

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

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

研究代表者：高橋 聡

東京大学医科学研究所・准教授

研究分担者：

安藤 潔 東海大学・教授
岩間 厚志 千葉大学大学院・教授
大津 真 東京大学医科学研究所・
特任准教授
高梨 美乃子 日本赤十字社関東甲信越ブ
ック血液センター・製剤一部長
谷口 修一 虎の門病院血液内科・部長
服部 浩一 東京大学医科学研究・
特任准教授
宮田 敏男 東北大学大学院・教授
宮村 耕一 名古屋第一赤十字病院血液内
科・部長
森尾 友宏 東京医科歯科大学・准教授
山口 拓洋 東北大学大学院・教授

研究協力者・

小川 啓恭 兵庫医科大学・教授
岡田 昌也 兵庫医科大学・講師
小島 勢二 名古屋大学大学院・教授
高橋 義行 名古屋大学大学院・講師
中内 啓光 東京大学医科学研究所・
教授
長村 文孝 東京大学医科学研究所・
教授
藤田 由利子 東京大学医科学研究所・
特任研究員
山本 久史 虎の門病院・医員

A. 研究目的

臍帯血移植の安全性・成績向上と適応拡大を目指して移植合併症に対する新たな治療法の臨床開発と臍帯血バンク整備の支援を行う。特に、臍帯血移植における最も深刻な合併症である生着不全、ウイルス感染症、GVHDについてのこれまでの基盤研究を継続しつつ臨床研究に発展させる。さらに10年にわたる臍帯血バンク事業の問題点を総括し、骨髄バンクとの連携も含めての将来構想を考案する。

B. 方法

1. 線維素溶解系（線溶系）の作用を介した生着・造血回復促進法の開発：
線溶系を負に制御する PAI-1 を阻害する新規低分子化合物を開発し、造血細胞移植の動物モデルを用いて、造血回復・生着過程におけるその効果を明らかにする。
2. 新規低分子化合物による造血幹細胞増幅
これまで複数同定してきた臍帯血造血幹細胞の体外増幅効果を持つ化合物について、合成展開による最適化とその評価を行う。
3. 「アポトーシスシグナル遮断を介した造血幹細胞保護」による移植後造血回復促進法の開発
移植造血幹細胞がさらされる前処置直後の炎症環境で造血再構築の遅延につながるとの仮説をマウスモデルを用いて検証し、その作用点に抑制的に働く処置法を同定し確立する。
4. HLA 近似同種ウイルス特異的免疫細胞バンクの開発：
米国ベイラー医科大学と連携をとり、日本人に多い HLA での CMV、EBV、アデノウイルス

ス、BKV、HHV6 特異的細胞傷害性 T 細胞ラインを作成し、移植後患者が感染症を発症した際の治療用細胞製剤として利用するための SOP や文書体系を構築する。

5. 凝固・線溶系に作用する新規分子標的製剤による GVHD 治療法の開発：

凝固・線溶系因子プラスミンの新規阻害剤 Y0-2 は、炎症性サイトカイン分泌を抑制する。GVHD モデルマウスを用い、Y0-2 の投与効果を確認する。

6. 移植成績の収集・解析と臨床試験の立案・遂行、および臍帯血バンクの活性化：

日本造血細胞移植学会の一元化データベースおよび当該登録システムの確立に関する研究組織（厚労科研・熱田班）と連携をとり、移植データの統計解析を行う。新たな臨床研究を立案や「骨髄非破壊的前処置法を用いた骨髄内への移植法」などの臨床試験の実施を支援する。また、日本さい帯血バンクネットワークにおける臍帯血グラフトの品質向上・均一化に向けた議論を進める。さらには、臍帯血・骨髄バンクの連携関係の構築を目指す。

