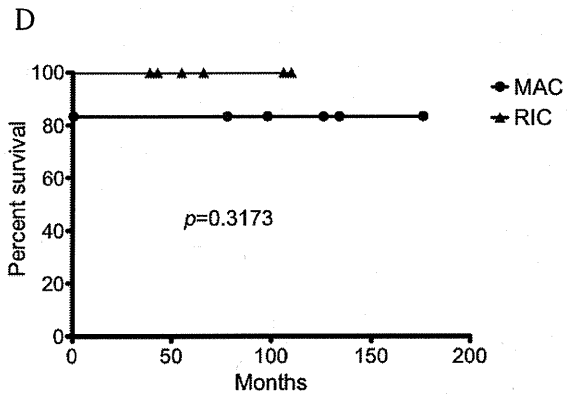
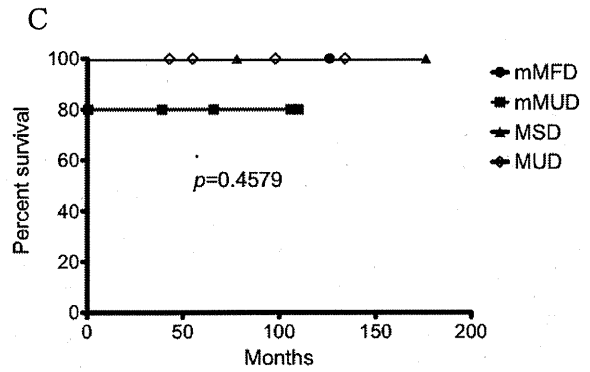
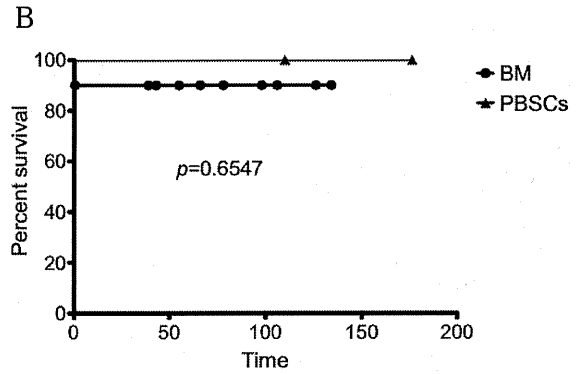
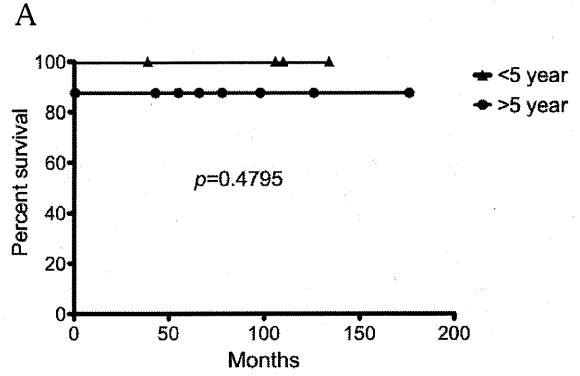


【図3】 A: 発症時年齢 (3歳未満対3歳以上)、B: 低ガンマグロブリン (Hypogamma) 血症の有無、C: 家族歴 (FH) の有無 による群間の比較

(iii) 移植の条件による予後

移植の条件として、移植時年齢 (図 4A)、移植に用いた造血幹細胞のソース (図 4B)、造血幹細胞のドナー (図 4C)、移植前処置 (図 4D) による移植後生存率の比較を行なったが、症例数が少なく群間に統計学的に有意な差があるかどうかの検討は困難と考えられた。

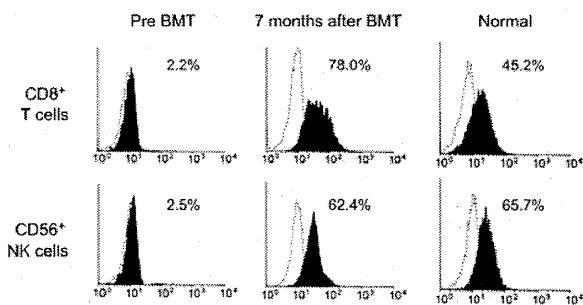


【図4】 A: 移植時年齢 (5歳未満対5歳以上)、B: 造血幹細胞のソース、C: 造血幹細胞のドナー、D: 移植前処置 による群間の比較

BM: 骨髄血、PBSC: 末梢血幹細胞、MSD: HLA 適合同胞ドナー、MUD: HLA 適合非血縁ドナー、mMFD: HLA 非適合家族内ドナー、mMUD: HLA 非適合非血縁ドナー、MAC: 骨髄破壊的前処置、RIC: 骨髄非破壊的前処置

(iv) 移植合併症

移植を受けた 12 例中、1 例が生着前に緑膿菌による感染症により死亡した。残り 11 例はドナーキメラリズムを保って生存している (観察期間中央値 7 年 9 か月)。6 例 (55%) に急性 GVHD (移植片対宿主病) が発症し、5 例 (45%) に慢性 GVHD が発症した。フローサイトメリーによる免疫細胞数の評価ができた症例では、CD8 陽性 T 細胞と NK 細胞における SAP 蛋白の発現は正常化していた (図 5)。



【図 5】 移植前後での CD8 陽性 T 細胞と NK 細胞における SAP 蛋白の発現の変化

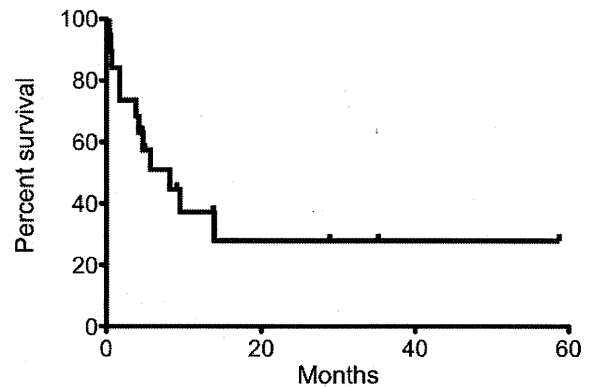
代表的な症例での CD8 陽性 T 細胞と NK 細胞における SAP 蛋白の発現の変化を示した。それぞれのリンパ球において、移植前にはほとんど発現のなかった SAP 蛋白が移植後 7 か月で正常対照と同等の発現を認めるようになっている。

