

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

平成17年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

### 第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

### 第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

### 第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

### 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

### 第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

### 第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

# 目 次

## 第1分野

### 課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

## 第2分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)受容体(S1P3)の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261



KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	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	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルゲンによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ー ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（平 成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・ 細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合 研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模 臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成 17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込細胞チップとナノセンサーによる 新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサ ーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬 効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤 の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺 伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的 評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資 源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640



## 第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究



## 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、臍帯血移植およびヒトウイルス感染モデルマウスの作製、および多種類ウイルス同時検出系の開発などを行った。また、臍帯血 DLI の臨床パイロット研究を行い、その有効性と安全性を示唆する結果を得た。

### 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
- (8) 東京医科歯科大学医学部 寺嶋一夫
- (9) 先端医療センター血液再生研究グループ 伊藤仁也

### A. 研究目的

臍帯血移植には、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）を施行できないという欠点がある。この点を克服するために、本研究は、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（臍帯血 DLI）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・実用化することを目的とする。

本研究は全体として3カ年計画であり、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、1年目に当たる昨年度は、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の確立、2) 得られた活性化臍帯血リンパ球の性状解析、3) 臍帯血 DLI 動物モデル作製への第一段階としての臍帯血移植モデルマウスの作製、などを行った。本年度は、①臍帯血 DLI 動物モデル作製への第二段階としてのヒトウイルス感染モデルマウスの作

製、②臍帯血 DLI の臨床パイロット研究による有効性と安全性の評価、③治療に用いる活性化臍帯血 T 細胞の安全性評価法の確立などを目的として研究を進めた。

### B. 研究方法

#### 1. 臍帯血移植と骨髄/末梢血幹細胞移植の治療成績の比較

1999年6月～2004年9月の間に国立小児病院/国立成育医療センター小児腫瘍科において臍帯血移植を行った7例の経過を検討し、過去10年間に行われた非血縁者間骨髄移植症例12例と比較することにより、臍帯血移植の問題点を抽出した。

#### 2. 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。

#### 3. ヒト臍帯血中の B 細胞系列へ分化する前駆細胞の定量的検出法の確立

マウスストローマ細胞株 TSt-4 単層培養上でヒト臍帯血由来の造血幹細胞/前駆細胞を培養し、B 前駆細胞から B 細胞への分化を誘導した。さらに、限界希釈にともなう B 細胞コロニー数の変化を Poisson 分布により解析し、未熟 B 細胞への分化能を持つ前駆細胞を定量した。

#### 4. 臍帯血リンパ球活性化培養法

昨年度確立した臍帯血 T 細胞活性化培養法を用いた。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 CO<sub>2</sub> インキュベーターで 6～14 日間静置培養した。

## 5. GeneChip を用いた活性化臍帯血 T 細胞の遺伝子発現プロファイルの解析

臍帯血および対照として成人末梢血由来の活性化 CD4 陽性 T 細胞から total RNA を抽出し、Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array により網羅的遺伝子発現を行った。データ解析には GeneSpring (Agilent 社) を用いた。

## 6. ヒト白血病モデルマウスの作製

成人末梢血 B 細胞を EBV によりトランスフォームして得られたリンパ芽球様細胞株 (EBV-LCL) を、免疫不全マウスである NOD / Ltz / SCID (8W、♂) に尾静脈より移植し、経時的な観察及び解析を行った。マウスは EBV-LCL  $1.0 \times 10^5$  cells / mouse 輸注群 (A 群)、EBV-LCL  $1.0 \times 10^6$  cells / mouse 輸注群 (B 群) の 2 群とした。

## 7. NOG マウスを使用したモデル実験系の確立

NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$  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  $\alpha$  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。 $1 \times 10^4$  -  $1.2 \times 10^5$  個の CD34 陽性細胞および  $2 \times 10^5$  個の活性化 CD4 陽性 T 細胞を尾静脈、腹腔あるいは骨髄内に投与した。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レ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。このマウスの脾臓より得られた B 細胞に B95-8 株 EBV を感染させ EBV-LCL を樹立・解析した。また、移植後、122-150 日目のマウスに、HIV-1<sub>JRC5F</sub> (R5 指向性)、HIV-1<sub>MNp</sub> (X4 指向性) および HIV-1<sub>NL4-3</sub> (X4 指向性) をそれぞれ 8 匹、11 匹、9 匹ずつ尾静脈より投与した (100ul/mouse)。

## 8. 臍帯血 DLI 実用化のためのウイルス検査法の開発

### (1) 検査対象ウイルスの選定

胎児に胎盤を介して感染する可能性がある (すなわち臍帯血に混入する可能性がある) ウイルスおよび母体に持続感染しているウイルスとして、DNA ウイルス: 単純ヘルペスウイルス (HSV-1, HSV-2)、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) サイトメガロウイルス (CMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 型、7 型、8 型 (HHV-6, -7, -8)、パルボウイルス B19 型 (PVB19) B 型肝炎ウイルス

