

分担研究報告書

7. 臍帯血 DLI に向けた取り組みと基盤整備

7-1 臍帯血活性化リンパ球の特性

分担研究者：伊藤 仁也

(先端医療センター再生医療研究部主任研究員)

研究協力者：鹿村 真之

(先端医療センター再生医療研究部客員研究員)

研究要旨

ドナーリンパ球輸注療法(Donor Lymphocyte Infusion: DLI)は 1990 年に Kolb らにより慢性骨髄性白血病(CML)に行われて以来、様々な国で大規模な臨床試験が行われ悪性腫瘍の免疫療法としては唯一確立された療法である。しかし、現在のところその効果は高免疫原性腫瘍など一部の疾患に限られている他、Graft versus leukemia (GVL) effect を得るためのドナーの負担が大きいことや効果発現までに時間がかかることなどの問題点が挙げられている。

我々は移植後免疫寛容を打ち破り、細胞障害性 T 細胞(CTL)を誘導するという観点から活性化した T 細胞による DLI の臨床試験を計画している。活性化 T 細胞による臨床試験の実現のためには GMP (Good Manufacturing Practice) に準じた無血清培養法の確立、活性化した T 細胞の機能試験およびその特徴、CTL の確立法、臍帯血への応用などの課題が残されている。

そこで、成人末梢血および臍帯血の活性化されたリンパ球の特性の比較検討を行った。その結果、成人末梢血に比べ臍帯血は劣っている点が多いが、活性化培養を行うことにより活性化されると、成人末梢血と同等の機能を有することができることが分かった。これより、活性化培養を利用することにより、DLI を臍帯血で行える可能性が示唆されたので、以下に順に示す。

A. 研究目的

臍帯血移植において DLI を行うことは、成人末梢血に比べ細胞機能的に劣っていることや、細胞数不足の点から不可能である。そこで、我々は前回の基礎実験から導かれた、効率よく T 細胞を活性化、増幅させる培養系を用いて活性化 DLI 療法を開発した。この療法では活性化した T 細胞を輸注するため、効果発現までの時間を短縮でき、更に GVL 効果が増強される可能性がある。また、Bag 培養を行うと 1000 倍以上にリンパ球を増殖することが可能であり、活性化した細胞を凍結することにより何度も使用することが可能である。これらのことから、臍帯血移植へ応用できると考えられる。

今回、臍帯血の活性化 T 細胞の特性を検討することを目標に本分担研究を開始した。

B. 研究方法

1) 培養法：兵庫臍帯血バンクから得られた臍帯血 (Cord Blood : CB) および成人ボランティアから得られた成人末梢血(Peripheral Blood Mononuclear Cell: PBMC)をフィコール比重遠心法により単核球層に分離し、リンパ球を採取した。培養培地は RPMI 1640 +7 (日研生物医学研究所) に 10% となるよう FCS (JRH BIOCIENCES) を添加し、更に IL-2 (CHIRON) を 1400 IU / mL で添加したものをを用いた。その後、OKT-3 抗体 (ヤンセン協和) で固相化した、25 cm² 抗 CD3 抗体固相化 Flask に採取したリンパ球それぞれを 1.0 ×10⁶ / 5 mL / Flask となるように播種し、37 °C、RH 97%、CO₂ 5%のインキュベーター内で2週間培養した。培養開始後は適時培養液を添加していき、5日目に OKT-3 刺激を排除し、IL-2 濃度を 700 IU / mL とした。その後、培養液を経日的に添加し最終 IL-2 濃度を 175 IU / mL とした。

Table 1 成人末梢血および臍帯血の特徴の相違

	成人末梢血 (PBMC) の特徴	臍帯血 (CB) の特徴
ナイーブ / メモリー分画	ナイーブ < メモリー	ナイーブ > メモリー
サイトカイン産生能	INF- γ , IL-2 産生 高	INF- γ , IL-2産生 低
T細胞活性化の指標	低親和性IL-2レセプター発現 高	IL-2レセプター γ 鎖発現 低
NK細胞機能	NK活性 正常	NK活性 低下
MLC (リンパ球混合培養)	1次MLC, 2次MLC 正常	2次MLC 低下

2) 細胞表面抗原解析：FACS Calibur (Becton Dickinson)にて細胞表面マーカーについて解析を行った。なお、抗体には BD 社製のものを用い、Subclass Control は IgG 1 とした。表面抗原としては CD 3、CD 4、CD 8、CD 16、CD 25、CD 28、CD 45RO、CD 56、CD 62L、CD 122、CD 132、CD 154 および HLA-DR について解析を行った。

3) サイトカイン染色：PMA (Phorbol 12-Myristate 13 Acetate) および Ionomycin 存在下で細胞を刺激し、細胞内にサイトカインを産生させる。このとき Medium 中に細胞内蛋白質輸送を阻害する Brefeldin A を添加し、産生されたサイトカインを細胞内に蓄積させる。蓄積させた後、細胞膜透過処理試薬を用いて細胞を固定し、膜透過処理を行い、細胞内サイトカインを染色した。サイトカインは IL-2、IL-4、IL-10 および INF- γ を解析し、その他 Perforin、Fas L についても解析を行った。

4) 細胞障害性能：ATP assay を用い NK 活性 (K-562)、LAK 活性 (Daudi) および Allo 抗原反応 (EB-LCL) について細胞障害性能を検討した。ATP assay は代謝活性を有する生存細胞の指標である ATP を、ルシフェラーゼを利用することにより測定する。ルシフェラーゼ反応には ATP が必要であるため、生じる光量は生存細胞数の指標

