

201229008A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患等克服研究事業  
(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 24 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 25 (2013) 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	8
	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	11
	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	15
	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	18
	塚本 浩
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	24



## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業  
(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、7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7年間持続した。SScに対する自己HSCT後の5、7年生存率はそれぞれ89%、78%、また5、7年無増悪生存率はそれぞれ65%、57%であり、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行った自己HSCT後の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。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。この遺伝子発現プロファイル解析においてSSc患者で発現亢進していた遺伝子の中から新しいバイオマーカーの候補としてDNAM-1を同定した。以上、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ル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

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。昨年度までの研究では、既移植症例について移植後 5 年間の安

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

全性と有効性を確認すると共に、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明らかにし、これら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。昨年度までの成果を踏まえ、本年度の研究では、1) 既移植症例について移植後 7 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 T 細胞受容体レパトアの多様性の変化につき長期間追跡することにより本治療の有効性とリンパ球の質的变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と共に、SSc にて特異的に発現が亢進または低下している遺伝子を抽出し(本年度は DNAM-1)機能解析を行う、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 SSc 19 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)  $4\text{g}/\text{m}^2$  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 CY  $200\text{mg}/\text{kg}$  を投与し、移植当日に  $2 \times 10^6/\text{kg}$  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) 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 V $\beta$  特異的プライマー (V $\beta$  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 $\beta$  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。

3) 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 Human HT-12 v4、解析は GeneSpring GX を用いた。

4) DNAM-1 の発現と病態との関連について、  
① SSc 患者と健常者について末梢血リンパ球 (CD4 $+$ 、CD8 $+$ 、CD19 $+$  細胞) 上の DNAM-1 の発現をフローサイトメトリー (FCM) にて測定した。  
② 健常者末梢血単核球を PMA + Ionomycin で刺激後、DNAM-1 陽性および DNAM-1 陰性細胞における各種サイトカインの産生および CD107a (脱顆粒マーカー) の発現を FCM にて比較した。  
③ 健常者末梢血から分離した CD8 $+$ T 細胞をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と、抗 DNAM-1 阻害抗体存在下または非存在下にて共培養し細胞傷害活性を測定した。

(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 SSc 19 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 HSCT48 ヶ月後には約 70%の改善を示し、その効果は 84 ヶ月後まで持続した。間質性肺炎では、%VC が自己 HSCT 後緩やかな増加傾向を示し、48、60 ヶ月後には有意に増加した。

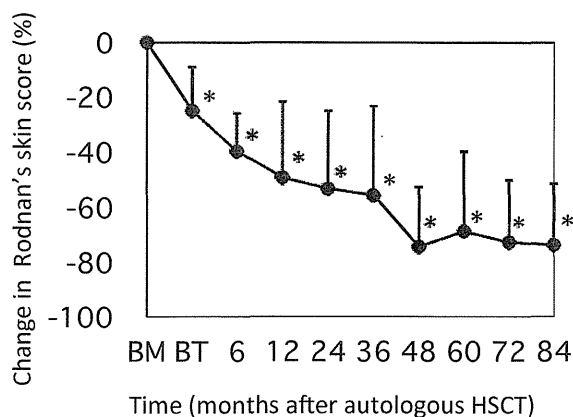


図1.スキンスコアの推移  
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前  
\*P<0.05 vs BM(ベースライン)

間質性肺炎のマーカーである KL-6 は移植 12 ヶ月後から 84 ヶ月後まで有意な低下が持続した。抗 Scl-70 抗体価は移植早期より有意に低下し 84 ヶ月間低下傾向は持続した。5、7 年生存率はそれぞれ 89%、78%、また 5、7 年無増悪生存率はそれぞれ 65%、57%であった。(図 2)。

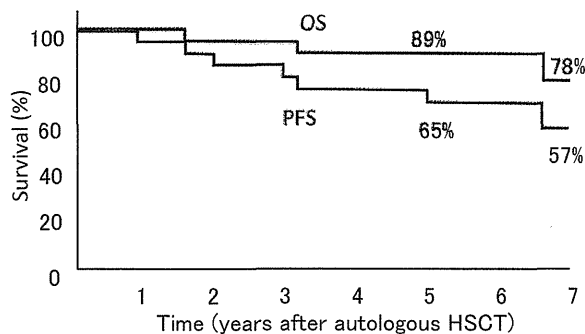


図2. 生存率 PFS: 無増悪生存; OS: 全生存

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。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。

