

ドナーとレシピエントの双方を改変した、骨髄非破壊的新規造血幹細胞移植法の開発基盤研究

研究代表者 田代 克久 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部
幹細胞制御プロジェクト プロジェクト研究員

A. 研究目的

造血幹細胞は骨髄に存在する自己複製能と多分化能を併せ持つ細胞であり、白血球や赤血球、血小板などの全ての血液細胞を一生にわたり供給し続けている。このような造血幹細胞の機能を利用した医療が骨髄移植・造血幹細胞移植である。造血幹細胞の骨髄への移入を本質とする骨髄移植や臍帯血移植は、白血病・骨髄腫・リンパ腫等の造血系腫瘍、免疫不全、造血障害の根治療法として推進されてきた。造血幹細胞移植のドナー細胞としては、従来から用いられている骨髄細胞に加え、最近ではドナーへの負担が軽減された状態で回収可能な末梢血幹細胞や臍帯血造血幹細胞が利用されている。我が国においては、これまでに40,000例以上の造血幹細胞移植が実施されている(1991年～2009年：造血幹細胞移植学会 平成22年度 全国調査報告書)。移植後、ドナー造血幹細胞はレシピエント骨髄に生着し、種々の血液細胞を産生することにより血液系を再構築する。しかしながら、ドナー造血幹細胞の生着不全によりドナー由来の血液細胞の産生がみとめられない場合がある。近年の研究の発展に伴い、移植後の生着不全の割合は減少しているものの、臍帯血造血幹細胞を用いた移植においては、未だに20% - 30%の割合で生着不全が観察される。特に、再生不良性貧血症に対する臍帯血造血幹細胞移植では40%強の割合で生着不全がみとめられている(造血幹細胞移植学会 平成20年度全国報告書)。したがって、ドナー造血幹細胞の生着率向上法の開発が望まれている。

ドナー造血幹細胞の骨髄への生着は、ドナー細胞とレシピエント骨髄の状態に依存すると考えられる。これまでにドナー造血幹細胞の生着を上昇させる手法として、主にドナー造血幹細胞の機能修飾に関する研究が行われてきた。一方、レシピエント骨髄内環境についてはほとんど着目されていない。生着不全はレシピエントの免疫応答により生じていると推察されるが、詳細な原因は不明である。そこで私は、生着不全の原因の一つとして、移植前処理の放射線照射やシクロホスファミド等のアルキル化剤により、レシピエント骨髄の造血幹細胞ニッチ(niche: 本来の居場所)が破壊されているのではないかと考えた。

G-CSF等のある種のサイトカイン/ケモカインは、骨髄の造血幹細胞を末梢血中へ遊離(動員)する作用を有している。これらの蛋白質の投与により、重篤な骨髄損傷を伴わずに造血幹細胞を骨髄から動員可能であると考えられたため、このような蛋白質はレシピエント骨髄内環境の制御分子として有用であると考えた。そこで本研究では、ドナー造血幹細胞に機能改変を施すとともに、レシピエント骨髄環境を操作することで、骨髄非破壊的新規造血幹細胞移植法の基盤技術構築を目指すこととした。具体的には、(1) アデノウイルス(Ad)ベクターを用いて種々のサイトカインをマウス全身で発現させることにより、造血幹細胞を効率良く骨髄から動員させる手法、つまり、「ニッチを新たに創り出す方法」を開発するとともに、(2) Adベクターを用いた遺伝子導入により機能を増強した造血幹細胞の作製を行う。そして(3) 機能増強した造血幹細胞をサイトカインで前処理したマウスへ移植し、キメリズムや生着率を評価する。本年度は主に、サイトカイン発現Adベクターを作製し、そのサイトカインによる骨髄動員作用について検討を行った。

B. 研究方法

3種類のサイトカイン発現Adベクター(Ad-GCSF、Ad-VEGF、Ad-CXCL12)と外来遺伝子を発現しないコントロールベクター(Ad-Null)は当研究室で開発した手法に基づき作製し、Ad-GCSFおよびAd-VEGF、Ad-CXCL12、Ad-NullをC57BL/6マウスへ尾静脈から投与してサイトカインを

発現させた。ベクター投与後の血中サイトカイン濃度を ELISA キットにより測定するとともに、骨髓細胞、末梢血細胞、脾細胞を回収し下記の実験に用いた。

各組織の生細胞数は NucleoCounter を用いて測定した。その後、各組織の細胞を蛍光標識された抗体にて染色し、造血幹細胞や間葉系幹細胞等の割合を FACSCalibur または LSRFortessa を用いて解析した。また、骨髓細胞や末梢血細胞を血液コロニーアッセイ用培地に播種し、未熟な血液細胞数の定量を行うとともに、CFU-F (colony-forming unit-fibroblast) アッセイを行い、骨髓中に存在する未熟なストローマ細胞数を測定した。

C. 結果

(1) 骨髓動員作用を有する蛋白質の評価

レシピエント骨髓に存在する造血幹細胞を末梢組織へ遊離させるためのサイトカイン/ケモカインとして、G-CSF、VEGF、CXCL12 に着目し、これらサイトカイン/ケモカインを発現する Ad ベクターを作製した。G-CSF は末梢血幹細胞移植用のドナー細胞回収に使用されている蛋白質であるため、レシピエント造血幹細胞を末梢組織へ動員するのに有効だと考えた。コントロールである Ad-Null 投与マウスと比較し、Ad-G-CSF 投与群では末梢血細胞数や脾細胞数が有意に増加していることが確認された。マウスの造血幹細胞を cKit+Sca-1+Lineage- (KSL) 画分に濃縮されていることが知られているため、次に KSL 細胞数をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、G-CSF 投与マウスの末梢血および脾臓において KSL 細胞数が有意に増加していた。さらに、コロニーアッセイにおいても多能性の血液前駆細胞が末梢組織へ動員されていることは確認された。なお、G-CSF 投与マウスの末梢組織では、多能性の血液前駆細胞のみならず、Gr-1⁺CD11b⁺のミエロイド系細胞数も顕著に増加していた。骨髓細胞についても同様の検討を実施したところ、骨髓においては総骨髓細胞数、多能性前駆細胞由来コロニー数に顕著な差はみとめられなかった。一方、KSL 細胞においては、G-CSF 投与により増加傾向が観察された。これは、G-CSF 投与により造血幹細胞が末梢組織へ動員され、骨髓に残存している造血幹細胞・血液前駆細胞の増殖が亢進している可能性が考えられる。したがって、G-CSF の投与により骨髓細胞が末梢組織へ動員されていることが示された。

