

201023040A

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

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：基礎から臨床へ

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池原 進

平成23(2011)年 3月

序

新しい骨髄移植の技術（灌流法＋骨髄内骨髄移植法）は、我々が開発した技術であり、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る。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。

骨髄内へ細胞を直接注入する方法（IBM）に関しては、臍帯血を腸骨内へ注入することが、世界中で広く実施されるようになってきているので、本班では、骨髄細胞の採取方法である PM の安全性のみならず、PM の利点を、従来の吸引法（AM）と比較検討する。特に、採取骨髄液中の赤血球と T 細胞の混入度を、donor の同意を得て、同一人の左右の腸骨を用いて比較する。現在、臨床プロトコールを倫理委員会へ提出中である。

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 23 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		
	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： 基礎から臨床へ	(池原 進) ----	3
III.	分担研究報告		
	1. 同種移植後の再発白血病の治療法開発	(赤塚 美樹) ----	13
	2. 間葉系幹細胞における HLA クラス Ib 分子の 発現に関する研究	(一戸 辰夫) ----	19
	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) ----	23
	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サイトメガロ， EB ウイルス感染症の治療	(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. 臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発	(村田 誠) ----	35
	7. 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：基礎から臨床へ	(森 眞一郎) ----	37
	8. 骨髄内造血細胞移植に付随する生着不全や日和見感染症に 対する新規診断法、免疫再構築過程評価法、及び免疫細胞 療法の開発に関する研究	(森尾 友宏) ----	39
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	43
V.	学会発表に関する一覧	-----	55
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	-----	61
VII.	研究事業報告	-----	63
VIII.	研究成果の刊行物・印刷	-----	297

I. 研 究 班 構 成

「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：
基礎から臨床へ」研究班

<区 分>	<氏 名>	<所 属>	<職 名>
研究代表者	池原 進	関西医科大学共同研究講座 (大塚製薬株式会社) 幹細胞異常症学	教 授
分担研究者	赤塚 美樹	藤田保健衛生大学医学部 血液内科	准教授
	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
	村田 誠	名古屋大学医学部附属病院 血液内科	講 師
	森 眞一郎	関西医科大学第一内科・ 同附属枚方病院血液腫瘍内科	講 師
	森尾 友宏	東京医科歯科大学・大学院・ 発生発達病態学分野	准教授
事務局	李 銘	関西医科大学共同研究講座 (大塚製薬株式会社) 幹細胞異常症学	講 師

〒570-8506 大阪府守口市文園町 10-15
Tel: 06-6992-1001 (内線 2684)
Fax: 06-6993-9627
E-mail: liming@takii.kmu.ac.jp

II. 総括研究報告

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：基礎から臨床へ

研究代表者 池原 進 関西医科大学共同研究講座（大塚製薬株式会社）

幹細胞異常症学 教授

研究要旨

同種骨髄移植（BMT）では、①移植片対宿主病、②生着不全、③T細胞、の機能の回復が不完全などの重要な問題が山積している。新しい BMT の技術（灌流法+骨髄内骨髄移植法）では、これらの問題が解決されるだけでなく、ドナーや患者さんの負担が軽減される。さらに、BMT の適用疾患が拡大されるため、多くの難病で苦しんでおられる患者さんにとって大きな福音となる。このような灌流法と骨髄内骨髄移植法を組み合わせた、新しい骨髄移植の技術は、我々が、世界で初めて開発したもので、他の追随を許さない。

本研究では、いかなる難病がこの新技術によって治療可能かをモデル動物で解析し、ヒトへ応用する。

研究分担者

赤塚 美樹 藤田保健衛生大学医学部
血液内科 准教授

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

村田 誠 名古屋大学医学部附属病院
血液内科 講師

森 眞一郎 関西医科大学第一内科・
同附属枚方病院
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

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、間葉系幹細胞の異常に伴って発症する疾患（アルツハイマー病、骨粗鬆症等）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、倫理委員会の承認と患者さんの同意を得て、ヒトへの応用を開始する。安全性が証明されれば、新しい骨髄移植法の応用範囲は、測り知れないものと考ええる。さらに、骨髄内骨髄移植と胸腺移植の併用療法は加齢に伴って発症する疾患（アルツハイマー病、糖尿病等）にも有用であることが判明している（*Neurosci. Lett.* 465:36, 2009）。

新しい骨髄移植の方法は国際的にもヒトへ応用しようという動きがあるが、現在まで、臍帯血を用いて、腸骨内へ注入しようとするものである。臍帯血中には、間葉系幹細胞が少量しか含まれないこと、また、血管の豊富な腸骨内への注入（申請者らは脛骨内へ注入）は、注入した細胞が循環系へ移行し易いため、静脈内注入と変わらず、現在までは、顕著な効果は得られていない。