(HBV)、RNA ウイルス: 風疹ウイルス、麻疹ウイルス、A 型、B 型インフルエンザウイルス、C 型肝炎ウイルス、レトロウイルス: ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1, 2) ヒト T リンパ球指好性ウイルスの 18 種類を選定した。また、ウイルススパイクの試験項目として、リンパ球に潜伏感染する EB ウイルス (EBV) および HHV-6、移植後の代表的日和見感染症ウイルスの CMV、造血系細胞への感染が知られている PVB19 を選定した。

### (2) ウイルス検出系の開発

核酸自動抽出機 (BioRobot EZ1: QIAGEN) と定量的 PCR 機 (LightCycler: ロッシュ) を使用し、Hybriprobe 法によるウイルス定量系と多項目 DNA ウイルス同時検出系を作成した。

## 9. 活性化臍帯血 T 細胞の安全性試験

治療に用いられる培養臍帯血 T 細胞の安全性評価法として、(1) エンドトキシン試験、(2) 無菌試験、(3) ウィルス試験、(4) 残存サイトカイン測定試験、(5) STR による個人識別試験の基礎的検討を行った。

## 10. 臍帯血 DLI のパイロットスタディ

### (1) 細胞の準備

臍帯血バッグ内に残存する極めて少量 (約 1ml) の臍帯血に対して、1% ヒト血漿加 RPMI-1640 を 20ml 加え、比重遠心法にて単核球を分離した。前年度に確立されたプロトコールにより、抗 CD3 および IL-2 添加培養、CD4 陽性細胞の選択を行い、いったん液体窒素中に保存した。DLI 施行直前に細胞を融解しさらに培養した後、多項目ウイルス検査法によりウイルス混入を検査した。

### (2) 対象患者の選択

1) 移植後生着不全、2) 移植後白血病再発、3) 移植後難治性日和見感染症、のいずれかのリスクありと主治医に判断された 7 症例を対象として、臍帯血 CD4T 細胞を増殖させ保存した。このうち 3 例の患者では実際に生着不全、難治性日和見感染症が発症し、投与を行った。

(倫理面への配慮)

### 1. 臍帯血使用および臍帯血 DLI 臨床パイロット研究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、臍帯血バンクより臍帯血の提供を受ける際には、連結不可能匿名



化を行い、個人情報の保護を図った。本研究は東京脐帯血バンクおよび国立成育医療センター倫理委員会の承認を得ている。

脐帯血 DLI のパイロットスタディについては、東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を得、また実際の培養・投与に当たっては、細胞調製前・及び細胞投与前に、十分に研究内容を説明し、インフォームドコンセントを取得した。

## 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. 脐帯血移植と骨髄/末梢血幹細胞移植の治療成績の比較

脐帯血移植では CD34 陽性細胞数は骨髄移植より少なかったが、これによる治療結果への影響は明らかではなかった。脐帯血移植で生細胞率が最低値(61%)であった症例に生着不全を認めたことから、輸注細胞数よりも生細胞率が、生着に影響する可能性が示唆された。脐帯血移植では白血病再発率が高く、免疫学的な抗腫瘍効果 (GVL 効果) が低いことが示唆された。また、脐帯血移植後は HHV-6 による感染症が重要であることが示唆された。

### 2. ヒト脐帯血中の B 細胞系列へ分化する前駆細胞の定量的検出法の確立

未熟 B 細胞への分化能を持つ前駆細胞の頻度は、CD34+Lin<sup>-</sup>細胞には 25.0 個に 1 個、CD34+CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>細胞には 14.6 個に 1 個であることが示された。

### 3. GeneChip を用いた活性化脐帯血 T 細胞の遺伝子発現プロファイルの解析

脐帯血および成人末梢血 1 検体ずつから活性化培養した CD4 陽性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。脐帯血由来活性化 CD4 陽性細胞 (CB-CD4) と末梢血由来活性化 CD4 陽性細胞 (PB-CD4) を比較したところ、幾つかのサイトカイン (IL-13、IL-5 など) では CB-CD4 で PB-CD4 より発現が高く、他のサイトカイン (IL-17 など) ではその逆であった。この他多くの遺伝子発現で両者の間に差が認められ、CB-CD4 と PB-CD4 の間には多くの免疫関連遺伝

