

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）研究事業
「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」

当グループ参加研究者の研究内容は以下の通りである：

研究内容	研究者名	所属
1. 造血幹細胞の生着と造血回復の促進		
◆ PAI-1 阻害剤による造血再生	安藤潔	東海大
同上	宮田敏男	東北大
◆ 低分子化合物による幹細胞増幅	岩間厚志	千葉大
◆ 炎症環境からの造血幹細胞保護	大津真	医科研
2. 感染症克服のための抗原特異的細胞製剤の開発		
◆ ウイルス特異的 CTL バンク構築	森尾友宏	東京医科歯科大
◆ ウイルス特異的 CTL 療法・臨床試験	小島勢二	名古屋大
同上	高橋義行	名古屋大
3. 線溶系阻害剤による新規 GVHD 治療法の開発		
	服部浩一	医科研
4. 臍帯血バンク・細胞バンクの将来構想		
	高梨美乃子	日赤関東甲信越ブロック 血液センター
5. 臨床研究、および開発研究支援		
◆ 移植臨床研究、その全国体制の確立	谷口修一	虎の門病院
同上	山本久史	虎の門病院
◆ 骨髄内臍帯血ミニ移植・臨床試験	小川啓恭	兵庫医大
同上	岡田昌也	兵庫医大
◆ 臨床研究支援・調査研究	山口拓洋	東北大
◆ 臨床研究における規制対応	長村文孝	医科研

我々は、これらの臨床開発研究の情報基盤を形成することにより、臍帯血移植を含めて同種細胞移植療法全体の成績向上をも目指す。

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）研究事業
「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」

臍帯血バンクの現状と将来構想

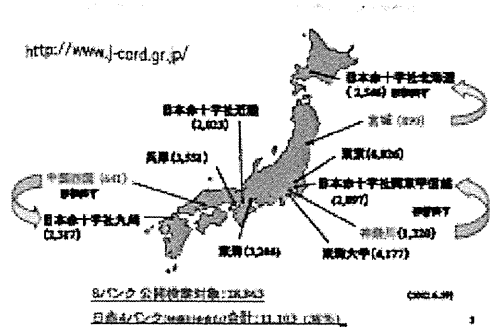
日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター・日本赤十字社関東甲信越臍帯血バンク

高梨美乃子

臍帯血バンクの現状と将来構想

高梨 美乃子

日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター
日本赤十字社関東甲信越さい帯血バンク
(日 東京 東京赤十字血液センター-臍帯血バンク)



日本赤十字社	日本赤十字社
北海道ブロック血液センター	北海道さい帯血バンク
東北ブロック血液センター	
関東甲信越ブロック血液センター	関東甲信越さい帯血バンク
東海北陸ブロック血液センター	
近畿ブロック血液センター	近畿さい帯血バンク
中国ブロック血液センター	
九州ブロック血液センター	九州さい帯血バンク

臍帯血の検査

臍帯血 検査検体 2.0 ml

有核細胞数測定
HLA 検査
CMV DNA検査

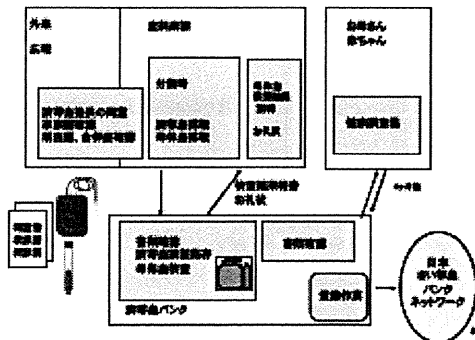
血漿: 感染症スクリーニング
ALT, 梅毒,
ウィルスマーカー
HbA_{1c}, anti-HBc, anti-HBc,
anti-HCV, anti-HIV1-2,
anti-HIV1-2, Parvovirus B19 Ag

感病検査は母体血清と
同様に実施している
母血清にて上記の項目の他,
anti-CMV (IgG/IgM) を行う

赤血球: 血液型判定 (ABO)

細菌検査

遺伝子検査:
コロンバクテリウム, CDS4遺伝子検査



臍帯血の品質管理

- 基準
- 検査感度、特異性
- 凍結保存の技術
- 衛生管理
- 責任体制
- 教育訓練

安全性
効能・効果

検査項目?

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）研究事業
「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」

臍帯血の品質管理

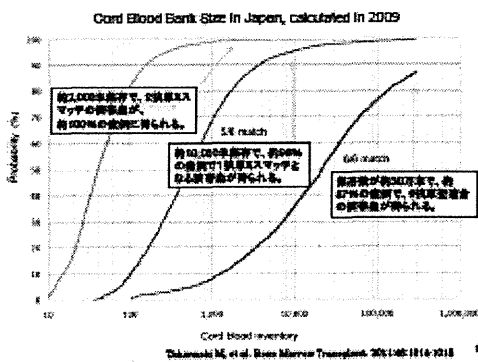
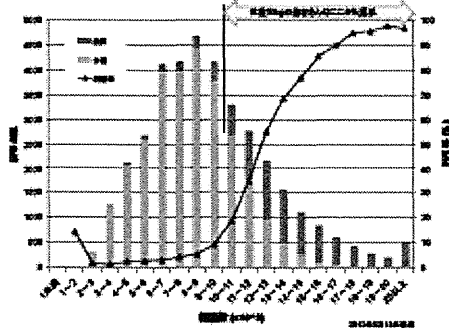
効能・効果

