に関する研究	16
	塚本 浩
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	22

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
総括研究報告書

純化自己幹細胞移植術による難治性自己免疫疾患治療の免疫再生メカニズムに
関する研究

研究者代表者 赤司浩一
九州大学大学院 病態修復内科学 教授

研究要旨

自己免疫疾患の中には進行性の間質性肺炎や皮膚硬化を呈し、治療抵抗性で予後不良の疾患群が依然として存在し、その克服が重要な課題となっている。このような難治性自己免疫疾患症例に対する新規治療法としてわれわれは自己造血幹細胞移植(自己HSCT)を施行し、5年間にわたる有効性を評価した。対象症例の内訳は全身性硬化症(SSc)19例、皮膚筋炎3例で、自己HSCT後、皮膚硬化、間質性肺炎の改善や自己抗体の低下等多くの症例で臨床的寛解が得られ、その効果は5年間持続した。SScに対する自己HSCT後の5年生存率は89%、また5年無増悪生存率は65%で、海外と同等以上の成績であった。有効性のメカニズムを明らかにするため、自己HSCT後の免疫学的再構築を検討したところ、SSc患者では自己HSCT後5年間Th1/Th2バランスはTh1優位が持続し、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。TCRレパトアの多様性の解析ではSSc患者において治療前は一部のVβのCDR3サイズがoligoclonalまたはmonoclonalな分布を示したが、自己HSCT後にTCRレパトアの多様性が有意に回復した。遺伝子発現プロファイル解析ではSSc患者リンパ球各亜分画において健常人とは遺伝子発現プロファイルが異なり、自己HSCT後に正常化する傾向が認められた。以上、自己HSCT後のTh1/Th2バランスにおけるTh1優位の免疫再構築、TCRレパトアの多様性の回復、リンパ球の遺伝子発現プロファイリングの正常化等が臨床的寛解の誘導および維持に関連していると考えられた。

研究分担者

堀内孝彦 九州大学大学院
病態修復内科学 准教授
宮本敏浩 九州大学病院
血液腫瘍内科 講師
新納宏昭 九州大学病院
免疫・膠原病・感染症内科 助教
塚本 浩 九州大学病院
免疫・膠原病・感染症内科 助教

A. 研究目的

自己免疫疾患の中には進行性の間質性肺炎や皮膚硬化を呈し、治療抵抗性で予後不良の疾患群が依然として存在し、その克服が重要

な課題となっている。われわれは、このような難治性自己免疫疾患 23 例(全身性硬化症(SSc)19 例、皮膚筋炎 3 例、ウェゲナー肉芽腫症 1 例)に対し自己造血幹細胞移植(自己HSCT)を施行し、多くの症例において臨床的寛解を得、寛解は移植後 3-5 年間継続した。しかし、有効性のメカニズムが不明であるため、この点を明らかにする事を目的とし昨年度より本研究を開始した。昨年度の研究では、既移植症例について移植後 3 年間の安全性と有効性を確認すると共に、自己 HSCT 後 3 年間の免疫学的再構築について検討し、自己

HSCT 後3年間Th1/Th2 バランスにおいてTh1 優位が持続し、有効性との関連が示唆されることを報告した。昨年度の成果を踏まえ、本年度の研究では、1) 既移植症例について移植後5年間にわたる有効性を評価するとともに、CD34 陽性細胞純化自己 HSCT と非純化自己 HSCT を比較する、2) これら既移植症例における再構築リンパ球分画の5年間にわたる経時的変化、T細胞受容体レパトアの多様性を詳細に解析することにより、本治療法の有効性とリンパ球機能変化との関連を明らかにする、3) 治療前後の末梢血リンパ球亜分画毎の遺伝子発現プロファイルを明らかにする、4) プロトコールに基づき新規症例に対する自己 HSCT を施行する、事を目的とする。

B. 研究方法

1) 自己HSCTの対象はSSc19例、皮膚筋炎3例。SSc患者について末梢血幹細胞の動員はシクロフォスファミド(CY)4g/m²とG-CSF投与にて行い、アフエレーシスによって末梢血幹細胞を採取した。前半の11例では幹細胞採取後、CliniMACSを用いてCD34陽性細胞に純化した。移植前治療としてはCY200mg/kgを投与し、移植当日に2x10⁶/kg以上のCD34陽性細胞を輸注した(純化自己HSCT)。後半の8例ではCD34陽性細胞への純化を行わなかった(非純化自己HSCT)。皮膚筋炎患者は2例に純化自己HSCT、1例に非純化自己HSCTを施行した。

2) 免疫学的再構築の解析対象はCD34純化自己HSCTを施行したSSc11例で、治療開始前、自己HSCT直前、自己HSCT1-60ヶ月後にフローサイトメトリーを用いて、リンパ球亜分画の実数を算出した。

3) T細胞受容体レパトアの多様性の解析ではSSc患者末梢血単核球よりRNAを調製し、

cDNA合成後に各TCR Vβ 特異的プライマー (Vβ 1-9, 11-18, 20-24の22種類) を用いてPCR増幅を行い、DNAシーケンサーを用いてTCR Vβレパトア分布および相補性決定領域3 (CDR3) サイズ分布解析を行った。

4) 遺伝子発現プロファイルの解析ではSSc患者末梢血リンパ球8分画よりRNAを調製し、cDNAを介してビオチン化cRNAをin vitro増幅によって作成し、ビーズチップ上にハイブリダイゼーションしたのちStreptavidine-Cy3の蛍光検出を行った。DNAチップはIllumina HumanHT-12 v4、解析はGeneSpringGXを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ている。本療法の施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

