

平成 21 年度 厚生労働科学研究 第 2 回合同班会議 プログラム・抄録集

研究班名：

<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
研究代表者 池原 進 (関西医科大学 第1病理)
- ・ 組織適合性に基づく非血縁者間造血幹細胞移植の成績向上に関する研究
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)
- ・ 同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究
研究代表者 谷口 修一 (虎の門病院 血液科)
- ・ 同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究
研究代表者 宮村 耕一 (名古屋第一赤十字病院 血液内科/造血細胞移植センター)
- ・ 臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究代表者 加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学)

<がん研究助成金>

- ・ 成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究
主任研究者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)

日 時:平成 22 年 1 月 30 日(土)・31 日(日)

会 場:東京医科歯科大学湯島キャンパス 5 号館 4 階講堂

平成 21 年度厚生労働科学研究 第 2 回合同班会議

研究班名：

<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
研究代表者 池原 進 (関西医科大学 第 1 病理)
- ・ 組織適合性に基づく非血縁者間造血幹細胞移植の成績向上に関する研究
研究代表者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)
- ・ 同種造血幹細胞移植成績の一元化登録と国際間の共有およびドナーとレシピエントの QOL を視野に入れた成績の向上に関する研究
研究代表者 谷口 修一 (虎の門病院 血液内科)
- ・ 同種末梢血幹細胞移植を非血縁者間で行う場合等の医学、医療、社会的基盤に関する研究
研究代表者 宮村 耕一 (名古屋第一赤十字病院 血液内科/造血細胞移植センター)
- ・ 臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究代表者 加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学)

<がん研究助成金>

- ・ 成人難治性造血器腫瘍に対する非血縁者間の同種造血幹細胞移植法の確立に関する研究
主任研究者 森島 泰雄 (愛知県がんセンター 血液・細胞療法部)

期 日：2010 年 1 月 30 日 (土)

10:00~12:00 池原班
12:00~13:00 昼 食
13:00~16:00 加藤班
16:00~18:00 森島班 (組織適合性)
18:00~19:00 森島班 (がん研究)

1 月 31 日 (日)

09:00~12:00 谷口班
12:00~13:00 昼 食
13:00~15:00 宮村班
15:00~17:00 合同公開シンポジウム

会 場：東京医科歯科大学湯島キャンパス 5 号館 4 階講堂
東京都文京区湯島 1-5-45 (JR、東京メトロ 御茶ノ水駅下車)

事務局：東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学内 TEL：0463-93-1121 (内 2311)

1 日 目

平成 22 年 1 月 30 日 (土)

平成21年度第2回合同班会議（厚労科学研究）

新しい造血幹細胞移植技術の開発に関する研究（H20-免疫-一般-019）

研究代表者 池原 進 （関西医科大学病理学第一講座）（10:00-12:00）

10:00-10:15

1. 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、前田嘉信（岡山大学 血液・腫瘍内科）

10:15-10:35

2. 間葉系幹細胞における HLA 分子の発現と機能に関する研究

一戸辰夫（京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科）

10:35-10:50

3. 難治性ウイルス感染症に対する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と臨床第 1 相試験

高橋義行、小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学）

10:50-11:05

4. マイナー抗原特異的 CTL の骨髄への積極的ホーミングの可能性の検討

赤塚美樹^{1,2}・鳥飼宏基²・山村武史²

（¹藤田保健衛生大学血液内科、²愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部）

11:05-11:30

5. 「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた、骨髄内骨髄移植療法
臨床第 1 相試験」 臨床試験プロトコル

吉原 哲、小川啓恭（兵庫医科大学 内科学講座血液内科）

森 眞一郎、福原資郎（関西医科大学 内科学第一講座）

池原 進（関西医科大学 病理学第一講座）

11:30-12:00

6. 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（関西医科大学 病理学第一講座）

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、前田嘉信（岡山大学 血液・腫瘍内科）

【目的】

移植後肺障害 Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に感染症以外の原因により広汎な肺胞障害を生じて発症する予後不良な肺合併症であり、肺への放射線照射 RT とドナー免疫担当細胞の関与が考えられている。ドナー免疫担当細胞を含む造血幹細胞は、静脈内骨髄移植 (iv-BMT) 後では多くが肺へトラップされるが、骨髄内骨髄移植 (intra-BMT) では少ないと考えられる。Ikebara らは、マウスモデルを用いて、intra-BMT では iv-BMT よりも GVHD が抑制されることを報告している。我々は intra-BMT では iv-BMT よりも IPS の発症が軽減されるとの仮説を立て、マウスモデルを用いて IPS に対する intra-BMT の影響に関して iv-BMT と比較検討を行った。

【方法と結果】

Donor マウスには C57BL/6J を用い、RT で前処置したレシピエントマウス B6D2F1 に iv BMT と intra-BMT を行い比較検討した。このモデルでは、intra-BMT で生存率が高く、GVHD スコアが低かった。移植 6 週後の気管支肺胞洗浄 bronchoalveolar lavage;BAL の解析では、回収洗浄液中の総細胞数および T 細胞数は、intra-BMT において iv-BMT よりも少ない傾向にあった。IVIS imaging system による解析では、intra-BMT では iv-BMT に比し肺への集積が軽度であった。以上から IPS は intra-BMT において軽度である可能性が示唆された。

【展望】

同様のマウス IPS モデルを用いて、1) 肺組織標本の免疫染色などによる評価、2) BALF 洗浄液中の種々のサイトカイン量を測定、3) 移植後輸注細胞の肺へのトラップに関して、IVIS imaging system を用いてさらに詳細に iv-BMT との比較検討をおこなう予定である。

間葉系幹細胞における HLA 分子の発現と機能に関する研究

一戸 辰夫 (京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科)

