

再生医学のいま

— 基礎研究から臨床への展開に向けて —

— 12 —

臨床応用に向けて — その基盤整備の重要性 —

等井泰成 前川 平*

京都大学医学部附属病院分子細胞治療センター *教授

Summary

再生医療は、人体の失われた機能や組織を再構築するための新しい治療として注目を集めているが、基礎研究の成果をもとに開発された最新の技術を臨床の現場で活かすには「治験」という大きなハードルを超えなければならない。新しい医療技術が開発され、それが一刻も早く臨床で応用されることを願う一方で、再生医療の安全性を確保し高い品質を維持していく管理体制を構築することも肝要である。

はじめに

再生治療や細胞治療など先進的な医療技術が開発され臨床での応用が可能となれば、既存の方法では治療が難しかった疾病に対しても新たな治療戦略が確立されよう(図1)¹⁾。しかし、数多くの基礎研究を経て開発された新しい技術が実際に臨床で応用されるまでには、安全性や治療効果などの評価を得るために「治験」というハードルを超えなければならない。一般的な医薬品の開発では製薬企業が主体となり医療機関に依頼して、いわゆる「治験」が実施されている。また改正薬事法では医師や医療機関が主導で実施する臨床試験についても一定の条件を満たせば治験として扱われることが可能となった。すなわち、「医師主導型治験」と呼ばれるものであり、最新の医療技術を臨床応用するための新しいトラックになると期待される。

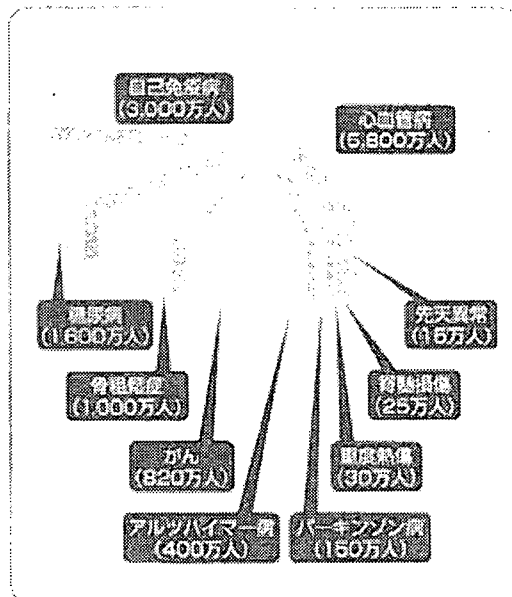


図1 米国において先端医療開発の恩恵にあずかると思われる患者総数の試算 (文献1)より改変)

再生医療で扱われる組織や細胞（以下、再生医療用ヒト細胞）はヒトへ移植されるものであり、医薬品と同様に品質の保証と安全性の確保が必要である。大学病院や研究所などで再生医療用製品の製造（培養や調整など）を行う際には、厳密な品質管理や製造管理が実施できるように専用の施設を設置し、GMP (good manufacturing practice)

に準拠した運用が必要不可欠となる。

わが国における再生医療研究が世界的な開発競争のなかでも勝ち残れるよう、その支援を推進すると同時に、再生医療用ヒト細胞の品質管理および製造管理に関する規制の整備が急務である。

I 再生治療とGMP

GMPは、医薬品や医療機器などの製造管理および品質管理に関する国際基準である。医薬品では、研究開発段階から生産→流通→使用されるまでの一貫した品質の保証管理体制が要求されている。

再生医療用製品のうち細胞や組織加工製品について治験を開始する際に、まず厚生労働省に対して確認申請を出す。細胞や組織の加工とは、疾患の治療や組織の修復または再建を目的として、細胞・組織の人為的な増殖、細胞・組織の活性化などを目的とした薬剤処理、生物学的特性改変、遺伝子工学的改変、非細胞・組織成分とのハイブリッド化、カプセル化などがこの範疇に含まれる。組織の分離や細切、細胞の分離、抗生物質による処理、洗浄などは加工とみなされない。確認申請の内容が承認されれば、厚生労働大臣へ治験計画を届け出ることができる。医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceutical and Medical Devices Agency : PMDA) では委託を受け、これを30日以内に審査して結果を大臣に通知する。必要に応じて治験計画の変更を命じられる場合もある。治験はGCPに従って実施され、また治験で使用される再生医療用ヒト細胞

の製造に関しては治験薬GMPに従った管理が必要となる²⁾。しかし、再生医療で用いられる組織や細胞は一般的な医薬品とは異なる特徴をもつため、細胞の特殊性を理解してさまざまな規制を柔軟に適用させる必要がある。

第I相試験は被験者の安全性を保証することが主たる目的となっているため、用いられる臨床研究新薬 (治験薬) (investigational new drug: IND)の製造にはCGMP (current GMP)に従った品質管理原則を臨床試験でも適用しなければならない。しかし米国では、大学やベンチャー企業で行われている探索的臨床試験研究 (トランスレーショナル・リサーチ: TR) に用いるINDの製造に、市販されている医薬品と同様の規制をかけたのでは開発のスピードが上がらないことが懸念され、FDAが1991年に交付したガイドラインに沿って研究用INDの製造に対して柔軟な指導を行ってきた。さらに2006年1月にはCGMPに従った第I相臨床試験のための生物製剤の製造を支援することを目的とした新しいガイダンス草案がFDAから公表されている^{3,4)}。

II 米国FDAの指針

FDAの新しいガイダンス草案では、第I相臨床

試験に用いられるINDの製造に対する規制は

主として被験者の保護を目的とし、そのうえでヒトでの臨床試験開発の促進を期待している。このガイダンス草案では以下のような提言がなされている。

- 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。
- ② 多種類のプロジェクトが進められる大学などでの細胞プロセッシングセンターの実情を考慮し、明確な区分ができていれば同一施設で多種類のINDを製造することが容認できること。
- ③ 清掃などの管理を的確に実施することで、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。

④ 治験用ヒト由来細胞の製造に関するバリレーションに柔軟性を持たせたこと、などである。

すなわち、第Ⅰ相臨床試験においては、数多くのIND候補のなかから安全性を確保しながら適切なINDを効率よく選び出すために、ある程度自由度を持った運用や適切な基準設定が必要であるとしている。このガイダンスの手順に従えば、基礎研究の成果を基にした探索的臨床試験から再生医療を含む医薬品の開発スピードが増し、より有効的で、より安全性の高い医薬品を、より早く患者に提供することが可能になると期待される。

III 細胞調整に必要な施設

探索的臨床試験や第Ⅰ相臨床試験においては安全性の確保とともに、効率よく開発を進めることが要求される。探索的臨床試験では大学や研究所など規模の小さな施設において再生治療用ヒト細胞の製造が行われることが多く、そこでは限られたエリアの内でも多くの製品や複数ロットが扱われる場合も想定される。したがって、交差汚染の防止や原料や製品の取り間違いを防ぐために原料、資材、製造中間体、そして製品などの保管管理にも十分な配慮が必要となる。これらの要件を満たしながら、医薬品と同

等の品質管理と安全性の確保を高い水準で維持するために必要とされる製造施設の基準は、治験薬GMPで求められている治験薬製造施設の構造設備に関する基準などを参考にして設定する必要がある³⁾。以下にその基準の主な内容を示す。

- 作業所のうち作業室または作業管理区域は、重要区域、直接支援区域、そのほかの支援区域に区分けされており、無菌操作を行うため清浄度レベルが常に維持されている（各区域の清浄度レベルは表1を参照）。
- 無菌室には、専用の前室を付設し、通常当該

表1 作業管理区域の清浄度レベル

名称	清浄度レベル grade	最大許容微粒子数/m ³		USP<1118>の規格	主な作業内容
		非作業時 0.5μm以上	作業時 0.5μm以上		
無菌操作重要区域 (層流作業区域)	A	3,530	3,530	クラス 100	開放系調整操作
無菌操作直接支援区域 (非層流作業区域)	B	3,530	353,000	クラス 10,000	閉鎖系調整操作、 二次更衣
その他の支援区域	C	353,000	3,530,000	クラス 100,000	組織や細胞の保管、 資材保管、一次更衣
その他の支援区域	D	3,530,000	※	(対応する規格なし)	モニタリング、 資材などの受け入れ

※：作業形態により、この区域の許容微粒子数は異なる。

前室を通じてのみ作業室内に出入り(ただし、一方向性が原則)できるような構造のものとし、かつ、その前室の出入口は屋外に直接面していない。

- 作業所のうち作業室または作業管理区域は、製造する無菌製品の種類、剤型および製造工程に応じ、適切な温度、湿度および清浄度を維持できる構造および設備を備えている。
- 温度、湿度、室圧などの環境条件の監視測定を行うための設備を有する。
- 製造施設の構造設備は、円滑かつ適切な作業を行うのに支障のないよう配置されており、清掃および保守が容易である。
- 作業室は、製造する製品の種類、物性および製造工程に応じ、塵埃または微生物による汚染を防止するのに必要な構造および設備を有している。
- 原料や製造中間体などが飛散しやすく、交叉汚染することによりほかの製品に重大な影響を及ぼすおそれのある場合には、それぞれの作業室を分離し、かつ、空気処理システムを別系統にしなければならない。
- 天井、壁および床の表面は、消毒液などによる洗浄に耐える素材で作られている。
- 作業室は、粒子がたまったり気流を妨げたりする可能性のある凹凸構造や、窓、扉周りな

