

201023018A

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

新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の  
ex vivo 増幅技術の開発と応用

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中 畑 龍 俊

平成 23 (2011) 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

新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の  
ex vivo 増幅技術の開発と応用

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中 畑 龍 俊

京都大学 iPS 細胞研究所

臨床応用研究部門 疾患再現研究分野

## はじめに

1988年に開始された臍帯血移植は、世界各国で造血幹細胞移植の一つの柱になってきている。特に我が国では臍帯血バンクも充実し、非血縁者間の臍帯血移植は骨髄バンクからの非血縁者間移植にほぼ匹敵する数の移植が行われている。臍帯血移植が抱える問題点として、生着不全の頻度が高い、血球回復に時間がかかる、感染症の頻度が高いなどの欠点が当初から指摘され、それらの問題を回避するため臍帯血中の造血幹細胞を体外で増幅して移植に用いる試みがなされてきた。

本研究班はこれまで基礎研究成果の臨床応用推進研究事業「*Ex vivo* 増幅臍帯血幹細胞を用いたトランスレーショナルリサーチ」、再生医療等研究事業「サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験」、および平成20年度から始まった、本免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の *ex vivo* 増幅技術の開発と応用」において、サイトカインを用いた臍帯血造血幹細胞の *ex vivo* 増幅という基礎研究成果を臨床に応用すべく、GTP(Good Tissue Practice)に則った製造法の確立、品質管理法、品質保証法の確立、治療の安全性と有効性を検証しうる臨床プロトコルの作成、臨床研究実施体制の整備、細胞プロセッシング法の検証、品質管理法における評価系の開発、及び検証を行うことにより各々における具体的なガイドラインを作成すること、さらには移植後の再発や感染症に対する検査法、治療法の開発などを行うことにより、移植成績の向上に貢献することを目的として研究を実施した。またこれまで取り組んできた完全無血清培地、培養バッグといった培養デバイスの製品化の試みも行った。

今後は、*ex vivo* 増幅臍帯血移植の安全性、有効性を検証すると同時に、治療用細胞製剤をいかに安全に臨床応用すべきかについて具体的に示す先駆的な研究として、我々が開発した細胞プロセッシング法、品質管理法を普及、発展させること、さらにはわが国の細胞治療、再生医療における問題点を明確にし、その解決策を示していくことを目標として研究活動を継続していきたいと考えている。

本報告書が関係者の参考になれば幸いである。

平成 23 年 3 月 主任研究者 中畑 龍俊

## 目 次

|  |    |
|--|----|
| I. 研究組織  | 1  |
| II. 平成 22 年度総括研究報告                                 | 3  |
| 中畑 龍俊  |    |
| III. 平成 22 年度分担研究報告                                |    |
| 1. <i>ex vivo</i> 増幅臍帯血移植の臨床研究                     | 13 |
| 伊藤 仁也  |    |
| 2. 新規培養法の効率、安全性の検証と cell processing におけるデバイスの開発    | 19 |
| 伊藤 仁也  |    |
| 3. Cell processing における GMP の構築とガイドライン作成に関する研究     | 23 |
| 前川 平   |    |
| 4. 臍帯血移植後の免疫機構再構築に関する研究                            | 35 |
| 平家 俊男  |    |
| 5. 治療用細胞製剤の品質管理法・評価系の確立                            |    |
| 1) 品質管理法の確立：微生物の迅速検出法の開発                           | 39 |
| 清水 則夫  |    |
| 2) 品質管理の自動化に関するバリデーション                             | 45 |
| 伊藤 仁也  |    |
| 6. 分子基盤に基づいた新規増幅法、分化誘導法の開発                         | 51 |
| 金倉 謙、田中 宏和   |    |
| 7. 可溶性 Notch リガンド Delta1-Fc を用いて増幅した臍帯血造血前駆細胞の臨床研究 | 57 |
| 千葉 滋   |    |
| IV. 班会議記録合同研究カンファレンス                               | 61 |

|                        |    |
|------------------------|----|
| V. 研究成果の刊行に関する一覧 ..... | 63 |
| VI. 研究成果の刊行物・印刷物 ..... | 71 |

# I. 研究組織



平成 22 年度厚生科学研究

「新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の ex vivo 増幅技術の開発」研究班  
研 究 組 織

|       | 氏 名    | 所 属                    |
|-------|--------|------------------------|
| 主任研究者 | 中畑 龍俊  | 京都大学 iPS 細胞研究所         |
| 分担研究者 | 前川 平   | 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部     |
|       | 金倉 謙   | 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科   |
|       | 平家 俊男  | 京都大学大学院医学研究科発達小児科      |
|       | 清水 則夫  | 東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学 |
|       | 千葉 滋   | 筑波大学大学院人間総合科学研究科       |
|       | 伊藤 仁也  | 神鋼病院 血液病センター 細胞治療室     |
|       | 田中 宏和  | 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科   |
| 研究協力者 | 松村 到   | 近畿大学医学部血液内科            |
|       | 長谷川 雄一 | 先端医療センター診療開発部          |
|       | 橋本 尚子  | 先端医療センター診療開発部          |
|       | 初山 麻子  | 先端医療センター細胞管理室          |
|       | 丸山 京子  | 先端医療センター細胞管理室          |
|       | 高橋 隆幸  | 神戸市立医療センター中央市民病院免疫血液内科 |
|       | 松下 章子  | 神戸市立医療センター中央市民病院免疫血液内科 |
|       | 田端 淑恵  | 神戸市立医療センター中央市民病院免疫血液内科 |
|       | 白数 昭雄  | ニプロ株式会社                |
|       | 吉川 義洋  | ニプロ株式会社                |
|       | 武田 和之  | ニプロ株式会社                |
|       | 細井 裕之  | 和研薬株式会社                |
|       | 西川 茂道  | 和研薬株式会社                |
|       | 瀬尾 稔   | ヘモネティスクジャパン株式会社        |
|       | 加藤 守孝  | ヘモネティスクジャパン株式会社        |
|       | 松本 建   | 日水製薬株式会社               |

