

200/0487

厚生科学研究費補助金  
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 齋藤 英彦

平成14(2002)年 3月

## 平成 13 年度報告書

### はじめに

本報告書は、厚生科学研究費補助金「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」の一つである「臍帯血を用いた移植・再生医療の確立に関する研究」班における平成 13 年度の研究成果をまとめたものである。本研究班は、平成 12 年に始まったミレニアム・プロジェクト「発生・分化・再生」事業の一環として臍帯血の自己修復能力を用いた治療法の実現を目指すものである。

1977 年に始まった我が国の非血縁者間臍帯血移植は、2002 年 3 月末には 600 例をこえる急速な発展を見せており、この数は世界の臍帯血移植の 4 分の 1 にもあがる。我が国で行われたすべての移植症例の臨床成績を詳細に解析するとともに、**prospective** な無作為臨床試験を行い臨床上的疑問に答えることは国際的な情報発信の点からも重要であると考えます。また臍帯血幹細胞や免疫担当細胞に関する研究は国際的に競争の激しい分野であるが、我が国独自の研究を推進する必要がある。

本研究班の本年度の目標は以下の二つである。(1) 造血幹細胞移植における臍帯血移植の位置づけを明らかにするために、我が国で行われるすべての臍帯血移植の臨床成績を集計、解析し成績の向上に役立てる。また、前向き無作為臨床試験を行い EBM (根拠に基づく医療) を確立する。(2) 臍帯血の特性を生かしつつその弱点を克服するため、臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持/増幅、移植後の造血・免疫システムの早期再構築に関する研究を促進する。なお、初年度に本研究班の目的の一つであった臍帯血幹細胞の体外増幅に関する研究は独立した班、堀田班において本年度から行われている。

本報告書は各分担研究者の年度末研究業績をまとめたものであり、関係者のご参考になれば幸いです。

齋藤 英彦

「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究班」平成13年度名簿

	氏名	所属・職名
班長	齋藤英彦	国立名古屋病院 院長
班員	加藤俊一	東海大学医学部小児科 助教授
	高倉伸幸	金沢大学がん研究所 細胞制御研究部門細胞分化研究分野 教授
	高橋恒夫	東京大学医科学研究所 細胞プロセッシング部門 教授
	直江知樹	名古屋大学大学院医学研究科 生体管理医学講座臨床感染統御学 教授
	仲野 徹	大阪大学微生物病研究所 遺伝子動態研究分野 教授
	原 宏	兵庫医科大学 輸血部 教授
研究協力者	加藤剛二	名古屋第一赤十字病院 小児科 副部長
	小島勢二	名古屋大学医学部 小児科 教授
	佐藤典宏	北海道赤十字血液センター 副部長
	佐藤博行	福岡県赤十字血液センター 副所長
	高梨美乃子	東京都赤十字血液センター 研究二課長
	西平浩一	神奈川県厚木保健所 所長
	矢崎 信	名古屋市立守山市民病院 小児科 部長
事務局	齋藤英彦	国立名古屋病院 〒460-0001 名古屋市中区三の丸4-1-1 TEL:052-951-1111(2200) FAX:052-951-0559

# 目 次

I. 総括研究報告	1
齋藤 英彦	
II. 分担研究報告	
1. 非血縁者間臍帯血移植における前向き登録と検体収集に関するシステムの確立	3
齋藤 英彦	
2. 臍帯血の免疫学的特性	6
高橋 恒夫	
3. 非血縁者間臍帯血移植における前向き臨床研究	10
加藤 俊一	
4. 成人に対する臍帯血移植－単施設における治療成績	13
原 宏	
遺伝子導入によるヒト臍帯血CD34(+)細胞由来内皮細胞株の樹立に関する研究	17
原 宏	
遺伝子導入によるヒト間葉系幹細胞株の樹立とその造血支持能に関する研究	18
原 宏	
5. 臍帯血中の血液幹細胞から免疫細胞への分化・増殖と養子免疫法の開発	22
直江 知樹	
6. 臍帯血造血幹細胞の血管内皮細胞の共存下における相乗的増殖効果の検討	26
高倉 伸幸	
7. 臍帯血あるいは胚性幹細胞培養による造血幹細胞や血管内皮細胞への増殖・分化	28
仲野 徹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究班会議発表者報告書（資料）	34

# I. 総括研究報告

主任研究者 齋藤 英彦 国立名古屋病院長

#### 研究要旨

我が国における非血縁者間臍帯血移植 456 例を集計、解析し、移植成績を左右する要因を明らかにすると共に、「至適 GVHD 予防法」の前向き臨床研究を開始した。基礎的研究として臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持/増幅、移植後の免疫システムの早期構築に関する研究を進めた。

#### 分担研究者

高橋恒夫（東京大学医科学研究所細胞<sup>7</sup>ディビジョン 教授）、加藤俊一（東海大学医学部小児科 助教授）、原 宏（兵庫医科大学輸血部 教授）、直江知樹（名古屋大学大学院医学研究科臨床感染統御学 教授）、高倉伸幸（金沢大学がん研究所細胞分化研究分野 教授）、仲野 徹（大阪大学微生物病研究所遺伝子動態研究分野 教授）

#### 研究協力者

加藤剛二（名古屋第一赤十字病院 副部長）、西平浩一（神奈川県厚木保健所 所長）、佐藤博行（福岡県赤十字血液センター 副所長）、佐藤典宏（北海道赤十字血液センター 副部長）、中島一格（東京都赤十字血液センター 副所長）、矢崎 信（名古屋市長守山市民病院 部長）、小島勢二（名古屋大学医学部 教授）

#### A. 研究目的

- (1) 造血細胞移植における臍帯血移植の EBM（根拠に基づく医療）を確立する。
- (2) 臍帯血の特性を生かしつつその弱点を克服するため、臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持/増幅、移植後の造血・免疫システムの早期再構築に関する研究を促進する。
- (3) 臍帯血や胎盤由来の間葉系細胞の基礎的研究を進め、臍帯血の有効利用により再生医療の適応を拡大する。

#### B. 研究方法

- (1) わが国で行われたすべての臍帯血移植の臨床成績を 6 ヶ月に一回の月例報告と年一回の詳細報告により追跡調査し詳細に解析すると共に、検体収集のシステムを確立し前向き登録による臨床研究を推進する。臍帯血移植における至適 GVHD 予防法の臨床研究を行う。
- (2) 造血幹細胞と血管内皮細胞の相互作用に焦点を絞り、両者の接着と造血幹細胞の未分化性の維持に必要な分子機構を解明する。また臍帯血造血前駆細胞から巨核球系への分化動態を末梢血造血前駆細胞と比較する。臍帯血 CD 陽性細胞をマウスに移植して免疫システムの再構築を評価するモデルを確立する。
- (3) 間葉系細胞を遺伝子導入により不死化した後に造血支持能を維持しうるか検討する。

（倫理面への配慮）

GVHD 予防に関する前向き無作為臨床試験にあたっては、各施設の倫理委員会の承認と患者および患者家族から十分なインフォームドコンセントを得て行う。臍帯血を研究目的で使う場合には、ドナーに研究目的、期間、プライバシーの保護などにつき説明し同意を得た上で実施する。

