

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究
平成 25 年度分担研究報告書

HLA 不適合造血幹細胞移植後の免疫再構築に関する研究

研究分担者 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 鈴木隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
大島久美 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 講師

研究要旨：近年、抗体医薬品による in vivo T 細胞除去術や移植後大量シクロホスファミドなどの新規技術の開発により、HLA 不適合血縁者間造血幹細胞移植の安全性は飛躍的に向上している。しかし、HLA 不適合血縁者間移植後の免疫系の再構築が、従来の移植法と比較してどのような特徴を有しているのかについては、まだ十分な知見が得られていない。本研究では、HLA 不適合造血幹細胞移植後に発生するさまざまな免疫学的合併症を高い精度で予測し、それらの合併症に対する医学的介入を適切なタイミングで実施することを可能とすることを旨として、次世代シーケンサーによる網羅的な免疫再構築解析技術の開発を試みた。

A. 研究の背景と目的

近年、抗体医薬品による in vivo T 細胞除去術や移植後大量シクロホスファミドなどの新規技術の開発により、HLA 不適合血縁者間造血幹細胞移植の安全性は画期的な向上を遂げている。しかし、HLA 不適合血縁者間移植後の移植片対宿主病(GVHD)、移植片対白血病(GVL)効果や感染症の制御、不適合 HLA に対するトランスなどにかかわる免疫系の再構築が、HLA 適合血縁者・非血縁者からの移植と比較してどのような特徴を有しているのかについては、まだ十分な知見が得られていない。HLA 不適合造血幹細胞移植後に発生するさまざまな免疫学的合併症を高い精度で予測する技術が開発され、それらの合併症に対する医学的介入を適切なタイミングで実施することが可能となれば、移植成績のさらなる向上に

寄与することが予測される。

そこで、本研究では、造血幹細胞移植後の免疫再構築過程の俯瞰的かつ再現性の高い解析を可能とするために、末梢血中に含まれる T 細胞・B 細胞のレパトリーを高速 DNA シーケンサーを用いて網羅的かつ定量的に決定する技術の開発を試みた。

B. 研究方法

T 細胞受容体(TCR)、B 細胞受容体(BCR)の相補性決定領域(CDR3 領域)遺伝子配列を、アダプターライゲーション PCR を用いて非バイアス増幅を行った後に、再度 PCR 増幅による DNA 断片の精製を行い、高速シーケンサーを用いて網羅的かつ定量的に同定する技術を開発した。

C. 研究結果

現在、上記の方法を用いて被験検体中に含まれる TCR, BCR の CDR3 領域配列を決定するための予備的な実験を実施中であり、移植後の免疫再構築の解析に応用するための研究プロトコルを「疫学研究に関する倫理指針」(平成 20 年 12 月 1 日一部改正版)に準拠して作成中である。

D. 考察 E. 結論

現在、造血幹細胞移植後の免疫再構築のモニタリング方法としては、細胞生物学的あるいは分子生物学的な手法による特定のリンパ球集団の経時的追跡や T 細胞受容体のレパトワ解析などが用いられている。しかし、これらの方法は煩雑で時間を要するため、臨床現場におけるリアルタイムの意思決定には有用ではない上に、すべての細胞集団を捕捉するための網羅性や再現性などの点に課題が残されている。次世代シーケンサーを用いた TCR レパトワの同定は、網羅性・定量性・再現性のいずれにおいても従来の方法よりすぐれていることが期待され、移植後の免疫再構築の解析にきわめて有用なツールとなり得ると考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき内容はない。

G. 研究発表

論文発表

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.* 161:566-577, 2013.

Hirokawa M, Fukuda T, Ohashi K, Hidaka M, Ichinohe T, Iwato K, Kanamori H, Murata M, Sakura T, Imamura M, Adachi S, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H; PRCA Collaborative Study Group. Efficacy and long-term outcome of treatment of pure red cell aplasia after allogeneic stem cell transplantation from major ABO-incompatible donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19:1026-32, 2013.

Miura Y, Yoshioka S, Yao H, Takaori-Kondo A, Maekawa T, Ichinohe T. Chimerism of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation: is it clinically relevant? *Chimerism.* 4:78-83, 2013.

Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Satake S, Hayashi Y, Tamura A, Hishita T, Ichinohe T, Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T. C/EBP β expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells regulates early B-cell lymphopoiesis. *Stem Cells.* 32:730-740, 2014.

Yoshihara M, Itamura H, Fukushima N, Itoh M, Furukawa K, Nagatomo D, Kamachi K, Kitamura H, Shindo T, Kubota Y, Sueoka E, Morita S, Ichinohe T, Kimura S. Therapeutic

management in cardiac lymphoma. *Leuk Lymphoma*. (in press)

Yao H, Miura Yoshioka S, Miura M, Hayashi Y, Tamura A, Iwasa M, Sato A, Hishita T, Higashi Y, Kaneko H, Ashihara E, Ichinohe T, Hirai H, Maekawa T. Parathyroid hormone enhances hematopoietic expansion via upregulation of cadherin-11 in bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. (in press)

学会発表

Ichinohe T. The expanding role of long-term fetal/maternal microchimerism in allogeneic hematopoietic cellular therapy. Symposium on chimerism, Graz, Austria, May 30, 2013.

H . 知的財産権の出願状況

準備中。

