

- 4) M. Li, M. Inaba, S. Hoshino, K. Okazaki, N. Abraham, S. Ikehara
 「Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP 8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation」
 14th International Congress of Immunology
 August 23-27, 2010 (Kobe, Japan)
- 5) S. Ikehara.
 「A novel BMT technique for the treatment of various currently intractable diseases: From bench to bedside」
 6th International Symposium: Haploidentical Stem Cell Transplantation.
 招聘講演 September 12-14, 2010 (Jerusalem, Israel)
- 6) S. Ikehara. →代理で M. Li が発表
 「Factors involved in aging: mesenchymal stem cells and thymus」
 Multidisciplinary Conference: Lifestyle and Ageing
 招聘講演 October 4-5, 2010 (Pisa, Italy)
- 7) M. Li, M. Shi, N.G. Abraham, S. Ikehara
 「Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP 8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation」
 Multidisciplinary Conference: Lifestyle and Ageing
 October 4-5, 2010 (Pisa, Italy)
- 8) S. Ikehara
 「A revolutionary therapy for the treatment of disorders of hemopoietic stem cells (HSCs) and/or mesenchymal stem cells (MSCs)」
 The Fourth International Conference on Cell Therapy
 招聘講演 November 11, 2010 (Seoul, Korea)
- 9) Susumu Ikehara.
 Autoimmune diseases as stem cell disorders: Rationale for normal stem cell transplantation for their treatment.
 The 5th Autoimmunity Congress Asia (ACA 2011).
 招聘講演 November 17-19, 2011. (Singapore)
- 10) Ming Li, Ming Shi, Susumu Ikehara.
 Improved SMP30 expression in the liver of diabetic mice by stem cell Transplantation.
 KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology
 Aging and Diseases of Aging
 October 22-27, 2012, Tokyo, Japan
- 11) Ming Li, Susumu Ikehara.
 Prospects for bone marrow transplantation in tolerance induction of organ transplantation.
 7th Five-Continent International Symposium on Cardiovascular Disease
 招聘講演 April 19-April 21, 2013. (Beijing, Cjina)
- 12) Sanae Hasegawa-Ishii, Atsuyoshi Shimada, Muneo Inaba, Ming Li, Ming Shi, Noriko Kawamura, Shiro Takei and Susumu Ikehara :
 Intra bone marrow procedure facilitates entry of transplanted bone marrow cells through the tenia of choroid plexus into brain parenchyma. 19th Annual Meeting of The PsychoNeuroImmunology (San Diego) 2012.6.7
- 13) Atsuyoshi Shimada, Sanae Hasegawa-Ishii, Muneo Inaba, Ming Li, Ming Shi, Noriko Kawamura, Shiro Takei and Susumu Ikehara :
 Enhanced recruitment of bone marrow-derived cells into the brain parenchyma in senescence-accelerated mice. 19th Annual Meeting of The PsychoNeuroImmunology (San Diego) 2012.6.7

14) Sanae Hasegawa-Ishii, Atsuyoshi Shimada, Muneo Inaba, Ming Li, Ming Shi⁵, Shiro Takei, Susumu Ikehara.

Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus.

20th Annual PNIRS Scientific Meeting

June 5-8, 2013, Stockholm, Sweden

特許取得日：2011.12.2

特許番号：HK1122973

2. 実用新案登録

1) 指定管理医療機器製造販売認証書

認証番号：第 223AABZX00163000 号

認証対象品：JIMRO-TRANS ニードル

認証日：平成 23 年 12 月 28 日

製造販売業者：株式会社 JIMRO

3. その他

1) Medical Tribune 平成 22 年 5 月 20 日 Vol. 43, No.20

「骨髄内骨髄移植法で多くの難病克服に期待」

池原 進

2) 毎日新聞 平成 22 年 9 月 13 日 (月) 夕刊 3 版 社会 10 関東版

「骨髄、胸腺移植で正常に」

池原 進、李 銘

3) YAYAHOO JAPAN! ニュース 平成 22 年 9 月 13 日 (月)

「< 2 型糖尿病 > 骨髄、胸腺移植で正常に動物実験で関西医大」

池原 進、李 銘

4) GOO ニュース

平成 22 年 9 月 13 日 (月)

「< 2 型糖尿病 > 血糖値、骨髄と胸腺移植で正常に 関西医科大、マウスで成功」

池原 進、李 銘

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明の名称：骨髄ドリル「BONE MARROW HARVESTING DRILL」

発明人：池原 進、白藤泰司、中村修二、
下田信夫、佐渡克行

国：アメリカ

特許取得日：2011.12.6

特許番号：US8070690

2) 発明の名称：骨髄ドリル「BONE MARROW HARVESTING DRILL」

発明人：池原 進、白藤泰司、中村修二、
下田信夫、佐渡克行

国：欧州(ベルギー、ドイツ、スペイン、
フランス、イギリス、イタリア、
スウェーデン)

