

20/229009A

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業
(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

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 池原 進

平成25(2013)年 3月

序

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、われわれは従来の吸引法（AM）に代わって灌流法（PM）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（GvHD）が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。

今後の展望としては、ヒトへの臨床応用として、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 を開始した。安全性が確認できれば、直ちに 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ある。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る。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、麻酔から覚醒後には痛みも少なく、歩行可能である。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る、新しい技術により、これまで不治の病であった種々の難病が根治されれば、患者にとってこれ以上の福音はない。

現在、ヒトへの応用を目指して本院の救命医学科と共同研究中で、脳死患者を用いて PM と AM との間の細胞採取量等を検討中である。

平成 25 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		
	移植技術を用いた難病の根治療法の開発	(池原 進) ----	11
	—整形外科医からみた“灌流法の実際”—	(池原 進) ----	19
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) ----	25
	2. 間葉系幹細胞を介する B 細胞分化制御についての研究	(一戸 辰夫) ----	29
	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) ----	33
	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) ----	37
	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) ----	39
	6. 灌流法による骨髄採取の安全性と有用性の検討	(野村 昌作) ----	45
	7. 臍帯血を用いた骨髄内移植療法の開発	(村田 誠) ----	47
	8. 新規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) ----	49
IV.	研究成果の刊行に関する一覧表	-----	55
V.	学会発表に関する一覧	-----	67
VI.	研究事業報告	-----	75
VII.	研究成果の刊行物・印刷	-----	576

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	広島大学原爆放射線医科学研究 所 血液・腫瘍内科研究分野	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
	野村 昌作	関西医科大学第一内科・ 同附属枚方病院血液腫瘍内科	教 授
	村田 誠	名古屋大学医学部附属病院 血液内科	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

〒573-1010 大阪府枚方市新町二丁目5番1号
Tel: 072-804-2450
Fax: 072-804-2454
E-mail: liming@hirakata.kmu.ac.jp

II. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（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
移植技術を用いた難病の根治療法の開発

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
研究協力者 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
石 明 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 助教

研究要旨

本研究の目的は難病の病因を解明し、根治療法を開発することである。大部分の難病が骨髄の造血幹細胞だけでなく間葉系幹細胞の異常に起因し、この両者を正常の細胞と置換することにより、種々の難病を予防と治療できることが明らかにした。加齢に伴って発症してくる難病（2型の糖尿病，アルツハイマー病等）は幹細胞の移植・置換だけでは、治療できないが、IBM-BMT と胸腺移植の併用すると有効であることが判明した。さらに GvHD や HvGR に関与しているのは、CD8 T細胞ではなくて、CD4 T細胞の方がむしろ重要な役割を演じていることを発見した。

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。

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 京都大学医学部附属病院
血液・腫瘍内科 助教（H22年度）
佐賀大学医学部附属病院 血液・
腫瘍内科 准教授（H23-24年度）
広島大学原爆放射線医科学研究所
血液・腫瘍内科研究分野 教授
（現在）
小川 啓恭 兵庫医科大学内科学講座
血液内科 主任教授
小島 勢二 名古屋大学大学院医学系
研究科・小児科学講座 教授

品川 克至 岡山大学病院
血液・腫瘍内科 講師
野村 昌作 関西医科大学附属枚方病院
血液腫瘍内科 教授（H24年度）
村田 誠 名古屋大学医学部附属病院
血液内科 講師
森尾 友宏 東京医科歯科大学大学院院
発生発達病態学分野 准教授

A. 研究目的

本研究の目的は、難病の病因を解明し、根治療法を開発することにある。研究代表者らは、大部分の難病が骨髄の幹細胞（造血幹細胞と間葉系幹細胞）の異常に起因し、この両者を正常の細胞と置換することにより、種々の難病を予防し治療できることを発見した。しかしながら、加齢に伴って発症してくる難病（2型の糖尿病、アルツハイマー病等）は両・幹細胞の移植・置換だけでは、治療できないことを見出した。その理由として、agingに左右されやすい細胞は造血幹細胞（HSC）ではなくて、間葉系幹細胞（MSC）であり、もう一つは、胸腺の上皮細胞（TEC）であるからである。本研究では、主としてマウスを用いて tolerance 誘導のメカニズムを明らかにし、ヒトの胸腺移植への応用に役立つ。