C. 結果

臍帯血移植における合併症（生着不全、GVHD）克服を目指した凝固・線溶系を標的とした新規治療法の開発に関しては、線溶系を制御する新規低分子化合物である PAI-1 阻害剤による移植細胞の生着促進作用（安藤・宮田）、およびプラスミン阻害剤である Y0-2 による GVHD 病変の改善作用（服部・宮田）について、それぞれの動物モデルにおいて有効性を明らかにした。前者においては、PAI-1 阻害剤の経口投与群では対照群に比べて移植後ドナー由来の造血回復が骨髄・末梢血ともに

促進されることが明らかになった（安藤）。後者に関しては臍帯血移植後の GVHD 発症患者血液検体において発症初期からその病勢に応じて血液凝固・線溶系の亢進が認められ、これに伴って GVHD の病態形成に関与する各種生体分子の細胞外ドメイン分泌を制御する MMP の活性化と各種炎症性サイトカインの血中濃度の上昇が誘導されることが明らかになり、この薬剤の作用点が GVHD 治療に重要であることが確認された（服部）。

また、臍帯血中の造血幹細胞の増幅への応用に向けて造血幹細胞の新規増幅法に有効であることが判明した低分子化合物 MISK303 の造血幹細胞に対する活性を評価するために、無血清培養条件でサイトカイン（SCF+TPO）を加えた培養系における MISK303 による造血幹細胞の増幅効果を明らかにした（岩間）。「アポトーシスシグナル遮断を介した造血幹細胞保護」法の開発に関しては、まず、移植前処置に用いられている放射線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することを動物モデルで明らかにした。さらに TNF- α 刺激により造血幹細胞中に産生される活性酸素（ROS）が骨髄再構築能低下の原因であることを証明し、移植前に TNF- α -ROS 産生シグナル経路の抑制ペプチドの 2 時間処理により、移植後の造血幹細胞再構築能が回復した（大津）。

多ウイルス特異的 T 細胞療法の開発に関しては、MTA を締結したうえでベイラー医科大学において開発された複数ウイルス特異的 CTL 療法の技術を導入し検証した。ドナー-PBMC を CMV 抗原（IE-1, pp65）、EBV 抗原（BZLF1, EBNA1, LMP2）、AdV 抗原（Hexon, Penton）の peptide mixture で刺激した後に、サイトカイン（IL4 + IL7）添加 CTL 培養液で約 10 日培養し、細胞数、表面マーカー、抗原特異的

IFN γ 産生能等について解析したところ、刺激後培養細胞はCD3陽性細胞が大部分を占め、CD8、CD4両分画が誘導され、セントラルメモリー細胞の維持、増幅を認めた。調製した細胞は、全てのウイルス抗原に対しIFN γ を産生し、これらの特異的T細胞はPBMCと比較して1-3log増幅した(森尾)。

臨床試験としては、虎の門病院での臍帯血ミニ移植における後方視的解析結果を基に、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り(谷口・山本)、「骨髄内へ移植する臍帯血ミニ移植」第I相試験に引き続いて有効性の検討を目的とした第II相試験が兵庫医科大学の主導のもとで多施設共同研究として実施されている(小川・岡田)。さらには名古屋グループにおける成人を対象とした標準的強度の前処置を用いた臍帯血移植の臨床試験も進行中である(宮村)。また、今後の臨床試験の解析に必要な統計処理法の至適化(山口)および規制対応への考え方(長村)についてもグループ内での討議を進めた。さらには、臍帯血バンクの問題点について、国際的な情報収集を進めると共に将来構想の確立に向けた議論を重ねた(高梨)。

D. 考察

臍帯血移植は、骨髄移植と並んで悪性疾患を主とした様々な送血器疾患に対する治療法として広く普及してきたが、依然として移植後合併症の発症率が高い傾向にあるため、早期の移植がより良好な臨床成績が得られるにもかかわらず、ギリギリまで移植時期が延ばされる、という背反するジレンマに陥っている。移植前処置法や移植細胞ルート改良などの臨床試験を進めることにより、既存の方法を用いながら、その適正化を目指している。一方で、患者および移植医に最も強いイン

