

201229008B

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 22-24 年度 総合研究報告書

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. 総合総括研究報告	
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. 総合分担研究報告	
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	10
	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	14
	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	19
	新納宏昭
4. 全身性硬化症における自己造血幹細胞移植後の免疫学的再構築の検討、および DNAM-1 の発現と病態との関連に関する研究	23
	塚本 浩
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	28
IV. 研究成果の刊行物・別刷	33

I. 総合総括研究報告

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)
総合総括研究報告書

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)を施行した。対象症例の内訳は全身性硬化症(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、その効果は長期間持続した。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バランスにおいてTh1優位が持続した。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V β 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患者ではリンパ球各亜分画において健常人とは異なる遺伝子発現プロファイルを示したが、自己HSCT後に正常化する傾向が認められた。遺伝子発現プロファイル解析においてSSc患者で高発現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、難治性自己免疫疾患に対する自己HSCTは有効かつ安全な治療法であり、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

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。これらの病態への新規治療法として、欧米では自己造血幹細胞移植(自己HSCT)が臨床応用されており、特に全身性硬化症(SSc)について現在臨床第III相試験が実施中で、試験終了後には標準治療となることが予想される。本邦においてわれわれは、難治性自己免疫疾患23例(SSc19例、皮膚筋炎3例、ウェゲナー肉芽腫症1例)に対し自己HSCTを施行した。驚くべき事に、多くの症例において劇的な寛解が得られ、移植後2-5

年間、臨床的寛解が継続している。しかし、この治療効果が造血幹細胞からの正常免疫再構築を得た結果であるのか、移植前療法としての大量化学療法による免疫抑制効果が継続しているものか等、有効性の鍵となるメカニズムが不明である。本研究では、1) 既移植症例について長期間にわたる安全性と有効性を評価する、2) これら既移植症例における再構築リンパ球分画と各分画の遺伝子発現プロファイルの経時的変化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) 臨床第 II 相試験のプロトコールを作成し学内の倫理委員会の承認を得、新たな症例において自己 HSCT を続ける、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) 免疫学的再構築の解析対象は自己 HSCT を施行した SSc 19 例で、治療開始前、自己 HSCT 直前、自己 HSCT 1-60 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 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。

4) 遺伝子発現プロファイル解析では、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。

5) 遺伝子発現プロファイル解析にて SSc 患者 CD8+ 細胞で高発現していた DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1, CD226) の発現量及び機能解析を行った。

(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

1) 自己 HSCT を施行した SSc 19 例では合併症として、アデノウイルス膀胱炎 2 例 (10.5%)、帯状疱疹 5 例 (26.3%)、サイトメガロウイルス

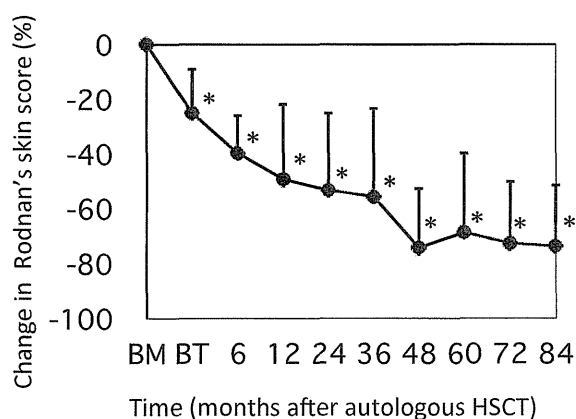


図1.スキンスコアの推移
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

抗原血症 8 例(42.1%)等を認めた。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 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)。

