

200706011A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

サイトカインによる増幅培養臍帯血による  
臍帯血移植の臨床試験

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中 畑 龍 俊

平成20(2008)年3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療等研究事業

Health and Labour Sciences Research Grants,  
Translational research, Ministry of Health, Labour and Welfare

サイトカインによる増幅培養臍帯血による  
臍帯血移植の臨床試験

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中 畑 龍 俊

先端医療センター 再生医療研究部  
京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座

## はじめに

本報告書は厚生労働科学研究費補助金「再生医療等研究事業」の一つである、「サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験」研究班における平成 19 年度の研究成果をまとめた報告書である。

本研究班は、サイトカインを用いて造血幹/前駆細胞を効率よくかつ安全に増幅する基礎的な研究成果を、臍帯血移植に臨床応用するために平成 14 年度発足し、平成 16 年まで先端医療センターでの総合的な基盤整備を実施してきた(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業「*Ex vivo* 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ」)。近年めざましく進歩を続ける細胞治療、再生医療において最も基礎的かつ重要なことは、被験者である患者の立場に立って、治療の安全性、有効性はもちろんのこと、加工した治療用細胞製剤の安全性、有効性を科学的に証明することである。

本研究班では、GTP(Good Tissue Practice)に則った製造法の確立、品質管理法、品質保証法の確立、治療の安全性と有効性を検証しうる臨床プロトコルの作成、及び臨床研究実施体制の整備を行い、平成 18 年 4 月 1 日より *ex vivo* 増幅臍帯血を用いた臨床研究「急性白血病等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」を開始し、平成 20 年 2 月 5 日第一例目に対して増幅臍帯血移植を実施した。

今後は、*ex vivo* 増幅臍帯血移植の安全性、有効性を検証すると同時に、治療用細胞製剤をいかに安全に臨床応用すべきかについて具体的に示す先駆的な研究として、我々が開発した細胞プロセッシング法、品質管理法を普及、発展させること、さらにはわが国の細胞治療、再生医療における問題点を明確にし、その解決策を示していくことを目標として研究活動を継続していきたいと考えている。

本報告書が関係者の参考になれば幸いである。

平成 20 年 3 月 主任研究者 中畑 龍俊

## 目 次

I. 研究組織 .....	1
II. 平成 19 年度総括研究報告 .....	3
中畑 龍俊	
III. 平成 19 年度分担研究報告	
1. GMP および GTP に準拠した培養法の確立	
1-1 <i>ex vivo</i> 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究 .....	11
伊藤 仁也 初山 麻子	
1-2 探索的臨床試験に求められる GMP 準拠細胞プロセッシング .....	15
前川 平	
2. 品質管理法の確立	
2-1 NOG mouse を用いた品質管理 .....	25
平家 俊男	
2-2 造血幹細胞移植後ウイルス感染症の動態に関する研究 .....	31
清水 則夫	
2-3 神戸バイオメディカル創造センターにおける品質管理試験体制の整備 .....	39
2-4 島津 光伸 松本 浩 柳原 玲	
2-5 IL-2 と抗 CD3 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 .....	47
伊藤 仁也 丸山 京子	
3. 臍帯血 DLI に向けた取り組みと基盤整備	
3-1 IL-2 と抗 CD3 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 .....	53
伊藤 仁也 鹿村 真之	

4. 造血幹細胞の自己複製機能機序解明に関する研究	
4-1 Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が造血幹/前駆細胞の増殖、分化に及ぼす影響について	59
田中 宏和    金倉 譲    松村 到	
IV. 班会議記録合同研究カンファレンス	69
V. 研究成果の刊行に関する一覧	75
VI. 研究成果の刊行物・印刷物	89

