

200832044 A

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池 原 進

平成21(2009)年3月

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池原 進

平成21(2009)年 3月

序

造血幹細胞移植（骨髄移植，末梢血幹細胞移植，臍帯血移植）は、先天性免疫不全症，造血系疾患，代謝異常症等の治療法として目覚ましい成果を上げている。最近では、自己免疫疾患の治療にも造血幹細胞移植が実施されるようになって来たが、自己の幹細胞移植が主流であるため、再発例が、増加しており、アロの幹細胞移植の重要性が再認識されている。HLAのバリアーを超えたアロの移植では、移植片対宿主反応や生着不全，さらにはT細胞機能の回復が不完全であるというような問題点が山積している。我々は難治性の自己免疫疾患を自然発症するマウスを用いて、主要組織適合抗原の異なる正常マウスの骨髄細胞を骨髄内に注入（骨髄内骨髄移植）すると、難治性の自己免疫疾患が治療できることを発見した。この革新的骨髄移植法は、臓器移植や加齢に伴って発症する肺気腫，骨粗鬆症，悪性腫瘍にも効果を示すことを見出した。

この骨髄内骨髄移植をヒトへ応用するため、カニクイザルを用いた実験を開始し、まず、骨髄細胞の新しい採取方法を開発した。従来の腸骨よりの吸引法では、末梢血が混入するため、採取骨髄細胞中には20%以上もT細胞が含まれる。そのためT細胞を除去しないとGvHDが発症する。そこで、灌流法を考案した。これは、骨髄穿刺針を2個所に挿入して、一方より生食を注入し、他方より骨髄細胞を採取するもので、短時間に大量の骨髄細胞を安全に採取できる。末梢血の混入がないため、T細胞も10%以下で、T細胞を除去しなくてもGvHDが発症しない。採取した全骨髄細胞を骨髄内へ注入するため、ドナーの間葉系幹細胞も骨髄内へ効率良く移植が可能となる。

このように”種”（造血幹細胞）も”畑”（間葉系幹細胞）も正常のものと置換する，この新しい骨髄移植方法は、加齢と共に発症してくる糖尿病，動脈硬化症，アルツハイマー病，悪性腫瘍等の根本治療につながる可能性を秘めている。実際、我々は、モデル動物を用いて、骨粗鬆症や肺気腫が治療できることを明らかにしている。

現在、ヒトへの応用を視野に入れ、実験用カニクイザルを用いて最善のconditioning regimenを決定すべく努力している。この方法がヒトへ応用されるようになれば、骨髄移植，臓器移植，再生治療，遺伝子治療の上に革命をもたらすものと確信している。

この研究班を遂行していくにあたり、協力頂いた5人の分担研究者を初め、貴重な御助言、御協力をいただいた愛知医科大学の小寺良尚教授，兵庫医科大学の小川啓恭教授に対してこの場をお借りして深謝致します。

平成21年3月

研究代表者 池原 進

目 次

I.	研究班構成	-----	1
II.	総括研究報告	-----	3
	新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究 (池原 進)		
III.	分担研究報告		
1.	選択的移植片対腫瘍反応の誘導　マイナー抗原ワクチンの 臨床研究 (赤塚美樹)	-----	9
2.	新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究 (一戸辰夫)	-----	12
3.	ウイルス抗原特異的細胞障害性T細胞(CTL)の体外増幅法の 開発に関する研究 (小島勢二)	-----	16
4.	マウスモデルを使った造血幹細胞の静脈内と骨髄内輸注法 の比較 (品川克至)	-----	19
5.	骨髄内造血細胞移植後の生着・免疫学的再構築促進等を 目的とした、 <i>ex vivo</i> 増殖ドナー活性化T細胞輸注療法 (活性化CD4-DLIなど)の開発 (森尾友宏)	-----	22
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	25
V.	学会発表に関する一覧表	-----	37
VI.	研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	-----	39
VII.	研究事業報告	-----	41
VIII.	研究成果の刊行物・別刷	-----	341

I. 研 究 班 構 成

「新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究」研究班

<区 分>	<氏 名>	<所 属>	<職 名>
研究代表者	池原 進	関西医科大学病理学第一講座	教 授
分担研究者	赤塚 美樹	愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部	室 長
	一戸 辰夫	京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学	助 教
	小島 勢二	名古屋大学大学院医学系 研究科・小児科学	教 授
	品川 克至	岡山大学医学部 血液・腫瘍内科	講 師
	森尾 友宏	東京医科歯科大学・大学院・ 発生発達病態学分野	准教授
事 務 局	稲葉 宗夫	関西医科大学病理学第一講座	准教授

〒570-8506 大阪府守口市文園町10-15
 Tel: 06-6992-1001(内線2475)
 Fax: 06-6994-8283
 E-mail: inabam@takii.kmu.ac.jp