#### C. 研究結果

昨年に引き続き非血縁者間臍帯血移植の全国調査を行い 456 例の解析を行った。その結果、1) 移植細胞数が  $4 \times 10^7 / \text{kg}$  以上ではそれ未満と比較して 3 年後の無病生存率が高い ( $41.3 \pm 4.0\%$  vs  $28.8 \pm 3.5\%$ )、2) 年齢別では 16 歳未満の群がそれ以上に比較して 3 年後の無病生存率が高い ( $36.4 \pm 3.1\%$  vs  $30.8 \pm 4.6\%$ )、3) 急性骨髄性白血病においても急性リンパ性白血病においても患者リスク (standard risk または high risk) は予後に大きく影響する、ことを明らかにした。ALL の standard risk 群 (65 例) の 2 年後の無病生存率は 64%、high risk 群では 12% (97 例) であった。また 270 例の詳細な解析により、GVHD 予防法として 2 剤以上使用した群は 1 剤群と比較して無病生存率がよいことを多変量解析により明らかにした。この結果に基づいて、至適 GVHD 予防法を確立するための無作為割付臨床試験 (サイクロスポリン+メソトレキセート群 100 例とタクロリムス+メソトレキセート群 100 例の比較) を開始した。

造血幹細胞の自己複製に重要な未分化性の維持は、血管内皮細胞との相互作用により支持されること、造血幹細胞上の TIE2 の活性化により幹細胞の未分化性を個体内で誘導できることを示した。ヒト臍帯血前駆細胞からの巨核球への分化は末梢血前駆細胞からに比べて遅延した。また巨核球の DNA 量を経時的にみると臍帯血からは末梢血に比較して多倍体化が少なかった。これらの結果は臍帯血移植後の血小板回復の遅延の一端を明らかにしたものである。

臍帯血移植後の免疫能の回復を骨髄移植や CD34 陽性幹細胞移植と比較するとリンパ球総数の回復は良好であるが、CD4、CD8、CD19 いずれの細胞群でも幼若な細胞を中心とした回復であった。そのためリンパ球の機能が低下していると考えられた。NOD/shi-scid マウスに臍帯血 CD34 陽性細胞を移植する in vivo の系を開発し B 細胞再構築過程の解析を可能にした。また IL2 受容体の common  $\gamma$  鎖をノックアウトした NOD/scid- $\gamma^{-/-}$  マウスを用いて

免疫系の再構築を解析するモデルを確立した。さらに臍帯血単核球よりNK細胞をIL15とFlt3Lを用いて5・10倍に増幅する方法を確立した。このNK細胞は末梢血中のものと同等の細胞障害活性を有するので移植後の抗腫瘍効果のために臨床応用可能である。臍帯血の再生医療への適応を拡大する研究としては、ヒト間葉系幹細胞をレトロウイルスベクターSSR#69により可逆的に造血支持能をもちつつ不死化することが出来ることを示した。

#### D. 考察

多数の症例の集積、解析の結果は小児のALLのstandard risk患者に対しては臍帯血移植をFirst Choseとしてもよいことを明らかにしたものである。また、GVHF予防法が予後に影響するという結果は国際的にも新しいものである。前向き臨床試験の結果が待たれる。

#### E. 結論

我が国における非血縁者間臍帯血移植の成績を集計、解析し「移植細胞数」、「患者リスク」と共に「GVHD予防法」が無病生存率に重要なこと、小児ALLに対しては臍帯血移植がFirst Choseになりうることを明らかにした。臍帯血中の造血幹細胞や免疫担当細胞の生物学的特性がさらに明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

代表的論文

- 1)Sato K, Takahashi TA, et al.: Chemokine receptor expressions and responsiveness of cord blood T cells. *J Immunol* 166: 1659-1666, 2001.
- 2)Tokushima Y, Takahashi TA, et al.: Repopulating activities of human cord blood cells separated by a stem cell collection filter in NOD/SCID mice: a comparative study of filter method and HES method. *Transfusion* 41: 1014-1019, 2001.
- 3)Rocha V, Kato S, et al.: Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 97: 2962-2971, 2001.
- 4)Hirose Y, Saito H, Naoe T, et al.: B-cell precursors differentiated from cord blood CD34<sup>+</sup> cells are more immature than those derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells. *Immunology* 104: 410-417, 2001.
- 5)Yamamoto Y, Saito H, Naoe T, et al.: Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97:Sep-34, 2001.
- 6)Zhang XQ, Takakura N, et al.: Stromal cells

expressing ephrin-B2 promote the growth and sprouting of ephrin-B2(+) endothelial cells. *Blood* 98: 1028-1037, 2001.

- 7)Yamada Y, Takakura N, et al.: Exogenous clustered neuropilin 1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. *Blood* 97: 1671-1678, 2001.
- 8)Suda T, Takakura N: Role of hematopoietic stem cells in angiogenesis. *Int J Hematol* 74: 266-271, 2001.
- 9)Iwai N, Nakano T, et al.: Alteration of cell adhesion and cell cycle properties of ES cells by an inducible dominant interfering Myb mutant. *Oncogene* 20: 1425-1434, 2001.
- 10)Suzuki A, Nakano T: Development of Hematopoietic Cells From Embryonic Stem Cells. *Int J Hematol* 73: 51-55, 2001.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当するものなし
2. 実用新案登録  
該当するものなし
3. その他  
該当するものなし

## II. 分担研究報告



厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

研究課題：非血縁者間臍帯血移植における前向き登録と検体収集に関するシステムの確立  
 分担研究者：齋藤英彦 国立名古屋病院  
 研究協力者：西平浩一 神奈川県厚木保健所、磯山恵一 昭和大学藤が丘病院小児科  
 直江知樹 名古屋大学大学院医学研究科臨床感染統御学、  
 加藤俊一 東海大学医学部小児科、加藤剛二 名古屋第一赤十字病院小児科

研究要旨

我が国で行われた非血縁者間臍帯血移植 456 例および 270 例を追跡調査、解析し、「移植細胞数」「患者リスク」「GVHD 予防法」が予後に影響することを示した。また至適 GVHD 予防法の前向き臨床試験を開始した。

A. 研究目的

1997 年に始まった我が国の非血縁者間臍帯血移植は、飛躍的に増加し 2002 年 3 月末には 600 例を越えた。この数は世界で行われた臍帯血移植の 4 分の 1 にもあたる。しかし、移植に必要な細胞数、HLA 不一致度の許容範囲、臍帯血移植の適応、疾患・病期別の成績などについては不明な点が多く、EBM(根拠に基づく医療)が確立していない。本研究は、臍帯血移植の臨床成績を集計、解析して成績の向上に役立てるとともに前向き登録による臨床研究を推進することを目的とする。

