

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591232

研究課題名（和文）複数臍帯血移植におけるドナー由来細胞の生着動態の解析

研究課題名（英文）Analysis of engraftment kinetics of donor-derived cells in multi-cord blood transplantation

研究代表者

渡辺信和（Watanabe, Nobukazu）

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：10334278

研究成果の概要（和文）：臍帯血移植（CBT）は多くの利点から、我が国では骨髄移植とほぼ同数まで増加している。一方、CBT では生着不全の頻度が高く、解決すべき課題となっている。それらを解決する目的で、2 個の臍帯血を同時に移植するダブルユニット臍帯血移植（dCBT）が考案され、我が国では平成 18 年から臨床研究が開始された。しかし、dCBT の有効性に関しては相反する報告もあり、基礎研究も十分には行なわれていない。したがって、dCBT における生着動態の解明や、研究成果を踏まえたより有効なプロトコルの開発が強く望まれている。

本研究開始時には、dCBT 後の臨床検体を用いて解析を行なう予定であった。しかし、我が国における dCBT の臨床第 II 相試験は平成 22 年 3 月に登録が終了し、その後新たな dCBT は実施されなくなった。そこで、平成 22 年度後半から健常人血で人工キメリズム検体を作製し、キメリズム解析などを行なった。

平成 21 年度、それまでのマルチカラー解析では多くの問題があることが明らかとなった。市販の抗 HLA 抗体の多くは染色性が悪く、白血球ゲートには赤血球が多数混在するため、キメリズム解析が正確に測定できなかった。平成 22 年度、抗体と蛍光色素の組合せを工夫して、各蛍光色素間で蛍光の漏れ込みを最小限に抑えた 11 カラー解析に成功した。また、PE-Cy5 標識抗 CD235a 抗体により赤血球を除き、解析の精度を向上した。また、新たに染色性の良好な抗 HLA-B62 抗体を作製した。平成 23 年度、健常人血を使用した混合リンパ球培養を 11 カラー FACS で解析し、分取した各白血球分画の遺伝子発現を解析するシステムを立ち上げた。

本解析システムにより、dCBT 後の末梢血において T 細胞における 2 つのドナー由来細胞とレシピエント由来細胞をソーティングし、遺伝子発現解析などが可能となる。その結果を単一臍帯血移植と比較することにより、生着促進因子や graft versus leukemia 反応の本態について、より詳細なデータが得られる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Due to its many benefits, since 2003 the number of cord blood transplantations (CBT) being performed has increased to almost equal that of bone marrow transplantation in Japan. CBT, however, can be complicated by graft failure, which must be resolved for safe transplantation. To overcome these problems, double-unit cord blood transplantation (dCBT) has been developed. In Japan, a large scale clinical trial ran from 2006 to 2010 to check the effects of dCBT on the engraftment process. The results from this and other global dCBT clinical trials, however, are controversial. Additionally, basic research are not complete. Therefore, it is very important to investigate engraftment kinetics of dCBT and develop effective protocols on the basis of research data.

At the start of this research project, we planned to analyze recipient blood after dCBT.

After March 2010, however, there were no dCBT clinical trials in Japan. Therefore, we changed the project style from clinical investigation to analysis of artificial chimerism samples in culture.

In 2009, we had many biotinylated commercial allele specific HLA monoclonal antibodies and we discovered red blood cell contamination in the leukocyte fraction of peripheral blood. We found that previous multi-color chimerism analysis systems could not clearly analyze different kinds of HLA-bearing white blood cells from multiple persons.

In 2010, we changed the combination of antibodies and fluorescent agents to obtain a good separation of each subpopulation and proper compensations. Finally, we successfully established an 11-color flow cytometry system for accurate analysis. We used PE-Cy5-conjugated anti-CD235a antibody to get rid of red blood cells from gates on white blood cells for chimerism analysis. In addition, we made an anti-HLA-B62 antibody which stained cells very brightly.

In 2011, we used our 11-color flow cytometry system to analyze triple chimerism in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells in a mixed lymphocyte culture to measure frequencies of three donors' white blood cells and analyze mRNA levels of each person's CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells which will be useful to understand engraftment kinetics and molecular basis of allo-reactivity in future dCBT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：複数臍帯血移植、生着不全、キメリズム解析、HLA ミスマッチ、抗 HLA 抗体、フローサイトメーター

1. 研究開始当初の背景

臍帯血移植 (CBT) には多くの利点があり、我が国では 2003 年度以降、骨髄移植 (BMT) とほぼ同数まで移植数が増加している。しかしながら、CBT では白血球の回復が遅く、感染症誘発の原因となっている。また、生着不全の頻度も 10% と高く、解決すべき大きな課題である (Takahashi S, et al., Blood, 2007, 109:1322-1330)。

