

病院血液内科、聖隷浜松病院血液内科、名古屋第一赤十字病院小児医療センター血液腫瘍科、血液内科、名古屋第二赤十字病院血液内科、国立病院機構名古屋医療センター血液内科、小児科、名古屋大学医学部附属病院第1内科、小児科、愛知県厚生農業協同組合連合会 昭和病院内科、名鉄病院血液内科、藤田保健衛生大学病院血液・化学療法科、名古屋市立大学病院小児科、血液化学療法部、愛知県がんセンター病院血液・細胞療法部、名古屋掖済会病院内科、豊橋市民病院小児科、山田赤十字病院内科、滋賀医科大学附属病院血液内科、京都第一赤十字病院血液内科、京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科、京都府立医科大学附属病院第2内科、血液内科（臨床分子病態学）、大阪府成人病センター血液・化学療法科、大阪大学医学部附属病院小児科、血液・腫瘍内科、第3内科、第2内科、大阪府母子保健総合医療センター小児内科、関西医科大学附属病院輸血部、小児科、大阪市立総合医療センター小児内科、総合内科、近畿大学医学部附属病院血液・腎臓・膠原病内科、輸血部、近畿大学医学部堺病院内科、松下記念病院小児科、内科、大阪市立大学医学部附属病院血液内科、りんくう総合医療センター市立泉佐野病院内科、大阪医科大学附属病院小児科、大阪赤十字病院血液内科、兵庫医科大学病院血液・腫瘍科、輸血部、兵庫県立成人病センター血液内科、神戸大学医学部附属病院小児科、血液・腫瘍内科、神戸市立中央市民病院免疫血液内科、財団法人先端医療振興財団 先端医療センター内科、社会保険神戸中央病院内科、天理よろづ相談所病院血液内科、奈良県立医科大学附属病院輸血部、和歌山県立医科大学附属病院輸血・血液疾患治療部、小児科、日本赤十字社和歌山医療センター第2内科、鳥取大学医学部附属病院第2内科、輸血部、鳥取県立中央病院内科、血液免疫科、岡山大学医学部・歯学部附属病院小児科、輸血部、倉敷中央病院血液内科・血液治療センター、岡山市立市民病院内科、国立病院機構 岡山医療センター内科、広島赤十字・原爆病院内科／輸血部、小児科、島根大学医学部附属病院小児科、広島大学病院血液内科、国立病院機構 大竹病院内科、山口大学医学部附属病院輸血部、徳島大学医学部附属病院小児科、血液内科、香川大学医学部附属病院第1内科、愛媛県立中央病院血液内科、高知大学医学部附属病院第3内科、九州大学医学部附属病院小児科、遺伝子細胞療法部（旧・輸血部）、第3内科、国立病院機構九州がんセンター小児科、血液内科、聖マリア病院血液内科、浜の町病院血液内科、産業医科大学病院臨床検査・輸血部、輸血療法科、社会保険小倉記念病院内科、久留米大学病院第2内科、原三信病院血液内科、佐世保市立総合病院内科、佐賀県立病院好生館輸血室、佐賀大学医学部附属病院血液内科、国立病院機構熊本医療センター内科、大分大学医学部附属病院輸血部、第2内科、大分県立病院血液内科、国立病院機構 別府医療センター内科（血液内科）、熊本大学医学部附属病院輸血部、小児科、県立宮崎病院内科（血液）、慈愛会今村病院分院血液内科、鹿児島大学病院小児科、

血液・膠原病内科、琉球大学医学部附属病院第2内科、

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業)

『輸血用血液及び細胞療法の安全性に関する研究』

分担研究報告書

研究課題： 細胞治療・再生医療の安全性に関する調査研究とガイドライン作成

塩原信太郎 金沢大学医学部附属病院輸血部助教授

(研究要旨) 輸血副作用には、ドナーの同種抗原による同種免疫副作用が存在する。同種抗原は大別して、HLA 抗原とそれ以外のマイナー抗原に分けられるが、HLA 適合の移植例の GVHD 頻度を用いた研究では HLA よりもマイナー抗原の重要性が指摘されている。このマイナー抗原の威力を、HLA 適合移植例を対象に調査研究を行った。

