

201126019A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池原 進

平成24(2012)年 3月

序

新移植技術（灌流法+IBM-BMT）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、したがって GvHD が起こらないこと、一方、IBM-BMT を用いることによって効率よく、ドナーの HSC と MSC が移植可能であることが上げられます。それゆえ、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、この新移植技術がクローズアップされてきております。

ヒトへの臨床応用としては現在、灌流法+IBM-BMT の両技術のコンビネーションにおける安全性を最重点課題として、Phase I Study を開始しました。安全性が確認されればただちに Phase II Study が実施できるように、臨床プロトコールを準備中です。新しい BMT の方法がヒトへ応用されるようになれば、骨髄ドナーの負担が軽減されます。すなわち、骨髄穿刺針の穿刺部位が 8 ヶ所（従来の方法では 100 ヶ所以上）ですみ、麻酔からの覚醒後には痛みも少なく、歩行可能です。それゆえ、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、患者の負担も少なくなります。新技術により、これまで不治の病であった、種々の難病（厚労省指定以外の疾患をも含む）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と思います。

平成 24 年 3 月

研究代表者 池 原 進

目 次

I.	研究班構成	7
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) 11
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) 21
2.	間葉系幹細胞の造血調節機能についての研究	(一戸 辰夫) 25
3.	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、有用性を目指した研究	(小川 啓恭) 29
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) 33
5.	骨髄内骨髄移植マウスモデルを用いた 移植後肺障害に関する検討	(品川 克至) 35
6.	臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発	(村田 誠) 41
7.	新しい骨髄採取方法（灌流法）のメリットと問題点	43
	— 整形外科医からみた“灌流法の実際” —	(森 眞一郎) 45
8.	新しい造血幹細胞移植技術評価のための、 新規移植後モニタリングシステムの開発に関する研究	(森尾 友宏) 47
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	53
V.	学会発表に関する一覧	63
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	71
VII.	研究事業報告	75
VIII.	研究成果の刊行物・印刷	473

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	佐賀大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科	准教授
	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

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

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①GvHD②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 [PM] +骨髄内骨髄移植法 [IBM-BMT]）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。PM+IBM-BMT の新しい骨髄移植の技術は、申請者らが、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术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（流れ図・添付 [I] 参照）。

臨床応用に関しては、倫理委員会の承認と患者さんの同意を得て、平成 18 年 2 月、PM に関する、Phase I Study を開始した。さらに、PM と IBM-BMT を組合わせた Phase I Study を実施するための臨床プロトコールも、平成 22 年 3 月 9 日に承認された（承認番号：関医倫第 0745 号）。

動物を用いた基礎実験と臨床応用に関する研究は同時進行で実施する。新移植方法の安全性と有効性はすでにサルで実証済であるので、この新手法を用いた移植方法の適用疾患の拡大に向けて動物実験を行う。

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。

本年度からは臨床応用に重点を置き、国内の骨髄移植実施施設とも共同して Phase I から Phase II Study へと展開させる。

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	佐賀大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 准教授
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

A. 研究目的

難病のモデル動物（主として、マウス、ラット等の小動物）の実験結果に基づいて、いかなる難病が新技術により治療可能かを明らかにし、ヒトへ応用する（添付 [I] 参照）。新技術によって、造血幹細胞（HSC）のみならず、間葉系幹細胞（MSC）も正常ドナーの細胞に置換可能なため、かなりの難病が治療可能と考えられる。

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、HSC の異常に基づく白血病や自己免疫疾患のみならず、MSC 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した。PM に関しては、既に Phase I Study を開始しており、PM+IBM-BMT についても、臨床応用を開始する。

本年度は、神経難病（アルツハイマー病等）の治療に重点を置いて、骨髄や胎児肝に存在する ES-like cell を移植に利用する。さらに、胸腺移植を併用することによって治療可能な難病範囲の拡大をはかる。

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、その治療法を確立している。

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。

骨髄内骨髄移植によって、正常の間葉系幹細胞に置換し、治療できるか明らかにする。

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、根治療法を開発中である。

4) 新しい骨髄移植方法を用いた悪性腫瘍の治療

①DLI 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 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中である。

②胸腺移植の併用 (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。

5) 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。

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

ウサギにおいて、MHC の不一致の系よりも haploidentical 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中である。

