

4) t 検定による統計学的解析 (移植後 6 週での早期生着および 16 週での晩期生着の評価)

4. 倫理面の配慮

本研究で用いた臍帯血はインフォームドコンセントのもと臍帯血提供機関(兵庫さい帯血バンク)に提供され、日本さい帯血バンクネットワーク、及び先端医療センター内の倫理委員会にて承認されたものを用いた。

C. 研究結果

1. マウス骨髄、末梢血におけるヒト血球キメリズムの推移

移植後マウス骨髄中ヒトキメリズムは各群 16 週まで増加傾向にあり、生着が確認できた。Nakahata 法では移植後早期から高値を示し、移植後 6 週には他の群との間に有意差を認めた(Nakahata:57.6 ± 21.8, Fresh: 24.5 ± 19.1, McNiece: 31.3 ± 21.1, Kurtzberg: 10.1 ± 14.7) (p<0.05) (Fig.1)。

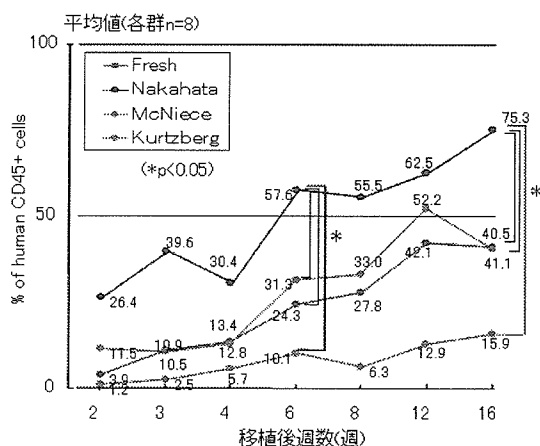


Fig. 1 マウス骨髄中のヒト CD45+細胞 (%)の推移

また McNiece 法と Fresh は、ともに 12 週以降 40~50%程度でほぼ一定となったが、Nakahata 法では 16 週まで上昇傾向にあった(16 週 Nakahata:75.2 ± 12.6, Fresh: 41.1 ± 25.9, McNiece: 40.5 ± 28.1, Kurtzberg: 15.9 ± 17.8) (p<0.05)。一方 Kurtzberg 法では他の群と比較して低いキメリズムで推移した。

末梢血でのヒトキメリズムについては、Kurtzberg 法では移植後 16 週までヒト血球の出現をほとんど認めなかった。一方他の群では移植後 3 週目以降徐々に上昇し、8 週から 16 週にかけてほぼ一定となる傾向にあった。各群の比較では、骨髄と同様に Nakahata 法が高値を示し、移植後 6 週以降に他の群との間に有意差を認めた(6 週 Nakahata: 4.80 ± 2.12, Fresh: 2.29 ± 1.05, McNiece: 2.74 ± 0.80, Kurtzberg:0.16 ± 0.05) (p<0.05)(Fig. 2)。

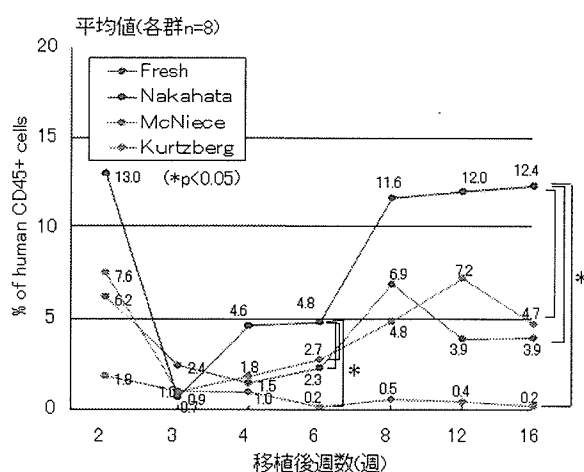


Fig. 2 マウス末梢血中のヒト CD45+細胞 (%)の推移

2. 生着ヒト血球における CD34 の発現の推移とコロニー形成能の比較

マウス骨髄におけるヒト CD34 陽性細胞の割合については、Nakahata 法を除く 3 群では 6~12 週まで上昇し、以後低下する傾向を認めた。一方 Nakahata 法では移植後 12 週以降も 6~7% を維持する傾向にあり、移植後 16 週において McNiece 法、Kurtzberg 法との間に有意差を認めた (Nakahata: 6.40 ± 3.90, McNiece: 2.44 ± 2.56, Kurtzberg: 2.15 ± 1.25) (p<0.05) (Fig. 3)。また Fresh と McNiece 法は同様の発現率で推移したが、Kurtzberg 法では他の群に先行し、6 週にピークとなり、以降速やかな減少を認めた。

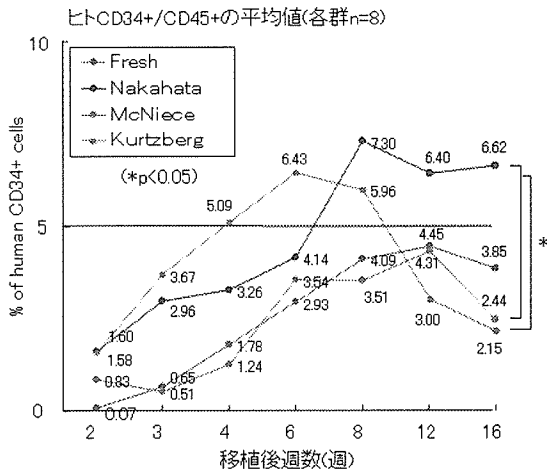


Fig. 3 マウス骨髄中のヒト CD34+細胞 (%)の推移

移植後 12 週におけるマウス骨髄のコロニー形成能の比較では、*in vitro* での解析結果と同様に Nakahata 法が Fresh と同等に優れ、McNiece 法、Kurtzberg 法と比較した場合、有意差は認めなかったものの CFU-Mix、BFU-E 形成能において優れている傾向にあった(Fig. 4)。

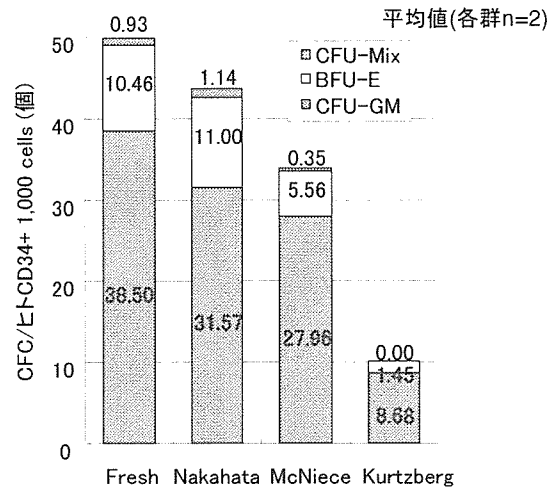


Fig. 4 移植後 12 週のマウス骨髄ヒト CD34+細胞のコロニー形成能

3. 生着ヒト血球における系統特異的マーカーの発現の推移

移植後 4 週から 16 週までの生着ヒト血球における Lineage マーカーの発現の推移を比較した結果、

赤芽球(GPA+)は、Nakahata 法で 2%前後とわずかながらも骨髄中に出現を認めましたが、他の群ではほとんど出現を認めなかった(Fig. 5)。

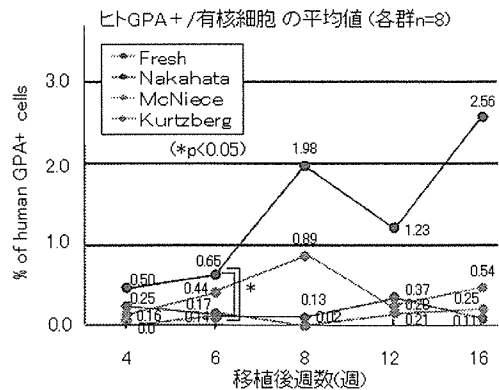


Fig. 5 マウス骨髄中のヒト GPA+細胞 (%)の推移

成熟顆粒球(CD66b+)は、いずれの群の末梢血においても移植後 12 週までは認められなかったが、Nakahata 法と McNiece

法で 12 週以降に出現を認め、16 週において Nakahata 法と他の群との間に有意差を認めた(16 週 Nakahata:0.16±0.10, Fresh: 0.01 ± 0.01, McNiece: 0.05 ± 0.06, Kurtzberg: 0.0±0.0) (p <0.05) (Fig.6)。