自己 HSCT を施行した SSc19 例において移植関連死は認めなかった。皮膚硬化に対する効果では、スキンスコアが自己 HSCT12ヶ月後には約50%、36ヶ月後には約70%の改善を示し、その効果は60ヶ月後まで持続した(図1)。

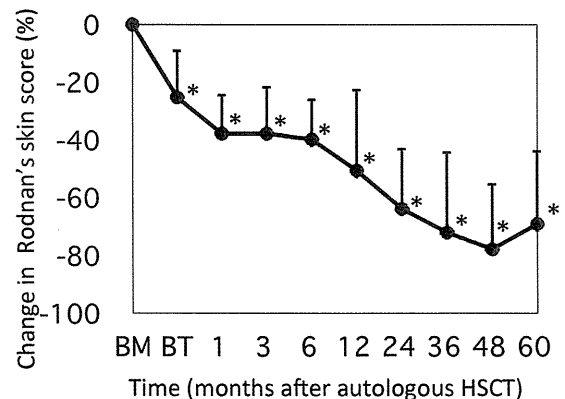


図1.スキンスコアの推移

BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

間質性肺炎では、%VCが自己HSCT後に増加傾向を示し、4年後には有意に増加した。抗Scl-70抗体価、KL-6は移植後有意に低下し5年間持続した。5年生存率は89%、また5年無増悪生存率は65%であった(図2)。純化HSCTでは非純化HSCTに比し、合併症としてウイルス感染を高頻度に認めたが、皮膚硬化に対する有効性は有意に優れていた。

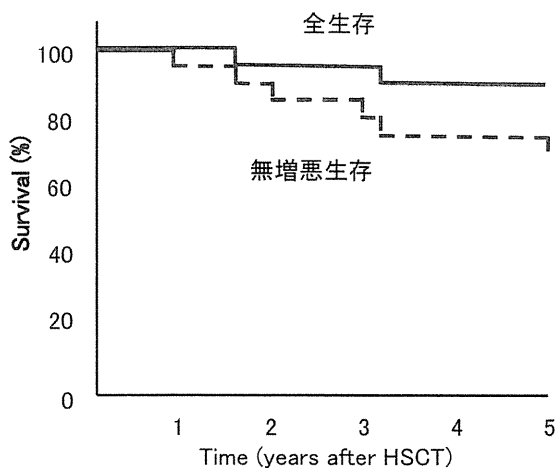


図2.生存率

臨床的に筋炎症状を伴わない皮膚筋炎(CADM)に合併した進行性間質性肺炎に自己HSCTを施行した2症例(症例12、23)では、自己HSCT1年後に間質性肺炎の改善を認め、またその効果は長期間持続し、症例12では9年後、症例23では3年後には間質性肺炎はさらに改善した。

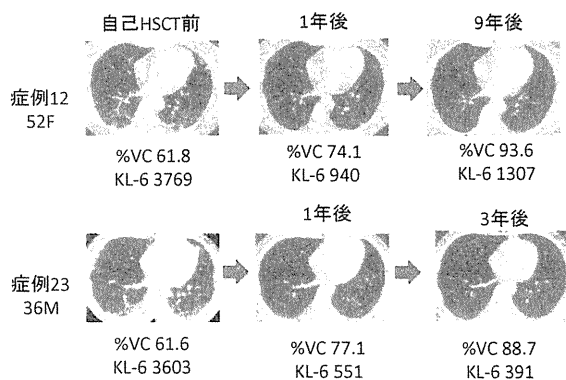


図3.CADMに伴う進行性間質性肺炎に対する自己HSCTの長期効果

免疫学的再構築ではT細胞は自己HSCT1ヶ月後より回復したが、大部分はCD8+T細胞で、CD4+T細胞の回復は自己HSCT後1-36ヶ月は著しく抑制され、低下していたCD4/CD8比は48ヶ月後以降1前後までに回復した(治療開始前は1.7)(図3)。

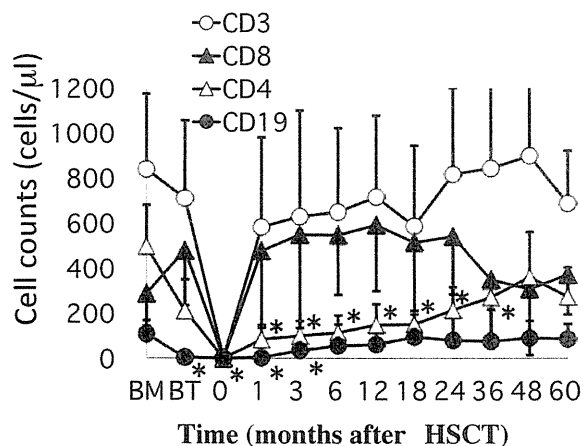


図4.自己HSCT後の免疫学的再構築
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

CD4+T細胞のうちナイーブCD4+/CD45RA+T細胞の回復は、メモリーCD4+/CD45RO+T細胞の回復に比較し著しく遅延した。B細胞は自己HSCT12ヶ月後に治療前値まで回復した。B細胞の内訳では治療前よりメモリーCD27+B細胞に比しナイーブCD27-B細胞が多かったが、自己HSCT60ヶ月後もCD27+メモリーB細胞の増加は認められなかった。Th1/Th2バランスは自己HSCT1ヶ月後より有意に上昇後、6ヶ月後にピークとなりその後60ヶ月後までTh1優位が持続した。

T細胞受容体レパトアの多様性の解析について、通常CDR3のサイズ分布は6-10個のピークを持ちガウス分布に従うが(図5)。SSc患者において治療前はTCR Vβレパトアに偏りが見られ、一部のVβのCDR3サイズはoligoclonalまたはmonoclonalな分布(skewed pattern)を示