子の発現に違いがあることが示唆されたが、今後実験を繰り返し確認する必要がある。

## 4. ヒト白血病モデルマウスの作製

EBV-LCL の移植後、A ( $1 \times 10^5$  cells/mouse)、B ( $1 \times 10^6$  cells/mouse) 両群ともマウス体重は減少した。体重減少は移植 2 週間以降から顕著となり、約 20 g の体重になると死亡した(図 1)。また、死亡後の病理学的検討により、腎臓、肝臓、胸腺、リンパ節、肺の臓器で EBV-LCL 細胞の浸潤が認められ、死亡原因は腫瘍死であると考えられた。マウス平均生存日数は A 群で  $47.4 \pm 8.23$  日、B 群で  $31.2 \pm 6.06$  日となり、B 群のマウスは約 1 ヶ月で 80% のマウスが死亡した(図 1)。Logrank 検定により両群間の差は有意 ( $p = 0.015$ ) とされた。

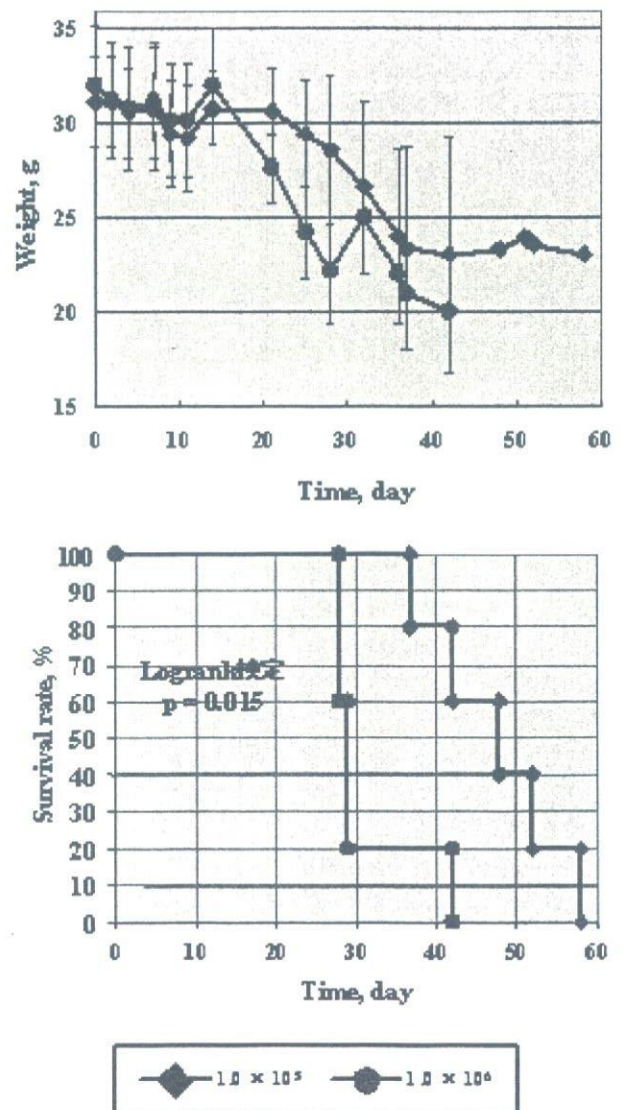


図 1. EBV-LCL移植後のマウスの体重 (上) および生存率 (下)



## 5. NOG マウスを用いたモデル実験系の開発

### (1) NOGマウスにおけるヒト免疫系の再構築

NOGマウスに臍帯血由来CD34陽性造血幹細胞を移植したところ、ヒトB細胞（CD19陽性）とT細胞（CD3陽性）、マクロファージ（CD68陽性）、樹状細胞（CD205陽）の分化がみとめられた。移植後4ヶ月までは末梢血、脾臓ともにヒト細胞の多くがB細胞であったが、その後T細胞が増加し6~7ヶ月ではB細胞の割合を上回った。

### (2) EBV感染実験

#### 1) EBV感染リンパ芽球様細胞株の樹立

臍帯血幹細胞移植後3ヶ月のマウスの脾臓および骨髄より単核細胞を分離しEBVを接種したところ、感染後2週目以降細胞の増殖が認められ、リンパ芽球様細胞株が樹立された。この細胞を蛍光抗体補体法により染色したところ、EBV核抗原（EBNA）が検出され、PCR法によりEBV DNAが検出された。また光学顕微鏡下ではリンパ芽球の形態を示し多数の細胞が集塊を形成していた。以上の点で、この細胞株はヒト末梢血Bリンパ球にEBVを感染させて樹立されるリンパ芽球様細胞株と区別できなかった。

#### 2) 樹立された細胞株におけるEBV遺伝子発現

NOGマウスの骨髄あるいは脾臓細胞にEBVを感染させて樹立されたリンパ芽球様細胞株におけるEBV遺伝子発現をRT-PCR法により解析したところ、EBNA1、EBNA2、EBNA3A、EBNA3B、EBNA3C、EBNA-LP、LMP1、LMP2A、LMP2B、EBER1の発現が認められた。これはIII型遺伝子発現に一致する。