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 3)。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 3)。

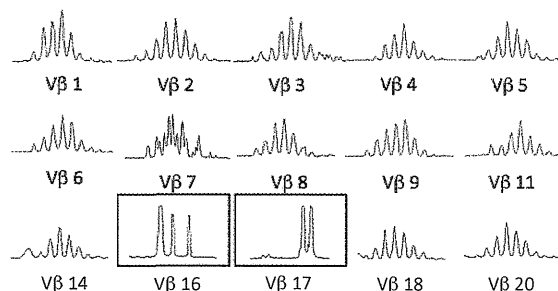


図3. CDR3サイズ分布解析の例: 症例B(自己HSCT前)  
正常では6-10個のピークをもちガウス分布に従う  
polyclonalなCDR3分布を示す  
CDR3に偏りがあると、skewed pattern(mono-oligoclonal)を示す □

CDR3 のサイズ分布が skewed pattern を示した 20 個の TCR Vβのうち 12 個は自己 HSCT 後に polyclonal pattern となり、4 個は検出されなくなった。これらの skewed pattern が消失した状態は長期間持続した。一方、4 個の Vβでは skewed pattern が長期間持続した(図 4)。

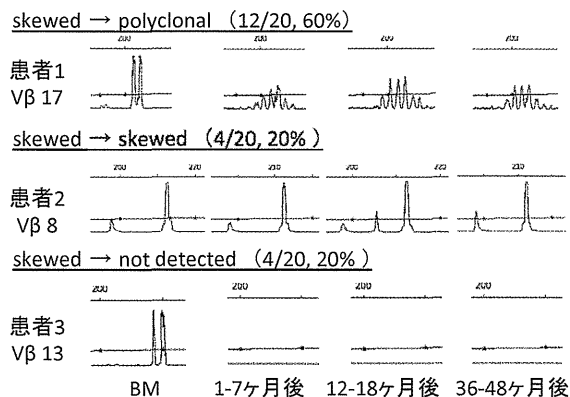


図4. skewed patternの多く(80%)は消失し、長期間維持される。 BM:末梢血幹細胞採取前

健常人6名および自己HSCT後経時的に評価したSSc患者6例を対象にすると、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18.4%で、健常人の4.2%と比較し有意に高頻度であった。skewed patternを示した割合は自己HSCT1-7ヶ月後は5.3%と有意に低下し、その後も長期間維持された(図5)。

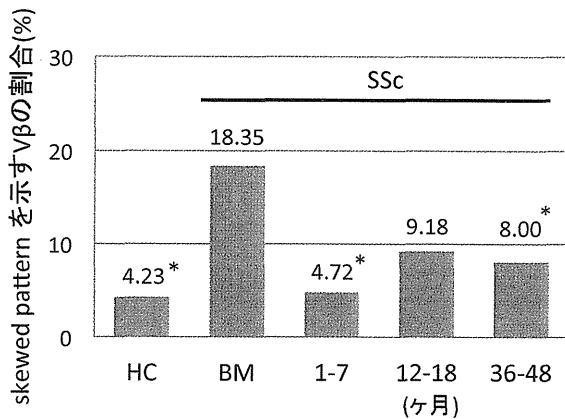


図5. 健常人およびSSc患者におけるT細胞受容体CDR3サイズ分布とHSCT後の変化 HC:健常人、BM:末梢血幹細胞動員前 \* p<0.05(vs BM)

遺伝子発現プロファイル解析では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。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、CD8エフェクターメモリーT細胞では400遺伝子を抽出し、クラスター分類を行った(図6)。

全般的には自己HSCT後健常人のパターンに近づく傾向が認められた。詳細に見ると、患者群で上昇し自己HSCT後に低下する遺伝子、患者群で低下し自己HSCT後に上昇する遺伝子、自己HSCT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。