生着遅延や生着不全の原因として、CBT における移植細胞数が少ないことが考えられるので、それらを解決する目的で、複数

の臍帯血を同時に移植する複数臍帯血移植 (multiple cord blood transplantation, MCBT) が考案された。1994 年に初めて中国で実施されて以来、世界各国で MCBT の臨床治験が行われ、その安全性と有効性が報告された (Barker JN, et al., Blood, 2005, 108: 1343-1347)。我が国においては、2002 年の臨床第 I 相試験で安全性が確認された後 (Kai S, et al., Blood, 2004, 104: 376b)、2006 年から多施設共同研究 [造血器悪性疾患に対する複数臍帯血同時移植の臨床第 2 相試験 (C-SHOT 0507)] が開始され、その

結果が注目されている。

しかしながら、MCBTの有効性に関しては相反する報告もあり、未だ確定した見解が得られていないのが現状である。また、MCBTの臨床応用が着実に進められているのに比べ、基礎研究、あるいは患者の検体を使用した臨床研究は大きく遅れている。したがって、MCBTにおける生着動態の解明や、臨床研究の成果を踏まえたより有効なプロトコルの開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発した新規キメリズム解析/HLA-Flow法(Watanabe N, et al., Biol. Blood Marrow Transplant., 2008, 14: 693-701)を使用して、MCBT後のキメリズム解析を白血球のサブポピュレーションごとに行なう。これらの動力的解析に加え、同種免疫反応を担うCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、およびNK細胞からそれぞれ2つのドナー由来細胞とレシピエント由来細胞を区別してソーティング(分取)し、各分画における遺伝子発現の網羅的解析を行なう。

これらの研究により、移植された2個のドナー由来細胞が活性化するメカニズムや、2個の臍帯血のうちどちらか一方が選択されるメカニズムの解明をめざす。以上の結果をもとに、MCBTのより有効なプロトコルを提案することが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

当研究期間内には国内で複数臍帯血移植が行われなかったため、当初の研究計画にあった複数臍帯血移植後の患者検体を使用した生着動態や遺伝子発現の解析は行えなかった。したがって、本研究においては、適当なHLAをもつ3名の健常人末梢血からそれぞれ得られた単核細胞を混合して人工キメリズム検体を作製し、FACS Aria II (Becton-Dickinson社、3レーザー装備)によるマルチカラー解析で白血球のサブポピュレーションごとのキメリズム解析を行なった。また、一部の検体解析では、各人のCD4⁺T細胞CD8⁺T細胞をそれぞれソーティングして、mRNAの発現解析を行なった。

4. 研究成果

我々は平成20年度、3名の健常人末梢血を混合して作製した人工キメリズム検体を

10カラーのフローサイトメーター(FCM)で解析し、白血球のサブポピュレーションごとにキメリズムを解析する方法を報告した(石井有実子ら、Cytometry Research、18巻、31-34頁、2008年)。しかしながら、平成21年度の研究でより多くの種類のHLAについて人工キメリズム検体を解析した結果、それまでのFACS Aria I (Becton-Dickinson社、3レーザー装備)によるマルチカラー解析では様々な問題があり、キメリズム解析にしばしば支障を来すことが判明した。蛍光標識に関しては、市販されているアリル特異的抗HLA抗体(ASHmAb)のほとんどは米国One Lambda社(Canoga Park, CA)で作製された抗体であるが、多くはリンパ球傷害テスト用に開発されたIgM型の抗体である。したがって、抗原に対するアフィニティーが低く、Biotin標識で使用されているため、3名の血液細胞を同時に判別しようとする場合、しばしばBiotin標識抗体が複数となり解析困難であった。多くの種類の白血球分画が含まれるリンパ球ゲートには、HLAを発現しない赤血球が多数混在していたため、キメリズム解析の精度が正確に測定できなかった。また、Red laser(633nm)で検出するAPC、Alexa Fluor 700、およびAPC-Cy7相互間の蛍光の漏れ込みが大きく、コンペンセーションが困難な場合があった。かった。

平成22年度、我々は解析に用いるFCM機器をFACS Aria II(同社)に変更し、抗体と蛍光色素の組合せを工夫して、各蛍光色素間で蛍光の漏れ込みを最小限に抑えた11カラー解析に成功した(例えば、FITC-HLA-A24、PE-HLA-A2、PerCP-Cy5.5-CD8、PE-Cy7-CD4、PE-TR-CD3、PE-Cy5-CD235a、Biotin-HLA-A11/SA-APC、Alexa Fluor 700-CD56、APC-Cy7-CD19、Alexa Fluor 405-CD45、Pacific Orange-CD14)。それにより、複数臍帯血移植を想定した3名の血液細胞の判別が、解析パラメータ数に余裕ができたためにより容易になった。PE-Cy5標識抗CD235a抗体を使用して、解析から赤血球を除くことにより、キメリズム解析の精度を向上することに成功した(PE-Cy5陽性細胞は解析から除外するため、PE-Cy5の他の色素への漏れ込みは問題にならなくなる)。一方、抗HLA抗体の作製を試みた結果、新たに染色性の良好なIgG型の抗HLA-B62抗体を作製し、本検査

