博士論文

アリル特異的抗 **HLA** 抗体を用いた治療モデルの開発

中内　祐介

アリル特異的抗 HLA 抗体を用いた治療モデルの開発

東京大学大学院 医学系研究科

病因・病理学 専攻

博士課程

指導教員名：中内 啓光

申請者名：中内　祐介

目次

I　略語..... **5**

II　要旨..... **8**

III 序文..... **9**

IV 材料と方法 **14**

(1)　マウス

(2)　ヒト検体

(3)　アリル特異的抗 **HLA** モノクローナル抗体（**ASHmAb**）の作製

(4)　モノクローナル抗体による細胞染色

(5)　**FACS** による解析とソーティング

(6)　**GVHD** モデルマウスの末梢血中の血算および生化学検査

(7)　**GVHD** モデルマウスの臓器免疫染色

(8)　**CD34** 陽性細胞の純化とヒト・骨髄キメラマウスの作製

(9)　統計解析

V　結果..... **21**

(1)　ハイブリドーマの樹立と特異性の評価

(2)　***In vitro*** における細胞障害作用を有する **ASHmAb** のスクリーニング

(3) ***In vivo*** **における kASHmAb の細胞障害作用の評価**

(4) **kASHmAb を用いた異種 GVHD モデルマウスの治療**

(5) **ヒト・マウス骨髄キメラマウスを用いた kASHmAb による造血細胞障害の評価**

VI 考察 29

VII 結語 37

VIII 図表 39

図 1 ハイブリドーマの作製（実験概略図）

図 2 **FlowPRA を用いた ASHmAb のアリル特異性の解析（培養上清）**

図 3 ***In vitro*** **における細胞障害作用を持つ ASHmAb（HLA-A2）のスクリーニング（培養上清）**

図 4 ***In vivo*** **における kASHmAb の細胞障害作用の評価**

図 5 ***In vitro*** **における健常人 PBMC を用いた精製抗体【ASHmAb（HLA-A2）】の染色性の評価**

図 6 **ASHmAb を用いた臍帯血移植後患者のキメリズム解析**

図 7 **免疫不全マウスを用いた異種 GVHD 治療モデル**

図 8 **kASHmAb による造血障害の検討**

IX 参考文献……...… **63**

X 特許出願……..…….. **70**

XI 謝辞……..…….. **71**

I　略語

ADCC：antibody-dependent cellular cytotoxicity

allo-HSCT：allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

ALT：alanine aminotransferase

APC：allophycocyanin

ASHmAb：alle-specific anti-HLA monoclonal antibody

AST：aspartate aminotransferase

ATG：antithymocyte globulin

CBC：complete blood count

CBT：cord blood transplantation

CD：cluster of differentiation

CDC：complement-dependent cytotoxicity

CNI：calcineurin inhibitor

DAB：3, 3-diaminobenzidine

DMEM：Dulbecco's modified Eagle medium

DNA：deoxyribonucleic acid

dUTP：2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate

EDTA：ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA：enzyme-linked immunosorbent assay

FACS：fluorescence activated cell sorter

FBS：fetal bovine serum

FITC：fluorescein isothiocyanate

GVHD：graft-versus-host disease

GVT：graft-versus-tumor

HAT：hypoxanthine-aminopterin-thymidine

HE：hematoxylin and eosin

HLA：human leukocyte antigen

IP：intravenous injection

IV：intraperitoneal injection

kASHmAb：killing ASHmAb

LDH：lactate dehydrogenase

MSC：mesenchymal stem cell

$NaHCO_3$：sodium hydrogen carbonate

NH_4Cl：ammonium chloride

NK：natural killer

NOD/SCID：non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency

NOG：NOD/Shi-scid/IL-2Rγ^{null}

PB：pacific blue

PBMC：peripheral blood mononuclear cell

PBS：phosphate buffered saline

PBSCT：peripheral blood stem cell transplantation

PE：phycoerythrin

PerCP：peridinin chlorophyll

PI：propidium iodide

RBC：red blood cell

TBS：tris buffered saline

TdT：terminal deoxynucleotidyl transferase

TUNEL：TdT-mediated dUTP nick end-labeling

II　要旨

GVHD は HLA ミスマッチ造血幹細胞移植における重大な合併症である。しかし、その確立された治療法は未だ存在しない。本研究は細胞障害作用を持つ ASHmAb に注目し、ドナー由来のミスマッチ HLA を標的とした新規 GVHD 治療モデルの開発を目指した。NOG マウスに健常人 PBMC を移植した致死性 GVHD マウスを作製し、kASHmAb を投与した結果、kASHmAb はアリル特異的にドナー（ヒト血液）細胞のみを傷害し、マウスの生存率を有意に改善した。また懸念される生着不全のリスクを抗体量の調製で回避できる可能性を示した。kASHmAb は今までにない新しい機序の GVHD 治療薬としてその臨床応用が期待される。

III　序文

1957 年、Donnall E. Thomas[1] により抗がん剤と全身放射線照射を組み合わせた前処置による世界で初めての骨髄移植が白血病患者に施行された [2]。当時、ドナーとレシピエントの組織適合性をマッチさせることなど全く考慮されずに移植が行われたため、GVHD の観察もされず、その移植成績は惨憺たるものであった [3]。しかしその後の移植免疫学の発展や支持療法の進歩もあり、Thomas らを中心に近代的骨髄移植法が確立された [4,5]。我が国でも近代的骨髄移植の本格的な臨床応用が 1970 年代中頃より開始されたが、その後世界中で骨髄移植数は増加し、血液疾患における根治療法として確立された地位を築いている。

近年では骨髄だけではなく、CBT や PBSCT などの新たな幹細胞源を用いた造血幹細胞移植も頻繁に行われるようになった。特に臍帯血や HLA 半合致ドナーを用いた allo-HSCT は、HLA 適合ドナーを見つけられない際の重要な治療選択肢であり [6,7]、その数は骨髄移植を凌駕する勢いで年々増加している。しかし、allo-HSCT 後非再発死亡の最大の原因である GVHD の頻度は依然として高く、新たな治療薬の出現が待ち望まれている [8,9]。ある程度の GVHD により GVT 効果を誘導でき、血液悪性疾患では再発が少ないとの報告もあるが [10–12]、GVHD が重症化することで患者が死にいたるケースも多く、そのコントロールは極めて

難しい。

臨床におけるGVHDには大きく分けて急性と慢性の2種類がある。急性GVHDは、移植後 100 日以内に発症する GVHD と定義される。皮膚症状が初発となることが多いが、主に障害される臓器として、皮膚、消化管、肝臓がある。重症度は皮疹の広がり、下痢の量、血清総ビリルビン値の上昇により決定されるが、少なくとも 1 つの臓器障害が 48 時間以上持続し、他の原因疾患が否定されたとき、急性 GVHD と診断される。一方で慢性 GVHD は、移植後 100 日以降に発症する GVHD と定義され、急性 GVHD とは異なる病態が考えられている。急性 GVHD と比較し、より多くの臓器が障害を受けること、またしばしば自己免疫疾患に類似した症状を呈することが臨床における特徴である。病態に関しては、急性 GVHD は移植片中の成熟 T 細胞が中心的な役割を果たすのに対して [13]、慢性 GVHD では移植された造血幹細胞から分化・成熟した T 細胞だけではなく、B 細胞も関与し、制御性 T 細胞の機能異常を含む、免疫寛容が破綻するという極めて複雑な病態が考えられている [14]。

代表的な GVHD 治療薬であるステロイド [15]、シクロスポリンなどの CNI[16]、あるいは ATG[17–19] などの免疫抑制剤は GVHD の予防薬や治療薬として臨床では長い間使用されているが、抗癌剤などの治療薬と同様、ドナーやレシピエントの

細胞を区別することなく血液細胞に作用するため、人体への影響は大きい。特にATGは抗体医薬の代表的なものだが、ヒト胸腺細胞を免疫することでできるポリクローナル抗体であるため、モノクローナル抗体がもつ単一の特異性とは違い、様々なエピトープに対する抗体が存在することで効果は非常に大きな反面、重篤な即時型アレルギー反応、一時的な血球減少、血清病、さらにはT細胞を強く抑制することによる易感染性など、副作用も重大なものが多く、使用には十分な知識と経験を要する。最近では抗CD3抗体[20]、抗CD52抗体[21,22]などリンパ球表面抗原をターゲットとしたモノクローナル抗体[23]や、MSC[24,25]、さらには自殺遺伝子を移植片に導入した遺伝子治療技術を利用したもの[26,27]などが報告されている。しかし、いずれの方法も効果が不十分であることや、効果はあるものの、重篤な副作用（特に感染症）や再発率の増加などで生存率に差はないことなど、様々な問題点があり、造血幹細胞移植領域での有効なGVHD治療薬としての普及には至っていない。

急性GVHDの病態として、前述のようにレシピエント側の抗原提示細胞に反応したドナー由来のアロ反応性T細胞が中心的な役割をもつことが知られているが[13]、こうした移植後のレシピエントとドナー細胞の混合した複雑な状態、いわゆるキメラ状態（キメリズム）を詳細に解析することが重要である。私が所