II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）
総括研究報告書

新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究

主任研究者 池原 進 関西医科大学病理学第一講座 教授

研究要旨

革新的造血移植技術を用いて次のような事実を見出した。

- ①骨髄内へ末梢 T 細胞を注入すると tolerance が誘導されて、移植片対宿主病 (GvHD) が発症しない。
- ②アロの臓器移植（肝，心，卵巣等）と併用することにより、免疫抑制剤の使用をすることもなく、長期間の免疫学的寛容が誘導され、移植臓器が拒絶されない。
- ③骨髄内造血幹細胞移植は、“真”の造血幹細胞を同定する新しい LTRA assay として期待できる。
- ④コラーゲン・ゲルを用いて、造血細胞が骨髄内に効率良く、留置するような工夫をすることで、造血回復能がさらに増す。
- ⑤胸腺移植を併用することにより、加齢に伴って発症する難病（骨粗鬆症，肺気腫，悪性腫瘍等）の治療法としての効果が発揮される。

分担研究者

赤塚美樹 愛知県がんセンター研究所
腫瘍免疫学部 室長
一戸辰夫 京都大学大学院医学研究科
血液・腫瘍内科学 助教
小島勢二 名古屋大学大学院医学系
研究科・小児科学 教授
品川克至 岡山大学医学部血液・
腫瘍内科 講師
森尾友宏 東京医科歯科大学・大学院・
発生発達病態学分野 准教授

A. 研究目的

我々が開発した新しい骨髄移植の技術（灌流法+骨髄内骨髄移植）は、ヒト同種骨髄移植の主要な問題点を解決する革新的技術であり、造血幹細胞の異常に基づく白血病や自己免疫疾患のみならず、間葉系幹細胞の加齢に伴って発症する、多様な疾患（アルツハイマー病、

糖尿病等）の根治療法の開発に直結する。ヒトへの応用を目指して、精力的にサルの実験を実施してきたが、新しい移植方法の安全性と有効性が確認できたので、この新技術によって、いかなる疾患が治療可能かを明らかにし、臨床応用に役立てる。

B. 研究方法 並びに C. 研究結果

I. 骨髄内骨髄移植に関する基礎的研究（改良法を含む）に関して

- 1) ドナー由来の造血系細胞を長期間維持するためには、静脈内移植よりは、骨髄内骨髄移植の方が優れていることを証明した（文献①）。この事実は、“真”の造血幹細胞を同定する、Long-term reconstituting ability (LTRA) の assay には、従来の静脈内移植よりも骨髄内骨髄移植を用いる必要があることを意味している。
- 2) G-CSF の投与に引き続いて、骨髄内骨髄移

植を行うと、アロの骨髄細胞の生着を早めることをマウスで明らかにした(文献②)。

3) 骨移植(ドナーの間葉系幹細胞を補充する目的で)と骨髄内骨髄移植の併用はドナーの骨髄細胞の生着を促進することを見出した(文献③)。

4) コラーゲン・ゲルに suspend した骨髄細胞を骨髄内に注入することによって、ドナーの造血系の細胞とドナーの間葉系の細胞が骨髄内に、効率よく trap され、造血回復能が促進されることを発見した(文献④)。

5) ヒトと同様にサルでも、造血系の維持には、NCAM が重要であることを明らかにした(文献⑤)。

II. 免疫学的寛容に関して

1) 骨髄内へ末梢の T 細胞を注入すると tolerance が誘導されて、移植片対主病(GvHD)が発症しないことを発見した(文献⑥)。

2) ①骨髄細胞(造血幹細胞+間葉系幹細胞を含む)、②胸腺、③微小環境の3つが異なったマウスの系においても、各々に対して tolerance が誘導されることを証明した。この事実は、将来、脳死者から、高齢者に対して骨髄内骨髄移植をする際、人工流産した第三者の胎児胸腺移植を併用することにより、高齢者の難病治療に役立てられる重要な発見である(文献⑦)。

3) 骨髄内骨髄移植をすることによって、ドナー由来の間葉系の細胞が胸腺へ移住し、胸腺上皮に分化することを見出した(文献⑧)。

III. 臓器移植の併用に関して

1) ラットを用いて、異所性のアロの心臓移植の系に、骨髄内骨髄移植を併用することによって、・年以上免疫抑制剤も使用せずに、慢性拒絶反応を抑制し、生着させることに成功した(文献⑨)。

2) 骨髄移植の前処置として、放射線や抗癌剤が用いられるが、これらの副作用として、骨粗鬆症や卵巣機能不全が問題となっている。骨髄内骨髄移植と併用したアロの卵巣の移植は、これらの副作用を予防できることを見出した(文献⑩)。