## Ⅱ. 平成 22 年度 総括研究報告書



総括研究報告書

新たな移植細胞療法に向けた造血幹細胞の  
ex vivo 増幅技術の開発と応用

総括研究者：中畑 龍俊  
（京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠点教授）

**研究要旨**

本研究では、造血幹/前駆細胞の絶対数不足から生じる臍帯血移植の問題点（生着不全、造血回復遅延など）を解決するため、*ex vivo* 増幅臍帯血を臍帯血移植へ臨床応用し、その有効性及び安全性を証明すること、さらには *ex vivo* 増幅臍帯血移植を新たな医療として確立することを目的としている。本研究においては、細胞治療を実現するために、アカデミアによる GMP（good manufacturing practice）に則った細胞治療製剤の製造、品質管理法の基盤づくりから、臨床応用へのトランスレーショナルリサーチとして、7つのテーマを設定し、研究を続けてきた。Clinical level での製造法の開発においては、完全無血清培地の開発、閉鎖系培養法の確立をデバイス開発とともに進めた。細胞治療製剤の品質管理においては、無菌試験やウイルス、マイコプラズマ否定試験を迅速かつ自動化を行い、バリデートし、品質管理の手順書を作成した。細胞治療製剤の長期安全性や有効性を予測する方法として、免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  を用いたヒト増幅臍帯血の移植系から全ての血球への分化、免疫系の解析を行うことに成功した。造血幹細胞の自己複製、分化の分子メカニズムの解明を目指した研究においては、造血幹細胞の分化、複製経路のシグナル伝達系の解析を通じ、次世代型の造血幹細胞の expand への道筋をつけることができたと考ええる。

## 総括研究者

中畑 龍俊 京都大学 iPS 細胞研究所  
臨床応用研究部門  
疾患再現研究分野  
特定拠点教授

## 分担研究者

前川 平 京都大学輸血細胞治療部  
教授

金倉 譲 大阪大学大学院医学系  
研究科血液・腫瘍内科学  
教授

平家 俊男 京都大学大学院医学研究科  
発達小児科学  
教授

清水 則夫 東京医科歯科大学難治疾患研  
究所ウイルス治療学  
准教授

伊藤 仁也 神鋼病院血液病センター  
細胞治療室

田中 宏和 大阪大学大学院医学研究科  
血液・腫瘍内科  
特任教授

千葉 滋 筑波大学大学院人間総合科学  
研究科  
教授

## 研究協力者

白数 照雄 ニプロ株式会社総合研究所  
人工臓器開発センター部長

西川 茂道 和研薬株式会社 (株)  
R&D 部部長

島津 光伸 株式会社三菱化学ビニール  
研究開発部長

## A：研究目的

近年、臍帯血移植数が急激に増加し、臍帯血移植の欠点とされる高い生着不全率と移植後の造血・免疫回復が遅延することが、明らかになってきた。今や臍帯血造血幹細胞の *ex vivo* 増幅法の確立、及び移植後早期に造血を回復させる方法の確立が急務となっている。すでに海外では、複数臍帯血移植の一方に *ex vivo* 増幅した臍帯血を移植する臨床試験を行い、明らかに生着が促進された報告もなされはじめています。一方 *ex vivo* で

加工した細胞を用いた臨床研究を実施する場合、GMP (good manufacturing practice) に則った治療用細胞製剤の製造法、品質管理法の確立は重要な課題である。

申請者らはこれまでサイトカインにより臍帯血CD34陽性細胞を体外増幅させる技術に関してのトランスレーショナルリサーチに取り組み、既存の増幅法と比較して有効かつ安全な細胞製剤の製造法、及び品質管理法を確立した。現在急性白血病を対象に、*ex vivo* 増幅臍帯血移植を実施し有害事象、生着促進への寄与につき評価する臨床研究を遂行している。

本研究期間中申請者らは、これまでの研究成果を応用、発展させる形で以下の3点を目標に研究を実施することを計画している。

1. 複数ユニットにおける増幅臍帯血移植の臨床研究を開始し、増幅臍帯血の意義を明確にすることにより、*ex vivo* 増幅臍帯血移植を新たな治療法として確立すること
2. 移植後の再発や感染症に対する検査法、治療法の開発を行うことにより、移植成績の向上に貢献すること
3. 申請者らが開発した細胞プロセッシング法及び品質管理法の検証を行うことにより、各々における具体的なガイドラインを作成し、様々な移植細胞治療に応用、発展させることを目的に本研究班を組織した。

## B：研究方法

本研究では、研究の実施にあたっては基盤整備、応用研究を含めた以下の7テーマを他大学や企業との共同で研究を進めた。

### I. *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

#### I-1. 単一ユニット増幅臍帯血移植

先端医療センターにおいて現在実施中の「急性白血病患者に対する同種臍帯血由来 *ex vivo* 増幅 CD34 陽性細胞移植に関する臨床第 I 相/前期第 II 相試験」の 1 例目に生じた生着不全の原因を解明するために拒絶に係るサイトカインの産生パターンを保存患者血清を用いて検討した。

## I-2. 複数ユニット増幅臍帯血移植

他の研究と並行する形で臨床プロトコルを作成し、*in vitro/in vivo*の細胞安全性試験（前臨床試験）を行い、「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に係る中央審査に向けたプロトコルを作成した。