属する研究室では、HLA のミスマッチを逆手に取り、抗 HLA 抗体でレシピエントとドナーの細胞を染め分け、FACS によるキメリズム解析を実施している [28]。これは HLA ミスマッチ造血幹細胞移植を行う患者の病態を詳細に解析するのに極めて有効な方法であり、生着を迅速かつ正確に診断することを可能としただけではなく、白血病などの再発の早期発見にも貢献することを報告している。ただし、解析に使用する抗 HLA 抗体には市販のものが多く存在するが、抗体によっては染色が不十分になることや、一部の特殊な HLA を持つ症例では市販のものでは対応できないこともあるため、独自の方法で効率的にアリル特異的抗 HLA モノクローナル抗体（ASHmAb）を作製し [29]、これらの問題にも対応できるようにしている。一方、抗 HLA 抗体は、固形臓器移植や造血幹細胞移植後の拒絶反応、あるいは、繰り返す血小板輸血における輸血不応の原因になるなどの報告があり、何らかの細胞障害作用をもつことが古くから知られている [30–32]。

私は、東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センターにおける初のクリニカルフェローとして、東京大学医科学研究所附属病院血液腫瘍内科の造血幹細胞移植病棟で半年間の臨床研修を行う機会を得た。主治医として多くの GVHD に苦しむ患者を見てきたことで、患者への負担が少ない、より有効な GVHD 治療法の開発に興味を持ち始めた。本研究は、抗 HLA 抗体の細胞障害作用に注目し、

私が大学院在学中に作製した ASHmAb の中に細胞障害作用を持つものが存在すると仮定した上で、その細胞障害抗体による GVHD 治療モデルの開発を目標とした。

IV　材料と方法

(1) マウス

NOD/SCID（NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J）マウスは三協ラボサービス株式会社、また NOG (NOD/Shi-scid/IL-2Rγ^{null}) マウスは公益財団法人実験動物中央研究所からそれぞれ購入した。HLA class I トランスジェニックマウスは熊本大学の滝口雅文博士より供与いただいた。すべての動物実験は、東京大学医科学研究所内の動物実験委員会において承認を得た上で実施した。

検体の処理（末梢血・骨髄）：マウスを吸入麻酔薬で鎮静した上で、ヘパリン採血管を用いて眼窩静脈から約 100-200 μl/匹の末梢血を採取した。末梢血採取後、溶血バッファー（NH_4Cl 41.3 g、$NaHCO_3$ 5.95 g、EDTA-2Na 0.189 g、蒸留水 500 ml、pH 7.3 に調整したものを蒸留水で 10 倍希釈）1 ml を加え、10 分静置後、25 ℃、1500 回転/分、5 分遠心した。上清を吸引後、1 ml の 5 % FBS 入り 1x PBS（Sigma）を加え、4 ℃、1500 回転/分、5 分遠心して得られる細胞を PBMC として使用した。また骨髄については、吸入麻酔薬で十分に鎮静し、頸椎脱臼した上で、両側大腿骨および頸骨中の骨髄を回収した。回収後、70 μm のフィルターに一度通し、4 ℃、1500 回転/分、5 分遠心したものを研究対象の細胞として使用した。

(2) ヒト検体

ヒト血液検体（末梢血・臍帯血）は、東京大学医科学研究所および同附属病院に所属する健常人および患者から同意を得た上でヘパリン採血したものを使用した。臍帯血は日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターから供与いただいた。ヒト検体が関与する全ての実験は東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認のもとで実施した（承認番号：24-36-0809）。

検体の処理（末梢血・臍帯血）：1x PBS を用いて血液を倍量に希釈後、リンホセパール I （免疫生物研究所）と共に、25 ℃、1800 回転/分、30 分遠心する。単核球層を回収し、5 % FBS 入り 1x PBS を適量加え、4 ℃、1500 回転/分、5 分遠心して得られたものを研究対象の細胞として使用した。

(3) アリル特異的抗 HLA モノクローナル抗体（ASHmAb）の作製

Yamazaki[29] らの報告をもとに ASHmAb の作製を実施した。テトラマーは、HLA-A*02:01 拘束性のサイトメガロウイルス特異的な抗原エピトープである pp65（NLVPMVATV）を結合し、PE 標識されたものと、HLA-A*24:02 拘束性のサイトメガロウイルス特異的な抗原エピトープである pp65（QYDPVAALF）を結合し、PE 標識されたものの 2 種類をマウスへの免疫原として購入・投与した

（MBL）。なお ELISA 法による抗体価の確認およびスクリーニングの際は、それぞれのテトラマーをプレートに固相化したものを使用した。

ASHmAb のアリル特異性の評価に用いた FlowPRA（One Lambda）は、添付文書に従い、実験を実施した。本研究では、ハイブリドーマ作製 day 28 での培養上清 150 μl を PE 標識された HLA のアリル抗原を持つビーズ 0.5 μl と反応させた後、APC で標識されたヤギ抗マウス IgG 抗体（2 次抗体）と反応させ、その後 FACS で解析した。ASHmAb のアイソタイプを判定するための実験は、rodent monoclonal isotyping strips（AbD Serotec）の添付文書に従い、実施した。また、ASHmAb の蛍光標識（Alexa Fluor 647）は、monoclonal antibody labeling kit（Molecular Probes）を使用した。

(4) モノクローナル抗体による細胞染色

FACS による解析は以下の抗体を用いて実施した。FITC：抗 HLA-A24 抗体（OneLambda）、抗 human lineage 抗体（BioLegend）、PE：抗 HLA-A2 抗体（BD Biosciences）と抗 CD56 抗体（BioLegend）、PE/Cy5：抗 CD235ab 抗体（BD Pharmingen）、PerCP/Cy5.5：抗 CD8 抗体（BioLegend）、PE/Cy7：抗 CD3 抗体、抗 CD33 抗体（BD Pharmingen）、抗 CD38 抗体（BD Biosciences）、APC：抗 CD3

抗体（BioLegend）、抗 CD34 抗体（BD Biosciences）、APC-Cy7：抗 CD19 抗（BioLegend）、PB：抗 CD4 抗体、抗 CD45 抗体（BioLegend）、Alexa Fluor 405 or 647：抗 CD45 抗体（BioLegend）。

FACS による解析の際は、得られた細胞を 1x PBS 100 μl に懸濁し、上記抗体をそれぞれ適量加え、氷上で 30 分反応させたものを使用した。また、PI（1 μg/ml）を 1x PBS で 1000 倍希釈したもの 20 μl を FACS 解析の直前に加え、死細胞の染色をした。

(5) FACS による解析とソーティング

BD FACS AriaII、CantoII、Verse（いずれも Becton Dickinson）を使用し、FACS による解析およびソーティングを実施した。FACS により得られたデータは、FlowJo software（Treestar）を用いて解析した。

(6) GVHD モデルマウスの末梢血中の血算および生化学検査

Celltac α（Nihon Kohden）はマウス末梢血の CBC の解析に、また DriChem（Fujifilm）はマウス末梢血の生化学検査（血清中の総ビリルビン、LDH、ALT、AST）の解析に用いた。CBC 解析には 0.1 mol/l の EDTA を少量加えたマウスの

末梢血約 100 μl を使用した。また生化学検査では、マウスの末梢血約 200 μl を１時間室温で静置した後、25 ℃、3000 回転/分、10 分遠心することで得られる上清（血清）を DriChem 専用のフィルムに 7 μl 滴下し、測定した。

(7) GVHD モデルマウスの臓器免疫染色

一般的な組織免疫染色の方法を用いて GVHD モデルマウスから得られた検体を処理した（以下、HE 染色以外の抗ヒト抗体を用いた染色手順を示す）。10 % のフォルマリンに固定し、パラフィン包埋された臓器（肝臓、肺、腸、腎臓）から切片（5 μm）を作製し、次の方法で免疫染色を実施した。まず各切片の脱パラフィンを行い、抗原を賦活化した。次に 3 % H_20_2 に 5 分間浸した後、wash buffer（Dako）に 2-3 分間浸した。軽く水洗いをした後で、5 % goat blocking buffer（Millipore）を数滴切片に添加し、5 分間室温で静置した。Blocking が終了したところで、rabbit anti-human CD3 monoclonal antibody（Abcam）と mouse anti-human CD45 monoclonal antibody（Dako）を 100 倍希釈したものを各組織の上に、それぞれ 4-5 滴添加し、37 ℃、30 分間静置した。抗体反応後、wash buffer（1x TBS + 0.05 % tween20）に 3 分間浸し、これを 3 回繰り返して洗浄した。洗浄終了後、ChemMate envision（Dako）を 4-5 滴添加し、室温で 30 分間静置した。抗体反応

後と同様に、wash buffer に 3 分間浸し、これを 3 回繰り返して洗浄した。抗体の発色基質として、ImmPACT DAB substrate kit（Vector Laboratories）の chromogen concentrate を 1 滴添加し、2-3 分間静置後、水で洗浄した。次に、ヘマトキシリンに 2-3 分間浸し、水洗いした。その後、100 %エタノール（2-3 分間/回）に 4 回浸し、続いてキシレン（2-3 分間/回）に 4 回浸した後、十分に乾燥させた。最後に fluorescent mounting medium（Dako）を 1 滴添加し、カバーグラスをかぶせて完成とした。