3) 肝移植に骨髄内骨髄移植を併用することによって、アロの肝の長期間の移植に成功した(文献⑪)。

IV. 胸腺移植併用に関して

1) 超致死量の放射線被爆事故に対しては、造血幹細胞の移植に加えて、新生児期の胸腺移植が有効であることをマウスで明らかにした(文献⑫)。

2) 骨髄内骨髄移植に成体胸腺移植(持続的なドナーリンパ球輸注を目的として)を併用することによって、GvHD は抑制するが、強力な抗腫瘍効果を引き出すことができることを発見した(文献⑬)。

3) 骨髄内骨髄移植と成体胸腺移植は、mild な conditioning regimens (低放射線量+低細胞数)でもアロの骨髄細胞を生着させ、長期の生存を可能とすることを見出した(文献⑭)。

なお、2007年10月に大阪国際会議場で開催された“Novel BMT Methods for Intractable Diseases: From Bench to Bedside”の内容が、自己免疫の分野では、一番 I.F. の高い”J. Autoimmunity”の2008年5月号に Special Issue として掲載された(添付資料参照:文献⑮)。

(倫理面への配慮)

灌流法に関する Phase I Study に関しては、倫理委員会の承認(関医倫第613号、平成18年9月21日承認)を得ている。

1 例目の症例に関しては、悪性リンパ腫の患者さんで、poor mobilizer を選択し、informed consent が得られたので、平成 18 年 12 月 25 日に実施した。患者さんは麻酔から覚醒後、腰痛もなく、歩行が可能であった。動物実験に関しても当大学の動物実験委員会の承認を得て実施している。

D. 考察 並びに E. 結論

新しい骨髄移植の方法（灌流法＋骨髄内骨髄移植）が、ヒトへ応用されるようになれば、先ず、骨髄ドナーの負担が軽減される。すなわち、骨髄穿刺針の穿刺部位が 8 か所（従来では 100 か所以上）で済み、麻酔から覚醒後には痛みも少なく、歩行可能である。それ故、骨髄バンクへの登録者が増加するし、たとえ、HLA が不一致でも、新しい移植方法では、GvHD も起らず、生着が促進されるため、前処置も軽減され、患者さんの負担も少なくなる。新技術により、これまで不治の病であった、種々の難病が根治できれば、患者さんにとって、これ以上の福音はない。

F. 健康危険情報

特記すべき内容はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Omae M, Inaba M, Sakaguchi Y, Tsuda M, Miyake T, Fukui J, Iwai H, Yaamashita T, and Ikehara S: Long-term maintenance of donor-derived hemopoiesis by intra-bone marrow transplantation. *Stem Cells and Development* 17: 291-302, 2008.
- ② Suzuki Y, Adachi Y, Zhang Y, Minamino K, Iwasaki M, Mukaide H, Nakano K, Koike Y, Wang J, Koike-Kiriyama N,

Shigematsu A, and Ikehara S: Administration of granulocyte colony-stimulating factor to recipients followed by intra-bone marrow transplantation accelerates acceptance of allogeneic bone marrow cells in mice. *Immunobiology* 213: 427-435, 2008.

- ③ Song C, Hisha H, Wang X, Li Q, Li M, Cui W, Guo K, Okazaki S, Mizokami T, Kato J, Cui Y, Feng W, Zhang Y, Shi M, Inaba M, Fan H, and Ikehara S: Facilitation of hematopoietic recovery by bone grafts with intra-bone marrow transplantation. *Immunobiology* 213: 455-468, 2008.
- ④ Shi M, Adachi Y, Shigematsu A, Koike-Kiriyama N, Feng W, Yanai S, Yunze C, Lian ZX, Li J, and Ikehara S: Intra-bone marrow injection of donor bone marrow cells suspended in collagen gel retains injected cells in bone marrow, resulting in rapid hemopoietic recovery in mice. *Stem Cells* 26: 2211-2216, 2008.
- ⑤ Kato J, Hisha H, Wang X, Mizokami T, Okazaki S, Li Q, Song C, Maki M, Hosaka N, Adachi Y, Inaba M, and Ikehara S: Contribution of neural cell adhesion molecule (NCAM) to hemopoietic system in monkeys. *Ann. Hematol.* 87: 797-807, 2008.
- ⑥ Miyake T, Inaba M, Fukui F, Ueda Y, Hosaka N, Kamiyama Y, and Ikehara S: Prevention of GvH disease by intra-bone marrow injection of donor T cells: Involvement of bone marrow stromal cells. *Clin. Exp. Immunol.*

