
厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と
安全性確保に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤 俊一

平成18年(2006年)3月

はじめに

本報告書は、厚生労働科学研究費補助金「ヒトゲノム・再生医療等研究事業」の一つである「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班における平成 17 年（2005 年）度の研究成果をまとめたものである。本研究班は本年度に新たに組織されたもので、臍帯血移植の技術の高度化と提供される臍帯血の品質向上を目的とするものである。

1999 年 8 月に厚生省（当時、現在の厚生労働省）の臍帯血移植検討会の中間報告に基づいて日本さい帯血バンクネットワークが設立され、わが国における本格的な臍帯血バンク事業による非血縁者間臍帯血移植が開始された。当初の臍帯血移植は小児患者を中心に行われていたが、2000 年頃から成人患者でも実施数が増加するようになり、2003 年頃からは 50 歳以上の高齢者における臍帯血移植が急速に増加している。

わが国における臍帯血移植と臍帯血バンク事業は順調に発展し、2006 年 3 月末の時点で 2 万 4 千件を超える臍帯血が保存され、累積で 2,877 件の非血縁者間臍帯血移植が実施されている。わが国のシステムは海外からも高く評価されており、非血縁者間臍帯血移植実施数においても世界で一、二の位置を占めるようになり、一部の移植施設においては国際的にみてもきわめて優れた移植成績を報告している。

このように数の上では順調に発展しているものの、保存される臍帯血の品質や移植成績の質的な評価については十分な検討がなされているとは言い難く、臍帯血バンク事業と臍帯血移植は量的な発展から質的な発展へと目標を変えるべき時代が来ているものと認識している。

本報告書は 17 年度の研究業績をまとめたもので、分担研究者ならびに研究協力者の方々に厚く御礼を申し上げる次第である。

2006 年 3 月

加藤 俊一

研究班の構成

	氏 名	所 属 ・ 役 職 ・ 専 門	役 割 分 担
主任研究者	加藤 俊一	東海大学医学部基盤診療学系・教授 造血幹細胞移植、再生医療科学	研究計画立案・総括
分担研究者	東 英一	三重大学医学部付属病院・助教授 細胞移植	麻疹ウィルスに対する DC ワクチンの開発
	安藤 潔	東海大学医学部内科学系・教授 血液学	臍帯血の骨髄移植法の開発
	磯山 恵一	昭和大学藤が丘病院・助教授 小児血液学	小児における臍帯血移植（至適前処置と GVHD 予防法の確立）
	甲斐 俊朗	兵庫医科大学・教授 輸血学	複数臍帯血の同時移植法の確立
	加藤 剛二	名古屋第一赤十字病院・部長 小児血液学	臍帯血移植時の感染症要因の解析と対策の検討
	坂巻 壽	東京都立駒込病院・部長 造血幹細胞移植	成人における臍帯血移植（固形腫瘍への適応の拡大）
	高梨 美乃子	東京都赤十字血液センター・部長 輸血学	臍帯血の品質管理と評価法の確立
	高橋 聡	東京大学医科学研究所・講師 造血幹細胞移植	成人における臍帯血移植（骨髄破壊的前処置法の標準化）
	高橋 恒夫	東京大学医科学研究所・客員教授 血液免疫学	臍帯血と胎盤を用いた再生医療の開発
	谷口 修一	虎の門病院血液科・部長 造血幹細胞移植	高齢者における臍帯血移植（骨髄非破壊的前処置法の確立）
	中林 正雄	愛育病院・院長 産婦人科学	臍帯血採取法の改良
	浜島 信之	名古屋大学医学部・教授 医学推計・判断	臍帯血移植成績登録システムの開発
研究協力者	熱田 由子	名古屋大学医学部・大学院生 医学推計・判断	臍帯血移植成績登録システムの開発
研究事務局	吉場 史朗	東海大学医学部基盤診療学系・助手 造血幹細胞移植、再生医療科学	臨床研究管理
	吉永 希世子	東海大学医学部基盤診療学系	研究班事務

目 次

I. 総括研究報告	1
主任研究者 加藤 俊一	
II. 分担研究報告	7
1. 分担研究者 東 英一	7
2. 分担研究者 安藤 潔	11
3. 分担研究者 磯山恵一	13
4. 分担研究者 甲斐俊朗	21
5. 分担研究者 加藤剛二	27
6. 分担研究者 坂巻 壽	31
7. 分担研究者 高梨美乃子	33
8. 分担研究者 高橋 聡	37
9. 分担研究者 高橋恒夫	41
10. 分担研究者 谷口修一	45
11. 分担研究者 中林正雄	49
12. 分担研究者 浜島信之	69
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	73
IV. 参考資料	77
わが国における臍帯血バンク事業と臍帯血移植の現況	

I . 総括研究報告

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究

主任研究者 加藤 俊一 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 教授

研究要旨

わが国における臍帯血バンク事業における臍帯血の品質の向上と、臍帯血移植における成績の向上を目指して、臍帯血の採取から臍帯血幹細胞の分離・保存、臍帯血提供体制、臍帯血の移植と長期経過調査にいたるまでの一連のプロセスのすべてについて検証する研究計画を立案した。

初年度においては、臍帯血の採取方法について具体的な提言をまとめ、臍帯血幹細胞の品質評価のための国際的な品質管理システムに参加することになった。また、複数臍帯血移植、成人における至適臍帯血移植、小児における至適臍帯血移植、高齢者における骨髄非破壊的臍帯血移植などの多施設共同臨床研究を立案し、研究事務局などの基盤整備を完成した。さらに、日本造血細胞移植学会などとの合同で造血幹細胞移植データの一元化システムを確立し、今後の研究推進のための基盤が整備された。