組織中のアポトーシスを起こした細胞の解析には、MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct（MBL）を用いて、TUNEL 染色を実施した。アポトーシスの過程で生じる組織切片中の断片化 DNA をビオチン標識 dUTP で標識した後、FITC 標識ストレプトアビジンを反応させて染色した。なお HE 染色、抗ヒト CD3 および CD45 抗体による染色の解析には生物顕微鏡 ECLIPSE 50i（Nikon）、TUNEL 染色の解析には蛍光顕微鏡 BX51 とデジタルカメラ DP71、DPManager（いずれも Olympus）を使用した。

(8) CD34 陽性細胞の純化とヒト・骨髄キメラマウスの作製

日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターから供与いただいた臍帯血か

らリンホセパール I を用いて単核球細胞を回収した。回収後、抗ヒト CD34 マイクロビーズ（Miltenyi Biotec）30 μl を混ぜ、氷上で 30 分反応させた。この細胞を専用のビーズ分離カラムである 25 LS Colum（Miltenyi Biotec）に通して得られた CD34 陽性細胞 1-2×10^5 個/匹を 150 μl の 1x PBS で懸濁し、1.5-2.0 Gy の放射線照射した 6-10 週齢の NOD/SCID あるいは NOG マウス（いずれもメス）に尾静脈あるいは眼窩静脈から移植した。なお、生細胞あるいは死細胞の判断は、細胞を数える時にトリパンブルー染色を行うことで評価した。

(9) 統計解析

全てのデータは平均値（±標準偏差）で示した。データの解析は GraphPad Prism 6（GraphPad software）をもとに、Student の paired t 検定にて行い、P 値が 0.05 未満のものを有意と判定した。

V　結果

(1)　ハイブリドーマの樹立と特異性の評価

山崎ら[29]の開発した ASHmAb を効率的に作製する技術を用いて、HLA-A*02:01 を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を目指した。まず HLA-A*02:01（あるいは HLA-A*24:02）テトラマーを HLA class I（HLA-A24 あるいは HLA-A2）トランスジェニックマウスに免疫した。この免疫マウスの血清中の抗体価を確認したのち、リンパ節・脾臓を採取し、スライドガラスを用いて各臓器をすりつぶした。この操作で得られる細胞と、ミエローマ細胞である Sp2/0 とで細胞融合を行い、ハイブリドーマを作製した（図 1）。HAT セレクション培地上で得られたハイブリドーマを培養し、コロニーを形成したものを 96 穴の培養プレートに継代した。ハイブリドーマが増殖し始めたところで、それぞれの培養上清を採取し、まず ELISA 法により、免疫した HLA テトラマーに反応するクローンを選び出した。次に FlowPRA を用いて HLA-A*02:01 のみを特異的に認識する抗体（Clone No.1）と、HLA-A*02:01 と HLA-A*03:01 の 2 種類のアリルを特異的に認識する抗体（Clone No.2）をそれぞれ 1 クローンずつ樹立・同定した（図 2a）。その後 HLA-A*02:01 特異的抗体を精製し、一部をキメリズム解析に用いるため、ビオチンおよび Alexa Fluor 647 で標識した。なお、図 2b

は、樹立した抗 HLA-A24 抗体に関して、FlowPRA を用いて同様に解析したものである。

(2)　*In vitro* における細胞障害作用を有する ASHmAb のスクリーニング

樹立した ASHmAb（ここでは HLA-A2 に対する抗体）が細胞障害活性を持つかどうかを調べるために、まず *in vitro* における細胞障害活性を解析した。HLA-A2 陽性あるいは HLA-A2 陰性ヒト PBMC（$1x10^6$ 個/well）を培養液（10 % FBS、100 U/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシン、2 nM L-グルタミンを加えた培地）250 μl 中に懸濁し、30 %幼齢ウサギ補体（baby rabbit complement）と樹立した ASHmAb を産生するハイブリドーマの培養上清 100 μl を加え、計 500 μl/well（24 穴プレート）とし、37 ℃、10 % CO_2 で 24 時間培養した。FACS による解析を行う直前に PI 染色を行い、PI 陽性死細胞の比率を解析した（図 3a, b）。その結果、HLA-A2 陽性細胞においては約 6 割の細胞が PI 陽性であり、negative control（NC）細胞と比較し、多くの細胞が傷害を受けていることを確認した。しかし、HLA-A2 陰性細胞においては PI 陽性細胞が 2 割前後で、NC 群と比較しても有意差は認められなかった。抗体添加後 3 時間後にも顕微鏡下で細胞の状態を確認しているが、この時点で NC 群と比較し、半数の細胞は凝集しており、

細胞の状態は明らかに悪いと判断した（データなし）。本研究ではこれ以降、HLA-A*02:01 に対するアリル特異的抗 HLA モノクローナル細胞障害抗体を A*02:01-kASHmAb とする。なお、この A*02:01-kASHmAb のアイソタイプは、rodent monoclonal isotyping strips （AbD Serotec）を用いた結果、IgG2a κであることが判明した。

(3) *In vivo* における kASHmAb の細胞障害作用の評価

In vivo における kASHmAb の細胞障害作用を解析するため、2.0 Gy の放射線照射した 6-7 週齢の NOD/SCID マウスに、予め HLA のタイピングをした臍帯血のうち、HLA-A2 陽性あるいは陰性の CD34 陽性細胞を移植し、ヒト・マウス骨髄キメラマウスを作製した。移植後 30 日が経過したところで A*02:01-kASHmAb を投与した。抗体投与直前の HLA-A2 陽性細胞群のヒト末梢血のキメリズムは 12.0 %を示したが、A*02:01-kASHmAb 投与 1 日後のキメリズムは 0.25 %に低下した。一方、HLA-A2 陰性細胞群の抗体投与前のヒト末梢血のキメリズムは 2.31 %を示したが、A*02:01-kASHmAb 投与 1 日後のキメリズムは 5.86 %であり、抗体投与後増加していた（図 4a, b, c）。この結果から kASHmAb は *in vivo* においてもアリル特異的に細胞障害性を示すことが明確となった。抗体投与を

簡便化するためにIPによる投与も実施したが、IVと同様に効率的な細胞障害性が認められることを確認している（図4d, e）。

次に、A*02:01-kASHmAbが2種類の異なるHLAを持つ健常人の血液細胞を*in vitro*で分離可能であるかどうかを解析した（図5）。方法として、一方はHLA-A2陽性細胞、もう一方はHLA-A2陰性細胞を同数（$1x10^6$個）混合し、抗体染色を行った後、FACSを用いて解析した。その結果、２つの細胞はマウスのLy5.1/5.2システム[33]と同様に正確に分離され、解析できることが示された。またHLA-A2陽性群をソーティングし、HLAのタイピングを実施したところ（SRLに委託）、HLA-A*02:01陽性であることが判明した。

さらに、ASHmAbを実際に臨床でGVHD治療薬として使用することを想定し、造血幹細胞移植後患者のPBMCを正確に区別することが可能かどうかを検討した。患者は46歳の男性で、急性骨髄性白血病に罹患し、12年前に東京大学医科学研究所附属病院で臍帯血移植を施行された。ドナー（臍帯血）はHLA-A2陰性かつHLA-A24陽性で、レシピエント（患者）はHLA-A2陽性かつHLA-A24陽性である。この移植後患者から得られたPBMCを、蛍光標識したA*02:01-kASHmAbと市販の抗HLA-A24抗体を用いてFACSによるキメリズム解析を実施したところ（図6）、全ての分画（B細胞、T細胞、NK細胞、単球）

でレシピエント細胞がわずかに残存していることが判明した。この結果より、ASHmAb は HLA ミスマッチ造血幹細胞移植後のドナーとレシピエント細胞を区別し、キメリズム解析を容易に、また正確に行うことができることを証明した。

(4) kASHmAb を用いた異種 GVHD モデルマウスの治療

過去の知見[34]をもとに、*in vivo* における A*02:01-kASHmAb の細胞障害作用とその特異性について、異種 GVHD モデルマウスを用いて検討した（図 7a）。致死性 GVHD を引き起こすモデルとして、非放射線照射の NOG マウス（9-10 週齢）に HLA-A2 あるいは HLA-A26 陽性の健常人 PBMC $1x10^7$ 個をそれぞれ尾静脈あるいは眼窩静脈より移植した（HLA-A2 マウスと HLA-A26 マウス）。この異種 GVHD モデルでは無治療のマウスは 2 ヶ月以内に確実に死亡することを確認している。このモデルマウスに、臨床で使用する造血幹細胞移植後の急性 GVHD に対する ATG（genzyme）の投与量（2.5-3.75 mg/kg/日 x 5 日間）を参考に、A*02:01-kASHmAb を 60 μg/匹/日 x 2 日間連日投与したところ、HLA-A26 マウスの末梢血中のヒト血液細胞は、抗体投与前は 8.8 %を示したが、抗体投与 1 週間後には 27.8 %に増加し、1 ヶ月後には全匹死亡した。一方、HLA-A2 マウ