2) XLP2 についての研究結果

(i) XLP2 の移植後生存率

XLP2 の症例に対して造血幹細胞移植を行った症例について国際調査を行い、19

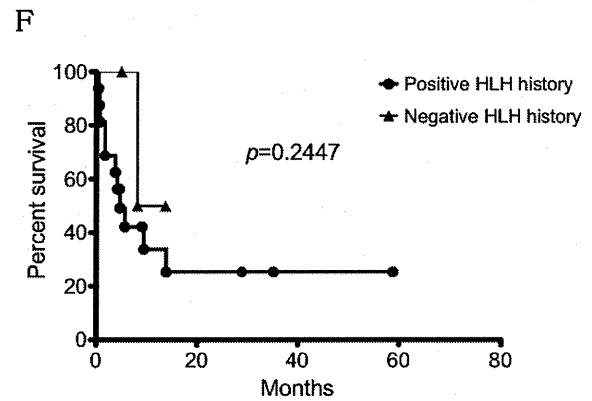
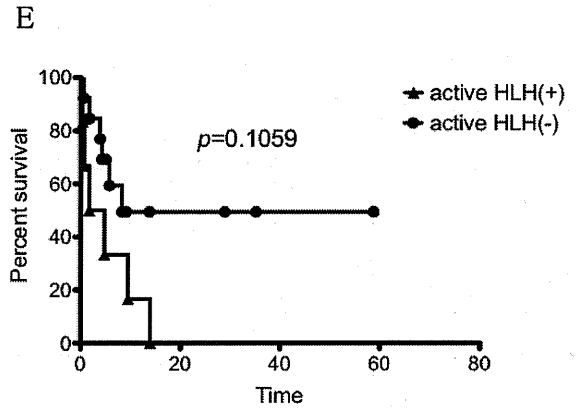
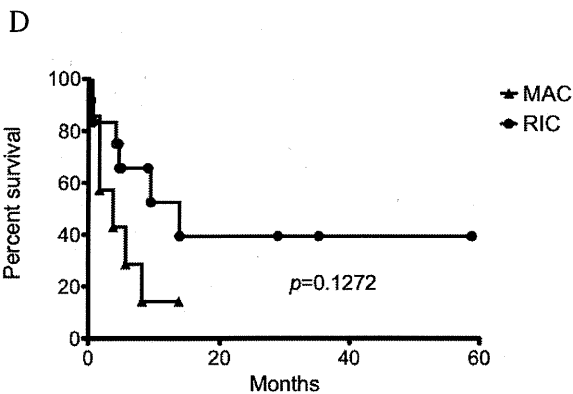
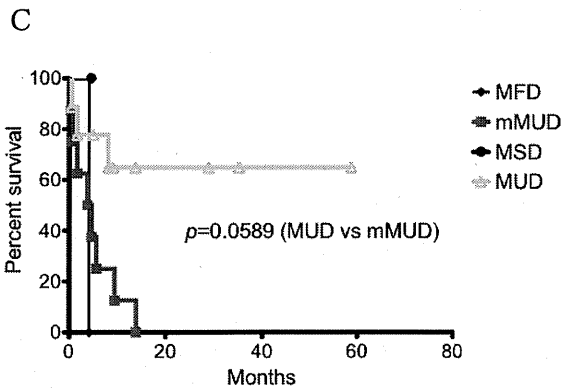
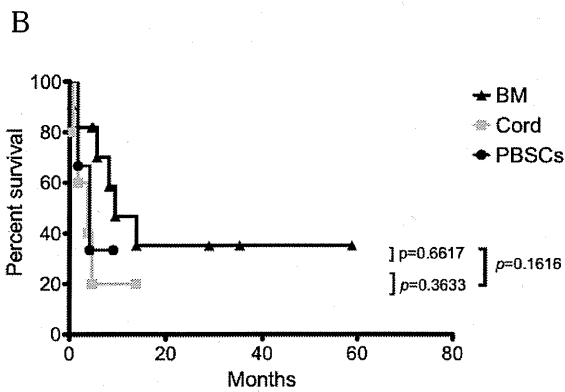
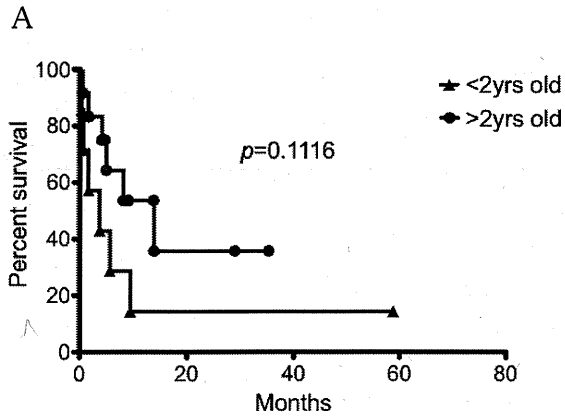
症例を見いだした。このうち移植後現在まで生存しているのは 7 例 (36.8%) であった。図 6 にこれらの症例についての生存曲線を示した。生存期間中央値は 8.2 か月であった。



【図 6】 XLP2 移植症例の全生存率

(ii) 移植の条件による予後

移植の条件として、移植時年齢 (2 歳未満対 2 歳以上) (図 7A)、移植に用いた造血幹細胞のソース (図 7B)、造血幹細胞のドナー (図 7C)、移植前処置 (図 7D)、移植時活動性血球貪食症候群の有無 (図 7E)、移植前血球貪食症候群既往の有無 (図 7F) による移植後生存率の比較を行なった。症例数が少なく群間に統計学的に有意な差を指摘することはできなかったが、移植時年齢 2 歳以上、移植細胞の HLA6 座以上一致、骨髄非破壊的前処置、移植時活動性の血球貪食症候群に罹患していないこと、の条件が満たされた場合に移植後の経過が相対的に良好となる傾向が示された。



【図 7】 移植の条件による予後の違い (A: 移植時年齢, B: 造血幹細胞のソース, C: 造血幹細胞のドナー, D: 移植前処置 による群間の比較, E: 移植時の活動性血球貪食性リンパ組織球症 [HLH] の有無, F: HLH の既往の有無)

BM: 骨髄血、PBSC: 末梢血幹細胞、Cord: 臍帯血、MSD: HLA 適合同胞ドナー、MUD: HLA 適合非血縁ドナー、mMFD: HLA 非適合家族内ドナー、mMUD: HLA 非適合非血縁ドナー、MAC: 骨髄破壊の前処置、RIC: 骨髄非破壊の前処置、HLH: 組織球性リンパ増殖症候群 (血球貪食症候群)

D. 考察

昨年の報告でも指摘した通り、XLP1・XLP2 の症例では移植を行なわなかった場合の予後は極めて不良であり、条件が整えば移植を行なうことが強く推奨される。今回の検討によって、XLP1 については 3 歳未満の症例と低ガンマグロブリン血症のある症例の予後は不良であり、これらの条件を

満たした場合の造血幹細胞移植は早期に行なう必要が示唆された。今回のコホートでの症例数の制約により望ましい移植の条件については統計学的に意味のあるデータが十分得られなかったが、海外での報告によれば (i) HLA 一致同胞からの (ii) 活動性の HLH のない時期の移植が望ましいが、前処置（骨髄破壊的前処置か骨髄非破壊的前処置か）による差は見られていなかった。以上については、今後前方視的臨床研究により日本人についても同じ所見が得られるかどうかについて検証することが課題であると考えられる。

XLP2 では XLP1 の場合と比較して移植に伴う合併症が多く観察されているが、(i) 移植時年齢 2 歳以上 (ii) 移植細胞の HLA6 座以上一致 (iii) 骨髄非破壊的前処置 (iii) 移植時活動性の血球貪食症候群に罹患していないこと、が移植後の経過について良好な条件となる可能性が示唆された。この知見が XIAP の欠失による生物学的現象かどうかについては、今後の基礎的研究の進展を待つ必要がある。

以上により、XLP1・XLP2 の治療において造血幹細胞移植は欠くことのできない位置を占めることが確認されるとともに望ましい移植の変数として複数の要素が抽出されたが、移植の為の最適の条件を同定するための前方視的臨床試験と病態生理についての基礎的研究が今後の課題となると考えられる。

E. 結論

(1) XLP1 については、適当なドナーが存在する場合は、造血幹細胞移植を積極的に行うべきである。現時点では各

施設の条件を勘案してドナー選定・前処置についての判断を行なっても許容される。

- (2) XLP2 については、現時点では骨髄非破壊的前処置による移植が推奨される。
- (3) いずれの疾患の移植についても、日本人について造血幹細胞移植を行った例についての臨床情報の蓄積が十分ではない為、今後行われる移植について調査の継続が必要である。
- (4) XLP1, XLP2 の病態生理についての基礎的研究に、積極的に援助を行なう必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Marsh RA, Rao K, Satwani P, Lehmsberg K, Müller I, Li D, Kim MO, Fischer A, Latour S, Sedlacek P, Barlogis V, Hamamoto K, Kanegane H, Milanovich S, Margolis DA, Dimmock D, Casper J, Douglas DN, Amrolia PJ, Veys P, Kumar AR, Jordan MB, Bleesing JJ, Filipovich AH. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: an international survey reveals poor outcomes. *Blood*, 121:877–83, 2013.
- 2) Wada T, Kanegane H, Ohta K, Katoh F, Imamura T, Nakazawa Y, Miyashita R, Hara J, Hamamoto K, Yang X, Filipovich AH, Marsh RA, Yachie A. Sustained elevation of serum interleukin-18 and its association with hemophagocytic lymphohistiocytosis in XIAP deficiency. *Cytokine*, 65:74–8, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植法の確立に関する研究

研究分担者 今井耕輔

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
小児・周産期地域医療学講座 准教授

研究協力者 水谷修紀、森尾友宏、高木正稔、富澤大輔、青木由貴、
小林千佳、宮脇零士

東京医科歯科大学小児科
梶原道子

東京医科歯科大学医学部附属病院輸血部

研究要旨

本年度は、2例の ELA2 異常症、1例の STAT1 異常症、1例の NEMO 異常症に対して、造血幹細胞移植を行った。STAT1 異常症の1例は致命的マクロファージ活性化症候群により、3回の移植と集中治療の甲斐なく不幸な転帰となった。2例の ELA2 異常症に対する臍帯血移植では、1例は拒絶後血縁者間半合致移植で救命が可能であり、1例は重症 GVHD を来したが、現在免疫抑制剤にてコントロール中である。NEMO 異常症についても、骨髄非破壊的前処置により、重度の感染症を来すことなく、生着が得られた。今後、昨年までの移植例とともに晩期障害についての検討が必要である。

