

20020476

厚生労働科学研究費補助金
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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 齋藤 英彦

平成15(2003)年 3月

平成 14 年度総括・分担研究報告書

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・再生医療に関する研究」班における平成 14 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。

1997 年に始まった我が国の非血縁者間臍帯血移植は、2003 年 3 月末には約 900 例にとどく急速な発展を見せており、今や骨髄移植と並んで造血細胞移植の一翼を担っている。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し予後因子を同定するとともに、prospective な無作為臨床試験を行い臨床上の疑問に答えることは、日本人における EBM（根拠に基づく医療）を確立する意味でも、また国際的な情報発信の点からも重要であると考えられる。さらに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により EBM 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。

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ある。

2003 年 3 月

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14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	東海大学総合医学研究所 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 総合内科学 教授
	今村雅寛	北海道大学大学院医学研究科 癌制御医学講座 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
	石井榮一	佐賀医科大学 小児科 助教授
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. 臍帯血の免疫学的特性	5
高橋 恒夫	
2. 臍帯血の母親のHLA不適合が臍帯血移植に及ぼす影響に関する研究	9
加藤 俊一	
3. 1) 臍帯血造血幹細胞の体外増幅を促進するマウス胎児線維芽細胞株の樹立に関する研究	12
原 宏	
2) 小児および成人造血器悪性腫瘍に対する非血縁さい帯血移植の比較検討 ー兵庫さい帯血バンクから提供した移植例の解析ー	14
原 宏	
3) インターロイキン-18によるヒト臍帯血V α 24 ⁺ V β 11 ⁺ natural killer T(NKT)細胞からのTh1, Th2サイトカイン産生制御に関する研究	20
原 宏	
4. 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	
5. 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	27
高倉 伸幸	
6. 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・分化に関する研究	28
仲野 徹	
7. 1) 造血幹細胞移植の需要予測 1. 小児における予測	29
今村 雅寛	
2) 造血幹細胞移植の需要予測 2. 成人における予測	37
今村 雅寛	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
IV. 研究班会議発表者報告書(資料)	62

I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究

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 599 例を集計、解析し、予後を左右する要因を明らかにすると共に、「至適 GVHD 予防法」の無作為割付臨床試験を進めた。また、成人への適用拡大のために「複数ドナーからのさい帯血同時移植」の臨床試験を開始し、我が国での第一例の移植を行った。基礎的研究として造血幹細胞の未分化性維持と自己複製機構、移植後の免疫システムの構築、臍帯血や胎盤に由来する間葉系細胞の研究を進めた。

分担研究者

高橋恒夫（東京大学医科学研究所細胞マニピュレーション部門 教授）、加藤俊一（東海大学総合医学研究所 教授）、原 宏（兵庫医科大学総合内科学 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）、今村雅寛（北海道大学大学院医学研究科 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）、高梨美乃子（東京都赤十字血液センター 課長）、矢崎 信（名古屋市立守山市民病院 部長）、小島勢二（名古屋大学医学部 教授）、石井榮一（佐賀医科大学小児科 助教授）

A. 研究目的

（1）臍帯血移植の EBM（根拠に基づく医療）を確立し、造血移植医療における位置づけを明らかにする。そのために、これまで施行された非血縁間臍帯血移植の臨床成績を引き続き、収集・解析するとともに、前向き登録による臨床研究を推進する。

（2）臍帯血移植の成人への適応拡大ならびに一層の安全性向上のため、造血幹細胞の生着促進、増幅、未分化性の維持に関する研究を行う。また、臍帯血移植後の免疫

系の再構築を促進し、再発や感染症を予防するための免疫療法を開発する。さらに、複数臍帯血同時移植に関する臨床成績を開始し、その有効性・安全性を評価する。

（3）臍帯血を用いた臓器再生医療を視野に入れ、臍帯血や胎盤に含まれる間葉系細胞の性状を明らかにし、体外での増幅・分化さらに生体内での臓器再生に関する基礎研究を行う。

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全国調査し解析すると共に、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（移植片対宿主病）予防法の臨床研究をひき続き行う。また、複数ドナーからの臍帯血同時移植の臨床研究を開始する。さらに今後数年間の我が国における臍帯血移植の需要を予測する。

（2）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 CD34 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。

（倫理面への配慮）

（1）臨床成績の収集・解析に際しては、患者やドナーに関わるプライバシーの保護に配慮し、データの匿名化を行う。一方、班研究で明らかになった結果や成果について

ては、公開シンポジウムやインターネット等を通じ一般にも公開する。GVHD 予防に関する前向き無作為臨床試験と複数ドナーからの移植にあたっては、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。

(2) 臍帯血や胎盤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。研究全般を通じて、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守する。ヒト胚性幹細胞に関しては、これを使用しない。