# I. 研究組織

平成 19 年度厚生科学研究「サイトカインによる増幅培養臍帯血による  
臍帯血移植の臨床試験」研究班

研 究 組 織

	氏 名	所 属
主任研究者	中畑 龍俊	先端医療センター血液再生研究グループ
分担研究者	前川 平	京都大学輸血細胞治療部
	金倉 譲	大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科
	平家 俊男	京都大学大学院医学研究科発達小児科
	清水 則夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学
	村上 雅義	先端医療センター臨床研究支援部
	永井 謙一	先端医療センター診療開発部
	伊藤 仁也	先端医療センター血液再生研究グループ
	田中 宏和	先端医療センター血液再生研究グループ
	島津 光伸	株式会社三菱化学ビーシーエル
研究協力者	平松 英文	京都大学大学院医学研究科発達小児科
	松村 到	大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科
	山下 武美	キリンビール株式会社
	鈴木 秀文	キリンビール株式会社
	芦原 義久	株式会社三菱化学ビーシーエル
	松本 浩	株式会社三菱化学ビーシーエル
	柳原 玲	株式会社三菱化学ビーシーエル
	鹿村 真之	先端医療センター血液再生研究グループ
	橋本 尚子	先端医療センター診療開発部
	初山 麻子	先端医療センター血液再生研究グループ
	丸山 京子	先端医療センター血液再生研究グループ
	高田 のぞみ	先端医療センター血液再生研究グループ

## Ⅱ. 平成19年度 総括研究報告書



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）

## 総括研究報告書

### サイトカインによる増幅臍帯血による臍帯血移植の臨床試験

総括研究者：中畑 龍俊

（先端医療センター 客員研究員、

京都大学大学院医学研究科 発達小児科学教授）

#### 研究要旨

本研究では、造血幹/前駆細胞の絶対数不足から生じる臍帯血移植の問題点（生着不全、造血回復遅延など）を解決するため、*ex vivo* 増幅臍帯血を臍帯血移植へ臨床応用し、その有効性及び安全性を証明すること、さらには *ex vivo* 増幅臍帯血移植を新たな医療として確立することを目的としている。昨年度までに臨床研究「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」を開始すると同時に、我々の開発した細胞プロセッシング法の検証、品質管理法における評価系の開発、及び検証を行うことにより各々における具体的なガイドラインを作成すること、さらには移植後の再発や感染症に対する検査法、治療法の開発を行うことにより、移植成績の向上に貢献することを目的として研究を実施してきた。

本年度はプロトコルにおける適格基準、前処置の変更により適応を拡大し、臨床研究を推進させると同時に、上記分担研究を継続して実施した。

今後は治療用細胞製剤をいかに安全に臨床応用すべきかについて具体的に示す先駆的な研究として、我々が開発した細胞プロセッシング法、品質管理法を普及、発展させるための研究活動を継続する予定である。

## 分担研究者

中畑 龍俊	京都大学大学院医学研究科 発達小児科学教授 先端医療センター 客員研究員
前川 平	京都大学輸血細胞治療部 教授
金倉 謙	大阪大学大学院医学系 研究科血液・腫瘍内科学 教授
平家 俊男	京都大学大学院医学研究科 発達小児科学助教授
清水 則夫	東京医科歯科大学難治疾患 研究所ウイルス感染学 助教授
村上 雅義	先端医療センター臨床 研究支援部研究開発部長
永井 謙一	先端医療センター 診療管理部長
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
田中 宏和	先端医療センター 血液再生研究グループ 主任研究員
白数 照雄	ニプロ株式会社総合研究所 第6班研究開発部部長代行
西川 茂道	和研薬株式会社(株) R&D 部部長
桜田 洋	ヘモネティクスジャパン (株) 開発室長
島津 光伸	株式会社三菱化学ビーシーエル 研究開発部長

