

臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI） の実用化

所属 国立成育医療センター研究所 母児感染研究部
研究者 藤原成悦

研究要旨： 臍帯血 DLI を実用化するための基礎研究として、臍帯血から CD4 陽性 T 細胞を選択的に活性化・増幅するための培養プロトコルを確立し、得られた細胞の性状を解析した。また、免疫不全マウスを用いて臍帯血 DLI の動物実験モデルの作製を進めた。

分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水則夫
- (2) 東京医科歯科大学医学部 森尾友宏
- (3) 国立成育医療センター研究所発生・分化研究部 清河信敬
- (4) 国立成育医療センター小児腫瘍科 熊谷昌明
- (5) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (6) 名古屋第一赤十字病院 加藤剛二
- (7) 株式会社リンフォテック 関根暉彬

A. 研究目的

造血幹細胞移植は悪性腫瘍や先天性免疫不全症の根治治療として普及しているが、最近では自己免疫疾患や固形がんにも適応の範囲を拡げている。造血幹細胞移植の一つ臍帯血移植は、ドナーの負担と危険がないこと、HLA 不適合を許容しやすいこと、コーディネート作業が不要であり必要なドナー細胞を速やかに供給しうることなど多くの長所をもつため、近年急速に普及している。しかし欠点としては、1 人のドナーから得られる細胞数が骨髄移植と比較して少ないため成人への適応が限られることや、生着不全をきたしやすいことがあげられる。また、移植後の悪性腫瘍再発や感染症に対してドナーリンパ球輸注療法（DLI）を施行できないことも重大な欠点である。

末梢血 T 細胞を *in vitro* で抗 CD3 抗体および IL-2 とともに短期間培養して活性化・増幅したのちに患者本人に戻す活性化自己 T 細胞輸注療法は、悪性腫瘍やサイトメガロウイルス等難治性ウイルス感染症に対して有効な治療法として確立されており、高度先進医療としての認定を受けている。また、造血幹細胞移植患者に対してこの活性化 T 細胞を用いて DLI を行う治療法も現在臨床試験が行われている。さらに、上記培養法により臍帯血 T 細胞を活性化培養できることもすでに示されている。

そこで本研究課題では、移植に使用する臍帯血

細胞の一部を *in vitro* で活性化・増幅したのち輸注する方法を、従来の DLI と同等あるいはよりすぐれた治療法として確立・実用化するための研究を行っている。具体的には、(1) 臍帯血単核細胞から CD4 陽性 T リンパ球を選択的に効率よく活性化・増幅するための培養プロトコルを確立すること、(2) 得られた活性化臍帯血リンパ球の性状を解析し、末梢血より同様に活性化・増幅したリンパ球と比較すること、(3) 免疫不全マウスを用いて、臍帯血移植モデル、ヒトウイルス感染モデル、臍帯血 DLI モデルを作製し、臍帯血 DLI の作用メカニズムの解析を行うこと、(4) これらの作業を通じて臍帯血 DLI の臨床試験実施に向けて理論的基盤を整備すること、の 4 点を目的とする。

臍帯血 DLI が実用化されれば、移植後の再発と感染症に対して治療法の選択肢が広がり、臍帯血移植の治療成績および移植後 QOL の向上につながる。特に、薬剤耐性ウイルスによる難治性感染症に対しては画期的な威力を発揮すると考えられる。また、活性化 T 細胞の輸注により移植細胞の生着が促進され、成人への臍帯血移植成功率が上昇することが期待される。さらに、免疫不全マウスを用いたヒトウイルス感染モデルは、ウイルス感染症の病態解明や新規治療法開発のための貴重な実験系となる。

本研究は全体として 3 年計画であり、最終的には臍帯血 DLI の臨床試験を行い、その有効性と安全性を確認することを目的としているが、今年度は 1 年目に当たり、基礎研究を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血の取得

東京臍帯血バンク分離保存施設（日本大学医学部）に提供された臍帯血のうち、細胞数不足のため保存が不可能であったものを利用した。

2. 臍帯血リンパ球活性化培養法

臍帯血 T 細胞の活性化培養は、これまでに確立されている末梢血 T 細胞の活性化培養法を改変して行った。比重遠心法により得られた臍帯血単核細胞を RPMI-1640 に 10% ヒト血清および 700U/ml IL-2 を添加した培養液に浮遊させ、抗 CD3 固相化フラスコに移し CO₂ インキュベーター(37°C±0.5°C CO₂ 濃度 5.0±0.2%、湿度 95%±5%)にて 6~14 日間静置培養した。その間、ほぼ 2 日ごとに等量の新鮮培養液が加えられた。抗 CD3 固相化フラスコは、ポリスチレン製フラスコにマウス由来抗 CD3 モノクローナル抗体を疎水結合させたもので、T 細胞を活性化させる作用を有する。上記の基本条件のもとで、培養液に含まれるヒト血清、IL-2、活性化培養期間、CD4 陽性細胞選択法などについて検討した。

(1) 培養液の検討

1.0×10⁶cells の CBMC を 14 日間培養し、細胞数の増加とフローサイトメトリー (FCM) による細胞表面活性化マーカー解析 (HLA-DR と CD69) で判定した。

1) 培養に用いる IL-2 濃度の検討

RPMI-1640 に 10% ヒト血清を添加した培養液に IL-2 を 50U/ml, 175U/ml, 350U/ml, 700U/ml, 1400U/ml の濃度で添加して培養した。

2) 培養に用いるヒト血清の検討

RPMI-1640 に 700U/ml IL-2 を添加した培養液に、海外ヒト血清または日本ヒト血清をそれぞれ 10% まで加えた培養液で比較した。

(2) 抗 CD3 抗体による活性化培養期間の検討

抗 CD3 固相化フラスコでの活性化培養 7 日目の時点で、同フラスコでの活性化培養を継続して行うものと、未固相化フラスコで 3 日間培養後、再び抗 CD3 固相化フラスコに戻したものとを、培養 14 日目・21 日目に細胞数及び細胞表面活性化マーカー解析 (HLA-DR, CD69) により比較・判定した。

