

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890220

研究課題名(和文) 臍帯血移植におけるT細胞の免疫再構築の検討

研究課題名(英文) Analysis of immune reconstitution after unrelated cord blood transplantation

研究代表者

諫田 淳也 (Kanda, Junya)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30636311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：非血縁者間臍帯血移植および非血縁者間骨髄移植後の検体を利用して、high-throughput sequencingを用いた包括的なT細胞受容体鎖遺伝子再構成の解析を行った。臍帯血移植1年後におけるT細胞レパトワの多様性を指標とした免疫再構築は、過去の報告と異なり非血縁者間骨髄移植後とほぼ同等であることを示した。臍帯血移植後、T細胞クローンの比率はダイナミックに変動することが明らかとなった。さらにウイルス特異的T細胞のT細胞受容体鎖のCDR3塩基配列が患者間で共有される可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the T-cell receptor beta-chain gene rearrangement by using high-throughput sequencing in patients who received unrelated cord blood or bone marrow transplantation. Immune reconstitution represented by T-cell repertoire diversity at 1 year after cord blood transplantation was comparable to that observed at 1 year after unrelated bone marrow transplantation. The frequency of each T cell clone dynamically changed after cord blood transplantation. We also suggested that the complementarity-determining region 3 sequence of T-cell receptor beta-chain of viral-specific T cells may be shared between patients.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：臍帯血移植 遺伝子再構成 免疫再構築

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 臍帯血移植は、小児領域だけでなく成人領域においてもこの 10 年間で急速に移植件数が増加している。本邦において臍帯血移植は非血縁者間骨髄移植とほぼ同数行われており、臍帯血は HLA 適合血縁・非血縁ドナーが得られない場合の代替移植ソースとしての地位を確立したといえる。また我々は本邦で行われた臍帯血移植 2288 例の解析を行い、臍帯血移植が HLA 一抗原不適合血縁者間移植と同等の成績を示す一方、移植片対宿主病の発症頻度は低く移植ソースとして適切であることを示している (Kanda J et al. BBMT2013)。しかし、臍帯血に含まれる有核細胞数および CD34 陽性細胞数は、他の確立された移植ソースである骨髄や末梢血幹細胞と比較し約 1/10 程度と少ない。また骨髄や末梢血幹細胞には多くのメモリー T 細胞が含まれ、移植後の免疫再構築に大きく寄与するが、臍帯血中の T 細胞はほとんどがナイーブ T 細胞である。そのため生着不全や感染症など移植関連合併症の頻度が高くなると考えられている。実際、我々は成人 T 細胞性白血病の移植において臍帯血と他の移植ソースの比較検討を行ったところ、HLA 適合血縁者間移植と比較し臍帯血移植では治療関連死亡率のリスクが 77%上昇し、その中でも感染症による死亡が多いことが明らかとなった (Hishizawa M, Kanda J, et al. Blood. 2010)。

(2) 成人領域における臍帯血移植と他の移植ソースとの免疫再構築を直接的に検討した論文は限られている。また数少ない欧米の報告においては、本邦の一般的な移植方法と異なり移植前処置に抗胸腺細胞グロブリンを使用している。そのため、臍帯血移植における T 細胞の免疫再構築は非常に遅延しており、本

邦における臍帯血移植の実態をあらわしていないと考えられる。我々は前処置に抗胸腺細胞グロブリンを用いない非血縁複数臍帯血移植と HLA 適合血縁・非血縁者間末梢血幹細胞移植の比較を行い、臍帯血移植においては移植後 6 か月に至るまで T 細胞の回復が遅延し、移植後 1 年で同程度にまで回復する可能性を示した (Kanda et al. BBMT2012)。また症例数は非常に限られてはいるが、胸腺で教育された T 細胞の指標となる TREC を検討したところ、移植ソース間で大きな差は認められなかった。さらに high-throughput sequencing を用いた包括的な T 細胞受容体鎖遺伝子再構成を検討したが、各遺伝子座の使用頻度やそのクローンの分布には大きな差がない可能性が示唆された。しかし症例数が少なく結果の解釈は困難であった。