## II. 新規培養法の効率、安全性の検証と cell processing におけるデバイスの開発

これまでの研究において我々は臍帯血造血幹細胞の完全無血清化に成功し、企業と共同で、無血清培地と培養バッグの開発を進めてきた。これにより、市販の培地より数倍 CD34 が増幅できるようになった。平成 22 年度内に新規デバイスを用いた培養により得られる細胞に関しての有効性、安全性を検証する。またこれらのデバイスの販売に向け、期間中に医療用具化に向けた申請を行う。

## III. Cell processing における GMP の構築とガイドライン作成に関する研究

アカデミアで行う細胞治療・再生治療開発に必要な cell processing における製造環境、品質管理、製造組織などの点からヒトに投与する細胞治療の安全性をいかに担保できるか細胞医療の実際の問題点などを検討した。

## IV. 臍帯血移植後の免疫機構再構築に関する研究

増幅させた細胞を移植することによってマウス生体内で再構築される T 細胞および B 細胞系再構築能に関して、これまでに確立した NOD/SCID/ $\gamma^c$  マウス (NOG マウス) への異種間移植系を用いて T、B 細胞の分化やその機能、及び特異的抗体産生や CTL の誘導能を解析する。また本年度はさらに CD4+CD25+regulatory T 細胞の出現についても検討した。臨床研究においては、臍帯血移植後の免疫能を細胞表面抗原解析、サイトカイン産生能、T 細胞動態につき評価し、増幅臍帯血が免疫機構再構築に及ぼす影響につき解析する。また申請者らが開発した真菌汚染の検査系の作製に加えて細菌の網羅的検査系についてさらに検討した。

## V. 治療用細胞製剤の品質管理法・評価系の確立

細胞製剤の品質安全性を担保すべく、①受入時、②中間、③出荷（最終製品）において必要な品質管理試験の検討を行った。

## VI. 分子基盤に基づいた新規増幅法、分化誘導法の開発

造血幹/前駆細胞の未分化性維持に関与する転写因子や細胞内シグナル伝達分子について解析を行い、それらを人為的に操作することで造血幹/前駆細胞を効率よくかつ安全に増幅、分化させる方法の開発に取り組んだ。細胞増殖にとって必須の金属である鉄に関しては、ほぼ 100%の飽和状態で鉄を含む細胞培養用 holo トランスフェリンを一定量含有するよう調整し用いており、培養液中から細胞内への鉄すなわちトランスフェリンの取込みはそのレセプターであるトランスフェリンレセプター1(CD71)を介したエンドサイトーシスにより行われる。細胞内の鉄濃度は種々機構により極めて厳密にコントロールされている一方で、鉄過剰状態では鉄の取込み、利用、貯蔵という過程の中で細胞内小器官間を速やかに行き来する不安定な鉄のプール(labile iron pool, LIP)が生じていることが知られているがLIPの生理的意義や病態との関連は明らかではない。そこで本研究では至適培養条件を検討する一環として、マウス造血細胞を用いて遊離鉄負荷が造血に及ぼす影響についての *in vitro* での解析を行った。

## VII. 可溶性 Notch リガンド Delta1-Fc を用いて増幅した臍帯血造血前駆細胞の臨床研究

サイトカインに加えて可溶性 Notch リガンドである Delta 1-Fc キメラ蛋白個相化した条件で臍帯血 CD133 陽性細胞を増幅する方法を開発した。その成果に基づいて臨床試験を行うため本年度は Clinical grade での培養試験を行った。

## C：結果と考察

### I. *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

「急性白血病に対する *Ex vivo* 増幅臍帯血移植の Phase I/II 試験」には 2 例の登録があったが、1 例は拒絶を生じ、もう 1 例は移植前検査の際に甲状腺癌が発見されて非適格となった。独立モニタリング委員会、および倫理委員会は 1 例目で拒絶を生じたことを重大な有害事象と判断し、原因究明を行うまで、新たな登録を行うことを見送る決定がなされたため、本年度も引き続き、拒絶された機序をサイトカインの詳細な検討を行い考察した。

症例報告：骨髄移植後再発 AML (M3) 例に対し、*ex vivo* 増幅臍帯血移植を行った。12 日間培養した結果、CD34 陽性細胞として  $15.0 \times 10^5/\text{kg}$  という大量 CD34 陽性細胞を移植することができた。(CD34 陽性細胞は 100.4 倍の増幅) Day16 に  $\text{WBC} > 1000$  となり、Day 19 の骨髄所見でも Complete chimera が得られ、多数の赤芽球や巨核球までもが出現していたが、結局その後、急激に拒絶された。

レスキューのために行った、1st donor からの PBSCT においても早期に生着したが、臍帯血移植の時と同様敗血症を発症し、Day21 からは汎血球減少が進行した。

拒絶時の骨髄にはレシピエントタイプの活性化 T 細胞が浸潤していたが臍帯血あるいは 2nd PBSCT のグラフトに対する特異的細胞傷害性 T 細胞ではなかった。(Elispot assay) 臍帯血移植後 Day10 で *Streptococcus mitis*、末梢血幹細胞後 Day10 には *Staphylococcus epidermidis* が検出され、その後 IL-5、IL-6、IL-8、MCP-1、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  といった炎症性サイトカインが上昇し、拒絶に陥った。細胞移植後感染が生じるまでは拒絶に関与することが報告されてきた。これらのサイトカインの変動はなかった。したがって、今回のサイトカインの産生パターンからは *ex vivo* 増幅臍帯血が拒絶に直接関わっていることを示すエビデンスは得られなかった。本症例では後述するように拒絶後行った末梢血幹細胞移植でも感染を契機に急速に拒絶に向かった反応がみられたことから、特殊な症例であった可能性も示唆され、今後症例の集積

