

厚生労働科学研究研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)  
「臍帯血を用いた造血幹細胞移植の確立に関する研究」班  
分担研究報告書

間葉系幹細胞との共培養による臍帯血巨核球系前駆細胞の体外増幅に関する研究

分担研究者 原 宏 兵庫医科大学教授

研究要旨 ヒト間葉系幹細胞とヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を共培養し、臍帯血巨核球系前駆細胞の体外増幅を検討した。この培養系では、臍帯血巨核球系コロニー形成細胞を効果的に増殖した。

A. 研究目的

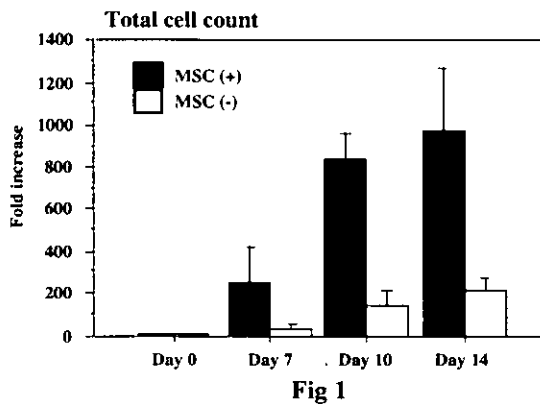
臍帯血移植では、骨髄移植等に比し造血回復の遅延が認められている。血小板の回復の促進を目的として、臍帯血巨核球系前駆細胞の体外増幅を検討した。

B. 研究方法

ヒト骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)を feeder layer とし、ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞(CD34<sup>+</sup>細胞) 1000 個を Flt3 ligand, stem cell factor, thrombopoietin の存在下に無血清で共培養し、巨核球系コロニー形成細胞(colony-forming units-megakaryocyte: CFU-MK)の体外増幅を検討した。

C. 研究結果

CD34<sup>+</sup>細胞を MSC 存在(+ )と MSC 非存在(-)条件下で培養した場合、総細胞数の増幅(Day0 を 1 とした倍率)は Fig.1 のように MSC(+ )で有意に多かった。



巨核球系コロニー形成細胞で検討すると増幅率(Day0 を 1 とした倍率)はすべてにおいて MSC 存在下で有意に高かった(Fig. 2)。培養開始後 7 日目では Mixed CFU-MK,

BFU-MK などの未熟な巨核球系前駆細胞の増幅がみられ、10 日目では成熟した巨核球系前駆細胞 CFU-MK(21-49)の増幅を認めた。14 日目では成熟したさらに成熟した CFU-MK(3-20)の有意な増幅がみられた(Fig. 2)。

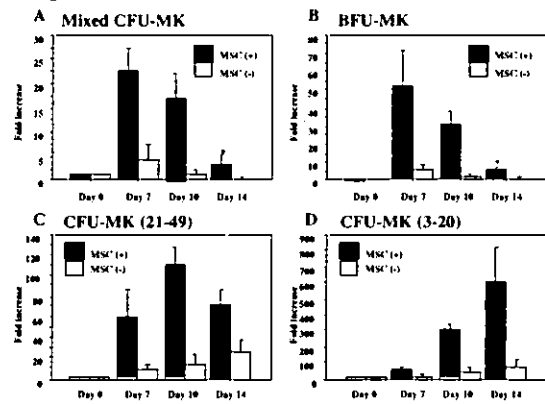


Fig. 2

Day0 に 1000 個の CD34<sup>+</sup>細胞を培養したとき各測定日の巨核球系前駆細胞数の総和をみると 10 日目にピークを示した (Fig. 3)

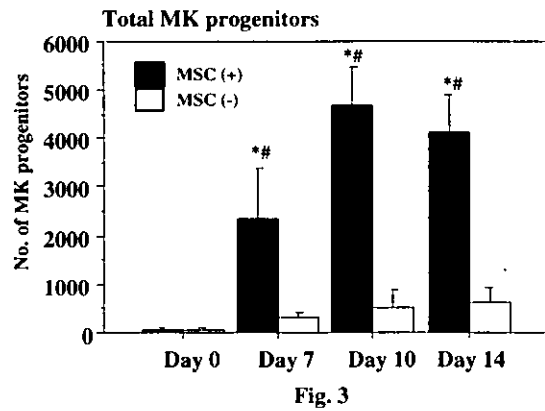


Fig. 3

D. 考察

MSC との共培養により、培養前期には未

熟巨核球系前駆細胞が増加し、培養後期には成熟した巨核球系前駆細胞細胞の著明な増幅がみられた。

E. 結論

ヒト MSC との共培養により、ヒト臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞から巨核球系前駆細胞を効果的に増幅することができた。本法で増幅した巨核球系前駆細胞は血小板回復促進に有用な可能性がある。

F. 健康危機情報

核当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

陳 明修, 藤盛 好啓, 大倉 伸彦, 甲斐 俊朗, 原 宏 (2004) ヒト間葉系幹細胞との共培養によるヒト臍帯血由来巨核球系前駆細胞

の体外増幅. 兵庫医科大学誌 (印刷中)

2. 学会発表

陳 明修, 藤盛好啓, 藤林由佳, 大倉伸彦, 西岡啓介, 甲斐俊朗, 原 宏(2003) ヒト間葉系幹細胞との共培養によるヒト臍帯血由来巨核球系前駆細胞の体外増幅. 第65回日本血液学会総会, 8.24, 大阪.

藤盛好啓, 陳 明修, 甲斐俊朗, 原 宏 (2004) 間葉系幹細胞との共培養による臍帯血巨核球系前駆細胞の体外増幅, 厚生科学研究補助金 (ヒトゲノム・再生医療等研究事業) 「臍帯血を用いた造血幹細胞移植の確立に関する研究」班, 班会議, 2.28, 東京.

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：臍帯血移植と HLA 適合性

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 臨床教授）

三澤真人（兵庫医科大学総合内科学 血液・腫瘍科 講師）

（要旨）造血器悪性腫瘍 91 例に対する臍帯血移植において HLA 適合性と移植成績の関連について検討した。HLA 適合度が高い程(5-6 適合 vs 3-4 適合)、好中球生着率が高く、移植関連死亡率(TRM)、無イベント生存率(EFS)も良好であるという結果が得られた。重症 AGVHD の発症率も有意に低かった(単変量解析)。Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析では、HLA 適合度は好中球生着と重症 AGVHD 発症に有意な影響を及ぼしていたが、一方 TRM、EFS や再発率には有意な関連は認めなかった。

また、臍帯血選択の上で問題になる HLA 適合度と細胞数に関して検討したところ、単変量解析ではあるが、細胞数が少ない場合には HLA 適合度が高い臍帯血を移植した方が生存率が良好であり、移植細胞数が多い場合(NCC;  $3 \times 10^7/\text{kg}$  以上)には HLA 適合度は EFS に有意な影響を及ぼしていないことが明らかになった。

#### A. 研究目的

造血幹細胞移植療法の一つである臍帯血移植(CBT)は、移植に至るまでの迅速性、ドナーリスクの回避、T 細胞の未熟性の故に HLA 不一致移植可能でありそのため移植可能な臍帯血 unit が容易に見いだせる等の理由から近年急速に増加の一途をたどり、我が国においては平成 15 年 12 月末までに既に 1300 例の以上の移植が施行された。

その多くは HLA 不適合移植であるが、臍帯血移植における HLA 適合度に関しては一定の見解は得られていないのが現状である。今回、NPO 法人兵庫さい帯血バンクから提供した移植例について HLA 適合度と移植成績に関して解析したので報告する。