A. 研究目的

我々が開発した新しい BMT の技術は、ヒト同種 BMT の主要な問題点を解決する革新的技術であり、

B. 研究方法

1) 造血幹細胞異常症の病因解析と治療法の確立 (池原, 品川, 一戸, 小川, 森, 小島, 村田)

RA のモデルマウス (SKG), 自己免疫性膵炎のモデルラット (WBN/Kob), Crohn 病のモデルマウス (SAM/Yit), ALS のモデルマウス, 心筋症のモデルマウス等を用いて、これらの病因が造血幹細胞の異常によるかを明らかにする。さらに、その治療法を確立する。

2) 間葉系幹細胞異常症の病因の解析と治療法の確立 (池原, 一戸, 品川, 森尾, 赤塚, 森, 小島, 村田)

我々は、骨粗鬆症や、ある種の肺気腫は、骨髄内骨髄移植により、治療だけでなく病気の transfer もできることを証明した (Stem Cells 24:2071,2006; Stem Cells 5:1356,2007)。従って、これらの疾患は間葉系幹細胞異常症であると考えられる (J. Hematother. Stem Res. 12: 643, 2003; J. Autoimmunity 30: 108, 2008)。さらに、加齢に伴って発症してくる疾患 (II 型の糖尿病, アルツハイマー病, Metabolic syndrome, 動脈硬化症, 等) も間葉系幹細胞の異常症ではないかという仮説に基づいて現在解析中である。

3) 難治性肺疾患の病因解析 (品川, 池原)

モデル動物を用いて、肺線維症, 肺気腫, 移植後肺障害 (IPS) 等の病因を明らかにし、根治療法を開発する。

4) 新しい骨髄移植方法を用いた悪性腫瘍の治療 : DLI の併用 (森尾, 赤塚, 品川, 森, 村田, 小島, 池原)

我々は、マウスの系で、骨髄内骨髄移植に DLI を併用することによって、抗腫瘍効果と延命効果が得られることを見出した (Int.J.Oncol. 30:1309,2007)。さらに、Treg や myeloid suppressor の除去、活性化した細胞傷害性 T 細胞の誘導、ペプチドワクチン等を併用することによって、癌の根治療法を開発する。

5) IBM-BMT と胸腺移植の併用による悪性腫瘍の治療 (池原, 赤塚, 森尾, 小島, 品川)

マウスで、骨髄内骨髄移植に胸腺移植を併用することにより、著明な抗腫瘍効果が発揮できることを見出した (Bone Marrow Transplantation 43:829,2008)。この際、移植する胸腺は、third party の胸腺でも有効であることが判明しており、ヒトへの応用も期待できる。

6) 臓器移植への応用 (全員)

我々は、骨髄内骨髄移植を臓器移植 (心, 膵島, 肝等) と併用すると、拒絶が起らないことを小動物の系で証明している。サルを用いてこれを証明し、ヒトへ応用する。

7) Haploidentical BMT の系への応用 (池原, 小川, 一戸, 森)

ウサギにおいては、MHC の不一致の系よりも haploidentical (半合致) の系の方が、骨髄移植の成功率が高いことが判明した (Transpl. Immunol.24:33,2010) ので、ヒトへの応用の前段階としてカニクイザルの系で確認する。

8) ヒトへの応用 (全員)

上記、動物実験の系で、安全性と有効性が確立されれば、ヒトへの応用を開始する (添付資料 I 参照)。

(倫理面への配慮)

研究対象者に対しては、人権擁護上の配慮を充分にする。先ず、研究対象者に対しては、不利益な内容がないことを説明し、危険性のないように充分配慮する。これらを、インフォームド・コンセントで詳細に説明し納得の上で実施する。

動物実験に関しても、動物愛護上の配慮を充分に行う。灌流法に関しては、100 匹以上のカニクイザルを用いた大規模な実験の結果に基づいて、ヒトへの Phase I Study を実施するが、これまでに一例も事故を起こしたことがないことを説明する。