した(図5)。全体で見ると、自己HSCT前のSSc患者におけるTCR V β のCDR3サイズがskewed patternを示した割合は18.3%で、健常人の5.9%と比較し有意に高頻度であり、自己HSCT後は5.3%と有意に低下した(図6)。

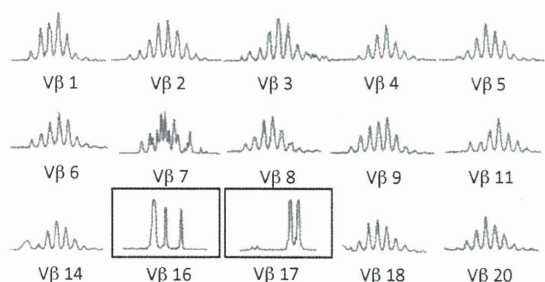


図5. CDR3サイズ分布解析の例: 症例B(自己HSCT前)
正常では6-10個のピークをもちガウス分布に従う
polyclonalなCDR3分布を示す
CDR3に偏りがあると、skewed pattern (mono-oligoclonal)
を示す □

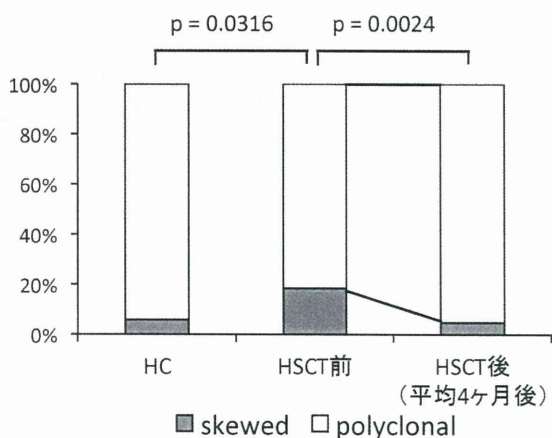


図6. 健常人およびSSc患者におけるT細胞受容体
CDR3サイズ分布とHSCT後の変化 HC:健常人

遺伝子発現プロファイルでは47,231遺伝子より健常人と自己HSCT未施行SSc患者で発現量に4倍以上差がある遺伝子に着目したところ、リンパ球各亜分画において200から400遺伝子が抽出された。メモリーB細胞では371遺伝子を抽出し、クラスター分類を行った(図7)。これらの遺伝子について、純化および非純化自己HSCT施行SSc患者では健常人と自己HSCT未施行SSc患者との中間の遺伝子発現プロファイルを呈し、更に純化自己HSCT

施行SSc患者は非純化自己HSCT施行SSc患者に比し健常人により近い遺伝子発現プロファイルを呈した。

学内倫理委員会にて承認されたプロトコールに基づき、新規SSc患者2例について純化自己HSCTを施行した。

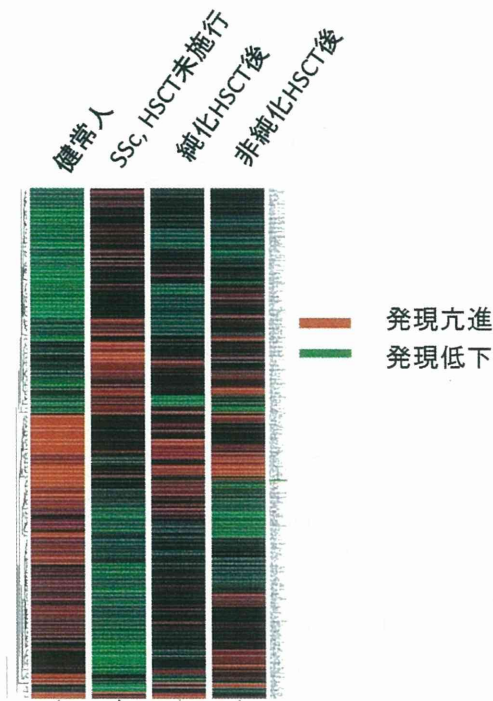


図7. SSc患者(HSCT未施行およびHSCT後)と健常人メモリーB細胞の遺伝子発現プロファイル

D. 考察

最近、海外の臨床第II相試験でSScに対する自己HSCTが従来のCY静注療法に比し、皮膚硬化や間質性肺炎に対する有効性において有意に優れている事が報告された(Burt et al. Lancet 2011)。本研究でも、SScに対する自己HSCTでは皮膚硬化や間質性肺炎に対して有意な改善効果が認められ、その効果は5年間持続した。海外における175例の集計では5年生存率は76%、また5年無増悪生存率は55%と報告されており、当施設の成績(それぞれ89%、65%)は同等以上と考えられる。純化および非

純化自己HSCTの比較では感染症の制御が可能である限り、有効性の高い純化HSCTの方がより優れていると考えられた。

IFN- γ は抗線維化作用、一方IL-4は線維化促進作用を有し、また、SScのモデルマウスにおいてTh1主体の免疫反応の誘導による皮膚硬化の抑制が報告されている事より、自己HSCT後のTh1優位のCD4+T細胞の回復とSScの皮膚硬化の改善との関連が推察される。

自己HSCT後にTCRレパトアの多様性が回復する傾向が認められ、臨床効果との関連が示唆された。移植前の大量免疫抑制療法によりTCR V β レパトアに偏りを持つT細胞集団が除去され、移植したCD34陽性細胞より、TCR V β レパトアに偏りを有さないT細胞が新しく分化するためと考えられる。

本研究によりSSc患者リンパ球各亜分画において健常人とは遺伝子発現プロファイルが異なる事が明らかになった。SSc患者では自己HSCT後、特に有効性に優れる純化自己HSCT後に遺伝子発現プロファイルが正常化する傾向が認められた事は、遺伝子発現プロファイルの是正が臨床効果と関連している事を示唆し大変興味深い。