A. 研究の目的と目標

臍帯血移植は骨髄移植、末梢血幹細胞移植に次ぐ第3の造血幹細胞移植として1990年代から臨床応用が開始され、ドナーにおけるリスクがなく、必要時に迅速に移植が実施できるという利点から、近年小児のみならず成人においても移植数が増加している。

わが国において臍帯血移植が実施されるようになってからまだ10年ほどしか経過していないため、また成人における移植が開始されてから数年程度であるため、移植法としての評価はまだ十分には定まっていないと言わざるをえない。

本研究班においては、臍帯血の採取から始まり、臍帯血幹細胞の分離と保存、臍帯血の提供体制、臍帯血の移植と長期経過調査にいたるまでの一連のプロセスのすべてについて検証し、わが国における臍帯血移植と臍帯血バンク事業が一般医療として確立されるための研究を組織的に行うことを

目的とする。

B. 研究計画

研究内容は臍帯血移植と再生医療に関する基礎的研究、臍帯血の提供体制に関する基盤整備、臍帯血の移植方法の改良と確立に関する臨床的研究の3つに大別して、それぞれの分担研究者を中心として研究計画が立案され、順次開始されている。

(1) 基礎的研究

- ・ 安藤潔分担研究者を中心として、臍帯血の骨髄内移植法の開発に関する基礎的検討が開始された。
- ・ 東英一分担研究者を中心として、臍帯血移植後のウイルス感染症に対する新しいDCワクチンの開発に関する基礎的検討が開始された。
- ・ 高橋恒夫分担研究者を中心として、臍帯血を利用した再生医療の開発に関する基礎的検討が開始された。

(2) 提供体制の基盤整備

- ・ 中林正雄分担研究者を中心として、臍帯血の採取方法の改良に関する検討が開始された。
- ・ 高梨美乃子分担研究者を中心として、臍帯血幹細胞の品質評価方法の検討が開始された。

(3) 臨床的研究

- ・ 甲斐俊朗分担研究者を中心として、複数臍帯血移植の臨床研究の研究計画が立案され、参加施設の倫理委委員会における承認を経て、患者登録が開始された。
- ・ 高橋聡分担研究者を中心として、成人における至適治療法確立のための前向き臨床研究の研究計画について検討が進められている。
- ・ 磯山恵一分担研究者を中心として、小児における至適治療法確立のための前向き臨床研究の研究計画について検討が進められている。
- ・ 谷口修一分担研究者を中心として、高齢者における至適治療法確立のための臨床研究が進められている。
- ・ 加藤剛二分担研究者を中心として、臍帯血移植後の感染症に関する詳細な解析が進められている。
- ・ 浜島信之分担研究者を中心として、これらの臨床研究を実施するための基盤整備と、臨床成績解析のための基盤整備が進められている。

(倫理面への配慮)

これらの基礎的あるいは臨床的研究の実施にあつては、国の諸指針に基づいて被験者となる患者の人権に十分配慮するとともに、個人情報の厳格な管理を行った。

また、動物を用いた基礎実験の実施にあつては動物愛護の精神に基づいて適切な配慮と処置を行った。

C. 研究結果

本年度は研究班として初年度にあたるため、全体的な研究計画の立案と研究実施のための基盤整備を重点的に実施し、ほぼ当初の計画どおりに進行することができた。

分担研究者毎の研究結果はそれぞれの分担研究報告書に詳細に記述されているとおりであるが、主な研究結果を以下に記述する。

(1) 基礎的研究

- ・ 安藤潔分担研究者らは、マウスにおいてヒトの造血幹細胞を骨髄内に移植する系を用いて、ヒト造血微小環境を再構築することが可能であることを明らかにし、骨髄内移植法の利点として期待できることを示した。
- ・ 東英一分担研究者らは、樹状細胞(DC) ワクチンの手法を用いて、麻疹ウイルスに対するワクチンを作成し、その効果を *in vitro* で確認した。
- ・ 高橋恒夫分担研究者らは、臍帯血中の間葉系細胞を効率的に分離するための条件を検討し、間葉系細胞の分化誘導能を調べた結果、臍帯血由来の間葉系細胞は特に軟骨の再生医療に用いえる可能性を示した。

(2) 提供体制の基盤整備

- ・ 中林正雄分担研究者らは、全国の臍帯血採取病院で実際に臍帯血採取を担当している産婦人科医による採取法に関するワークショップを開催し、アンケート調査と会議による検討の結

果、採取量に影響する因子を明らかにし、今後採取量を増加させるための提言を行った。

- ・ 高梨美乃子分担研究者らは、臍帯血幹細胞の機能評価法として用いられているコロニー形成試験について国内の11の臍帯血バンクに加えて国際的な検討システムに参加しての比較検討を開始した。また、CD34陽性細胞の算定法についても各バンクにおける方法の比較検討を開始した。

(3) 臨床的研究

- ・ 甲斐俊朗分担研究者らは、これまでに行われた複数臍帯血移植の第一相試験の結果に基づいて、試験実施施設の拡大と実施症例数の増加による第二相試験に着手した。症例の登録は研究班事務局で行い、その後の臨床研究の進捗管理については「NPO 法人血液疾患臨床研究サポートセンター (C-SHOT)」に委託して正確かつ安全に臨床研究を実施できるような体制を確立した。
- ・ 高橋聡分担研究者らは、東大医科学研究所の臍帯血移植プロトコルを用いて前向き登録により成人における臍帯血移植を多施設共同研究で実施する研究計画書を作成し、参加施設の倫理審査を受けるための準備を完了した。
- ・ 磯山恵一分担研究者らは、小児における至適治療法確立のために数回の検討会議を開催し、多施設共同研究計画書を完成した。参加施設における倫理審査により承認が得られ次第、実施する予定である。

- ・ 谷口修一分担研究者らは、高齢者における骨髄非破壊的前処置による臍帯血移植の至適条件を見いだすためのパイロット研究を行い、GVHD 予防法について一定の結論に達した。
- ・ 加藤剛二分担研究者らは、これまでわが国において実施された臍帯血移植における感染症の実態を詳細に解析し、今後の臨床研究計画のための基礎資料を作成した。
- ・ 浜島信之分担研究者らは、わが国における造血幹細胞移植の治療成績に関するデータを一元化する計画を完成し、臍帯血移植についても日本さい帯血バンクネットワークが日本造血細胞移植学会などとデータを共有することになった。

D. 結論

臍帯血移植の安全性確保を目的として、臍帯血採取法の改良への提言を行い、臍帯血幹細胞の品質評価法を標準化するための国際的評価機構への参加を開始した。

臍帯血移植技術の高度化と標準化を目的として、小児、成人、高齢者のそれぞれにおける至適治療法を検討するための臨床研究を計画し、参加施設内での倫理審査を経て症例の登録を開始した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 著書

加藤 俊一：小児造血幹細胞移植とシクロスポリン、免疫の進化—

シクロスポリン 20 年の軌跡、医薬ジャーナル社、東京、126-133、2006

2. 論文発表

- 1) Kanda Y, Sakamaki H, Sao H, Okimoto S, Kodera Y, Tanosaki R, Kasai M, Hiraoka A, Takahashi S, Miyawaki S, Kawase T, Morishima Y, Kato S: Japan Marrow Donor Program.: Effect of conditioning regimen on the outcome of bone marrow transplantation from an unrelated donor. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11(11): 881-9, 2005
- 2) Suzuki Y, Takemoto Y, Shimozawa N, Imanaka T, Kato S, Furuya H, Kaga M, Kato K, Hashimoto N, Onodera O, Tsuji S: Natural history of X-linked adrenoleukodystrophy in Japan. *Brain & Development* 27: 353-7, 2005
- 3) Kato S: Cord blood transplantation and cord blood banking. *Hematology* 10: 113-4, 2005
- 4) Yabe H, Hattori K, Inoue H, Matsumoto M, Hamanoue S, Hiroi A, Koike T, Kato S, Shimamura K, Yabe M: Fatal adenovirus infection indistinguishable from thrombotic microangiopathy after allogeneic CD34+ peripheral progenitor cell transplantation. *Tokai J Exp Clin Med.* 30(1): 71-75, 2005
- 5) Yabe H, Yabe M, Hattori K, Inoue H, Matsumoto M, Hamanoue S, Hiroi A, Koike T, Kato S: Secondary G-CSF mobilized blood stem cell transplantation without preconditioning in a patient with Gaucher disease: Report of a new approach which resulted incomplete reversal of severe skeletal involvement. *Tokai J Exp Clin Med.* 30(1): 77-82, 2005
- 6) Tsuboi K, Kawada H, Toh E, Lee YH, Tsuma M, Nakamura Y, Sato T, Ando K, Mochida J, Kato S, Hotta T: Potential and origin of the hematopoietic population in human skeletal muscle. *Leuk Res.* 29(3): 317-24, 2005
- 7) Nakai K, Kanda Y, Fukuhara S, Sakamaki H, Okamoto S, Kodera Y, Tanosaki R, Takahashi S, Matsushima T, Atsuta Y, Hamajima N, Kasai M, Kato S: Value of chemotherapy before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor for myelodysplastic

- syndrome. *Leukemia* 19(3):396-401, 2005
- 8) Imamura M, Asano S, Harada M, Ikeda Y, Kato K, Kato S, Kawa K, Kojima S, Morishima Y, Morishita Y, Nakahata T, Okamura J, Okamoto S, Shiobara S, Tanimoto M, Tsuchida M, Atsuta Y, Yamamoto K, Tanaka J, Hamajima N, Kodera Y: Current status of hematopoietic cell transplantation for adult patients with hematologic diseases and solid tumors in Japan. *International Journal of Hematology* 83(2), 2006
- 9) Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K: Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood* 107(5): 1878-87, 2006
- 10) Ando K, Yahata T, Sato T, Miyatake H, Matsuzawa H, Oki M, Miyoshi H, Tsuji T, Kato S, Hotta T: Direct evidence for ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood*, Epub ahead of print, 2006
3. 学会発表 (特別講演、シンポジウム)
- 1) Kato S for the Japan Cord Blood Bank Network (JCBBN): Clinical results of CBSCT in Japan. The 3rd Annual Meeting of the Asian Hematology Association. Jeju, August 18-20, 2005
- 2) 加藤 俊一 : HLA 不適合造血幹細胞移植—生着不全、GVHD、感染症を乗り越えて—. 第 67 回日本血液学会総会. 横浜、2005 年 9 月 17-19 日
- 3) Kato S for the Japan Cord Blood Bank Network: Cord blood transplantation and cord blood banking. XXXth World Congress of the International Society of Hematology, Istanbul, September 28-October 02, 2005

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 DC ワクチンを用いた臍帯血移植後のウイルス感染予防法の開発に関する研究