## A. 研究目的

本研究は、我々が開発したサイトカインの組み合わせにより造血幹/前駆細胞を効率よくかつ安全に増幅させる技術を臍帯血移植に臨床応用し、有効性及び安全性を証明すること、さらには *ex vivo* 増幅臍帯血移植を新たな医療として確立することを目的としている。これまで先端医療センターにおいて、平成 14~16、17~19 年にわたり総合的な基盤整備(基礎研究成果の臨床応用推進研究事業「*Ex vivo* 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ」)、並びに臨床研究(ヒトゲノム・再生医療等研究事業「サイトカインによる増幅臍帯血による臍帯血移植の臨床試験」)に取り組んできた。これら研究事業を通じ、GTP(Good Tissue Practice)に則った製造法の確立、品質管理・保証法の確立、治療の安全性、有効性を検証しうる臨床プロトコルの作成、並びに診療体制の整備を行ない、平成 18 年 4 月 1 日より *ex vivo* 増幅臍帯血を用いた臨床研究「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」を開始した。本臨床研究は凍結臍帯血を解凍後に分割し、 $2.0 \times 10^7/\text{kg}$  相当の臍帯血を未処理のまま移植、もう一方は CD34 陽性細胞に純化後、上述した培養法で 12 日間増幅し移植するものであり、主要評価項目としてその安全性さらには増幅培養した CD34 陽性細胞の輸注細胞数と生着率の相関を検討することを予定している。

また本臨床研究の実施と並行して、我々の開発した細胞プロセッシング法の検証及び改良、品質管理法における評価系の開発、検証、及び他分野への応用に向けた基礎的検討を行うことにより、各々の具体的なガイドラインを作成すること、さらには移植後の再発や感染症に対する検査法、治療法の開発を行うことにより、移植成績の向上に貢献することを目的として研究を実施した。

## B. 研究方法

本研究を進めるにあたり、本年度は以下の分担研究組織を組み研究にあたった。

### I. GMP 及び GTP に準拠した培養方法の確立

本分担研究は、細胞療法を実践する際に不可欠な「GMP に準拠した細胞プロセッシング法を確立すること」を主たる目的としている。これまでに新規無血清培地ならびに新規培養バッグ（Nipro 社製）の開発を行い、各々の性能評価において既存の製品よりも良好な臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅効果が得られることを示してきた。

本年度は、これら新規資材を *ex vivo* 増幅臍帯血の実製造法に応用することを目的として、CD34 陽性細胞の増幅効果を中心に引き続き検討を行った。(1-1. 分担研究者 伊藤)。

さらに細胞療法、再生医療等の先端医療における安全性を担保するための取り組みがどの様に進められているかを検証

し、開発を進めるために整備しなければならないインフラストラクチャーをどのように構築すべきかについて提言を試みた(1-2. 分担研究者 前川)。

### II. 品質管理方法の確立

*Ex vivo* 増幅臍帯血の効能および安全性評価の為には、前臨床試験として技術的に可能かつ科学的に合理性のある範囲で、実験動物を用いた適切に設計された試験により検討する必要がある。これまでに我々は、種々の免疫機構の障害を有する免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c$ <sup>null</sup> (NOG マウス)を作成し、ヒト臍帯血の生着が可能であることを確認してきた。本年度は、二次移植の系を用いて NOG マウスのヒト幹細胞活性評価における有用性について引き続き検討を行うと同時に、サイトカインにより増幅した CD34 陽性細胞の幹細胞活性について検討を行った。また移植後の NOG マウスにおいて構築されるヒト免疫機構において、T 細胞、NK 細胞、B 細胞の機能評価を行うことにより、造血幹細胞移植に伴う拒絶、GVHD 等の種々免疫反応制御に向けた基盤技術についての検討を開始した(2-1. 分担研究者 平家)。

臍帯血移植の重大な合併症の一つであるウイルス感染症に関し、その動態を明らかにすることを目的として、先端医療センターにおいて実施した臍帯血移植後の感染症の頻度、出現時期、ウイルスの種類、臨床症状とウイルスゲノム量の関係を経時的に測定することにより、我々が開発してきたウイルス検査系の有用性

