

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究

重点研究報告書（Ⅱ）

目 次

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	589
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	636
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	656
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	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄	680
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	691
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	707
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	720
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	728
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	740
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	761
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	772
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	783
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	795
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	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔	826
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	836
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	839
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	919
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	939
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の確立に関する研究	乾 賢一	951
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	966

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 …… 979
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 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型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 …… 1021
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 …… 1042
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 …… 1054
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 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤雄一 …… 1115

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
研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨 活性化臍帯血 T 細胞を用いたドナーリンパ球輸注療法（臍帯血 DLI）を実用化するために、基礎研究、前臨床試験、臨床パイロット研究を行い、基盤データを蓄積した。これにもとづき臨床試験プロトコールの原案を策定した。

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

臍帯血移植は、ドナーに負担と危険を及ぼさない、HLA 不適合を許容しやすい、コーディネート作業が不要でありドナー細胞を速やかに供給しうる、など多くの長所をもつため、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、生着遅延（不全）をきたしやすいことがあげられる。また、移植後の生着不全、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）が不可能であることも重大な欠点である。本研究は、移植に用いた臍帯血細胞の一部を凍結保存し、必要に応じて活性化・増幅したのちレシピエントに輸注する治療法（臍帯血 DLI）を、従来の DLI と同等あるいはより優れた治療法として確立・実用化することを目的とした。本研究の成果により、臍帯血移植後の生着不全、悪性腫瘍再発、感染症などに対して臍帯血 DLI が実用化されれば、悪性腫瘍や先天性免疫不全症の臍帯血移植による治療成績および移植後 QOL の向上が期待される。こ

れらの効果は医療費の削減にもつながり、長期的に広く国民の医療・福祉の向上に寄与するものである。

具体的には、以下の 6 点を主な目標として研究を進めた。(1) 臍帯血 T 細胞を効率よく活性化・増殖させ、大量高純度の CD4 陽性 T 調製細胞を調製するための培養プロトコールを確立する、(2) 得られた活性化臍帯血リンパ球の性状を解析し、成人ドナーから同様の操作により調製した細胞と比較する、(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 モデルを順次作製し、臍帯血 DLI の安全性、効果、および作用メカニズムを検討する、(4) 臍帯血 T 細胞へのウイルス混入を防ぐための安全管理法を確立する、(5) 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究を行う、(6) 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し、臨床試験プロトコールを作成すること。

B. 研究方法

1. 臍帯血 T 細胞の活性化培養と CD4 陽性細胞の選択

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、細胞数不足のため移植に使用できなかったものを利用した。

比重遠心法により単離した単核細胞を IL-2 添加培養液に浮遊させ、抗 CD3 抗体を付着させたフラスコで培養するという基本条件のもとで、至適 IL-2 濃度、至適培養期間、および CD4 陽性細胞の選択法を検討した。

2. 活性化臍帯血 T 細胞の性状解析

細胞表面マーカー発現および T 細胞抗原受容体レパトアはフローサイトメトリーにより解析した。サイトカイン産生は ELISA 法により解析した。また、

Gene Chip 法を用いて、遺伝子発現を網羅的に解析した。

3. モデル動物の作製と解析

NOD/Ltz/scid マウスおよび NOD/SCID/ γ c^{null} マウス (NOG マウス) を使用した。

1) ヒト化マウスの作製

臍帯血から比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を用いて CD34 陽性造血幹細胞を分離した。1×10⁴~1.2×10⁵ 個の CD34 陽性細胞を、NOG マウスの尾静脈より移植した。

2) ヒト化マウスへの EBV 感染実験

コトントップタマリン由来 EBV 産生細胞株 B95-8 の培養上清を遠心により 100 倍に濃縮した後、0.45 μ m フィルターを通過させたものを尾静脈 (IV) あるいは腹腔内 (IP) に接種した。ウイルス量は約 1×10⁹ transforming units を用いた。

3) 臍帯血 DLI マウスモデル

EBV 接種後 14 日目と 28 日目に、ヒト化マウスに対して活性化臍帯血 T 細胞 DLI を行った。細胞は、マウス移植時に一部培養用に分取した臍帯血より培養したものを一度凍結保存し、マウス DLI 時期に合わせて再度活性化培養したものを用いた。DLI 当日に培養細胞を RPMI-1640 で洗浄し、再び RPMI-1640 に浮遊させ、kg あたり 5.0×10⁶cells(1.0×10⁶cells) を 2 週間隔で計 2 回、尾静脈から投与した。なお、DLI には、活性化 CD4 陽性細胞と活性化全 T 細胞の 2 種類を使用した。

4. 培養臍帯血細胞の安全管理

1) 多項目同時 DNA 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: ロッシェ) 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。