#### A. 研究目的と方法

今回はより少ないマイナー抗原で相応しいドナー選択が可能かどうか、GVL 効果が高い 4 種類の同種多型分子を用いてその有効性を検討した。対象は 1985 年から 2003 年の間に金沢大学骨髄移植班と協力 2 施設で、造血器腫瘍に対し HLA 適合ドナーから移植を受けた合計 108 例(男性：64 例、女性：44 例)で、全例が骨髄破壊的な前処置を受けた後、十分な免疫抑制を受けていた。移植病期はスタンダードリスク群 67 例とそれ以外の病期で移植を行ったハイリスク群 41 例である。最低 2 年以上を観察し再発の有無を検討した。検査方法は患者とドナーの DNA を用いて HA-1、CD31 codon 125、CD31 codon 563、CD62L4 種類のアレルを決定し、不適合例は GVH 方向に不一致があり、HLA 拘束性を示す例を不適合例と診断した。統計解析は生存曲線を Kaplan-Meier 法により求め、Logrank 検定によりその有意差を検討した。

#### C. 研究成果

図 1 に再発率と GVHD の頻度を示す。全症例 (n=108) とスタンダードリスク群 (n=67) の再発率を、4 種類の同種多型分子の不適合例と適合例とで比較すると、4 種類の中で少なくとも一つ以上の多型分子の不適合がある 33 例の再発率は 15.2%で、不適合のない 75 例の再発率 40.0%に比べて有意に低かった (P=0.011)。しかし、急性 GVHD (≥Ⅱ) 発症率については、33 例の発症率は 27.3%、不適合のない 75 例が 33.3%と差を認めなかった。同様に、慢性 GVHD 発症率について、不適合例が 56.3%、適合例が 51.4%と差を認めなかった。再発率低下を誘導する因子として、同種多型分子の不適合、慢性 GVHD の発症、PBSCT の選択、急性 GVHD の発症、非血縁者ドナーの選択の順でいずれも再発率低下を認めたが、多型分子の不適合のみが有意に再発予防効果を認める因子であった (P=0.011)。再発率は CD62L、CD31 codon 563、HA-1、CD31 codon 125 の順に 5.9%、11.8%、16.7%、23.1%であり、適合例の再発率はそれぞれ 36.2%、35.1%、46.2%、29.3%、適合例と比べて有

意差が認められたのはCD62Lだけであった。図2に同種多型分子の不適合が生存率に与える影響を示す。不適合例の10年無再発生存率は83.7%であり、適合例の53.5%に比べて有意に高かった ( $P=0.003$ )。

#### D. 考察と今後の展開

今回の研究結果からCD62Lをはじめとする4種類の同種多型分子はimmunodominantなmHagであり、HLA適合の造血幹細胞移植後の長期生存に有利にはたらくことが明らかになった。移植前にHLA抗原に加えてこの4種類を検討すればGVHD頻度が低く、高いGVL効果が期待できるドナー選択に有用であろう。再発率は移植時の病期、疾患、移植方法、GVHDの有無などによって影響を受けるため、各々の因子のOdds比を求めて原因

を検討したところ、これらのmHagの不適合だけが再発率低下の有意な因子として検出できた。複数あるマイナー抗原の中で4種類の多型分子だけで再発予防効果が現れた理由としては、わが国では関与するmHagの数が限られていることと検討した4種類はその中でも抗原能力の高い、造血系細胞に限局して発現する同種多型分子であることが考えられる。CD31 codon 563やHA-1も強いGVL効果を示したが、特にCD62Lの不適合は最も強いGVL効果を示した。今後、これらの抗原は再発例に対する細胞療法 of 標的抗原になることが期待される。また、本研究から得られた結果をより確かなものとするために昨年4月よりprospectiveな比較検討を行っている。