分担研究者 東 英一 三重大学医学部附属病院細胞移植療法部 助教授

研究要旨

臍帯血移植(CBT)を含む造血細胞移植(HCT)後の免疫抑制期において、サイトメガロウイルス(CMV)、Epstein-Barr ウイルス(EBV)、アデノウイルス(ADV)などの感染症は時に重症化し、致命的となる。また、本邦など、時に麻疹の流行を認める地域においては、造血細胞移植後の麻疹ウイルス(MV)感染症の致死率が高いことも報告されている。今回、我々は、樹状細胞(DC)ワクチンの手法を用いて、MV に対するワクチンを作成し、その効果を *in vitro* で確認した。

A. 研究目的

CBT などの HCT 後の免疫抑制下において、効果的に抗ウイルス免疫を誘導するワクチンを開発する。DC ワクチンの手法を用いて、MV、EBV、CMV、ADV などのウイルスに対するワクチンを作成する。

B. 研究方法

抗ウイルス DC ワクチンは、各種ウイルス感染細胞を紫外線(UV)照射によりウイルスを不活化した後、DC に貪食させることにより作成する。今回の研究では、MV に対する DC ワクチンを作成する。MV 感染 DC を自己 DC に貪食させることにより、抗 MV DC ワクチンを作成する。UV 照射によりアポトーシスに陥った被感染細胞からウイルス抗原を認識した DC は、自己 T 細胞にウイルス抗原を提示する能力を獲得し、抗ウイルス免疫を惹起する (図 1)。

抗 MV DC ワクチンによる、細胞障害性 T 細胞(CTL)誘導能などの自己 T 細胞活性化は、インターフェロンガンマ(IFN- γ)産生細胞の誘導能を ELISPOT 法で測定することにより確認する。

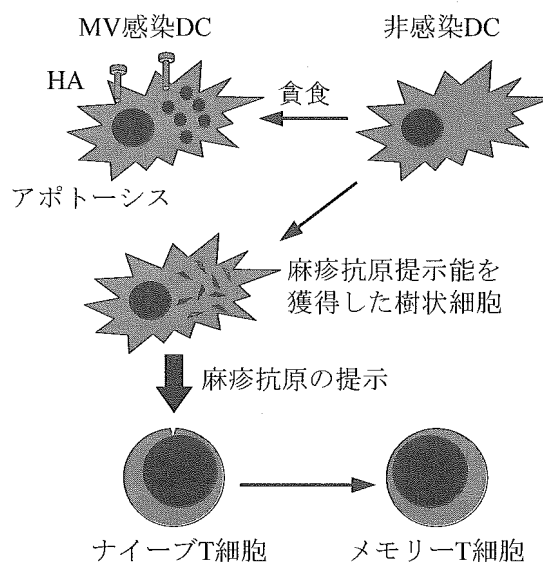


図1 抗MV DC ワクチンの原理

C. 研究結果

MV は DC に感染し MV 蛋白を産生する。その一つである Hemagglutinin (HA)蛋白は DC 細胞表面に発現し、DC が T 細胞に抗原提示する際、T 細胞の増殖を抑制するシグナルを伝達する。これにより、MV は生体内で免疫抑制状態を惹起する (図 2)。我々は、MV 感染が DC に及ぼす影響をみる目的で、健常

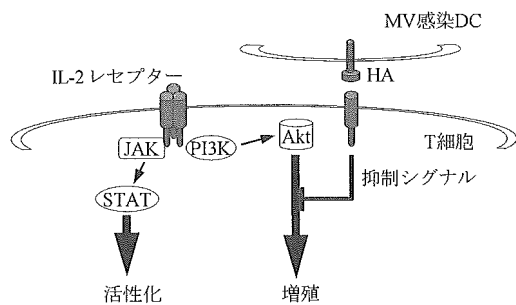


図2 DCに発現したMV蛋白HAによる免疫抑制機構

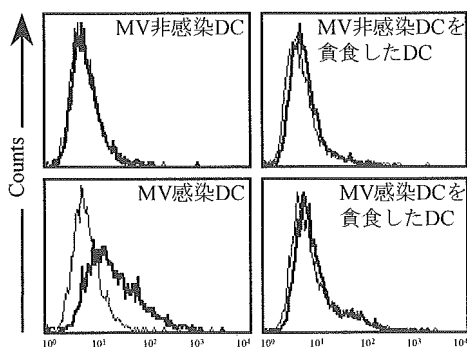


図3 抗MV DCワクチンのHAの発現: MV非感染、あるいは、MV感染DC、および、これらを食したDCを抗MV-HA抗体で免疫蛍光染色し、FACSで測定した。MV感染DCにみられるHAの発現は、MV感染DCを食したDCには認めない。

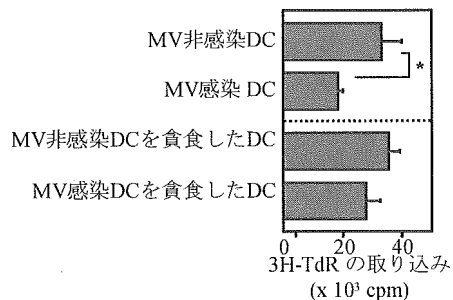


図4 抗MV DCワクチンの同種末梢血単核球増殖反応(alloMLR):図3のDCと同種末梢血単核球を混合培養し、5日間培養した。培養終了12時間前にトリチウムチミン(3H-TdR)を加え、その取り込みを測定することにより、細胞増殖反応をみた。MV感染DCにみられるalloMLRの低下は、MV感染DCを食したDCでは認めない。