E. 結論

難治性自己免疫疾患患者に対する自己HSCTの有効性は長期間持続する事が示された。SScに対する自己HSCT後長期間Th1/Th2バランスにおいてTh1優位が持続すること、自己HSCT後のTCRレパトアの多様性の回復、リンパ球の遺伝子発現プロファイリングの正常化などが臨床的寛解の誘導および維持に関連していると考えられた。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niiro H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20: 246-59, 2011.
2. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, Akashi K, Teshima T. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med* 208:285-94, 2011
3. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niiro H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. *Rheumatology* 50: 944-52, 2011
4. Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Sunami S, Kamitani T, Sakai S, Hatakenaka M, Nagafuji K, Horiuchi T, Harada M, Akashi K, Honda H. Correlation between pretreatment or follow-up CT findings and therapeutic effect of autologous peripheral blood stem cell transplantation for interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis. *Eur J Radiol* 79: e74-9, 2011.
5. Odawara J, Harada A, Yoshimi T, Maehara K, Tachibana T, Okada S, Akashi K,

- Ohkawa Y. The classification of mRNA expression levels by the phosphorylation state of RNAPII CTD based on a combined genome-wide approach. *BMC Genomics* 12: 516, 2011.
6. Shimoda S, Harada K, Niuro H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakanuma Y, Leung P, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 53: 1270-81, 2011.
 7. Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Huber E, Landfried K, Akashi K, Vander Lugt M, Reddy P, Chin A, Zhang Q, Hanash S, Paczesny S. 2011. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118: 6702-8
 8. Harris AC, Ferrara JL, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Landfried K, Akashi K, Vander Lugt M, Couriel DR, Reddy P, Paczesny S. Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. *Blood* 119: 2960-3, 2012.
 9. Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, Akashi K. CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. *Blood* 119: 2263-73, 2012.
 10. Mizuochi C, Fraser ST, Biasch K, Horio Y, Kikushige Y, Tani K, Akashi K, Tavian M, Sugiyama D. Intra-Aortic Clusters Undergo Endothelial to Hematopoietic Phenotypic Transition during Early Embryogenesis. *PLoS One* 7: e35763, 2012.
 11. Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Shiratsuchi M, Abe Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 18: 458-65, 2012.
2. 学会発表
1. Akashi K: Leukemic stem cells. ヨーロッパ血液学会, 2011年7月, London, 英国
 2. Akashi K: Origin of leukemic stem cells. ドイツ造血幹細胞学会, 2011年9月, Tubingen, ドイツ
 3. Akashi K: Transcriptional regulation in normal and malignant hematopoiesis, 米国血液学会, 2011年12月, San Diego, 米国.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
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

厚生労働科学研究費補助金（免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植における末梢血リンパ球の遺伝子発現プロ
ファイル解析

研究者分担者 堀内孝彦
九州大学大学院 病態修復内科学 准教授

研究要旨

全身性硬化症 (SSc) に対する自己造血幹細胞移植 (自己 HSCT) の有効性の機序を解明するため、SSc における自己 HSCT 後の遺伝子発現プロファイルの変化を明らかにする事を目的とした。対象は CD34 純化および非純化自己 HSCT を施行した SSc それぞれ 4 例、自己 HSCT 未施行 SSc 8 例、健常人 5 例で、末梢血リンパ球を 8 分画に分け、フローサイトメトリーを用いたソーティングにより各分画を回収した。得られた各分画より RNA を調製し、cDNA を介してビオチン化 cRNA を *in vitro* 増幅によって作成し、ビーズチップ上にハイブリダイゼーションしたのち Streptavidine-Cy3 の蛍光検出をおこなった。47,231 遺伝子より健常人と自己 HSCT 未施行 SSc 患者で発現量に 4 倍以上差がある遺伝子に着目したところ、リンパ球各亜分画において 200 から 400 遺伝子が抽出された。これらの遺伝子について、純化および非純化自己 HSCT 施行 SSc 患者では健常人と自己 HSCT 未施行 SSc 患者との中間の遺伝子発現プロファイルを呈し、更に純化自己 HSCT 施行 SSc 患者は非純化自己 HSCT 施行 SSc 患者に比し健常人により近い遺伝子発現プロファイルを呈した。本研究により SSc 患者リンパ球各亜分画において健常人とは遺伝子発現プロファイルが異なり、自己 HSCT 後に正常化する傾向が認められる事が明らかとなった。

A. 研究目的

全身性硬化症 (SSc) に対する自己造血幹細胞移植 (自己 HSCT) の有効性の機序を解明するため、SSc における自己 HSCT 後の遺伝子発現プロファイルの変化を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

対象は CD34 純化および非純化自己 HSCT を施行した SSc それぞれ 4 例、自己 HSCT 未施行 SSc 8 例、健常人 5 例で、末梢血リンパ球を CD4 ナイーブ T 細胞、CD4 メモリー T 細胞、CD8 ナイーブ T 細胞、CD8 エフェクターメモリー T 細胞、CD8 セントラルメモリー T 細胞、ナイーブ

B 細胞、メモリー B 細胞、プラズマブラストの 8 分画に分け、フローサイトメトリーを用いたソーティングにより各分画を回収した。得られた各分画より RNA を調製し、cDNA を介してビオチン化 cRNA を *in vitro* 増幅によって作成し、ビーズチップ上にハイブリダイゼーションしたのち Streptavidine-Cy3 の蛍光検出をおこなった。DNA チップは Illumina HumanHT-12 v4、スキャナーは Illumina BeadArray Reader、解析は GeneSpringGX を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得、施行にあたっては全例に対し、