特許取得日：2011.11.23

特許番号：1949858

3) 発明の名称：骨髄ドリル「BONE MARROW HARVESTING DRILL」

発明人：池原 進、白藤泰司、中村修二、
下田信夫、佐渡克行

国：中国

特許取得日：2011.7.20

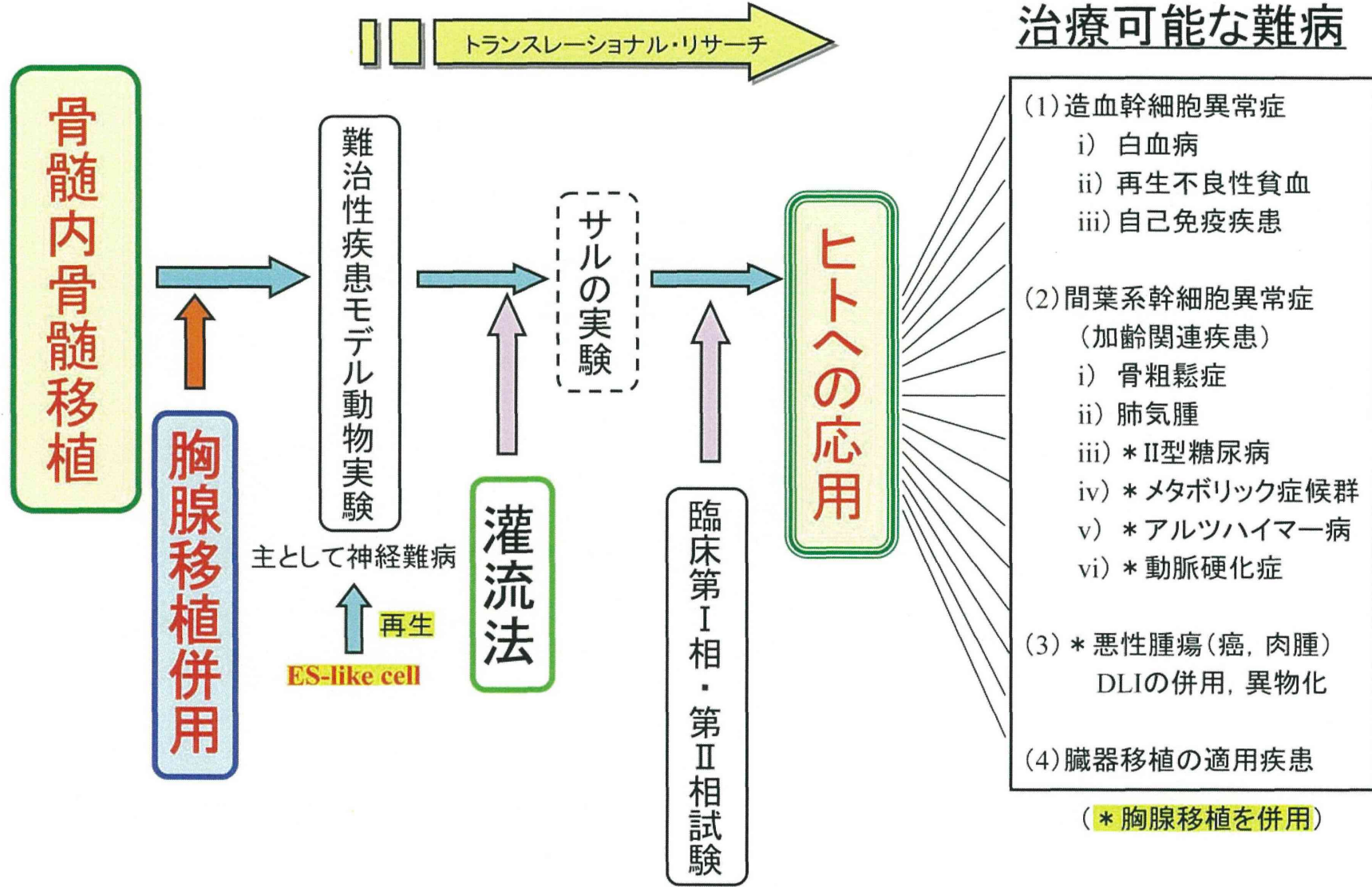
特許番号：200810003972.0

4) 発明の名称：骨髄ドリル「BONE MARROW HARVESTING DRILL」

発明人：池原 進、白藤泰司、中村修二、下
田信夫、佐渡克行

国：香港

今後の見通し



III. 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）
分担研究年度終了報告書

同種移植後の再発白血病の治療法開発

分担研究者 赤塚 美樹（藤田保健衛生大学医学部・准教授）

研究要旨

再発ハイリスク例に対する同種造血幹細胞移植後では再発が主な死因となっている。同種移植はマイナー（組織適合）抗原や不適合 HLA 分子を標的としたアロ免疫反応によって移植片対白血病・リンパ腫（GVL）効果を得るものである。我々は自らが同定した、選択的 GVL 効果を期待しうる造血系のみを発現しているマイナー抗原を標的とし、再発ハイリスク造血器腫瘍の再発予防・治療としてマイナー抗原ペプチドワクチン療法の第 1 相臨床試験を実施してきた。抗原タイピングを行った症例の約 3 割において ACC-1Y, ACC-1C (HLA-A24 拘束性), ACC-2, ACC-6 (HLA-B44 拘束性), HA-1 (HLA-A2 拘束性)のいずれかのマイナー抗原で GVL 方向の不適合を認めた。これらのうち、再発例 4 例と再発ハイリスク例 3 例の合計 6 例において、実際にワクチンの投与がなされた。局所反応以外に有害事象は認められなかったが、骨髄腫の再発例で SD が得られた他、ワクチン後にマイナー抗原特異的キラー細胞の誘導が 2 例で認められた。ワクチンから T 細胞応答には時間を要することから、治療には養子免疫療法がより有効と考えられる。HLA-A24 拘束性 ACC-1Y、ACC-1C マイナー抗原に特異的 CTL から得られた T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を用いた遺伝子改変 T 細胞の作製、また HLA-A2/HA-1 マイナー抗原複合体を認識する抗体の樹立と、これを T 細胞で発現させるいわゆる CAR-T 細胞の作製も行い、前者では内在性 TCR との競合が制限因子となったが、後者では CAR の発現は良好で細胞傷害性も確認できたことより、今後の展開が期待される。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する有用な治療法として確立されてきたが難治性症例の移植成績はまだ満足できるものではない。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対白血病・リンパ腫（GVL）効果が期待できるが、その効果が原病の悪性度を克服できないと再発が起ると考えられる。GVL 効果の主要な標的はマイナー組織適合抗原と腫瘍関連抗原（TAA）であるが、とくに前者はドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来するペプチドが患者の HLA 分子に提示されて抗原物質となったもので、TAA のような自己抗原と異なり、非自己抗原であるため強い免疫反応ができると期待されている。

マイナー組織適合抗原はドナー、患者間の遺伝子多型の差に由来するため、移植ペア毎に適応となるマイナー抗原が異なるという不便もあるが、移植前に HLA タイピングとともにマイナー組織適合抗原遺伝子タイピングを行っておけば不適合の有無が分かることから、各症例に合ったマイナー抗原を選択するという、テーラーメイド治療が可能となる。

我々は自らが同定してきた、日本人に多い HLA-A*24:02 や HLA-A*02:01, -B*44:03 によって提示されるマイナー組織適合抗原エピトープのペプチドを GMP グレードで調製し、再発ハイリスク造血器腫瘍の再発時または移植後再発予防としてマイナー抗原ペプチドワクチン療法の第 1 相臨床試験を実施した。

ワクチンのような能動免疫は、十分量の T 細胞反応および増殖に時間を要し、急性白血病のような腫瘍の増加スピードが速い場合には対処が困難であることがワクチンを受けた移植後再発例で分かってきた。これまで患者末梢血を不適合マイナー抗原ペプチドで刺激し、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を得ようとしたが、多くはペプチド依存性の低親和性 TCR を持つものがほとんどであり、細胞傷害活性が低いこと、増殖性がわるいことが問題であった。この解決のために、これまでに樹立し、細胞傷害性の良好であった CTL から T 細胞受容体遺伝子をクローン化し、これをレトロウイルスベクターにて患者もしくはドナー T 細胞に遺伝子導入し、標的マイナー抗原に特異的なエフェクター CTL を大量に得る方法を検討した。さらに、外来性 TCR を導入した T 細胞上の当該 TCR の発現率には大きな差があり、これは内在性 TCR との競合であることが分かってきたため、TCR 以外の抗原受容体、すなわち抗体構造を T 細胞に導入した chimeric antigen receptor (CAR) 発現 T 細胞の開発も 3 年度目より着手した。

B. 研究方法

①マイナー抗原ワクチン臨床試験 (H22~H24 年度、継続予定)

対象症例は同種造血幹細胞移植を受ける予定であるか、受けた後の患者。再発時の治療目的のマイナー組織適合抗原ワクチン投与の場合、以下の疾患を対象とした：a) RAEB, CMML、b)いかなる時期の AML、ALL、c)いかなる時期の CML、d)多発性骨髄腫、e)悪性リンパ腫。再発予防目的の場合は移植後 30%以上の再発が予想される疾患群に限定し、a)RAEB, CMML (で再発リスクの高いもの)、b) AML：第 3 寛解期以降ないしは非寛解期移植、FAB：M0、M6、M7、c)ALL：第 2 寛解期以降ないしは非寛解期移植、d)CML：第 2 慢性期以降ないしは加速期・急転期移植、e)多発性骨髄腫：進行期 (PD) 移植、e)悪性リンパ腫：非寛解期移植を対