スの末梢血中のヒト血液細胞は、抗体投与前は 5.4 %を示したが、抗体投与 1 週間後には 0 %に減少し、1 ヶ月を経過してもヒト血液細胞は認められなかった（図 7b）。統計学的に解析したところ（図 7c）、HLA-A2 マウスは平均で 3 ヶ月以上生存したが、A*02:01-kASHmAb に反応しない HLA-A26 陽性細胞を移植された HLA-A26 マウスは 2 ヶ月以内に全匹死亡した（$p<0.0001$）。この結果から、kASHmAb は *in vivo* でも正確に HLA を区別し、特定の細胞のみを傷害することで、異種 GVHD モデルマウスを治療できることが示された。

本研究で使用した異種 GVHD モデルマウスの直接の死亡原因が GVHD であることを確認するために、PBMC 移植後、3 週間（day 21）が経過した時点における各モデルマウスの臓器（肺、肝臓、腎臓、腸管）を HE（図 7d）、抗ヒト CD3 抗体、抗ヒト CD45 抗体で染色した（図 7e）。さらにアポトーシス細胞を観察するために TUNEL 染色も実施した（図 7f）。この結果、特に CD3 陽性の T 細胞を中心としたヒト血液細胞の各臓器（特に肺においては間質と肺胞中隔、また肝臓においては門脈域を中心とする部分）への浸潤を認めただけではなく、TUNEL 染色でもアポトーシスを起こしている細胞の存在も各臓器に認め、GVHD の発症を強く示唆する所見を確認した。

なお、客観的に GVHD の発症を判断するため、本研究では血液検査、体温、

体重の変化を指標とした（図 7g, h, i）。PBMC 移植直前と 3 日後に比較した血液検査では、RBC、hematocrit、hemoglobin のみ有意差を認め、GVHD 発症の基準とした。しかし kASHmAb 投与前後における体重変化および体温変化から GVHD 発症を裏付けるようなデータは得られなかった。

(5)　ヒト・マウス骨髄キメラマウスを用いた kASHmAb による造血細胞障害の評価

これまでの実験結果より、kASHmAb はレシピエントの細胞ではなく、移植したドナー細胞のみを傷害することで GVHD モデルマウスを治癒した。しかし臨床応用を考慮した際、kASHmAb がドナー細胞を傷害するということは、移植片を傷害することであり、それにより拒絶・生着不全の可能性が高まることを意味する。この問題を検証するため、1.5 Gy の放射線を照射した NOG マウスに HLA-A2 陽性の臍帯血由来 CD34 陽性造血幹・前駆細胞（2.0×10^5 個/匹）を移植し、ヒト・マウス骨髄キメラマウスを作製した（図 8a 上段）。移植後 3 ヶ月が経過し、骨髄が安定したところでこのマウスに A*02:01-kASHmAb を投与することで、造血細胞の傷害の程度を調べることができると考えた。

この結果、GVHD 治療モデル同様、A*02:01-kASHmAb を 60 μg/匹/日 x 2 日間

連日投与したマウスでは、末梢血中のヒト血液細胞は一旦大幅に減少するものの、数週間すると再びその割合が増加してくることが FACS による解析で判明した（図 8a 下段）。また統計学的解析でも、抗体投与直後のヒト血液細胞は一旦減少するものの、抗体投与後 day 28 には治療前の平均 60%以上、day 84 では平均で 80 %近くまで回復することを確認した（図 8b）。さらに抗体投与後 3 ヶ月（day 84）が経過した時点でマウスを安楽死させ、骨髄細胞（両側脛骨・大腿骨）を回収し、抗ヒト CD34 抗体と抗ヒト CD38 抗体を用いてそれぞれ染色したところ、骨髄造血幹・前駆細胞と考えられる CD34 陽性・CD38 陰性の分画にわずかながら細胞が存在していることも確認した（図 8c）。

VI　考察

HLA ミスマッチでも移植が可能であることから、臍帯血や HLA 半合致ドナーを用いた allo-HSCT は急増している [6,7]。しかし、HLA のミスマッチで移植が行われるが故に、GVHD の頻度は依然として高く、ステロイド [15]、CNI[16]、あるいは ATG[17–19] などの代表的な免疫抑制剤が GVHD の予防薬、あるいは治療薬として臨床では長い間使用されている。これらの薬剤はドナーやレシピエントの細胞を区別することなく細胞を傷害するため、副作用は当然のことながら大きく、新たな治療薬の開発が望まれている。

急性 GVHD の病態として、レシピエント側の抗原提示細胞に反応したドナー由来のアロ反応性 T 細胞が中心的な役割を果たし、レシピエント細胞を傷害することで GVHD が発症することが知られている [13]。HLA 一致・不一致問わず、このような GVHD を抑制するために前述の薬剤が使用されてきたが、最近では病態の理解が深まり、より標的細胞を絞った抗体、例えば成熟 T 細胞表面に発現する CD3 抗原を標的にした抗 CD3 抗体 [20] や、T 細胞や B 細胞に強く発現し、その他 NK 細胞、単球、好酸球、上皮細胞でも一部発現を認めるとされる CD52 抗原を標的にした抗 CD52 抗体 [21,22] などが臨床応用されている。前者では、腎移植後の難治性急性拒絶反応の治療や難治性潰瘍性大腸炎の治療に臨床応用され

てきた。しかし、治療効果が不十分であることや安全性の問題（感染症の増悪やアレルギー反応など）で製造が中止され、現在 GVHD 治療薬としては使用できない。また後者では、感染の増加、T リンパ球免疫能回復遅延を指摘されており、薬物動態を含め、検討段階にあるため、まだまだ発展途上にあると言える。これらの抗体も含め、今までの急性 GVHD 治療薬に共通することは、いずれもドナー細胞とレシピエント細胞の両方を対象とするもので、副作用が強いということである。HLA ミスマッチ allo-HSCT の場合、ドナーの免疫担当細胞を特異的に認識することが望ましいが、現実的にはこのような抗体を作製することは難しい。

前述のように、私が所属する研究室では以前、CBT や HLA 半合致移植を含む、HLA ミスマッチ allo-HSCT 後の動向（キメリズム）を迅速に解析・診断することを考え、ASHmAb の作製にチャレンジし、効率のよい作製方法を生み出した[29]。この新しい方法と従来の方法の大きな違いは、①免疫するマウスとして HLA トランスジェニックマウスを使用していること（HLA の共通部分を自己抗原として免疫マウスに認識させる目的）、②免疫原として HLA テトラマーを使用していることである。①、②の方法を用いることで、汎抗 HLA 抗体が作られることを限りなく抑え、目的のエピトープに対する抗体を効率よく得ることを可能

にしている。この新しい技術で作製された ASHmAb により、HLA ミスマッチ allo-HSCT における生着を迅速かつ正確に診断できるようになっただけではなく、再発の早期発見にも貢献することを報告した[28]。一方、抗 HLA 抗体は、固形臓器移植や造血幹細胞移植後における拒絶反応や、繰り返す血小板輸血における輸血不応の原因になるなどの報告があり、何らかの細胞障害作用をもつことが古くから知られている[30–32]。本研究では、ASHmAb をスクリーニングする過程で、細胞障害活性を持つ kASHmAb の樹立に成功し、モデルマウスを用いて、GVHD 治療にも kASHmAb が役立つことを明らかにすることができた。ここで使用した GVHD モデルマウスは異種 GVHD 反応を起こしたマウスであり、同種 GVHD 反応と全く同様の免疫反応が生じているとはいえない。しかし非常に再現性の高いモデルであること、また治療のコンセプトであるドナー細胞のみを傷害することにより、異種免疫反応ではあるが、kASHmAb に GVHD を改善する効果があるのかどうかを判断することが最初に証明するべき重要な問題であると考え、NOG マウスにヒト PBMC を移植する異種 GVHD モデルマウスを採用した。

kASHmAb の投与量・投与間隔は、臨床において allo-HSCT 後の急性 GVHD を治療する際に使用する ATG の標準投与量を参考に設定した。しかし、ATG は

ポリクローナル抗体であるため、モノクローナル抗体である kASHmAb はより少ない量で投与可能であると考えられた。実際、本研究では当初予定していた ATG を参考に決定した投与量（60 μg/匹/日 x 5 日間）の 5 分の 2（60 μg/匹/日 x 2 日間）に減量して kASHmAb を投与したが、それでも十分に有効であることが判明した。

GVHD の発症を判断する基準として、過去に血液検査、体重、体温、さらに皮膚の障害範囲をスコア化したものなどがある[35–37]。しかし、皮膚の障害範囲をスコア化することなどは主観的な要素が大きく入り込むため、客観的な判断が難しいと判断した。このため本研究では、血液検査、体温、体重の変化を指標に GVHD の発症を検討した。実験開始当初、GVHD 発症に伴い、血液検査では白血球の増加、貧血の増悪、血小板数の減少、肝機能異常、腎機能異常など、また体温・体重検査では、体温上昇・体重減少を認めると予想していた。しかし実際に GVHD 発症開始の指標として有効と考えられたのは、ヒト PBMC 移植後 3 日目にデータの有意な変化を認めた RBC、hematocrit、hemoglobin のみであり、その他はマウスの外見も含め、特に大きな変化は認めなかった。これらの結果を踏まえ、PBMC 移植後 3 日目を GVHD 発症の日と判断し、抗体投与開始としたが、実際の臨床ではわずかな血液データや体温の変化をもとに早期に