7) ヒトへの応用 (全員)

既に“灌流法+骨髄内骨髄移植法”の Phase I Study のための臨床プロトコールを作成し、倫理委員会で承認済 (承認番号: 関医倫第 0745 号) を得ている。さらに、先ず、Phase I Study を灌流法で実施し、灌流法の安全性のみならず、灌流法の利点を、従来 of 吸引法と比較検討している。特に、採取骨髄液中の赤血球と T 細胞の

混入度を、ドナーの同意を得て、同一人の左右の腸骨を用いて比較している。臨床プロトコールを作成し、倫理委員会の承認も得られている (平成 23 年 7 月 19 日に承認された。承認番号: 関医倫第 1106 号)。問題点としては、灌流法のドナーが肥満体の場合に、骨髄針が腸骨のような扁平骨の骨髄腔内に上手に刺入できていない可能性をこれまでの症例で経験している。現在、このようなことが起こらないための対策として、整形外科医の指導の下で CT の造影や、将来は“ナビゲーション・システム”を開発し、誰にでも容易に灌流法が実施できるように改善する予定である。

Phase I Study に関しては 5 例を終了後、Phase II Study へ移行する。

(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

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、HSC の異常に基づく白血病や自己免疫疾患のみならず、MSC 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した。

PM に関しては、既に Phase I Study を開始しており、PM+IBM-BMT に関しても、臨床応用を開始している。

基礎的な研究としては、IBM-BMT の際、注入骨髄細胞の漏出を防ぐため、コラーゲン・ゲルで suspend する方法を申請者らは開発した（Stem Cells 26:2211, 2008）。この方法を用いることによって、ドナーの骨髄細胞（HSC+MSC の両者）がレシピエントの骨髄腔内に効率良く注入され、骨髄内にどどまることが重要であることが明らかになった。さらにマグネットとマグネットビーズを用いて、注入局所に骨髄細胞が長くどどまる方法を開発した（Bone Marrow Transplantation 45: 993-999, 2010）。

IBM-BMT 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、2 型の糖尿病等）にも有効であることが判明した（Neurosci. Lett. 465:36, 2009、J. Autoimmun.35: 414-423, 2010）。

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、MSC 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、静脈内注入とそれ程変わらず、現在までは、顕著な効果は得られていない。

D. 考察・E. 結論

新しい骨髄移植の方法（PM+IBM-BMT）が、ヒトへ応用されるようになれば、骨髄ドナーと患者さんの負担が軽減される。すなわち、従来の AM では 100 か所以上から 1ℓ 近くの液量を採取するため、自己血による輸血の準備が必要であるが、灌流法では、骨髄穿刺部位が 10 か所以内で済むため、輸血の必要もなく、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 も起りにくく、また、移植細胞の数が少なくても拒絶されにくく、前処置も軽減できるため、患者さんへの負担も少なくなる。造血機能や T 細胞の回復が速やかであるため、感染症に対する危険も少なくなる。この新技術を用いることにより、これまで不治の病であった、種々の難病（厚労省指定以外の疾患をも含む）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。

また、骨髄内骨髄移植療法を施行するにあたって、申請者が開発した、「骨髄細胞の採取装置および骨髄針」、「骨髄ドリル」の特許も取っており、さらに、「骨髄針」に関しては、指定管理医療機器製造販売認証書も取っている。