造血幹細胞

総有核細胞数
単核細胞数
CD34+細胞数
コロニー形成細胞数
細胞生存率

Total CFU
CFU-GM

登録臍帯血、移植臍帯血の分布と利用率



課題

補助金依存事業

事業を充実させる経済力(品質の向上)が困難

2012年4月より、CBT 1件につき
408,000円を移植回数に課税

成人に使用可能な臍帯血の保存

広域化

広報

国際化



第一八〇回
参議二〇号

移植に用いる造血幹細胞の
適切な提供の推進に関する法律案

目次

- 第一章 総則(第一条-第八条)
- 第二章 基本方針(第九条)
- 第三章 移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進のための
施策(第十条-第十六条)
- 第四章 骨髄・末梢血幹細胞提供あっせん事業
(第十七条-第二十九条)
- 第五章 臍帯血供給事業(第三十条-第四十三条)
- 第六章 造血幹細胞提供支援機関(第四十四条-第五十二条)
- 第七章 雑則(第五十三条-第五十四条)
- 第八章 罰則(第五十五条-第六十一条)
- 附則

骨髄内炎症環境における幹細胞保護

東京大学医科学研究所

大津真

造血幹細胞移植は白血病等の血液疾患をはじめとし、多くの難治性疾患に応用可能な治療手技である。先天性免疫不全症の一部の特殊例を除き、ほとんど全ての移植レジメンは程度の差こそあれ放射線照射あるいは化学療法等の骨髄毒性を伴う前処置を必要とする。これらの前処置は一時的に（あるいは恒久的に？）骨髄環境を破壊するが、この「環境破壊」が移植される造血幹細胞にいかなる影響を与えうるか、必ずしも実験的に明らかにされてはいない。我々は、放射線照射に反応して骨髄環境中に炎症性サイトカインが一過性に産生される現象に着目し、これが移植後の造血幹細胞に与える影響につきマウスモデルを用いて検討した結果、以下を明らかとした。1) 照射後骨髄中に産生される炎症性サイトカインのうち、TNF- α のみが純化造血幹細胞活性を用量依存的に抑制した。2) 照射後骨髄に短期間（24 時間）造血幹細胞を生体内暴露する実験系を確立し、再構築能に与える環境側の影響を検討した結果、照射骨髄の時期特異的な抑制効果が明らかとなり、特に照射 48 時間後に最も顕著な造血幹細胞傷害活性が示された。3) 骨髄環境側に TNF- α 欠損マウスを用いることで、上記の造血幹細胞抑制効果は大幅に軽減された。4) TNF- α 刺激により造血幹細胞中に活性酸素（ROS）の産生を認め、ROS 高産生細胞においては骨髄再構築能の低下を認めた。5) 移植前に上記の TNF- α -ROS 産生シグナル経路の抑制ペプチドで短期間（2 時間）処理することで、炎症環境中における造血幹細胞の再構築能が回復した。

以上の結果は、前処置を伴う移植において造血幹細胞の活性低下はデフォルトである程度不可避であるが、その原因を明らかにし造血幹細胞をその影響から「保護」することで移植後の造血再構築を改善できる可能性を示している。本合同班会議においては、ヒトへの応用を見据えた展望も含め、我々の取り組みについて紹介する。

線維素溶解系と GVHD

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞制御領域
服部浩一

移植片対宿主病(GVHD)は、臍帯血移植をはじめとする造血幹細胞移植患者の quality of life と生命予後を左右する深刻な合併症の一つである。我々は、これまでの研究を通じて、急性 GVHD の発症に関与する TNF- α や Fas-ligand 等の炎症性サイトカインに各々標的臓器指向性が存在すること、またその多くが、金属要求性蛋白分解酵素で、組織中の構造蛋白、細胞基底膜を主な基質とするマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) による細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)を経て産生されること、さらにリンパ球、単球・マクロファージ系細胞をはじめとする骨髄由来の炎症性細胞群の組織内浸潤が MMP の活性化を必須とすること等を明らかにしてきた(図 1)。

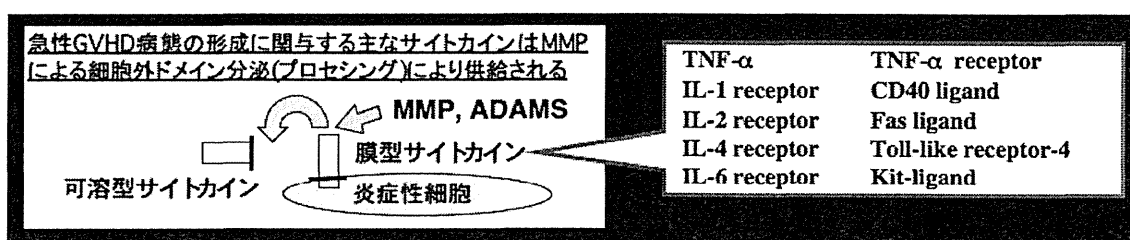


図 1: MMP による炎症性サイトカインの細胞外ドメイン分泌制御機構

さらにこれらの研究成果を基礎として、MMP 阻害剤の急性 GVHD のマウスモデルに対する有効性を明らかにし、炎症性疾患病態にたいする新しい分子療法の可能性を示唆することに成功した(Blood 91:4051, 1998, Blood 90:542, 1997, 図 2)。しかしながら、元来、がんに対する分子療法薬として期待された MMP 阻害剤については、欧米の対がん臨床治験で確認された Musculoskeletal syndrome 等の深刻な副作用の存在もあって、臨床普及への道は閉ざされつつある。