#### B. 対象および方法

1997 年 9 月以降、全国 51 移植施設(表 1)において造血器悪性腫瘍に対して骨髓破壊の前処置により UCBT が施行され、データが回収された 91 例(表 2)を対象とした。再移植および複数臍帯血移植症例は解析から除いた。年齢(16 歳以上 vs 未満)、性、体重(47kg 以上 vs 未満)、ドナー・レシピエントの ABO 適合性、HLA 適合度(5-6 適合 vs 3-4 適合)、疾患、移植病期(standard risk 群 vs high risk 群)、移植有核細胞数

( $3.0 \times 10^7/\text{kg}$  以上 vs 未満)、CD34 陽性細胞数( $1.0 \times 10^5/\text{kg}$  以上 vs 未満)、CFU-GM 数( $1.7 \times 10^4/\text{kg}$  以上 vs 未満)、移植片対宿主病(GVHD)予防法(MTX を含んでいるか否か、単剤か 2 剤以上の GVHD 予防か、ciclosporine か FK506 か)の各因子が、生着(生着率、好中球および血小板回復速度)、急性 GVHD 発症頻度、移植関連死亡率(TRM)、再発率、無イベント生存率(EFS)にどのような影響を及ぼしているかを解析した。なお、生着不全・自己造血回復、再発、死亡をイベントとし、HLA は HLA-A、B は血清学的タイピング、HLA-DRB1 は high resolution DNA タイピングによった。standard risk 群とは急性白血病初回あるいは第 2 寛解期、慢性骨髄性白血病初回あるいは第 2 慢性期移植であり high risk 群はその他の病期の移植を示し、移植細胞数は凍結保存時の細胞数で示した。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。Kaplan-Meier 法により TRM、再発率、DFS を求め、有意差検定は log-rank test により行った。log-rank test により  $p < 0.1$  を示す因子に関しては Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。

#### C. 研究結果

Kaplan-Meier 法による移植後 60 日にお

ける好中球 500/ $\mu$ l 以上の到達率、移植後 180 日における血小板 50000/ $\mu$ l 以上の到達率はそれぞれ 81% および 87.5% であった。好中球および血小板が上記の値に回復するまでに要した期間はそれぞれ 13-42 日 (中央値: 22 日, n=66) および 29-207 日 (中央値: 52 日, n=49) であった。

単変量解析では、移植 CD34 陽性細胞数、HLA 適合度が好中球生着に有意な影響を及ぼしていたが、多変量解析では HLA 適合度だけが有意な影響を及ぼす因子であった (表 3, 図 1)。血小板生着には、移植有核細胞数 (NCC)、CD34 陽性細胞数、CFU-GM 数、移植病期、GVHD 予防法 (MTX を含むか否か) が単変量解析で有意な影響を及ぼしていたが多変量解析では有意な因子は認めなかった (表 3)。早期死亡が 7 例 (8%)、生着不全および自己造血回復が 14 例 (早期死亡を除く 84 例中 17%) にみられ、HLA の拒絶方向の一致度と早期死亡、生着不全および自己造血回復率をみると表 4 に示したように HLA3-4 適合移植の方が 5-6 適合移植に比べ早期死亡、生着不全・自己造血回復率が高かった。

重症急性 GVHD 発症には HLA 適合度 (発症率; 3-4 適合 24% vs 5-6 適合 4%, HR 0.120, 95%CI; 0.015-0.936, p=0.0431) が、また移植後再発率には移植時病期 (standard risk 36% vs high risk 65.3%, HR 2.518, 95%CI; 1.093-5.801, p=0.0301) だけが多変量解析で有意な影響を及ぼしていた (図 2)。

単変量解析では移植関連死 (TRM) には、患者年齢、体重、NCC、HLA 適合度が、また、EFS には患者年齢、NCC、HLA 適合度および移植病期が有意に関連していた。しかし、Cox 比例ハザード法による多変量解析では、年齢が 16 歳以下の症例ほど、また HLA 適合度高い程 TRM が低い傾向にあり、また high risk 移植群、HLA 適合度が高い方が EFS が良くなる傾向があるものの有意な影響はみられなかった (表 5)。

HLA 5/6 適合症例について class I (HLA-A あるいは -B 不適合) あるいは class II (DRB1) の不適合の違いにより EFS に差があるかどうか検討したが両群間に有意差は認めず (class I vs class II 不適合; 53% vs 63%)、4/6 適合症例について class I あるいは class II 単独の不適合あるいは class I + class II 不適合間で検討してもそれぞれの間には有意差は認めなかった (class I または II 単独不適合

vs class I + II 不適合; 20% vs 24%)。

次に、単変量解析ではあるが EFS に影響を及ぼした 4 因子のうち、移植実施に当たって臍帯血選択で問題になる HLA 適合度と NCC の 2 因子について HLA 5-6 適合で NCC  $3 \times 10^7$ /kg 以上 (A) であるいは未満 (B) の臍帯血移植を受けた群、HLA 3-4 適合で NCC  $3 \times 10^7$ /kg 以上 (C) あるいは未満 (D) の臍帯血移植を受けた群の 4 群に分けて EFS を検討した。Kaplan-Meier 法による EFS は (A), (B), (C), (D) 群それぞれ 49%, 68%, 35% および 10% であり、NCC  $3 \times 10^7$ /kg 未満の移植群において HLA 5-6 適合 (n=13) と 3-4 適合移植群 (n=32) の間 (B vs D; p=0.0194) に、また、HLA 3-4 適合移植群において NCC  $3 \times 10^7$ /kg 未満 (n=32) と以上 (n=27) の群の間 (C vs D; p=0.0199) に有意差を認めた。(B) 群、(D) 群には standard risk 移植例がそれぞれ 3 例 (3/13; 23%) および 9 例 (9/32; 28%)、また、16 歳以上の成人移植例が 12 例 (12/13; 92%) および 27 例 (27/32; 84%) 含まれておりその背景には有意差がなかった。一方、(C) 群には standard risk 移植例が 14 例 (14/27; 61%) 成人移植例が 9 例 (9/27; 33%) 含まれており、(C) 群と (D) 群の背景を比較すると (C) 群には standard 移植例、小児例が有意に多く含まれていた。(A) 群には standard risk 移植例 10 例 (10/19; 53%)、成人例が 3 例 (16%) 含まれており、(C) 群と比較して (A) 群には若干成人例が多いものの、この両群間に EFS に有意差はみられなかった (A vs C; 49% vs 35%) (図 3)。

#### D. 結論と考察

従来の報告によると、臍帯血移植においては HLA 適合度は移植細胞数や CD34 陽性細胞数とともに、好中球生着や血小板生着が関連するが、GVHD 発症率には関連しないとの報告が多い。今回の我々の成績では多変量解析においても HLA 適合度は好中球生着率とともに重症 GVHD の発症にも有意な影響を及ぼす因子であるとの結果が得られた。一方、TRM には HLA の不適合の数や NCC が、また生存率には、年齢、NCC、CD34 陽性細胞数、患者の CMV 既感染の有無あるいは臍帯血移植を受けた年代が関連しているとの報告がみられる。今回の解析の結果からは、単変量解析では TRM に年齢、体重、NCC、HLA 適合度の 4 因子がまた、EFS には年齢、

NCC、HLA 適合度、移植時の病期の4因子がそれぞれ関連していたが多変量解析の結果からはいずれの因子も有意な関連はみられなくなった。

単変量解析ではあるが EFS に有意な影響を及ぼした4因子のうち、移植実施に当たって臍帯血選択の上で問題になる HLA 適合度(5-6 適合 vs 3-4 適合)と NCC( $3 \times 10^7/\text{kg}$  以上 vs 未満)の2因子によりそれぞれ4群に分けて EFS を検討したところ、NCC の少ない( $3 \times 10^7/\text{kg}$  未満)の場合には HLA 適合度が高い臍帯血を移植した群が HLA 適合度の低い臍帯血を移植した群と比較しての有意に生存率が良好であり、移植細胞数が多い場合(NCC;  $3 \times 10^7/\text{kg}$  以上)には HLA 適合度は EFS に有意な影響を及ぼしていないことが明らかになった。(これらの比較群間においては単変量解析で EFS に影響を及ぼした他の因子である移植病期、年齢に関して患者背景には有意差を認めなかった。)

これらの結果から、臍帯血選択時において細胞数(NCC)が  $3 \times 10^7/\text{kg}$  以上の臍帯血が見つからない場合には HLA 適合度が高いものを選択することにより成績の向上に繋がることが期待される。また、 $3 \times 10^7/\text{kg}$  以上の細胞数の多い臍帯血を移植することにより、EFS に対する HLA 適合度の影響が低くなることが示唆された。

#### E. 健康危険情報 該当なし

#### F. 研究発表 論文発表

1) Nishihira H, Kato K, Isoyama K, Takahashi TA, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H.: 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.* 2003 Feb;120(3):516-22.

2) Isoyama K, Ohnuma K, Kato K, Takahashi T, Kai S, Kato S, Takanashi M, Sato N, Sato H, Kitajima K, Naoe T, Saito H, Nishihira H.: Cord blood transplantation from unrelated donors: A preliminary Report from the Japanese

Cord Blood Bank Network. *Leukemia & Lymphoma* 44(3),429-438,2003.

3) Qiu H, 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 Research* 12;39-46,2003.

4) Kai S, Hara H.: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 7(3);285-291,2003.

5) Tanaka H, Kai S, Yamaguchi M, Misawa M, Fujimori Y, Yamamoto M, Hara H.: Analysis of natural killer (NK) cell activity and adhesion molecules on NK cells from umbilical cord blood. *Eur J Haematol.* 71: 29-38,2003.

6) Nishioka K, Fujimori Y, Hashimoto-Tamaoki T, Kai S, Qiu H, Kobayashi N, Tanaka N, Westerman K, Leboulch P, Hara H.: Immortalization of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells by removable simian virus 40T antigen gene: Analysis of the ability to support expansion of cord blood hematopoietic progenitor cells. *International J of Oncology* 23;925-932,2003.

#### 学会発表

1) 甲斐俊朗: シンポジウム「造血幹細胞移植の応用」非血縁さい帯血移植、2003.5.30, 第51回日本輸血学会総会(北九州)

2) 甲斐俊朗、三澤真人、山本益嗣、高橋隆幸、小泉民雄、小阪嘉之、園田 隆、原 宏: 造血器悪性腫瘍に対する非血縁さい帯血移植: 兵庫さい帯血バンクからの報告、第65回日本血液学会・第45回臨床血液学会合同総会(ワークショップ)、2003.8.29(大阪)

3) 甲斐俊朗: ドナーアフェレーシスの課題「顆粒球輸血の課題」(ミニシンポジウム)、第23回日本アフェレーシス学会学術大会、2003.10.4 (東京)

4) Kai S: シンポジウム「臍帯血移植」、Clinical results of multiple unit cord blood transplantation in Japan; preliminary report of phase I/II clinical study. 第26回日本造血細胞移植学会、2003.12.19 (横浜)

5 ) S.Kai: Special lecture, Double unit cord blood transplantation in Japan. The 8th Winter Meeting of Korean Society of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2004.2.5-7. (Muju)

G. 知的所有権の出願・取得状況  
該当なし

移植実施施設 51 施設  
表 1, 移植実施施設

旭川赤十字小児科, 札幌医大小児科, 北大血液内科, 秋田大第 3 内科,  
東北大血液免疫内科, 千葉大第 2 内科, 成田赤十字病院, 自治医大血液科,  
慶応大血液内科, 慶応大小児科, 帝京大学内科, 都立駒込病院, 都立府中病院  
虎の門病院血液科, 日本医大第 3 内科, 日本大学板橋病院, 東京大学小児科,  
東大医科研, 国立がんセンター, 東邦大森病院, 横浜市大 1 内, 横浜市大小児科,  
神奈川県立がんセンター血液科, 神奈川県立こども病院, 静岡県立こども病院,  
静岡県立総合病院第 1 内科, 金沢大小児科, 名古屋第一赤病院血液内科,  
名古屋第二赤血液内科, 滋賀医大小児科, 京都大血液腫瘍内科, 京大小児科,  
大阪市立総合医療センター, 大阪大第 3 内科, 大阪大小児科, 松下記念病院  
大阪府立成人病センター, 大阪府立母子保健総合医療センター,  
りんくう総合医療センター, 兵庫医大血液腫瘍科, 兵庫医大小児科, 神戸大小児科,  
神戸大血液腫瘍科, 兵庫県立成人病センター, 徳島大小児科, 愛媛県立中央病院,  
九大第 1 内科, 浜の町病院内科, 聖マリア病院, 国立熊本病院, 今村病院分院内科

兵庫さい帯血バンク臨床評価委員会

小泉民雄, 小阪嘉之, 園田 隆, 高橋隆幸, 山本益嗣, 甲斐俊朗

表 3 好中球生着および血小板生着に関連する因子

Neutrophil engraftment		log-rank test		
uni-variate analysis				
CD34+ (x10 <sup>7</sup> /kg)	1.0<	n=57	81.7%	0.0354
	1.0>	n=32	77.6%	
HLA	5-6 match	n=32	90.3%	0.0040
	3-4 match	n=58	74.4%	
multi-variate analysis				
HLA	HR 1.857 (95%CI: 1.119-3.082)		p=0.0166	
Platelet engraftment				
uni-variate analysis				
NCC (x10 <sup>7</sup> /kg)	3=<	n=46	100%	0.0202
	3>	n=44	65.3%	
CD34+ (x10 <sup>7</sup> /kg)	1.0<	n=57	89.8%	0.0159
	1.0>	n=32	78.0%	
CFU-GM (x10 <sup>4</sup> /kg)	1.7=<	n=50	100%	0.0100
	1.7>	n=40	66.3%	
Disease status at CBT	High risk	n=54	75.4%	0.0172
	Standard risk	n=36	100%	
GVHD prophylaxis	MTX(-)	n=30	68.7%	0.0342
	MTX(+)	n=57	100%	

表 4, HLA 適合度と生着不全, 早期死亡

HLA compatibility (HvG vector)	No. of Pt	Early death	Graft failure Autorecovery	Survivor without disease
3/6	14	1 (7%)	2 (14%)	2
(I-1,II-2)	8	0	0	1
(I-2,II-1)	6	1	2	1
4/6	38	5 (13%)	10 (26%)	12
(I-2)	4	0	1	1
(II-2)	5	0	3	1
(I-1,II-1)	29	5	6	10
5/6	28	1 (4%)	1 (4%)	16
(I-1)	17	0	1	8
(II-1)	11	1	0	8
6/6	11	0	1 (9%)	7
Total	91	7 (8%)	14 (15%)	37