である ATP の存在量に比例する。

C. 研究結果

1) 細胞の増殖能の評価

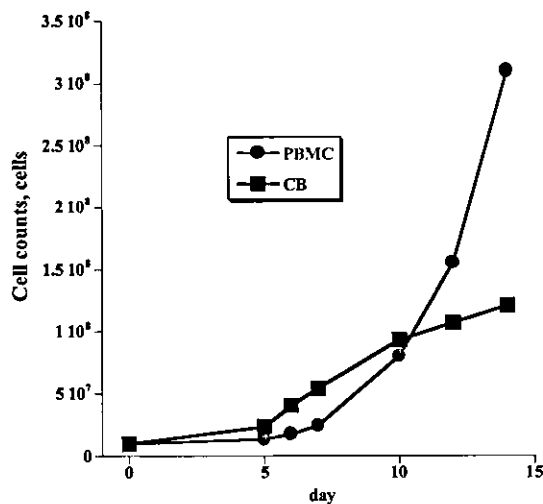


Fig. 1 PB および CB の増殖曲線

Fig. 1 に活性化培養における PB および CB の細胞増殖曲線を示す。PB は培養 1 週間後から良好な増殖を示し、2 週間後には総細胞数で約 300 倍の増殖を示した。一方、CB においては、一次増殖が見られたがその後減退し、最終総細胞数は約 100 倍と PB の 1/3 程度の増殖に留まった。

2) 活性化の評価

Fig. 2 に Fresh における PB および CB の IL-2 レセプターの発現率を示した。CD 4 陽性細胞 (CD 4+)、CD 8 陽性細胞 (CD 8+) とともに低親和性 IL-2 レセプターである CD 122 / CD 132 dimer の発現率が PB > CB であった。これらのことから、臍帯血中の T 細胞では低親和性 IL-2 レセプター (β/γ) の発現

が PB に比べて低く、活性化されにくい状態にあることが確認された。

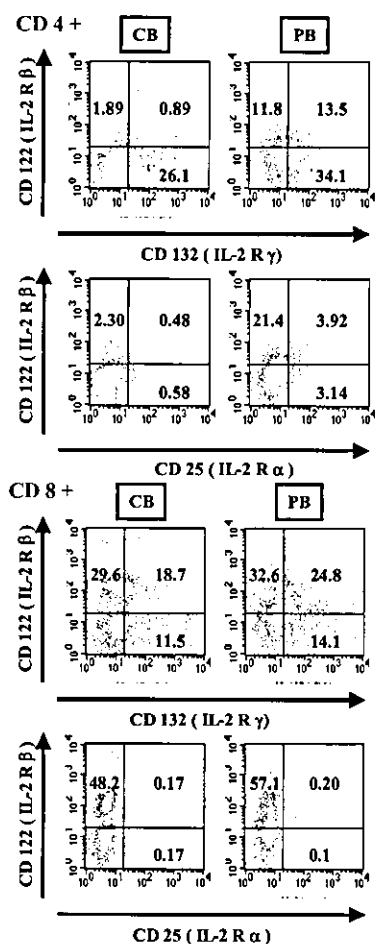


Fig. 2 培養開始時 (Fresh) における

PB および CB の IL-2 レセプター発現 Fig. 3 に培養 4 日目における PB および CB の IL-2 レセプターの発現率を示した。PB、CB とともに α 鎖の発現が認められ、高親和性 IL-2 レセプターになっていることが確認された。また、 β 鎖および γ 鎖も発現しており、PB と CB の相違はあまり見られなかった。これらのことから、低親和性 IL-2 レセプターの発現が低い臍帯血 T 細胞においても一度活性化されれば、IL-2 レセプ

ターは高親和性となり、数、強度ともに成人末梢血 T 細胞と相違が無いことが分かった。

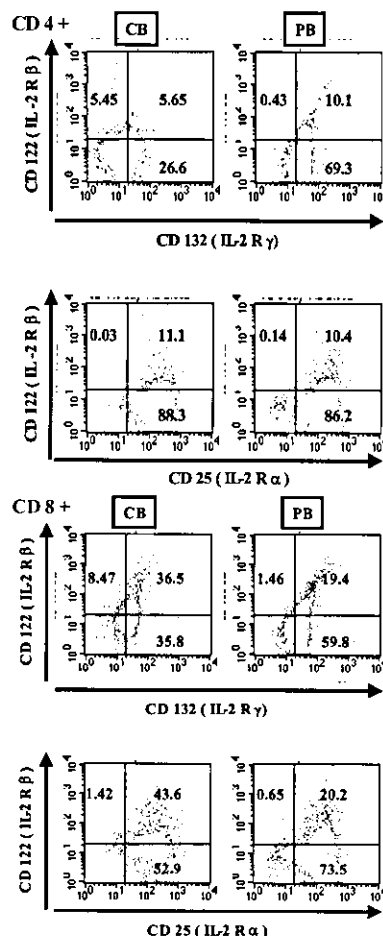


Fig. 3 培養 4 日目における

PB および CB の IL-2 レセプター発現

3) T 細胞分画の評価

Fig. 4 に PB および CB の T 細胞分画の推移を示した。Fresh において、CB はナイーブ細胞が主であり (86.5 ± 5.58)、記憶細胞 (エフェクターメモリー細胞、セントラルメモリー細胞) はほとんど存在しなかった (1.04 ± 0.02 , 1.94 ± 0.57)。一方 PB では、ナイーブ細胞が多かった ($54.7 \pm$

15.1)ものの、CB に比べ記憶細胞の存在が確認できた(14.8 ± 3.89、15.3 ± 2.74)。また、PB、CB はともに活性化培養することによりセントラルメモリー細胞の増加が認められた。

