

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591149

研究課題名(和文)

臍帯血移植の生着・拒絶に関与する移植片中および患者末梢血中 CD8 陽性 T 細胞の解析

研究課題名(英文)

Significance of CD8-positive T lymphocytes in graft and recipient peripheral blood in the immunoresponse after allogeneic cord blood transplantation

研究代表者

村田 誠 (MURATA MAKOTO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40378063

研究成果の概要(和文)：

同種造血幹細胞移植後の様々な免疫反応における、移植片中および移植後患者末梢血中 CD8 陽性 T 細胞の意義について解析した。(1) 臍帯血移植後のナイーブ CD8 陽性 T 細胞の回復速度は、骨髄移植後のそれと同等であること、(2) 臍帯血移植後の拒絶には、残存している患者由来 CD8 陽性 T 細胞が関与しうること、(3) HLA 不適合移植後患者体内では、不適合 HLA 特異的 CD8 陽性 T 細胞による強い免疫応答が発生するが、その HLA の発現量が低下もしくは消失した白血病細胞分画が増殖することで再発に至ること、を全て実際のヒト移植で確認した。

研究成果の概要(英文)：

We analyzed a significance of CD8-positive T lymphocytes in graft and recipient peripheral blood in the immunoresponse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. We observed the followings: (1) recovery of naïve CD8-positive T lymphocytes after cord blood transplantation is comparable to that after bone marrow transplantation, (2) CD8-positive T lymphocytes that survive beyond pre-transplant conditioning can cause graft rejection, and (3) under immunological pressure by CD8-positive T lymphocytes that recognize mismatched HLA molecule between donor and recipient, residual leukemia blast clones whose HLA expression is low can expand and result in relapse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、骨髄移植、生着、拒絶、移植片対宿主病、移植片対白血病効果、T細胞、HLA

## 1. 研究開始当初の背景

臍帯血移植などの同種造血幹細胞移植に

おける生着や拒絶、移植片対宿主病 (GVHD) や移植片対白血病効果に影響を与える因子

として、ドナーと患者のHLA適合度、移植片中CD34陽性細胞数などの移植片側の因子の他、残存患者T細胞や抗体、また移植後に回復したドナー由来免疫担当細胞の関与などが指摘されている。しかし、その全容はまだまだ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

我々は、これらの様々な因子の中で特にCD8陽性T細胞に着目し、移植後患者末梢血中および移植片中におけるCD8陽性T細胞の亜分画もしくはクローンが、移植後免疫応答に与える影響を生物学的に明らかにすることを目的として、本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 移植後患者末梢血中および移植片中のT細胞分画の解析

移植後経時的に採取した患者末梢血および移植片から単核球浮遊液を作成し、全リンパ球、naive・central memory・effector memoryに細分化したCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞、制御性T細胞、B細胞、NK細胞の各細胞数を、マルチカラー・フローサイトメトリーを用いて解析した。

尚、患者からは文書による同意を得た上で、血液等の提供を受けた。

### (2) 細胞傷害性T細胞クローンの分離

移植後患者末梢血から分離した単核球をインターロイキン2加培養液中で37°C14日間培養し、得られたT細胞ラインをさらに14日間96well plate上で限界希釈法を用いて培養し、クローン化した。

クロナリティーの確認は、T細胞受容体Vbetaの種類およびその塩基配列の決定により行った。

### (3) 細胞傷害性試験

EBウイルスを感作させて不死化したドナーB細胞や患者B細胞、また患者から採取した白血病細胞などをCrで標識し、それらを標的細胞として分離したT細胞によるCr放出試験を行った。

### (4) インターフェロン放出試験

目的とするHLA cDNAをCOS細胞や不死化したB細胞などに遺伝子導入し、分離したT細胞と共培養した。その培養上清中のインターフェロン $\gamma$ 放出量をELISA法で測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 臍帯血移植後の同種免疫応答に関するT細胞分画の解析

臍帯血移植後患者6名、骨髄移植後患者4名から、移植1、2、3、6、12ヶ月後に末梢血を採取し、全リンパ球、naive・central memory・effector memoryに細分化したCD4陽性細胞およびCD8陽性細胞、制御性T細胞、B細胞、NK細胞の各細胞数をマルチカラー・フローサイトメトリーで測定した。その結果とそれぞれの臨床経過との相関を検討したところ、①全リンパ球、T細胞、B細胞、NK細胞は骨髄移植後よりも臍帯血移植後の方がやや回復が早く、これまでの報告と一致すること、②naive CD4陽性細胞の回復は骨髄移植の場合6ヶ月後以降と報告されているが、臍帯血移植後ではそれよりやや早いこと、③naive CD8陽性細胞の回復速度は臍帯血移植後と骨髄移植後とで同程度であること、④CD4制御性T細胞は骨髄移植後と比べて臍帯血移植後では一貫してやや少ないこと、などが明らかになった。