#### 3) 樹立された細胞株の表面マーカー発現解析

樹立されたリンパ芽球様細胞株の表面抗原をフローサイトメトリーにより解析したところ、CD19、CD20、CD21、CD23、CD40の発現が認められ、活性化B細胞のフェノタイプを有していた。また、健常者末梢血B細胞にEBVを感染させて樹立したリンパ芽球様細胞株のフェノタイプと区別できなかった。

### (3) ヒト免疫不全症ウイルス（HIV）感染実験

感染マウスの病態を解析し、エイズ発症の可能性を検討した。マウスの1個体では、HIV-1<sub>NL4-3</sub>投与後32日目にプラズマ中に $1.2 \times 10^6$  / mlのウイルスコピー数が検出された。このように高いviremiaを示すマウスでは、同臍帯血ドナー同時期の非感染コントロールマウスに比べ、末梢血と脾臓中でCD4陽性T細胞の割合の激減、胸腺内ではCD4CD8共陽性の未熟T細胞の消失がみられた。

剖検した23匹の感染マウスについてまとめると、

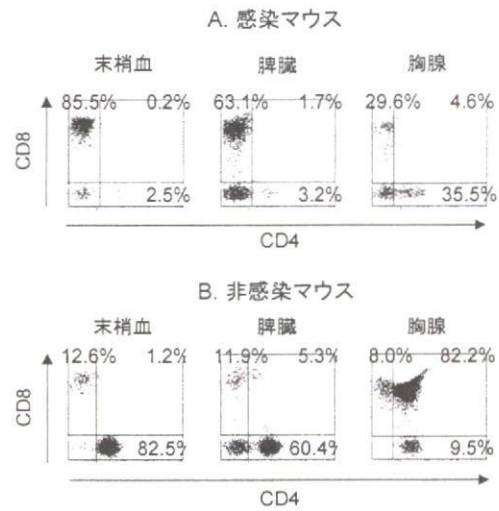


図2. HIV接種後ヒト型NOGマウスにおけるCD4陽性T細胞の減少

同時期の非感染マウスに比べて末梢血、脾臓におけるCD4/CD8の割合、胸腺内でのCD4CD8共陽性細胞の割合に明らかな減少がみとめられた（図2）。これは、ヒトの末期エイズ患者の病態を反映し、エイズ発症モデルとしてそのメカニズム解明の研究に利用できることを示している。

## 6. 臍帯血DLIの安全性評価のためのウイルス検査法の開発

### (1) ウイルス定量系の作製と感度検定

検査対象とした全てのウイルスに対し、5~10コピーのウイルスゲノムを定量できる感度を有する定量系を作製した。

### (2) 多項目同時DNAウイルス検出系の開発

18種類のウイルスの測定を合計5本のキャピラリーで行うマルチプレックスPCR系を作製した。実際の測定手順は、1.核酸抽出、2.RT-PCR反応（RNAおよびレトロウイルスの場合）3.PCR反応、4.遠心によるプローブの混合と加熱、5.メルティング解析によるウイルスの同定、である。これまでの検討では、1本のキャピラリーで8種類のウイルスを測定することが可能だった。検査時間は2時間、検出感度は50コピーであった（図3）。

### (3) ウイルススパイク試験の準備

EBVはB95-8細胞株、CMVはヒト胎児肺細胞由来HFL-1細胞で増殖させウイルス力価を測定したものをウイルス原とした。PVB19は良いウイルス増殖系がないため感染者血漿をウイルス原とした。