C. 研究結果

(1) 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 599 例の解析をした。患者の年齢分布：0～64 歳（小児 71%，成人 29%）、対象疾患：腫瘍性 85%，非腫瘍性 15%、移植細胞数：0.5～26.6 × 10⁷/kg、HLA 一致度（血清学的 A, B, DR 6 抗原）：6 抗原 14%，5 抗原 53%，4 抗原 32%，3 抗原 1%。HLA 適合度は無病生存率および GVHD の重症度とは相関がなかった。しかし白血球と血小板の回復速度と生着率は 4 抗原一致では 6 または 5 抗原一致に比べて悪かった。移植の対象疾患が腫瘍性疾患群(476 例)と非腫瘍性疾患群(86 例)では無病生存率に有意差はなかった。患者体重当たりの移植細胞数が多いほど 3 年後の無病生存率がよく、4 × 10⁷/kg 以上の群(190 例)と以下の群(336 例)と比較すると前者が高かった(p=0.0013)。GVHD 予防法と無病生存率との関係では、サイクロスポリン単独群(63 例)よりもタクロリムス+メソトレキセート群(13 例)の方が無病生存率が高かった(p<0.0001)。これらの結果は、以前の少数例での解析結果と一致するものである。

興味あることは、臍帯血移植は従来主に体重の少ない小児が対象であったが、最近細胞数の多い臍帯血の保存が各バンクの努力により進んだ結果、2002 年には成人の移植の方が小児よりも多かった。臍帯血移植では非常に高率（保存臍帯血 18 個に 1 個）にドナーが見つかることが骨髄移植に比べた特徴である。また、今後数年間の臍帯血移植の需要は、小児と成人の両者で年

間 400～600 例にのぼると予測された。

「至適 GVHD 予防法」の臨床研究には 38 例の登録が今までにあったが、さらに登録を増やす必要がある。「複数ドナーからの臍帯血同時移植」の有用性と安全性を検討する臨床研究を開始し、我が国における第一例の移植を実施した。

(2) 造血幹細胞の自己複製に重要な未分化性の維持は、生態学適所(niche; ニッチ)を構成する血管内皮細胞との細胞間相互作用が重要であり、この分子メカニズムとして、造血幹細胞からの TIE2 リガンドの発現ならびに双方の TIE2 受容体の活性化が関与することを示した。また CD34 陽性かつ TIE2 受容体陽性細胞にのみ認められる遺伝子発現をクローニングし、転写因子 e11 を得た。これは骨髄、精巣、卵巣に限局して発現が認められ、RNAi による発現抑制実験から、幹細胞における均等分裂に関与する可能性が示唆された。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、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。また、OP9 細胞を用いたマウス胚性幹細胞からの分化誘導システムを確立し、転写因子 GATA-2 を強制発現させるとマクロファージ分化を抑制し巨核球への分化が誘導されることを示した。造血転写因子群のなかで GATA2 の発現調節による血球分化の制御が可能となるかもしれない。

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。そのためにリンパ球の機能が低いと考えられた。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して、末梢血幹細胞に比較して臍帯血には、抗体産生可能な成熟 B 細胞が少ないことが免疫不全の原因の一つであることを示した。また IL2 受容体の common γ 鎖をノックアウトした NOD/scid- $\gamma^{-/-}$ マウス (NOG 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。このモデルはヒト造血幹細胞移

植により B 細胞に加えて T 細胞も出現するユニークな移植系である。NOG マウスにヒト臍帯血 CD4 細胞を IL-2 と抗 CD3 抗体で培養した活性化 CD4 細胞を同時に投与すると、免疫抗原に対する IgG の産生ならびに胚中心形成が認められた。この所見から、臍帯血移植後免疫不全に対する養子免疫療法の有用性が示唆された。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。

同種造血幹細胞移植後に出現する CMV 特異的 CD4 細胞の性状について、臍帯血移植と骨髄移植で比較した。いずれも移植後 1 ヶ月後には CMV 特異的 CD4 は検出されるが、前者では CD45RA 陰性 Perforin 弱陽性であり、後者では CD45RA 陽性 Perforin 陽性の CTL も出現した。これらは、臍帯血移植後の T 細胞免疫の機能不全を示唆するものであり、CMV 感染に対する新たな対応が必要と考えられた。

ヒト胎盤絨毛から均一な間葉系マーカーを発現する細胞を得る方法を開発し、*ex vivo* で骨芽細胞、神経細胞への分化誘導が可能である。

D. 考察

臍帯血移植の症例の蓄積と共に日本人における予後因子など臨床的に有用な情報が得られつつある。HLA 一致度が無病生存率や急性 GVHD の重症度とは無関係であるという結果は、最近の欧米からの報告とは異なり我が国に独自のものである。

「GVHD 予防の前向き臨床試験」は、小児を対象とするためもあり各施設における倫理委員会審査の手続きに時間をとり、症例登録が遅れている。新しく始めた「複数ドナーからの臍帯血同時移植」は 10 例を目標としており、第一例は実施した。今後如何にこれらの臨床研究を速やかに完了していくかが課題である。