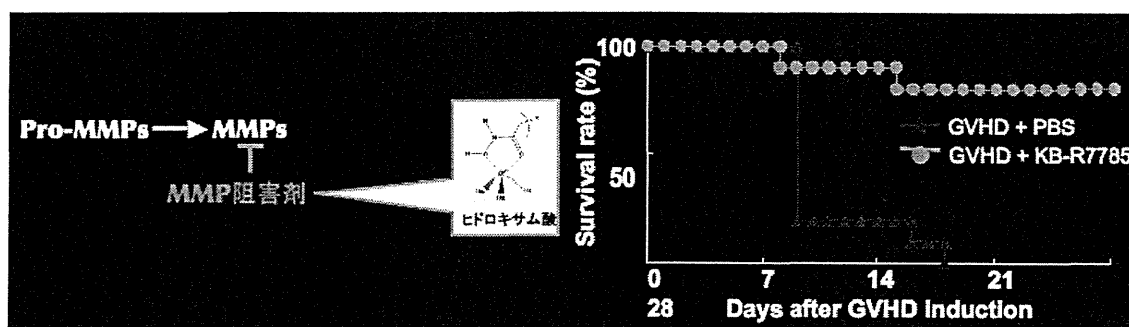


図 2: MMP 阻害剤の急性 GVHD に対する有効性

我々は、その後の研究で、造血幹細胞の分化増殖、そして骨髄由来の炎症性細胞、組織前駆細胞の末梢組織への動員、浸潤過程における MMP、特に血管基底膜を主な基質とする MMP-9 の活性化とこれに伴う代表的な造血因子 Kit-ligand のプロセッシングの重要性を明らかにした(J Exp Med 202:739, 2005, Nat Med 10:64, 2004, Cell 109:625, 2002, Nat Med 8:841, 2002)。さらに生体内の MMP 活性化-潜在型酵素 ProMMP から MMP への変換は、膜型 MMP(MT1-MMP)をはじめとする各種 MMP 間の相互活性化

システムと血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミンの生成とによって制御されていること、またマウス生体への組織プラスミノゲンアクチベータの投与は、MMPの活性化を介し、Kit-ligandのプロセッシングを誘導し、骨髄造血、組織再生を促進することを見出した(Cell Stem Cell 1:658, 2007, Nat Med 12:557, 2006, Blood 115:4302, 2010, Blood 119:5405, 2012, Blood in press, 2012)。このことは、線溶系の亢進が、各種炎症性サイトカインの分泌制御に寄与していることを示唆していると言えよう。

我々はこうした実験結果を基礎として、生体内の凝固・線溶系因子動態が、MMP活性と炎症性サイトカインの分泌制御を通じて、急性GVHDの病態形成に何らかの形で関与しているとの仮説に至った(図3)。さらに、この仮説に基づき、プラスミン活性阻害剤による線溶系活性の抑制によるGVHD病態の制御-新規治療法の可能性について、動物実験と臨床検体の両面から精査、検討することとした。プラスミン阻害剤YO-2については、神戸学院大学薬学部との共同研究で薬効精査を進めることとなっており、最近当方より、この薬剤のMMP活性の抑制作用、白血病・リンパ腫に対する有効性を確認、報告している(Leukemia 26:332, 2012)。

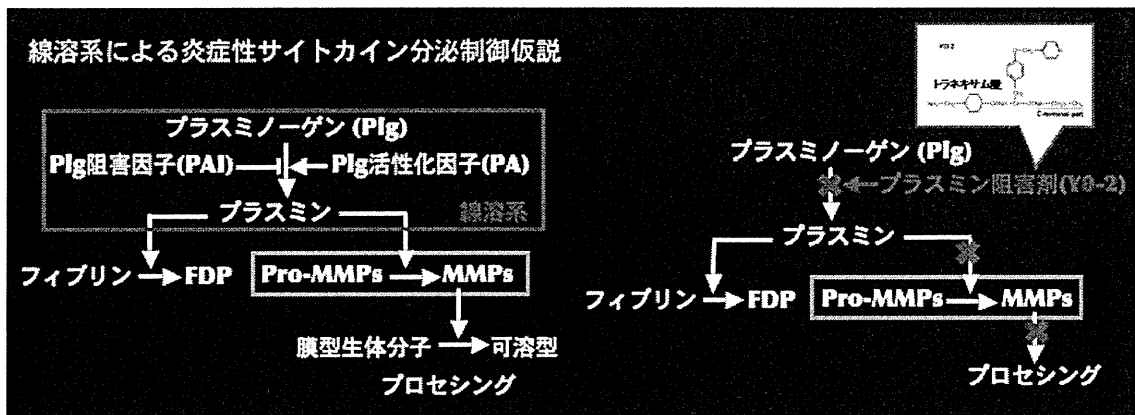


図3：線溶系阻害剤の炎症性サイトカイン分泌抑制機序

本研究では、血液凝固・線溶系と炎症性疾患病態との関連性及びその相互作用に注目し、急性GVHDの病態におけるMMPの活性制御と炎症性サイトカインをはじめとする生体因子の分泌産生の起点として、その上流に位置する線溶系因子群の機能解明を主たる目的とする。さらにこれを基礎とした、炎症性サイトカインのプロセッシング阻害に基づく、線溶系を標的とした免疫・炎症性疾患の病態制御、新規分子療法の開発までをその目的の範疇とする。

研究計画において、GVHDの実験動物モデルの作製から、血中の各種プロテアーゼ活性、サイトカイン動態、さらにこれらの病理組織の解析については、東京大学医科学研究所、幹細胞治療研究センター幹細胞制御領域で主に進めるものとし、急性あるいは慢性GVHD患者検体の精査及びこれら検体データと臨床病態、重症度、さらには前出の実験結果と患者病態との相互の関連性については、東京大学医科学研究所附属病院、血液腫瘍内科との共同研究を通じて十分な議論を重ね、将来的にはトランスレーショナルリサーチ指向型の研究としての展開を考えている。

