

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

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：基礎から臨床へ

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池原 進

平成25(2013)年 3月

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

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：基礎から臨床へ

平成二十四年度 総括・分担研究報告書 平成二十五年 三月 研究代表者 池原 進

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池原 進

平成25(2013)年 3月

平成二十四年度 総括・分担研究報告書
平成二十五年度 総括・分担研究報告書
平成二十五年 三月 研究代表者 池原 進

序

マウスを用いて開発した骨髄内骨髄移植法（IBM-BMT）は、造血幹細胞（HSC）の増殖・分化を促進するために必要なドナーの間葉系幹細胞（MSC）を効率よく補充する方法である。この方法をヒトへ応用するために、われわれは従来の吸引法（AM）に代わって灌流法（PM）をサルを用いて開発した。

この両者（IBM-BMT+灌流法）の組合せによる新しい移植方法は、移植片対宿主病（GvHD）が発症しないだけでなく、ドナーに対してもレシipientに対しても負担を軽減する優れたもので、難治性の自己免疫疾患や加齢に伴って発症する種々の難病（Alzheimer 病や肺気腫など）にも強力な武器となりうるものと確信する。

今後の展望としては、ヒトへの臨床応用として、現在、灌流法+IBM-BMT の両技術のコンビネーションにおける安全性を最重点課題として、Phase I Study を開始した。安全性が確認されれば、直ちに Phase II Study が実施できるように、臨床プロトコルを準備中である。新しい BMT の方法がヒトへ応用されるようになれば、骨髄ドナーの負担が軽減される。すなわち、骨髄穿刺針の穿刺部位が 8 カ所（従来の方法では 100 カ所以上）ですみ、麻酔から覚醒後には痛みも少なく、歩行可能である。それゆえ、骨髄バンクへの登録者が増加するし、たとえ、HLA が不一致でも新しい移植方法では GvHD も起こらず、生着が促進されるため、前処置も軽減され、患者の負担も少なくなる、新しい技術により、これまで不治の病であった種々の難病が根治されれば、患者にとってこれ以上の福音はない。

現在、ヒトへの応用を目指して本院の救命医学科と共同研究中で、脳死患者を用いて PM と AM との間の細胞採取量等を検討中である。

平成 25 年 3 月

研究代表者 池 原 進

目 次

| | | | |
|------|--|-----------|----------|
| I. | 研究班構成 | - - - - - | 7 |
| II. | 総括研究報告 | | |
| | 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：基礎から臨床へ | | |
| | 移植技術を用いた難病の根治療法の開発 | (池原 進) | - - - 11 |
| | 整形外科医からみた“灌流法の実際” | (池原 進) | - - - 19 |
| III. | 分担研究報告 | | |
| | 1. 同種移植後の再発白血病の治療法開発 | (赤塚 美樹) | - - - 25 |
| | 2. 間葉系幹細胞を介する B 細胞分化制御についての研究 | (一戸 辰夫) | - - - 29 |
| | 3. 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 | (小川 啓恭) | - - - 33 |
| | 4. ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞による造血幹細胞移植後の難治性感染症の治療 | (小島 勢二) | - - - 37 |
| | 5. 骨髄内骨髄移植マウスモデルを用いた移植後肺障害に関する検討 | (品川 克至) | - - - 39 |
| | 6. 灌流法による骨髄採取の安全性と有用性の検討 | (野村 昌作) | - - - 45 |
| | 7. 臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発 | (村田 誠) | - - - 47 |
| | 8. 新規造血幹細胞移植技術評価のための新規移植後モニタリングシステムの開発に関する研究 | (森尾 友宏) | - - - 49 |
| IV. | 研究成果の刊行に関する一覧表 | - - - - - | 55 |
| V. | 学会発表に関する一覧 | - - - - - | 67 |
| VI. | 研究事業報告 | - - - - - | 75 |
| VII. | 研究成果の刊行物・印刷 | - - - - - | 576 |

I. 研 究 班 構 成

「灌流法により採取された骨髓細胞を用いた骨髓内骨髓移植療法：
基礎から臨床へ」研究班

| <区 分> | <氏 名> | <所 属> | <職 名> |
|-------|-------|---------------------------------------|-------|
| 研究代表者 | 池原 進 | 関西医科大学共同研究講座 (大塚製薬株式会社) 幹細胞異常症学 | 教 授 |
| 分担研究者 | 赤塚 美樹 | 藤田保健衛生大学医学部 血液内科 | 准教授 |
| | 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 |
| | 小川 啓恭 | 兵庫医科大学内科学 血液内科 | 教 授 |
| | 小島 勢二 | 名古屋大学大学院医学系 研究科・小児科学 | 教 授 |
| | 品川 克至 | 岡山大学医学部 血液・腫瘍内科 | 講 師 |
| | 野村 昌作 | 関西医科大学第一内科・ 同附属枚方病院血液腫瘍内科 | 教 授 |
| | 村田 誠 | 名古屋大学医学部附属病院 血液内科 | 講 師 |
| | 森尾 友宏 | 東京医科歯科大学・大学院・ 発生発達病態学分野 | 准教授 |
| 事務局 | 李 銘 | 関西医科大学共同研究講座 (大塚製薬株式会社) 幹細胞異常症学 | 講 師 |

〒573-1010 大阪府枚方市新町二丁目5番1号

Tel: 072-804-2450

Fax: 072-804-2454

E-mail: liming@hirakata.kmu.ac.jp

II. 總括研究報告

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

**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：基礎から臨床へ
移植技術を用いた難病の根治療法の開発**

研究代表者 池原 進 関西医科大学共同研究講座（大塚製薬株式会社）幹細胞異常症学 教授
研究協力者 李 銘 関西医科大学共同研究講座（大塚製薬株式会社）幹細胞異常症学 講師
石 明 関西医科大学共同研究講座（大塚製薬株式会社）幹細胞異常症学 助教

研究要旨

本研究の目的は難病の病因を解明し、根治療法を開発することである。大部分の難病が骨髄の造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞の異常に起因し、この両者を正常の細胞と置換することにより、種々の難病を予防と治療できることが明らかにした。加齢に伴って発症してくる難病（2型の糖尿病，アルツハイマー病等）は幹細胞の移植・置換だけでは、治療できないが、IBM-BMT と胸腺移植の併用すると有効であることが判明した。さらに GvHD や HvGR に関与しているのは、CD8 T細胞ではなくて、CD4 T細胞の方がむしろ重要な役割を演じていることを発見した。

我々が開発した新しい BMT の技術は、ヒト同種 BMT の主要な問題点を解決する革新的技術であり、HSC の異常に基づく白血病や自己免疫疾患のみならず、MSC の異常に伴って発症する疾患（アルツハイマー病，骨粗鬆症等）の根治療法の開発に直結する。ヒトへの応用を目指して、精力的にサルの実験を実施してきたが、新しい移植方法の安全性と有効性が確認できたので、倫理委員会の承認と患者さんの同意を得て、ヒトへの応用を開始した。

研究分担者

赤塚 美樹 藤田保健衛生大学医学部
血液内科 准教授
一戸 辰夫 京都大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科 助教（H22年度）
佐賀大学医学部附属病院 血液・
腫瘍内科 准教授（H23-24年度）
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
（現在）
小川 啓恭 兵庫医科大学内科学講座
血液内科 主任教授
小島 勢二 名古屋大学大学院医学系
研究科・小児科学講座 教授

品川 克至 岡山大学病院
血液・腫瘍内科 講師
野村 昌作 関西医科大学附属枚方病院
血液腫瘍内科 教授（H24年度）
村田 誠 名古屋大学医学部附属病院
血液内科 講師
森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院院
発生発達病態学分野 准教授

A. 研究目的

本研究の目的は、難病の病因を解明し、根治療法を開発することにある。研究代表者らは、大部分の難病が骨髄の幹細胞（造血幹細胞と間葉系幹細胞）の異常に起因し、この両者を正常の細胞と置換することにより、種々の難病を予防し治療できることを発見した。しかしながら、加齢に伴って発症してくる難病（2型の糖尿病，アルツハイマー病等）は両・幹細胞の移植・置換だけでは、治療できないことを見出した。その理由として、aging に左右されやすい細胞は造血幹細胞（HSC）ではなくて、間葉系幹細胞（MSC）であり、もう一つは、胸腺の上皮細胞（TEC）であるからである。本研究では、主としてマウスを用いて tolerance 誘導のメカニズムを明らかにし、ヒトの胸腺移植への応用に役立てる。

B. 研究方法

アルツハイマーのモデルマウス SAM や 2 型の糖尿病を発症する db/db マウスに、骨髄内骨髄移植（IBM-BMT）を実施したが、発症の予防はできても、治療には至らず、IBM-BMT に胸腺移植を併用した所、いずれのマウスも免疫能が正常化し、病気が改善した（Neurosci. Lett. 465:36-40, 2009; J.Autoimmun. 35:414-423,2010）。

加齢に伴って発症する難病には、免疫の異常が関与しており、骨髄内骨髄移植だけでなく胸腺の移植の併用が重要であることを明らかにした。GvHD や HvGR に関与しているのは、CD8 T 細胞ではなくて、CD4 T 細胞の方がむしろ重要な役割を演じていることを発見した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物の愛護及び管理に関する法律に則り実験計画を作成し、関西医科大学の動物実験委員会の審査・承認を得た後に適正な動物実験等を実施した。

C. 研究結果

糖尿病腎症のモデルマウスである db/db マウスに骨髄内骨髄移植と胸腺移植を併用し、腎臓のヘムオキシゲナーゼ、リン酸化 eNOS と AKT の発現が上昇し、iNOS の発現が低下し、腎臓の機能を改善することを明らかにした（Int. J. Biol. Sci. 8: 1335-1344, 2012）。

胸腺移植のヒトへの応用を視野に入れて、マウスの新生時期や胎生期の胸腺を用いて解析した結果、成熟した T 細胞を除去すれば、GvH 反応や HvG 反応（拒絶反応）も起こらないことを明らかにした（J. Autoimmun. 31: 408-415, 2008; Immunology 126: 552-564, 2008; Bone Marrow Transplant. 43: 829-837, 2009; Stem Cells Dev. 20: 599-607, 2011; Stem Cell Dev. 21, 1441-1448, 2012）。すなわち、新しく分化して来た T 細胞は、HSC のみならず、MSC に対しても tolerance が誘導されていることを物語っており、ヒトへの応用の上にも重要な知見である。加齢に伴って発症するアルツハイマーのモデルマウス SAMP10 を用い、IBM-BMT により胸腺上皮細胞の Sirt1 発現を改善したことが明らかにした（Cell

Transplantation 2013 Feb 26.[Epub ahead of print]）。GvHD や HvGR に関与しているのは、CD8 T 細胞ではなくて、CD4 T 細胞の方がむしろ重要な役割を演じていることを発見した（J. Immunology 190: 2976-2983, 2013）。

D. 考察

加齢に伴って発症する難病は、胸腺の萎縮に伴って T 細胞の機能の異常や低下が認められ、感染が引き金となって発症するものと考えられる。我々はモデル動物を用いて、骨髄内骨髄移植だけでなく胸腺の移植の併用が重要であることを明らかにした。加齢に伴って発症する疾患は、骨髄の造血幹細胞よりも、むしろ、間葉系の幹細胞の異常に起因することを見出した。IBM-BMT と胸腺移植の併用療法は加齢に伴って発症する疾患（アルツハイマー病，2型の糖尿病等）にも有効であることが判明した。

加齢に伴って発症する難病には、免疫の異常が関与しており、骨髄内骨髄移植だけでなく胸腺の移植の併用が重要であることを明らかにした。

E. 結論

我々が開発した新しい BMT の技術は、ヒト同種 BMT の主要な問題点を解決する革新的技術であり、HSC の異常に基づく白血病や自己免疫疾患のみならず、MSC の異常に伴って発症する疾患（アルツハイマー病、骨粗鬆症等）の根治療法の開発に直結する。ヒトへの応用を目指して、精力的にサルの実験を実施してきたが、新しい移植方法の安全性と有効性が確認できたので、倫理委員会の承認と患者さんの同意を得て、ヒトへの応用を開始した。

新しい骨髄移植の方法は国際的にもヒトへ応用しようという動きがあるが、現在まで、臍帯血を用いて、腸骨内へ注入しようとするものである。臍帯血中には、MSC が少量しか含まれないこと、また、血管の豊富な腸骨内への注入（申請者らは脛骨内へ注入）は、注入した細胞が循環系へ移行し易いため、静脈内注入とそれ程変わらず、現在までは、顕著な効果は得られていない。新しい骨髄移植の方法（PM+IBM-BMT）が、ヒトへ応用されるようになれば、骨髄ドナーと患者さんの負担が軽減される。この新技術を用いることにより、これまで不治の病であった、種々の難病（厚労省指定以外の疾患をも含む）が根治できれば、患者さんにとって、これ以上の福音はない。また、骨髄内骨髄移植療法を施行するにあたって、申請者が開発した、「骨髄細胞の採取装置および骨髄針」、「骨髄ドリル」の特許も国内、国外において取得しており、国際的、社会的にも貢献出来るものとする。さらに、国内において、「骨髄針」に関しては、指定管理医療機器製造販売認証書も取っている。