法の適応率が向上した。ところで、我が国における複数臍帯血移植の臨床第2相試験は平成22年3月に登録が終了し、その後は2年間のフォローアップと、データの解析および結果の評価が行なわれる。それに続く新たなプロトコルの作成と臨床研究が実施される予定が無く、本研究で予定した臨床検体のキメリズム解析はその実施が不可能となった。そこで平成23年度は、将来行なわれると予想される複数臍帯血移植に備え、健常人血を使用した混合リンパ球培養を11カラーFACSで解析し、分取した各白血球分画の遺伝子およびタンパク質発現の解析システムを準備することにした。

平成23年度、健常人血を混合して作製した人工キメリズム検体をマルチカラーFACSで解析し、分取した各白血球分画の遺伝子発現解析システムを立ち上げた。解析対象の遺伝子は、IL-2、IL-4、IL-10、IL-17、IFN γ 、TNF α 、TGF β 、FasL、Perforin1、GranzymeA、GranzymeB、CCND1(CyclinD4)、CCR5、CCR7、CXCR3、GATA3などである。

本解析システムにより、複数臍帯血移植後1~3週間の末梢血において、CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞のそれぞれにおけるドナー1由来細胞、ドナー2由来細胞、およびレシピエント由来細胞の各分画についてソーティングし、遺伝子発現解析などが可能となる。その結果を単一臍帯血移植後の生着動態や同種免疫反応と比較検討することにより、生着を促進する因子や、graft versus leukemia反応の本態について、より詳細なデータが得られる可能性がある。

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)

Yamazaki S, Suzuki N, Saito T, Ishii Y, Takiguchi M, Nakauchi H, Watanabe N. A rapid and efficient strategy to generate allele-specific anti-HLA monoclonal antibodies. *J. Immunol. Method*, 343(1): 56-60, 2009.

[学会発表] (計8件)

1. 渡辺信和、『キメリズム解析／HLA-Flow法を使用したHLAミスマッチ造血細胞移植後の病態解析』、第34回日本造血細胞移植学会、ランチョンセミナー8(日本ベクトン・ディッキンソン社)、平成24年2

月24日(大阪国際会議場)

2. 渡辺信和、HLA-Flow法による造血幹細胞移植後キメリズム解析への分光フローサイトメーター応用の試み、第40回日本免疫学会、テクニカルセミナー、平成23年11月28日(幕張メッセ)

3. 渡辺恵理、渡辺信和、森尾友宏、阿部泰子、原寿郎、中内啓光、重症複合免疫不全症に対する前処置軽減臍帯血移植後の混合キメリズム病態の解析、第73回日本血液学会、口頭発表、平成23年10月15日(名古屋国際会議場)

4. 渡辺恵理、中内祐介、渡辺信和、石田宏之、中内啓光、『11カラーFACS解析による造血細胞移植後の生着動態と白血病細胞の同時モニタリング』、第21回日本サイトメトリー学会、口頭発表、平成23年6月26日(京都市国際交流会館)

5. Nobukazu Watanabe, Yusuke Nakauchi, Eri Watanabe, Masaya Kakuta, Koji Futamura, Motohiro Furuki, Hiromitsu Nakauchi, Clinical diagnosis of graft failure and relapse of leukemia after HLA-mismatched hematopoietic cell transplantation by chimerism analysis using a spectral analyzer. CYTO2011, May. 22nd, 2011, Baltimore, MD.

6. 山本久史、松野直史、渡辺信和、成田円、西田彩、島津浩、大田光、五十嵐夏恵、池邊太一、田結庄彩知、石綿一哉、中野伸亮、辻正徳、土橋留美子、森有紀、伊豆津宏二、内田直之、和気敦、米山彰子、牧野茂義、中内啓光、谷口修一、Rapid chimerism-switch of lymphocytes and phenotypic conversion of naïve T cells early after CBT-臍帯血移植後早期のドナー由来リンパ球の生着動態、第72回日本血液学会、平成22年9月25日(横浜)

7. Stephanie C. Napier, Satoshi Yamazaki, Nobukazu Watanabe, Naofumi Matsuno, Satoshi Takahashi, Akinobu Takaki, and Hiromitsu Nakauchi, Flow cytometric analysis of donor-recipient chimerism using anti-HLA antibody after HLA-mismatched hematopoietic cell and organ transplantation, ICI 2010, Aug. 26th, 2010, Kobe

8. Naofumi Matsuno, Hisashi Yamamoto, Nobukazu Watanabe, Kazuya Ishiwata, Nobuaki Nakano, Masanori Tsuji, Yuki Asano-Mori, Naoyuki Uchida, Atsushi Wake, Madoka Narita, Hiromitsu Nakauchi, Shuichi Taniguchi, Engraftment kinetics of donor-derived lymphocytes early after reduced-intensity cord blood transplantation in

adults. The 8th Annual International Umbilical Cord Blood Transplantation Symposium, Poster, June 5, 2010, San Francisco.

[その他]

ホームページ等

<http://stemcell-u-tokyo.org/dm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺信和 (Watanabe, Nobukazu)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：10334278

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし