

ま と め

- 保存時の有核細胞数、CD34、CFUとも移植後の好中球回復に相関した。
- 移植時の有核細胞数、CD34は移植後の好中球回復に相関した。
- 移植後の無病生存と相関したのは移植時のCD34のみであった。
- 今後、日本全体の解析を行い、細胞数と移植成績の相関についての結論を急ぐべきである。

7.

非血縁者間臍帯血移植におけるリンパ細胞 HLA抗体の重要性

荒木 延夫¹⁾、秋田 真哉¹⁾、河村 久美子¹⁾、能勢 義介¹⁾、
井本 しおん¹⁾、三戸 壽¹⁾、甲斐 俊朗²⁾、原 宏²⁾

1) 兵庫県赤十字血液センター 2) 兵庫県さい帯血バンク

目的

非血縁者間臍帯血移植では、ドナー細胞の免疫学的寛容性より、HLA不一致での移植も数多く実施されている。一方で、移植対象が成人へと拡大し、非腫瘍性疾患への適応も施行されており、患者が保持するHLA抗体が生着率・造血回復速度に関与しているとも推測される。

今回、我々はHLA適合検査に患者血清中のHLA抗体スクリーニング検査及び、患者・ドナー間のクロスマッチ検査を導入し、知見を得たので報告する。

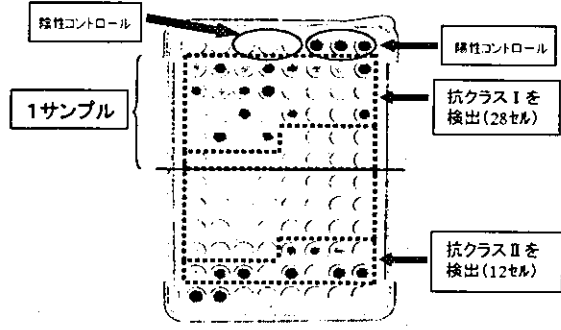
材料・方法

材料：患者血清中HLA抗体スクリーニング検査実施例215。

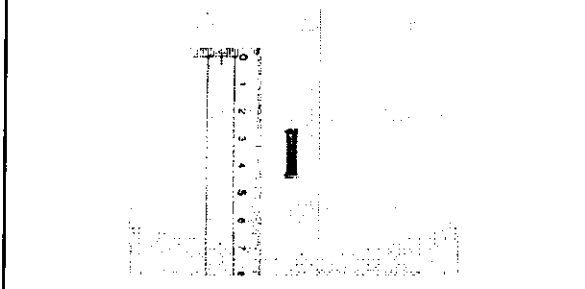
非血縁者間臍帯血移植患者及びドナー検体で、患者血清とドナーリンパ球によるクロスマッチ検査(ドナーリンパ球のクロスが不能の場合は、HLAタイプが同じ自家凍結リンパ球による擬似クロスを含む)。

方法：HLA抗体スクリーニング検査には、OneLambda社「LAMBDA ANTIGEN TRAY: LAT」を使用。クロスマッチ検査は、LCT法・AHG-LCT法を用いた。

Lambda Antigen Tray (LAT法)



ドナー凍結保存細胞



HLA抗体スクリーニング結果 N=215

HLA抗体スクリーニング (LAT法)	陰性	陽性	陽性率
	193	22	10.23%
抗クラスⅠ抗体		9	4.19%
抗クラスⅡ抗体		3	1.40%
抗クラスⅠ+Ⅱ抗体		10	4.65%

抗HLAクラス I 抗体適合検査(クロスマッチ)結果

抗クラス I を対象	抗HLAクラス I 抗体陽性患者 N=19	ドナー細胞に陰性	ドナー細胞に陽性	陽性率	抗クラス I 2例 抗クラス I + II 2例
	クロスマッチ(LCT, AHG, LCT法)	15	4	21.05%	

ドナー細胞に抗HLAクラス I 抗体陽性4例
 2例が移植
 2例が兵庫さい帯血バンク内のドナーに変更

抗HLAクラス II 抗体適合検査(LAT法)結果

抗クラス II を対象に検討	抗HLAクラス II 抗体陽性患者 N=13	ドナー細胞に陰性	ドナー細胞に陽性	陽性率	抗クラス II 2例 抗クラス I + II 4例
	LAT法	7	6	46.15%	

ドナー細胞に抗HLAクラス II 抗体陽性6例
 2例が移植
 1例が移植中止、1例が兵庫さい帯血バンク内のドナーに変更、2例が別ドナーに変更

抗HLA抗体陽性患者結果一覧①

No	検査日	HLA Type				クロスマッチ		LAT (陽性率)	
		A	B	DRB1*	LCT	AHG	クラス I	クラス II	
1	H13.3.10	p. 111.24	35 02	0406 0801	111	111	10/20	12/12	
2	H13.6.30	p. 0208 24	52 58	0405 1002	111	111	10/20	8/12	
3	H13.6.0	p. 2801 31	52	1502	陽性111	70/70	12/12		
4	H14.2.8	p. 2803 33	55 44	0901 1302	111	111	0/20	4/12	
5	H14.3.7	p. 0208 24	52 58	0405 1002	111	111	0/20	10/12	
6	H14.5.8	p. 0201 24	52 80	0406 1002	111	111	7/20	0/12	
H14.6.6	p. 0201 24	80 02	0901 1401	陽性111	20/20	12/12			
H14.6.10	p. 0201 24	80 02	0901 1401	111	111	70/70	12/12		
8	H14.8.20	p. 2803 33	55 44	0901 1401	陽性111	10/20	0/12		
10	H14.8.21	p. 0201 2801	35 44	0403 0405	111	111	8/20	0/12	
H14.7.5	p. 0208 0202	3001 48	0802 0801	陽性	陽性	10/20	0/12		
H14.7.15	p. 0208 0202	3001 48	0802 0801	111	111	10/20	0/12		
13	H14.8.27	p. 24 31	46 01	1501 0801	陽性111	8/20	0/12		

抗HLA抗体陽性患者結果一覧②

No	検査日	HLA Type				クロスマッチ		LAT (陽性率)	
		A	B	DRB1*	LCT	AHG	クラス I	クラス II	
14	H15.2.22	p. 24 31	52 48	4008 0901 1301	111	111	14/20	6/12	
15	H15.8.6	p. 24 31	55 55	1302 0801	111	111	15/20	2/12	
16	H15.8.11	p. 24 31	55 55	0405 0801	111	111	7/20	0/12	
17	H15.8.24	p. 24 31	51 55	0802 1401	111	111	70/70	12/12	
18	H15.8.27	p. 0207 31	48 4002	0802 0801	陽性111	0/20	12/12		
19	H15.7.5	p. 0201 0208	3802 4002	0803 1408	陽性111	24/20	5/12		
20	H15.7.28	p. 24 31	44 44	0403 1405	111	111	11/20	0/12	
H15.9.3	p. 24 31	55 55	0405 0408	陽性	陽性	12/20	0/12		
H15.9.8	p. 24 31	55 55	0405 0408	111	111	17/20	0/12		
22	H15.1.22	p. 0207 2801	35 48	0802 0803	111	111	15/20	8/12	
24	H15.1.28	p. 0201 31	12 4008	0801 1202	陽性111	8/20	0/12		
25	H15.2.12	p. 24 31	51 54	0405 1401	陽性	陽性	10/20	12/12	

HLA抗体陽性患者の生着結果

No.	ドナー細胞に対する								疾患	年齢	生着
	A	B	DRB1*	LCT	AHG	LAT	抗クラス I 陽性	抗クラス II 陽性			
p. 111.24	35	02	0406	0901	(-)	(+)	(-)	CML	47	生着	
p. 111.24	52	58	0405	0901	(-)	(+)	(-)	RAEB	66	不全	
p. 24	52	4006	0901	0803	(-)	(-)	(+)	AML	51	不全	
p. 0207 31	46	4002	0802	0803	(-)	(-)	(+)	MDS	68	不全	