パクトを持って移植適応の決定に影響をもたらす合併症である拒絶に対して、当研究グループでは幹細胞増幅・保護・骨髄への生着促進など様々なアプローチで移植細胞の生着率を向上させる方法の開発を進めている。動物モデル実験の段階では有望な結果が得られており、今後は移植後の造血再構築促進効果を確認するための臨床研究の早期開始を目指す。一方、より頻度の高い合併症としてウイルス感染症およびGVHDが問題となっており、そのためのQOL低下は大きな問題であるのみならず二次性生着不全の誘因となる場合もある。現在、我々が取り組んでいる第三者ドナーからの多ウイルス特異的CTL療法および新規プラスミン阻害剤によるGVHD抑制は既存の治療法とは全く異なる機序であり、臨床的有用性が強く期待される。

E. 結論

現在取り組んでいる新規治療法の開発により、臍帯血移植の安全性が高まることが強く期待される。臍帯血バンク事業の安定化のために現在の問題を解決するための具体的な将来構想の策定が必要である。

造血再生促進薬の開発に関する研究

研究分担者 安藤 潔 東海大学医学部・教授

- A. 研究目的：臍帯血は、他の造血幹細胞源と比較して移植後の造血回復が遅いこと、生着不全の頻度が高いことが欠点である。したがって、より安全で成功率の高い臍帯血移植法を確立するためには、移植初期における造血回復を可能な限り効率よく迅速に達成させる方法の確立が重要である。近年、抗がん剤などの投与により誘導される骨髄内での線維素溶解系（線溶系）造血回復に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。我々は、線溶系を負に制御する PAI-1 を阻害する新規低分子化合物を開発した。本研究では、新規 PAI-1 阻害剤の早期造血回復におよぼす効果を明らかにすることが目的である。
- B. 方法・野生型 C57BL/6 マウスに致死量放射線（9Gy）を照射し、骨髄細胞を 2.5×10^6 個経静脈的に移植した。移植当日から 5 日間、1 日 1 回の割合で新規 PAI-1 阻害剤を 1mg/kg、3mg/kg、10mg/kg のそれぞれを経口投与した。対照群には生理食塩水を経口投与した。移植後 1 週間目と 3 週間目に末梢血と骨髄細胞を回収し、細胞数や造血幹細胞の存在比率について解析した。
- C. 結果 新規 PAI-1 阻害剤投与群は、生理食塩水投与群に比べて c-kit などの造血因子の発現量 tPA などの線溶系因子依存的に高く、ドナー由来の白血球や血小板の有意に高い回復が認められた。また、総骨髄細胞数も新規 PAI-1 阻害剤投与によって迅速な回復が誘導されていた。さらに、生理食塩水投与群と比べて、TM5509 投与群の方が造血幹細胞の存在比率と細胞数共に有意に増加していた。二次移植実験の結果、自己複製能の維持にも有効であった。
- D. 考察 新規 PAI-1 阻害剤は tPA 主導の造血再生因子の発現を誘導し、移植後の迅速で効率よい造血回復反応が誘導されるということを明らかにした。また、新規 PAI-1 阻害剤の投与によって誘導される造血回復の促進効果は、成熟造血細胞の回復のみならず、造血幹細胞の増幅も促進しているということが明らかとなった。
- E. 結論・新規 PAI-1 阻害剤は造血再生の促進に有効である。

新規造血幹細胞増幅法の開発

研究分担者 岩間 厚志 千葉大学大学院医学研究院・教授

A. 研究目的

本研究では臍帯血造血幹細胞を用いた再生医療の改良を目的とする。造血幹細胞の増幅が可能となれば臍帯血を用いた造血幹細胞移植を安全に行うことが可能であり、また適応の拡大につながるものと期待している。