重症複合免疫不全症患者に対する造血幹細胞移植のデータ解析を行い、日本における臍帯血移植の有効性、安全性について検討した。140例の移植が行われており、特に移植前の遺伝子診断と前処置法、キメリズム解析法の標準化と前向き観察試験が必要であると考えられた。

A. 研究目的

当科では、原発性免疫不全症の中で自然経過が不良である病型、特に細胞性免疫不全症患者に対して、その根治療法として、造血幹細胞移植(骨髄移植、臍帯血移植)を行っており、これまでの総数は62例で生存例は40例である(64.5%)。内訳は、重症複合免疫不全症(SCID)18例、Wiskott-Aldrich症候群15例、CD40L欠損

症9例、慢性活動性EBV感染症5例、その他15例である。

本年度は、ELA2異常症2例、STAT1異常症1例、NEMO異常症1例に対して、造血幹細胞移植を行った。

また、造血細胞移植学会を母体とした統合データベース TRUMP のデータ解析により、国内における重症複合免疫不全症の成績について解析した。

B. 研究方法

ELA2 遺伝子異常を持つ 2 例の患者、STAT1 異常をもつ 1 例の患者、NEMO 異常を持つ 1 例の患者について、HLA1 座不一致臍帯血、HLA 一致非血縁者骨髄を用い、欧州骨髄移植学会プロトコール B(フルダラビン 180mg/sqm、ブスルファン 16mg/kg、抗胸腺グロブリン：ATG 5-10mg/kg)を前処置として移植を行った(図 1:25 ページ参照)。生着不全の場合、代替ドナーとして、HLA0-1 座不一致臍帯血あるいは血縁 HLA 半合致骨髄を用いて移植を行った。

TRUMP データについては、一元化委員会の許可の元、SCID についての成績を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京医科歯科大学、および防衛医科大学校倫理審査委員会承認を得られた研究計画に基づいて行われた。

C. 研究結果

ELA2 欠損症については、1 例(3 歳、男児)は重症 GVHD を呈し、1 例(2 歳、男児)は拒絶後重症 GVHD を呈したが、どちらの症例もタクロリムス、プレドニン、ミコフェノール酸、リツキサシ、シクロフォスファミド、を組み合わせることによりコントロールが可能になり、生着し、安定した好中球数を保つことが可能となった。

B 細胞欠損、パルボウイルス感染症後赤芽球癆、頻回血球貪食症候群を呈した STAT1 異常症患者(9 歳、男児)に対して、HLA 一致非血縁者間骨髄移植を行ったが、移植後血球貪食症候群を呈して拒絶され

た。緊急で、前処置後非血縁臍帯血移植を行ったが、血球回復時に再度血球貪食症候群となり拒絶された。その後、重症アデノウイルス感染症に罹患し、救済として、父からの HLA 半合致移植を行ったが、血球回復時に重症の毛細血管漏出症候群(CLS)を呈し、多臓器不全にて亡くなった。アデノウイルス感染症に対して、学内の倫理委員会の承認後、家族への説明・同意の後、未承認薬であるシドフォビルの投与を行ったが、白血球減少、CLS 状態であったためか、十分な効果は得られず、腎不全となり、腹膜透析を余儀なくされた。

播種性 BCG 感染症、重症 MAC 感染症を既往とする NEMO 異常症の 1 例(12 歳、男児)に対して、HLA 一致非血縁者間骨髄移植を行った。前処置後に何度か CRP 上昇を伴う発熱も見られた。白血球減少時のものは、細菌感染症だった可能性もあるが、有意な培養結果は得られず、抗生物質投与で軽快した。抗結核薬併用を行っており、抗酸菌感染症は見られなかった。

TRUMP データベースを用いて、1974 年から 2010 年までの SCID に対する造血幹細胞移植について検討した。140 例に対して移植が行われ、72 例が初回移植後生存しており、58 例が死亡していた。2 回以上の移植を 10 例に施行しており、5 例が生存していた。 γ C 鎖をコードする IL2RG 遺伝子異常による X 連鎖性 SCID が約 50% を占めることもあり、75% が男児であった。ドナーとしては、1/3 が血縁一致、1/3 が血縁不一致で、1/3 が臍帯血であった。年代があがるにつれ、臍帯血移植の割合が増え、血縁不一致移植の割合が減っていた。5 年生存率は 56.6% であり、諸外国での検討と同程

度であった。特に1年以内の生存率は年代を追う毎に改善しており(49.3%→84.6%)移植技術の向上が窺われた。3ヶ月未満の乳児期の移植は100%の成功率であり、今後、新生児マススクリーニングの導入により、重症感染症前の発見を行うことで、予後の飛躍的上昇が見込めると考えられた。

D. 考察

ELA2 異常症に対する非血縁者間臍帯血移植は、国内で4例に対して施行されており、3例で生着が得られていたため、HLA一致骨髄ドナーの得られない2症例で臍帯血移植を行った。GVHD予防、拒絶予防に有効とされるATGではあるが、今回は重症GVHD、拒絶ともに見られており、臍帯血移植での本剤の使用の問題点が明らかになった。今後の臍帯血移植症例に対しては、ATG非使用により施行したい。

STAT1 異常症に対する骨髄移植では、類似症例が国内、海外で報告されており、本疾患に対する移植の困難さ、治療法の開発が急務であると考えられた。また、今回は効果不十分であったが、アデノウイルス感染症に対する唯一の治療薬である、シドフォビル[®]の投与を行った。本治療薬については、各学会から承認の要望が出ているが改めてその必要性を感じた。

NEMO 異常症に対する造血幹細胞移植は、世界調査にて22例が施行されていることが明らかとなっている(Picard, et al.未発表データ)。その中では、骨髄破壊的に近いブスルファンを用いた例での成功が見られた。このため、EBMTプロトコールBを用いたところ、粘膜障害も軽微であり、生着も

速やかに得られた。今後、NEMO 異常患者に対して症例を重ねて行きたい。

SCID に対する移植は諸外国と遜色のない数を行っており、また成績も悪くはないことが明らかになった。今後は米国で導入されている新生児マススクリーニングを日本にも導入し、また英米仏伊で行われている遺伝子治療の導入により、さらなる予後の向上を図ることが望ましいと考えられた。

E. 結論

原発性免疫不全症に対する移植法については、前処置法、GVHD 予防法、感染症に対する予防および治療法、移植後マクロファージ活性化症候群のコントロール、晩期合併症の対策など、改善の余地は多々ある。国内未承認薬の問題も大きく、継続して、研究を重ね、患者の予後改善に寄与するべきと考えられる。

国内 SCID 患者に対する造血幹細胞移植のデータ解析からは、日本における臍帯血移植の有効性、安全性について明らかになった。しかし、混合キメラになった例や、遺伝子型によっては不幸な転帰を取っている例もあり、前処置法の検討、キメリズム解析法の標準化と前向き観察試験が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, Ariga T, Santisteban I, Hershfield MS, Miyawaki T. Successful bone marrow transplantation with

reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Transplant.* (2013).17.E29-E32.

2. 学会発表

(海外)

- 1) Imai K. SCT for SCID—Japanese experience. ESID/EBMT Inborn Errors Working Party Conference. Leiden, Netherlands .15th Sep .2013. 学会発表資料添付 (P26-29)

(国内)

- 1) 小林千佳、宮脇零士、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、今井耕輔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀. 重症先天性好中球減少症(ELANE変異)に対する非血縁者間同種臍帯血移植. 第19回小児HSCT研究,2013年10月25日,東京.
- 2) 渡辺恵理,渡辺信和,森尾友宏,今井耕輔,阿部泰子,工藤寿子,糸洲倫江,原寿郎,中内啓光. 原発性免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植後の混合キメリズムの解明と治療法の開発. 医科研共同研究成果報告会,2013年3月11日,東京.
- 3) 関中佳奈子,今井耕輔,梶原道子,富澤大輔,長澤正之,森尾友宏,水谷修紀,野々山恵章.CD40リガンド異常による高IgM症候群に対する造血細胞移植療法についての後方視的検討. 第35回日本造血細胞移植学会総会.2013年3月9日,金沢.
- 4) 今井耕輔, 国内SCID140症例の造血幹細胞移植成績について. 第6回日本免疫不全症研究会(一般口演). 2013年1月26日,品川.
- 5) 大川哲平,小林千佳,手束真理,満生紀子,磯田健志,富澤大輔,今井耕輔,高木正稔,梶原道子,長澤正之,森尾友宏,水谷修紀. 多彩な皮膚粘膜症と血球減少、複合型免疫不全を呈し、非血縁臍帯血移植に至ったSTAT1異常症の1例.第35回日本造血細胞移植学会総会.2013年3月9日,金沢.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Reduced Intensity Conditioning