同種造血幹細胞移植においてはドナー由来の間葉系幹細胞 (MSC) あるいはその前駆細胞も同時に移植されるが、それらの移植後の動態については十分に明らかにされていない。造血細胞移植後の骨髄 MSC のキメリズムに関しては、使用する移植前処置や幹細胞ソースの相違によらず長期間にわたりホスト由来であるとする報告が多いが (Rieger et al. *Exp Hematol* 2005, Bartch et al. *Transplantation* 2009)、小児においてはドナー由来 MSC との混合キメリズムとなる場合もあり得ることが報告されている (Pozzi et al. *Exp Hematol* 2006)。また、灌流法を用いた骨髄採取を用いた骨髄内骨髄移植法では、ドナー由来の骨髄 MSC が従来より大量に移植される可能性があるため、移植片中の CFU-F の測定、移植後の骨髄 MSC のキメリズムに関して、従来の移植法と比較検討を行うことが重要な課題になるものと考えられる。

また現在、移植後に発症した重篤な GVHD の治療を目的として、*ex vivo* 増幅を行った third party 由来 MSC の輸注療法の開発が試みられている。輸注された MSCs が一定期間レシピエント体内に残存し得るためには、ドナー由来免疫担当細胞の監視を回避する機構が必要と推察されるが、その詳細に関しては不明な点が多い。臍帯血・骨髄・脂肪細胞などから分離される MSC (MSC 様細胞) はすべて HLA クラス I 分子を発現しており、IFN- γ などの存在下では HLA クラス II 分子も発現されることが確認されている (Le Blanc et al. *Exp Hematol* 2003)。われわれもヒト由来 MSC 細胞株由来の培養上清あるいは細胞溶解物を用いた検討を試みたところ、十分な量の HLA クラス I 分子がタンパク質レベルで発現している可能性が高いことを示唆するデータが得られた。これらの観察から、GVHD の治療に使用される MSC は HLA クラス I 分子を発現しており、HLA 抗体や移植ドナー由来の T 細胞・NK 細胞によって認識され得るにもかかわらず、それらによる細胞傷害性免疫応答を回避する何らかの分子機構を有していることが推察される。このような観点から、移植後のホスト免疫系と MSC の相互作用に MSC に発現される HLA 分子がどのように関与しているかについても新たな検討を開始することが必要と思われる。

難治性ウイルス感染症に対する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と臨床第1相試験

名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学
高橋義行、小島勢二

【目的】造血幹細胞移植後の患者におけるウイルス感染症は、移植前処置に ATG を用いた場合や GVHD の治療中など強い免疫抑制下で重篤化しやすく、そのコントロールは移植を成功させるために重要である。現在日本では抗ウイルス薬による治療が行われているが、少数ながら抗ウイルス薬が効かない症例がみられることや、抗ウイルス剤による副作用などの問題がある。欧米の一部の施設では造血幹細胞移植後難治性ウイルス感染症に対してウイルス抗原特異的 CTL の臨床応用が行われ優れた効果が報告されている。我々はウイルス既感染の健常人ドナーより CMV, EBV 特異的 CTL の体外増幅法を開発し臨床第1相試験を行っている。難治性ウイルス感染が起きてからの培養では1ヶ月程度の時間を要するため、HLAハプロ一致移植などハイリスクの症例においてウイルス感染前に培養し凍結保存しておくことも可能とした。【方法】HLA-A2 または A24 陽性健常人の末梢血 30ml から単核球を分離し、ウイルス特異的ペプチドで刺激後、IL-2 添加培地で1週間培養し、その後我々の開発した方法にもとづき CD3 で刺激した T 細胞に抗原ペプチドをパルスしたものを抗原提示細胞とし T 細胞に加え閉鎖培養無菌バッグにより培養した。増幅した CTL の細胞数、MHC-tetramer 陽性細胞の濃度により、投与基準を満たしたものを凍結保存し、培養上性中のウイルス、細菌の感染がないことを確認する。【結果】登録された症例は 8 例 (CMV3 例、EBV5 例) で 30ml の末梢血より 21 日間の培養で CTL の細胞数、MHC-tetramer 陽性率が輸注量に達したのは CMV-CTL が 3 例中 3 例、EBV-CTL が 5 例中 2 例であった。CMV-CTL の 1 例で培養上清中に EBV-DNA が検出されたため投与基準を満たさなかった。8 例のうち実際にウイルス特異的 CTL を輸注したのは、骨髄移植後の難治性 CMV 感染症の 1 例で治療に伴う副作用として軽度肝障害が見られたが自然軽快している。CTL 輸注後に CMV アンチゲネミア、CMV-DNA の陰性化が観察されたが今後の注意深い観察が必要である。【結論】ウイルス特異的 CTL による臨床第一相試験実施し、重篤な副作用は見られていない。臨床スケールにおける培養効率のさらなる改善が必要である。

「マイナー抗原特異的 CTL の骨髄への積極的ホーミングの可能性の検討」

赤塚美樹^{1,2}・鳥飼宏基²・山村武史²

(¹藤田保健衛生大学血液内科、²愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部)

1. CTL の骨髄へのホーミング法の検討

平成 20 年度の第 2 回班会議にて、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)。

以上の所見をもとに、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-1^H 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。骨髄腫細胞を複数の 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ころ、HA-1^H 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 クローンをを用いて同様な実験を追試したが、HA-1^H 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-1^H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。

【謝辞】 骨髄腫細胞株 KMS シリーズを供与していただいた川崎医科大学衛生学教室の大槻剛巳先生と、NOG マウス共同研究に関してご意見をいただいた実験動物中央研究所の伊藤守先生に深謝します。

2. マイナー抗原と腫瘍関連抗原のどちらが移植後に重要か（研究計画）

現在、同種造血幹細胞移植は予後が良好でない白血病に対する標準的治療として確立されて来ている。この場合、GVL 効果は HLA が一致の場合はマイナー抗原および腫瘍関連抗原が、HLA が不一致の場合は不適合 HLA と腫瘍関連抗原がその標的として想定される。しかし、それぞれの抗原がどの程度 GVL 効果に関与しているかについて、同時に評価された研究はほとんどない。そこで、