新しい骨髄移植のヒトへの応用を目指して、研究分担者の野村教授、研究協力者の石井講師並びに研究協力者の整形外科の飯田教授、串田講師と共同研究を開始している。臨床応用に関しては、臨床プロ

トコールを変更し、倫理委員会の承認も得られている（平成 24 年 7 月 25 日に承認。承認番号：関医倫第 1106 号）。現在、整形外科医の指導の下で CT や、“ナビゲーション・システム”の開発を目指しており、安全で容易に灌流法が実施できるように改善する予定である。

灌流法（PM）を骨髄内骨髄移植法（IBM-BMT）と併用することによって、ドナーの正常の造血幹細胞（HSC）のみならず、間葉系幹細胞（MSC）も正常ドナーの細胞に置換可能なため、かなりの難病が治療可能と考えられる。特に、神経難病（アルツハイマー病等）の治療に重点を置いて、骨髄や胎児肝に存在する ES-like cell を移植に利用する。さらに、胸腺移植を併用することによって治療可能な難病範囲の拡大を目指す。

動物を用いた基礎実験と臨床応用に関する研究は同時進行で実施している。新移植方法の安全性と有効性はすでにサルで実証済であるので、この新手法を用いた移植方法の適用疾患の拡大に向けて動物実験を行っている。

灌流法を用いた骨髄内骨髄移植法（PM+IBM-BMT）は、これまでの 3 年間、厚生労働省の厚生労働科学研究費補助金からサポートを受けており、ヒトへの応用に全力を挙げており、今までに兵庫医科大学と関西医科大学との間で、倫理委員会の承認の上、2 例実施したが、その後、適応症例が中々見つからないので、今後は、関西医科大学の救命との共同研究で、脳死患者において灌流法と吸引法の比較を予定している。

臨床応用に関しては、症例数も少ないため十分な効果は上がっていない。

しかし、この新技術を用いることにより、これまで不治の病であった、種々の難病（厚労省指定以外の疾患をも含む）が根治できれば、患者さんにとって、これ以上の福音はない。

厚生労働省の労働行政の種々の課題を解決する上にも多大な貢献をするものとする。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 池原 進. 革新的移植方法 灌流法 + 骨髄内骨髄移植法. 医学のあゆみ「造血幹細胞移植の最新動向：造血幹細胞移植のトピックス」 240 (5): 465-469, 2012.
- 2) Zhang Y, Hosaka N, Cui Y, Shi M, Li M, Li Q, and Ikehara S. Effects of intrabone marrow-bone marrow transplantation plus adult thymus transplantation on survival of mice bearing leukemia. *Stem Cells Dev.* 21: 1441-1448, 2012.
- 3) Shima C, Adachi Y, Minamino K, Okigaki M, Shi M, Imai Y, Yanai S, Takahashi K, Ikehara S. Neuroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor on ischemia-reperfusion injury of the retina. *Ophthalmic Res.* 48: 199-207, 2012.
- 4) Ueda Y, Katagiri K, Tomiyama T, Yasuda K, Habiro K, Katakai T, Ikehara S, Matsumoto M, Kinashi T. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus. *Nat. Commun.* 3: 1098, 2012.
- 5) Li M, Vanella L, Zhang Y, Shi M, Takaki T, Shapiro JI, Ikehara S. Stem cell transplantation increases antioxidant effects in diabetic mice. *Int. J. Biol. Sci.* 8: 1335-1344, 2012.
- 6) Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, Takei S, Chiba Y, Hosokawa M, Ikehara S. Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *Brain Behav. Immun.* 29: 82-97, 2013.
- 7) Shi M, Li M, Cui Y, Liu L, Adachi Y, Ikehara S. CD4⁺ T cell-depleted lymphocyte infusion impairs neither the recovery of recipient thymus nor the development of transplanted thymus. *J. Immunol.* 190: 2976-2983, 2013.
- 8) Li M, Shi M, Abraham NG, Ikehara S. Improved expression of Sirt1 on thymic epithelial cells of SAMPI after intra bone marrow-bone marrow transplantation. *Cell Transplant.* 2013 Feb 26 [Epub ahead of print]
- 9) Shimo T, Adachi Y, Yamanouchi S, Tsuji S, Kimata T, Umezawa K, Okigaki M, Takaya J, Ikehara S, Kaneko K. A novel nuclear factor kB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, Ameliorates puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in mice. *Am. J. Nephrol.* 37: 302-309, 2013.
- 10) Li M, Ikehara S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells Int.* 2013: 132642, 2013.

(書籍)

- 1) Ikehara S. A revolutionary BMT method. In: *Bone Marrow Transplantation Across Major Genetic Barriers* (Yair Reisner and Massimo F martelli, eds.) World Scientific. New Jersey • London • Singapore • Beijing • Shanghai • Hong Kong • Taipei • Chennai 441-455, 2010.
- 2) Susumu Ikehara. A new concept of stem cell disorders, and the rationale for transplantation of normal stem cells. *STEM CELLS AND CANCER STEM CELLS*. Chapter (ed. Dr. M.A. Hayat) Springer In press.
- 3) Ming Li and Susumu Ikehara: Bone marrow stem cell therapies for diabetes mellitus and its complications: *STEM CELLS AND CANCER*

STEM CELLS. Chapter (ed. Dr. M.A. Hayat)
Springer In press.

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 保坂直樹、高橋伯夫、池原 進 .
胸腺移植を併用した新しい骨髄移植法の悪性腫瘍への効果 II : 胎生、新生、成体期の造血幹細胞と胸腺の比較 .
第 101 回日本病理学会総会
平成 24 年 4 月 26 日~平成 24 年 4 月 28 日 (東京)
- 2) 石井さなえ、島田厚良、稲葉宗夫、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸 靖、河内 全、細川昌則、池原 進 .
骨髄由来免疫系細胞が健常脳に進入する新たな経路の骨髄内骨髄移植による組織学的同定 .
第 101 回日本病理学会総会
平成 24 年 4 月 26 日~平成 24 年 4 月 28 日
(東京)
- 3) 足立 靖、下 智比古、梅澤一夫、金子一成、池原 進 .
LPS 投与マウスにおける DHMEQ (NF- B inhibitor) の効果 .
第 101 回日本病理学会総会
平成 24 年 4 月 26 日~平成 24 年 4 月 28 日
(東京)
- 4) 石 明、嶋千絵子、足立 靖、南野桂三、高橋寛二、池原 進 .
マグネット・ビーズを用いた骨髄内骨髄移植法 .
第 101 回日本病理学会総会
平成 24 年 4 月 26 日~平成 24 年 4 月 28 日 (東京)
- 5) 足立 靖、松添弘樹、川田交俊、高津宏樹、生田寿彦、石田明彦、中野麗香、山内荘作、下智比古、池原 進 .
巨大右心房内血栓症から両肺の肺動脈血栓塞栓症をきたした 1 例
第 58 回日本病理学会秋期特別総会
平成 24 年 11 月 22 日~平成 24 年 11 月 23 日
(名古屋)
- 6) LI Ming, LI Ming, SHI Ming, Ikehara Susumu.
Bone marrow transplantation improved SMP30 expression in the liver of type II diabetes mice.
第 41 回日本免疫学会学術集会
平成 24 年 12 月 5 日~平成 24 年 12 月 7 日
(神戸)
- 7) 石井さなえ、島田厚良、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸靖、河内全、細川昌則、池原進
骨髄由来免疫系細胞が健常脳に進入する新たな経路：骨髄内骨髄移植による組織学的同定。
第 53 回日本神経病理学会
2012.6.30. (新潟)
- 8) 島田厚良、石井さなえ、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸靖、河内全、細川昌則、池原進
老化促進モデルマウスにみられる骨髄由来細胞の脳実質へのリクルートの亢進。
第 53 回日本神経病理学会
2012.6.30. (新潟)
- 9) 石井一慶、野村昌作、串田剛俊、飯田寛和、池原 進 .
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：基礎から臨床へ “ 過去・現在・未来 ” .
平成 24 年度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))
平成 24 年度第 1 回造血細胞移植合同班会議 .
平成 24 年 7 月 7 日~7 月 8 日 (名古屋)

10) 池原 進 . 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：総括と今後の展望 .
平成 24 年度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））
平成 24 年度第 2 回造血細胞移植合同班会議 .
平成 25 年 1 月 13 日~1 月 14 日 （東京）

11) 研究代表者 池原 進 .
革新的な骨髄移植療法の開発に向けて .
平成 24 年度研究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））
平成 24 年度厚生労働科学研究免疫アレルギー等予防・治療研究事業/がん臨床研究事業
造血細胞移植研究合同公開シンポジウム .
平成 25 年 1 月 14 日 （東京）

12) 研究報告書 池原 進 .
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：基礎から臨床へ .
平成 24 年度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）（移植医療分野）研究報告会
平成 25 年 1 月 15 日 （東京）

13) 足立 靖、下智比古、山内壮作、沖垣光彦、梅澤一夫、石 明、金子一成、池原 進 .
微小糸球体病変モデルマウスに対する NF-κB 阻害薬 DHMEQ の効果 .
第 102 回日本病理学会総会
平成 25 年 6 月 6 日~平成 25 年 6 月 8 日
（札幌）

14) 李 銘、石 明、池原 進 .
SAMP10 マウスの胸腺上皮細胞における Sirt1 発現についての検討
骨髄内骨髄移植を用いて
第 13 回日本抗加齢医学会総会

平成 25 年 6 月 28 日~平成 25 年 6 月 30 日
（横浜）

（国際学会）

- 1) 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
- 2) 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, China)
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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.

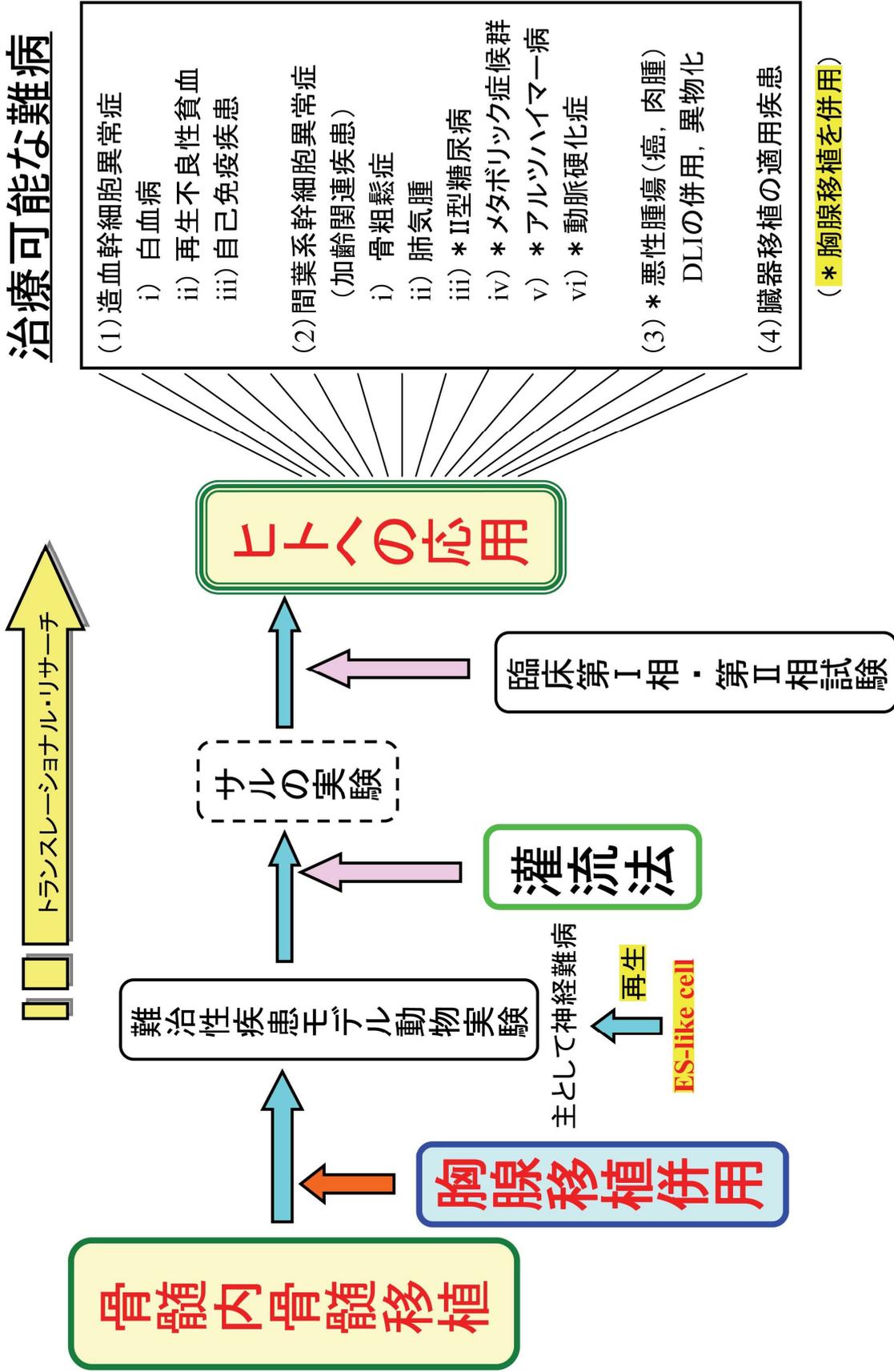
20th Annual PNIRS Scientific Meeting

June 5-8, 2013, Stockholm, Sweden

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

今後の見通し



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））
総括研究報告書

**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：基礎から臨床へ
整形外科医からみた”灌流法の実験“**

研究代表者 池原 進 関西医科大学共同研究講座（大塚製薬株式会社）幹細胞異常症学 教授
研究協力者 串田 剛俊 関西医科大学整形外科学講座 講師
飯田 寛和 関西医科大学整形外科学講座 教授
森 眞一郎 関西医科大学血液呼吸器膠原病内科講座 講師
野村 昌作 関西医科大学血液呼吸器膠原病内科講座 講師