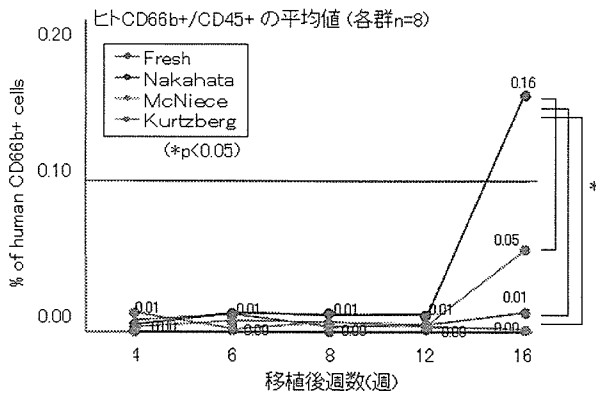


Fig. 6 マウス末梢血中のヒト CD66b+細胞 (%)の推移

血小板(CD41+)は、Kurtzberg 法を除く 3 群の末梢血において移植後 4 週以降に出現が認められ、Nakahata 法においてより早期から上昇する傾向にあった(Fig. 7)。

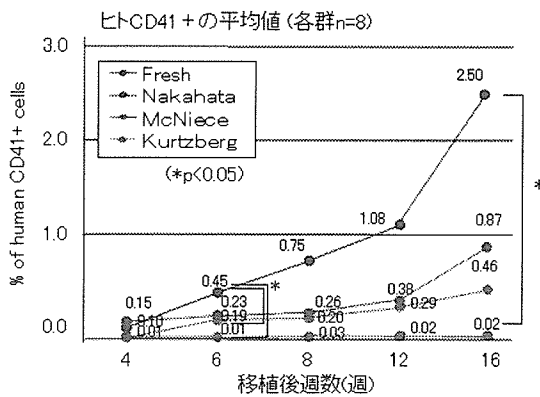


Fig. 7 マウス末梢血中のヒト CD41+細胞 (%)の推移

B 細胞系(CD19+)については、末梢血のヒト血球キメリズムと同様の推移を示し、6 週以降 Nakahata 法と他の群との間に有意差を認めた(6 週 Nakahata:4.06 ± 1.96,

Fresh: 1.82 ± 0.86, McNiece: 2.27 ± 0.71, Kurtzberg: 0.11 ± 0.04) (p <0.05) (Fig. 8)。

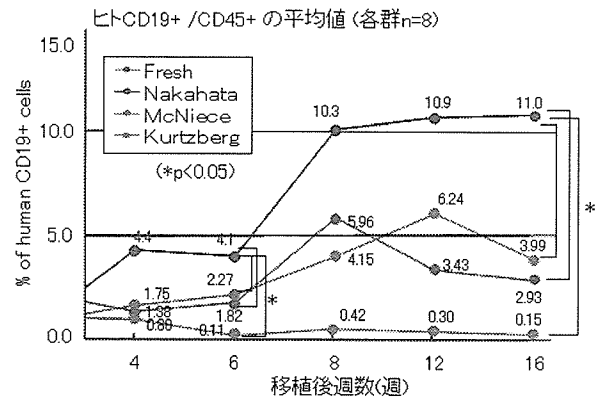


Fig. 8 マウス末梢血中のヒト CD19+細胞 (%)の推移

4. 移植後 20 週のマウス組織におけるヒト血球の分布と Lineage 解析

移植後 20 週のマウス体内におけるヒト CD45 陽性細胞の分布を調べた結果、Kurtzberg 法ではいずれの組織でもヒト血球の発現は認められなかったが、他の 3 群ではそれらが骨髄(BM)、脾臓に多く分布していること、その他肝臓、肺に分布していることが確認された(Fig. 9)。

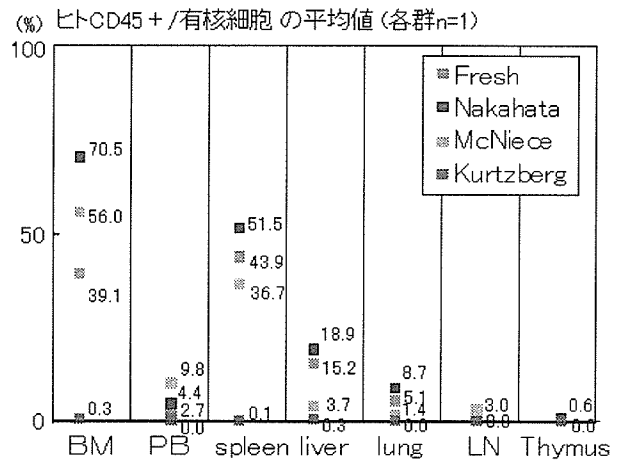


Fig. 9 移植後 20 週のマウス各組織におけるヒト血球の分布

一方リンパ節(LN)、胸腺における発現はいずれの群においてもほとんど認められなかった。各組織での発現率を比較した場合、いずれの組織においても Nakahata 法が高い傾向にあり、組織特異的な分布は認められなかった。

以上の結果より Nakahata 法により *ex vivo* 増幅した細胞を移植した群では、

1. 他の群と比し移植後早期からマウス骨髄および末梢血において、高いヒト血球キメリズムが得られた。
2. 移植後16週まで有意にCD34陽性細胞が維持されており、これらの細胞は他の群と比しより高いコロニー形成能を有していた。
3. 骨髄中の赤芽球系、末梢血中の成熟顆粒球、血小板、及びB細胞系いずれのLineageにおいても、他の群と比しより早期から出現する傾向にあった。
4. 他の群と同様に主に骨髄、脾臓への生着が認められたが、リンパ節、胸腺への生着は認められなかった。

これらのことから、Nakahata 法では McNiece、Kurtzberg らの増幅法と比較してより高い骨髄再構築能を有する細胞を増幅できると考えられた。

D. 考察及び今後の展望

現在、ヒト造血幹細胞が有する未分化能を評価出来る系として最も優れているのが、NOD/SCID マウスへの異種間移植系であり、移植細胞中の造血幹細胞数

(SRC (SCID repopulating cells))を測定すること、及びマウス体内においてT細胞等一部免疫系の細胞を除くすべての系統のヒト血球の生着を確認することが可能である。しかしながらこの系において、骨髄への生着までの期間、及びそのキメリズム(%)が造血の回復に及ぼす影響については明らかではなかった。

本研究により

1. 6週までの移植後早期では、いずれの群においても骨髄ではある程度のヒト血球の生着が得られているにもかかわらず、末梢への成熟血球の出現は認められなかった。また同種間移植における血球回復の動態とは異なり、骨髄において赤芽球系が骨髄球系に先行して回復する傾向が認められた。
2. 6~16週の移植後後期では、Nakahata 法により増幅した細胞を移植した群では、恐らく自己複製により、骨髄でのCD34陽性細胞がある一定の割合で維持され、骨髄でのヒト血球キメリズムも上昇を続けることが確認された。一方、他の群ではCD34陽性細胞が減少する傾向にあり、以後の造血を維持できない可能性が示唆された。いずれの群においても、この時期に末梢への成熟血球の出現が認められ、同種間移植における血球回復の経過とは異なることが示唆された。さらに骨髄でより多くのCD34陽性細胞が維持されているNakahata法において、早期からの成熟血球の回復を認めた。