どの横棧のない構造である。

- 設備および器具は、滅菌または消毒が可能な素材で作られている。
- 重要区域においては、製品および重要表面の無菌性を維持するような気流パターンとなっている。
- 異なる清浄度レベルの区域間にはエアロックを設置し適切な室間差圧を維持している。
- 作業室は、作業員以外の者の通路とならないように造られている。
- 複数のロット、または異なる製品が同一作業室で製造される場合には、製品の製造設備が専用かつ閉鎖式である。
- 原料、資材、中間製品および製品を区分して、衛生的かつ安全に貯蔵するために必要な設備を有している。
- 貯蔵設備は、恒温装置、自記温度計そのほか必要な計器を備えたものである。
- 原料、資材および製品の試験検査に必要な設備および器具を備えている。
- 設備や機器類は適切な間隔で点検が行われ、計器類は定期的に校正が行われている。

これらの基準を満たすためには専用の細胞調整施設 (cell processing center : CPC) の設置、またはGMPに準拠したアイソレーターの導入が不可欠となる。

IV わが国の現状

探索的臨床試験で用いられる研究用の再生医療用製品の製造様式は多様かつ特殊であり、その特徴に応じた適切な対応が必要である。開発段階に応じた「規制」は安全性の確保と同時に先端医療開発の推進力ともなりうるであろう (stepwise approach の必要性) (図2)⁶⁾

薬事法の改正により、医師や医療機関が主導

して行う臨床試験についても一定の条件を満たせば「治験」として位置づけられることが可能となった。この医師主導型治験により、臨床試験で用いられる最新の技術を迅速に医薬品や医療機器として承認申請に反映できるようになった。2006年9月からは「ヒト幹細胞を用いる臨床試験に関する指針」⁷⁾が施行されている。再生医療の

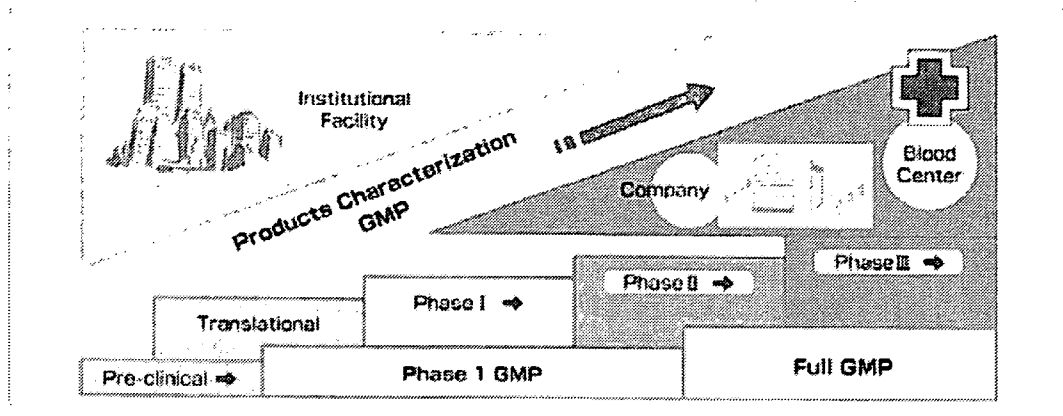


図2 stepwise approachの概念

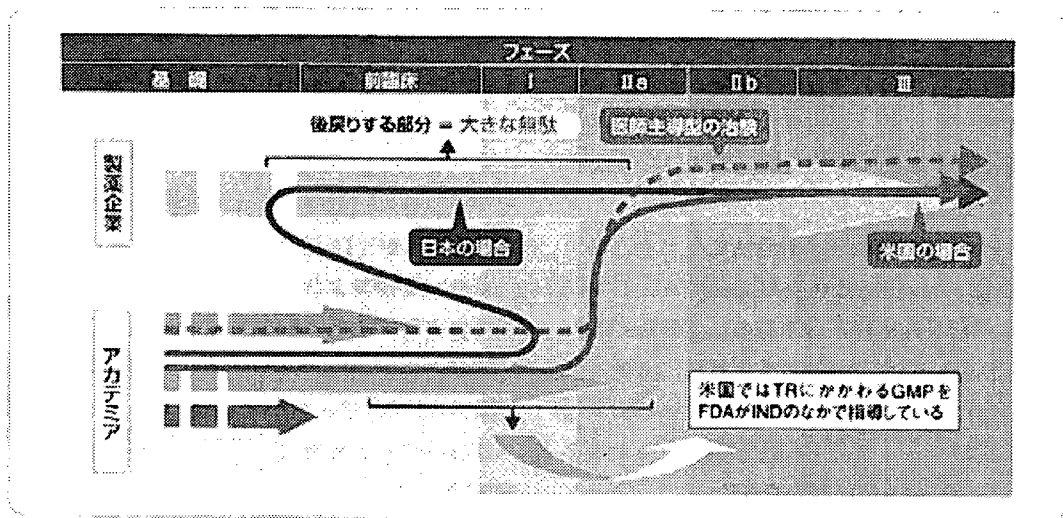


図3 臨床研究と治験システム 日米の比較

治療試験で用いられる細胞などの調整にかかわる規制の一つであるが、この指針のなかで細胞の調整機関に関する基準は治験薬GMPに準ずることが要求されている。これはFDAのガイドラインと同様に、市販される医薬品に対する厳密なGMPではなく、再生医療用ヒト細胞の安全性を確保しながら臨床試験をスムーズに進められるよう開発段階に応じた規制の内容となっている。

また、米国ではTRの段階からどんな臨床試験であってもINDとしてFDAが把握し品質管

理についても指導を行っているため、有望な結果が得られれば、その後第II相、第III相臨床試験へと移行できる。しかし、わが国では大学などで適切な品質管理がなされていない「院内製剤」を用いて行われる臨床試験について、たとえ良好な結果が得られても、保険取裁可能な新しい医療技術とするためには、前臨床試験の段階に戻って安全性の検証からやり直さなければならない。この大きな無駄をなくさなければ技術開発のスピードアップは期待できない(図3)⁹⁾。さ

らに米国CBER(生物製品評価研究センター)に比べ、わが国のPMDAの生物系審査部担当官の数は驚くほど人数が少ない。今後わが国でも申

請件数が増大することが予測されるためさらなる審査体制の強化が望まれている⁶⁾。

おわりに

再生医療に関する研究の開発スピードを上げるとともに、再生医療にもちいられる組織や細胞の安全性を確保していくことが求められている。わが国において再生治療にかかわる規制の整備と支援体制の構築は急務である。実際、厚生労働省およびPMDAがその支援体制を整えている最中である。開発研究を行っているアカデミアや研究所、それにベンチャー企業などとの

コミュニケーションを十分に図ることが肝要であり、ヒト細胞を用いたGMPに準拠した環境を整えることが不可欠である。そのなかで、「医師主導型治験」は、基礎研究で培われた最先端の再生医療を臨床へ橋渡しをする新しいトラック、すなわち日本版INDシステムとして確立されてゆくことが大いに期待される。



参考文献

- 1) Perry D: Patients' voices: the powerful sound in the stem cell debate. *Science*, 287(5457): 1423, 2000.
- 2) 田中克平: 薬事法改正等の解説。再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性(大串 始 監修), シーエムシー出版, 東京, 239-254, 2007.
- 3) FDA, CDER. Guidance for Industry: INDs—Approaches to complying with CGMP During Phase I. CBER, January 2006 (<http://www.fda.gov/cder/guidance/6164dft.htm>)
- 4) 江崎幸子, 村山敏典, 西川昭子, 笠井泰成, 川真田伸, 中村憲正, 福島雅典, 前川 平: 産業界のためのガイドライン, INDs—第1相試験におけるCGMPに準拠したアプローチ(邦訳). *臨床評価*, 33(3): 603-624, 2006.
- 5) 治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備基準(治験薬GMP)について。(平成9年3月31日 薬発第440号)
- 6) 前川 平: 探索的臨床試験に求められるGMP基準とは. *臨床評価*, 33(3): 625-627, 2006.
- 7) ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針。(厚生労働省 平成18年7月3日) (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2006/07/dl/s0727-4l.pdf>)
- 8) 笠井泰成, 中川陽子, 佐藤玲子, 戸原英司, 木村晋也, 前川 平: 再生医療分野における海外動向。再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性。大串 始(監修), シーエムシー出版, 東京, 288-303, 2007.
- 9) 田中克平: 医薬品医療機器総合機構と再生医療の今後—私案も含めて—, *再生医療*, 5, 50-59, 2005.