B. 研究方法

アルツハイマーのモデルマウス SAM や 2型の糖尿病を発症する db/db マウスに、骨髄内骨髄移植（IBM-BMT）を実施したが、発症の予防はできても、治療には至らず、IBM-BMT に胸腺移植を併用した所、いずれのマウスも免疫能が正常化し、病気が改善した（Neurosci. Lett. 465:36-40, 2009; J.Autoimmun. 35:414-423,2010）。

加齢に伴って発症する難病には、免疫の異常が関与しており、骨髄内骨髄移植だけでなく胸腺の移植の併用が重要であることを明らかにした。GvHD や HvGR に関与しているのは、CD8 T細胞ではなくて、CD4 T細胞の方がむしろ重要な役割を演じていることを発見した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物の愛護及び管理に関する法律に則り実験計画を作成し、関西医科大学の動物実験委員会の審査・承認を得た後に適正な動物実験等を実施した。

C. 研究結果

糖尿病腎症のモデルマウスである db/db マウスに骨髄内骨髄移植と胸腺移植を併用し、腎臓のヘムオキシゲナーゼ、リン酸化 eNOS と AKT の発現が上昇し、iNOS の発現が低下し、腎臓の機能を改善することを明らかにした（Int. J. Biol. Sci. 8: 1335-1344, 2012）。

胸腺移植のヒトへの応用を視野に入れて、マウスの新生時期や胎生期の胸腺を用いて解析した結果、成熟した T細胞を除去すれば、GvH 反応や HvG 反応（拒絶反応）も起こらないことを明らかにした（J. Autoimmun. 31: 408-415, 2008; Immunology 126: 552-564, 2008; Bone Marrow Transplant. 43: 829-837, 2009; Stem Cells Dev. 20: 599-607, 2011; Stem Cell Dev. 21, 1441-1448, 2012）。すなわち、新しく分化して来た T細胞は、HSC のみならず、MSC に対しても tolerance が誘導されていることを物語っており、ヒトへの応用の上にも重要な知見である。加齢に伴って発症するアルツハイマーのモデルマウス SAMP10 を用い、IBM-BMT により胸腺上皮細胞の Sirt1 発現を改善したことが明らかにした（Cell

Transplantation 2013 Feb 26.[Epub ahead of print]）。GvHD や HvGR に関与しているのは、CD8 T細胞ではなくて、CD4 T細胞の方がむしろ重要な役割を演じていることを発見した（J. Immunology 190: 2976-2983, 2013）。

D. 考察

加齢に伴って発症する難病は、胸腺の萎縮に伴って T細胞の機能の異常や低下が認められ、感染が引き金となって発症するものと考えられる。我々はモデル動物を用いて、骨髄内骨髄移植だけでなく胸腺の移植の併用が重要であることを明らかにした。加齢に伴って発症する疾患は、骨髄の造血幹細胞よりも、むしろ、間葉系の幹細胞の異常に起因することを見出した。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。

加齢に伴って発症する難病には、免疫の異常が関与しており、骨髄内骨髄移植だけでなく胸腺の移植の併用が重要であることを明らかにした。

E. 結論

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。

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。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。この新技术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」の特許も国内、国外において取得しており、国際的、社会的にも貢献出来るものとする。さらに、国内において、「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。

新しい骨髄移植のヒトへの応用を目指して、研究分担者の野村教授、研究協力者の石井講師並びに研究協力者の整形外科の飯田教授、串田講師と共同研究を開始している。臨床応用に関しては、臨床プロ

トコールを変更し、倫理委員会の承認も得られている（平成 24 年 7 月 25 日に承認。承認番号：関医倫第 1106 号）。現在、整形外科医の指導の下で CT や、“ナビゲーション・システム”の開発を目指しており、安全で容易に灌流法が実施できるように改善する予定である。

灌流法（PM）を骨髄内骨髄移植法（IBM-BMT）と併用することによって、ドナーの正常の造血幹細胞（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。特に、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目指す。

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している。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っている。