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) 池原 進. 革新的移植方法 — 灌流法 + 骨髓内骨髓移植法. 医学のあゆみ「造血幹細胞移植の最新動向：造血幹細胞移植のトピックス」 240 (5): 465-469, 2012.
- 2) Lee WS, Suzuki Y, Graves SS, Iwata M, Venkataraman GM, Mielcarek M, Peterson LJ, Ikehara S, Torok-Storb B, and Storb R. Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 17: 465-475, 2011.
- 3) Zhang Y, Hosaka N, Cui Y, Shi M, and 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: 599-607, 2011.
- 4) Oe K, Kushida T, Okamoto N, Umeda M, Nakamura T, Ikehara S, and Iida H. New strategies for anterior cruciate ligament partial rupture using bone marrow transplantation in rats. *Stem Cells Dev.* 20: 671-679, 2011.
- 5) Katagiri K, Ueda Y, Tomiyama T, Yasuda K, Toda Y, Ikehara S, Nakayama KI, and Kinashi T. Deficiency of Rap1-binding protein RAPL causes lymphoproliferative disorders through mislocalization of p27kip1. *Immunity* 34: 24-38, 2011.
- 6) Shi M, Lian Z, Zhang Y, Yanai S, Shima C, Imai Y, and Ikehara S. Combination of intra-bone marrow-bone marrow transplantation and subcutaneous donor splenocyte injection diminishes risk of GVHD and enhances survival rate. *Stem Cells Dev.* 20: 759-768, 2011.
- 7) Ikehara S. Thymus transplantation for treatment of cancer: lessons from murine models. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 7: 205-211, 2011.
- 8) Mori S, Fujita S, Yamamoto Y, Li M, Fukuhara S, Nomura S, and Ikehara S. Perfusion method for bone marrow cell collection in poor mobilizer lymphoma patient. *Int. J. Hematol.* 93: 822-824, 2011.
- 9) Ikehara S. A novel BMT technique for treatment of various currently intractable diseases. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24: 477-483, 2011.
- 10) Shimo T, Adachi Y, Umezawa K, Okigaki M, Takeya J, Taniuchi S, Ikehara S, and Kaneko K. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) can suppress tumour necrosis factor- production in lipopolysaccharide-injected mice, resulting in rescuing mice from death in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 166: 299- 306, 2011.
- 11) Hoshino S, Kurishima A, Inaba M, Ando Y, Fukui T, Uchida K, Nishio A, Iwai H, Yokoi T, Ito T, Ishii S, Shimada A, Li M, Okazaki K, and Ikehara S. Amelioration of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by immunoregulatory dendritic cells. *J. Gastroenterol.* 46: 1368-1381, 2011.

- 12) Zhang Y, Hosaka N, Cui Y, Shi M, Li M, Li Q, and Ikehara S. Effects of intrabone marrow-bone marrow transplantation plus adult thymus transplantation on survival of mice bearing leukemia. *Stem Cells Dev.*2011 Oct 19 [Epub ahead of print]
- 4) LI Ming, SHI Ming, IKEHARA Susumu. 「骨髄と胸腺の同時移植による 2 型糖尿病の治療/Treatment of type 2 diabetes mellitus in db/db mice by intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus thymus transplantation.」第 40 回日本免疫学会学術集会。平成 23 年 11 月 27 日～平成 23 年 11 月 29 日 (千葉)

(書籍)

- 1) Susumu Ikehara. A new concept of stem cell disorders, and the rationale for transplantation of normal stem cells. *STEM CELLS AND CANCER STEM CELLS*. Chapter (ed. Dr. M.A. Hayat) Springer In press.
- 5) 保坂直樹, 崔 雲澤, 石 明, 李 銘, 李 清, 高橋伯夫, 池原 進. 「白血病担癌マウスにおける成体胸腺移植を併用した IBM-BMT の効果/Effects of IBM-BMT plus adult thymus transplantation on mice bearing leukemia.」第 40 回日本免疫学会学術集会。平成 23 年 11 月 27 日～平成 23 年 11 月 29 日 (千葉)

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 足立 靖、今井雄一郎、石 明、池原 進. 「アポトーシス阻害薬 Z-VAD-fmk を用いた効率の良い骨髄内骨髄移植法.」第 100 回日本病理学会総会。平成 23 年 4 月 28 日～平成 23 年 4 月 30 日 (横浜)
- 2) 李 銘、張玉明、石 明、池原 進. 「骨髄と胸腺の同時移植によるインスリン感受性の増加機序の解析 - 2 型糖尿病モデルマウスを用いて.」第 11 回日本抗加齢医学会総会。平成 23 年 5 月 27 日～平成 23 年 5 月 29 日 (京都)
- 3) 森 眞一郎、野村昌作、池原 進. 「新しい骨髄採取方法 (灌流法) のメリットと問題点.」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 23 年度第 1 回造血細胞移植合同班会議。平成 23 年 7 月 2 日～7 月 3 日 (名古屋)
- 6) 植田祥啓, 片桐晃子, 富山 尚, 安田鐘樹, 羽廣克嘉, 片貝智哉, 池原 進, 木梨達雄. 「Mst1 キナーゼによる胸腺細胞動態と抗原認識の制御/Mst1 regulates thymocyte trafficking and antigen recognition within thymic tissues.」第 40 回日本免疫学会学術集会。平成 23 年 11 月 27 日～平成 23 年 11 月 29 日 (千葉)
- 7) 串田剛俊、飯田寛和、森 眞一郎、野村昌作、池原 進. 「整形外科医からみた“灌流法の実際”」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 23 年度第 2 回造血細胞移植合同班会議。平成 24 年 1 月 8 日～1 月 9 日 (東京)

8) 研究代表者 池原 進.