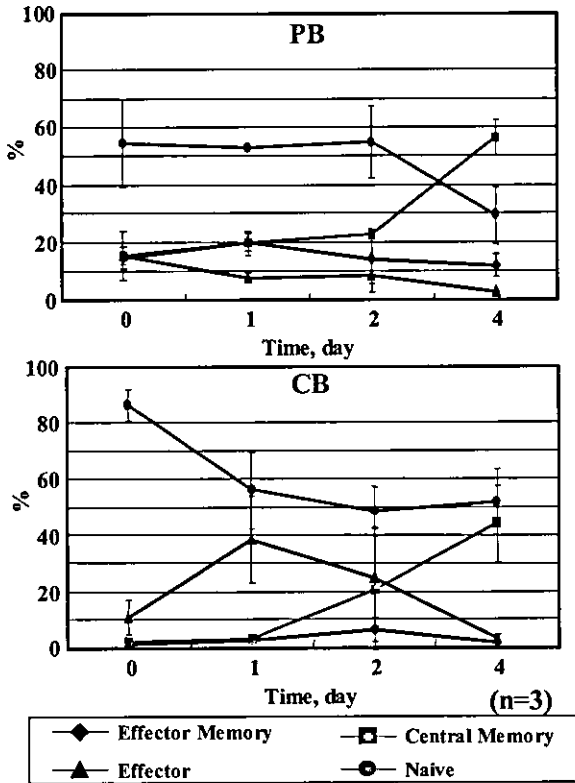


Fig. 4 PB および CB の T 細胞分画の推移
 一般に移植に適しているのはエフェクター細胞であるとされているが、エフェクター細胞は寿命が短いため、速い効果は期待できるが、その後の効果は期待できない。そこで、我々はエフェクター細胞に分化でき、再刺激後の反応も速く、大量のサイトカインを分泌するエフェクターメモリー分画の増幅を目標とした。今回の検討においては十分な増幅は得られなかったが、活性化を持続することによりセント

ラルメモリー細胞からエフェクターメモリー細胞に誘導されることが予想される。

4) 機能的マーカーの評価

次に細胞障害性機能を見るために、機能的マーカーである Perforin および Fas L の発現を活性化培養前後で比較した。Fresh において、PB、CB ともに Perforin および Fas L の発現は認められなかった (Table 2-1、-2)。

Table 2-1 Perforin 発現率 (Fresh) (n=3)

Perforin	CD 4 +	CD 8 +
CB	0.013 ± 0.02	0.013 ± 0.01
PB	0.023 ± 0.04	0.003 ± 0.05

Table 2-2 Fas L 発現率 (Fresh) (n=3)

Fas L	CD 4 +	CD 8 +
CB	0.56 ± 0.42	0.46 ± 0.33
PB	0.48 ± 0.21	0.43 ± 0.41

活性化培養 14 日目において Fas L の発現が PB、CB ともに認められたが、Perforin はほとんど確認されなかった (Fig. 5-1、-2)。これより、CB は活性化培養することにより、Fas L の発現が高まり PB と同等な細胞障害性能を有することができることが分かった。

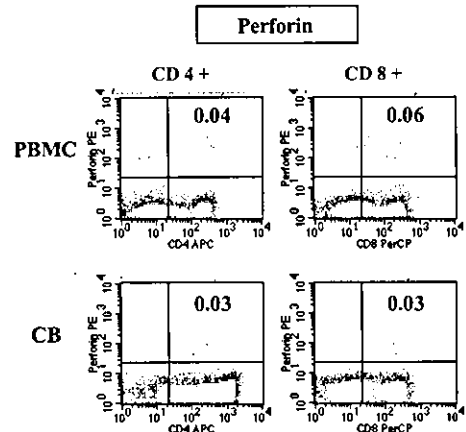


Fig. 5-1 Perforin 発現率 (Day 14)

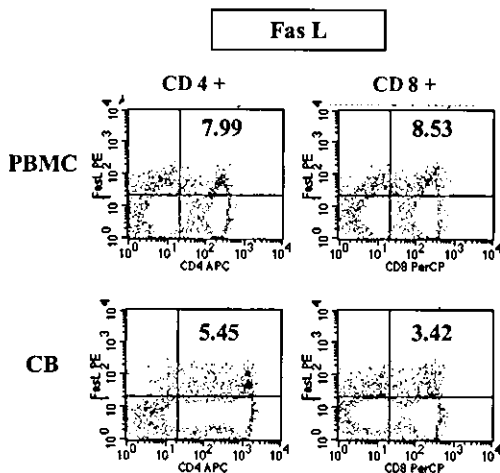


Fig. 5-2 Fas L 発現率 (Day 14)