但し、骨髄移植例では移植後にGVHD等の合併症に対するステロイド投与を受けた症例が多く含まれており、その解釈は慎重に行う必要があると考えている。

### (2) 臍帯血移植後の同種免疫応答に関するT細胞クローンの分離、解析

当施設で臍帯血移植を受け移植片拒絶に至った患者の末梢血から、2つの細胞傷害性Tリンパ球クローンを分離した。フローサイトメトリー解析を行い、一方はCD3陽性/CD8陽性、もう一方はCD3陽性/CD4陽性の細胞であることを確認した。またフローサイトメトリー解析により、それぞれのクローンが使用しているT細胞受容体Vbetaの決定を試みたところ、後者はVbeta 8を使用していることが判明したが、前者は決定できなかった。

次に、EBウイルスを感作させて不死化した移植片由来のB細胞株と、同じく不死化した患者由来のB細胞株を標的細胞として、分離したT細胞クローンによる細胞傷害性試験を行った。2つのクローンはいずれも臍帯血由来細胞を傷害し、かつ患者由来細胞は傷害しなかった。この結果は、これら2つのT細胞クローンが本患者の移植後拒絶に関与していた可能性を示唆している。

さらに、それらT細胞クローンの標的抗原の同定を行った。具体的には、まずEBウイルスを感作させた第三者由来B細胞株を多数用いて、2つのクローンの細胞傷害活性を発揮するのに必須となるHLAを決定した。次にそのHLAのcDNA

construct を作製して COS 細胞に遺伝子導入し、それぞれの T 細胞クローンを刺激し、インターフェロン $\gamma$  産生能を評価した。その結果、患者・ドナー間で不適合となる HLA 分子を認識する T 細胞クローンであることが確認された。現在論文作成中である。

(3) 骨髄移植後の同種免疫応答に関する T 細胞クローンの解析

当施設で骨髄移植を受けた後に白血病再発を来した患者末梢血から、患者のみが有する不適合 HLA に特異的な細胞傷害活性を呈する T 細胞クローンを分離し、解析した。患者は HLA 1 座 (GVHD 方向) 不適合の母から骨髄移植を受けた後、制御不良な GVHD を合併していたにも関わらず、再発した。

移植後再発白血病細胞では、移植前白血病細胞と比べて、不適合 HLA の発現量が低下していた。一方、患者・ドナー間で適合していた HLA については、発現量は不変だった。

次に、移植後患者末梢血から分離したドナー由来 T 細胞クローンは、全て不適合 HLA 分子を標的とする細胞傷害活性を示した。保存細胞数の制限から解析の制約を受けたが、少なくとも解析し得たクローンは、移植前白血病細胞を傷害し、移植後白血病細胞は傷害しなかった。

この患者体内では、患者のみが有する不適合 HLA 分子を認識する強い T リンパ球応答が発生し、制御不良な GVHD が発症した。そして、その強い免疫学的圧力を受けた結果、不適合 HLA の発現量が低下もしくは消失した分画の白血病細胞が増殖し、移植後再発に至った (白血病細胞のエスケープ現象) と考えられる。ときに制御不良な移植後 GVHD を発症しながら、同時に白血病再発を来す症例を経験するが、今回の研究結果はこの再発メカニズムを説明しうるものと考えている。現在論文作成中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

① Murase M, Nishida T, Onizuka M, Inamoto Y, Sugimoto K, Imahashi N, Murata M, Miyamura K, Kodera Y, Inoko H, Naoe T. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 haplotype correlates with relapse and survival after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*, 2011, 印刷中. 査読有.

② Terakura S, Atsuta Y, Sawa M, Ohashi H, Kato T, Nishiwaki S, Imahashi N, Yasuda T, Murata M, Miyamura K, Suzuki R, Naoe T, Ito T, Morishita Y. A prospective dose-finding

trial using a modified continual reassessment method for optimization of fludarabine plus melphalan conditioning for marrow transplantation from unrelated donors in patients with hematopoietic malignancies. *Annals of Oncology*, 2011, 印刷中. 査読有.

③ Inamoto Y, Murata M, Katsumi A, Kuwatsuka Y, Tsujimura A, Ishikawa Y, Sugimoto K, Onizuka M, Terakura S, Nishida T, Kanie T, Taji H, Iida H, Suzuki R, Abe A, Kiyoi H, Matsushita T, Miyamura K, Kodera Y, Naoe T. Donor single nucleotide polymorphism in the *CCR9* gene affects the incidence of skin GVHD. *Bone Marrow Transplantation*, 2010, 45:363-369. 査読有.

④ Sugimoto K, Murata M, Terakura S, Naoe T. Cytotoxic T lymphocyte clones isolated from an HLA-Cw-mismatched bone marrow transplant recipient with acute graft-versus-host disease. *Journal of Immunology*, 2009, 183:5991-5998. 査読有.