生着認めず、他のバンクより再移植
 生着認めず、他のバンクより再移植
 生着認めず、他のバンクより再移植
 生着認めず、他のバンクより再移植

結語①

- ① 非血縁者間臍帯血移植におけるHLA抗体スクリーニング検査において、215例中22例(陽性率10.23%)の陽性を得た。抗体の内訳は、抗クラス I が9例、抗クラス II が3例そして、抗クラス I + II が10例であった。
- ② [抗クラス I 抗体の影響について]
 非血縁者間臍帯血移植におけるクロスマッチ検査において、HLA抗体スクリーニングクラス I 抗体陽性患者19例中4例(陽性率21.05%)の陽性を得た。クロスマッチ陽性は、移植後早期拒絶のリスクが考えられるため、内2例はドナー変更された。また、2例に移植が行われたが、1例は生着、他1例は生着不全であった。

結語②

③ 【抗クラスⅡ抗体の影響について】

クロスマッチ陰性で抗クラスⅡ陽性が13例を示した。内6例(陽性率46.15%)の抗クラスⅡ抗体がドナー細胞に陽性であると推定され、1例が移植中止、3例がドナー変更された。また、2例に移植が行われたが、2例共に生着不全であった。

④ 抗クラスⅠ、抗クラスⅡ抗体の不適合が生着率に関与する可能性が示唆される結果を得た。症例を追加し、更に検討していきたい。

8. 臍帯血移植の安全性ワーキンググループ
(厚生科学審議会疾病対策部会造血幹細胞移植委員会)

目的

- 医薬品(血液製剤)と比較して同等の安全性の確保
- 米国FDAの動向を見ながら検討を進める
- 現行基準の水準の検証
 - (ネットワーク基準書・各バンク手順書)
 - 各さい帯血バンクの視察
 - チェックリストの作製と実地検証

臍帯血移植の安全性ワーキンググループ

[平成16年度委員会構成]

委員長 小澤 敏也 自治医科大学医学部内科学講座血液学部門

委員 岡田 義昭 国立感染症研究所血液・安全性研究部

神原 永子 日本赤十字社血液事業部

佐藤 典宏 北海道大学医学部附属病院輸血部

鹿野 真弓 独立行政法人医薬品医療機器総合機構

高梨美乃子 東京都赤十字血液センター技術部

高橋 恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング

山口 一成 国立感染症研究所血液・安全性研究部

山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子細胞医薬部

臍帯血の安全化の手順(ソフト面)

1. 臍帯血の定義

- 有効性を担保するための事項
 - 性状、分量、生細胞数、造血幹(前駆)細胞数(コロニー数)
 - CD34陽性細胞数、HLA、など
 - 安全性を担保するための事項
 - 感染症のチェックなど
2. 定義を満たす臍帯血製造
- 「生物由来原料基準」の観点から
 - ドナー選択基準、ドナー感染症等検査
 - 造血幹細胞採取法、保存方法

(具体案作成担当)

高梨美乃子(東京都赤十字血液センター技術部)

高橋 恒夫(東京大学医科学研究所細胞プロセッシング)

臍帯血の安全化の手順(ハード面)

定義を満たす臍帯血の製造施設: 構造・設備面

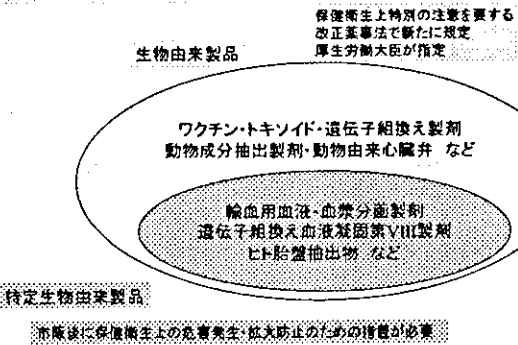
- 「構造設備基準」「生物由来原料基準」の観点から
- 造血幹細胞保存方法、汚染防止措置

(具体案作成担当)

岡田 義昭(国立感染症研究所血液・安全性研究部)

- 施設視察

血液製剤は特定生物由来製品



生物由来原料基準 (平成十五年五月二十日)(厚生労働省告示第二百十号)

第1 通則

(略)

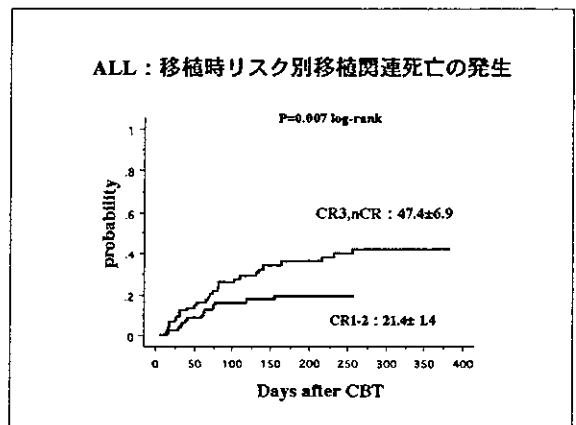
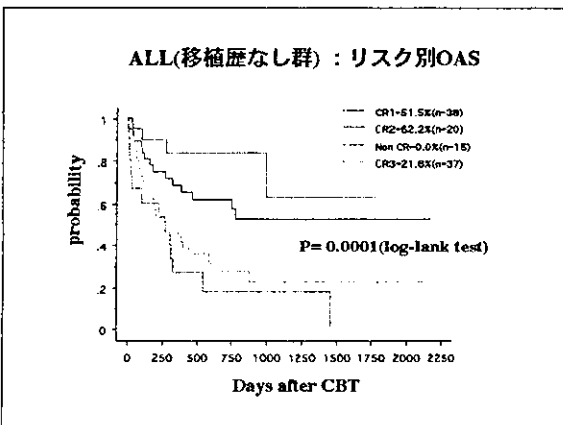
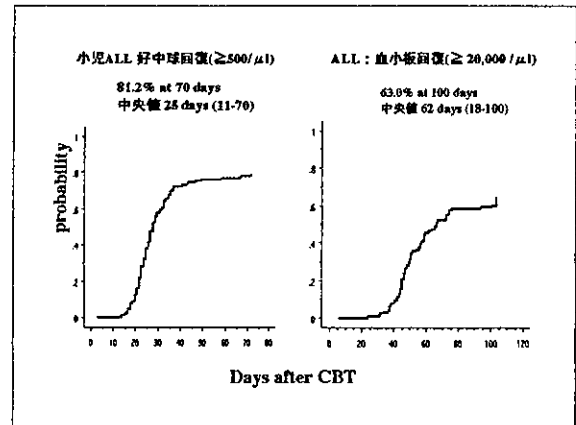
第2 血液製剤総則

1 輸血用血液製剤総則(要約)

- (1) 血液の提供者に対して問診等が必要
- (2) 採血法
- (3) 輸血用血液製剤の原材料
- (4) 保存は1~10℃。ただし、血小板製剤を製造する場合又は血液成分を分離する場合は、常温に置くことができる。
- (5) 血清学的検査にて適格: 少なくとも梅毒トレポネマ、HBV、HCV、HIV-1、HIV-2、及びHTLV-1
- (6) 核酸増幅検査にて陰性: 少なくともHBV DNA、HCV RNA及びHIV RNA
- (7) ABO式血液型及びRh式血液型
- (8) 記録の保存: 採血所名、年月日、献血者の検診記録、血清学的検査及び核酸増幅検査の結果、採取作業経過、献血者を特定する番号、その他

小児ALLの特徴

患者数	194
移植時リスク (number evaluable)	(171/194)
CR1-2群	95
CR3-non CR群	76
染色体/遺伝子異常 (number evaluable) (107/194)	
高危険群	
t(9;22) or bcr/abl(+)	12
11q23t or MLL(+)	28
その他の異常	20
正常核型	39



ALL : 死因

死因名	29日以内の死亡	
	62例 (91.4%)	9例 (8.6%)
感染症	26	6
菌血症	11	0
真菌血症	4	0
肺炎	2	3
ウイルス性心筋炎	1	1
敗血症	2	1
HSV6感染	1	0
CMV感染	1	0
麻疹/紅斑熱	1	0
敗血症	13	0
成人呼吸器不全症候群	13	4
VOD	8	0
TMA	5	0
GVHD	4	0
I度	3	2
II度	2	0
III度	1	0
IV度	1	0
出血	1	0
腎不全	1	0
SIRS	0	1
移植片植込み不全	0	1
不明	9	0

(重複発生あり)