(3) CD4 陽性細胞の選択培養法

8.0×10⁶cells 以上まで T 細胞を増幅した後、磁気ビーズ (Dynal 社) で選択的に CD4 陽性細胞を分離し培養した。以下の二つの方法を比較検討した。

1) CD4 磁気 beads のみで CD4 陽性細胞群を分離する方法

分離操作前に FACS 解析により CD4 陽性細胞数を算出し、これと等量の CD4 磁気 beads にて CD4 陽性細胞を分離した。回収した細胞を 2~3 日間培養し、FACS 解析で CD4 陽性率を検討した。

2) CD8 磁気 beads で CD8 陽性細胞群を除去後、CD4 磁気 beads にて CD4 陽性細胞を分離する方法

分離操作前に FACS 解析を行い、CD4 陽性細胞

数・CD8 陽性細胞数をそれぞれ算出し、これと等量の磁気 beads にて CD8 陽性細胞を除去後、CD4 磁気 beads にて CD4 陽性細胞を分離した。回収した細胞を 2~3 日間培養し、FACS 解析で CD4 陽性率を検討した。

3. 活性化臍帯血 T 細胞の性状解析

(1) 細胞表面マーカーの解析

活性化・増幅された臍帯血リンパ球について、FCM により細胞表面マーカーを解析し、含まれている細胞の種類や活性化の程度を検討した。また、T 細胞の活性化マーカーとして一般的に用いられている HLA-DR, CD28, CD69 の発現と、顕微鏡下での細胞の形態および細胞数算定結果を、培養開始後 0, 7, 14 日目に比較し、細胞の芽球化および増殖能と相関性のある活性化マーカーの選定を行った。

(2) T 細胞抗原受容体 (TCR) レパートリーの検討

活性化培養の前後における Vβ 遺伝子発現を、TCR Vβ Repertoire kit (Beckman Coulter) を用いて解析した。

(3) 活性化臍帯血 T 細胞のサイトカイン産生の解析

ELISA を用いて、以下のサイトカインを測定した。IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, sIL-6R, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-γ, M-CSF, G-CSF, GM-CSF, VEGF, SCF, Epo, RANTES, TGF-β。

4. NOG マウスを使用したモデル実験系の確立

NOD/SCID/γ_c^{null} マウス (以下、NOG マウス) は NOD/Shi-*scid* マウスに、さらに IL-2 受容体コモン γ 鎖のノックアウトを加えたもので、現在、ヒト造血細胞の移植に最も適した免疫不全マウスである。

6~8 週齢の NOG マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所の無菌飼育室で飼育した。前処置として NOG マウスに放射線照射を行い、翌日に 1 x 10⁴~1.2 x 10⁵ 個の CD34 陽性細胞および 2 x 10⁵ 個の活性化 CD4 陽性 T 細胞を投与した。造血幹細胞移植は、尾静脈、腹腔あるいは骨髄内投与により行った。CD34 陽性造血幹細胞は MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を用いたポジティブセクション、あるいは Stemsep キット (ステムセルテクノロジー社) を用いたネガティブセクションにより分離した。造血幹細胞の生着は、ヒト CD45 抗原陽性細胞を指標として検討した。

(倫理面への配慮)

1. 臍帯血使用に関する倫理的配慮

臍帯血バンクに提供された臍帯血には、細胞数の不足などの理由により保存されないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、保存が不可能な場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報保護を図った。本研究は国立成育医療センター倫理委員会の承認を得ている。

日本大学医学部では毎月臍帯血バンク運営委員会を開催しており、研究用に臍帯血を使用したい場合は指定された所定の申請用紙に研究者名、研究目的などを記載し委員会に提出して承認の可否を審議する。申請は年度ごとの更新とし、年度終了時には研究報告書が提出される。また、使用数については、研究者に臍帯血を提供するたびに記入し、管理を行っている。

2. 動物実験における倫理的配慮

動物実験においては、動物愛護と動物福祉の観点から十分な配慮をした。研究に参加する各研究機関において、国が定める各種の関連法律および各研究機関が制定する動物実験指針を遵守した。また、個々の動物実験については、「動物実験計画書」を作成し、動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 臍帯血細胞における造血能の指標と生着との関連について

2001年10月から2004年8月までに東海臍帯血バンクに保存された臍帯血1462件体についてコロニー形成能としてCFU-GM及びBFU-EをMethoCult GF H33343Vを用いて測定し、CD34陽性細胞数をFlowcytometryにて測定し、コロニー形成能との相関を検定した。また東海臍帯血バンクから供給され実際に移植された32例につき患者体重あたりの保存時細胞数、CD34陽性細胞数、コロニー形成能につき相関を検討し、臨床的な生着の有無との相関についても検討した。

(1) 保存時細胞数、CD34+細胞数及びコロニー数の相関

1) 保存細胞数と採取量の相関では $y=6.20x+34.81$ で、相関係数は0.75と高い強い相関を認めた。

2) 保存細胞数とCD34+細胞数との相関は $y=0.38x-0.46$ で、相関係数は0.60と中等度の相関を認めた。

3) 保存細胞数とCFU-GMとの相関は $y=0.62x-1.10$ で、相関係数は0.73と強い相関を

認めた。

4) 保存細胞数とBFU-Eとの相関は $y=0.67x-0.66$ で、相関係数は0.68と中等度の相関を認めた。

5) CD34+細胞数とBFU-Eの相関は $y=1.19+1.46x$ で、相関係数が0.79と最も強い相関を認めた。

6) CD34+陽性細胞数とCFU-GMの相関は $y=1.05+0.96x$ で、相関係数が0.79と5と同様に最も強い相関を認めた。

(2) 移植臍帯血の生着とCD34陽性細胞数及びコロニー数との相関

2001年10月から2004年8月までに保存された臍帯血の内、移植に用いられた32件につき生着と保存時の患者体重あたりの細胞数、CD34+細胞数、及びコロニー形成能との関係を検討した。その結果、保存細胞数が $3.72 \times 10^7/\text{kg}$ 以上、CD34+細胞数が $2.46 \times 10^5/\text{kg}$ 以上、CFU-GMが $2.85 \times 10^4/\text{kg}$ 以上では全例に生着が認められた。