表 2, Patient's characteristics

No. of Patients	n= 91		
Median age(range)	21 yr (4 Mo - 60 yr)		
Body weight	45kg (4.4 - 80.8 kg)		
Gender (male/ female)	53/38		
Diagnosis			
ALL	30	AML	30
CML	17	Malignant lymphoma	5
others	9		
Disease status at CBT			
Standard risk	36		
High risk	55		
Cell dose (before freezing)			
NCC (x10 <sup>7</sup> /kg)	3.01 (range:1.69 - 19.93)		
CFU-GM (x10 <sup>4</sup> /kg)	1.89 (range:0.41 - 12.18)		
CD34+ cells (x10 <sup>7</sup> /kg)	1.360 (range:0.234 - 38.313)		
ABO compatibility			
Matched	26		
Minor mismatched	19		
Major mismatched	44		
Not reported	2		
HLA compatibility (A,B; serology, DRB1; DNA high resolution)			
	GVH vector	HVG vector	
3/6 match	14 (15%)	14 (15%)	
(I-1,II-2)	8	6	
(I-2,II-1)	6	8	
4/6 match	38 (42%)	38 (42%)	
(I-2)	4	4	
(II-2)	6	5	
(I, II)	28	29	
5/6 match	31 (34%)	28 (31%)	
(I)	19	17	
(II)	12	11	
6/6 match	8 (9%)	11 (12%)	

(Hyogo Cord Blood Bank, as of 31/Dec, 2003)

表 5, TRM および EFS に影響を及ぼす因子

TRM		prob. TRM		logrank test
uni-variate analysis				
Age	adults	n=51	47.9%	0.0014
	children	n=40	10.7%	
Body weight	47kg=<	n=48	18.7%	0.0330
	47kg>	n=43	44.1%	
NCC	3.0=<	n=46	14.9%	0.0027
	3.0>	n=45	46.9%	
HLA	5-6 match	n=32	9.6%	0.0077
	3-4 match	n=59	41.3%	
multi-variate analysis				
Age	HR 0.262 (95% CI: 0.068 - 1.014)		p=0.0524	
HLA	HR 0.309 (95% CI: 0.091 - 1.052)		p=0.0601	
EFS				logrank test
uni-variate analysis				
Age	adults	n=51	26.8% (1yr)	0.0234
	children	n=40	44.4% (5yr)	
NCC (x10 <sup>7</sup> /kg)	3.0=<	n=46	40.8%	0.0268
	3.0>	n=45	21.1%	
HLA	5-6 match	n=32	54.4%	0.0146
	3-4 match	n=59	22.6%	
Disease status at CBT	High risk	n=55	20.4% (4yr)	0.0271
	Standard risk	n=36	47.9% (5yr)	
multi-variate analysis				
Disease status	HR 1.977 (95% CI: 0.995 - 3.927)		p=0.0515	
HLA	HR 0.559 (95% CI: 0.278 - 1.121)		p=0.1013	

### HLA compatibility (HvG direction)

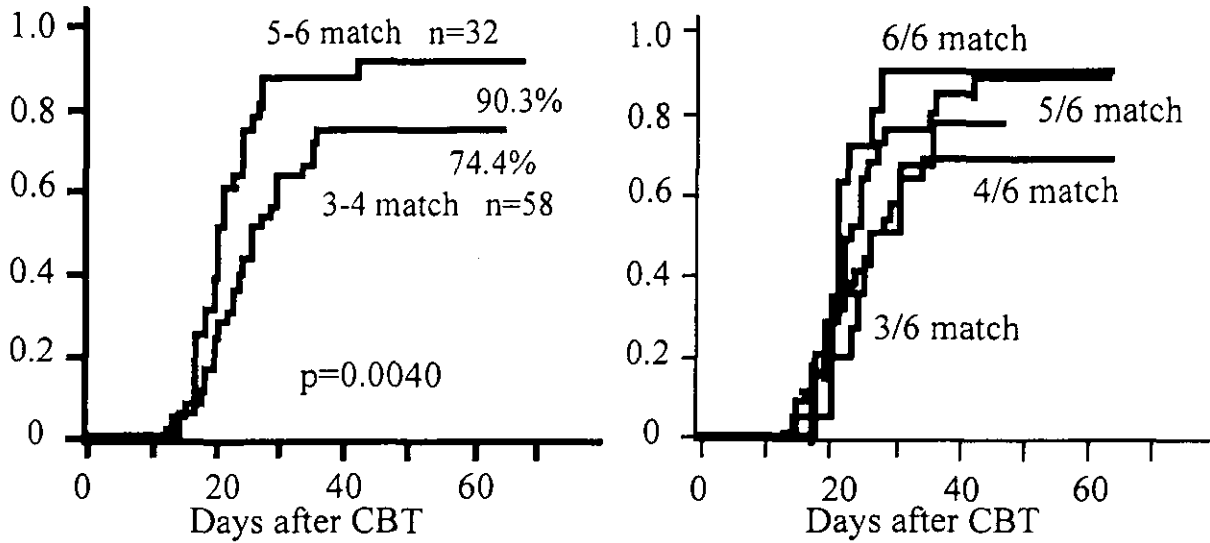


図1、好中球生着とHLA適合性

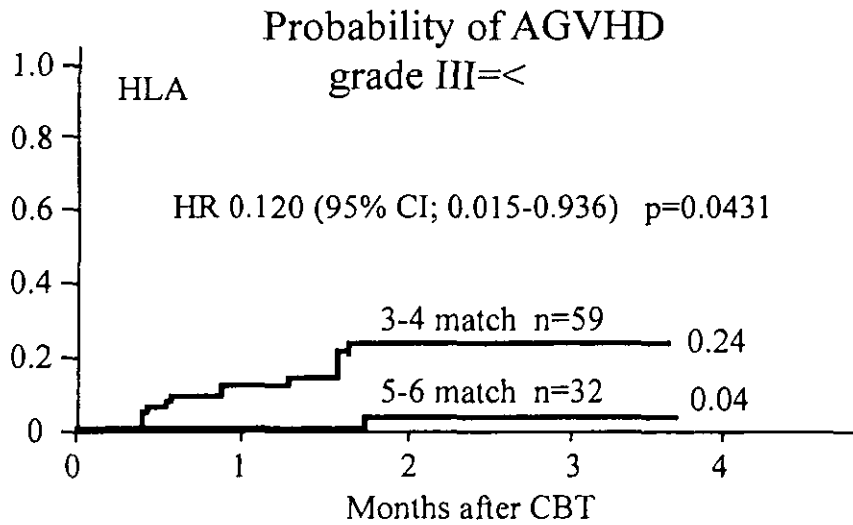


図2、HLA適合度と急性GVHD

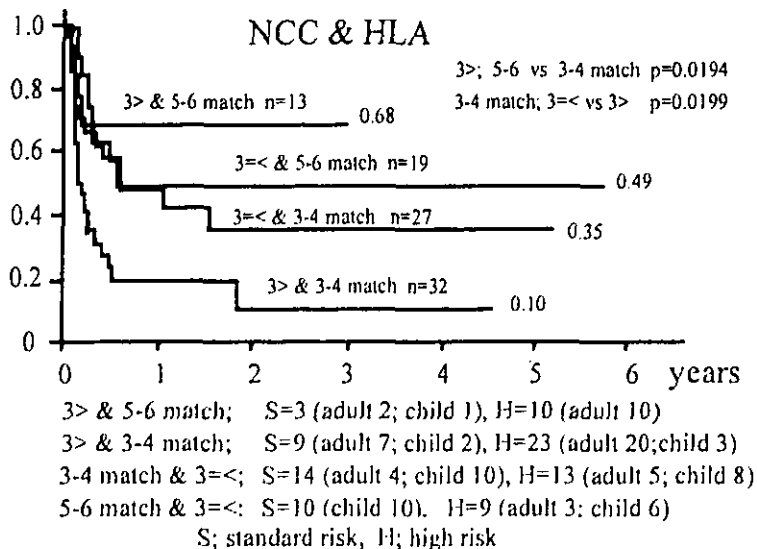


図3、臍帯血有核細胞数およびHLA適合度と無イベント生存率(EFS)