①これまでに新規マイナー組織適合抗原同定のための研究目的で経時的に収集された末梢血単核球細胞を反応細胞として、移植前の患者末梢血単核球（抗マイナー抗原ないしは抗不適合 HLA が標的）または腫瘍細胞ないしは人工的に既知の腫瘍抗原を発現させたドナー細胞を刺激抗原として用い、限界希釈法にて細胞傷害性 T 細胞の前駆体頻度を測定する。

②HLA が不適合の移植の場合は、ドナーLCL に不適合 HLA 遺伝子を導入したものを細胞傷害性試験の標的とし、免疫反応のどの程度が不適合 HLA 分子に向けられているか検討する。

③限界希釈法で細胞傷害活性を示したウェルから CTL クローンを樹立し、この特異性（不適合 HLA またはマイナー組織適合抗原）を検討し、臨床意義の高いものについては標的抗原分子を同定する。

以上

「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた、骨髄内骨髄移植療法 臨床第 I 相試験」 臨床試験プロトコル

兵庫医科大学 血液内科 吉原 哲、小川啓恭
関西医科大学 第一内科 森眞一郎、福原資郎
関西医科大学 第一病理 池原 進

灌流法による骨髄採取+骨髄内骨髄移植の有用性については、動物モデルにおいては多数のデータにより示されている。しかしながら、ヒトにおける臨床応用は中国で 1 例行われたのみであり、本邦では実施されていない。本臨床試験では、同種移植の系における、灌流法による骨髄採取+骨髄内骨髄移植の安全性を検討するものとした。

すでに、兵庫医科大学では倫理委員会にて承認されており、実施準備中である。

0-1. 試験実施計画の概要

0-1-1. 試験の目的

「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法」の、安全性の検討（臨床第 I 相試験）

1) ドナー：灌流法による骨髄採取について評価する

- ① 主要評価項目：灌流法による骨髄採取に伴う安全性を primary endpoint とする
- ② 副次的評価項目
 - 有害事象に関連するパラメーター：手術時間、麻酔時間、骨穿孔数・皮膚穿孔数、自己血採取・輸血量
 - 採取した骨髄細胞の評価：骨髄有核細胞数、採取細胞中の CD3、CD34 陽性細胞数、骨髄液に混入した赤血球数

2) レシピエント

- ① 主要評価項目：灌流法で採取した骨髄細胞を用いる骨髄内骨髄移植法の安全性を primary endpoint とする
- ② 副次的評価項目：
 - ドナー型生着率（「ドナー型生着」は、好中球数が 3 ポイント以上の連続した検査日においてに回復 (> 500/ μ l) し、かつキメリズム解析において移植後 60 日以内にドナー由来細胞が 90%以上になることと定義する）
 - 急性 GVHD・慢性 GVHD の頻度と重症度
 - 移植後 1 年の時点での全生存率・無病生存率・治療関連死
 - 感染症（細菌・真菌・ウイルス・その他）の発生頻度
 - 移植後の免疫回復

0-1-2. 対象（ドナー）

- 1) HLA 適合または GVH 方向血清 3 抗原以内不適合血縁者（初回移植と同一ドナーでもよい）

2) 適格条件、除外条件については、非血縁バンクドナーの基準に準ずる

0-1-3. 骨髄採取法（灌流法）

- 1) 全身麻酔下で両腸骨から灌流法で採取する。
- 2) 2本の骨髄穿刺針を腸骨に約3-5cmの間隔で穿刺し、生理食塩液30mlを一方よりゆっくり注入し、同時に対側から軽く吸引する。この時、採取側シリンジには、ヘパリン（10-30 U/mlとする）加生理食塩液（約0.5 ml）を含む。
- 3) 採取は、骨髄の有核細胞数（Nucleic cell count, NCC） $2.0\sim 3.0\times 10^8$ 個/kg（レシピエント体重あたり）以上の細胞数を目標として行う。ただし、 1.0×10^8 /kg（レシピエント体重あたり）以上の細胞数が確保できれば、骨髄内骨髄移植法による臨床試験を継続する（ 1.0×10^8 /kgの細胞数が確保できなかった場合は、本臨床試験からは脱落とし、従来の骨髄吸引法など他の方法を施行する）。

0-1-4. 対象（レシピエント）

1) 対象疾患・病期

- ① 慢性骨髄性白血病：以下の2つの基準をともに満たす症例
 - 病期：第2慢性期以降の慢性期、移行期および急性転化期、非慢性期再発
 - 病状：骨髄における芽球が登録時に30%未満
- ② 急性骨髄性白血病：以下の2つの基準をともに満たす症例
 - 病期：初回寛解期以外（ただし、高リスク染色体を有する症例、骨髄異形成症候群からの移行例、寛解導入に複数コースの化学療法を要した症例は初回寛解期でも可）
 - 病状：骨髄における芽球が登録時に30%未満
- ③ 急性リンパ性白血病：以下の2つの基準をともに満たす症例
 - 病期：初回寛解期以外（ただし、フィラデルフィア染色体ないしMLL再構成を有する症例、寛解導入に複数コースの化学療法を要した症例は初回寛解期でも可）
 - 病状：骨髄における芽球が登録時に30%未満
- ④ 骨髄異形成症候群・骨髄異形成/増殖性疾患：IPSS（International Prognostic Factor Scoring System）にてintermediate-IIまたはhighに分類される症例、または寛解後の再発（移植後を含む）
- ⑤ 悪性リンパ腫
 - 低悪性度リンパ腫（マントル細胞リンパ腫を含む）：化学療法抵抗性の症例
 - 中悪性度リンパ腫：化学療法抵抗性の症例
 - 高悪性度リンパ腫：初回寛解期以外

2) 適格条件の主なもの

- ① 登録時の年齢が12歳以上65歳以下の症例。
- ② 血縁（兄弟、親または子）にHLA適合を含む、HLA haplotypeの一致したGVH方向血清3抗原不適合までのドナーを有する症例（ドナーの適格条件については3-1-1に記載）。

