

2009 34031A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池 原 進

平成22(2010)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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池 原 進

平成22(2010)年 3月

序

我々が開発した新しい骨髄移植の技術は、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、ヒトへの応用を開始した。さらに、この新技術の改良法を小動物とサルを用いて開発したので、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た。

灌流法に関しては、倫理委員会の承認と患者さんの同意を得て、Phase I Study を既に開始している。現在、灌流法＋骨髄内骨髄移植法に関する Phase I/II Study のための臨床プロトコールを、作成中である。灌流法と骨髄内骨髄移植法の技術的な安全性に関しては、本年3月に倫理委員会の承認が得られたので、Phase I Study を平成22年6月に実施する予定である。

新しい骨髄移植の方法（灌流法＋骨髄内骨髄移植法）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、移植片対宿主病(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。

平成22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		
	新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究（池原 進）	—	3
III.	分担研究報告		
	1. 選択的移植片対腫瘍反応（G v TR）の誘導（赤塚美樹）	---	11
	2. 骨髄移植後の生着不全に対する HLA 抗体・ MICA 抗体の影響に関する研究（一戸辰夫）	-----	16
	3. 骨髄内骨髄移植の安全性、有効性の確立に関する研究 （小川啓恭）	---	20
	4. ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞による 造血幹細胞移植後の難治性感染症の治療（小島勢二）	---	25
	5. 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に関する研究（品川克至）	-----	27
	6. 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）	---	30
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	35
V.	学会発表に関する一覧	-----	45
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	---	51
VII.	研究事業報告	-----	53
VIII.	研究成果の刊行物・印刷	-----	293

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
	小川 啓恭	兵庫医科大学内科学 血液内科	教 授
	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: 06-6992-1000 (内線 2475)

Fax: 06-6994-8283

E-mail: inabam@takii.kmu.ac.jp

II. 總 括 研 究 報 告

研究代表者 池原 進 関西医科大学病理学第一講座 教授

研究要旨

新しい骨髄移植法（灌流法＋骨髄内骨髄移植法）を用いることによって、いかなる疾患（難病を含む）が治療可能かを動物実験で証明し、トランスレーショナル・リサーチ（サル等を用いる）を介して、最終的にはヒトへ応用することである。

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
小川啓恭 兵庫医科大学内科学
血液内科 教授
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

従来の同種骨髄移植(BMT)の問題点としては、①移植片対宿主病(GvHD)②生着不全③前処置（放射線や骨髄に毒性のある薬剤を使用）による副作用④T細胞機能の不完全な回復等が上げられる。代表者らが開発した新しい BMT の方法（灌流法＋骨髄内骨髄移植法）はこれらの問題を解決できる画期的な方法で、ヒトへ応用できるようになれば、HLA の一致したドナーを探す必要もなくなり、患者さんにとって負担の少ない前処置で移植が可能となるため、臓器移植にも応用できる。従って免疫抑制剤を使用する必要もなくなる。さらに、若い

正常人の造血幹細胞と間葉系幹細胞に置換できれば加齢に伴って発症する難病の根治にも直結する。

本研究の目的は、新しい骨髄移植法（灌流法＋骨髄内骨髄移植法）を用いることによって、いかなる疾患（難病を含む）が治療可能かを動物実験で証明し、トランスレーショナル・リサーチ（サル等を用いる）を介して、最終的にはヒトへ応用することにある（添付図1参照）。

B. 研究方法並びに C. 研究結果

I. 基礎的研究に関して

- 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、1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1）。
- 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。骨髄内骨髄移植を併用したアロの卵巣の移植によって、これらの副作用を予防できることを証明した（文献2）。
- 3) ヒトで、自己免疫性の膵炎(AIP)が最近注目を浴びている。しかし、モデル動物がなくて、解析が進んでいなかったが、WBN/Kob ラットが AIP のモデル動物であることを見出した（文献3）。
- 4) 骨髄内へ末梢の T 細胞を注入すると tolerance が誘導されて、GvHD が発