研究要旨

従来の骨髄採取方法（吸引法）はドナーの腸骨を 100 回以上穿刺するため負担が多い。また、採取された骨髄細胞には末梢血中リンパ球の混入が多くみとめられ、処理が必要となる。これに対し、池原らが開発した灌流法は長管骨または扁平骨に骨髄穿刺針を 2 本穿刺し、一方より生理食塩水を加え、他方より骨髄液を採取する方法である。この方法では穿刺数が少なく、末梢血の混入も抑制することが可能な方法である（Stem Cells. 18. 453-456, 2000; Stem Cells. 20. 155-162. 2002）。今回、整形外科医からみた骨髄内への穿刺方法や、より安全に挿入するための手術器具などの点から灌流法について検討した。

A. 研究目的

従来の骨髄採取方法（吸引法）はドナーの腸骨を 100 回以上穿刺するため負担が多い。また、採取された骨髄細胞には末梢血中リンパ球の混入が多くみとめられ、処理が必要となる。これに対し、池原らが開発した灌流法は長管骨または扁平骨に骨髄穿刺針を 2 本穿刺し、一方より生理食塩水を加え、他方より骨髄液を採取する方法である。この方法では穿刺数が少なく、末梢血の混入も抑制することが可能な方法である（Stem Cells. 18. 453-456, 2000; Stem Cells. 20. 155-162. 2002）。今回、整形外科医からみた骨髄内への穿刺方法や、より安全に挿入するための手術器具などの点から灌流法について検討する。

腸骨を覆う骨膜には血管と知覚神経が豊富にある。整形外科手術において腸骨からの採骨後に局所疼痛が長期にわたり残存することがある。吸引法は多数回の腸骨への穿刺を行うため、骨膜周囲の血腫や知覚神経損傷をきたす可能性がある。一方、灌流法では穿刺回数が少なく、ドナーの負担が軽減される。

【穿刺の方向と深さ】

1) 吸引法と灌流法の穿刺針の深さの違い

吸引法において、骨髄穿刺針は骨髄腔内にわずかに入れれば（5-10mm 程度）、骨髄の採取可能である（図 1）。一方、灌流法においては、髄腔内を灌流液で灌流するため、骨髄穿刺針はある程度の深さ（20-30mm 程度）が必要ではないかと考えられる（図 2）。

B. 研究方法 C. 研究結果

【骨膜刺激症状】

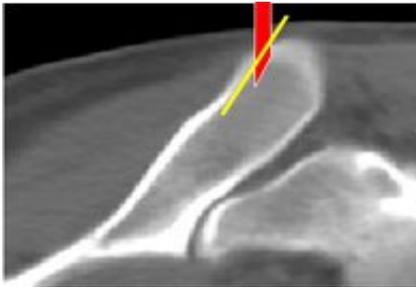


図1 吸引法の穿刺針の深さ

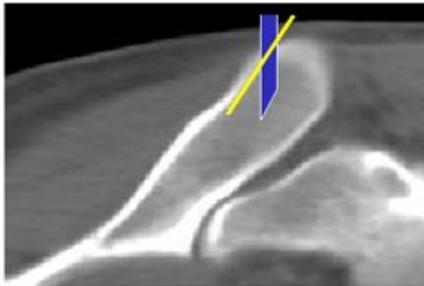


図2 灌流法の穿刺針の深さ

2) 吸引法と灌流法の穿刺針の穿刺方向の違い

ドナーが腹臥位になった際、腸骨稜内の傾きは水平面に対し、約 60 度傾いており、髓腔内に 2-3cm 挿入使用とした際、穿刺する部位により骨髓穿刺針を傾ける必要がある（図 3、4）。

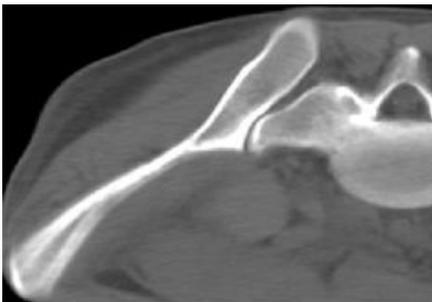


図3 腸骨稜の傾き

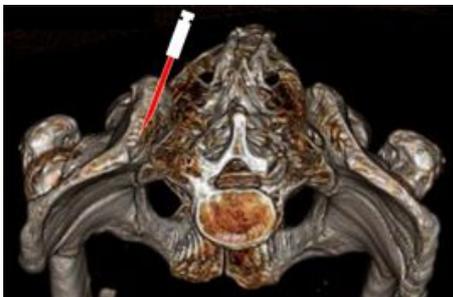


図4 骨髓穿刺針の傾き

【様々な装置を用いた穿刺方法】

1) ポータブル透視装置

主に骨折の手術に用いる透視装置である。X線により骨折の整復および固定状況がリアルタイムに把握できる。利点として、ポータブルタイプのため様々な場所に移動が可能であり、透視装置の角度を変えることにより被写体を動かすことなく 360 度回転が可能である。

腸骨への骨髓穿刺針の刺入時、肥満な症例や筋肉質の症例では腸骨翼の角度が把握しにくいいため、腸骨骨髓内への針刺入が困難な場合がある。ポータブル透視装置を用いれば、針刺入の角度や刺入距離など正確に把握できる。

2) CT ガイド

CT ガイド下に脊椎内や骨盤内の骨生検査を行っている。また、脊椎圧迫骨折時に CT ガイド下に椎体内に骨セメントを注入している。いずれも清潔操作で行っており、腸骨への骨髓穿刺にも応用が可能である。ポータブル透視装置より、正確に骨髓腔内に穿刺が可能である。

3) ナビゲーションシステム

ポータブル透視装置や CT は術中に放射線を使用するデメリットがある。これに対し、ナビゲーションシステムは赤外線を利用して、リアルタイムでモニター上に表示することが可能な装置である。特に、脳外科の手術で多く用いられているが、整形外科分野では脊椎後方固定時にスクリューの挿入に用いられる。

この方法は、骨髓採取においてドナーの放射線被曝が無く、また、安全に骨髓穿刺針を骨盤内に刺入することが可能であり、利用効果が高いと考えられる。

D. 考察 E. 結論

整形外科分野では骨・骨髄への穿刺・挿入方法において、様々な工夫がなされている。骨盤への骨髄穿刺においても、従来の穿刺方法に改良を加えることにより、骨髄腔を利用した灌流法が、より簡便かつ確実に行うことが可能と考えられる。

参考文献

- 1). Kushida T, Ikehara S, et al: A new method for bone marrow cell harvesting. Stem Cells. 18. 453-456, 2000.
- 2). Kushida T, Ikehara S, et al: Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT. Stem Cells. 20. 155-162. 2002.

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

III. 分 担 研 究 報 告

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

同種造血細胞移植後に再発した造血器腫瘍の予後は極めて不良であるが、再発ハイリスク例における移植後再発率は 30% に及ぶ。GVHD を誘導することなく抗白血病（GVL）効果を得る方法として、血液系に限局して発現するマイナー抗原を標的とする免疫療法が検討されてきた。我々は、そのような性質をもったマイナー抗原を認識するキラーT 細胞受容体をドナーT 細胞に遺伝子導入して武装する方法を開発する傍ら、HLA に結合したマイナー抗原を認識する抗体を分離し、これを単鎖化し T 細胞に導入する CAR-T 細胞療法の可能性についても検討した。マイナー抗原 / HLA 複合体を接種し免疫したマウス脾細胞から B 細胞を分離、ファージディスプレイ法にて特異的なクローンを分離した。得られた抗体は、マイナー抗原の陰性アリルペプチドをパルスした細胞には結合せず、抗原陽性ペプチド濃度依存性に結合した。これを T 細胞に導入することで、CD19 抗体で行われたような CAR-T 細胞免疫療法にトランスレーションすることが今後の目標である。

A. 研究目的

我々はこれまでに 9 種類のマイナー抗原を同定してきたが、うち 4 種類が血液系細胞に特異的に発現する遺伝子にコードされており、選択的 GVL 効果誘導に有望と考えられた。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各症例に合ったマイナー抗原を選択できるという、テーラーメイド治療が可能である。現在マイナー抗原ペプチドワクチン療法の臨床試験では 8 例に投与がなされたが、移植後の極めて長期経過例で十分な免疫反応が得られない傾向がわかってきた。このため事前にマイナー抗原特異的 T 細胞を事前に用意しておき、再発早期や、再発予防のブースとして投与することを考慮する必要がある。本研究は、クローン化した T 細胞では十分な輸注細胞数を得られない反省から、マイナー抗原 T 細胞受容体（TCR）や、マイナー抗原 / HLA 複合体を認識する抗体で武装した T 細胞

を開発することに注力した。TCR 導入細胞については昨年度の ACC-1Y マイナー抗原を認識するものに加えて、ACC-1C 抗原を認識する TCR のクローン化を試みた。

B. 研究方法

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：

ACC-1C を認識する CTL クローン、1B9 の TCR α 鎖、 β 鎖を PCR 法にてクローン化した。配列確認後、それぞれの鎖は PGK promoter もしくは 2A 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：

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 XtreamGene9

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。

ウイルスの感染：

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 、 $2,000\times\text{G}$ 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 T 細胞を入れて培養した。必要に応じ 2~3 回感染を反復し、感染 1 週間後より、マイナー抗原を $10\sim 100\text{nM}$ 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 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。

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

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：

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。

A2/HA-1H を認識する抗体については 5×10^8 スケールのファ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。

D. 考察

昨年度の報告で、マイナー抗原 ACC-1Y 特異的 1B3-CTL の TCR を導入された T 細胞の細胞傷害活性や avidity は充分ではなかったが、最大の理由は TCR の導入効率が 1~5% (増幅後) と低く、十分なエフェクター/標的 (E/T) 比が得られないことが考えられ、感染後の刺激・増幅が必要であった。今回作成した ACC-1C 特異的 1B9-CTL の TCR については、感染 T 細胞で特異的テトラマー HLA-

A24/ACC-1C での染色が得られなかった。この原因として 1B9-CTL が 2 つ TCR α 鎖を発現しており、今回半定量 PCR で強く発現していた α 鎖が内在性 β 鎖の本来のペアリング相手ではなかった可能性がある。このため、現在もう一つの α 鎖をクローニングして 2A を介して 1 本鎖化したベクターの構築を行っている。もう 1 つの可能性として、過去にライデン大学から報告があったように、導入した TCR α と β 鎖のペアリングが導入された T 細胞が endogenous に発現する T 細胞より CD3 コンプレックスを奪う力が弱いものであった可能性がある。この場合は S-S 結合を導入するなど、ペアリングの強化が必要と考えられた。

HLA-A*02:01 に提示された HA-1H ペプチドを認識する抗体と、この抗体を発現する CAR-T 細胞の作成は結果に示したごとく、抗体のスクリーニングの開始は 5 \times 10⁸ クローンと大きなプールであったにもかかわらず、陰性コントロール HLA-A2/MAGEA3 モノマーを加えたパニングで 12.5% の効率で HLA-A2/HA-1H 特異的抗体を得ることが出来た。この効率は抗体スクリーニング結果として非常に高いと考えられた。

CAR-T 細胞の機能については解析途上であるが、少なくともさまざまな HLA-A*02:01 結合性ペプチドを用いたパルス実験では、単鎖抗体がわずかに 1 アミノ酸の違いを見分けているデータが得られた。しかし、もともと HA-1R (抗原陰性のペプチド) は HLA-A*02:01 への結合効率が HA-1H より 10 分の 1 ほど低いと報告されており、単純に同じペプチド濃度でのパルスの比較をするのはフェアではないと考えられる。しかし、#131 scFV テトラマー抗体や CAR-T 型が反応した 10 μ M 以上というのは、生理的には達しえない濃度 (生理的には高くても 0.1 μ M が上限と考えられる) であり、非常に特異性の高い抗体が得られたと考えている。

今後の課題として、CAR-T 型における詳細な特異性検討、介在補助分子の有無、細胞傷害活性を CTL 並みに改善する方法の開発などを考えている。

E. 結論

移植後の選択的 GVL 効果を用いた再発白血病の予防や治療は今後さらに主要な課題となると考えられる。能動免疫であるワクチンは我々のみならず、オランダ・ドイツグループが樹状細胞ベースで開発を開始しているが (Dr. Dolstra、私信)、効果の速さの点で養子免疫に勝るものはない。TCR の導入では発現効率や、内在性 TCR とのキメラ形成など問題があったが、CAR-T はこれらの問題は回避できる。今後さらに良質な抗体を作成することで、臨床にトランスレーション可能な治療系が開発できる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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).