象とした。移植タイプとして血縁者間、臍帯血を含む非血縁者間移植すべてを対象とした。患者および必要に応じて血縁者ドナーに研究目的と個人情報管理、予期される効果と危険性を説明したのち文書にて同意を得られた場合に本研究へ登録を行った。

対象とするマイナー組織適合抗原として HLA-A*24:02 陽性患者には ACC-1Y、ACC-1C、HLA-B*44:02/03 陽性患者には ACC-2、ACC-6、HLA-A*0201/A*0206 陽性患者には HA-1H 抗原の GVL 方向不適合について遺伝子タイピングを行った。マイナー組織適合抗原が GVL 方向に不適合が存在しても、ドナーおよび患者双方が拘束性 HLA 型を持つ場合のみを適格例とした。

各ペプチドは GMP グレードで合成され、愛知県がんセンターの細胞調製施設の安全キャビネット内で 2mg/ml または 5mg/ml の濃度で分注、-30 度で凍結保存しているものを用いた。分注後、ペプチドは外注検査機関にて純度等の品質検査を行い、分解がないことを確認した。

ペプチドは投与直前に室温で解凍後、安全キャビネット内で必要量を注射器で吸引し、モンタナイド ISA51VG (フロイント社) と混合してエマルジョン化し、外来にて接種した。

試験用量設定として、初期のがんワクチンで用いられた 30 μ g より開始、300 μ g, 1mg の段階的増加を行った。各用量で 3 名または 6 名 (有害事象の程度に応じて) とした。ペプチドは隔週で 5 回投与し、安全性と免疫誘導能のエンドポイントは接種終了 3 週間後とした。何らかの理由でワクチン接種を中止した場合、3 回以上投与していれば評価可能とした。

主評価項目として、2 項目、グレード 3 度以上の急性 GVHD・広範慢性 GVHD の発症頻度、および NCI-CTC 基準で 3~4 度の非血液毒性の発症頻度を設定した。また、副次評価項目として 3 項目、5 回のワクチン終了後 3 週間以内での寛解到達率、ワクチンに特異的な T 細胞反応の継続期間・動態、安全に投与可能なワクチン量を設定した。免疫学的反応の評価については、CD8+ 抗原特異的 T 細胞

(CTL) の増減をテトラマーや IFN- γ ELISPOT 法にて検討し、残存腫瘍量については評価可能なサロゲイトマーカーがある場合、定量 PCR や FISH 法などで評価することとした。

②マイナー抗原特異的 CTL の TCR (H22-23 年度) およびマイナー抗原・HLA 複合体特異的抗体を用いた遺伝子導入細胞の作製 (H24 年度、別途継続予定)

TCR のソースとして、それぞれ ACC-1Y および、ACC-1C に特異的 CTL から得られたの TCR を組み込んだレトロウイルスベクターの作成した。ACC-1Y を認識する CTL クローン 1B3, ACC-1C を認識する CTL の TCR α 鎖、 β 鎖を PCR 法にてそれぞれクローン化した。配列確認後、 α 鎖と β 鎖は PGK promoter もしくは F2A ペプチドで結合し、必要に応じて下流に選択用の NGFR を結合した。レトロウイルスプラスミドには Stanford 大学から得た LZRSpBMN-Z を改変したものをを用いた。

レトロウイルスの産生には、パッケージング細胞として、GALV- Phoenix-GP 細胞を用いた。プラスミドの導入は XtreamGene 9 を用いて行い、puromycin にて導入細胞を選択し、一過性プロデューサー細胞を得た。

遺伝子導入は、準備したウイルス上清をレトロネクチンコーティングしたプレートに入れ、32°C、2,000xG で 3~4 時間遠心後、Jurkat/MA 細胞、もしくは OKT3、CD3/CD28 ビーズで 2~3 日間活性化した健常人由来 T 細胞を入れて培養した。必要に応じて 2~3 回感染を反復し、感染 1 週間後より、マイナー抗原を 10~100nM の濃度でパルスした自己 B-LCL で 2~3 度反復刺激した。TCR 遺伝子導入・発現効率はそれぞれ A24/ACC-1Y-PE、A24/ACC-1C-PE テトラマーと CD3、CD8 抗体のカウンター染色にて評価した。またクロム遊離試験によって、TCR 導入 T 細胞がどの程度細胞傷害性を有するか検討した。

さらに、CAR-T を作成するために、まずマウスに HLA-A*02:01/HA-1H (以下 A2/HA-1H) テトラマーを複数回 B6 系統のマウスに接種して免疫を行った。脾細胞 B 細胞を取り出し、その免疫グロブリン cDNA ライブラリから A2/HA-1H に反応性の抗体を A2/HA-1H モノマーと陰性コントロールの HLA-A*02:01/MAGEA3 モノマーでスクリーニングし、前者のみに反応するクローンを得た。次のステップとして HLA-A*02:01 に提示された HA-1H ペプチドには反応するが、HA-1R ペプチドには反応しない特異性の高いクローンを選択した。さらにこの単鎖抗体断片 (scFv) で作成したテトラマーが細胞上に発現した HLA-A*02:01 に提示された HA-1H に結合できるか検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等に従って作成した研究計画書を作成し、倫理委員会の審査・承認を得た後に、担当医による人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明を実施後書面にて同意を得られた場合のみに実施された。以上の厳格な遵守により、本研究は倫理面で問題が無かったものとする。

C. 研究結果

①マイナー抗原ワクチン臨床試験：

これまでに 85 症例がマイナー組織適合抗原タイプピングを受けた。うち、19 ペア (22.3%) において対象としたいずれかのマイナー組織適合抗原で GVL 方向の不適合を認めた。

この 19 例の中で 8 例からワクチン投与について同意を得たが、1 例は準備中に現疾患が急速に増悪し脱落となり、最終的に 7 例において投与がなされたが 1 例は早期に PD となり解析対象から除外した。評価可能な患者の背景を表 1 に示す。3 例がハイリスク造血器腫瘍に対する予防投与、3 例が治療投与であった。移植ソースは HLA 一致同胞が 2 例、非血縁 JMDP が 3 例、臍帯血が 1 例であった。ワクチン投与後の評価を表 2 に示す。有害事象は 6 例中 2 例に生じ、2 例が微熱を示した。ワクチン接種局所での遅延型過敏反応 (DTH) は 1 例で認めた。もう 1 例では ALP、CRP の若干の上昇 (Grade 1) を認めた。抗腫瘍効果は、再発時にワクチンを行った 3 例のうち 1 例 (多発性骨髄腫例) で Stable disease が得られ、他の 2 例 2AML、PTCL-u) は Progressive disease であった。免疫反応は採血試料の直接テトラマー染色・フローサイトメトリー評価では全例で陰性、抗原ペプチドで刺激後は 3 例でテトラマー染色が陽性となった。なお現在、1mg のコーホートで試験を行っている。