PROTOCOL	CHEMOTHERAPY	SEROTHERAPY	GVHD PROPHYLAXIS
B	Busulfan (iv) (AUC dosing) ² Fludarabine 180 mg/m ²	[†] Campath 1H (TD 0.6-1mg/kg) OR ^{††} ATG (TD 7.5-10mg/kg)	CyA or CyA + MMF or MTX (as 2 nd agent)
C	Fludarabine 150 mg/m ² Melphalan 140 mg/m ²	Campath 1H (TD 0.6-1mg/kg)	CyA or CyA/MMF
D	Treosulphan 42 g/m ² Fludarabine 150 mg/m ²	None or Campath 1H(0.6-1mg/kg)	CyA or CyA/MMF

²AUC dosing for iv Bu -- 60+- 5 mg*hr/L (see appendix for specific protocols for different donor sources and dosing)
 Avoid Melphalan 140mg/m² < 1 year of age unless HLH
 Treosulphan 36g/m² < 1 year of age (see appendix for specific protocols)
 If using ATG with protocols C or D – be aware of increased incidence of EBV-PTLD
 For these protocols if using matched UD or MFD – PBSCs are stem cell source of choice
 If using BM consider decrease in Campath 1H dose to 0.6mg/kg esp if condition requires full donor chimaerism as in WAS or MHC class II deficiency

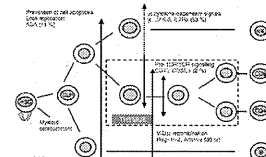
図1: 欧州骨髓移植学会先天性疾患作業グループ推奨骨髓非破壊的前処置法

Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in Japan: 1974-2010

Kohsuke Imai¹⁾, Yasuo Horikoshi²⁾, Koji Kato³⁾, Hiromasa Yabe⁴⁾, Shigeaki Nonoyama⁵⁾, and Tomohiro Marito¹⁾
¹⁾ Department of Pediatrics, Tokyo Medical and Dental University, Japan
²⁾ Division of Hematology and Oncology, Shizuoka Children's Hospital, Japan
³⁾ Division of Hematology/Oncology, Children's Medical Center, Japanese Red Cross Nagoya First Hospital, Japan
⁴⁾ Department of Cell Transplantation and Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine, Japan
⁵⁾ Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Japan

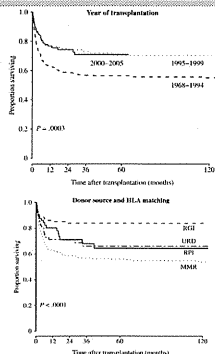
Severe combined immunodeficiency (SCID)

- Primary combined (cellular and humoral) immunodeficiency due to the defect of T cell neogenesis
- Prevalence: approximately: 1/25000~50000 (20~40 in a year in Japan)
- Phenotype : T-B+NK-, T-B-NK+, T-B+NK+
- Responsible genes >20
 - IL2RG (γ c: XSCID), JAK3, IL7RA, RAG1, RAG2, Artemis, Cernunnos, LIG4, CD45, CD3D, CD3E, ADA etc.
- Fatal during infant period without HSCT
- Newborn screening using TREC is started in US



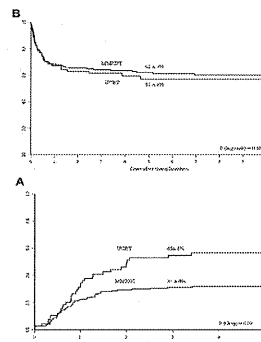
SCID-HSCT evidence @Europe

- Gennery, et al. *J Allergy Clin Immunol*, 2010
- Data from SCETIDE database of ESID/EBMT for HSCT for PID, 37 centers
- 699 SCID
- OS: <1995: 56% vs >1995: 71%
- CD34+ HSCT from haplo donor is improved recently
- Cord blood transplantation is limited
- B(-)SCID is worse than B(+)-SCID
- Conditioning did not affect survival