これらの結果から、NOD/SCID マウス

への異種間移植系では、ヒト造血の回復を評価する際、少なくとも16週までの(骨髄における)ヒト血球キメリズムを観察する必要があると考えられた。また移植後の速やかなヒト血球の回復には、より早期から骨髄へ移植細胞が生着すること、さらには移植後 CD34 陽性細胞がある程度維持されることが重要であると考えられた。

本研究は治療用細胞製剤の効能に関する前臨床試験として位置づけられるものであり、Nakahata 法では *in vitro* において効率よく未分化な細胞を増幅でき、かつそれらが *in vivo* において高い造血回復能を有することから、Nakahata 法により *ex vivo* 増幅した細胞を臨床応用することにより、先行した臨床研究では得られなかった移植後の生着促進効果が期待できると推測された。

今後は同様に NOD/SCID マウスへの異種間移植系を用いて、安全性に関する評価、検討を引き続き行う予定である。

尚、本研究の成果は第29回日本造血細胞移植学会総会において発表した。

E. 健康危惧情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

丸山京子, 伊藤仁也, 田中宏和, 鹿村真之, 初山麻子, 高田のぞみ, 中畑龍俊
NOD/SCID マウスを用いた *ex vivo* 増幅臍帯血移植における生着促進効果の検討
第29回日本造血細胞移植学会総会
(2006.2.16-7, 福岡)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特願なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

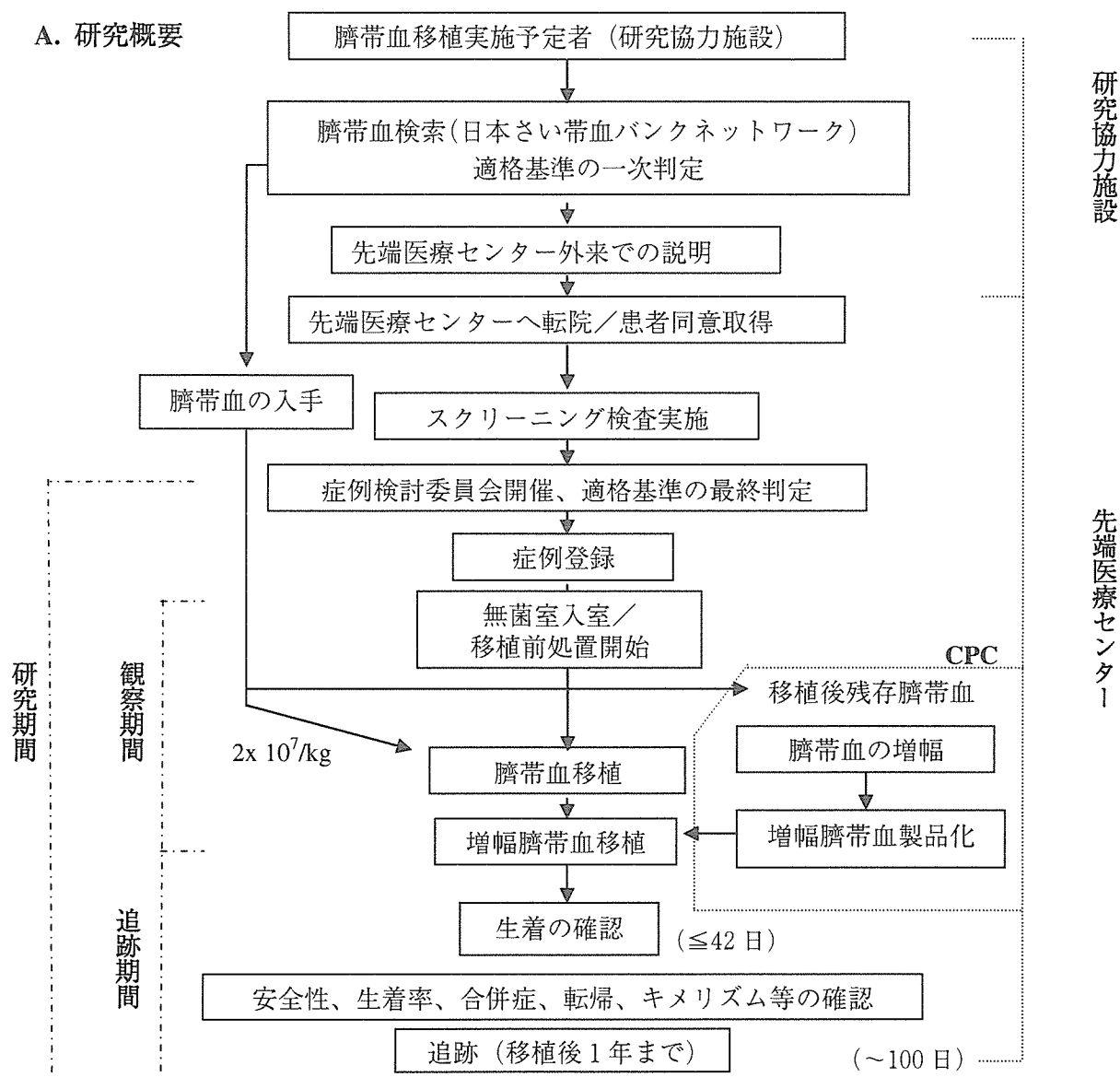
3. 臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

「急性白血病患者に対する同種臍帯血由来 *ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞移植に関する
臨床第 I 相/前期第 II 相試験（BRI-ML 04-01（Phase I-II）」

研究グループ：

主任研究者	：	先端医療センター 血液再生研究グループ	伊藤 仁也
副主任研究者	：	先端医療センター 血液再生研究グループ	田中 宏和
統計解析責任者	：	静岡県立大学薬学部医薬品情報解析学研究室	大門 貴志
研究事務局	：	先端医療センター 血液再生研究グループ内	
試験進捗	：	プロトコル完成 症例登録開始	
登録開始日	：	2006 年 4 月 1 日	登録終了日：2007 年 3 月 31 日（予定）
追跡終了日	：	2008 年 3 月 31 日（予定）	

A. 研究概要



B. 研究目的

本研究では、日本造血細胞移植学会の「造血幹細胞移植のガイドライン」に合致する患者で、骨髄移植および末梢血幹細胞移植において適切なドナーを得ることができない急性白血病を対象として、

臍帯血内の CD34 陽性細胞の一部を *ex vivo* 増幅して臍帯血移植を実施し、その安全性・効果を検討する。さらに、臍帯血内の CD34 陽性細胞および増幅培養した CD34 陽性細胞における輸注細胞数と生着率の相関を検討する。

C. 研究方法

a) 対象症例

選択規準

- 1) FAB 分類で診断された急性骨髄性白血病および急性リンパ性白血病である
- 2) 以下の病期および危険度分類に該当する患者(4.2. 病期・リスク分類における移植適応規準参照)
 - a) 急性骨髄性白血病
 - ・ Standard risk 群
 - ・ High risk 群の第 1 寛解期
 - ・ 全ての群における第 2 寛解期以降、非寛解期
 - b) 急性リンパ性白血病
 - ・ High risk 群の第 1 寛解期
 - ・ Standard risk 群及び High risk 群における第 2 寛解期以降、非寛解期
- 3) 同意取得時の年齢が 12 歳以上 50 歳以下である
- 4) Performance Status (P.S.)(ECOG：付表 1) が 0 または 1 である
- 5) 造血幹細胞が提供可能な HLA 一致、あるいは HLA 1 抗原不一致(血清レベル)の血縁者がいない*
- 6) 骨髄バンクにおいて造血幹細胞が提供可能な HLA 一致、あるいは HLA 1 抗原不一致(血清レベル)の非血縁ドナーがいない、または、迅速なコーディネートの成立が困難であると判断されている*
- 7) さい帯血バンクネットワークにおいて、HLA 一致、あるいは HLA1、2 抗原不一致(血清レベル)で、総細胞数として $3 \times 10^7/\text{kg}$ (患者体重)以上かつ CD34 陽性細胞数が 4.5×10^6 個(絶対数)以上の臍帯血が見出される患者*