2) その他の安全管理法

エンドトキシン試験・無菌試験・STR 個人識別法による細胞取り違い防止、移植後キメラズム検査法など各種品質検査方法の応用を試みた。

5. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究

CD4 リンパ球減少症・自己免疫疾患、急性骨髄性白血病、重症複合型免疫不全症・Omenn 病、重症複合型免疫不全症 (2 例)、副腎白質ジストロフィー、の計 6 例において、バッグに残存した血液から CD4 陽性 T 細胞を活性化・増殖させ、前 3 例においては実際に患者に投与した。

6. 臍帯血 DLI 臨床試験プロトコルの策定

「臍帯血移植後活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験」プロトコル案策定委員会で協議し

策定した。

(倫理面への配慮)

1) 基礎研究について

臍帯血バンクに提供された臍帯血には、細胞数不足などの理由により移植に用いることができ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、移植に使用できない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、個人情報の保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

2) 臨床パイロット研究について

東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を得た。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。

C. 研究結果

1. 臍帯血由来 CD4 陽性 T 細胞の選択的活性化培養法

以下 1)~3) の検討を経て、10ml 程度の臍帯血から約 3 週間の培養で 1×10⁹ レベルの CD4 陽性 T 細胞の調整が可能となった。

1) 培養に用いる IL-2 濃度の検討

50~1,400U/ml の IL-2 濃度で良好な細胞増殖が誘導されたが、HLA-DR や CD69 など活性化 T 細胞マーカーの高レベルの発現には、350U/ml 以上の濃度が必要であった。

2) 抗 CD3 抗体による刺激スケジュールの検討

抗 CD3 を付着させた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 日以降は増殖速度と活性化マーカー発現が低下し、死細胞も増加した。一方、培養 7 日目から 3 日間抗 CD3 による刺激を中断したのち再開した場合は、培養 21 日目まで、良好な増殖と高レベルの活性化マーカー発現を示した。

3) CD4 陽性細胞の選択法

抗 CD4 ビーズのみで細胞分離を行った場合、得られた CD4 陽性細胞の純度は平均 86.6% (60.3%~99.0%)、CD8 陽性細胞の混入率は平均 0.76% (0.03%~2.19%) であった。一方、抗 CD8 ビーズによりあらかじめ CD8 陽性細胞を除去した後に CD4 陽性細胞を分離した場合、その純度は平均 93.9% (65.7%~99.9%)、CD8 陽性細胞の混入率

は平均 0.16% (0.0%~0.12%) であった。

2. 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

CD4 細胞を選択的に活性化培養した後に解析したところ、典型例では、CD2、CD3、CD4、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。CD2+、CD3+、CD28+、CD38+、CD69+、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。HLA-DR、CD28、CD69 のうち、CD69 が臍帯血 T 細胞の活性化を最もよく反映するマーカーであった。

2) 活性化臍帯血リンパ球の TCR レパトアの解析

活性化・増殖させた臍帯血 T リンパ球において、TCR の多様性に偏りが生じる可能性を検討するために、TCR レパトアの解析を行った。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解析したところ、活性化培養後も TCR の偏り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

活性化臍帯血 T リンパ球より、IL-2、IL-8、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 、TGF- β などの産生が認められた。IFN- γ と IL-8 の産生は、対照として成人末梢血 T 細胞を活性化培養した場合より低かったが、TNF- α の産生は同等であった。

4) Gene Chip 法による網羅的遺伝子発現解析

臍帯血由来活性化 CD4(+)細胞では、末梢血由来のものと比較して、IL-10、GM-CSF、M-CSF 等のサイトカイン、IL-2、IL-18、GM-CSF 等に対する受容体、CCL-1、XCL-1、-2 等のケモカイン、CCR-1、-2、CXCR6 等のケモカイン受容体、CD38、CD96、CD99 等の細胞膜表面分子の発現が高かった。一方、IL-17、IL-7 等のサイトカイン、IL-6、IL-7 に対する受容体、CCL-5 等のケモカイン、CCR1、CXCR3 等のケモカイン受容体は、末梢血由来活性化 CD4(+)細胞でより高い発現が認められた。

3. 臍帯血中リンパ球前駆細胞の定量的検出法

マウスストローマ細胞株 TSt-4 および、これにヒト delta-like 1 遺伝子を強制発現させた細胞との共培養により、臍帯血中の B および T 前駆細胞を定量する方法を確立した。