C. 研究結果

- 1) IBM-BMT とドナーリンパ球輸注 (DL) の併用療法は、悪性腫瘍の増殖を抑制するだけでなく、GvHD の発症も抑えることができることを我々は発見した。今回、静脈内へ T 細胞を注入する (IV-DLI) よりも、皮下注 (SC-DLI) した方が、より優れていることを見出した (文献①参照)。
- 2) 我々は IBM-BMT に胸腺移植 (TT) を併用することによって、強力な抗腫瘍効果が得られることを見出した。今回、TT の際の胸腺の aging の影響を比較し、新生時期の胸腺 (NT) が最も効果があり、造血幹細胞 (HSC) のソースとしても胎性期肝 (FLC) との組合せが最善であることが判明した (文献②参照)。
- 3) I 型の糖尿病は、自己免疫疾患と考えられてきたが、最近、II 型の糖尿病も自己免疫疾患ではないかということを示唆するデータが蓄積している。我々は、II 型糖尿病モデルマウス (db/db) を用いて、新しい骨髄移植 (IBM-BMT) と胸腺移植を併用して病因を解析した。IBM-BMT だけでは、db/db マウスの T 細胞が回復しないため感染で死亡したが、IBM-BMT に胸腺移植を併用することにより、糖尿病が治療できることを発見した。これは、IBM-BMT によって、ドナーの間葉系幹細胞 (MSC) が recruit されるためであり、骨髄の脂肪化、糖尿病性腎症も改善され、T 細胞の機能や血中の adiponectin の量も正常化することが明らかになった。将来、ヒトへの応用の可能性も視野に入れ、さらなる解析をしている (文献③参照)。
- 4) ウサギではアロの BMT の成功率が、極めて低い。今回、半合致 (haploidentical) の親子のウサギの組合せで、灌流法により骨髄細胞を採取し、骨髄内骨髄移植をすることにより、GvHD の発症を予防し、1 年以上の長期に亘って生存させることに成功した (文献④参照)。
- 5) FGF と FGFR は造血系の細胞にも表現されているが、我々は、FGFR2 からの signaling が IBM-BMT 後の造血系の回復を促進することを見出した。これは、シグナルが前駆細胞に入ると、anti-apoptotic に作用することに依ると考える (文献⑤参照)。
- 6) ヒトを含めた担癌動物では胸腺の機能が低下し、免疫不全に陥り、予後の悪化につながるが、進行した担癌動物に胸腺移植をすると、延命効果が期待できることを明らかにした。興味あることに、T cell の機能が回復し、myeloid suppressor や Treg の数の減少が認められた (文献⑥参照)。
- 7) BMT の際の放射線照射の副作用として早期の卵巣機能不全 (POF) と骨粗鬆症が重要な問題である。我々は、IBM-BMT に卵巣の移植を併用すると、POF と骨粗鬆症の発症を予防できることを明らかにした。これらの結果は、悪性腫瘍の治療として、ヒトでは、大量の放射線照射や大量の化学療法が行われているが、これらの副作用を軽減する上に IBM-BMT と卵巣の移植の併用の有用性を示唆するものである (文献⑦参照)。
- 8) 我々が、胎生期のマウスの骨髄付着細胞から樹立した mesenchymal stem cell の cell line (FMS/PA6-P) は neural cell adhesion molecules (NCAM) を強度に発現している。この NCAM は、HSC と MSC との interaction molecule としてこれまで注目されてきたが、今回、マウス由来の MSC (FMS) とヒトの造血前駆細胞分画 (CD34 (+) CD38 (-) 細胞) との coculture で、NCAM は、ヒトの hematopoiesis を促進する上でも、重要な分子であることを明らかにした (文献⑧参照)。
- 9) 樹状細胞 (DC) は、免疫の調節に重要な役割を演じているが、この論文は、TNBS で誘導した ileitis (Crohn disease のモデル) を用いて、ある種の DC subset がこの ileitis の終焉に重要な働きを演じていることを見出した (文献⑨参照)。

D. 考察・E. 結論

基礎研究としては、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、末梢値の混入が少ないこと、

従って、GvHD が起こらないこと、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。

骨髄内へ細胞を直接注入する方法（IBM）に関しては、臍帯血を腸骨内へ注入することが、世界中で広く実施されるようになってきているので、本班では、骨髄細胞の採取方法である PM の安全性のみならず、PM の利点を、従来の吸引法（AM）と比較検討する。特に、採取骨髄液中の赤血球と T 細胞の混入度を、donor の同意を得て、同一人の左右の腸骨を用いて比較する。臨床プロトコールを作成し、倫理委員会へ承認を得るべく、資料を提出中である。

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 も起こらず、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