成人末梢血からDCを培養し、MVを感染させた。MV感染DCがHAを発現し(図3)、同種末梢血単核球の増殖を抑制することを確

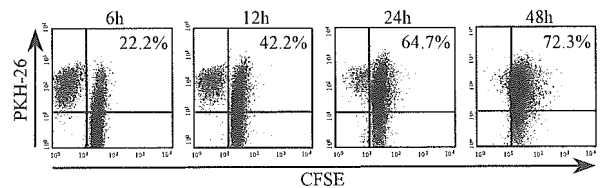


図5 抗MV DCワクチンの作成: UV照射したMV感染DCと、非感染自己DCを各々PKH-26とCFSEで染色し、図中に示した時間、混合培養した。時間とともにPKH-26とCFSE双方とも陽性の細胞、すなわち、MV感染DCを食したDCの増加を認める。

認した(図4)。すなわち、MV感染が免疫抑制を惹起する事を確認した。次に、抗MV DCワクチンを作成するため、MV感染DCをUV照射した後に、自己DCに食させた。食食反応は経時的に増加し、48時間後には約70%のMV感染DCが自己DCに食された(図5)。このMV感染DCを食したDC(抗MV DCワクチン)は、細胞表面にHAを発現せず(図3)、同種末梢血単核球の増殖も抑制しない事を確認した(図4)すなわち、我々が開発した抗MV DCワクチンは免疫抑制を惹起せず、その生体内への投与が安全であることが示唆された。さらに、抗MV DCワクチンが自己T細胞、特にナイーブCD4、および、ナイーブCD8 T細胞のIFN- γ 産生を

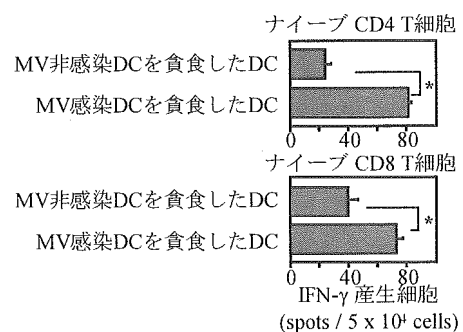


図6 抗MV DCワクチンによるMV特異的免疫能の誘導: MV非感染、あるいは、感染DCを食したDCとナイーブCD4陽性、あるいはCD8陽性T細胞を混合培養し、IFN- γ の産生細胞をELISPOT法で測定した。抗DC MVワクチンは両T細胞のIFN- γ の産生を誘導する。

表 1 HCT 患者における抗 MV DC ワクチンの効果 (*in vitro*)

患者	年齢 (才)	疾患	移植片	HCT後 月数	GVHD	免疫抑制剤	IFN- γ 産生細胞 (spots/5 x 10 ⁴ cells)		
							抗MV DC ワクチン	コントロール ワクチン	P
1	13	ALL	uBM	1	acute	CSA	60.3 ± 9.9	20.3 ± 6.5	0.004
2	3	NB	aPBSC	1	-	-	11.7 ± 2.5	3.7 ± 1.5	0.009
3	3	CML	rBM	2	-	-	20.3 ± 1.5	1.3 ± 1.0	<0.001
4	10	AML	uBM	2	-	FK506	30.0 ± 2.6	14.0 ± 7.9	0.029
5	8	ALL	rBM	6	-	-	45.7 ± 4.0	6.3 ± 2.1	<0.001
6	9	BT	aPBSC	7	-	-	32.4 ± 2.3	4.5 ± 0.6	<0.001
7	2	NB	aBM	7	-	-	21.0 ± 3.0	2.3 ± 1.2	<0.001
8	6	AML	uBM	10	chronic	PDN,FK506,MMF	51.0 ± 2.6	24.6 ± 4.1	<0.001
9	56	MDS	uBM	13	chronic	-	9.0 ± 4.6	1.0 ± 1.0	0.042
10	4	MDS	CB	16	-	-	9.0 ± 0.6	1.7 ± 1.0	0.001
11	13	ALL	CB	20	-	-	31.0 ± 6.2	9.3 ± 3.5	0.006
12	13	NB	aPBSC	19	-	-	25.7 ± 4.2	3.8 ± 2.2	<0.001
13	24	MDS	rPBSC	25	-	FK506	55.3 ± 5.7	23.7 ± 4.0	0.001
14	13	ALL	uBM	28	-	-	30.7 ± 2.0	3.7 ± 1.5	<0.001
15	9	ALL	uBM	39	-	-	42.2 ± 5.2	2.2 ± 1.0	<0.001
16	27	MDS	uBM	52	-	-	11.3 ± 2.6	2.3 ± 1.0	0.007
17	20	AA	rPBSC	55	-	FK506	16.3 ± 3.2	6.7 ± 1.2	0.008
18	27	AA	uBM	57	-	-	43.7 ± 3.2	13.6 ± 1.5	<0.001
19	6	AA	CB	60	-	-	35.2 ± 4.4	5.8 ± 2.1	<0.001
20	16	CML	rBM	75	-	-	2.3 ± 1.0	4.7 ± 1.5	0.102
21	21	AA	rBM	92	-	-	42.0 ± 2.0	7.7 ± 1.5	<0.001