- 症しないことを見出した(文献4)。この事実は、骨髄中のストローマ細胞(主として間葉系幹細胞)が tolerance を誘導している可能性があり、重要な発見である。
- 5) 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5)。
 - 6) ①骨髄細胞(造血幹細胞+間葉系幹細胞を含む)、②胸腺、③レシピエントの環境の3つが異なったトリプル・キメラ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(胸腺の萎縮を認める)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6)。
 - 7) 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7)。すなわち、“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移植を用いる必要があることを意味している。
 - 8) 前処置として G-CSF を投与しておいてから、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8)。
 - 9) 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9)。
 - 10) 肝移植に骨髄内骨髄移植を併用することによって、免疫抑制剤を使用することもなく、アロの肝の長期間の移植に成功した(文献10)。
 - 11) ヒトと同様にサルでも、造血系の維持には、NCAM が重要な分子であることを明らかにした(文献11)。
 - 12) 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 trap され、造血回復能が促進されることを発見した(文献12)。
 - 13) 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13)。この胸腺上皮は、positive selection のみならず、negative selection にも関与していることが判明している。
 - 14) 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に)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14)。
 - 15) 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15)。
 - 16) Treg 欠損の SKG マウスは、ヒトの関節リウマチ(RA)のモデルと考えられている。このマウスの RA 発症直前に正常マウスの骨髄細胞を骨髄内骨髄移植すると、RA の発症を予防するだけでなく、1年以上生存することを見出した(文献16)。
 - 17) 研究代表者らが提唱してきた、新しい Stem Cell Disorders の概念が国際的にも認められ、骨髄内骨髄移植により、造血幹細胞異常症のみならず、間葉系幹細胞異常症も治療できることを証明した(文献17)。
 - 18) 老化促進マウス(SAM)の substrain である SAMP8 はアルツハイマー病のモデルマウスと考えられているが、このマウスの病気発症前に骨髄内骨髄移植をすることによって、アルツハイマー病の予防ができることを発見した(文献18)。
 - 19) 放射線照射後に発生する卵巣の機能不全や骨粗鬆症は、骨髄内骨髄移植と卵巣の同時移植によって予防できることを見出した(文献19)。
 - 20) Caspase inhibitor である ZVAD-fmk は移植後に in vivo に投与することによって、造血系の早期の回復を促進す

るが、これは、ZVAD-fmk が造血幹細胞の apoptosis を抑制することによることを発見した (文献 20)。

- 21) 筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスを用いて、骨髄内骨髄移植が ALS の発症を遅らせることができることを見出した (文献 21)。
- 22) 骨髄内に注入したドナーの細胞の局所定着を促すために、磁石とマグネティックビーズを coat した骨髄細胞を用いると効果があることを発見した (文献 22)。

以上の動物実験は、当大学の動物実験委員会の承認を得て実施した。

II. 臨床応用に関して (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。

さらに、灌流法と骨髄内骨髄移植法を合わせた Phase I Study に関しても、臨床プロトコールが完成したので、関西医科大学の倫理委員会へ提出し、承認を得たので、6 月 25 日に開始する予定である。

D. 考察並びに E. 結論

基礎的研究としては、種々のモデル動物を用いて、新しい骨髄移植の方法の安全性と有効性が証明され、難病の根治療法として新技術が有望であることが証明された。

新技術の特徴としては、灌流法での骨髄採取によって、末梢血の混入が少ないこと、従って、GvHD が起らないこと、骨髄内骨髄移植によって、効率良くドナーの造血幹細胞と間葉系幹細胞が移植可能であることがあげられる。それ故、造血幹細胞異常症のみならず、間葉系幹細胞異常症 (加齢に伴って発症する疾患) の根治療法として新移植技術がクローズアップされてきている。ヒトへの臨床応用としては、現在、灌流法 + 骨髄内骨髄移植法の両技術の

combination における安全性に重点をおいて、Phase I Study が開始されようとしているが、倫理委員会で承認され、安全性が確認されれば、直ちに Phase II Study を実施できるよう臨床プロトコールを準備中である。新しい骨髄移植の方法 (灌流法 + 骨髄内骨髄移植法) 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 (従来の方法では 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) 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.
- 2) 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 transplantation. *Transplantation* 84: 1459-1466, 2008.
- 3) Sakaguchi Y, Inaba M, Tsuda M, Guo K, Omae M, Ando Y, Uchida K, Okazaki K, and Ikehara S: The WBN/Kob Rat, A Unique Animal Model for Autoimmune Pancreatitis with Autoimmune Extrapancreatic