G-CSF 以外の蛋白質として VEGF 発現する Ad ベクターを作製した。G-CSF 投与により末梢血中 VEGF 濃度が上昇するという知見から、VEGF が造血幹細胞の動員に関与していると考えた。VEGF 発現 Ad ベクターをマウスへ投与し、その後の血液細胞の動態を解析した。その結果、Ad-VEGF 投与マウスにおいて末梢血細胞数や多能性血液前駆細胞由来のコロニー数、ミエロイド系細胞数の有意な増加が観察された一方で、骨髓においては総細胞数および KSL 細胞数、そしてミエロイド系細胞数が有意に減少していた。したがって、血中 VEGF 濃度の上昇により多能性血液前駆細胞を含む骨髓細胞は末梢組織へ動員されることが示された。なお、VEGF 過剰発現時の骨髓中の細胞動態は G-CSF 投与時と異なっていたことから、造血幹細胞を含む骨髓細胞の動員機序も異なることが示唆された。近年の研究から、通常時、造血幹細胞はニッチにとよばれる骨髓微小環境に存在しており、骨芽細胞や血管内皮細胞、間葉系幹細胞等が種々の接着分子やサイトカインを介して造血幹細胞を支持していることが明らかになっている。そこで次に VEGF が造血幹細胞の支持細胞 (ニッチ細胞) の動態に影響を与えているか否か検討することとした。本研究ではニッチ細胞の中でも、最近特に注目されている間葉系幹細胞の動態について解析した。Ad-Null または Ad-VEGF 投与後の骨髓間葉系幹細胞画分をフローサイトメトリーにて解析したところ、VEGF 過剰発現マウスにおいて、間葉系幹細胞が減少していることが明らかとなった。また、VEGF 投与後の間葉系幹細胞の減少は CFU-F アッセイ (ストローマ細胞用コロニー形成法) においても確認された。したがって、VEGF の過剰発現は造血幹細胞のニッチ細胞の一つである間葉系幹細胞の動態に影響を及ぼし、その結果として造血幹細胞の骨髓動員・骨髓での減少が引き起こされたものと考えられた。なお、G-CSF と VEGF の造血幹細胞動員作用が異なることが示唆されたことから、これらを同時に投与することでより効率良く骨髓から造血幹細胞を動員できるのではないかと考え、Ad-G-CSF と

Ad-VEGF の同時に投与し血液細胞の動態解析を行った。その結果、Ad-GCSF または Ad-VEGF の単独投与と比較し、Ad-GCSF と Ad-VEGF を投与したマウスではより多くの血液前駆細胞が末梢血へ動員されていることが明らかとなった。今後は、サイトカイン投与マウスの血液細胞だけでなく、ニッチ細胞の解析も進めていく予定である。

その他の因子として CXCL12 に着目し、CXCL12 発現 Ad ベクターも作製したが、このベクターを投与したマウスは投与 2-3 日後に何らかの理由で死亡してしまい解析ができなかった。したがって、今後は投与量を検討する予定である。

(2) 造血幹細胞 (ヒト CD34 陽性細胞) への遺伝子導入

我々はこれまでにヒト CD34 陽性細胞へ遺伝子導入可能な Ad ベクターを開発済みである。また、最近、血液系細胞を含む種々の細胞へ効率良く遺伝子導入可能な、新規 Ad ベクターの開発にも成功した。したがって、現在、どちらのベクターが CD34 陽性細胞への高効率遺伝子導入に適しているか検討しているところである。

D. 考察 E. 結論

本研究ではドナーとレシピエントの双方を遺伝子改変することにより造血幹細胞の生着率向上法の開発を目指して研究を実施した。今年度は主に、レシピエント側の改変、つまりレシピエント骨髄から造血幹細胞を動員させ、「空きニッチ」を創製することを目的として研究を行った。今回、G-CSF または VEGF を発現する Ad ベクターをマウスへ投与することにより末梢組織へ多能性血液前駆細胞・造血幹細胞を動員することが可能であった。G-CSF は幹細胞動員因子としてすでに臨床で使用されているが、骨髄造血幹細胞の動態については詳細には解析されていない。G-CSF 投与マウスの骨髄では KSL 細胞 (造血幹細胞画分) が増加していた一方で、VEGF 投与マウスの KSL 細胞は有意に減少していた。近年の研究により、マウス造血幹細胞は KSL 細胞の中の CD34 陰性 Flt3 陰性画分 (KSL³⁴Flt3⁻) または KSL 細胞中の CD48 陰性 CD150 陽性画分 (KSL⁴⁸150⁺) に濃縮されているということが示されていることから、G-CSF および VEGF を投与した際のこれらの細胞群を解析する必要があると思われる。また、今回 VEGF 投与マウスの骨髄では間葉系幹細胞数の減少が観察された。骨髄中のニッチ細胞数は造血幹細胞の移植効率に大きく関与しているものと考えられるため、サイトカイン投与後にニッチ細胞 (骨芽細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞) がどのような影響を受けているのか、更なる検討が必要であると考えられた。今後、Ad-GCSF または Ad-VEGF を投与したマウス、あるいは Ad-GCSF と Ad-VEGF を共投与したマウスへの骨髄移植実験も実施し、骨髄動員作用を有する蛋白質の投与が空きニッチ形成に有効が否か検討を行う予定である。また、Ad ベクターを用いた造血幹細胞の機能修飾法の開発についても検討し、ドナーとレシピエントの双方の改変方法の最適化を進めていく予定である。

**HLA 不適合血縁者間移植の安全性および
有効性向上のための包括的研究**

(課題名) HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究

研究代表者氏名 神田 善伸 自治医科大学附属さいたま医療センター血液科 教授

研究分担者 小川 啓恭 兵庫医科大学内科学講座血液内科研究分野 教授
千葉 滋 筑波大学血液内科学 教授
谷口 修一 国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液内科 部長
田中 淳司 北海道大学大学院医学研究科内科学講座血液内科学分野 准教授
平家 勇司 国立がん研究センター中央病院血液腫瘍科・造血幹細胞移植科 医長
一戸 辰夫 佐賀大学医学部内科学講座造血幹細胞移植 准教授
高橋 義行 名古屋大学医学部附属病院小児科学 准教授
前田 嘉信 岡山大学病院血液 腫瘍内科 助教
森田 智視 横浜市立大学附属市民総合医療センター臨床統計学・疫学分野 教授
熱田 由子 名古屋大学大学院医学系研究科 造血細胞移植情報管理 生物統計学 講師

A. 研究目的

HLA 型は自己と非自己を認識する最も重要な抗原であり、同種造血幹細胞移植に最も適したドナーは HLA 適合同胞である。次いで優先すべきは HLA 適合非血縁者と HLA 一抗原不適合血縁者であり、両者の移植成績が同等であることを、研究代表者の神田らが明らかにした (Kanda Y, Blood 2003)。これらのドナーが得られない場合には、HLA 二抗原以上不適合血縁者間移植と非血縁者間臍帯血移植が候補となる。臍帯血中の造血幹細胞数は限られているため生着不全の危険性が高い。一方、二抗原以上不適合血縁者間移植では、移植片対宿主病(GVHD)のコントロールが重要である。海外では体外でドナー幹細胞液から T 細胞を除去して移植する方法が一般的であるが、拒絶や感染症が多発する。そこで、日本国内では体外での T 細胞除去を行わない(非 T 細胞除去)独自の HLA 不適合移植方法として、研究分担者の一戸らの母子間免疫寛容に基づいた移植法(Ichinohe T, Blood 2004)や、研究分担者の小川らによるタクロリムス、ステロイド併用の強力な GVHD 予防法を用いた移植法(Ogawa H, Biol Blood Marrow Transplant 2006)、研究代表者の神田らの抗 CD52 モノクローナル抗体アレムツズマブを用いた移植法(Kanda Y, Transplantation 2005)などが開発され、非 T 細胞除去 HLA 不適合移植の分野においては世界の最先端の開発研究が行われている。