- 8) 本試験への参加について本人または代諾者の同意が文書で得られている
*なお、不一致の対象となる HLA 抗原は HLA-A、B、DR 血清型とする。

b) エンドポイント

Primary endpoint：移植 100 日までの有害事象の発現数及び頻度、好中球生着日数
Secondary endpoint：血小板生着日数、赤血球生着日数、総細胞・CD34 陽性細胞増幅率、輸注総細胞数、培養移植細胞幹細胞マーカー、培養移植細胞コロニー形成細胞数、全生存期間、無再発生存期間、治療完遂の有無、移植関連合併症死の頻度、移植後 100 日時点での免疫学的回復能

c) 予定症例数、登録期間、追跡期間

予定症例数：10 例

登録期間：1 年 (2006 年 4 月 1 日～2007 年 3 月 31 日)

追跡期間：登録終了から 1 年

d) 中間解析

実施しない。

D. 登録状況

0 症例 (2007 年 3 月 31 日現在)

倫理委員会承認施設 1 施設

参加施設別登録症例数

先端医療センター 0 症例

E. 考察及び今後の方針

2006 年 4 月 1 日より臨床研究を開始すると同時に、患者リクルートに対する協力を呼びかけたが、適格基準に合致した

患者の登録はなく、2007年3月31日現在での登録数は0症例である。今後は適格基準における疾患に移植適応のある骨髓異形成症候群を加えること、年齢を55歳まで引き上げること、及び臍帯血の基準を $2.7 \times 10^7/\text{kg}$ 以上まで引き下げることなど適応を拡大することにより、目標を達したいと考えている。

また本臨床研究終了後、ex vivo 増幅臍帯血移植を新たな医療として発展させていくことを目指し、これまでに我々が開発した新規培養バッグ、無血清培地を用いた検討を開始、確認申請書類の作成を予定している。

F. 健康危険情報

特筆すべき事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

特筆すべき事項なし

H. 特許

特筆すべき事項なし

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事業

分担研究報告書

4. 臍帯血 DLI に向けた取り組みと基盤整備

4-1 IL-2 と抗 CD 3 抗体を用いた活性化培養法の臍帯血への応用についての検討

分担研究者：伊藤 仁也

(先端医療センター 血液再生研究グループ 主任研究員)

研究協力者：鹿村 真之

(先端医療センター 血液再生研究グループ 客員研究員)

研究要旨

本分担研究では、我々が開発した末梢血リンパ球を固相化抗 CD 3 抗体と IL-2 刺激により活性化、増幅させる培養法を応用し、臍帯血リンパ球の活性化培養法を確立することを目的としている。本年度は、培養の際の抗 CD 3 抗体の排除時期、及び IL-2 濃度に関して、臍帯血リンパ球の細胞増幅率、生存率、及び活性化マーカーの発現を指標に、至適排除時期、至適濃度について検討を行った。また培養した臍帯血リンパ球の表面抗原を解析することにより、その特性についての評価を行った。培養条件を種々設定し検討を行った結果、10% FCS 添加基礎培地に IL-2 を終濃度 175 IU / mL 添加した培養液で培養を行うこと、培養 4 日目に抗 CD 3 抗体刺激の排除することにより、最も効率よく臍帯血リンパ球を増幅できることが明らかとなった。また培養した臍帯血リンパ球は、活性化マーカーを十分に発現していること、T 細胞分画にはエフェクター細胞やメモリー細胞が誘導されていることから、本活性化培養により増幅した臍帯血リンパ球は、DLI に応用可能な性質を有している可能性が示唆された。

今後 *in vitro*, *in vivo* における詳細な機能解析、及び安全性の評価を行うと同時に、臨床応用に適した培養方法へと改良を進めていく予定である。

A. 研究目的

ドナーリンパ球輸注療法(DLI)は骨髄移植、あるいは末梢血幹細胞移植後の再発や感染症に効果が期待される治療法の一つである。一方臍帯血(CB)移植においては、移植後にドナーのリンパ球を採取することは不可能であり、また採取可能であったとしてもCB中に含まれるT細胞は、ほとんどがナイーブT細胞であり、IL-2レセプターの発現が低い、IFN- γ などのTh-1サイトカインの産生能が低いなどの特性が報告されていることから、輸注後十分な Graft versus leukemia (GVL) effect や速やかな抗ウイルス活性を惹起できない可能性がある。

本分担研究では、これまでに我々が開発した末梢血リンパ球を活性化、増幅させる培養法(ドナー末梢血中より単核球を分離し、固相化CD3抗体とIL-2刺激により選択的にTリンパ球を増幅、活性化する方法)を応用し、CBリンパ球の活性化培養法を確立することを目的としている。

CBリンパ球の活性化培養が可能となれば、増幅、活性化した細胞を凍結保管することにより移植後のDLIが可能となるばかりか、GVL効果や抗ウイルス活性の向上と、効果発現までの期間を短縮できることが予想される。

本年度は、CBリンパ球の培養において、より効率よく細胞を増幅しかつ活性化が維持できる培養法を開発することを目的として以下の検討を行った。

1. 抗CD3抗体刺激排除時期の検討
2. 培養液中IL-2濃度についての検討

B. 研究方法

1. 使用臍帯血

兵庫さい帯血バンクから供与頂いた実験用CBを使用した。Ficoll Paque (Amersham Biosciences)を用いて分離を行い、単核球層を採取、CP-1 (KYOKUTO)を用いて凍結保存した。

2. 臍帯血活性化培養

1) 抗CD3抗体刺激排除時期の検討

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、OKT-3抗体(ヤンセン協和)で固相化した抗CD3抗体固相化フラスコにて培養を行った。単核球を解凍後 1.0×10^6 cells / mLとなるように播種し、37.0 °C、97.0% RH、5.0% CO₂のインキュベータ内で培養を開始した。

IL-2濃度に関しては末梢血リンパ球の活性化培養に準じ、IL-2 (CHIRON) 700 IU / mLにて培養を開始、適時培養液を添加することにより7日目には350 IU / mLに、10日目には175 IU / mLに減じ、以降は14日目まで175 IU / mLで培養した。また、細胞の増幅状況に合わせて随時フラスコを拡大した。

抗CD3抗体刺激に関して①OKT-3刺激を行わない群、②OKT-3刺激を培養4日目に排除する群、③OKT-3刺激を培養7日目に排除する群及び④OKT-3刺激を排

除しない群の4群を設け、14日間培養を行った。

2) 培養液中 IL-2 濃度についての検討

1)と同様に 10%FCS RPMI 1640 +7 を基本培地とし、抗 CD 3 抗体固相化フラスコを用いて培養を行った。単核球を解凍後 1.0×10^6 cells / mL となるように播種し、37.0 °C、97.0% RH、5.0% CO₂ のインキュベータ内で培養を開始した OKT-3 刺激は培養 7 日目に排除し、14日間培養を行った。

添加 IL-2 濃度に関して⑤0 IU / mL 群、⑥175 IU / mL 群、⑦350 IU / mL 群及び⑧700 IU / mL 群の4群を設けた。各群とも培養期間を通じ、培養開始時の IL-2 濃度を維持した。

3. 細胞数測定

培養 4 日目、7 日目、10 日目及び 14 日目に培養フラスコ中から細胞浮遊液を適量採取、細胞浮遊液と Trypan Blue stain 0.4% (GIBCO) を混合し、血球計算盤にて細胞数及び生存率を算定した。

4. フローサイトメトリー

培養 14 日目に培養フラスコ中から細胞浮遊液を適量採取し、FACS Calibur (Becton Dickinson) にて細胞表面抗原の解析を行った。Subclass Control は IgG 1 とし、以下の表面抗原について解析した。CD 3、CD 4、CD 8、CD 16、CD 19、CD 20、CD 25、CD 56、CD 69、CD 95、CD 122、CD 45 RO、CD 62L、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ 、HLA-DR