8. 本邦における安全な細胞療法の実施に向けて

笠井 泰成¹⁾・前川 平²⁾
Kasai Yasunari Maekawa Taira

京都大学医学部附属病院 分子細胞治療センター¹⁾主任²⁾センター長

Summary 現在、ヒト由来の細胞・組織を用いた再生医療や細胞治療などの開発が急速に進んでいるが、これらの開発を進めていくなかで、治療に用いられる細胞や組織の高い品質を維持し、安全性をいかに担保していくかは重要な課題のひとつである。また、細胞プロセッシングに関わる法制度の整備も急務とされ、厚生労働省からは細胞治療に関わる指針などが相次いで発表され施行されている。わが国においても細胞治療の開発を推進させるとともに、その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述べてみたい。

はじめに

細胞治療に用いられる細胞・組織などはヒトあるいは動物由来の細胞・組織を加工した医薬品または医療機器のいずれかに定義される。これらを細胞治療に用いる医薬品や医療機器として企業が開発しようとする場合、わが国では薬事法の下でその製造管理や品質管理を行うことになる。しかし、細胞治療に用いられる細胞・組織などの種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、臨床試験や治療を開始する段階において細胞や組織の安全性および機能の評価方法が必ずしも確立されているとは限らない。細胞治療に関わる臨床試験や治療が進められていく中で、そこで使用される細胞や組織の安全性の確認や機能の評価に必要な

技術を開発して行くことも必要となる。

臨床試験や治療において被験者の安全性を保証することは最も重要なことである。研究成果を臨床の現場に還元し、細胞を用いた新しい治療法を広く国民に提供して行くには、先端医療開発の推進力を高めるとともに、開発の初期段階では安全性を確保しながら柔軟な規制の下で研究開発を支援していく環境の整備が不可欠である。開発段階に応じたGMP、いわゆる phase 1 GMP (われわれが提唱してきた、細胞治療用に特化した institutional GMP (iGMP) と同様の概念) を考慮することも必要となってくる (図1)^{1, 2)}。現在、厚生労働省から出されている指針や指導内容から、安全な細胞治療を開発してゆくために必要なポイントをまとめてみた。

iGMP (institutional GMP)

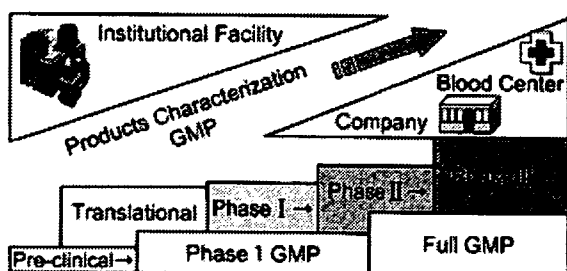


図1 Phase 1 GMPで提唱されているstepwise approachの概念

詳細は本文参照。

1. 品質評価のポイント

治験を開始するまでに必要な確認申請では、製品の特性解析が適切に実施され、一定の品質と安全性が担保されるために適切な規格が設定されているかが評価される。しかし、確認申請の段階で必要な規格を決定することが困難な場合には、その時点で得られている品質および安全性に関するデータ、または関連する情報を基に暫定的な規格値を設定する方策も考えられる。

組織や細胞を利用した製品では、通常の医薬品と異なり加熱や濾過などにより細菌やウイルスなどの感染性物質を不活化または除去することが困難であるため、原料の入手から製品の出荷に至るまで交差汚染防止の対策が重要となる。とくに同種細胞の場合、ドナースクリーニングとしてHBV (hepatitis B virus), HCV (hepatitis C virus), HIV (human immunodeficiency virus), HTLV (human T cell leukemia virus) や、必要に応じてパルボウイルスB19、サイトメガロウイルスやEB (Epstein Barr) ウイルスについて、血清学的検査あるいはPCR法などで検査を行う必要がある。ただし、これらのウイルス検査では、高感度な検査方法を用いても検出できないウィンドウ期

HBV (hepatitis B virus) HCV (hepatitis C virus) HIV (human immunodeficiency virus)
HTLV (human T cell leukemia virus) EB (Epstein Barr)

があることから、適切な時期に再検査を行うことも必要である。また、細胞プロセッシング(細胞の培養や組織の分離などの操作)に用いられる培地や試薬などが最終製品の中に不純物として残留する可能性がある場合には、不純物の量が製品の品質や安全性にどのような影響を及ぼすのかを検討しておくことも必要である。

細胞治療に用いる細胞・組織とともに最終製品の一部を構成する組織・細胞以外の原材料(カプセルやマトリックスなど)がある場合には、その原材料の品質および安全性に関する情報と、その原材料と移植される組織・細胞との相互作用が移植細胞自体に及ぼす影響についても明らかにしておくことが必要である。

治験において被験者の安全性を確保することは最も重要なポイントであり、特に感染性物質や不純物の評価に関する適切な情報が確認申請では求められる^{3, 4)}。

2. 品質管理上の課題

一般的な医薬品製造の場合、一定の品質を有する製品を恒常的に生産するためにバリデーション(評価と検証)を受けた製造工程の中で品質管理がされている原材料を用いて生産が行われる。しかし、細胞治療で使用される組織や細胞のプロセッシング過程では、(1)原料となる細胞や組織の個体差が大きい、(2)感染性物質の不活化、不純物の除去が困難、(3)細胞や組織の機能評価あるいは品質指標の設定が難しい、(4)製品の製造後、直ちに移植されることが多く、移植までにすべての検査結果が得られない場合もあるなどの特徴があり、一般の医薬品以上に品質管理の難しさがある。しかし、細胞治療の実用化を目指すためには、その時点の技術水準を反映した合理的根拠に基づ

いた手法によって、製品の品質管理と安全性の確認を行うことが望まれる。

原料となる細胞や組織の個体差によって、最終製品の規格や工程内試験の試験結果の値がばらつく場合があるが、目的とする細胞の種類、純度、細胞の本質的な特性などが失われていないことが必須である。また、原材料由来ではあっても、目的以外の細胞の混入や工程由来の不純物（酵素や培地に添加されている成長因子など）については、製造工程内で除去できるようなプロセスを設け、不純物除去のバリテーションを行うこと、および残留物が安全上問題のないことを評価できる規格や試験方法を設定する必要がある³⁾。

感染物質の汚染を防止するためには、原料の受入から製造工程を経て最終製品の出荷、そして移植が行われるまでの各工程での原材料や製品の管理が重要となる。特に製造工程では細胞プロセッシング専用の施設を利用することが不可欠であり、臨床試験においても製造作業施設の構造設備に関しては治験薬 GMP で求められているレベルの施設を使用しなければならない^{5, 6)}。詳細については後述する。

細胞や組織を利用した製品の特性や品質解析には、生化学的あるいは免疫学的生産物の測定、形態学的特徴、細胞表面マーカーなどによる確認などの手法が用いられるが、さらに有効な細胞や組織の機能評価を行うためには、臨床試験の進行とともに品質や安全性に関連する適切なパラメータを探索する必要がある⁷⁾。

製品の出荷時には無菌検査やマイコプラズマ否定試験、エンドトキシン測定などが必須の項目だが、製造後直ちに出荷され移植される製品では検査結果が後追いになる場合がある。もし、移植後に出た検査結果で無菌性やマイコプラズマなどが否定できなかった場合には、適切な対応処置が迅速に実施できるよう事前に対応策などを取り決めておく必要がある。

その他、異種動物由来細胞・組織を製造する場合は、「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針について（平成 14 年 7 月 9 日、医政研発第 0709001 号）」に従いドナースクリーニングを行う。また、フィーダー細胞に関しては「異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針」に基づく 3T3 J2 株及び 3T3 NIH 株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針について（平成 16 年 7 月 2 日、日医政研発第 0702001 号）」に従い品質管理を行う必要がある⁷⁾。

3. 細胞調整を行う施設の基準

探索的臨床試験や第 I 相臨床試験においては、安全性の確保とともに、効率よく開発を進めることが要求される。探索的臨床研究では大学や研究所などの比較的規模の小さな施設において細胞プロセッシングが行われることが多く、そこでは限られたエリア内で多くの製品や複数のロットが扱われる場合も想定される。このような環境では、交差汚染の防止や原材料などの取り間違いを防ぐために、原料、資材、製造中間体、そして製品などの保管管理にも十分な配慮が必要となる。これらの要件を満たしながら、医薬品と同等の品質管理と安全性の担保を高い水準で維持するために必要とされる製造施設の基準は、治験薬 GMP で求められている製造施設の構造設備に関する基準などを参考にして設定する必要がある⁸⁾。例えば、以下のような条件を満たすように要求されている。

- ・作業管理区域は 4 段階のゾーニングが施され、無菌操作が行える環境を維持する（各区域の清浄度レベルと環境微生物の評価基準は表 1 と表 2 を参照）。
- ・無菌室には専用の前室を附置し、通常当該前室を通じてのみ作業室内に出入りできるような構造とする。