B. 方法

分担者は、臍帯血造血幹細胞の体外増幅に効果のある化合物を複数同定してきた。これらの化合物を臨床応用につながるために、本研究においては以下の点に重点を置いて研究を行う。①合成展開による化合物の最適化とその評価、②培養系ならびに免疫不全マウスへの移植を用いた化合物による造血幹細胞増幅率の評価、③最適化した化合物による造血幹細胞増幅法の標準プロトコルの作製。これらの研究を通して、低分子化合物を用いた造血幹細胞増幅法を確立し、前臨床研究の終了を目指す。

C. 結果

以前のスクリーニングから得られた臍帯血造血幹細胞の増幅に有効と考えられる低分子化合物 MISK303 の造血幹細胞に対する活性を評価した。無血清培養条件でサイトカインとして SCF と TPO を加えて 7 日間培養したところ、MISK303 添加群において特に CD34+造血前駆細胞の増加は認められなかったが、CD34+CD38-造血幹細胞は未添加群の約 2 倍に増加することが確認された。また、大型のコロニーを形成する細胞も約 2 倍に増加していた。次に、上記の培養条件で 2 週間培養した細胞を免疫不全マウスに移植した。移植細胞数を限外希釈して MISK303 による造血幹細胞の増幅活性を評価したところ、機能的な造血幹細胞が約 3 倍に増加していることが確認された。

D. 考察

以上の結果から、新規点分子化合物 MISK303 は体外培養の系において造血幹細胞を増幅する活性が確認された。本化合物は未だ合成展開による化合物の最適化が終了しておらず、現在も合成展開産物の活性を MISK303 と比較検討中である。今後さらに効果のある化合物が得られる可能性が期待される。上半期までには合成展開を終了し、化合物の最適化を終了したい。また、MISK303 の作用標的分子は未だ同定されておらず、この点も検証が必要である。

E 結論

臍帯血造血幹細胞の増幅に有効と考えられる低分子化合物 MISK303 の造血幹細胞に対する活性を評価し、*in vitro* の培養系と免疫不全マウスへの移植の系においてその有効性を確認した。現在は、合成展開による化合物の最適化を推進中である。上半期までには合成展開による化合物の最適化を終了し、最適化した化合物による造血幹細胞増幅法の標準プロトコルの作製の準備に移行したい。

TNF- α シグナル遮断法を用いた造血幹細胞保護による移植後造血回復促進法の開発

研究分担者 大津 真 東京大学医科学研究所・特任准教授
研究協力者 中内 啓光 東京大学医科学研究所・教授

A 目的: 移植された造血幹細胞が前処置直後の骨髄中で炎症環境にさらされることで、造血再構築の遅延や強固性の損失につながるとの仮説を実験的に検証する。さらに造血幹細胞をその原因から保護することが造血再構築に有利に働くことを示し、臨床応用につなげることを目的とする。

B 方法: マウス骨髄中に放射線照射後、有意に増加する液性因子を同定する。それらのマウス造血幹前駆細胞に対する影響を *in vitro* および *in vivo* において解析し、機能低下を指標に候補因子の絞込みを行う。機能低下に結びつく分子機構を探索して検証し、その作用点に抑制的に働く処置法を同定し確立する。同定した方法により「保護」された造血幹・前駆細胞を実際に移植し、炎症環境下の骨髄中で機能温存されるかについて検討する。得られた成果をヒト造血細胞に応用し、「幹細胞保護」による移植改善法を確立する。

C 結果: 計画に従い、炎症骨髄環境で造血幹細胞機能に対し負に影響する候補因子として TNF- α を同定した。In vitro で TNF- α は、用量依存的にマウス造血幹細胞からのコロニー形成を抑制した。また、独自の実験系により、骨髄腔内でも TNF- α が短期間の暴露により移植造血幹細胞の機能に負に制御することが示された。観察された機能低下に関連する分子機構として、TNF- α 刺激から RfK を介して NADPH oxidase の活性化に至るシグナル伝達経路に着目した。他の細胞種を用いて、このシグナル伝達により細胞内活性酸素 (ROS) レベルの上昇が誘導されることが証明されていたが、マウス造血幹前駆細胞においても TNF- α 刺激が用量依存的に ROS 産生を誘導することを確認した。当該伝達経路を特異的に遮断するペプチドを合成し、現在、ROS に関連する種々のインヒビターとの比較において、TNF- α 刺激下の造血幹前駆細胞への作用を検討中である。