灌流法を用いた骨髄内骨髄移植法（PM+IBM-BMT）は、これまでの 3 年間、厚生労働省の厚生労働科学研究費補助金からサポートを受けており、ヒトへの応用に全力を挙げており、今までに兵庫医科大学と関西医科大学との間で、倫理委員会の承認の上、2 例実施したが、その後、適応症例が中々見つからないので、今後は、関西医科大学の救命との共同研究で、脳死患者において灌流法と吸引法の比較を予定している。

臨床応用に関しては、症例数も少ないため十分な効果は上がっていない。

しかし、この新技术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。

厚労省の労働行政の種々の課題を解決する上にも多大な貢献をするものとする。

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 + 骨髄内骨髄移植法. 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) 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.* 21: 1441-1448, 2012.
- 3) Shima C, Adachi Y, Minamino K, Okigaki M, Shi M, Imai Y, Yanai S, Takahashi K, Ikehara S. Neuroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor on ischemia-reperfusion injury of the retina. *Ophthalmic Res.* 48: 199-207, 2012.
- 4) Ueda Y, Katagiri K, Tomiyama T, Yasuda K, Habiro K, Katakai T, Ikehara S, Matsumoto M, Kinashi T. Mst1 regulates integrin-dependent thymocyte trafficking and antigen recognition in the thymus. *Nat. Commun.* 3: 1098, 2012.
- 5) Li M, Vanella L, Zhang Y, Shi M, Takaki T, Shapiro JI, Ikehara S. Stem cell transplantation increases antioxidant effects in diabetic mice. *Int. J. Biol. Sci.* 8: 1335-1344, 2012.
- 6) Hasegawa-Ishii S, Shimada A, Inaba M, Li M, Shi M, Kawamura N, Takei S, Chiba Y, Hosokawa M, Ikehara S. Selective localization of bone marrow-derived ramified cells in the brain adjacent to the attachments of choroid plexus. *Brain Behav. Immun.* 29: 82-97, 2013.
- 7) Shi M, Li M, Cui Y, Liu L, Adachi Y, Ikehara S. CD4⁺ T cell-depleted lymphocyte infusion impairs neither the recovery of recipient thymus nor the development of transplanted thymus. *J. Immunol.* 190: 2976-2983, 2013.
- 8) Li M, Shi M, Abraham NG, Ikehara S. Improved expression of Sirt1 on thymic epithelial cells of SAMP1 after intra bone marrow-bone marrow transplantation. *Cell Transplant.* 2013 Feb 26 [Epub ahead of print]
- 9) Shimo T, Adachi Y, Yamanouchi S, Tsuji S, Kimata T, Umezawa K, Okigaki M, Takaya J, Ikehara S, Kaneko K. A novel nuclear factor kB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, Ameliorates puromycin aminonucleoside-induced nephrosis in mice. *Am. J. Nephrol.* 37: 302-309, 2013.
- 10) Li M, Ikehara S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells Int.* 2013: 132642, 2013.

(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) 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.
- 3) Ming Li and Susumu Ikehara: Bone marrow stem cell therapies for diabetes mellitus and its complications: *STEM CELLS AND CANCER*

STEM CELLS. Chapter (ed. Dr. M.A. Hayat)
Springer In press.