- 152: 153-162, 2008.
- ⑦ Cui W, Hosaka N, Miyake T, Takaki T, Nishida T, Inaba M, and Ikehara S: Analysis of Tolerance Induction using Triple Chimeric Mice: MHC-Disparate Thymus, Hemopoietic Cells and Microenvironment. *Transplantation* 85:1151-1158, 2008.
- ⑧ Takaki T, Hosaka N, Miyake T, Cui W, Nishida T, Inaba M, and Ikehara S: Presence of donor-derived thymic epithelial cells in [B6→MRL/lpr] mice after allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation (IBM-BMT). *J. Autoimmune.* 31: 408-415, 2008.
- ⑨ Guo K, Inaba M, Li M, An J, Cui W, Song C, Wang J, Cui Y, Sakaguchi Y, Tsuda M, Omae M, Li Q, Wang X, Feng W, and Ikehara S: Long-Term Donor-Specific Tolerance in Rat Cardiac Allografts by Intra-Bone Marrow Injection of Donor Bone Marrow Cells. *Transplantation* 85: 93-101, 2008.
- ⑩ Feng W, Cui Y, Song C, Zhan H, Wang X, Li Q, Cui W, Guo K, Maki M, Hisha H, and Ikehara S: Prevention of osteoporosis and hypogonadism by allogeneic ovarian transplantation in conjunction with intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Transplantation* 84: 1459-1466, 2008.
- ⑪ Okazaki S, Hisha H, Mizokami T, Takaki T, Wang X, Song C, Li Q, Kato J, Kamiyama Y, and Ikehara S: Successful acceptance of adult liver allografts by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Stem Cells and Development* 17: 629-639, 2008.
- ⑫ Ryu T, Hosaka N, Miyake T, Cui W, Nishida T, Takaki T, Li M, Kawamoto K, and Ikehara S: Transplantation of newborn thymus plus hematopoietic stem cells can rescue supralethal irradiated mice. *Bone Marrow Transplantation* 41: 659-666, 2008.
- ⑬ Miyake T, Hosaka N, Cui W, Nishida T, Takaki T, Inaba M, Kamiyama Y, and Ikehara S: Adult thymus transplantation with allogeneic intra-Bone marrow-bone marrow transplantation from same donor induces strong graft-versus-tumor effects with mild graft-versus-host reaction with high thymopoiesis. *Immunology* In press.
- ⑭ Nishida T, Hosaka N, Takaki T, Miyake T, Cui W, Inaba M, Kinoshita H, Matsuda T, and Ikehara S: Allogeneic intra-BM-BMT plus adult thymus transplantation from same donor has benefits for long-term survival even after sublethal irradiation or low-dose BM cell injection. *Bone Marrow Transplant.* In press.
- ⑮ Ikehara S: A novel method of bone marrow transplantation (BMT) for intractable autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 30:108-115, 2008.

2. 学会発表

(国内)

- ① 第7回佐賀造血幹細胞移植フォーラム, 特別講演 6月6日

「新しい骨髄移植方法の有用性」池原 進

- ② 厚労科学研究造血幹細胞合同班会議, 6月6日, 7日

「新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究計画」池原 進

- ③ 第20回大阪造血幹細胞移植研究会, 特別講演 6月27日

「新しい骨髄移植方法を用いた難病の治療」池原 進

- ④ 鳥取大学医学部附属病院学術講演会, 特別講演 9月24日

「新しい骨髄移植方法の有用性」池原 進

- ⑤ 第1回滋賀医科大学・サルシンポジウム 11月28日

「サルを用いた新しい骨髄移植法の開発」池原 進

- ⑥ 財団法人安田医学財団創立20周年記念講演会, 特別講演 12月13日

「新しい骨髄移植方法の将来性(癌治療を含めて)」池原 進

- ⑦ 厚労科学研究造血幹細胞合同班会議, 1月17日

厚労科学研究6研究班合同公開シンポジウム, 1月18日

「新しい造血幹細胞移植技術(灌流法+骨髄内骨髄移植法)の有用性—ウサギのhaploidentical BMTの系を用いて—」池原 進

厚労科学研究6研究班合同公開シンポジウム, 1月18日

「灌流法と骨髄内骨髄移植法の臨床応用に向けて」(「新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究」班)研究代表者 池原 進

- ⑧ 第4回骨髄内骨髄移植研究会, 2月5日

「“灌流法+骨髄内骨髄移植法”の有用性—基礎から臨床へ—」池原 進

- ⑨ 第40階北陸呼吸器シンポジウム, 特別講演 2月6日

「難病の新しい治療法—呼吸器疾患を含む—」池原 進

- ⑩ 第4回 Annual Review transplant Forum, 特別講演 2月13日

「新しい骨髄移植法(灌流法+骨髄内骨髄移植法)の最新知見」池原 進

(国外)

- ① 2008年3月

“What do We Learn from Experimental Models?”:34th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation(EBMT) 招聘講演(イタリア)

- ② 2008年3月

“Stem Cell Transplantation for Autoimmune Diseases and Age-Associated Diseases (including Diabetes Mellitus) “Pisa University (Prof. Antonio L'Abbate) 招聘講演(イタリア)

- ③ 2008年9月

A New BMT Method for Stem Cell Disorders”:6th International Congress on Autoimmunity 招聘講演(ポルトガル)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