C. 研究結果

1. 抗 CD 3 抗体刺激排除時期の検討

検討細胞群を

- ① : OKT-3 刺激を行わない群
 - ② : OKT-3 刺激培養 4 日目排除群
 - ③ : OKT-3 刺激培養 7 日目排除群
 - ④ : OKT-3 刺激を排除しない群
- で示す。

1) 細胞増幅率及び生存率

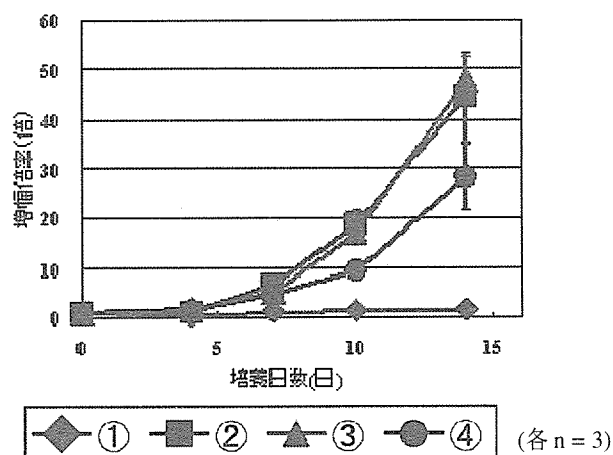


Fig. 1 OKT-3 排除時期の変更による細胞増幅率の変化

培養 7 日目以降細胞増幅率に変化が現れ、14 日目では②(OKT-3 4 日目排除)群と③(OKT-3 7 日目排除)群がほぼ同等(②: 44.3 ± 9.0 倍、③: 47.6 ± 5.0 倍)の細胞増幅率を示した(Fig. 1)。次いで④(OKT-3 非排除)群は 28.3 ± 6.8 倍の増幅を示し、①(OKT-3 無刺激)群では僅かに 1.4 ± 0.8 倍の増幅に留まった。

このとき各群の細胞生存率を比較すると、培養 7 日目までは 4 群ともほぼ同等であり 85.0%前後の細胞生存率を示した

(Fig. 2)。一方培養 10 日目以降群による差が見られ、②及び③群では生存率維持されたが、①及び④群では減少する傾向にあった。特に④は培養 14 日目生存率が $47.8 \pm 10.6\%$ と 50% を下回る結果であった

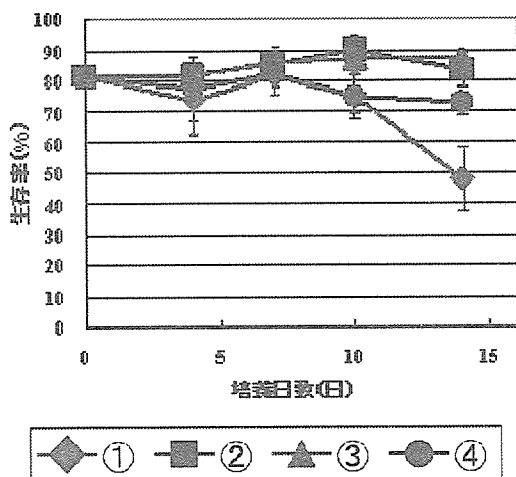


Fig. 2 細胞生存率の推移

2) フローサイトメトリー

培養 14 日目に培養細胞の表面抗原の解析を行った(Fig. 3)。

全ての群で CD 3 の発現率が最も高かった。CD 3 陽性細胞の内では①群以外の 3 群で CD 8 陽性細胞率が CD 4 陽性細胞率を上回っていた。

①群では CD 56 / CD16 陽性細胞率が他の 3 群と比較して高く、NK 細胞が多く見られた。また、全ての群で CD 3 / CD 56 の NKT 細胞が確認されたが、①群での陽性率が高かった。全ての群で B 細胞(CD 19、CD 20)陽性細胞はほとんど見られなかった。

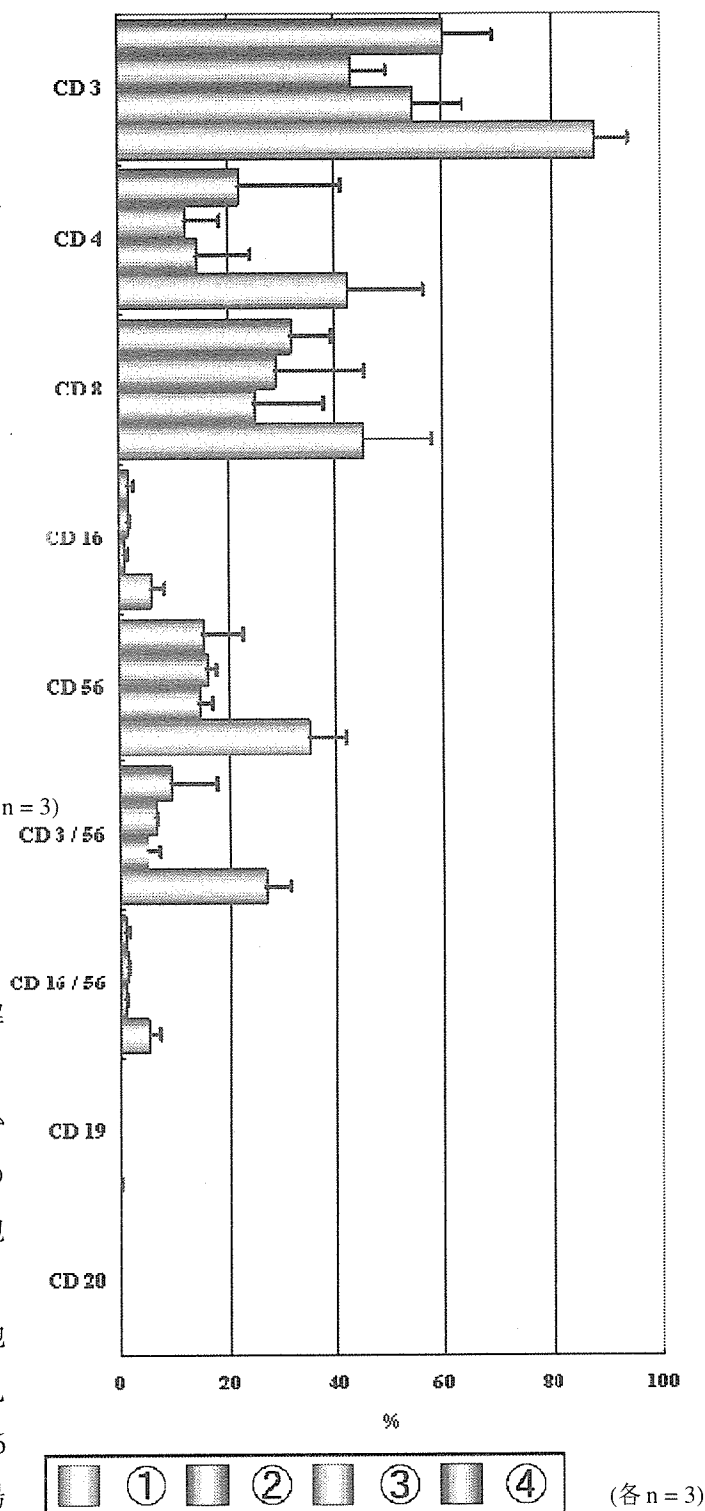


Fig. 3 培養細胞のサブセット解析

次に培養細胞の活性化度を IL-2 レセプター- α , β (CD 25, CD 122)、HLA-DR 及び CD 69 の発現率で比較検討した(Fig. 4)。