説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

47,231遺伝子より健常人と自己HSCT未施行SSc患者で発現量に4倍以上差がある遺伝子に着目した。リンパ球各亜分画において200から400遺伝子が抽出された。メモリーB細胞では371遺伝子を抽出し、クラスター分類を行った(図1)。

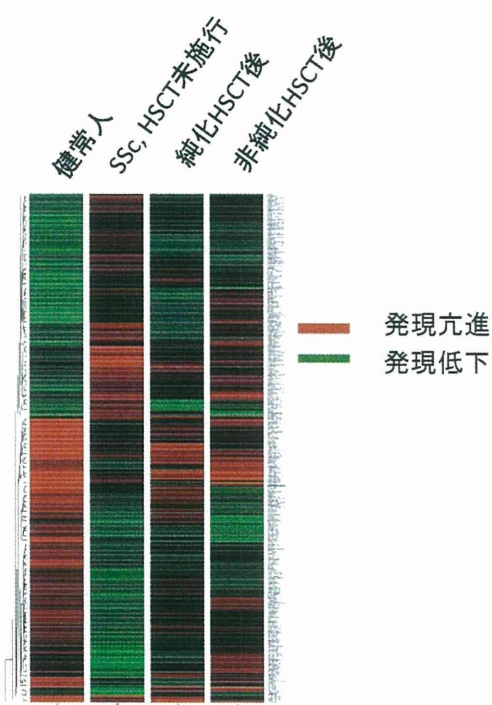


図1. SSc患者(HSCT未施行およびHSCT後)と健常人メモリーB細胞の遺伝子発現プロファイル

これらの遺伝子について、純化および非純化自己HSCT施行SSc患者では健常人と自己HSCT未施行SSc患者との中間の遺伝子発現プロファイルを呈し、更に純化自己HSCT施行SSc患者は非純化自己HSCT施行SSc患者に比し健常人により近い遺伝子発現プロファイルを呈した。詳細に見ると、患者群で上昇し移植後に低下する遺伝子、患者群で低下し移

植後に上昇する遺伝子、移植後に純化群でより正常化する遺伝子等に分類可能であった。

D. 考察

SSc患者でリンパ球亜分画毎に遺伝子発現プロファイル解析を行ったのは本研究が初めてである。本研究によりSSc患者リンパ球各亜分画において健常人とは遺伝子発現プロファイルが異なる事が明らかになった。SSc患者では自己HSCT後、特に有効性に優れる純化自己HSCT後に遺伝子発現プロファイルが正常化する傾向が認められた事は、遺伝子発現プロファイルの是正が臨床効果と関連している事を示唆し大変興味深い。今後、候補遺伝子を絞り込み、遺伝子発現量の確認および機能解析を行う必要がある。

E. 結論

SSc患者リンパ球では健常人と異なる遺伝子プロファイルを呈し、自己HSCT後に正常化する傾向が認められた。

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and interaction with smoking and alcohol consumption in lung cancer risk: a case-control study in a Japanese population. BMC Cancer 11: 459, 2011.
2. Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K, Nakanishi Y. Genetic polymorphisms involved in carcinogen metabolism and DNA repair and lung cancer risk in a Japanese population. J Thorac Oncol 7: 954-62, 2012.

3. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Asami T, Ide S, Atsumi T, Kobashi G, Tada Y, Takahashi H. Cigarette Smoking, Alcohol Consumption, and Risk of Systemic Lupus Erythematosus: A Case-control Study in a Japanese Population. J Rheumatol (in press)
4. Suematsu R, Ohta A, Matsuura E, Takahashi H, Fujii T, Horiuchi T, Minota S, Ishigatsubo Y, Ota T, Takei S, Soejima S, Inoue H, Koarada S, Tada Y, Nagasawa K. Therapeutic response of patients with adult Still's disease to biologic agents: multicenter results in Japan. Mod Rheumatol (in press)
3. その他
なし

2. 学会発表

- 1) 堀内孝彦：全身性エリテマトーデスの診療ー最近の進歩ー。第43回日本内科学会九州支部主催生涯教育講演会 2011年1月、福岡
- 2) 堀内孝彦：TNF とリウマチ性疾患ーその病態から治療までー。第41回九州リウマチ学会（日本リウマチ学会九州・沖縄支部学術集会）教育講演 2011年3月19日、宮崎
- 3) 堀内孝彦、石ヶ坪良明、井田弘明、楠原浩一、高橋裕樹、武井修治、田平知子、藤井隆夫、蓑田清次、鷲尾昌一：TNF 受容体関連周期性症候群（Tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: TRAPS）の全国実態調査 第108回日本内科学会総会 2011年4月、東京
- 4) 堀内孝彦：難治性炎症性疾患の画期的治療薬ー抗 TNF 製剤の基礎と臨床ー。第40回日本免疫学会学術集会クリニカルセミナー 2011年11月、千葉

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植の有効性に
関する研究

研究者分担者 宮本敏浩
九州大学病院 血液腫瘍内科 講師

研究要旨

難治性自己免疫疾患患者に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の移植後 5 年間の有効性を検討することを目的とした。対象は全身性硬化症(SSc)19 例、皮膚筋炎(DM)3 例、ウェゲナー肉芽腫症(WG)1 例の計 23 例である。末梢血幹細胞の動員は CY4g/m²に引き続き G-CSF を投与し、アフエレーシスによって末梢血幹細胞採取した。移植前治療としては CY200mg/kg を投与し、移植当日に 2x10⁶/kg 以上の CD34 陽性細胞を輸注した。自己 HSCT を施行した SSc19 例において皮膚硬化に対する効果では、スキンスコアが自己 HSCT36 ヶ月後には約 70%の改善を示し、その効果は 60 ヶ月後まで持続した。間質性肺炎では、%VC が自己 HSCT 後増加傾向を示し、4 年後には有意に増加した。抗 Scl-70 抗体価は、自己 HSCT 後 5 年間継続して低下した。皮膚筋炎 3 例のうち 2 例は筋症状が乏しく、進行性の間質性肺炎を有していたが、自己 HSCT 後間質性肺炎は改善した。1 例は左前腕に難治性の巨大皮膚潰瘍を伴っていたが、自己 HSCT 後に治癒した。このうち自己 HSCT 後 5 年以上経過した皮膚筋炎 2 症例は再発を認めていない。難治性自己免疫疾患患者に対する自己 HSCT は有効で、その効果は少なくとも 5 年間持続する事が明らかになった。