B. 研究方法

我が国で行われたすべての非血縁者間臍帯血移植の臨床成績を、日本さい帯血バンクネットワークを介して 6 ヶ月に一回の月例報告と年一回の詳細報告により追跡調査した。2001 年 9 月 30 日までに施行された非血縁者間臍帯血移植例 456 例については、移植細胞数、年齢、リスクと予後の関連を解析した。無病生存率は Kaplan-Meier method (log-rank test) で解析した。一方、2001 年 3 月 31 日までに移植が行われた症例のうち詳細報告の得られた 270 例（悪性腫瘍性疾患 219 例、非血液腫瘍性疾患 51 例）に関しては、移植前処置、GVHD 予防法、好中球および血小板生着、GVHD 発生率、移植関連死亡率 (TRM) などの予後に及ぼす影響を多変量解析 (Cox proportional hazards model) により解析した。また検体収集のシステムを確立し前向き登録による臨床研究を行う。本年度は至適 GVHD 予防法の研究を始めた。

(倫理面への配慮)

GVHD 予防に関する前向き無作為臨床試験にあたっては、各施設の倫理委員会の承認と患者および患者家族から十分なインフォームドコンセントを得て行う。臍帯血を研究目的で使う場合には、ドナーに研究目的、期間、プライバシーの保護などにつき説明し同意を得た上で実施する

C. 研究結果及び D. 考察

(1) 456 例の解析結果

昨年に引き続き非血縁者間臍帯血移植の全国調

査を行い 456 例の解析を行った。その結果、1) 移植細胞数が  $4 \times 10^7 / \text{kg}$  以上ではそれ未満に比較して 3 年後の無病生存率が高い ( $41.3 \pm 4.0\%$  vs  $28.8 \pm 3.5\%$ ) (図 1)、この結果は欧米からの報告と同様に細胞数が移植後の生着、予後に重要であることを示すものであり、さい帯血バンクにおける最低保存細胞数を引き上げていくことが必要であろう。2) 年齢別では 16 歳未満の群がそれ以上に比較して 3 年後の無病生存率が高い ( $36.4 \pm 3.1\%$  vs  $30.8 \pm 4.6\%$ ) (図 2)、3) 急性骨髄性白血病 (AML) においても急性リンパ性白血病 (ALL) においても患者リスク (standard risk または high risk) は予後に大きく影響することを明らかにした (図 3,4)。小児 ALL の standard risk 群 (65 例) の 2 年後の無病生存率は 64%、high risk 群では 12% (97 例) であった (図 4)。この結果は小児 ALL の standard risk 患者に対しては臍帯血移植を First Chose としてもよいことを明らかにしたものである。長期のコーディネーションを必要としないさい帯血移植の長所をいかして早期に移植を実現すべきである。

非血縁者間臍帯血移植の  
移植細胞別無病生存率 JCBN 01.10.1.

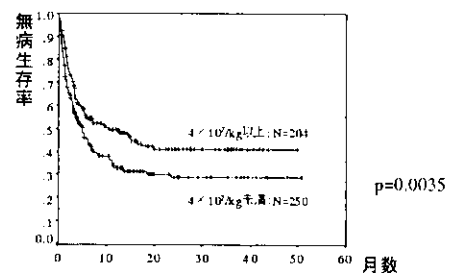


図 1

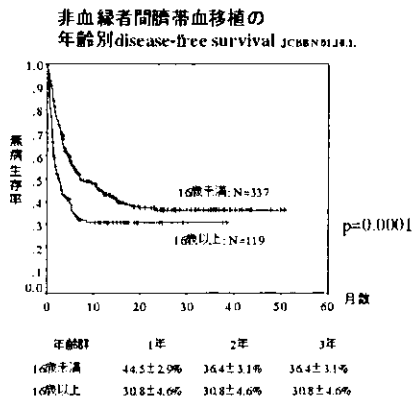


図 2

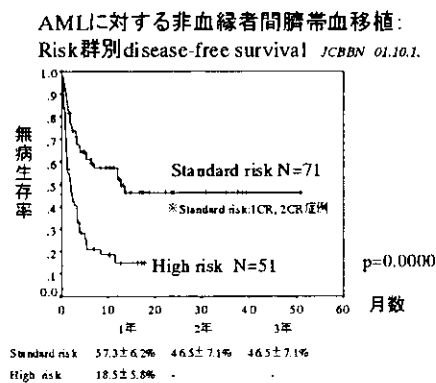


図 3

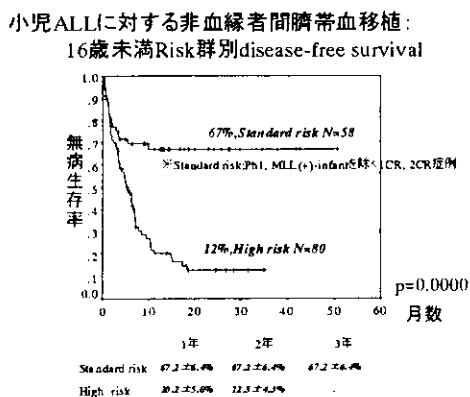


図 4

(2) 270 例の解析結果  
 早期死亡(移植後 28 日未満で死亡)例を除く 245 例の好中球 500/ $\mu$ l 以上への回復は 23.5 日(中央値)、11-209 日(レンジ)であった。移植後 40 日での好中球回復率は 89.4%で、移植細胞数  $3.7 \times 10^7$ /kg 以上では有意に回復が早かった。移植後 60 日での血小板 5 万/ $\mu$ l 以上への回復は 62.9%であった。急性 GVHD の発生は 35.5%にあり、single drug 群では有意に発生率が高かったが、HLA 適合度による発生率に差は認めなかった。100 日以上生存した 115 例中 20 例に慢性 GVHD が見られた。一般に臍帯血移植では骨髓移植に比べて GVHD が軽症であると考えられているが、

HLA 不一致ドナーからの非血縁者間臍帯血移植では HLA 一致ドナーからの非血縁者間骨髓移植とほぼ同程度の GVHD がみとめられた。移植関連死亡率 (TRM) の発生は 55.9%にあり、high risk 群、single drug 群で有意に高い発生率を示した(図 5,6)。多変量解析の結果、患者リスク (high risk 群) と GVHD 予防法 (single drug 群) が悪性腫瘍性疾患の移植後の無病生存率を低下させる独立した予後因子であった(図 7)。GVHD 予防法が予後因子であることは本研究により明らかになった新しい事実である。