が必要と考えられる。

骨髄非破壊的前処置による臍帯血移植後の生着不全例の特徴について虎ノ門病院グループは、生着不全の一要因である hemophagocytic syndrome (HPS) 発症と移植後 day10 以降の IL-8、MCP-1 高値との相関、pre-engraftment immune reaction (PIR) 発症と移植後 day10 以降の IL-5、IL-8 高値との相関、さらには血流感染症と移植後 day10 以降の IL-6、IL-8 高値との相関を報告している。

本症例において上昇したサイトカインが造血幹細胞に与える影響を造血幹細胞の培養系で検討した結果、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  を添加した系では、CD34 陽性細胞は早期に Apoptosis を起こすこと、単球、マクロファージへの分化が進み、試験管内でも Apoptosis 細胞をマクロファージが貪食する現象が再現されることがわかった。

これらのサイトカインに刺激された活性化マクロファージ、活性化 T 細胞から TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  がミトコンドリアが豊富で細胞回転が速い造血前駆細胞をミトコンドリア膜の Ca influx を増大させ、急激に Apoptosis に陥らせることが示唆される。別の試験で *ex vivo* 増幅した臍帯血は、直接これらのサイトカインを産生していないことから *Ex vivo* 増幅臍帯血移植特有の現象ではなく、敗血症に伴う高サイトカイン血症が引き金となり、Apoptosis 誘導性のサイトカイン、ケモカインが産生され、拒絶に至ったと考えたと本例における拒絶を説明できるのではないかと考えた。

### II. 新規培養法の効率、安全性の検証

昨年度に引き続き、より効率で安全な培養法の確立を目的としてリコンビナントアルブミンを担体としたリポソームを用いた新規無血清培地ならびにポリオレフィン系フッ化処理培養バッグ (NIPRO 社製) の開発を行った。新規無血清培地と培養バックを用いて現行の製造方法による製造試験を行った結果、従来の培養法に比し、約 2 倍の増幅効果が得られた。

実製造試験ならびに品質に関するデータ

の検討により、培養日数はこれまでの12日間から9日に短縮してもこれまでと同等の造血能力を持つ細胞が約同数得ることができることがわかった。

得られた細胞の染色体異常などは伴わずに、一定の安全性確保されると考えられた。

### III. GMP 及び GTP に準拠した cell processing におけるデバイス開発

前川らが担当したFDAのcGMPの調査研究および京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部分子細胞治療センター(Center for Cell and Molecular Therapy)での経験をもとに、わが国における先端医療開発、とくに先端的細胞治療や再生治療を進めるうえで必要なインフラストラクチャーとはどのようなものであるかについて、とくに安全性や品質評価の観点から検討を行った。

### IV. 臍帯血移植後の免疫機構再構築に関する研究

分担研究者の平家らはこれまでに臍帯血CD34+細胞を主任/分担研究者らが開発した免疫不全マウス NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$  移植し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺等におけるヒト血液細胞の出現を確認した。さらに、その分化の方向性についても検討し、従来の免疫不全マウスでは認められないヒトT細胞をも含むすべての系統への分化を確認した。また本年度はさらにCD4+CD25+regulatory T細胞の出現についても検討し、T細胞の出現とほぼ同じ時期にこれらのregulatory T細胞が出現することが確認された。

### V. 治療用細胞製剤の品質管理法・評価系の確立

細胞製剤の品質安全性を担保すべく、①受入時、②中間、③出荷(最終製品)において必要な品質管理試験の検討を行った。ウイルス否定試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験をバリデートして迅速に行えるよう整備した。また細胞膜のATP活性を鋭敏に定量することにより、細胞毒性試験、細胞傷害性試験を確立した。無菌試験にBacT/ALERT3Dシステムを導入し、バリデート

した。

真菌汚染の検査系の作製に加えて細菌の網羅的検査系を確立すべく、清水らは株間での保存性の高いリポゾーマルRNA遺伝子の共通配列を利用した真菌および細菌を網羅的・迅速に検出する系を確立した。

### VI. 分子基盤に基づいた増幅法、分化誘導法の開発

本年度は、至適培養条件を検討する一環として、遊離鉄負荷が造血に及ぼす影響についてin vitroでの解析を行い、急激な鉄負荷が正常造血細胞に対して、細胞内ROSの蓄積、さらにはROSによるp38MAPKの持続的活性化を介して未分化な細胞により強く細胞死を誘導すること、また赤血球系の分化異常など無効造血の病態形成に関与していることを見出した。

今後は転写因子、細胞周期制御因子の内的因子操作、及び培養条件を検討することで、至適な造血幹細胞増幅法、ならびに造血幹細胞からの系統特異的分化誘導法の開発を継続して行う予定である。

### VII. 可溶性NotchリガンドDelta1-Fcを用いて増幅した臍帯血造血前駆細胞の臨床研究

ヒト臍帯血CD133陽性細胞を可溶性NotchリガンドDelta1-Fcキメラ蛋白を固相化条件で培養し、筑波大学細胞プロセッシングファクトリーにてClinical gradeの培養法の確立を行った。さらに臨床試験に移行するため、筑波大学附属病院内に設置された細胞プロセッシング・ファクトリー(CPF)での臨床用試験GMP基準書の作成を行った。

また、実臨床試験に向けてfresh cord bloodからfrozen cord bloodの利用への切り替えを想定した予備実験を遂行した。

### D: まとめ

「急性白血病に対するex vivo増幅臍帯血移植のPhaseI/II試験」で行った第1例目に生じた拒絶に係るサイトカインの産生などについて検討した。保存血清や細胞を用いた様々な試験において増幅臍帯血移植との