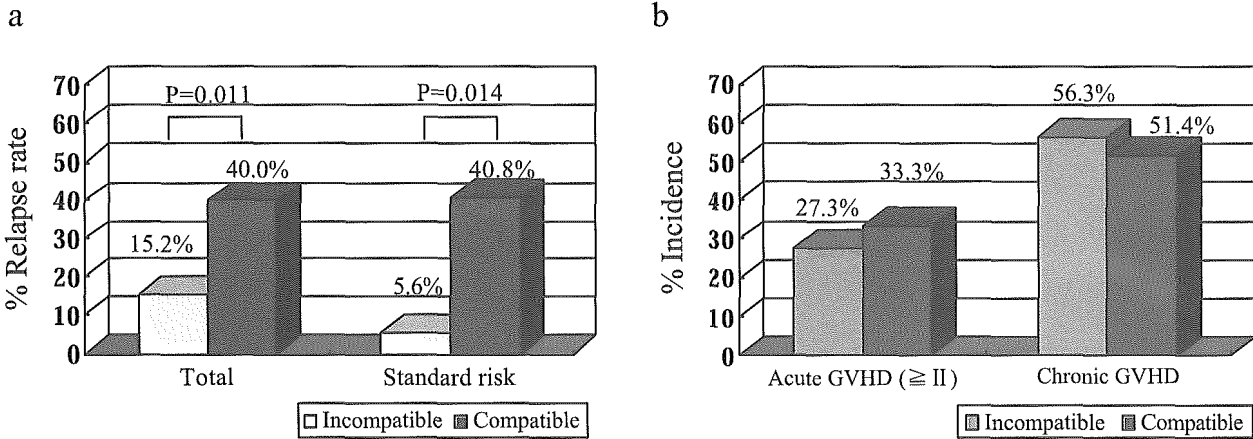


Figure 1. Effect of mHags (a) GVL effect of mHags was evaluated by relapse rate. The vertical axis indicates relapse rate. Total includes 108 patients and standard risk group includes 67 patients. (b) No effect of mHags on GVHD. The vertical axis indicates incidence of acute and chronic GVHD. Acute GVHD ( $\geq$  II) was analyzed in 108 patients and chronic GVHD was analyzed in

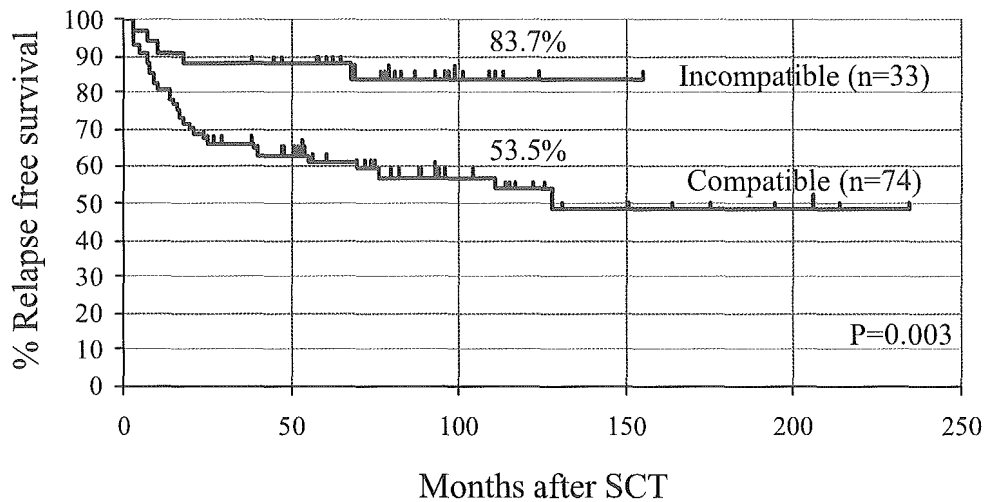
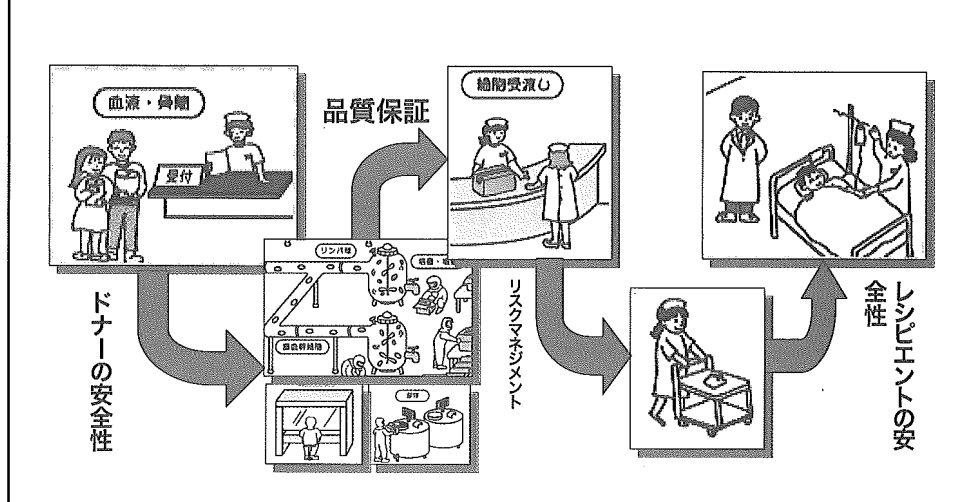