分担研究報告書

研究課題 造血幹細胞の増幅とその臨床応用に関する研究

分担研究者 堀田知光 東海大学医学部・教授

研究要旨：本年度は増幅されたヒト臍帯血幹細胞の造血幹細胞(SRC)測定のための骨髓内移植法を開発した。従来体外プロセッシングを受けた細胞は生着能が低下することが報告されていたが、本法はそのような細胞にも応用可能であり臨床応用が期待される。

**A. 研究目的**

臍帯血の体外増幅法を開発し、その有効性、安全性について検討する。そのために  
1) 骨髓ストローマ細胞を利用しない体外増幅法の開発、2) 増幅幹細胞の分化能、特に免疫細胞への分化能を解析可能な系の確立、3) 検出感度の高いヒト造血幹細胞アッセイ法の確立を行う。

**B. 研究方法**

1. 昨年度マウス骨髓ストローマ細胞 HESS-5 は支持能の低い MS-5 と比較して、Delta-1 の遺伝子発現が高いこと見出した。本年度はその増幅活性を確認するため、発現ベクターに Delta-1 遺伝子を導入しリコンビナント Delta-1 蛋白を大腸菌により作成した。
2. 臍帯血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID/ $\gamma$ <sub>c</sub> マウスに増幅前および増幅後の CD34<sup>+</sup>細胞を移植し、経時的に各種組織中のヒト細胞の存在および分化をフローサイトメトリーで解析した。
3. 臍帯血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウス骨髓内に移植して定量的 SRC アッセイを行った。

**C. 研究結果と考察**

1. SDS-PAGE により Delta-1 蛋白の産生を確認した。2004 年度は本蛋白を生成して生物活性を確認する。
2. 昨年度は実験動物中央研究所の伊藤らが開発した NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$  欠損 (NOG) マウスを利用することにより臍帯血 CD34<sup>+</sup>細胞が成熟 T 細胞まで分化することを確認した。本年度は B 細胞の分化過程を解析し B1 細胞が優位であることを示した。(研究発表 3)
3. 骨髓内移植法は従来の経静脈的投与と比較して 15 倍の SRC 検出感度があり、増幅幹細胞にも応用可能であることを見いだした。(研究発表 1)

**E. 結論**

検出感度の高いヒト造血幹細胞アッセイ法として骨髓内移植法を開発した。従来体外増幅のようなプロセッシングを受けた造血幹細胞は生着能が低下することが報告されていたが、本法はそのような細胞にも応用可能であり臨床応用が期待される。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yahata T, Ando K, Sato T, Nakamura Y, Muguruma Y, Kato S, Hotta T.: A highly sensitive strategy for scid-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. Blood 101: 2905-2913, 2003.
- 2) C.Ito, H.Sato, K.Ando, S.Watanabe, F.Yoshiba, K.Kishi, A.Furuya, K.Shitara, S.Sugimoto, H.Kohno, A.Hiraoka, & T.Hotta.: Serum stem cell growth factor (SCGF) for monitoring hematopoietic recovery following stem cell transplantation (SCT). Bone Marrow Transplant 32:

391-398, 2003.

- 3) Matsumura T, Kametani Y, Ando K, Hirano Y, Katano I, Ito R, Shiina M, Ito M, Motoyoshi K, Habu S. CD5+ B cells (B1 cells) develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/gcnull (NOG) mice transplanted with human umbilical cord blood, bone marrow and mobilized peripheral blood CD34+ cells. Exp Hematol 31: 789-797, 2003.
- 4) Muguruma Y, Nakamura Y, Sato T, Matsuzawa H, Akatsuka A, Yahata T, Miyatake H, Ando K, Kato S, Hotta T.: In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. Exp Hematol 31: 1323-1330, 2003

## H. 知的財産権の出願・登録状況

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）  
分担研究報告書

臍帯血移植患者血清中のHLA抗体が臍帯血移植に及ぼす影響に関する検討

分担研究者 加藤俊一 東海大学医学部基盤診療学系・教授  
研究協力者 佐藤薫、中塩屋千絵、土田文子、板垣浩行、杉本達也、  
佐藤真理、佐々木ひとみ、飯塚幸人、福澤由紀子、太田  
祥江、小林信昌（東海大学さい帯血バンク、細胞移植再  
生医療科）

研究要旨

非血縁者間臍帯血移植における生着不全の原因として移植患者におけるHLA抗体が関与しているか否かの検討を行った。HLA抗体の有無を検査しえた82例中19例（23%）にクラスI、クラスIIのいずれか、あるいは両方に対する抗体が検出された。78例中ドナー臍帯血の生着を評価できた61例中15例（25%）でHLA抗体が認められたが、抗体の有無と生着の有無との相関関係は認められなかった。また、好中球の生着速度についても抗体の有無による影響は認められなかった。

今回の検討は患者と移植臍帯血との間の直接的な特異抗体を見たものではないが、患者血清中の抗体が臍帯血の生着不全の直接的な原因となっている可能性は低いのではないかと考えられた。

A. 研究目的

臍帯血移植においては高頻度で生着不全があり、移植法としての短所となっている。生着不全の原因としては、免疫学的な拒絶、造血能力の不足の2点が考えられている。免疫学的な機序としては、液性免疫によるものと細胞性免疫によるものがありえる。液性免疫としてはHLA抗原に対する抗体と非HLA組織適合抗原に対する抗体とが想定される。

今回、液性免疫のうち患者血液中のHLA抗体が臍帯血移植後の生着不全に関与している可能性を検討した。

B. 研究方法

1) 対象

東海大学さい帯血バンクから臍帯血を

提供し移植が実施された218例の内、移植直前の患者血清サンプルが残存し、移植後の経過について詳細な報告がなされている82例を対象とした。

2) 方法

Flow PRA I & II Screening Test (One Lambda 社) を用い、患者血清中のHLAクラスI、クラスII抗体を測定した。

Flow PRA (Panel Reactive Antibodies) 法とは、複数のHLA抗原分子を結合させたマイクロビーズと患者血清を反応させ、その後FITC標識anti human-IgGを加え、70-サイトメーターにて測定し、得られたヒストグラムより血清中の抗体の有無を評価する方法である。

3) 生着

主治医より報告された移植結果調査票

により、臍帯血の生着の有無を判定した。また、好中球が  $500/\mu\text{l}$  に達した日を好中球生着日として、累積生着率を Kaplan-Meier 法にて検討した。

(倫理面での配慮)

検査にあたっては、患者ならびに臍帯血の匿名化を行い、プライバシーの保護に十分な配慮をした。

### C. 研究結果

#### 1. 患者血清中のHLA抗体の頻度

HLA抗体の有無を検討しえた82検体における結果を表1に示した。

クラスI抗体の陽性率は21%、クラスII抗体の陽性率は7%、いずれか一方もしくは両方が陽性であったは23%であった。

表1. 患者血清中のHLA抗体の有無

		クラスI		合計
		陽性	陰性	
ク ラ ス II	陽 性	4 (5%)	2 (2%)	6 (7%)
	陰 性	13 (16%)	63 (77%)	76 (93%)
合計		17 (21%)	65 (79%)	82

#### 2. 生着

生着についての正確な情報がえられたのは78例で、①完全なドナー生着40例(51%)、②安定した混合キメラ4例(5%)、③一時的な生着後の拒絶7例(9%)、④自己回復2例(3%)、⑤不生着(生着不全)8例(10%)、⑥未生着(評価不能)17例(22%)であった。