しかし、臍帯血移植が厚生労働省研究班などで全国規模での研究が進んできたのに対し、HLA 不適合移植の開発は個々の施設単位での研究にとどまり、国際的に高い評価を受けているにもかかわらず、国内普及が進まなかった。そこで本研究では全国規模での研究組織によって様々な方法で行われている HLA 不適合移植の利点、欠点を明確にするとともに、臍帯血移植との優劣についても評価し、さらに HLA 不適合移植の治療成績を改善するための基礎的な研究、医療費、薬剤の保険適応外使用の対策、ガイドラインの発表を含め、包括的な研究を行う。

B. 方法

● 平成23年度に実施中の臨床試験

本邦から世界に発信されている様々な体外T細胞非除去HLA二抗原以上不適合移植法の開発と、海外の標準的手法であるCD34陽性細胞移植について、以下の臨床試験を実施している。さらに、既に日常診療として行われているHLA一抗原不適合移植の治療成績の向上や、移植後の免疫回復の促進をめざした臨床試験の計画を進めている。

(a) 研究分担者の一戸らによる母子間免疫寛容を利用したHLA不適合移植

【移植方法】標準的前処置にサイモグロブリン 2.5mg/kgをday -2、1に加え、GVHD予防としてタクロリムスを用いる。【目標症例数】15例【主要評価項目】移植後100日目までの非再発死亡

(b) 研究分担者の小川らによる強力免疫抑制剤を併用したHLA不適合移植

【移植方法】減弱移植前処置にゼットブリン 2mg/kgをday -4~1に加え、GVHD予防としてタクロリムスとメチルプレドニゾンを用いる。【目標症例数】25例【主要評価項目】移植後100日の時点での生存率

(c) 研究代表者の神田、研究分担者の千葉らによるアテムツズマブを用いたHLA不適合移植(アテムツズマブの減量を試みる自主臨床試験)

【移植方法】標準的前処置加えるアテムツズマブの投与総量を0.8mg/kgから0.4mg/kgまで漸減する。GVHD予防としてシクロスポリンとメソトレキサートをを用いる。【目標症例数】18例【主要評価項目】移植後60日目までの生存、生着、グレードIII以上の急性GVHDの発症

(d) 研究分担者の平家らによる体外でCD34陽性細胞を選択したHLA不適合移植およびHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法の臨床試験

【移植方法】標準的な移植前処置後にCD34陽性細胞選択造血幹細胞を輸注した後にHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法による免疫回復促進を図る。【目標症例数】10例【主要評価項目】免疫系再構築並びにGVHD発症頻度および制御能

(e) HLA-I抗原不適合移植の至適化

【移植方法】GVHD予防法として少量サイモグロブリン併用の意義を無作為割り付けによって評価する。【目標症例数】50例【主要評価項目】グレードIII以上の急性GVHDの発症

■ 平成23年度に実施中の臨床研究(非介入)

研究代表者が委員長を務める日本造血細胞移植学会「HLAと移植成績ワーキンググループ」と連携し、造血細胞移植学会のデータベースや各施設のHLA不適合移植症例データベースを用いて、HLA不適合移植の成否にかかわる様々な因子の影響について調査する。抗HLA抗体については前方視的にデータを収集することによって、より正確な解析を行う。

1. HLA不適合が移植成績に与える影響の検討

(a) HLA不適合の影響に関する学会データベースを用いた後方視的解析のアップデート

(b) 母子間免疫寛容の影響に関する学会データベースを用いた後方視的解析

(c) 移植片拒絶に対する再移植におけるHLA不適合移植と臍帯血移植の有用性の比較

2. 抗HLA抗体と生着不全の関係

(a) HLA不適合移植後の抗HLA抗体力価の経時的変化

(b) 抗HLA抗体と生着不全、GVHD、再発率との関連

◎ 平成23年度に実施中のHLA不適合移植の成績向上のための基礎研究

HLA不適合移植後の最大の問題である免疫回復の遷延について、移植後に問題となりやすい病原微生物や、腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。

(a) HLA不適合移植後の免疫不全状態における抗原特異的抗腫瘍・抗感染症療法の開発

(b) ELISPOTおよびFACSによる抗HLA抗体産生細胞の定量

(c) HLA不適合に伴うNK細胞の活性化と細胞傷害能の解析

C. 結果

研究分担者の一戸らによる母子間免疫寛容を利用したHLA不適合移植は佐賀大学における臨床試験として標準的前処置にサイモグロブリン 2.5 mg/kgをday -2, 1に加え、GVHD予防としてタクロリムスを用いるデザインで進行している。研究分担者の小川らによる強力免疫抑制剤を併用したHLA不適合移植は減弱移植前処置にゼットプリン 2 mg/kgをday -4~-1に加え、GVHD予防としてタクロリムスとメチルプレドニゾロンを用いた臨床試験から、体内T細胞除去薬をサイモグロブリンに変更し、その投与量を徐々に減量する臨床試験に移行している。研究代表者の神田、研究分担者の千葉らによるアテムツズマブを用いたHLA不適合移植(アテムツズマブの減量を試みる自主臨床試験)は、医師主導治験が2010年度に登録終了、2011

年6月に観察期間も終了した。本研究においてアテムツズマブの投与量と免疫回復の有意な相関が認められたため、引き続き実施する自主臨床試験についてもプロトコールが完成し、倫理審査を受ける段階に進んでいる。研究分担者の平家らによる体外でCD34陽性細胞を選択したHLA不適合移植およびHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法の臨床試験は、国立がん研究センター中央病院で臨床試験が進行し、実際にHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注が2症例に行われた。現在のところ、輸注に関連する有害事象はみられず、一例では安定した免疫回復が得られている。

後方視的研究については、HLAの一抗原不適合の影響が移植成績に及ぼす影響について日本造血細胞移植学会データベースを用いた解析を行った。10年前の解析とは異なり、HLA一抗原不適合血縁者間移植の成績はHLA適合非血縁者間移植よりも有意に劣っていた。その原因としてはHLA適合非血縁者間移植が遺伝子レベルのタイピングによってHLA適合血縁者間移植と同等の成績まで向上していることが考えられた。また、HLA一抗原不適合血縁者間移植ではB座の不適合症例の成績が悪く、C座不適合との連鎖の影響が示唆された。この研究に基づいてHLA一抗原不適合血縁者間移植における至適なGVHD予防方法を模索する前方視的臨床試験を計画している。

統計ソフトウェア開発についてはマウス操作だけで一般的な名義変数、連続変数、生存期間の解析に加えて、移植領域の統計解析で必須となる時間依存性変数を扱う解析や競合イベントを扱う解析が実行できるソフトウェア(EZR)のβ版が完成し、さいたま医療センターのホームページで無料公開している。