2. 臍帯血バンクにおける臍帯血の採取と解析

日本大学附属板橋病院では1998年8月から院内バンクとして臍帯血の保存を開始した。2002年3月には、東京臍帯血バンクの保存機関として日本臍帯血バンクネットワークに認定された。開始以来の採取数、保存数、公開数の変化を図1に示す。2003年度には、保存率が低下したが、これは保存基準が変更されたことによる。

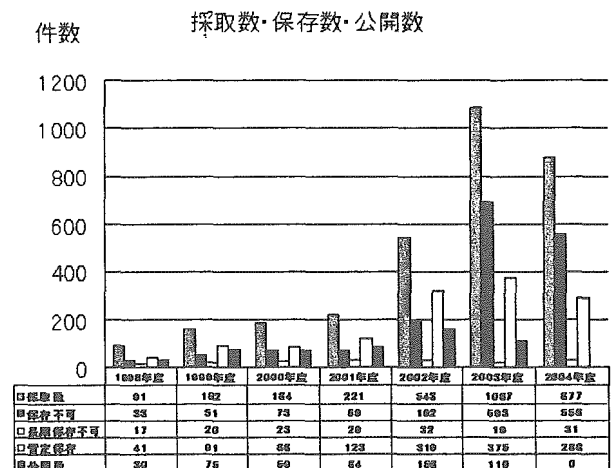


図1. 日本大学医学部における臍帯血の採取・保存・公開数の推移。

現在、 6×10^8 以上の有核細胞数を含む臍帯血を保存しているが、採血量90ml以上の場合には80%以上が保存可能であり、50ml以上70ml未満では40%以下が保存可能であった。従って、50ml以上70ml未満の臍帯血の60%が本研究に提供可能である。一月平均60件弱が提供可能である。

採取血液量と種々の細胞数との関連を調べたと

ころ、採取量と総有核細胞数との間には相関が見られたが、採取量と CD34 陽性細胞数および総 CFU-GM 数との間には相関が見られなかった。また、総有核細胞数と CD34 陽性細胞数の間に相関がみられたが、総有核細胞数と CFU-GM 数の間には相関がみられなかった。

3. 臍帯血リンパ球活性化培養法の検討

(1) 培養に用いる IL-2 濃度の検討

IL-2 濃度と細胞増殖の関係について検討した。臍帯血単核細胞を 14 日間培養し、細胞数算定および FCM による活性化マーカー解析結果により、最適な IL-2 濃度を決定した。その結果、50~1,400U/ml の範囲内では、IL-2 濃度による細胞増殖の有意な違いは認められなかった。一方、細胞表面活性化マーカーの解析では、50U/ml および 175U/ml の低濃度で培養した細胞に比べ、350U/ml, 700U/ml, 1400U/ml など高濃度で培養した細胞は、HLA-DR と CD69 の発現レベルが有意に高かった (表 1)。

表 1. IL-2 濃度比較検討 (培養 14 日目)

IL-2 濃度	14 日目の細胞数とマーカー発現		
	細胞数	CD3/HLA-DR	CD3/CD69
50U	2.3×10^8	24.1%	54.0%
175U	2.1×10^8	17.3%	41.3%
350U	2.5×10^8	30.0%	75.4%
700U	2.2×10^8	31.9%	72.4%
1400U	2.3×10^8	35.7%	72.9%

総細胞数では優位差が認められないが、活性化マーカーでは IL-2 濃度が 175U/ml・350U/ml を境に有意差が認められた。

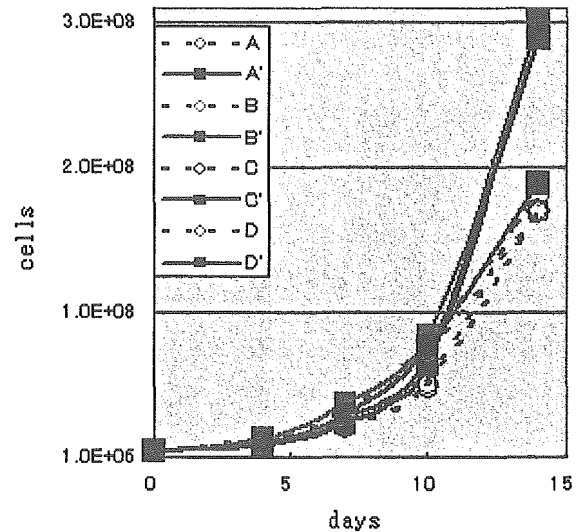
(2) 培養に用いるヒト血清の検討

培養に用いるヒト血清の品質が、臍帯血細胞の活性化と増殖に大きく影響することが予想されたため、安定的な供給が期待できる複数の血清をテストした。海外より輸入したヒト血清と、日本産ヒト血清を比較したところ、増殖能と細胞表面活性化マーカーにおいて有意な差は認められなかった。

(3) 抗 CD3 抗体での活性化培養期間の検討

末梢血リンパ球培養において、抗 CD3 固相化フラスコで 14 日間を超える長期培養を行うと、細胞増殖能が低下することが知られているので、臍帯血細胞においても、抗 CD3 固相化フラスコでの培養期間についての検討を行った。固相化フラスコで持続的に培養し続けた細胞は、培養開始後 14~18 日までには順調に増殖したが、それ以降は増殖速度と活性化マーカー発現がともに低下し

た。培養 21 日目には多くの死細胞が確認された。一方、培養 7 日目に固相化フラスコでの活性化培養を一時中断し、未固相化フラスコで 3 日間培養の後、再び固相化フラスコに戻して培養した細胞は、培養 16~19 日目においても顕著な増殖能の低下は認められず、最終判定を行った培養 21 日目でも死細胞は僅かであった。また、活性化マーカーの発現も低下しなかった。(図 2)