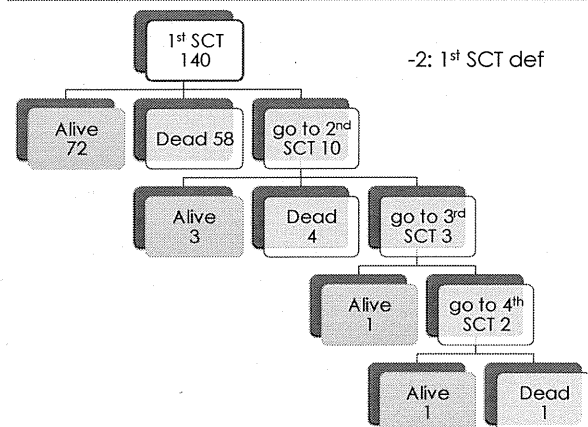
SCID-HSCT evidence @Europe

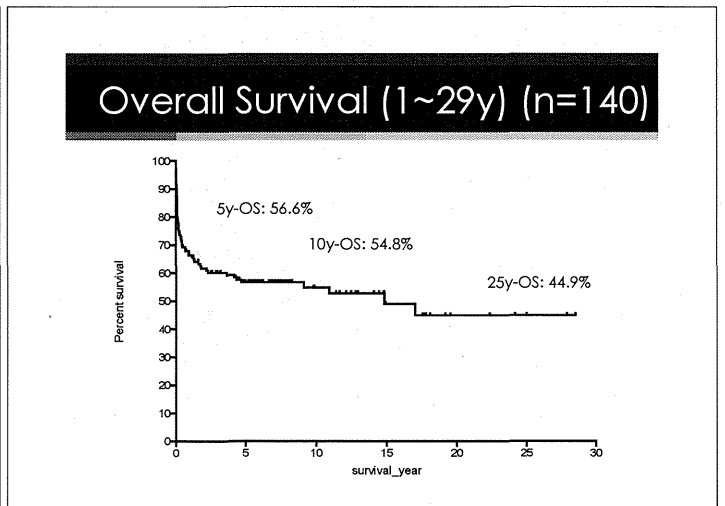
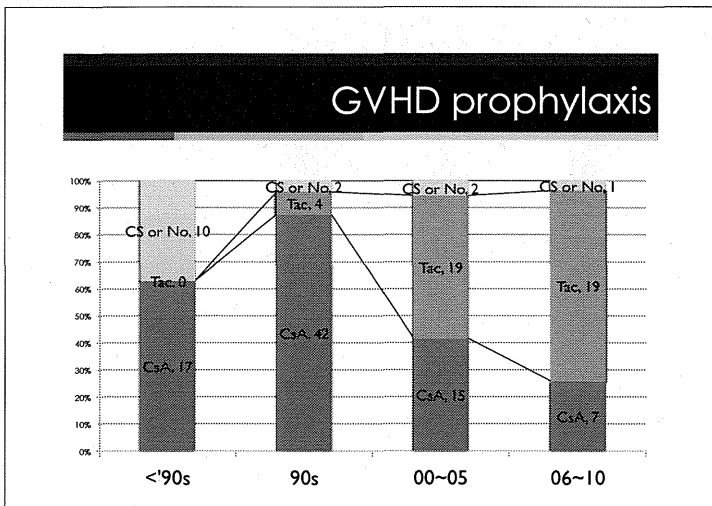
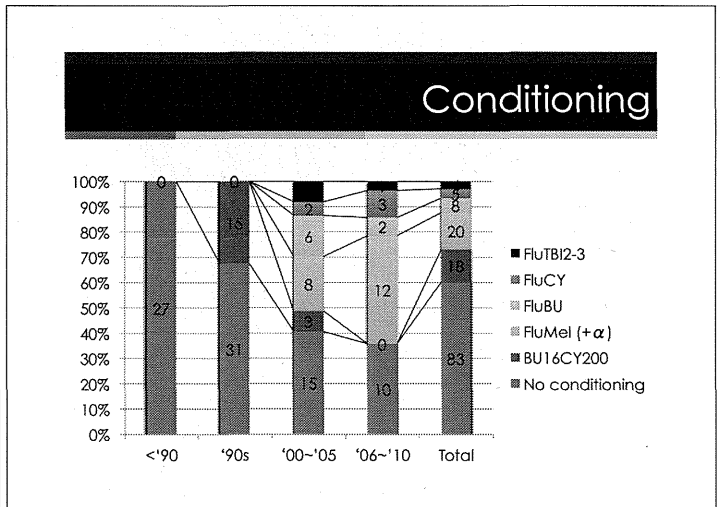
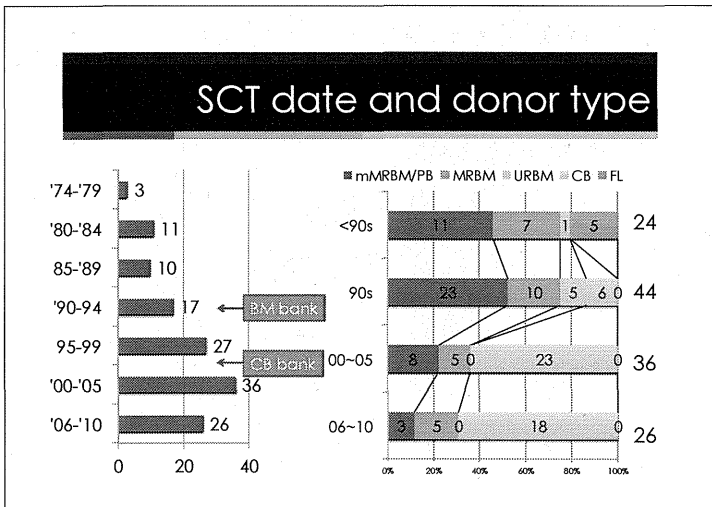
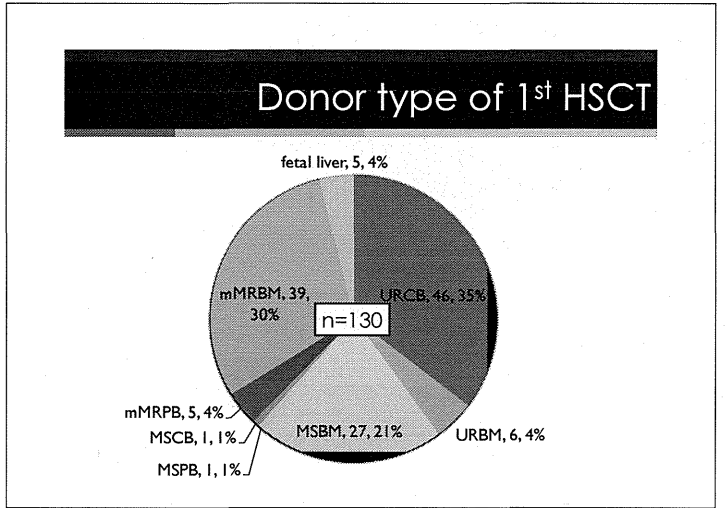
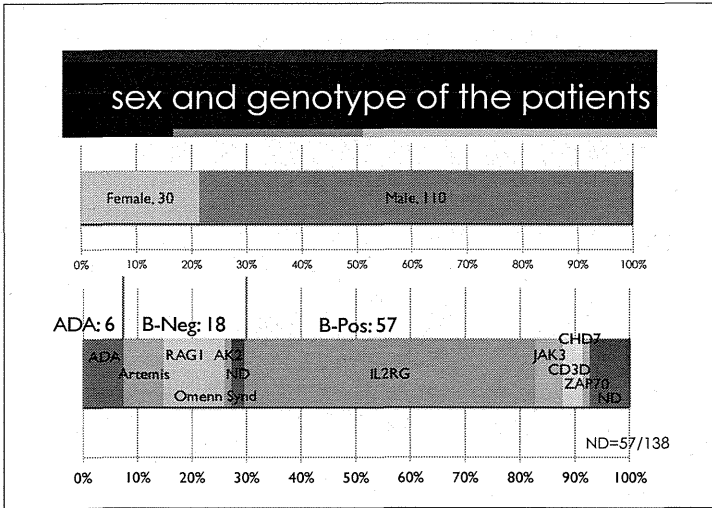
- Fernandes, 2012, *Blood*
- SCETIDE database
- UCBT 74 vs mMRDT 175
 - High GVHD in UCBT
 - aGVHD: II-IV: 34% vs 22%
 - cGVHD: 22% vs 10%
 - prophylaxis: CsA: 96% vs 27%
 - Good immunological reconstitution in UCBT
 - No IVIG: 45% vs 31%
 - MAC: 62% vs 46%
 - 5OS: 57 vs 62%
 - major cause of death: Infection, ARDS, GVHD

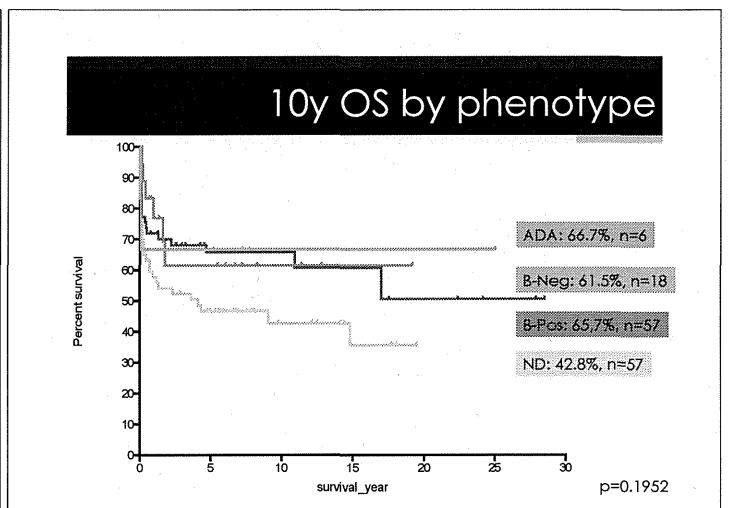
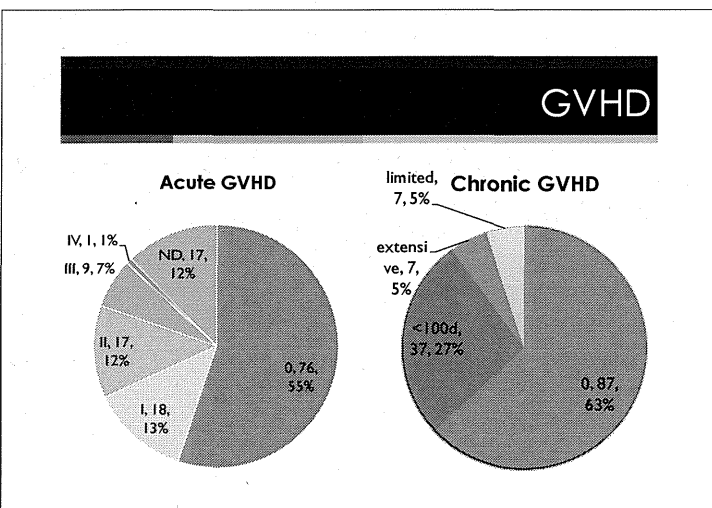
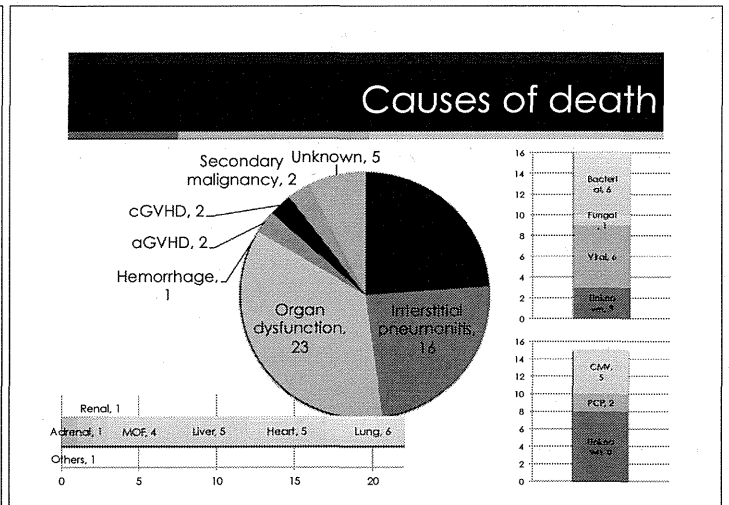
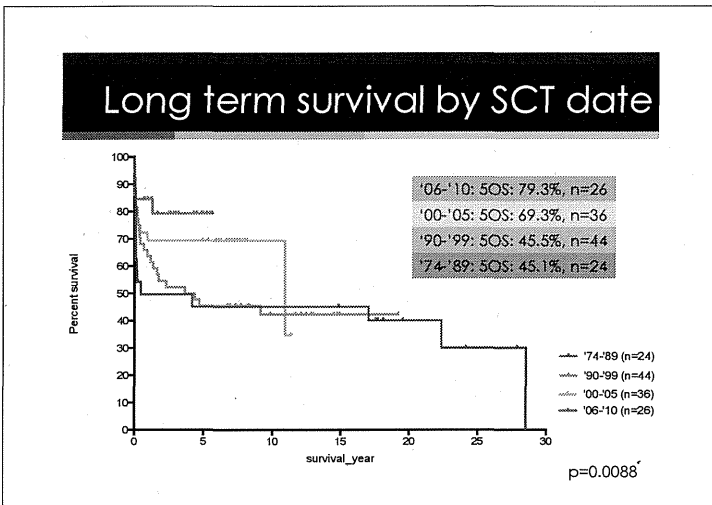
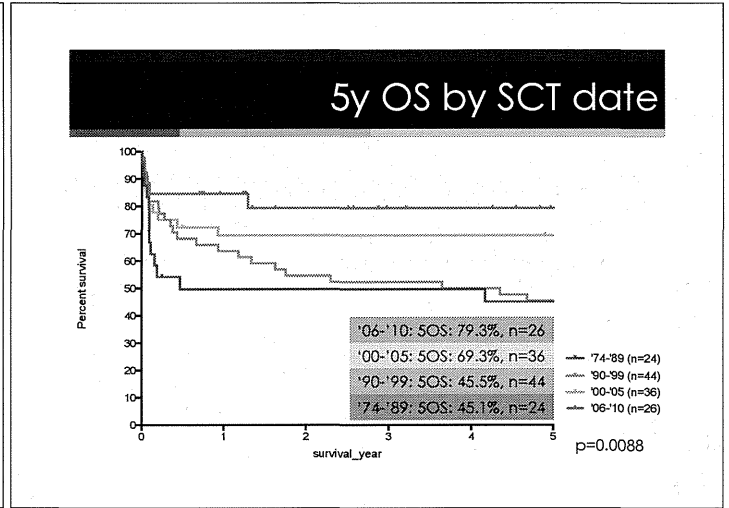
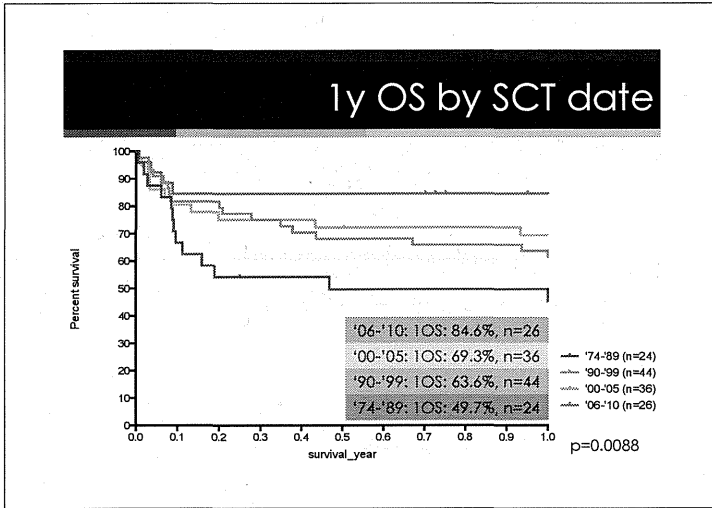