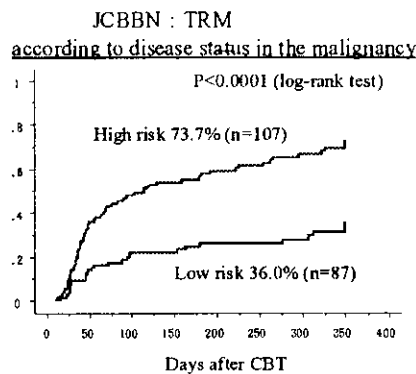


図 5

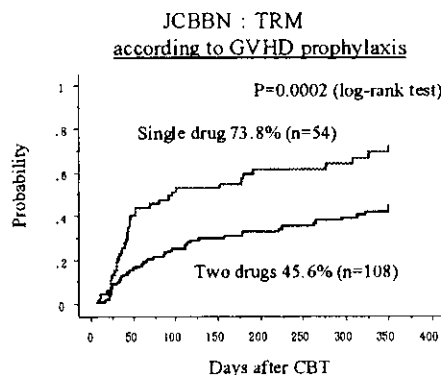


図 6

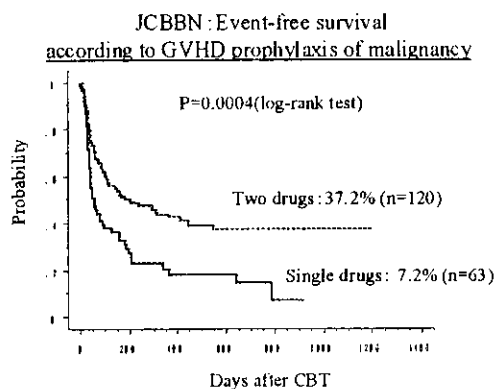


図 7

### (3) GVHD 予防法の前向き臨床試験

臍帯血移植では移植後の GVHD が骨髄移植よりも軽症であることが特徴とされている。しかしながら、どのような GVHD 予防法がよいかについては科学的な比較検討はまだ行われていない。また、予防薬の種類や組み合わせによる生着速度や感染症合併に関する比較検討も行われていない。我々は我が国における臍帯血移植 270 例の解析により GVHD 予防法が重要な予後因子であることを明らかにした。これをうけて、サイクロスポリンとタクロリムスをメソトレキセートと組み合わせて両者を比較する多施設無作為割付臨床試験を開始した。A 群：サイクロスポリン+メソトレキセート群 100 例、B 群：タクロリムス+メソトレキセート群 100 例として、急性および慢性 GVHD の頻度・程度を一次エンドポイント、生存期間を二次エンドポイントとして解析する。小児が対象となるため登録症例数は未だ少ない。

### E. 結論

我が国における非血縁者間臍帯血移植の成績を集計、解析し「移植細胞数」、「患者リスク」と共に「GVHD 予防法」が無病生存率に重要なこと、小児 ALL に対しては臍帯血移植が First Choice になりうることを明らかにした。また至適 GVHD 予防法を検討する多施設無作為臨床試験を開始した。EBM を確立するために充分計画された臨床試験を積極的に行っていくことが重要である。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

Ohnuma K, Nishihira H, et al.: Cord blood transplantation from HLA-mismatched unrelated donors as a treatment for children with haematological malignancies. Br J Haematol 112(4):981-987, 2001.

Ohnuma K, Nishihira H, et al.: The influence of HLA genotyping compatibility on clinical outcome after cord blood transplantation from unrelated donors. J Hematother Stem Cell Res 9(4): 541-550, 2000.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働省 厚生科学研究費補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
齋藤班「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」

研究課題：臍帯血の免疫学的特性

主任研究者：高橋 恒夫；東京大学医科学研究所，細胞プロセッシング研究部門，教授  
分担研究者：長村（井上）登紀子，渡辺 信和

タイトル：Flt3L と IL15 による臍帯血単核球由来 NK 細胞の増幅活性化

研究要旨 T細胞の未熟な臍帯血を用いた臍帯血移植では移植後の抗腫瘍効果 Graft versus leukemia/tumor (GVL/T)としてHLA非拘束性、腫瘍非特異的細胞傷害活性を有すNK細胞は重要な効果細胞と考えられる。本研究ではIL15とFlt3Lを用いて臍帯血単核球由来NK細胞の増幅活性化を検討した。IL15+Flt3L存在下2週間でNK細胞(CD3-CD56+)は5から10倍の増幅(培養後細胞中75.5±18.3%)を示した。培養細胞はCD56強陽性、CD16, LFA1, VLA4 陽性, perforin 陽性。RT-PCRにてFasL, Granzyme Bの誘導を認めた。またK562およびJurkatに対する細胞傷害活性も認められた。以上、臍帯血単核球よりNK細胞はIL15とFlt3Lにて増幅可能かつ機能的でGVL/T細胞として臨床的貢献が期待される。

#### A. 研究目的

非血縁者間臍帯血移植では非血縁者間骨髓移植に比して有意に移植片対宿主病(GVHD)の発症頻度が低く、その機構として我々は以前臍帯血T細胞の未熟さを報告した。また臍帯血移植においては重症GVHDによる死亡例は殆ど認められていない。しかし、白血病の再発に関しては同種骨髓移植同様に、移植時の再発症例においては極めて予後が悪い。さらに、臍帯血移植の場合にはドナーからの細胞数に限りがあり、近年行われているような移植後のドナー末梢血輸注(DLI)等の免疫学的後療法が行い難い。当概研究は現在移植数が飛躍的に伸びている臍帯血移植の成績向上のため、特に移植後の再発防止すなわちGraft versus leukemia/tumor (GVL/T)効果を目指すことを目的とする。NK細胞はHLA非拘束性非特異的抗腫瘍活性を有し、これらの増幅方法のひとつにこれまでIL15とFlt3Lを用いて骨髓CD34+細胞からのNK細胞の分化誘導

法(Yu et al, Blood, 92,3647, 1998)がある。この2つのサイトカイン欠損マウスにおいては明らかにNK細胞の減少/欠損が認められているが、これまで多く臨床に使われてきたIL2の欠損マウスでは正常なNK細胞が認められたことから本質的なものではないと思われる。

われわれは、臍帯血という限られた細胞数のなかで、如何に無駄なくNK細胞を増幅できるかという点を考慮し、単核球(mononuclear cell)からのNK細胞の増幅活性化し臨床的応用を目指すことを目的とした。

#### B. 研究方法

臍帯血由来単核球(MNCs)またはAUTOMACS(NK cell Isolation kit, Miltenyi Biotec, ISA)にてnonNK細胞を除いた純化NK細胞をIL15+Flt3L種々濃度で2または3週間培養した。培養後生細胞数を測定しFACSにてNK細胞分画(CD3-CD56+)の絶対数を算出するとともに表面マーカーの解析を

4 color 解析にて行った。K562, Jurkat に対する細胞傷害活性ならびに機能的分子である Perforin, Granzyme B, Fas ligand の発現 (RT-PCR) は培養前後の NK 細胞を AUTOMACS にて純化した細胞を用いた。

(倫理面への配慮) 臍帯血の採取保存に関しては東京大学医科学研究所倫理委員会の承認を得、東京臍帯血バンク規定に準じ個人情報等機密保持を徹底した。

### C. 研究結果

純化した NK 細胞では IL15+Flt3L においても増殖は認められず MNCs より培養を行うと細胞は Dish に付着傾向を示しながら増殖した。2 週間の増幅率は初期 NK 細胞数の 5 から 10 倍で培養後生細胞の平均 75.5% ±18.3%(range 48.3-99%)が NK 分画の細胞であった。これらは培養開始 MNCs 数からその 2 倍の細胞数にほぼ相当する。また表面マーカーは CD56 強陽性, LFA1, VLA4 陽性, perforin 陽性であった。RT-PCR にて FasL, Granzyme B, Perforin の培養後誘導も確認された。K562 および Jurkat に対する細胞傷害活性も培養後に非常に強く認められこれらは ConcanamycinA(perforin 阻害剤)にて抑制された。この細胞傷害活性は末梢血では培養前から認められるも臍帯血培養前では殆ど認められず, IL15+Flt3L による培養後は末梢血同等に認められた。

