

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5月14日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591266

研究課題名（和文） 難治性自己免疫疾患に対する新しい幹細胞移植療法の開発

研究課題名（英文） Development of a new stem cell transplantation regimen in the treatment of refractory autoimmune diseases

研究代表者

塚本 浩（TSUKAMOTO HIROSHI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70304722

研究成果の概要（和文）：難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植療法の最適化を目的とした。CD34 純化自己造血幹細胞移植または非純化移植を施行した強皮症 19 例を対象に、純化群、非純化群を比較したところ、純化群ではウイルス感染症をより高頻度に認めたものの、有効性においては優れていた。強皮症患者リンパ球における遺伝子発現プロファイルは健常人と異なっていたが、純化移植群では非純化群に比し移植後、より健常人に近い遺伝子発現プロファイルを示した。以上より、難治性自己免疫疾患に対しては純化移植を選択すべきと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The objective was to determine the best regimen of autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) for refractory autoimmune diseases. CD34+ selected auto-HSCT was more effective on skin sclerosis and more strongly associated with viral infection than unmanipulated auto-HSCT in patients with systemic sclerosis (SSc). The gene expression profile of lymphocytes more normalized in SSc patients who received CD34+ selected auto-HSCT than those who received unmanipulated auto-HSCT. In conclusion, CD34+ selected auto-HSCT should be applied in the treatment of refractory autoimmune diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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、膠原病・アレルギー内科学

キーワード：造血幹細胞移植、自己免疫疾患、CD34 陽性細胞、免疫再構築、純化

1. 研究開始当初の背景

難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植の臨床応用が 1990 年代末より欧米にて開始され、当施設でも難治性自己免疫疾患 23 例（強皮症 19 例、皮膚筋炎 3 例、ウェゲ

ナー肉芽腫症 1 例）に対し、自己造血幹細胞移植を施行し、有効性と安全性について確認してきた。移植片としては末梢血への造血幹細胞動員後にアフエレーシスにて回収した末梢血単核球を免疫学的方法に

てCD34陽性細胞(造血幹細胞)に純化後移植する方法と、純化せずに(非純化)移植する方法等がある。純化した場合、自己反応性T細胞の除去が出来る一方、制御性T細胞も除去されてしまう。どの方法が最適かについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植療法の最適化の為の、臨床的および基礎的検討を行う。特に移植片の操作に焦点を当てて検討する。

3. 研究の方法

(1)CD34純化自己造血幹細胞移植とまたは非純化自己造血幹細胞移植を施行された強皮症19例を対象とし、純化群、非純化群間の有効性及び安全性の比較を行った。また両群の免疫学的再構築を比較した。

(2)強皮症患者(移植前、純化または非純化自己HSCT後)または健康人由来のリンパ球をT細胞5分画(CD4ナイーブ、CD4メモリー、CD8ナイーブ、CD8セントラルメモリー、CD8エフェクターメモリー)、B細胞3分画(ナイーブ、メモリー、plasmablast)に分けフローサイトメトリーを用いたソーティングにより各分画を回収した。各々の細胞集団よりRNAを調製、逆転写後、cDNAアレイを用いて、強皮症患者における移植前後のリンパ球の遺伝子発現プロファイルを健康人と比較した。