E. 結論

臍帯血移植の EBM を確立するための臨床成績の集計、解析により日本人における「予後因子」や骨髄移植との比較成績も明らかになりつつある。新しいエビデンスを

創るための前向き臨床研究をさらにスピードアップする必要がある。基礎的研究では臍帯血中の造血幹細胞の未分化性維持機構、臍帯血移植後の免疫系再構築過程、胎盤の間葉系細胞の分化能などが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

代表的論文

- 1) Yazaki M, Saito H, et al.: Human leukocyte antigen-Cw-specific cytotoxic T lymphocytes generated from naive cord blood used for cord blood stem cell transplantation. **Br J Haematol** 117:893-898, 2002.
- 2) Li Y, Saito H, et al.: Aberrant DNA methylation of p57KIP2 gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. **Blood** 100: 2572-2577, 2002.
- 3) Nagayama H, Takahashi TA, et al.: Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim. **Bone marrow transplantation** 29: 197-204, 2002.
- 4) Tanigaki T, Nakano T, et al.: Notch/RBPJ signaling is involved in cell fate determination of Marginal Zone B cells. **Nature Immunol** 3: 443-450, 2002
- 5) Yahata T, Kato S, et al: Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetes/Shi-scid, IL-2 receptor γ null mice. **J Immunol** 169: 204-209, 2002.
- 6) Kitajima K, Nakano T, et al: GATA-2 and GATA-2/ER display opposing activities in the development and differentiation of blood progenitors. **EMBO J** 21: 3060-3069, 2002
- 7) Nishihira H, Takahashi TA, Kato S, Naoe T, Saito H, et al.: The Japanese cord blood bank network experience with cord blood transplantation from unrelated donors for haematological malignancies: an evaluation of graft-versus-host disease prophylaxis. **Br**

J Haematol 120(3):516-522, 2003.

- 8) Isoyama K, Takahashi TA, Kato S, Saito H, et al: Cord blood transplantation from unrelated donors: A preliminary report from the Japanese Cord Blood Bank Network. **Leukemia & Lymphoma** 44:429-438, 2003.
- 9) Suzuki A, Nakano T, et al.: Critical roles of Pten in B cell homeostasis and immunoglobulin class switch recombination. **J Exp Med**, in press, 2003.
- 10) Yamada Y, Takakura N: Neurophilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. **Blood** in press, 2003.

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：臍帯血の免疫学的特性

分担研究者：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

研究協力者：長村（井上）登紀子、渡辺信和 同研究部門

タイトル：臍帯血移植後の T 細胞の動態解析と臍帯血由来 NK/T 細胞の増幅、活性化

研究要旨 臍帯血移植における問題点として、生着遅延、CMV 等の感染症の発症や、DLI のような移植後の細胞療法が確立していないことがあげられる。これらの病態を理解して治療法を開発するためには、臍帯血移植後の免疫再構成の解析は不可欠である。我々は、臍帯血移植後の naïve/memory phenotype および CMV 特異的 T 細胞を解析し、臍帯血移植後の細胞性免疫能獲得の様相を解析した。多くの患者で移植後早期に CMV 特異的 T 細胞が検出されたが、それにもかかわらず CMV 抗原血症を発症した患者がいた。本患者においては CTL のサイトカイン分泌能が低く このために感染症をコントロールできなかった可能性が示唆された。一方 これまでに 抗腫瘍効果を期待して、IL15 と Flt3L を用いて臍帯血単核球から NK 細胞の増幅活性化について報告してきた。本年度はその細胞傷害活性について Ph1 陽性細胞株を Target として比較検討した。その結果 原因は未だ明らかではないが NK 細胞の細胞傷害活性は myeloid 優位であることが予想された。さらに、臍帯血単核球より IL15 と Flt3L ベースとして IL7 および α GalCer の添加によって、2 週間の培養で約 2,300 倍の V α 24V β 11 NKT 細胞の増幅誘導が可能であり、CD4 陽性かつ NKT1/NKT2 両方の性質を持った細胞が得られた。

I. 移植後の細胞性免疫回復の解析：

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 細胞の未熟さが報告されている。臍帯血移植では同種骨髓移植に比べて CMV 感染症などの発症が多い。これは同種骨髓移植 donor 由来の成熟 T 細胞は、naïve と memory がほぼ半数ずつ存在し、donor が CMV 既感染者の場合 CMV 特異的 T 細胞が含まれているが、移植臍帯血に含まれる T 細胞は naïve T 細胞であることに起因すると考えられている。今回我々は、flow cytometer を用いて臍帯血移植後の T 細胞における naïve/memory

phenotype、および CMV 特異的 CD4⁺ T 細胞および特異的 CD8⁺ T 細胞を解析し、健常成人と同種骨髓移植後の T 細胞におけるそれらと比較検討した。