表1 無菌医薬品製造のための空気清浄度

名称	清浄度レベル Grade	最大許容微粒子数/m ³		USP <1116>の規格	主な作業内容
		非作業時 0.5µm以上	作業時 0.5µm以上		
無菌操作重要区域 (層流作業区域)	A	3,530	3,530	クラス 100	開放系調整操作
無菌操作直接支援区域 (非層流作業区域)	B	3,530	353,000	クラス 10,000	閉鎖系調整操作、 二次更衣
その他の支援区域	C	353,000	3,530,000	クラス 100,000	組織や細胞の保管、 資材保管、一次更衣
その他の支援区域	D	3,530,000	(*)	(対応する規格なし)	モニタリング、 資材などの受け入れ

*1 作業形態により、この区域の許容微粒子数は異なる。

表2 環境微生物の評価基準^{*1}

グレード	空中微生物数 ² (CFU/m ³)	最小空気採取量 (m ³)	接触付着微生物数 ³	
			機器 設備	手袋
(CFU/24×30cm)				
A	<1	0.5	<1	<1
B	10	0.5	5	5
C	100	0.2	25	—
D	200	0.2	50	—

*1 各条件における平均許容上限値を示す。

*2 スリットサンプラー法又は同等の微生物捕集性能を有する方法を用いての値。

*3 コンタクトプレート(直径約5.4~6.2cm)当たりに現れる生菌数を示す。拭き取り法を用いる場合には、25cm²当たりの表面積の換算値とする。手袋の場合は、通常、5指をプレートに押捺。

(第15改正日本薬局方より引用)

- ・作業室又は作業管理区域は、製造工程に応じて適切な温度、湿度及び清浄度を維持できる構造及び設備を備えている。
- ・温度、湿度、室圧等の環境条件の監視測定を行うための設備を有している。
- ・製造施設の構造設備は、円滑かつ適切な作業を行うのに支障のないよう配慮されており、清掃及び保守が容易である。
- ・作業室は、塵埃または微生物による汚染を防止

するのに必要な構造及び設備を有する。

- ・原料や製造中間体などが飛散しやすく、他の製品に影響を及ぼすおそれのある場合には、それぞれの作業室を分離し、かつ空気処理システムを別系統にする。
- ・天井、壁及び床の表面は、消毒液等による洗浄に耐える素材で作られている。
- ・作業室は、粒子が溜まったり気流を妨げたりする構造でないこと。

- ・重要区域においては、製品及び重要表面の無菌性を維持するような気流パターンとなっている。
- ・異なる清浄度レベルの区域間にはエアロックを設置し、適切な室間差圧を維持している。
- ・複数のロット、または異なる製品が同一作業室で製造される場合には、製品の製造設備が専用かつ閉鎖式である。
- ・原料、資材、中間製品及び製品を区分して、衛生的かつ安全に貯蔵するために必要な設備を有している。
- ・貯蔵設備は、恒温装置、自記温度計その他必要な計器を備えたものである。
- ・原料、資材及び製品の試験検査に必要な設備及び器具を備えている。
- ・設備や機器類は適切な間隔で点検が行われ、計器類は定期的に校正を行う。

おわりに

現在、ヒトまたは動物由来の成分を用いた細胞療法に関わる指針として「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：平成12年12月26日）」がその規制の中核となっているが¹⁾、

平成19年9月には自己由来に限定した細胞・組織加工製品などの品質および安全の確保に関する指針案が厚生労働省から提示され、パブリックコメントの募集が行われた。今後、細胞療法の安全性を高めるために、様々な角度から適切な規制の整備も進められて行くであろう。

文 献

- 1) 前川 平：探索的臨床試験に求められるGMP基準とは。臨床評価 33 (3) : 625-627, 2006
- 2) 笠井泰成, 中川陽子, 松岡玲子, 芦原英司, 木村晋也, 前川 平：再生医療分野における海外動向。再生医療に用いられる細胞・再生組織の評価と安全性 (大串 始 監修), シーエムシー出版, 東京, pp.288-303, 2007
- 3) 安藤 剛, 鹿野真弓, 田中克平：細胞組織利用製品の評価の視点。再生医療 5 : 22-26, 2005
- 4) 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：平成12年12月26日)
- 5) ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針 (厚生労働省：平成18年7月3日)
- 6) 治験薬の製造管理及び品質管理基準及び治験薬の製造施設の構造設備基準 (治験薬GMP) について (薬発第480号：平成9年3月31日)
- 7) 福永悟史, 鹿野真弓, 田中克平, 早川亮夫：細胞組織利用製品の品質確保。再生医療 5 : 27-32, 2005



Potential of dendritic cell immunotherapy for relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, shown by WT1 peptide- and keyhole limpet hemocyanin-pulsed, donor-derived dendritic cell vaccine for acute myeloid leukemia

Toshio Kitawaki,¹ Norimitsu Kadowaki,^{1*} Tadakazu Kondo,¹ Takayuki Ishikawa,¹ Tatsuo Ichinohe,¹ Satoshi Teramukai,² Masanori Fukushima,² Yasunari Kasai,³ Taira Maekawa,³ and Takashi Uchiyama¹

Induction of leukemia-specific immune responses is a promising treatment for acute myeloid leukemia. A 58-year-old woman received Wilms' tumor 1 (WT1) peptide- and keyhole limpet hemocyanin (KLH)-pulsed, donor-derived dendritic cell (DC) vaccination for AML relapse after allogeneic stem cell transplantation. The vaccination induced immune responses to the naïve antigen KLH, whereas definitive immune responses to WT1 were not detected. Leukemia gradually progressed despite of vaccination. This study indicates that DC vaccination can induce an antigen-specific immune response in a patient after allogeneic stem cell transplantation, thus representing a viable strategy to induce antigen-specific immune responses in such patients. Am. J. Hematol. 00:000–000, 2008. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Introduction

A graft-versus-leukemia (GVL) effect is the main mechanism by which allogeneic stem cell transplantation (allo-SCT) eliminates residual leukemic cells. The GVL effect is also exploited in donor lymphocyte infusion (DLI) for relapse after allo-SCT. However, DLI often provokes graft-versus-host disease (GVHD), because a wide array of allogeneic antigens is targeted. It may be possible to procure a GVL effect without GVHD by inducing immune responses exclusively to leukemia-associated antigens. Wilms' tumor 1 (WT1) is such a promising target for leukemia-specific immunotherapy, because it is expressed in a majority of cases of acute leukemia and is apparently immunogenic as shown by spontaneous immune responses in leukemic patients [1–4], even after allo-SCT [5]. Indeed, clinical trials of WT1 peptide vaccination have shown immunological as well as clinical responses in a substantial number of cases [3,6].

Administration of ex vivo generated, antigen-pulsed dendritic cells (DC) (also called "DC vaccine") is currently under vigorous exploration in clinical trials of tumor immunotherapy. It has been suggested that DC vaccination may be superior to other types of vaccination methods, such as peptide vaccinations and viral vectors, in clinical efficacy for melanoma [7]. Thus, we hypothesized that induction of a WT1-specific immune response by DC vaccination may be effective to treat AML relapse after allo-SCT. We performed a phase I/IIa clinical trial to test safety and immunogenicity of WT1 peptide-pulsed DC vaccination in AML patients who relapsed after allo-SCT. As monocytes from a posttransplant patient have been shown to be defective in the ability to differentiate into DC [8], we used monocytes from the allo-SCT donor as a cellular source of DC. Here, we report the first case in our trial that completed the DC vaccination.

Case Report

A 58-year-old woman was diagnosed as AML FAB M4 with t(11;17)(q23;q25) translocation. Although complete remission (CR) was achieved by chemotherapy with cytarabine and daunorubicin, the leukemia relapsed after 7 months. It was refractory to salvage chemotherapy, and with overt leukemia, the patient underwent reduced-inten-

sity allo-SCT from an HLA-matched sibling donor using a conditioning regimen composed of fludarabine, busulfan, and low-dose (2 Gy) total body irradiation 2 months after the relapse. Tacrolimus and short-term methotrexate were administered for prophylaxis of acute GVHD. The patient established complete chimerism without acute GVHD, and second CR was achieved. However, 3 months after transplantation, the leukemia relapsed. Tacrolimus were discontinued to induce a GVL reaction, but no clinical response or GVHD was observed.

