

200934031B

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～平成21年度 総合研究報告書

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20年度～平成21年度 総合研究報告書

研究代表者 池 原 進

平成22(2010)年 3月

序

骨髄移植(BMT)は、1968年に SCID の baby に姉から移植を受け、成功したのが、最初の症例である。以後、BMT を含めた造血幹細胞移植（末梢血幹細胞移植、臍帯血移植等）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きた。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、再発例が増加している。これは、我々が動物モデルで証明して来たように、自己免疫疾患は造血幹細胞の異常に基づく(“Stem Cell Disorders”)からである。従って、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った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ので、ヒトへの応用を目指して、本研究班は、切磋琢磨してきた。2年間の結果をまとめたので報告する。

平成22年3月

研究代表者 池原 進

目 次

I.	研究班構成	-----	1
II.	総合研究報告		
	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
	1. 選択的移植片対腫瘍反応（GvTR）の誘導（赤塚美樹）	---	11
	2. 新しい骨髄移植方法の安全性と有効性に関する研究 （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）	---	22
	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）	---	27
	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）	-----	31
	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）	---	35
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	41
IV.	学会発表に関する一覧	-----	59
V.	研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況	---	67
VI.	研究事業報告	-----	69
VII.	研究成果の刊行物・印刷	-----	587

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
事務局	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
	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. 総合研究報告

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

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

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と、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。
- ⑥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

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。

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

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

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 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 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 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 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 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 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 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, Yamashita T, Kaneko K, and Ikehara S: Caspase inhibitor, ZVAD-fmk, facilitates engraftment of donor hematopoietic stem cells in intra-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 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
1 1 月 2 8 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 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
「新しい骨髄移植法 (灌流法+骨髄内
骨髄移植法) 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
「骨髄幹細胞異常と自己免疫」
池原 進
- 13) 第 41 回日本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+骨髄内骨
髄移植) 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
「骨髄内骨髄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
追加発言「新しい骨髄内骨髄移植法
—ドナー骨髄細胞のレシピエント骨髄
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
- 17) 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術
集会
3 月 28 日 シンポジウム
「骨髄細胞 (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：US6333833481