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 保坂直樹、高橋伯夫、池原 進.
胸腺移植を併用した新しい骨髄移植法の悪性腫瘍への効果 II : 胎生、新生、成体期の造血幹細胞と胸腺の比較.
第 101 回日本病理学会総会
平成 24 年 4 月 26 日~平成 24 年 4 月 28 日 (東京)
- 2) 石井さなえ、島田厚良、稲葉宗夫、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸 靖、河内 全、細川昌則、池原 進.
骨髄由来免疫系細胞が健常脳に進入する新たな経路の骨髄内骨髄移植による組織学的同定.
第 101 回日本病理学会総会
平成 24 年 4 月 26 日~平成 24 年 4 月 28 日 (東京)
- 3) 足立 靖、下 智比古、梅澤一夫、金子一成、池原 進.
LPS 投与マウスにおける DHMEQ (NF- κ B inhibitor) の効果.
第 101 回日本病理学会総会
平成 24 年 4 月 26 日~平成 24 年 4 月 28 日 (東京)
- 4) 石 明、嶋千絵子、足立 靖、南野桂三、高橋寛二、池原 進.
マグネット・ビーズを用いた骨髄内骨髄移植法.
第 101 回日本病理学会総会
平成 24 年 4 月 26 日~平成 24 年 4 月 28 日 (東京)
- 5) 足立 靖、松添弘樹、川田交俊、高津宏樹、生田寿彦、石田明彦、中野麗香、山内莊作、下智比古、池原 進.
巨大右心房内血栓症から両肺の肺動脈血栓塞栓症をきたした 1 例
第 58 回日本病理学会秋期特別総会
平成 24 年 11 月 22 日~平成 24 年 11 月 23 日 (名古屋)
- 6) LI Ming, LI Ming, SHI Ming, Ikehara Susumu.
Bone marrow transplantation improved SMP30 expression in the liver of type II diabetes mice.
第 41 回日本免疫学会学術集会
平成 24 年 12 月 5 日~平成 24 年 12 月 7 日 (神戸)
- 7) 石井さなえ、島田厚良、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸靖、河内全、細川昌則、池原進.
骨髄由来免疫系細胞が健常脳に進入する新たな経路：骨髄内骨髄移植による組織学的同定。
第 53 回日本神経病理学会
2012.6.30. (新潟)
- 8) 島田厚良、石井さなえ、稲葉宗夫、李銘、石明、河村則子、武井史郎、千葉陽一、榎戸靖、河内全、細川昌則、池原進.
老化促進モデルマウスにみられる骨髄由来細胞の脳実質へのリクルートの亢進。
第 53 回日本神経病理学会
2012.6.30. (新潟)
- 9) 石井一慶、野村昌作、串田剛俊、飯田寛和、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“過去・現在・未来”。
平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業))
平成 24 年度第 1 回造血細胞移植合同班会議。
平成 24 年 7 月 7 日~7 月 8 日 (名古屋)

- 10) 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：総括と今後の展望.
平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業））
平成 24 年度第 2 回造血細胞移植合同班会議.
平成 25 年 1 月 13 日~1 月 14 日（東京）
- 11) 研究代表者 池原 進.
革新的な骨髄移植療法の開発に向けて.
平成 24 年度研究厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業））
平成 24 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合同公開シンポジウム.
平成 25 年 1 月 14 日（東京）
- 12) 研究報告書 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.
平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業（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 25 年 1 月 15 日（東京）
- 13) 足立 靖、下智比古、山内壮作、沖垣光彦、梅澤一夫、石 明、金子一成、池原 進.
微小糸球体病変モデルマウスに対する NF-κB 阻害薬 DHMEQ の効果.
第 102 回日本病理学会総会
平成 25 年 6 月 6 日~平成 25 年 6 月 8 日
（札幌）
- 14) 李 銘、石 明、池原 進.
SAMP10 マウスの胸腺上皮細胞における Sirt1 発現についての検討
—骨髄内骨髄移植を用いて—
第 13 回日本抗加齢医学会総会
- 平成 25 年 6 月 28 日~平成 25 年 6 月 30 日
（横浜）
- （国際学会）
- 1) Ming Li, Ming Shi, Susumu Ikehara.
Improved SMP30 expression in the liver of diabetic mice by stem cell Transplantation.
KEYSTONE SYMPOSIA on Molecular and Cellular Biology Aging and Diseases of Aging
October 22-27, 2012, Tokyo, Japan
 - 2) Ming Li, Susumu Ikehara. Prospects for bone marrow transplantation in tolerance induction of organ transplantation.
7th Five-Continent International Symposium on Cardiovascular Disease
招聘講演 April 19-April 21, 2013.(Beijing, China)
 - 3) Sanae Hasegawa-Ishii, Atsuyoshi Shimada, Muneo Inaba, Ming Li, Ming Shi, Noriko Kawamura, Shiro Takei and Susumu Ikehara :Intra bone marrow procedure facilitates entry of transplanted bone marrow cells through the tenia of choroid plexus into brain parenchyma. 19th Annual Meeting of The PsychoNeuroImmunology (San Diego) 2012.6.7
 - 4) Atsuyoshi Shimada, Sanae Hasegawa-Ishii, Muneo Inaba, Ming Li, Ming Shi, Noriko Kawamura, Shiro Takei and Susumu Ikehara: Enhanced recruitment of bone marrow-derived cells into the brain parenchyma in senescence-accelerated mice. 19th Annual Meeting of The PsychoNeuroImmunology (San Diego) 2012.6.7
 - 5) Sanae Hasegawa-Ishii, Atsuyoshi Shimada, Muneo Inaba, Ming Li, Ming Shi⁵, Shiro Takei, Susumu Ikehara.
Selective localization of bone marrow-derived

ramified cells in the brain adjacent to the
attachments of choroid plexus.