A Method of Inducing
Immunological Tolerance

特開 2001-172188

特願 09-531891

2000. 3. 21

2. 実用新案登録

骨髓液採取セット及び骨髓針

特願 2001-241586

2001. 8. 9

悪性腫瘍の治療方法

特願 2003-49198

2004. 2. 26

骨髓ドリル

特願 2007-12791

2008. 1. 17

Immunotolerance Inducer

PCT/JP98/00909

1998. 3. 4

III. 分 担 研 究 報 告

選択的移植片対腫瘍反応の誘導—マイナー抗原ワクチンの臨床研究
分担研究者 赤塚美樹（愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部室長）

研究要旨

同種造血幹細胞移植は難治性造血器腫瘍の最終治療法として確立されてきた。しかし、再発ハイリスク例では移植後再発が主な死因となっている。同種移植はマイナー抗原や不適合 HLA 分子を標的としたアロ免疫反応によって移植片対腫瘍 (GVT) 効果を得るものであるが、これが不十分にしか誘導されないことが移植後再発のひとつの原因と考えられる。我々は造血器腫瘍の再発時の治療として、または再発ハイリスク移植後に予防投与としてマイナー抗原ペプチドワクチン療法の安全性と有用性を問う臨床試験を開始した。これまでに 56 例の検査が終了、9 例で適応例があり、このうち 2 例に第一段階の投与量である 30 μ g のワクチンを接種した。局所反応以外に有害事象は認められなかったが、免疫学的に検出可能な特異的キラー細胞の誘導も認められなかった。投与量を今後漸増し、さらに評価を継続する予定である。

ワクチンと並び養免疫療法は直ちに効果を発揮するエフェクター細胞を体外増幅して輸注できることから今後期待される方法であるが、体内でのメモリー細胞への分化と維持が不十分であることに難点がある。骨髄は腫瘍細胞のみならずメモリー CTL のニッチと考えられているため、ここに効率よく CTL をホーミングさせるための遺伝子を CTL に導入して効果を評価するマウスモデル実験を継続している。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する有用な治療法として確立されてきたが難治性症例の移植成績はまだ満足できるものではない。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対腫瘍 (GVT) 効果が期待できるが、その効果が原病の悪性度を克服できないと再発が起ると考えられる。GVT 効果の主要な標的はマイナー抗原と腫瘍関連抗原であるが、とくに前者はドナー・患者間の遺伝子多型の違いに由来するペプチドが患者の HLA 分子に提示されて抗原物質となったもので、非自己抗原であるため強い免疫反応が期待できる。

マイナー抗原はドナー、患者間の遺伝子多型の差に由来するため、移植ペア毎に適応となるマイナー抗原が異なり、移植前遺伝子タイピングにより不適合の有無が分かることから、各症例に合ったマイナー抗原を選択するという、テーラーメイド治療が可能となる。

本年度は、ワクチン療法の臨床試験の進捗状況と白血球細胞のニッチである骨髄に CTL を効率よく送達するための遺伝子治療のマウスモデルについて報告する。

B. 研究方法

① マイナー抗原ワクチン: HLA-A24 拘束性 ACC-1^Y、ACC-1^C、HLA-B44 拘束性

ACC-2、HLA-A*0201/A*0206 拘束性 HA-1^H のペプチドが GMP グレードで分注され、準備済みである。これらの HLA を有する患者とそのドナーについて、マイナー抗原タイピングを HLA 研究所（京都）で行い、ワクチン療法の対象症例をリクルートし、適応例に臨床試験を行う体制を取っている。最初の 3 例は 30 μg を隔週で 5 回投与し、重篤な有害事象がなければ 100 μg に増量となる。ワクチンはモンタナイド ISA51VG アジュバントに懸濁し、皮下投与した。また、ワクチン前後について ELISPOT 法およびテトラマー法にて特異的 CTL の増減を検討した。

② CRCX4 導入 CTL を用いた骨髄への CTL の効率的な送達：マウスと人の CXCR4 はアミノ酸レベルで 89% 相同であることから、まず CXCR4 高発現ヒト骨髄腫細胞株がマウス骨髄に集積しうるか検討した。細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入し安定株を得た後、8 週齢の NOG マウスの尾静脈から 1×10^7 個を投与し、6 週目の時点で屠殺し、骨髄・脾臓への浸潤をフローサイトメトリー（抗ヒト CD45、CD38 抗体を指標）で検討した。

CXCR4-IRES-GFP のコンストラクトをレトロウイルスにてマイナー抗原特異的 CTL に導入し、養子移入を行った。GFP を指標とした場合、CTL への遺伝子導入効率は 80% 程度と良好であった。この CTL とマイクロチャンバーを隔てて SDF1 α 濃度勾配を用いた chemotaxis assay を行った。

（倫理面への配慮）

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、すでに各研究参加施設の倫理委員会の審査・承認を得たものであり、説明と理解を得た後、書面にて同意を得られた場合のみに実施された。さらに、マイ