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

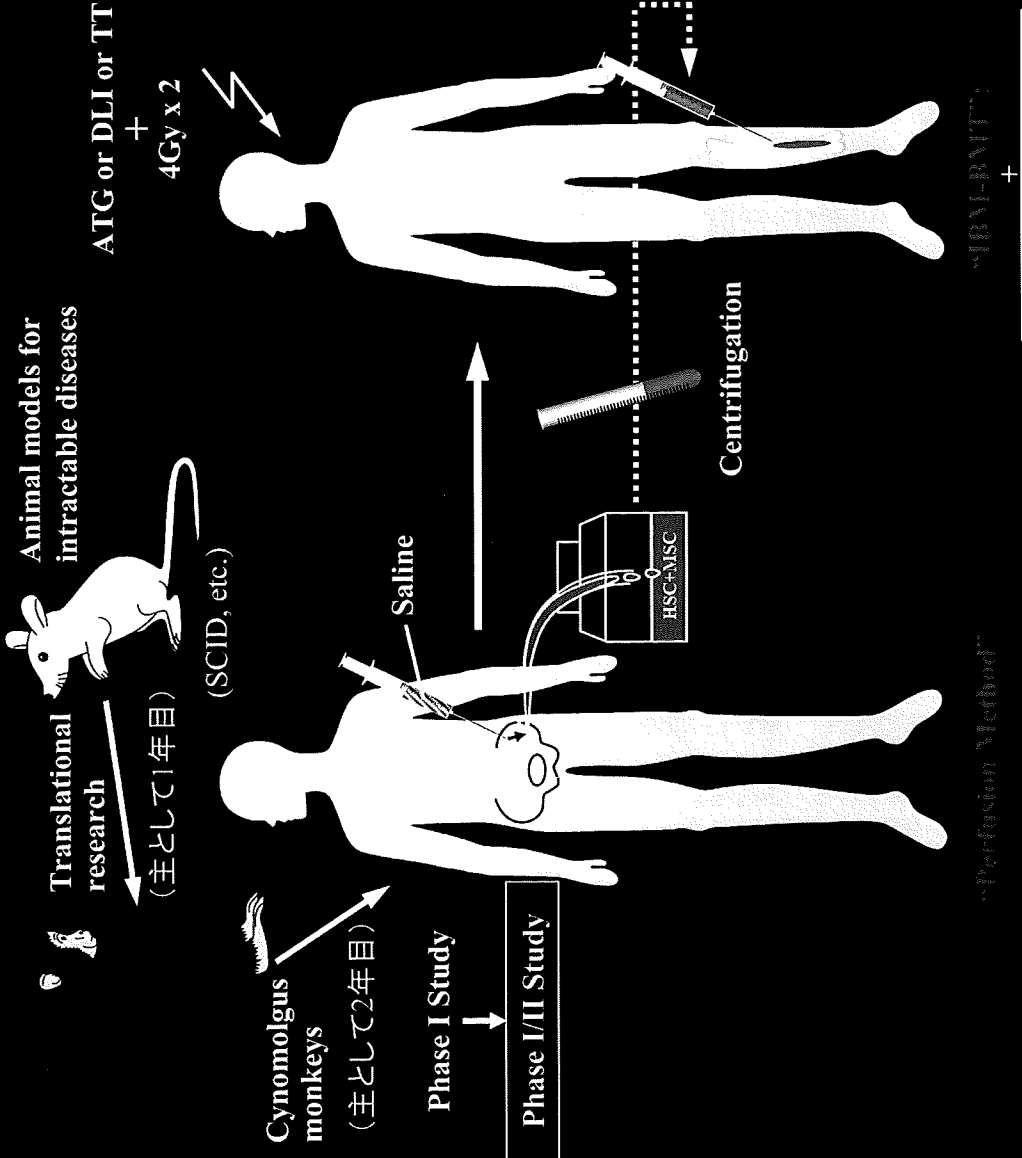
PCT/JP98/00909

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



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)

Organ Transplantation

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 72 例の検査が終了、12 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。2 例投与後、適格例が見つからず、現在さらに症例の登録を積み重ねているところである。

マイナー抗原は HLA 一致同種移植の場合に有力なアロ抗原標的となるが、HLA 不一致例の場合は未知数である。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、その特異性を解析しつつある。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。この CTL はインターフェロン処理した線維芽細胞を傷害せず、患者の移植前の血液細胞と DR8 陽性白血病細胞を傷害した。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。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ので、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を行いうる知見を得た。

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ぐ、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 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 μ g を隔週で 5 回投与し、重篤な有害事象がなければ 10 倍量の 300 μ g に増量とする。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 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 \rightarrow 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。

(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 マイナー抗原ワクチン： これまでに 72 例の検査が終了、12 例で適応例があった。

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 μ g 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

認めたと自然消退した。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とはいずれも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 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 をタイプングしたところ 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キング実験、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。

さらに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 1/1317 の頻度で存在し、そのうちの 73%が DRB1*0803 に向けられていた。

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 μg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。今後こうした現象が普遍的であるかどうか、他の症例においても検討していく予定である。

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。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taniguchi K, Shimazaki C, Ochiai N, Maruya E, Akatsuka Y, Ashihara E, Maekawa T, Taniwaki M, Saji H. Modified ELISPOT assay may predict T-cell hyporesponsiveness to non-inherited maternal antigens. *Int J Lab Hematol.* 2008 Nov 17. [Epub ahead of print]
- 2) Ogawa S, Matsubara A, Onizuka M, Kashiwase K, Sanada M, Kato M, Nannya Y, Akatsuka Y, Satake M, Takita J, Chiba S, Saji H, Maruya E, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Takehiko S; Japan Marrow Donation Program (JMDP). Exploration of the genetic basis of GVHD by genetic association studies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009 Jan;15(1 Suppl):39-41.
- 3) 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.
- 4) Kamei M, Akatsuka Y, et al. HapMap scanning

of novel human minor histocompatibility antigens. *Blood.* 113: 5041-5048, 2009.

- 5) 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.
 - 6) 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、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。
 - 2) Torikai H, Yanagisawa M, Akatsuka Y, et al. Clinical significance of CD8⁺ CTL clone recognizing mismatched HLA class II. 日本癌学会総会、愛知 2009年10月。
 - 3) 鳥飼宏基、赤塚美樹ら。HLA一座不一致同胞間骨髄移植患者より樹立したHLA-class IIを直接認識するCD8⁺CTLクローンの意義。第13回日本がん免疫学会総会、福岡 2009年6月。
 - 4) 赤塚美樹、藤井伸治、Warren EHら。移植後再発白血病に対するマイナー抗原特異的CTL養子免疫療法後に重症肺GVHDの合併を来した標的抗原の同定。第13回日本がん免疫学会総会、福岡 2009年6月。
 - 5) 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
 - 6) 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

- 7) 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
- 8) 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