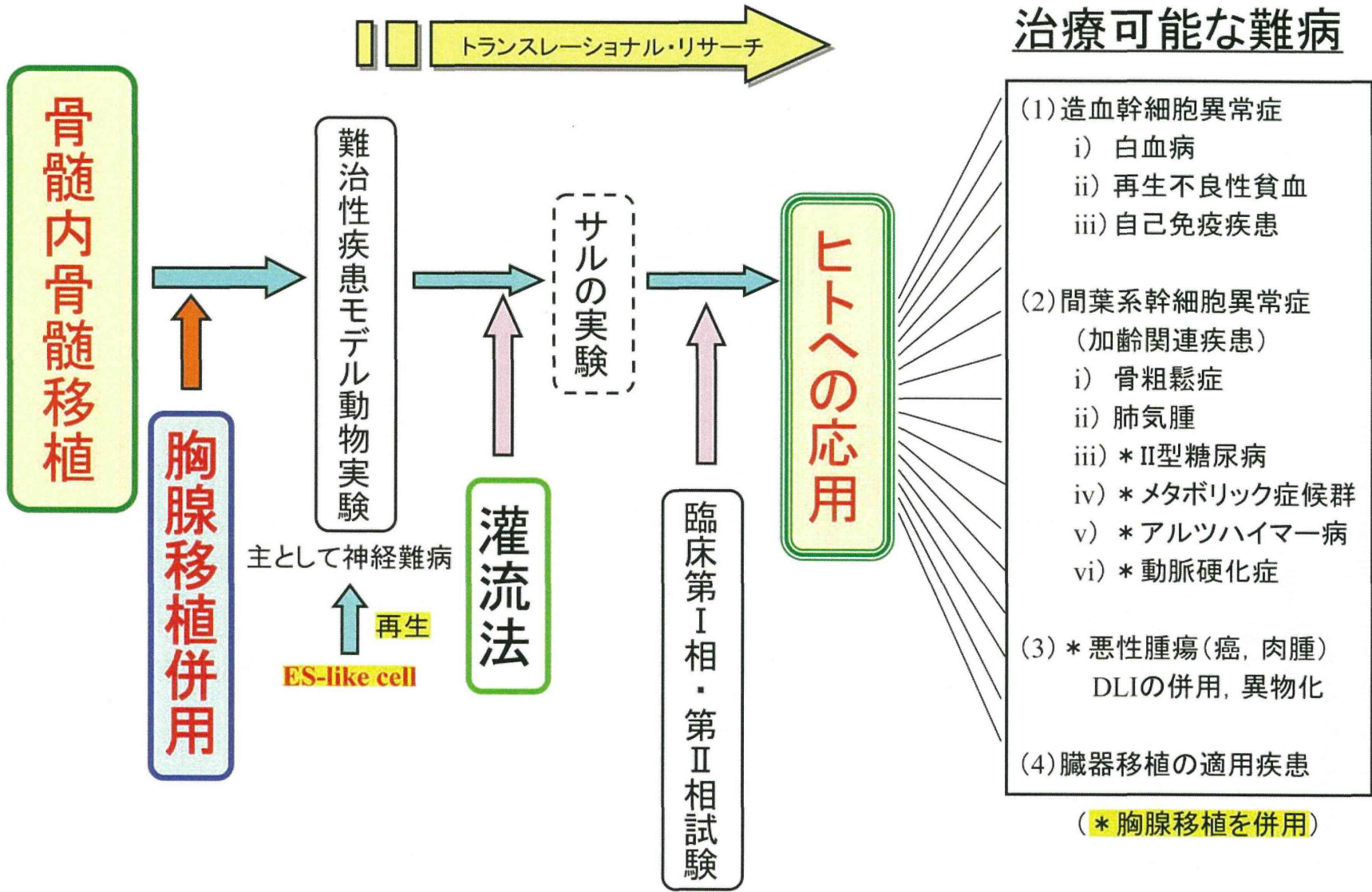
20th Annual PNIRS Scientific Meeting

June 5-8, 2013, Stockholm, Sweden

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

今後の見通し



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業
（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
—整形外科医からみた”灌流法の実際”—