「新しい移植法とはどんな法法？」

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 23 年度厚生労働科学研究免疫アレルギー等予防・治療研究事業/がん臨床研究事業 造血細胞移植研究 7 班合同公開シンポジウム.

平成 24 年 1 月 9 日 (東京)

9) 研究代表者 池原 進.

「灌流法により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 23 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(移植医療分野)研究報告会

平成 24 年 1 月 17 日 (東京)

10) 池原 進、李 銘、石 明.

「移植技術を用いた難病の根治療法の開発。」

平成 23 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(移植医療分野)研究報告会

平成 24 年 1 月 17 日 (東京)

(国際学会)

1) Susumu Ikehara. Autoimmune diseases as stem cell disorders: Rationale for normal stem cell transplantation for their treatment. The 5th Autoimmunity Congress Asia (ACA 2011).

招聘講演 November 17-19, 2011 (Singapore)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明の名称：骨髄ドリル「BONE MARROW HARVESTING DRILL」

発明人：池原 進、白藤泰司、中村修二、
下田信夫、佐渡克行

国：アメリカ

特許取得日：2011.12.6

特許番号：US8070690

2) 発明の名称：骨髄ドリル「BONE MARROW HARVESTING DRILL」

発明人：池原 進、白藤泰司、中村修二、
下田信夫、佐渡克行

国：香港

特許取得日：2011.12.2

特許番号：HK1122973

3) 発明の名称：骨髄ドリル「BONE MARROW HARVESTING DRILL」

発明人：池原 進、白藤泰司、中村修二、
下田信夫、佐渡克行

国：欧州(ベルギー、ドイツ、スペイン、
フランス、イギリス、イタリア、
スウェーデン)