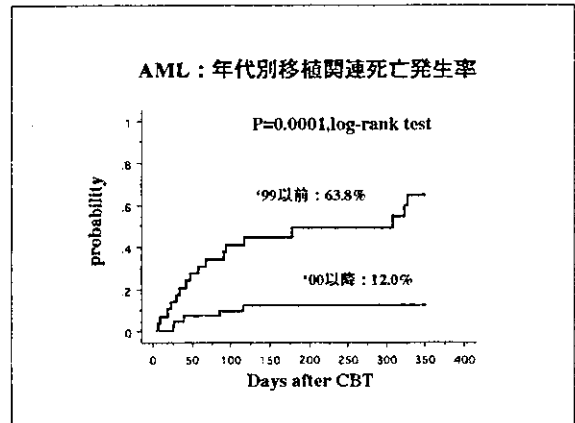
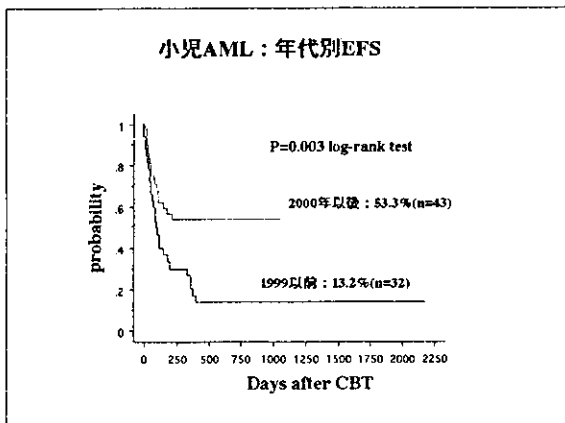
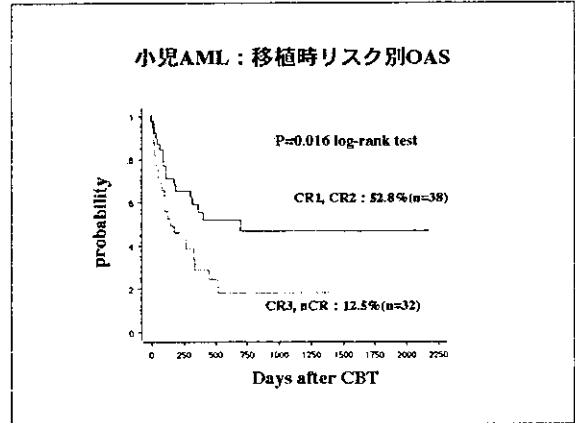
まとめ

ALL
 血球回復：好中球数(>500/μL)の回復時間は25日(中央値)であり、他の移植とほぼ同程度であった。血小板数(>20,000/μL)への回復は62日で、他の移植の2-3倍の時間を要する。移植既往、移植細胞数が両者共通の因子となった。生存率：第1,2寛解期の移植、移植既往なしはEFS, OASに対する各々独立した予後因子として認められた。GVHD：II度以上の急性GVHDの発生頻度は31.3%(100日)慢性GVHDの発生率は29/163(17.8%)であった。移植関連死亡：第3寛解期または非寛解期の移植、急性GVHDIII度以上の場合に頻度が高かった。死因：感染症が42.8%(28日以内)、30.9%(29日以降)に認められた。

臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究 班会議

小児AMLの特徴

患者数	92
移植時リスク (number evaluable)	(82/92)
CR1-2	45
CR3-nonCR	37
染色体/遺伝子異常 (number evaluable) (50/92)	
予後良好群	
t(8;21), t(15;17), inv(16)	4
中間危険群	20
高危険群	26



まとめ

AML
 血球回復：好中球数(>500/ μ L)の回復時間は28日(中央値)、血小板数(>20,000/ μ L)への回復は79日であった。
 生存率：第1,2寛解期の移植、移植年代(2000年以後の移植)はEFS, OASに対する各々独立した因子であった(図)。
 再発率は45.8%で全て移植1年以内であった。
 GVHD：II度以上の急性GVHDの発生頻度は34.1%(100日)慢性GVHDの発生率は19/77(25%)であった。
 移植関連死亡：移植年代(2000年以後の移植)による差が認められた('99以前63.8%:'00以後12.0%)。
 死因：感染症が42%(28日以内)、28%(29日以降)に認められた。

AML：死因

病名	29日以後死亡		28日以内死亡	
	35例 (83.1%)	9例 (16.9%)		
疼痛死	14	0		
感染	11	5		
細菌性肺炎	6	0		
真菌感染	2	1		
細菌感染	1	1		
感染症	1	1		
アスペルギルス肺炎	0	1		
肺炎	1	0		
敗血症	0	1		
成人型呼吸器感染症	1	0		
TMA	3	0		
VOD	3	2		
肺出血、出血	2	1		
肺梗塞	1	0		
GVHD	1	0		
多臓器不全	0	2		
心不全	0	1		
肺水腫	1	1		
不明	2	0		

(重複発生あり)

小児急性白血病の非血縁臍帯血移植成績

10. Ex vivo 増幅臍帯血造血幹細胞を用いた再生医療の問題点

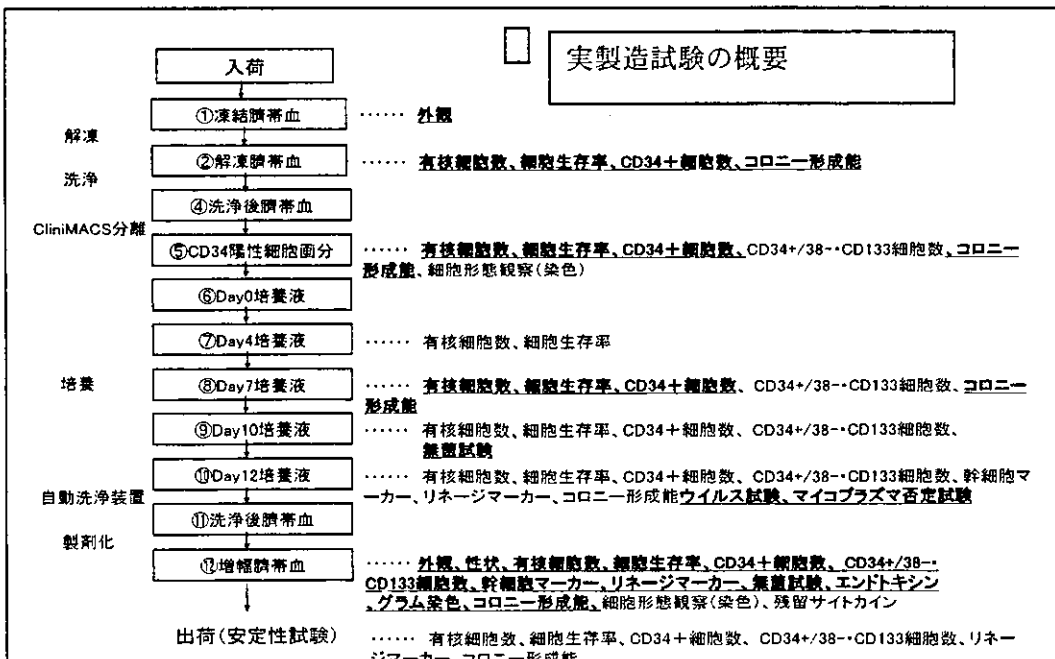
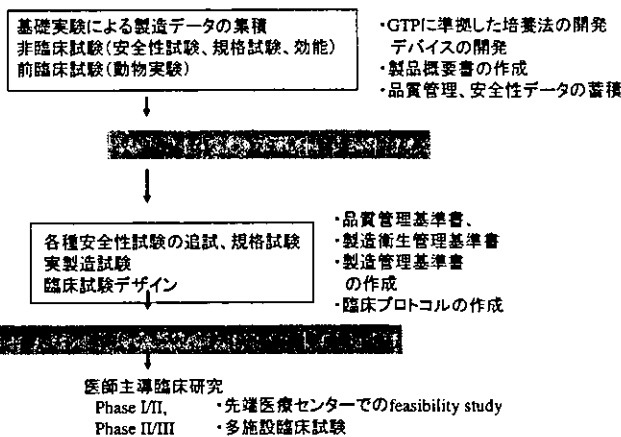
先端医療センター再生医療研究部 伊藤 仁也、田中 宏和

京都大学発達小児科学

中畑 龍俊

要約

サイトカインを用い、Ex vivo 増幅させた臍帯血造血幹細胞による移植の臨床研究を行うにあたり、我々はGTP(GoodTissu Practice)に基づく培養法の開発、品質管理法の開発、安全性の証明を行ってきた。今回臨床試験に向けた実製造試験において、増幅不良が生じた。さまざまな検討の結果、原材料として使用している培地に原因のあることがわかった。再生医療を行う上において原材料の品質保証のあり方は重要な問題であると考えられ、細胞製造における原材料品質管理が必要である。