GVHD 治療の開始を検討するため、day 3 での抗体投与は妥当ではないかと判断した。しかし重症の GVHD を発症した患者では全身状態は極めて悪い状態にあるため、臨床応用を考えた場合、kASHmAb に加え、従来の治療薬を組み合わせて治療するなどの工夫が必要であると考える。

興味深いことに、ヒトとは違い、本研究における異種 GVHD モデルマウスでは腸管のダメージが軽度であった。確かに下痢や便潜血陽性反応を示すマウスも存在したものの（データなし）、病理所見では粘膜固有層にわずかなヒト血液細胞の浸潤を認めたのみであった。異種 GVHD 反応では、アロ反応性 T 細胞の標的臓器が異なる可能性が示唆されたが、過去の文献においても未だ不明な点は多い[38]。

kASHmAb がマウス末梢血中のヒト血液細胞の大部分を消失させることで、感染症など様々な合併症のリスクが高まることが予想される。しかし、アリル特異的な抗 HLA class II 抗体を作製することで、より特異的に細胞を傷害することができ、この問題は解決しうると考える。現在、その開発に取り組んでいる。また、最近では GVHD を予測する研究も進んでいるため[39]、少量の kASHmAb で早期に安全に GVHD を治療することも可能になるかもしれない。

抗体による細胞死誘導の機構には CDC、ADCC、オプソニン化による食細胞

の貪食などがある[40]。私が大学院在学中に樹立に成功した kASHmAb（抗 HLA-A2 抗体および 抗 HLA-A24 抗体）は、*in vitro* の実験で少なくとも補体依存的に細胞障害活性を示すことを確認している（CDC に関しては図 3 参照／ADCC 活性に関してはデータなし）。実験に使用した NOG マウスでは T 細胞、B 細胞、NK 細胞、さらには補体がないという報告を考慮すると[41]、食細胞による貪食が細胞死の機序として最も考えられた。しかし、たとえ作製した ASHmAb に細胞障害作用がない場合でも、抗体に放射性同位元素や抗癌剤を付加したり、あるいは標的分子が抗体と反応する際に internalization を起こすのであれば[42]、細胞障害性の薬剤を標識したりすることで、細胞死を誘導することも可能と考える[43,44]。近年の抗体加工技術が優れていることもあり、ASHmAb の用途は無限大の可能性を秘めている。

ドナー由来の T リンパ球と NK 細胞が移植後 GVT を誘発する主要因子であると考えられている[45]。このことから、GVHD と GVT はよく諸刃の剣に例えられるが、これらを完全にコントロールすることは現在の医学では非常に困難である。最近の移植研究において注目されている分野は、アロ免疫に依存しないワクチンや養子免疫による腫瘍特異的免疫療法である。もしこれらの治療法が有効であるならば、kASHmAb と組み合わせることで、GVT 効果を強化しつつ、

GVHD を治療する理想的な GVHD 治療法が生まれるかもしれない。今後さらなる研究が期待される。

本研究における最も重要な事項として、kASHmAb が HLA の class I を認識する細胞障害抗体であることが挙げられる。本来 HLA class I 分子は赤血球を除く、全ての細胞に発現しているため[46–48]、投与された kASHmAb は赤血球を除く全てのドナー血液細胞を標的とするはずであり、抗体投与による生着不全が懸念される。実際に臍帯血から分離した CD34 陽性細胞の HLA class I の発現を、pan anti-HLA class I 抗体を用いた FACS による解析で確認している（データなし）。ところが、一連の実験結果から、kASHmAb の投与によりマウス末梢血中のドナー（ヒト血液）細胞は一旦大幅に減少するものの、数週間すると再びドナー細胞が立ち上がることが判明した。この理由として、抗体の投与経路が末梢血管からであることから、骨髄に到達する前に末梢血中のヒト血液細胞により抗体が消費されてしまう可能性、また中和抗体の産生が考えられた。さらに、骨髄中の造血幹・前駆細胞は比較的抗体によるダメージを受けにくい可能性が示唆された。造血幹細胞は骨髄中のニッチで冬眠していて、アポトーシスなどに対しても耐性であることが報告されているため[49,50]、予想以上に末梢血中のドナー（ヒト血液）細胞と比較し、ダメージが少ないものと考えられた。これらのこ

とから、kASHmAb の投与量を調整することで、造血細胞には大きなダメージを与えずに、末梢血中のドナー細胞を傷害することが可能になると考えられる。このことは、実際の臨床において kASHmAb が患者に投与されることを想定すると、患者に大きな負担となる拒絶・生着不全、そして再移植のリスクを下げる手段として、極めて重要なことといえる。

VII　結語

HLA というよく知られた分子を標的にし、ASHmAb を治療薬として用いた治療モデルの開発は GVHD も含め過去に例がなく、この研究が世界で最初の報告となる。臨床で古くから使用されるステロイド、CNI、ATG などの免疫抑制剤と違い、kASHmAb は HLA のミスマッチを逆手に取り、拒絶・生着不全を起こさずにドナーの血液細胞のみを特異的に傷害することで、副作用を最小限に、GVHD を治癒する可能性を秘めた抗体である。

現在の GVHD 予防・治療に関するエビデンスの多くは、HLA 適合間骨髄破壊的骨髄移植が標準の時代に得られたものである。しかし近年の造血幹細胞移植は、骨髄や末梢血、あるいは臍帯血といった幹細胞源の違いだけではなく、HLA 不適合ドナーの増加、骨髄非破壊的前処置など、移植前処置の多様化も伴うことで、GVHD の臨床像もより複雑になり、新たな GVHD 制御の必要性が高まっている。

本研究で用いた A*02:01-kASHmAb だけではなく、HLA class II も含む、より多くの異なるアリルに対する kASHmAb を樹立できれば、このような GVHD のコントロールが極めて重要になる今後の移植医療において、より深い病態の解明に一石を投じるとともに、ドナー由来の細胞のみを傷害する新しい作用機序

の GVHD 治療薬として、その臨床応用が可能であると考える。

VIII　図表

図 1　ハイブリドーマの作製

（実験概略図）

アリル特的抗 HLA モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製し、スクリーニングするまでの手順。

Day 0：HLA トランスジェニックマウスにテトラマーを免疫
Day 10：マウスの血清を用いて抗体価を確認後、同様のテトラマーで 2 次免疫
Day 13：脾臓およびリンパ節から得られる細胞とミエローマ細胞（SP2/0）とで細胞融合し、aminopterine を含まない条件下で 24 時間培養
Day 14：融合細胞を HAT セレクション培地上で培養（10 cm dish）
Day 20-22：各ハイブリドーマコロニーを 10 % FBS 入り DMEM で満たした 96 穴プレートに移動
Day 27-28：培養上清を回収し、ELISA 法でスクリーニング後、FACS 用いて FlowPRA によるスクリーニング

図 2　FlowPRA を用いた ASHmAb のアリル特異性の解析（培養上清）

a. ＜HLA-A2 に対する ASHmAb（FlowPRA Group1）＞

b. ＜HLA-A24 に対する ASHmAb（FlowPRA Group2）＞

(a), (b) 作製したハイブリドーマが産生する抗体（抗 HLA-A2 抗体：計 2 クローン、抗 HLA-A24 抗体：計 2 クローン）のアリル特異性を、FlowPRA を用いて評価した。FlowPRA で使用するビーズの表面には以下の種類の PE 標識された HLA 抗原が固相化されており、各抗原に反応する抗体が陽性として判定される。ここでは HLA-A2 および HLA-A24 のアリルに対して、それぞれ FlowPRA Group 1 と FlowPRA Group 2 を使用した。横軸は ASHmAb（HLA-A2 あるいは HLA-A24）、縦軸は蛍光強度を変えた以下の HLA アリル抗原を結合したビーズである。

＜FlowPRA Group 1＞
1: HLA-A*01:01, 2: A*02:01, 3: A*03:01, 4: B*49:01, 5: A*25:01, 6: A*29:02, 7: A*30:01, and 8: control antigen or 9: A*26:01

＜FlowPRA Group 2＞
1: HLA-A*68:01, 2: A*11:01, 3: A*34:01, 4: A*24:02, 5: A*32:01, 6: A*33:01, 7: A*31:01, and 8: control antigen or 9: A*23:01

図 3　*In vitro* における細胞障害作用を持つ **ASHmAb（HLA-A2）**のスクリーニング（培養上清）

a. ***<In vitro*** **における ASHmAb（HLA-A2）の細胞障害作用（代表的な FACS の結果）>**

b. <*In vitro* における ASHmAb（HLA-A2）の細胞障害作用（統計学的解析結果）>

(a) *In vitro* における ASHmAb（HLA-A2）の細胞障害作用について示した。左図は HLA-A2 陰性細胞、右図は HLA-A2 陽性細胞に対して kASHmAb を投与し、24 時間経過した時点での死細胞の割合を、横軸を PI としてヒストグラムで表示している（いずれも健常人 PBMC）。解析の際、doublets は全て除いている。赤線は negative control（NC）、青線は ASHmAb。

(b) 図 3a の結果を統計学的に解析したものである。データは平均値（±標準偏差）で示した。赤は HLA-A2 陰性、青は HLA-A2 陽性細胞における死細胞の割合（縦軸）を NC と kASHmAb で比較した結果である。データの統計学的有意差の解析は Student の paired t 検定にて行い、P 値が 0.05 未満のものを有意と判定した。各群 n=4。NC: negative control, NS: not significant.