B. 研究方法：

東京大学医科学研究所・附属病院で 2002 年 10 月から 12 月までに臍帯血移植を受けた 4 名の成人造血器悪性腫瘍患者と、5 名の健常人を対象とした。患者末梢血から Ficoll で単核球を分離し、naïve/memory phenotype の解析は、flow cytometer を用いて細胞表面の CD45RA と CD62L を測定して行った。CD8⁺ T 細胞に関しては、細胞内 perforin 分子の発現レベルも測定した。CMV 特異的 T 細胞の検出は、不活化 CMV と抗 CD28 抗体を用いて患者の末梢血単核

球を刺激し、特異的に反応して IFN γ を産生する細胞を 16 時間後に細胞内 IFN γ 染色して行った。

C. 研究結果：I.CMV 特異的 T 細胞は移植後 25 日頃までは検出されないが、4 例とも 35 日目には CMV 特異的 CD4⁺ T 細胞検出された。1 例の患者が移植後 50 日目に CMV 抗原血症を発症し、56、83、および 90 日目に CMV 特異的 CD4⁺ T 細胞に加えて CMV 特異的 CD 8⁺ T 細胞が検出された。これらの CMV 特異的 T 細胞は、CD45RA⁻CD62L^{dim}perforin^{dim}が主体で、CMV 既感染の健常人や同種骨髄移植後にみられる CD45RA⁺CD62L^{perforin}⁺の成熟した CTL は、移植後 90 日を過ぎても全 CD8⁺ T 細胞中の 10%以下であった。

D. 考察：これらの所見は、臍帯血移植後早期に CMV 特異的 T 細胞が獲得されるにもかかわらず CMV 感染症が発症し、CMV 特異的 CD 8⁺ T 細胞が出現してもその根治ができないことを示している。

E. 結論：臍帯血移植後の特に CMV に対する免疫学的解析は 今後細胞療法・ワクチン療法のデザインを考えるとき、参考となると考えられた。

II.NK 細胞の細胞傷害活性の検討：

A. 研究目的：白血病の再発に対して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。われわれは移植後の再発防止すなわち Graft versus leukemia/tumor (GVL/T) 効果を期待した NK/T 細胞の増幅についてこれまで報告してきた。HLA 不適合移植が大半を占め、かつ未成熟な T 細胞を抱える臍帯血移植において NK 細胞の

役割は大きいと考えられる。これまで IL15 と Flt3 による 特に IL15 の濃度を調製することによって NK 細胞含有率の高い増幅方法について報告した。今回 その細胞傷害活性について 特に Ph1 陽性細胞株を Target として比較検討した。

B. 研究方法：NK 細胞の調製：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 週間培養した。培養後 AutoMACS にて NK 細胞分画(Depletion method)を純化し、種々の Ph1 陽性白血病細胞株に対する細胞傷害活性を比較検討した。

C. 研究結果：一方増幅 NK 細胞の細胞傷害活性を 特に Ph1 陽性細胞株を Target として比較検討した。NK 細胞の細胞傷害活性は Flt3L+IL15 培養後 E/Tratio10:1 において p210^{BCR/ABL} タイプの細胞株、K562, BC 1, BC2 では 100%の細胞傷害活性を認めた。一方 p190 BCR/ABL タイプの細胞株 (pre-B cell ALL type) では NK 細胞による細胞傷害活性は OM9:22, KOPN30, KOPN57,KOPN72 とともに著明な低下を認めた。

NK 細胞の細胞傷害活性は、これまでの報告通り myeloid 優位であることが予想された。

D. 結論：免疫細胞の増幅においては 特に ALL に対する CTL の誘導を含めて T 細胞と NK 細胞をバランスよく増幅させることによって抗腫瘍効果を誘導していくことが今後の課題である。

III. NKT 細胞の増幅：

A. 目的：NKT 細胞はマウスでは抗腫瘍効果を有しているが、人では証明されていない。臍帯血中単核球由来 V α 24V β 11NKT 細胞増幅し その性状解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法：

臍帯血単核球から IL-15+IL-7+Flt3-L 存在下に α -GalCer を加えて培養 V α 24V β 11NKT 細胞を FACS にて解析し絶対数にて増幅率を検討した。また培養後の V α 24V β 11NKT 細胞の性状を FACS にて解析した。得られた V α 24V β 11NKT および同時に増幅された T 細胞を細胞内染色 にて IFN- γ と IL-4 抗体を用いて解析した。

C. 結果：臍帯血中に α -GalCer の Receptor である CD1d molecule は CD19+ B cell と CD14+ Monocyte に豊富に発現が認められ、CD3-CD1a+Dendritic Cell にも弱く発現されていた。2 週間培養で 2,300 倍の V α 24V β 11NKT cell の増幅が認められた。培養後の NKT 細胞は CD4+CD8-細胞が主で細胞内染色では Th1 サイトカインである IFN- γ と Th2 サイトカインである IL-4 を出していた。