につき検討を行った(2-2. 分担研究者 清水)。

*Ex vivo* 増幅臍帯血移植を臨床応用化するにあたり、実際の製造工程に連動した品質管理試験体制の整備が必要である。我々は、*Ex vivo* 増幅臍帯血の製造を行う先端医療センターに隣接した神戸バイオメディカル創造センター (BMA) 内に、感染性否定試験を実施する品質管理施設を整備してきた。本年度は培養過程における真菌汚染の規格試験実施に向け、 $\beta$ -D-グルカン試験の基準値の設定を試みた。(2-3. 分担研究者 島津)。

これまでに海外では *ex vivo* 増幅臍帯血移植が実施され、その安全性は確認されているが、生着、造血回復までの日数の短縮といった効果は得られていない。本年度は、昨年度の *ex vivo* 増幅臍帯血の効果に関する評価に引き続き、非臨床安全性試験の一環として、増幅した細胞を移植した際の体内動態、ならびに移植細胞がレシピエントの正常な細胞または組織に与える影響を検討するため、移植後長期のマウス組織における病理組織学的検査を行った。また移植細胞の *in vivo* における安全性を評価するため、移植後長期のマウス骨髄における生着ヒト血球の染色体解析を行った。(2-4. 分担研究者 伊藤)。

### III. 臍帯血由来 CDF34 陽性細胞を用いた *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

2006年4月1日より「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」を開始、2008年2月5日第一例目に対し増幅臍帯血移植を実施した(主任研究者 伊藤仁也)。

### IV. 臍帯血 DLI に向けた培養法及び品質管理法の開発

本分担研究では、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 刺激による臍帯血リンパ球の活性化培養法を確立し、臍帯血ドナーリンパ球輸注療法を新たな医療として確立することを目的としている。本年度は、臨床応用に適した培養方法としてバッグを用いた閉鎖系培養を行い、臍帯血リンパ球の細胞増幅率及び生存率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、増幅した細胞の機能的分類を行った(4-1. 分担研究者 伊藤)。

### V. 造血幹細胞の自己複製期所の解明

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。本分担研究では昨年度までに、GSK-3 阻害剤による内因性の  $\beta$ -catenin の活性化が、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ことを示してきた。本年度はさらに内因性の  $\beta$ -catenin の活性化による造血幹細胞の系統決定について詳細な検討を行った(5-1. 分担研究者 金倉、田中)。

## C. 研究結果ならびに今後の方針

### I. GMP 及び GTP に準拠した培養方法の確立

1-1. 無血清培地に関しては、改良の結果 12 日間の plate 培養により総細胞数 1,361 倍、CD34 陽性細胞数 347 倍の増幅が得られるようになった。また無血清培地において増幅した細胞を NOD/SCID mouse に移植した場合、未処理 CD34 陽性細胞を移植した場合と比較して、移植後 8 週目の骨髄で有意に高いヒト血球キメリズムが得られた。

さらに新規無血清培地と培養バックを用いて現行の製造方法による製造試験を行った結果、新規資材を組み合わせることで、現在使用している資材と比較して 2 倍以上の増幅効果が得られた。しかしながら新たな系では培養 7 日目以降に著しい viability の低下が認められ、今後至適な培養条件(培養日数、希釈回数等)を検討する必要があると考えられた。

1-2. 幹細胞を利用した再生医療に関しては、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(医薬発第 1314 号、厚労省医薬安全局長通知)、「トランスレーショナルリサーチ実施にあたっての共通倫理審査指針」、さらには 2006 年 9 月 1 日「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が厚生労働省から施行され、わが国におけるヒト幹細胞臨床研究のあり方、方向性が示されたといえる。今後、細胞治療の安全性を高めていくために、様々