- Exocrinopathy. Clin. Exp. Immunol. 152: 1-12, 2008.
- 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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-bone marrow-transplantation. Stem Cells and Development 17: 291-302, 2008.
 - 8) 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-bone marrow transplantation accelerates acceptance of allogeneic bone marrow cells in mice. Immunobiology 213: 427-435, 2008.
 - 9) 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-bone marrow transplantation. Immunobiology 213: 455-468, 2008.
 - 10) 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 Dev. 17: 629-639, 2008.
 - 11) 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.
 - 12) Shi M, Adachi Y, Sgigematsu 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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 126: 552-564, 2009.
 - 15) 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. 43: 829-837, 2008.
- 16) Kushida T, Ueda Y, Umeda M, Oe K, Okamoto N, Iida H, Abraham NG, Gashing ME, and Ikehara S: Allogeneic intra-bone marrow transplantation prevents rheumatoid arthritis in SKG/Jcl mice. J. Autoimmun. 32: 216-222, 2009.
 - 17) Ikehara S: A new BMT method for stem cell disorders. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1173: 774-780, 2009.
 - 18) Li M, Inaba M, Guo K, Abraham NG, and Ikehara S: Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. Neurosci. Lett. 465:36-40, 2009.
 - 19) Feng W, Cui Y, Zhan H, Shi M, Cui W, Guo K, Li Q, Song C, Zhang Y, Mori T, Gashing ME, Abraham NG, and Ikehara S: Prevention of premature ovarian failure and osteoporosis induced by irradiation using allergenic ovarian/bone marrow transplantation. Transplantation 89: 395-401, 2010.
 - 20) Imai Y, Adachi Y, Shi M, Shima C, Yanai S, Okigaki M, Yamashima T, Kaneko K, and Ikehara S: Caspase inhibitor, ZVAD-fmk, facilitates engraftment of donor hematopoietic stem cells in intra-bone marrow-bone marrow transplantation. Stem Cells Dev. 19: 461-468, 2010.
 - 21) Ohnishi S, Ito H, Suzuki Y, Adachi Y, Wate R, Zhang J, Nakano S, Kusaka H, and Ikehara S: Intra-bone marrow-bone marrow transplantation slows disease progression and prolongs survival in G93A mutant SOD1 transgenic mice, an animal model mouse for amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res. 1296: 216-224, 2009.
 - 22) Shima C, Adachi Y, Shi M, Imai Y, Okigaki M, Yanai S, Minamino K, Takahashi K, and Ikehara S: The combination method of magnetic beads and a magnet helps sustain the number of donor BM cells after intra-BM injection, resulting in rapid hematopoietic recovery. Bone Marrow Transplant. In press.
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
「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回骨髓内骨髓移植研究会.
2月5日
「灌流法+骨髓内骨髓移植法」の有用性—基礎から臨床へ—
池原 進
- 9) 第4回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
「新しい骨髓移植法（灌流法+骨髓内骨髓移植法）の最新知見」
池原 進
- 11) 厚生労働科学研究造血幹細胞合同班会議. 6月20日
「革新的な幹細胞移植技術（灌流法+IBM-BMT）」の最新知見：モデル動物のデータ—
池原 進
- 12) 第6回日本病理学会
特別講演 7月31日
「骨髓幹細胞異常と自己免疫」
池原 進
- 13) 第41回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
特別講演 9月4日
「難病の革新的治療法」
池原 進
- 14) 第45回日本移植学会総会
特別講演 9月18日
「中枢性免疫寛容の革新的誘導法—難治治療の新展開—」
池原 進
- 15) 第9回血液細胞療法フォーラム
特別講演 10月17日
「革新的移植技術（灌流法+骨髓内骨髓移植）を用いた難病治療」
池原 進
- 16) 厚労科学研究造血幹細胞合同班会議.
1月30日
「骨髓内骨髓移植に胸腺移植併用の利点—ヒトへの応用を目指して—」
池原 進
- 17) 追加発言「新しい骨髓内骨髓移植法—ドナー骨髓細胞のレシピエント骨髓内保持効果—」
足立 靖、池原 進
1月31日
「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
- 18) 第115回日本解剖学会総会・全国学術集
3月28日 シンポジウム
「骨髓細胞（造血幹細胞+間葉系幹細胞）入れ替え療法による難病の治療」
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)
招聘講演 (イタリア)
"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