### D. 考察

われわれは臍帯血単核球から IL15 と Flt3L によって NK 細胞を増幅しその特性を検討した。臍帯血の NK 細胞は種々の機能的分子の発現は RT-PCR レベルで認められるが細胞障害活性は成人末梢血 NK 細胞と比較して明らかに低い。こうした特徴は以前から報告があるが IL15 と Flt3L によって増

幅, および活性化を評価した報告はまだない。今回われわれの検討で 臍帯血単核球から増幅された NK 細胞は末梢血同等の細胞傷害活性を有し, 臨床的応用が可能であろうと考えられる。現在, NOD/SCID マウスに腫瘍と共に純化 (sorting) した NK 細胞を輸注し in vivo での抗腫瘍活性の評価を行っている。また この増幅方法は臍帯血以外でも十分応用可能であると考えており今後検討していく予定である。

### E. 結論

臍帯血 MNC 由来 NK 細胞の IL15 と Flt3L にて増幅可能でありかつ機能的で GVL/T として臨床的に貢献できる可能性があると思われた。

### F. 健康危険情報

臍帯血に関しては 特に本研究において本項目に該当するものはない。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Nagayama H, Misawa K, Tanaka H, Ooi J, Iseki T, Tojo A, Tani K, Yamada Y, Kodo H, Takahashi TA, Yamashita N, Shimazaki S and Asano S. Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. Bone Marrow Transplantation 2002,29,197-204
2. Teramachi T, Kashiwakura I, Takahashi TA, Takagi Y. Effects of glycosaminoglycans on the in vitro colony formation of CD34+ megakaryocytic progenitor cells in human placental/umbilical cord blood. Yakugaku Zasshi. 2001 Sep;121(9):691-9.
3. Tokushima Y, Sasayama N, Takahashi TA. Repopulating activities of human cord blood

cells separated by a stem cell collection filter in NOD/SCID mice: a comparative study of filter method and HES method. *Transfusion*. 2001 Aug;41(8):1014-9.

4. Yasutake M, Sumita M, Terashima S, Tokushima Y, Nitadori Y, Takahashi TA. Stem cell collection filter system for human placental/umbilical cord blood processing. *Vox Sang*. 2001;80(2):101-5.

5. Inanami O, Yamamori T, Takahashi TA, Nagahata H, Kuwabara M. ESR detection of intraphagosomal superoxide in polymorphonuclear leukocytes using 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide. *Free Radic Res*. 2001 Jan;34(1):81-92.

6. Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, Enomoto M, Morimoto C, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. Signaling events following chemokine receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages. *Int Immunol*. 2001 Feb;13 (2):167-79.

## 2. 学会発表

1. Tokiko Nagamura-Inoue, Mika Shioya, Michiko Sugo, Yan Cui, Hiromi Kikuchi, Atsuko Takahashi, <sup>1</sup>Hideki Kodo, <sup>2</sup>Shigetaka Asano, Tsuneo A. Takahashi. Effect on the Rate of Engraftment of the Removal of

Cryoprotectant from Thawed Cord Blood Units. 98, 833-I, 199a, *Blood*, Dec.2001

2. Nagamura-Inoue T, Tsujimura H.<sup>1</sup>, Tamura T.<sup>1</sup>, Takahashi A. T., Ozato K.<sup>1</sup> ICSBP-dependent induction of macrophage differentiation and inhibition of granulocytes differentiation augmented by interferon-gamma, 98, 313-II, 287a..*Blood*, Dec.2001

3. 長村 (井上) 登紀子, 森有加, 渡辺信和, 高橋恒夫: Flt3L と IL15 による臍帯血由来 NK 細胞の増幅活性化, (P2-9)p177, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

4. 長村 (井上) 登紀子, 塩谷美夏, 須郷美智子, 催 硯, 菊地裕美, 高橋敦子, 幸道秀樹, 浅野茂隆, 高橋恒夫: 解凍臍帯血の凍害保護液除去洗浄による生着率, 生着速度への影響, P-18-1(177)p217, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

5. 赤川栄二, 榎本誠, 高橋恒夫: 臍帯血単球由来樹状細胞の機能解析 P1-10, p40 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

6. Zheng Yizhou, 渡辺信和, 長村 (井上) 登紀子, 長山人三, 東條有伸, 高上洋一, 岡本真一郎, 高橋恒夫: 臍帯血 CD34<sup>bright</sup> 細胞における接着因子とケモカインレセプターの発現 P1-3, p39, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

7. 高田圭, 長村 (井上) 登紀子, 須郷美智子, 塩谷美夏, 菊地裕美, 高橋敦子, 催 硯, 田口淳史, 佐藤友宏, 高橋恒夫: 臍帯血バンクにおける ISO9002 品質保証システムの導入 P18-3, p217, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

8. 岩元潮, 田口淳史, 高田圭, 緑川三恵, 高橋恒夫: 臍帯血プロセッシングにおける温度変化の造血細胞へ及ぼす影響 P18-4(181), p217, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

9. 緑川三恵, 高橋恒夫, BEST Working Party: BEST Working Party における臍帯血有核細胞分離法の評価 P18-5(181), p218, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

10. 菊地裕美, 須郷美智子, 塩谷美夏, 催 硯, 高橋敦子, 森有加, 長村 (井上) 登紀

子, 高橋恒夫 : 東京臍帯血バンクにおける細胞分離保存成績 P18-6(182), p218, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

11. 井関徹, 大井淳, 友成章, 高橋勉, 石井幸司, 関根理恵子, 内丸薫, 長村文孝, 石川久美子, 海老原康博, 鶴田敏久, 真部淳, 長村登紀子, 東條有伸, 辻浩一郎, 前川平, 谷憲三朗, 高橋恒夫, 浅野茂隆 : 成人骨髓系造血器腫瘍に対する臍帯血移植—単一施設, 単何時—移植方法による成績 W1-5, p140, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

12. 岩元潮, 大石真人, 後藤三郎, 高橋恒夫 : 国際臍帯血バンクネットワーク組織参加のための情報システム構築 W1-6, p140, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

13. 渡辺信和, 伊倉宏一, 三鶴亜矢子, 岩元潮, 高田圭, 高橋恒夫 : 胎盤構成細胞の解析と再生医療への応用 04-17, p168, 第 24 回日本造血細胞移植学会総会