生着についての評価が可能である61例について、①、②を生着あり、③、④、⑤を生着なしとして、患者血清中の抗体の

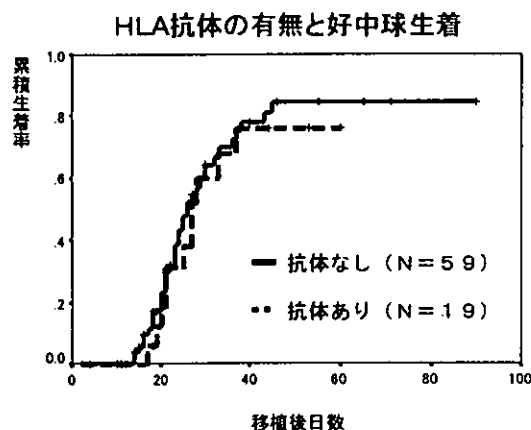
有無との関係を表2に示した。

表2. HLA抗体の有無と生着

		生着		合計
		あり	なし	
抗 体	なし	34 (74%)	12 (26%)	46
	あり	10 (67%)	5 (33%)	15
合計		44 (72%)	17 (28%)	61

#### 3. 好中球生着速度

好中球が  $500/\mu\text{l}$  に到達する日までの累積生着率をHLA抗体の有無で比較したが、両者の間に有意の差は認められなかった(図1)。



### D. 考案

今回の検討は少数例であり、HLA抗体全体としての有無のみを検討したものであるため、移植された臍帯血そのものに対するHLA抗体の影響を正確に評価できるものではない。

今後HLA抗原特異抗体との関連を検討するためには、HLA抗原既知のパネル細胞を用いて特異性を明確にしなければならない。また、HLA抗体以外の抗体も含めた交差試験によっても間接的ながら

検討は可能かと思われる。

#### E. 結論

非血縁者間臍帯血移植における患者血清中のHLA抗体の有無が移植後の生着に与える影響について予備的な検討を行った。HLA抗体の存在が移植後の生着に強く影響してい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

小寺良尚・加藤俊一編集「必携造血細胞移植」: 執筆担当; 歴史; 2-7、治療原理; 8-14, 先天性疾患 379-390, 医学書院、2004.

##### 2) 原著論文

Yahata T, Kato S, et al. A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow. *Blood*. 2003;101:2905-13.

Hagihara M, Kato S, et al. The in vitro generation of Ph1+ ALL-specific HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes using a synthetic 16 mer minor bcr-abl peptide. *Leuk Res*. 2003;27:253-7.

Hagihara M, Kato S, et al. Increased frequency of CD3/8/56-positive umbilical cord blood T lymphocytes after allo-priming in vitro. *Ann Hematol*. 2003 82:166-70.

Gansuud B, Kato S, et al. Umbilical cord blood dendritic cells are a rich source of soluble HLA-DR: synergistic effect of exosomes and dendritic cells on autologous or allogeneic T-Cell proliferation. *Hum Immunol*. 2003;64:427-39.

Inoue H, Kato S, et al. The kinetics of immune reconstitution after cord blood transplantation and selected CD34+ stem cell transplantation in children: comparison with bone marrow trans-

plantation. *Int J Hematol* 2003 77:399-407.

Ueda Y, Kato S, et al. The effects of alphaGalCer-induced TCR Valpha24 Vbeta 11(+) natural killer T cells on NK cell cytotoxicity in umbilical cord blood. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 52:625-31.

Yoshihara F, Kato S, et al. Complete resolution of severe chronic active Epstein-Barr virus infection by cultured, activated donor T lymphocyte infusion after nonmyeloablative stem cells allografting. *Bone Marrow Transplant*. 2003 32:107-10.

Hagihara M, Kato S, et al. Clinical effects of infusing anti-Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T-lymphocytes into patients with severe chronic active EBV infection. *Int J Hematol*. 2003 78:62-8.

Tsuboi K, Kato S, et al. Multivariate analysis of risk factors for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2003 32:903-7.

Ueda Y, Kato S, et al. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol*. 2003 64:1144-51.

Muguruma Y, Kato S, et al. In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol*. 2003 31:1323-30.

Yasuda Y, Yabe H, Kato S, et al. Comparison of PCR-amplified JC virus control region sequences from multiple brain regions in PML. *Neurology*. 2003 Dec 9;61(11):1617-9.

Tazume K, Hagihara M, Kato S, et al. Induction of cytomegalovirus-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes from seropositive or negative healthy subjects or stem cell transplant recipients. *Exp Hematol*. 2004 Jan;32(1):95-103.

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

### 臍帯血移植の安全性に関する検討

分担研究者 小澤敬也 自治医科大学 医学部 内科学講座血液学部門 教授

#### 研究要旨

臍帯血は臍帯血バンクから供給されるという特殊性から、将来的には「細胞医薬」として扱われる可能性がある。そこで、臍帯血移植の安全性に関するワーキンググループを設置し、臍帯血が医薬品として扱われるようになった場合を想定した上で、臍帯血の有効性ならびに安全性を担保するために必要な事項（医薬品としての臍帯血の定義）について検討した。

#### A. 研究目的

我が国では臍帯血移植の成人患者への適応拡大と共に、移植数の急速な増大が見られている。一方、臍帯血は臍帯血バンクから供給されるという特殊性から、将来的には「細胞医薬」として扱われる可能性がある。そこで、医薬品（血液製剤）と比較して同等の安全性を確保するために必要な事項を検討し、臍帯血バンクが今後取り組むべき課題を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

臍帯血移植の安全性に関するワーキンググループ（下記）を設置し、臍帯血が医薬品として扱われるようになった場合を想定した上で、臍帯血の有効性ならびに安全性を担保するために必要な事項について検討を行った。

#### 委員長

小澤 敬也 自治医科大学医学部教授

#### 委員

岡田 義昭	国立感染症 血液・安全性研究部第一室長
佐々木次雄	国立感染症 細菌第二部第二室長
佐藤 典宏	北海道大学医学部附属病院輸血部副部長
高梨美乃子	東京都赤十字血液センター技術部研究第二課長
高橋 恒夫	東京大学医科学研究所客員教授
平井 耕作	日本赤十字社血液事業部参事

#### （倫理面への配慮）

本研究は、倫理的な問題が生ずることはないと考えている。

#### C. 研究結果

- 1) 臍帯血の定義について：臍帯血の有効性を担保するための事項としては、性状、分量、生細胞数、造血幹細胞数（コロニー形成細胞数、CD34 陽性細胞数で代替する）、HLA 型、製造日などの記載が必要になる。また、臍帯血の安全性を担保するための事項としては、感染性微生物のチェック（HCV、HBV、HIV などに対する NAT、無菌試験、Quarantine、ドナーの間診など、現在の輸血用血液と同レベルの検査）が必要となる。
- 2) 定義を満たす臍帯血製造に関しては、「構造設備基準」ならびに「生物由来原料基準」の観点から具体的検査項目を決定する必要がある。例えば、ドナー選択基準、ドナー感染症等検査、造血幹細胞収集法、保存方法、汚染防止措置、工程内試験などが必要であると議論された。

#### D. 考察

我が国では、現在稼働している臍帯血バンクの調査が過去に実施されたことはあるが、医薬品としての観点から安全性の検討が行われたことはない。そこで、有効性と安全性の点で医薬品としての規格を満たす臍帯血の製造が行われているかどうか判断するための具体的検査項目を検討した。米国では、FDA（食品医薬品局）において、臍帯血を医薬品として規制する方向で検討が進んでおり、国際