H. 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）
分担研究報告書

間葉系幹細胞を介する B 細胞分化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）

研究要旨

間葉系幹細胞（MSC）は、骨髄微小環境において造血幹細胞（HSC）の自己複製や増幅に重要な支持機能を果たしており、骨髄内骨髄移植法では、MSC と HSC がいずれも同所的に移植されるため、経静脈法と比較して移植後の造血機能の回復が促進されることが期待されている。本研究では、分化系列特異的な造血制御過程への MSC の関与を明らかにすることを目的として、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。遺伝子改変マウス由来の MSC は、正常同系マウス由来の MSC と比較して、骨芽細胞・脂肪細胞への分化能の低下を認め、stromal cell-derived factor 1 の発現量低下を介して正常マウス由来造血幹細胞の B 細胞分化を障害した。この結果より、今後、造血障害の新たな治療戦略として、異常な MSC の機能修復を目指した薬理学的手法の開発が有望な選択肢となり得ることが示唆された。

A. 研究目的

間葉系幹細胞（mesenchymal stromal/stem cells, MSC）は骨髄微小環境において造血細胞ニッチを構成する重要な細胞である。最近、造血異常と骨髄微小環境異常の相関を示唆する知見が相次いで報告されており、われわれも昨年度の研究において、in vitro の培養下で薬理的に機能を賦活化されたヒト MSC がヒト CD34 陽性細胞の増幅を増強する可能性を報告した。本年度の研究においては、さらに MSC が系列特異的な造血過程の制御に関与している可能性を明らかにするため、B 細胞系列に造血異常を認めることが知られている遺伝子欠損マウスを用いて、MSC の機能と B 細胞分化能の関連について検討を行った。

B. 研究方法

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

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. 考察

本研究の結果により、骨髄 MSC の遺伝子欠損に伴う機能異常が、造血幹細胞の B 細胞分化障害に関与することが明らかとなり、今後、造血障害の新たな治療戦略として、異常な間葉系幹細胞機能の修復を目指したアプローチが選択肢となり得ることを示唆するものと考えられる。また、特に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は、ドナーに由来するより多数の正常な MSC を直接的に骨髄微小環境へ投与を行うため、レシピエント MSC に由来する異常な骨髄微小環境の改善にも有効である可能性がある。

E. 結論

MSC の機能異常が系列特異的な血球分化過程にも影響を与え得ることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 auto-immune hemolytic anemia. *Leuk Lymphoma*. 2012; 53(11):2307-2309.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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):109-16, 2013.
- 6) 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) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Hayashi Y, Tamura A, Ichinohe T, Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T. Expression of C/EBP β 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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に移植するためには、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。

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ipient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。

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。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。

D. 結論

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。

E. 結論

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。

F. 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, Tamaki H, Inoue T, Soma T, Kai S, Kato S, Ogawa H. Intrabone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment: a phase I study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 18; 633-639, 2012.
- 2) Ikegame K, Kaida K, Yoshihara S, Fujiwara M, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, Kamikonya N, Saji H, Hirota S, Ogawa H. Feasibility of unmanipulated haploidentical stem cell transplantation using standard GVHD prophylaxis for HLA-homozygous patients. *International Journal of Hematology*, 96; 101-108, 2012.
- 3) Yoshihara S, Ikegame K, Kaida K, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, Ogawa H. Incidence of extramedullary relapse after haploidentical SCT for advanced AML/myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplantation*, 47; 669-676, 2012.
- 4) Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Okada M, Soma T, Hayashi K, Fujii N, Onuma T, Kusunoki Y, Saji H, Ogawa H. Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplantation*, 47; 508-515, 2012.
- 5) Yoshihara S, Ikegame K, Taniguchi K, Kaida K, Kim EH, Nakata J, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, Ogawa H. Salvage haploidentical transplantation for graft failure using reduced-

intensity conditioning. *Bone Marrow Transplantation*, 47; 369-373, 2012.

- 6) Taniguchi K, Yoshihara S, Tamaki H, Fujimoto T, Ikegame K, Kaida K, Nakata J, Inoue T, Kato R, Fujioka T, Okada M, Soma T, Ogawa H. Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. *Ann Hematol*, 91; 1305-1312, 2012.

2. 学会発表

- 1) The 54th annual meeting of the American Society of Hematology, 2012, 12.8-11, Atlanta, USA. Okada M, Fujimori Y, Oku N, Tamekane A, Takafuta T, Nakajima T, Tokugawa T, Sawada A, Ishii S, Kaida K, Ikegame K, Soma T, Ogawa H. FDG-PET/CT early after 90Y-ibritumomab tiuxetan therapy predicts outcome in relapsed or refractory indolent B-cell lymphoma.
- 2) The 54th annual meeting of the American Society of Hematology, 2012, 12.8-11, Atlanta, USA. Ishii S, Ikegame K, Kaida K, Yoshihara S, Okada M, Kato R, Inoue T, Tamaki H, Fujimori Y, Soma T, Ogawa H. A novel regimen of unmanipulated HLA-haploidentical transplantation using a small dose of anti-T-lymphocyte globulin for patients in high tumor burden.
- 3) 2013 Tandem BMT Meetings, 2013, 2.13-17, Salt Lake City, USA. Ikegame K, Taniguchi Y, Yoshihara S, Kaida K, Taniguchi K, Ishii S, Inoue T, Kato R, Okada M, Tamaki H, Fujioka T, Soma T, Ogawa H. From murine model to clinical trial of graft-versus-GVHD, a second transplantation from another donor for the rescue from refractory acute GVHD.
- 4) Shinichi Ishii, Kazuhiro Ikegame, Katsuji Kaida, Ruri Kato, Takayuki Inoue, Satoshi Yoshihara, Masaya

Okada, Toshihiro Soma, Hiroyasu Ogawa : HLA-haploidentical myeloablative stem cell transplantation using anti-T-lymphocyte glibulin、第 74 回日本血液学会学術集会、京都、2012 年 10 月 20 日

5) Masaya Okada, Naohiko Oku, Akira Tamegane, Toshiro Takafuta, Toshiyuki Nakajima, Tazuko Tokugawa, Akihiro Sawada, Shinichi Ishii, Katsuji Kaida, Kazuhiro Ikegame, Toshihiro Soma, Yoshihiro Fujimori, Hiroyasu Ogawa : FDG-PET/CT early after Zevalin therapy predicts outcome in relapsed indolent B-cell lymphoma, 第 74 回日本血液学会学術集会、京都、2012 年 10 月 21 日

6) 池亀和博，海田勝仁，石井慎一，吉原哲，谷口享子，加藤るり，井上貴之，岡田昌也，相馬俊裕，小川啓恭．血縁 HLA 半合致ミニ移植（haplo-mini）の他施設前向き臨床試験（第 / 相試験）．第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013.3 金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞による造血幹細胞移植後の 難治性感染症の治療

分担研究者 小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学講座 教授）

研究要旨

ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）による臨床第 1 相試験を行った。造血細胞移植の HLA - A2 または A24 陽性ドナー末梢血よりサイトメガロウイルス（CMV）、EB ウイルス（EBV）に対する特異的 CTL を誘導した。CMV 特異的 CTL の投与を 5 名で行った。投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、1 例で GradeIII の肝障害を認めたが無治療で速やかに改善した。他に重篤な合併症も認めなかった。4 名の患者で投与後末梢血から CMV - DNA の低下、消失を認めた。

A. 研究目的

造血幹細胞移植後の患者における難治性ウイルス感染症に対し、臨床応用可能なウイルス特異的 CTL の体外増幅法を開発し、移植後の難治性ウイルス感染症に対して臨床第 1、2 相試験を行う。

B. 研究方法

造血細胞移植 HLA-A2 または A24 陽性ドナーの末梢血 30ml から単核球を分離し、ウイルス特異的ペプチドで刺激後、IL-2 添加培地で 1 週間培養し、その後我々の開発した方法に基づき CD3 で刺激した T 細胞に抗原ペプチドをパルスしたものを抗原提示細胞とし T 細胞に加え閉鎖的培養無菌バッグにより培養した。初回投与細胞数、 $1 \times 10^5 / \text{kg}$ より漸増し、計 3 回の投与を行い、投与前後の末梢血ウイルス DNA の評価を行う。

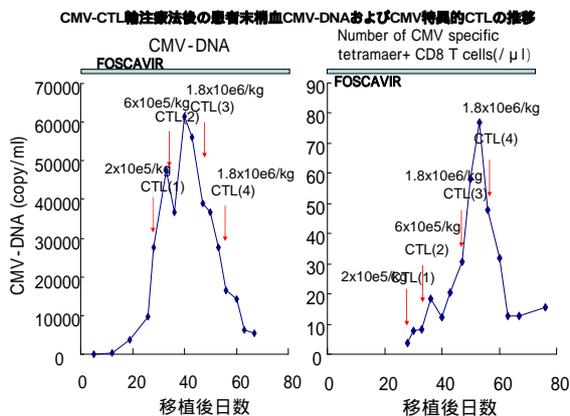
（倫理面への配慮）

本研究は名古屋大学医学部バイオ先端臨床研究審査委員会の承認後、ドナーから文書による同意を得ておこなう。

C. 研究結果

造血細胞移植の HLA - A2 または A24 陽性ドナー末梢血よりサイトメガロウイルス（CMV）、EB ウイルス（EBV）に対する CTL を誘導した。培養はこれまでに CMV が 12 名、EBV が 17 名で行い、それぞれ 7 名、7 名で初回投与基準を満たす細胞数の増殖が得られた。うち培養上清中に含まれるウイルス検査の基準も満たしたのは、6 名、3 名であった。

GCV 耐性 CMV 感染を起こした患者 5 名（うち本年度は 2 例）に対し CMV-CTL の投与を行った。いずれも投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、他に重篤な合併症も認めなかった。1 例で GradeIII の肝障害を認めたが無治療で速やかに改善した。5 例中 4 例の患者で投与後末梢血からの CMV - DNA の低下、消失を認めた。CTL 投与後の CMV-DNA の消失および患者体内での CMV-CTL の増加を示す（下図）



別の1名は2回のCTL投与後にウイルスDNAの減少が見られなかったため、ホスカビル投与を行いCMV-DNAは消失した。

D. 結論

骨髄移植ドナーから3-4週間の培養期間でCMVまたはEBV特異的CTLを臨床応用可能なレベルまで培養増幅することができた。

当院倫理委員会での承認後、臨床第1,2相試験が開始された。5名の投与はいずれも安全に投与でき、うち4名で効果が見られた。培養に3-4週間かかること、投与基準をみたらCTLが得られるのはCMV特異的CTLで約50%、EBV特異的CTLでは約30%であることから、EBV特異的CTLの誘導ペプチドの追加など培養法の改善が必要と考えられ、またリスクの高い移植患者ではあらかじめドナーより培養し凍結しておくか、第3者からウイルス特異的CTLを培養し保存しておくCTLバンクの作成、運用が望ましいと考えられた。

E. 結論

臨床第1相試験が開始された。まだ投与例が少なく、今後さらにCTL培養条件を改善し、症例数を増やす必要があるものの、いずれも安全に投与可能であり、明らかな効果の見られた症例も認められた。厚労省へ本治療法に関する先進医療への方向性についてご相談し、臨床第2相試験については第3者から

のCTL療法を行うよう指導を受け、現在準備中である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kato K, Otake H, Tagaya M, Takahashi Y, Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S, Nakashima T. Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child. Am J Otolaryngol. 2013 Jan-Feb;34(1):89-92.
- Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. Blood. 2013 Jan 31;121(5):862-3.