臍帯血ミニ移植の前処置

虎の門病院 血液内科 山本久史 谷口修一

臍帯血ミニ移植は難治性血液疾患に対する根治的治療として普及しているが、その至適な前処置は確立していない。我々は、臍帯血ミニ移植の開発当時から、Fludarabine(125mg/m²) / Melphalan(80mg/m²) / TBI 4Gy (Flu / Mel / TBI)を移植前処置として用い、高齢者ハイリスク疾患群を中心にその安全性・有効性を報告してきた(Miyakoshi; CCR 2004)。また再生不良性貧血や骨髄繊維症といった生着不全の高リスク群に対しても、良好な生着がみられており(Yamamoto; Blood 2011, Takagi; Blood 2011)、確実な生着担保はFlu / Mel / TBIの大きな利点と思われる。一方で、消化管毒性や重症の同種免疫反応(生着前免疫反応・血球貪食症候群)を起因とする高い非再発死亡率(NRM)は克服すべき問題であった(Kishi; Transplant 2005, Uchida; BBMT 2008, Takagi; BJH 2009)。MMFの導入により移植後早期の安全性は改善したが、中後期の NRM および原病再発のため、最終的な生存率改善には至っていない(Uchida; Transplantation 2011)。Fludarabine / i.v. Busulfan(12.8mg/kg)(FluBu4)は、毒性を軽減した骨髄破壊的前処置として、末梢血や骨髄を用いた移植において、近年急速に普及しつつある前処置である。一方、FluBu4 を用いた臍帯血移植においては、高い生着不全率が報告されており、その利点をいかせていないのが現状である。臍帯血移植における FluBu regimen の安全性・有効性および至適化を検証するため、当院で施行した Flu / i.v.Bu-based regimens を用いた臍帯血移植 62 例を後方視的に解析した。年齢中央値は 59(21-72)歳、HCT-CI は 2(0-5) score であった。原疾患は AML / MDS 52 例、CML 3 例、ALL 6 例、ATLL 1 例で、高リスク疾患が 92%であった。また 26%の症例では同種移植歴を有していた。移植前処置として Fludarabine(125-180mg/m²) / i.v. Bu(6.4-12.8mg/kg)を用い、全例において TBI (2-8Gy)もしくは Melphalan (80-140mg/m²)を併用した。至適な FluBu regimen を検証するため、様々な前処置を Busulfan の量に応じて 2 群に分けて解析した(FB4 群 (i.v.Bu 12.6mg/kg) vs FB2-3 群 (i.v. Bu 6.4-9.6mg/kg))。2 群間で患者背景に差はなかった。全対象における、好中球生着・2 年 NRM・2 年再発の累積発症率は、77.4%, 28.6%, 40.9%であった。好中球生着および NRM は、FB4 群と FB2-3 群の 2 群間で差はなかったが、再発率は FB4 群において有意に低下がみられた(FB4; 31% vs FB2-3; 53.8%, $P=0.03$)。多変量解析においても FB4 群が再発率低下に寄与する唯一の因子として抽出された(HR:0.89, $P=0.01$)。2 年全生存率 / 無病生存率は、FB4 群において 58.3 / 41.3%、FB2-3 群において 30.8% / 19.2%と、有意に FB4 群で優れていた。本解析では、FluBu に TBI もしくは Mel を加えることで安定した生着が得られること、FB4-based regimen は高齢者ハイリスク集団においても、NRM を増やすことなく再発率を低下させる可能性が示唆された。現在、高齢者 AML / MDS を対象に FB4+TBI4Gy を用いた臍帯血移植の安全性・有効性に関する多施設前向き試験を進行中である(JSCT FB09/10)。また院内においては、より進行期疾患を対象に FB4+Mel80 を用いた臍帯血移植の Pilot study を進めている。これらの中間解析の結果を含め紹介する。

骨髄内臍帯血ミニ移植（臨床第 II 相試験）

兵庫医科大学 血液内科
岡田昌也、小川啓恭

成人に対する骨髄破壊的前処置を用いた臍帯血移植は 1990 年代後半から試みられるようになり、報告によっては非血縁ドナーからの骨髄移植に比肩する成績が得られている。臍帯血移植が骨髄移植に比して不利な点は、患者体重当たりの移植細胞数が骨髄移植の約 1/10 と少ないことである。これにより拒絶・生着不全のリスクが高く、血球回復が遅延するという問題が生じる。上記の報告においても、非血縁ドナーからの骨髄移植では、生着不全を起こした症例は 0-7%であったのに対し、臍帯血移植を受けた症例の 8-20%で生着不全が起こっている。

生着不全のリスクは、ミニ移植においてはさらに高くなる。臍帯血ミニ移植のまとまった報告は少なく、また報告によって前処置が異なるという問題はあるが、7.3-67%の症例で生着不全が認められている。我々のグループも、臍帯血ミニ移植を積極的に試みてきたが、約 20%の症例で生着不全を認めている。

生着不全のリスクを低下させる方法の一つとして、臍帯血を造血の場である骨髄に直接移植するという方法が試みられている。

ジェノバ大学の Frassoni らは、2007 年の EBMT annual meeting において、骨髄内臍帯血移植を施行した 20 例について報告を行った。その結果、1) 成人臍帯血移植において問題となる生着不全が 1 例も見られなかった、2) 血小板 >2 万/ μ l 回復の中央値が 34 日と速やかであった 3) 急性 GVHD2-4 度の頻度が 6%と低かった、としている。コントロール研究ではないが、これらはいずれも経静脈的臍帯血移植よりも骨髄内移植に優位性があることを示唆するものであった。一方、ミネソタ大学の Wagner らも、骨髄内臍帯血移植の臨床試験を行っているが、同時に静脈内に輸注した臍帯血に対し生着の優位性は認めず、骨髄内移植の有効性については否定的であった。

以上より、骨髄内臍帯血移植について、臍帯血移植の最大の問題である生着不全を減らし、予後を改善する可能性があるかを検討する意義があると考ええる。

兵庫医科大学 血液内科において 55 歳から 70 歳の悪性血液疾患患者を対象として、臍帯血を洗浄することなく、そのまま患者の骨髄内へ移植する臍帯血ミニ移植の第 I 相試験を行った。主要評価項目は、上記の方法で骨髄内へ臍帯血を移植することの安全性であった。予定の 10 例を終了したが、移植後の肺塞栓などの合併症は認められなかった。また、骨髄内へ臍帯血を注入する際の疼痛も、大きな問題とならないことが確認された。現在、当移植法の安全性が示されたものと考え、予定していた骨髄内臍帯血ミニ移植の有効性を検討する第 II 相試験を多施設共同研究の形で実施している。

造血細胞移植合同班会議（厚労科学研究）

7月8日（日）

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（H22-免疫-一般-009）
研究代表者 池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