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shi M, Adachi Y, Cui Y, Li M, Lian Z, Zhang Y, Yanai S, Shima C, Imai Y, Ikehara S: Combination of Intra-Bone Marrow-Bone Marrow Transplantation and Subcutaneous Donor Splenocyte Injection Diminishes Risk of Graft-Versus-Host Disease and Enhances Survival Rate. *Stem Cells Dev.* 2010 Dec 22. [Epub ahead of print].
- 2) Zhang Y, Hosaka N, Cui Y, Shi M, Ikehara S. Effects of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Plus Thymus Transplantation on Malignant Tumors: Comparison Between Fetal, Newborn, and Adult Mice. *Stem Cells Dev.* 20(4): 599-607, 2011.
- 3) Li M, Abraham NG, Vanella L, Zhang Y, Inaba M, Hosaka N, Hoshino S, Shi M, Ambrosini YM, Gershwin ME, Ikehara S: Successful modulation of type 2 diabetes in db/db mice with intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus concurrent thymic transplantation. *J. Autoimmun.* 35(4): 414-423, 2010.
- 4) Cui Y, Nakamura S, Shi M, Feng W, Cui W, Guo K, Zhang Y, Ikehara S: A successful haploidentical bone marrow transplantation method in rabbits: perfusion method plus intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Transpl. Immunol.* 24(1): 33-39, 2010.
- 5) Shigematsu A, Shi M, Okigaki M, Adachi Y, Koike N, Che J, Iwasaki M, Matsubara H, Imamura M, Ikehara S: Signaling from fibroblast growth factor receptor 2 in immature hematopoietic cells facilitates donor hematopoiesis after intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *Stem Cells Dev.* 19(11): 1679-1686, 2010.

- 6) Hosaka N, Cui W, Zhang Y, Takaki T, Inaba M, Ikehara S: Prolonged survival in mice with advanced tumors treated with syngeneic or allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus fetal thymus transplantation. *Cancer Immunol. Immunother.* 59(7): 1121-1130, 2010.
- 7) Feng W, Cui Y, Zhan H, Shi M, Cui W, Guo K, Li Q, Song C, Zhang Y, Mori T, Gershwin ME, Abraham NG, Ikehara S: Prevention of premature ovarian failure and osteoporosis induced by irradiation using allogeneic ovarian/bone marrow transplantation. *Transplantation.* 89(4): 395-401, 2010.
- 8) Wang X, Hisha H, Mizokami T, Cui W, Cui Y, Shi A, Song C, Okazaki S, Li Q, Feng W, Kato J, Ikehara S: Mouse mesenchymal stem cells can support human hematopoiesis both in vitro and in vivo: the crucial role of neural cell adhesion molecule. *Haematologica.* 95(6): 884-891, 2010.
- 9) Hoshino S, Inaba M, Iwai H, Ito T, Li M, Gershwin ME, Okazaki K, Ikehara S: The role of dendritic cell subsets in 2, 4, 6- trinitrobenzene sulfonic acid-induced ileitis. *J. Autoimmun.* 34(4): 380-389, 2010.

(書籍)

- 1) Ikehara S : A revolutionary BMT method. In: *Bone Marrow Transplantation Across Major Genetic Barriers* (Yair Reisner and Massimo F martelli, eds.) World Scientific. New Jersey・London・Singapore・Beijing・Shanghai・Hong Kong・Taipei・Chennai 441-455, 2010.

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 石 明, 足立 靖, 池原 進.
「骨髄内骨髄移植と皮下 donor lymphocyte infusion の組み合わせによる効果」
第 99 回日本病理学会総会
4 月 27 日～4 月 29 日 (東京)
- 2) 中村修二、森 眞一郎、池原 進.
「ヒト灌流法のマニュアル」
厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業平成 22 年度第 1 回合同班会議
7 月 3 日, 4 日
- 3) 池原 進
「新しい骨髄移植方法の最新の知見と今後の見通し」
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 平成 22 年度第 2 回合同班会議
1 月 29 日
- 4) 研究代表者 池原 進
「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：基礎から臨床へ」
厚生労働科学研究 7 研究班合同公開シンポジウム
1 月 30 日

(国際学会)

- 1) Q. Li, H. Hisha, T. Takaki, Y. Adachi, M. Li, J. Kato, M. Inaba, N. Hosaka, M. Maki, S. Ikehara
「Transformation potential of bone marrow stromal cells into undifferentiated high grade pleomorphic sarcoma」
14th International Congress of Immunology
August 23, 2010~August 27, 2010 (Kobe, Japan)
- 2) Y. Cui, S. Nakamura, M. Shi, Q. Li, M. Li, S. Ikehara
「Prevention of premature ovarian failure and osteoporosis induced by irradiation using allogeneic ovarian/ bone marrow transplantation」
14th International Congress of Immunology
August 23-27, 2010 (Kobe, Japan)
- 3) M. Shi, Y. Adachi, Y. Cui, M. Li, Q. Li, S. Yanai, S. Ikehara
「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」
14th International Congress of Immunology
August 23-27, 2010 (Kobe, Japan)
- 4) M. Li, M. Inaba, S. Hoshino, K. Okazaki, N. Abraham, S. Ikehara.
「Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP 8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation」
14th International Congress of Immunology
August 23-27, 2010 (Kobe, Japan)
- 5) S. Ikehara.
「A novel BMT technique for the treatment of various currently intractable diseases: From bench to bedside」
6th International Symposium: Haploidentical Stem Cell Transplantation.
September 12-14, 2010 (Jerusalem, Israel)
招聘講演
- 6) S. Ikehara. → 代理で M. Li が発表
「Factors involved in aging: mesenchymal stem cells and thymus」
Multidisciplinary Conference: Lifestyle and Ageing
October 4-5, 2010 (Pisa, Italy) 招聘講演
- 7) M. Li, M. Shi, N.G. Abraham, S. Ikehara.
「Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP 8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation」
Multidisciplinary Conference: Lifestyle and Ageing
October 4-5, 2010 (Pisa, Italy)
- 8) S. Ikehara.
「A revolutionary therapy for the treatment of disorders of hemopoietic stem cells (HSCs) and/or mesenchymal stem cells (MSCs)」
The Fourth International Conference on Cell Therapy
November 11, 2010 (Seoul, Korea) 招聘講演