②マイナー抗原特異的 CTL の TCR およびマイナー抗原・HLA 複合体特異的抗体を用いた遺伝子導入細胞の作製：

ACC-1Y マイナー抗原を特異的に認識する CTL-1B3 の TCR α 鎖と β 鎖を別々のレトロウイルスベクターに組み込んだ場合と、IRES 配列を利用してタンデムに結合して 1 つのベクターに組み込んで作成した Phoenix-Galv パッケージング細胞ウイルスに感染させた Jurkat/MA 上のテトラマー陽性率を比較したところ、両者ともテトラマー陽性分画が得られたが、タンデムに繋いだ場合、陽性強度が弱い傾向が見られた。

CTL-1B3 の TCR α ・ β 鎖をタンデムにつないだベクターを感染した正常 T 細胞のテトラマー陽性率は 10~20%前後であった。これを bulk の T 細胞株、磁性ビーズによって CD4 分画、CD8 分画に分けて細胞障害性試験を行ったところ、CD8 分画>bulk>

CD4 分画の順に ACC-1Y ペプチドをパルスした自己 B-LCL を傷害した。TCR を導入していない”Untransduced” T 細胞は細胞傷害活性を示さず、マイナー抗原特異性が TCR 遺伝子導入で付与できることが確認できた。

次いで、TCR 導入直後のテトラマー陽性率は 1%にも満たない場合でも、抗原ペプチドをパルスした自己抗原提示細胞で刺激を行うと、その頻度を高める事が出来るかを検討したところ、抗原刺激を反復することにより 4 週間で 6.2%にまで高める事が出来た。この、段階で細胞傷害性試験を行ったが、遺伝子導入 T 細胞は 100nM の抗原ペプチドを添加しない限り、もとの CTL-1B と比較して活性を発揮できなかった。これは TCR 導入細胞の割合が低すぎ、十分なエフェクター/ターゲット比が得られなかったこと、タンデムに繋いだ場合の細胞あたりの TCR 発現量そのものが低かったことが原因と考えられた。

引き続き、ACC-1C 特異的 CTL の TCR を組み込んだレトロウイルスベクターの作成するために、特異的 CTL-1B9 の TCR α 鎖と β 鎖を 2A 配列を利用してタンデムに結合して 1 つのベクター (TRBV7-9*03 BJ2.1) \rightarrow F2A \rightarrow α (AV24-AJ37) を Phoenix-Galv パッケージング細胞に導入し、産生されたウイルスを Jurkat/MA に感染させて、発現を評価した。特異的テトラマーは 陽性コントロールであるオリジナルの CTL-1B9 には良好な反応性を示したが、Jurkat/MA に TCR を感染させたものはほとんど染色されなかった。CTL-1B9 は PCR 解析でもう 1 種類の in-frame の TCR- α 鎖を弱く発現しており、これが bona fide の TCR である可能性があるため、再検中である。

最後に、A2/HA-1H を認識する抗体については 5×10^8 スケールのフェージライブラリから出発し、3 回のパニングによる濃縮後にランダムにピックアップした 144 個のコロニーをスクリーニングした。この結果 7 種類、18 クローン (12.5%) が得られた。これ以外は HLA-AH2/MAGEA3 にも反応する

もの、無反応のものであった。このうち最も結合力が強い単鎖の scFv をコードする cDNA (クローン #131) を 4 量体化した蛍光色素標識ファージ抗体ないしは、IgG4 抗体定常領域の前に組み込みテトラマー化して、HA-1H ペプチドをパルスした TAP 欠損 HLA-A*02:01 陽性の T2 細胞と反応させたところ、10nM まで反応が得られたが、HA-1R ペプチドやそれ以外の HLA-A*02:01 結合性ペプチド (MAGEA3、HIV、Influenza-A MP <以下 Inf-A>、EBV) とは非生理的な高濃度である 10 μ M でも反応しなかった。

次いで PCR 法にて、#131 scFv の C 末端に CD28 の膜貫通部位と CD3 ζ 鎖の ITAM 部分をタンデムに結合し、レトロウイルスベクター LZRSpBMN-Z に組み込んだ。これを TCR 遺伝子導入の場合と同様に GALV- Phoenix-GP に導入し、puromycin でウイルス産生細胞を得た。この段階で GALV- Phoenix-GP は HLA-A2/HA-1H テトラマーによって染色されたため、scFv-CD28- ζ コンストラクトは正常に機能していることが確認できた。この上清を CD3/CD28 ビーズで活性化した健康人から得た CD8⁺ T 細胞に感染させ、CAR-T 細胞を得た。2 日連続の感染によりほぼ 95% の T 細胞に効率良く遺伝子導入されたことがテトラマー試薬で確認できた。

これらの CAR-T 細胞は 2 週間でおおよそ 100 倍以上に増殖した。2 週間後の時点でも HLA-A2/HA-1H テトラマーで CAR の発現は保たれていた。これらの細胞をエフェクター細胞とし、⁵¹Cr でアイソトープ標識した T2 細胞もしくは HA-1H 陰性・HLA-A*02:01 導入 K562 細胞標的細胞に HA-1H、HA-1R、Inf-A ペプチドをパルスして細胞傷害性試験を行ったところ、Inf-A パルス細胞は 10 μ M でも傷害されなかったのに対して、HA-1H パルス細胞は少なくとも 10nM まで傷害された。HA-1R パルスの場合、10 μ M では傷害活性が見られたが、1 μ M ではすでに消失した。以上より、HLA に結合したペプチドの 1 アミノ酸置換を見分けることができる抗体の作成が可能であることを示すことができた。

現在、これを T 細胞に導入して CAR-T 細胞としての機能を解析している。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Hirosawa T, Torikai H, Yanagisawa M, Kamei M, Imahashi N, Demachi-Okamura A, Tanimoto M, Shiraishi K, Ito M, Miyamura K, Shibata K, Kikkawa F, Morishima Y, Takahashi T, Emi N, Kuzushima K, Akatsuka Y. Mismatched HLA class II-restricted CD8(+) cytotoxic T-cells may serve selective GVL effects following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Sci*, 102:1281-6, 2011. (PMID: 21466613)
- 2). An J, Fujiwara H, Suemori K, Niiya T, Azuma T, Tanimoto K, Ochi T, Akatsuka Y, Mineno J, Ozawa H, Ishikawa F, Kuzushima K, Yasukawa M. Activation of T-cell receptor signaling in peripheral T-cell lymphoma cells plays an important role in the development of lymphoma-associated hemophagocytosis. *Int J Hematol*. 93:176-85, 2011. (PMID: 21229399)
- 3). Suzuki S, Yoshikawa T, Hirosawa T, Shibata K, Kikkawa F, Akatsuka Y, Nakatsura T. Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci*. 102:1622-9, 2011. (PMID: 21668581)
- 4). Yamamoto Y, Tsuzuki S, Akahori Y, Ukai Y, Sumitomo M, Murayama Y, Yamamoto K, Inaguma Y, Tokuda M, Abe A, Akatsuka Y, Emi N, Kurosawa Y. Isolation of human mAbs that directly modulate FMS-related tyrosine kinase 3 signaling. *Cancer Sci*. 103 : 350-9, 2012. (PMID: 22049994)
- 5). Okanami Y, Tsujimura K, Mizuno S, Tabata M, Isaji S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Takahashi T, Uemoto