2. 学会発表

- Yoshiyuki Takahashi, Virus specific cytotoxic T-cell therapy for drug resistant virus infection after hematopoietic stem cell transplantation, 細胞療法シンポジウム、第54回日本小児血液・がん学会総会(2012年12月1日、パシフィコ横浜会議センター、横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

骨髄内骨髄移植マウスモデルを用いた移植後肺障害に関する検討

分担研究者 品川 克至（岡山大学医学部 血液・腫瘍内科 講師）

研究要旨

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に肺胞障害により発症する予後不良な肺合併症である。肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与などが想定されているが未解明な部分が多い。我々は骨髄内骨髄移植（IBM-SCT）では静脈内骨髄移植（IV-SCT）よりも移植後に肺へトラップされるドナー細胞が少なく、IPS の発症が軽減されると仮定し IPS のマウスモデルにより比較検討した。移植 6 週後の気管支肺胞洗浄では、IBM-SCT において IV-SCT よりも回収液中の総細胞数および T 細胞数が有意に少なく、組織学的にも細胞浸潤、組織障害が軽度であった。また *in vivo* bioluminescence imaging (BLI)分析では、移植後 1 時間では IV-SCT でほとんどの細胞が肺に取り込まれたが、IBM-SCT では肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった。移植後 2 日目の肺局所組織での各種ケモカイン mRNA 発現は、IV-SCT で高い傾向にあり特に CCL2 では有意であった。一方、移植後 5 日目の BLI 分析では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT と IBM-SCT で差はなかったが、allogeneic の系では移植後 2 日目よりさらに有意に IV-SCT で増加した。肺障害のメカニズムとして移植 2 日までのドナー細胞の肺へのトラップに加え、各種ケモカイン mRNA 発現増加が allo 免疫反応を誘導していると考えられた。以上から IPS は IBM-SCT において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の輸注細胞の肺での物理的動態およびケモカイン発現の差異がこれらの現象に関与していると考えられた。

A. 研究目的

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS) は、移植後に広汎な肺胞障害を生じて発症する予後不良な肺合併症の総称であり、肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与などが考えられている。診断基準は、a) 広範な肺胞障害の存在、b) 下気道感染症の否定、である。胸部 X-P、CT 上の多発浸潤影の出現、肺炎の臨床症状、肺機能障害（低 O₂血症、拘束性肺機能障害）が見られる。また細菌、真菌、ウイルス感染を否定することが必要である。頻度は、同種移植では再生不良性貧血など非腫瘍性疾患では 3~7%、白血病など腫瘍性疾患では 7~10%、自己移植後では 6%といわれており、悪性腫瘍に対する同種移植後に多い。発症時期は移植後、中央値で 21 日といわれているが、2 ヶ月以降の発

症もある。死亡率は 60~82%であり予後はきわめて不良である。発症に関与する危険因子として、前述の悪性腫瘍に対する同種移植の他、高齢、全身放射線照射(TBI)、移植片対宿主病(GVHD)などが推定されている。

病態メカニズムは明らかでないが、TBI による組織障害によりサイトカインの誘導や、肺上皮細胞での MHC、補助シグナル、接着因子の発現上昇などが発生し、肺局所へのドナー細胞の流入と活性化がおこり、肺胞上皮とドナー T 細胞の接触による免疫反応、および RT による肺障害の両者により発症することが推定されている。

ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内骨髄移植（IV-SCT）後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植（IBM-SCT）後では少な

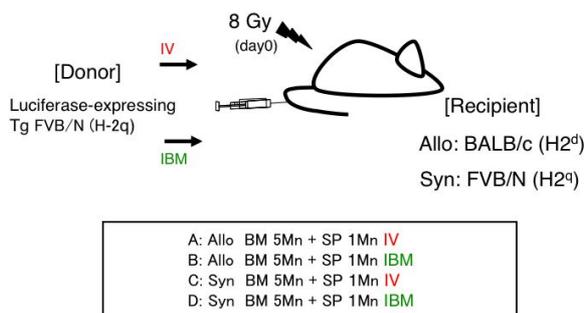
いと考えられる。池原らは、マウスモデルを用いて、IBM-SCT では IV-SCT よりも GVHD が抑制されることを報告している。我々は IBM-SCT では IV-SCT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立て、マウスモデルを用いて IPS に関して IBM-SCT と IV-SCT との比較検討を行った。

B. 研究方法

ドナーマウスに C57BL/6J を用い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に IV-SCT と IBM-SCT を行い比較検討した。

移植後の、体重および GVHD スコア、生存率を評価した。また移植後 6 週間後に、気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage (BAL) を行い、回収液中の細胞を解析した。また肺組織の病理所見を検討するとともに、肺組織から抽出した mRNA におけるサイトカイン発現レベルを測定した。次にドナーマウスに FVB/N lac+, レシピエントに BALB/c を用いた系で、*in vivo* bioluminescence imaging (BLI) 分析により移植後輸注細胞の体内分布の時間的、場所的推移に関して IV-SCT と IBM-SCT で比較検討した。(図 1)

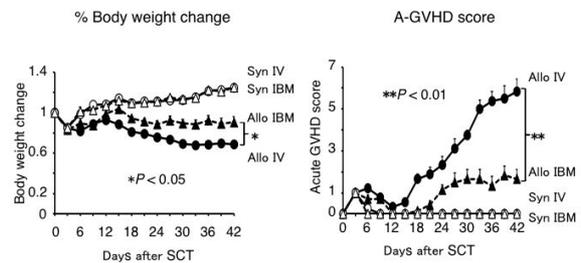
(図 1)



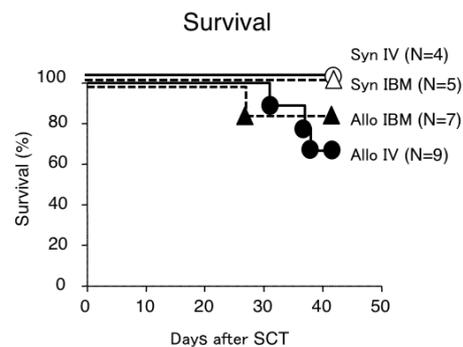
C. 研究結果

移植 6 週間において、IBM-SCT で体重減少が低く ($p < 0.05$)、また GVHD スコアも低く ($p < 0.01$)、生存率が高かった。(図 2, 3)

(図 2)

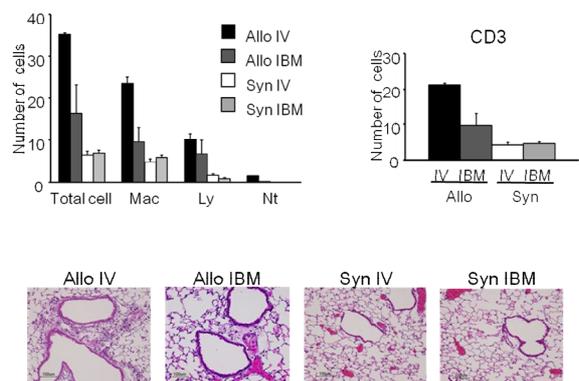


(図 3)



同じく移植 6 週後の BAL の解析では、回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は、IBM-SCT において IV-SCT よりも少ない傾向にあり、組織学的にも IBM-SCT において細胞浸潤、組織障害が軽度であった。(図 4)

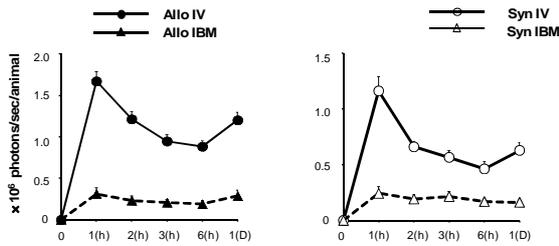
(図 4)



さらにルシフェラーゼによる発光反応を用いた *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) 分析による解析では、IBM-SCT では IV-SCT に比し移植後早期 (1-6 時間) の肺への移植細胞の集積が少なかった。移植後 1h では IV-SCT 群でほとんどの細胞が肺に取り

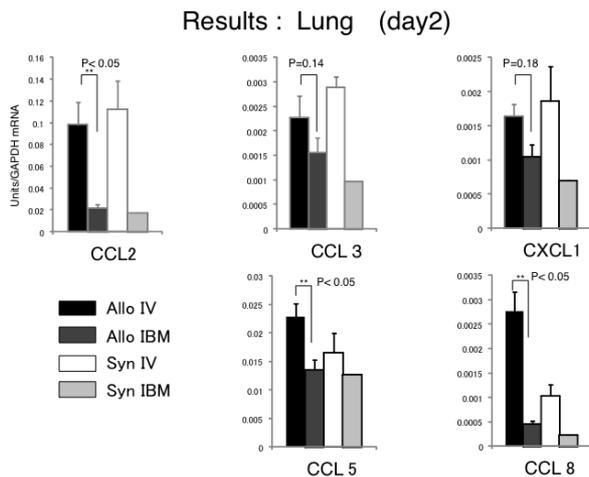
込まれたが、IBM-SCT 群では輸注下肢にとどまり肺に取り込まれた細胞は有意に少なかった(3.1 ± 0.7 vs $16.7 \pm 1.1 \times 10^5$ photons/sec/animal, IBM-SCT vs IV-SCT; $p < 0.01$)。(図 5)

(図 5)



次に移植後 2 日目の肺組織から抽出した mRNA における各種ケモカインの発現レベルは、IV-SCT 群で高い傾向にあり、特に CCL2 では有意であった (0.098 ± 0.020 vs 0.020 ± 0.003 units/GAPDH mRNA; $p < 0.05$)。(図 6)

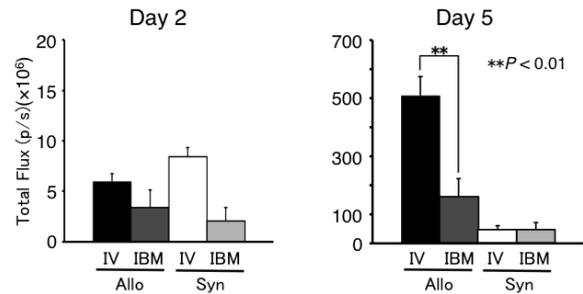
(図 6)



以上の 2 つの結果は syngeneic の系においても同様の結果が得られたため(2.4 ± 0.6 vs. $11.6 \pm 1.3 \times 10^5$ photons/sec/animal; $p < 0.01$)、移植早期の輸注細胞の肺へのとりこみは IV と IBM の輸注手技の違いによって示唆された。移植後 2 日目と 5 日目の BLI 分析では、5 日目では syngeneic の系において肺への取り込みは IV-SCT 群と IBM-SCT 群で差はな

かったが (4.8 ± 1.1 vs. $4.6 \pm 2.5 \times 10^7$ photons/sec/animal; $p = 0.94$)、allogeneic の系では移植後 2 日目よりさらに有意に IV-SCT で増加した (50.9 ± 6.6 vs $16.0 \pm 6.2 \times 10^7$ photons/sec/animal; $p < 0.05$) (図 7)

(図 7)



以上から IPS は IBM-SCT において軽度である可能性が示唆された。また肺障害のメカニズムとして移植 2 日までのドナー細胞の肺へのトラップに加え、各種ケモカイン mRNA 発現増加が allo 免疫反応を誘導していると考えられた。

D. 考察

IPS マウスモデルによる IV-SCT と IBM-SCT の比較研究は過去になく、今回肺局所のリンパ球の集積の差異が経時的に *in vivo* 観察され、その機序がケモカインレベルで証明された意義は大きいと思われる。IBM-SCT が移植後肺障害軽減の点からも有効であることが示唆され臨床応用が期待される。今後さらに IPS 発症に関与する T 細胞を含めた細胞分画の同定と詳細な検討が課題である。

E. 結論

今回検討した IPS マウスモデルでは IPS は IV-SCT 群に比し IBM-SCT 群において軽度である可能性が示唆され、移植後早期の輸注細胞の肺での物理的動態およびケモカイン発現の差異がこれらの現象に関与していると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H Nishimori, Y Maeda, T Teshima, H Sugiyama, K Kobayashi, Y Yamasuji, S Kadohisa, H Uryu, K Takeuchi, T Tanaka, T Yoshino, Y Iwakura and M Tanimoto. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17 Blood 119:285-295, 2012
- 2) Teshima T, Maeda Y, Ozaki K. Regulatory T cells and IL-17- producing cells in acute graft-versus-host disease. Immunotherapy. 2011;3(7):833-52
- 3) Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Fukushima N, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R. Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. Clin Cancer Res 2012 Aug 1;18(15):4183-4190
- 4) Sato Y, Inoue D, Asano N, Takata K, Asaoku H, Maeda Y, Morito T, Okumura H, Ishizawa S, Matsui S, Miyazono T, Takeuchi T, Kuroda N, Orita Y, Takagawa K, Kojima M, Yoshino T. Association between IgG4-related disease and progressively transformed germinal centers of lymph nodes. Mod Pathol. 2012 Jul;25(7):956-67

2. 学会発表

- 1) Hideaki Fujiwara, Koichiro Kobayashi, Hisakazu Nishimori, Masaaki Nishinohara, Sachiyo Okamoto, Kenichi Matsuoka, Eisei Kondo, Nobuharu Fujii, Katsuji Shinagawa, Mitsune Tanimoto and Yoshinobu

Maeda. B7H1 expression on recipient regulate the frequency of IL-17+ IFN γ + T cells and contribute to the pathogenesis of cGVHD. 2013 ASBMT tandem meeting.