## 2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植において臍帯血は非常に有力な代替移植ソースと考えられているが、成人臍帯血移植後の感染症を中心とした移植関連合併症は依然極めて大きな問題である。その原因の一つとして臍帯血移植後の免疫再構築の遅延が指摘されているものの、その詳細な解析は行われていない。本研究では臍帯血移植における T 細胞の免疫再構築とその臨床的意義に関して検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

(1) 自施設の非血縁者間臍帯血移植 5 例および HLA 適合非血縁者間骨髄移植 9 例から経時的に採取した末梢血検体より genomic DNA を抽出した。健康人 3 名から採取した末梢血検体も用いた。また末梢血の各 T 細胞集団の割合や絶対数の継時的変化をフローサイ

トメトリー法により検討した。

(2) TREC の定量： T 細胞新生能の指標として TREC ( Douek DC, et al. Nature 1998 ) を TaqMan 法を用いて定量的に測定した。

(3) high-throughput sequencing を用いた包括的な T 細胞受容体 鎖遺伝子再構成の解析： high-throughput sequencing を用いた検討においては、個々の T 細胞クローンの CDR3 領域の塩基配列が同定できると同時に、クローンの定量も可能である。Robbins ら ( Blood 2009 ) の方法により T 細胞受容体鎖の CDR3 領域の塩基配列をすべて同定し、各クローンの同定およびその定量を行った。また T 細胞レパトワの多様性は各遺伝子座の利用および同一塩基配列を持つ各 T 細胞クローンの数を考慮できる、Entropy と呼ばれる指標を用いて数値化した。

#### 4 . 研究成果

(1) TREC の数値は一部症例において非常に良い回復を示すものの、健常人と比較し非常に低く、また臍帯血移植、非血縁者間骨髄移植の間に有意差は認められなかった。

(2) 臍帯血移植 1 年後における T 細胞レパトワの多様性の指標となる Entropy の値は、非血縁者間臍帯血移植群で中央値 7.0、HLA 適合非血縁者間骨髄移植群で 8.1 であり、両群間に有意差は認められなかった ( P = 0.317 )。一方、健常者の値は 14.4 であり、その値はそれぞれの移植群より有意に高かった。この結果は、臍帯血移植後の T 細胞の多様性は、HLA 適合非血縁者間骨髄移植と移植後 1 年の時点でほぼ同等となることを示している。

(3) 各症例において、固有の塩基配列を持つ T 細胞クローンを 3000 個前後同定することが可能であった。またそれら T 細胞クローンの

頻度の推移も検討可能であり、移植後、クローンの数・比率は非常にダイナミックに変動することが明らかとなった。さらに興味深いことに、患者内だけでなく患者間で同じ塩基配列をもった T 細胞クローンが移植後早期に同定される症例があったが、文献検索上、あるウイルスの特異的 T 細胞で同定された塩基配列と一致していた。これはウイルスに感作されていない臍帯血を用いた移植後であっても、ウイルス再活性化や感染症を契機に比較的早期にウイルス特異的 T 細胞が誘導される可能性を示している。

以上より臍帯血移植後の免疫回復能は移植 1 年後の時点で非血縁者間骨髄移植とほぼ同等となることが明らかとなった。臍帯血移植後早期にウイルス特異的 T 細胞が出現する可能性が示されており、今後さらに詳細な解析を行う必要がある。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Kuwatsuka Y, Atsuta Y, Horowitz MM, Inagaki J, Kanda J, Kato K, Koh K, Zhang MJ, Eapen M. Graft-versus-host disease and survival after cord blood transplantation for acute leukemia: a comparison of Japanese versus white populations. Biol Blood Marrow Transplant. 2014 ;20(5):662-7. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.020. ( 査読あり )
2. Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Fuji S, Maeda Y, Ichinohe T, Takanashi M, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Mori T, Sao H, Kobayashi N, Iwato K,