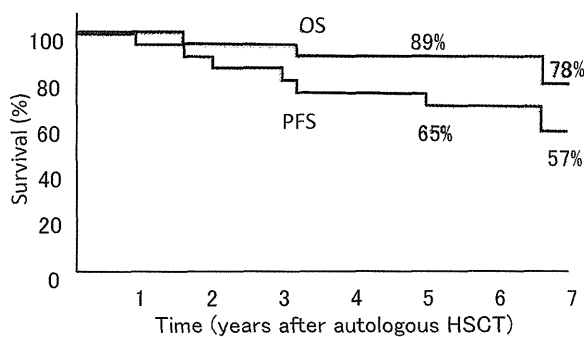


図2. 生存率 PFS: 無増悪生存; OS: 全生存

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。

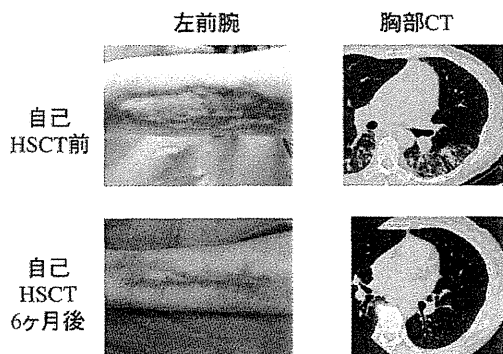


図3. 皮膚筋炎における自己HSCT後の皮膚潰瘍と間質性肺炎の改善

皮膚筋炎 3 例のうち 2 例は筋症状が乏しく (Clinically amyopathic dermatomyositis,

CADM)、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(図 3)。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。

2)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 4)。

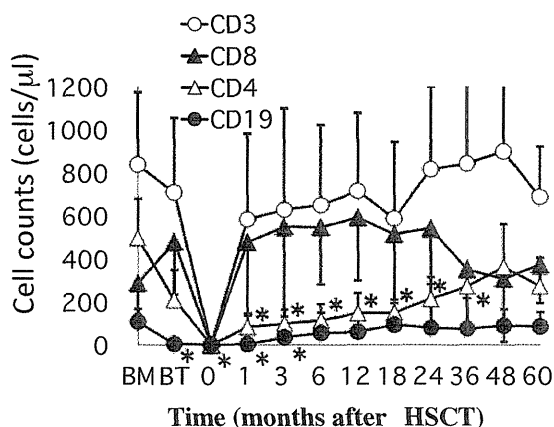


図4. 自己HSCT後の免疫学的再構築
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

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

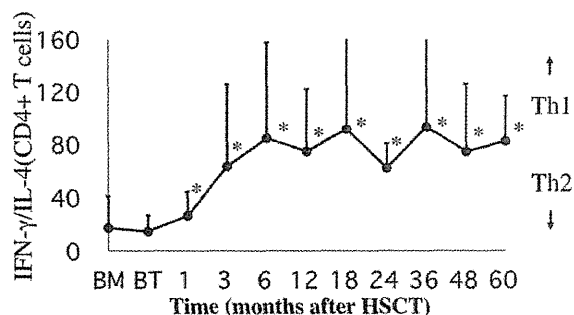


図5. 自己HSCT後のTh1/Th2バランスの変化
BM:末梢血幹細胞採取前 BT:HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

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(図 5)。

3)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。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)。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

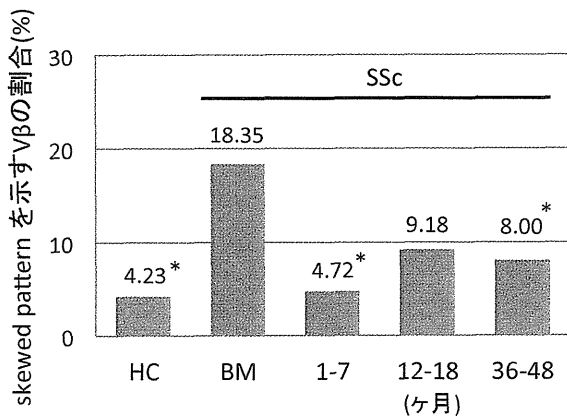


図6. 健常人およびSSc患者におけるT細胞受容体 CDR3サイズ分布とHSCT後の変化 HC:健常人、BM: 末梢血幹細胞動員前 * p<0.05(vs BM)

意に低下し、その後も長期間維持された(図6)。4)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7)。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。