患者群で発現亢進していた遺伝子はCD4メモリーT細胞ではPRKD4、SUMO4、SERPIN2等、CD8エフェクターメモリーT細胞では

STK33、CD300a、DNAM-1(CD226)等、メモリーB細胞ではSDC3、FOXP1、AFF3等であった。

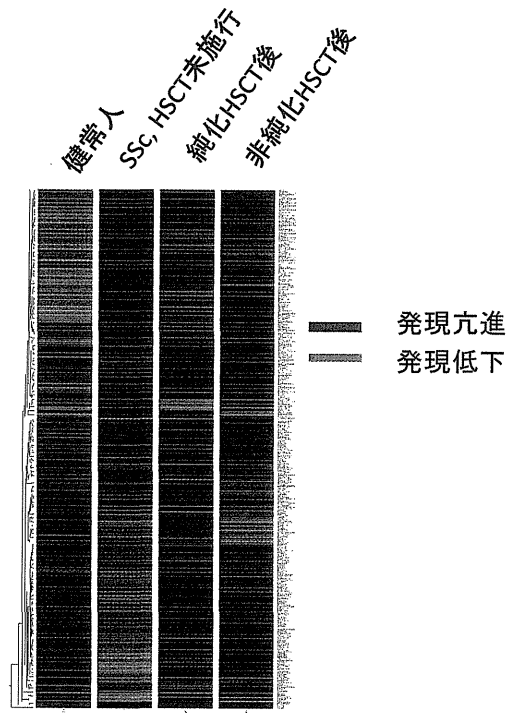


図6. SSc患者(HSCT未施行およびHSCT後)と健常人メモリーB細胞の遺伝子発現プロファイル

この中でDNAM-1(DNAM-1, CD226)に着目し、SSc患者末梢血リンパ球のDNAM-1の発現と病態との関連を検討したところ、SSc患者のCD8+細胞ではDNAM-1陽性率が有意に高かった(図7. 82.6% vs 71.3%, p=0.0316)。

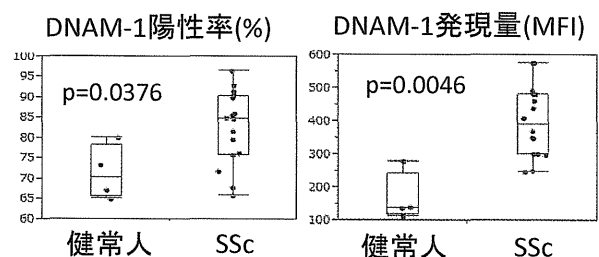


図7. 健常人及びSSc患者CD8+T細胞におけるDNAM-1陽性率および発現量の比較

CD8+細胞上のDNAM-1発現量 (MFI) は抗 Scl-70抗体陽性および間質性肺炎合併SScで高く、%VCと負の相関を認めた。DNAM-1+CD8+細胞でIL-13産生細胞が有意に多かった (p=0.0019)。CD8+T細胞とHUVECの共培養に抗DNAM-1阻害抗体を加えるとHUVECの細胞死が部分的に抑制された。

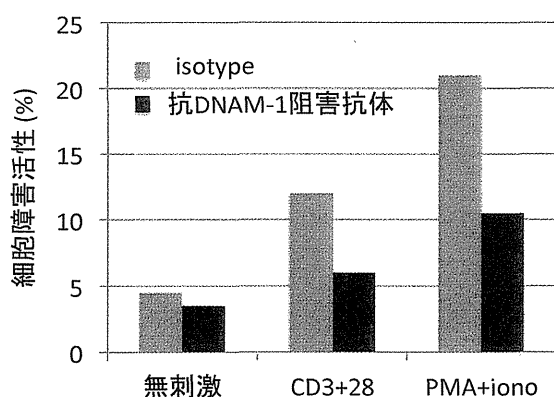


図8. 抗DNAM-1阻害抗体により、ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する細胞障害活性は部分的に抑制される

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。

#### 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7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。

自己HSCT後のTCRレパトアの多様性の回復が長期間持続する事が明らかになり、臨床効果との関連が示唆された。TCRレパトアの多様性の回復は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。

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相関している事を示唆し大変興味深い。また本解析によりSScで高発現する遺伝子の抽出が可能となった。