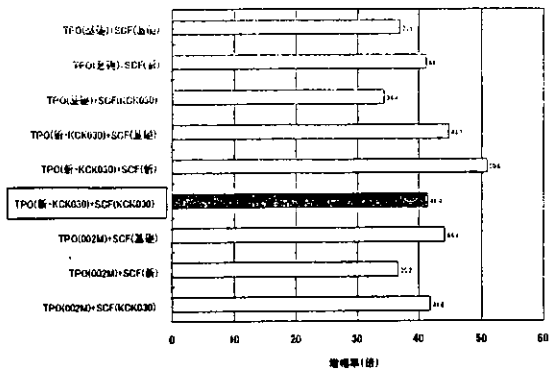


Fig1 サイトカイン力価の検討
 サイトカインの Lot には問題なかった。

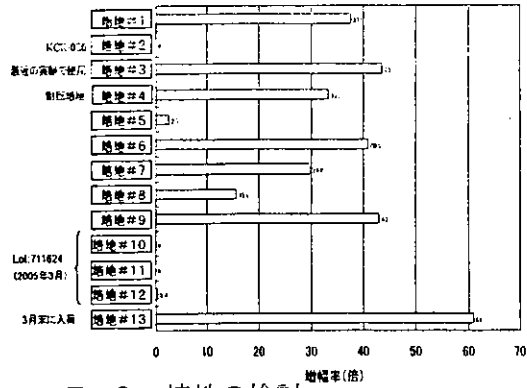


Fig2 培地の検討
 培地により増殖が完全に抑制される Lot が存在した。

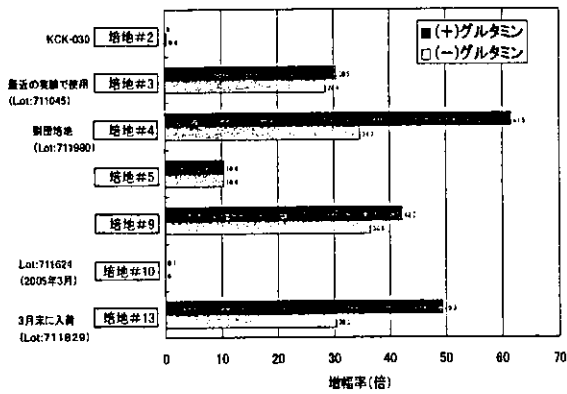


Fig3 グルタミン負荷試験
 増殖不良の培地はグルタミン負荷によっても改善されなかった。

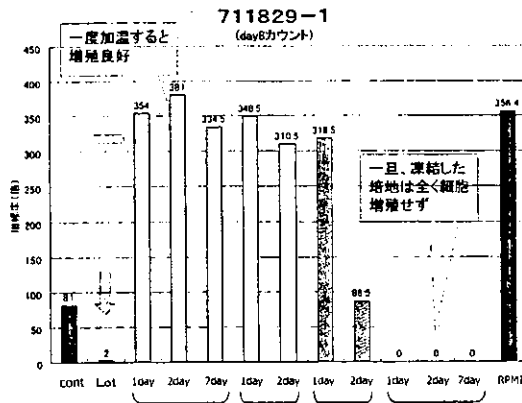


Fig4 培地の過酷試験結果 (1)
 Molt4 細胞による温度試験。凍結により増幅不良となる。

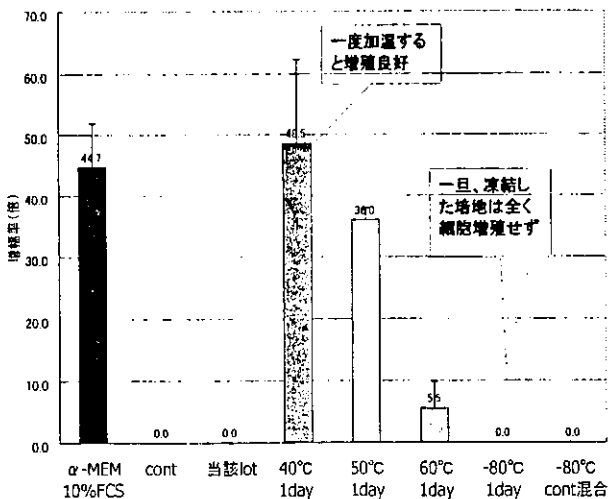


Fig5 培地の過酷試験 (2)
 CB CD34 cell による温度試験
 凍結により増幅が抑制された

まとめ

- 臨床試験に先立ち、実製造試験を行った。
- 実製造試験にて増幅不良事例が出現した。
- 増幅不良は培地が原因であった。
- 安全に細胞治療を行うためには培地の Lot チェックなどの管理体制を整える必要がある。

平成16年度厚生労働科学研究費補助金
「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」班第2回班会議
日時：2005年1月29日（土）9:15-12:40
場所：東京慈恵会医科大学高木会館 5F B 会議室
港区西新橋 3-25-8 TEL：03-3433-1111

*発表原稿はA4用紙で70部をご用意いたします。

*発表時間は発表12分、質疑応答3分の計15分をお願いします。

(9:15-9:25)

はじめに
ご挨拶

国立病院機構名古屋医療センター 齋藤英彦
厚生労働省疾病対策課臓器移植対策室 齋藤 崇

(9:25-10:10)

【司会：東京大学医科学研究所 高橋恒夫】

1. 胎盤・さい帯血を用いた再生医療

東京大学医科学研究所 高橋恒夫

2. 臍帯血からの心筋細胞の誘導

金沢大学がん研究所 高倉伸幸

3. ヒト造血幹細胞の分化とToll-like receptorの発現

兵庫医科大学 原 宏、藤盛好啓、粕本育代、甲斐俊朗

(10:10-10:55)

【司会：大阪大学大学院 仲野 徹】

4. 転写因子制御による未分化造血細胞の増幅

大阪大学大学院 仲野 徹

5. 臍帯血幹細胞の体外増幅：クローンレベルでの証明

東海大学医学部 安藤 潔

6. exvivo増幅造血幹細胞移植の基盤整備

京都大学大学院 中畑龍俊、先端医療センター 伊藤仁也

(10:55-11:55)

【司会：兵庫医科大学 原 宏】

7. 臍帯血移植における移植歴の検討

東京都赤十字血液センター臍帯血バンク 高梨美乃子

8. 兵庫さい帯血バンクの移植成績－HLA適合度と臍帯血移植成績－

兵庫医科大学 原 宏、甲斐俊朗、三澤真人、
兵庫さい帯血バンク臨床評価委員会 小泉民雄、高橋隆幸、園田 隆、小阪嘉之、大塚欣敏

9. 臍帯血の保存年数と移植成績

東海大学医学部 吉場史朗、佐藤 薫、加藤俊一

10. 「臍帯血移植の安全性に関する作業委員会」報告 -政策の動向を中心に-

東大医科研 高橋恒夫、東京都赤十字血液センター 高梨美乃子、自治医科大学 小澤敬也

(11:55-12:40)

【司会：東海大学医学部 加藤俊一】

11. 臍帯血ミニ移植第I層試験(RIST0304)終了報告

国立がんセンター中央病院 金 成元

12. 臍帯血ミニ移植新規試験の計画について

虎ノ門病院 谷口修一

13. Reduced-intensity cord blood transplantation (RICBT) でのPre-engraftment reactions (PER) におけるFK506の影響について

虎ノ門病院 宮腰重三郎

1. 胎盤・臍帯血を用いた再生医療：

胎盤絨毛部由来間葉系細胞から軟骨細胞への分化誘導

分担研究者：高橋恒夫（東大医科研細胞プロセッシング研究部門）

協力者：張曉紅、高橋賢次、伊倉宏一、三鶴亜矢子、市野瀬志津子（東京医科歯科大学）、山下匡

【目的】我々はこれまで胎盤胎児側の絨毛に存在する間葉系細胞が、骨、軟骨、脂肪および神経細胞へ分化可能であることを *in vitro* にて明らかにした。今回、特に軟骨細胞への分化能に関し、臨床応用の可能性について検討した。胎盤由来間葉系細胞は、一定の分裂回数を経ると増殖が停止してしまう傾向があり、クローナル解析の障害となっていた。そこで胎盤由来間葉系細胞に TERT 及び Bmi-1 遺伝子を導入し、不死化させた細胞からクローンを作製、そのクローナル分化能について検討した。またヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を胎盤由来間葉系細胞と骨髄内共移植し、造血幹細胞生着率への効果について検討した。