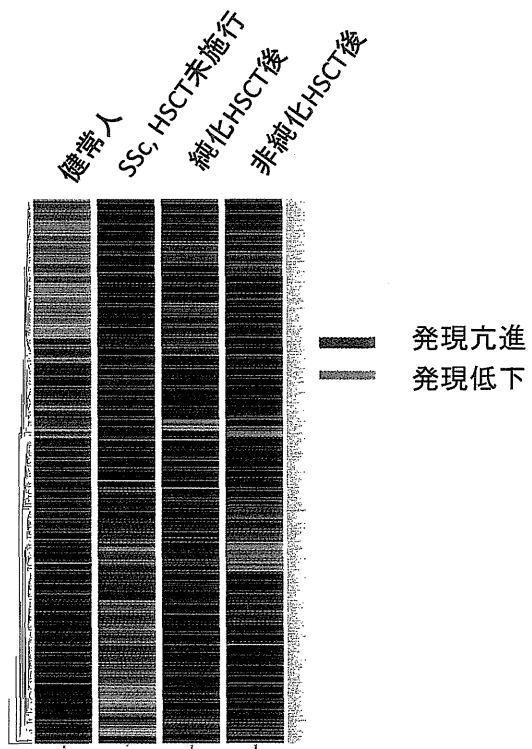


図7. SSc患者(HSCT未施行およびHSCT後)と健常人メモリーB細胞の遺伝子発現プロファイル

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。

5) 遺伝子発現プロファイル分析においてSSc患者の末梢血リンパ球で高発現していた遺伝子のうちDNAX accessory molecule 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%、 $p=0.0376$)。

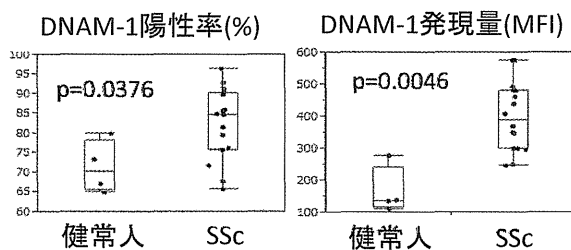


図8. 健常人及びSSc患者CD8+T細胞におけるDNAM-1陽性率および発現量の比較

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

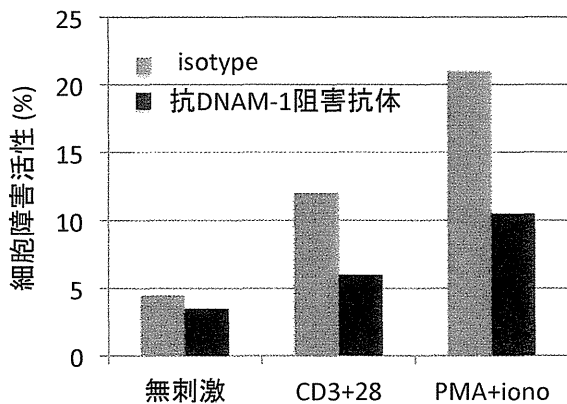


図9. 抗DNAM-1阻害抗体により、ヒト臍帯静脈内皮細胞に対する細胞障害活性は部分的に抑制される

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。

6) 既移植症例の臨床成績を解析し、また海外の臨床試験のプロトコルを参考に、難治性SSc及び皮膚筋炎を対象とした臨床第II相試験のプロトコルを作成し、学内倫理委員会の承認を受けた。自己HSCTの方法としては有効性に優る純化自己HSCTを選択した。承認されたプロトコルに基づき、新規SSc患者4例について純化自己HSCTを施行した。

D. 考察

本研究において、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、その効果は長期間持続した。最近、海外の臨床第II相試験でも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)。重症SScの従来の治療による5年生存率は50-60%と報告されているが、海外における自己HSCT施行SSc175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%と報告されている。当施設の成績はそれぞれ89%、65%で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。この解析結果より、新プロトコルでは純化HSCTを選択した。

CADMに合併する進行性の間質性肺炎で従来の免疫抑制療法に抵抗性なのは、予後が極めて不良であるが、自己HSCTは本病態に対しても劇的な改善効果を示した。

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。

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。われわれは遺伝子発現プロファイル分析の結果を基に、SSc 患者 CD8+細胞において 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。SSc に対する自己 HSCT 後の

Th1/Th2 バランスにおける Th1 優位の持続、TCR レパトアの多様性の回復、及びリンパ球の遺伝子発現プロファイルの正常化等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, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 708-17, 2010
2. Asakura S, Hashimoto D, Takashima S, Sugiyama H, Maeda Y, Akashi K, Tanimoto M, Teshima T. Alloantigen expression on non-hematopoietic cells reduces graft-versus-leukemia effects in mice. *J Clin Invest* 120:2370-8, 2010
3. 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
4. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niuro 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
5. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, Mori Y, Iino T, Yamauchi T, Eto T, Niino 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.
 6. 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.
 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: 6702-6708
 8. 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
 9. Niino 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. Kumamaru H, Ohkawa Y, Saiwai H, Yamada H, Kubota K, Kobayakawa K, Akashi K, Okano H, Iwamoto Y, and Okada S. Direct isolation and RNA-seq reveal environment-dependent properties of engrafted neural stem/progenitor cells. *Nat Commun* 3:1140, 2012
 11. 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,
 12. 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 α -defensins. *Blood* 120: 223-231, 2012
 13. Yuki H, Ueno S, Tatetsu H, Niino 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
 14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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：白血病幹細胞を考える。第72回日本血液学会総会、2010年9月24日、横浜
 2. 赤司 浩一：造血幹細胞からの骨髄球系細胞の分化。第60回日本アレルギー学会、2010年11月25日、東京
 3. Akashi K: Leukemic stem cells. ヨーロッパ血液学会、2011年7月、London, 英国
 4. 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
 5. Akashi K: Transcriptional regulation in normal and malignant hematopoiesis, 米国血液学会、2011年12月、San Diego, 米国.
 6. 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
 7. 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
 8. 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. 総合分担研究報告