な角度から法的な規制の整備を進めてゆく必要がある。2006 年 1 月米国 FDA より早期フェーズ I (探索的臨床試験) で用いる IND(Investigational New Drug)の GMP 製造に関するガイドライン草案が公表された。本 phase I GMP 指針で注目すべき点として、1. 臨床開発の段階に応じた IND の品質管理が可能であることを明記したこと 2. 多種類のプロジェクトを請け負う大学などの CPC の実情を考慮し、同一の施設で多種類の IND を製造することを容認していること 3. 清掃の管理などを確実にすることで、異なるプロジェクトを同一の部屋で時間を変えれば可能であることを明記していること 4. 治療用ヒト細胞の製造に関するバリデーションに柔軟性を持たせたこと 5. 無菌検査結果が判明する前に出荷しなければならない状況を容認していることが挙げられる。これは我々が従来から提唱してきた開発段階に応じた GMP、いわゆる iGMP (institutional GMP)の必要性と相通ずるものであると考えられた。今後はわが国における法体系や規制の中でのトランスレーショナルリサーチの現状把握、及びその問題点を明確にすることにより、独自の IND システム構築に向け取り組んでいくことを予定している。

### II. 品質管理方法の確立

2-1. 免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  は、ヒト造血細胞の生着を許容するのみでなく、ヒト臍帯血 CD34+細胞よりの、機能的血球細胞、免疫細胞の分化をも誘導する

ことにより、*in vivo*での優れたヒト造血幹細胞活性系と成りうる事が明らかとなった。また、造血細胞の持つ分化可塑性も評価できるシステムであること、造血幹細胞移植に伴う免疫反応制御に向けた取り組みも可能であることも明らかとなり、NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$ マウスが、ヒト細胞を用いた再生医療の確立の為に必要な有効性、安全性の面より、多くの貴重な知見を提供してくれることが期待される。

**2-2.** 移植後ウイルス感染症として重要なウイルスの中から、12種類のDNAウイルスを選定、患者末梢血中のウイルスの定性、定量法を確立し、その感度、特異性について検証を行った。さらに臨床プロトコルを作成し、4名の移植後患者をパイロット的にモニタリングした結果、3名に、また測定回数にして9回中4回にCMV, EBV, HHV-6, BKVいずれかのウイルスが検出され、臍帯血移植患者では持続感染ウイルスの再活性化が頻繁に起きていると推測された。今後臨床症状との相関等を含めデータの蓄積を行なっていく予定である。

**2-3.** 搬送バリデーション試験の結果、マイコプラズマ遺伝子検査、ウイルス遺伝子検査、エンドトキシン試験、及び $\beta$ -D-グルカン試験は搬送の影響を受けないことが確認された。一方無菌試験では、現行の搬送法では検体中の標準菌が検出できない場合があり、無菌試験の検体については、試験用培地に直接サンプリングするなどの工夫が必要と考えられた。今

後も定期的なバリデーション試験を実施することにより、検査系の検証を行っていく予定である。

**2-4.** 臨床研究まで行った他のグループとの臍帯血の*ex vivo*培養法を比較することにより、臨床の場での効果の予測を行うことが可能であると考えられる。我々の開発した方法で*ex vivo*増幅した細胞を移植した群では、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。またいずれの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。これらの結果よりNakahata法では他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。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、検討を行う予定である。

### III. 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

**3-1.** 適格基準における疾患に移植適応のある骨髄異形成症候群を加えたこと、年齢を55歳まで引き上げたこと、及び臍帯血の基準を $2.7 \times 10^7/\text{kg}$ 以上まで引き下げたこと、さらに移植前処置として骨髄非破壊的レジメンを加えたことにより適応を拡大した。

臨床研究第一例目に関しては、製造にかかる全行程をとくに問題なく施行でき、十分なCD34陽性細胞の増幅が得られた。しかしながら移植後生着が得られず、試験中止とせざるを得なかった。今後は再

度増幅臍帯血の安全性を検討した上で、臨床研究を継続すると同時に、*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、複数ユニットの臍帯血を用いた臨床研究に向けた検討を予定している。