## 7. 臍帯血DLIの安全性試験

以下の5項目について、活性化臍帯血T細胞製品の安全性評価法として利用するための基礎的検討を行った。



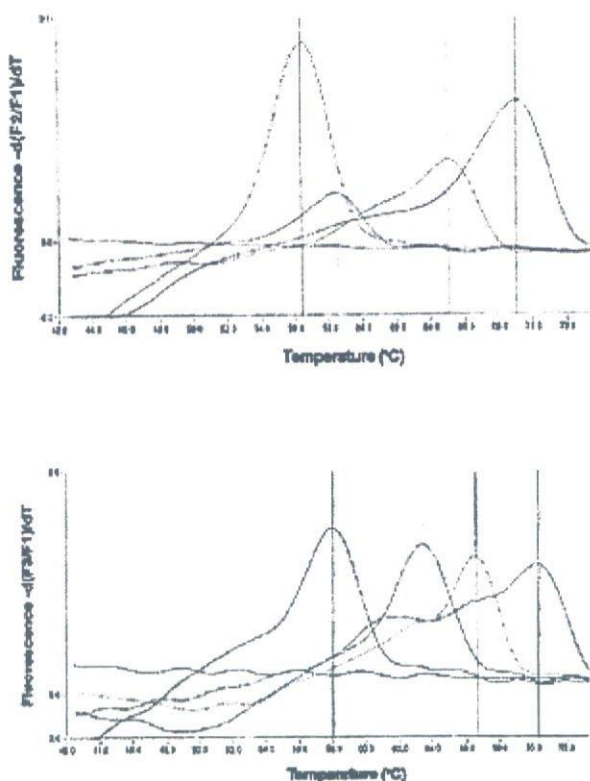


図3. Multiplex-PCR法によるウイルス定性試験

8種類のプライマーを使用したMultiplex-PCR、2種類の蛍光色素で標識した合計8種類のHybridprobeによる検出とメルティング解析により、1本のキャピラリーで8種類のウイルスの検出、同定が可能となる

#### (1) エンドトキシン試験

日局方の「エンドトキシン試験法」を用いた試験では、全てのサンプル（培養 14~18 日目の培養上清）において 0.0125EU/mL の検出限界値以下であった。

#### (2) 無菌試験

チョコレート寒天培地および、SCD 寒天培地のいずれの培地においても、全てのサンプル（培養 14~18 日目の培養上清）がコロニー陰性であった。

#### (3) ウィルス試験

培養前の臍帯血と培養後の活性化細胞のいずれにもウィルスは検出されなかった。

#### (4) 残存サイトカイン測定試験

投与用に調整する直前の培養上清、細胞洗浄後の洗浄液、投与用調整後の細胞浮遊液をサンプルとし、IL-2 の残存量を ELISA 法にて測定した。その結果、培養上清中では 9673.8pg/mL と今回検査を行った中で最も高濃度で存在していた IL-2 も、細胞洗浄後洗浄液では 106.7pg/mL まで減少し、投与用調製後の細胞浮遊液においては <20.0 と検出限界以下であった。

#### (5) STR による個人識別試験

培養前臍帯血と培養後活性化臍帯血 T 細胞とが全てのサンプルについて同一であることが証明された。

### 8. 臍帯血 DLI の臨床パイロットスタディ

#### (1) 臍帯血バッグからの ex vivo CD4 陽性 T 細胞培養

対象とした 7 例全例において CD4 陽性 T 細胞の増幅は良好で、臍帯血移植後にバッグに残存した約 1ml の臍帯血から、 $2 \times 10^7$  cells/vial で最低 2-3 本凍結保存することができた。CD4T 細胞の純度は 95% 以上で、CD8 細胞の混入率は 1% 以下であった。実際に投与を行った 3 症例では、投与前に凍結細胞からさらに CD4T 細胞を、IL-2 を含む培養液で活性・増殖させた。最終的な細胞数は  $1 \sim 5 \times 10^8$  cells であり、CD4 陽性率は 95% 以上、CD8 陽性細胞や  $\gamma\delta$ T 細胞の混入は 1% 以下、viability は 95% 以上であった。

#### (2) 調製した CD4 陽性細胞の品質管理（微生物の混入及び増幅）

7 例の臍帯血の活性化培養後において、HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BK virus, JC virus, Parvovirus B19, HBV が陰性であった。同様に培養後の T 細胞においてもウイルスの増殖・検出は認められなかった。また細菌培養、エンドトキシン検査でも陽性例は存在しなかった。

#### (3) 臍帯血 DLI を行った症例報告

1) 10 才男児。原因不明の CD4 リンパ球減少症・自己免疫疾患（間質性肺炎、多発軟骨炎、血管炎）に対して臍帯血幹細胞移植を行った。移植後の日和見感染症が懸念されたため、臍帯血 CD4T 細胞を増殖保存した。

患児は移植後 VOD, GVHD, 感染症を起こしたが、移植片は生着した。移植後にはしかし、リンパ球減少 ( $100-200/\text{mm}^3$ ) が続き、持続性ノロウイルス感染症、クリプトスポリジウム感染症などの感染症を併発した。ステロイドを使用中ではあったが、リンパ球増加及び感染症治療を目的に、凍結 T 細胞をおこし、活性化 CD4-4DLI を合計 3 回行った。CD4-DLI 後にはリンパ球数が  $200/\text{mm}^3$  から最大  $900/\text{mm}^3$  まで増加したが、効果は一過性であった。CD4-DLI に関係する可能性のある有害事象は生じなかった。

2) 1 歳男児。急性骨髄性白血病 (M7)・骨髄線維症に対して非寛解期に臍帯血幹細胞移植を行った。移植後再発及び生着不全が懸念され、臍帯血から CD4T 細胞を増殖し、保存した。移植後急性