抗 MV DC ワクチン : MV 感染 DC を貪食した DC、コントロールワクチン : MV 非感染 DC を貪食した DC

誘導する事を確認した (図 6)。すなわち、抗 MV DC ワクチンが MV 特異的免疫を惹起することを *in vitro* で証明した。

抗 MV DC ワクチンの HCT 患者における効果を *in vitro* で測定した (表 1)。21 人中 20 人 (95%) の HCT 後の患者末梢血から作成した抗 MV DC ワクチンが、自己末梢血単核球 (主に T 細胞) の IFN- γ 産生を誘導した。このうち、HCT 後 1 年以内の患者 (8 人)、CBT 後の患者 (3 人)、急性、あるいは慢性 GVHD に罹患している患者 (3 人) や免疫抑制剤を服用中の患者 (5 人) から作成した抗 MV DC ワクチンは全て、IFN- γ 産生を誘導した。

D. 考察

日本小児血液学会・造血細胞移植委員会が 2002 年 5 月に行った本邦における HCT

後の MV 感染症の全国調査によれば、調査した 170 施設中 21 施設 (12%) で合計 37 名の麻疹発症があり、そのうち 3 名 (8%) が死亡し、34 名は軽快した。また、本邦での一般人口における小児・成人の麻疹の最近の急増に伴い、HCT 後の麻疹症例も最近 3 年間で全症例の 76% と増加傾向にあることがわかった。このような現状にもかかわらず、HCT 後の症例に MV 生ワクチンを行っているのは 170 施設中 30 施設 (18%) であった。MV 生ワクチン接種により一過性の免疫抑制を来すことが、臨床現場でワクチン接種を躊躇させる一因となっていると推測された。

米国 Centers for Disease Control and Prevention (CDC) の勧告では HCT 患者への MV 生ワクチンの接種は、HCT 後 2 年経過している患者で、かつ、免疫抑制剤を服用していないなどの免疫抑制状態にない患者に限ら

れている。また、HCT 後 1 年の患者に対する MV 生ワクチン接種を試みた報告では、抗 MV 免疫獲得率は 46% と低値であった。

我々が開発した抗 MV DC ワクチンは、HCT 後 1 年以内の患者から作成した場合も有効であるだけでなく、CBT など MV 非感染ドナーからの HCT 後の患者や、GVHD や免疫抑制剤服用中などの強度の免疫抑制下にある HCT 患者においても有効である事が推測された。

過去に使用された麻疹不活化ワクチンを接種した患者が、野生株 MV に感染した場合、出血性発疹や間質性肺炎などを呈する非定型麻疹に罹患することが知られている。したがって、我々の抗 MV DC ワクチンを臨床応用するためには、*in vivo* における効果、および、副反応をみる研究が不可欠である。現在我々は霊長類を用いた *in vivo* 実験を計画中である。

共同研究者

熊本忠史・三重大学大学院医学系研究科・病態解明医学講座・小児発達医学・助手

平山雅浩・三重大学医学部附属病院・小児科・講師

E. 結論

DC ワクチンの手法を用いて作成した抗 MV ワクチンが、HCT 患者に効果的に抗 MV 免疫を惹起しうることを、*in vitro* で証明した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirayama M, Azuma E, et al.: Discrimination of acute graft-versus-host disease from infections by enumeration of peripheral blood IFN- α spot-forming cells. *Transplantation* 81, 632-5, 2006

- 2) Hirayama M, Azuma E, et al.: Prediction of acute graft-versus-host disease and detection of distinct end-organ targets by enumeration of peripheral blood cytokine spot-forming cells. *Transplantation* 80: 58-65, 2005

2. 学会発表

米国血液学会で本研究に関して口演 47th Annual Meeting of American Society of Hematology, Atlanta, December 2005

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

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 臍帯血幹細胞骨髄内移植に関する研究

分担研究者 安藤 潔 東海大学医学部内科学系 教授

研究要旨

本年度は骨髄内移植法を利用してマウス内でヒト造血微小環境を再構築するアッセイを開発した。臍帯血の骨髄内移植法は効率よい生着を達成するために有望な方法であるが、間葉系幹細胞を同時に移植することにより更に造血微小環境も再構築可能であり、臨床応用が期待される。

A. 研究目的

われわれは NOD/SCID マウスへの骨髄内 (iBM) 移植法を利用して、ヒト臍帯血 CD34 細胞の生着効率の改善 (Blood, 101, 2905-2913, 2003)、マウス間葉系幹細胞の生着 (Blood 104,3581-3587, 2004) を報告してきた。間葉系幹細胞は非造血系の骨髄幹細胞であり、骨髄内微小環境を提供していることが推測されているが、直接の証明はなされていない。今回われわれはヒト間葉系幹細胞を NOD/SCID マウスへ骨髄内移植し、その分化と造血維持機を検討した。

B. 研究方法

ヒト間葉系幹細胞(MSC)および臍帯血 CD34 細胞をそれぞれレンチウイルスを用いて GFP および YFP で標識した。

C. 研究結果と考察

10⁶個の GFP⁺ MSC を iv および iBM にて投与した。4 週後に骨髄内 GFP⁺ 細胞を測定した。iv 法ではほとんど細胞が検出されなかったが iBM 法では GFP⁺ 細胞を認めたので、以後の実験は iBM 法を用いた。10 週後に生着している GFP⁺ 細胞を同定した。細胞の 70% は endosteal 領域に認められた。60% の細胞が α -SM アクチン陽性であり、これらの中で血管内皮の外側に存在するものは pericyte、それ以外の細胞は myofibroblast と同定された。ALP 陽性の細網を有する細胞は reticular cell と同定された。更に osteocalcin 陽性の osteocytes, N-cadherin 陽性の

osteoblast が同定された。これらの細胞はヒト造血細胞と接して存在している像が多数認められた。これらヒト MSC 由来骨髄微小環境の機能を調べるためにマウス右脛骨に MSC を移植した後臍帯血 CD34 細胞を iv 移植し、生着を左右で比較した。右脛骨への生着率が有意に高く、含まれる CD34 細胞、コロニー形成細胞、SRC 数もいずれも右脛骨に多かった。更にヒト CD34, CD15, Gly-A 細胞で比較すると GFP⁺ 細胞と接している細胞は CD34 細胞に多く、CD34 細胞と接している GFP⁺ 細胞は endosteal 領域に多く認められた。以上の結果からヒト MSC 由来細胞はヒト造血幹細胞に対するニッチを提供することが明らかとなり、このアッセイを hematopoietic microenvironment repopulating cells (HMRC) アッセイとした。