D. 増幅された V α 24V β 11NKT cell は NKT1 と NKT2 の両方の性状を有していると考えられた。

E. 結語：臍帯血由来 V α 24V β 11NKT cell 細胞は免疫制御性 T 細胞として、他の NK 細胞、T 細胞と共に細胞移植後の GVHD/GVL 機構の理解に役立つと思われる

(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。

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

論文発表

1. T. Nagamura-Inoue, M. Shioya, M. Sugo, Y. Cui, A. Takahashi, S. Tomita, Y. Zheng, K. Takada, H. Kodo, S. Asano and T. A. Takahashi. Wash-out of DMSO does not improve the speed of engraftment of cord blood transplantation: follow-up of 46 adult patients with units shipped from a single cord blood bank, Tokyo Cord Blood Bank. *Transfusion*, in press.2003.
2. Nagayama H. Takahashi TA et al. Cord blood stem cells, Transient hematopoietic stem cell rescue using umbilical cord blood for a lethally irradiated nuclear accident victim (2002). *Bone marrow transplantation*, 29,197-204.
3. Xiaohong Zhang, Takashi Nakaoka, Toshihide Nishishita, Nobukazu Watanabe, Koichi Igura, Ken-ichi Shinomiya, Tsuneo A. Takahashi, Naohide Yamashita. Efficient Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Expression in Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells. *Microbiol. Immunol.*, 47: 109-116, 2003.
4. 高田圭, 長村(井上)登紀子, 須郷美智子, 塩谷美夏, 高橋敦子, 崔硯, 平井雅子, 田口淳史, 渡辺信和, 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と運用, 日本輸血学会雑誌, 印刷

中, 2003

学会発表 :

1. Igura, K., Watanabe, N., Nagamura-Inoue, T., Takahashi, K., Iwamoto, U., Takada, K., Mitsuru, A. and Tsuneo A. Takahashi. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Neural Cells. *Blood*, 100, Suppl. 1: 517a, 2002.
2. Watanabe, N., Igura, K., Nagamura-Inoue, T., Iwamoto, U., Takada, K., Mitsuru, A. and Tsuneo A. Takahashi. Multilineage Potential of Human Placenta-Derived Mesenchymal Cells. *Blood*, 100, Suppl. 1: 517a, 2002.
3. 長村登紀子、高橋恒夫：炎症再生医学会 ワークショップ：臍帯血の保存管理と臍帯血移植 2002 年
他

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。

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

臍帯血の母親のHLA不適合が臍帯血移植に及ぼす影響に関する研究

分担研究者 加藤俊一 東海大学総合医学研究所教授

研究要旨

非血縁者間臍帯血移植におけるHLA抗原のNIMA相補性が移植結果に与える影響について予備的な検討を行った。母児間での免疫学的寛容がHLA抗原のNIMA相補性による可能性を示す事実はえられなかったが、今後より大規模な検討により結論をだすべき問題であると考えられる。

A. 研究目的

臍帯血移植においては臍帯血と患者間のHLA抗原が完全に一致していなくても、必ずしも重症の移植片対宿主病（GVHD）が発症しないことが知られている。そのため、HLA-A, B, DR合計6抗原のうち血清学的レベルで4～6抗原が一致するドナーからの移植が行われている。

妊娠中の母親と胎児の間ではHLAが半分異なるにも関わらず胎児が拒絶されないことから、双方向に免疫学的な寛容状態が成立しているものと考えられている。この寛容状態が母児間で不適合のHLA抗原に対する抗原特異的なものであるとするならば、母親と同じHLA抗原を有する患者に対して臍帯血は免疫学的な反応を起こしにくい関係にあるのではないかとこの仮説がとなえられてきた。

今年度の分担研究では、このような母児間の免疫学的寛容が実際の非血縁者間臍帯血移植において影響している可能性について検討を試みた。

B. 研究方法

東海大学さい帯血バンクから臍帯血を提供し、移植後の経過について詳細な報告がなされている79例について、患者・臍帯血・母親のHLA抗原を検査し、生着の有無と速度、GVHDの重症度、最終転帰との相関について解析した。

（倫理面での配慮）

東海大学さい帯血バンクでは、臍帯血提供の説明書に臍帯血自体と母親のHLA抗原を検査することと、検査方法としてDNA検査も含まれることを記載し、臍帯血提供同意書中にも明記したうえで同意を取得している。また、臍帯血ならびにその母親のHLA検査は匿名化後に行い、プライバシーの保護に十分な配慮をした。