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明の名称：骨髓細胞の採取装置及び骨髓針

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) 発明の名称：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) 骨髓液採取セット及び骨髓針

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) 骨髓ドリル

特願 2007-12791

2008.1.17

4) Immunotolerance Inducer

PCT/JP98/00909

1998.3.4

3. その他

1) 池原 進

「骨髄内骨髄移植法で多くの難病克服に期待」

Medical Tribune Vol. 43, No.20

平成 22 年 5 月 20 日

2) 池原 進、李 銘

「骨髄、胸腺移植で正常に」

毎日新聞

平成 22 年 9 月 13 日 (月) 夕刊 3 版 社会 10

関東版

3) 池原 進、李 銘

「<2 型糖尿病>骨髄、胸腺移植で正常に 動物
実験で関西医大」

YAHOO JAPAN!ニュース

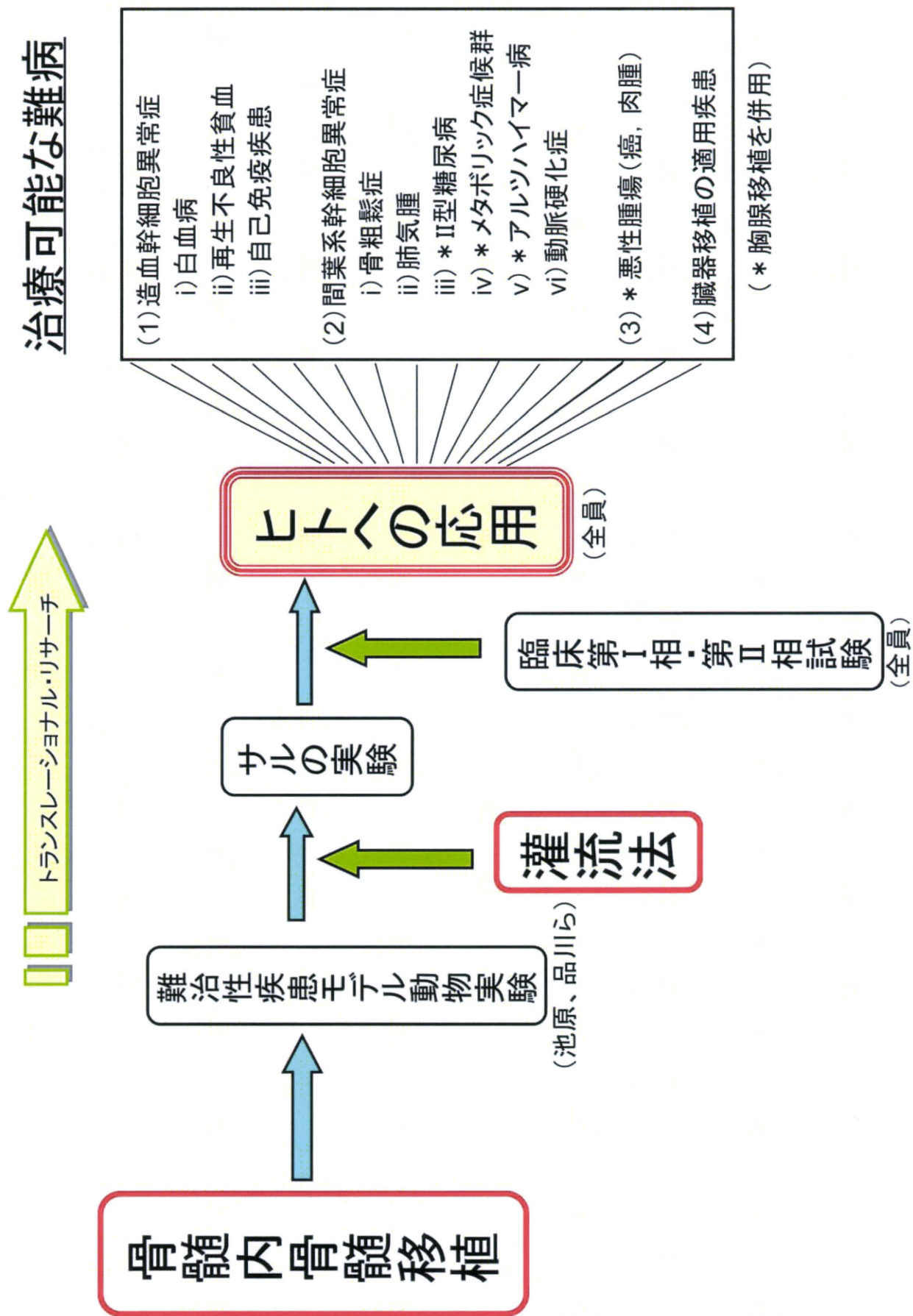
平成 22 年 9 月 13 日 (月)