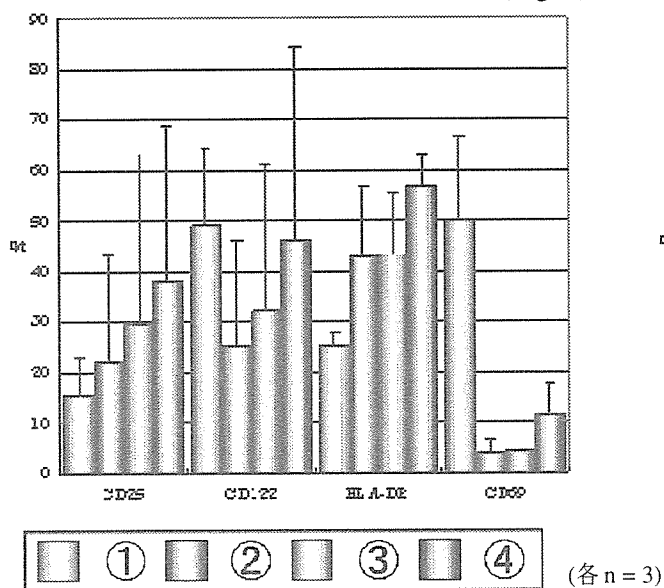


Fig. 4 活性化度解析

IL-2 刺激により発現が誘導される CD 25 は OKT-3 刺激期間が長いほどその出現率が上昇した。一方で CD 122 は①群において出現率が最も高く、その他は OKT-3 刺激期間が長いほどその出現率が上昇した。また HLA-DR は OKT-3 無刺激の①群で低く、OKT-3 の刺激がある②、③及び④群で高い値が得られた。一方 CD 69 発現は①群で高く、②、③及び④群では低かった。

次に、CD 45 RO 及び CD 62L の解析により、培養した T 細胞のエフェクター / メモリー細胞分画の検討を行った(Fig. 5)。OKT-3 刺激期間が長いほどセントラルメモリー細胞(C. M.)の割合が上昇し、エフェクター細胞(Effector)及びナイーブ細胞(Naïve)の割合が減少した。エフェクター

メモリー細胞(E. M.)は 4 群ではほぼ同等の発現を示しており OKT-3 刺激期間による差は見られなかった。

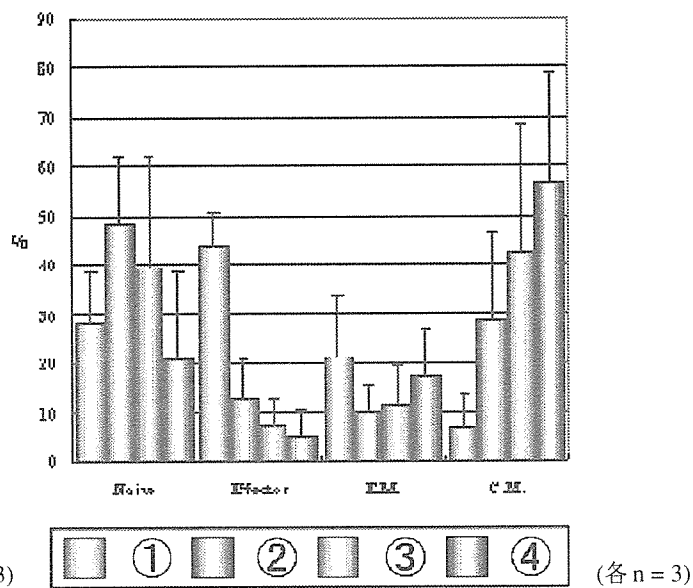


Fig. 5 エフェクター / メモリー分画解析

さらにアポトーシスの指標として CD 95(Fas)の発現率の解析を行った。Fas の発現率は①群で $83.6 \pm 12.6\%$ 、②群で $22.7 \pm 30.2\%$ 、③群で $27.6 \pm 32.2\%$ 、④群で $25.0 \pm 23.4\%$ であった。OKT-3 無刺激の①群において Fas の発現が高く、刺激期間があった 3 群では Fas の発現が抑制されていた。

2. 培養液中 IL-2 濃度についての検討

検討細胞群を

- ⑤ : IL-2 濃度 0 IU / mL 群
 - ⑥ : IL-2 濃度 175 IU / mL 群
 - ⑦ : IL-2 濃度 350 IU / mL 群
 - ⑧ : IL-2 濃度 700 IU / mL 群
- で示す。

1) 細胞増幅率及び生存率

IL-2 を添加していない⑤群ではほとんど細胞増殖が見られなかったが、IL-2 を添加した⑥、⑦及び⑧群では同等の細胞増殖が得られた。

14 日目での細胞増殖は⑤群で 1.2 ± 0.4 倍、⑥群で 29.1 ± 8.9 倍、⑦群で 31.0 ± 3.5 倍、⑧群で 26.8 ± 13.0 倍であった(Fig. 6)。

また、各群の細胞生存率を比較すると細胞増幅率と同様に⑥、⑦及び⑧群はほぼ同等の推移を示し 80%前後の生存率を保っていた(Fig. 7)。一方で⑤群は培養 4 日目以降減少し続け 14 日目には 30%を下回った(⑤群： $23.2 \pm 11.0\%$ 、⑥群： $76.3 \pm 7.2\%$ 、⑦群： $77.6 \pm 4.1\%$ 、⑧群： $69.5 \pm 11.8\%$)。

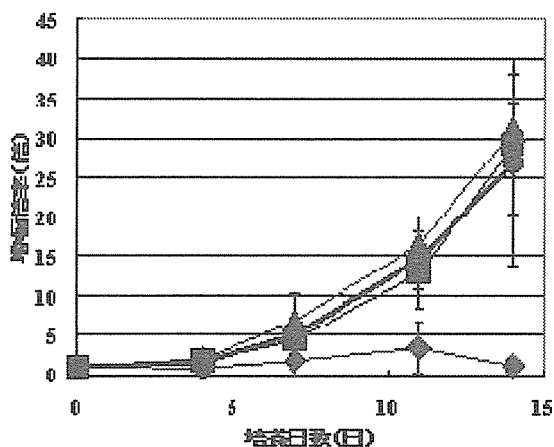


Fig. 6 IL-2 濃度の違いによる細胞増幅率の変化 (各 n=3)

Fig. 6 IL-2 濃度の違いによる細胞増幅率の変化

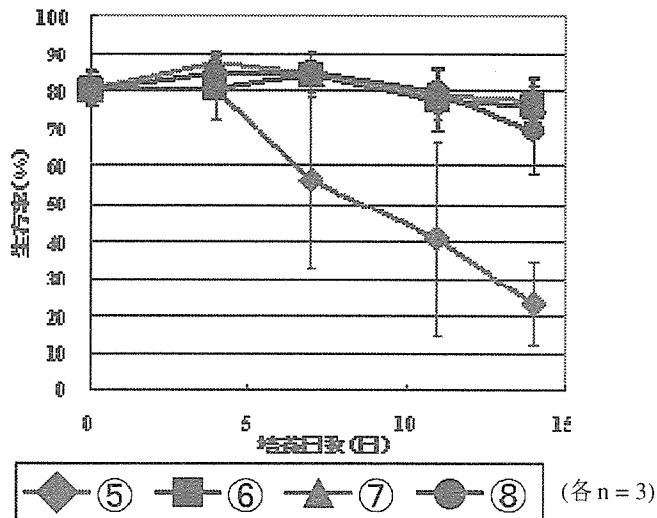


Fig. 7 細胞生存率の推移 (各 n=3)

2) フローサイトメトリー

全ての群で、培養した細胞は CD 3 陽性細胞を主とした細胞集団であった。IL-2 添加濃度が高い群ほど CD 3 陽性細胞中の CD 8 の発現率が高く、逆に CD 4 は発現率が低い傾向にあった (Fig. 8)。

また IL-2 を添加した⑥、⑦及び⑧群では CD 56 陽性細胞(NK 細胞)及び CD 3 / CD 56 陽性細胞(NKT 細胞)が発現しており、それらの発現率は IL-2 濃度依存的に高くなった。またいずれの群においても CD 19、CD 20 陽性の B 細胞ほとんど確認されなかった

次に培養細胞の活性化度解析を行った (Fig. 9)。⑥、⑦及び⑧群と比較して、IL-2 無添加の⑤群で活性化の指標である CD 25、CD 122 及び HLA-DR の発現率が上回っていた。CD 69 については IL-2 を添加した 3 群の発現率が無添加の⑤群を上回った。また、⑥、⑦及び⑧群の CD 25、CD 122 及び HLA-DR の発現率はほぼ同等