#### IV. 臍帯血 DLI に向けた培養法及び品質管理法の開発

4-1. 培養 Bag を用いることにより最大で総細胞数 52.2 倍、CD3 陽性細胞数 147.5 倍の増幅を得ることができた。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、より臨床応用に適した培養法への改良を進めていく予定である。

#### V. 造血幹細胞の自己複製期所の解明

5-1. 臍帯血 CD34 陽性細胞をサイトカイン添加無血清培地にて培養し、paired daughter cells assay により検討を行った結果、 $\beta$ -catenin はヒト CD34+細胞が CD38-から CD38+へと分裂、成熟し、さらに分化していく過程において、CD38-細胞の分裂を抑制すると同時に CD38+細胞の分化の方向性を骨髄球系から赤芽球、巨核球系へと変化させていると考えられた。またマウス骨髄細胞を用いた検

討から、成体内においても内因性の  $\beta$ -catenin が骨髄球系、及び赤芽球、巨核球への分化に必須の転写因子の活性を制御し、前駆細胞からの血球分化を調節している可能性が示唆された。

今後は異種移植の系を用いて、内因性の  $\beta$ -catenin の活性化が骨髄再建能、さらにはその後の血球分化に及ぼす影響について検討を行う予定である。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。

#### D. まとめ

本年度、これまでの総合的な基礎研究、基盤整備を背景として、臨床研究を開始した。また我々が確立した細胞プロセッシング法、品質管理法の検証を行い、その有用性、及び安全性を確認した。

本研究を含め、幹細胞を利用した再生医療に関しては、「ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について」(医薬発第 1314 号、厚労省医薬安全局長通知)、「トランスレーショナルリサーチ実施にあたっての共通倫理審査指針」、さらには 2006 年 9 月 1 日「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」が厚生労働省から施行され、わが国におけるヒト幹細胞臨床研究のあり方、方向性が示されたといえる。しかしながら現状の法体系や指針の枠組みの中で、円滑に研究を進めていくため

には、治療用細胞製剤の品質管理方法一つをとっても、その項目、規格値設定等未だ多くの解決すべき課題が残されている。

今後は臨床研究を推進させると同時に、治療用細胞製剤をいかに安全に臨床応用すべきかについて具体的に示す先駆的な研究として、我々が開発した細胞プロセッシング法、品質管理法を普及、発展させること、さらにはわが国のトランスレーショナルリサーチにおける問題点を明確にし、その解決策を示していくことを目標として研究活動を継続する予定である。

#### **E. 健康危険情報**

特筆すべき事項なし

#### **F. 研究発表**

研究成果の刊行に関する一覧表参照

#### **G. 特許**

特筆すべき事項なし



### Ⅲ. 平成19年度 分担研究報告書

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

1. GMP 及び GTP に準拠した培養法の確立

1-1 ex vivo 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究

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：初山 麻子

(先端医療センター 血液再生研究グループ 技術員)

研究要旨

本分担研究では、*ex vivo* 増幅臍帯血の製造法の確立に関する研究の一環として、新規無血清培地ならびに新規培養バッグ（Nipro 社製）の開発を行い、各々の性能評価において既存の製品よりも良好な臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅効果が得られることを示してきた。

本年度は、これら新規資材を *ex vivo* 増幅臍帯血の実製造法に応用することを目的として、CD34 陽性細胞の増幅効果を中心に引き続き検討を行った。

無血清培地に関しては、改良の結果 12 日間の plate 培養により総細胞数 1361 倍、CD34 陽性細胞数 347 倍の増幅が得られるようになった。さらに無血清培地において増幅した細胞を NOD/SCID mouse に移植した場合、未処理 CD34 陽性細胞を移植した場合と比較して、移植後 8 週目の骨髄で有意に高いヒト血球キメリズムが得られた。