- 2) H Fujiwara, Y Maeda, H Yamane, M Uno, T Yano, T Masunari, S Asakura, K Matsuoka, N Fujii, E Kondo, K Shinagawa, M Tanimoto. Therapeutic Outcome of Localized CD5-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma. 74th JSH 2012.
- 3) Asano T, Fujii N, Saeki K, Hasegawa E, Kuroi T, Matsuoka K, Kondo E, Maeda Y, Shinagawa K, Ichimura K, Tanimoto M. Successful allogenic stem cell transplantation for MDS complicated by severe organizing pneumonia 第 74 回日本血液学会学術集会 2012.10.19
- 4) 野村昌作, 石井一廣, 藤田真也, 伊藤量基, 片山雄太, 許 泰一, 田中志津, 前田嘉信, 谷本光音, 錦井秀和, 藤島直仁, 澤田賢一, 大田秀一, 林 邦雄, 竹内麻子, 池添隆之, 朴 永東, 八木秀男, 岡田昌也, 小川啓恭. 同種造血幹細胞移植後のサイトカイン・ケモカイン・可溶性分子の変動に対するリコンビナントトロンボモジュリンの影響について(サイト研究会中間報告). 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013.3.8(金沢)
- 5) 西之原正昭, 藤原英晃, 廻 勇輔, 吉岡尚徳, 新谷大悟, 近藤英生, 藤井伸治, 前田嘉信, 品川克至, 谷本光音. 悪性リンパ腫に対する臍帯血移植 23 例の検討 第 51 回日本リンパ網内系学会総会
- 6) 藤原英晃, 品川克至, 長谷川詠子, 佐伯恭昌, 黒井大雅, 浅野 豪, 吉岡尚徳, 廻 勇輔, 松岡賢市, 藤井伸治, 近藤英生, 前田嘉信, 谷本光音. 治療抵抗性血液悪性疾患に対するハプロ

移植の検討：単一施設の最新成績. 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013.3.8(金沢)

- 7) 浅野 豪, 近藤英生, 佐伯恭昌, 長谷川詠子, 黒井大雅, 西森久和, 松岡賢市, 浅田 騰, 藤井敬子, 藤井伸治, 前田嘉信, 品川克至, 谷本光音. 当院同種造血幹細胞移植症例における Disease risk index の有用性の検討. 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013.3.9(金沢)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきこと無し

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）
分担研究報告書

灌流法による骨髄採取の安全性と有用性の検討

分担研究者 野村 昌作（関西医科大学内科学第1講座 主任教授）

研究協力者 石井 一慶（関西医科大学内科学第1講座 講師）

研究要旨

HLA 適合血縁者を対象として、灌流法による骨髄採取の安全性と有用性を検討した。採取の経過において重篤な合併症はなく安全に実施することができた。しかしながら、有核細胞数、CD 34 陽性細胞は吸引法に比して 1/10 以下と少数であった。

A. 研究目的

本臨床試験では、灌流法による骨髄採取の安全性と有用性を検討する（臨床第 相試験）。

主要評価項目：灌流法による骨髄採取に伴う安全性を primary endpoint とする。

副次的評価項目：灌流法に要した手術時間、骨穿孔、皮膚穿孔数・採取量、採取有核細胞数、ヘマトクリット、CD3(+), CD34(+), CFU-C 及び CFU-F。

B. 研究方法

1. 対象

HLA 適合血縁者

適格条件、除外条件については、非血縁バンクドナーの基準に準ずる。

2. 方法

骨髄採取法（灌流法、並びに吸引法）右腸骨稜全体の 1/2 に当たる部位から灌流法により骨髄細胞を採取する。次いで、右腸骨稜残り 1/2 の部位、および左後腸骨稜全体から従来法である吸引法を用いて必要細胞数に達するまで骨髄採取を継続する。

1) 灌流法による骨髄採取法

ドナーの管理法は日本骨髄バンクの「骨髄採取マニュアル」(第四版)に準ずる。

骨髄採取は入院下で実施する。

全身麻酔下で一方の腸骨から 2~4 カ所で灌流法採取を実施する。

2 本の骨髄穿刺針を腸骨に 3~5cm の間隔で穿刺し、生理食塩水 30 ml を一方よりゆっくり注入し、同時に対側から軽く吸引する。この時、採取側シリンジのみヘパリン（10~30 U/ml とする）加生理食塩液を約 0.5 ml 使用する。

採取時には、採取量、骨髄の有核細胞数（Nucleic cell count, NCC）、ヘマトクリット（HCT%）を計測する。

2) 吸引法による骨髄採取法と採取骨髄細胞の処理

右側腸骨の上後腸骨棘から腸骨稜結節にかけて灌流法で穿刺した残り後半 1/2 の部位、および左後腸骨稜全体から吸引法を用いて必要細胞数に達するまで骨髄採取を施行する。吸引法による骨髄採取は日本骨髄バンクの「骨髄採取マニュアル」(第四版)に準ずる。採取時間は従来報告通り 3 時間の予定である。吸引法で採取した骨髄細胞をレシピエントへ移植する。吸引法による骨髄採取後、自己血輸血を施行する。

(倫理面への配慮)

平成 17 年に中国で実施された症例ではドナーに対する負担も少なく、翌日には歩行が可能であった。肺塞栓症などの重篤な有害事象も認められなかった。レシピエントへの採取骨髄細胞の骨髄内投与時にも重篤な有害事象は認めず、安全に施行可能であった。平成 22 年に関西医科大学で施行された症例でも採取の経過において重篤な合併症はなく安全に実施することができた。従来 of 吸引法による健常人ドナーからの骨髄採取事例において、心停止、呼吸停止、脳梗塞、肺脂肪塞栓症などの重症有害事象の報告を認めるものの、その頻度は 1,600~4,600 例に 1 例程度であり、吸引法に伴う重症有害事象の頻度は非常に低いと考えられている。以上より、本臨床試験において重症有害事象の発症を認めた際には、灌流法による可能性を否定できないと考えられる。したがって、ドナーにおいて CTCAE v4.0 Grade 4 以上の有害事象が出現した際には、急送報告を義務とし効果安全性評価委員会において灌流法との因果関係を検討する。

C. 研究結果

採取の経過において重篤な合併症はなく安全に実施することができた。有核細胞数は吸引法に比して 1/10 であり RBC 除去後でも 1/3 と少数であった。CD34 陽性細胞でも吸引法に比して 1/10 以下であった。T 細胞の混入は 6.1-15.4% と吸引法に比して少なかった。

D. 考察

灌流法で有核細胞数、CD 陽性細胞とも採取細胞数が少ない。実施した症例での細胞数にばらつきがあり、採取技術の確立が望まれる。また、T 細胞の混入が少ないことは GVHD には好ましいが、生着不全への影響を検討する必要がある。実際に中国の症例では DLI+ATG を要した。

E. 結論

灌流法はカニクイザルでは採取数が蓄積された結果、技術的には確立され、かつ採取細胞数に関しても臨床応用可能な結果が導き出された。しかしながら、実地臨床への移行に関しては今回の phase I に期待して、症例の蓄積を待つ必要がある。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特記すべきことなし。

2. 学会発表

特記すべきことなし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発

分担研究者 村田 誠（名古屋大学医学部附属病院 血液内科 講師）

研究要旨

骨髄非破壊的前治療を用いた臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者を対象として、解凍した臍帯血を洗浄・濃縮し、直接骨髄内へ輸注する移植法の臨床試験を行っている。平成 24 年度は 2 例に対して試験を実施した。重篤な有害事象は認めず、いずれの症例においても速やかな生着を確認した。

A. 研究目的

本研究では、骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植における生着率の向上を目指し、同種造血幹細胞移植の適応でありながら、骨髄または末梢血幹細胞提供ドナーが得られない成人血液悪性疾患患者を対象として骨髄内臍帯血移植を実施し、その安全性と有効性を確認する。

本試験を通じて得られる、例えば臍帯血の洗浄・濃縮技術や骨髄への注入技術などは、将来の「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」の確立に寄与するものと考える。

B. 研究方法

本試験のデザインは臨床第 II 相試験。対象は骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者。主として、フルダラビン+シクロフォスファミドによる前治療法と、短期メソトレキセート+タクロリムスによる GVHD 予防法を用いる。解凍した臍帯血を洗浄、濃縮したのち、後腸骨稜から通常の骨髄穿刺針を用いて注入する。主要評価項目は移植後 60 日時点での生着かつ生存。予定登録数は 22 例で、登録期間は 4 年。追跡期間は最終症例の移植後 1 年。尚、本臨床研究の実施に当たっては当大学倫理委員会での承認を得た（承認番号：550、550-2）。

C. 研究結果

平成 24 年度は 2 例に対して試験を実施し、総実施数は 12 例となった。重篤な有害事象は認めず、いずれの症例においても速やかな生着を確認した。平成 23 年 3 月末で試験期間終了の予定であったが、予定登録症例数をまだ満たさないこと、しかしながら今後も新規登録症例が見込めることなどから、試験期間の延長を行った（平成 24 年 2 月 20 日承認、承認番号 550-3）。

D. 考察

造血幹細胞を用いた臨床研究を行う際には、改訂された厚生労働省「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」との関係を確認した上で、実施の判断をする必要がある。

試験期間を 2015 年 3 月まで延長した。本試験の多施設共同研究への拡大を進めており、登録症例数を増やし完遂を目指す。

E. 結論

引き続き、安全性に配慮しながら本試験を進める。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato T, Murata M, et al. Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation. *Cell Immunol.* 2012; 276: 75-82.
- 2) Kuwatsuka Y, Murata M, et al. Phase II study of dose-modified busulfan by real-time targeting in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancy. *Cancer Sci.* 2012; 103(9): 1688-1694.
- 3) Nishiwaki S, Murata M, et al. Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. *Int J Hematol.* 2012; 96(3): 295-300.

2. 学会発表

- 1) Murata M, et al. Clinical factors predicting the response of acute graft-versus-host disease to corticosteroid therapy. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, Dec 2012.
- 2) Nakane T, Murata M, et al. Older age increases non-relapse mortality in patients with grade II-IV acute GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation: A retrospective analysis from the Japanese TRUMP database. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, Dec 2012.
- 3) Kato K, Murata M, et al. The impact of ATG/ALG in preconditioning on the allogeneic stem cell transplantation for patients with acute leukemia. 54th ASH Annual Meeting and Exposition, Atlanta, Dec 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

**新規造血幹細胞移植技術評価のための
新規移植後モニタリングシステムの開発に関する研究**

分担研究者 森尾 友宏（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 准教授）
研究協力者 清水 則夫（東京医科歯科大学・難治疾患研究所・ウイルス治療学 准教授）
今井 耕輔（東京医科歯科大学・大学院・小児・周産期地域医療学講座）
中谷 夏織（東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野）

研究要旨

造血細胞移植では、原疾患の治癒が最も重要であるが、早期・晩期拒絶、混合キメリズム、GVHD、感染症、長期的免疫不全症、晩期合併症などが短期・長期予後を規定している。本研究は、骨髄内造血細胞移植における免疫学的再構築や移植後合併症の詳細かつ簡便な解析法を開発することを目的とした。

本年は特に造血細胞移植後の免疫学的再構築の定量的評価を目的に、sjKRECs, cjKRECs, TRECs 解析法にて、造血細胞移植後患者 117 名を対象に B/T 細胞新生能を検討した。その結果臍帯血移植では B 細胞の回復が早いこと、また T 細胞の回復についても骨髄移植と遜色がないことが明らかになった。今後骨髄内造血細胞移植においても検証していくべきと考えている。

A. 研究目的

造血細胞移植では、原疾患の再発に加えて、早期・晩期拒絶、混合キメリズム、GVHD、感染症、長期的免疫不全症、晩期合併症などが短期・長期予後を規定している。骨髄内造血細胞移植などの新しい造血幹細胞移植技術においては、生命予後や移植関連合併症に加えて、その効果及び安全性を多角的にかつ科学的に検証することが重要である。本研究は、骨髄内造血細胞移植における免疫学的再構築や移植後合併症の詳細かつ簡便な解析法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1) 移植後免疫学的再構築能の解析

対象患者：造血細胞移植を行った 117 名の患者（70：悪性腫瘍、47：免疫不全症、年齢：0-62 歳）を対象とした。

全血から抽出した DNA を用いて、signal joint T-cell receptor excision circles (sjTRECs), signal joint kappa deleting recombination excision circles (sjKRECs), coding joint KRECs (cjKRECs) をリアルタイム PCR 系で測定した。

測定結果は μgDNA あたりのコピー数として表し、RNaseP および GAPDH をコントロールとして用いた。

データの欠落のある中、移植後 1, 3, 6, 12, 24 ヶ月後の sj/cjKRECs, TRECs を解析し、生存率、移植後（細菌、真菌、ウイルス）感染症などとの相関を解析した。

また sj/cjKRECs, TRECs の回復に寄与する因子として、ドナー年齢、レシピエント年齢、ドナーソース、前処置法、HLA 一致度、ステロイドの使用などをあげて、単変量・多変量解析を行った。

2) 微生物検査法の全自動化に関する検証

機器の組み合わせにより核酸抽出から解析までを streamline 化できるシステムについて検証を行った。

(倫理面への配慮)

KRECs, TRECs 測定の大半は retrospective study であり、ウイルス検査や遺伝子検査の際に用いた核酸検体の一部を用いて実施した。患者にはできるだけ遡って同意を取得し、また HP 上に本研究についての情報を掲載するなどの配慮を行った。

本研究については東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) 免疫学的再構築評価法：

移植後 3 ヶ月時点で TRECs が陽性になることが、悪性腫瘍における生存率と相関があることが明らかになった。また有意差はないものの 1 ヶ月時点での KRECs, TRECs 陽性は重症感染症発症リスクの低下に繋がる傾向にあることが明らかになった。

また TRECs, KRECs の回復に寄与する因子についても解析を加えた。その結果臍帯血移植が KRECs 回復に有利であることや、免疫学的再構築にはレシピエント年齢が関与することなどが明らかになった。

2) 微生物検査法の全自動化

既存のシステムの組み合わせによる検証、既に存在する全自動機器の検証、新規機器の開発を並行して行い、現在も検討中である。

D. 考察

KRECs, TRECs についてはまだ症例数は少ない中、一定の傾向が明らかになりつつあるが、今後は前方視的な大規模解析が必要である。またその実現にあたり体系的ウイルス検査との共通プラットフォームでの自動化リアルタイム PCR 系を立ち上げているところである。

移植後の定量的なモニタリングシステムの開発は新規移植技術評価において極めて重要である。今後

は短期的な解析のみならず、長期的な予後との関連も重要になると考えている。

測定系については、全自動化に載せることにより、さらに簡便かつ低価格に解析ができるようになることが期待される。

E. 結論

造血細胞移植後の免疫学的再構築について、KRECs, TRECs により B/T 細胞新生能の解析を行った。感染症や生存率との関連性も示唆され、今後モニタリングとして有用となると推察される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm M.C., Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. *J. Allerg. Clin. Immunol.* 49:01839-8, 2012.
- 2) Uchida Y, Matsubara K, Morio T, Kasawaki Y, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukawya T. Acute cerebellitis and concurrent encephalitis associated with parvovirus B19 infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 31:427, 2012.