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)
総合分担研究報告書

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)。

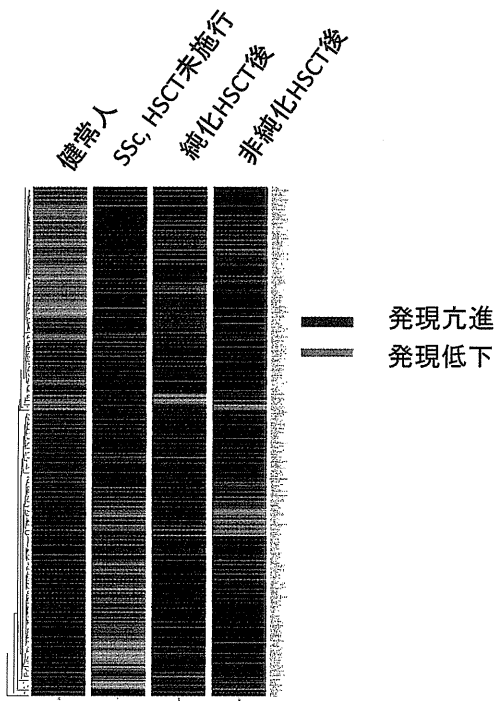


図1. SSc患者(HSCT未施行およびHSCT後)と健常人メモリーB細胞の遺伝子発現プロフィール

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。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ィールを呈した。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。以上はT細胞、B細胞いずれの分画でも同じ傾向であった。

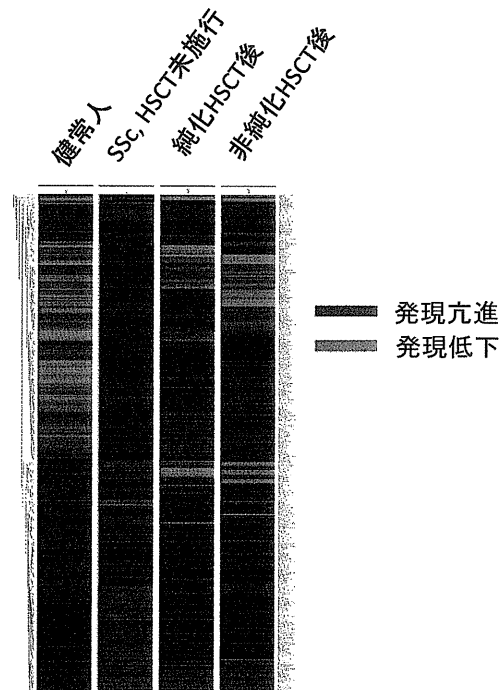


図2. SSc患者と健常人CD8+エフェクターメモリーT細胞の遺伝子発現プロフィール

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。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. Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Kiyohara C, Mitoma H, Uchino A, Furugo I, Yoshizawa S, Ueda A, Harashima S, Sawabe T, Tahira T, Hayashi K, Yoshizawa S, Shimoda T, Akashi K, Harada M. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatology* 49:1346-53, 2010
2. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 49:1215-28, 2010
3. Uchino A, Tsukamoto H, Nakashima H, Yoshizawa S, Furugo I, Mitoma H, Oryoji K, Shimoda T, Niuro H, Tada Y, Yano T, Nonaka T, Oishi R, Akashi K, Horiuchi T. Tacrolimus is effective for lupus nephritis patients with persistent proteinuria. *Clin Exp Rheumatol* 28:6-12, 2010
3. 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.
4. 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.
5. 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
6. 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.
7. 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)
8. 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：抗 TNF 製剤の作用機序—その共通点と相違点—第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 2010 年 4 月 22 - 25 日、神戸
2. 堀内孝彦：抗 TNF 製剤の作用機序—その共通点と相違点そして臨床効果との関連—第 31 回日本炎症・再生医学会、2010 年 8 月 6-7 日、東京
3. 堀内孝彦：全身性エリテマトーデスの診療—最近の進歩—、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
4. 堀内孝彦：TNF とリウマチ性疾患 —その病態から治療まで—、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
5. 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、鷺尾昌一：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
6. 堀内孝彦：難治性炎症性疾患の画期的治療薬—抗 TNF 製剤の基礎と臨床—、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
7. 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