さらに新規無血清培地と培養バックを用いて現行の製造方法による製造試験を行った結果、新規資材を組み合わせることで、現在使用している資材と比較して 2 倍以上の増幅効果が得られた。しかしながら新たな系では培養 7 日目以降に著しい viability の低下が認められ、今後至適な培養条件(培養日数、希釈回数等)を検討する必要があると考えられた。

## A. 研究目的

治療用細胞製剤の製造を行うにあたっては、使用する原材料の安全性の担保は不可欠である。しかしながら、本邦では安全な細胞培養のための無血清培地や培養バッグが医療用具として認可されておらず、製造にあたっては海外の認可品を輸入し利用しているのが実状である。

本分担研究では *ex vivo* 増幅臍帯血の製造に関わる基盤整備として、含有成分の明らかな無血清培地ならびにポリオレフィン系フッ化処理培養バックの開発を行い、*ex vivo* 増幅臍帯血を用いた臍帯血移植の臨床研究を通じて、これら資材の医療用具化に向け検討を行ってきた。

昨年度までに各々の単独の性能評価において、既存の製品よりも良好な臍帯血 CD34 陽性細胞の増幅効果が得られることを示してきたが、本年度は無血清培地に関しては、開発当初に比べその性能が大きく変化したことを踏まえ、培地の性能ならびに増幅した細胞の再評価を行った。さらにこれら新規資材の実製造への応用に向けた基礎検討として、培地と培養バックとを併せて使用した場合の性能評価を、現行の製造方法による製造試験において行った。

## B. 研究方法ならびに結果

### 1) 無血清培地の性能評価

臍帯血由来 CD34 陽性細胞を 5 種のサイトカイン SCF, TPO, FL, IL-6, sIL-6 を用いて 12 日間の増幅培養を行い、新規無血清培地 (serum Free, S.F) の性能評価を行った。培養の比較対照として有血清培地 10%FCS 添加  $\alpha$ MEM の系 (FCS) をお

いた。

培養には 24well plate を用い、サイトカイン添加培地に浮遊した CD34+陽性細胞が  $1 \times 10^4$ /ml、1well/1ml になるようにトリプリケイトで播種した。培養 6, 9 日目に培地の追加と解析、12 日目に細胞を回収し解析を行った (n=5)。

結果、総細胞の増幅率は S.F が  $1361 \pm 230$  倍、FCS が  $642 \pm 115$  倍であった (Fig. 1)。

また CD45/CD34 の表面抗原解析から換算した結果、CD34 陽性細胞の増幅率は S.F  $347 \pm 86$  倍、FCS  $122 \pm 46$  倍であった (Fig. 2)。

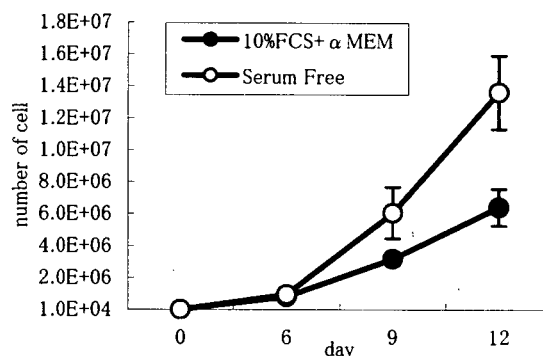


Fig. 1: プレート培養における増殖曲線 (総細胞)

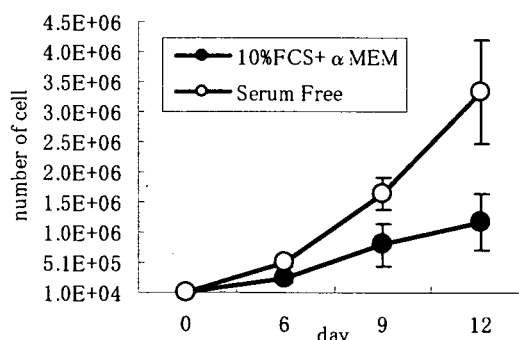


Fig. 2: プレート培養における増殖曲線 (CD34 陽性細胞)