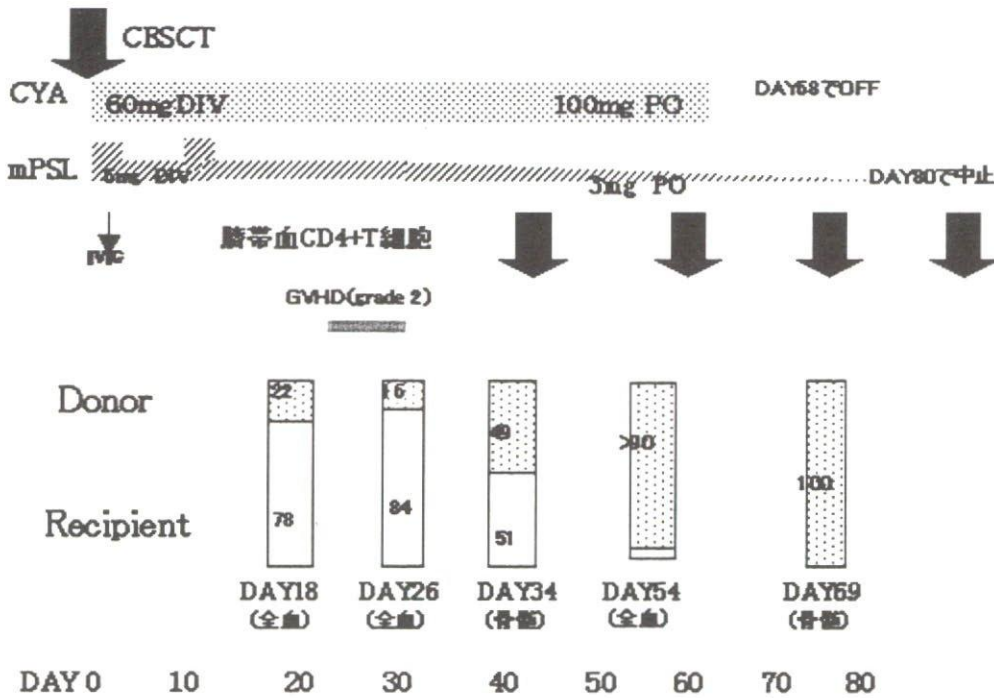


図4. 臍帯血DLIの臨床パイロット研究を行った症例(3)の臨床経過

肺出血などの合併症を起こし、白血球  $<500/\text{mm}^3$ 、赤血球・血小板輸血依存の状態が続いた。白血球はしかし、ドナー由来であり、白血球細胞の混在も認めなかったため、CD4-DLIを3回行った。出血→輸血を繰り返している状態であり、また輸注前に行った骨髓生検でも明らかな骨髓線維症を認め、CD4-DLIの治療効果は認めなかった。なお、有害事象は認めなかった。

3) 8ヶ月男児。重症複合型免疫不全症・Omenn病に対して臍帯血肝細胞移植を行った。移植後白血球は速やかに増加したが、キメリズム解析にて80%程度がレシピエントタイプと判明し、また骨髓においても50%がレシピエント由来であり、免疫抑制剤減量にても変化を認めなかった。そこで移植後部分キメラに対して臍帯血CD4-DLIを行った。合計8回の投与を行ったが、1回の投与にて白血球は $>90\%$ がドナータイプとなり、以後完全キメラを持続した(図4)。

完全キメラを達成してからしかし、MAC感染症に罹患し、通常の化学療法に対する反応が不良であったため、免疫能増強のために活性化CD4-DLIを継続した。5回目からは生着T細胞を増殖して、合計8回の投与を行った。この症例においても、有害事象を認めなかった。症例の経過を図1に示す。

#### D. 考察

##### 1. ヒト臍帯血中のB細胞系列へ分化する前駆細胞の定量的検出法の確立について

移植細胞原に含まれている造血幹細胞/前駆細胞の分化能を評価することは、移植の成否にかかわる重要な問題の1つであるが、現在はCFU-Cアッセイで検出されるCFU-GMコロニー数で判定されている。しかし、この方法では造血幹細胞/前駆細胞の赤血球、顆粒球および巨核球系列への分化能に限定され、リンパ球系列への分化能を測定することはできない。悪性腫瘍に対する化学療法や放射線療法後の幹/前駆細胞移植では、赤血球、白血球および血小板の回復のみならず、T、Bリンパ球の再構築も重要であるため、本研究で開発された方法により、臍帯血のB細胞構築能を移植前に評価できるようになったことは大きな進展である。今後は、T前駆細胞の定量法の開発も必要である。