図 4　*In vivo* における kASHmAb の細胞障害作用の評価

a.

b.

p<0.01
NS
HLA-A2(-) cells (%)
300
200
100
0
Untreated
Day1
Day7

c.

p<0.0001
p<0.0001
HLA-A2(+) cells (%)
100
75
50
25
0
Untreated
Day1
Day7

d.

Transplantation
[HLA-A9(+)]
Flow cytometry
Flow cytometry
Flow cytometry
Day -30
-1
0
1
7
2Gy
Cord blood
NOD/SCID
ASHmAb
IP
<HLA-A2 (+) / CD34 (+) cord blood transplanted mouse>
Untreated
Day1
Day7
12.0%
0.25%
0.8%
HLA-A2
hCD45

e.

p<0.01
p<0.001
HLA-A2(+) cells (%)
100
75
50
25
0
Untreated
Day1
Day7

(a) 臍帯血から採取した CD34 陽性細胞（HLA-A2 陰性あるいは HLA-A2 陽性）を、2.0 Gy の放射線照射をした 6-7 週齢の NOD/SCID マウスの尾静脈あるいは眼窩静脈より $1.0x10^5$ 個/匹ずつ移植し、ヒト・マウス骨髄キメラマウスを作製した。移植後 1 ヶ月経過したところで精製した ASHmAb（A*02:01-kASHmAb）0.5 mg/dose を 1x PBS 500 μl に溶解し、day 0（移植日を day -30 とする）に尾静脈より投与した。その後、day 1 と day 7 に、FACS でマウス末梢血を解析した（図中の FACS は代表的なものを提示）。上段は HLA-A2 陰性、下段は HLA-A2 陽性の臍帯血 CD34 陽性細胞を移植したマウス末梢血中のヒト血液細胞の割合である。なお、解析の際は doublets と死細胞は全て除いている。hCD45: human CD45（横軸）、HLA-A2（縦軸）。

(b), (c) 図 4a を統計学的に解析したものである。(b)は、臍帯血由来 HLA-A2 陰性 / CD34 陽性細胞を移植した群に、(c)は、臍帯血由来 HLA-A2 陽性 / CD34 陽性細胞を移植した群にそれぞれ A*02:01-kASHmAb（60 μg/dose）を投与している。データは平均値（±標準偏差）で示した。データの統計学的有意差の解析は Student の paired t 検定にて行い、P 値が 0.05 未満のものを有意と判定した。n=3（HLA-A2 陰性）、n=5（HLA-A2 陽性）。NS: not significant.

(d), (e) 図 4a では A*02:01-kASHmAb を尾静脈より投与しているが、図 4d, e は腹腔内投与で全く同様の実験を施行した。腹腔内投与であることを除き、条件は図 4a と全て同じである。ただしここでは HLA-A2 陰性細胞の評価はしていない。

図 5　*In vitro* における健常人 PBMC を用いた精製抗体　【ASHmAb（HLA-A2）】の染色性の評価

健常人 PBMC No.1 は HLA-A2 陽性、No.2 は HLA-A2 陰性である。左端の図では PBMC No.1 のみ（1x10^6 個）、中央の図では PBMC No.2 のみ（1x10^6 個）、右端の図では、PBMC No.1（1x10^6 個）と No.2（1x10^6 個）を混ぜたものを抗ヒト CD45 抗体と蛍光標識済みの ASHmAb（A*02:01-kASHmAb）で染色した。右端の図ではさらに HLA-A2 陽性を示した細胞群を FACS でソーティングし、HLA のタイピングをした（SRL に委託）。なお、doublets と死細胞は解析の際に除いている。また横軸は human CD45（hCD45）、縦軸は ASHmAb（HLA-A2）を示す。

図 6　ASHmAb を用いた臍帯血移植後患者のキメリズム解析

造血幹細胞移植後患者の末梢血キメリズム解析を ASHmAb（図 5 で使用したものと同様の蛍光標識抗体）と市販の抗 HLA-A24 抗体を用いて施行した。

＜症例＞

46 歳 男性 急性骨髄性白血病に罹患し、臍帯血移植を施行。移植後 12 年経過した時点での末梢血検体。横軸：HLA-A2（患者のみ陽性）、縦軸：HLA-A24（患者および臍帯血いずれも陽性）。Doublets および死細胞は全て除く。R : recipient、D：donor.

ドナー（臍帯血）：HLA-A2(-) / HLA-A24(+)

レシピエント（患者）：HLA-A2(+) / HLA-A24(+)

図 7　免疫不全マウスを用いた異種 **GVHD** 治療モデル

a.

b.

<HLA-A2 (-) GVHD mouse>
Untreated
Day8
Day28
8.8%
27.8%
All dead
<HLA-A2 (+) GVHD mouse>
Untreated
Day8
Day28
5.4%
0.0%
0.0%
HLA-A2
hCD45

c.

HLA-A2(+) mice + kASHmAb
HLA-A2(-) mice + kASHmAb
p<0.0001
Percent survival
100
50
0
0
20
40
60
80
100
Days

d.

Day21 after PBMC iv
HLA-A2 (-)
+ kASHmAb
HLA-A2 (+)
+ kASHmAb
Lung
Liver
Kidney
Intestine
A
Br
PV
C
B
H
R
I
L
S
M

e.

Day21 after PBMC iv
HLA-A2 (-) + kASHmAb
HLA-A2 (+) + kASHmAb
CD3
CD45
CD3
CD45
Lung
Liver
Kidney
Intestine

f.

Day21 after PBMC IV
HLA-A2 (-) + kASHmAb
HLA-A2 (+) + kASHmAb
Lung
A
A
A
Br
Kidney
R
Liver
P
B
H
P
B
Intestine
L
S
M
L
Lung
A
A
A
Br
Br
Kidney
R
Liver
P
Intestine
L
S
M
L

g.

RBC
HLA-A2(+)
HLA-A2(-)
(x10⁴/μL)
900
800
700
600
500
**
**
Untreated
Day3
Untreated
Day3
Hematocrit
(%)
45
40
35
30
25
Hemoglobin
(g/dl)
14
13
12
11
10
9
8
Platelet
(x10⁴/μL)
110
100
90
80
70
NS
LDH
(U/L)
1000
800
600
400
200
0
GOT
(U/L)
200
150
100
50
0
GPT
(U/L)
40
30
20
10
0
Total Bilirubin
(mg/dl)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0

h.

(%)
Body Weight
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
-1 2
10
20
30
40
50
60
70
80
90
(Day)
: HLA-A2(-)
: HLA-A2(+)
† : indicates death of mouse

i.

(℃)
Body Temperature
40.0
38.0
36.0
34.0
32.0
30.0
28.0
26.0
24.0
22.0
20.0
-1 2
10
20
30
40
50
60
70
80
90
(Day)
: HLA-A2(-)
: HLA-A2(+)
† : indicates death of mouse

(a) kASHmAb を用いた GVHD 治療モデルの実験。Day 0: HLA-A2 陰性あるいは HLA-A2 陽性の PBMC を 9-10 週齢の NOG マウス（放射線照射なし）にそれぞれ尾静脈あるいは眼窩静脈より移植した（1.0×10^7 細胞/匹）。Day 3-4: kASHmAb（3 μg/g/日）を 2 日間連続して尾静脈から投与した。血液検査は day 2、FACS による解析を day 2、day 8、そして day 28 に施行した。各グループの生存率は PBMC 移植後、3 ヶ月が経過したところで評価した。写真左は治療が有効であった HLA-A2 陽性 PBMC 移植マウス、右は治療効果がなく、GVHD を発症した HLA-A2 陰性 PBMC 移植マウスである。

(b) GVHD モデルマウスの末梢血中のヒト血液細胞の割合を、kASHmAb 投与直前、移植後 day 8 そして、day 28 に FACS で解析した（図では代表例を提示）。横軸は human CD45（hCD45）、縦軸は ASHmAb（HLA-A2）である。上段、下段はそれぞれ、健常人の HLA-A2 陰性 PBMC、HLA-A2 陽性 PBMC を移植されたマウスの末梢血を解析したものである。なお解析の際に赤血球、doublets、および死細胞は全て除いている。

(c) GVHD モデルマウスの生存率の解析。赤と青はそれぞれ HLA-A2 陰性、HLA-A2 陽性の健常人 PBMC を移植されたマウスの生存曲線であり、移植後 3 ヶ月間記録した（それぞれ n=4 と n=5）。Kaplan–Meier 法に基づきデータの統計学的解析をした。

