

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(スタートアップ)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20890096
 研究課題名(和文) 臍帯血移植後の腫瘍抗原およびアロ抗原に対する免疫反応の解析
 研究課題名(英文) Immune reaction against tumor-antigen and allo-antigen after cord blood transplantation

研究代表者

西田 徹也 (NISHIDA TETSUYA)
 名古屋大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：80508929

研究成果の概要(和文)：臍帯血移植後の腫瘍抗原やアロ抗原に対する免疫反応を成人 T 細胞性白血病(ATL)細胞を用いて行った。CD3/CD28 で活性化した ATL 細胞は、腫瘍細胞としての特徴を維持したまま抗原提示能を有することが示された。臍帯血移植後抗腫瘍効果を認めた ATL 患者の移植後末梢血単核球からは ATL 細胞に細胞傷害性を示す T 細胞株は樹立されなかった。また、サイトメガロウイルスに対する臍帯血移植後の免疫反応も骨髄移植や末梢血幹細胞移植と比べ弱いことも示された。

研究成果の概要(英文)：Immune reaction against tumor-antigen and allo-antigen after cord blood transplantation was analyzed using adult T cell leukemia (ATL) cells. ATL cells activated with CD3/CD28 maintained characteristics of ATL and acquired the potential as an antigen presenting cells. ATL reactive T cells were not generated from post-transplant peripheral blood mononuclear cells isolated from ATL patients with clinical response. Immune reaction against cytomegalovirus after cord blood transplantation was also weaker than that after bone marrow transplantation and peripheral blood stem cell transplantation

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：臍帯血移植、腫瘍反応性 T 細胞、抗原提示細胞、成人 T 細胞性白血病、サイトメガロウイルス、CTLA-4

1. 研究開始当初の背景

(1) 造血幹細胞移植は、造血器悪性腫瘍の治

癒が期待できる治療法として広く行われてきている。移植前治療よりも、ドナー免疫細

胞による移植片対白血病 (GVL) 効果が、移植後の腫瘍細胞の根絶にとってより重要であると考えられている。ドナー免疫細胞は、GVT 効果により腫瘍根絶に寄与しうるが、GVHD を引き起こし致死的になることもあるため、移植片対宿主病 (GVHD) の合併なく GVT 効果のみを誘導する方法の確立が期待されている。

(2) 臍帯血移植は、ドナーへの負担が無く、移植までの期間が短いため、近年、急速に件数が増加している。臍帯血移植においては、HLA 不適合移植であっても、重症 GVHD の発症率は低く、GVL 効果も維持されとの報告がなされている。そのメカニズムについては十分に解明されてはいないが、臍帯血に含まれる T 細胞の多くがナイーブ T 細胞であることやナチュラル・キラー (NK) 細胞の関与などが考えられている。また、HLA 不適合同種骨髄移植後のドナー T 細胞中には不適合 HLA (アロ抗原) を認識する細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の頻度が多く、GVHD 発症率が高い原因と考えられるが、臍帯血移植では、アロ抗原を認識し細胞傷害性を示す T 細胞の頻度が低く、腫瘍抗原を認識している T 細胞が維持されている可能性も考えられる。臍帯血移植において GVHD 発症率が低いにも関わらず、GVL が維持されている機序を解明することが、GVHD を合併することなく GVT 効果を効率よく誘導する方法の確立に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 臍帯血由来のどの免疫細胞が腫瘍細胞に対して細胞傷害性を示すかを明らかにする。

(2) 腫瘍反応性免疫細胞の出現と移植後の抗腫瘍効果や GVHD との関連を明らかにする。

(3) HLA 不適合臍帯血移植後のドナー細胞中のアロ抗原と腫瘍抗原を認識している細胞頻度を、HLA 不適合 UR-BMT 症例と比較し、移植後ドナー細胞が認識する抗原の違いを明らかにする

(4) ドナー由来 CTL に認識され、腫瘍細胞上に発現している抗原を同定する。

3. 研究の方法

(1) 成人 T 細胞性白血病 (ATL) 特異的 T 細胞

① 患者末梢血から分離した ATL 細胞を IL-2 存在下で CD3/CD28 ビーズで活性化する。活性化後の T 細胞を HTLV-1 gag specific primer を用いて RT-PCR を行い、HTLV-1 感染細胞であることを確認し、細胞表面上の細胞接着分子 (CD54/CD58) や共刺激分子 (CD80/CD86) の発現をフローサイトメトリーにて検討した。

② 活性化 ATL 細胞を抗原提示細胞として、HLA が異なる健常ドナーから分離した末梢血単核球を IL-2 存在下で刺激し、異なる HLA に反応する T 細胞を樹立し、その細胞傷害性を ^{51}Cr -release assay で検討した。

③ 臍帯血移植後の ATL 患者末梢血単核球を活性化 ATL 細胞で刺激して ATL 反応性 T 細胞の誘導を行い、 ^{51}Cr -release assay でその細胞傷害性を検討した。

(2) サイトメガロウイルス (CMV) に対する T 細胞反応：同種造血幹細胞移植を施行された HLA-A2 または HLA-A24 を有する患者の末梢血単核球を、それぞれの HLA 上に提示される CMV pp65 エピトープペプチド ($1\ \mu\text{M}$) を加え、IL-2 存在下に 14 日間培養を行い、テトラマーを用いて CMV 抗原特異的 T 細胞の頻度および細胞数を解析した。

(3) Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) ハプロタイプの同種造血幹細胞移植に対する影響：造血器悪性疾患に対して施行された HLA 一致同胞間造血幹細胞移植 147 例を対象と、ドナーにおける CTLA-4 の 3 つの SNP: -318 (rs5742909)、