4. モデル動物の作製と解析

1) NOD/Ltz/scid マウスを用いた実験

EBV により不死化したリンパ芽球様細胞を尾静脈すると、まず末梢血に EBV 陽性細胞が出現し、その後、腎臓、脾臓、肝臓、胸腺、リンパ節、肺にヒト細胞の浸潤が見られ、最終的にはほぼ全てのマウスが死亡した。本実験系を EBV による移植後日和見感染症(リンパ増殖性疾患 (LPD))のモデルとして、活性化 T 細胞輸注による治療実験を行った。臍帯血 DLI の前段階として、末梢血由来活性化 T 細胞輸注を行ったところ、対象と比較して有意に生存期間が延長され、末梢血および主要臓器において EBV 感染細胞数が減少した。すなわち、LPD モデルに対する末梢血由来活性化 T 細胞の治療効果が認められた。また、その作用機序としては、ELISPOT 法や細胞傷害性試験の結果から、輸注された T 細胞から EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)が誘導されることが示唆された。

2) NOG マウスを用いた実験

造血幹細胞移植後 3 および 6 ヶ月のマウス計 12 頭を用いて EB ウイルス(EBV)感染実験を行った。4 頭には静脈内 (IV)、他の 4 頭には腹腔内 (IP) に EBV を投与した。また、対照として、紫外線により不活化したウイルスを IV あるいは IP で 2 頭ずつに投与した。IV 投与した 4 頭すべてで感染が成立し末梢血 EBV DNA レベルが $10^3\sim 10^4$ copies/ μ g DNA の高値となった。末梢血より各リンパ球分画を、磁気ビーズ法により採取して調べたところ、EBV DNA は主に B 細胞分画から検出された。これらのマウスは感染後 6~17 週で体重減少と全身状態悪化が著名となり死亡した。剖検により、脾臓、腎臓、肝臓などの腫大が認められ、末梢血、脾臓、骨髓、肝臓、肺、腎臓、胸腺、リンパ節などから高レベルの EBV DNA が検出されたことから、この病態は LPD と同様のものと推測された。一方 IP 投与群では、4 頭のうち 1 頭で感染が成立したが、一般状態に大きな変化がなかった。ヒト造血幹細胞を移植しなかったマウス 2 頭では感染が成立しなかった。感染ウイルス量を変化させた実験では、 10^3 transforming units を接種したマウスは致死的となったが、 10^2 transforming units 以下ではマウスは生存した。

3) 臍帯血 DLI マウスモデル

EBV 投与後に DLI を行ったマウスでは、対照と比較して生存率が高い傾向が認められた。CD4 陽性 T 細胞投与群と全 T 細胞投与群の比較では、生存率の差は認められなかったが、マウスを剖検し各臓器より DNA 抽出後、real time-PCR にて EBV コピー数を定量したところ、CD4 陽性 T 細胞投与群よりも

全 T 細胞投与群で EBV コピー数が低い傾向が認められた。

5. 培養臍帯血細胞の安全管理

1) 多種ウイルス同時検出法の開発

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 1 型・2 型、水痘・帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 型、7 型、8 型、パルボウイルス B19 型、B 型肝炎ウイルス、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 1 型・2 型、ヒト T リンパ球嗜好性ウイルス 1 型・2 型の 18 種類を選定した。これら 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。PCR をキャピラリーで行なうライトサイクラーの利用と自動核酸抽出機を使用する事により、検査を 2 時間以内に終了することが可能だった。また、この検査系を改良して半定量検査系も開発した。

2) その他の安全管理法

また、培養細胞の安全性確立を目的として、エンドトキシン試験・無菌試験・multiplex-PCR による網羅的ウイルス定性試験及び real time-PCR 法によるウイルス定量試験・STR 個人識別法による細胞取り違い防止、移植後キメリズム検査法など各種品質検査方法を確立した。

6. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究

6 症例において、臍帯血から CD4 陽性細胞の培養を行った。バッグに残存した臍帯血から CD4 陽性 T 細胞を培養し、全例で 2×10^7 cells/vial で 2-3 本凍結保存可能であった。6 例中 3 例では、凍結細胞を融解後再び培養し、 $1 \sim 5 \times 10^8$ cells を 3-4 回投与した。投与の適応は 1) 移植後生着不全・部分キメラ、2) 移植後難治性日和見感染症である。症例 3（重症複合型免疫不全症・Omenn 病）では、1 回の投与でキメリズムの逆転（ドナー細胞の回復）が観察され、症例 1（CD4 リンパ球減少症・自己免疫疾患）ではリンパ球数の増加と芽球化反応の改善が認められた。しかし症例 2（急性骨髄性白血病）では造血能の回復を誘導することはできなかった。移植後 GVHD は全例で II 度であり、臍帯血 DLI 後に GVHD を認めず、他の有害事象も記録されていない。

7. 臍帯血 DLI 臨床試験プロトコルの策定

「臍帯血移植後活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験」プロトコル案（別紙添付）を策定した。