2. 学会発表

- 1) 森尾友宏：再生医療・細胞治療領域で問題となる微生物のモニタリング、第 60 回日本ウイルス学会学術集会（シンポジウム）大阪、2012 年 11 月 13 日-11 月 15 日
- 2) 森尾友宏：「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」：免疫細

胞療法における指針及び治療の現状と展望、第
60 回日本輸血細胞治療学会(シンポジウム)、福
島、2012 年 5 月 27 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

書 籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書 籍 名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|-----------------------------------|---|---|-----------------------------------|-------------------|---|------------|---------|
| <u>Ikehara S.</u> | A revolutionary BMT method. In: Bone Marrow Transplantation Across Major Genetic Barriers | Yair Reisner and Massimo F martelli, eds. | Across Major Genetic Barriers | World Scientific. | New Jersey・London・Singapore・Beijing・Shanghai・Hong Kong・Taipei・Chennai | 2010 | 441-455 |
| <u>Susumu Ikehara.</u> | A new concept of stem cell disorders, and the rationale for transplantation of normal stem cells. | Dr. M.A. Hayat | STEM CELLS AND CANCER STEM CELLS. | Springer | | In press. | |
| Ming Li and <u>Susumu Ikehara</u> | Bone marrow stem cell therapies for diabetes mellitus and its complications | Chapter (ed. Dr. M.A. Hayat) | STEM CELLS AND CANCER STEM CELLS. | Springer | | In press. | |
| 森尾友宏 | (分担執筆) 多項目ウイルスモニタリングからの情報[診療のコツ] | 豊嶋崇徳編 | 症例とエビデンスに学ぶ 造血細胞移植と感染症 | 医薬ジャーナル社 | 大阪 | 2011年8月15日 | p150-2 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|--|---|------------------------------------|---------|-----------|------|
| <u>池原 進.</u> | 革新的移植方法 灌流法 + 骨髄内骨髄移植法. | 医学のあゆみ「造血幹細胞移植の最新動向：造血幹細胞移植のトピックス」 | 240 (5) | 465-469 | 2012 |
| Zhang Y, Hosaka N, Cui Y, Shi M, Li M, Li Q, and <u>Ikehara S.</u> | Effects of intrabone marrow-bone marrow transplantation plus adult thymus transplantation on survival of mice bearing leukemia. | Stem Cells | Dev.21 | 1441-1448 | 2012 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|---|---|---------------------|------|-----------|-----------------------------------|
| Shima C, Adachi Y, Minamino K, Okigaki M, Shi M, Imai Y, Yanai S, Takahashi K, <u>Ikehara S.</u> | Neuroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor on ischemia-reperfusion injury of the retina. | Ophthalmic Res. | 48 | 199-207 | 2012 |
| Ueda Y, Katagiri K, Tomiyama T, Yasuda K, Habiro K, Katakai T, <u>Ikehara S.</u> Matsumoto M, Kinashi T. | Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus. | Nat. Commun. | 3 | 1098 | 2012 |
| Li M, Vanella L, Zhang Y, Shi M, Takaki T, Shapiro JI, <u>Ikehara S.</u> | Stem cell transplantation increases antioxidant effects in diabetic mice. | Int. J. Biol. Sci. | 8 | 1335-1344 | 2012 |
| Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, Takei S, Chiba Y, Hosokawa M, <u>Ikehara S.</u> | Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. | Brain Behav. Immun. | 29 | 82-97 | 2013 |
| Shi M, Li M, Cui Y, Liu L, Adachi Y, <u>Ikehara S.</u> | CD4 ⁺ T cell-depleted lymphocyte infusion impairs neither the recovery of recipient thymus nor the development of transplanted thymus. | J. Immunol. | 190 | 2976-2983 | 2013 |
| Li M, Shi M, Abraham NG, <u>Ikehara S.</u> | Improved expression of Sirt1 on thymic epithelial cells of SAMP1 after intra bone marrow-bonne marrow transplantation. | Cell Transplant. | | | 2013 Feb 26 [Epub ahead of print] |
| Shimo T, Adachi Y, Yamanouchi S, Tsuji S, Kimata T, Umezawa K, Okigaki M, Takaya J, <u>Ikehara S.</u> , Kaneko K. | A novel nuclear factor kB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, Ameliorates puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in mice. | Am. J. Nephrol. | 37 | 302-309 | 2013 |
| Li M, <u>Ikehara S.</u> | Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. | Stem Cells Int. | 2013 | 132624 | 2013 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|--|---|-------------------------------------|--------|---------------|------|
| Ochsenreither S, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, Wood B, Choi YE, Bleakley M, Warren EH, Hudecek M, <u>Akatsuka Y</u> , 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. (PMID:22529286) | 119 | 5492-501 | 2012 |
| Tamanaka T, Oka Y, Fujiki F, Tsuboi A, Katsuhara A, Nakajima H, Hosen N, Nishida S, Lin YH, Tachino S, <u>Akatsuka Y</u> , 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. (PMID: 23225417) | 32 | 5201- 5119 | 2012 |
| Demachi- Okamura A, Torikai H, <u>Akatsuka Y</u> , Miyoshi H, Yoshimori T, Kuzushima K. | Autophagy creates a CTL epitope that mimics tumor-associated antigens. | PLoS One. (PMID: 22529286) | 710 | e47126 | 2012 |
| Itamura H, Fukushima N, Kondo S, Urata C, Tanaka- Yoshimura M, Yokoo M, Ide M, Hisatomi T, Kubota Y, Sueoka E, <u>Ichinohe T</u> , Kimura S. | Successful reduced-intensity umbilical cord blood transplant for fulminant hemophagocytic syndrome in an adult with preexisting rheumatoid arthritis and auto- immune hemolytic anemia. | Leuk Lymphoma. | 53(11) | 2307- 2309 | 2012 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|---|---|-------------------------------|--------|---------|------|
| Kanda J, <u>Ichinohe T</u> , 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 I-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. | Leukemia. | 27(2) | 286-294 | 2013 |
| Ito T, Akagi K, Kondo T, Kawabata H, <u>Ichinohe T</u> , Takaori-Kondo A. | Splenic irradiation as a component of a reduced- intensity conditioning for allogeneic hemato- poietic cell transplantation in myelofibrosis with massive splenomegaly. | Tohoku J Exp Med. | 228(4) | 295-299 | 2012 |
| Kanda J, Atsuta Y, Wake A, <u>Ichinohe T</u> , 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. | 19(2) | 247-254 | 2013 |
| Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Yamashita K, <u>Ichinohe T</u> , 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. | 97(1) | 109-16 | 2013 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|--|---|---|----------|---------|-------------------|
| Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Maeda Y, <u>Ichinohe T</u> , Ohashi K, Fukuda T, Koichi Miyamura K, Iida H, Mori T, Iwato K, Eto T, Kawa K, Morita S, <u>Morishima Y</u> . | 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] |
| Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, Tamaki H, Inoue T, Soma T, Kai S, Kato S, <u>Ogawa H</u> . | Intrabone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment: a phase I study. | Biology of Blood and Marrow Transplantation | 18 (4) | 633-639 | 2012 |
| Ikegame K, Kaida K, Yoshihara S, Fujiwara M, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, Kamikonya N, Saji H, Hirota S, <u>Ogawa H</u> . | Feasibility of unmanipulated haploidentical stem cell transplantation using standard GVHD prophylaxis for HLA-homozygous patients. | International Journal of Hematology | 96(1) | 101-108 | 2012 |
| Yoshihara S, Ikegame K, Kaida K, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, <u>Ogawa H</u> . | Incidence of extramedullary relapse after haploidentical SCT for advanced AML/myelodysplastic syndrome. | Bone Marrow Transplantation | 47(5) | 669-676 | 2012 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|--|---|--------------------------------|-------|---------------|------|
| Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Okada M, Soma T, Hayashi K, Fujii N, Onuma T, Kusunoki Y, Saji H, <u>Ogawa H.</u> | Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT | Bone Marrow Transplantation | 47(4) | 508-515 | 2012 |
| Yoshihara S, Ikegame K, Taniguchi K, Kaida K, Kim EH, Nakata J, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, <u>Ogawa H.</u> | Salvage haploidentical transplantation for graft failure using reduced-intensity conditioning. | Bone Marrow Transplantation | 47(3) | 396-373 | 2012 |
| Taniguchi K, Yoshihara S, Tamaki H, Fujimoto T, Ikegame K, Kaida K, Nakata J, Inoue T, Kato R, Fujioka T, Okada M, Soma T, <u>Ogawa H.</u> | Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. | Ann Hematol | 91(8) | 1305- 1312 | 2013 |
| Kato K, Otake H, Tagaya M, <u>Takahashi Y,</u> Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S, Nakashima T | Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in animmunocompromised child. | Am J Otolaryngol | 34(1) | 89-92 | 2013 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|---|---|----------------|--------|---------|------|
| Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group | Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. | Blood | 121(5) | 862-3 | 2013 |
| H Nishimori, Y Maeda, T Teshima, H Sugiyama, K Kobayashi, Y Yamasuji, S Kadohisa, H Uryu, K Takeuchi, T Tanaka, T Yoshino, Y Iwakura, M Tanimoto. | Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17 | Blood | 119 | 285-295 | 2012 |
| Teshima T, Maeda Y, Ozaki K. 18(15) | Regulatory T cells and IL-17- producing cells in acute graft-versus-host disease. | Immunotherapy. | 3(7) | 833-52 | 2011 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|---|--|-----------------------|--------|-----------|------|
| Ito Y, Kimura H, Maeda Y, Hashimoto C, Ishida F, Izutsu K, Fukushima N, Isobe Y, Takizawa J, Hasegawa Y, Kobayashi H, Okamura S, Kobayashi H, Yamaguchi M, Suzumiya J, Hyo R, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, Suzuki R. | Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. | Clin Cancer Res | 18(15) | 4183-4190 | 2012 |
| Sato Y, Inoue D, Asano N, Takata K, Asaoku H, <u>Maeda Y</u> , Morito T, Okumura H, Ishizawa S, Matsui S, Miyazono T, Takeuchi T, Kuroda N, Orita Y, Takagawa K, Kojima M, Yoshino T. | Association between IgG4-related disease and progressively transformed germinal centers of lymph nodes. | Mod Pathol. | 25(7) | 956-67 | 2012 |
| Kato T, <u>Murata M</u> , et al. | Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation. | <i>Cell Immunol.</i> | 276 | 75-82 | 2012 |
| Kuwatsuka Y, <u>Murata M</u> , et al. | Phase II study of dose-modified busulfan by real-time targeting in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myeloid malignancy. | <i>Cancer Sci.</i> | 103(9) | 1688-1694 | 2012 |
| Nishiwaki S, <u>Murata M</u> , et al. | Efficacy and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for supporting hematopoiesis. | <i>Int J Hematol.</i> | 96(3) | 295-300 | 2012 |

雑 誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 年号 |
|---|--|--------------------------------------|-----|---------|------|
| Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan- Hammerstrom Q, van Zelm M.C., Morio T, Imai K, Nonoy | Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. | <i>J. Allerg. Clin. Immunol.</i> | 49 | 01839-8 | 2012 |
| Uchida Y, Matsubara K, Morio T, Kasawaki Y, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukawya T. | Acute cerebellitis and concurrent encephalitis associated with parvovirus B19 infection. | <i>Pediatr. Infect. Dis. J.</i> | 31 | 427 | 2012 |
| Morio T. Atsuta Y. Tomizawa D. Nagamura-Inoue T. Kato K. Ariga T. Kawa K. Koike K. Tauchi H. Kajiwara M. Hara T. Kato S. | Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88patients with primary immunodeficiency in Japan. | <i>Br. J. Haematol.</i> | 154 | 363-372 | 2011 |
| Miyanaga M. Sugita S. Shimizu N. Morio T. Miyata K. Mochizuki M. | A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. | <i>Br J Ophthalmol.</i> | 94 | 344-340 | 2010 |