A~D : 抗 CD3 抗体による活性化培養のみ
A'~D' : 抗 CD3 抗体による活性化培養を一時休止後、再び活性化培養

図 2. 抗 CD3 抗体での刺激方法の検討。

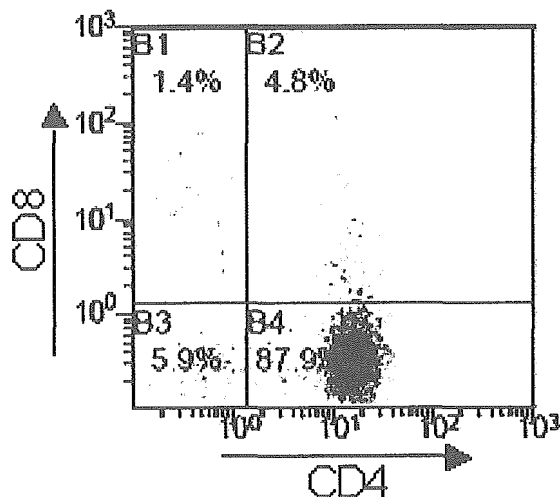
(4) CD4 陽性細胞の選択培養法

CD4 陽性細胞のみを高純度に培養する方法について、CD4 陽性細胞の分離操作前に CD8 陽性細胞群の除去を行う方法と行わない方法とを比較検討した。(図 3)

CD4beads のみで細胞分離を行った場合の CD4 陽性細胞の純度は平均 86.6% (60.3%~99.0%) であった。一方、CD8 陽性細胞を除去後に CD4 陽性細胞を分離した場合、CD4 陽性細胞の純度は平均 93.9% (65.7%~99.9%) であり、CD8 陽性細胞をあらかじめ除去することにより高純度に CD4 T 細胞を回収することができた。また、CD4beads のみで細胞分離を行った場合、CD8 陽性細胞の混入率は、平均 0.76% (0.03%~2.19%) であった。一方、CD8 陽性細胞を除去後に CD4 陽性細胞を分離した場合、CD8 陽性細胞の混入率は平均 0.16% (0.0%~0.12%) であり、CD8 陽性細胞をあらかじめ除去することによって CD8 陽性細胞の混入を大幅に減らすことができた。加

えて、磁気 beads で反応させる際、CD8beads は CD8 細胞数の 2 倍量で反応させた方がより高純度の CD4 T 細胞の回収が可能となることが明らかとなった。

A CD40ビーズのみで選択



B. CD8細胞除去後、CD40ビーズで選択

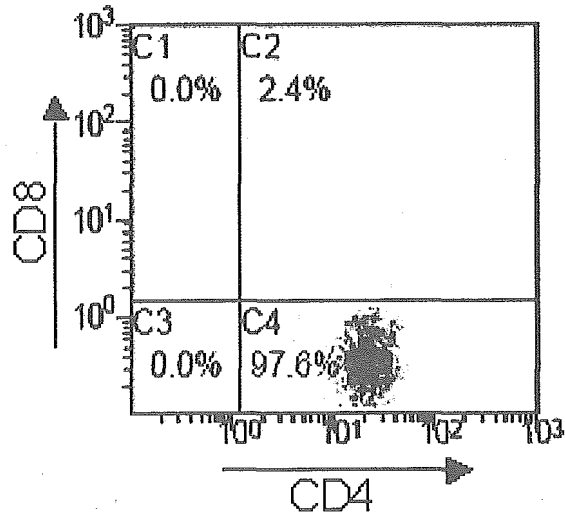


図3. CD4 陽性細胞選択法の検討. CD4 ビーズによる選択のみを行った場合 (A) とあらかじめ CD8 陽性細胞をビーズにより除去した後に CD4 ビーズによる選択を行った場合 (B) の CD4 陽性細胞の純度を比較した。

4. 活性化臍帯血リンパ球の性状解析

(1) 細胞表面マーカーの解析

活性化培養開始後 2~3 週間後の臍帯血リンパ球を FCM により解析した。CD4 陽性細胞の選択を行わなかった場合の典型的な結果では、得られた

細胞は、CD2、CD3、CD5、CD7、CD25、CD28、CD29、CD38、CD45RA、CD62L、CD71、HLA-DR、TCR $\alpha\beta$ を発現していた。CD1a、CD10、CD11b、CD13、CD14、CD16、CD19、CD20、CD33、CD34、CD41、CD56、CD57、TCR $\gamma\delta$ の発現は認められなかった。CD4 は 75%、CD8 は 56% で陽性であった。CD2⁺、CD3⁺、CD38⁺、CD71⁺、HLA-DR⁺ などの結果から判断して、活性化 T 細胞のフェノタイプを有すると考えられた。成人末梢血由来細胞も同様に活性化・増幅して表面解析を行ったが、顕著な差は認められなかった。TCR に関しては、TCR $\alpha\beta$ が選択的に活性化・増幅されることが示された。

培養開始から 0,7,14 日後に HLA-DR、CD28、CD69 の発現率を FCM により解析し、同時期における細胞の形態と増殖速度から判断した活性化の程度と相関がある細胞表面マーカーを検索した。その結果、CD69 がもっとも適当なマーカーであると考えられた。

培養開始後約 4 日目から顕微鏡下において細胞増殖が認められたが、7 日目では、細胞数は約 10 倍に増加し、FCM でも CD69 と HLA-DR の発現が認められた。14 日目においては、細胞数は約 100 倍になりそれと相関して CD69 と HLA-DR の発現率も高くなった。一方 CD28 は培養開始時点で既に発現が認められ、培養 7 日目では発現率の上昇が認められたものの、14 日目では発現率が低下した。(図 4)

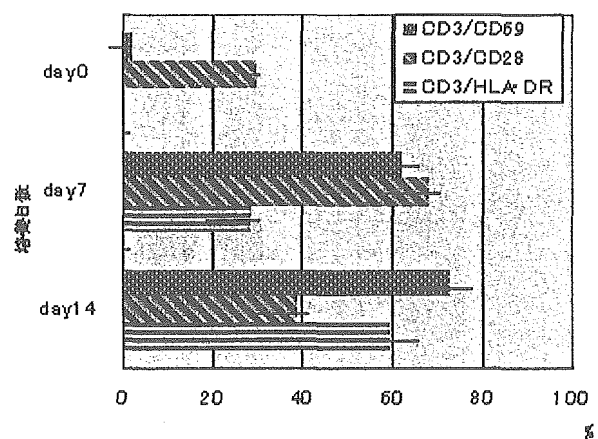


図4. 細胞表面活性化マーカー発現の推移. CD69、HLA-DR とともに細胞数の増加と比例して発現が高くなったが、CD28 は Day0 で既に発現認められ、Day7 を境に発現が低くなった。