【方法】胎盤の胎児側絨毛部から得た間葉系細胞を 10%FBS 含有の DMEM 培地(low-glucose)を用いて explant culture 法により単離増殖させた。軟骨細胞誘導はペレット培養により軟骨細胞誘導培地を用いて3週間培養し、ペレットサイズ、重さと Alician Blue 染色定量をヒト骨髄由来間葉細胞と比較した。3次元培養法で胎盤絨毛由来間葉細胞を用いて軟骨様組織作製の可能性を、また *in vivo* 系ではヌードマウスの皮下及び膝軟骨骨欠損モデルにて胎盤絨毛由来間葉細胞を移植し、軟骨形成の可能性を検討した。

レンチウイルスベクターを用いて、Bmi-1 遺伝子およびテロメラーゼ遺伝子 TERT を単独あるいは両方を胎盤由来間葉系細胞に導入した。TERT/Bmi-1 細胞を限界希釈法にてサブクローニングして得られた細胞の軟骨、骨細胞の分化能を分析した。

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を X 線照射後 NOD/SCID マウス右脛骨骨髄内に移植、移植8週後、両側の大腿骨、脛骨から骨髄を回収し、ヒト CD45 陽性細胞及び CD34 陽性細胞の存在比率を FACS にて算出した。

【結果】胎盤絨毛由来間葉細胞はヒト骨髄由来間葉細胞と同等に軟骨細胞へ分化能をもつ細胞が存在していると考えられた。胎盤絨毛由来間葉細胞は3次元培養法により軟骨様組織の作製が可能であり、また *in vivo* では軟骨細胞へ分化した胎盤絨毛由来間葉細胞は生存を維持でき、さらに大量の軟骨細胞外 matrix を合成、分泌した。クローナル解析により胎盤絨毛由来間葉細胞は軟骨、骨に分化できるクローンが存在しているが示唆された。また、胎盤由来間葉系細胞をヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞と同時に骨髄内に移植すると生着率が高くなった。

【考察】胎盤の胎児側絨毛由来間葉細胞には *in vivo* にて軟骨形成可能な細胞が存在し、胎児側絨毛由来間葉細胞は多分化能がある細胞が存在する可能性が得られた。また CD34 陽性細胞と骨髄内に共移植すると生着率に促進効果が見られた。再生医療の細胞ソースとして胎盤由来間葉系細胞が有用である可能性が示唆された。

2005年1月29日

2. 臍帯血からの心筋細胞の誘導

金沢大学がん研究所

高倉伸幸

抄録

(目的)

近年、骨髄中の幹細胞分画を用いた種々の再生医療への応用の可能性について検討されている。中でも血管再生への応用はすでに開始されており、骨髄を下肢の虚血部位や心筋虚血領域に移植して血管新生を誘導する医療法が実施されてきた。また2001年に Orlic らが骨髄中の Lin⁻Kit⁺細胞の心筋虚血部への移植により、これら細胞が心筋細胞に分化して、心筋虚血を改善するということを発表し (Nature 410)、心筋再生への骨髄細胞の応用に期待が持たれた。しかし、この骨髄幹細胞の心筋細胞への分化についてはその後否定的な論文があいついで発表されているのも現状である (Balsom et al. Nature 428, 2004, Murray et al. Nature 428, 2004)。一方、臍帯血を用いた CD34⁺細胞の心筋虚血部への移植により、心筋機能が有意に改善されることも報告されており、直接的に臍帯血が心筋細胞に分化することは未だ正確には証明されていないものの、臍帯血においては今後心筋再生への応用に期待が持たれるところである。そこで今回我々は、骨髄細胞や臍帯血細胞を遺伝子導入などの操作を行わずに、試験管内で心筋細胞に分化誘導する培養系を樹立することを目的に研究を行った。

(本年度の研究成果と考察)

1) マウス新生仔の褐色脂肪組織と白色脂肪組織を分散培養を行い、10%FCS を含む DMEM 培地で培養を行ったところ、褐色脂肪組織から高頻度に自律拍動する心筋細胞が分化することが判明した (図1)。

2) マウス骨髄細胞とマウス褐色脂肪細胞を、カルチャーインサートでそれぞれ隔離した状態で共培養を行うと、骨髄細胞から心筋細胞の発生を誘導できた (図2)。またマウスの褐色脂肪組織と、ヒト臍帯血の共培養にても臍帯血から心筋細胞の分化が誘導された。

3) 骨髄および臍帯血由来の心筋細胞はラットの心筋梗塞モデルにおいて有意に心筋機能を回復させた。

以上より、脂肪組織を用いた心筋誘導技術により、新しい心再生の方法論が確立されたと考えらる。

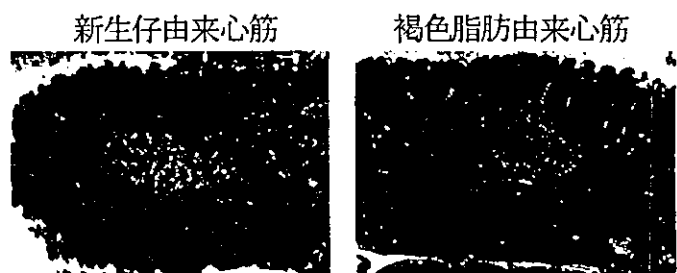


図1：褐色脂肪組織から分化した心筋細胞

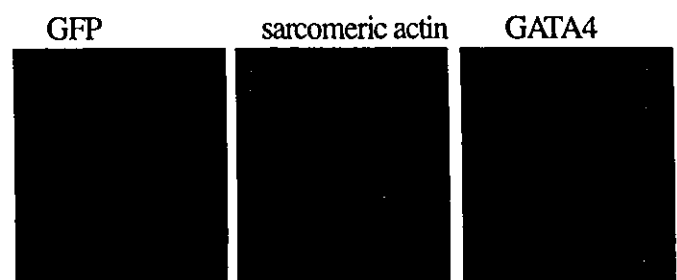


図2：骨髄細胞から分化した心筋細胞

3. ヒト造血幹細胞の分化と Toll-like receptor の発現

兵庫医科大学 原 宏, 藤盛 好啓, 粕本育代, 甲斐 俊朗

A. はじめに

Toll-like receptor (TLR) は、ショウジョウバエの初期発生に関わる Toll 分子のマウス・ヒトでの相同分子で、細菌・ウイルスなどの病原体を認識するレセプターである。我々は、造血幹細胞の分化における TLR の発現の変化を検討した。

B. 研究方法

臍帯血より CD34 陽性細胞を AotoMACS で分離し、TLR1-10 の mRNA の発現を調べた。成熟血球についても同様に TLR の発現を検討した。TLR1, 2, 4 については、抗体を用いて各系統に特異的な分化抗原とのフローサイトメトリーで解析した

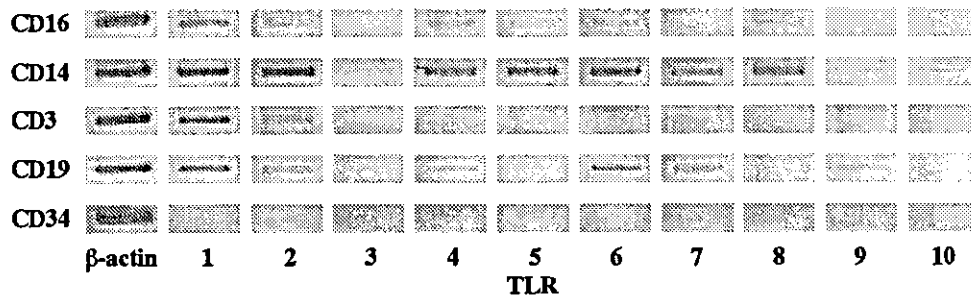


Fig.1 Expression of Toll-like receptors on cord blood cells

C. 研究結果

CD14 陽性単球は TLR1, 2, 4, 5, 6, 8 等の mRNA を発現し、CD16 陽性好中球も同様に多くの TLR を発現していた (Fig. 1)。フローサイトメトリーでも、TLR1, 2, 4 の細胞表面での発現が認められた (Fig. 2, 上段)。しかし CD34 造血幹細胞はこれらの mRNA の発現は非常に微弱で (Fig. 1, 最下段)、フローサイトメトリーでは TLR1, 2, 4 の細胞表面での発現は非常に弱かった。 (Fig. 2, 下段)