ただし、HLA2-3 抗原不適合ドナーから移植を行う場合は、日本骨髄バンク (JMDP) において HLA-A,B,DR 血清型一致かつ遺伝子型で HLA-A,B,DRB1 の不一致が 1 座以内の非血縁ドナーを有さないか、病勢が強く早期の移植が必要であると考えられる症例。

- ③ Performance status が ECOG の基準で 0~1 の症例
- ④ 十分な肝、腎、心、肺機能を有する症例。
 - GOT, GPT が施設正常値上限の 5.0 倍以下
 - 総血清ビリルビン値 2.0mg/dl 以下
 - 血清クレアチニン値 2.0mg/dl 以下
 - PaO₂ 60mmHg 以上または SaO₂ もしくは SpO₂90%以上 (酸素吸入なし)
 - 重篤な心電図異常がなく、心エコーで EF が 50%以上

3) 除外条件の主なもの

- ① コントロール不良な活動性の感染症を有する症例
- ② 骨髄生検にて、骨髄の線維化を認める症例

0-1-5. 移植前処置

移植前処置については特に規定せず、骨髄破壊的レジメン、および強度減量レジメンのいずれも可とする。HLA2-3 抗原不適合移植の場合は、原則として 45 歳以下には骨髄破壊的レジメン、46 歳以上には強度減量レジメンを用いる。

0-1-6. 骨髄投与方法 (骨髄内骨髄移植法)

- ① ドナーから灌流法で採取された骨髄細胞は、バッグ遠心法により無菌的に血漿除去を行った後、約 20ml の生理食塩水に再浮遊させる。
- ② 骨髄細胞を脛骨または腸骨の骨髄内に投与する。
- ③ 可能であれば、投与前にレシピエントの骨髄から約 10ml の骨髄液を採取する (骨髄内への注入時の圧を減じるため)。
- ④ 骨髄細胞浮遊液 (約 20ml) を半分ずつ 2 本のシリンジに分け、それぞれを左右の骨髄内に注入する。注入前には、ミダゾラム等による鎮静を行う。穿刺部に対しては、圧迫止血 (およそ 5 分程度) を行い注入した骨髄液が出血と共に漏れないように注意する。

0-1-7. GVHD 予防

GVHD 予防法については、特に定めないが、HLA 適合ドナーからの移植では、サイクロスポリン+短期 MTX を基本とし、HLA 不適合ドナーからの移植ではタクロリムス+ステロイドを基本とした方法を推奨する。

6. 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 —

関西医科大学病理学第一講座

池原 進

高齢者に対する骨髄移植の成績は、若年者に比較して思わしくないが、その原因として移植後にドナー造血幹細胞由来のT細胞の機能回復が悪いことが上げられている。これは、高齢者では胸腺の上皮細胞の分化誘導能が低下しているため、十分なT細胞の機能回復が望めないことによる。

われわれは、生後1年近くになると自己免疫性膵炎(AIP)を発症するマウス(MRL/+)に従来の骨髄移植(静脈内骨髄移植)に胎児胸腺(ドナーと同じMHC)移植を併用することによって、AIPを治療し、延命効果が得られることを見出した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8558-8562, 1996)。そこで、胸腺移植の臨床応用を視野に入れて、トリプルキメラマウスを作製し、toleranceの状態を解析した。

まず、先天性に胸腺の欠如したBALB/c(H-2^d)ヌードマウスの腎被膜下にB6(H-2^b)のマウスの胎児胸腺を移植し、7Gy放射線照射後、C3H/He(H-2^k)マウスの骨髄細胞を移植し、3か月後に、3者の皮膚を移植した所、いずれの皮膚も拒絶されないことが判明した。但し、3者とは、無関係なDBA/1(H-2^q)の皮膚は拒絶されることから、免疫学的寛容状態が誘導されていることが明らかになった。

以上の結果に基づいて、担癌マウスや、種々の難病のモデルマウス(アルツハイマー病のSAMP8やII型糖尿病のdb/db)を用いて、骨髄内骨髄移植(IBM-BMT)と胸腺移植実験を行い、胸腺移植の併用がいかに重要であるかを紹介する。

厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班

平成 21 年度第 2 回班会議プログラム

日時：平成 22 年 1 月 30 日（土）13 時 00 分～16 時 00 分

場所：東京医科歯科大学 5 号館 4 階講堂

13:00 厚生労働省ご挨拶 (健康局疾病対策課臓器移植室)

13:10 研究代表者挨拶 加藤 俊一 (東海大学医学部基盤診療学系)

<セッション 1：基礎的研究>

座長 安藤 潔

13:20 造血細胞移植後患者に対する抗麻疹 DC ワクチン—第 I 相臨床試験—

○熊本 忠史、東 英一 (三重大学医学部・細胞移植療法部)

13:30 さい帯血造血幹細胞の老化解析

○八幡 崇 (東海大学医学部・基盤診療学系)、安藤 潔 (同・内科学系)

<セッション 2：臍帯血採取、品質管理、解析法開発>

座長 高橋 聡

13:40 臍帯血採取法の改良に関する研究

○正岡 直樹 (東京女子医科大学八千代医療センター・産婦人科)

13:50 臍帯血の品質管理

○高梨 美乃子 (東京都赤十字血液センター)

14:00 フローサイトメーターを使用したキメリズム解析法と STR-PCR 法の比較検討

○渡辺 信和、大井 淳、塚田 信弘、加藤 せい子、佐藤 亜紀、河北 敏郎、
柳生 友浩、高橋 聡 (東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター)

<セッション 3：基盤整備と臨床研究 (1)>

座長 加藤 剛二

14:10 臍帯血移植データ登録の一元化に向けて

○長村 登紀子、加藤 剛二

(東京大学医科学研究所セルプロセッシング・輸血部、名古屋第一赤十字病院)