- S. Intracellular interferon- γ staining analysis of donor-specific T-cell responses in liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 44:548-54, 2012. (PMID: 22410067)
- 6). Ochsenreither S, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, Wood B, Choi YE, Bleakley M, Warren EH, Hudecek M, Akatsuka Y, Weissman IL, Greenberg PD. Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen. *Blood.* 119: 5492-501, 2012. (PMID:22529286)
- 7). Tamanaka T, Oka Y, Fujiki F, Tsuboi A, Katsuhara A, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Lin YH, Tachino S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Oji Y, Kumanogoh A, Sugiyama H. Recognition of a natural WT1 epitope by a modified WT1 peptide-specific T-cell receptor. *Anticancer Res.* 32:5201-5119, 2012. (PMID: 23225417)
- 8). Demachi-Okamura A, Torikai H, Akatsuka Y, Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K. Autophagy creates a CTL epitope that mimics tumor-associated antigens. *PLoS One.* 710: e47126, 2012. (PMID: 22529286)
- 2). 小川誠司, 松原亜以子, 鬼塚真, 柏瀬貢一, 真田昌, 南谷泰仁, 赤塚美樹, 佐竹正博, 千葉滋, 佐治博夫, 丸谷悦子, 猪子英俊, 森島泰雄, 小寺良尚, 笹月健彦. MHC と疾患 GWAS の手法による同種造血幹細胞移植の遺伝学的背景の探索. 第 13 回日本組織適合性学会大会 (口演)、東京 2010 年 9 月 18 日. *MHC: Major Histocompatibility Complex* 17 巻 2 号, 141, 2010.
- 3). Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Matsubara A, Hamajima T, Nannya Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. Development of an Online Tool to Scan Single Nucleotide Polymorphisms for Identification of Novel Minor Histo-compatibility Antigens. 第 17 回 BMT Tandem Meetings (ポスター #508)、ハワイ 2011 年 2 月 19 日. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 17(2) Suppl.1, pp S335, 2011.
- 4). Akatsuka Y. Characterization And Clinical Application of Minor Histocompatibility Antigens. The 15th Annual Winter Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation (Plenary session), Muju Resort, Feb 25, 2011. *The Korean Journal of Hematology* 46(suppl) pp10, 2011.

2. 学会発表

- 1). Akatsuka Y, Yamamura Y, Bleakley M, Hikita J, Hamajima T, Nannya Y, Matsubara A, Riddell SR, Takahashi T, Kuzushima K, Ogawa S. Identification of novel minor histocompatibility antigens using HAPMAP EBV-LCL panels transduced with restricting HLA cDNA retrovirally. 第 16 回日本遺伝子治療学会総会 (ポスター #147)、宇都宮 2010 年 7 月 1 日. *The 16th Annual Meeting-JSGT2010*, 2010.
- 5). 赤塚美樹. マイナー組織適合抗原の重要性. 第 33 回日本造血細胞移植学会 (シンポジウム 2)、松山 2011 年 3 月 9 日. *日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集* pp164, 2011.
- 6). 赤塚美樹, 山村武史, Bleakley Marie, 疋田潤哉, 濱島剛, 南谷泰仁, 松原亜以子, Riddell Stanley, 恵美宣彦, 小寺良尚, 森島泰雄, 小川誠司. HapMap 資源を利用したマイナー組織適合抗原に関わる SNP 同定のためのオンラインソフトの開発. 第 33 回日本造血細胞移植学会 (ポスター PS2-128)、松山 2011 年 3 月 10 日.

日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp336, 2010.

- 7). 赤塚美樹、森島泰雄、田地浩史、山本 一仁、宮村耕一、高橋利忠、小寺良尚、恵美宣彦、葛島清隆。同種移植後再発予防・治療を目的としたマイナー抗原ワクチン臨床試験（中間報告）（口演#39）。第15回日本がん免疫学会総会、大阪 2011年6月30日。日本がん免疫学会総会プログラム・抄録集 pp17, 2011.
- 8). 赤塚美樹、森島泰雄、田地浩史、山本 一仁、宮村耕一、高橋利忠、小寺良尚、恵美宣彦、葛島清隆。同種移植後再発予防・治療を目的としたマイナー抗原ワクチン臨床試験の中間報告。第3回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会（口演）、別府 2011年8月21日。
- 9). 岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、三好 浩之、吉森 保、葛島清隆。脾がん細胞における恒常的高活性オートファジーによる CTL エピトープの産生。第70回日本癌学会学術総会（ポスター、#3204）、熊本 2011年10月5日。日本がん免疫学会総会プログラム・抄録集 pp499, 2011.
- 10). 赤塚美樹、松原亜以子、南谷泰仁、森島泰雄、高橋利忠、葛島清隆、小川誠司、恵美宣彦。マイナー組織適合抗原をコードする一塩基多型のオンライン検索ツール。第70回日本癌学会総会（ポスター、P-1444）、大阪 2011年10月3日。日本癌学会総会プログラム・抄録集 pp204, 2011.
- 11). Akatsuka Y, Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Matsubara A, Hamajima T, Nannya Y, Morishima Y, Kodera Y, Riddell SR, Ogawa S, Emi N. An online tool to scan single nucleotide polymorphisms for identification of novel minor antigens. 第73回日本血液学会学術集会（ポスター #PS1-262）、

名古屋 2011年10月14日。臨床血液抄録集 pp204, 2011.

- 12). Yukiya Yamamoto, Sachiko Tsuzuki, Yasushi Akahori, Yoshinori Ukai, Mariko Sumitomo, Masutaka Tokuda, Tadaharu Kanie, Akihiro Abe, Yoshiki Akatsuka, Yoshikazu Kurosawa, Nobuhiko Emi. Isolation of human monoclonal antibodies directly modulating FLT3 signaling. 第73回日本血液学会学術集会（ポスター #PS2-284）、名古屋 2011年10月15日。臨床血液抄録集 pp584, 2011.
- 13). 赤堀 泰, 赤塚美樹, 葛島清隆, 恵美宣彦: HLA-A*02:01 拘束性に提示されたマイナー抗原 HA-1H ペプチドを認識する抗体の単離。第4回造血器腫瘍免疫療法研究会。金沢、H24年8月18日。プログラム抄録集抄録集 pp64.
- 14). 赤堀 泰, 稲熊容子, 赤塚美樹, 山本幸也, 村山裕子, 伊庭佐知子, 遠藤明美, 平松可帆, 葛島清隆, 恵美宣彦. HLA-A2 拘束性に提示されたマイナー抗原 HA-1H ペプチドを認識する抗体の単離とその臨床応用に向けての検討（口演 11-3）。第35回日本造血細胞移植学会、金沢。2013年3月8日。日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp202.
- 15). Yoshiki Akatsuka, Hirofumi Taji, Yasuo Morishima, Koichi Miyamura, Yoshihisa Kodera, Nobuhiko Emi, Toshitada Takahashi, Tomohiro Kinoshita, Kiyotaka Kuzushima. Vaccination With Minor Histocompatibility Antigen-Derived Peptides In Post-Transplant Patients With Hematological Malignancies - Preliminary Results. 2nd International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2012年11月6日, NIH Bethesda, MD, USA. Abstract P-11 (pp34).

F. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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）
分担研究年度終了報告書

間葉系幹細胞を介する免疫再構築と造血制御についての研究

分担研究者 一戸 辰夫（広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野
教授）

研究協力者 三浦 康生（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 助教）

平位 秀世（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 院内講師）

前川 平（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授）

石谷 昭子（奈良県立医科大学医学部 法医学教室 非常勤講師）

下嶋 典子（奈良県立医科大学医学部 細菌学教室 助教）

研究要旨

骨髄内骨髄移植法は造血幹細胞/前駆細胞（hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC）と間葉系幹細胞（mesenchymal stem/stromal cells）が同所的に移植されることを最大の特徴としており、移植された MSC は多様なメカニズムを介して、同種免疫応答の制御や HSPC の増幅に関与することが知られている。本研究では、骨髄内骨髄移植の臨床応用に向けて、MSC の機能を薬理的に賦活化することを目指して、（1）MSC の免疫調節作用における非古典的 HLA クラス Ib 分子の関与についての検討；（2）In vitro で薬理的に活性化された MSC が骨髄 CD34 陽性細胞の増幅能に与える影響の検討；（3）MSC が HSPC の系列特異的な分化能に与える影響についての検討を行った。

A. 研究目的

間葉系幹細胞（mesenchymal stem/stromal cells, MSC）は自己複製能と骨細胞・脂肪細胞・軟骨細胞などへの多分化能を有する体性幹細胞であり、骨髄・臍帯血・歯胚・脂肪組織などから比較的容易に分離することが可能である。また、体外で培養されたヒト MSC は造血幹細胞/前駆細胞（hematopoietic stem/progenitor cells, HSPC）の増殖を促進することや、T 細胞・NK 細胞・B 細胞・樹状細胞など広範な免疫担当細胞の機能を抑制することが報告されており、造血幹細胞移植後の生着の促進や移植片対宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)の治療などを目的として、実際に MSC の移植を行う臨床試験が国内外において実施されている。しかし、ヒト MSC の造血促進作用や免疫調節作用がどのような

分子機構によって担われているのかに関しては、いまだに十分な知見が得られていない

灌流法によって採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植法では、HSPC と MSC が骨髄外臓器にトラップされることなく直接同所性に移植されるため、MSC の造血支持能力や免疫調節作用が従来の移植法よりも発揮されやすくなる可能性が想定される。また、骨髄内骨髄移植による MSC 生着率の向上は、移植後に出現する組織障害や免疫学的合併症の軽減にも寄与する可能性がある。本研究では、骨髄内骨髄移植法のヒトへの応用の際に、これらの MSC の潜在機能を有効に活用するための薬理学的手法を開発することを目的として、以下の3つの課題についての検討を行った。

平成 22 年度： MSC の免疫調節作用における非古典的 HLA クラス Ib 分子の関与についての検討（下嶋、石谷、一戸）

平成 23 年度： In vitro で薬理的に活性化された MSC がヒト CD34 陽性細胞の増幅能に与える影響の検討（三浦、一戸）

平成 24 年度： MSC が造血前駆細胞の B 細胞分化能に与える影響についての検討（三浦、平位、一戸）

B. 研究方法

(MSC の免疫調節機能についての検討)

ヒト骨髄由来 MSC 株は Lonza 社より入手した。RT-PCR 法による HLA クラス Ib (HLA-E, HLA-F, HLA-G) mRNA の検出は国際ワークショップで規定された方法に準拠して行った。HLA-G の ELISA 法による HLA-G の測定には、HLA-G に対する単クローン抗体として、MEM-G/9 および G233（いずれも EXBIO 社）を使用し、種々の濃度に調整した精製 HLA-G 分子を含む検体により検量線の作成を行った。また、HLA-F の細胞表面における発現の検討には、D. Geraghty 博士 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA) より供与された 3 種類の単クローン抗体を用いた。

(MSC が HSPC 増幅能に与える影響についての検討)

SCF、FLT3-ligand、TPO、IL-3 存在下に CD34 陽性細胞と MSC との共培養を行い、CD34 陽性細胞の増幅率を検討した。次いで、あらかじめパラサイロイドホルモン(PTH)により in vitro で機能を賦活化した MSC を用いて同様の検討を行った。

(MSC が B 細胞分化支持能に与える影響についての検討)

骨髄 B 細胞分画の減少が報告されている遺伝子改変マウスより、骨髄 MSC を分離増幅し、その骨分化能・脂肪分化能、B 細胞造血にかかわる液性因

子の産生能等について、正常同系マウスに由来する骨髄 MSC を対照群として比較検討を行った。また、この遺伝子改変マウスに由来する骨髄 MSC と正常同系マウスに由来する c-kit+Sca-1+lineage-細胞(KSL 細胞)の共培養を行い、正常同系マウス由来の骨髄 MSC を支持細胞とした場合と B 細胞分化能の相違を検討した。さらに、この遺伝子改変マウスに由来する骨髄を正常同系マウスに移植し、遺伝子改変マウスに由来する造血幹細胞の正常 MSC 存在下での B 細胞分化能を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」（平成 20 年 7 月 31 日全部改正）に準拠し、京都大学医学部医の倫理委員会・奈良県立医科大学倫理委員会の承認を得て実施された。また本研究における遺伝子組み換え生物を用いた実験は京都大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の承認を得て実施された。また、本研究における動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

1) MSC における HLA-G の発現の検討

RT-PCR 法を用いた MSC における HLA クラス Ib 遺伝子の発現に関する検討を試みたが、HLA-G あるいはその可溶性アイソフォームの mRNA は、今回用いた MSC 株のいずれにおいても検出することはできなかった。一方、HLA-E、HLA-F については mRNA レベルでの発現が確認された。

次いで、定常状態の骨髄由来 MSC 株の培養上清・細胞溶解物中を用いて HLA-G のタンパク質発現を検討したが、いずれにおいても HLA-G タンパクを検出することはできなかった。そこで、HLA-G の発現を亢進させることが報告されている液性因子として IL-10 の存在下で骨髄由来 MSC 株の培養を行ったが、IL-10 添加後 6 日目までの時点における検討では、HLA-G mRNA、HLA-G タンパク質のいずれも検出することはできなかった。

次いで、MSC における HLA-F の細胞表面における発現量を検討するため、成人 T 細胞白血病の細胞株を用いて HLA-F に対する単クローン抗体の検定を行った。成人 T 細胞白血病由来の細胞株においては、HLA-F の細胞表面への発現が確認可能であることが判明したが、MSC 表面におけるその発現の確認には至らなかった。

2) MSC が CD34 陽性細胞増幅能に与える影響についての検討

CD34 陽性細胞と MSC を *in vitro* で共培養すると CD34 陽性細胞分画が約 15 倍に増加した。一方、あらかじめ PTH で刺激した MSC と共培養する CD34 陽性細胞分画が約 24 倍に増加した。一方、CD34 陽性細胞を MSC 非存在下で培養した場合には、約 1.6 倍の増加にとどまった。MSC による CD34 陽性細胞の増幅には MSC の発現するケモカインなどの液性因子と接着分子などの細胞表面分子の双方が関与していたが、PTH 刺激によるその増強効果には接着分子などの細胞表面分子のみが関与していた。