(2) 活性化臍帯血リンパ球の TCR レパートリーの解析

活性化・増幅後の臍帯血リンパ球において、TCR の多様性に偏りが生じているかどうかを検

討するために、TCR レパートリーの解析を行った。

V β 1, V β 2, V β 3, V β 4, V β 5.1, V β 5.2, V β 5.3, V β 7.1, V β 7.2, V β 8, V β 9, V β 11, V β 12, V β 13.1, V β 13.2, V β 13.6, V β 14, V β 16, V β 17, V β 18, V β 20, V β 21.3, V β 22, V β 23 の 24 種類の V β 遺伝子発現について、フローサイトメトリーにより解析した。4 例の臍帯血由来リンパ球および対照として 4 例の成人ドナー由来リンパ球を解析した。4 例の臍帯血全てにおいて、培養開始時点において上記 24 種類の V β 全ての発現が認められた。ここで用いられた活性化培養法では TCR α β 細胞が優位に増幅されるため、培養開始後 1~2 週間では、多くの V β 遺伝子の発現頻度が上昇していたが、培養前後において、各 V β 遺伝子の相対的発現頻度に明らかな変化は認められなかった。また、4 例の成人ドナー由来リンパ球と比較しても、各 V β 遺伝子の発現頻度に明らかな差は認められなかった。

(3) 活性化臍帯血リンパ球のサイトカイン産生
1) 培養液のサイトカイン・ケモカイン・造血因子濃度

予備実験として培養液自体に含まれるサイトカインを測定したところ、活性化のために添加されている IL-2 に加えて、血清中に存在する RANTES (346pg/ml) と TGF- β (203pg/ml) が検出された。

2) 臍帯血 T 細胞のサイトカイン産生 (1 回目)

臍帯血単核細胞を抗 CD3 固相化フラスコ内で 700IU/ml IL-2 存在下で培養し、さらに 175IU/ml IL-2 で培養を続け、上清中のサイトカインを測定した。その結果(単位は全て pg/ml、Mean \pm SD) は以下の通りであった。

IL-2, 15,730 \pm 1275.2; IL-4, <15.0; IL-8, 333.8 \pm 263.6; IL-10, <8.0; TNF- α , 344.0 \pm 177.6; IFN- γ , 7.2 \pm 7.7。

CD4 陽性細胞を選択培養した場合は以下の通りであった(単位は全て pg/ml で、Mean \pm SD を示す)。

IL-2, 32586 \pm 12410; IL-4, <15.0; IL-8, 3227 \pm 3710; IL-10, 58.3 \pm 16.0; TNF- α , 1236 \pm 860.1; IFN- γ , 122.3 \pm 133.7。

この値を健常成人と比較すると、IFN- γ 、IL-8 の産生は悪いが、TNF- α の産生は比較的良好であった。また IFN- γ 、TNF- α 、IL-8 の産生は主に CD4 陽性 T 細胞からであることが判明した。培養液中に IL-2 が添加されていることを考慮しても、臍帯血 CD4 陽性細胞からは良好な IL-2 産生があると判断された。

3) 臍帯血 T 細胞のサイトカイン・ケモカイン産生 (2 回目)

臍帯血単核細胞を抗 CD3 固相化フラスコで 50IU/ml IL-2 存在下で培養し、さらに 175IU/ml IL-2 で培養を続け、上清中のサイトカインを測定した。

第 14-16 日目に測定した 3 例の結果(単位は全て pg/ml で Mean \pm SD を示す)は以下の通りであった。

IL-2, 9063; IL-4, 11.0; IL-6, 6.9; IL-8, 11460 \pm 8673; IL-10, 2928 \pm 2548; IL-12, 9.8; IFN- γ , 6021 \pm 1359; RANTES, 4582 \pm 1764; TGF- β , 609.5 \pm 60.9。

第 18-21 日目に測定した 3 例(単位は全て pg/ml で Mean \pm SD を示す)の結果は以下の通りであった。

IL-2, 6563.0; IL-4, 0.1; IL-6, 0.1; IL-8, 451.4 \pm 216.6; IL-10, 423.8 \pm 383.9; IL-12, 5.0; IFN- γ , 886.4 \pm 266.4; RANTES, 1131 \pm 661.3; TGF- β , 204.0 \pm 35.5。

以上より、培養 14 日~16 日の時点では、成人末梢血由来細胞と比較して、IL-8、IL-10 の産生能が高く、IL-6 の産生は少ない。また成人と同程度の IFN- γ が分泌されていることが確認された。

培養期間を 4~5 日延長すると、IL-8 の産生、IFN- γ 、RANTES、TGF- β の産生が著しく不良になることが判明した。IL-4、IL-6 は健常成人でも分泌能は低いが、臍帯血ではさらに低値であった。

5. NOG マウスを用いたモデル実験系の開発

(1) ヒト造血幹細胞移植法の検討

CD34 ネガティブセレクション法により造血幹細胞を分離すると、CD34 陽性細胞の割合は約 50%であった。その細胞中には、CD34 陰性 CD45 強陽性、CD34 陽性 CD45 中程度陽性、CD34 陰性 CD45 弱陽性の 3 つの集団がみられた。X 線照射した NOG マウスに 0.5-3 x 10⁵ 個の細胞を静注すると、今までに 87 匹中 84 匹にヒト細胞の生着が確認された。移植後約 2 ヶ月までは、ヒト細胞のほとんどが B 細胞であり、4 ヶ月以降 T 細胞の増加がみられた。(図 5)