で IL-2 添加濃度による差は見られなかった。

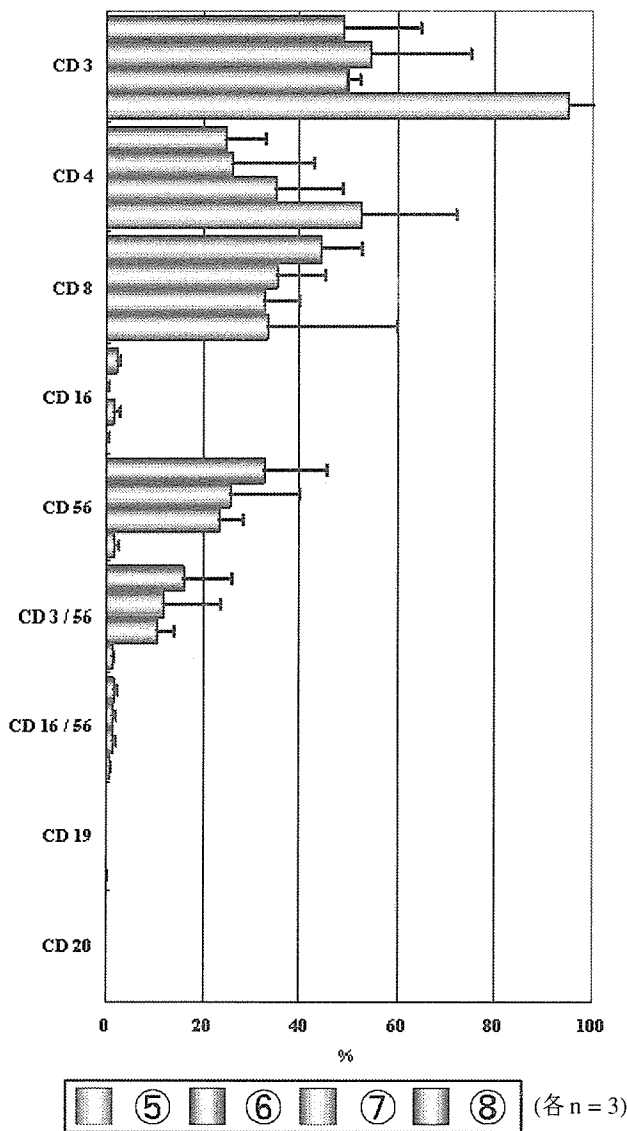


Fig. 8 培養細胞のサブセット解析

さらに培養したT細胞のエフェクター / メモリー細胞分画の検討を行った(Fig. 10)。4 群ともにセントラルメモリー細胞の割合が最も高く、ナイーブ細胞、エフェクター細胞及びエフェクターメモリー細胞の割合はほぼ同等であった。また、IL-2 濃度による差もほとんど無く、4 群はほぼ同等の細胞画分の集団であった。

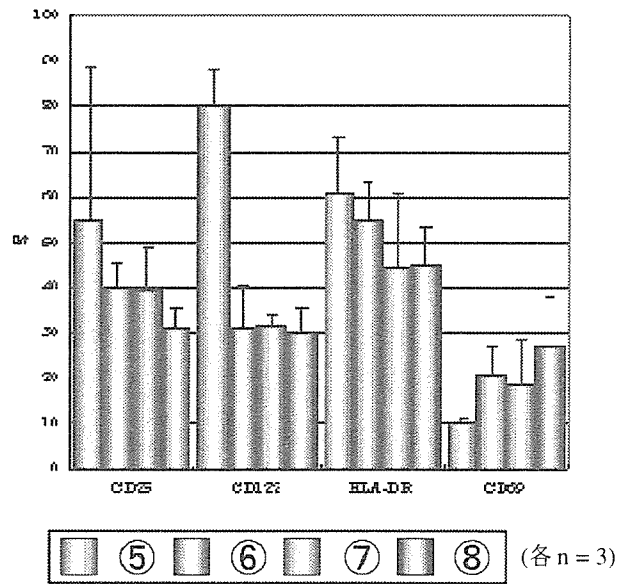


Fig. 9 活性化度解析

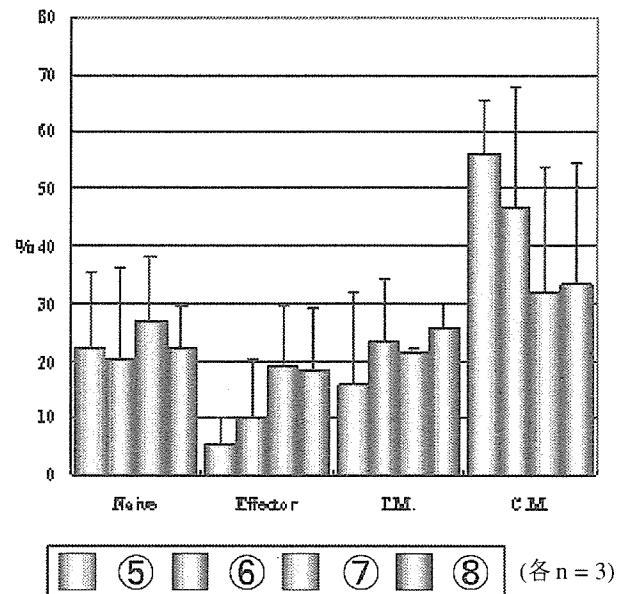


Fig. 10 エフェクター / メモリー分画解析

Fas の発現は⑤群で $68.5 \pm 12.1\%$ 、⑥群で $54.3 \pm 23.2\%$ 、⑦群で $53.4 \pm 26.5\%$ 、⑧群で $49.3 \pm 24.4\%$ であり、4 群ともほぼ同等であった。

D. 考察

1. 抗 CD 3 抗体刺激排除時期の検討

今回の検討により、臍帯血リンパ球の活性化培養を行う場合、細胞増幅には抗 CD 3 抗体刺激は必要不可欠なものであるが、刺激し続けることにより細胞が死滅することが確認された。この細胞死は過度の活性化により AICD(Activated Induced Cell Death)が引き起こされた結果であると考えられた。

臍帯血リンパ球では CD 3 抗体刺激期間が長いほど活性化マーカーが出現し、CD 8 陽性細胞が増加することが確認された。また刺激期間が長いほどメモリー細胞が増加し、ナイーブ細胞が減少することも確認された。これより、活性化培養により臍帯血中の未熟なナイーブ細胞が刺激を受け、細胞障害性能を有するエフェクター細胞や記憶細胞であるメモリー細胞へ誘導されることが確認できた。

以上のことから、抗 CD 3 抗体刺激により臍帯血リンパ球は活性化され、DLI に応用可能な性質を有していることが示唆された。また細胞増幅率及び生存率を考慮すると抗 CD 3 抗体刺激の排除時期は培養 4 日目が適していると考えられた。

2. 培養液中 IL-2 濃度についての検討

今回の検討により、IL-2 の添加が臍帯血リンパ球の活性化培養における生存率維持に重要であり、無添加の培養液では細胞が死滅することが確認された。一方今回検討を行った範囲内の IL-2 の添加

濃度の違いによる増殖率、生存率の差は認められなかった。さらに細胞表面抗原の解析から、IL-2 の添加濃度にかかわらず同等の活性化が得られることが確認された。

これらのことから至適 IL-2 濃度は、培養に掛かる費用を鑑み 175 IU / mL が適していると考えられた。

以上の検討から、最も効率よく臍帯血リンパ球を増幅、活性化するためには 10% FCS 添加基礎培地に IL-2 を終濃度 175 IU / mL 添加した培養液で培養を行うこと、培養 4 日目に抗 CD 3 抗体刺激の排除することが適していると考えられた。