The patient was HLA-A*2402-positive, and met eligibility criteria of the clinical trial, which was approved by the institutional review board of Kyoto University Hospital. DC vaccines were generated at the cell processing facility of Kyoto University Hospital under good manufacturing practice (GMP) conditions. CD14⁺ cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells of the allo-SCT donor by ClinMACS using CD14 Microbeads (Miltenyi Biotec). Fresh monocytes were used for the generation of the first vaccine, and frozen monocytes were thawed and used for the generation of the following cycles of vaccines. The CD14⁺ cells were cultured in RPMI1640 supplemented with 2% plasma of the donor in the presence of 800 IU/ml GM-CSF and 500 IU/ml IL-4. At Day 6, fresh medium containing 2 µg/ml keyhole limpet hemocyanin (KLH) and maturation-inducing factors consisting of 10 ng/ml TNF-α, 10 ng/ml IL-1β, 1000 IU/ml IL-6, and 1 µg/ml prostaglandin E₂ was added. KLH was used to assess the ability of DC to induce

¹Department of Hematology and Oncology, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan; ²Department of Clinical Trial Design and Management, Translational Research Center, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan; ³Center for Cell and Molecular Therapy, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan

*Correspondence to: Norimitsu Kadowaki, Department of Hematology and Oncology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan.
E-mail: kadowaki@kuhp.kyoto-u.ac.jp

Received for publication 6 August 2007; Revised 16 October 2007; Accepted 20 November 2007

Am. J. Hematol. 00:000–000, 2008.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/ajh.21127

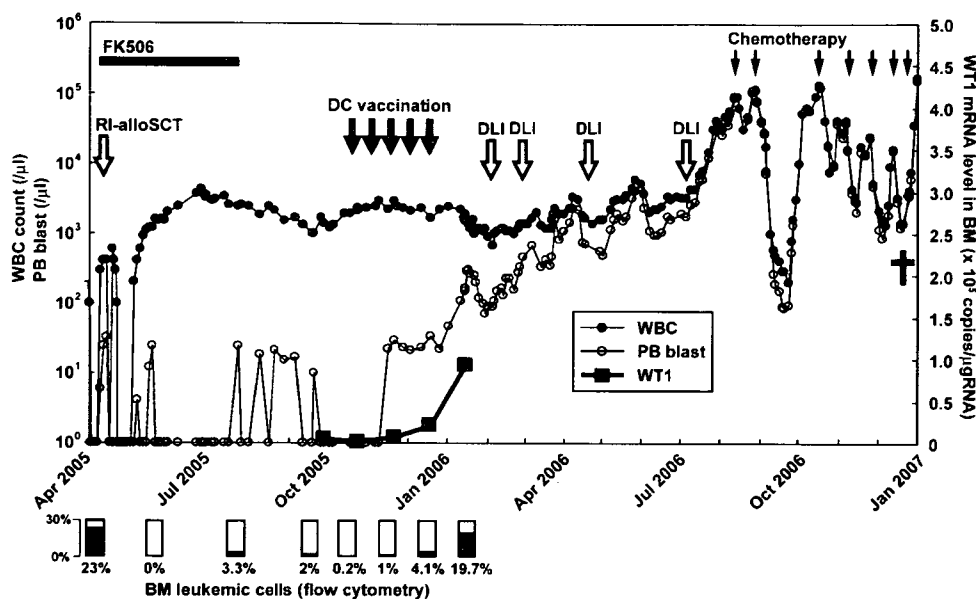


Figure 1. The clinical course of the patient. Starting 6 months after transplantation, the patient was given DC intradermally every 2 weeks for five doses in a dose-escalating manner, starting with 1×10^5 cells, next 5×10^6 cells, and a maximum number of 1×10^7 cells from the third cycle. BM: bone marrow, DC: dendritic cell, DLI: donor lymphocyte infusion, PB: peripheral blood, RI-alloSCT: reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation.

immune responses in a posttransplant patient, and to provide WT1-specific CD8⁺ T cells with CD4⁺ T-cell help. At Day 8, 10 μ M HLA-A*2402-restricted WT1 modified peptide [9] (CYTWNQMNL, residues 235–243), which has tyrosine instead of methionine at the second residue to enhance the affinity to the HLA molecule, was pulsed for the last 4 hr. Then, DC were used for vaccination.

Starting 6 months after transplantation, the patient was given DC intradermally every 2 weeks for five doses (Fig. 1). Local erythema and itching of Grade 2 were observed at the injection sites. There was no GVHD or other adverse reaction of the vaccines. The percentage of leukemic cells and the expression level of WT1 mRNA in the bone marrow gradually increased during and after the vaccinations. Although the patient received DLI and chemotherapy, she died of sepsis 13 months after the completion of the vaccination. We closed the clinical trial only with this case due to difficulty in recruiting eligible patients.

As immunological monitoring, skin DTH tests using donor-derived mature DC pulsed with the WT1 peptide, KLH, or no antigen were performed. Before DC vaccination, there was no DTH reaction to WT1 or KLH. After the fourth vaccination, a strong DTH reaction to KLH-pulsed DC (48 hr after injection, erythema of 30 mm \times 21 mm and induration of 24 mm \times 17 mm) was observed, which was much stronger than the reaction induced by unpulsed DC (erythema of 9 mm \times 9 mm and no induration), indicating that the DC vaccination induced a KLH-specific immune response. The skin reaction to WT1 peptide-pulsed DC was erythema of 12 mm \times 10 mm and induration of 10 mm \times 10 mm. The induction of induration by WT1 peptide-pulsed but not unpulsed DC implies a WT1-specific immune response, although not definitive. The immune response to KLH was also demonstrated by IFN- γ , perforin, and granzyme B ELISPOT assays using unstimulated peripheral blood mononuclear cells (Fig. 2) as well as bone marrow cells (data not shown). However, an immune response to the WT1 peptide was not detected by ELISPOT, using either peripheral blood or bone marrow cells, unstimulated or after in vitro stimulation with the WT1

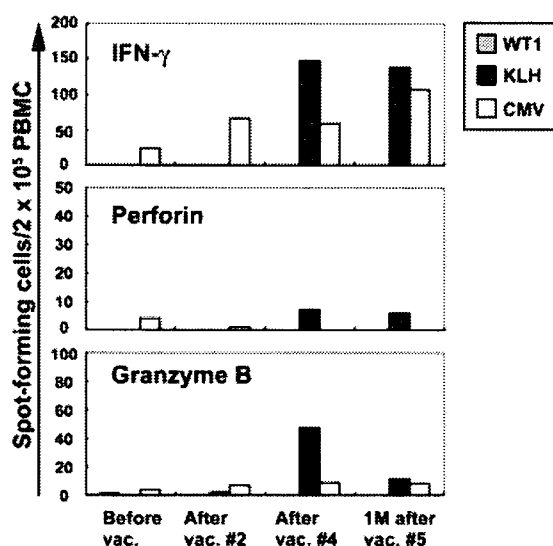


Figure 2. ELISPOT assay for WT1 peptide, KLH protein, and CMV peptide. IFN- γ , perforin, and granzyme B ELISPOT assays were performed using ELISPOT kits (Mabtech). PBMC of the patient were collected and frozen at the indicated time points until use. Donor-derived mature DC were generated from frozen CD14⁺ cells, pulsed with one of the indicated antigens, and used as a stimulator. As a positive control, HLA-A*2402-restricted CMV pp65 peptide (QYDPVAALF) [10] was used. PBMC of the patient were plated at 2×10^5 cells/well with stimulator cells (PBMC: stimulator = 10:1) in 96-well, capture antibody-precoated PVDF plates (Millipore). After 40 hr of incubation, spots were developed using an AEC substrate according to the manufacturer's instructions. Spots were counted by an automated ELISPOT reader (CarlZeiss). The numbers of antigen-specific spot-forming cells were calculated by subtracting the numbers of spots with unpulsed DC. WT1 peptide did not induce a detectable level of specific spots.

peptide for a week. A WT1 modified peptide/HLA-A*2402 tetramer did not detect specific CD8⁺ T cells in peripheral blood and bone marrow, unstimulated or after in vitro stimulation, although the tetramer detected WT1 peptide-specific CD8⁺ T cells from a healthy donor, which were obtained by repetitive stimulation with WT1 peptide-pulsed DC (data not shown).

Discussion

Although responses to vaccination for various infections are impaired after allo-SCT [11], effective antitumor immunity can be elicited by tumor vaccination after allo-SCT in murine models [12–14]. There have been two reports on DC vaccination after allo-SCT in humans. In the first report, four patients were vaccinated with donor-derived DCs pulsed with autologous tumor cells for relapse of leukemia or lymphoma [15]. The injected cell populations contained substantial numbers (~40%) of T cells primed in vitro. Cytotoxicity of T cell lines against autologous tumor cells was observed in vitro in two patients, and decreases in tumor cell numbers in peripheral blood were observed in three patients. However, it is not clear which cells were responsible for the immune responses, T cells stimulated by DCs in vivo or contaminating T cells stimulated by DCs in vitro before injection. In the second report, one patient was vaccinated with donor monocyte-derived DCs pulsed with autologous tumor lysate for progression of renal cell carcinoma after allo-SCT [8]. Neither DTH reaction to DCs pulsed with tumor lysate nor a clinical response was observed. Here, we observed a strong immune response to a naïve antigen KLH added to DCs, as demonstrated by DTH and ELISPOT assays. Thus, this is the first report showing unequivocally that DCs are capable of inducing an antigen-specific immune response, even though the vaccines are administered 6 months after allo-SCT. This indicates that DC vaccination may be a viable strategy for antigen-specific immunotherapy after allo-SCT. Although DCs pulsed with KLH have been shown to induce an immune response in all the healthy individuals [16] and in the majority of melanoma patients [17], it has not been examined whether KLH induces an immune response in posttransplant patients. Our study shows that KLH is also useful to assess the ability of DC to induce immune responses in a posttransplant patient.