Figure 2. 10 year relapse free survival Survival rates and curves were estimated by Kaplan-Meier method and Logrank test. Total number of patients was 107 (incompatible: n=33, compatible: n=74). End point is relapse or death.

## 輸血、細胞治療の流れ —ドナーから患者への橋渡し—



## アフェレーシスドナーの安全管理

2年間の調査結果のまとめ

- 1、自称健康人の中には、病気の人が2%紛れ込んでいる。
- 2、アフェレーシスによる負担に対する許容量はドナーと患者との関係によって異なる。血縁ドナーの場合は心理的のも支援が必要。
- 3、アフェレーシスドナーはACD負荷により血液が希釈される。
- 4、リスクがあってもドナーを守る仕組みがあれば、国民は新しい医療を受容する。献血に対する日赤、骨髄提供に対する骨髄バンク、細胞療法に対しては？輸血部など！

次年度の目標

- 5、ドナー外来でのドナーの評価
- 6、アフェレーシスナーズの認定
- 7、合併症の持続的定点観察
- 8、アフェレーシスドナーに対する倫理的課題

## 品質管理

2年間の調査結果のまとめ

- 1、GMPの理解と普及
- 2、カテゴリー別の規制
- 3、再生医療のアンケート調査 (初回)

次年度の目標

- 4、カテゴリー1の細胞処理のガイドラインの作成
- 5、定期的再生医療のアンケート調査研究
- 6、品質保証の新しい方法の研究

## レシーピエントの安全性

輸血副作用を惹起する同種抗原の有効性

2年間のまとめ

- 1、抗HLA抗体の輸血副作用に及ぼす影響
- 2、HLA一致移植例におけるマイナー抗原の威力
- 3、臍帯血移植例のHLA不一致とGVHD

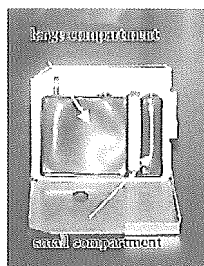
次年度の目標

- 4、マイナー抗原の前方視的調査研究
- 5、臍帯血移植における赤血球輸血の仕方
- 6、臍帯血移植におけるCMV陰性血の有効性の調査研究

# 造血幹細胞の新しい測定法の開発

国立感染研  
浜口 功

幹細胞数の測定は細胞治療の有効性や安全性における品質評価法として重要であり、より正確な測定法開発が望まれる



ヒト臍帯血パック

1x10<sup>6</sup> 細胞(約0.1ml)を使用



約0.1ml

定量PCRを使って造血幹細胞分子HE4の発現量の解析

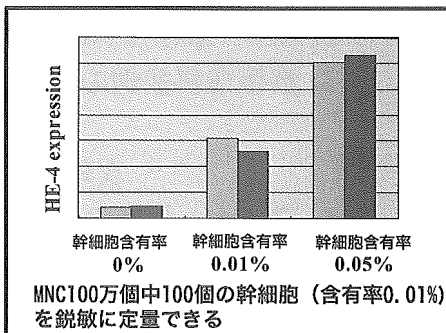
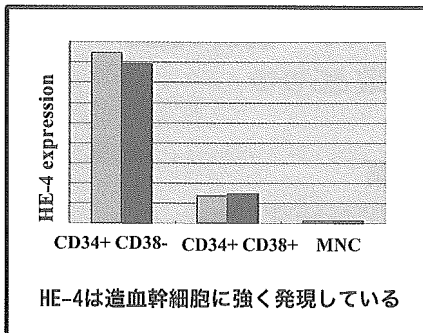
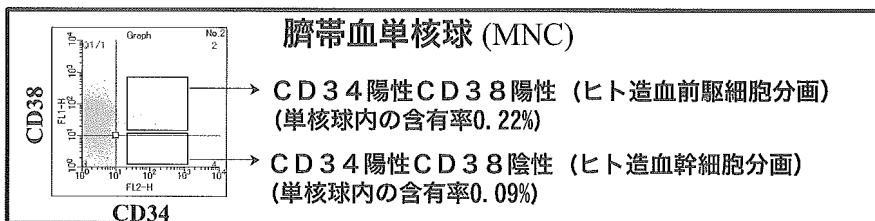