因果関係は低いものの、臍帯血移植の拒絶の原因となるPIRに関しては改善効果が乏しかったということになる。今後複数臍帯血移植の一方を増幅させ、一方を増幅させない試験を準備しているが、移植免疫担当細胞を強化させるため、CD34 だけではなくすべての細胞を移植することに反映させたい。細胞治療製剤をアカデミアによるGMP製造への取り組みについては、品質管理法の自動化、製造施設の基準づくり、閉鎖系、無血清培養法の確立など成果をあげた。今後の再生医療、細胞治療への臨床応用に貢献するものとする。また、遊離鉄負荷が造血に及ぼす影響について *in vitro* での解析を行い、急激な鉄負荷が正常造血細胞に対して、細胞内ROSの蓄積、さらにはROSによるp38MAPKの持続的活性化を介して未分化な細胞により強く細胞死を誘導すること、また赤血球系の分化異常など無効造血の病態形成に関与していることを見出した。これは今後造血幹細胞の *ex vivo* 増幅に応用されることが期待される。

サイトカインに加えて、可溶性NotchリガンドDelta1-Fcキメラ蛋白を固相化条件で造血幹細胞を増幅する系は今後速やかな臨床展開が図られることが期待される。

## E：健康危険情報

*Ex vivo* 増幅臍帯血移植時に拒絶を生じた。詳細な報告書は独立モニタリング委員会、臍帯血バンクネットワーク、厚生労働省に提出した。

## F：研究発表

### 論文発表

1. Suzuki N, Yumura-Yagi K, Yoshida M, Hara J, Nishimura S, Kudoh T, Tawa A, Usami I, Tanizawa A, Hori H, Ito Y, Miyaji R, Oda M, Kato K, Hamamoto K, Osugi Y, Hashii Y, Nakahata T, Horibe K: Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with induction failure treated by the Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) ALL F-protocol. *Pediatric Blood Cancer*. 54(1):71-78, 2010.
2. Kato I, Umeda K., Awaya T., Yui Y., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Watanabe K., Heike T., Adachi N., Endo H., Mizukami T., Nunoi H., Nakahata T., Adachi S.: Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia by Rituximab. *Pediatr Blood Cancer*. 54:

- 329-331, 2010.
3. Sakai H, Ito S, Nishikomori R, Takaoka Y, Kawai T, Saito M, Okafuji I, Yasumi T, Heike T, Nakahata T.: A case of early-onset sarcoidosis with a six-base deletion in the NOD2 gene. *Rheumatology (Oxford)*. 49: 194-196, 2010.
4. Kubota M., Adachi S., Usami I., Okada M., Kitou T., Shiota M., Taniguchi Y., Tanizawa A., Nanbu M., Hamahata K., Fujino H., Matsubara K., Wakazono Y., Nakahata T.: Characterization of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in Japanese children: a retrospective multi-center study. *Int. J. Hematol*. 91:252-257, 2010.
5. Takeuchi M., Kimura S., Kuroda J., Ashihara E., Kawatani M., Osada H., Umezawa K., Yasui E. Imoto M., Tsuruo T., Yokota A., Tanaka R., Nagao R., Nakahata T., Fujiyama Y., Maekawa T.: Glyoxalase-I is a novel target against Bcr-Abl+ leukemic cells acquiring stem-like characteristics in a hypoxic environment. *Cell Death Diff*. 17:1211-1220, 2010.
6. Mizushima Y., Taki T., Shimada A., Yui Y., Hiraumi Y., Matsubara H., Watanabe M., Watanabe K., Kamitsuji Y., Hayashi Y., Tsukimoto I., Kobayashi R., Horibe K., Tawa A., Nakahata T., Adachi S.: Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int. J. Hematol*. 91:831-837, 2010.
7. Mizuno Y., Chang H., Umeda K., Niwa A., Iwasa T., Awaya T., Fukada S., Hiroshi Yamamoto H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T.: Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J*. 24:2245-2253, 2010.
8. Kuroda Y., Kitada M., Wakao S., Nishikawa K., Tanimura Y., Makinoshima H., Goda M., Akashi H., Inutsuka A., Niwa A., Nabeshima Y., Nakahata T., Nabeshima Y., Fujiyoshi Y., Dezawa M.: Muse cells – unique multipotent cells in human mesenchymal cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:8639-8643, 2010.
9. Matsuda K., Taira C., Sakashita K., Saito S., Yanagisawa MT., Yanagisawa R., Yozo Nakazawa Y., Shiohara M., Fukushima K., Oda M., Honda T., Nakahata T., Koike K.: Long-term survival after non-intensive chemotherapy in some juvenile myelomonocytic leukemia patients with *CBL* mutations, and the possible presence of normal individuals with the mutations. *Blood* 115:5429-5431, 2010.
10. Matsuse D., Kitada M., Kohama M., Nishikawa K., Makinoshima H., Wakao S., Fujiyoshi Y., Heike T., Nakahata T., Akutsu H., Umezawa A., Harigae H., Kita J., Dezawa M.: Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells differentiate into functional Schwann cells that sustain peripheral nerve regeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 69:973-985, 2010.
11. Kumada T., Yamanaka Y., Kitano A., Shibata M., Awaya T., Kato T., Okawa K., Abe T., Oshima N., Nakahata T., Heike T.: Ttyh1, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein localized to the endoplasmic reticulum,

is required for early embryonic development. *Develop. Dynam.* 239:2233-2245, 2010.