1 特許取得

1)発明の名称：骨髄細胞の採取装置及び骨髄針

発明人：中村修二、足立庄一、池原進、青木正人、沼澤正明

国：マレーシア、

特許取得日：2009.1.30

特許番号：MY-137309-A

国：台湾、特許取得日：2004.1.1

特許番号：568765

国：オーストラリア、

特許取得日：2008.5.22

特許番号：2002323915

国：中国、特許取得日：2004.10.27

特許番号：1541079

国：韓国、特許取得日：2006.4.7

特許番号：10-0571180

国：フィリピン、

特許取得日：2007.8.22

特許番号：1-2004-500107

国：ロシア、特許取得日：2005.7.6

特許番号：2410-12932RU

国：香港、特許取得日：2007.3.16

特許番号：HK1067028

国：シンガポール、

特許取得日：2005.3.31

特許番号：101874

特許実施権：株式会社 JIMRO

2)発明の名称：造血幹細胞移植用剤

発明人：池原 進、稲葉宗夫、竹内賢治、串田剛俊

国：米国、特許取得日：2002.5.7

特許番号：US63338333481

特許実施権：株式会社 JIMRO

3)悪性腫瘍の治療法

発明人：池原 進、足立 靖、鈴木康弘

国：米国、特許取得日：2009.6.2

特許番号：US7541025

特許実施権：株式会社 JIMRO

2 実用新案登録

1)骨髄液採取セット及び骨髄針

特願 2001-241586

2001. 8. 9

2)悪性腫瘍の治療方法

特願 2003-49198

2004. 2. 26

3)骨髄ドリル

特願 2007-12791

2008. 1. 17

4)Immunotolerance Inducer

PCT/JP98/00909

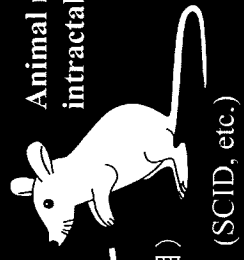
1998. 3. 4

新しい造血幹細胞移植技術(灌流法と骨髄内移植法)を用いた難病の根治法の開発

Conditioning Regimen

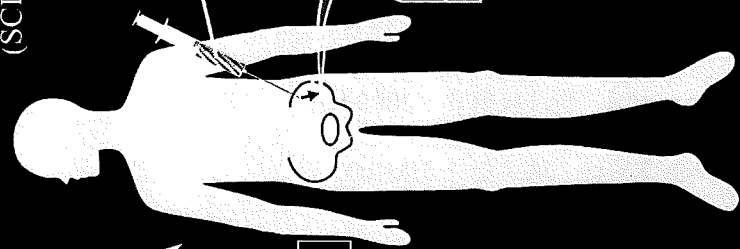
Screening by IBM-BMT

Translational research
(主として1年目)



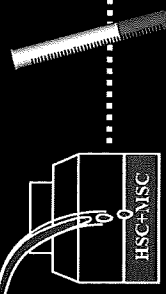
ATG or DLI or TT
+
4Gy x 2

Cynomolgus monkeys
(主として2年目)