造血幹細胞数の定量



- 臍帯血、骨髄細胞の品質管理
- 細胞治療への貢献

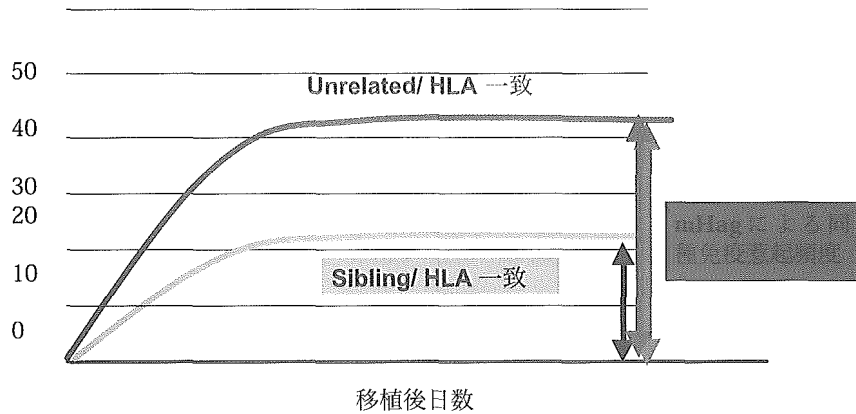
## 新規造血幹細胞分子HE-4の発現の特異性



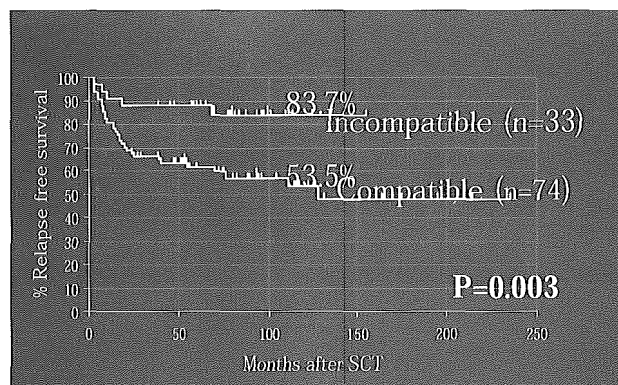
CD34よりもさらに特異性高く幹細胞の含有数を定量することができる



## HLA適合例におけるマイナー抗原の威力 —同種免疫反応の発症頻度—



## マイナー抗原不適合ドナーの選択 は長期予後を改善する



ドナーリンパ球輸注療法の標的抗原？  
前方視的共同研究中

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合事業  
輸血用血液及び細胞療法の安全性に関する研究  
分担研究報告書

研究課題 細胞療法に用いる細胞の品質管理に関する研究

分担研究者 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

協力研究者 米村雄一 熊本大学 輸血部 講師

久米晃啓 自治医科大学 遺伝子治療研究部 助教授

小林正夫 広島大学 小児科 教授

笠井道之 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

研究要旨

移植をはじめとした細胞治療の成績向上を図るには、造血幹細胞数の正確な把握と、これに基づく緻密な治療戦略が要求される。造血幹細胞数を正確に把握するために、造血幹細胞に特異的に発現する分子 HE4 を同定し、遺伝子発現をもとに定量化を試みた。通常の臍帯血バック中に CD34+CD38- の造血幹細胞分画がおおよそ 0.1% 含まれているが、HE4 の発現はそれよりもさらに 10 倍低い 0.01% の幹細胞含有率であっても鋭敏に定量できることが判明した。本研究課題で開発した HE4 発現量を指標にした新しい評価法により、造血幹細胞の品質の管理がさらに高いレベルで実現できるものと考えられる。