DTH tests, which reflect in vivo accumulation of specific T cells at injected sites, might have an advantage in detecting a rare population of T cells over ELISPOT or HLA tetramer assays, which analyze only limited numbers of T cells contained in peripheral blood samples. Indeed, positive DTH tests with negative tetramer staining in peripheral blood have been reported in other vaccination trials [18,19]. We observed the induction of induration in skin DTH using WT1 peptide-pulsed but not unpulsed DC, implying the induction of a WT1-specific immune response. To definitively show specificity to the WT1 peptide, it will be useful to perform in situ tetramer staining or tetramer analysis of lymphocytes liberated from the DTH skin lesion, as recently shown [18].

Absence of clinical efficacy in the present patient may be due to insufficient potency of WT1-specific responses for growing leukemic cells. To obtain clinical efficacy, it may be important to select patients who already have detectable WT1-specific memory CD8⁺ T cells before vaccination, to

develop DC that can induce more potent antileukemic immunity, or to apply DC vaccines to patients with less tumor burden, for example, patients with minimal residual disease or in remission.

Acknowledgments

We thank Dr. Kiyotaka Kuzushima (Aichi Cancer Center, Japan) for providing us with tetramers of HLA-A*2402/peptides from WT1, CMV pp65, or HIV gag protein.

References

1. Scheibenbogen C, Letsch A, Thiel E, et al. CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;100:2132–2137.
2. Rezvani K, Grube M, Brenchley JM, et al. Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8⁺ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:2892–2900.
3. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13885–13890.
4. Rezvani K, Brenchley JM, Price DA, et al. T-Cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: Identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res* 2005;11:8799–8807.
5. Morita Y, Heike Y, Kawakami M, et al. Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Cancer* 2006;119:1360–1367.
6. Mailander V, Scheibenbogen C, Thiel E, et al. Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity. *Leukemia* 2004;18:165–166.
7. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005;5:296–306.
8. Tatsugami K, Eto M, Harano M, et al. Dendritic-cell therapy after non-myeloablative stem-cell transplantation for renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 2004;5:750–752.
9. Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, et al. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:614–620.
10. Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, et al. Efficient identification of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood* 2001;98:1872–1881.
11. Ljungman P, Engelhard D, de la Camara R, et al. Vaccination of stem cell transplant recipients: Recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:737–746.
12. Anderson LD Jr, Savary CA, Mullen CA. Immunization of allogeneic bone marrow transplant recipients with tumor cell vaccines enhances graft-versus-tumor activity without exacerbating graft-versus-host disease. *Blood* 2000;95:2426–2433.
13. Teshima T, Mach N, Hill GR, et al. Tumor cell vaccine elicits potent antitumor immunity after allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Cancer Res* 2001;61:162–171.
14. Moyer JS, Maine G, Mule JJ. Early vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells after allogeneic bone marrow transplantation has antitumor effects. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:1010–1019.
15. Fujii S, Shimizu K, Fujimoto K, et al. Treatment of post-transplanted, relapsed patients with hematological malignancies by infusion of HLA-matched, allogeneic-dendritic cells (DCs) pulsed with irradiated tumor cells and primed T cells. *Leuk Lymphoma* 2001;42:357–369.
16. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, et al. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest* 1999;104:173–180.
17. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, et al. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2001;61:6451–6458.
18. de Vries IJM, Bernsen MR, Lesterhuis WJ, et al. Immunomonitoring Tumor-specific T cells in delayed-type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *J Clin Oncol* 2005;23:5779–5787.
19. Thomas-Kaskel A-K, Zeiser R, Jochim R, et al. Vaccination of advanced prostate cancer patients with PSCA and PSA peptide-loaded dendritic cells induces DTH responses that correlate with superior overall survival. *Int J Cancer* 2006;119:2428–2434.

Potential Target Molecules for *Ex Vivo* Expansion of Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Normal Hematopoiesis

Hirokazu Tanaka^{*1,2}, Itaru Matsumura^{*2}
and Yuzuru Kanakura^{*2}

¹ Department of Regenerative Medicine, Institute of Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan

² Department of Hematology and Oncology, Osaka University Graduate School of Medicine

Abstract

Hematopoietic stem cells (HSCs) are characterized by two distinct abilities, that is, self-renewal ability and multipotency. To keep homeostasis of hematopoiesis and protect exhaustion of HSCs throughout the life, most of HSCs are kept quiescent and only a limited number of HSCs enter cell cycle to supply mature blood cells. Cell cycle state of HSCs is crucially regulated by external factors such as cytokines, adhesion molecules, Notch ligands, and Wnt signals in the bone marrow (BM) microenvironment, so called hematopoietic niche. In addition, intrinsic molecules expressed in HSCs such as transcription factors and cell cycle regulatory molecules also control their growth and differentiation. To utilize HSCs more efficiently and to develop new therapeutic strategies for various diseases, it is of particular interest to expand HSCs *ex vivo*. At present, three clinical studies, in which cord blood HSCs were *ex vivo* expanded by cytokines and transplanted into patients with hematologic malignancies, have been performed. However, the expanded HSCs did not shorten the recovery of hematopoiesis. So, further novel strategies to expand HSCs more efficiently and to fasten hematopoiesis from HSCs are required by modifying the function of the molecules that regulate self-renewal of HSCs.

Introduction

HSCs are characterized by two distinct abilities; self-renewal ability and multipotency. With these activities, HSCs are capable of maintaining a life-long supply of all lineages of hematopoietic cells according to systemic needs. The durability of the output potential of HSCs is believed to be dependent on their ability to execute self-renewal divisions; that is, an ability to proliferate without activation of a latent readiness to differentiate along restricted lineages. *In vivo*, to

* Address correspondence to Hirokazu Tanaka, M.D., Ph.D.
Department of Regenerative Medicine, Institute of Biomedical Research and Innovation, Kobe, Japan.
Address: 2-2 Minatojima-Minamimachi, Chuo-ku, Kobe, 650-0047 Japan. TEL: +81-78-304-5773. FAX: +81-78-304-5774. E-mail: htanaka@fbri.org

maintain homeostasis of hematopoiesis and protect exhaustion of HSC population, most of HSCs are kept quiescent and only a limited number of cells enter cell cycle to supply mature blood cells. During this cell division, HSCs are obliged to undergo self-renewal, differentiation, or apoptosis. This step is controlled by external stimuli transmitted from the bone marrow (BM) microenvironment, including cytokines signals, adhesion molecules, Notch ligands, and Wnt signals. Also, intrinsic factors expressed in HSCs, such as transcription regulators and cell cycle regulatory molecules, are crucially involved in this regulation.

Human umbilical cord blood (CB) is a useful source of HSCs for transplantation. In fact, during the last few years an increasing number of patients have received CB transplants [1]. However, its clinical application is restricted because of the insufficient number of HSCs in each CB sample for most of adult patients. Also, compared with transplantation using HSCs from BM or mobilized into peripheral blood, the recovery of hematopoiesis is rather delayed in CB transplantation, partly due to the insufficient number of transplanted HSCs/hematopoietic progenitor cells (HPCs) and to the persistent quiescence of CB HSCs, which is often accompanied by lethal complications [1]. Therefore, it is of particular interest to expand CB HSC/HPCs *ex vivo* and to develop strategies for hastening hematopoietic recovery after CB transplantation *in vivo* [2-4].

In this paper, we will review recent papers describing molecular mechanisms governing the stemness of HSCs. Also, by referring the results of three clinical trials, in which *ex vivo* expanded cord blood HSCs were transplanted, we will discuss how we can solve the problems observed in these studies by modulating the function of molecules that regulate self-renewal of HSCs.

Characteristic of HSCs

The procedure for the purification of HSCs has made great progress along with the identification of molecular markers that characterize the cells having reconstitution activities in transplanted mice. The most primitive murine HSCs are considered to be

with the CD34^{low/-}c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻ (CD34⁺KSL) phenotype, since a single cell with this phenotype could reconstitute whole hematopoiesis *in vivo* with high probability [5]. In addition to the specific surface phenotype, HSCs present in steady-state adult mouse BM are functionally characterized by their ability to excrete Rhodamine-123 and Hoechst 33342 [6, 7]. When adult mouse BM cells are stained with Hoechst 33342, exposed to the UV light, and examined at 2 emission wavelengths simultaneously, HSCs are found in the rare side population (SP) with the dim fluorescence because of this ability [8, 9]. The low fluorescence of HSCs after staining with Rhodamine-123 and Hoechst 33342 is attributed to their selective expression of different ABC transporters, P-glycoprotein and bcrp-1, respectively [10,11].