#### H. 知的財産権の出願/登録状況

特に本項目に該当する出願, 登録および予定は無い。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

非血縁者間臍帯血移植における前向き臨床研究

分担研究者 加藤俊一 東海大学医学部小児科学助教授  
研究協力者 井上裕靖 東海大学医学部小児科  
研究協力者 迫 正広 大阪市立総合医療センター小児科

研究要旨 臍帯血移植（CBT）後の免疫能の回復を詳細に解析し、骨髄移植（BMT）またはCD34陽性幹細胞移植（CD34SCT）を行った症例と比較検討した。CBTでは他の移植群よりリンパ球数が多く、CD4の比率は変わらないが実数が増加し、CD8の比率は減少しているが実数は変わらず、CD4/CD8比は増加していた。CD19は比率、実数ともに増加していた。IL-2に対するリンパ球幼若化反応はCD34SCTとともに低下していた。

以上の結果は臍帯血移植後の免疫能の回復が骨髄移植よりも遅れ、そのためウイルス感染症などが多発する背景となっていることを示唆するものである。

A. 研究目的

臍帯血移植（CBT）においては移植後にウイルス、真菌、細菌などの種々の感染症が好発し、早期死亡の原因となっている。これは臍帯血移植後の免疫の回復が遅れるためと考えられているが、これまで詳細な研究報告がなかった。

本研究では、臍帯血移植後の免疫能の回復を詳細に検討し、骨髄移植（BMT）やCD34陽性幹細胞選択的移植（CD34SCT）などと比較して、それぞれの移植の特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

東海大学病院あるいは大阪市立総合医療センターにおいて1986年から2001年までの期間に移植が行われ、移植後ドナー造血細胞が生着した小児症例を対象とした。各移植群の症例数はCBT群20例、BMT群58例、CD34SCT群10例であった。群間に年齢、性別、疾患についての差はなく、CBT群ではBMT群よりも非血縁者ドナーの比率とHLAミスマッチドナーの比率が高く、CD34SCT群ではBMT群よりもHLAミスマッチドナーの比率が高かった。

3群間でリンパ球総数、CD4、CD8、CD19、CD56、CD4+/CD45RA+、CD8+/CD11b+、CD8+/CD11b-につき比率と実数を比較した。また、IL-2に対するリンパ球幼若化反応についても比較した。

なお、集計と解析にあたっては患者の人權とプライバシーを侵害しないように配慮した。

C. 研究結果

1) リンパ球総数

CBTにおいては移植後1カ月ではBMTよりもやや低値であるが、2カ月以降はBMT、CD34SCTよりも高値で推移した。（図1）

2) CD4

CD4の比率においては3群に有意の差はなかったが、リンパ球総数の差によりCBTで有意に高値で推移した。（図2）

CD4+/CD45RA+の比率はCBTが他の移植よりも高値であり、実数においても有意に高値であった。（図3）

3) CD8

CD8の比率はCBTで最も低値であったが、実数ではBMTとの間に差を認めなかった。（図4）

CD8+/CD11b-の比率はCBTで最も低値であった。（図5）CD8+/CD11b+の比率は3群間で差を認めなかった。

4) CD19

CD19は比率と実数ともにCBTで最も高く推移した。（図6）なかでもCD19+/CD5+の幼若B細胞がCBTで高値であった。

5) CD56

CD56の比率はCBTとCD34SC



Tで移植後1カ月で一過性に高値となったが3カ月以降はBMTよりも低値で推移したが、実数では3群に差を認めなかった。

6) IL-2によるリンパ球幼若化反応  
CBTとCD34 SCTではBMTよりも低反応で推移した。

#### D. 考察

##### 1) 達成度

平成13年度の調査研究としての目標を達成することができた。

##### 2) 研究成果の学術的・社会的意義

今回の研究は臍帯血移植の特徴を明らかにし、他の細胞源による造血幹細胞移植と使い分けを行うための指標とすることに役立つ研究である。

これまで臨床的には臍帯血移植後にウイルス感染症などが多く、長期生存を妨げていることが多くの研究者によって報告されているが、その背景となる免疫能についての詳細な研究はほとんどなかった。その意味で本研究は国際的にみても意義が大きいと考える。

##### 3) 今後の展望

今回の研究により明らかにされた成果をもとにして、今後は臍帯血移植後の免疫能をいかにして高めていくかを検討していく必要がある。具体的にはリンパ球の体外増幅や樹状細胞を用いた免疫療法の開発を計画している。

#### E. 結論

臍帯血移植後の免疫能の回復を骨髄移植やCD34陽性幹細胞移植と比較したところ、臍帯血移植ではリンパ球総数の回復は良好であるにもかかわらず、CD4、CD8、CD19いずれの細胞群でも幼若な細胞を中心とした回復であった。そのため、リンパ球の機能としては骨髄移植よりも低下していることが、臍帯血移植やCD34陽性幹細胞移植後に種々の感染症が多発する背景となっていることが明らかにされた。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 著書

加藤俊一：先天性免疫不全症に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植。「Annual Review血液2002」高久史磨他編、中外医学社137-142、2002。

##### 2. 論文発表

Ying Y, Kato S, et al.: Enhancement of human

cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J Immunology*, 166:1590-1600, 2001.

Rocha V, Kato S, et al: Comparison of outcomes of unrelated bone marrow transplantation and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001;97:2962-2971.

Hagihara M, Kato S, et al.: The efficient generation of immunocompetent dendritic cells from CD14 positive acute myelomonocytic or monocytic leukemia cells in vitro. *Leukemia Research* 2001;25:249-258.

Hagihara M, Kato S, et al.: Successful in vitro generation of Epstein-Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes from severe chronic active EBV patients. *Medical Microbiological Immunology* 2001;189:137-145.

Matsumoto S, Kato S, et al.: Injection of CD4+ and CD8+ cells with donor or host accessory cells induces acute graft-versus-host disease in human skin in immunodeficient mice. *Experimental Hematology* 2001;29:720-727.

Hagihara M, Kato S, et al.: Extensive and long-term ex vivo production of dendritic cells from CD34 positive umbilical cord blood or bone marrow cells by novel culture system using mouse stroma. *J Immunol Methods* 2001;253:45-55.

Kato S, et al.: Absence of CD34- hematopoietic precursor population in recipients of CD34+ stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:587-595.

Oki M, Kato S, et al.: Efficient lentiviral transduction of human cord blood CD34+ cells followed by their expansion and differentiation into dendritic cells. *Experiment Hematol* 2001;29:1210-1217.

加藤俊一：造血器腫瘍に対する臍帯血移植。 *medicina*, 2001;38:251-253.

加藤俊一：骨髄バンクと臍帯血バンク。 *内科* 2001;88:418-422.