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
研究協力者 串田 剛俊 関西医科大学整形外科学講座 講師
飯田 寛和 関西医科大学整形外科学講座 教授
森 眞一郎 関西医科大学血液呼吸器膠原病内科講座 講師
野村 昌作 関西医科大学血液呼吸器膠原病内科講座 講師

研究要旨

従来の骨髄採取方法（吸引法）はドナーの腸骨を 100 回以上穿刺するため負担が多い。また、採取された骨髄細胞には末梢血中リンパ球の混入が多くみとめられ、処理が必要となる。これに対し、池原らが開発した灌流法は長管骨または扁平骨に骨髄穿刺針を 2 本穿刺し、一方より生理食塩水を加え、他方より骨髄液を採取する方法である。この方法では穿刺数が少なく、末梢血の混入も抑制することが可能な方法である（Stem Cells. 18. 453-456, 2000; Stem Cells. 20. 155-162. 2002）。今回、整形外科医からみた骨髄内への穿刺方法や、より安全に挿入するための手術器具などの点から灌流法について検討した。

A. 研究目的

従来の骨髄採取方法（吸引法）はドナーの腸骨を 100 回以上穿刺するため負担が多い。また、採取された骨髄細胞には末梢血中リンパ球の混入が多くみとめられ、処理が必要となる。これに対し、池原らが開発した灌流法は長管骨または扁平骨に骨髄穿刺針を 2 本穿刺し、一方より生理食塩水を加え、他方より骨髄液を採取する方法である。この方法では穿刺数が少なく、末梢血の混入も抑制することが可能な方法である（Stem Cells. 18. 453-456, 2000; Stem Cells. 20. 155-162. 2002）。今回、整形外科医からみた骨髄内への穿刺方法や、より安全に挿入するための手術器具などの点から灌流法について検討する。

B. 研究方法 C. 研究結果

【骨膜刺激症状】

腸骨を覆う骨膜には血管と知覚神経が豊富にある。整形外科手術において腸骨からの採骨後に局所疼痛が長期にわたり残存することがある。吸引法は多数回の腸骨への穿刺を行うため、骨膜周囲の血腫や知覚神経損傷をきたす可能性がある。一方、灌流法では穿刺回数が少なく、ドナーの負担が軽減される。

【穿刺の方向と深さ】

1) 吸引法と灌流法の穿刺針の深さの違い

吸引法において、骨髄穿刺針は骨髄腔内にわずかに入れれば（5-10mm 程度）、骨髄の採取可能である（図 1）。一方、灌流法においては、髄腔内を灌流液で灌流するため、骨髄穿刺針はある程度の深さ（20-30mm 程度）が必要ではないかと考えられる（図 2）。

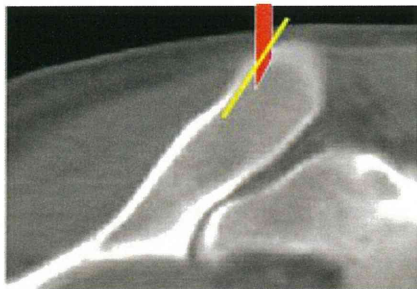


図 1 吸引法の穿刺針の深さ

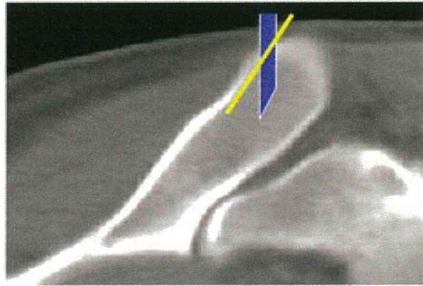


図 2 灌流法の穿刺針の深さ

2) 吸引法と灌流法の穿刺針の穿刺方向の違い

ドナーが腹臥位になった際、腸骨稜内の傾きは水平面に対し、約 60 度傾いており、髓腔内に 2-3cm 挿入使用とした際、穿刺する部位により骨髓穿刺針を傾ける必要がある（図 3、4）。