14:20 一元化登録の報告

○熱田 由子、鈴木 律朗 (名古屋大学造血細胞移植情報管理・生物統計学)

14:30 HLA-C と臍帯血移植の成績

○甲斐 俊朗、荒木 延夫、原 宏 (兵庫医科大学・輸血部、兵庫さい帯血バンク)

<セッション 4：臨床研究 (2)>

座長 磯山 恵一

14:40 東大医科研の方法による成人臍帯血移植の多施設第 II 相臨床試験—進捗状況—

○高橋 聡、田野崎 隆二 (東大医科研、国立がんセンター中央病院・幹細胞移植科)

14:50 小児臍帯血移植におけるシクロスポリン 3 時間点滴による GVHD 予防法の検討

○松原 央、足立 壮一 (京都大学医学研究科人間健康科学、附属病院・小児科)

15:00 臍帯血 CD4-DLI 臨床試験

○梶原 道子、森尾 友宏 (東京医科歯科大学医学部発生発達病態学分野、輸血部)

<セッション 5：臨床研究 (3)>

座長 谷口 修一

15:10 高齢者造血器疾患に対する臍帯血移植の現状と前方視的試験

○内田 直之、谷口 修一 (虎の門病院血液内科)

15:20 骨髓内臍帯血ミニ移植

○岡田 昌也、吉原 哲、池亀 和博、甲斐 俊朗、小川 啓恭
(兵庫医科大学・血液内科、輸血部)

15:30 臍帯血移植後に発症する臍帯血由来白血病の遺伝子解析

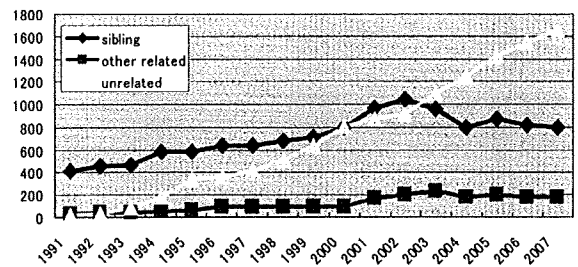
○坂下 一夫、松田 和之、小池 健一 (信州大学医学部小児科、臨床検査部)

平成21年度
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

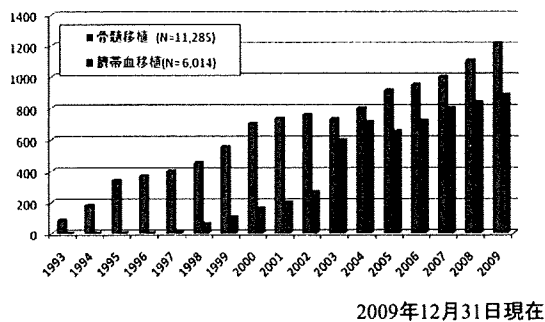
臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術
の高度化と安全性確保に関する研究

研究代表者
加藤 俊一
(東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学)

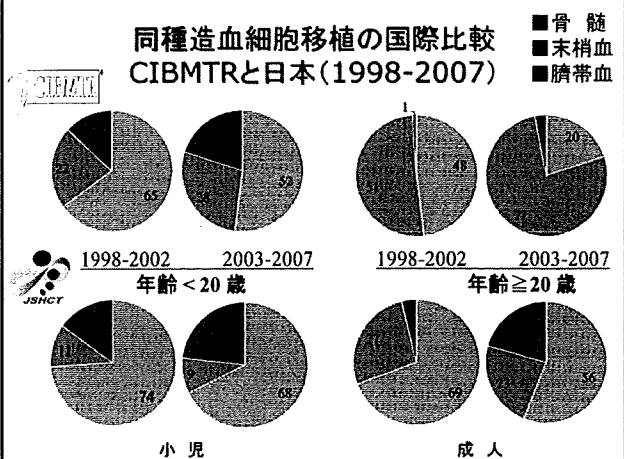
わが国における同種造血細胞移植
ドナー別推移(JSHCT 1991-2007)



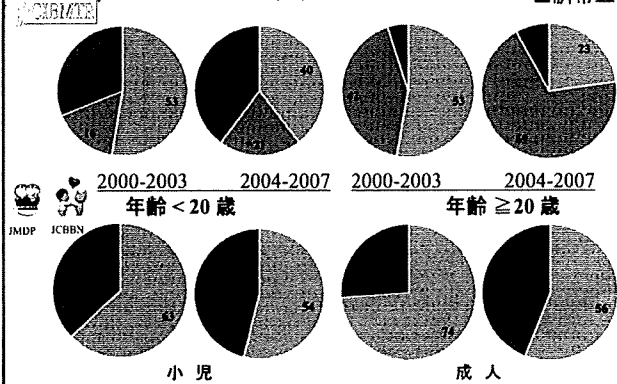
わが国における非血縁者間
骨髄移植と臍帯血移植の推移



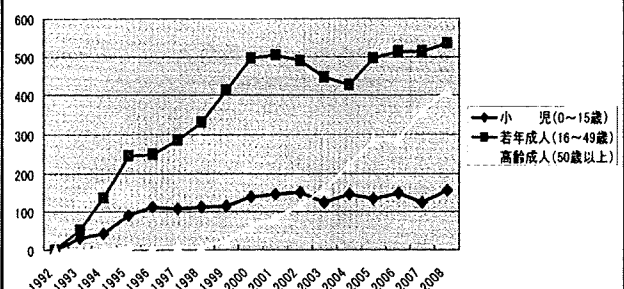
同種造血細胞移植の国際比較
CIBMTRと日本(1998-2007)