##### 2. GeneChipを用いた活性化臍帯血T細胞の遺伝子発現プロファイルの解析

今回の検討の結果から、同じCD4(+)T細胞であっても、CB-CD4とPB-CD4では、一部のサイトカインやケモカイン遺伝子の発現に差があり、両者の間に機能の差があることが示唆された。今後、例数を増やして検討し、今回の結果がCB-CD4とPB-CD4の一般的な性格を反映したものであることを確認するとともに、実際に両者の機能の差



について解析することが必要であると考えられる。

### 3. ヒト白血病モデルマウスの作製

NOD / SCID マウスに EBV-LCL を移植することにより、白血病モデルマウスを作製することに成功した。このモデルマウスでは、LCL の表面抗原を追跡することにより、LCL が白血化していく推移と DLI を行った際の治療効果も確認でき、効果と安全性を評価可能な汎用性の高いモデルマウスで考えられる。今後、LCL と同一個体 (HLA 完全一致である auto-transfusion) 由来の臍帯血 T 細胞を活性化させ、輸注した後、生存日数、CD23、LMP-1 等の LCL に発現する表面マーカーを利用した数的解析を行い、臍帯血 DLI の効果判定を行う予定である。また GVHD などの副作用等の安全性の評価を行う予定である。

### 4. NOG マウスを用いたモデル実験系について。

移植後の NOG マウス骨髄および脾臓細胞より EBV 感染によりリンパ芽球様細胞株が樹立されたことは、当マウスにおいて臍帯血造血幹細胞よりヒト B 細胞が分化し、健常者末梢血 B 細胞同様に EBV に対する感受性を有していることを示している。従って、今後行われる in vivo の感染実験において少なくとも感染が成立することは確実であると考えられる。また、HIV 感染実験において、CD4 陽性 T 細胞が激減したことは、この NOG マウスの実験系がエイズ発症モデルとして応用可能であることを示唆している。

### 5. 臍帯血 DLI の安全管理に関する研究

他種類のウイルスを同時に迅速・簡便・安価に検出できる検査法が開発されたことは、臍帯血 DLI に用いる細胞製品の安全管理において大きな進展である。今後、実際の活性化臍帯血 T 細胞に既知量のウイルスを混入させ、検出感度を調べるスパイク試験を行い実用化を検討する。

また、ウイルス混入以外の危険性に関しては、細菌の混入、残存サイトカインによる副反応、細胞のとり違いなどを防止するための方策として、エンドトキシン試験、無菌試験、残存サイトカイン試験、個人識別試験などの検討を行い、基礎データを得ている。

### 6. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究

移植後のバッグに残存する約 1ml の臍帯血から臍帯血 DLI を行うに十分量の T 細胞が得られることが明らかになった。実際に投与を行った患者は 3 名であったが、いずれも臍帯血 DLI によると考えられる (あるいは疑いのある) 有害事象は発症しなかった。また 3 例のうち 1 例では混合キメラの解消が、1 例では短期間ではあったがリンパ球

数の増加が認められ、この方法が有効であることが示唆された。

今後臨床研究を開始することにより、さらに多数例の症例を検討し、有害事象及び効果について明らかになることが期待される。

## E. 結論

臍帯血 DLI 実用化のための基礎研究および臨床パイロット研究を行い以下の結果を得た。

1. 臍帯血中に含まれる B 前駆細胞の定量法を確立した。
2. ヒト白血病モデルマウスおよびヒトウイルス感染モデルマウスを作製した。これらは、臍帯血 DLI の有効性および安全性評価の場としての応用が期待される。
3. 臍帯血 DLI の安全管理法の一つとして、多種ウイルス同時検査系が開発された。
4. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究が行われ、その有効性及び安全性を示唆する結果が得られた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Dewan MZ, Uchihara JN, Terashima K, Honda M, Sata T, Ito M, Fujii N, Uozumi K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kubuki Y, Okayama A, Toi M, Mori N, Yamamoto N. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood*. 2006 Jan 15;107(2):716-24.

(2) Dewan MZ, Watanabe M, Ahmed S, Terashima K, Horiuchi S, Sata T, Honda M, Ito M, Watanabe T, Horie R, Yamamoto N. Hodgkin's lymphoma cells are efficiently engrafted and tumor marker CD30 is expressed with constitutive nuclear factor-kappaB activity in unconditioned NOD/SCID /gammac(null) mice. *Cancer Sci*. 2005;96(8):466-73.

(3) 伊藤 仁也 移植後免疫療法の多様化—活性化リンパ球輸注療法— 今日の移植 17(1) 2004, p89-98

福原康之, 岡田就将, 崎山美知代, 塩田曜子, 清谷知賀子, 小崎里華, 高橋孝雄, 熊谷昌明, 奥山虎之: 臍帯血移植後完全生着し, 発達遅滞の改善を認めた Hurler 病の 2 歳男児例. *日本小児科学会雑誌* 109:168, 2005

(4) Tsuji Y, Ito S, Isoda T, Kajiwara M.