##### 3. 学会発表

加藤俊一：小児白血病における非血縁者間骨髄移植と非血縁者間臍帯血移植の比較。日本臨床血液学会シンポジウム、2001年10月。

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし。

図1. リンパ球総数

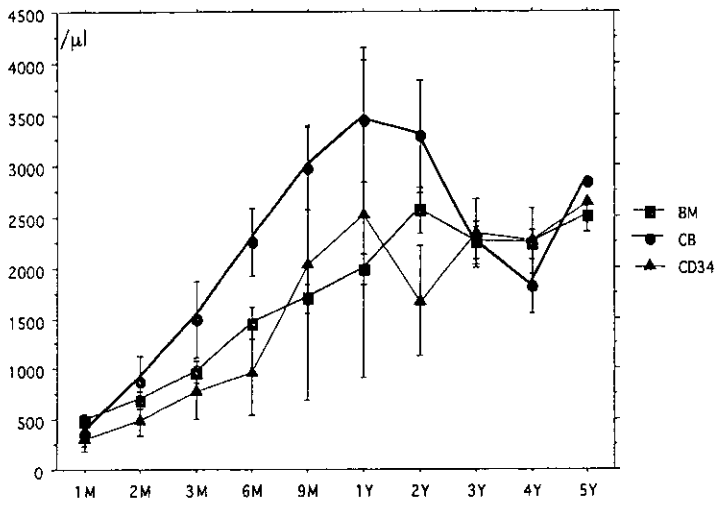


図4. CD8の実数

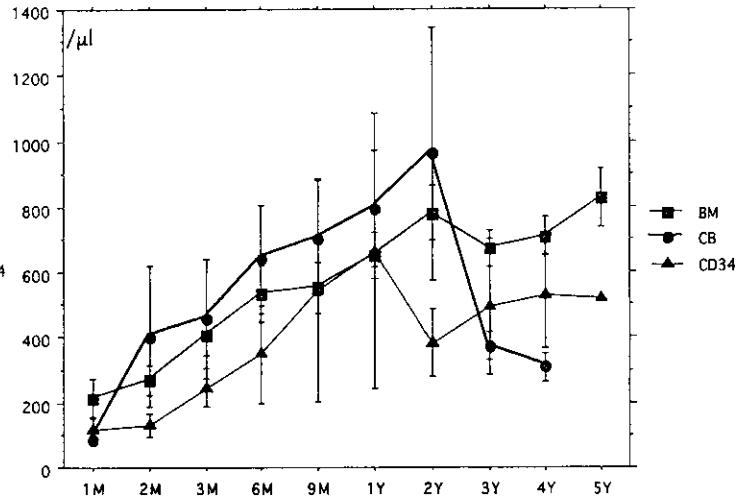


図2. CD4の実数

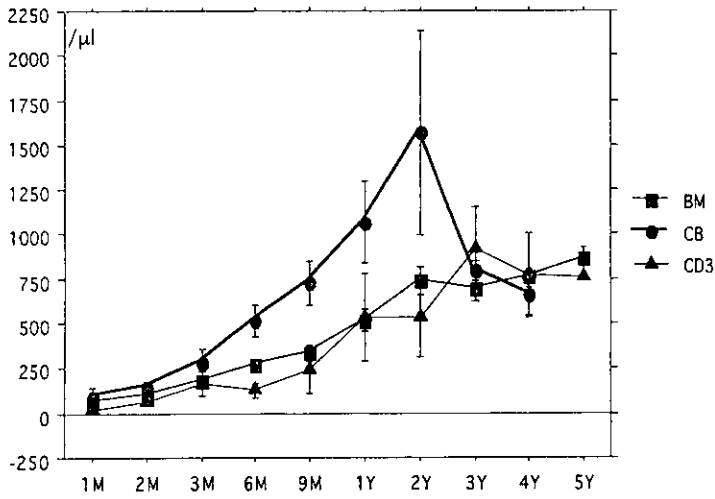


図5. CD8+/11b-の比率

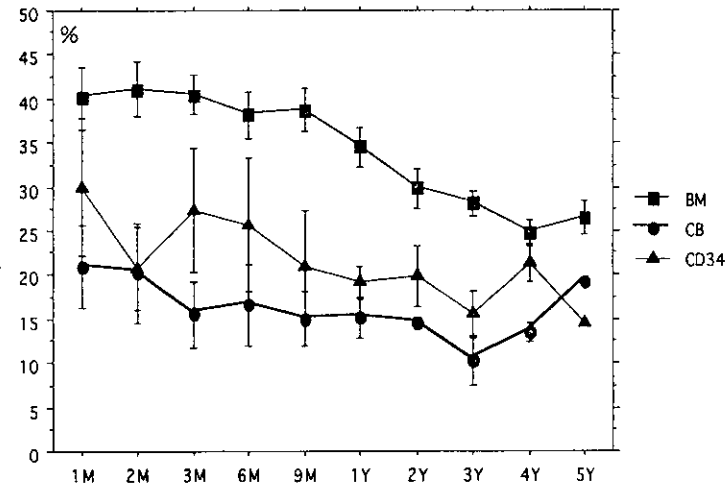


図3. CD4+/45RA+の実数

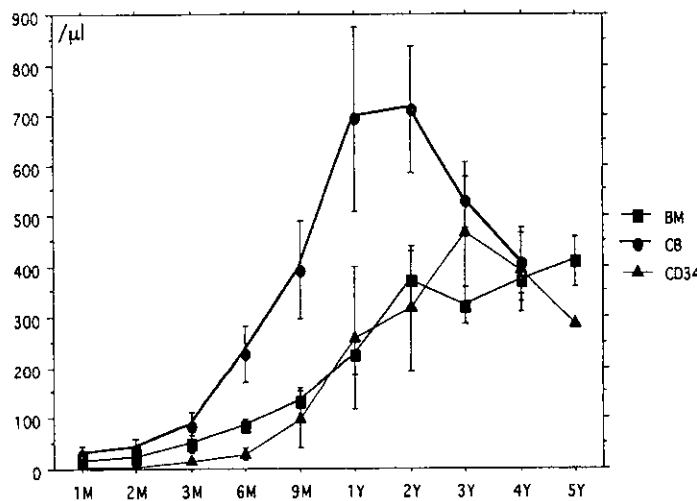
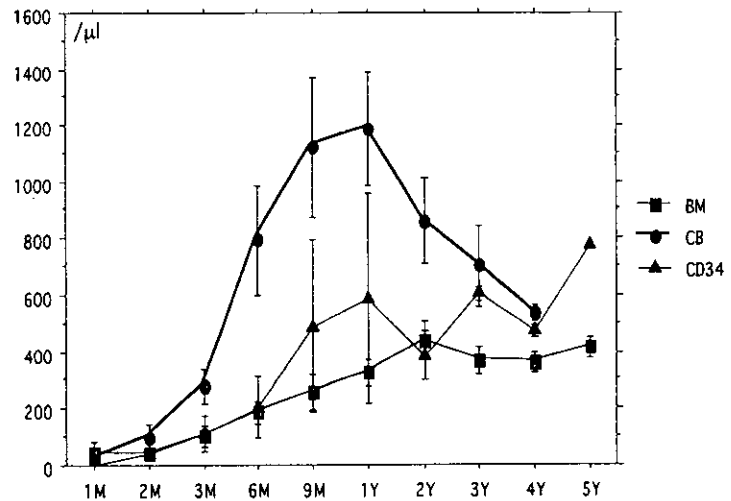