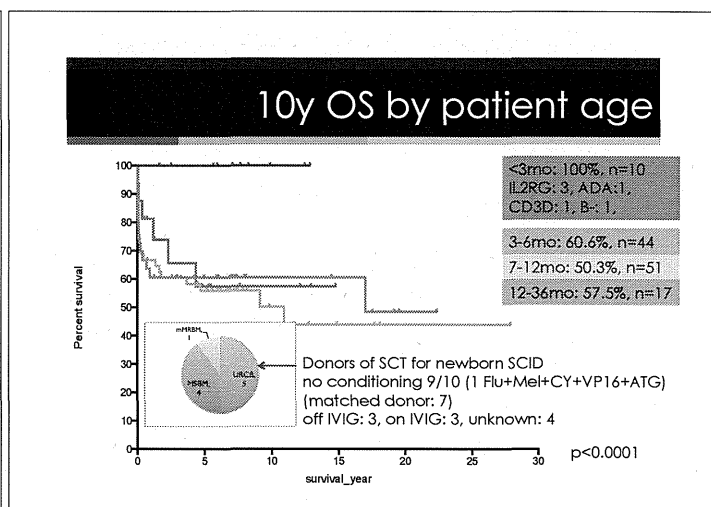
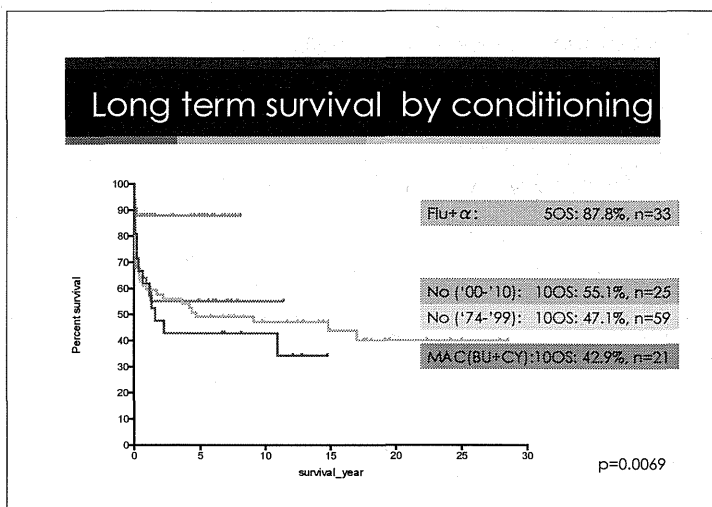
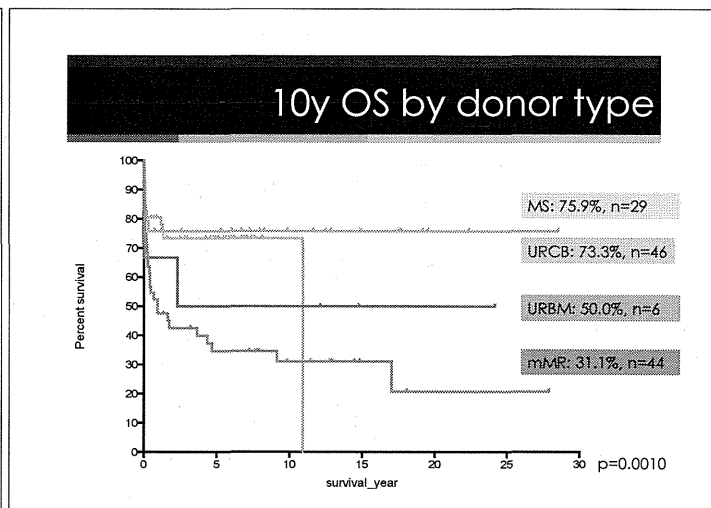
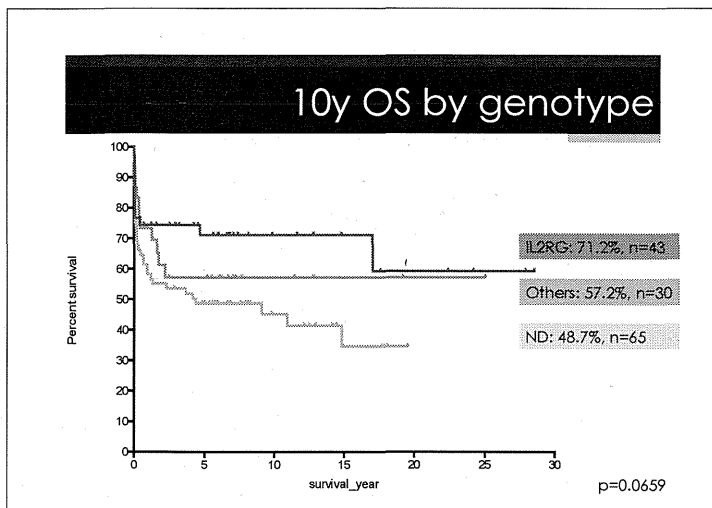
SCID-SCT in Japan

- [Object]
 - To elucidate current status of SCT for SCID in Japan
- [Method]
 - Retrospective analysis of SCT for SCID in Japan using TRUMP* database was done
 - 140 cases were transplanted during 1974-2010
 - *Transplant Registry Unified Management Program
 - *Individual data of JSHCT (Japanese society for hematopoietic cell transplantation), JSPHO (Japanese society of hematology/oncology), JMDP (Japan Marrow Donor Program) and JCBN (Japan Cord Blood Bank Network) were integrated to TRUMP at 2006