5) サイトカイン産生能の評価

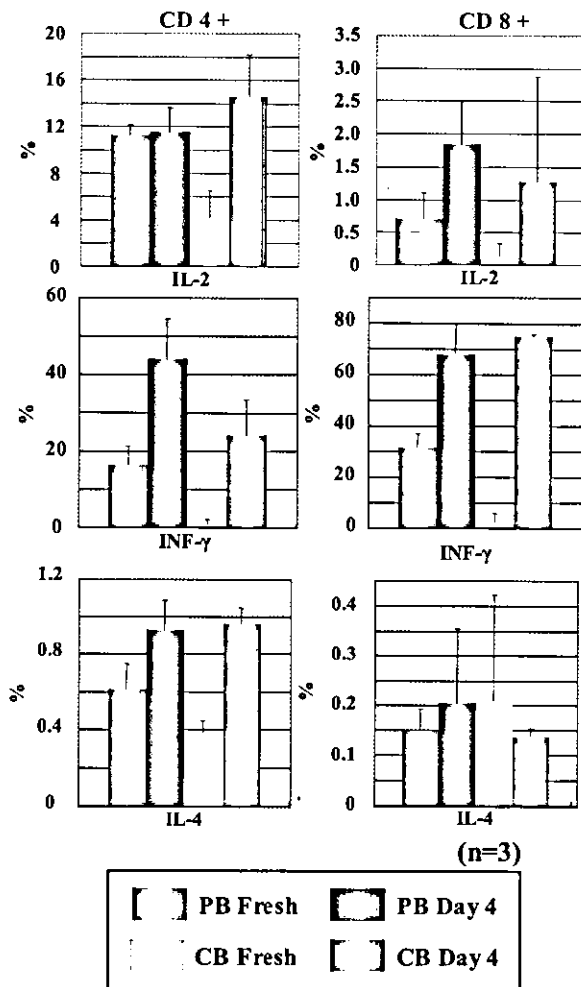


Fig. 6 活性化培養前後における
サイトカイン産生能の違い

活性化培養前後におけるサイトカイン産生能について比較検討を行った (Fig. 6)。Fresh においてはほぼ全てのサイトカインで PB > CB となり、Fresh 時での CB のサイトカイン産生能の低さが確認された。しかし、活性化培養を行うことにより、CB からのサイトカイン産生は著しく上昇し、PB とほぼ同等の発現率が得られた。特に、CD 4 (+) 細胞では IL-2 および IL-4 の産生能が PB を上回り、CD 8 (+) 細胞では INF-γ の産生が高かった。これらのことから、CB は活性化することにより PB とほぼ同等のサイトカイン産生能を持ちうるということが分かった。また、活性化 PB および CB はともに Th1 優位のサイトカイン産生を示した。

6) 細胞障害性能の評価

我々は細胞障害性 T 細胞の検定を、通常行われる ⁵¹Cr 遊離試験ではなく、RI による汚染が無く、かつ簡便に行える Non RI での測定法を確立し、行った。測定方法として前述した ATP assay を用い、HLA 非拘束性反応をみるために NK 活性および LAK 活性を行った。また、EB-LCL を用いて Allo reactive な反応を確認した。

Table 3 NK 細胞の割合 (n=3)

	Fresh		
	56/16	16	56
PB	9.47 ± 5.68	0.75 ± 0.04	1.85 ± 0.37
CB	11.1 ± 1.70	8.46 ± 6.01	1.52 ± 0.23
	Day 4		
	56/16	16	56
PB	0.70 ± 0.27	0.20 ± 0.13	2.96 ± 0.27
CB	1.50 ± 0.52	0.37 ± 0.23	2.51 ± 0.21

Fig. 7 に活性化培養前後における NK 活性および LAK 活性を示した。また、Table 3 は活性化培養前後における NK 細胞の割合を示している。CD 56 / 16 陽性 NK 細胞は培養により発現率が低下したが、培養により総細胞数が増加しているため NK 細胞数自体は変化していない。しかし、活性化培養したリンパ球では PB、CB ともに NK 活性が上昇した。特に、CB において著しく上昇しておりこの傾向は LAK 活性においても認められた。これより、CB においても活性化培養によって、NK 細胞による細胞障害性能と IL-2 刺激で活性化された T 細胞による細胞障害性能を獲得することが分かった。

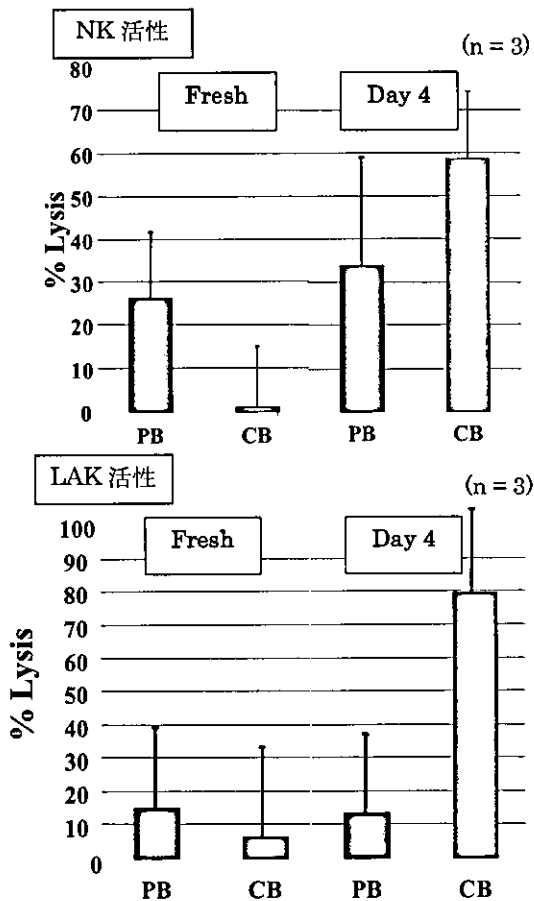


Fig. 7 NK 活性および LAK 活性

Fig. 8 に Allo 抗原反応性を示した。今回の検討では、PB より EB-LCL を作製し Target cell とした。その後、別人の PB および CB を Effector cell とし、4 h 共培養した後、ATP assay を行い Allo 細胞に対する CTL 活性を確認した。

Fresh において PB では反応が認められたが、CB では認められなかった。しかし、活性化すると CB においても反応が認められ、PB においても活性化により CTL 活性の上昇が認められた。

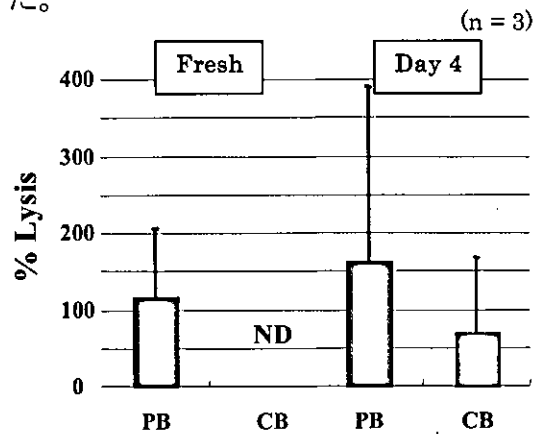


Fig. 8 Allo 抗原反応性

D. 考察

以上のことより、

- 1、臍帯血は増殖能、活性化能ともに成人末梢血に劣るものの一度活性化させることによりその後は増殖させることができた。
- 2、臍帯血 T 細胞においても成人末梢血 T 細胞と同様にメモリー T 細胞へ誘導される。