SSc患者で発現亢進していた遺伝子のうちDNAM-1に着目した。DNAM-1は免疫グロブリンスーパーファミリーに属するI型膜糖蛋白でT細胞、単球、NK細胞等に発現し、接着分子としての機能を有するが、近年DNAM-1はSScなど多くの自己免疫疾患における疾患感受性遺伝子として注目されている。我々はSSc患者CD8+細胞ではDNAM-1発現が亢進していることを初めて明らかにした。DNAM-1陽性CD8+T細胞は血管内皮細胞障害や向線維化サイトカインIL-13の産生を介してSScの病態に関与していると考えられた。

#### 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



の新規バイオマーカーの候補として DNAM-1 を同定した。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ル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. Kuriyama T, Takenaka K, Kohno K, Yamauchi T, Daitoku S, Yoshimoto G, Kikushige Y, Kishimoto J, Abe Y, Harada N, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Engulfment of hematopoietic stem cells caused by down-regulation of CD47 is critical in the pathogenesis of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood* 120: 4058-4067, 2012
2. Kumamaru H, Ohkawa Y, Saiwai H, Yamada H, Kubota K, Kobayakawa K, Akashi K, Okano H, Iwamoto Y, Okada S. Direct isolation and RNA-seq reveal environment-dependent properties of engrafted neural stem/progenitor cells. *Nat Commun* 3:1140, 2012
3. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, Shimoda S, Iwasaki H, Shimono N, Ayabe T, Akashi K, Teshima T. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of  $\alpha$ -defensins. *Blood* 120: 223-231, 2012
4. Niiro 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
5. Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niiro H, Iino T, Endo S, Kawano Y, Komohara Y, Takeya M, Hata H, Okada S, Watanabe T, Akashi K, Mitsuya H, Okuno Y. PU.1 is a potent tumor suppressor in classical Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 121: 962-970, 2012
6. Maehara K, Odawara J, Harada A, Yoshimi T, Nagao K, Obuse C, Akashi K, Tachibana T, Sakata T, Ohkawa Y. A co-localization model of paired ChIP-seq data using a large ENCODE data set enables comparison of multiple samples. *Nucleic Acids Res* 41: 54-62, 2012
7. Harris AC, Ferrara JL, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Landfried K, Akashi K, Lugt MV, Couriel DR, Reddy P, Paczesny S. Plasma biomarkers of lower gastrointestinal and liver acute GVHD. *Blood* 119: 2960-2963, 2012
8. Mori Y, Miyamoto T, Kamezaki K, Kato K, Kikushige Y, Takashima S, Urata S, Shimoda S, Shimono N, Takenaka K, Iwasaki H, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K. Low incidence of adenovirus hemorrhagic cystitis following autologous hematopoietic stem cell transplantation in the rituximab era. *Am J Hematol* 87: 828-830, 2012
9. Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y.

- Chd2 interacts with H3.3 to determine myogenic cell fate. *EMBO J* 31: 2994-3007, 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: 35763, 2012
11. Takenaka K, Nagafuji K, Takase K, Kamimura T, Mori Y, Ito Y, Nishi Y, Henzan H, Kato K, Harada N, Eto T, Miyamoto T, Teshima T, Akashi K. Initial low-dose valganciclovir as a preemptive therapy is effective for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Int J Hematol* 96: 94-100, 2012
12. Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood* 121: 1316-1325, 2013
13. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121: 840-848, 2013
14. Fukata M, Ishikawa F, Najima Y, Yamauchi T, Saito Y, Takenaka K, Miyawaki K, Shimazu H, Shimoda K, Kanemaru T, Nakamura K, Odashiro K, Nagafuji K, Harada M, Akashi K. Contribution of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells to the generation of donor-marker(+) cardiomyocytes in vivo. *PLoS One* 8: e62506, 2013
2. 学会発表
1. 赤司浩一：「造血器悪性幹細胞の成立機構」第101回日本病理学会, 2012年4月, 東京
  2. 赤司浩一：「慢性リンパ性白血病幹細胞の特性と治療応用」第10回日本臨床腫瘍学会, 2012年7月, 大阪
  3. 赤司浩一：「悪性造血器腫瘍における癌幹細胞の病理」第71回日本癌学会, 2012年9月, 札幌
- 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 難治性疾患等克服研究事業  
(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SSc8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た。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、自己HSCT未施行SSc、健常人それぞれ3-8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、CD4メモリーT細胞では400遺伝子、CD8エフェクターメモリーT細胞では400遺伝子を抽出し、クラスター分類を行った(図1、2)。