今後は今回確立した方法にて増幅、活性化した臍帯血リンパ球の *in vitro*, *in vivo* における詳細な機能解析、ならびに安全性の評価を行うと同時に、臨床応用に適した培地の無血清化など培養方法の改良を進めていく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

鹿村真之, 伊藤仁也, 清水則夫

「免疫不全マウスを用いた活性化 CD 4-DLI 後の経時的 T 細胞の性質と動態に関する検討」第 29 回日本造血細胞移植学会総会 (2006, 2 16, 福岡)

H. 特許

特筆すべき事項なし。

分担研究報告書

5. 造血幹細胞の自己複製能の機序解明に関する研究

5-1 GSK-3 阻害剤が造血幹/前駆細胞の増殖、分化に及ぼす影響について

分担研究者：田中 宏和、金倉 譲

研究者協力者：松村 到

（先端医療センター 血液再生研究グループ、

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学）

研究要旨

Wnt シグナル経路は、造血細胞の未熟性維持に重要であることが示されているが、その機序については未だ不明な点が多い。本研究では、GSK-3 阻害剤により内因性の β -catenin を活性化した場合、造血幹/前駆細胞の増殖、分化がどのように変化するのかについて解析を行った。

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞をサイトカイン添加無血清培地で7日間培養した場合、総細胞、CD34 陽性細胞は各々 31.3 ± 4.6 倍、 17.9 ± 3.8 倍に増幅したが、GSK-3 Inhibitor9 (GI9) はいずれの増幅も濃度依存的に抑制した。また培養後の FACS、形態解析、及びコロニーアッセイの結果、GI9 は CD34 陽性細胞から骨髓球系細胞への分化を抑制し、赤巨核球系細胞への分化を誘導した。この機序として、活性化 β -catenin は骨髓球系細胞への分化に必須の転写因子 C/EBP α の機能を抑制すること、赤巨核球系細胞への分化に必須の転写因子 GATA1 の機能を増強することが明らかとなった。

以上の結果から、GSK-3 阻害剤による内因性の β -catenin の活性化は、造血幹/前駆細胞におけるサイトカイン存在下での増殖のみでなく、系統決定に重要な転写因子に作用することで、その分化に影響を与えていると考えられた。

今後は、この分子機構について詳細に検討すること、また我々が開発した合成ペプチドによる内的因子操作と組み合わせることにより、効率の良い系統特異的な血球産生に向けた検討を行う予定である。

A. 研究目的

Wnt/ β -catenin 経路は、造血幹細胞の未熟性維持に重要であることが示されている。これまでに活性化型 β -catenin の強制発現系や Wnt 精製蛋白などを用いてこの経路を活性化することにより、マウス及びヒト造血幹細胞の自己複製能、多分化能が維持されることが報告されているが、その分子機構については未だ明らかにされていない。

Wnt/ β -catenin 経路の活性は細胞質に存在する β -catenin の量によって制御されており、Wnt シグナルがない状態では、 β -catenin は GSK-3 β によりリン酸化され、ユビキチンプロテオソーム系により分解されている。レセプターを介して Wnt からのシグナルが細胞内に入ると GSK-3 β が不活性化され、安定化した β -catenin が核に移行し、標的遺伝子の転写を制御することが知られている。一方 GSK-3 阻害剤、6-bromoindirubin-3-oxime は、ATP 競合的に GSK-3 β の活性を抑制することにより、内因性の β -catenin を活性化することが報告されている。

本研究では、ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を、GSK-3 阻害剤で処理することにより内因性の β -catenin を活性化した場合、その増殖、分化がどのような影響を受けるかについて検討を行った。

B. 研究方法

1. 臍帯血より磁気ビーズ法にて CD34 陽性細胞を分離し、ヒト造血幹/前駆細胞

(CB CD34+ hHSC/HPCs)を得た。臍帯血は兵庫さい帯血バンクより供与された実験用臍帯血を用いた。遺伝子発現解析は、市販の CB CD34+ hHSC/HPCs を用い行なった。

2. 分離した CB CD34+ hHSC/HPCs を用いて以下の解析を行った。

1) GSK-3 阻害剤処理前後での細胞内 β -catenin の発現、局在変化について

2) GSK-3 阻害剤がサイトカイン添加無血清培養における hHSC/HPCs の増殖、幹細胞マーカーの発現、及び分化マーカーの発現に及ぼす影響について

3) GSK-3 阻害剤が hHSC/HPCs の colony 形成能に及ぼす影響について

4) GSK-3 阻害剤が系統特異的な転写因子の発現、及びその活性に及ぼす影響について

(倫理面の配慮)

研究に用いた臍帯血は、インフォームドコンセントのもとに母親から提供され、臍帯血提供機関（兵庫さい帯血バンク）及び先端医療センターにおいて倫理審査が済んでいるものを用いた。

C. 研究結果

1. GSK3 阻害剤処理前後での β -catenin の発現、局在変化について

CB hHSC/HPCs を GSK-3 Inhibitor IX(GI9) (Calbiochem)で処理 24 時間後の細胞内 β -catenin の発現量、及び局在につ

いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。以下 GI9 は DMSO で希釈したものを 2.0, 10.0 μ M となるように添加し、control として溶媒 DMSO を GI9 と同量添加した細胞を用いた。Control の細胞では、 β -catenin の発現は細胞膜にわずかに認められたのに対し、GI9 で処理した細胞では、処理濃度依存的に核内に強く集積する像が認められたことから、GI9 は CB hHSC/HPCs において内因性の β -catenin を活性化し得ると考えられた。

2. GSK3 阻害剤が hHSC/HPCs の増殖、及び幹細胞マーカーの発現に及ぼす影響について

CB hHSC/HPCs を SCF, Flt-3 ligand, TPO, IL-6, 及び可溶性 IL-6 レセプター添加無血清培地にて 7 日間培養した際、阻害剤を添加することによりその増殖がどのような影響を受けるかについて検討した。阻害剤を添加しなかった場合、総細胞、CD34 陽性細胞は各々 31.3 ± 4.6 倍、 17.9 ± 3.8 倍に増幅されたが(n=3)、阻害剤を 2 μ M 添加時には総細胞の増幅率にほとんど影響なかったが、10 μ M 添加時有意に抑制され、ほとんど増幅がなかった。また CD34 陽性細胞の増幅率は阻害剤の濃度依存的に抑制された(n=3)。次に 7 日間培養後、CD34 の他、CD38, HLA-DR, CD133, CD90 などの幹細胞マーカーの発現を FACs で検討した結果、阻害剤 2 μ M 添加により、CD34 陽性細胞の割合は減少していたものの、他のマーカーに関しては添

加しなかった場合と比較して明らかな差は認められなかった。

3. GSK-3 阻害剤が hHSC/HPCs のコロニー形成能に及ぼす影響について

サイトカイン添加無血清培地にて 7 日間、及び 14 日間培養した細胞をメチルセルロース (MethoCult H4434V) に播種し、10 日後に出現したコロニーの種類と数を計測した(n=3)。7 日間培養した細胞では、total の colony 数に GI9 処理細胞と control との間で明らかな差は認められなかったが、GI9 添加濃度依存的な CFU-GM の減少、CFU-E/BFU-E の増加が認められた。一方 14 日間培養した細胞では、GI9 処理により total の colony 数が有意に減少しており、7 日間培養した細胞と同様に CFU-GM が減少し、CFU-E/BFU-E が増加する傾向にあった。

4. GSK-3 阻害剤が hHSC/HPCs の分化に及ぼす影響について

サイトカイン添加無血清培地にて 7 日間培養した細胞を用い、系統特異的な分化マーカーの発現を FACS にて解析した。今回用いた系では、阻害剤を添加しなかった場合、約 90% の細胞が CD33 陽性を示したのに対し、阻害剤を添加した場合約 60% 程度であり、骨髓球系細胞への分化抑制が認められた。一方赤芽球系及び巨核球系細胞のマーカーである glycoplycophorin A 及び CD41 の陽性率が増加傾向にあり、形態的にも阻害剤を添