SCID-SCT in Japan: 1974-2010

- 140 SCT was performed during 1974-2010 in Japan
- ¾ was male (50%, XSCID)
- UCB is 70% since 2000
- 25y OS is 45%, but 5OS of recent years is 80%
- URCB is comparable with MS-BM (73 vs 76%)
- Fludarabine based conditioning achieved 88% OS
- 10 cases were transplanted <3mo and the survival is 100% (half URCB, half MSBM)
- Cause of death was mainly infection and organ dysfunction, GVHD is rare because of FK506?
- Newborn screening before infection is needed to improve the outcome

- ### Acknowledgements
- JSHCT IE working party**
- Tokyo Medical and Dental University
 - Kohsuke Imai
 - Tomohiro Morio
 - Shizuoka Children's Hospital
 - Yasuo Horikoshi
 - Japanese Red Cross Nagoya First Hospital
 - Koji Kato
 - Tokai University School of Medicine,
 - Hiromasa Yabe
- Japanese society for immunodeficiency**
- National Defense Medical College
 - Hiroki Sato
 - Shigeaki Nonoyama
 - Toyama University
 - Hirokazu Kanegane
 - Toshio Miyawaki
 - Kyushu University
 - Toshio Hara
 - Nagoya University
 - Seiji Kojima

多能性幹細胞を用いた新規血球分化系の構築に関する研究

研究分担者 中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所 副所長・教授

研究要旨

造血幹細胞移植は多くの原発性免疫不全症に対する根治的治療法であるが、疾患により前処置の方法、移植後合併症、GVHD の制御などが異なり、移植成績の向上のためには各疾患の病態解明が必須と考えられている。我々は、健常人あるいは患者の皮膚、末梢血から iPS 細胞を作成し、この細胞から免疫担当細胞を含む各種血球系に分化させる系の構築を行い、複数の免疫不全症の疾患解析を開始している。さらに、将来的に移植のソースとして多能性幹細胞由来血球細胞を用いることを目標に、血球分化系の改善に取り組んでいる。

本年度は、血球分化系の改善として、従来より開発している二次元の無血清、フィーダー細胞を用いない血球分化法を拡張し、新たなスキャフォールドを用いた 3 次元培養法を確立した。PET 線維で補強したコラーゲンスポンジを基材として用いることにより、従来の血球系と異なり、細胞クラスターでなく単一細胞を播種して血球分化を開始することが可能となった。また、この系には、長期間の培養が可能になり、電子顕微鏡による解析では、ニッシュ細胞と血球細胞が 3 次元スキャフォールド上でつつしえを構築していることが明らかになった。この系を応用することにより、ニッシュ細胞と血球細胞のマウスへの同時移植や、血球系細胞の大量培養が可能になると期待される。

A. 研究目的

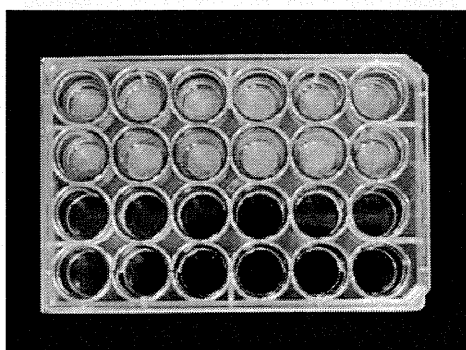
造血幹細胞移植は多くの原発性免疫不全症に対する根治的治療法であるが、疾患により前処置の方法、移植後合併症、GVHD の制御などが異なり、移植成績の向上のためには各疾患の病態解明が必須と考えられている。我々の研究は、健常人あるいは患者の皮膚、末梢血から iPS 細胞を作成し、この細胞から免疫担当細胞を含む各種血球系に分化させる系の構築を行い、複数の免疫不全症の疾患解析を行うことにより、移植医療の最適化に資することのできる病態解析データを蓄積することを目的

としている。また、将来的に移植のソースとして多能性幹細胞由来血球細胞を用いることを目標に、血球分化系の改善に取り組んでいる。

これらの目的のためには、iPS 細胞より多くの血球系細胞を安定して確保することが必要であるが、従来の方法では限界があった。そこで、本年度は、既存の二次元培養法を拡張し、3 次元のコラーゲンスポンジ中で血球分化を行い、擬似的にスキャフォールド内でニッシュを構築する系を確立することを試みた。

B. 研究方法

ヒト ES/iPS 細胞コロニーをコラゲナーゼで解離し、非接着培養用に処理した培養皿で浮遊培養を行う。基礎培地としては主に臍帯血の ex vivo 増幅に用いられる無血清培地を用いる。サイトカインは主に ES/iPS 細胞の中胚葉分化に VEGF、造血分化に SCF, TPO, FL, IL3, EPO を用い、それらの濃度と投与期間を変えて検討した。3次元スキュフォールドとして、PET 繊維補強コラーゲンスポンジ (PETcol-24W) を MedGEL CO., LTD から購入して使用した。



24穴プレートで培養中のCS

(倫理面への配慮)

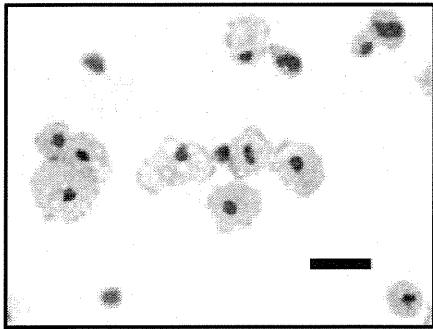
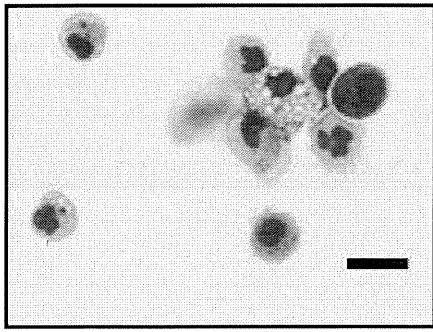
尚、iPS 細胞に関する本研究における患者の遺伝子情報の取り扱いに際しては、“ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針”及び文部科学省研究振興局長通知に定める細則に沿って、京都大学医の倫理委員会の審査承認を受けている(実施責任者:中畑龍俊、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)が、人権及び利益の保護について、十分配慮しながら実験を行った。患者からの疾患関連 iPS 細胞作製にあたり、「ヒト疾

患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究」について、京都大学医の倫理委員会の承認を頂いている(実施責任者:中畑龍俊、当初承認日:平成20年6月4日、変更・追加承認日:平成24年7月19日)。

C. 研究結果

最初に、我々が以前に開発した二次元・マトリゲル上の血球分化系(以下 2D-MG系)を応用して、CS 上の血球分化を行えるかを検討した。すると、従来の方法と同様に、Day 6 の flow cytometry では、KDR+CD34+の中胚葉系の血球前駆細胞と考えられる分画が生じていた。その割合は、クローン毎に様々であったが、2D-MG法と同程度であった。

次に、上述の造血前駆細胞分画から各種血球細胞を得るために幾つかのサイトカインの組み合わせを用いて血球分化を行った。概ね day 20 頃からスポンジから浮遊細胞の出現が顕著になり、well の底に溜まっていく。これらの細胞は、スポンジを取り出して残りの培養上清を遠心することにより簡単かつ繰り返し回収することができる。得られた血球細胞の細胞表面マーカーと形態を観察すると、サイトカインカクテルの組み合わせにより、好中球系細胞、単球系細胞あるいは赤芽球系細胞を作り分けることが可能であった。



**好中球様細胞(上)と
単球様細胞(下)**

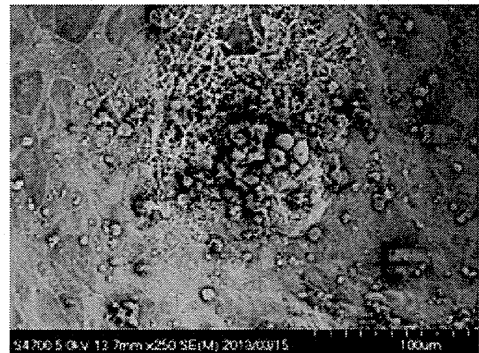
中胚葉・血球分化系は共培養や胚様体形成が必要で、Single-cell にばらした状態からフィーダーフリーで血球分化させるのは困難である。しかし、分化能の定量化や手技の簡略化のためには、Single cell にしたPSCから分化が行えることが望ましい。そこで、接着している iPS 細胞を単一細胞に解離してCSに撒いて分化が可能かを検討した。この場合も、Day 6 の flow cytometry では、KDR low~+ CD34+の分画が出現していた。さらに、Day 20 頃からCSから浮遊細胞が遊離しており、これらはCD43+CD45+の血球系細胞であることが確認された。CSの内部構造を確認するため、走査電顕でCSを観察したところ、一部で、円柱あるいは扁平上皮が細胞集簇して平面を形成し、その一部から球形の細胞が敷石状に萌出している部分を認めた。また、