特異的免疫能の評価系についてはサイトメガロウイルスおよびEBウイルスに特異的に働く細胞傷害性T細胞をテトラマーによって同定する系が確立された。今後は細胞傷害性T細胞を単一細胞に分離した上でT細胞受容体レパトアの解析を行い、強力な特異的細胞傷害活性を有するT細胞のレパトアを同定する。また、研究分担者の前田らの研究ではマウス慢性GVHDモデルにおいてIL-17欠損マウスをドナーに用いると慢性GVHDの発症は有意に抑制された。レチノイン酸を投与することにより慢性GVHDが抑制され予防・治療効果を認め、Th17細胞の慢性GVHDへの関与が明らかとなった。

D 考察

様々な方法を用いた体外 T 細胞非除去 HLA 二抗原以上不適合移植法の臨床研究の進捗状況は良好である。日本造血細胞移植学会データベースを用いた解析についても日常診療にすぐに還元される成果が得られ、統計ソフトウェアの開発により、今後はさらに解析が促進されることが期待できる。

基礎的研究については HLA 不適合移植において鍵をにぎる GVHD の制御と免疫回復の両面において新たな知見が得られた。

E. 結論

本研究班の初年度の研究は前方視的臨床試験、後方視的臨床研究、基礎的研究のいずれにおいても順調な進捗を示している。HLA二抗原以上不適合の血縁ドナーは95%以上の患者が有するため、本研究でHLA不適合移植の有用性を明らかにすることで、将来的には骨髄バンク、さい帯血バンクのドナープール拡大の負担を軽減することが期待できる(研究代表者が委員を努める日本造血細胞移植学会幹細胞移植法・幹細胞バンク検討会議で提言する)。また、様々なHLA不適合移植法の利点、欠点を明確にするとともに、臍帯血移植との優劣についても評価し、診療現場での治療選択に役立つ情報を提供する。医療経済的な観点からも比較することによって、社会と適合した健全な移植医療の発展が期待される。

多彩な造血幹細胞移植のソースが使用可能となり、移植適応についてもより明確にしていく必要があるため、ガイドラインを作成(あるいは研究代表者らが担当している造血細胞移植学会ガイドラインの改定)することによって幅広く情報を発信する。不必要な移植医療の削減は、倫理的観点のみならず、医療費の観点からも重要である。

本研究班の基礎的な研究成果は、HLA不適合移植のみならず、同じくHLA不適合の存在が前提となっている臍帯血移植の治療成績の改善にも応用することができる。また、HLA不適合移植における薬剤の適応外使用の現状についても把握することで、将来の治療のあり方、有害事象の解析方法についても展望する。

アテムツズマブを用いたHLA不適合移植の開発および腫瘍・感染症特異的免疫の研究

研究代表者氏名 神田 善伸 自治医科大学附属さいたま医療センター血液科教授

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植を必要としながらも、HLA 適合同胞、HLA 適合非血縁者、HLA 一抗原不適合血縁者などの一般的なドナーが得られない患者のために、抗 CD52 モノクローナル抗体アテムツズマブを用いた HLA 不適合移植の開発を行っている。また、HLA 不適合移植はしばしば高度な免疫抑制状態を生じ、感染症や腫瘍の再発の増加につながっている。そこで、病原微生物や腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。

並行して研究代表者は日本造血細胞移植学会「HLA と移植成績ワーキンググループ(HLA WG)」委員長を務めており、この研究班を通して HLA WG の研究を支援するとともに、データベースを効率的に利用するプログラムを作成することによって造血幹細胞移植領域のエビデンス構築の促進を図る。

B. 方法

標準的な移植前処置にアテムツズマブを加えることによって重篤な GVHD を予防する HLA 不適合移植法の医師主導治験を遂行し、さらに臨床試験として継続する。アテムツズマブの投与総量は治験で用いられた 0.96~1.20 mg/kg から減量し、0.72 mg/kg を開始量としてさらに段階的に減量を試みる。主要評価項目は移植後 60 日目までの生存、生着、グレード III 以上の急性 GVHD の発症とする。HLA 不適合移植後の最大の問題である免疫回復の遷延について、病原微生物や、腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。

また、データベースの効率的利用のために、無料の統計ソフトである R を基盤として Tcl/Tk 言語でプログラムを作成し、複雑なスクリプトの入力を必要とせずマウス操作だけで簡単に統計解析が可能になる統計ソフトウェアの開発を行う。

C. 結果

2010 年度に登録終了した医師主導治験については 2011 年 6 月に観察期間も終了した。2012 年前半の承認申請を目標としている。引き続き実施する自主臨床試験についてもプロトコルが完成し、倫理審査を受ける段階に進んでいる。特異的免疫能の評価系についてはサイトメガロウイルスおよび EB ウイルスに特異的に働く細胞傷害性 T 細胞をテトラマーによって同定する系が確立された。今後は細胞傷害性 T 細胞を単一細胞に分離した上で T 細胞受容体レパトアの解析を行い、強力な特異的細胞傷害活性を有する T 細胞のレパトアを同定する。

統計ソフトウェア開発についてはマウス操作だけで一般的な名義変数、連続変数、生存期間の解析に加えて、移植領域の統計解析で必須となる時間依存性変数を扱う解析や競合イベントを扱う解析が実行できるソフトウェア(EZR)のβ版が完成し、さいたま医療センターのホームページで無料公開している。

D. 考察

アテムツズマブを用いた HLA 不適合移植は 2012 年の承認申請、2014 年頃の承認を目標としている。それまでに本研究班の自主臨床研究においてこの移植方法の安全性、有効性に関するエビデンスをさらに蓄積する。ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞のレパトアを同定することは将来の免疫療法の開発につながる。

E. 結論

本研究によってアテムツズマブを用いた HLA 不適合移植法の利点、欠点を明確にすることができる。同時に HLA WG の研究を推進し、HLA 不適合移植を本当に必要とする患者層を同定し、ガイドラインを作成することを目標とする。

HLA不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究

研究分担者 田中淳司 北海道大学大学院医学研究科准教授

A. 研究目的

HLA 不適合移植では強い GVL 効果により再発率の低下が期待されるものの、GVHD を含めた移植関連死が増加するため必ずしも再発率の低下が生存率の向上には寄与しないことが知られている。

欧米人と日本人では GVHD のリスクが異なり、海外でのデータを単純に日本人に当てはめることはできないことから、日本人でのデータを集積することが重要である。そこで比較的移植条件等がそろっていると思われる、北海道大学血液内科グループ（当科および関連施設）の移植成績について HLA 適合度を中心に後方視的な解析を行った。

B. 方法

2000 年 1 月～2009 年 12 月に北海道大学血液内科グループ（北海道大学病院および札幌北楡病院）にて施行した臍帯血移植を除く初回同種移植症例 393 例（HLA 適合同胞間移植 135 例、HLA 適合非血縁者間移植 133 例、HLA 不適合移植 125 例）を対象とした。

HLA-A, B, DR1 座についての HLA 適合度を遺伝子型で評価し一座以上の不適合がある場合を HLA 不適合移植と定義した。

AML, ALL の第一・第二寛解期、CML の第一・第二慢性期、MDS の RA、low grade lymphoma、非悪性疾患を standard risk、他はすべて High risk とした。