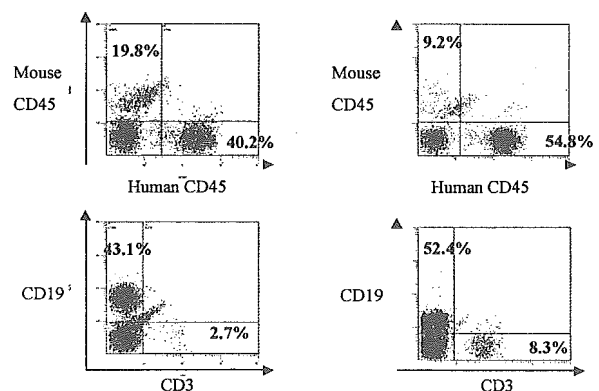


図5：造血幹細胞移植後のマウス脾臓中ヒト細胞の発生と T, B 細胞の割合

ポジティブセレクション法により分離した CD34 陽性細胞を同様に移植した場合も、生着に関しては良好な成績が得られたが、CD34 陰性細胞では、21 頭中 7 頭と生着率が低かった。臍帯血単核細胞の全体を移植した場合は、ほとんどのマウスが3ヶ月以内に死亡した。X 線照射については、行わない場合の方がマウスが長期間生存し、良好なヒト T および B 細胞の分化が観察された。

(2) 移植マウスに検出されるヒト T 細胞におけるケモカインリセプターの解析

ヒト造血幹細胞移植後 134 日目および 139 日目に脾臓、骨髄、胸腺において、HIV-1 感染のコレセプターとなるケモカインリセプター発現を解析した。脾臓中の CD4 陽性 T 細胞のうち、約 40% が T 細胞指向性コレセプター CXCR4 陽性、約 30% がマクロファージ指向性コレセプター CCR5 陽性だった (図 6 .A,B)。CD14 陽性単球は CD4 弱陽性であり、すべてに CCR5 の発現が認められた (図 6 .B)。骨髄では CD4/CXCR4、CD4/CCR5 共陽性の細胞がともに 4% 程度みられ (図 6 .C,D)、胸腺では、CD4 陽性 T 細胞のうち約 10% が CXCR4 陽性であり (図 6 .E)、CCR5 陽性の T 細胞はわずかだった (図 6 .F)。

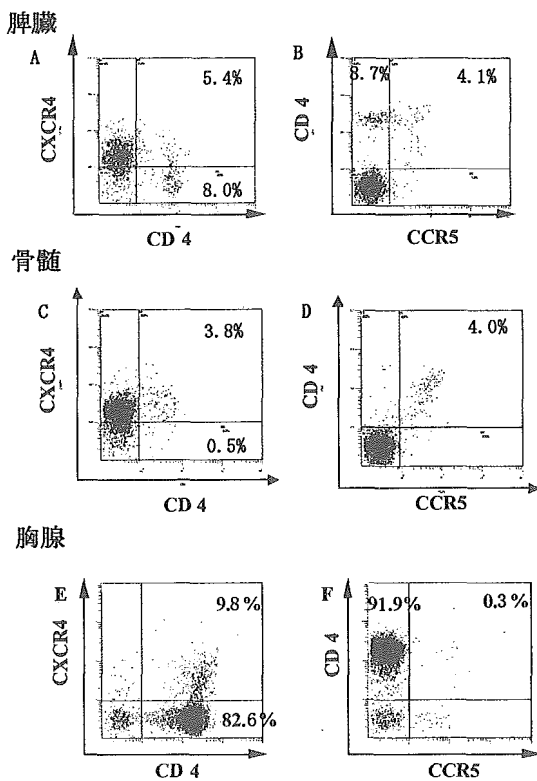


図6．移植後 134 日目のマウスの脾臓 (A, B)、骨髄 (C, D)、胸腺 (E, F) の解析

(3) ヒトリンパ濾胞様構造の解析とマクロファージ、樹状細胞 (DC)、濾胞樹状細胞 (FDC) の検出

ヒト造血幹細胞移植後 123 日目のマウス脾臓中のマクロファージ、DC、FDC の存在を組織免疫染色により解析した。マクロファージ、DC は共に抗原提示に重要な細胞である。また FDC は、2 次免疫応答の要であるリンパ濾胞形成に非常に重要な細胞で、マウス体内でのヒト免疫系の構築に重要な働きをされると考えられる。免疫染色の結果、ヒト CD45 陽性細胞は、脾臓中で集団構造 (リンパ濾胞様構造) として観察された。ヒト FDC マーカーである DRC-1 で染色される細胞は観察されなかったが、リンパ濾胞様構造にマウス FDC マーカーである FDC-M1 で染色される網目状の構造が観察された。ヒト CD68 陽性マクロファージは、リンパ濾胞様構造を含む脾臓全体に点在してみられ、ヒト CD205 陽性 DC は、リンパ濾胞様構造中でクラスターとして存在した。

D. 考察

1. 臍帯血細胞における造血能の指標と生着との関連について

非血縁者間臍帯血移植施行時の生着不全率は骨髄移植のそれと比較して高く、臍帯血移植の利便性と相反する短所となっている。そのため保存時の臍帯血の生物学的指標が得られれば主治医が臍帯血を選択する際に重要な着目点となる。そのため今回 CD34+細胞数、有核細胞数、コロニー形成能との相関を調べた結果、この3者には相関がみられとりわけ CD34 とコロニー数との相関が顕著であった。そのため臨床的観点からはコロニー数と CD34 はどちらも移植後の造血能の指標として有用であることが判明し、かつそれぞれが一定数以上得られた場合には生着が確実視されることは重要と考えられる。

2. 臍帯血バンクからの臍帯血供給について

現在進められている基礎研究の範囲内では、十分な臍帯血供給体制ができあがっている。しかし、臨床研究を開始する際には、公開された臍帯血を使用する必要があるため、倫理面への配慮をさらに徹底する必要があると考えられる。

3. 臍帯血リンパ球活性化培養法について

基本的には、末梢血 T リンパ球活性化培養法を、臍帯血細胞の特性に合わせて改変することで、十分な活性化・増幅が実現可能と考えられた。培養に加える IL-2 の濃度については、増殖速度のみから判断すると低濃度 (50 U/ml) でも十分であったが、細胞表面マーカーの解析結果は、十分な活性化のためには 350 U/ml 以上の濃度が必要であ

ることを示唆した。抗 CD3 固相化フラスコで長期間活性化培養すると、細胞増殖と活性化マーカー発現が低下したが、途中で数日間抗 CD3 非存在下で培養すると、このような低下がみられず、良好な活性化と増殖が観察された。