図6. CD19の実数



厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」分担研究報告書

成人に対する臍帯血移植 — 単施設における治療成績

分担研究者 原 宏（兵庫医科大学 輸血学・細胞移植部 教授）

要旨 成人造血器悪性腫瘍 12 症例に対して Fludarabine を組み入れた前処置により非血縁臍帯血移植を施行し、早期死亡 1 例を除く 11 例中 10 例に生着が得られた。移植後早期の感染症の合併、早期死亡率の高さ、GVHD の頻度・治療に対する反応性は、少数例ではあるが他の報告と同様であり、観察期間が短い、進行期移植例 6 例を含め無病生存率は 44.4%であった。2GyTBI/Flu の前処置は骨髄非破壊的臍帯血移植には適さない印象を受けたが、TBI/FLAG は骨髄破壊的非血縁臍帯血移植の前処置として有用と考えられた。

#### A. 研究目的

予後不良成人造血器悪性腫瘍患者に対し、生着不全を克服しかつ抗腫瘍効果を高める目的で全身放射線照射(TBI)に fludarabine、cytosine arabinoside (ara-C)、G-CSF 加えた TBI/FLAG で、また高齢者・臓器障害を有する 2 例には 2GyTBI/fludarabine を用いた骨髄非破壊的前治療により非血縁臍帯血移植を行い fludarabine を組み込んだ移植前処置の有用性を検討した。

#### B. 研究方法

対象は、予後不良造血器悪性疾患 12 例で詳細は表 1 に示した。

移植前処置として、9 例には 2.5~3Gy/日 x4 日間の全身放射線照射(TBI)(day-10~day-7)と fludarabine 30mg/m<sup>2</sup>/日、cytosine arabinoside 2g/m<sup>2</sup>/日および G-CSF 300 μg/m<sup>2</sup>/日をそれぞれ 5 日間 (day -6~day-2) の TBI/FLAG 療法を、1 例には、TBI (1.4Gyx2/日 x 3) + fludarabine (30mg/m<sup>2</sup>/日 x 4) + L-PAM (140mg/m<sup>2</sup>/日 x1)を、高齢者・臓器障害を有する 2 例には骨髄非破壊的前処置として fludarabine (30mg/m<sup>2</sup>/日 x3) + TBI (2Gy)を用いた。移植片対宿主病(GVHD)

の予防は全例 FK506 で行った。支持療法は通常の造血幹細胞移植と同様に行った。

前処置関連臓器毒性(regimen-related toxicity;RRT)の評価は Berman らの基準に従い、各臓器毒性の内最も grade の高いものを RRT の overall grade とした。

移植後好中球絶対数が 500/μl 以上に回復し 3 日以上持続した最初の日を生着日とし、生着は性染色体 FISH(異性間移植例)、STR-PCR 法で確認した。

死亡、白血病再発、生着不全、自己造血回復を event とし Kaplan-Meier 法により event free survival (EFS)を求めた。解析は 2002 年 3 月 17 日に行った。成人臍帯血移植に関するプロトコールは兵庫医科大学倫理委員会の承認を得たものであり、データの解析にあたっては患者の人権とプライバシーを侵害しないように配慮した。

#### C. 成績

##### 1) 前処置による臓器毒性 (表 2)

TBI/FLAG で前処置を行った症例 9 例全例に何らかの RRT を認めた。肝障害が 100%に見られ、1 例は重篤な肝静脈閉塞症により死亡した。Grade 3 以上の臓器障害を呈した症例は 2 例、grade 2 の障害が

6例にみられた。好中球が $500/\mu\text{l}$ 以上に回復する以前(移植後5~11日)に、 $38^{\circ}\text{C}$ 以上の発熱、紅斑、肺障害、肝障害、体重増加、中枢神経症状等生着症候群と思われる症状を呈した例が5例あった。

TBI/Fluの前処置では重篤な臓器障害を認めなかった。

#### 2) 生着(表3)

生着は、移植後18日の早期死亡の1例を除いた11例中10例に認められた。好中球回復( $500/\mu\text{l}$ 以上)に要する期間は16~35日(中央値;20.5日)、血小板が $50,000/\mu\text{l}$ 以上に達するまでの期間は45~207日(中央値;56日、 $n=5$ )、最終血小板輸血日は25~110日(中央値;34日)であった。自己造血回復を認めたUPN.110は骨髄非破壊的前処置で移植を行った症例であった。

#### 3) 移植片対宿主病(表4)

2度以上の急性GVHDは評価可能症例9例中4例(3度;3例、4度;1例)に合併した。その内2例は早期に免疫抑制剤FK506を中止した後のGVHD発症であり、1例はFK506とsteroidの再開より改善、1例はPSL2mg/kgやmethyl-PSL大量、CSA投与にもかかわらず治療抵抗性で全身型慢性GVHDへと進展した。他の2例はsteroidの追加投与により治癒した。脳症合併のためday19にFK506を中止し以後MP2mg/kg単独でGVHD予防を行った1例は2度以上のGVHDの合併はみなかった。

慢性GVHDは、評価可能症例5例中4例(全身型3例、限局型1例)に合併した。

#### 4) 合併症

1例を除き全例が移植後30日までに $38^{\circ}\text{C}$ 以上の発熱をみ、その時のCRPのピーク値は1例を除き $10\text{mg}/\text{dl}$ 以上であった。 $38^{\circ}\text{C}$ 以上の有熱日数は6~26日(中央値;13日)(30日未満の死亡3例を含

む;18,21,29日に死亡)、感染巣が明らかだったのは3例(敗血症2例、真菌血症1例)で3例共30日以内の早期死亡例であった。CMV感染は6例でみられたが、重篤なCMV感染症を併発したものはなかった。

#### 5) 死因と生存率

死亡5例は移植後18~173日(中央値;29日)に死亡、再発死1例を除く4例は移植後早期の死亡(18~34日)であり、死因は細菌性敗血症、真菌性敗血症、多臓器不全1例、肝静脈閉塞症+細菌性敗血症1例であった。12例中7例が移植後45~451日(中央値;199日)で生存、予想EFSは44.4%、over all survivalは55.6%であった。(図1)

#### D, 考案

Fludarabineはその強い免疫抑制作用による生着促進効果を期待され骨髄非破壊的造血幹細胞移植の前処置に好んで用いられ成果を上げている。また、生着不全や拒絶の頻度が高いと予想される、頻回輸血歴を有する重症再生不良性貧血に対するHLA不一致血縁間骨髄移植やHLA一致非血縁者間骨髄移植、さらには非血縁臍帯血移植の前処置に導入され効果が認められたとの報告が散見する。また、難治性白血病に対するsalvage療法として、強い抗腫瘍効果を期待したFLAG療法の一薬剤としてとして用いられ一定の効果を挙げている。我々の施設では、fludarabineの免疫抑制作用およびFLAG療法としての強い抗腫瘍効果に着目し、成人難治性造血器悪性腫瘍に対する臍帯血移植の前処置としてTBI/FLAGを選択した。

TBI/FLAGの前処置で行った9例中2例にgrade3以上の臓器障害を認めた。HBs抗原陽性で前処置開始前に肝障害を有した症例がgradeIVの臓器障害(HVOD)で