C. 結果

全生存率、無増悪生存率は HLA 適合同胞間移植、HLA 適合非血縁者間移植、HLA 不適合移植の 3 群間で有意差を認めなかった。しかし HLA 不適合移植症例では HLA 適合移植（血縁・非血縁）と比較して移植関連死亡は有意に多かった。移植関連合併症として急性 GVHD (II-IV) および慢性 GVHD はともに HLA 不適合移植症例に多く認められた。一方、HLA 不適合移植症例では再発率が有意に低いために生存率としては有意差を認めないものと考えられた。

HLA 不適合移植症例では免疫抑制剤に tacrolimus を用いた群で重症 GVHD (grade III-IV) の発症は有意に少なかった。

多変量解析では HLA-A 不適合が Hazard risk 1.70 (95CI, 1.03-2.67, P=0.037) と有意に全生存率に悪影響を及ぼしていた。

D. 考察

HLA 不適合移植においては再発率の低下が認められる一方で GVHD などの移植関連合併症が増加してその生存率を低下させてしまう。従って、HLA 不適合移植後の生存率向上のためには GVHD のコントロールが重要と考えられる。

今回は NK 細胞活性に大きな影響を与えると考えられる HLA-C 適合度については十分なデータがなく解析できなかったが、今後日本造血移植学会一元化データを用いて解析を試みていく予定である。

E. 結論

HLA 不適合移植後の生存率向上のためには GVHD 制御が非常に重要と考えられた。

マウスモデルを使ったHLA不適合移植後の免疫寛容の誘導に関する検討

研究分担研究者 前田嘉信 岡山大学病院 血液・腫瘍内科 助教

A 研究目的

同種造血幹細胞移植は、白血病などの悪性疾患に対する根治的治療として確立しているが、致死合併症である移植片対宿主病（GVHD）は今日なお克服すべき課題である。GVHDは急性GVHDと移植後期に発症する慢性GVHDに大別される。慢性GVHDは急性GVHDと発症時期が異なるだけでなく、その病態も異なると考えられている。急性GVHDの基本的メカニズムは次第に明らかとなっており、急性GVHDのエフェクター細胞がTh1細胞であるのに対し、これまで慢性GVHDについてはTh1/Th2細胞で病態が十分に説明できていない。そこで我々はTh1、Th2細胞に続く第二の免疫担当細胞であるTh17細胞の慢性GVHDへの関与を、マウスモデルを用いて明らかにする。また、Th1/Th17の活性化と相反の関係にある制御性T細胞（Treg）は減弱しており慢性GVHDを十分に抑制できていないことを明らかにする。

B 研究方法

ドナーにB10.D2、ホストにBALB/cを使ったマウス慢性GVHDモデルにおいて、IL-17欠損マウスをドナーに用いて慢性GVHD発症が抑制されるかを検討する。次にTh17細胞への分化を抑制するレチノイン酸を投与しGVHDの抑制、治療効果を明らかにする。また、マウス造血幹細胞移植モデルで、体内の新規Tregによる長期の免疫寛容再構築動態を検討し、m-TOR(mammalian target for rapamycin)阻害剤による免疫寛容再構築効果を検討する。

C 結果

IL-17欠損マウスによって慢性GVHDは、組織学的、臨床的指標でコントロール群と比較し有意に抑制された。レチノイン酸を投与することにより慢性GVHDが抑制され予防・治療効果を認め、Th17細胞の慢性GVHDへの関与が明らかとなった。また、逆に慢性GVHD発症マウスは新規Tregによる長期の免疫寛容再構築が不十分であり、m-TOR阻害剤は免疫寛容再構築を進め、慢性GVHDの発症を抑えた。

D 考察

慢性GVHDは新規Tregによる免疫寛容の再構築が不十分であることと合わせTh17細胞が増加する状態「Treg/Th17バランスの崩れ」が発症に関与していることが示唆された。

E 結論

Treg/Th17バランスの崩れが慢性GVHD発症に関与し、バランスを改善させ移植後の免疫寛容の誘導にはレチノイン酸とm-TOR阻害剤が有効であると考えられた。

バイオ人工細胞・臓器の開発による
糖尿病その他の疾患の治療
に関する研究

バイオ人工細胞・臓器の開発による糖尿病その他の疾患の治療に関する研究

主任研究員 宮川周士 大阪大学大学院医学系研究科 小児成育外科 准教授

分担研究者 長島比呂志 明治大学農学部生命科学科 教授
岡部 勝 大阪大学遺伝情報実験センター 教授

研究協力者 大阪大学大学院医学系研究科 小児成育外科
上野豪久(助教) 高間勇一(医員) 王 丹丹(院生) 山本志野(研究員)
南條明子(研究員) 乾中智佳子(研究員)
明治大学農学部生命科学科
渡邊 将人(研究員) 梅山一大(研究員) 松成ひとみ(大学院生)、
中野和明(大学院生)
大阪大学遺伝情報実験センター
伊川正人(准教授)

A. 研究目的

目的は、医療用バイオ人工細胞・臓器の開発である。主眼をバイオ人工膵島とし、その細胞供給用の遺伝子改変ブタの作出をめざす。期間内に現有する糖転移酵素 GnT-III と補体制御因子 DAF (CD55) を遺伝子導入、かつ異種抗原 α -Gal を knockout (KO) したブタに、他の補体制御因子、抗凝固因子、細胞性免疫制御分子やレトロウイルス制御用遺伝子を導入し、臨床応用可能な膵島細胞の供給源となるブタを作出する。将来的に糖尿病患者へのこのバイオ人工膵島を足がかりに、劇症肝炎治療へバイオ人工肝臓、透析患者にバイオ人工腎臓の供給を目指す。またこの医療用ブタの開発により、移植医療を抜本的に変えることができ、国民の医療福祉に絶大な貢献をもたらす事を目的とする。

現況としては、移植用臓器の開発は、我々が異種移植の超急性拒絶反応が宿主の補体と移植片の補体制御因子の種差に起因する反応である事を見だし報告した、それに伴い1990年頃より世界的にベンチャー産業と結び付きヒトの遺伝子を導入 (transgenic TG)、あるいはブタの遺伝子をつぶした (knockout KO) 遺伝子改変ブタの開発競争が始まった。米国ではハーバード大、Mayo Clinic、ピッツバーク大で開発が盛んで、ピッツバーク大では、Gal-KO-ブタをベースに、補体制御因子DAF、凝固因子であるCD39、TFPI、CD39、thrombomodulin (TM)、細胞性免疫の制御を目的としCTLA4-Ig、HLA-E、TRAILを発現するブタを既に作成し、かけ合わせでGal-KO/hCD46/TFPI/CTLA4-Igブタを作成している。一方、欧州では”Euro XENOME”プロジェクトを立ち上げ、ナンテ大(仏)でGal-KO/CD55/CD59/CD39/HTブタを作出。ハノーバー大(独)で、今年Gal-KOの作成に成功した。さらにDAFブタ、TMブタ、さらにHO-1ブタを作製、ブタ内在性レトロウイルス(PERV)のknockdown (KD)ブタ、CTLA4-Igのブタも作成している。また、豪のメルボルン大、韓国ではソウル大、台湾でも台北大学で盛んにブタを開発している。これに対し、我々は、H8年度よりトランジェニックブタ (DAF+糖転移酵素GnT-III) の作成に取りかかり、この線維芽細胞を使って α -Gal抗原のKOに成功し2006年末ホモが産まれた。我々は既に何種類かの特許を所有し、この分野での極めて独自の異種移植用ブタを開発する事を目指している。