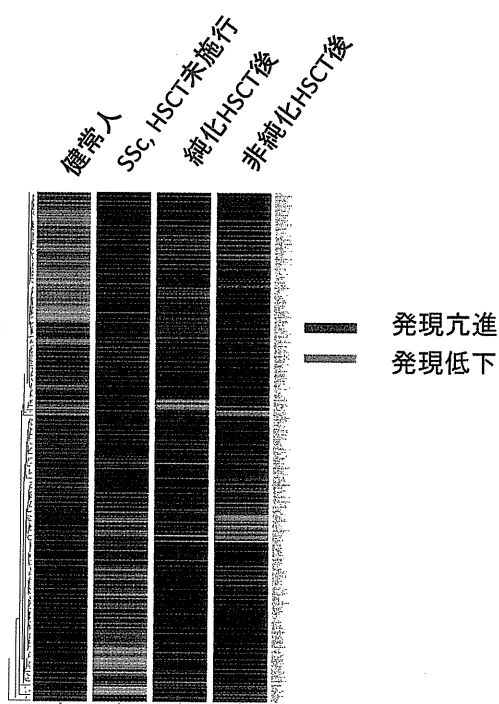


図1. SSc患者(HSCT未施行およびHSCT後)と健常人メモリーB細胞の遺伝子発現プロフィール

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ィールが異なっていた。全般的には自己HSCT後健常人のパターンに近づく傾向が認められた。詳細に見ると、患者群で上昇し自己HSCT後に低下する遺伝子、患者群で低下し自己HSCT後に上昇する遺伝

子、自己HSCT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。

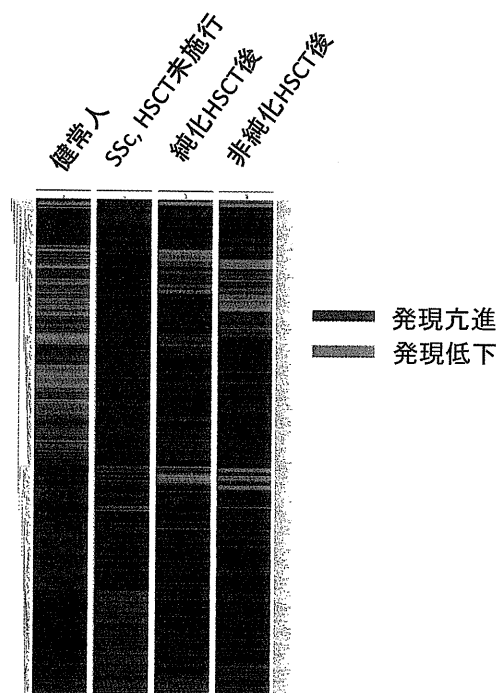


図2. SSc患者と健常人CD8+エフェクターメモリーT細胞の遺伝子発現プロフィール

患者群で発現亢進していた遺伝子はメモリーB細胞ではSDC3、FOXP1、AFF3等、CD4メモリーT細胞ではPRKD4、SUMO4、SERPIN2等、CD8エフェクターメモリーT細胞ではSTK33、CD300a、DNAM-1(CD226)等、であった。

### D. 考察

SSc患者でリンパ球各亜分画毎に遺伝子発現プロフィー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ィールが異なる事が明らかになった。SSc患者では自己HSCT後遺伝子発現プロフィールが正常化する傾向が認められた事は、遺伝子発現プロフィールの是正が臨床効果と相関している事を示唆し大変興味深い。現在、

DNAM-1(CD226)等を候補遺伝子として、遺伝子発現量の確認および機能解析を行っている。

#### 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. Genetic polymorphisms involved in carcinogen metabolism and DNA repair and lung cancer risk in a Japanese population. *J Thorac Oncol* 7: 954-62, 2012.
2. 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* 39: 1363-1370, 2012
3. 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* 22: 712-719, 2012.
4. Furukawa M, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Uchino A, Nakagawa M, Oryoji K, Shimoda T, Harada M, Akashi K. Prevalence and risk factors of vertebral fracture in female Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* (in press)