3、サイトカイン産生能は成人末梢血と同等に上昇し、活性化の指標である高親和性IL-2レセプターの発現も認められた。

が確認され、活性化することにより臍帯血T細胞は成人末梢血T細胞と同等な機能を有することが分かった。

E. 結論

今回の検討より、PB 比べ CB は増殖能および機能において劣っているが、活性化培養を行うことにより活性化されると、機能においては PB と同等のものを有することができることが分かった。これより、臍帯血が DLI に有用であることが確認され、今後、活性化期間の変更等を検討し、細胞増殖率の向上を図り DLI の臍帯血での応用を目指して開発を進める予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことはない。

G. 研究発表

1) 論文発表

(1) 活性化リンパ球輸注療法

伊藤 仁也

今日の移植 17(1) P89-98, 2004

(2) 活性化 T 細胞の造血細胞移植

への臨床応用

伊藤 仁也

血液成分治療 P145-161, 2004

2) 学会発表

臍帯血 DLI の臨床応用にむけた基礎的検討—臍帯血と成人末梢血活性化 T 細胞の特性—

鹿村 真之、伊藤 仁也、

中畑 龍俊

第 27 回 日本造血細胞移植学会
総会

平成 15 年 12 月 17 日 (2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許出願中

特 2002-171966

臍帯血由来活性化リンパ球及び該リンパ球を主成分とする製剤ならびに該製剤の製造方法、該製剤調整用キット

2) 特許公開

US6, 692, 958、2004. 2. 17

CORD BLOOD-DERIVED
ACTIVATED LYMPHOCYTES,
PREPARATIONS CONTAINING SAID
LYMPHOCYTES AS MAIN
INGREDIENT AND MATHOD AND
KIT FOR PRODUCING SAID
PREPARATIONS.

IV. 班会議記録・合同研究カンファレンス

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金
「基礎研究成果の臨床応用推進研究」班会議記録

第 1 回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成 16 年 4 月 13 日 (火) 14:00~16:00
- 2 場所 京都大学病院 第一臨床研究棟 地下 1F
- 3 データカンファレンス

演者	演題名
初山麻子 先端医療振興財団技術員	「無血清培養による Magakaryocyte への分化誘導」-予備実験-
鈴木秀文 キリンビール (株) 先端医療振興財団 特別研究員	「Ex vivo 増幅臍帯血の製造試験の実施について」 —増幅不良事故の原因究明について—
田中宏和 先端医療振興財団 主任研究員	「HOX 転写因子群のデコイペプチドを用いた内的因子操作法」

第2回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成16年5月18日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟 4階研修室
- 3 データカンファレンス

演者	演題
吉川義洋 ニプロ株式会社 副主任研究員	「QBSF-60 に関する途中経過報告」
松崎正晴 日本BD(株) バイオサイエンス	「FCM による幹細胞の評価方法」 -増幅加工工程、及び最終製品の品質管理試験・SP 細胞検出の基礎検討
平家俊男 京都大学大学院発達 小児科・助教授	「ヒト臍帯血CD34 陽性細胞の肝細胞への分化能の検討」

第3回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成16年6月8日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 ばるるプラザ京都 6階会議室
- 3 データカンファレンス

演者	演題
鈴木 秀文 先端医療センター 特別研究員 キリンビール株式会社 主任研究員	「Ex vivo 増幅臍帯血実製造試験結果について」
吉川 義洋 ニプロ株式会社 副主任研究員	「QBSF-60 に関する経過報告」

第4回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成16年7月6日(火) 15:00~17:00
- 2 場所 先端医療センター臨床棟 4階研修室
- 3 データカンファレンス

演者	演題
<p>廣瀬 弥保 先端医療センター 特別研究員、 日本BD株式会社</p>	<p>【実製造試験増幅臍帯血の表面抗原解析の結果と問題点】</p>
<p>丸山 京子 先端医療センター再生医療 研究部技術員</p>	<p>【実製造試験における規格検査および非臨床試験結果について】</p>
<p>清水 則夫 東京医科歯科大学 難治性疾患研究所ウイルス 学助教授</p>	<p>【増幅臍帯血におけるウイルス負荷試験について】</p>

第5回合同研研究カンファレンス

- 1 日時 平成16年8月31日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 ばるるプラザ京都 6階会議室
- 3 データカンファレンス

演者	演題
<p>鹿村 真之 先端医療センター再生医療 研究部技術員</p>	<p>【臍帯血活性化T cellの特性】</p>
<p>小林 健一郎 先端医療センター 特別研究員</p>	<p>【QBSF 培地性能試験中間報告1】</p>
<p>槻木 裕志 先端医療センター再生医療 研究部技術員、ニプロ株式 会社</p>	<p>【QBSF 培地性能試験中間報告2】</p>

第6回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成16年8月31日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 ぱるるプラザ京都 6階会議室
- 3 データカンファレンス

演者	演題
多田 典子 先端医療センター再生医療研究部技術員	『GSK-3 β 阻害剤が造血幹細胞の未熟性維持に及ぼす影響についての検討』
初山 麻子 先端医療センター再生医療研究部技術員	『臍帯血造血幹細胞の増幅培養系における完全無血清培地の性能評価』
槻木 裕志 先端医療センター特別研究員 ニプロ株式会社	『QBSF-60 培地性能評価試験 中間報告3』

第7回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成16年11月9日(火) 16:00~18:00
- 2 場所 芝蘭会館別館2階 研修室2
- 3 データカンファレンス