3) MSC が B 細胞分化支持能に与える影響についての検討

骨髄 B 細胞分画の減少が報告されている遺伝子改変マウスに由来する MSC は、正常同系マウスと比較して、骨芽細胞・脂肪細胞への分化能の低下を認め、正常マウスに由来する KSL 細胞の B 細胞分化を障害していることが明らかとなった。また、そのメカニズムの一つとして遺伝子改変マウス由来 MSC においては、stromal cell-derived factor 1 (SDF-1/CXCL12) の発現低下が関与していることが明らかとなった。一方、この遺伝子改変マウスに由来する骨髄を正常同系マウスに移植した場合には、B 細胞分化の異常は認められなかった。

D. 健康危険情報

特記すべきことなし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanda J, Ichinohe T, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Ichiyama S, Uchiyama T. Impact of discontinuing fluoroquinolone prophylaxis after allogeneic marrow or peripheral blood SCT with myeloablative conditioning. Bone Marrow Transplant. 2010; 45(8):1369-1371.
- 2) 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. 2010; 116(8):1369-1376.
- 3) Ichinohe T. Long-term fetal-maternal microchimerism revisited: microchimerism and tolerance in hematopoietic stem cell transplantation. Chimerism. 2010; 1(1):39-43.
- 4) Nagafuji K, Matsuo K, Teshima T, Mori S, Sakamaki H, Hidaka M, Ogawa H, Kodera Y, Kanda Y, Maruta A, Mori T, Yoshida F, Ichinohe T, Kasai M, Takatsuka Y, Kubo K, Sao H, Atsuta Y, Suzuki R, Yoshida T, Tsuchida M, Harada M. Peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors in patients with leukemia: a propensity score-based comparison from the Japan Society for Hematopoietic Stem Cell Transplantation registry. Int J Hematol. 2010; 91(5): 855-864.
- 5) Kanda J, Mizumoto C, Ichinohe T, Kawabata H, Saito T, Yamashita K, Kondo T, Takakura S, Ichiyama S, Uchiyama T, Ishikawa T. Pretransplant serum ferritin and C-reactive protein as predictive

- factors for early bacterial infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2011; 46(2):208-216.
- 6) Sato T, Ichinohe T, Kanda J, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Clinical significance of subcategory and severity of chronic graft-versus-host disease evaluated by National Institutes of Health consensus criteria. *Int J Hematol*. 2011; 93(4):532-541.
 - 7) 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*. 2012; 119(9):2141-2148.
 - 8) Itamura H, Fukushima N, Kondo S, Urata C, Tanaka-Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Hisatomi T, Kubota Y, Sueoka E, Ichinohe T, Kimura S. Successful reduced-intensity umbilical cord blood transplant for fulminant hemophagocytic syndrome in an adult with preexisting rheumatoid arthritis and autoimmune hemolytic anemia. *Leuk Lymphoma*. 2012; 53(11):2307-2309.
 - 9) Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, Nagamura-Inoue T, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda Y; on behalf of the Donor/Source Working Group and HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Unrelated cord blood transplantation vs. related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. *Leukemia*. 2013; 27(2):286-294.
 - 10) Ito T, Akagi K, Kondo T, Kawabata H, Ichinohe T, Takaori-Kondo A. Splenic irradiation as a component of a reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic cell transplantation in myelofibrosis with massive splenomegaly. *Tohoku J Exp Med*. 2012; 228(4):295-299.
 - 11) Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kanda Y; HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of the direction of HLA mismatch on transplantation outcomes in single unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013; 19(2):247-254.
 - 12) Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Yamashita K, Ichinohe T, Ishikawa T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Differing impacts of pre-transplant serum ferritin and C-reactive protein levels on the incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2013; 97(1):109-116, 2013.
 - 13) Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Maeda Y, Ichinohe T, Ohashi K, Fukuda T, Koichi Miyamura K, Iida H, Mori T, Iwato K, Eto T, Kawa K, Morita S, Morishima Y. Impact of a single HLA allele mismatch on the outcome of unrelated bone marrow transplantation over two time periods. A retrospective analysis of 3003 patients from the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol* [Epub 2013 Mar 4]

2. 学会発表

- 1) 下嶋典子、吉岡 聡、菱澤方勝、大森勝之、Geraghty DE、一戸辰夫、石谷昭子. 成人 T 細胞白血病ウイルス感染細胞株における HLA-F の発現解析. 第 19 回日本組織適合性学会、東京、2010 年 9 月 17-19 日.
- 2) 吉岡 聡、一戸辰夫、下嶋典子、菱澤方勝、大森勝之、Geraghty DE、石谷昭子、高折晃史. 成人 T 細胞白血病ウイルス感染者の T 細胞表面における HLA-F の発現についての検討. 第 20 回日本組織適合性学会、静岡、2011 年 8 月 28-30 日.
- 3) 吉岡 聡、一戸辰夫、下嶋典子、菱澤方勝、大森勝之、Geraghty DE、石谷昭子、高折晃史. 成人 T 細胞白血病ウイルス感染者の末梢血 T 細胞における HLA-F の表面発現分画についての検討. 第 21 回日本組織適合性学会、東京、2012 年 9 月 15-17 日.
- 4) Ichinohe T. Microchimerism-associated tolerance to noninherited maternal antigens (NIMAs) reduces severity of GVHD after MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation by a CD4+CD25+ T-cell-dependent mechanism. The 16th Annual Summer Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation. Busan, Korea, August 19, 2011.
- 5) Ichinohe T. Emerging roles of non-inherited maternal alloantigens (NIMAs) and inherited paternal alloantigens (IPAs) in HLA-mismatched hematopoietic cell transplantation. The Joint Meeting of the 17th International Symposium on Gnotobiology and the 34th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease. Yokohama, Japan, November 21, 2011.
- 6) Iida M, Kanda Y, Toubai T, Nakase K, Mitamura M, Kanda J, Fukuda T, Miyamura K, Kanamori H, Mori T, Iida H, Atsuta Y, Morishima Y, Sakamaki H, Ichinohe T: on behalf of the Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Foreign Donors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Foreign Donors: Current Status in Japan. 16th Congress of Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation, October 30-31, 2011, Sydney, Australia.
- 7) Ichinohe T, Iida M, Kanda Y, Kimura F, Toubai T, Nakase K, Mitamura M, Kanda J, Fukuda T, Miyamura K, Kanamori H, Mori T, Iida H, Atsuta Y, Morishima Y, Sakamaki H; Hematopoietic Stem Cell Transplantation from Foreign Donors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Outcomes of hematopoietic cell transplantation from overseas unrelated donors are comparable to bone marrow or cord blood transplantation from domestic unrelated donors: a retrospective matched-pair cohort Study. 17th Congress of Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation, October 26-28, 2012, Hyderabad, India.
- 8) Ichinohe T, Kanda J, Inagaki J, Inoue M, Koh K, Kikuta A, Yabe H, Tanaka J, Atsuta Y, Kanda Y; on behalf of the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. Impact of parental donor type on outcomes after HLA-matched and HLA-mismatched T-cell-replete hematopoietic cell transplantation for patients with leukemia: A retrospective cohort study. 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, U.S.A. December 9, 2012.