12. Kaichi S., Hasegawa K., Takaya T., Yokoo N., Mima T., Kawamura T., Morimoto T., Baba S., Doi H., Yamanaka S., Nakahata T., Heike T.: Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovascular Res.* 88: 314-323, 2010
13. Iwasa T., Baba S., Doi H., Kaichi S., Yokoo N., Mima T., Kanatsu-Shinohara M., Shinohara T., Nakahata T., Heike T.: Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 400: 27-33, 2010
14. Kusunoki T., Morimoto T., Nishikomori R., Yasumi T., Heike T., Fujii T., Nakahata T.: The effect of past food avoidance due to allergic symptoms on the growth of children at school age. *Allergology International.* 59: 369-374, 2010
15. Morishima T., Watanabe K., Niwa A., Fujino H., Matsubara H., Adachi S., Suemori H., Nakahata T., Heike T.: Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* in press.
16. Ueno H, Blanck JP, Sidney J, Zurawski SM, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski G, Nicewander D, Heike T, Nakahata T., Arai K, Arai N, Blankenship D, Sette A, Banchereaul J: Circulating CD4+ T cells Specific for H5 Hemagglutinin in Healthy Subjects. *J. Infectious Diseases* in press
17. Yui Y., Itoh K., Yoshioka K., Naka N., Watanabe M., Hiraumi Y., Matsubara H., Watanabe K., Sano K., Nakahata T., Adachi S.: Mesenchymal mode of migration participates in pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma LM8. *Clin Exp Metastasis.* in press
18. 中畑龍俊: 造血因子と臨床応用. *臨床検査* (第 54 巻第 6 号) 623-629, 2010 年 6 月 15 日
19. 中畑龍俊: iPS 細胞と遺伝性疾患 (特集 臨床遺伝学の進歩と日常診療. 遺伝性疾患の新しい治療と今後期待される治療研究) *日本医師会雑誌* (第 139 巻第 3 号) 632-634, 2010 年 6 月
20. 河井昌彦, 三宅史子, 岩永甲午郎, 松倉崇, 丹羽房子, 中畑龍俊: 早期新生児期の DIC パラメータの出生体重・日齢に伴う変化についての検討. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* (第 19 巻第 2 号) 33-36, 2010 年 10 月

#### 学会発表

1. Kodera Y, Yamamoto K, Kato S, Harada M, Kanda Y, Hamajima N, Asano S, Ikeda Y, Imamura M, Kawa K, Morishima Y, Nakahata T., Tanimoto M, Dohy H, Tanosaki R, Shiobara S, Sung-Won Kim, Nagafuji K,

Hino M, Miyamura K, Suzuki R; Safety and Risk of Allogenic Peripheral Blood Stem Cell Donation: The Comprehensive Report of Nation-Wide Consecutively Pre-Registered 3, 264 Family Donor Survey In 10 years Project by Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December4-7, 2010, Orland, Florida

2. Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Heike T, Nakahata T., Takihara Y, Kobayashi M: A novel Mutation K673R in STAT1 impaired the STAT1 signal transduction in a dominant- Negative manner identified in a Japanese boy with MSMD. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December4-7, 2010, Orland, Florida
3. Kato I, Niwa A, Saito M, Fujino H, Saida S, Hiramatsu H, Oshima K, Ito M, Adachi S, Heike T, Nakahata T.: Establishment of a novel CNS infiltrated xenograft model through engraftment of patient-derived acute lymphoblastic leukemic cell into NOD/SCID/ $\gamma$  c<sup>null</sup> mouse. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December4-7, 2010, Orland, Florida

4. 中畑龍俊: iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 18 回長崎細胞移植研究会、特別講演、2010 年 2 月 5 日 ホテルニュー長崎 長崎市
5. 中畑龍俊: iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 47 回日本小児神経学会近畿地方会、特別講演、2010 年 2 月 13 日 ピアザ淡海 大津市
6. 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 16 回西日本小児がんセミナー、特別講演、2010 年 2 月 27 日 リーガロイヤルホテル大阪 大阪市
7. 中畑龍俊: iPS 細胞を用いた今後の医療. 横浜内科学会例会、特別講演、2010 年 3 月 3 日 ホテルキャメロットジャパン 横浜市
8. 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 12 回外科分子細胞治療研究会、特別講演、2010 年 4 月 8 日 名古屋国際会議場 名古屋市
9. 中畑龍俊: iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 22 回大阪造血幹細胞疾患研究会 2010 年 6 月 25 日 ANA クラウンプラザホテル大阪 (ブリストル・マイヤーズ)
10. 中畑龍俊: iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 6 回医学生・若手医師のための小児診療最前線～新生児医療から高度先端医療・移植医療まで～ 2010 年 6 月 26 日 きたのホール (大阪市)