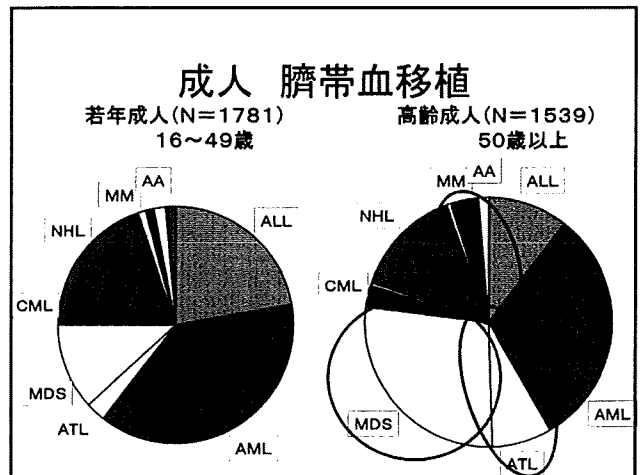
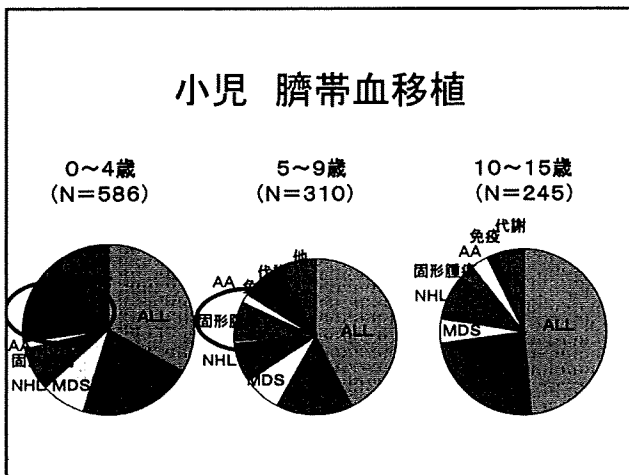
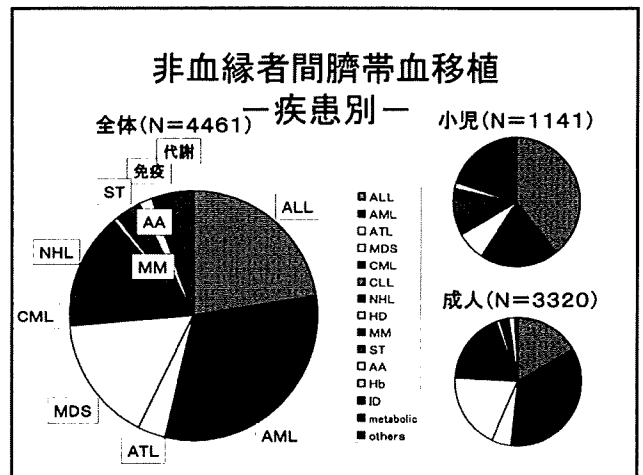
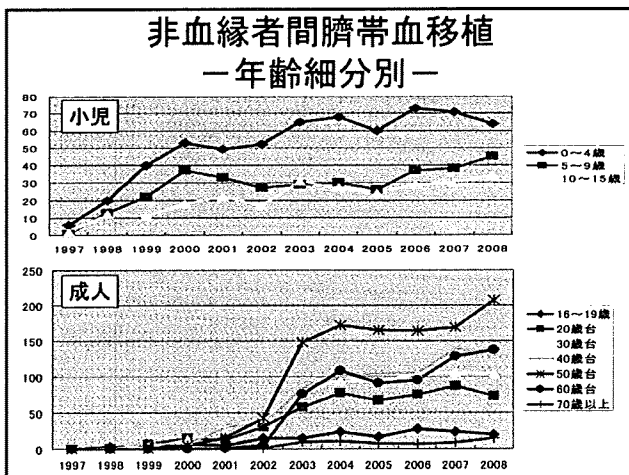


非血縁者間造血細胞移植の国際比較
CIBMTRと日本(2000-2007)



非血縁者間骨髄移植
—小児、若年成人、高齢成人別—





- ### 研究班2期目の目標と計画(1)
- 臍帯血バンクに関する検討
- 臍帯血の採取方法の検討 (正岡直樹)
 - 臍帯血採取バッグの改良(ニプロと共同開発)
 - 臍帯血の品質管理方法の検討 (高梨美乃子)
 - HLA抗体と生着の関係
 - HLA-C抗原と白血病再発・生存との関係
 - GMP基準での細胞処理の経費試算(河原和夫)
- 基礎的検討から臨床応用へ
- 臍帯血の骨髄内移植法の開発 (安藤 深)
 - 臨床研究の開始 (小川啓恭)
 - 麻疹DCワクチンの開発 (東 英一)
 - 臨床研究の開始

- ### 研究班2期目の目標と計画(2)
- 臨床研究
- 小児における前処置の至適化 (磯山恵一)
 - 小児におけるGVHD予防法の至適化 (足立壮一)
 - 成人におけるCSTの前方視研究 (田野崎隆二)
 - 高齢者におけるRISTの前方視研究 (谷口修一)
 - 複数臍帯血移植 (甲斐俊朗)
 - 精緻なキメリズム評価法の開発 (高橋 聡)
 - 臍帯血移植におけるDLIの開発 (森尾友宏)
 - 真菌、ウイルス感染症の予防の検討 (加藤剛二)
 - 臨床研究サポートシステムの整備 (熱田由子)
 - 臍帯血移植データベースの確立 (長村登紀子)
 - 臍帯血由来細胞の白血病化 (小池健一)

加藤班班会議 平成22年1月30日

造血細胞移植患者に対する 抗麻疹DCワクチンの第I相臨床試験

分担研究 「DCワクチンを用いた臍帯血移植後のウイルス
感染予防法の開発に関する研究」

三重大学小児科・細胞移植療法部
熊本忠史、伊藤美津江、岩本彰太郎、
平山雅浩、東 英一

目的とエンドポイント

- 目的：造血細胞移植後で既存のワクチン接種が困難な時期に、免疫抑制を惹起しない安全な麻疹DCワクチンを接種することにより、移植後に罹患すると致死率が高い麻疹の感染予防を行う。
- エンドポイント：
 - プライマリーエンドポイント：
 - ・安全性の確認
 - セカンダリーエンドポイント：
 - ・麻疹抗体価の上昇
 - ・麻疹特異的B細胞の増加
 - ・ワクチン接種至適時期の設定