11:15-11:22（質疑応答含）

1. 骨髄間葉系幹細胞によるB細胞分化制御

三浦康生¹、吉岡 聡²、前川 平³、一戸辰夫⁴（¹京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部、²京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科、³京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部、⁴佐賀大学医学部内科学講座 血液・呼吸器・腫瘍内科）

11:22-11:29（質疑応答含）

2. 同種造血幹細胞移植後合併症におけるHMGB1-RAGE系の関与の検討

前田嘉信、近藤英生、藤井伸治、品川克至（岡山大学病院 血液・腫瘍内科）

11:29-11:36（質疑応答含）

3. 難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性T細胞（CTL）の体外増幅法の開発と臨床第1相試験

高橋義行、小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学）

11:36-11:43（質疑応答含）

4. 同種移植後の再発白血病への細胞治療法の開発

赤塚美樹（藤田保健衛生大学医学部 血液内科）

11:43-11:50（質疑応答含）

5. 骨髄内臍帯血移植療法の開発

村田 誠（名古屋大学医学部附属病院 血液内科）

11:50-11:57（質疑応答含）

6. 骨髄内骨髄移植の技術的諸問題の解決に向けて

相馬俊裕、池亀和博、小川啓恭（兵庫医科大学 内科学講座 血液内科）

11:57-12:30（質疑応答含）

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
“過去・現在・未来”

石井一慶、野村昌作（関西医科大学内科学第一講座、同附属枚方病院血液腫瘍内科）
串田剛俊、飯田寛和（関西医科大学整形外科学講座）
池原 進（関西医科大学 共同研究講座 幹細胞異常症学）

骨髄間葉系幹細胞による B 細胞分化制御

三浦 康生¹、吉岡 聡²、前川 平³、一戸 辰夫⁴

¹京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 助教

²京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科 大学院生

³京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部 教授

⁴佐賀大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 准教授

間葉系幹細胞は骨髄微小環境において造血細胞ニッチを構成する重要な細胞である。また、造血異常と骨髄微小環境異常の相関を示唆する知見が示されつつある。我々は B 細胞系列に造血異常を認める遺伝子欠損マウスを用いて、間葉系幹細胞の機能と B 細胞の分化能の関連について検討を行った。その結果、骨分化、脂肪分化といった多分化能に欠損を有する間葉系幹細胞が前駆 B 細胞から成熟 B 細胞への分化障害に関与し、そのメカニズムの一つとして異常間葉系幹細胞の stromal cell-derived factor 1 (SDF-1、CXCL12) の発現低下が関与していることが明らかとなった。この結果は造血異常の改善を目的として、異常な間葉系幹細胞を標的とする新たな治療戦略の可能性を示唆し、より多数の正常な間葉系幹細胞が直接的に骨髄微小環境へ投与され、異常な骨髄微小環境の改善が期待される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が有効である可能性がある。

研究分担者：一戸 辰夫

研究協力者：三浦 康生

同種造血幹細胞移植後合併症における HMGB1-RAGE 系の関与の検討

岡山大学病院 血液・腫瘍内科 前田嘉信、近藤英生、藤井伸治、品川克至

同種造血幹細胞移植後の GVHD を含めた合併症の克服は、移植成績を向上させる上で重要である。Idiopathic pneumonia syndrome (IPS)は、移植後に広汎な肺障害を生じて発症する予後不良な肺合併症の総称である。近年、Ikehara らの骨髄内移植 (intra-BMT) は、生着率の向上と GVHD 抑制の両面から注目されているが、我々は、従来の静脈内へ輸注 (iv- BMT) に比べ intra-BMT 後の IPS 発症が抑制されるかを検討した。その結果、移植後早期に iv- BMT 群でドナー細胞が肺に集積し、肺におけるケモカインの発現を増強させることが明らかとなった。iv- BMT 後には、移植された細胞によってホストの環境が変化することが示唆されたが、移植後早期に起こる生体内の変化 “danger signal”は、その後の移植合併症を誘発させる可能性がある。

“danger signal”としては、炎症性サイトカインと微生物特有の分子群 PAMP (Pathogen-associated molecular pattern ; 病原体関連分子パターン)の役割が明らかにされている。PAMP を認識するレセプターとして TLR (toll-like receptor)や NLR (NOD-like receptor) などがあり、腸内微生物のグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分 LPS は TLR を介して DC を活性化させる。この LPS-TLR 経路が GVHD 発症に重要であることはマウスモデルにより証明されたが、ヒトにおいても TLR の遺伝子多型が GVHD 重症度に影響すると報告されている。

“danger signal”には、外的要因 (微生物) としての PAMP に対し、内的要因 (細胞障害など) の分子群は DAMP (Damage associated molecular pattern ; ダメージ関連分子パターン) として大別される。High-mobility group box 1 protein (HMGB-1)は、核内において転写調節に重要な核内蛋白質として知られていたが、免疫担当細胞から能動的に細胞外に分泌、または細胞死に伴って受動的に細胞外へ放出される。受容体としては、receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)や TRL が知られている。

今回、我々はマウスモデルを使って DAMP である HMGB1-RAGE 系が同種造血幹細胞移植後合併症の病態に関与しているかを検討する。

移植後の薬剤抵抗性 CMV 脳室炎に対してドナー由来 CMV 抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) 療法を実施した 1 例

名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学

高橋義行 小島勢二

当科では、難治性ウイルス感染症に対するウイルス抗原特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の体外増幅法の開発と臨床第 1 相試験を行なっている。今回我々は、造血幹細胞移植後の薬剤抵抗性 CMV 脳室炎に対し、ウイルス特異的 CTL 髄腔内投与を実施したので報告する。