DLI においては GVHD を引き起こす原因と考えられる CD8 陽性細胞と NK 細胞の混入を極力避ける必要がある。特に、活性化リンパ球を用いて DLI を行う場合、これらの細胞群も活性化されていることから、より重篤な GVHD の発生が危惧される。そこで、CD4 陽性細胞を選択的に活性化培養する方法を検討した結果、抗 CD8 磁気ビーズを用いて一旦 CD8 陽性細胞を除いてから抗 CD4 磁気ビーズで選択する方法で純度の高い CD4 陽性細胞を得ることができた。

現在はおもに新鮮（未凍結）臍帯血を用いて基礎研究を行っているが、臨床応用される場合は、一旦凍結された細胞を使わざるを得ない。凍結・融解後の臍帯血細胞の活性化培養条件について検討することが今後の課題である。

4. 活性化臍帯血 T 細胞の性状解析

活性化臍帯血リンパ球の表面マーカー解析では、活性化 T 細胞のフェノタイプを持つ細胞の増殖が確認された。細胞の形態や増殖速度から判断した活性化の程度を最も良く反映するマーカーは CD69 であった。T 細胞抗原リセプター (TCR) のレパートリー解析の結果、活性化臍帯血リンパ球において、TCR 特異性の偏りは認められなかった。

5. NOG マウスを用いたモデル実験系について。

移植の前処置として X 線照射を通常より弱めるまたは照射を行わずに CD34 陽性造血幹細胞を尾静脈より静注すると安定的にヒト血液細胞の生着が可能で、かつ長期生存が得られ、臍帯血 DLI の研究に好適であると考えられる。また、ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスの CD4 陽性 T 細胞には T 細胞指向性 HIV-1 のコレセプター CXCR4 が、マクロファージにはマクロファージ指向性 HIV-1 のコレセプター CCR5 が発現されていることから、HIV-1 感染モデルおよび HIV-1 感染に対する免疫治療モデルになりうることを示された。ヒト造血幹細胞移植 NOG マウスは、EB ウイルストランスフォームリンパ芽球様細胞株を利用した腫瘍の臍帯血 DLI による治療や造血幹細胞の生着促進のモデルとしても使用可能であるとともに、様々なウイルス学的・免疫学的な研究への応用が期待できる。

E. 結論

ヒト血清と IL-2 を添加した培養液と抗 CD3 抗

体を固相化したフラスコを用いて、数週間の培養により、 10^9 程度の臍帯血由来活性化 CD4 陽性細胞を得ることが可能な培養法を開発した。

NOG マウスを用いて臍帯血幹細胞移植を行い、ヒト T および B リンパ球とマクロファージの分化を確認した。また、T リンパ球とマクロファージには、HIV のリセプターとコアリセプターの発現が確認され、感染モデル作製の理論的な根拠が得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi, T., Bamba, K., Kitayama, A., Kuroiwa, Y., Yoshimatsu, K., Shimakawa, T., Ogawa, K., Sekine, T., Shimizu, N., and Yamamoto, K. Long-term Intravenous Administration of Activated Autologous Lymphocytes for Cancer Patients Does Not Induce Antinuclear Antibody and Rheumatoid Factor. *Anti Cancer Research* 24:2434-2430 (2004)
- 2) Morio T. Shimizu N. Yamamoto K. Yamaguchi T. Bamba K. Sekine T. Itoh K. Nonoyama S. Nagasawa M. Mizutani S. Ex vivo-expanded T cell transfusion for opportunistic infections in primary immunodeficiency with T cell defect. *Br. J. Haematol.* (submitted)
- 3) Tomizawa D. Yuki A. Nagasawa M. Morio T. Kajiwara M. Sekine T. Shimizu N. Kato M. Yachie A. Mizutani S. Adopted immunotherapy for mixed chimerism after unrelated cord blood transplantation using reduced-intensity conditioning in Omenn disease. *Eur J Haematol.* (submitted)
- 3) Nagasawa M. Zhu Y. Isoda T. Tomizawa D. Itoh S. Kajiwara M. Morio T. Nonoyama S. Shimizu N. Mizutani S. Analysis of serum soluble CD40 ligand (sCD40L) in the patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: platelet is a major source of serum sCD40L. *Eur J Haematol.* 74: 54-6, 2005.
- 4) Ohtsuka Y. Shimizu T. Nishizawa K. Ohtaki R. Someya T. Noguchi A. Shimura N. Kim H. Sugimoto H. Fujita H. Morio T. Yamashiro Y. Successful engraftment and decrease of cytomegalovirus load after cord blood stem cell transplantation in a patient with DiGeorge syndrome. *Eur J Pediatr.* 163: 747-748, 2004.
- 5) Chang JH. Ryang YS. Morio T. Lee SK.

Chang EJ. Trichomonas vaginalis Inhibits Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages by Suppressing NF- κ B Activation. *Mol Cells*. 18: 177-185, 2004.

6) Chae WJ. Lee HK. Han JH. Kim SW. Bothwell AL. Morio T. Lee SK. Qualitatively differential regulation of T cell activation and apoptosis by T cell receptor α chain ITAMs and their tyrosine residues. *Int Immunol*. 16: 1225-1236, 2004.

7) Tomizawa D. Imai K. Ito S. Kajiwara M. Minegishi Y. Nagasawa M. Morio T. Nonoyama S. Mizutani S. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for seven children with X-linked hyper-IgM syndrome: A single center experience. *Am. J. Hematol*. 76: 33-39, 2004.

8) Imai K. Morio T. Zhu Y. Jin Y. Itoh S. Kajiwara M. Yata J. Mizutani S. Ochs HD. Nonoyama S.. Clinical Course of Patients with WASP Gene Mutations. *Blood*. 103: 456-64, 2004.

9) Nagasawa M. Tomizawa D. Tsuji Y. Kajiwara M. Morio T. Nonoyama S. Asada M. Mizutani S. Pancytopenia presenting with monosomy 7 which disappeared after immunosuppressive therapy. *Leuk. Res*. 28: 315-9, 2004.

10) Shimasaki N. Mori T. Shimada H. Sugita M. Higuchi M. Mukai M. Morio T. Okamoto S. Epstein-Barr virus-associated posttransplant lymphoproliferative disorder after a cord blood stem cell transplantation presenting with pulmonary nodules. *J. Pediatr. Hematol. Oncol*. 26: 124-7, 2004.