- Sawada A, Mori S. Changes in the clinical impact of high-risk human leukocyte antigen allele mismatch combinations on the outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Apr;20(4):526-35. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.01.003. ( 査読あり )
3. Tanaka Y, Yamazaki R, Terasako-Saito K, Nakasone H, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Kimura S, Kikuchi M, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. Universal cytotoxic activity of a HTLV-1 Tax-specific T cell clone from an HLA-A\*24:02<sup>+</sup> patient with adult T-cell leukemia against a variety of HTLV-I-infected T-cells. *Immunol Lett.* 2014;158(1-2):120-5. doi: 10.1016/j.imlet.2013.12.016. ( 査読あり )
  4. Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Feb;49(2):228-35. doi: 10.1038/bmt.2013.151. ( 査読あり )
  5. Nakasone H, Tanaka Y, Yamazaki R, Terasako K, Sato M, Sakamoto K, Yamasaki R, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Machishima T, Ashizawa M, Kimura SI, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, Kanda Y. Single-cell T-cell receptor- $\beta$  analysis of HLA-A\*2402-restricted CMV- pp65-specific cytotoxic T-cells in allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Jan;49(1):87-94. doi: 10.1038/bmt.2013.122. ( 査読あり )
  6. Kanda J. Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol.* 2013 Sep;98(3):300-8. doi: 10.1007/s12185-013-1405-x. ( 査読あり )
  7. Murata M, Nakasone H, Kanda J, Nakane T, Furukawa T, Fukuda T, Mori T, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Hino M, Inoue M, Ogawa H, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Yabe H, Morishima Y, Sakamaki H, Suzuki R. Clinical factors predicting the response of acute graft-versus-host disease to corticosteroid therapy: an analysis from the GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013 Aug;19(8):1183-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.05.003. ( 査読あり )
- [学会発表](計4件)
1. 諫田淳也, 高見昭良, 田中淳司, 宮村耕一, 大橋 一輝, 福田 隆浩, 小澤幸泰, 森島泰雄, 坂巻壽, 熱田由子, 神田善伸 第一寛解期急性白血病に対する同種移植のドナー選択に関する臨床決断分析 GVH 方向 HLA 一抗原不適合血縁者と

HLA8/8 アリル適合非血縁者の比較 第  
35 回日本造血細胞移植学会総会 一般口  
演 石川 2013 年 3 月 8 日

2. Kanda J, Takami A, Tanaka J, Miyamura K, Ohashi K, Fukuda T, Ozawa Y, Morishima Y, Sakamaki H, Atsuta Y, Kanda Y. Decision Analysis of Donor Selection in Allogeneic Stem Cell Transplantation for Patients with Acute Leukemia in First Remission - Related Donor with HLA-1 Antigen Mismatch in the GVH Direction vs. HLA-8/8 Allele-Matched Unrelated Donor. 2013 BMT Tandem Meetings, Poster Session, Utah, USA (February, 2013)
3. 諫田淳也, 前田嘉信, 大橋 一輝, 福田隆浩, 宮村 耕一, 森慎一郎, 森島泰雄, 熱田由子, 神田善伸 非血縁者間骨髓移植における HLA 不適合方向が移植成績に及ぼす影響- JSHCT HLA ワーキンググループによる後方視的解析 第 36 回日本造血細胞移植学会総会 一般口演 沖縄 2014 年 3 月
4. Kanda J, Maeda Y, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Mori S, Morishima Y, Atsuta Y, Kanda Y. The impact of HLA-mismatch direction on the outcome of unrelated bone marrow transplantation: A retrospective analysis from the JSHCT HLA working group. 2014 BMT Tandem Meetings, Oral Session, Texas, USA (March, 2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

諫田 淳也 (KANDA, Junya)

自治医科大学 医学部 講師

研究者番号 : 30636311