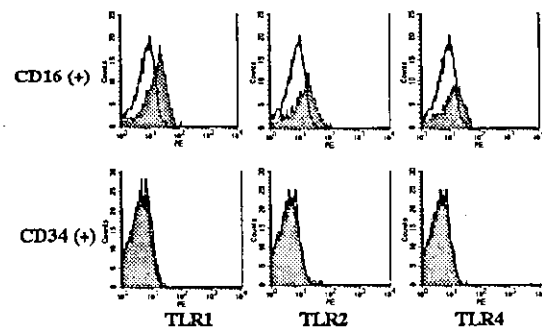


Fig. 2

D. 結語

臍帯血の CD34 陽性造血幹細胞では TLR の発現は非常に弱く、成熟血球への分化とともに、各血球に特徴的な TLR が発現すると考えられた。

4. 転写因子制御による未分化血液細胞の増幅

大阪大学大学院医学系研究科 病理病態学
仲野 徹

<目的>

血液細胞は、幹細胞から多能性の前駆細胞、単能性前駆細胞を経て、増殖・分化することにより産生される。幹細胞に比較して大量に存在する前駆細胞や、より分化した血液細胞を体外増幅する技術が確立できれば、細胞移植のリソースとして利用できる可能性がある。我々は、ES細胞からの試験管内分化誘導と、遺伝子操作法を組み合わせることにより、未分化な血液細胞の増幅法の開発を試みている。種々の転写因子の強制発現や遺伝子破壊により解析をおこなってきたうち、赤血球系の終末分化に必須な転写因子である GATA-1 を欠損する前赤芽球は、その分化状態を保ったまま増殖することを見出した。

<方法>

GATA-1 を欠損する ES 細胞を作成し、OP9 ストロマ細胞と共生培養することにより、血液細胞への分化誘導をおこなった。

<結果>

1. コントロール ES 細胞を分化誘導した場合には、分化誘導 1 4 日目以降には、脱核した赤血球へと分化した。それに対して、GATA-1 を欠損する前赤芽球様細胞は、OP9 細胞とエリスロポエチン (EPO) の存在下において、長期間にわたって増殖した。
2. GATA-1 欠損前赤芽球は、EPO 受容体だけでなく、IL-3、GM-CSF、IL-7 など、他の血液細胞系列に発現するサイトカイン受容体を発現していた。しかし、TPO の受容体である c-mpl の発現は認められなかった。
3. この細胞は、GM-CSF および IL-3 に反応して増殖した。また、GM-CSF 存在下では顆粒球・マクロファージに、IL-3 存在下ではマスト細胞へと分化することが明らかとなった。しかし、c-mpl を発現させても TPO には反応せず、比較的近縁な血液細胞系列である巨核球への分化は認められなかった。
4. GATA-1 欠損前赤芽球に GATA-1 を発現させると、成熟した赤血球への分化が認められた。一方、顆粒球系に機能する転写因子である C/EBP を発現させると、EPO に反応して顆粒球・マクロファージへの分化が認められた。

<考察ならびに今後の方針>

赤血球の終末分化において機能する転写因子を欠損させた場合、その転写因子が機能する前の段階の細胞が、未分化な状態を保ったまま増殖できることが明らかとなった。さらに、そのような細胞は赤血球以外の細胞への分化能も維持していた。RNAi を用いることにより、ヒトの前赤芽球や脐帯血においても同様の実験が可能ではないかと考え、現在おこなっている。また、B細胞でも似た現象が報告されていることから、このような転写因子制御による未分化血液細胞制御は、他の血液細胞系列においても利用可能なのではないかと推測される。

5 臍帯血幹細胞の体外増幅：クローンレベルでの証明

班員：東海大学医学部血液・腫瘍内科 堀田知光

協力者：東海大学医学部血液・腫瘍内科 安藤 潔、

東海大学医学部再生医学センター 八幡 崇

【背景と目的】臍帯血移植が小児例を中心に普及し他の造血幹細胞移植に劣らぬ成績が示されている。成人例への適応には細胞数不足が問題である。近年、国内外で臍帯血幹細胞を各種サイトカインの組み合わせにより *ex vivo* で増幅するさまざまな試みが展開されている。ヒト造血幹細胞の定量には従来、定量的NOD/SCID mice repopulating cells (SRC)アッセイが利用されている。しかしながらこの方法では培養前後のSRC数とともに増殖力、ホーミング能力の変化を同時に測定していることとなり、幹細胞数の増幅を評価することはできない。そこでわれわれが開発したマウス骨髄ストローマ細胞株を feeder layer とした膜分離型共培養系で、レンチウイルスにより遺伝子マーキングした臍帯血 CD34⁺細胞を4日間培養した後、10匹のNOD/SCIDマウスに移植し、linear amplification-mediated (LAM) PCR法を用いてクローンレベルでの幹細胞の動態を追跡した。

【方法】臍帯血 CD34⁺細胞をレンチウイルスベクターによりEGFPでマーキングし、無血清培地でTPO, FL, SCF各50ng/mlの存在下に膜分離型培養系で4日間培養する。培養後細胞を10等分し、それぞれNOD/SCIDマウスに骨髄内移植する。10週後に造血再構築を確認した後、DNAを抽出し、ウイルスLTR内に設定したプライマーより1st strand DNAを合成し、random priming後、制限酵素Tsp509Iで処理し、linker cassette ligationを行う。塩基配列を決定し、BLAST searchにてヒト染色体上の配列であることを確認する。レンチウイルス内に設定したprimerとヒト染色体上に設定したprimerで得られたPCR産物はクローンマーカーとして利用される。

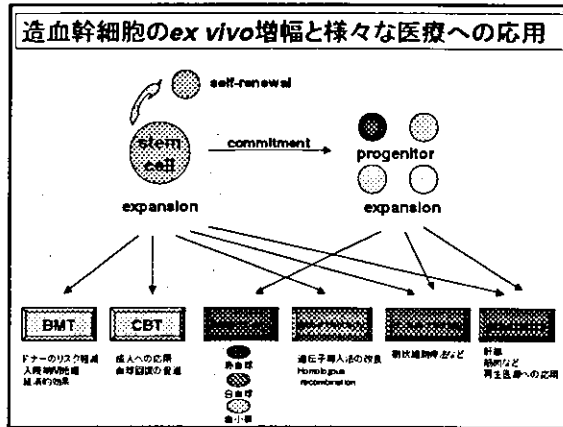
【結果】1) 遺伝子マーキングした臍帯血CD34⁺細胞を培養し10匹のマウスに骨髄内移植し、LAM-PCR法によりクローンを解析した結果、検出されたクローンの約10%は複数のマウスに存在した。2) これらのクローンの一部ではCD19⁺細胞およびCD33⁺細胞に存在し、多分化能をもつことが示された。3) これらのクローンの一部では2次移植後も多分化能を保持しつつ存在した。

以上より一部の造血幹細胞は体外で増幅したことが証明された。

**6. Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞を用いた
臨床試験の問題点**

中畑龍俊
伊藤仁也

京都大学大学院医学研究科発達小児科学



**ヒト造血幹細胞上に発現しているサイトカイン受容体
(対応するサイトカイン)**

The diagram shows a stem cell with receptors for Flk2/Flt3 (FL), Mpl (TPO), c-Ki (SCF), and gp130 (IL-6 and IL-6R complex). It also asks if there are self-renewal factor receptors (self-renewal factors).

サイトカインを組み合わせた臍帯血 CD34+ 細胞のex vivo増幅

The process starts with CB MNCs, followed by AutoMACS and CD34 positive selection. The selected cells are cultured at a concentration of 1-2x10⁴/ml for 1 week with the following cytokine cocktail: SCF 100ng/ml, FL 100ng/ml, IL-6 100ng/ml, sIL-6R 100ng/ml, and TPO 10ng/ml.