E. 結論

ヒト間葉系幹細胞は骨髄内で造血微小環境を再構築する。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K: Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in

the murine bone marrow compartment. *Blood*, Vol. 107(5): 1878-87, 2006

- 2) Ando K, Yahata T, Sato T, Miyatake H, Matsuzawa H, Oki M, Miyoshi H, Tsuji T, Kato S, Hotta T: Direct evidence for ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood*, Epub ahead of print, 2006

厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 小児における臍帯血移植（至適前処置と GVHD 予防法の確立）

分担研究者 磯山 恵一 昭和大学藤が丘病院小児科 助教授

研究要旨

造血幹細胞移植の一つとして非血縁臍帯血移植が行われるようになってきたが、小児臍帯血移植に対する移植前処置法や GVHD 予防法の標準的なものは未だ確立されていない。また、臍帯血移植で明らかにされてきた問題点の一つとして、移植後の生着不全が多いことがあげられる。小児臍帯血移植に対する至適前処置法や GVHD 予防法を開発することは、生着不全などの問題点を克服し、成績を向上させるためには重要なことである。

A. 研究目的

目的：非血縁臍帯血移植における至適前処置および GVHD 予防を確立するため、非血縁臍帯血移植が適応となる小児急性白血病患者に対しリン酸フルダラビン、全身放射線照射、シクロフォスファミドを用いた前処置を行い、安全性・有効性を検討する。

背景：臍帯血移植は、1988 年、Gluckman らにより世界で初めて行われた。この成功は同種造血幹細胞移植に新分野を開き、以来、現在まで既に 3000 例以上の臍帯血移植が施行され、わが国においても、近年急速に移植例が増加し、2004 年末までに 2,500 例を越す臍帯血移植が行われている。臍帯血移植は、ドナーに負担が全くないばかりでなく、患者の病状に応じた至適時期に移植できる利点がある。また、臍帯血に含まれる免疫担当細胞は未熟でありそのため GVHD の発症率が低く、HLA 不適合の移植が可能であるという利点を有している。他方、臍帯血移植では他の造血幹細胞移植に比較して生着の割合が低いことが問題点の一つである。非血縁臍帯血移植 (UCBT) における好中球生着率は 87-91%と報告さ

れ、そのうち小児急性白血病に対する UCBT の好中球生着率は 80-88%である。日本さい帯血バンクネットワークの小児急性白血病に対する UCBT の移植後 70 日の好中球生着は AML 80.5%、ALL 81.2%であった。一方、骨髄バンクドナーからの移植では JMDP の急性白血病 2,266 例（成人例を含む）では、生着不全は HLA 適合度により 2.15-2.43%、National Marrow Donor Programに登録された約5,000例のUBMTにおける全体の graft failure は4%と報告されている。また、小児急性白血病に対する同種骨髄移植では95%の生着が得られている。これらは症例の背景や例数に差が認められることや生着判定の基準が異なるが、UCBT では UBMT に比較して生着不全の頻度が高い可能性があることは明らかである。生着に関与する因子には、移植細胞数、HLA の適合度、移植前処置の免疫抑制、移植後の免疫抑制、患者に残存するリンパ球などの免疫担当細胞による同種免疫機構の関与が考えられる文献)。この点を克服し、臍帯血移植の安全性、有効性が確保できれば、臍帯血移植の一般さらに適応が拡大し、造血幹細胞移植におけるドナー不足の問題

も解消されるものと考えられる。今回、臍帯血移前処置として抗腫瘍作用とともに免疫抑制効果の高い薬剤を加えることにより臍帯血移植の不生着率を減少させることを目的として研究を計画した。

B. 研究方法

I. 対象疾患に対する臍帯血移植成績の現状の把握

研究計画を策定するにあたり、小児急性白血病に対する臍帯血移植成績の現状を把握した。1997年以來、日本さい帯血バンクネットワークを介して国内で行われたUCBT15歳以下の小児へ移植は440例(2003年6月現在)である。その中で、急性リンパ性白血病198例、急性骨髄性白血病98例であった。移植時の年齢中央値は4歳(0-15歳)、体重は16kg(4-67.5kg)移植細胞数(採取時)の中央値は $4.3 \times 10^7/\text{kg}$ で、最低値 $0.6 \times 10^7/\text{kg}$ から最大 $82 \times 10^7/\text{kg}$ と幅広い分布を示していた。HLAの適合度は、完全一致例は17%であり、多くの症例で1座以上の不一致移植であった。

1. 移植後の血液回復

小児急性白血病への移植後、その半数の症例で末梢血の好中球数が $500/\mu\text{L}$ へ回復する日数(中央値)は28日、移植後70日目では約80%(AML 80.5%、ALL 81.2%)の症例で好中球数が $500/\mu\text{L}$ に到達している。好中球回復に影響を与える因子としては、移植時の患者の状態や移植細胞数($\geq 3.6 \times 10^7/\text{kg}$)などが関係していることも明らかになっている。血小板数 $20,000/\mu\text{L}$ への回復は中央値70日で、移植100日目では65%の症例で血小板の回復が認められた。血球回復の遅れは、臍帯血に含まれる造血幹細胞が他の移植細胞に比べ未熟であることが関係していると考えられているが、詳細が明らかにされているとは言いがたい。