- 9) Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Hayashi Y, Tamura A, Ichinohe T, Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T. Expression of C/EBP in bone marrow mesenchymal stem cells is mandatory for early stage B cell lymphopoiesis. The 54th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Atlanta, U.S.A., December 10, 2012.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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）
研究年度終了報告書

灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法の安全性、
有用性を目指した研究

分担研究者 小川 啓恭（兵庫医科大学 内科学講座血液内科 教授）

研究要旨

灌流法による骨髄細胞の採取とそれを用いた骨髄内骨髄移植は、サルなどの動物実験のデータから、通常の骨髄移植と比べて、移植片の骨髄への生着率の飛躍的な向上、移植片対宿主病発症率の低下など、様々な利点が考えられた。本研究では、この治療法のヒトへの応用に際して、その安全性、有用性の検討を行った。灌流法による骨髄細胞の採取を、2例で実施したが、通常の吸引法による骨髄採取と比べて、赤血球の混入が多い、採取した細胞成分に差がないという結果であった。したがって、灌流法による骨髄細胞の採取法の技術面の改善が必要という結論である。一方、採取した骨髄細胞を骨髄内移植するためには、赤血球を除去し、20-24ml に濃縮して移植を行う必要があり、この骨髄内移植の後半部分の研究を同時に進める必要がある。

A. 研究目的

関西医科大学、池原らによって考案された「灌流法による骨髄細胞の採取とそれを骨髄内に移植するという新しい骨髄移植法」は、膨大な量の動物実験データより、その有効性が示唆されている。たとえば、灌流法による骨髄細胞の採取は、1) 末梢血の混入が少なく、その結果、移植片対宿主病(graft-versus-host disease=GVHD)を惹起する T 細胞の混入が少ない、2) 通常の吸引法に比べて、赤血球の混入が少なく、遠心法のみで骨髄細胞浮遊液の容積を大幅に減らすことができること、また、骨髄内への移植は、静脈内への移植に比べて、3) 造血幹細胞が高率に骨髄へ生着することが期待されること、4) 骨髄は、免疫が抑制された環境にあるため、GVHD が少なく、MHC 不適合移植片でも許容される可能性があることなどの有用性が示されている。しかし、ヒトでの安全性および有用性は不明である。したがって、本研究は、この新規移植法のヒトにおける安全性と有効性を検討することを目的にした。

同時に、骨髄内に移植片を直接投与することの安全性を検討する目的で、骨髄内臍帯血移植を行った。

B. 研究方法

「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法」の臨床研究に関して、対象患者は、慢性骨髄性白血病（第 2 慢性期以降）、急性骨髄性白血病（初回寛解期を除く）、急性リンパ性白血病（初回寛解期を除く）、骨髄異形成症候群(IPSS で intermediate-II または high)、悪性リンパ腫（治療抵抗性も低悪性度リンパ腫、化学療法抵抗性の中等度リンパ腫、初回寛解期を除いた高悪性度リンパ腫）とした。ただし、白血病においては、芽球 30%以下の症例を対象とした。患者年齢は、12 歳以上 65 歳以下とした。患者の performance status は、ECOG の基準で 0-1 とした。ドナーは、血縁ドナーとし、HLA 適合または、GVH 方向 3 抗原不適合までのドナーとした。関西医科大学で、灌流法による骨髄採取を行い、それを兵庫医科大学に運び、患者に移植を行うこととした。

臨床第 I 相試験では、安全性の検討を行うこととした。ドナーに関する主要評価項目は、「灌流法による骨髄採取に伴う安全性」、レシピエントに対しては、「骨髄内投与法(骨髄内骨髄移植)の安全性」とした。

一方、骨髄内骨髄移植の安全性/有用性を検討する目的で、「骨髄内臍帯血ミニ移植」の臨床研究を別途行った。対象患者は、骨髄線維症を除外することを除いて、上記と同様の対象患者である。方法は、通常通りの fludarabine+cyclophosphamide+TBI の前処置を行った患者に対して、臍帯血ユニットを解凍し、4 分割して、腸骨に輸注した。

(倫理面への配慮)

「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法」のプロトコールは、関西医科大学と兵庫医科大学の倫理委員会で承認された。患者とドナーから、書面による informed consent を得た後、試験は実施された。移植の前処置が開始されるまでであれば、いつでも患者の自由意思で撤回することが可能であった。また、試験結果が公表される際は、患者個人が特定できないように、匿名化がなされるなど、ヘルシンキ宣言に基づいて、試験は実施された。

C. 研究結果

灌流法による骨髄採取を 2 例施行した。骨髄細胞の採取に際しては、左右の腸骨で、採取される細胞成分に関して、灌流法による骨髄採取と通常の吸引法による骨髄採取を比較検討した。その結果、CD34 陽性細胞率、T 細胞の混入率において、両者の間で差を認めなかった。さらに、灌流法による骨髄採取においては、赤血球の混入率が高く、プロトコールに記載されているように、遠心分離法による血球成分の濃縮だけでは、骨髄内骨髄移植に用いることができなかった。このため、同時並行で、前処置を行っていた患者に対しては、吸引法で採取した

骨髄を、通常の方法に準じて、静脈内へ輸注することにより、移植を行った。

2 例の灌流法による骨髄採取の経験から、採取される細胞成分において、灌流法と吸引法とで、差を認めなかったことから、灌流法による骨髄採取の手技において、改良を加える必要があることが判明した。また、赤血球の混入が多いことから、灌流法で採取した後、赤血球を除去する行程が必要なことが判明した。骨髄内に移植した骨髄移植を、骨髄腔内に留め置くためには、骨髄内臍帯血移植の経験から、両側腸骨の 4 か所に、注入するとして、1 か所当たり、5-6 ml の volume に抑える必要がある。したがって、容量として、20-24 ml 以内に採取した骨髄細胞を濃縮する必要がある。

骨髄内臍帯血ミニ移植に関しては、予定していた第 I 相試験の 10 例を終了した。肺塞栓を含めて、1 例も有害事象を認めなかった。この結果については、論文報告を行った(Biology of Blood and Marrow Transplantation, 18; 633-639, 2012)。現在、第 II 相試験として、生着率の改善が得られるかという有用性の検討に入っている。

結論として、上記の問題点を解決するため、1) 灌流法による骨髄採取の手技を改善すること、2) 幹細胞を失うことなく、赤血球を除去する方法の開発を合わせて進める必要がある。灌流法による骨髄採取法が完成した後に、スムーズに骨髄内骨髄移植ができるように、通常の吸引法で採取した骨髄細胞を濃縮し、それを骨髄内へ移植する部分の開発を同時に行う必要がある。さらに、灌流法で採取した骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植法の有用性を証明するためには、吸引法で採取した骨髄細胞と比較する必要がある、そのためにも、この研究は重要と考える。

D. 健康危険情報

灌流法による骨髄採取において、合併症は認められなかった。