【症例】生後5ヶ月時、ランゲルハンス細胞組織球症と診断。治療抵抗性のため生後1歳2ヶ月時に非血縁者間臍帯血移植術を実施した。移植後CD4+T細胞の低下が持続し、ガンシクロビル耐性サイトメガロウイルス (CMV) 網膜炎を発症した。ホスカルネットを投与するもCMVは消失せず、次第に聴力低下、閉塞性気管支炎を認めたため、11歳時にHLAハプロ致 (4/6) の母からドナー由来CMV抗原特異的CTLを培養、凍結保存しておき造血幹細胞移植を行った。移植前よりホスカルネットでCMV感染予防を行っていたが、移植後早期より血中CMV抗原とDNAが陽性化したため、day 28よりCTLの静脈内投与を開始した。CTLの4回投与後には、患者体内のCMV特異的テトラマー陽性CTLの増加とともに、血中CMV抗原およびDNAの陰性化を確認し (day81)、以後は血中CMV抗原およびDNAは陽性化していない。しかし、血中からCMVは消失したにもかかわらず、意識レベル低下と頭部MRIにて特徴的な所見を認め、髄液中CMV-DNAが90,600 copies/mlであったことから、CMV脳室炎と診断した。CTLの静脈内投与を再開し、ホスカルネットをシドフォビルに変更、脳室シャント術による脳室内減圧を実施することで。Day159には髄液中CMV-DNAは207 copies/mlに減少した。しかし、Day162より痙攣が出現し、髄液中CMV-DNAは2,356 copies/mlに上昇し、脳室炎の悪化がみられた。そこで、当院倫理委員会の承認のもと、day188よりCTLの髄腔内投与を開始した。Day212の髄液中CMV-DNAは94 copies/mlに減少したが、4回のCTLの髄腔内投与でも完全なウイルスDNAの消失は得られていない。しかし、臨床的には簡単な会話が可能となり、意識レベルは徐々に改善している。【考案】造血幹細胞移植後の脳室炎は極めて稀であり、かつ予後不良である。これまで報告のある18例はのうち、救命できたのは1例のみである。これまで、世界的にもウイルス特異的CTLを髄腔内投与された報告は見られないが、造血細胞移植後に中枢神経再発白血病に対してドナーリンパ球を髄腔内投与された報告は4例に計20回輸注され、副作用を認めていない。ウイルス特異的CTL髄腔内投与は、現時点は副作用もなく一定の効果が見られており、本症の予後を考慮すれば、試みるべき治療法と考えられる。

「同種移植後の再発白血病への細胞治療法の開発」

赤塚美樹（藤田保健衛生大学医学部血液内科、愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部）

研究協力者：赤堀 泰（藤田保健衛生大学医学部・総合医科学研究所免疫学）

【背景】同種造血細胞移植後の再発は主要な死因の一つであり、これを減らすことを目的として様々な方法が試みられている。我々の移植後再発予防および治療を行うマイナー抗原ペプチドワクチンの臨床試験は7例まで投与を終了したが、Overtな再発期でのワクチン接種の3例は全例PDであった。ワクチンの欠点は、特異的CTLの誘導に時間を要することであり、抗原特異的T細胞による養子免疫療法による大量のT細胞輸注が重要と考えられる。昨年度は我々が同定したACC-1^Y（全移植例の約11%が適応）を認識するT細胞受容体（TCR）をエフェクター細胞にレトロウイルスベクターにて遺伝子導入し、遺伝子導入効率、細胞傷害性、*in vitro*における機能発揮について研究を行ってきたが、ウイルスタイターが低いことと、遺伝子発現効率が十分でない問題点があった。ウイルスタイターを上げるベクターの改良にメドが立った。

【目的】本年度は、①臨床応用に向けて安定して高タイターウイルスを産生できるクローン化細胞株の樹立、②対象を増やすためにHLA-A*24:02拘束性ACC-1C特異的T細胞とHLA-A*02:01/06拘束性HA-1特異的T細胞からTCR α ・ β 遺伝子をクローニングして、改良ベクターに組み込む。なお、HLA-A*24:02拘束性ACC-1C特異的T細胞は*in-frame*のTCR α を2本持つことが昨年度判明したため、双方をクローニングして正しい方を選ぶ。

これに加え、③HLA分子に提示されたマイナー抗原を認識する抗体を作成し、抗体療法の可能性を検討する。

【方法】①は、これまでの一過性発現によるウイルス産生から、レトロウイルスベクターによる遺伝子治療に使われているPG13という細胞にウイルスを感染させてプロウイルスにしたのち、限界希釈法にてクローンを複数個得る。ついで高タイターのウイルス上清を産生するクローンをPCRでスクリーニングし、安定したクローンを作る。これを健康人のT細胞に感染させて細胞傷害性試験を行う。②は①の方法をそのまま転用できる。③はファージディスプレイで取得されたHLA-A2/HA-1Hに反応性の単鎖抗体をHLA-A2/HA-1Hテトラマーとコントロールテトラ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る。次のステップとしてHLA-A2/HA-1Hには反応するが、HLA-A2/HA-1Rには反応しない特異性の高いクローンを選択する。さらにこれら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、弱い場合には親和性の向上を行う。有望な単鎖抗体が得られた場合、これにヒンジと定常部位をつけた上で、HLA-A*02:01陽性HA-1H陽性の細胞に対してADCC活性などが出るか検討する。不十分な場合は単鎖抗体の軽鎖の末端にCD28およびCD3と鎖を結合したChimeric antigen receptor (CAR)を合成し、レトロウイルスベクターでT細胞に導入し、HA-1H陽性、もしくはHA-1R陽性細胞に対する反性を検討する。最終的に白血病細胞に対する傷害活性を*in vitro*, *in vivo*で評価する。

【今後の展望】MHCに提示されたエピトープを認識する抗体の報告はあるが、マイナー抗原のエピトープは細胞あたり10コピー前後と低いいため、少なくとも通常のフローサイトメトリーでは検出できない可能性がある。このためADCC活性など、機能面での評価を行う必要がある。