対象と投与方法

- ・ 自家あるいは同種造血細胞移植後2年未満の患者。
- ・ 移植後2年以上であっても免疫抑制剤を投与中、など通常の麻疹生ワクチン接種が困難と考えられる患者。
- ・ 投与方法
 - 接種部位と回数：上腕あるいは大腿の皮下に1回接種
 - 1回当たりの接種細胞数：
 - ・ コホート1 2x10⁵ 3例
 - ・ コホート2 1x10⁶ 3例
 - ・ コホート3 5x10⁶ 3例

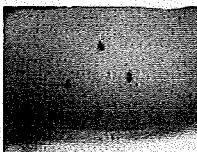
対象症例とDCワクチン投与細胞数

| 症例 | 診断 | 移植後 | ドナー | 慢性GVHD | 免疫抑制剤 | DCワクチン投与細胞数 |
|----|------------|-----|--------------|--------|-------|----------------------|
| 1 | infant-ALL | 15M | Unrelated BM | - | - | 2 x 10 ⁵ |
| 2 | T-ALL | 27M | Double CB | - | - | 2 x 10 ⁵ |
| 3 | NB | 29M | Auto BM | - | - | 2 x 10 ⁵ |
| 4 | AA | 12M | Unrelated BM | - | FK506 | 10 x 10 ⁵ |
| 5 | Ph1-ALL | 14M | Unrelated BM | - | - | 10 x 10 ⁵ |
| 6 | AML | 10Y | Related BM | + | FK506 | 2月18日 |

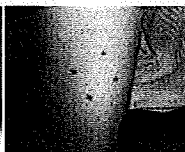
安全性

- ・ 5例すべてにおいて接種後24時間以内の有害事象の発生なし。

症例1



症例2



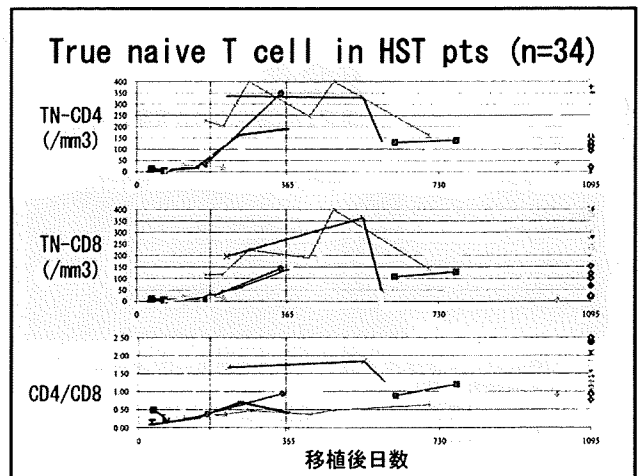
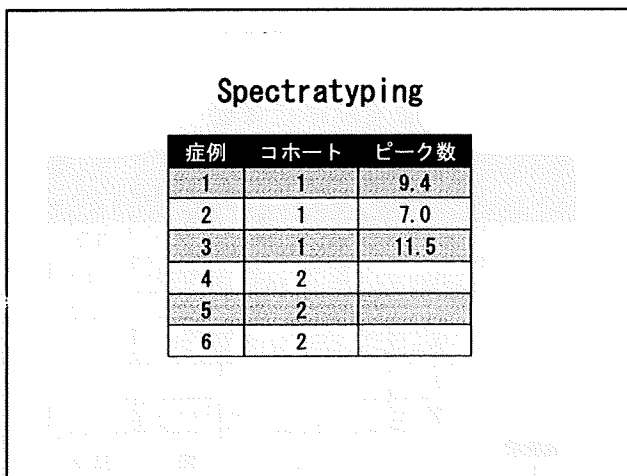
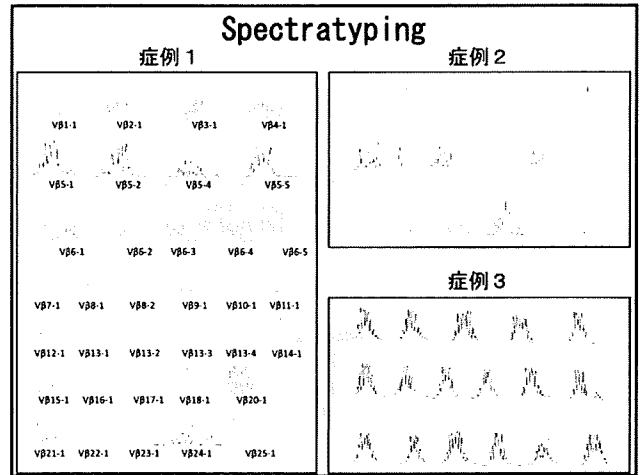
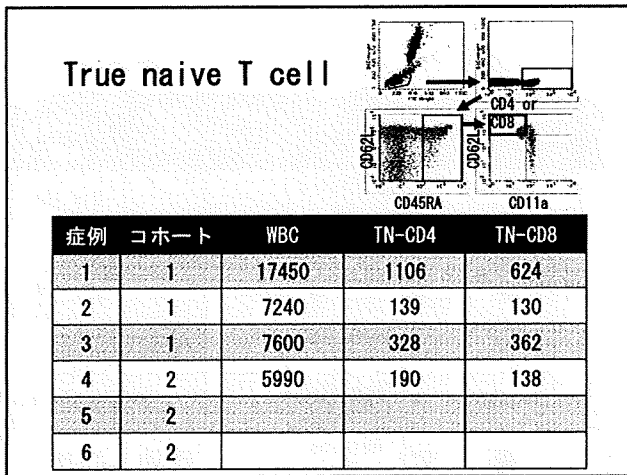
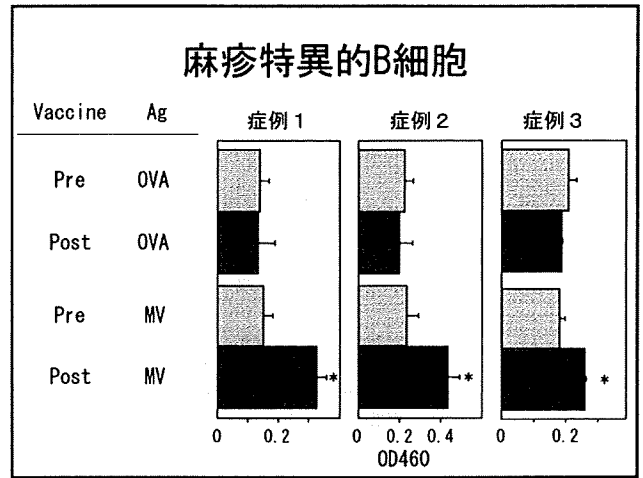
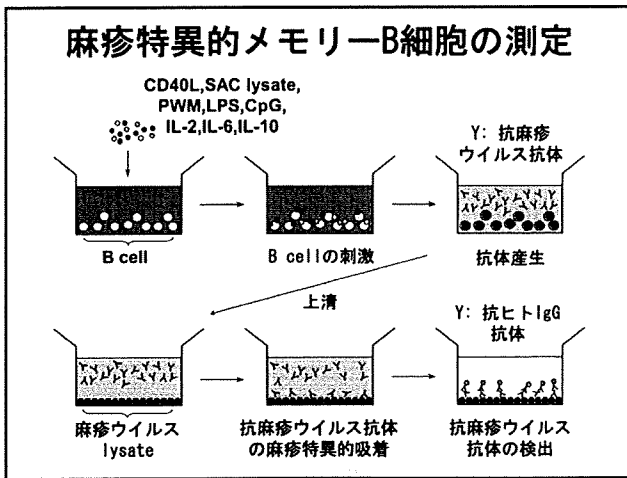
症例3