演者	演題
田中 宏和 先端医療センター主任研究員	『合成ペプチドによる内的因子操作法の開発』
清水 則夫 東京医科歯科大学助教授	『造血幹細胞増幅系へのウイルス添加試験：中間報告2』

第8回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成16年12月14日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 先端医療センター 4階研修室
- 3 データカンファレンス

演者	演題
丸山 京子 先端医療センター再生医療研究部技術員	『ex vivo 増幅臍帯血の臨床試験にむけた品質管理法の確立』
鹿村 真之 先端医療センター再生医療研究部技術員	『臍帯血 DLI の臨床応用にむけた基礎的検討 -臍帯血と成人末梢血活性化 T 細胞の特性-』
高田 のぞみ 先端医療センター再生医療研究部技術員	『臍帯血造血幹・前駆細胞の ex vivo 増幅培養日数検討』

第9回合同研究カンファレンス

- 1 日時 平成17年1月11日(火) 14:00~16:00
- 2 場所 ぱるるプラザ京都 6階会議室
- 3 データカンファレンス

演者	演題
鈴木 秀文 キリンビール(株)医薬カンパニー 生産技術センター 主任研究員	『第3回実製造試験の結果』
丸山 京子 先端医療センター再生医療研究部技術員	『第3回実製造試験の品質管理結果』
初山 麻子 先端医療センター再生医療研究部技術員	『Nakahata 法によるさい帯血全単核球培養の検討』

平成16年度厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業
基礎研究成果の臨床応用推進研究

トランスレーショナル研究成果発表会

1・日時

平成17年2月23日(水) 13:00~17:00

2・場所

(財)がん研究振興財団内 国際研究交流会館

演者	演題
・京都大学大学院発達小児科教授 ・先端医療センター再生医療研究部 客員研究員 中畑 龍俊	Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ

Ex vivo 増幅臍帯血を用いたトランスレーショナルリサーチ

主任研究者・発表者 先端医療センター再生医療研究部 特別主席研究員
京都大学 医学部発達小児科学 教授 中畑 龍俊

1. はじめに

我々は造血幹細胞のサイトカイン受容体の解析から SCF, FL, TPO, IL-6/sIL-6R による臍帯血 CD34 陽性細胞の ex vivo 増幅を行い、NOD/SCID マウスへ移植した結果、SRC 活性が 4.3 倍増幅されることを証明した基礎の成果を臨床応用することを目的にこの研究班にて研究を進めている。臍帯血移植は体重の軽い小児が対象と考えられてきたが、年々成人に対する移植例が増加しており、2004 年までに 546 例の移植が行われた。しかし、1000 日 EFS(event free survival)は 22%にとどまるのに対し、TRM(Treatment related mortality)は 50%に達し、問題点を含んでいるといえる。原因の 1 つとして臍帯血移植においては、生着不全率が高いこと、生着日数が遅いことがあげられており、感染症の頻度も高いことが、TRM を高める結果となっている。また生着と輸注 CD34 陽性細胞数は多変量解析で強い相関があることがわかり、CD34 陽性細胞を増幅することにより臍帯血移植成績を向上させることが、期待される。胞治療製剤によるトランスレーショナルリサーチの実践は、わが国においても始まったばかりの分野であり、我々は 1) Good tissue practice(GTP)に則った培養法の確立 2) 細胞製剤の品質管理法の確立 3) 製造環境の基盤整備 (Cell processing center の整備) 4) 科学的に証明しうる臨床試験の確立という目標をたて、研究を開始した。これまでの成果において、ex vivo で増幅した臍帯血の安全性および効果を予測するための前臨床試験を終了したので報告する。

2. 臍帯血の ex vivo 増幅培養法の確立

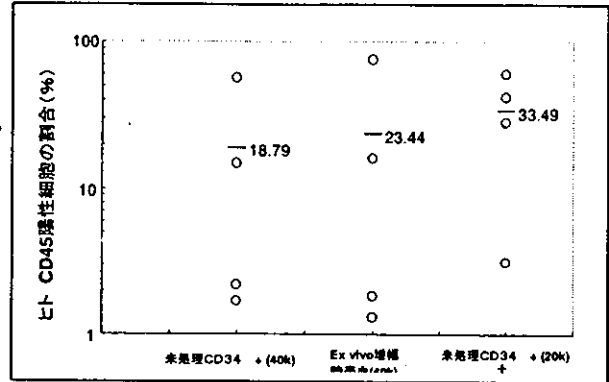
細胞製剤の臨床応用に向けて病原微生物の混入や取り違えを防ぎ、品質が確保された細胞製造法を確立することは重要な課題である。我々は閉鎖系培養法の確立と動物やヒトの血清を使用しない無血清培養法の確立を目標に実際の臍帯血を用いて製造試験を行った。閉鎖系培養には ClinIMACS にて CD34 陽性細胞を分離後バッグ培養により、SCF+FL+TPO+FP-6 (IL-6/sIL-6R 複合体)の添加を行い、12 日間培養した。最終製剤は赤血球洗浄装置を改良した無菌細胞洗浄装置を用いてアルブミン添加整理食塩水に浮遊させた。この培養法によって 6 回の実製造試験を行った。12 日間の培養による総細胞増幅率は 69.7 ± 30.3 倍、CD34 陽性細胞増幅率は 21.9 ± 6.1 倍であった。無血清培地の選択には 3 種類の造血幹細胞用無血清培地をテストして決定した。しかし、試験製造中に臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅が全くおこらなかったり、増幅不良が生じることがあることがわかり、原因究明を試みたところ