ナー抗原を標的とした移植後再発造血器腫瘍に対するペプチドワクチン療法、養子免疫療法は、愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子倫理委員会で承認済みの研究実施書と同意文書に基づいて、書面による同意の得られた場合のみに実施されたものである。以上の厳格な遵守により、本研究は倫理面で問題がなかったものと考えられる。

C. 研究結果

① マイナー抗原ワクチン：1 例目は自家移植後の PTCL-u の第一再発時に HLA-DR 血清 1 座不一致非血縁移植を受けたものの、13 カ月後に右鼠経部に腫瘤として再発した男性。「治療投与」適格と判定されたため、30 μg の ACC-1^C ペプチドを投与した。3 回接種時点で右鼠経腫瘤が PD となったため投与を中止した。有害事象として、3 回目のワクチン接種局所に 7 cm 大の発赤と硬結を認めたが自然消退した。末梢血のテトラマー及び ELISPOT 検査ではワクチン前、ワクチン後ともに ACC-1^C 特異的 CTL は検出されなかった。

2 例目は T-ALL/LBL の第一寛解期に HLA 一致同胞間移植を受けた男性。再発ハイリスク症例であったため当院へ紹介となった。「再発予防投与」適格と判定されたため、30 μg の HA-1^H ペプチドを投与した。予定の 5 回の接種を終了した。有害事象として、4 回目以降のワクチン接種局所に 5 cm 大の発赤と硬結を認めたがいずれも 1 週間程度で自然消退した。末梢血のテトラマー及び ELISPOT 検査についてはワクチン前後で有意な変動は認められなかった。

② CRCX4 導入 CTL を用いた骨髄への CTL の効率的な送達：

ヒト骨髄腫細胞株にルシフェラーゼ遺伝子を導入し安定株を得た後、NOG マウスの尾静

脈から 1×10^7 個を投与し経過観察した。6週目の時点でも末梢血中には骨髄腫細胞が認められなかったため屠殺し、骨髄・脾臓への浸潤を検討したところ、抗ヒト CD45、CD38 抗体で同定される腫瘍の骨髄への選択的な生着が認められた。またルシフェラーゼの発光でも同様の傾向が認められた。

CXCR4-IRES-GFP のコンストラクトを導入した CTL の chemotaxis assay では、CXCR4 導入細胞で有意な migration が認められた(約 80% vs. 約 35%、単回実験)

D. 考察

ワクチンの臨床試験については、いずれの症例も有害事象は局所反応だけであり、また今回の 2 例とともに今後 3 例目でも特異的免疫反応が不十分と考えられれば、投与量・スケジュールを変更すべきか効果安全評価委員会と検討する予定である。また、拘束性 HLA の存在に加え、mHag の GVL 方向不適合がある症例は 20%程度であるので、今後さらなる症例のリクルートを行っていく。

CXCR4 導入 CTL に関しては、CXCR4 が SDF-1 で走化することが示されたので、今後実際に NOG マウスの尾静脈から投与し、骨髄へのホーミング、事前に生着させておいた腫瘍細胞への抗腫瘍効果について検討する予定である。

E. 結論

ワクチンの臨床試験は少なくとも最初の 2 例については有害事象を認めなかった。しかし特異的免疫反応も誘導できなかったため、今後プロトコルに沿って投与量の増加を行い、さらに安全性・有効性を検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamei M, Akatsuka Y, et al. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. Blood. 2008 (in press).
- 2) Torikai H, Akatsuka Y, et al. Aberrant expression of BCL2A1-restricted minor histocompatibility antigens in melanoma cells: application for allogeneic transplantation. Int J Hematol. 87: 467-73, 2008.
- 3) Watanabe K, Akatsuka Y, et al. CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy. Int J Hematol. 88: 311-320, 2008.

2. 学会発表

- 1) 鳥飼宏基, 亀井美智, 南谷泰仁, ら. Public Resource を用いたゲノムワイド解析による新規マイナー抗原同定法の開発. 第 12 基盤的癌免疫研究会総会, 埼玉 2008 年 7 月
- 2) 赤塚美樹, 森島泰雄. 骨髄移植症例に誘導される GVL 効果の解析. 第 67 回日本癌学会総会シンポジウム, 愛知 2008 年 9 月
- 3) Nannya Y, Kamei M, Torikai H, ら. HapMap scanning of novel human minor histocompatibility antigens. 第 50 回米国血液学会総会, サンフランシスコ 2008 年 12 月
- 5) 赤塚美樹. Minor Antigen 反応性 CTL の移植医療への関与. 第 31 回日本造血細胞移植学会総会, シンポジウム. 札幌 2008 年 2 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究補助金(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業)
新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究
平成 20 年度分担研究報告書

研究分担者 一戸辰夫 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学
研究協力者 三浦康生 大阪赤十字病院 血液内科