一方現在のバイオ人工細胞・臓器の臨床としては、WHOによれば、既に臨床応用に22の報告が有り。加えて、2年前よりニュージーランドでは国会で承認され、免疫隔離膜下の膵島移植の臨床が始まっている。ロシア、アルゼンチンでこれに続いている。

B. 方法

- 1 遺伝子の選択。現在世界で遺伝子改変ブタ作製に関係する分子は、
 - * 補体制御因子---C1-INH, MCP (CD46), DAF (CD55), CD59
 - * 糖転移酵素---GnT-III, α -1, 2FT, Endo- β -galC
 - * 凝固系(抗凝固因子) ---TFPI、Thrombomodulin(TM)、CD39
 - * NK細胞制御---HLA-G, HLA-E,

- * Macrophage 制御--CD47
- * T 細胞制御--CTLA4-Ig, FasL, TRAIL, CIITA
- * 保存----Hemoxygenase-1,
- * 内在性ブタレトロウイルス (PERV) の KD
- * Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原の遺伝子(CMAH) の KD、等である。

今回の project では、まずは、Gal を KO したブタを base に下線を引いた分子を発現したブタの作出を目指す。

2. 遺伝子構築。

Promoter の選定では、現在使われている promoter は一般的に、CMV や RSV のウイルス promoter、Chick β actin (pCAGGS)、human EF-1 α 、humanmouse H2k、あるいは rat insulin II or pig Insulin promoter である。加えて、導入 gene 本来の promoter である。豚島での遺伝子発現は、一般的に insulin promoter が確実と思われるが、他の臓器での発現が望めない欠点がある。一方、pCAGGS はユビキタスに発現するが、一部の報告では豚島での発現が弱いとされている。今回はより重要と思われる CTDM を insuline promoter で、HLA-E を pCAGGS で発現させることにした。Enhancer には CMV の enhancer を使用した。

諸外国のブタ作出方法はヒトの遺伝子=cDNA や genome を 1 つ 1 つ導入し、高発現の系統を樹立し、交配により重ね合わせる方法である。また、最近では IRES に換え 2A システムを用い、2-3 の分子を繋いで一度に発現させる方法も一部で始められている。

我々は高発現を得るのに、cDNA の codon を改変しブタで至適なものとする方法を取る。Codon 変換に関しては、各分子のアミノ酸配列を崩さず、ブタで最も頻度の高い t-RNA に合わせた DNA 配列に組み替える方法である。これまでに DAF を codon 変換し in vitro, in vivo (マウス) での強発現を確認している。

* 各分子の機能ドメインを、同分子、別の分子間で繋いだ多重化分子 (hybrid) を作製し、この人工 cDNA をブタに遺伝子導入する方法をとる。<CTDM>

DAF の機能ドメインに関しては、SCR2-3 が補体の classical pathway を制御し、SCR2-4 が alternative pathway を制御する事が判明しているため、SCR2-4 を使った。

同じく、MCP の場合も、補体制御機能が有る SCR2-4 を使った。

さらに、C1-INH に関しては、アミノ酸配列の 1-99 は補体制御機能とは関係しないので、この部分を取り除いた構造を作出した。

Thrombomodulin に関しては、直接抗凝固機能に関与する EGF4-6 と EGF3 の一部を選んだ。

* HLA-Ev (147) (147 番目の S を C に変更する事により高発現が見込まれる) に IRES で human β 2m を繋ぎ合わせた。<HLA-E*>

* CMAH の siRNA 法による KD を試みた。

* PERV の KD も試みた。ブタを使ったバイオ人工細胞・臓器での大きな難題はブタ PERV の存在である。siRNA による KD が効果を現す事を既に in vitro で確かめている。PERV 対策の siRNA の導入は次回になったが、既に H-1 promoter に pol 部分の siRNA を組み込む。又、U6 promoter も用意し、他の部分の siRNA を組み込む。

3. In vitro での確認

ブタの血管内皮細胞 (PEC) 及び繊維芽細胞で検定する。導入方法は、lipid 法 (リポフェクトアミン、等)、あるいは電気ショック法を用いた。

4. Transgenic ブタ作り

顕微授精 (ICSI-mediated gene transfer) 法を用いて、ブタの体外成熟卵に 2 種の遺伝子導入を行い、発生への影響を調べた。用いた遺伝子は C1-INH+Thrombomodulin+DAF+MCPcyt (-) <CTDM> と HLA-Ev (147)+IRES+human β -2 microglobulin (h β 2m) <HLA-E*> である。注入卵の胚盤胞への体外発生によって、導入遺伝子の初期発生への影響を解析した。発生阻害の見られなかった遺伝子については、遺伝子導入胚の移植により胎仔の獲得を試みた。

C. 結果

1 作製した遺伝子構築。

- * 補体制御 + α
C1-INH - DAF - DAF <C1DD>-----pCAGGS(chick β actin + CMV enhancer)/C1DD
C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP <CTDM> ---pCAGGS/CTDM 及び pCPI(pig insulin promoter + CMV enhancer)/CTDM
- * NK 細胞制御 HLA-Ev(147)+human β 2m---pCAGGS/HLA-Ev(147)-IRES-h β 2m <HLA-E*>--pCPI/HLA-E*
- * 糖鎖抗原の制御 H-D 抗原=pigCMAH の siRNA---H1/siRNA-pCMAH
- * PERV の制御 PERV の KD-----H1/siRNA-PERV(pol)

2. 細胞での発現確認

これらの遺伝子をブタの血管内皮細胞に導入し、FACS で発現を確認した。

3. ブタでの発現

CTDM および HLA-E*遺伝子をそれぞれ約 40 個の卵に導入した結果、18.4%および 35.9%の胚盤胞形成率が得られた。対照の遺伝子導入を伴わない顕微授精区では 30.0%の胚盤胞形成率であったことから、HLA-E*遺伝子導入の発生阻害はないと判断した。

HLA-E*遺伝子導入胚 97 個を 2 頭のレシピエント雌に移植した。妊娠診断はまだ実施していない

D. 考察

遺伝子構築に関しては、in vitro での発現を確認するのは勿論であるが、ブタ個体及び目的臓器（臍島）での発現が重要と考えられる。

一方、我々は既に顕微授精法が遺伝子改変ブタの作出に効果的であることを確認している。この方法の応用により、HLA-E*および CTDM 遺伝子を導入したブタの作出は、十分可能であると考えられる。CTDM 遺伝子コンストラクトを再精製し、発生阻害性を検討する予定である。

また、個々の hybrid 遺伝子の in vivo での発現を確認した後、これらを繋ぎ合わせた比較的長い構築を作製し、Gal-KO ブタからの fibroblast に in vitro で遺伝子導入し、高発現の line からの核移植により、遺伝子改変ブタを作製する方法を考えている。