協調の観点からも、我が国の体制を整備していく必要性が発生するものと予想される。本研究班（臍帯血移植の安全性に関するワーキンググループ）は、そのような事態に備え、予め諸問題を検討しておくのが狙いである。薬事法に基づく品目承認を臍帯血に与える場合には、規格及び試験方法、製造方法、効能効果・用法用量を示す必要がある。また、各臍帯血バンクは医薬品製造業の許可を得る必要性が発生し、細胞処理・保存施設は「医薬品製造工場」として営利事業を行うこととなり、ハード、ソフトの両面で医薬品 GMP に適合することを求められるようになるといった点が、今後の大きな課題になると思われる。本年度の議論を踏まえて、次年度は各臍帯血バンクを査察し、医薬品としての規制がかけられた場合に必要となる設備や体制の改善策を明らかにしていく計画である。

#### E. 結論

今後大きな発展が予想される臍帯血移植において、臍帯血が医薬品として規制を受けるようになる可能性があり、有効性及び安全性の観点から考慮すべき事項を明らかにした。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表（原著論文）

1) Itoh A, Okada T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mizukami H, Kume A, Takatoku M, Komatsu N, Hanazono Y, and Ozawa K: A soluble CAR-SCF fusion protein improves adenoviral vector-mediated gene transfer to c-Kit-positive hematopoietic cells. *J Gene Med* 5: 929-940, 2003.

2) Asano T, Ageyama N, Takeuchi K, Momoeda M, Kitano Y, Sasaki K, Ueda Y, Suzuki Y, Kondo Y, Torii R, Hasegawa M, Ookawara S, Harii K, Terao K, Ozawa K, and Hanazono Y: Engraftment and tumor formation after allogeneic in utero transplantation of primate embryonic stem cells. *Transplantation* 76: 1061-1067, 2003.

3) Shibata H, Hanazono Y, Ageyama N,

Nagashima T, Ueda Y, Hasegawa M, Ozawa K, Yoshikawa Y, and Terao K: Collection and analysis of hematopoietic progenitor cells from cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*): Assessment of cross-reacting monoclonal antibodies. *Am J Primatol* 61: 3-12, 2003.

4) Mori M, Uchida M, Watanabe T, Kirito K, Hatake K, Ozawa K, and Komatsu N: Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol* 195: 290-297, 2003.

5) Noborio K, Muroi K, Izumi T, Toshima M, Kawano-Yamamoto C, Otsuki T, Nagai T, Komatsu N, and Ozawa K: Massive immune hemolysis after non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO-incompatibility. *Leuk. Lymphoma* 44: 357-359, 2003.

6) Nagashima T, Ueda Y, Hanazono Y, Kume A, Shibata H, Ageyama N, Terao K, Ozawa K, and Hasegawa M: New selective amplifier genes containing c-Mpl for hematopoietic cell expansion. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 170-176, 2003.

7) Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, and Ozawa K: In vivo expansion of transduced murine hematopoietic cells with a selective amplifier gene. *J Gene Med* 5: 175-181, 2003.

8) Kami M, Hamaki T, Miyakoshi S, Murashige N, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y, Taniguchi S, Hirai H, Ozawa K, and Kasai M: Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br J Haematol* 120: 304-309, 2003.

9) Komatsu N, Watanabe T, Uchida M, Mori M, Kirito K, Kikuchi S, Liu Q, Tauchi T, Miyazawa K, Endo H, Nagai T, and Ozawa K: A member of Forkhead transcription factor FKHL1 is a downstream effector of ST1571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL expressing cells. *J Biol Chem* 278: 6411-6419, 2003.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

造血幹細胞の体外増幅の基盤整備

分担研究者 中畑 龍俊 京都大学医学研究科発達小児科学教授

研究要旨

これまで我々が開発したサイトカイン用いた臍帯血造血幹細胞の体外増幅法を用い、臨床研究に用いる臍帯血バンクに保存された凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞を、効率良く増幅できる無血清培養法を確立した。免疫不全マウスを用いた *in vivo* での移植系による評価を行なうことで、増幅した細胞の有用性と安全性を示した。さらには合成ペプチドを用いた新たな転写因子操作により、造血幹細胞の自己複製、分化の制御が可能であることを示した。

A. 研究目的

本研究は、これまで我々が開発したサイトカイン用いた臍帯血造血幹細胞の体外増幅法を、臍帯血移植に応用するトランスレーショナルリサーチを行なうことを目的とし、細胞治療・再生医療の基盤を整備しながら総合的に臨床研究を進めるため、I.GMP に準拠した培養法の確立 II.安全な細胞治療製剤の processing のための基盤整備 III. 品質管理法・細胞評価系の確立 IV.臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明 以上4項目を中心に研究を進めている。

本年度の研究として、臨床研究に用いる臍帯血バンクに保存された凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞を、効率良く増幅できる無血清培養法を確立すると共に、セルプロセッシングに必要

不可欠な閉鎖系培養システムの開発を試みる。また増幅した細胞の *in vitro* における安全性の評価を行なうための系を確立し、免疫不全マウスを用いた *in vivo* での移植系による評価を行なうことで、増幅した細胞の有用性と安全性に関して評価する。さらには合成ペプチドを用いた新たな転写因子操作により、造血幹細胞の自己複製、分化の制御が可能であるか否か、検討する。

B. 研究方法

I. GMP に準拠した培養法の確立

臍帯血バンクに凍結してある臍帯血を用いて、無血清培養法の開発、効果的な細胞融解法、Clinical grade での



CD34 陽性細胞分離法の検討、バッグ培養による閉鎖系培養システムの構築などの開発を行う。

## II. 安全な細胞治療製剤の processing のための基盤整備

安全に細胞をプロセッシングするためのデバイスの開発として、CO2 インキュベータ、培養バッグ、無菌閉鎖系細胞洗浄装置を開発する。

## III. 品質管理法・細胞評価系の確立

体外増幅した細胞の有効性、安全性の検討を行なう。NOD/SCID マウスおよび NOG マウスを用いて体外増幅した細胞の生着能の評価、体内分布、炎症、変性、及び癌化の有無などの検討を行なう。また、NOG マウスの移植実験においては、これまで検討することができなかった T 細胞系の再構築能を検討する。

## IV. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明

造血幹細胞の自己複製因子 HOX/PBX1 複合体の活性を変化させ得る合成ペプチドをヒト臍帯血造血幹細胞に導入することにより、合成ペプチドが造血幹細胞の自己複製能や多分化能に及ぼす影響について検討を行なう。

## (倫理面への配慮)

臍帯血提供に協力していただいたボランティアに対するインフォームドコンセントは書面でとる。また、作成した分化型造血細胞輸注に関しては、学内倫理審査委員会での慎重な審議、許可をへてベッドサイドでの応用を目指す。また、実験動物使用に関しては、動物実験施設での講習を受講し、動物愛護の面よりの配慮を行なう。

## C. 研究結果

### I. GMP に準拠した培養法の確立

平成 14 年 7 月に薬事法が改正され、細胞治療製剤が定義されるとともに GMP に準拠した製造が義務づけられたことを受け、GMP に準拠したより安全な培養を行うため、実際の臍帯血バンクに凍結してある臍帯血を用いて、無血清培養法の開発、効果的な細胞融解法、Clinical grade での CD34 陽性細胞分離法の検討、バッグ培養による閉鎖系培養システムの構築などの開発を行なった。