研究要旨: 灌流法により採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植法では、従来の経静脈的骨髄移植法を用いた場合と比較して間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells, MSC)の骨髄への生着が促進されることによって、移植後に出現する組織障害や免疫学的合併症が軽減することが期待されている。本研究では、MSCの骨髄内移植によって期待される有効性を薬理学的方法によっても利用可能とすることを目的として、実際に現在臨床的に使用されている薬剤の中からMSCの機能を賦活化する物質を探索することを試みた。正常ヒト骨髄由来MSCのin vitroにおける骨形成能を指標として検討を行った結果、エリスロポエチン、アセチルサリチル酸がMSCの機能の賦活化を促進するとともに、その効果の発現過程においてエリスロポエチンではSTAT5を介するシグナル経路が、アセチルサリチル酸ではWntシグナル経路が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、アセチルサリチル酸を介して機能賦活化を受けたMSCでは、テロメラーゼ活性が増強しているとともに、テロメア長の短縮抑制が認められた。今後、このような薬理的なMSCの機能賦活化が実際の造血幹細胞移植後の合併症の軽減化にどのように寄与し得るかを明らかにするため、in vivoのモデルを用いてさらなる検討を行っていく必要がある。

A. 研究の背景と目的

世界諸地域の中で最も早く「超高齢社会」の到来を迎えたわが国では、今後しばらくの間、骨髄性白血病・悪性リンパ腫など中高年期以降に好発する難治性造血器悪性腫瘍の粗罹患率が経年的に増加していくことが推測されている。これらの疾患の多くは既存の化学療法のみでは長期生存が困難である上に、生活習慣への介入などによる予防可能性も知られていないため、医療資源に持続的負荷を与えていくことが予測され、分子標的薬などの新規薬剤の導入による治療法の革新が待望されている。一方、長期生存が目指される場合には、現時点においても同種造血幹細胞移植が有力な治療手段であり、実際、1990年後半以降、プリンアナログを用いた

前処置法の普及を通じて、移植適応年齢の上限も60-70歳程度にまで拡大されている。また、移植に対するニーズの増大に対応するために幹細胞ソースも多様化し、臍帯血移植やHLA複数抗原不一致血縁者からの造血幹細胞移植が行われるようになっている。しかしながら、このような移植適応の拡大に伴う帰結として、前処置関連死亡、生着不全、重篤な移植片対宿主病(GVHD)などの移植後合併症への危険がますます重要な問題として認識されるに至っており、臨床現場においては、より安全性の高い移植方法の開発が切実に希求されている。このような中で、池原らは新しい造血幹細胞移植方法として「灌流法により採取された骨髄を用いた骨髄内骨髄移植」をカニクイザルを用いた大型実験動

物の系において確立し、そのヒトへの応用により早期の造血回復やGVHDの軽減効果がもたらされることが期待されている。

間葉系幹細胞(以下 MSC)は多分化能を示す組織幹細胞であるが、その経静脈的投与により同種造血幹細胞移植後の生着が促進される事や難治性急性 GVHD に伴う臓器障害が改善する事が、最近、ヒトを対象とする臨床試験において示されている。また、マウス放射線モデルにおいては、MSC が腸管粘膜などの臓器障害の改善に関与するという見聞も得られている。このような背景から、研究分担者らは、同種移植に際して MSC を薬理的に機能賦活する事によって、移植前処置に伴う臓器障害や GVHD、生着不全などの合併症の発症を抑制することが可能となり、安全かつ有効な同種移植が施行できるのではないかという仮説を立案するに至った。

そこで、既存の臨床で使用されている薬剤の中から MSC を機能賦活する候補物質の探索的な検討を行った結果、アセチルサリチル酸(以下 ASA)およびエリスロポエチン(以下 EPO)が候補物質として同定されたため、本年度は、これらの物質の MSC への影響について様々な角度から検討を行った。なお、以下の研究のうち動物を対象とする実験は、実験実施機関における動物実験倫理規定を遵守して行われた。

B. 研究方法

1) マウスモデルを用いた *in vivo* での MSC 機能の評価

骨髄由来 MSC の *in vitro* での培養方法は既報(Miura Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102: 14022)の如く行った。また、マウスモデルを用いた MSC の *in vivo* での機能評価方法については既報(Miura Y, et al. Stem Cells 2006; 24: 2428)の如く行った。このシステムにお

いては MSC の機能である骨組織形成能(分化能)ならびに骨髄組織誘導能を *in vivo* で検討する事が可能である。

2) EPO 刺激の MSC への影響に関する解析

ヒト MSC における EPO レセプター(EPOR)の発現をフローサイトメトリー法(FCM)およびウエスタンブロットリング法(WB)により検討した。メッセンジャーRNA の発現は RT-PCR 法により検討した。MSC を 0.1 U/ml の濃度のリコンビナントヒト EPO(rhEPO)で刺激し、STAT5 のリン酸化を指標として細胞内シグナル伝達経路について検討した。さらに EPO で刺激された MSC の間葉系幹細胞マーカーの発現を FCM で検討し、さらに先のマウスモデルを用いてヌードマウス皮下に移植することにより *in vivo* での骨組織形成および骨髄組織誘導を検討した。