D 考察: TNF- α の造血細胞への影響は、細胞系譜、分化段階等により正負どちらも報告されており混沌としている。分担者らの解析結果は、少なくとも造血幹細胞のレベルでの再構築能への負の影響を示唆している。一方で、致死量放射線照射による骨髄前処置が、髄腔内に炎症性変化を惹起し、その中には TNF- α 産生の増加が含まれることも明らかとなった。独自に確立した生体内暴露モデルと、TNF- α ノックアウトマウスの使用によって、A の仮説の妥当性を指示する実験結果が蓄積しているが、実際の生体内での影響についての証明は、予期される抑制からの遮断効果の検証をもつて行う必要があり、さらなる移植実験、ヒト細胞を用いた検討を継続することが肝要である。

E 結論: 現在までに A の作業仮説の妥当性が検証されつつあり、TNF- α による造血幹・前駆細胞の機能低下を生体内で「保護」する新規移植法の実現可能性が示唆された。

臍帯血バンクの課題と将来構想

研究分担者 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・製剤一部長

A. 目的：

2011年、本邦の臍帯血移植は年間1100例となり、非血縁者間造血細胞移植の48%が臍帯血移植であった。これまで臍帯血バンクの運営は多くの問題を抱え、近年3バンクが活動を停止した。将来にわたって安定的な臍帯血の供給を実現するために、現在の臍帯血バンクの課題を整理する。

B. 方法：

以下の論点について情報を収集した (1) 臍帯血バンクの規模、(2) 臍帯血バンクの組織、(3) 臍帯血バンクの集約と採取協力施設の広域化、(4) 臍帯血採取施設への支援、(5) 臍帯血の品質管理、(6) 国際化。

C. 結果：

(1) 本邦は世界の他地域に比べて HLA 型が偏っており、約 2000 本保存で HLA-A, B, DR 座 4/6 適合の臍帯血が約 100%の症例で得られ、約 10,000 本保存で 5/6 適合の臍帯血が約 96%の症例で得られ、約 300,000 本保存で 6/6 適合の臍帯血が約 87%の症例で得られると計算された。同時に、本邦の臍帯血移植患者は大多数が成人である。(2) 臍帯血バンク活動自体は利潤を生む構造にはなっておらず、事業継続上の課題があり近年に 3 カ所の臍帯血バンクが事業を停止するに至った。母体組織が事業の位置づけを明確にすれば、責任体制等が充実する。(3) 臍帯血バンクは比較的人口密度の高い都市圏に位置し、臍帯血採取施設は全国に 100 程しかない。近年 3 バンクが活動を停止したが、それに伴い採取施設まで失う事は、本邦全体の臍帯血公開数を保つ上では不利である。神奈川臍帯血バンクおよび宮城臍帯血バンクの採取施設は日本赤十字社関東甲信越さい帯血バンクへと引き継がれたが、効率と採取施設拡大のバランスについての評価を継続して行う必要がある。(4) 全国に約 100 カ所の採取協力施設しかなく、数万人の妊婦さんを対象とする協力推進のための広報を大規模に行う事はできない状況がある。上記(1)のために保存細胞数基準を上げると、採取現場のモチベーション維持はより困難になると推測される。(5) 本邦の公的臍帯血バンクは、長年にわたり凍結臍帯血検体を配布して多施設にて同一検査項目の結果をまとめてきた。多項目自動血球分析装置の配備、CD34 陽性細胞算定法の統一 (ISCT/ ISHAGE 法)、コロニーアッセイ培地の統一などに加え、施設数の減少もあり、本邦の検査結果はかなり安定してきたと考えられる。今年度の多施設検定でも CV 値は許容できる結果であった。(6) 米国は輸入する臍帯血の製造バンクは国際的な認証を得ているもの、という条件を課した。これまでのところ国際的な (欧米の) 認証制度を活用するかについての議論はされていない。