A. 研究目的

細胞治療に用いられる臍帯血には、造血幹細胞が少数ながら一定数含まれている。移植をはじめとした細胞治療の成績向上を図るには、造血幹細胞数の正確な把握と、これに基づく緻密な治療戦略が要求される。

現在 CD34 陽性細胞数を指標に造血幹細胞数を評価しているが、この分画には幹細胞以外の細胞が含まれており、幹細胞を正確にモニターしているとは言えない。

また、現在の検査法よりも、少量でしかも正確な方法の開発により、造血幹細胞数を簡

便にモニターすることが可能になると期待される。新しい造血幹細胞評価法を確立し、細胞の品質管理への実用化をはかることが、本研究課題の目的である。

B. 研究方法

造血幹細胞数を正確に把握するために、造血幹細胞に特異的に発現する分子を同定し、遺伝子発現をもとに定量化を試みた。

a. 造血幹細胞特異分子の同定

幹細胞特異的に発現する分子を同定するために、造血幹細胞、生殖幹細胞の両者に

特異的に発現する遺伝子について解析を行なった。

#### b. 造血幹細胞特異遺伝子の発現解析

造血幹細胞分画として CD34+CD38-細胞、造血前駆細胞分画として CD34+CD38+細胞を、さらに分化した血液細胞分画を多く含む単核球をそれぞれ分取し、RNA を抽出し、cDNA を作製した。それぞれの分画での Tal-1, GATA2, GATA1, IL7R, Tie2 遺伝子の発現様式を解析したところ、Tal-1, GATA2, Tie2 は造血幹細胞分画に、GATA1 および IL7R は単核球分画に強く発現しており、それぞれの cDNA が造血幹細胞、前駆細胞、分化の進んだ細胞を識別するのに妥当であることを予め確認した。同定した造血幹細胞特異分子の発現量をこれらの cDNA を用い、リアルタイム PCR で定量化した。

c. 臍帯血中に含まれる造血幹細胞の定量  
臍帯血より CD34 陽性細胞を除いた単核球分画にセルソーターを用いて CD34+CD38-の造血幹細胞を一定数加えた。これらの細胞から RNA を抽出し、造血幹細胞の含有率が定量化された cDNA サンプルを作製した。造血幹細胞特異遺伝子を指標にした、造血幹細胞の定量が正確になされるかどうかを、造血幹細胞含有率とリアルタイム PCR による測定値とを対比させることにより検討した。

### C. 研究結果

#### a. 造血幹細胞特異分子 HE4 の同定

篠原ら (Kanatsu-Shinohara et. al. Cell 2004 119: 1001-1012) により樹立されたマウス生

殖幹細胞に特異的に発現する分子をスクリーニングしたところ、約50個の遺伝子を同定した。このうち造血幹細胞にも発現している HE4 を新たに同定した。

ヒト HE4 は WAP-type four disulfide core (WFDC)ドメインをもつ遺伝子でこれまでに、副精巢、子宮内膜、卵管および肺の上皮細胞に強く発現していることが報告されている。これらの組織において、プロテアーゼインヒビターとしての機能を有すると想定されるが、詳しい機能解析はなされていない。

#### b. 造血幹細胞特異遺伝子の発現解析

ヒト HE4 が造血幹細胞に特異的に発現していることを明らかにするために、CD34+CD38- (造血幹細胞分画)、CD34+CD38+ (造血前駆細胞分画)、単核球 (分化した血液細胞分画) からそれぞれ RNA を抽出し、cDNA を作製してリアルタイム PCR で発現解析を行なったところ、造血幹細胞分画において、特異的に高発現していることが明らかとなった。一方、造血前駆細胞および単核球では HE4 の発現量が造血幹細胞のそれぞれ8の1および 80 分の1程度であった。

#### c. HE4 を用いた臍帯血中の造血幹細胞の定量

セルソーターにより 100 万個の単核球に造血幹細胞を 0、10、100、500 個加えた細胞集団 (それぞれ 0、0.01、0.1、0.5%含有率) を準備し、RNA 抽出後 cDNA を作製し、HE4 の発現量をリアルタイム PCR を用いて解析した。通常の臍帯血バック中に CD34+CD38-細胞分画が 0.1%含まれてい