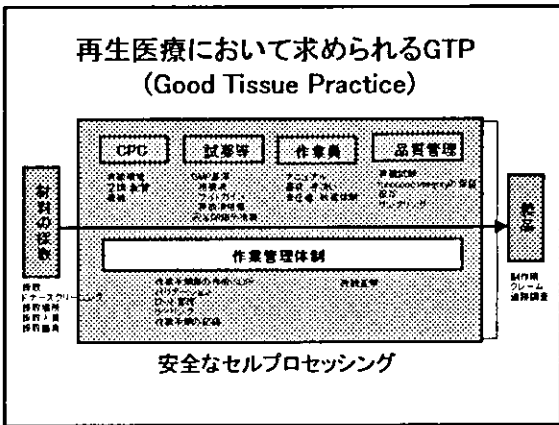
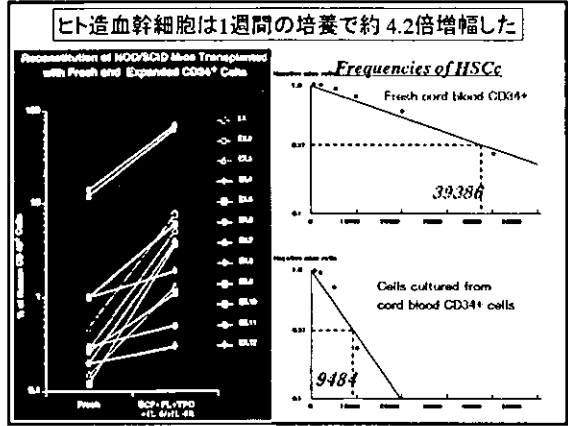
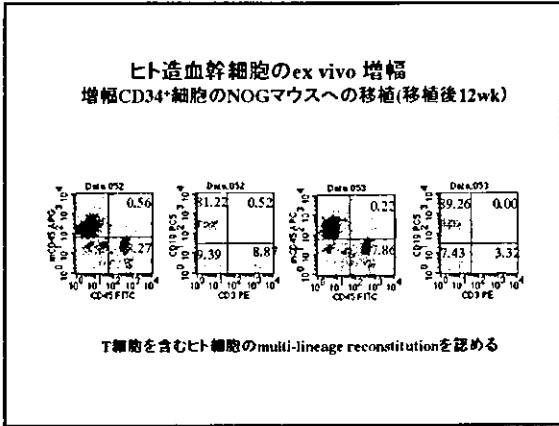
臍帯血造血幹細胞のex vivo増幅が可能となった

The graphs show the presence of human stem cells (CD34⁺ cells) in the bone marrow of recipient mice. The first graph shows 12% of human stem cells, and the second graph shows 68.5% of human stem cells. The text indicates that human stem cells are present in the bone marrow of recipient mice for more than 1 month after transplantation.

再生医療を進めるためにはヒト体性幹細胞を受け入れる免疫不全マウスの開発が必須である

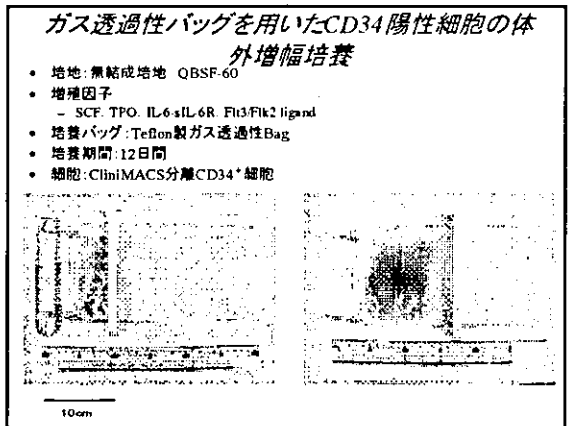
NOD/SCID/ γ_c null (NOG) マウスを開発した

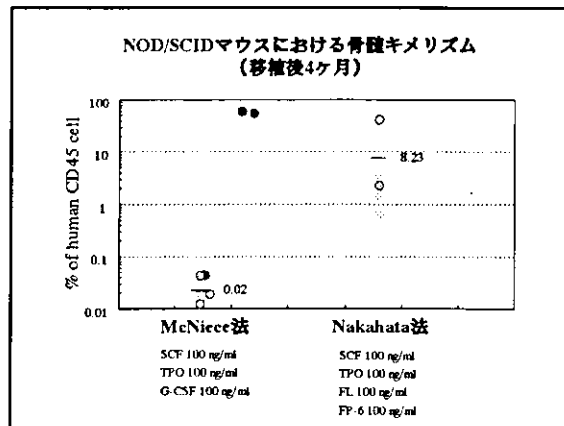
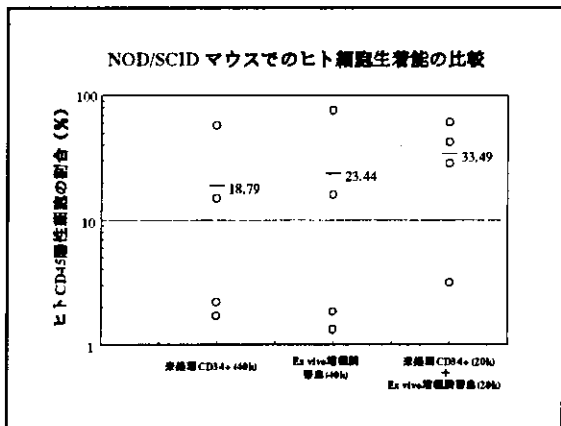
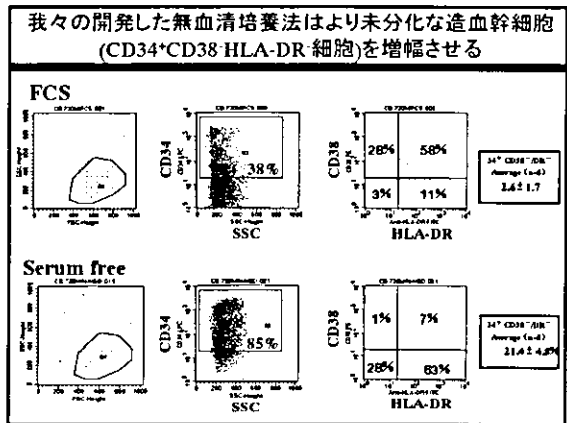
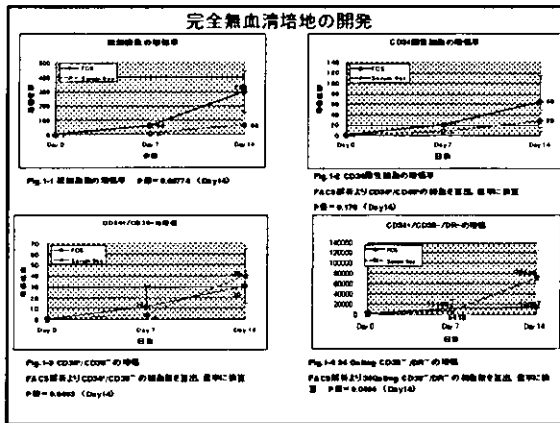
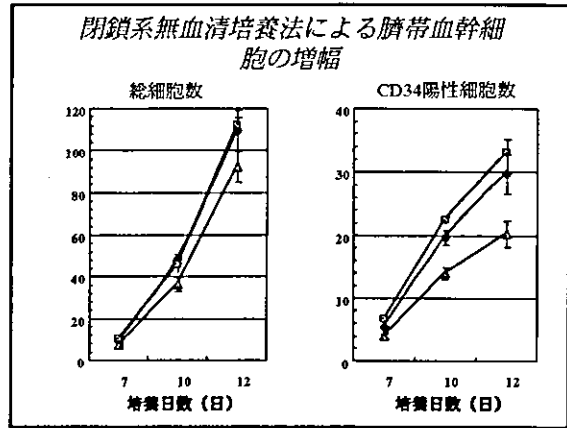
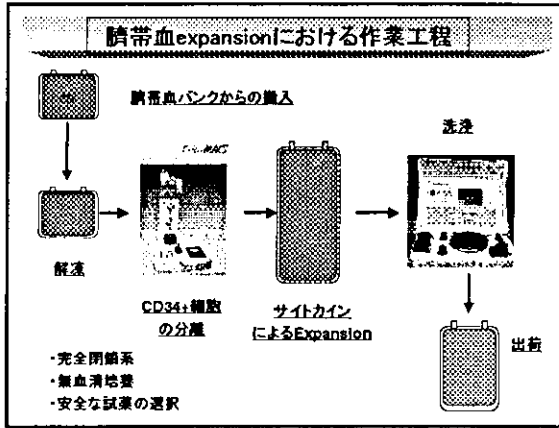
The image shows a mouse and a bar chart of the IL-2 receptor family (IL-2, IL-15, IL-4). The text lists the characteristics of the NOG mouse: T, B lymphocytopenia, Macrophage dysfunction, Complement insufficiency, and Complete NK cell deficiency.