D. 考察

1. 臍帯血リンパ球活性化培養法について

末梢血 T 細胞を活性化培養後体内に戻す活性化自己 T 細胞輸注療法はすでに確立された治療法となっているが、これに用いる末梢血 T 細胞活性化培養法を、臍帯血細胞の特性に合わせて改変することにより、十分な活性化・増殖を実現することができた。また、抗 CD3 付着フラスコで継続して培養せず、途中で数日間刺激を中断すると、その後に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 陽性細胞の混入を極力避ける必要がある。抗 CD8 ビーズを用いて一旦 CD8 陽性細胞を除いてから抗 CD4 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。

2. 活性化臍帯血 T 細胞の性状解析

培養後の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。

Gene Chip 法を用いた網羅的な解析により、同じ活性化 CD4(+)細胞であっても、臍帯血由来と末梢血由来では、サイト (ケモ) カイン、サイト (ケモ) カイン受容体、膜表面分子の発現に差異があることが示唆された。これらの分子はリンパ球の機能発現に重要な役割を持つことから、臍帯血 DLI は部分的に末梢血 DLI と異なる特性を持つ可能性があると考えられた。

3. マウスモデルについて

NOD/Ltz/scid マウスを用いた実験では、成人末梢血由来活性化 T 細胞による DLI の抗腫瘍効果と延命効果が示されたので、臍帯血由来活性化 T 細胞も同様の効果を持つことが推測された。

ヒト化 NOG マウスに EBV を感染させたところ、脾臓、腎臓、肝臓などが腫大し、多数の EBV 感染リンパ球の浸潤が認められた。この病態は実際のヒトの LPD に類似するものと考えられたので、臍帯血 DLI による治療実験を行い、その効果と安全性を示唆する結果を得た。CD4 陽性細胞よりも全 T 細胞の効果が大きいことを示唆する結果が得られたが、これは輸注された細胞から CD8(+)の EBV 特異的 CTL が誘導されることを示した NOD/Ltz/scid マウスの実験結果とも一致するものである。CD8(+)細胞は GVHD の原因となるために、末梢血活性化 T 細

胞による DLI の場合は除去されるが、臍帯血 DLI では、CD8(+)細胞が混入しても GVHD を起こしにくいことも考えられる。この点について今後検討したい。

4. 培養臍帯血細胞の安全管理

臍帯血に混入する可能性のある 18 種類のウイルスを同時に検査することが可能な、迅速・安価な検査法が開発されたことは、臍帯血 DLI の安全管理に大きく寄与するものと考えられる。また、細菌の混入や細胞取り違えを防止する方策も検討した。

5. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究

実際に臍帯血より活性化培養した CD4 陽性細胞を 3 例に投与したところ、重症複合型免疫不全症・Omenn 病と CD4 リンパ球減少症・自己免疫疾患の 2 症例で良好な結果を得た。

6. 臍帯血 DLI 臨床試験プロトコルの策定

「臍帯血移植後活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験」プロトコル案(別紙添付)を策定した。

本研究の当初の計画では、臨床試験の実施までを目標に含めていたが、基礎研究および前臨床試験に慎重を期したため、期間内における臨床試験の実施は不可能となった。臨床試験プロトコル原案の策定までで研究を終了した。

E. 結論

1. 臍帯血 T 細胞を効率よく活性化・増殖させ、大量高純度の CD4 陽性 T 細胞を得るための培養プロトコルを確立した。
2. 得られた活性化臍帯血 CD4 陽性 T 細胞は末梢血由来活性化 CD4 陽性 T 細胞とほぼ同じ性状を示したが、詳細な遺伝子発現の解析では、若干の相違が認められた。
3. NOG マウスを用いて、ヒトウイルス感染モデルと臍帯血 DLI モデルが作製された。これを用いて、臍帯血 DLI の安全性と効果が示唆され、その作用メカニズムが解析された。
4. マルチプレックス PCR 法を応用して、多種ウイルス同時検出法が開発され、臍帯血 DLI の安全管理に利用することが可能となった。
5. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究が行われ、臍帯血移植後の生着不全、感染症、悪性腫瘍再発などに有効であることが示唆された。
6. 臍帯血 DLI 臨床試験のプロトコル原案が策定された。

F. 研究発表(抜粋)

- 1) Tomizawa D, Yuki A, Nagasawa M, Morio T,

Kajiwara M, Sekine T, Shimizu N, Kato M, Yachie A, Mizutani S. Novel adopted immunotherapy for mixed chimerism after unrelated cord blood transplantation using reduced-intensity conditioning in Omenn disease. *Eur J Haematol.* 75: 441-444, 2005.

2) 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)

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) I. Okamoto H, Arii C, Shibata F, Toma T, Wada T, Inoue M, Tone Y, Kasahara Y, Koizumi S, Kamachi Y, Ishida Y, Inagaki J, Kato M, Morio T, Yachie A. Clonotypic analysis of T cell reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with severe combined immunodeficiency. *Clin. Exp. Immunol.* 2007 (in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅱ)

平成19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