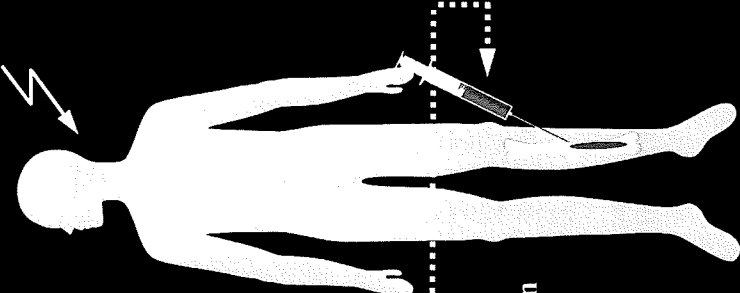


Phase I Study

Phase I/II Study



Centrifugation



Conditioning Regimen

Screening by IBM-BMT

Organ Transplantation

Diseases Curable by Our New BMT Method

- i) Hematological disorders (Aplastic anemia, Leukemia, Malignant lymphomas, etc.)
- ii) Congenital immunodeficiencies (SCID, etc.)
- iii) Metabolic disorders (Enzyme deficiencies, Amyloidosis, etc.)
- iv) Autoimmune diseases (RA, SLE, Scleroderma, etc.)
- v) Diseases curable by gene therapy
- vi) Allergies (Atopic dermatitis, Asthma, etc.)
- vii) Age-associated diseases (Osteoporosis, Emphysema, Alzheimer's disease, Diabetes mellitus, Metabolic synd., Atherosclerosis, Myocardial infarction, Cerebral infarction, Essential hypertension, Lung fibrosis, Sensorineural hearing loss, Retinopathy, etc.)
- viii) Diseases curable by organ transplantation in conjunction with "IBM-BMT" (Kidney, Intestine, etc.)
- ix) Malignant tumors (Cancers, Sarcomas, etc.): Auto or Allo "IBM-BMT"
- x) Secondary immunodeficiency (Aging, Infection, and Malignant tumors, etc.): in conjunction with thymus transplantation with "IBM-BMT"

(The Disease Highlighted in Yellow are Ongoing Projects)

III.分 担 研 究 報 告

選択的移植片対腫瘍反応（GvTR）の誘導

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長）

研究要旨

同種移植後の造血器腫瘍は根治が困難で、新規の予防や治療法の開発が必須である。本研究では不適合 HLA-DR 分子が細胞傷害性 T 細胞の標的となる可能性およびマイナー抗原が抗骨髓腫効果の標的抗原となりうるか検討した。

HLA 不一致移植の場合の主要なアロ抗原を検討する目的で、HLA 不一致同種移植を受けた症例の移植後末梢血から、患者のアロ抗原反応性キラーT 細胞をクローニングし特異性を解析した。うち HLA-DR、DP 不適合移植後を受けた患者から CD8 が陽性ながら不適合 HLA-DR 8 分子を認識する CTL を樹立した。免疫不全 NOG マウスを使用した白血病幹細胞アッセイで、この CTL と共培養した Ph 陽性 ALL 白血病細胞は NOG マウスに生着出来なかったが、特異性の異なる CTL と共培養した白血病細胞は生着した。また追跡しえた移植後 1 年まで、患者の全アロ反応性 CD8 細胞の過半数がこの不適合 DR 分子を認識していた。別の 2 症例でも追試を行ったが、前駆体頻度の差はあったものの移植後末梢血には不適合 HLA-DR を認識する CD8 陽性細胞が存在していた。HLA-DR は正常の組織では発現しておらず、白血病を含む血液系細胞のみに発現しているため、マイナー抗原が利用できない HLA 不適合移植でも、DR 分子を標的とした免疫療法の可能性が示された。

多発性骨髓腫は不治の血液腫瘍であるが、若年者では同種造血細胞移植による治癒例が存在する。移植片対骨髓腫（GVM）効果を過去に樹立したマイナー抗原特異的 CTL を用いて検討した。NOG マウスに骨髓腫細胞株を 5 週間かけて生着させた後、CTL を養子移入して 3 日目の効果を見たところ生着した骨髓腫細胞の著明な減少ないし消失を認めた。以上より、マイナー抗原は GVM 効果の標的と考えられた。

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ると、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。

他方、HLA 不適合移植では、不一致 HLA 分子に対する免疫反応がマイナー抗原に対する反応よりも強いという報告がなされており、この場合の免疫療法としてどのような抗原を標的とするかが重要となる。これまでの報告は、HLA クラス II を認識する CD4 陽性の細胞障害性 T 細胞 (CTL) がほとんどであるが、今回 CD8 陽性で HLA-DR を直接認識する CTL を樹立したので、その意義について検討した。