5. Oryoji K, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Niuro H, Shimoda T, Akashi K, Yanase T. Reduced carotid intima-media thickness in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclosporine A. *Mod Rheumatol*(in press)

##### 2. 学会発表

1. 堀内孝彦：TNF 阻害薬の作用機序—その共通点と相違点、そして臨床効果との関連—第 22 回日本脊椎関節炎学会総会 2012 年 9 月 29 日、大阪
2. 堀内孝彦：全身性エリテマトーデス—病態解明と治療の最近の進歩—第 27 回日本臨床リウマチ学会総会総会、2012 年 11 月 24 日、神戸

#### 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 難治性疾患等克服研究事業  
(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)の長期安全性と有効性を評価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/m<sup>2</sup>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 2x10<sup>6</sup>/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 HSCT48ヶ月後には約 70%の改善を示し、その効果は 84ヶ月後まで持続した。間質性肺炎では、%VC が自己 HSCT48、60ヶ月後には有意に増加した。抗 Scl-70 抗体価は、自己 HSCT 後 84ヶ月間継続して低下した。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。5、7年生存率はそれぞれ 89%、78%、また 5、7年無増悪生存率はそれぞれ 65%、57%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。難治性自己免疫疾患患者に対する自己 HSCT は安全かつ有効で、その効果は長期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)の長期安全性と有効性を評価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/m<sup>2</sup>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 2x10<sup>6</sup>/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

HSCT48ヶ月後には約70%の改善を示し、その効果は84ヶ月後まで持続した。間質性肺炎では、%VCが自己HSCT後緩やかな増加傾向を示し、48、60ヶ月後には有意に増加した。

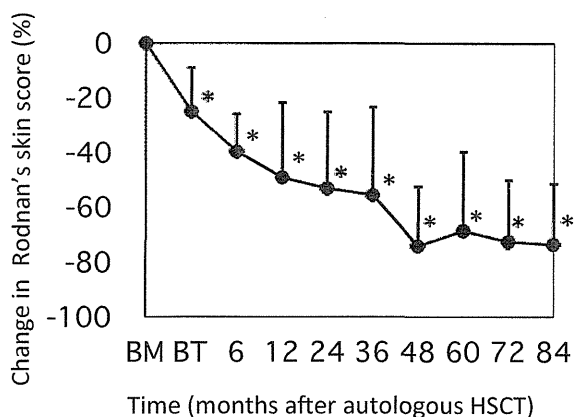


図1. スキンスコアの推移  
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前  
\*P<0.05 vs BM(ベースライン)

間質性肺炎のマーカーであるKL-6は移植12ヶ月後から84ヶ月後まで有意な低下が持続した。抗Scl-70抗体価は移植早期より有意に低下し84ヶ月間低下傾向は持続した。

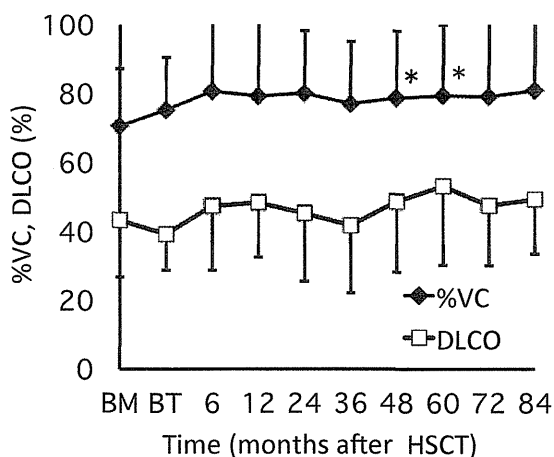


図2. 肺機能の推移  
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前  
\*P<0.05 vs BM(ベースライン)

5、7年生存率はそれぞれ89%、78%、また5、7年無増悪生存率はそれぞれ65%、57%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。