4) 池原 進、李 銘

「<2 型糖尿病>血糖値、骨髄と胸腺移植で正常
に 関西医科大、マウスで成功」

GOO ニュース

平成 22 年 9 月 13 日 (月)



III.分 担 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）
分担研究報告書

同種移植後の再発白血病の治療法開発

分担研究者 赤塚 美樹（藤田保健衛生大学医学部・准教授）

研究要旨

再発ハイリスク例に対する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たものの、依然として移植後再発が主な死因となっている。同種造血細胞移植はマイナー組織適合抗原や不適合HLA 分子を標的としたアロ免疫反応によって移植片対白血病・リンパ腫（GVL）効果を得るものである。我々はマイナー組織適合抗原に標的を絞り、さらに選択的 GVL 効果を期待しうる造血系のみで発現している抗原の同定を行ってきた。このうち日本人に多い HLA-A*24:02 や HLA-A*02:01, -B*44:03 によって提示されるマイナー組織適合抗原ペプチドを GMP グレードで調製し、再発ハイリスク造血器腫瘍の再発時または移植後再発予防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実施している。これまでに 79 症例が抗原タイピングを受け、うち 50 例がドナーとペアでタイピングを受けた。18 ペア（36%）において現在ペプチドワクチン準備の済んでいる ACC-1Y, ACC-1C（HLA-A*24:02）, ACC-2（HLA-B*44:03/B*44:02）, HA-1（HLA-A*02:01/A*02:06）ACC-6（HLA-B*44:03/B*44:02）のいずれかのマイナー組織適合抗原で GVL 方向の不適合を認めた。これらのうち、再発例 3 例と再発ハイリスク例 3 例の合計 6 例において、実際にワクチンの投与がなされた。局所反応以外に有害事象は認められなかったが、現在可能な免疫学的検査法によって検出可能な特異的キラー細胞の誘導も 1 例を除いて認められなかった。今後、第 2 段階以降の用量接種症例を積み重ね、安全性と免疫反応誘導の検討を実施する。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、造血器腫瘍に対する有用な治療法として確立されてきたが難治性症例の移植成績はまだ満足できるものではない。同種移植後にはドナーのリンパ球が患者に残存する腫瘍細胞を傷害する移植片対白血病・リンパ腫（GVL）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。GVL 効果の主要な標的はマイナー組織適合抗原と腫瘍関連抗原（TAA）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、TAA のような自己抗原と異なり、非自己抗原であるため強い免疫反応ができると期待されている。

マイナー組織適合抗原はドナー、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いう不便もあるが、移植前に HLA タイピングとともにマイナー組織適合抗原遺伝子タイピングを行っておけば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。

今年度は、日本人に多い HLA-A*24:02 や HLA-A*02:01, -B*44:03 によって提示されるマイナー組織適合抗原ペプチドを GMP グレードで調製し、再発ハイリスク造血器腫瘍の再発時または移植後再発予防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において得られた結果を中間解析として報告する。

B. 研究方法

①対象症例：同種造血幹細胞移植を受ける予定であるか、受けた後の患者を対象とした。再発時の治療目的のマイナー組織適合抗原ワクチン投与の場合、以下の疾患を対象とした：a) RAEB, CMML、b) いかなる時期の AML、ALL、c) いかなる時期の CML、d) 多発性骨髄腫、e) 悪性リンパ腫。再発予防目的の場合は移植後 30%以上の再発が予想される疾患群に限定し、a) RAEB, CMML（で再発リスクの高いもの）、b) AML：第 3 寛解期以降ないしは非寛解期移植、FAB：M0、M6、M7、c) ALL：第 2 寛解期以降ないしは非寛解期移植、d) CML：第 2 慢性期以降ないしは加速期・急転期移植、e) 多発性骨髄腫：進行期（PD）移植、e) 悪性リンパ腫：非寛解期移植を対象とした。移植タイプとして血縁者間、臍帯血を含む非血縁者間移植すべてを対象とした。