図 3 腸骨翼の傾き

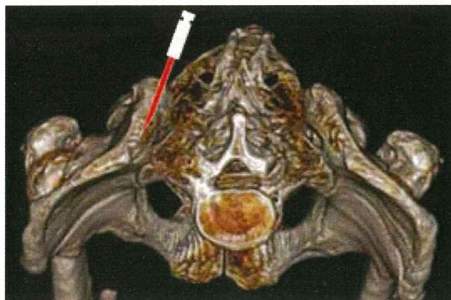


図 4 骨髓穿刺針の傾き

【様々な装置を用いた穿刺方法】

1) ポータブル透視装置

主に骨折の手術に用いる透視装置である。X線により骨折の整復および固定状況がリアルタイムに把握できる。利点として、ポータブルタイプのため様々な場所に移動が可能であり、透視装置の角度を変えることにより被写体を動かすことなく 360 度回転が可能である。

腸骨への骨髓穿刺針の刺入時、肥満な症例や筋肉質の症例では腸骨翼の角度が把握しにくいいため、腸骨骨髓内への針刺入が困難な場合がある。ポータブル透視装置を用いれば、針刺入の角度や刺入距離など正確に把握できる。

2) CT ガイド

CT ガイド下に脊椎内や骨盤内の骨生検査を行っている。また、脊椎圧迫骨折時に CT ガイド下に椎体内に骨セメントを注入している。いずれも清潔操作で行っており、腸骨への骨髓穿刺にも応用が可能である。ポータブル透視装置より、正確に骨髓腔内に穿刺が可能である。

3) ナビゲーションシステム

ポータブル透視装置や CT は術中に放射線を使用するデメリットがある。これに対し、ナビゲーションシステムは赤外線を利用して、リアルタイムでモニター上に表示することが可能な装置である。特に、脳外科の手術で多く用いられているが、整形外科分野では脊椎後方固定時にスクリューの挿入に用いられる。

この方法は、骨髓採取においてドナーの放射線被曝が無く、また、安全に骨髓穿刺針を骨盤内に刺入することが可能であり、利用効果が高いと考えられる。

D. 考察 E. 結論

整形外科分野では骨・骨髄への穿刺・挿入方法において、様々な工夫がなされている。骨盤への骨髄穿刺においても、従来の穿刺方法に改良を加えることにより、骨髄腔を利用した灌流法が、より簡便かつ確実に行うことが可能と考えられる。

参考文献

- 1). Kushida T, Ikehara S, et al: A new method for bone marrow cell harvesting. Stem Cells. 18. 453-456, 2000.
- 2). Kushida T, Ikehara S, et al: Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeys at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT. Stem Cells. 20. 155-162. 2002.

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

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

同種造血細胞移植後に再発した造血器腫瘍の予後は極めて不良であるが、再発ハイリスク例における移植後再発率は 30%に及ぶ。GVHD を誘導することなく抗白血病（GVL）効果を得る方法として、血液系に限局して発現するマイナー抗原を標的とする免疫療法が検討されてきた。我々は、そのような性質をもったマイナー抗原を認識するキラーT 細胞受容体をドナーT 細胞に遺伝子導入して武装する方法を開発する傍ら、HLA に結合したマイナー抗原を認識する抗体を分離し、これを単鎖化し T 細胞に導入する CAR-T 細胞療法の可能性についても検討した。マイナー抗原/HLA 複合体を接種し免疫したマウス脾細胞から B 細胞を分離、ファージディスプレイ法にて特異的なクローンを分離した。得られた抗体は、マイナー抗原の陰性アリルペプチドをパルスした細胞には結合せず、抗原陽性ペプチド濃度依存性に結合した。これを T 細胞に導入することで、CD19 抗体で行われたような CAR-T 細胞免疫療法にトランスレーションすることが今後の目標である。