11. 中畑龍俊 : iPS 細胞を用いた今後の医療. Cell Biology Summer Meeting (CBSM) 2010 (細胞生物学から再生を考える) 2010年7月3-4日(3日) 箱根湯本温泉 南風荘(神奈川県足柄下郡)
12. 中畑龍俊 : iPS 細胞を用いた今後の医療. 第40回九州小児外科研究会 2010年8月28日 TKP 博多シティセンター
13. 中畑龍俊 : iPS 細胞を用いた今後の医療. 第55回日本輸血・細胞治療学会中国四国支部例会 2010年9月11日 米子コンベンションセンター
14. 中畑龍俊 : iPS 細胞を用いた今後の医療. 第62回和歌山市医師会医学会総会 2010年10月23日 和歌山ビック愛(和歌山市医師会大会議室) (和歌山市)
15. 中畑龍俊 : 小児における再生医療の展望. 第113回日本小児科学会学術集会、教育講演、2010年4月23-25日(23日) 盛岡市民文化ホール
16. 中畑龍俊 : Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells(iPS cells). 第16回日本遺伝子治療学会学術集会、教育講演、2010年7月1-3日(3日) 栃木県総合文化センター(宇都宮市)
17. 中畑龍俊 : iPS を用いた今後の医療. 第24回日本手術看護学会年次大会、教育講演、2010年9月17日-18日(17日) 国立京都国際会館
18. 中畑龍俊 : 再生医療とレチノイド(1. iPS 細胞). 第21回日本レチノイド研究会学術集会、教育講演、2010年11月13-14日(14日) 大阪医科大学(看護専門学校講堂)
19. 中畑龍俊 : iPS 細胞の臨床展開. 第31回日本臨床薬理学会年会、教育講演、2010年12月1-3日(1日) 国立京都国際会館(京都大学医学部附属病院薬剤部)
20. 中畑龍俊、伊藤守 : 再生医療の基礎研究に有用なヒト化動物. 第57回日本実験動物学会総会 シンポジウム3(テーマ: 再生医療の幕を開く動物実験)、5月12-14日(14日)、京都テルサ
21. 矢部普正、小原明、大賀正一、小林良二、土田昌宏、中畑龍俊、別所文雄、麦島秀雄、小島勢二 : 小児再生不良性貧血に対する代替ドナー移植前処置の検討; Thymoglobulin in Childhood Aplastic Anemia: The Dose of Thymoglobulin. 第32回日本造血細胞移植学会総会 2010年2月19-20日(20日)、アクトシティ浜松
22. 丹羽明、齋藤潤、加藤格、大嶋宏一、百瀬大、高橋和利、末盛博文、中辻憲夫、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊 : ヒトES/iPS 細胞からの試験管内造血系を用いた分化過程の解析. 第9回日本再生医療学会総会 2010年3月18-19日(19日) 広島国際会議場 広島市
23. 中畑龍俊 : 疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第47回日本臨床分子医学学会学術集会 2010年4月10-11日(11日) 東京国際フォーラム 東京都
24. 中畑龍俊 : Derivation of Engraftable Myogenic Precursors from Murine ES/iPS cells and Generation of Disease-specific iPS cells from Patients with Duchenne Muscular dystrophy(DMD) and Other Diseases. 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(第51回日本神経学会総会) Symposium 7(The Forefront of Regenerative Medicine Research) 5月20-22日(22日) 東京国際フォーラム
25. 中畑龍俊 : iPS 細胞と疾患モデル細胞. (ミニシンポジウム 1: 血液免疫関連疾患と iPS 細胞) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)
26. 西小森隆太、田中尚子、井澤和司、酒井秀政、村田祐樹、横山宏司、阿部純也、田中孝之、齋藤潤、河合朋樹、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男 : 抗 IL-1 療法(ワークショップ 2: サイトカインを標的とした病態制御の可能性) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)
27. 栗屋智就、張璽、水野雄太、丹羽明、加藤竹雄、深田宗一朗、山元弘、山中伸弥、中畑龍俊、平家俊男 : マウス胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞からの骨格筋幹/前駆細胞の誘導と移植効果(ワークショップ 7: 組織幹細胞による臓器再生) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)
28. 丹羽明、齋藤潤、加藤格、大嶋宏一、末盛博文、平家俊男、中畑龍俊 : ヒトES/iPS 細胞からの in vitro 二次元無血清造血誘導における、分化過程の経時的解析(ポスター) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日 京王プラザホテル(東京)
29. Itaru Kato, Akira Niwa, Toshio Heike, Megumu Saito, Satoshi Saida, Hisanori Fujino, Katsutsugu Umeda, Souichi Adachi, Mamoru Ito, Fumihiko Ishikawa, Tatsutoshi Nakahata: A novel therapy for ALL by targeting the extramedullary sites. (プレナリー) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
30. Tatsuya Morishima, Ken-Ichiro Watanabe, Akira Niwa, Hisanori Fujino, Souichi Adachi, Tatsutoshi Nakahata: Neutrophil differentiation from human induced pluripotent stem(iPS) cells for disease investigation. (口演)

第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜

31. Akira Niwa, Toshio Heike, Katsutsugu Umeda, Koichi Ohima, Itaru Kato, Hirofumi Suemori, Megumu Saito, Tatsutoshi Nakahata: Tracing the developmental route from human ESC/iPSCs to blood via mesoderm in Serum-free 2D culture. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
32. Nao Yoshida, Shinsuke Hirabayashi, Yuji Zaïke, Masahiro Tsuchida, Ayami Yoshimi, Atsuko Masunaga, Masahumi Ito, Yoshitoshi Otsuka, Seiji Kojima, Kenichi Koike, Tatsutoshi Nakahata, Atsushi Manabe: A prospective registration of 75 children with juvenile myelomonocytic leukemia. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
33. Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Hidemasa Sakai, Ryuta Nishikomori, Yoko Mizoguchi, Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi: Identification of novel mutation in STAT1 and molecular pathogenesis of MSMD. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
34. 中畑龍俊: 白血病治療の進歩と今後の展望. 第52回日本小児血液学会総会/第26回日本小児がん学会学術集会(特別企画 叡智の結果—過去、現在、そして未来へ) 2010年12月17-19日(18日) 大阪国際会議場
35. 加藤格、丹羽明、平家俊男、斎藤潤、才田聡、森嶋達也、藤野寿典、梅田雄嗣、足立壮一、伊藤守、石川文彦、中畑龍俊: 白血病細胞と髓外微小環境の解明. 第16回西日本小児がんセミナー 2010年2月27日 リーガロイヤルホテル大阪 大阪市