患者および必要に応じて血縁者ドナーに研究目的と個人情報管理、予期される効果と危険性を説明したのち文書にて同意を得られた場合に本研究へ登録を行った。

②対象とするマイナー組織適合抗原：HLA-A*24:02 陽性患者には ACC-1Y、ACC-1C、HLA-B*44:02/03 陽性患者には ACC-2、ACC-6、HLA-A*0201/A*0206 陽性患者には HA-1H 抗原の GVL 方向不適合について遺伝子タイピングを行った。タイピングは HLA 研究所（京都市）で実施した。ドナーから検体を得られない場合は、移植後に完全キメラに達した後の患者の頬粘膜スワブ、爪などを患者型タイピング試料として、患者末梢血をドナー型タイピング試料として用いた。なお、マイナー組織適合抗原が GVL 方向に不適合が存在しても、ドナーおよび患者双方が拘束性 HLA 型を持つ場合のみを適格例とした。

③投与方法と投与時期：各ペプチドは GMP グレードで合成され、愛知県がんセンターの細胞調製

施設の安全キャビネット内で 2mg/ml 濃度で分注、-30 度で凍結保存しているものを用いた。分注後、ペプチドは東レ研究所にて純度などについて品質検査を行い、分解がないことを確認した。

ペプチドは投与直前に室温で解凍後、安全キャビネット内で必要量を注射器で吸引し、モンタナイド ISA51VG（フロイント社）と混合してエマルジョン化し、外来にて接種した。

試験用量設定として、初期のがんワクチンで用いられた 30 μ g より開始、300 μ g, 1mg の段階的増加を行った。各用量で 3 名または 6 名（有害事象の程度に応じて）とした。ペプチドは隔週で 5 回投与し、安全性と免疫誘導能のエンドポイントは接種終了 3 週間後とした。何らかの理由でワクチン接種を中止した場合、3 回以上投与していれば評価可能とした。

④評価項目と方法：主評価項目として、2 項目、グレード 3 度以上の急性 GVHD・広範慢性 GVHD の発症頻度、および NCI-CTC 基準で 3~4 度の非血液毒性の発症頻度を設定した。また、副次評価項目として 3 項目、5 回のワクチン終了後 3 週間以内での寛解到達率、ワクチンに特異的な T 細胞反応の継続期間・動態、安全に投与可能なワクチン量を設定した。

免疫学的反応の評価については、CD8+ 抗原特異的 T 細胞（CTL）の増減をテトラマーや IFN- γ ELISPOT 法にて検討し、残存腫瘍量については評価可能なサロゲイトマーカーがある場合、定量 PCR や FISH 法などで評価することとした。

（倫理面への配慮）

本研究に伴って行われる HLA タイピングおよびマイナー組織適合抗原タイピングのためのゲノム解析は、政府の定めるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）に従って作成した研究計画書を作成し、愛知県がんセンターの倫理委員会

の審査・承認を得た後に、担当医による人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明を実施後書面にて同意を得られた場合のみに実施された。

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対象患者の登録状況：

これまでに 79 症例がマイナー組織適合抗原タイピングを受けた。このうち大部分が移植後におけるタイピングで、50 例がドナーとペアでタイピングを受けた。うち、18 ペア (36%) において現在ペプチドワクチン準備の済んでいる

ACC-1Y, ACC-1C (HLA-A*24:02),

ACC-2 (HLA-B*44:03/B*44:02),

HA-1 (HLA-A*02:01/A*02:06)

ACC-6 (HLA-B*44:03/B*44:02)

のいずれかのマイナー組織適合抗原で GVL 方向の不適合を認めた。

この 18 例の中で 7 例からワクチン投与について同意を得たが、1 例は準備中に現疾患が急速に増悪し脱落となり、最終的に 6 例において投与がなされた。患者背景を表 1 に示す。3 例がハイリスク造血器腫瘍に対する予防投与、3 例が治療投与であった。移植ソースは HLA 一致同胞が 2 例、非血縁 JMDP が 3 例、臍帯血が 1 例であった。

②症例：

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-1C ペプチドを投与した。3 回接種時点で右鼠経腫瘍が 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 7cm 大の発赤と硬結を認めたが自然消退した。末梢血のテトラマー及び ELISPOT 検査ではワクチン前、ワクチン

後ともに ACC-1C 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 μ g の HA-1H 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 5cm 大の発赤と硬結を認めたがいずれも 1 週間程度で自然消退した。末梢血のテトラマー及び ELISPOT 検査についてはワクチン前後で有意な変動は認められなかった。本例は接種終了後 1 年半経過するが、再発を認めていない。