## 2) 増幅した細胞の性能評価

増幅した細胞の短期骨髄再建能を評価するため、致死量の放射線照射をした NOD/SCID マウスに未処理の臍帯血 CD34 陽性細胞 (Unmanipulated CB) を  $1 \times 10^4$ /Mouse 移植した群(n=5)と、1) と同一ロットの無血清培地を用いて  $1 \times 10^4$  の CD34 陽性細胞から増幅した細胞を  $1.3 \times 10^7$ /Mouse 移植した群(n=9)との比較を行った。

移植後 8 週目のマウス骨髄中のヒト血球のキメリズムは S.F  $40 \pm 27.3\%$ 、Unmanipulated CB  $2.1 \pm 3.9\%$ であった(Fig. 3)。

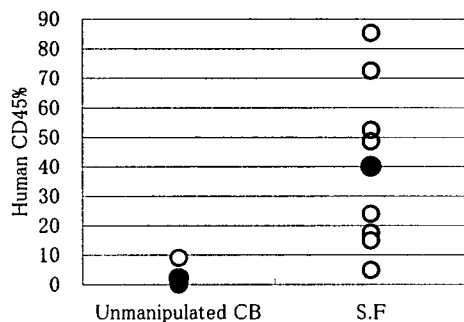


Fig. 3: 移植後 8 週目におけるマウス骨髄中のヒト血球キメリズム

## 3) 製造試験における新規資材の性能評価

次に、新規無血清培地と培養バッグを組み合わせる現行の製造方法による製造試験を行い、総細胞増幅率、CD34 陽性細胞増幅率、およびコロニー形成能について検討した。

既存材料との比較検討は下記の組み合わせで行った。

Bag① Nipro バック/S.F

Bag② Nipro バック/QBSF-60  
(Quality Biotechnology 社製)

Bag③ FEP バック (Afc 社製) / QBSF-60

12 日間の培養の結果、総細胞増幅率は Bag①1049 倍、Bag②707 倍、Bag③386 倍であった(Fig. 4)。

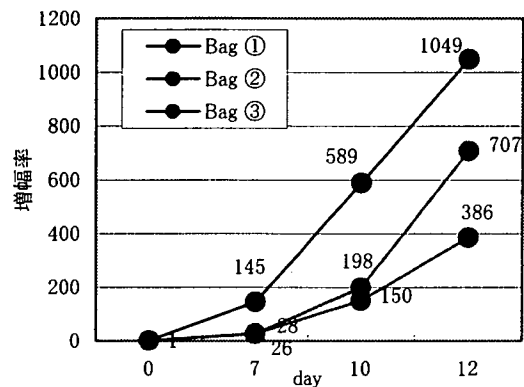


Fig. 4: バッグ培養における総細胞増幅率

また CD34 陽性細胞増幅率は Bag①98 倍、Bag②49 倍、Bag③39 倍であった(Fig. 5)。

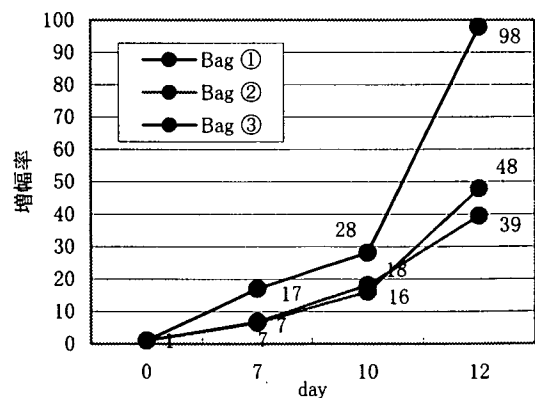


Fig. 5: バッグ培養における CD34 陽性細胞の増殖率

培養 12 日目の単位細胞あたりのコロニー形成能は Bag① $48.8/10^3$ 、