E. 結論

プロジェクトの一年目であるため、今だブタ個体での導入遺伝子の発現に関する評価はできていない。現時点で、一つの遺伝子構築が終わり、それぞれ ICSI 法でブタに遺伝子導入し、in vivo での発現を検討中であるが、顕微授精法による、ブタ体外成熟卵への HLA-E*遺伝子の導入は発生を阻害せず、胎仔を得ることが可能であると考えられた。

遺伝子構築に関する研究

主任研究員 宮川周士 大阪大学大学院医学系研究科 小児成育外科 准教授

研究協力者 上野豪久 (助教) 高間勇 (医員) 王丹丹 (院生) 山本志野 (研究員)
南條明子 (研究員) 乾中智佳子 (研究員)

A. 研究目的

目的は、医療用バイオ人工細胞・臓器の開発である。主眼をバイオ人工膵島とし、その細胞供給用の遺伝子改変ブタの作出をめざす。

B. 方法

1 遺伝子の選択。今回遺伝子改変ブタ作製に関係する分子は、補体制御因子 C1-INH, MCP (CD46), DAF (CD55)、凝固系 (抗凝固因子) Thrombomodulin(TM)、NK 細胞制御 HLA-E、内在性ブタレトロウイルス (PERV) の KD、Hanganutziu-Deicher (H-D) 抗原の遺伝子(CMAH) の KD である。

2 遺伝子構築。今回はより重要と思われる CTDM を insuline promoter で、HLA-E を pCAGGS で発現させることにした。Enhancer には CMV の enhancer を使用した。我々は高発現を得るのに、cDNA の codon を改変しブタで至適なものとする方法を取る。

* 各分子の機能ドメインを、同分子、別の分子間で繋いだ多重合分子 (hybrid) を作製し、この人工 cDNA をブタに遺伝子導入する方法をとる。〈CTDM〉

* HLA-Ev(147) (147 番目の S を C に変更する事により高発現が見込まれる) に IRES で human β 2m を繋ぎ合わせた。〈HLA-E*〉

* CMAH の siRNA 法による KD を試みた。

* PERV の KD も試みた。ブタを使ったバイオ人工細胞・臓器での大きな難題はブタ PERV の存在である。siRNA による KD が効果を現す事を既に in vitro で確かめている。

3 In vitro での確認。ブタの血管内皮細胞 (PEC) 及び繊維芽細胞で検定する。

C. 結果

1 作製した遺伝子構築。

* 補体制御 + α : C1-INH - Thrombomodulin - DAF - MCP 〈CTDM〉

---pCAGGS/CTDM 及び pCPI (pig insulin promoter + CMV enhancer)/CTDM

* NK 細胞制御 : HLA-Ev(147)+human β 2m---pCAGGS/HLA-Ev(147)-IRES-h β 2m 〈HLA-E*〉

--- pCPI/HLA-E*

* 糖鎖抗原の制御 H-D 抗原=pigCMAH の siRNA---H1/siRNA-pCMAH

* PERV の制御 PERV の KD-----H1/siRNA-PERV (pol)

2. 細胞での発現確認

これらの遺伝子をブタの血管内皮細胞に導入し、FACS で発現を確認した。

D. 考察

遺伝子構築に関しては、in vitro での発現を確認するのは勿論であるが、ブタ個体及び目的臓器 (膵島) での発現が重要と考えられる。また、個々の hybrid 遺伝子の in vivo での発現を確認した後、これらを繋ぎ合わせた比較的長い構築を作製し、Gal-KO ブタからの fibroblast に in vitro で遺伝子導入し、高発現の line からの核移植により、遺伝子改変ブタを作製する方法を考えている。

E. 結論

プロジェクトの一年目であるため、今だブタ個体での導入遺伝子の発現に関する評価はできていない。現時点で、二つの遺伝子構築が終わりそれぞれ ICSI 法でブタに遺伝子導入し、in vivo での発現を検討中である。

遺伝子改変ブタの作出に関する研究

分担研究者 長嶋比呂志 明治大学農学部生命科学科教授

研究協力者 明治大学農学部生命科学科

渡邊 将人（研究員）、梅山一大（研究員）、松成ひとみ（大学院生）、中野和明（大学院生）

A. 研究目的

我々は既に、糖転移酵素GnT-IIIとCD55を遺伝子導入し、かつ異種抗原 α -GalをKOしたブタを作出している。この遺伝子改変ブタに、新たな補体制御因子、抗凝固因子、細胞性免疫制御分子やレトロウイルス制御用遺伝子などを導入し、臨床応用可能な臍島細胞の供給源となるブタを作出する。

B. 方法

顕微授精(ICSI-mediated gene transfer)法を用いて、ブタの体外成熟卵に2種の遺伝子導入を行い、発生への影響を調べた。用いた遺伝子は C1-INH+Thrombomodulin+DAF+MCPcyt(-)<CTDM>と HLA-Ev(147)+IRES+human β -2 microglobulin(h β 2m)<HLA-E*>である。注入卵の胚盤胞への体外発生によって、導入遺伝子の初期発生への影響を解析した。発生阻害の見られなかった遺伝子については、遺伝子導入胚の移植により胎仔の獲得を試みた。

C. 結果

CTDM および HLA-E*遺伝子をそれぞれ約40個の卵に導入した結果、18.4%および35.9%の胚盤胞形成率が得られた。対照の遺伝子導入を伴わない顕微授精区では30.0%の胚盤胞形成率であったことから、HLA-E*遺伝子導入の発生阻害はないと判断した。HLA-E*遺伝子導入胚97個を2頭のレシピエント雌に移植した。妊娠診断はまだ実施していない。

D. 考察

我々は既に、顕微授精法が遺伝子改変ブタの作出に効果的であることを確認している。この方法の応用により、HLA-E*およびCTDM遺伝子を導入したブタの作出は、十分可能であると考えられる。CTDM遺伝子コンストラクトを再精製し、発生阻害性を検討する予定である。

E. 結論

顕微授精法による、ブタ体外成熟卵へのHLA-E*遺伝子の導入は発生を阻害せず、胎仔を得ることが可能であると考えられる。

VIII. 研究成果の刊行物・印刷

表 題

著 者 名

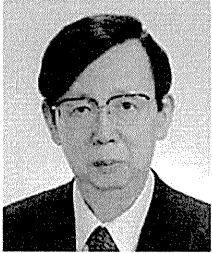
週 刊
医学のあゆみ 別 刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

革新的移植方法

——灌流法＋骨髄内骨髄移植法

Revolutionary method for bone marrow transplantation——Perfusion method＋intra-bone marrow-BMT



池原 進

Susumu IKEHARA

関西医科大学共同研究講座幹細胞異常症学

◎著者らがマウスを用いて開発した骨髄内骨髄移植法(IBM-BMT)は、造血幹細胞(HSC)の増殖・分化を促進するために必要なドナーの間葉系幹細胞(MSC)を効率よく補充する方法である。この方法をヒトへ応用するために、従来の吸引法にとって代わって灌流法をサルを用いて開発した。この両者(IBM-BMT＋灌流法)の組合せによる新しい移植方法は、移植片対宿主病を発症しないだけでなく、ドナーに対してもレシピエントに対しても負担を軽減する優れたもので、難治性の自己免疫疾患や加齢に伴って発症する種々の難病(Alzheimer病や肺気腫など)にも強力な武器となりうるものと確信する。