特許取得日：2011.11.23

特許番号：1949858

4) 発明の名称：骨髄ドリル「BONE MARROW HARVESTING DRILL」

発明人：池原 進、白藤泰司、中村修二、
下田信夫、佐渡克行

国：中国

特許取得日：2011.7.20

特許番号：200810003972.0

2. 実用新案登録

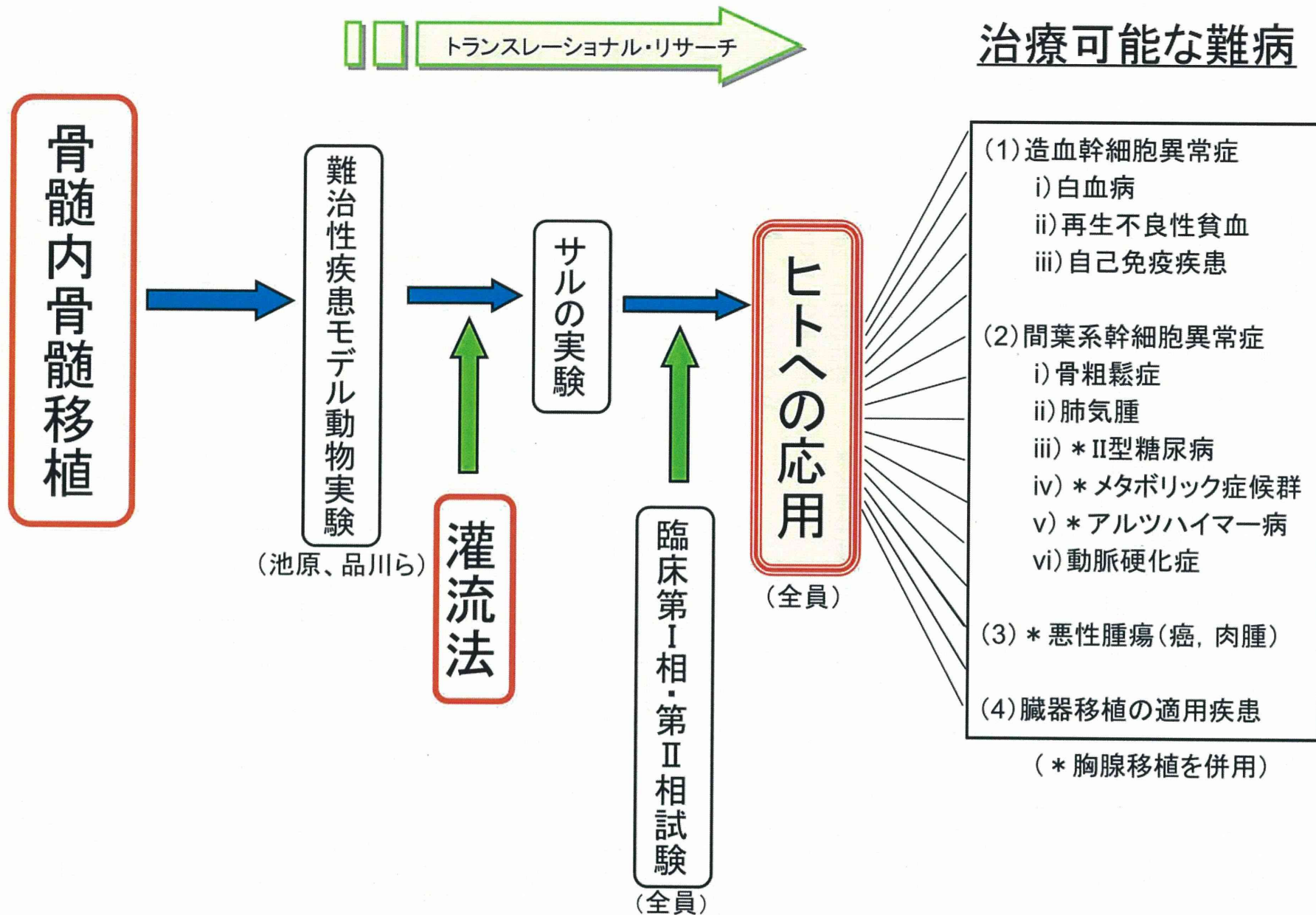
1) 指定管理医療機器製造販売認証書

認証番号 第 223AABZX00163000 号

認証対象品：JIMRO-TRANS ニードル

認証日：平成 23 年 12 月 28 日

製造販売業者：株式会社 JIMRO



III. 分 担 研 究 報 告

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、移植後再発が主な死因の1つとなっている。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、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。しかしワクチン後に十分な免疫誘導がかからない例があり、移植後長期経過した症例等では能動免疫より受動免疫のほうが有効な可能性がある。そこで移植後末梢血をマイナー抗原ペプチドで刺激し、さらにペプチド・HLA テトラマーによる濃縮を試みたが Avidity が弱い CTL が多かった。このためマイナー組織適合抗原特異性が良好な CTL から得られた TCR 遺伝子を他の T 細胞に導入し、これを対外増幅して再発時に輸注する養子細胞免疫療法の基礎研究を開始した。レトロウイルスベクターのウイルス価に問題があるものの、TCR 遺伝子導入細胞の抗原特異的細胞傷害活性は得られたため、今後は効率よくベクターを導入・発現させるシステムの開発が重要と考えられた。

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。同種移植後には移植片対白血病・リンパ腫（GVL）効果が期待できる。GVL 効果の主要な標的はマイナー組織適合抗原であるが、これはドナー・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。現在進行中のマイナー抗原ペプチドワクチン療法の臨

床試験は中間解析段階で、移植後の極めて早期例や長期経過例で十分な免疫反応が得られないという問題ありそうであるため、これを克服するために、養子免疫療法の形でマイナー抗原特異的な T 細胞受容体を遺伝子導入した T 細胞が応用できないか、基礎研究を行った。

B. 研究方法

①マイナー抗原特異的 CTL の誘導：

マイナー抗原遺伝子タイピングの結果、ドナーが既知のマイナー抗原 ACC-1 の多型部位のアミノ酸がシステインのホモで、患者がチロシンを有する場合の患者の移植後末梢血を、ACC-1Y ペプチドを添加した単球で刺激した。複数回刺激後、得られた T 細胞株を HLA-A24/ACC-1Y テトラマーで染色し、陽性分画をソーティングし、限界希釈法でクローンを得た。