培地のロットや保管状況によって増幅不良が生じることが明らかになった。このことは製造上重要な問題を含んでおり、我々は原材料受け入れ試験として、実際の臍帯血を培養して増幅の良いロットを選択する培地ロット試験と製造直前に全数受け入れ検査として白血球株の ATP 活性をルシフェラーゼ反応により検出する培地ボトル試験を開発した。また市販の培地とは別に脂質とレコンビナントアルブミン、ビタミン類を添加した完全無血清培地を開発した。この培地で増幅される臍帯血 CD34 陽性細胞はコロニー形成能、表面マーカーなどの in vitro のアッセイでも NOD/SCID マウスを用いた移植実験でも非常に未分化な造血前駆細胞を増幅させられることがわかり、製品化を急いでいる。

3. Ex vivo 増幅臍帯血の品質管理法の確立

「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 906 号、および 1314 号、厚生省医薬安全局長通知)に必要な品質管理法の概要が示されており、我々はこれに従い安全性の検討を行なった。安全性を示す試験としては、培養前後における各種染色を組み合わせて

た形態観察、電顕での微細構造の観察、染色体異常の確認を行なった。我々の培養方法で増殖した細胞には形態異常が認められず、また50%以上が非常に幼弱な芽球の形態を保っていることがわかった。さらにはがん化や染色体異常の検索には、G-band法による染色体検査、sky-FISHによる微小転座の有無、さらに白血病の中でも頻度が高い8種類の転座に注目し、RT-PCR法により白血病キメラ遺伝子の有無を調べた。これらの解析においても異常は認められなかった。*Ex vivo*で増幅した細胞を実際に移植する場合、これらの細胞が生体内でさまざまなサイトカインを産生し、思わぬ副作用を起こす可能性もあるため、我々はサイトカインアレイを行い、培養後の細胞について79種類のサイトカイン分泌の有無を網羅的に解析した。その結果、増幅臍帯血ではIL-1, MIP-1, SDF-1, FGF-4, IGFBP-1, IP-10, LIF, NAP-2, TIMP-1, IL-8の産生が確認された。さらにはNOD/SCIDマウスを用いた増幅臍帯血の生着能、および体内分布、炎症や癌化の関与などを観察する移植実験を行なったが、臨床試験で予定している未処理の臍帯血と増幅臍帯血を等量混ぜて投与した群で未処理群をヒト細胞キメラズム解析で上回り有効性が確認できた。また、移植マウスの病理学的検討結果、炎症、変性、がん化などの変化は認められず一定の安全性を確認できた。また少量の検体から短時間で薬事法で規定されたウイルスの検出を行う系をキット化し、特許出願した。

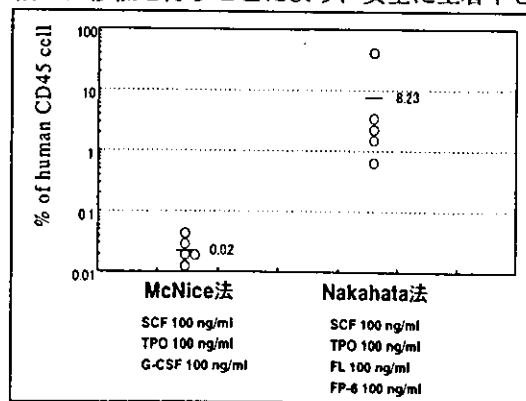


4 臍帯血造血幹細胞を用いた再生医療のための基盤整備

細胞製造環境はわが国においても十分な指針が示されているわけではないのが現状である。先端医療センターではセルプロセッシングセンター(CPC)の整備を行い、ソフト、ハードの開発を通じて最適な細胞製剤のプロセッシングを行えるよう、研究を進めてきた。ハードの整備においては、取り違いを防止する電磁ロック付きインキュベータ、培養環境のモニタリングや操作ミス未然に防ぐための細胞カルテシステム、無菌閉鎖系細胞洗浄装置などのデバイスの開発を行った。また環境衛生試験を実施し、塵埃数、浮遊菌、付着菌を測定することにより、科学的データに基づいた環境衛生基準書を作成した。

5 臍帯血幹細胞の *ex vivo* 増幅の臨床試験に向けた取り組み

わが国および海外での臍帯血移植例数の増加に伴い、臍帯血移植の問題点が明らかになってきた。前述したように、臍帯血移植の最大の欠点は採取細胞数に制限があるため、生着不全や生着遅延が起こることである。最近Minnesota大学を中心としたグループとDuke大学を中心としたグループがCD34陽性細胞数をそれぞれ $1.7 \times 10^5/\text{kg}$, $1.2 \times 10^5/\text{kg}$ 以上移植した例では生着率のみならず、生存率まで有意に改善させたと報告している。わが国においてもCD34陽性細胞数が $0.8 \times 10^5/\text{kg}$ 以下では生着不全率が高いことが示された。しかし、成人においてこれだけ、多数のCD34陽性細胞を移植できることは極めて稀である。したがってCD34陽性細胞を*Ex vivo*増幅して $1.7 \times 10^5/\text{kg}$ 以上に増幅し、移植を行うことにより、安全に生着率を向上させ、安全に移植する上で理にかなった治療法と考えられる。一方で、これまで海外で行われた*ex vivo*増幅臍帯血を用いた臨床試験は必ずしも生着促進効果が確認されていない。我々は増幅した臍帯血が生着に関与できるのかどうか、海外で臨床試験が行われている2グループの培養法(McNiece法, Kurtzberg法)を追試し、CD34陽性細胞数、コロニー形成能、NOD/SCIDマウスでの造血再構築能を比較し、効果の予測を試みた。その結果我々の方法では有意にコロニー形成能、CD34増幅率が上回った。さらにはNOD/SCIDマウスでのSRC活性も有意