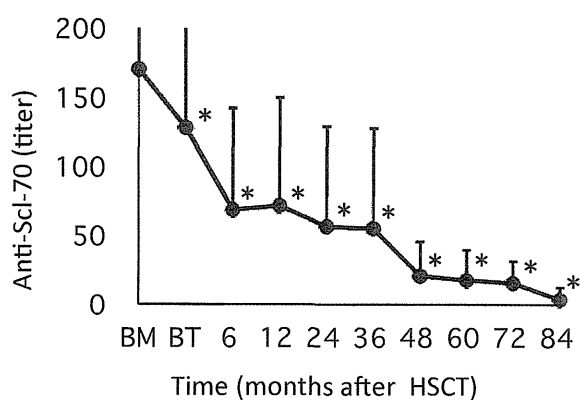


図3. 抗Scl-70抗体価の推移  
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前  
\*P<0.05 vs BM(ベースライン)

自己HSCT後5年以上経過した皮膚筋炎2症例は再発を認めていない。

学内倫理委員会にて承認された臨床第II相試験の新プロトコールに基づき、本研究期間内に新規SSc患者2例に対して純化自己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7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。CD34陽性細胞の純化に関し、感染症のコントロールが可能である限り、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。

#### E. 結論

難治性自己免疫疾患患者に対する自己 HSCT



は安全かつ有効で、その効果は長期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. 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. Chong Y, Shimoda S, Yakushiji H, Ito Y, Miyamoto T, Shimono N, Kamimura T, Akashi K. Fatal candidemia caused by azole-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematological malignancies. *J Infect Chemother* 18: 741-746, 2012
  3. Kamimura T, Miyamoto T, Takashima S, Yokota N, Chong Y, Ito Y, Akashi K. Injection site reaction after subcutaneous administration of bortezomib in Japanese patients with multiple myeloma. *Int J Hematol* 96: 525-527, 2012
  4. 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* 47: 1075-1081, 2012
  5. Kato K, Miyamoto T, Numata A, Nakaike T, Oka H, Yurino A, Kuriyama T, Mori Y, Yamasaki S, Muta T, Takenaka K, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Diffuse panbronchiolitis after humanized anti-CCR4 monoclonal antibody therapy for relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Hematol* 97: 430-432, 2013
  6. Uchida M, Ikesue H, Miyamoto T, Kato K, Suetsugu K, Ichinose K, Hiraiwa H, Sakurai A, Takenaka K, Muta T, Iwasaki H, Teshima T, Shiratsuchi M, Egashira N, Akashi K, Oishi R. Effectiveness and safety of antiemetic aprepitant in Japanese patients receiving high-dose chemotherapy prior to autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Pharm Bull* 36: 819-824, 2013
  7. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Mori Y, Kamezaki K, Takase K, Henzan H, Numata A, Ito Y, Takenaka K, Iwasaki H, Kamimura T, Eto T, Nagafuji K, Teshima T, Kato K, Akashi K. Quantitation of hematogones at the time of engraftment is a useful prognostic indicator in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 121: 840-848, 2013
- ##### 2. 学会発表
1. Miyamoto T: Mobilization of allogeneic and autologous peripheral blood stem cells. Asian Workshop for Hematopoietic Stem Cell Transplantation 2012.4.20-22, Kumamoto, Japan
  2. 宮本敏浩.当施設における同種造血幹細胞移植後の出血性膀胱炎. ワークショップ1.造血幹細胞移植後のウイルス感染症.第34回日本造血細胞移植学会 (2012.2.24 大阪)
  3. 宮本敏浩.ボルテゾミブ併用メルファラン大量前処置による自己末梢血幹細胞移植の検討 第37回日本骨髄腫学会学術集会 (2012.7.7-8 京都)

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 難治性疾患等克服研究事業  
(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 $\beta$  特異的プライマーを用いて PCR 増幅を行い、TCR V $\beta$  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 $\beta$  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有意に減少し、長期間にわたり維持された。以上、SSc に対する自己 HSCT により TCR レパトアの多様性の回復が早期より認められると共に、長期間持続しており、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である。本年度は昨年度より、症例数を増加、観察期間を延長にて検討を行った。