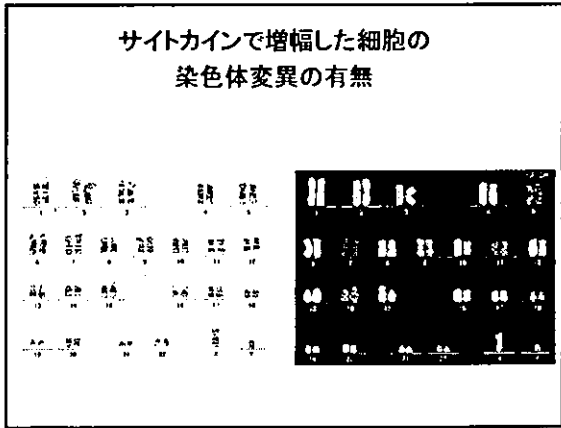


- ### Ex vivo増幅臍帯血の品質・安全性試験
- ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針-厚生労働省
- 加工細胞の性質の変化を表現型、染色体検査等を行ない解析すること。
細胞の形態(光顕、電顕による観察)、表面抗原解析、染色体検査、FISH(遺伝の有無)
 - 必要に応じて細胞・組織が産生する各種サイトカイン、成長因子等の遺伝的性質の定量化を行ない、生体内へ導入した時の影響に関して考察を行なうこと。
増幅造血幹細胞は各種サイトカインを分泌することが知られており、24時間培養した際の培養上清サイトカインを定量化
 - 製品の変性が患者等の正常な細胞又は組織に影響を及ぼす可能性について検討、考察すること。
マウスを用いた体内動態・細胞分布の解析
ウイルス負荷試験等

- ### Ex vivo増幅臍帯血の前臨床試験
- 目的
- 臨床モデルマウスでの安全性の確認
 - 臨床効果の予測
- NOD/SCIDマウスへ増幅臍帯血を移植することにより生着できるのかどうか、体内で癌化、毒性、炎症反応が起こらないのか安全性を確認する。
 - 従来の臍帯血移植と比較できる系をつくり、増幅臍帯血の有用性を証明する。→マウス体内でのヒト細胞のキメラズム(ヒト細胞の割合)を比較

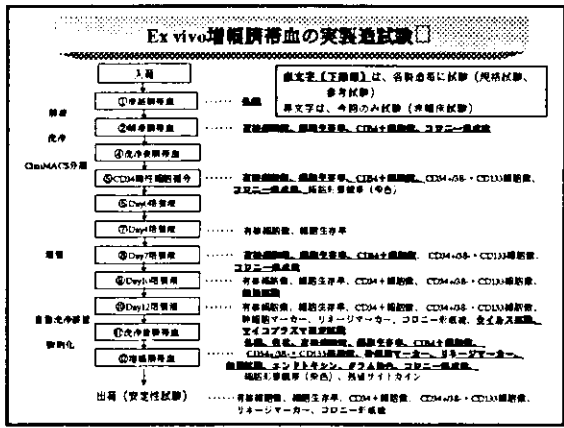
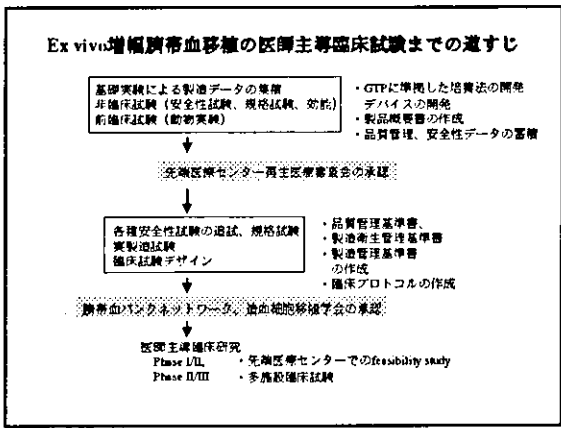






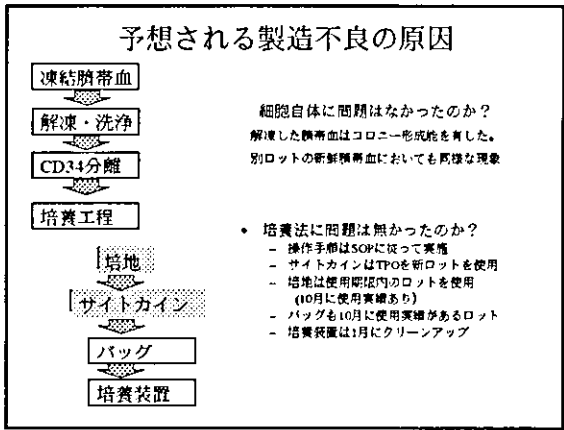
増幅した培養細胞のサイトカイン産生能

サイトカイン種	GMP-60増幅での増幅上層			10%K1A1型血清を添加したGMP-60増幅での増幅上層		
	KCK-016	KCK-017	KCK-018	KCK-016	KCK-017	KCK-018
IL-3a	-	+	+	-	-	-
IL-1β	-	+	+	-	-	-
IL-2	±	±	±	-	-	-
IL-6	+	+++	+++	+++	+++	+++
IL-12	-	±	±	-	-	-
IL-25	-	±	±	-	-	-
IFN-γ	±	±	±	-	-	-
MIP-1β	-	-	-	-	±	+
SCF	±	±	±	-	-	-
SDF-1	+	±	±	-	-	-
LIF	±	-	-	±	±	±
LIGHT	-	-	±	-	±	±
MIP	±	±	±	-	-	-
RAP-2	+++	+++	+++	±	-	+
TMP-1	±	±	±	+	-	-
TMP-2	+	±	±	+	-	-



実製造試験の結果

- 実施日：2004年2月27日
- 内容：増幅不良のため、7日目で中止。
 - CD34陽性細胞数：1.97 × 10⁶個
 - バッグ培養を開始したが、4日目の稀釈操作時点で細胞の増幅が認められず。
 - 7日目の稀釈操作を行うが、総細胞増幅が確認できず、中止と判断。
 - CD34陽性細胞のコロニー形成能は正常。
 - 7日目の時点で、無菌性等は確認済み。
- 対応
 - 予定していた第3回、第4回の製造は中止し、増幅不良の原因究明を進める。



まとめ

- 臨床試験に先立ち、実製造試験を行った。
- 実製造試験にて増幅不良事例が出現した。
- 増幅不良は培地が原因であった。
- 安全に臨床治療を行うためには培地のチェックなどの管理体制を整える必要がある。

体外増幅誘導血移植研究スケジュール

2002		2003				2004					
30	40	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20

培養方法 確立

品質検査法の確立

培養液の調整

培養液の調整

培養液の調整

培養液の調整

培養液の調整

培養液の調整

↑

・再生医療審議会
 ・兵庫県血液バンク
 倫理委員会
 (基礎研究に関する申請)

・再生医療審議会
 ・IRB
 (臨床試験に関する申請)

・臨床血バンクネットワーク倫理委員会
 ・造血幹細胞移植学会倫理委員会
 (臨床試験に関する申請)

さらに効率良い造血幹細胞の *ex vivo* 増幅を得るために

↓

造血幹細胞自己複製因子の遺伝子クローニング

↓

造血幹細胞自己複製因子を用いた *ex vivo* 増幅

造血発生にヒントを得て造血幹細胞自己複製因子の遺伝子クローニングを試みている

マウスAGM領域から造血幹細胞の増殖を支持するストローマ細胞株(AGM-S3)を樹立した

AGM領域からマウス、ヒト造血幹細胞増殖支持能を持つストローマ細胞株:AGM-S3を樹立した

AGM-S3

AGM-S3にヒト造血幹細胞 (CD34+ CD38- 細胞) の増殖を支持した

AGM-S3との共培養で6週後も多数のODFU-M2が産生された

AGM-S3のサブライン(A9)から造血幹細胞自己複製因子の遺伝子クローニングを試みている