3 例目は T-ALL の第一寛解期に HLA2 座不一致臍帯血移植を受けた女性。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 μ g の ACC-1C 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、初回のワクチン接種から局所に発赤と硬結を認め、3 回目以降に直径が増大したがいずれも 1 週間程度で自然消退した。末梢血のテトラマー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が、*in vitro* でペプチド刺激後の T 細胞のテトラマー解析ではワクチン前後で軽度の変動を認めた (図 1)。ただしバックグラウンドが強く出ているため、再検予定である。本例は接種終了後 9 ヶ月経過した現時点で再発を認めていない。

4 例目は B-ALL の第一寛解期に HLA8/8 一致非血縁者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、「再発予防投与」適格と判定された。30 μ g 用量で 3 症例終了し、300 μ g 用量へ移行段階であったが ACC-1Y ペプチドは 30 μ g の投与例が無かったため 30 μ g の 4 例目として登録した。予定の 5 回の接種を終了したが、接種局所の発赤は全く出現しなかった。末梢血のテトラマー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 (図 2)。本例は接種終了後 7 ヶ月経過するが、再発を認めていない。

5 例目は AML-M2, t(8;21)の第一寛解期に HLA7/8 一致非血縁者間移植を受けた女性。移植後 PCR により分子再発を来し、ドナーリンパ球輸注でコントロールされていたが、移植後 22 ヶ月経過したところで PCR コピー数が急増し始めたため当院へ紹介、「治療投与」適格と判定された。300 μ g 用量で 4 症例終了していたため、300 μ g 用量へ移行し、300 μ g の ACC-1C ペプチドを投与開始した。接種中に PCR コピー数が増加し血液学的にも骨髄で芽球が見られ始め、3 回の接種で終了した。接種局所の発赤は初回から 30mm 程度出現し、2 回目 40mm、3 回目は 70mm となり熱感を伴った。末梢血のテトラマー検査については現在検討中である。本例は紹介元の病院にて臍帯血移植を受けた。

6 例目は Multiple myeloma, IgA の自家移植後に HLA 一致同胞間移植を受けた男性。移植後 2 年経過したところで IgA 値が増加し始め、「治療投与」適格と判定された。300 μ g の ACC-1C ペプチドを投与開始した。接種中に PCR コピー数が増加し、3 回の接種で終了した。接種局所の発赤は初回から出現し、5 回目まで 30~50mm で持続、第 4, 5 回目後は熱感を伴った。5 回接種後の IgA 値は開始前 534mg/dl から 614mg/dl と持続的に増加したため、治療判定は NC で本研究の目標 PR 以上には達しなかったため、ワクチンの継続は行わなかった。末梢血のテトラマー検査については現在検討中である。

D. 考察・結論

マイナー組織適合抗原ワクチン接種を行った 6 症例について報告した。検査症例数が増えるにつれ、GVL 方向不適合症例の出現割合が昨年度の 20%程度から予測値である 30%に近づいてきた。30 μ g 接種の 4 例および 300 μ g 接種の 2 例において主な有害事象は局所反応であり、1 例において微熱が認められた。以上より現時点で、本ワクチンの安全性については確認されつつあるが、予定症例に至るまで慎重に試験を継続したい。

抗腫瘍効果については、予防投与の 3 例においては現時点で再発を認めていない。治療投与の 3 例中、PTCL-u 症例は再発後腫瘍量がかなり増えた時点での接種であり、マイナー腫瘍適合抗原ワクチンに限らずワクチン療法では反応が期待しづらい病期と考えられる。AML (M2) は分子再発~血液学的再発初期であり、またワクチン後の局所反応の強さ、微熱などで GVL 効果誘導が期待されたが、2 回目の移植へ移行したため効果判定は困難である。骨髄腫症例においては 5 回接種後、IgA 値は微増であり NC と判定されたため、ワクチン投与終了となった。最近、免疫療法の効果判定において、NC は病勢コントロールありと判定されるようになっており、本試験の判定基準は厳密過ぎる可能性がある。

HLA テトラマーで検出される特異的免疫反応は症例 4 において、*in vitro* 培養後ではあったが、ワクチン後に CTL 前駆体の増加を認めた。300 μ g 接種の 2 例については今後検討予定である。他のがんワクチンにおいても、未培養でテトラマー陽性 CTL が検出される例は稀であり (WT-1 ワクチン例として、Kaida M, et al. J Immunother. 34:92-9, 2011)、培養はマイナー腫瘍適合抗原ワクチンでも必要であると考えられる。

今後、凍結末梢血単核球を用いて、条件を再検討した後、同一条件で CTL 前駆体頻度を測定する予定である他、300 μ g, 1mg 投与例の集積を続ける予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。