②ACC-1Y 特異的 CTL の TCR を組み込んだレトロウイルスベクターの作成：

ACC-1Y を認識する CTL クローン,1B3 の TCR 鎖、鎖を PCR 法にて検討したところ AV14, BV4-1 であった。そこでそれぞれの全長 cDNA を得るために開始コドンに Kozak 配列をつけたプライマーを 5' に設計し、PCR 法にてクローニングを行った。配列確認後、それぞれの鎖は PGK promoter もしくは F2A で結合し、必要に応じて下流に選択用の NGFR を結合した。レトロウイルスプラスミドには Stanford 大学から得た LZRSpBMN-Z を改変したものを用いた。

③レトロウイルスの産生：

パッケージング細胞として、Stanford 大学で開発された Phoenix-GP 細胞に Gibon ape leukemia virus (GALV) のエンベロープを導入したものを用いた。プラスミドの導入は Fugene-6 を用いて行い、puromycin にて導入細胞を選択し、プロデューサー細胞を得た。

また、Stable なプロデューサーを得るために、Phoenix-Eco 細胞に同様にプラスミドを導入し、その上清を GALV のエンベロープを持ち、マウス NIH3T3 細胞ベースの PG13 に感染させた。その後、PG13 を限界希釈法にてクローニングし、上清のウイルスを RT-PCR 法で検出して、高タイター産生株を選択して増やして用いた。

④ウイルスの感染：

ウイルス上清をレトロネクチンをコーティングしたプレートに入れ、32℃、2,000xG で 3～4 時間遠心後、Jurkat/MA 細胞、もしくは OKT3、CD3/CD28 ビーズで 2～3 日間活性化した T 細胞を入れて培養した。必要に応じて 2～3 回感染を反復し、感染 1 週間後より、マイナー抗原を 10～100nM の濃度でパルスした自己 B-LCL で 2～3 度反復刺激した。導入細胞をふやす目的で特異的 HLA テトラマーと磁性ビーズを用いポジティブセレクションした。

⑤TCR 導入細胞の評価：

TCR 遺伝子導入・発現効率は A24/ACC-1Y-PE テトラマーと CD3, CD8 抗体のカウンター染色にて評価した。

またクロム遊離試験によって、TCR 導入 T 細胞がどの程度細胞傷害性を有するか検討した。

(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、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考えられる。

C. 研究結果

①マイナー抗原特異的 CTL の誘導とクローニング：

ACC-1Y の GVL 方向の不適合移植を受けた患者の移植後末梢血単核球にペプチドを添加による刺激を 3 回行った後で A24/ACC-1Y テトラマーでポジティブセレクションを行い、クローン CTL-C10 を得た。図 1 のタイトレーション実験で示すように C10 は 0.5nM の ACC-1Y ペプチド濃度で 50%の細胞障害性を発揮し、良好な Avidity を有すると考えられたが、HLA-A24 陽性、ACC-1Y 抗原陽性の B-LCL を弱くしか傷害できなかった（図 2）。TCR の鎖の塩基配列は、過去にクローニングした CTL-1B3 と類似していたが、鎖が全く異なっていた（データ示さず）。

②ACC-1Y 特異的 CTL の TCR を組み込んだレトロウイルスベクターの作成：

CTL-1B3 の TCR 鎖と 鎖を別々のレトロウイルスベクターに組み込んだ場合と、IRES 配列を利用してタンデムに結合して1つのベクターに組み込んで作成した Phoenix-Galv パッケージング細胞ウイルスに感染させた Jurkat/MA 上のテトラマー陽性率を比較した。図3に示すように、両者ともテトラマー陽性分画が得られたが、タンデムに繋いだ場合、陽性強度が弱い傾向が見られた。

③TCR 導入 T 細胞の細胞傷害活性：

CTL-1B3 の TCR 鎖をタンデムにつないだベクターを感染した正常 T 細胞のテトラマー陽性率は 10~20%前後であった。これを bulk の T 細胞株、磁性ビーズによって CD4 分画、CD8 分画に分けて細胞障害性試験を行ったところ、CD8 分画 > bulk > CD4 分画の順に ACC-1Y ペプチドをパルスした自己 B-LCL を傷害した。TCR を導入していない “Un-transduced” T 細胞は細胞傷害活性を示さなかった (図4)。