- ・ 4例において接種後6週以内の有害事象の発生なし（1例は接種後5週）。
- ・ 5例すべてのDCワクチンの細菌・真菌PCR陰性、エンドトキシン陰性

血清麻疹抗体価

| 症例 | コホート | HI | | ELISA | |
|------|------|-----|------|-------|------|
| | | Pre | Post | Pre | Post |
| 1 | 1 | <8 | <8 | <2.0 | 3.2 |
| 2 | 1 | <8 | <8 | <2.0 | 2 |
| 3 | 1 | <8 | <8 | <2.0 | <2.0 |
| 4 | 2 | | | | |
| 5 | 2 | | | | |
| 6 | 2 | | | | |
| 健康成人 | 1 | 8 | 8 | 30.7 | 33.8 |



まとめ

- ・造血細胞移植後の患者3例に 2×10^5 、2例に 10×10^5 の抗麻疹DCワクチンを接種した。
- ・副反応は認めず、安全性が確認された。
- ・3例中2例に血清麻疹抗体価の陽転をEIA法で認めた。
- ・3例中2例に麻疹特異的B細胞の増加を認めた。
- ・ワクチン接種時期の設定法として、現在末梢血true naive T cellとT cell repertoireを検討中である。
- ・TN-CD4 T cell数は、CD4/8比と比較して、HCT後早期に回復する傾向にあった。

厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

「臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究」班
会議

平成 22 年 1 月 30 日

於 東京医科歯科大学湯島キャンパス 5 号棟 4 階講堂

臍帯血造血幹細胞の老化解析

東海大学医学部 ○八幡 崇、安藤 潔

臍帯血造血幹細胞 (HSC) を免疫不全マウスに移植すると、マウス骨髄内にヒトの造血系が再構築する。移植された HSC は盛んな増殖反応を伴う造血再生を行わなければならない。この HSC の過度の細胞分裂は酸化ストレスの蓄積などを誘導する。その結果、自己複製能の低下、すなわち、幹細胞の早期老化を誘導し、組織再生機構の破綻に至る危険性が增大する。このことは、移植した幹細胞の生着不全や白血病の再発などといった深刻な問題の大きな要因となる。したがって、より安全で有効な再生医療法の確立のためには、幹細胞の組織再生能力を最大限に引き出すことと同時に、幹細胞の老化機構の理解に基づいた幹細胞機能を長期的に維持する戦略の確立が重要である。

我々はヒト HSC を免疫不全マウスに移植し、ヒト造血系を再構築させた後、再度別個体に移植を繰り返すことにより、ヒト HSC の幹細胞活性が著しく低下し、多くの HSC が幹細胞プールから枯渇してしまういわゆる早期老化状態に陥ることを明らかにした。そこで、移植前、1 次移植、2 次移植の各段階における CD34+CD38-細胞の性状解析を行なった。その結果、移植の進行にともなって CD34+CD38-細胞の活性酸素種 (ROS) レベルが上昇するとともに、 γ H2AX を指標とした DNA 損傷が、特に 2 次移植骨髄に生着している CD34+CD38-細胞において顕著に蓄積していることを見いだした。この DNA 損傷の蓄積は CD34+CD38+の前駆細胞集団には認められなかった。DNA 損傷は、不可逆的な細胞周期の停止状態、いわゆるセネッセンスを誘導することから、細胞老化の主因として注目されている。ROS の増加と DNA 損傷の関係を明確にするために、試験管内において CD34+CD38-細胞に L-Buthionine-sulfoximine (BSO) を添加して培養することにより細胞内 ROS の蓄積を誘導したところ、BSO の濃度依存的に DNA 損傷が引き起こされた。DNA 損傷によってヒト HSC における ink4a などの CDKI の発現が亢進し、細胞増殖停止状態に陥っていた。さらに、ROS による DNA 損傷を受けたヒト HSC の骨髄再建能が低下していた。ROS による DNA 損傷は抗酸化剤である N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) の添加によって抑制された。重要なことに、複数