D. 考察：

(1) 成人男性に使用可能な細胞数の臍帯血を最低 2,000、できれば 10,000 を公開できる、というのが第一目標である。小児については、多少細胞数が低くても保存公開し、HLA 5/6 適合以上を目標としてバンクサイズを考える必要がある。(2) 2012 年度より診療報酬から臍帯血バンクへ支払われる費用が見直されているので、事業運営の継続性については今後の再評価が必要である。「造血幹細胞適合検索サービス」は発展させる事により非血縁者間移植を希望する人への single point of access となる可能性がある。(3) 提供者の裾野の拡大は臍帯血バンクの課題であるが、採取施設の拡大は搬送体制によって制限されている。時間、搬送費用、広域化の意義についての議論が必要であろう。(4) 採取協力施設の活性化のためには広報活動が必須である。採血推進活動を大きく転換する必要がある。(5) 品質には組織の責任体制、機器管理、衛生管理など多くの要素が含まれる。新たな法整備のもとでは、minimum requirement を設定し、それを将来よりよいものにしていく必要がある。(6) 現状の管理基準には、本邦独自のものもあり、将来の臍帯血の国際的な流通にあたっては障害となる可能性もある。

E. 結論：

2012年9月には初めて造血幹細胞移植のための法律が制定公布され、本邦の臍帯血バンクを巡る状況は大きな転換期を迎えている。臍帯血バンク規模の達成に向けて各方面の協力を得たい。また品質管理においては海外の情報を収集しつつ議論する事が必要である。

臍帯血ミニ移植の至適前処置に関する研究

研究分担者 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
研究協力者 山本久史 国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液内科・医員

A 目的 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 ら ; BBMT 2008, Takagi ら ; BJH 2009)。MMFの導入によるGVHD予防法の強化により、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。本研究の目的は、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ことである。

B 方法 当院で施行したFlu/i. v Buを基本とする移植前処置を用いた臍帯血移植62例を後方視的に解析した。本研究は当院の医学研究倫理審査委員会の承認のもと実施した。

C 結果 対象62例の年齢中央値は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、57例(92%)が非寛解期移植であった。また16例(26%)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を検証するため多種な前処置を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%, 29%, 41%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; 54%, $P=0.03$)。多変量解析では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, 95% CI 0.81-0.98, $P=0.01$)。2年全生存率/無病生存率は、FB4群において58%/41%、FB2-3群において31%/19%と、有意にFB4群で優れていた($P=0.03$)。

D 考察 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 UMIN000002426, UMIN000004211/000004213)。

E 結語 FB4-based regimenは、高齢者ハイリスク臍帯血移植において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。

凝固・線溶系を介した新規 GVHD 治療法の開発

研究分担者 服部浩一 東京大学医科学研究所・特任准教授

A. 研究目的：

臍帯血移植の合併症の一つである移植片対宿主病(GVHD)は、移植患者の quality of life と生命予後に直結する難治疾患群であり、その病態解明と治療法の開発は、幹細胞移植成立上の最重要課題に挙げられている。研究者らは、これまでの研究で、GVHD の発症と臓器障害に関与する多くの炎症性サイトカインのプロセッシングが、生体内のマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性化に依存しており、さらに MMP 活性は、血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミンの生成によって制御されていることを明らかにした。本研究では、GVHD 病態における線溶系因子群の機能解析とこれを基礎とした新規分子療法の開発を目的とする。