PET 繊維に円形の細胞が集団を形成している部分を認めた。

D. 考察

このような3次元スキュフォールドを用いた多能性幹細胞からの血球分化系は過去に報告がない。この系では、ニッシュを構成する基質と細胞が一塊となって形成され、血球分化を支持しているように見える。この分化系は、従来の2D-MG系などに比べて長期間維持が可能であることや、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として可搬性のある基材上で誘導できることから、複数のCSを浮遊培養に持ち込むことにより大量の血球細胞を継続的に得ることが可能になるかもしれない。また、ニッシュと血球系前駆細胞を一塊として免疫不全マウスに移植するという応用も考えられる。

もちろん現時点ではニッシュの機能は不十分ではあるものの、今後改善を重ねて、系を改良することにより、より有用な系が開発できるものと期待される。



**ニッシュ細胞上の
血球様細胞**

E. 結論

免疫不全疾患の解析や移植実験に有用な、新たな多能性幹細胞からの分化誘導系を開発することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morishima T, Watanabe KI, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 2013 Aug;23:98: doi 10.3324/haematol.2013.083873.
- 2) Saida S, Watanabe KI, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T.: Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood*, 121:4377-87, 2013.
- 3) Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, Ozaki F, Nishimoto S, Murata Y, Yasumi T, Ito J, Tomida S, Oshima K, Asaka I, Goto H, Heike T, Nakahata T, Saito MK: Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS ONE*. 4/3/2013; 8(4): e59243. doi:10.1371/journal.pone.0059243.
- 4) Tomizawa D., Akio Tawa A., MD/PhD, Watanabe T., Saito A.M., Kudo K., Taga T., Iwamoto S., Shimada A., Terui K., Moritake H., Kinoshita A., Takahashi H., Nakayama H., Koh K., Kigasawa H., Kosaka Y., Miyachi H., Horibe K., Nakahata T., Adachi S.: Excess reduction of anthracyclines results in inferior event-free survival in core binding factor acute myeloid leukemia in children; a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). *Leukemia* doi:10.1038/leu.2013.153.
- 5) Nakazawa Y., Saito S., Yanagisawa R., Suzuki T., Toshiro Ito T., Ishida F., Muramatsu H., Matsumoto K., Kato K., Ishida H., Umeda K., Souichi Adachi S., Nakahata T., Koike K.: Recipient seropositivity for adenovirus type 11 is a highly predictive factor for the development of AdV11-induced hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*. 48:737-739, 2013.
- 6) Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A; for the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A.: PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Sep 30. doi: 10.1038/bmt.2013.147. [Epub ahead of print].
- 7) Honda Y, Tsuchida M., Zaike Y, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukemia who

developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). Brit. J. Haematol. 2013 In press.

- 8) 斎藤潤、中畑龍俊: 疾患特異的iPS細胞. 再生医療12(1):19-29,2013.

2. 学会発表

(海外)

- 1) Suzuki N., Hira A., Niwa A., Matsuo K., Takata M., Yabe M., Nakahata T., Saito M.: Mesodermal development from reprogrammed Fanconi anemia cells is affected by ALDH2 enzymatic activity. 11th Annual Meeting of international Society for Stem Cell Research (ISSCR). 7/12-7/15, Boston, MA, USA.

(国内)

- 1) 中畑龍俊: 特別講演、iPS細胞研究が切り開く未来の医療. 日本学術会議公開学術講演会「未来社会を築く生命科学と医療のフロンティア」2013年8月3日 京都大学薬学部記念講堂.
- 2) 中畑龍俊: 特別講演、さい帯血造血幹細胞発見秘話とiPS細胞ストックの臍帯血活用の未来像. さい帯血移植1万例突破記念事業「さらなる飛躍へのステップ」記念講演会 2013年9月28日 TKP田町カンファレンスセンター.
- 3) 中畑龍俊: 特別講演、iPS細胞の小児医療への応用. 第38回東日本小児科学会 2013年11月23日 大宮ソニックシティ(さいたま市).
- 4) 中畑龍俊: 教育講演、iPS細胞の臨床応用. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013年11月29日-12月1日(30日) ヒルトン福岡シーホーク.
- 5) 中畑龍俊: 基調講演、iPS細胞を用いた今後の医療の可能性. 日本製薬医学会第4回年次大会 2013年7月19日 エーザイ株式会社本社5階ホール(塩野義製薬).

- 6) 中畑龍俊: 基調講演、iPS細胞を活用した医療の可能性と倫理. 第10回STSフォーラム「科学技術が拓く人間の未来」公開シンポジウム 2013年10月5日 京都商工会議所ビル講堂.

- 7) ⑦横山宏司、西小森隆太、池谷真、那須輝、田中孝之、齋藤潤、梅田雄嗣、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男: 罹患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群における関節病態の分子機構の解明. 第34回日本炎症・再生医学会 2013年7月2-3日(ポスター) 国立京都国際会館.

- 8) Hasegawa D., Hama A., Nozawa K., Salaguchi H., Yabe M., Ito E., Ito M., Kojima S., Nakahata T., Manabe A.: Hematological and morphological characteristics of inherited bone marrow failure syndromes(IBMFS). The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 2013年10月11-13日(12日) さっぽろ芸文館.

- 9) Honda Y., Tsuchida M., Masunaga A., Yoshimi A., Kojima S., Ito M., Kikuchi A., Nakahata T., Manabe A.: Clinical characteristics of 17 children with JMML who developed blast crisis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology(第75回日本血液学会学術集会) 2013年10月11-13日(12日) 札幌市教育分化会館

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植法の確立

研究分担者 小原 収 (公財)かずさDNA研究所 副所長

研究要旨

感染症のコントロール、前処置の方法、移植後の免疫抑制剤使用法、ドナーソースなどこれまでに蓄積されたデータをもとに前向き研究を行い、原発性免疫不全症の至適な造血幹細胞移植法を確立するために、本分担研究では臨床情報アーカイブである PIDJ の維持・改良と、必要に応じてそれぞれの症例の遺伝子検査結果を対応付けながら閲覧できるような情報基盤に向けた改良を進めた。特に今年度は、こうした遺伝子検査への次世代シーケンサーの導入にも対応できるように 専門臨床医のみにアクセス制限した遺伝子検査情報プラットフォームの改良と運用を開始した。さらに、今後の遺伝子検体数増に対応できるように、遺伝子検査の標準手順書の整備とその下での遺伝子解析データの蓄積を進めた。

A. 研究目的

原発性免疫不全症では、移植時に感染症を併発する事が多く、感染症を抱えたままの移植になるケースがあるだけでなく、DNA 修復障害が基礎にある疾患では、前処置の強度を最低限にしなければならないなどの注意が必要である。またHLA 不一致の移植を行わざるを得ないことも多く、GVHD も起こしやすい。このように、造血幹細胞移植の中で解決すべき問題点が多い疾患である。

そこで、感染症のコントロール、前処置の方法、移植後の免疫抑制剤使用法、ドナーソースなどこれまでに蓄積されたデータをもとに前向き研究を行い、原発性免疫不全症の至適な造血幹細胞移植法を確立することを最終的な目的とする。本分担研究では、原発性免疫不全症の症例の遺伝子検査データの蓄積とその症例と解析結果の情報基盤整備を通じて、目的達成に貢献する。

B. 研究方法

- 原発性免疫不全症候群に関する調査研究班と連携し、臨床アーカイブである PIDJ (<http://pidj.rcai.riken.jp/index.html>)への登録推進を行うとともに、理化学研究所の PIDJ 運用グループと連携しながら、今回の前向き研究も視野に入れた PIDJ の維持・改修を進める。
- 移植プロトコルの確立を視野に入れた患者登録のための臨床アーカイブとしての PIDJ 更新に呼応して、個々の症例の遺伝的な背景の情報を対応付けられるように、PIDJ の臨床アーカイブ情報とかずさDNA研究所で得られた遺伝子解析結果情報をリンクできるようにかずさDNA研究所側での情報統合のための基盤整備を進める。
- 蓄積された臨床情報と各疾患の遺伝的な原因の対応をつけるべく、各症例の