(d), (e) GVHD モデルマウスの臓器の病理組織標本（肺、肝臓、腎臓、腸管）。移植後 day 21 に GVHD モデルマウスの病理解剖を行い、各臓器を HE（図 7d）、抗ヒト CD3・CD45 抗体（図 7e）を用いて染色した。図 7e では、HLA-A2 陰性 PBMC 移植マウスと HLA-A2 陽性 PBMC 移植マウスからそれぞれ臓器を回収し、免疫染色をしている。矢印は、HLA-A2 陰性 PBMC 移植マウスに ASHmAb を投与した時の臓器中のヒト CD3 および CD45 陽性細胞を示している。倍率 200 倍（腎のみ 400 倍）、scale bar：400 μl（腎のみ 200 μm）。

A, Alveoli（肺胞）; B, Bile duct（胆管）; Br, Bronchiole（細気管支）; C, Central vein（中心静脈）; H, Hepatic artery（肝動脈）; I, Inner cavity（内腔）; L, Lamina propria（粘膜固有層）; M, Muscularis（筋層）; PV, Portal vein（門脈）; R, Renal corpuscle（腎小体）; S, Submucosa（粘膜下層）; V, Vessel（血管）。

(f) GVHD モデルマウスのアポトーシスを評価するための TUNEL 染色。図 7d, e と同様に、HLA-A2 陰性 PBMC 移植マウスと HLA-A2 陽性 PBMC 移植マウスのそれぞれ day 21 の臓器（肺、肝臓、腎臓、腸管）を回収し、TUNEL 染色した。緑色に発色している細胞はアポトーシスを起こしている細胞である。倍率 200 倍、scale bar：400 μl。
A, Alveoli（肺胞）; B, Bile duct（胆管）; Br, Bronchiole（細気管支）; H, Hepatic artery（肝動脈）; L, Lamina propria（粘膜固有層）; M, Muscularis（筋層）; PV, Portal vein（門脈）; R, Renal corpuscle（腎小体）; S, Submucosa（粘膜下層）。

(g) GVHD モデルにおける血液データの変化（血算・生化学検査）。PBMC 移植直前（day 0）と抗体投与直前（day 3）にマウスの眼窩静脈より 100 μl 採血し、RBC、hematocrit、hemoglobin、platelet、総ビリルビン、LDH、ALT、AST を評価した。HLA-A2 陰性 PBMC 移植マウスと HLA-A2 陽性 PBMC 移植マウス、いずれも PBMC 移植時 9-10 週齢（それぞれ n=5 と n=6）。データの統計学的有意差の解析は Student の paired t 検定にて行い、P 値が 0.05 未満のものを有意と判定した。*P<0.05, **P<0.01, NS: not significant.

(h), (i) kASHmAb 投与前後における GVHD モデルマウスの体重と体温の変化をそれぞれ示したもの。赤線：HLA-A2 陰性 PBMC 移植マウス、青線：HLA-A2 陽性 PBMC 移植マウス。全てのマウスは 2 回/週の頻度で体重・体温の測定を実施した。†は死亡を意味する。
測定条件：室温 22 ℃、湿度 55 %、測定時刻 15:00-19:00。%体重は PBMC 移植直前の体重を 100 %として計算した。

図 8　kASHmAb による造血障害の検討

a.

b.

HLA-A2(+) cells (%)
120
100
80
60
40
20
0
Untreated
Day2
Day7
Day28
Day56
Day84

c.

Bone Marrow (Day84)
2.96%
0.48%
96.5%
0.036%
hCD38
hCD34
0
10^2
10^3
10^4
10^5

(a) kAHmAb による造血障害を評価するための実験計画。臍帯血から純化した CD34 陽性 / HLA-A2 陽性細胞を 1.5 Gy の放射線照射した NOG マウスに移植した。移植後 3 ヶ月経過したところで kASHmAb を腹腔内投与した（60 μg/匹/日 x 2 日間）。kASHmAb 投与直前、移植後 day 2、7、28、56、そして 84 に FACS でマウス末梢血中のヒト血液細胞を解析した（図は代表的な FACS を提示）。

(b) 図 8a の結果を統計学的に解析したもの。青の棒グラフは、ヒト・マウス骨髄キメラマウス末梢血中の CD45 陽性 / HLA-A2 陽性細胞の割合である。各群 n=5、データは平均値（±標準偏差）で示した。

(c) 抗体投与後 3 ヶ月（day 84）が経過したところでマウス骨髄中の CD34 陽性 / CD38 陰性細胞を評価した（図は代表的な FACS を提示）。hCD34: human CD34（横軸）、hCD38: human CD38（縦軸）である。なお解析の際は、赤血球、doublets、および死細胞は全て除いている。

IX 参考文献

1. Storb, R. Edward Donnall Thomas (1920-2012). *Nature* **491,** 334 (2012).

2. Appelbaum, F. R. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N. Engl. J. Med.* **357,** 1472–5 (2007).

3. Bortin, M. M. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* **9,** 571–87 (1970).

4. Thomas, E., Storb, R., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, F. L., Neiman, P. E., Lerner, K. G., Glucksberg, H. & Buckner, C. D. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* **292,** 832–43 (1975).

5. Thomas, E. D., Storb, R., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, L., Neiman, P. E., Lerner, K. G., Glucksberg, H. & Buckner, C. D. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* **292,** 895–902 (1975).

6. Fuchs, E. J. Haploidentical transplantation for hematologic malignancies: where do we stand? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2012,** 230–6 (2012).

7. Ballen, K. K., Gluckman, E. & Broxmeyer, H. E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood* **122,** 491–8 (2013).

8. Pavletic, S. Z. & Fowler, D. H. Are we making progress in GVHD prophylaxis and treatment? *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2012,** 251–64 (2012).

9. Martin, P. J., Rizzo, J. D., Wingard, J. R., Ballen, K., Curtin, P. T., Cutler, C., Litzow, M. R., Nieto, Y., Savani, B. N., Schriber, J. R., Shaughnessy, P. J., Wall, D. A. & Carpenter, P. A. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **18,** 1150–63 (2012).

10. Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D. & Storb, R. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med.* **300,** 1068–73 (1979).

11. Storb, R., Gyurkocza, B., Storer, B. E., Sorror, M. L., Blume, K., Niederwieser, D., Chauncey, T. R., Pulsipher, M. A., Petersen, F. B., Sahebi, F., Agura, E. D., Hari, P., Bruno, B., McSweeney, P. A., Maris, M. B., Maziarz, R. T., Langston, A. A., Bethge, W., Vindelov, L., *et al.* Graft-Versus-Host Disease and Graft-Versus-Tumor Effects After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **31,** 1530–8 (2013).

12. Ho, V. T. & Soiffer, R. J. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **98,** 3192–204 (2001).

13. Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet* **373,** 1550–61 (2009).

14. Linhares, Y. P. L., Pavletic, S. & Gale, R. P. Chronic GVHD: Where are we? Where do we want to be? Will immunomodulatory drugs help? *Bone Marrow Transplant.* **48,** 203–9 (2013).

15. Deeg, H. J. How I treat refractory acute GVHD. *Blood* **109,** 4119–26 (2007).

16. Jørgensen, K. A., Koefoed-Nielsen, P. B. & Karamperis, N. Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand. J. Immunol.* **57,** 93–8 (2003).

17. Mohty, M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* **21,** 1387–94 (2007).

18. Kumar, a, Mhaskar, a R., Reljic, T., Mhaskar, R. S., Kharfan-Dabaja, M. a, Anasetti, C., Mohty, M. & Djulbegovic, B. Antithymocyte globulin for acute-graft-versus-host-disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic

hematopoietic cell transplantation: a systematic review. *Leukemia* **26,** 582–8 (2012).

19. Mueller, T. F. Mechanisms of Action of Thymoglobulin. *Transplantation* **84,** S5–S10 (2007).

20. Knop, S., Hebart, H., Gratwohl, A., Kliem, C., Faul, C., Holler, E., Apperley, J., Kolb, H. J., Schaefer, a, Niederwieser, D. & Einsele, H. Treatment of steroid-resistant acute GVHD with OKT3 and high-dose steroids results in better disease control and lower incidence of infectious complications when compared to high-dose steroids alone: a randomized multicenter trial by the EBMT Chronic Leukemia Working Party. *Leukemia* **21,** 1830–3 (2007).

21. Kanda, Y., Oshima, K., Kako, S., Fukuda, T., Uchida, N., Miyamura, K., Kondo, Y., Nakao, S., Nagafuji, K., Miyamoto, T., Kurokawa, M., Okoshi, Y., Chiba, S., Ohashi, Y., Takaue, Y. & Taniguchi, S. In vivo T-cell depletion with alemtuzumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Combined results of two studies on aplastic anemia and HLA-mismatched haploidentical transplantation. *Am. J. Hematol.* **88,** 294–300 (2013).

22. Martínez, C., Solano, C., Ferrá, C., Sampol, A., Valcárcel, D. & Pérez-Simón, J. A. Alemtuzumab as treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease: results of a phase II study. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **15,** 639–42 (2009).

23. Busca, A. The use of monoclonal antibodies for the treatment of graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplantation. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11,** 687–97 (2011).

24. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M. & Ringdén, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363,** 1439–41 (2004).

25. Ringdén, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lönnies, H., Marschall, H.-U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., Omazic, B., Aschan,

J., Barkholt, L. & Le Blanc, K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* **81,** 1390–7 (2006).