⑤ Tanizaki R, Nomura Y, Miyata Y, Minami Y, Abe A, Hanamura A, Sawa M, Murata M, Kiyoi H, Matsushita T, Naoe T. Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and reestablishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOG mice. *Cancer Science*, 2009, 101(3):631-638. 査読有.

⑥ Inamoto Y, Ito M, Suzuki R, Nishida T, Iida H, Kohno A, Sawa M, Murata M, Nishiwaki S, Oba T, Yanada M, Naoe T, Ichihashi R, Fujino M, Yamaguchi T, Morishita Y, Hirabayashi N, Kodera Y, Miyamura K. Clinicopathological manifestations and treatment of intestinal transplant-associated microangiopathy (i-TAM). *Bone Marrow Transplantation*, 2009, 44:43-49. 査読有.

⑦ Narimatsu H, Murata M, Terakura S, Sugimoto K, Naoe T. Potential role of a mismatched HLA-specific CTL clone developed pretransplant in graft rejection following cord blood transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2008, 14:397-402. 査読有.

⑧ Murata M, Ishikawa Y, Ohashi H,

Terakura S, Ozeki K, Kiyoi H, Naoe T. Donor cell leukemia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: a case report and literature review. *International Journal of Hematology*, 2008, 88:111-115. 査読有.

[学会発表] (計 17 件)

- ① Kato T, Murase M, Daikoku T, Shiraki K, Murata M, Naoe T. Exhaustion of CMV specific T cells with enhanced PD-1 expression in persistent cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. The 52nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2010 年 12 月 6 日 Orange County Convention Center (フロリダ州オーランド) .
- ② Kato T, Nishida T, Murase M, Daikoku T, Shiraki K, Murata M, Naoe T. Mechanism of persistent cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. 第 72 回日本血液学会総会, 2010 年 9 月 24 日 パシフィコ横浜 (神奈川県) .
- ③ 村田 誠. 教育講演 3 :造血幹細胞移植. 第 19 回日本組織適合性学会大会, 2010 年 9 月 19 日 東京大学 (東京都) .
- ④ 村瀬未帆、西田徹也、鬼塚真仁、稲本賢弘、杉本恭子、今橋伸彦、村田 誠、宮村耕一、小寺良尚、猪子英俊、直江知樹. 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, 2010 年 2 月 19 日 浜松アクロシティ(静岡県) .
- ⑤ Terakura S, Sawa M, Ohashi H, Kato T, Nishiwaki S, Imahashi N, Murata M, Miyamura K, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T, Ito T, Morishita Y. Optimization of fludarabine + melphalan conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with hematopoietic malignancies: a prospective dose-finding trial using modified continual reassessment method. The 51st Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2009 年 12 月 6 日 New Orleans Convention Center (ルイジアナ州ニューオーリンズ) .
- ⑥ 村田 誠, 谷口 修一, 長村-井上 登紀子, 加藤剛二, 日本臍帯血バンクネットワーク. 原発性骨髄線維症に対する臍帯血移植. 第

71 回日本血液学会総会, 2009 年 10 月 25 日 京都国際会議場 (京都府) .

- ⑦ Murata M, Sugimoto K, Terakura S, Naoe T. Characteristics of CTL clones isolated from bone marrow transplant recipient with HLA-Cw-mismatched donor. 2009 BMT Tandem Meetings, 2009 年 2 月 15 日 Tampa Convention Center (フロリダ州タンパ) .
- ⑧ 村田 誠. シンポジウム 3 骨髄内臍帯血移植. 第 31 回日本造血細胞移植学会総会, 2009 年 2 月 6 日 ロイトン札幌 (北海道) .
- ⑨ Sugimoto K, Murata M, Terakura S, Naoe T. Characterization of cytotoxic T lymphocyte clones isolated from bone marrow transplant recipient with HLA-Cw-mismatched donor. The 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, 2008 年 12 月 6 日 Moscone Center (カリフォルニア州サンフランシスコ) .
- ⑩ 村田 誠, 稲本賢弘, 寺倉精太郎, 鈴木律朗, 小寺良尚, 直江知樹. 成人血液悪性疾患に対する減量強度前治療を用いた骨髄内臍帯血移植法の有効性に関する研究. 第 70 回日本血液学会総会, 2008 年 10 月 10 日 京都国際会議場 (京都府)

[図書] (計 1 件)

- ① 村田 誠, 直江知樹. メディカルレビュー社, 診療ガイドライン UP-TO-DATE, 2010, p. 600-608.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/1639/1674/ketsuekishuyounaikagaku.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 誠 (MURATA MAKOTO)  
名古屋大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号 : 40378063

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

鈴木治彦 (SUZUKI HARUHIKO)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号 : 90283431