④TCR 導入効率の改善方法の検討：

TCR 導入直後のテトラマー陽性率は 1%にも満たない場合でも、抗原ペプチドをパルスした自己抗原提示細胞で刺激を行うと、その頻度を高める事が出来るかを検討した。図5に示すように、抗原刺激を反復することにより 4 週間で 6.2%にまで高める事が出来た。この、段階で細胞傷害性試験を行ったが、遺伝子導入 T 細胞は 100nM の抗原ペプチドを添加しない限り、もとの CTL-1B と比較して活性を発揮できなかった (図6)。

D. 考察

米国 NIH で行われているメラノーマを対象とした MelanA 特異的 TCR 導入 T 細胞療法の成績や、国内の WT1 特異的 TCR 導入 T 細胞の細胞傷害に比較して、マイナー抗原 1B3 の TCR を導入された T 細胞の障害活性や avidity は充分ではなかった。最大の理由は TCR の導入効率が 1~5% (増幅後)

と低く、十分なエフェクター/標的 (E/T) 比が得られないことが挙げられる。この原因としてウイルス価が Phoenix-Galv の一過性発現系では低いことが予想される。このため我々は PG13 パッケージング細胞にトランスフェクションでなく感染にてレトロウイルスゲノムを組み込んだ上、高ウイルス価産生クローンを得る試みを継続中である。

また正常 T 細胞の内在性 TCR との競合はこの TCR 導入 T 細胞療法の原型が示されて時からの問題であり、本研究でも共同研究により内在性 TCR をロックダウンする shRNA を搭載したベクターを構築しつつある。

さらに intrinsic に発現が良好な TCR とそうでない TCR があるのは事実であり、CTL-1B3 以外のマイナー抗原特異的 CTL であるクローン 1B9 から得られた TCR を組み込んだレトロウイルスベクターも今後構築していく予定である。

E. 結論

移植後の GVL 効果をもたらす免疫反応の標的抗原について検討を行っているが、能動免疫であるワクチンで常に免疫誘導を得るのは容易ではない。これに対して抗原特異的 TCR を導入した T 細胞療法は有望であるが、やはり固有の問題が存在することが分かってきたので、更なる検討が必要と考えられた。

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) Suzuki S, Yoshikawa T, Hirotsawa T, Shibata K, Kikkawa F, Akatsuka Y, Nakatsura T. Glypican-3 could be an effective target for immunotherapy combined with chemotherapy against ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* 102:1622-9, 2011. (PMID: 21668581)
- 2) Yamamoto Y, Tsuzuki S, Akahori Y, Ukai Y, Sumitomo M, Murayama Y, Yamamoto K, Inaguma Y, Tokuda M, Abe A, Akatsuka Y, Emi N, Kurosawa Y. Isolation of human mAbs that directly modulate FMS-related tyrosine kinase 3 signaling. *Cancer Sci.* 103 : 350-9, 2012. (PMID: 22049994)
- 3) Okanami Y, Tsujimura K, Mizuno S, Tabata M, Isaji S, Akatsuka Y, Kuzushima K, Takahashi T, Uemoto S. Intracellular interferon- γ staining analysis of donor-specific T-cell responses in liver transplant recipients. *Transplant Proc.* 44:548-54, 2012. (PMID: 22410067)

2. 学会発表

- 1) 赤塚美樹、森島泰雄、田地浩史、山本一仁、宮村耕一、高橋利忠、小寺良尚、恵美宣彦、葛島清隆. 同種移植後再発予防・治療を目的としたマイナー抗原ワクチン臨床試験（中間報告）（口演#39）. 第 15 回日本がん免疫学会総会、大阪 2011 年 6 月 30 日. 日本がん免疫学会総会プログラム・抄録集 pp17, 2011.
- 2) 赤塚美樹、森島泰雄、田地浩史、山本一仁、宮村耕一、高橋利忠、小寺良尚、恵美宣彦、葛島清隆. 同種移植後再発予防・治療を目的としたマイナー抗原ワクチン臨床試験の中間報告. 第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会（口演）、別府 2011 年 8 月 21 日.