C. 研究結果

1. NIMA相補性の頻度

臍帯血の母親から臍帯血に受けつがれていないHLAをNIMA抗原（non-inherited maternal antigen）と呼び、そ

のNIMA抗原を患者が有する場合を「NIMA相補性あり」と定義した。

79組中NIMA相補性が認められたのは6組であり、いずれも血清学的HLA抗原であった(表1)。

表1. NIMA相補性組合せのHLA抗原

	患者	臍帯血	臍帯血母親
1	DR1, DR4	DR14, DR1	DR14, DR4
2	B44, B60	B52, B44	B52, B60
3	DR1, DR15	DR1, DR9	DR1, DR15
4	DR15, DR4	DR15, DR15	DR15, DR4
5	A11, A26	A11, A31	A11, A26
6	A24, A26	A2, A24	A2, A26

2. NIMA相補性移植6例の患者背景

6例の患者背景を表2に示したが、年齢、体重、疾患とその病期などについてはハイリスク症例ばかりであったが、移植細胞数においてはNIMA相補性のない73例とほぼ同様の分布であった(表2)。

表2. 6例の疾患背景

	年齢 歳	体重 kg	疾患・病期	細胞数 x10 ⁷ /kg
1	3	18	ムコ多糖症II	4.7
2	5	18	ALL、再発	7.4
3	31	78	CML、BC	1.3
4	39	52	CML、BC	2.8
5	3	12	MDS、JCML	4.3
6	13	40	ALL、再発	2.6

3. 移植結果(表3)

①生着

6例中2例は早期死亡のため、生着についての評価ができなかった。3例において生着が認められたが、そのうちムコ多糖症の1例では自己造血回復が起こり最終的には拒絶された。残り1例では最初から生着が認められなかった。

生着が認められた3例における好中球生着日(500/μl)は15、17、18日であり、全体の生着日と同等かやや早い傾向であった。

②急性GVHD

生着の認められた3例での急性GVHDは、0度、I度、III度がそれぞれ1例ずつであった。

③最終転帰

一時的な生着後に拒絶されたムコ多糖症の症例は非血縁者間骨髄移植を受けて生存中で、3例は移植関連死亡、1例が再発生存中、1例が無病生存中である。

表3. 6例の移植結果

	生着	好中球 500/μl	急性 GVH	最終転帰
1	一時	15日	0度	再移植・生存
2	あり	18日	III度	死亡・真菌
3	NE	—	NE	死亡・ウイルス
4	NE	—	NE	死亡・VOD
5	なし	—	NE	再発生存
6	あり	17日	I度	無病生存

D. 考案

今回の検討は少数例であるため、非血縁者間臍帯血移植におけるNIMA相補性の意義を明確にすることは困難であった。妊娠中に成立していた母児間の免疫学的寛容が不適合HLA抗原に対する特異的なものかどうか、非血縁者間臍帯血移植においてこの寛容状態が生着、GVHDなどの移植後のイベントにどのような影響を与える可能性があるかという問題については今後さらに多数例において検討する必要がある。

E. 結論

非血縁者間臍帯血移植におけるN I M A相補性が移植結果に与える影響について予備的な検討を行った。母児間での免疫学的寛容がN I M A相補性による可能性を示す事実はえられなかった。

F. 健康危害情報

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。

加藤俊一：造血幹細胞移植。「血液・造血器疾患の治療と看護」堀田知光他編、南江堂 242-272、2002。

2. 論文発表

Tsuchiya T, Hagihara M, Shimakura Y, Ueda Y, Gansuud B, Munkhbat B, Inoue H, Tazume K, Kato S, Hotta: The generation of immunocompetent dendritic cells from CD34+ acute myeloid or lymphoid leukemia cell. *Int J Hematology*, 2002; 75:55-62.

Gansuud B, Hagihara M, Ying Y, Inoue H, Ueda Y, Tsuchiya T, Masui A, Ando K, Nakamura Y, Munkhtuvshin N, Kato S, Thomas JM, Hotta T: Human umbilical cord blood NK T cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanisms. *Human Immunology*, 2002; 63:164-175.

Hagihara M, Gansuud B, Ueda Y, Tsuchiya T, Masui A, Tazume K, Inoue H, Kato S, Hotta T: Killing activity of human umbilical cord blood-derived TCR Valpha24+ NKT cells against normal and malignant hematological cells in vitro: a comparative study with NK cells or OKT3 activated T lymphocytes or with adult peripheral blood NKT cells. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 2002; 51: 1-8.

Yahata T, Ando K, Nakamura Y, Ueyama Y, Shimamura K, Tamaoki N, Kato S, Hotta T: Functional human T lymphocyte

development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetes/Shi-scid, IL-2 receptor γ null mice. *J Immunol*, 2002; 169:204-209.

Morishima Y, Sasazuki T, Inoko H, Juji T, Akaza T, Ishikawa Y, Kato S, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Hamajima N, Asano S, Kodera Y: The clinical significance of human leukocyte antigen(HLA) allele compatibility in patients receiving a marrow transplant from serologically HLA-A, HLA-B, and HLA-DR matched unrelated donors. *Blood*, 2002; 99:4200-4206.

Li C, Ando K, Kametani Y, Oki M, Hagihara M, Shimamura K, Habu S, Kato S, Hotta T.: Reconstitution of functional human B lymphocytes in NOD/SCID mice engrafted with ex vivo expanded CD34(+) cord blood cells. *Exp Hematol*, 2002; 30:1036-43.

Kojima S, Matsuyama T, Kato S, Kigasawa H, Kobayashi R, Kikuta K, Kodera Y. : Outcome of 154 patients with severe aplastic anemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program. *Blood*, 2002; 100:799-803.

Saijo M, Yasuda Y, Yabe H, Kato S, Suzutani T, De Clercq E, Niikura M, Maeda A, Kurane I, Morikawa S: Bone marrow transplantation in a child with Wiskott-Aldrich syndrome latently infected with acyclovir-resistant (ACV^r) herpes simplex virus type 1: emergence of Foscarnet-resistant virus originating from the ACV^r virus. *Journal of Medical Virology*, 2002; 68:99-104.

Inoue H, Yasuda Y, Hattori K, Shimizu T, Matsumoto M, Yabe M, Yabe H, Tsuchida F, Tanaka Y, Hosoi G, Sako M, Kato S: The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34-positive stem cell transplantation in children; comparison with bone marrow transplantation. *Int J Hematol*, in press

H. 知的所有権の取得状況

なし

臍帯血造血幹細胞の体外増幅を促進するマウス胎児線維芽細胞株
の樹立に関する研究

分担研究者 原 宏 兵庫医科大学教授

研究要旨 マウス胎児より線維芽細胞株を樹立し、ヒト造血幹細胞への影響を
検討した。HYMEQ-5 株は臍帯血 CD34 陽性細胞を効果的に増殖した。この
細胞株は臍帯血造血幹細胞の *ex vivo expansion* の研究・開発に有用である。

A. 研究目的

胎児線維芽細胞は ES 細胞の維持に重要であるが、造血幹細胞への影響は知られていないため、細胞株を樹立しその造血支持能を検討した。

B. 研究方法

胎生 12 日の C57BL/6 マウス胎児の体幹から、付着性の stroma 細胞を得、X 線照射により 3 つの細胞株を樹立し、その造血支持能を表面抗原、コロニーアッセイ、SRC アッセイを用いて検討した。

C. 研究結果

HYMEQ-1, -5, -8 の 3 つの細胞株が得られ、これらの細胞は血球系マーカー陰性、血管内皮マーカー陰性、HLA class I 陽性、細胞内 vimentin 陽性およびその形態から、線維芽細胞と考えられた。3 つの細胞株のうち、HYMEQ-5 細胞を feeder すると、Dexter-type の培養系で長期に臍帯血 CD34 陽性細胞からの造血を維持すること

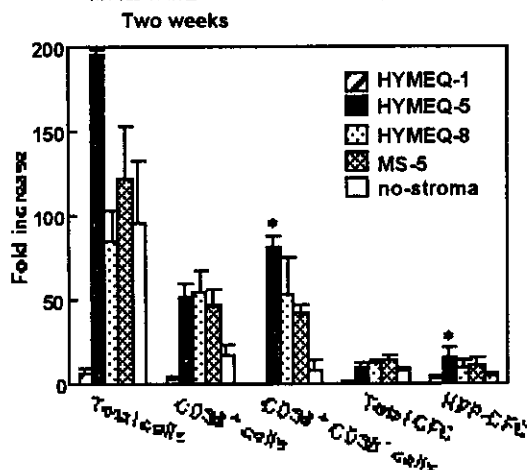


Fig. 1

ができた。また、HYMEQ-5 株は、TPO、FL、SCF の存在下に臍帯血 CD34 陽性細胞からの HPP-CFC や CD34+CD38- 細胞の増幅を促進した (Fig. 1)。さらに、増幅した臍帯血 CD34 陽性細胞は、NOD/SCID マウスで、SRC を増加した (Fig. 2)。