B. 研究方法

当施設において自己 HSCT を施行した SSc 患者 12 名、および健常人 6 名を対象とした。SSc 患者 (HSCT 前と HSCT 後 1-7 ヶ月、12-18 ヶ月、36-48 ヶ月) 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 $\beta$  特異的プライマー (V $\beta$  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 V $\beta$  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。TCR V $\beta$  8,17 については、HSCT 非施行 SSc 患者 8 名に対しても同様のプライマーおよび方法を用いて解析を行った。

(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)。HSCT施行SSc患者においては、治療前8例(66.7%)にTCR Vβ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(skewed pattern)を示す割合が健常人より高かった。(図1)。

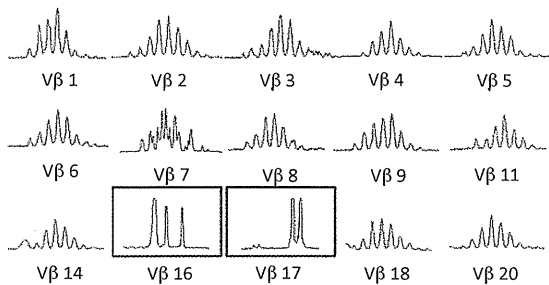
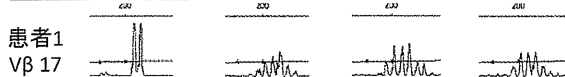


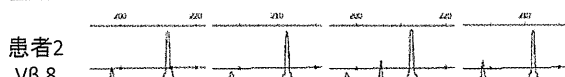
図1. CDR3サイズ分布解析の例: 症例B(自己HSCT前) 正常では6-10個のピークをもちガウス分布に従う polyclonalなCDR3分布を示す CDR3に偏りがあると、skewed pattern (mono-oligoclonal) を示す □

共通の TCR Vβ (Vβ 17 5 例、Vβ 8 4 例) で異常を認めたが、HSCT 非施行 SSc 8 例 (限局型 6 例、びまん型 2 例) では偏りや異常分布は見られなかった。

skewed → polyclonal (12/20, 60%)



skewed → skewed (4/20, 20%)



skewed → not detected (4/20, 20%)

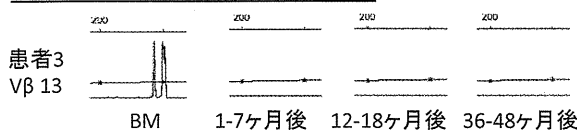


図2. skewed patternの多く(80%)は消失し、長期間維持される。BM:末梢血幹細胞採取前

CDR3のサイズ分布がskewed patternを示した

20個のTCR Vβのうち12個は自己HSCT後に polyclonal pattern となり、4個は検出されなくなった。これらの skewed pattern が消失した状態は長期間持続した。一方、4個のVβでは skewed pattern が長期間持続した(図2)。

健常人6名および自己HSCT後経時的に評価したSSc患者6例を対象にすると、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18.4%で、健常人の4.2%と比較し有意に高頻度であった。skewed patternを示した割合は自己HSCT1-7ヶ月後は5.3%と有意に低下し、その後も長期間維持された(図3)。

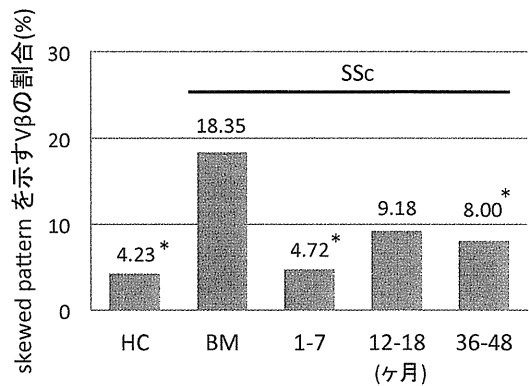


図3. 健常人およびSSc患者におけるT細胞受容体 CDR3サイズ分布とHSCT後の変化 HC:健常人、BM:末梢血幹細胞動員前 \* p<0.05(vs BM)

### D. 考察

自己HSCT後のTCRレパトアの多様性の回復が長期間持続する事が明らかになり、臨床効果との関連が示唆された。TCRレパトアの多様性の回復は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。また、症例の蓄積