26. Kaneko, S., Mastaglio, S., Bondanza, A., Ponzoni, M., Sanvito, F., Radrizzani, M., Seta-catamancio, S. La, Provasi, E., Mondino, A., Fleischhauer, K., Russo, V., Traversari, C., Ciceri, F., Dc, W., Aldrighetti, L., Nagasawa, T., Bordignon, C., Bonini, C. & La Seta-Catamancio, S. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. *Blood* **113,** 1006–15 (2009).

27. Di Stasi, A., Tey, S.-K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A. G., Grilley, B., Liu, H., Cruz, C. R., Savoldo, B., Gee, A. P., Schindler, J., Krance, R. a, Heslop, H. E., Spencer, D. M., Rooney, C. M., *et al*. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N. Engl. J. Med*. **365,** 1673–83 (2011).

28. Watanabe, N., Takahashi, S., Ishige, M., Ishii, Y., Ooi, J., Tomonari, A., Tsukada, N., Konuma, T., Kato, S., Sato, A., Tojo, A. & Nakauchi, H. Recipient-Derived Cells after Cord Blood Transplantation : Dynamics Elucidated by Multicolor FACS , Reflecting Graft Failure and Relapse. *Biol. Blood Marrow Transplant*. **14,** 693–701 (2008).

29. 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. Methods* **343,** 56–60 (2009).

30. Lachmann, N., Terasaki, P. I., Budde, K., Liefeldt, L., Kahl, A., Reinke, P., Pratschke, J., Rudolph, B., Schmidt, D., Salama, A. & Schönemann, C. Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation* **87,** 1505–13 (2009).

31. Takanashi, M., Atsuta, Y., Fujiwara, K., Kodo, H., Kai, S., Sato, H., Kohsaki, M., Azuma, H., Tanaka, H., Ogawa, A., Nakajima, K. & Kato, S. The impact of

anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood* **116,** 2839–46 (2010).

32. Taniguchi, K., Taniguchi K, Yoshihara S, Maruya E, Ikegame K, Kaida K, Hayashi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Onuma T, Fujii N, Kusunoki Y, Soma T, Saji H, O. H., Maruya, E., Ikegame, K., Kaida, K., Hayashi, K., Kato, R., Inoue, T., Fujioka, T., Tamaki, H., Okada, M., Onuma, T., Fujii, N., Kusunoki, Y., Soma, T., Saji, H. & Ogawa, H. Donor-derived HLA antibody production in patients undergoing SCT from HLA antibody-positive donors. *Bone Marrow Transplant*. **47,** 1338–42 (2012).

33. Ema, H., Morita, Y., Yamazaki, S., Matsubara, A., Seita, J., Tadokoro, Y., Kondo, H., Takano, H. & Nakauchi, H. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat. Protoc*. **1,** 2979–87 (2006).

34. Ito, R., Katano, I., Kawai, K., Hirata, H., Ogura, T., Kamisako, T., Eto, T. & Ito, M. Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice. *Transplantation* **87,** 1654–8 (2009).

35. Nishimori, H., Maeda, Y., Teshima, T., Sugiyama, H., Kobayashi, K., Yamasuji, Y., Kadohisa, S., Uryu, H., Takeuchi, K., Tanaka, T., Yoshino, T., Iwakura, Y. & Tanimoto, M. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* **119,** 285–95 (2012).

36. Nervi, B., Rettig, M. P., Ritchey, J. K., Wang, H. L., Bauer, G., Walker, J., Bonyhadi, M. L., Berenson, R. J., Prior, J. L., Piwnica-Worms, D., Nolta, J. a & DiPersio, J. F. Factors affecting human T cell engraftment, trafficking, and associated xenogeneic graft-vs-host disease in NOD/SCID beta2mnull mice. *Exp. Hematol*. **35,** 1823–38 (2007).

37. Anderson, B. E., Mcniff, J., Yan, J., Doyle, H., Mamula, M., Shlomchik, M. J. & Shlomchik, W. D. Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest*. **112,** 101–108 (2003).

38. Hoffmann-Fezer, G., Gall, C., Zengerle, U., Kranz, B. & Thierfelder, S. Immunohistology and immunocytology of human T-cell chimerism and graft-versus-host disease in SCID mice. *Blood* **81,** 3440–8 (1993).

39. Harris, A. C., Ferrara, J. L. M. & Levine, J. E. Advances in predicting acute GVHD. *Br. J. Haematol.* **160,** 288–302 (2013).

40. Carter, P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* **1,** 118–129 (2001).

41. Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T. & Nakahata, T. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* **100,** 3175–82 (2002).

42. Chatenoud, L. & Bach, J.-F. Antigenic modulation - a major mechanism of antibody action. *Immunol. Today* **5,** 20–25 (1984).

43. Gerber, H.-P., Koehn, F. E. & Abraham, R. T. The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product-based cancer therapeutics. *Nat. Prod. Rep.* **30,** 625–39 (2013).

44. An, Z. Monoclonal antibodies - a proven and rapidly expanding therapeutic modality for human diseases. *Protein Cell* **1,** 319–30 (2010).

45. Warren, E. H. & Deeg, H. J. Dissecting graft-versus-leukemia from graft-versus-host-disease using novel strategies. *Tissue Antigens* **81,** 183–93 (2013).

46. Piacibello, W., Aglietta, M., Stacchini, A., Spinelli, P., Salvetti, L., Kerim, S., Malavasi, F., Infelise, V., Resegotti, L. & Gavosto, F. Expression of HLA class II determinants by normal and chronic myeloid leukemia progenitors. *Leuk. Res.* **11,** 285–90 (1987).

47. Ottmann, O. G., Nocka, K. H., Moore, M. A. & Pelus, L. M. Differential expression of class II MHC antigens in subpopulations of human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia* **2,** 677–86 (1988).

48. Sabir, H. J., Nehlin, J. O., Qanie, D., Harkness, L., Prokhorova, T. A., Blagoev, B., Kassem, M., Isa, A. & Barington, T. Separate Developmental Programs for HLA-A and -B Cell Surface Expression during Differentiation from Embryonic Stem Cells to Lymphocytes, Adipocytes and Osteoblasts. *PLoS One* **8,** e54366 (2013).

49. Yamazaki, S., Iwama, A., Takayanagi, S., Eto, K., Ema, H. & Nakauchi, H. TGF-β as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* **113,** 1250–1256 (2009).

50. Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M. M., Karlsson, S., Iwama, A. & Nakauchi, H. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* **147,** 1146–58 (2011).

X　特許出願

・ 特願 2012-171113

・ PCT/JP2013/052319

・ 発明の名称

「移植片対宿主病などの造血幹細胞移植に伴う疾患を治療することのできる抗体およびその機能断片並びにこれらを含んでなる医薬組成物」

XI　謝辞

本研究を進めるにあたり、終始親身なご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野 中内 啓光 博士、山崎 聡 博士、同研究センター 病態解析領域 渡辺 信和 博士に謹んで感謝の意を表します。

日常の議論を通じて多くの貴重なご意見や実験技術指導を賜りました葛西 正孝 博士、渡部 素生 博士、大津 真 博士、渡会 浩志 博士、金子 新 博士、山本 玲 博士、伊藤 慶一 博士、木村 隆治 氏、石垣 知寛 氏、石田 礼子 氏はじめ、中内研究室の皆様、また FACS 解析において多大なるご支援を頂いた山崎 祐治 氏、石井 有実子 氏、藤田 梓 氏、渡辺 恵理 氏に心から感謝申し上げます。特に、研究初心者の私に親身に実験技術・英語のご指導下さいました Stephanie Carlisle Napier 氏には厚く御礼申し上げます。

研究を円滑に進めるためにご尽力頂いた東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 津久井 弘子氏、岡田 京子 氏、宮内 倫代 氏、中村 由希子 氏、柏倉 由美恵 氏、為ヶ井 優早 氏に深く感謝いたします。

お忙しい中、専門的な知識・技術を惜しむことなく提供して下さり、ご指導頂きました大田 泰徳 博士、小野田 春男 氏（東京大学医科学研究所附属病院

病理部)、松岡 周二 博士（順天堂大学大学院分子病理病態学)、臼井 丈一 博士（筑波大学医学医療系臨床医学域腎臓内科学）に感謝申し上げます。

東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センターのクリニカルリサーチフェローとして、終始親身に病棟でご指導頂いた東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科 移植グループの高橋 聡 先生、大井 淳 先生、河北 敏郎 先生、加藤せい子 先生、そしていつも献身的な看護で患者さんをサポートして下さいました 7 階病棟の全ての看護師はじめ、関係者の皆様へ心から感謝いたします。

臨床医の視点から、多くの貴重なご意見を頂いた豊田 茂雄 先生はじめ、横須賀共済病院 血液内科の先生方に感謝申し上げます。

研究を行うにあたり、快く検体を提供していただいた健常人の皆様、そして患者様に心から感謝いたします。

本研究のために命を失った数多くのマウスたちに哀悼の意を捧げます。

最後に、どんな時でも私のことを心配し、応援してくれた両親、家族のために使うべき時間を削ってまで研究することを許し、支え続けてくれた妻、そして、とびきりの笑顔でいつも私を癒やしてくれた息子に感謝します。家族のサポートなしではこの研究はあり得ません。