4. 研究成果

(1)対象は純化移植が11例(男3、女8)、非純化移植が8例(男1、女7)で平均年齢はそれぞれ 52.3 ± 7.5 歳、 55.5 ± 5.5 歳であった。純化移植群では輸注したCD34陽性細胞が $4.7 \pm 2.6 \times 10^6/\text{kg}$ 、CD3陽性細胞が $0.011 \pm 0.012 \times 10^6/\text{kg}$ で非純化移植群では輸注したCD34陽性細胞が $7.6 \pm 10.7 \times 10^6/\text{kg}$ 、CD3陽性細胞が $45.6 \pm 28.1 \times 10^6/\text{kg}$ であった。生着までの日数は両群間に差を認めなかった。有害事象では純化移植群においてアデノウイルス膀胱炎や帯状疱疹、サイトメガロウイルス感染などのウイルス感染をより高頻度に合併していたが、いずれも抗ウイルス薬にてコントロール可能であった。有効性について、移植後両群共に皮膚硬化の有意な改善が認められたが、純化移植群では非純化移植群に比較し移植1、12、24、36か月後において、皮膚硬化の改善が有意に優れていた。間質性肺炎に対する有効性については両群間に有意な差を認めなかった。疾患特異的自己抗体である抗Scl-70抗体の移植後の変化についても両群間で差を認めなかった。免疫学的再構築の解析では、移植後のCD4陽性細胞の回復は両群共に遅延し、非純化群でやや回復が早い傾向を認めるものの両群間で差を認

めなかった。移植後のTh1/Th2バランスのTh1へのシフトは臨床効果と関連があり、純化群で移植後よりTh1へよりシフトする傾向を認めたが有意な差には至らなかった。制御性T細胞に特異的なマーカーであるFoxP3を用いて検討したところ、CD4陽性FoxP3陽性細胞の回復は両群共に移植3年後でも抑制されていた。移植後の制御性T細胞の減少は移植片としてCD34陽性細胞+制御性T細胞を用いる事による有効性向上を示唆するが、CD34への純化のみで高頻度にウイルス感染を合併する事を考えると、制御性T細胞の同時移植は更なる感染症の合併を誘発する可能性があり、現実的ではないと考えられた。(2)強皮症患者と健康人で発現量に2倍以上差がある遺伝子に着目すると、リンパ球各亜分画において800から1500遺伝子が抽出された。これらの遺伝子について、移植施行後の強皮症患者では健康人と移植施行前強皮症患者との中間の遺伝子発現プロファイルを呈し、更に純化移植施行強皮症患者は非純化移植施行患者に比し健康人により近い遺伝子発現プロファイルを呈した。本研究により強皮症患者リンパ球各亜分画において健康人とは遺伝子発現プロファイルが異なる事が明らかになった。強皮症患者において臨床効果が優れる純化移植後に遺伝子発現プロファイルがより正常化する事は、強皮症に対し純化移植を選択する理論的根拠となる。以上より、合併するウイルス感染症がコントロール可能である事を考えると、難治性自己免疫疾患に対する自己造血幹細胞移植としては有効性に優る純化移植を選択すべきと考えられた。

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9件)

- ①Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Kikushige Y, Shima T, Noda K, Ota S, Tsuzuki H, Inoue Y, Arinobu Y, Iwasaki H, Shimoda S, Baba E, Tsukamoto H, Horiuchi T, Taniyama T, and Akashi K. CIN85 is required for Cbl-mediated regulation of antigen receptor signaling in human B cells. Blood 査読有 119: 2263-2273, 2012.
- ②Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niuro H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K. Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell

- transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. *Rheumatology* 査読有 50: 944-52, 2011
- ③ Furukawa M, Kiyohara C, Tsukamoto H, Mitoma H, Kimoto Y, Uchino A, Nakagawa M, Oryoji K, Shimoda T, Akashi K, Harada M, Horiuchi T. Prevalence of and risk factors for low bone mineral density in Japanese female patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 査読有 31:365-76, 2011
- ④ Yamamoto T, Horiuchi T, Miyahara H, Yoshizawa S, Maehara J, Shono E, Takamura K, Machida H, Tsujioka K, Kaneko T, Uemura N, Suzawa K, Inagaki N, Umegaki N, Kasamatsu Y, Hara A, Arinobu Y, Inoue Y, Niuro H, Kashiwagai Y, Harashima SI, Tahira T, Tsukamoto H, Akashi K. Hereditary Angioedema in Japan: Genetic Analysis of 13 Unrelated Cases. *Am J Med Sci* 査読有 342:210-214, 2011
- ⑤ Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Sunami S, Kamitani T, Sakai S, Hatakenaka M, Nagafuji K, Horiuchi T, Harada M, Akashi K, Honda H. Correlation between pretreatment or follow-up CT findings and therapeutic effect of autologous peripheral blood stem cell transplantation for interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis. *Eur J Radiol* 査読有 79:e74-79, 2011
- ⑥ Uchino A, Tsukamoto H, Nakashima H, Yoshizawa S, Furugo I, Mitoma H, Oryoji K, Shimoda T, Niuro H, Tada Y, Yano T, Nonaka T, Oishi R, Akashi K, Horiuchi T. Tacrolimus is effective for lupus nephritis patients with persistent proteinuria. *Clin Exp Rheumatol* 査読有 28: 6-12, 2010.
- ⑦ Kimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Kiyohara C, Mitoma H, Uchino A, Furugo I, Yoshizawa S, Ueda A, Harashima S, Sawabe T, Tahira T, Hayashi K, Yoshizawa S, Shimoda T, Akashi K, Harada M. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL5 with systemic lupus erythematosus and accompanying infections. *Rheumatology* 査読有 49: 1346-1353, 2010.
- ⑧ Kohno K, Nagafuji K, Tsukamoto H, Horiuchi T, Takase K, Aoki K, Henzan H, Kamezaki K, Takenaka K, Miyamoto T, Teshima T, Harada M, Akashi K. Infectious complications in patients receiving autologous CD34-selected hematopoietic stem cell transplantation for severe autoimmune diseases. *Transpl Infect Dis* 査読有 11: 318-323, 2009
- ⑨ Horiuchi T, Washio M, Kiyohara C, Tsukamoto H, Tada Y, Asami T, Ide S, Kobashi G, Takahashi H; Kyushu Sapporo SLE Study Group. Combination of TNF-RII, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and the risk of Japanese SLE: findings from the KYSS study. *Rheumatology* 査読有 48: 1045-1049, 2009.
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Tsukamoto H, Horiuchi T, Miyamoto T, et al. CD34-selected and unmanipulated autologous hematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis. Annual European Congress of Rheumatology, May 27, 2011, London, UK.
- ② 塚本 浩、堀内孝彦、新納宏昭、他. 全身性硬化症に対するCD34陽性細胞純化及び非純化自己造血幹細胞移植. 第55回日本リウマチ学会総会、平成23年7月20日、神戸市
- ③ Tsukamoto H, Horiuchi T, Miyamoto T, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for severe systemic sclerosis : long-term follow-up analysis of immune reconstitution. Annual European Congress of Rheumatology. June 18, 2010, Rome, Italy.
- ④ 塚本 浩、堀内孝彦、三苫弘喜、他. 全身性硬化症に対する大量免疫抑制療法と自己造血幹細胞移植. 第54回日本リウマチ学会総会、平成22年4月24日、神戸市
- ⑤ 塚本 浩、堀内孝彦、三苫弘喜、他. 全身性硬化症に対する大量免疫抑制療法と自己末梢血純化CD34陽性細胞移植: 術後5年間の臨床成績と免疫学的検討. 第53回日本リウマチ学会総会、平成21年4月24日、東京
- ⑥ 塚本 浩、堀内孝彦、三苫弘喜、他. 全身性硬化症に対する大量免疫抑制療法と非純化自己末梢血細胞移植の短期成績. 第53回日本リウマチ学会総会、平成21年4月24日、東京

〔図書〕（計 1 件）

- ①大井洋之、木下タロウ、松下 操、塚本 浩
、堀内孝彦、他. メジカルレビュー社、補
体への招待、2011、232

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本 浩 (TSUKAMOTO HIROSHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70304722

(2)研究分担者

堀内 孝彦 (HORIUCHI TAKAHIKO)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：90219212

(3)連携研究者

なし