### II. 安全な細胞治療製剤の processing のための基盤整備

安全に細胞をプロセッシングするためのデバイスの開発として、CO2 インキュベータ、培養バッグ、無菌閉鎖系細胞洗浄装置を開発した。

### III. 品質管理法・細胞評価系の確立

「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(医薬発第 1314 号、厚生省医薬安全局長通知)に従い、体外増幅した細胞の安全性の検討を行なった。また効果を予測する試験として、NOD/SCID マウスおよび NOG マウスを用いて体外増幅した細胞の生着能の評価、体内分布、炎症、変性、及び癌化の有無などの検討を行なった。また、NOG マウスの移植実験においては、これまで検討することができなかった T 細胞系の再構築能を検討した。

### IV. 臍帯血造血幹細胞の自己複製能、分化能の機序の解明

造血幹細胞の自己複製因子 HOX/PBX1 複合体の活性を変化させ得る合成ペプチドをヒト臍帯血造血幹細胞に導入することにより、合成ペプチドが造血幹細胞の自己複製能や多分化能に及ぼす影響について検討を行なった。

### D. 考察

これまで我々が開発したサイトカイン用いた臍帯血造血幹細胞の体外増幅法を用い、臨床研究に用いる臍帯血バンクに保存された凍結臍帯血中の

CD34 陽性細胞を、効率良く増幅できる無血清培養法を、閉鎖系バッグ用いて確立した。これら方法により、現在保存されている臍帯血を利用した、安全で有効なヒト臍帯血増幅システムの開発が可能となり、今後の臨床展開に向けて、大きな進歩が得られた。また、免疫不全マウスを用いた *in vivo* での移植系による評価を行なうことで、増幅した細胞の有用性と安全性を示した。今後このシステムは、他の体性幹細胞の活性測定にも応用できるものと思われ、一層の進歩が期待される。さらには合成ペプチドを用いた新たな転写因子操作により、造血幹細胞の自己複製、分化の制御が可能であることを示した。合成ペプチドは細胞内に取り込まれた後分解され、恒久的なシグナル導入にはつながらない。この結果は、転写因子を会するシグナルを、安全に導入する方法が可能であることを示唆し、今後のシグナル導入、改変手技として、重要な役割を果たすことが期待される。

### E. 結論

これまで我々が開発したサイトカイン用いた臍帯血造血幹細胞の体外増幅法を用い、臨床研究に用いる臍帯血バンクに保存された凍結臍帯血中の CD34 陽性細胞を、効率良く増幅でき

る無血清培養法を確立した。免疫不全マウスを用いた *in vivo* での移植系による評価を行なうことで、増幅した細胞の有用性と安全性を示した。さらには合成ペプチドを用いた新たな転写因子操作により、造血幹細胞の自己複製、分化の制御が可能であることを示した。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項を認めない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mitsui T., Watanabe S., Hanada S., Ebihara Y., Sato T., Nakahata T., Tsuji K.: Impaired neutrophil maturation in truncated G-CSF receptor transgenic mice. *Blood* 101:2990-2995,2003.
2. Hiramatsu H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Katamura K., Nakahata T.: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using NOD/SCID/  $\gamma_c^{null}$  mice model. *Blood* 102:873-880, 2003.
3. Yoshimoto M., Shinohara T., Heike T., Shiota M., Kanatsu-Shinohara M., Nakahata T.: Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicate the presence of a niche. *Exp. Hematol.* 31:733-740,2003.
4. Imai T, Adachi S, Nishijo K, Ohgushi M, Okada M, Yasumi T, Watanabe K, Nishikomori R, Nakayama T, Yonehara S, Toguchida J and Nakahata T. FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. *Oncogene* 22:9231-9242 (2003)
5. Heike T. Nakahata T.: Stem cell plasticity in the hematopoietic system. *Int. Hematol.* 79:7-14,2003.
6. Adachi S., Leoni M., Carson DA, Nakahata T.: Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies. *Acta Haematol.* 111:107-123, 2004.
7. Kambe N., Hiramatsu H., Shimonaka M., Fujino H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Ueyama Y., Matsuyoshi N., Miyachi Y., Nakahata T.: Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cells with identical distribution pattern to human body. *Blood* 103:860-867,2004.
8. Umeda K., Yoshimoto M., Heike T., Nakahata T.: Development of primitive and definitive hemayopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells *in vitro*. *Development in*

press.

2. 学会発表

—国内学会—

1. 長尾研二、太田貴之、水谷悟、平家俊男、中畑龍俊、西川光郎：AGM由来ストローマ細胞からの造血幹細胞支持因子の探索 第65回日本血液学会総会 平成15年8月28-31日
2. 梅田雄嗣、平家俊男、末盛博文、藤野寿典、塩田光彦、吉本桃子、平松英文、鳥居隆三、中辻憲夫、中畑龍俊：霊長類ES細胞を用いた一次造血・二次造血の分化誘導 第65回日本血液学会総会 平成15年8月28-31日
3. 鈴木秀文、伊藤仁也、田中宏和、渋谷和憲、河合弘行、菅谷信二、平家俊男、金倉謙、中畑龍俊：サイトカインを用いた臍帯血CD34陽性細胞の体外増幅培養に関する基礎的研究 第65回日本血液学会総会 平成15年8月28-31日
4. 谷口義弘、平家俊男、三井哲男、中畑龍俊：切断型G-CSF受容体トランスジェニックマウスへのG-CSF長期投与の影響 第65回日本血液学会総会 平成15年8月28-31日
5. 梅田雄嗣、平家俊男、吉本桃子、塩田光隆、藤野辞典、末盛博文、鳥居隆三、中辻憲夫、中畑龍俊：霊長類ES細胞からの血管前駆細胞の分化誘導と血管再生医療への応用 第24回日本炎症・再生医学会 平成15年11月26、27日 京都
6. 長門雅子、平家俊男、加藤竹雄、山中康成、吉本桃子、中畑龍俊：神経幹細胞の表面抗原を用いた同定の試みと生体への移植 第24回日本炎症・再生医学会 平成15年11月26、27日 京都
7. 川村晃久、長谷川浩二、北鞆、日高京子、森崎隆幸、平家俊男、中畑龍隆、古谷正敬、末盛博文、中辻憲夫、米田正始：ヒストンおよびGATA-4のアセチル化がES細胞からの心筋細胞への分化効率に与える影響 第24回日本炎症・再生医学会 平成15年11月26、27日 京都
8. 平家俊男、塩田光隆、吉本桃子、春山宗忠、中畑龍俊：マウス骨髄由来造血幹細胞及び間葉系細胞による筋肉分化 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 遺伝性筋疾患に対する分子治療の基盤研究 平成15年度研究班会議 平成15年12月3、4日 東京
9. 伊藤仁也、渋谷和憲、井出陽一、後藤真澄美、鈴木秀文、平家俊男、前川平、金倉謙、中畑龍俊：Ex vivo増幅臍帯血の非臨床試験（その3）：NOD/SCID移植モデルにおける評価 第26回日本造血細胞移植学会 平成15年12月19、20日 東京
10. 伊藤仁也、井出陽一、菊池泰子、後藤真澄美、渋谷和憲、鈴木秀文、丸山京子、平家俊男、前川平、金倉謙、中畑龍俊：Ex vivo増幅臍帯血幹細胞の非臨床試験（その1）：閉鎖系培養法を用いたEx vivo増幅臍帯血幹細胞の製造 増幅細胞の形態学的特徴、および増幅細胞が分泌するサイトカイン類の測定 第26回日本造血細胞移植学会 平成15年12月19、20日 東京
11. 鈴木秀文、伊藤仁也、小林典孝、田中宏和、渋谷和憲、後藤真澄美、