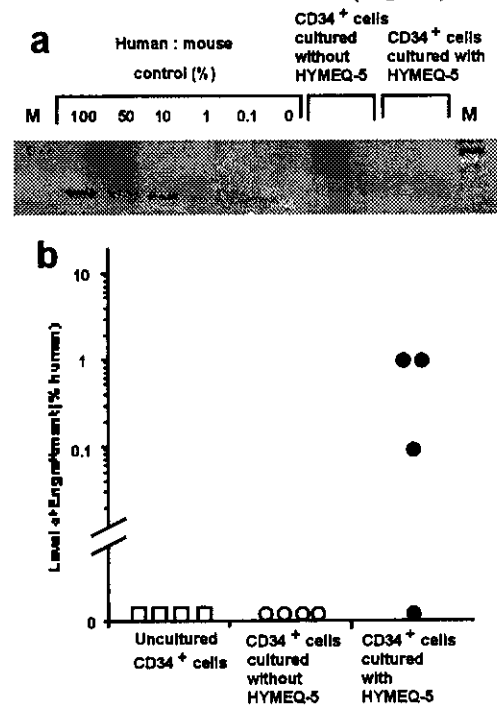


Fig. 2

D. 考察

HYMEQ-5 株は、臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅を効果的に支持した。

E. 結論

HYMEQ-5 株は、造血幹細胞の増幅の研究・開発に有用である。

F. 健康危機情報

核当なし

G. 研究発表

1. 論文発表 Qiu F, Fujimori Y, Kai S, Fujibayashi Y, Nishioka K, Hara H: Establishment of mouse embryonic fibroblast cell lines that promote ex vivo expansion of human cord blood CD34⁺ hematopoietic progenitors.

J Hematotherapy & Stem Cell Res, 12, 39-46, 2003

2. 学会発表

藤盛好啓、仇恵英、西岡啓介、甲斐俊朗、原 宏 (2002) 臍帯血造血幹細胞の増殖

を促進するマウス胎児繊維芽細胞株の樹立. 第 64 回日本血液学会総会, 9.13, 横浜.(第 64 回日本血液学会総会プログラム・抄録集, 173, 2002)

仇恵英, 藤盛好啓, 西岡啓介, 甲斐俊朗, 原宏(2002)臍帯血造血幹細胞の体外増幅を促進するマウス繊維芽細胞株の樹立, 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」班, 班会議, 6.21, 名古屋.

H. 知的財産権の出願・登録状況

核当なし

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

研究課題：小児および成人造血器悪性腫瘍に対する非血縁さい帯血移植の比較検討

－兵庫さい帯血バンクから提供した移植例の解析－

分担研究者	原 宏	(兵庫医科大学総合内科学 血液・腫瘍科 教授)
研究協力者	甲斐俊朗	(兵庫医科大学輸血部 助教授)
	三澤真人	(兵庫医科大学総合内科学 血液・腫瘍科 講師)
	山口雅生	(兵庫医科大学総合内科学 血液・腫瘍科 助手)
	陳 明修	(兵庫医科大学総合内科学 血液・腫瘍科 研究生)
	田畑雅彦	(兵庫医科大学総合内科学 血液・腫瘍科 研究生)

要旨 成人および小児造血器悪性腫瘍に対するさい帯血移植の成績を比較した。成人移植例は小児に比較して移植細胞数（凍結保存時細胞数で表した）は有意に少なく、生着不全の頻度も高い。また、非再発イベントの頻度が高く、無病生存率(DFS)も低かった。これは、生着症例のみで解析しても同様の結果であった。移植細胞数を揃えて比較しても、その成績は小児より劣っていた。しかし、移植細胞数が多いほど、その成績は良い傾向にあり、移植細胞数を増やすことによりその成績の向上がみられる可能性を示唆する成績が得られた。

A. 研究目的

近年、成人に対するさい帯血移植が急速に増加してきている。一方、成人さい帯血移植においては移植細胞数が少ないため生着不全・移植関連死の頻度が高くその成績は小児に比較して劣っているとの報告もみられる。今回、NPO 法人兵庫さい帯血バンク（近畿さい帯血バンクを含む）から提供した成人造血器悪性腫瘍に対する移植成績を小児移植例の成績と比較検討し、成人に対するさい帯血移植の特徴を明らかにし、その有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

（対象および解析）1997年9月から2002年12月末までにさい帯血移植が施行され、データが回収された90例（成人16歳以上45例、小児16歳未満45例）（表1）を対象とし、生着（生着率、好中球および血小板回復速度）、移植片対宿主病発症頻度、および非

再発イベント累積頻度（生着不全、自己造血回復、死亡をイベントとした）、無病生存率(DFS)、死因について成人と小児で比較検討した。

移植後好中球絶対数が $500/\mu\text{l}$ 以上に回復し3日以上持続した最初の日を生着日とした。また、Kaplan-Meier法により非再発イベント累積頻度、無病生存率(DFS)を求め、有意差検定はlogrank testにより行った。

（倫理面への配慮）さい帯血ならびに患者の移植後のデータ管理・解析にあたっては兵庫さい帯血バンク規程に準じその人権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

患者体重当たりのさい帯血凍結前有核細胞数、CD34陽性細胞数は、成人移植例が中央値 $2.58 \times 10^7/\text{kg}$ （範囲： $1.92-4.57 \times 10^7/\text{kg}$ ）、 $0.974 \times 10^5/\text{kg}$ （ $0.234-2.915 \times 10^5/\text{kg}$ ）、小児では $4.94 \times 10^7/\text{kg}$