ると想定されるが、HE4 の発現量はそれよりもさらに 10 倍低い 0.01%の幹細胞含有率のサンプルを鋭敏に定量できることが判明した。

#### D. 考察

##### HE4 が新しい幹細胞マーカーである意義

多くの体性幹細胞には未分化性を維持した自己を複製する共通の機能が存在し、細胞系列をこえて幹細胞の共通の機能分子が存在することは十分に予想できる。本研究課題で同定した HE4 は生殖幹細胞と造血幹細胞の両者に特異的に高発現する分子である。HE4 の機能に関しては現在のところほとんど未解明であるが、発現の特異性から幹細胞の未分化性に密接に関連した分子と考えられる。本研究課題での成果をもとにさらに詳しい解析がなされるものとする。

##### リアルタイム PCR を用いた定量法の意義

現在リアルタイム PCR は各研究機関、研究室において広く用いられており、その利便性からさらに普及するものと考えられる。本研究課題における検討では 100 万個の白血球から抽出される RNA で十分解析可能で、これは臍帯血 100–200  $\mu$ l に相当する。造血幹細胞に特異的に発現する HE4 は分化が進むとともに激減しており、HE4 の発現量をもとに造血幹細胞数を定量することは非常に信頼性が高い方法といえる。

##### 今後の発展性、見通し

臍帯血を用いた細胞治療の成功の秘訣は造血幹細胞数の十分な含有であることは、これまでの臍帯血移植の成績と照らしあわ

せても明らかである。現在の CD34 陽性細胞の確認は最低限幹細胞の含有の目安にはなるものの、今後さらに幹細胞を応用した高度な治療を行なう際には、さらに厳格に幹細胞の評価を行なわねばならない。本研究課題で開発した HE4 発現量を指標にした新しい評価法が臍帯血保存前後に簡便に行なわれることにより、造血幹細胞の品質の管理がさらに高いレベルで実現できるものとする。

#### E. 結論

臍帯血中に含まれる造血幹細胞数を HE4 遺伝子の発現量を指標に信頼性高く定量する方法を開発した。このことにより、造血幹細胞の品質管理がさらに向上することが期待できる。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T: Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival.

Blood, 107, 1207-1213, 2006

2. Azuma M, Hirao A, Takubo K, Hamaguchi I, Kitamura T, Suda T: A

quantitative matrigel assay for assessing repopulating capacity of prostate stem cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 338, 1164-1170, 2005

3. Flygare J, Kiefer T, Miyake K, Utsugisawa T, Hamaguchi I, Da Costa L, Richter J, Davey EJ, Matsson H, Dahl N, Wiznerowicz M, Torono D, Karlsson S: Deficiency of Ribosomal Protein S19 in CD34+ cells generated by siRNA blocks erythroid development and mimics defects seen in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 105: 4627-4634, 2005

4. Yamada Y, Nishimoto E, Mitsuya H, Yonemura Y: In vitro transdifferentiation of adult bone marrow Sca-1(+)cKit(-) cells into hepatic-like cells without fusion. *Exp Hematol*: 34, 97-106, 2006

5. 浜口功、山口一成、ウイルス抗体価の診断基準と問題点—HIV  
*Medical Technology* 33: 581-587, 2005

6. 水上拓郎、浜口功、山口一成、血液製剤における病原体検査の現状  
*感染症*: 35, 155-160, 2005

## 2) 学会発表

1. 水上拓郎、浜口功、内藤誠之郎、益見厚子、倉光球、野瀬俊明、山口一成: ニッチにおける生殖幹細胞と造血幹細胞の共通の

幹細胞システムの解明、第67回日本血液学会総会(横浜)平成17年9月

2. 倉光球、浜口功、水上拓郎、益見厚子、内藤誠之郎、山口一成: ダイヤモンド・ブラックファン貧血(DBA)原因遺伝子 RPS19 の細胞増殖に与える影響、第67回日本血液学会総会(横浜)平成17年9月

3. 益見厚子、浜口功、水上拓郎、倉光球、内藤誠之郎、山口一成: インターフェロン制御転写因子 IRF-2 の血液細胞分化における影響、第67回日本血液学会総会(横浜)平成17年9月