B. 方法

1. C57BL/6 マウスの脾細胞を(C57BL/6/BALB/c)F1 へと輸注し、急性 GVHD のモデルマウスを作製する。ここに線溶系阻害剤 YO-2 を連日投与する群とその溶媒投与群を作製し、血液、脾臓、骨髄等の病理組織標本の作製とその免疫特殊染色、各種組織細胞表面マーカーの発現、血中の各種 GVHD 関連サイトカイン濃度、MMP、線溶系酵素活性等を精査し、急性 GVHD の病態における線溶系の機能解析、また線溶系を標的とした GVHD の分子療法の有効性を探る。
2. 各種幹細胞移植後で急性 GVHD と診断された患者について、経時的に血中の一般検査所見、各種サイトカイン濃度、MMP、線溶系酵素活性、血液・組織中の各種組織細胞表面マーカーの発現等を精査し、急性 GVHD の重症度、臨床所見と線溶系との関連性を明らかにする。

C. 結果：

今年度の研究で、急性GVHD患者の血液中において、発症初期からその病勢に応じて、血液凝固・線溶系の亢進が認められ、これに伴って、GVHDの病態形成に関与する各種生体分子の細胞外ドメイン分泌を制御するMMPの活性化とTNF- α 、Fas-ligandやインターロイキン受容体等の炎症性サイトカインの血中濃度の上昇が誘導されることを明らかにした。さらに、F1ハイブリッドのマウスモデルにおける急性及び慢性GVHDの誘導に成功し、急性GVHDマウスモデルの血液中においても同様のMMPの活性化とサイトカイン血中濃度増加が認められること、さらにMMP阻害剤、加えてMMP活性を上流から制御する線溶系因子プラスミンの活性阻害剤の投与により、GVHDによって形成される各種臓器中の組織病変、脾臓、末梢血中のリンパ球構成、症状・重症度が、有意に改善することを明らかにした。

D. 考察

急性GVHDの病態において、血液凝固・線溶系因子の動態がMMP活性、炎症性サイトカイン分泌を通じ、その重症度や病勢に深く関与していることが示唆された。またプラスミン阻害剤による線溶系活性の抑制は、MMP活性を起点とした生体の組織傷害機構を制御する可能性を有しており、新しいタイプの抗炎症、免疫制御療法としての期待も担っている。MMP阻害剤は、欧米での臨床試験で明らかとなったその深刻な副作用から、臨床応用の道が事実上閉ざされた状況になっており、本研究は、これに代わる新たな分子標的薬開発の基礎研究としても重要な役割を果すものと考えている。

E. 結論：

血液凝固・線溶系因子の活性は、急性GVHD病態の形成に関与しており、プラスミン阻害剤による線溶系の活性抑制は、GVHDの新たな治療法として期待出来る。

凝固・線溶系を介した造血回復促進法および組織再生促進法の開発 に関する研究

研究分担者 宮田敏男 東北大学大学院・教授

A. 目的

臍帯血移植をはじめとする造血幹細胞移植療法においては、移植前処置による傷害、そして移植後組織の円滑な組織再生プロセスが治療の成否を左右する。近年、末梢壊死組織の再生過程において、マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性化に伴う組織再生に至適な微小環境形成の重要性が示唆された。また最近、血液線維素溶解系(線溶系)因子群によるMMPの活性制御機構が解明された。本研究では線溶系を起点とした血管新生機構の解明を主目的とし、これを基礎とした組織再生促進療法の開発までをその目的の範疇とする。

B. 方法

- 1) 各種MMP及びプラスミノゲン(P1g)遺伝子欠損及びその野生型マウスに組織P1g活性化因子(tPA)あるいはPA阻害因子(PAI)阻害剤(TM5275)を投与し、骨髄由来細胞の末梢組織中への動員能を評価する。また動員される細胞の性状、成熟度、さらにその過程におけるMMPないしは線溶系因子群の活性変化について、血漿中濃度、免疫組織染色等でモニターし、細胞動員機構について考察する。
- 2) 各種MMP遺伝子欠損及びその野生型マウスについて大腿動静脈結紮による末梢虚血壊死組織形成を誘導し、tPAないしはuPAの投与によりこれらの組織再生促進、機能改善効果について病理組織、超音波ドップラー等を使用し、評価すると共に、1)に関連した骨髄由来細胞の組織再生機構における機能解析を行う。
- 3) 1)、2)を基礎として臍帯血移植前処置前後、そして移植前後の患者の各種臓器組織検体中のMMPないしは線溶系因子群の活性変化、骨髄由来細胞性状と病態進展との関連性について評価検討する。