Nagasawa M. Morio T. Mizutani S. Successful nonmyeloablative cord blood transplantation for an infant with malignant infantile osteopetrosis. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 2005; 27: 495-498.

(5) Okano M. Kawa K. Kimura H. Yachie A. Wakiguchi H. Maeda A. Imai S. Ohga S. Kanegane H. Tsuchiya S. Morio T. Mori M. Yokota S. Imashuku S. Proposed Guidelines for Diagnosing Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *Am. J. Hematol.* 2005; 80: 64-69.

(6) Tang W-R, Shioya N, Eguchi T, Ebata T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Takagaki Y, Enosawa S, Itagaki M, Taguchi T, Kiyokawa N, Amemiya H, Fujimoto J. Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lympho-cytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor  $\delta$  -chains. *Vet Immunol Immunopathol* 103:113-127, 2005.

(7) 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. *Leuk Res* 29:573-581, 2005.

加藤麻衣子、麦島秀雄：ヒト臍帯血中のB細胞系列へ分化する前駆細胞の定量的検出法の確立 日大医学雑誌 64(5):253-258 2005

(8) Imadome, K., Shimizu, N., Arai, A., Miura, O., Watanabe, K., 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.* 192: 1340-1348, 2005.

(9) 藤原成悦. EBウイルス感染症をめぐる新しい状況と研究の進展. *日本小児科学会雑誌*, 109(12): 1417-1424, 2005.

## 2. 学会発表

(1) 加藤麻衣子、麦島 秀雄、桂 義元、河本宏：ヒト臍帯血を用いたB前駆細胞およびT前駆細胞の定量的検出法の確立, 東京, 第28回日本造血細胞移植学会, 2006.2.24

(2) 渡辺 哲、寺嶋 一夫、太田 信頼、矢島 美彩子、塩澤 容子、清水 則夫、本多 三男、山本 直樹、NOG マウスで確立された全身性 HIV-1 感染系第 53 回日本ウイルス学

会学術集会

2005 年 11 月 22 日横浜

(3) 渡辺 哲、寺嶋 一夫、太田 信頼、堀端 重男、清水 則夫、本多 三男、山本 直樹、NOG マウスを利用した HIV-1 慢性感染実験系の確立 第 19 回日本エイズ学会学術集会

2005 年 12 月 3 日熊本

(4) 免疫不全マウスを用いた活性化 CD4 輸注療法の有効性、安全性の評価 鹿村 真之、伊藤 仁也、清水 則夫 第 28 回日本造血細胞移植学会総会 2006..2 東京

(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-治療の背景と臨床試験経過報告-」平成 17 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、末梢血等を利用した効率的な造血細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立並びにドナー及びレシピエントの安全確保と QOL 向上に関する研究」班 第 1 回班会議 2005 年 7 月 01 日、02 日 (名古屋)

(6) 富澤大輔、青木由貴、磯田健志、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀 原発性免疫不全症に対する Reduced-intensity stem cell transplantation. 第 47 回小児血液学会、宇都宮、2005 年 11 月 26 日

(7) 竹野内寿美、清河信敬、塩沢裕介、北村紀子、田口智子、大喜多肇、藤本純一郎. In vitro での造血細胞の分化・増殖における接着分子の効果に関する検討. 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 9 月 17-19 日, 2005.

(8) 塩沢裕介、清河信敬、竹野内寿美、北村紀子、田口智子、斎藤正博、大喜多肇、藤本純一郎. ヒト正常骨芽細胞の造血支持能に関する解析. 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 9 月 17-19 日, 2005.

(9) 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、梶原道子: 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 53 回日本輸血学会総会 (2005/5/26 浦安)

(10) 安富英理子、清水則夫、渡邊 健、水上美樹、伊藤仁也、山本興太郎: Ex vivo 増幅臍帯血 CD34 陽性細胞に対するウイルススパイク試験法の開発 第 5 回日本再生医療学会総会 (2006/3/8 岡山)

(11) 今留謙一、清水則夫、藤原成悦. 慢性活動性 EB ウイルス感染症のウイルス感染細胞における

CD40 シグナルの役割. 第2回 EB ウイルス研究会シンポジウム. 2005年7月8日、大阪.

(12) 中村浩幸、今留謙一、矢島美彩子、藤原成悦. EBV 蛋白質 LMP1 のインターフェロン応答に対する作用. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 横浜、2005.11月.

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。



---

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号  
共同ビル（小伝馬町駅前）4F  
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社