#### G: 知的財産権の出願・登録状況

なし

### Ⅲ. 平成 22 年度 分担研究報告書



分担研究報告書

1. *ex vivo* 増幅臍帯血移植の臨床研究

移植後拒絶例でのサイトカインの解析

分担研究者：伊藤 仁也

（神鋼病院 血液病センター 細胞治療室）

研究要旨

本研究班では「急性白血病に対する *Ex vivo* 増幅臍帯血移植の Phase I/II 試験」を 2007 年 4 月から開始し、骨髄移植後再発 AML (M3) 例に対し、*Ex vivo* 増幅臍帯血移植を行った。Day16 に WBC>1000 となり、Day 19 の骨髄所見でも Complete chimera が得られ、多数の赤芽球や巨核球までもが出現していたが、結局その後、急激に拒絶された。レスキューのために行った、1st donor からの PBSCT においても早期に生着したが、臍帯血移植の時と同様敗血症を発症し、Day21 からは汎血球減少が進行した。

拒絶の原因を解明することが急務と考えられ、種々の解析を行ったが、（平成 20 年度報告書）サイトカインによる、造血細胞の細胞死を誘導の関与が疑われた。そのため、本年度は、拒絶の際に検出された、サイトカインが造血幹細胞に与える影響を解析した。

拒絶時 IL-5, IL-6, IL-8, IL-2、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  MCP-1, RANTES、NAP-2, TIMP-1, TIMP-2, IL-4, Ang, IGFBP-2 といったサイトカインが検出されたが、経時変化において拒絶と関わったサイトカインは IL-5, IL-8, MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  であった。臍帯血 CD34 陽性細胞を用いた実験において TNF- $\alpha$  と INF- $\gamma$  は相乗的に作用し、細胞死に至らせるメカニズムがあることが判明した。今回臨床例においては、感染症とそれに続発した PIR (pre-engraftment immune reaction) により、高濃度の TNF- $\alpha$  と INF- $\gamma$  が産生され、造血幹細胞のミトコンドリア障害を引き起こし、急激に細胞死を誘導した結果、拒絶が起きたと考えられた。

## A：研究目的

「急性白血病に対する Ex vivo 増幅臍帯血移植の PhaseI/II 試験」には2例の登録があったが、1例は拒絶を生じ、もう1例は移植前検査の際に甲状腺癌が発見されて非適格となった。独立モニタリング委員会、および倫理委員会は1例目で拒絶を生じたことを重大な有害事象と判断し、原因究明を行うまで、新たな登録を行うことを見送る決定がなされたため、本年度も引き続き、拒絶された機序をサイトカインの詳細な検討を行い考察した。

## B：研究方法

Ex vivo 増幅造血幹細胞移植後拒絶を生じた患者保存血清を用いて経時的にサイトカインの産性パターンを検討した。

サイトカインパターンの定性的解析はウエスタンブロット法により72種類のサイトカイン・ケモカインを網羅的に調べ、陽性例に対しては、フローサイトメトリーによるビーズ定量法によりサイトカイン量を定量した。

また、拒絶時に産性されているサイトカインを臍帯血 CD34 陽性細胞に添加し、コロニー形成に与える影響を調べた。また CD34 陽性細胞を SCF+TPO+FL+IL-6/sIL-6R で刺激した際の増幅抑制への影響を検討した。細胞死のアッセイには Annexine/PI 染色を行い、Apoptosis 細胞の定量的解析を行った。

## C：結果

### 【患者の臨床経過】

移植前処置は Flu 25mg/m<sup>2</sup> 5日間、L-PAM

70mg/m<sup>2</sup> 2日間投与し、全身放射線照射(2Gy)を施行した。移植に伴う合併症は前処置による regimen related toxicity である嘔気が持続した他は、特に認めなかったが、Day10から 38.1 度の発熱を認め、血液培養で Streptococcus mitis /oralis が検出され、敗血症と診断した。day12 からは浮腫、体重増加が出現した。day12 に増幅臍帯血を輸注した。(有核細胞数 0.85x10<sup>7</sup>/kg, CD34 15.0x10<sup>5</sup>/kg) 輸注に伴う有害事象は特に認めなかった。day14 には、WBC 170/μl に上昇し、day16 には WBC 1020/μl に上昇したが、38.6 度の発熱、呼吸数の増加と SpO<sub>2</sub> が若干低下(96~97%)を来したため、生着症候群と考え、利尿剤の投与および G-CSF を中止した。しかしその後も 38 度から 39.8 度の spike fever が day22 まで持続した。day19、の骨髄検査では有核細胞数 1 万/μl、で下図のような幼弱な顆粒球系細胞や赤芽球の集簇像、巨核球まで出現していた。骨髄キメリズム検査では99%以上の細胞がドナータイプであった。しかし、同日より血球減少が生じ day22 には WBC300/μl となり再び骨髄検査を行ったところ有核細胞数は 4000/μl に減少し、単球、マクロファージの増生が目立った。明らかな血球貪食像の増加は認めなかったが、骨髄キメリズム検査では27%のレシピエント細胞が出現してきた。また LDH の上昇(1076 IU/l)に加え、発熱の持続(7日間)があったため、移植後血球貪食症候群も鑑別にあげ、mPSL の投与を行ったが、day28 の骨髄検査で骨髄キメリズムは 100%レシピエントタイプとなり拒絶を確認した。この時点で study off として直ちに 1st donor からの末梢血幹細胞による再移植の準備を開始した。2<sup>nd</sup> SCT は 1st donor である妹より Flu 40mg/kg 5 日間の前処置後に有核細胞数