V. 学会発表に関する一覧

学会発表に関する一覧

| 発表者氏名 | 演題名 | 学会名 | 会場 | 日時 |
|--|--|--|-----|---------------------------------------|
| 足立 靖、今井雄一郎、石 明、 <u>池原 進</u> . | 「アポトーシス阻害薬 Z-VAD-fmk を用いた効率の良い骨髄内骨髄移植法 . 」 | 第 100 回日本病理学会総会 . | 横浜 | 平成 23 年 4 月 28 日 ~ 平成 23 年 4 月 30 日 |
| 李 銘、張玉明、石明、 <u>池原 進</u> . | 「骨髄と胸腺の同時移植によるインスリン感受性の増加機序の解析-2 型糖尿病モデルマウスを用いて . 」 | 第 11 回日本抗加齢医学会総会 | 京都 | 平成 23 年 5 月 27 日 ~ 平成 23 年 5 月 29 日 |
| 森 眞一郎、野村昌作、 <u>池原 進</u> . | 「新しい骨髄採取方法（灌流法）のメリットと問題点 . 」 | 厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 平成 23 年度第 1 回造血細胞移植合同班会議 . | 名古屋 | 平成 23 年 7 月 2 日 ~ 7 月 3 日 |
| LI Ming, SHI Ming, <u>IKEHARA Susumu</u> . | 「骨髄と胸腺の同時移植による 2 型糖尿病の治療 / Treatment of type 2 diabetes mellitus in db/db mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus thymus transplantation. 」 | 第 40 回日本免疫学会学術集会 . | 千葉 | 平成 23 年 11 月 27 日 ~ 平成 23 年 11 月 29 日 |
| 保坂直樹、崔 雲澤、石 明、李 銘、李 清、高橋伯夫、 <u>池原 進</u> . | 「白血病担癌マウスにおける成体胸腺移植を併用した IBM-BMT の効果 / Effects of IBM-BMT plus adult thymus transplantation on mice bearing leukemia. 」 | 第 40 回日本免疫学会学術集会 . | 千葉 | 平成 23 年 11 月 27 日 ~ 平成 23 年 11 月 29 日 |
| 植田祥啓、片桐晃子、富山 尚、安田鐘樹、羽廣克嘉、片貝智哉、 <u>池原 進</u> 、木梨達雄 . | 「Mst1 キナーゼによる胸腺細胞動態と抗原認識の制御 / Mst1 regulates thymocyte trafficking and antigen recognition within thymic tissues. 」 | 第 40 回日本免疫学会学術集会 . | 千葉 | 平成 23 年 11 月 27 日 ~ 平成 23 年 11 月 29 日 |
| 串田剛俊、飯田寛和、森 眞一郎、野村昌作、 <u>池原 進</u> . | 「整形外科医からみた “ 灌流法の実際 ” 」 | 厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 平成 23 年度第 2 回造血細胞移植合同班会議 . | 東京 | 平成 24 年 1 月 8 日 ~ 1 月 9 日 |
| 研究代表者 <u>池原 進</u> . | 「新しい移植法とはどんな法法？」 | 厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 平成 23 年度厚生労働科学研究免疫アレルギー等予防・治療研究事業/がん臨床研究事業 造血細胞移植研究 7 班合同公開シンポジウム . | 東京 | 平成 24 年 1 月 9 日 |

学会発表に関する一覧

| 発表者氏名 | 演題名 | 学会名 | 会場 | 日時 |
|--|---|--|------------------------|----------------------|
| 池原 進、李 銘、石 明 . | 「移植技術を用いた難病の根治療法の開発 . 」 | 平成 23 年度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(移植医療分野)研究報告会 | 東京 | 平成 24 年 1 月 17 日 |
| Susumu Ikehara . | Autoimmune diseases as stem cell disorders: Rationale for normal stem cell transplantation for their treatment. The 5 th Autoimmunity Congress Asia (ACA 2011). | The 5 th Autoimmunity Congress Asia (ACA 2011). 招聘講演 | Singapore | November 17-19, 2011 |
| 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 . プログラム抄録集抄録集 pp64. | 第 4 回造血器腫瘍免疫療法研究会 . | 金沢 | H24 年 8 月 18 日 |
| 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). 日本造血細胞移植学会総会プログラム・抄録集 pp202. | 第 35 回日本造血細胞移植学会 | 金沢 | 2013 年 3 月 8 日 |
| 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. Abstract P-11 (pp34). | 2nd International Workshop on the Biology, Prevention, and Treatment of Relapse After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. | NIH Bethesda, MD, USA. | 2012 年 11 月 6 日 |
| 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 |
| 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, | Hyderabad, India. | October 26-28, 2012 |

学会発表に関する一覧

| 発表者氏名 | 演題名 | 学会名 | 会場 | 日時 |
|--|--|--|----------------------|--------------------|
| <u>Ichinohe T</u> , 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. |
| Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Hayashi Y, Tamura A, <u>Ichinohe T</u> , Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T. | Expression of C/EBP β 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. |
| Okada M, Fujimori Y, Oku N, Tamekane A, Takafuta T, Nakajima T, Tokugawa T, Sawada A, Ishii S, Kaida K, Ikegame K, Soma T, <u>Ogawa H</u> . | FDG-PET/CT early after 90Y-ibritumomab tiuxetan therapy predicts outcome in relapsed or refractory indolent B-cell lymphoma. | The 54th annual meeting of the American Society of Hematology | Atlanta, USA. | 2012, 12.8-11 |
| Ishii S, Ikegame K, Kaida K, Yoshihara S, Okada M, Kato R, Inoue T, Tamaki H, Fujimori Y, Soma T, <u>Ogawa H</u> . | A novel regimen of unmanipulated HLA-haploidentical transplantation using a small dose of anti-T-lymphocyte globulin for patients in high tumor burden. | The 54th annual meeting of the American Society of Hematology | Atlanta, USA. | 2012, 12.8-11 |
| Ikegame K, Taniguchi Y, Yoshihara S, Kaida K, Taniguchi K, Ishii S, Inoue T, Kato R, Okada M, Tamaki H, Fujioka T, Soma T, <u>Ogawa H</u> . | From murine model to clinical trial of graft-versus-GVHD, a second transplantation from another donor for the rescue from refractory acute GVHD. | 2013 Tandem BMT Meetings | Salt Lake City, USA. | 2013, 2.13-17 |
| Shinichi Ishii, Kazuhiro Ikegame, Katsuji Kaida, Ruri Kato, Takayuki Inoue, Satoshi Yoshihara, Masaya Okada, Toshihiro Soma, <u>Hiroyasu Ogawa</u> | HLA-haploidentical myeloablative stem cell transplantation using anti-T-lymphocyte globulin | 第 74 回日本血液学会学術集会 | 京都 | 2012 年 10 月 20 日 |

学会発表に関する一覧

| 発表者氏名 | 演題名 | 学会名 | 会場 | 日時 |
|---|---|-------------------------------|----|------------------|
| Masaya Okada, Naohiko Oku, Akira Tamegane, Toshiro Takafuta, Toshiyuki Nakajima, Tazuko Tokugawa, Akihiro Sawada, Shinichi Ishii, Katsuji Kaida, Kazuhiro Ikegame, Toshihiro Soma, Yoshihiro Fujimori, <u>Hiroyasu Ogawa</u> | FDG-PET/CT early after Zevalin therapy predicts outcome in relapsed indolent B-cell lymphoma | 第 74 回日本血液学会学術集会 | 京都 | 2012 年 10 月 21 日 |
| <u>池亀和博</u> , <u>海田勝仁</u> , <u>石井慎一</u> , <u>吉原哲</u> , <u>谷口享子</u> , <u>加藤るり</u> , <u>井上貴之</u> , <u>岡田昌也</u> , <u>相馬俊裕</u> , <u>小川啓恭</u> | 血縁 HLA 半合致ミニ移植 (haplo-mini) の他施設前向き臨床試験 (第 / 相試験) | 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 | 金沢 | 2013.3 |
| <u>Yoshiyuki Takahashi</u> | Virus specific cytotoxic T-cell therapy for drug resistant virus infection after hematopoietic stem cell transplantation | 第 54 回日本小児血液・がん学会総会細胞療法シンポジウム | 横浜 | 2012 年 12 月 1 日 |
| Hideaki Fujiwara, Koichiro Kobayashi, Hisakazu Nishimori, Masaaki Nishinohara, Sachiyo Okamoto, Kenichi Matsuoka, Eisei Kondo, Nobuharu Fujii, <u>Katsuji Shinagawa</u> , Mitsune Tanimoto and Yoshinobu Maeda. | B7H1 expression on recipient regulate the frequency of IL-17+ IFN γ + T cells and contribute to the pathogenesis of cGVHD. | 2013 ASBMT tandem meeting | | |
| H Fujiwara, Y Maeda, H Yamane, M Uno, T Yano, T Masunari, S Asakura, K Matsuoka, N Fujii, E Kondo, <u>K Shinagawa</u> , M Tanimoto. | Therapeutic Outcome of Localized CD5-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma. | 74th JSH 2012 | | |
| Asano T, Fujii N, Saeki K, Hasegawa E, Kuroi T, Matsuoka K, Kondo E, Maeda Y, <u>Shinagawa K</u> , Ichimura K, Tanimoto M. | Successful allogenic stem cell transplantation for MDS complicated by severe organizing pneumonia | 第 74 回日本血液学会学術集会 | | 2012.10.19 |

学会発表に関する一覧

| 発表者氏名 | 演題名 | 学会名 | 会場 | 日時 |
|--|---|--|---------|-----------|
| 野村昌作, 石井一廣, 藤田真也, 伊藤量基, 片山雄太, 許泰一, 田中志津, 前田嘉信, 谷本光音, 錦井秀和, 藤島直仁, 澤田賢一, 大田秀一, 林 邦雄, 竹内麻子, 池添隆之, 朴 永東, 八木秀男, 岡田昌也, 小川啓恭. | 同種造血幹細胞移植後のサイトカイン・ケモカイン・可溶性分子の変動に対するリコンビナントトロポモジュリンの影響について(サイト研究会中間報告). | 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 | 金沢 | 2013.3.8 |
| 西之原正昭, 藤原英晃, 廻 勇輔, 吉岡尚徳, 新谷大悟, 近藤英生, 藤井伸治, 前田嘉信, 品川克至, 谷本光音 | 悪性リンパ腫に対する臍帯血移植 23 例の検討 | 第 51 回日本リンパ網内系学会総会 | | |
| 藤原英晃, 品川克至, 長谷川詠子, 佐伯恭昌, 黒井大雅, 浅野 豪, 吉岡尚徳, 廻 勇輔, 松岡賢市, 藤井伸治, 近藤英生, 前田嘉信, 谷本光音. | 治療抵抗性血液悪性疾患に対するハプロ移植の検討: 単一施設の最新成績. | 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 | 金沢 | 2013.3.8 |
| 浅野 豪, 近藤英生, 佐伯恭昌, 長谷川詠子, 黒井大雅, 西森久和, 松岡賢市, 浅田 騰, 藤井敬子, 藤井伸治, 前田嘉信, 品川克至, 谷本光音. | 当院同種造血幹細胞移植症例における Disease risk index の有用性の検討. | 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 | 金沢 | 2013.3.9 |
| <u>Murata M.</u> , et al. | Clinical factors predicting the response of acute graft-versus-host disease to corticosteroid therapy. | 54th ASH Annual Meeting and Exposition | Atlanta | Dec 2012. |
| Nakane T, <u>Murata M.</u> et al. | Older age increases non-relapse mortality in patients with grade II-IV acute GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation: A retrospective analysis from the Japanese TRUMP database. | 54th ASH Annual Meeting and Exposition | Atlanta | Dec 2012. |
| Kato K, <u>Murata M.</u> , et al. | The impact of ATG/ALG in preconditioning on the allogeneic stem cell transplantation for patients with acute leukemia. | 54th ASH Annual Meeting and Exposition | Atlanta | Dec 2012. |

学会発表に関する一覧

| 発表者氏名 | 演題名 | 学会名 | 会場 | 日時 |
|-------------|--|--------------------------------|----|----------------------------------|
| <u>森尾友宏</u> | 再生医療・細胞治療領域で問題となる微生物のモニタリング | 第 60 回日本ウイルス学会 学術集会（シンポジウム） | 大阪 | 2012 年 11 月 13 日-11 月 15 日 |
| <u>森尾友宏</u> | 「医療機関における自家細胞・組織を用いた再生・細胞医療の実施について」：免疫細胞療法における指針及び治療の現状と展望 | 第 60 回日本輸血細胞治療学会(シンポジウム) | 福島 | 2012 年 5 月 27 日 |