2. 使用されている前処置

UCBにおいて選択されていた前処置方法は表1、2に示したとおりである。急性リンパ性白血病では121例(76%)はTBIを含む方法が選択されていた。組み合わせる抗腫瘍剤はシクロフォスファミドが多く、骨髄移植で使用されてきた方法に準じた組み合わせを選択していることがうかがわれた。一方、約38%の症例は1例ごとに異なった組み合わせを用いたものであった。187例全体で44種類の使用方法が使用されていた。急性骨髄性白血病でもほぼ同様に傾向が認められた。TBI使用は全体の68%であり、組み合わせる抗腫瘍剤はシクロフォスファミドであった。一方、全体の42%は個別の組み合わせを用いて移植が行われており、84例で25種類の使用方法が使用されていた。

3. 小児急性リンパ性白血病に対する移植成績

198例の5年全生存率は、35%である。全生存率が良好となる因子は、初回または第2寛解で移植を行った場合、移植歴がないこと、複数薬剤による拒絶(GVHD)予防法を行った場合であった。特に、初回または第2寛解の場合で、初回移植としてUCBTを選択することが成績を向上させることに繋がることを示している。II度以上の急性GVHDの発生率は31%で、急性GVHDの発生とHLAの一致率との間には関連は認められない。移植1年以内の移植関連死亡の発生率は、33.6%、第3寛解・非寛解移植では47%の発生率であったのに対し、初回・第2寛解の場合では約20%に。死因では、感染症の発生頻度が高いことが示された。間質性肺炎、成人型呼吸窮迫症候群などの呼吸器合併症の頻度も高い傾向があった。

4. 小児急性骨髄性白血病に対する移植成績

92 例の 5 年全生存率は、29%であった。急性リンパ性白血病の場合と同様に、初回または第 2 寛解で移植を行った場合 (52.8%) が第 3 寛解・非寛解での移植に比較して有意に生存率が高くなっていた。また、移植実施年代別に検討した場合、2000 年以後に実施された場合には、それ以前に比較して成績が改善していた。II 度以上の急性 GVHD の発生率は 31%で、発生と HLA の一致率との間には関連は認められない。全体の移植 1 年以内移植関連死亡の発生率は、34.7%であった。2000 年以後では、移植後早期死亡数 (感染症による死亡) の減少が認められたことが生存率の改善に繋がっているものと考えられた。死亡原因では、急性リンパ性白血病と同様に感染症の発生が多く認められた。

C. リン酸フルダラビンを含む前処置法を使用した臍帯血移植の第 II 相試験計画

上記 I をふまえて試験計画を策定した。研究の概要を図 1 に示した。

1. 対象疾患および患者

非血縁臍帯血移植移植が必要と考えられる 15 歳未満の急性白血病とした。移植施設は登録確認の通知を受ければ、直ちに、臍帯血申込書 (臍帯血バンク宛) を当該バンクへネットまたは FAX で当該臍帯血の申込を行なう。その後、臍帯血の確認検査が済み次第、臍帯血の提供を受け移植へと進む。移植が実施されれば、移植後 72 時間以内に小児臍帯血移植実施報告書をデータセンターに FAX する。

2. 治療レジメン設定の根拠

対象とする疾患の症例数は少なく多施設共同治療も行われていない。1997 年から

2003 年までに日本さい帯血バンクネットワークに登録された小児 ALL187 例、AML84 例のうち今回対象となる第 2 寛解、第 3 寛解、非寛解症例数のうち非移植例はそれぞれ 149 例 (79%、25 例/年)、71 例 (84%、12 例/年) である。そのため、従来のグループを越えた研究が必要であると考えられた。これらの症例に対する移植前処置の設定においては、従来の方法を大幅に変更しない、抗腫瘍効果が ALL、AML 双方に効果があり、かつ多用されていない薬剤を選択することとした。前述 2 の「使用されている前処置」で示されたごとく、ALL、AML の前処置は TBI+シクロフォスファミドが基本となる組み合わせが多く選択されていることから「TBI+シクロフォスファミド」を踏襲する。これは従来の成績と比較するためにも重要な点であると考ええる。次に、ALL、AML 両者に抗腫瘍効果を有する薬剤としては、リン酸フルダラビンを選択した。リン酸フルダラビンは、non-myeloablative stem cell transplantation (NST) の基本薬剤としてその免疫抑制効果に注目して使用されている。欧米からの *in vitro*、*in vivo* の試験結果では、両者に有効な抗腫瘍剤と報告され使用されつつある薬剤である。また、リン酸フルダラビン+シクロフォスファミドは NST で頻用されている薬剤の組み合わせであり、リン酸フルダラビンはシクロフォスファミドによって引き起こされる DNA 修復機構を妨げることが明らかになっており、この組み合わせでリンパ系腫瘍の治療に有効として使用されてきた^{11,12)}。

3. 対象患者と選択基準

以下のすべての条件を満たす患者を対象とする。非血縁臍帯血移植が必要と判断された急性白血病でかつ、初回の造血細胞移植として行われる患者、年齢は 6 ヶ月以上 16 歳未満、体重あたり $2 \times 10^7/\text{kg}$ 以上の細