A. 研究目的

難治性自己免疫疾患患者に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の移植後 5 年間の有効性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

対象は全身性硬化症(SSc)19 例、皮膚筋炎(DM)3 例、ウェゲナー肉芽腫症(WG)1 例の計 23 例である。末梢血幹細胞の動員は CY4g/m²に引き続き G-CSF を投与し、アフエレーシスによって末梢血幹細胞採取した。SSc11 例、DM2 例、WG 症例では末梢血幹細胞採取後、CliniMACS を用いて CD34 陽性細胞に純化し

た(純化 HSCT)。移植前治療としては CY200mg/kg を投与し、移植当日に 2x10⁶/kg 以上の CD34 陽性細胞を輸注した。SSc8 例、DM1 例では CD34 陽性細胞への純化を行わなかった(非純化 HSCT)。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ている。本療法の施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

自己 HSCT を施行した SSc19 例において皮膚硬化に対する効果では、スキンスコアが自己

HSCT36ヶ月後には約70%の改善を示し、その効果は60ヶ月後まで持続した。間質性肺炎では、%VCが自己HSCT後増加傾向を示し、4年後には有意に増加した。

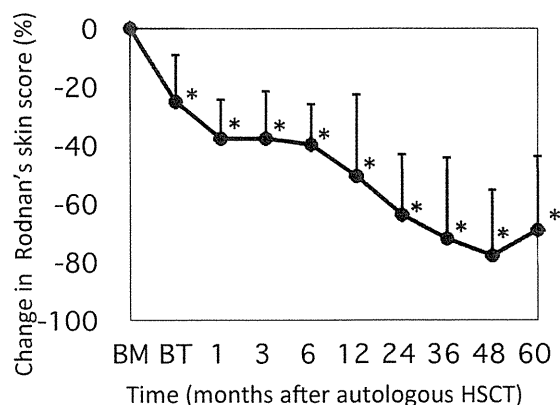


図1.スキンスコアの推移
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

間質性肺炎のマーカーであるKL-6は移植1年後から5年後まで有意な低下が持続した。抗Scl-70抗体価は移植1ヶ月後より有意に低下し5年間低下傾向は持続した。5年生存率は89%、また5年無増悪生存率は65%であった。純化HSCTでは非純化HSCTに比し、合併症としてウイルス感染を高頻度に認めたが、皮膚硬化に対する有効性は有意に優れていた。

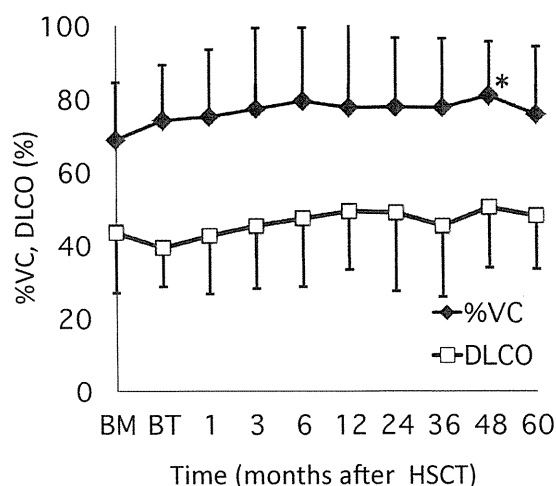


図1.肺機能の推移
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

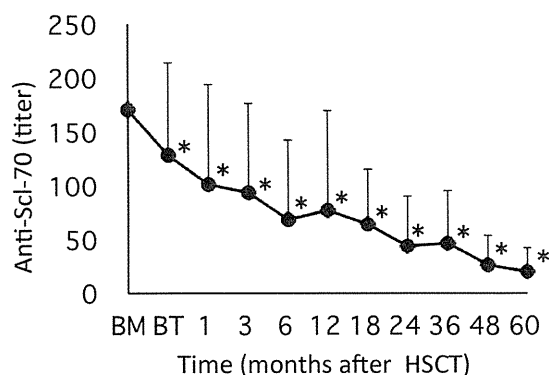


図3.抗Scl-70抗体価の推移
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

自己HSCT後5年以上経過した皮膚筋炎2症例も再発を認めていない。新規SSc患者2例について純化自己HSCTを施行した。

D. 考察

海外の臨床第II相試験でSScに対する自己HSCTが従来のCY静注療法に比し、皮膚硬化や間質性肺炎に対する有効性が有意に優れている事が報告された(Burt et al. Lancet 2011)。海外では現在臨床第III相試験が進行中である。本研究では、SScに対する自己HSCTでは皮膚硬化や間質性肺炎に対して、有意な改善効果が認められ、その効果は5年間持続した。海外における175例の集計では5年生存率は76%、また5年無増悪生存率は55%と報告されており、当施設の成績(それぞれ89%、65%)は同等以上であると考えられる。

E. 結論

難治性自己免疫疾患患者に対する自己HSCTは有効で、その効果は少なくとも5年間持続する事が明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y,

- Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niuro H, Iwasaki H, Takenaka K, Akashi K. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 20: 246-59, 2011.
2. Ohga S, Ishimura M, Yoshimoto G, Miyamoto T, Takada H, Tanaka T, Ohshima K, Ogawa Y, Imadome K, Abe Y, Akashi K, Hara T. Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood. *J Clin Virol* 51: 31-7, 2011.
 3. Kamimura T, Miyamoto T, Nagafuji K, Numata A, Henzan H, Takase K, Ito Y, Ohno Y, Fujisaki T, Eto T, Takamatsu Y, Teshima T, Gondo H, Akashi K, Taniguchi S, Harada M. Role of autotransplantation in the treatment of acute promyelocytic leukemia patients in remission: Fukuoka BMT Group observations and a literature review. *Bone Marrow Transplant* 46: 820-6, 2011.
 4. Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Shiratsuchi M, Abe Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 18: 458-65, 2012.
 5. Mori Y, Teshima T, Kamezaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Nagafuji K, Eto T, Akashi K. Validation of pretransplantation assessment of mortality risk score in the outcome of hematopoietic SCT in non-Caucasians. *Bone Marrow Transplant* (in press)
2. 学会発表
 1. Miyamoto T: Alterations of Phenotype and Gene Expression during Progression of Myelodysplastic Syndrome into Acute Myelogenous Leukemia. 11th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. 2011.5.18-21, 2011 Edinburgh, UK
 2. Miyamoto T: Human herpes virus 6-associated encephalitis following allogeneic HSCT. 2011 Beijing International Stem Cell Transplantation Symposium. 2011.9.16-17, Beijing, China
 3. Miyamoto T, Kikushige Y, Shima T, Akashi K. TIM-3 Is a Promising Target to Eradicate Acute Myeloid Leukemia Stem Cells Sparing Normal Hematopoietic Stem Cells. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting. 2011.12.12, San Diego, CA, USA
- G.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)
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(免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
分担研究報告書

全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後の T 細胞受容体レパトア多様性の変化に
関する研究

研究者分担者 新納宏昭
九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科 助教

研究要旨

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT) は高い臨床効果を認めているが、その有効性の機序については不明の部分も多い。本研究では自己 HSCT 前後で T 細胞受容体 (TCR) レパトアの多様性の変化を解析することにより、自己 HSCT 後の免疫学的再構築による有効性の機序を明らかにする事を目的とした。当施設において自己 HSCT を施行した SSc 患者、および健常人を対象とした。SSc 患者末梢血単核球および健常人末梢血単核球より RNA を調製し、cDNA 合成後に各 TCR V β 特異的プライマーを用いて PCR 増幅を行い、DNA シークエンサーを用いて TCR V β レパトア分布および相補性決定領域 3 (CDR3) サイズ分布解析を行った。SSc 患者において治療前は TCR V β レパトアに偏りが見られ、CDR3 サイズでは oligoclonal または monoclonal な分布を示す割合が健常人より有意に高かった。経時的に評価したところ自己 HSCT 後早期より、CDR3 サイズの oligoclonal または monoclonal な分布を示す割合は減少した。以上、SSc にみられる TCR レパトアの偏りは自己 HSCT 後早期から改善しており、高い臨床効果をもたらす一因と考えられた。

A. 研究目的

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT) は高い臨床効果を認めているが、その有効性の機序については不明の部分も多い。本研究では自己 HSCT 前後で T 細胞受容体 (TCR) レパトアの多様性の変化を解析することにより、自己 HSCT 後の免疫学的再構築による有効性の機序を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

当施設において自己 HSCT を施行した SSc 患者 6 名、および健常人 6 名を対象とした。SSc 患者(HSCT 前と HSCT 約 4 ヶ月後)および健常

人末梢血単核球より RNA を調製し、cDNA 合成後に各 TCR V β 特異的プライマー (V β 1-9, 11-18, 20-24 の 22 種類) を用いて PCR 増幅を行い、DNA シークエンサーを用いて TCR V β レパトア分布および相補性決定領域 3 (CDR3) サイズ分布解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得、施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

通常 CDR3 のサイズ分布は 6-10 個のピークを持ちガウス分布に従う(図 1)。SSc 患者において治療前は TCR V β レパトアに偏りが見られ、

一部のVβのCDR3サイズはoligoclonalまたはmonoclonalな分布(skewed pattern)を示した(図1)。

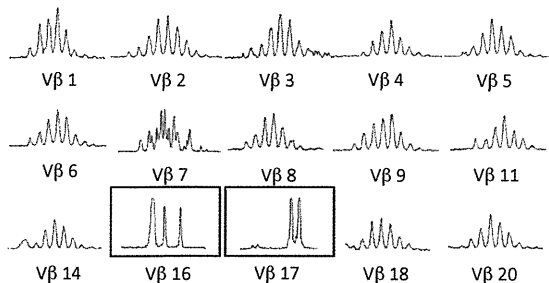


図1. CDR3サイズ分布解析の例: 症例B(自己HSCT前) 正常では6-10個のピークをもちガウス分布に従う polyclonalなCDR3分布を示す CDR3に偏りがあると、skewed pattern (mono-oligoclonal) を示す □

CDR3のサイズ分布がskewed patternを示した20個のTCR Vβのうち11個は自己HSCT後にpolyclonal patternとなり、6個は検出されなくなった。一方、3個のVβではskewed patternが持続した(図2)。

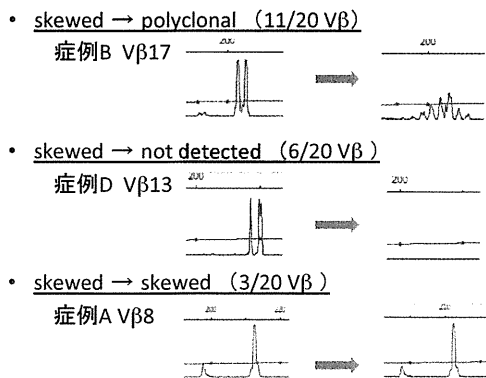


図2. CDR3サイズ分布の偏りの多くはHSCT後短期間で改善(4ヶ月後)