に上回り、我々の方法がより未分化な造血前駆細胞を増幅していることが確認された。

Group	Nakahata	MacNiece	Kutzberg
Combination of cytokine	IL-6/sIL-6R+TPO + SCF + FL	G-CSF+TPO + SCF	GM-3.1%CSF/IL-3 + EPO+ FL
Fold of total mononuclear cell	180	230	21.4
Fold of CD34+ cell	49.9	15.7	1.3
Fold of total colony forming cell	66.0	39.3	4.7
Fold of CFU-Mix	26.6	8.8	6.7
Rate of CD34 cell of expanded CB	28.8%	7.1%	7.1%
Rate of CD34+/CD133+ cell	26.8%	8.9%	3.1%

我々は増幅した CD34 陽性細胞に生着促進効果があるかどうか臨床試験によって確認する予定である。

6 臍帯血 DLI の臨床応用に向けた取り組み

我々は昨年までの成果で、少量の凍結臍帯血中に含まれる T 細胞を個相化 CD3 抗体と IL-2 を用いて大量活性化増幅培養できる技術を確立し、特許を出願したが、本年度は臍帯血の活性化 T 細胞が DLI に用いられるかどうか、性質を解析した。臍帯血の T 細胞は IL-2 レセプター γ 鎖の発現が弱く、またナイーブ T 細胞が大部分を占め、INF- γ や FasL, Perforin を発現するエフェクター T 細胞が極めて少ないことが特徴である。またアロ免疫反応に関しても 2 次 MLC を誘導できないなどの機能的な未熟性が指摘されている。我々は臍帯血を活性化させることにより、エフェクター T 細胞を増幅させ、INF- γ 産生能、FasL 発現を誘導できることを証明した。また機能的にも活性化することにより、アロの EBV LCL に対する CTL 活性を誘導できることを証明した。また品質管理試験を行い DLI への臨床応用に向けた基盤整備を開始した。

『基礎研究成果の臨床応用推進事業』により開発され、特許出願した新技術

1. ウイルス標的核酸検出法：特願2003-164799
2. 抗癌、抗菌または抗ウイルス作用を有する医薬品組成物：特願2003-18321
3. 検体（細胞）取り違い防止および検体（細胞）管理システム：特願2003-009157
4. 組織培養装置：特願2002-165225
5. 転写因子操作による造血幹細胞の体外増幅法の開発：特願2003-392892、PCT/JP2004/017290
6. リコンビナントアルブミンを利用した造血幹細胞用無血清培地と培養法：特願2004-13291
7. 造血幹細胞培養システム：特願2004-102529
8. CORD BLOOD-DERIVED ACTIVATED LYMPHOCYTES, PREPARATIONS CONTAINING SAID LYMPHOCYTES AS MAIN INGREDIENT AND METHOD AND KIT FOR PRODUCING SAID PREPARATIONS. : US6,692,958, 2004.2.17 OPEN
9. 臍帯血由来活性化リンパ球及び該リンパ球を主成分とする製剤ならびに当該製剤の製造方法、当該製剤調製用キット：特開 2002 - 171966

V. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Matsubara H, Watanabe K, Sakai H, Chang H, Fujino H, Higashi Y, Kobayashi M, Adachi S, Seto S, Nakahata T	Rapid improvement of paraplegia caused by epidural involvements of Burkitt's lymphoma with chemotherapy.	Spine	29	E4-6	2004
Adachi S, Leoni M, Carson DA, Nakahata T	Apoptosis induced by molecular targeting therapy in hematological malignancies	Acta Haematol	111	107-123	2004
Kawai N., Momoi T., Mamada M., Yorifuji T., <u>Nakahata T</u>	Early initiation of GH therapy does not influence adult height but earlier start of pubertal induction in children with multiple pituitary hormone deficiency.	Clin.Endocrinology	60	608-612	2004
Okada M, Adachi S, Imai T, Watanabe K, Toyokuni S, Ueno M, Zervos AS, Kroemer G, <u>Nakahata T</u>	A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL positive human leukemic cells - caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediated by serine protease activity.	Blood	103	2299-2397	2004
Yorifuji T., Kurokawa K., Mamada M., Imai T., Kawai M., Nishi Y., Shishido S., Hsegawa Y., <u>Nakahata T</u>	Neonatal diabetes mellitus and neonatal polycystic, dysplastic kidneys: phenotypically discordant recurrence of a mutation in the hepatocyte nuclear factor 1 β gene due to germ-line mosaicism.	J. Clin. Endo. Metab.	89	2905-2908	2004
Yorifuji T., Kawai M., Mamada M., Kurokawa K., Egawa H., Shigematsu Y., Kohno Y., Tanaka K., <u>Nakahata T</u>	Living-related liver transplantation for propionic academia.	J. Inherit. Metab. Dis.	27	205-210	2004
Yagasaki H., Hamanoue S., Oda T., <u>Nakahata T.</u> , Asano S., Yamashita T.	Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi anemia gene FANCA in the Japanese population.	Human Mutat.	24	481-490	2004
Iida M., Heike T., Yoshimoto M., Baba S., Doi H., Nakahata T	Identification of cardiac stem cells with FLK1 expression during embryonic stem cell differentiation.	FASEB J	19	371-378	2004
Matsubara H., Adachi S., Yano J., Kitamura N., Miyazaki M., Mizushima Y., Hiramatsu H., Kobayashi M., Nakahata T	Successful allogeneic bone marrow transplantation in a patient with acute myelogenous leukemia and cytomegalovirus retinitis.	Int. J. Hematol.	80	190-192	2004
Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba T., Kazuki Y., Toyokuni S., Oshimura M., Heike T., <u>Nakahata T.</u> , Ishino F., Ogura A., Shinohara T	Generation of multipotent stem cells from postnatal mouse testis.	Cell	119	1001-1012	2004
Harazaki M., Kawai Y., Su L., Hamazaki Y., <u>Nakahata T.</u> , Minato N., Hattori M	Specific recruitment of SPA1 to the immunological synapse: involvement of actin-bundling protein actinin.	Immunol. Letter	92	221-226	2004