A. 研究目的

我々はこれまでに 9 種類のマイナー抗原を同定してきたが、うち 4 種類が血液系細胞に特異的に発現する遺伝子にコードされており、選択的 GVL 効果誘導に有望と考えられた。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各症例に合ったマイナー抗原を選択できるという、テーラーメイド治療が可能である。現在マイナー抗原ペプチドワクチン療法の臨床試験では 8 例に投与がなされたが、移植後の極めて長期経過例で十分な免疫反応が得られない傾向がわかってきた。このため事前にマイナー抗原特異的 T 細胞を事前に用意しておき、再発早期や、再発予防のブースとして投与することを考慮する必要がある。本研究は、クローン化した T 細胞では十分な輸注細胞数を得られない反省から、マイナー抗原 T 細胞受容体（TCR）や、マイナー抗原/HLA 複合体を認識する抗体で武装した T 細胞

を開発することに注力した。TCR 導入細胞については昨年度の ACC-1Y マイナー抗原を認識するものに加えて、ACC-1C 抗原を認識する TCR のクローン化を試みた。

B. 研究方法

①ACC-1C 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-1C を認識する CTL クローン、1B9 の TCR α 鎖、 β 鎖を PCR 法にてクローン化した。配列確認後、それぞれの鎖は PGK promoter もしくは 2A ペプチドで結合し、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 を改変したものをを用いた。

②レトロウイルスの産生：

パッケージング細胞として、GALV- Phoenix-GP 細胞を用いた。プラスミドの導入は XstreamGene9

を用いて行い、puromycin にて導入細胞を選択し、一過性プロデューサー細胞を得た。

③ウイルスの感染：

ウイルス上清をレトロネクチン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 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。TCR 遺伝子導入・発現効率は A24/ACC-1C-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。

④CAR-T を作成するために、まずマウスに HLA-A*02:01/HA-1H (以下 A2/HA-1H) テトラマーを複数回 B6 系統のマウスに接種して免疫を行った。脾細胞 B 細胞を取り出し、その免疫グロブリン cDNA ライブラリから A2/HA-1H に反応性の抗体を A2/HA-1H モノマーと陰性コントロールの HLA-A*02:01/MAGEA3 モノマーでスクリーニングし、前者のみに反応するクローンを得た。次のステップとして HLA-A*02:01 に提示された HA-1H ペプチドには反応するが、HA-1R ペプチドには反応しない特異性の高いクローンを選択した。さらにこの単鎖抗体断片 (scFv) で作成したテトラマーが細胞上に発現した HLA-A*02:01 に提示された HA-1H に結合できるか検討した。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)、厚生労働省の所管する実施機関における

動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知) 及び申請者が所属する研究機関で定めた倫理規定等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する。

C. 研究結果

①ACC-1C 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-1B9 の TCR α 鎖と β 鎖を 2A 配列を利用してタンデムに結合して 1 つのベクター (TRBV7-9*03 BJ2.1) \rightarrow F2A \rightarrow α (AV24-AJ37) を Phoenix-Galv パッケージング細胞に導入し、産生されたウイルスを Jurkat/MA に感染させて、発現を評価した。特異的テトラマーは 陽性コントロールであるオリジナルの CTL-1B9 には良好な反応性を示したが、Jurkat/MA に TCR を感染させたものはほとんど染色されなかった。CTL-1B9 は PCR 解析でもう 1 種類の in-frame の TCR- α 鎖を弱く発現しており、これが bona fide の TCR である可能性がある。

②A2/HA-1H を認識する抗体については 5×10^8 スケールのファージライブラリから出発し、3 回のパニングによる濃縮後にランダムにピックアップした 144 個のコロニーをスクリーニングした。この結果 7 種類、18 クローン (12.5%) が得られた。これ以外は HLA-AH2/MAGEA3 にも反応するもの、無反応のものであった。このうち最も結合力が強い単鎖の scFv をコードする cDNA (クローン#131) を 4 量体化した蛍光色素標識ファージ抗体ないしは、IgG4 抗体定常領域の前に組み込みテトラマー化して、HA-1H ペプチドをパルスした TAP 欠損 HLA-A*02:01 陽性の T2 細胞と反応させたところ、10nM まで反応が得られたが、HA-1R ペプチドやそれ以