8. 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)
総合分担研究報告書

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/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、ウイルス感染を高頻度に認めたが、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 HSCT36 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。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/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 例では合併症として、アデノウイルス膀胱炎 2 例(10.5%)、帯

状疱疹5例(26.3%)、サイトメガロウイルス抗原血症8例(42.1%)等を確認した。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HSCT36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。

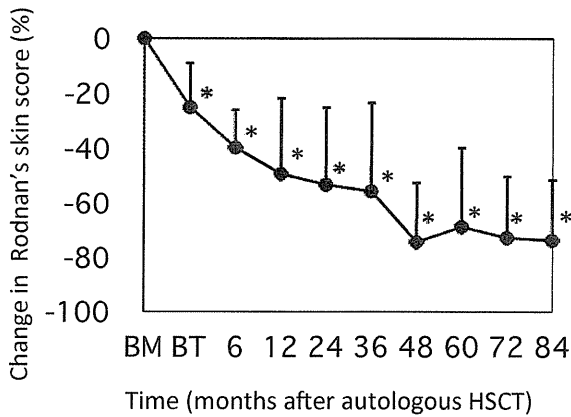


図1.スキンスコアの推移
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

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。

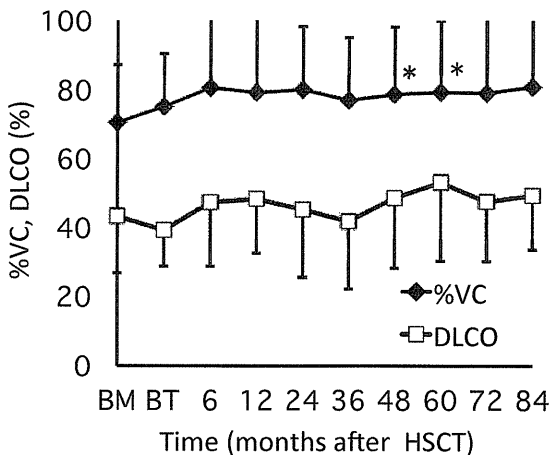


図2.肺機能の推移
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

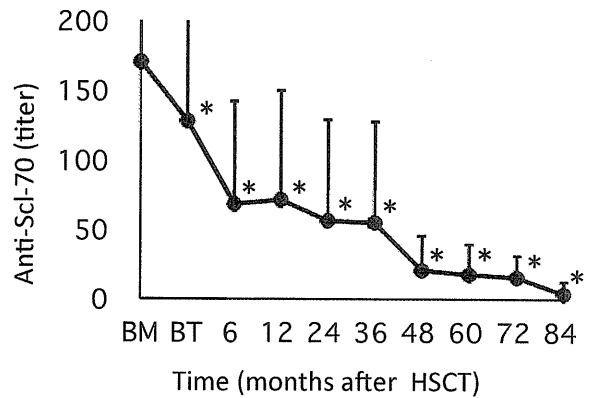


図3.抗Scl-70抗体価の推移
BM; 末梢血幹細胞採取前, BT; HSCT前
*P<0.05 vs BM(ベースライン)

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。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。

既移植症例の臨床成績を解析し、また海外の臨床試験のプロトコルを参考に、難治性SSc及び皮膚筋炎を対象とした臨床第II相試験のプロトコルを作成し、学内倫理委員会の承認を受けた。自己HSCTの方法としては有効性に優る純化自己HSCTを選択した。承認されたプロトコルに基づき、新規SSc患者4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. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Takenaka K, Teshima T, Tanaka T, Inagaki Y, Akashi K. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7: 708-17, 2010
2. Mori Y, Miyamoto T, Nagafuji K, Kamezaki K, Yamamoto A, Saito N, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Abe Y, Teshima T, Akashi K. High incidence of human herpes virus 6-associated encephalitis/myelitis following a second unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16:1596-602, 2010
3. Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol* 150:334-44, 2010
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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