「骨髄内臍帯血移植療法の開発」

名古屋大学医学部附属病院 血液内科

村田 誠

臍帯血移植における生着率の向上を目指して、解凍した臍帯血を骨髄内に輸注する移植法が国内外で試みられている。この移植法は手技が簡便でかつ費用が安価なこと、また先行する国内外の試験で良好な生着率が得られていることから期待されている。

我々は、骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の適応でありながら、骨髄または末梢血幹細胞提供ドナーが得られない成人血液悪性疾患患者を対象として、骨髄内臍帯血移植の臨床試験（P-I）を実施している。

当初は単施設で開始したが、厚生労働省から本試験は「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の対象には該当しないとの判断を得て、その後多施設共同研究へ変更した。これまでに金沢大学、岡山大学、新潟大学、北海道大学各施設の倫理委員会で承認が得られている。尚、骨髄内輸注に伴う重篤な合併症は1件も発生していない。

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

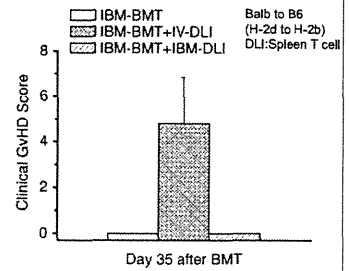
骨髄内骨髄移植の技術的諸問題の解決に向けて

兵庫医科大学 内科学講座血液内科
相馬俊裕、池亀和博、小川啓泰

2012. 7. 8

Rationale for IBM-BMT より安全なハプロ移植を目指して

- GVHD
 - 骨髄内は免疫抑制的
 - 免疫抑制剤の減量が可能だろう
- ドナー負担の軽減
 - 自己血貯血不要に
- GVL
 - モデル構築中



Ikehara et al. STEMCELLS 2007;25:1595-1601

採取の問題

- 静水圧と陰圧の組み合わせでは十分な量が得られなかった
 - 採取内容もかなり赤血球に偏っていた。
 - ヒト腸骨における圧力分布などの解析が不十分
- 従来法(吸引法)の改善を図る
 - 従来法で採取した骨髄を骨髄内移植に適した量に濃縮する

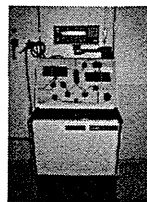
骨髄処理の諸問題

- 通常採取では大量の赤血球が同時に採取される
 - 減量方法
 - 臍帯血RBC 沈降法に準じる方法
 - 容量が多すぎて不適当
 - 末梢血幹細胞採取装置を用いた濃縮方法
 - 十分なHb減量ができる
 - » 最終容量が大きい
 - » 少量採取では追加赤血球が必要
 - 新規濃縮装置の導入

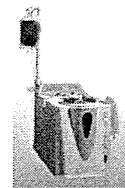
骨髄処理の目的と手段

- A→O型移植なので血球を除く
 - Spectra で濃縮し異型赤血球を減らす
 - 洗浄O型赤血球と交換する
- 濃縮し、移植場所1カ所あたり5mlの量にする
 - SEPAXで20mlまで濃縮
- 移植骨髄濃度を正常2倍以下程度にする
 - Spectraで好中球を除き細胞数を減らす

濃縮装置

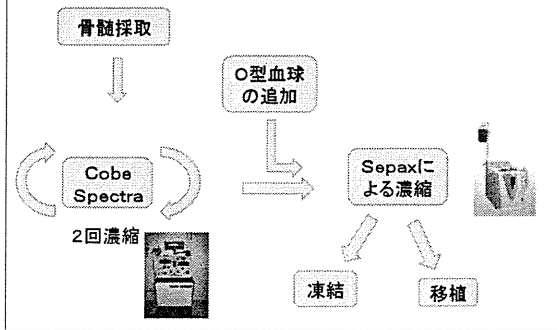


Cobe spectra

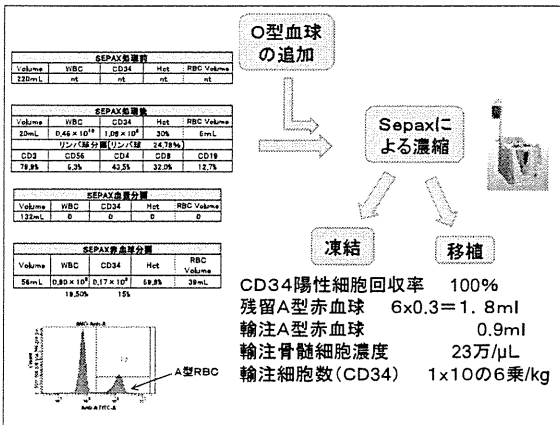
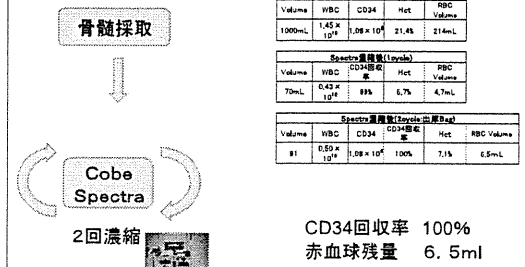


Sepax CB concentration

骨髓濃縮の方法



骨髓濃縮の結果



H.A. 65歳F, AML(M7), IF, 血液型 O(+), 体重 54kg

移植前 BM blast 39.2% ドナー嬢 (O/3), 血液型 A(+)

High titer donor-specific antibody (DSA) (HLA抗体) x 5400

前処置: FluMeThy(2.5)TBI(3Gy) GVH予防: CSP+MMF(30 mg/kg)

採取有核細胞数: 2.9×10^8 /kg: Spectraで濃縮した後、SEPAXで処理し、
final volume: 20 ml: 半分凍結 → 10 mlを骨髓内へinjection