11) Nagasawa M. Itoh S. Sawada Y. Morio T. Nonoyama S. Mizutani S. Coagulopathy in a patient with X-linked hyper-IgM syndrome who developed Kaposi's sarcoma. *Am. J. Hematol*. 75: 116-7, 2004.

12) Ikeda Y, Fukuda N, Wada M, Matsumoto T, Satomi A, Yokoyama S, Saito S, Matsumoto K, Kanmatsuse K and Mugishima H: Development of Angiogenic Cell and Gene Therapy by Transplantation of Umbilical Cord Blood with Vascular Endothelial Growth Factor Gene *Hypertens Res* 27(2):119-128,2004

13) Hosono S, Mugishima H, Nakano Y, Murabayashi M, Shimada M, Minato M, Takahashi S, Harada K, Ikeda T and Fukuzawa M: Autologous cord blood transfusion in an infant with a huge sacrococcygeal teratoma *J.*

Perinat. Med. 32(2):187-189 2004

14) Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Diagnostic importance of CD179a/b as markers of precursor B-cell lymphoblastic lymphoma. *Modern Pathol* 17: 423-429, 2004.

15) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahashi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC- γ 2 phosphorylation and Ca²⁺ influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112: 575-582, 2004.

16) Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* (in press).

17) Imadome, K., Shimizu, N., Arai, A., Miura, O., Nakamura, H., Nonoyama, S., Yamamoto, K., and Fujiwara, S. Co-expression of CD40 and CD40 ligand in Epstein-Barr virus-infected T and NK cells and their role in cell survival. *J. Infect. Dis.* in revision.

2. 学会発表

1) 磯山恵一, 加藤剛二, 加藤俊一, 土屋滋, 麦島秀雄, 西平浩一: 日本さい帯血バンクネットワークを利用した小児血液腫瘍性疾患への臍帯血移植の成績 第 107 回 日本小児科学会総会 2004.4 岡山

2) 星野茂角、里見綾、山本法子、田原佳幸、麦島秀雄、田中博、伊藤武善、久野宗一郎、相澤信、藤田壽太郎: 東京臍帯血バンクの保存施設である日本大学先端医学総合研究センターにおける保存有核細胞数増加への試み 第 52 回日本輸血学会総会 2004 6 札幌

3) 長村(井上)登紀子、崔 硯、須郷美智子、高橋敦子、塩谷美夏、平井雅子、高田圭、麦島秀雄、幸道秀樹、浅野茂隆、高橋恒夫: 東京臍帯血バンクからの海外への臍帯血出庫と移植成績 第 52 回日本輸血学会総会 2004 6 札幌

4) 星野茂角、麦島秀雄、里見綾、山本法子、田原佳幸、伊藤武善、田中博、相澤信: 臍帯血採取時における羊水性状についての検討 第 27 回日本造血細胞移植学会総会 2004 12 岡山

5) 森尾友宏、清水則夫 造血幹細胞移植後難治性感染症に対する活性化 CD4DLI 療法 一臨床試

験実施体制と症例報告ー平成16年度厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究班」第二回会議、平成17年1月28日

6) 清水則夫、森尾友宏 再生医療・細胞治療実用化のための安全管理体制の確立 平成16年度厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業「五研究班合同公開シンポジウム」平成17年1月29日

7) 清水則夫、水上美樹、渡辺 健、森尾友宏、馬場憲三、熊谷麻理、山本興太郎、再生医療をサポートする網羅的微生物汚染検出システムの開発 第4回日本再生医療学会総会 平成17年3月1日 大阪

8) 水上美樹、渡辺 健、渡辺 哲、森尾友宏、馬場憲三、山本興太郎、清水則夫 再生医療・細胞治療の製品保証に関する研究：多項目迅速ウイルス検査システムの開発と運用 第52回日本ウイルス学会学術集会 平成16年11月21日～23日、横浜

9) 青木由貴、富澤大輔、島田衣里子、中島啓介、石井卓、磯田健志、長澤正之、森尾友宏、梶原道子、水谷修紀、谷内江昭宏、加藤政彦 骨髄非破壊的前処置を用いて非血縁間臍帯血移植を試行した Omenn 病の一例 第10回小児 H-SCT 研究会 平成16年11月05日

10) 青木由貴、磯田健志、佐藤隆介、富澤大輔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀、加藤政彦、谷内江昭宏 臍帯血移植後に MAC (Mycobacterium avium complex) 感染症を起こした Omenn 病の一男児例 第1回東京小児感染免疫懇話会 平成17年2月24日 東京

11) 田口智子、竹野内寿美、大喜多肇、清河信敬、藤本純一郎. B 前駆細胞の分化誘導に対する IGFBP-6 の役割. 第66回日本血液学会総会・第46回日本臨床血液学会総会、京都、9月17日、2004.

12) 竹野内寿美、清河信敬、塩沢祐介、田口智子、坂口佐知、鈴木恭子、斎藤正博、大喜多 肇、藤本純一郎. 造血にかかわる血液—骨髄間質細胞間の接着に関する検討. 第20回小児がん学会、第46回日本小児血液学会、同時期開催、京都、11月21～23日、2004.

13) 田口智子、清河信敬、藤本純一郎. ヒト BLNK 陰性 pre-B 細胞株の解析. 第34回日本免疫学会総会、札幌、12月1～3日、2004.

14) 今留謙一、清水則夫、藤原成悦. EB ウイルス感染 T、NK 細胞における CD40/CD40L シグナルの重要性. 第1回 EB ウイルス研究会 シンポ

ジウム「EB ウイルス発がんの分子メカニズム」、平成16年7月2日、札幌.

15) 今留謙一、清水則夫、藤原成悦. EB ウイルス感染 T、NK 細胞における CD40/CD40L シグナルの役割. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004、11.

16) 加藤剛二、臍帯血幹細胞移植. 第2回九州 BMT 研究会、2004. 2. 14

17) 加藤剛二、小児に対する非血縁者間臍帯血移植. 第27回日本造血細胞移植学会総会、2004.12.17.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。