骨髄内骨髄移植法(IBM-BMT)、灌流法、造血幹細胞(HSC)、間葉系幹細胞(MSC)、難病治療

著者らは27年前に、自己免疫疾患を自然発症するマウスに、正常マウスの骨髄細胞を移植することにより病気が治療できることを発見した¹⁾。逆に、自己免疫マウスの骨髄細胞を正常マウスに移植すると自己免疫疾患がtransferされることを見出し、自己免疫疾患は造血幹細胞(HSC)の異常に起因することを提唱してきた²⁾。その後、種々の難病のモデル動物を用いて、1型糖尿病だけでなく、ある種の2型糖尿病³⁾や難治性の腎炎⁴⁾も、アロの骨髄移植(BMT)によって治療できることを証明した。

しかし、MRL/lpr マウス⁵⁾だけが例外で、このマウスは放射線感受性のため8.5 Gy以上の放射線に耐えられず、低線量(8.5 Gy以下)の放射線照射と、静脈(iv)からの骨髄細胞注入を行う従来のBMTの方法(IV-BMT)では、正常なドナーの骨髄細胞が生着せず、自己免疫疾患が再発してくることを明らかにした⁶⁾。そこで、このマウスを用いてmildなconditioning regimen(前処置)でもアロのBMTが成功する方法の開発に努め、新しいBMTの方法を発見したので紹介する。

新しい骨髄移植方法の特徴

アロ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の使用)による副作用、④T細胞機能の不完全な回復、などがあげられる。著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：IBM-BMT)はこれらの問題が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。したがって、免疫抑制剤を使用する必要もなくなる。さらに、若い健常人の造血幹細胞(HSC)と間葉系幹細胞(MSC)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。

本稿では、新しいBMT法を用いることによっていかなる疾患が治療可能かを、最新の動物実験結果を交えて紹介し、ヒトへの臨床応用についても考察する。

造血幹細胞と間葉系幹細胞の“相性”

著者らは多能性造血幹細胞を精製する方法を開

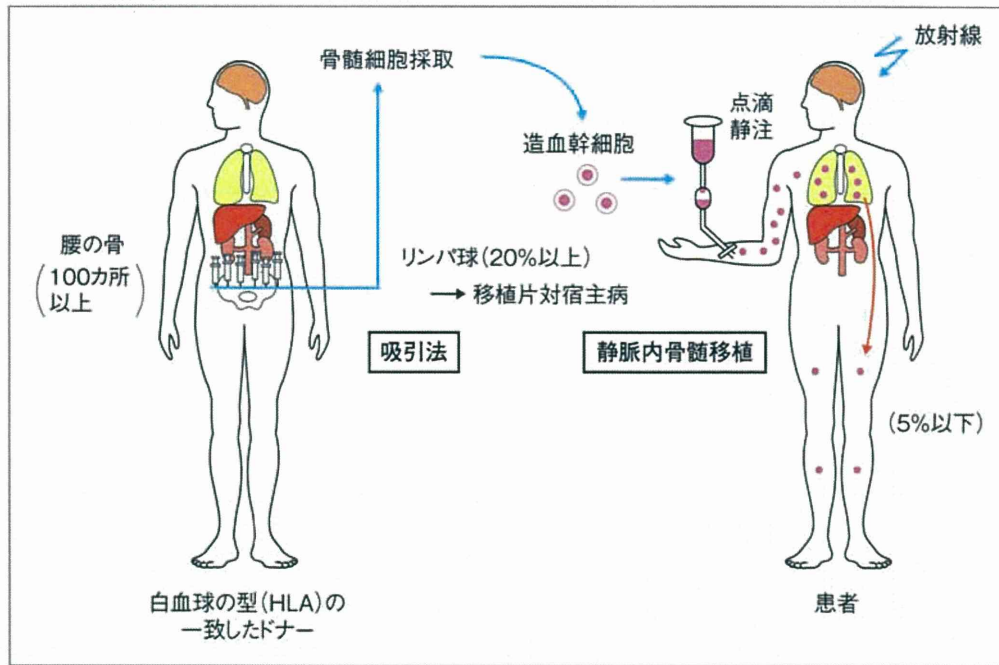


図 1 従来の骨髄移植の方法(吸引法+静脈内骨髄移植法)

腸骨に100カ所以上、骨髄穿刺針を挿入して吸引法で骨髄細胞を採取する。末梢血の混入のため、T細胞が20%以上含まれ、T細胞を除去しないとGvHDが発症する。1L近くの採取液を点滴で静脈内へ注入するため、ほとんどが肺にtrapされ、骨髄内へ、ホーミングする細胞は5%以下である。

発し⁷⁾、HSCの分化・増殖を解析した結果、HSCが増殖・分化するためには骨髄の微小環境構成細胞(ストローマ細胞;とくにMSC)が必要であることを明らかにした。さらに、BMTの際、HSCとMSCとの主要組織適合抗原複合体(とくにMHCのclass I)が一致していると、HSCの増殖率が高いこと、すなわちMHCの拘束性が存在することを見出した(HSCとMSCの相性)^{8,9)}。これらの結果に基づいてアロのBMTの際、HSCだけでなく、ドナー由来のストローマ細胞(MSC)の補充が必要と考え、骨髄微小環境構成細胞であるストローマ細胞をドナー側と置換するための種々の方法(骨移植や肝への造血細胞注入)を試みた結果、骨髄内(intra-bone marrow: IBM)へ全骨髄細胞(HSCとMSCを含む)を移植する方法“IBM-BMT”が最善であることが判明した¹⁰⁾。

● 灌流法vs. 吸引法

大動物(ウサギ、イヌ、サルなど)やヒトで骨髄細胞を採取するには、これまで複数箇所へ骨髄穿刺針を挿入し、吸引法で採取していたが、末梢血

が混入するためGvHDが発生しやすかった。著者らがサルを用いて開発した灌流法は、2カ所に穿刺針を入れて片方から生食で骨髄内を灌流するもので、T細胞の混入も10%以下のため、GvHDも発症しにくい^{11,12)}。灌流法はT細胞の混入が少ないだけでなく、吸引法のような100カ所以上の腸骨穿刺による痛みも少なく、さらに短時間で純粋な骨髄細胞を大量に採取できることなどそのメリットは甚大である^{12,13)}。現在、この両者の優劣について、phase I studyを実施し比較検討中である。

● 骨髄内骨髄移植法vs. 静脈内骨髄移植法

従来のBMTのように、吸引法で採取した細胞を静脈内へ注入すると、図1のように肺にほとんどがtrapされるが、これらの細胞を直接骨髄内へ注入(文字どおりの“骨髄移植”;図2)すると、ドナーの骨髄細胞が注入骨髄内に効率よくとどまり生着率が高まる。このIBM-BMTによって、造血幹細胞(“種”)と骨髄の環境の構成細胞である間葉系幹細胞(“畑”)の両者をドナーの正常な細胞に置