骨髓内移植細胞 NCC: 0.23×10^6 /10 ml = 0.43×10^8 /kg

5.4×10^7 CD34⁺ cells: /10 ml = 1.05×10^8 /kg

RBC 3 ml/10 ml 8.85×10^6 CD3⁺ cells/kg

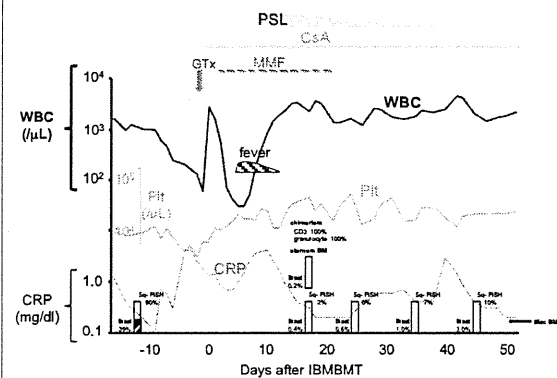
両側の腸骨の1か所ずつに、5 mlをinjection

On day 56 Neu > 500 day 10 PLT > 2万 未

GVHD (-) DSA titer x128に低下 (day 40)

BM CR RBCの回復遅延 (抗A抗体 x1-4)

IBMBMT case Clinical course



Summary

1. 通常の吸引法により、採取した骨髓液 1Lを、SpectraとSEPAXを用いて、赤血球を除き、最終volume 20 mlにまで、濃縮できた。
2. CD34⁺細胞の回収率は、ほぼ100%であった。
3. 骨髓内へinjectionした、RBC volumeはtotalで3 ml(その70%はO(+):患者血型)であった。
4. 移植細胞は、 0.43×10^8 NCC/kg, 1.05×10^6 CD34⁺ cells/kg, 8.85×10^6 CD3⁺ cells/kgであった。
5. 骨髓内移植は、安全に施行可能であった。
6. 高齢、非寛解期、DSA high titer、GVH 0Ag/HVG 3 Agと、極めて不利な条件であるにもかかわらず、生着は極めて良好(Neu > 500 on day 10)であった。
7. 血小板、赤血球の回復遅延は、残存するDSAと抗A抗体が原因か?
8. 今後、症例を重ねて、骨髓内骨髓移植の安全性、有用性を検討する。

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”

関西医科大学内科学第一講座、同附属枚方病院血液腫瘍内科 石井一慶、野村昌作

関西医科大学整形外科科学講座 串田剛俊、飯田寛和

関西医科大学共同研究講座幹細胞異常症学 池原 進

これまでの経緯（池原）

- 1) 1985年：SLEのようなAutoimmune diseases (AIDs)が、allo-BMTで治療可能であることをマウスで発見する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:2483-2487, 1985. Ikehara S, et al.)。
- 2) 1990年：AIDsがStem Cell Disorders (SCDs)であることを証明する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:8341-8344, 1990. Ikehara S, et al.)。
- 3) 1989年：mild condition regimenを用いた場合には長期間の観察では、AIDsが再発してくることをキメリズム抵抗性のMRL/lprマウスを用いて証明する (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:3306-3310, 1989. Ikehara S, et al.)
- 4) 1997年：造血幹細胞(HSC)と間葉系幹細胞(MSC)の間にはMHCのclass I restrictionが存在する (Blood 89:49-54, 1997. Hashimoto F, et al.)。
- 5) 2001年：これらの結果から、allo-BMTの際、donorのMSCも同時に移植する必要があることが判明し、donorのMSCを生着させるには、IBM-BMTが最も優れていることをMRL/lprマウスを用いて証明する (Blood 97:3292-3299, 2001. Kushida T et al.)。
- 6) 2002年：ヒトへの応用を視野に入れて、サルの実験を開始し、従来の骨髄細胞の採取方法(吸引法：AM)よりも灌流法(PM)の方が優れていることを証明する (Stem Cells 20:155-162, 2002. Kushida T et al.)。

- 7) これまでのサルの実験で安全性と有効性が証明されたので、両大学の倫理委員会の承認の下に、PM+IBM-BMT を 2004 年に実施した。
中国の広州の大学病院との共同研究で、重症の地中海貧血の女兒（6 才）に父親（37 才）の骨髄を移植した（2 locus 不一致）。mild な condition regimens のため、生着が遅れたが、DLI と ATG の投与により、移植後 55 日には、99%以上が donor 由来の造血系の細胞（T 細胞も含む）に置換した。残念なことには、夜中に気道が喀痰のため閉塞し、患者さんは、突然死された。GvHD も HvGR の所見も認められなかった。肺炎のような炎症所見もみられなかった。
- 8) 2006 年:日本では、poor mobilizer の男性（58 才）から灌流法で骨髄細胞を採取した。

臨床サイドからみたこれまでの問題点（石井）

1. 安全性は確保されたが、有用性は？

1.1 データにばらつきがある

技術的に困難が伴うのであれば、実地臨床として普及しにくい。

簡便でかつ、画一的な方法の確立は可能か？

1.2 細胞数が少ない

1.2.1 NCC

吸引法に比して 1/10。RBC 除去後でも 1/3。

1.2.2 CD34⁺

吸引法に比して 1/10 以下。

1.3 T 細胞の混入が少ない

GvHD には好ましいが、生着不全は？中国の症例では DLI+ATG 要した。

臨床サイドからみたこれから明らかにすべき問題点（石井）

1. 灌流法で採取細胞数が少ない

技術的な問題なのか？整形外科医全面的 back up のもと、採取する。

それでも少なければ、

CFU-C が高いことは好ましいが、適切な細胞数を同定する必要がある。

骨髄内骨髄移植を検討する

2. T 細胞の混入が少ない

前処置に ATG 必要か？長期的に GVL 効果は？

7月8日(日)
午後

平成24年度厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
「成人T細胞性白血病(ATL)の根治を目指した細胞療法の確立およびそのHTLV-1
抑制メカニズムの解明に関する研究」 鵜池班(H22-がん臨床-一般-028)

平成24年度移植合同班会議 平成24年7月8日午後1時30分～午後2時

1. 鵜池班の概要

鵜池 直弘 （九州がんセンター 血液内科）

2. Tax 特異的樹状細胞ワクチン療法仮登録第1例目