全体でみると、自己HSCT前のSSc患者におけるTCR VβのCDR3サイズがskewed patternを示した割合は18.3%で、健常人の5.9%と比較し有意に高頻度であり、自己HSCT後は5.3%と有意に低下した。

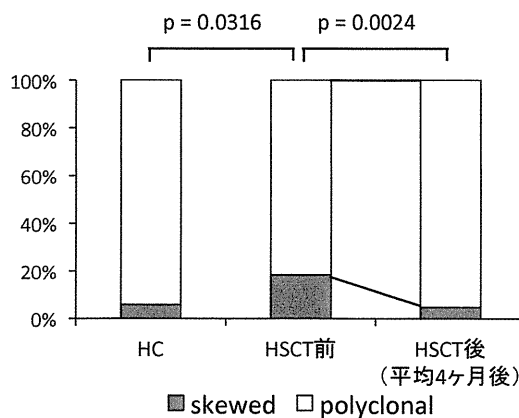


図3. 健常人およびSSc患者におけるT細胞受容体CDR3サイズ分布とHSCT後の変化 HC:健常人

D. 考察

自己HSCT後にTCRレパトアの多様性の回復が認められ、臨床効果との関連が示唆された。移植前の大量免疫抑制療法によりTCR Vβレパトアに偏りを持つT細胞集団が除去され、移植したCD34陽性細胞より、TCR Vβレパトアに偏りを有さないT細胞が新しく分化するためと考えられる。一方、一部にはVβの異常が持続する症例も認められ、移植前の大量免疫抑制療法後も生存する異常クローンの存在が疑われた。

E. 結論

SScにみられるTCRレパトアの偏りは自己HSCT後早期から改善しており、高い臨床効果をもたらす一因と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Shimoda S, Harada K, Niuro H, Shirabe K, Taketomi A, Maehara Y, Tsuneyama K, Nakanuma Y, Leung P, Ansari AA, Gershwin ME, Akashi K. Interaction between Toll-like receptors and natural killer cells in the destruction of bile ducts in

primary biliary cirrhosis. Hepatology 53:
1270-81, 2011.

2. Nihiro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, Akashi K. CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. Blood 119: 2263-73, 2012.

2. 学会発表

1. 新納宏昭、ジャバルザデ タブリジ シアマツク、大田俊一郎、野田久美子、上田尚靖、田中淳、藤健太郎、井上靖、有信洋二郎、塚本浩、堀内孝彦、赤司浩一: 健常人ならびに SLE 患者 B 細胞における IRAK 発現とその役割 第 55 回日本リウマチ学会総会 2011.7.19 神戸
2. Ota S, Nihiro H, Tsuzuki H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Noda K, Inoue Y, Arinobu Y, Akashi K: Elucidation of the signaling pathways to induce human regulatory B cells (Bregs). 2011 Keystone Symposia April 15, 2011, Whistler, BC, Canada

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

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（免疫・アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
分担研究報告書

全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植後の免疫学的再構築に関する研究

研究者分担者 塚本 浩
九州大学病院 免疫・膠原病・感染症内科 助教

研究要旨

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の効果が長期間持続する機序を解明するため、SSc における自己 HSCT 後の免疫学的再構築の特徴を明らかにする事を目的とした。対象は CD34 純化自己 HSCT を施行した SSc11 例で、治療開始前、自己末梢血幹細胞採取後、自己 HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 ヶ月後にフローサイトメトリーを用いて、リンパ球亜分画の実数を算出し、また Th1/Th2 バランスを測定した。T 細胞は自己 HSCT1 ヶ月後より回復したが、その大部分は CD8+T 細胞で、CD4+T 細胞の回復は自己 HSCT 後 1~6 ヶ月は著しく抑制されていた。CD4+T 細胞のうちナイーブ CD4+/CD45RA+T 細胞の回復は、メモリー CD4+/CD45RO+T 細胞の回復に比較し著しく遅延した。また制御性 T 細胞を含む CD4+/CD25+T 細胞の回復は CD4+/CD25-T 細胞の回復に比較し著しく遅延した。B 細胞は自己 HSCT12 ヶ月後に治療前値まで回復した。B 細胞亜分画では治療前よりメモリー CD27+B 細胞に比しナイーブ CD27-B 細胞が多かったが、自己 HSCT60 ヶ月後も CD27+メモリー B 細胞の増加は認められなかった。自己 HSCT 後 60 ヶ月間 Th1/Th2 バランスは Th1 優位が持続し、長期間にわたる有効性との関連が示唆された。

A. 研究目的

全身性硬化症(SSc)に対する自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の効果が長期間持続する事が明らかになったが、その機序については不明の点も多い。本研究では有効性の機序を解明するため、SSc における自己 HSCT 後の免疫学的再構築を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

対象はCD34純化自己HSCTを施行したSSc11例で、内訳は男性3例女性8例、平均年齢は52.3歳である。治療開始前、自己末梢血幹細胞採取後、自己HSCT1, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60ヶ

月後にフローサイトメトリーを用いて CD3/CD19, CD4/CD8, CD4/CD45RA, CD4/CD45RO, CD4/CD25, CD19/CS27について、リンパ球亜分画の実数を算出し、また Th1/Th2バランス(CD4+T細胞)を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得、施行にあたっては全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

T細胞は自己HSCT1ヶ月後より回復したが、その大部分はCD8+T細胞で、CD4+T細胞の回復は自己HSCT後1~36ヶ月は著しく抑制さ