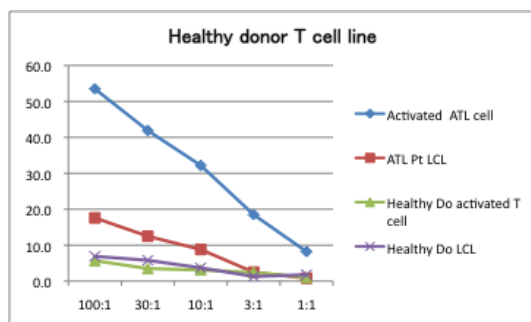
+49 (rs231775)、CT60 (rs3087243)の遺伝子型を Taqman PCR 法及びシーケンス法により同定し、そのハプロタイプを決定した。Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行い、同種造血幹細胞移植に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 成人 T 細胞性白血病 (ATL) 特異的 T 細胞

① ATL 細胞は、CD3/CD28 による活性化後、細胞接着分子 (CD54/CD58) や共刺激分子 (CD80/CD86) の細胞表面上での発現が増強した。また、HTLV-1 gag specific primer を用いた RT-PCR により、活性化後の T 細胞も HTLV-1 感染を確認した。

② 活性化 ATL 細胞が抗原提示細胞として細胞傷害性 T 細胞の誘導ができるかを確認するために、2 名の ATL 患者から樹立した活性化 ATL 細胞を、HLA が異なる健常ドナー末梢血単核球と共培養したところ、活性化 ATL 細胞に細胞傷害性を示し、ドナー活性化 T 細胞および患者・ドナーの EB ウイルス感作 B リンパ球 (B-LCL) を傷害しない T 細胞株を樹立することができた。この結果から、活性化 ATL 細胞は腫瘍細胞としての特徴を維持したまま、抗原提示能を有することが示された。



③ 臍帯血移植後抗腫瘍効果が得られた 3 名の ATL 患者の移植後末梢血単核球を患者活性化 ATL 細胞で刺激を行い、ATL 反応性 T 細胞の誘導を試みたが、臨床上

抗腫瘍効果が認められたにも関わらず、ATL 細胞に細胞傷害性を示す T 細胞株は樹立されず、臍帯血移植後の腫瘍抗原特異的 T 細胞が非常に少ない可能性が示唆された。

(2) サイトメガロウイルス (CMV) に対する T 細胞反応：骨髄移植/末梢血幹細胞移植後の患者においては、ペプチドによる刺激を行う前から約 0.1% の抗原特異的 T 細胞が検出され、14 日間の培養後は 2-3% にまで増殖した。一方、臍帯血移植後の 2 名の患者から分離した末梢血単核球では、ペプチドでの刺激前後で抗原特異的 T 細胞は検出されなかった。以上のことから、臍帯血移植後の T 細胞の免疫反応は、骨髄・末梢血幹細胞移植後に比べ弱いことが示唆された。

(3) Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) ハプロタイプの同種造血幹細胞移植に対する影響：GVHD と GVL 効果を分離することが造血幹細胞移植の成績向上に重要であることから、T 細胞の活性化を抑制する Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) に着目し、ドナーにおける CTLA-4 SNP のタイピングを行った。HapMap データから日本人におけるハプロタイプ (-318, +49, CT60) は、CGG, CAA, TAG の 3 種類のみであることがわかった。147 症例のハプロタイプ頻度は、CGG 59.5%、CAA 30.6%、TAG 9.9%であった。多変量解析の結果、ハプロタイプ CAA を有するドナーから移植を受けた場合、再発率は有意に低く (HR: 0.53, 95%CI: 0.29-0.96, p=0.035)、全生存率は有意に高かった (HR: 0.60, 95%CI: 0.36-0.99, p=0.047)。また無病生存率が高い傾向が見られた (HR: 0.66, 95%CI: 0.41-1.06, p=0.085)。急性及び慢性 GVHD 発症と非再発死亡については、ハプロタイプ CAA の有無で差は認められなかった。HLA 一致同胞間造血幹細胞移植において、ドナー

のCTLA-4ハプロタイプ(-318、+49、CT60)がCAAの場合に、再発を抑制し生存率を向上させることが示され、ドナー選択に有用な情報となる可能性が示唆された。今後、CTLA-4ハプロタイプがGVL効果に影響を及ぼすメカニズムについての検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Nishida T, Murayama T, et al. (他9人、1番目) Phase II study of tacrolimus and methotrexate for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after HLA-A, B, and DRB1 genotypically mismatched unrelated bone marrow transplantation among Japanese patients. *International Journal of Hematology*. 89(1):98-105, 2009 (査読 有)

[学会発表] (計4件)

1. Miho Murase, Tetsuya Nishida Effect of Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) Haplotype on Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation
2010 BMT Tandem Meeting
February 27, 2010
Orlando, Florida, US
2. 村瀬 未帆、西田 徹也 同種造血幹細胞移植におけるCytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4(CTLA-4)遺伝子多型の影響
第32回日本造血細胞移植学会総会
平成22年2月19日 浜松
3. 西田徹也 HLA-A, B, DRB1遺伝子学的適合非血縁者間骨髄移植に対するFK506とCyclosporine Aを用いたGVHD予防法の臨床第Ⅲ相試験

第31回日本造血細胞移植学会総会

平成21年2月5日 札幌

4. 西田徹也 慢性リンパ性白血病に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植後の細胞傷害性T細胞と抗腫瘍効果との関連

第70回日本血液学会総会

平成20年10月10日 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 徹也 (NISHIDA TETSUYA)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80508929