B. 研究方法

① HLA-DR を認識する CD8 陽性 CTL の樹立と臨床的意義：同胞ドナーより HLA クラス II 一座不一致(DRB1*1502→DRB1*0803)の同種骨髄移植を受けた患者の移植後 207 日目の末梢血単核球(PBMC)を移植前の患者末梢血 PBMC で刺激し CTL 株を誘導後、限界希釈法にて CTL クローンを得た。クローンは CD8 陽性で移植前の患者血液細胞を強く傷害したが、皮膚線維芽細胞は傷害しなかったため、このクローンの認識する抗原の同定に進んだ。HLA 拘束性の決定には、レトロウイルスベクターを用いた HLA cDNA 導入細胞株と、抗 HLA 抗体によるブロッキング試験と、限界希釈法と split-well 細胞傷害性試験により、移植後患者末梢血内のアロ反応性 CD8 細胞の前駆体頻度を測定した。

② GVM 効果におけるマイナー抗原の意義：

骨髄が残存白血病細胞の存続の場所であると同時にセントラルメモリー T 細胞のリザーバーであることから、CTL を効率的に骨髄への送達に利用できるかどうかの基礎的検討結果を示した。モデルでは SDF-1/CXCL12 を分泌する骨髄へのホーミングレセプターである CXCR4 を CTL に遺伝子導入する方法を採った。

マウスと人の CXCR4 間の 89%の相同性を利

用し、ルシフェラーゼ遺伝子を導入しておいた CXCR4 高発現ヒト骨髄腫細胞株を 8 週齢の NOG マウスの尾静脈から 1×10^7 個を投与し、マウス骨髄に集積しうるか検討した。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 抗体およびルシフェラーゼの発光を指標) で検討したところ、骨髄への選択的な生着が認められた。次いで 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、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 を行ったところ、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)。

(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無かったものとする。

C. 研究結果

① HLA-DR を認識する CD8 陽性 CTL の機能解析と臨床的意義：当初得られた CTL クローン 1H8 は CD8 陽性であったため、パネル B-LCL に対する傷害パターンから HLA-A*2402 が拘束 HLA 分子と推測した。そこで

HLA-A*2402 を導入した HapMap LCL を用い、我々が新規に開発したゲノムワイド関連解析法により抗原の同定を試みたところ 6 番染色体の HLA クラス II を含む巨大な不平衡ブロックの領域が特定された。しかし、この領域に存在する HLA 以外の遺伝子上には傷害パターンと一致する SNP は存在しなかった。そこで各パネル LCL のクラス II をタイピングしたところ 1H8 に傷害を受ける LCL は全てドナー→患者方向に不一致であった HLA-DRB1*0803(または*0802)が陽性であった。抗体を用いたブロック実験、HLA-DRB1*0803 導入ドナーLCL に対する傷害性などから 1H8 は不一致クラス II を直接認識していると考えられた。1H8 の組織特異性を再度確認するために皮膚線維芽細胞を IFN- γ と TNF- α で処理し、HLA-DRB1*0803 の発現を検討したところ細胞表面上にわずかに検出されるのみであり、実際 1H8 の傷害も受けなかった。一方で、1H8 は HLA-DRB1*0803 を発現している造血細胞とともに白血病細胞の CD34 陽性分画も傷害した。次にこの 1H8 が白血病幹細胞を傷害することを確認するため、Ph 陽性白血病細胞 (株化していない初発時保存細胞) を CD34 を目安にポジティブセレクションし、1H8 もしくはコントロール CTL と共培養後 NOG マウスの腹腔内に接種した。6 週間後、コントロール CTL と共培養した場合は 2/2 で骨髄および末梢血にヒト芽球の生着をみたが、1H8 と培養したものは 0/3 で生着しなかった。以上より、HLA クラス II を直接認識する CD8+CTL クローンが HLA 不一致移植において移植後 GVL 効果に関与しうる可能性が示唆された。限界希釈法にて前駆体頻度を検討したところ、移植後 207 日目では全アロ抗原に反応する CD8 細胞が 1/1,317 の頻度で存在し、そのうちの 73%が DRB1*0803 に向けられていた。

さらに HLA-DR を含む複数の HLA 不適合移植を受けた 2 症例で、上述の限界希釈法を用いた CTL 前駆体頻度を CD8 陽性細胞について実施したところ、頻度は少ないながら不適合 HLA-DR を認識する CTL の存在が認められた。

② GVM 効果におけるマイナー抗原の意義:

CXCR4 導入 mHag 特異的 CTL またはコントロール CTL を 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骨髄腫細胞株への抗腫瘍効果について検討した。なお、HLA-A*0201 陽性 HA-1H mHag 陽性の腫瘍株 KMS27 は入手可能であったが、HLA-A*2402 陽性 ACC-1^Y mHag 陽性の腫瘍株は無かったため、ACC-1^Y BCL2A1 遺伝子を導入した HLA-A*2402 陽性の腫瘍株 KMS28 を用いた。骨髄腫株を複数の NOG マウスの尾静脈から接種し 4-5 週間後に 1 匹を屠殺、生着を確認できたところで各 CTL を 1×10^7 個を投与した。3 日後にすべて屠殺し、各主要臓器における骨髄腫細胞や CTL の存在につきフローサイトメトリーを用いて検討した。

末梢血、骨髄、脾臓、肝臓、肺について検索したところ、用いた CTL クローンにより傾向が多少異なったものの、CXCR4 を入れない方が骨髄および脾臓への局在が優れていた。また抗骨髄腫細胞株 (GVM) 効果を NOG マウス骨髄内の腫瘍細胞で見たとところ、HA-1H 特異的 CTL に関しては腫瘍量の減少が認められなかった (0/3)。他方、ACC-1^Y 特異的 CTL に関しては、骨髄内の腫瘍量の著明な減少を認めた (3/3)。さらに CXCR4 導入 ACC-1^Y 特異的 CTL は抗 GVM 効果を発揮できなかった。CXCR4 ないしは Mock 導入をしない CTL クローンを用いて同様な実験を追試したが、HA-1H 特異的 CTL の GVM 効果はやはり認められず (0/3)、他方で ACC-1^Y 特異的

CTL に関しては3匹中2匹のマウスで骨髄内の腫瘍の消失を認めた。

HA-1H 特異的 CTL は *in vitro* CTL アッセイで細胞傷害活性が ACC-1^Y 特異的 CTL より低かったこと、骨髄腫細胞株への ACC-1^Y の発現が遺伝子導入で行われたため、エピトープの発現量が多かったことなどが得られた GVM 効果の差となった可能性はあるものの、mHag 特異的 CTL の GVM 効果が *in vivo* CTL 養子免疫で明らかに示された。CXCR4 は骨髄へのホーミングマーカーとされるが、少なくとも本実験系においては積極的な意義がないばかりか、むしろ GVM 効果を無くしていた理由に関しては今後の検討が必要である。

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10倍量の300 μ gとしても良いと効果安全評価委員会から回答があり、増量の予定である。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。

HLA-DR 分子を直接認識する CD8 陽性細胞が非常に高頻度で存在することは予想外であった。他の2症例においても CD8 陽性細胞のなかに不適合 HLA-DR を認識する CTL 前駆体が存在することが限界希釈法で示されており、今後移植後の白血病再発の予防や治療を目的とした免疫療法への応用を検討していく予定である。

さらにマイナー抗原が GVM 効果の標的であり、養子免疫により GVM 効果を増強できる可能性が示されたので、ミニ移植後の残存骨髄腫の根絶におけるマイナー抗原標的免疫療法の可能性が示されたと考える。

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。またマイナー抗原が主要なアロ抗原とならない HLA 不適合移植の場合、特に HLA クラス II 分子は GVL 効果を増強しうる有望な標的であることが示された。またマイナー抗原が骨髄腫に対する同種造血幹細胞移植後の GVM 効果を増強しうる標的であることも示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 115 :3158-3161, 2010.
- 2) Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, Niwa A, Chen Y, Nakazaki K, Nomoto J, Asakura Y, Muto S, Tamura A, Iio M, Akatsuka Y, Hayashi Y, Mori H, Igarashi T, Kurokawa M, Chiba S, Mori S, Ishikawa Y, Okamoto K, Tobinai K, Nakagama H, Nakahata T, Yoshino T, Kobayashi Y, Ogawa S. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature*. 459:712-716, 2009.

2. 学会発表

- 1) 鳥飼宏基、柳澤真弓、赤塚美樹ら. HLA クラス II 不適合骨髄移植患者より樹立した不一致クラス II 拘束性アロ CD8⁺CTL クローンの解析. 第71回日本血液学会総会、京都 2009年11月.