- 3) 岡村文子、鳥飼宏基、赤塚美樹、三好浩之、吉森 保、葛島清隆. 腫がん細胞における恒常的高活性オートファジーによる CTL エピトープの産生. 第 70 回日本癌学会学術総会（ポスター、#3204）、熊本 2011 年 10 月 5 日. 日本がん免疫学会総会プログラム・抄録集 pp499, 2011.
- 4) 赤塚美樹、松原亜以子、南谷泰仁、森島泰雄、高橋利忠、葛島清隆、小川誠司、恵美宣彦. マイナー組織適合抗原をコードする一塩基多型のオンライン検索ツール. 第 70 回日本癌学会総会（ポスター、P-1444）、大阪 2011 年 10 月 3 日. 日本癌学会総会プログラム・抄録集 pp204, 2011.
- 5) Akatsuka Y, Yamamura T, Bleakley M, Hikita J, Matsubara A, Hamajima T, Nannya Y, Morishima Y, Kodera Y, Riddell SR, Ogawa S, Emi N. An online tool to scan single nucleotide polymorphisms for identification of novel minor antigens. 第 73 回日本血液学会学術集会（ポスター #PS1-262）、名古屋 2011 年 10 月 14 日. 臨床血液抄録集 pp204, 2011.
- 6) Yukiya Yamamoto, Sachiko Tsuzuki, Yasushi Akahori, Yoshinori Ukai, Mariko Sumitomo, Masataka Tokuda, Tadaharu Kanie, Akihiro Abe, Yoshiki Akatsuka, Yoshikazu Kurosawa, Nobuhiko Emi. Isolation of human monoclonal antibodies directly modulating FLT3 signaling. 第 73 回日本血液学会学術集会（ポスター #PS2-284）、名古屋 2011 年 10 月 15 日. 臨床血液抄録集 pp584, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

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

間葉系幹細胞の造血調節機能についての研究

分担研究者 一戸 辰夫（佐賀大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科）

研究協力者 三浦 康生（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部）

前川 平（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部）

研究要旨

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法では、同所的に間葉系幹細胞が移植されることが、造血機能の回復促進に寄与する可能性がある。そこで、間葉系幹細胞（MSC）が造血能に与える影響を検討することを目的として、MSC の存在下、非存在下に CD34 陽性細胞の培養を行った。MSC との共培養を行った場合には、共培養を行わなかった場合と比較して、CD34 陽性細胞分画が有意に増加しており、パラサイロイドホルモンで刺激後の MSC を共培養に用いた場合には、そのような CD34 陽性細胞分画の増幅効果が著しく増強した。以上の知見より *in vitro* の培養で腑活化された MSC は、造血幹細胞の増幅を増強する可能性が示唆された。

A. 研究目的

間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells, MSC）は骨、脂肪などへの多分化能を有する組織幹細胞であり、骨髄においては骨組織、脂肪組織の維持に関与していると考えられる。近年、骨髄微小環境の細胞・分子レベルで検討がなされ、MSC より分化した骨芽細胞が造血幹細胞の維持に関与する骨髄微小環境の構成細胞の一つであることが明らかとなった（造血幹細胞ニッチ）。また生体内で骨髄微小環境の異常が造血機能の異常を引き起こすことがマウスモデルを用いた研究で明らかとなっている。本研究では、このような MSC の有する造血調節機能を薬理的に増強する方法を検討した。

B. 研究方法

エリスロポエチン、パラサイロイドホルモン、血小板由来成長因子で MSC を腑活化したのち、SCF、FLT3-ligand、TPO、IL-3 存在下に、同一ドナーに由来する CD34 陽性細胞との共培養を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」（平成 20 年 7 月 31 日全部改正）に準拠し、京都大学医学部医の倫理委員会の承認を得て実施された。

C. 研究結果

エリスロポエチンやパラサイロイドホルモンで刺激を受けた MSC では、MUC-18（CD146）、ALCAM（CD166）などの間葉系幹細胞を特徴づける細胞表面マーカーの発現が増強していた。血小板由来成長因子で刺激を受けた MSC では N-カドヘリンの発現が増強していた。また、パラサイロイドホルモンで刺激を受けた MSC と CD34 陽性細胞を SCF、FLT3-ligand、TPO、IL-3 存在下に *in vitro* で共培養すると CD34 陽性細胞分画が 20 倍以上増加することが確認された。またコロニーアッセイ法でもコロニー形成細胞が増加していることが確認された。