3) ASA 刺激の MSC への影響に関する解析

メス C3H マウスに 0.6 mg/ml の ASA を含む飲料水を 2 ヶ月間投与した後に卵巣摘出を行い、1 か月後に大腿骨骨幹端部の骨変化について microCT を用いて検討した。また、ASA を投与された骨粗鬆症モデルマウス(OVX マウス)由来の MSC の骨形成能を、既述の *in vivo* 機能評価方法(Miura Y, et al. Stem Cells 2006; 24: 2428)により検討した。*In vitro* での MSC の骨形成能は培養液に 2 mM β グリセロフォスフェート、100 μ M アスコルビン酸、10 nM のデキサメタゾンを加えた骨誘導条件でのカルシウム沈着をアリザリンレッド染色で評価した。さらにヒト MSC を 50 μ g/ml の ASA で刺激し、骨形成への関与が示唆されている Wnt- β カテニン経路やテロメア活性・テロメア長への影響について検討した。

C. 研究結果

1) EPO 刺激は MSC の機能を賦活する。

ヒト MSC は EPOR を発現し、EPO 刺激により *in vitro* で STAT5 のリン酸化の亢進が認められた。MSC を EPO で刺激する事により STRO-1 や MUC18、ALCAM-1 といった間葉系幹細胞マーカーの発現が増強したが、これらの細胞を HA/TCP と混和し、ヌードマウスの皮下に移植すると、MSC による *in vivo* での骨形成が促進するとともに、骨周囲に誘導される骨髄組織の形成も促進した。骨及び骨髄組織の形成は MSC を EPOR や STAT5 に対する siRNA で前処理する事により抑制された。以上から EPO 刺激により MSC は機能的に賦活され骨形成能および骨髄誘導能は増強し、そのメカニズムとして EPOR/STAT5 シグナル伝達経路が一部関与していると考えられた。

2) ASA 刺激は MSC の機能を賦活する。

OVX マウスの大腿骨骨幹端骨密度は卵巣非摘出マウス (Sham) に比して低下する事が知られているが、ASA を投与された OVX マウスは骨密度低下が有意に抑制されていた。ASA を投与された OVX マウス由来 MSC の *in vivo* での骨形成能は ASA を投与されなかった OVX マウス由来 MSC に比し有意に改善していた。ASA 投与マウス由来 MSC の骨形成能低下の抑制は *in vitro* において骨誘導条件下で培養した際にも認められた。一方、正常ヒト骨髄由来 MSC の *in vitro* での骨形成能は ASA 投与により増強したが、MSC のテロメア活性の増強とテロメア長の短縮抑制、および β -カテニンの脱リン酸化の促進が認められた。以上から ASA 刺激により MSC は機能的に賦活され骨形成能は増強し、そのメカニズムとして Wnt- β -カテニン伝達経路やテロメラーゼ活性の増強が一部関与していると考えられ

た。

D. 考察

MSC は骨芽細胞へ分化することにより骨形成に関与するが、骨芽細胞は骨表面に存在し、造血幹細胞 (HSC) の骨髄内での存在部位である HSC ニッチの構成細胞であることが明らかとなっている。つまり MSC は生体内で HSC ニッチの制御を介して造血機能に関与する可能性が示唆されている。また、近年、培養増幅した MSC を同種移植後に全身投与する事によって血球生着の促進や急性 GVHD の抑制が期待可能であることが報告されており、MSC の細胞治療ソースとしての有用性が示されつつある。これらの知見の重要性は、灌流法による骨髄採取 (=MSC の採取効率の向上) と骨髄内骨髄移植 (=MSC の骨髄内への生着の向上) の組み合わせという MSC の生物学的特質を最大限に期待できる移植技術においてさらに高まるものと考えられる。

本研究の結果、EPO および ASA はそれぞれ単独で MSC の機能を賦活する事が明らかとなったが、これらの薬剤が、実際と同種造血幹細胞移植において、MSC を介する生着の促進や急性 GVHD の軽減といった治療上の有益性をもたらし得るかに関しては、今後 *in vivo* モデルを用いて検討を行っていくことが必要である。また、これらの薬剤による MSC の機能賦活化作用は、異なったシグナル経路を介して発揮されることから、両薬の併用によって相乗・相加的な効果が得られる可能性に関しても検討を行う必要がある。

E. 結論

EPO および ASA は MSC を薬物的に機能賦活する事が確認された。そのメカニズムとして前者においては EPOR/STAT5 シグナル伝達経路が、