In addition, the cells having the strongest dye efflux capacity (Tip-SP cells) with the CD34⁺KSL phenotype were shown to be the most primitive HSCs, which can reconstitute long-term hematopoiesis with almost 100% probability even after the single cell transplantation [12]. The cells in the SP fraction is considered to be in G0 phase, and this state is supposed to be regulated by "hematopoietic niche" in the BM as described later. On the other hand, in steady-state human BM, a majority of HSCs having long-term reconstitution activity express CD34 [13], and the most primitive human HSCs are considered to exist in the population with Lineage (CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, CD20, hCD56, and glycoprotein A)⁻CD34⁺CD38⁻ phenotype [14]. Whereas CD34⁺ has been utilized as a marker of HSCs, recent reports indicated that SRCs (SCID-repopulating cells) are more concentrated in CD133⁺ cells than in CD34⁺ cells [15,16]. That is, Suzuki et al. demonstrated that CB CD133-sorted cells contained an approximately 4.5-fold greater absolute number of SRCs than CD34-sorted cells [17]. Further clinical studies comparing CD34⁺ and CD133⁺ cells would determine which is a better phenotype to collect and evaluate human HSCs.

Cytokines Involved in Stemness Regulation in HSCs

A number of cytokines regulate growth, differentiation, and survival of HSCs both positively and negatively. Among these, stem cell factor (SCF), Flt3 ligand (FL), thrombopoietin (TPO), interleukin-3 (IL-3), and IL-6 are known to promote the growth of HSCs *in vitro* [18-20]. In fact, SI/SI and W/W mice each having homozygous defect in the SCF gene and its receptor *c-kit* gene reveal severe anemia [21]. Also, total number of HSCs was reduced in the BM of *c-mpl* (TPO receptor)-null mice [22]. In addition, *c-mpl*^{-/-} HSCs revealed severely decreased activities in reconstitution assays. These lines of evidence indicate that cytokine signals are required for the growth and survival of HSCs *in vivo* as well as *ex vivo* [23].

TGF- β 1 is a 25 kd protein produced by stromal cells and hematopoietic progenitors, which induces the growth arrest in HSCs in autocrine and/or paracrine manners [24-28]. Using antisense oligonucleotides, it was demonstrated that the inhibition of TGF- β 1 production could release HSCs in the umbilical CB or BM from the quiescent state [29-32]. Furthermore, the inhibition of the TGF- β 1 signaling pathways in human HSCs using blocking antibodies against TGF- β 1 or its receptor allowed quiescent cells to enter cell cycle [33]. TGF- β 1 had been supposed to induce cell-cycle arrest in various cell types including HSCs through cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs), p21^{WAF1} (p21) and p27^{Kip1} (p27) [34-40]. However, a recent paper provided evidence that TGF- β 1 induced growth arrest independently of p21^{WAF1} or p27^{Kip1} using HSCs and progenitor cells lacking both p21^{WAF1} and p27^{Kip1} [41]. As for the other possible mechanism of TGF- β 1-induced growth arrest, TGF- β 1 was reported to induce the expression of the other CKI, p15^{NK4B} (p15), [42, 43] and downregulate the expression of c-Kit, FLT3, and IL-6 receptor on HSCs, thereby disrupting cytokine-dependent growth signals [44, 45].

In contrast, another TGF- β super family protein, bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) was reported to induce self-renewal of HSCs [46].

At present, the utilization of cytokines is the most promising and practical strategy for the *ex vivo* expansion of HSCs. To establish the culture conditions most suitable for expansion of HSCs, a number of investigators have employed various cytokine combinations [47, 48]. When their effects were compared by long-term reconstitution assays in transplanted mice, the combination of SCF, FL, TPO, and IL-6/soluble IL-6 receptor (sIL-6R) was found to expand HSCs most efficiently, with a 4.2-fold increase in SCID-repopulating cells (SRC) [49]. Several patients were already transplanted with cytokine-expanded CB HSCs without serious toxicities as described later [136-138]. However, cytokine-expanded CB HSCs did not shorten the nadir period after transplantation, indicating the limited usefulness of cytokines for *ex vivo* expansion of CB HSCs. Thus, further improvement is necessary to prepare more efficient HSCs [50].

Effects of the BM Microenvironment "Hematopoietic Niche" on Stemness of HSCs

As were the cases with gut and certain skin stem cells [51, 52], HSCs receive critical signals for proliferation and differentiation from the BM microenvironment called "hematopoietic niche" (Figure 1), which consists of stromal cells and the extracellular matrix (ECM) [53-55]. ECM is composed of a variety of molecules such as fibronectin (FN), collagens, laminin, and proteoglycans. ECM in the BM is not merely an inert framework but mediates specialized functions [56-60]. Some components of ECM bind to growth factors produced by stromal cells and immobilize them around cells, which gives spaces where hematopoietic cells and growth factors colocalize. In addition, ECM can bind to glycoproteins expressed on HSCs. FN, collagens, and laminin are ligands for integrins that not only control anchorage, spreading, and migration of HSCs but also activate signal transduction pathways in these cells [56-58, 61].

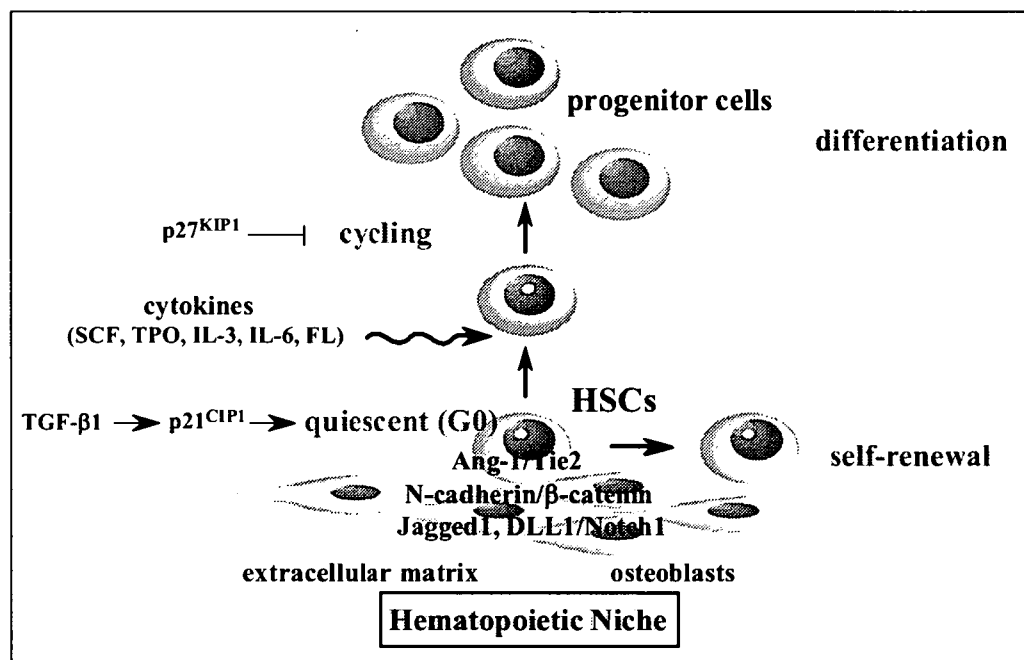


Figure 1. Effects of BM Microenvironment on Cell Cycle of HSCs.

Two groups individually generated mice lacking the BMP receptor type A (BMPRIA) and those engineered to produce osteoblast-specific, activated parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) receptors (PPRs) [62,63]. In these mice, the osteoblast population was found to increase in the specific regions of bone, "trabecular bone-like areas". Also, the increase of the osteoblast population caused the parallel increase of the HSC population, particularly long-term repopulating HSCs. As for this mechanism, Zhang et al. demonstrated that the long-term HSCs were attached to spindle-shaped N-cadherin⁺CD45⁻ osteoblastic (SNO) cells. Two adherent junction molecules, N-cadherin and β-catenin, were asymmetrically localized between the SNO cells and the long-term HSCs, suggesting that SNO cells function as a key component of the niche to support HSCs, and that BMP signaling through BMPRIA controls the number of HSCs by regulating niche size. Meanwhile, in the latter study, Calvi et al. demonstrated that PPR-stimulated osteoblasts produced high levels of the Notch1 ligand, Jagged1, and supported the activity of HSCs through the Notch signaling. Together, these papers indicate

that the interaction with osteoblasts contributes to the maintenance of HSCs.

HSCs expressing the receptor tyrosine kinases, Ties, were quiescent, and the ligand for Tie2, Ang-1, which is expressed on endothelial cells and HSCs, enhanced the quiescence of HSCs and their adhesion to fibronectin and collagen [64,65]. Therefore, it was assumed that the Ang-1/Tie2 signaling pathway plays some role to keep HSCs in quiescent. In accord with this hypothesis, a recent paper proved that Tie2⁺ HSCs were in close contact with sub-endoosteal osteoblasts expressing Ang-1, and that these Tie2⁺ cells were included in SP and in G0 phase of cell cycle [66]. These results suggest that HSCs attaching to the specific osteoblasts in the hematopoietic niche are kept quiescent and protected from the myelosuppressive stress such as the treatment with 5-Fluorouracil (5-FU), a cell cycle-specific myelotoxic agent that kills cycling cells. However, it remains unknown which fraction of osteoblasts expresses Ang-1 and how it is regulated. Furthermore, the molecular mechanisms through which Tie2/Ang-1 signaling prevents cell cycle entry also remain elusive.

Effects of Notch ligand, Wnt, and Sonic Hedgehog (Shh) Signals on Self-Renewal of HSCs

Besides cytokines and molecules consisting of the extracellular matrix, various stimuli such as the Notch ligand, Wnt, and Shh are transmitted to HSCs in the BM microenvironment. The activation of Notch transmembrane receptors expressed on HSCs by their ligand (Delta or Jagged) expressed on stromal cells promotes self-renewal of HSCs [67-71]. Karanu et al. reported that a soluble form of Jagged-1 can enhance the expansion of human CD34⁺ HSCs when added to liquid cultures with SCF, FL, IL-6, IL-3, and G-CSF, indicating the potential usefulness of soluble Jagged-1 for promoting *ex vivo* expansion of HSCs. It was also reported that a soluble form of Delta-like1 augmented cytokine-dependent *ex vivo* expansion of HSCs in CB CD133⁺ cells measured by SRCs [17]. However, since Notch-1 has propensity to induce lymphoid differentiation rather than myeloid differentiation, further studies are required to verify the usefulness and to establish the utility of these approaches. Nonetheless, these strategies would be a promising method to expand HSCs *ex vivo*. As for the critical target molecule of Notch signals that mediates self-renewal of HSCs, we found that c-Myc was transcriptionally induced by Notch [72]. In addition, the ectopic expression of c-Myc induced the growth of HSCs without disrupting their biologic properties in terms of surface phenotypes, colony-forming abilities, and reconstituting abilities. Thus, c-Myc was supposed to play a major role in self-renewal of HSCs as an effector molecule of Notch signals.

Like Jagged1/Notch, a number of Wnt proteins are expressed in the BM and their receptor frizzled was detectable on BM-derived HSC/HPCs [73,74]. In the absence of Wnt-mediated signaling, β -catenin is degraded by the ubiquitin/proteasome pathway. Wnt signaling through frizzled inhibits the degradation of β -catenin, resulting in the accumulation of β -catenin associating with T-cell factor (TCF)/lymphoid-enhancer-binding factor (LEF)-family transcription factors, and these proteins regulate the transcription of downstream target genes. As for the effects of Wnt on HSCs,

purified Wnt3a was shown to expand HSCs isolated from Bcl2-transgenic mice *ex vivo* [75]. In addition to Wnt3a that activates the canonical pathway through Frizzled/ β -catenin/TCF/LEF, non-canonical Wnt, Wnt-5a, was also reported to expand HSCs *in vitro* [76]. However, its mechanisms remain to be clarified. Also, retrovirally expressed a constitutively active form of β -catenin enhanced proliferation of a phenotypically defined murine HSC population [77]. Limiting dilution assays indicated that the induction of activated β -catenin led to over 50-fold increase in HSC numbers after 1-week culture. As for the mechanism of Wnt-mediated proliferation of HSCs, it was demonstrated that the activation of Wnt signaling induced the increased expression of HoxB4 and Notch1 in HSCs. Glycogen synthase kinase-3(GSK-3) is a constitutively active serine-threonine kinase, which form the destruction complex with Axin and adenomatous polyposis coli (APC). Association with this complex leads to ubiquitilation of β -catenin and subsequent proteosomal degradation. Recently, Trowbridge et al. reported beneficial effects of post transplantation treatment with an ATP-competitive GSK-3 inhibitor on human HSC engraftment [78]. These reports suggested that Wnt signaling is important for the *in vitro* and *in vivo* self-renewal of HSCs. However, it is also reported that constitutive activation of β -catenin enforced cell cycle entry of HSCs, thereby, exhausting the long-term repopulating cell pool and leading to hematopoietic failure associated with loss of multilineage differentiation [79,80]. Therefore, fine-tuned (in terms of expression level and duration) Wnt stimulation is required for normal hematopoiesis and critical for therapeutic HSC expansion.

Shh is a family member of human homologs of *Drosophila* Hedgehog (Hh) and expressed on the cell surface as transmembrane proteins. Hh signals can be mediated through cell-to-cell contact between adjacent cells expressing the Patched (Ptc) receptor. Alternatively, NH₂-terminal cleavage of Hh can generate a soluble Hh ligand that can interact with distal cells expressing Ptc [81,82]. In the BM, Shh and their receptors Ptc and Smoothed (Smo) are expressed in highly purified HSCs. Cytokine-induced proliferation of HSCs was

inhibited by the anti-Hh Ab, implying that endogenously produced Hh proteins play a role in the expansion of HSCs. Conversely, the addition of soluble forms of Shh increased the number of HSCs with pluripotent repopulating abilities. In addition, Noggin, a potent BMP-4 inhibitor, was found to inhibit the mitogenic effects of Shh, indicating that Shh signaling acts upstream of BMP-4 signaling in the proliferation of HSCs [83].

Transcription Factors That Regulate the Stemness of HSCs

In addition to extrinsic factors, accumulated evidence indicates that the stemness of HSCs is regulated by intrinsic transcription regulatory factors, such as c-Myc, c-Myb, GATA-2, HOX proteins, and Bmi-1 (Figure 2).

Willson et al. provided genetic evidence for function of c-Myc in the homeostasis of HSCs [84]. c-Myc-deficient HSCs bound to the BM niche too tightly and revealed impaired differentiation, which was correlated with the up-regulation of N-cadherin and a number of adhesion receptors, suggesting that c-Myc was required for the release of HSCs from the stem cell niche. In accord with this finding, endogenous c-Myc is differentially expressed and induced upon differentiation in long-term HSCs. Thus, c-Myc was assumed to control the balance between stem cell self-renewal and differentiation, presumably by regulating the interaction between HSCs and their niche.

A transcriptional factor, c-Myb promotes the growth of HSCs, probably through the induction of *c-myc* and upregulated expression of *c-kit* and *Flt3* [85,86], and c-Myb-deficient mice die at embryonic day 15.5 (E15.5) due to the defect of definitive hematopoiesis [87]. Similarly, GATA-2^{-/-} mice are embryonic lethal around E11.5 because of the defect in the development and/or maintenance of HSCs [88]. However, since functional roles of GATA-2 in the growth of HSCs are still controversial [89-92], it remains unknown whether GATA-2 by itself enhances or suppresses the growth of HSCs.

Among Hox family of transcription factors, HOXB4 is of particular remark during the last few

years because its retroviral gene transfer induced ~40-fold murine and ~30-fold human HSC expansion *ex vivo*, suggesting its usefulness in clinical application [93-95]. Regarding its clinical use, it was initially concerned that constitutive expression of HOXB4 in HSCs might cause leukemia. This is because deregulated expression of HOXB8 was found in myeloid leukemia, and HOX family genes are sometimes involved in leukemogenic chromosomal translocations such as t(7;11)(p15;p15) yielding NUP98-HOXA9 [96,97]. However, HSCs engineered to express HOXB4 reconstituted all hematopoietic lineages in transplanted mice without causing leukemia, indicating that HSCs overexpressing HOXB4 were still under the control of hematopoietic system *in vivo* [94]. However, very recently, HOXB4 overexpression in collaboration with insertional mutagenesis by virus integration was reported to induce myelomonocytic leukemia in the canine model [98]. Therefore, before clinical application, it is crucial to establish the safe measures as to the retroviral gene transfer strategy. To eliminate any deleterious effects caused by stable HOXB4 gene transfer, Krosel et al. tried to expand murine HSCs by delivering HOXB4 protein [99]. In this study, cell membrane-permeable, recombinant TAT-HOXB4 protein was added to the culture medium, resulting in a five-fold net expansion of HSCs. Although TAT-HOXB4 was delivered with high efficiency, its half-life was estimated as only 1 h. Meanwhile, Amsellem et al. tried to expand human CB HSCs using HOXB4 protein, which was secreted into the culture supernatant from cocultured MS-5 murine stromal cells [100]. This approach increased SRCs 2.5-fold. However, the efficiency of protein delivery was not so high, and the coculture system would not be practical for clinical applications.

HOX proteins interact with the non-HOX homeobox protein, PBX1, and regulate the expression of target genes both positively and negatively. We recently synthesized a decoy peptide containing the YPWM motif from HOX proteins, which was predicted to act as a HOX mimetic, and analyzed its effects on self-renewal of human cord blood CD34⁺ cells [101](Figure 3).