C. 結果

今年度の研究で、研究者らは壊死組織を薬剤によって再生し、機能を回復する画期的な治療法を考案し、その基礎実験に成功した。研究グループは、通常は生体内で血液凝固能の調節に関与しているプラスミンという因子が、組織中の細胞移動や血管新生因子、細胞増殖因子分泌を促進することに注目した。プラスミンは、プラスミノゲンという酵素前駆体がプラスミノゲン活性化因子(PA)により活性化されて生成する。PAI-1阻害剤(TM5275)は、出血等の副作用を呈することなく、生体内のPA産生を増加し、骨髄由来細胞動員の促進を通じて、マウス大腿動静脈の末梢に形成された壊死組織の再生、そして下肢血流と機能回復を促進した。

D. 考察

本研究結果は、生体内の組織再生の新機構と、これを最大限に活用した再生医療の新たな可能性を提示している。虚血性壊死、抗癌剤、放射線等による組織傷害に対し、tPAの組織再生促進作用が、既に同グループによって確認、報告されていることから、PAI-1阻害剤による組織再生促進は、さまざまなストレスに対する細胞・組織傷害に有効性が期待され、その応用範囲も広いことが予想される。PAI-1阻害剤-薬剤による血液線維素溶解系の制御による組織再生促進療法は、倫理面、安全面そして簡便性においても従来の方法とは一線を画し、その実現性の点でも、臨床応用への至近距離にあると考えられ、今後の再生医学の研究面でも新機軸を担う重要性・有用性を有している。

E. 結論

プラスミノゲン活性化抑制因子(PAI-1)阻害剤の投与により、虚血性壊死に陥った組織の再生を促進することに成功した。末梢組織の再生を制御する新機構を解明した。

成人難治性血液悪性腫瘍に対する非血縁者間臍帯血移植の有効性に関する研究

研究分担者 宮村耕一 名古屋第一赤十字病院・部長

A 研究目的： 再発・難治であると考えられ、同種造血幹細胞移植の適応でありながら適切なドナーが得られない成人血液悪性腫瘍患者に対して G-CSF 併用あるいは G-CSF を併用しないキロサイド (Ara-C) とエンドキサシ (CY) と全身放射線照射 (TBI) を用いた移植前治療を用いて非血縁者間臍帯血移植 (Unrelated cord blood transplantation, UCBT) を行い、その安全性・有効性を検討する。

B 方法 対象は、再発高リスク白血病であって同種造血幹細胞移植以外の他の治療では治癒や長期生存の確率が極めて低い病状であるにもかかわらず、適切な時期に適切なドナーが得られない患者とする。前治療として、骨髄球系悪性腫瘍 (AML/MDS) に対しては、現在 UCBT における骨髄破壊的前処置法として有望視されている G-CSF 併用 Ara-C+TBI+ CY を用いる。急性リンパ性白血病 (ALL) に対しては G-CSF の併用の有用性は示されていないため、G-CSF を併用しない Ara-C/CY/TBI (12Gy) を前治療法として採用する。移植後の免疫抑制療法としては短期メトトレキセートとタクロリムスを用いる。臨床第 II 相試験として、主要評価項目は移植後 Day180 時点において移植した臍帯血が生着し、生存している割合とする。

C 結果 現在、臨床試験が進行中である。予定登録者数は 60 名であり、本年度中の登録終了を目指している。なお、最終症例の移植後 2 年までを追跡観察期間としており、全症例の解析はその時点で行うことを予定している。

D 考察： 多くの移植施設では適切な非血縁骨髄ドナーが見つからなくても寛解であるうちはドナーサーチを続行し UCBT を施行しないことが多い。必然的に非寛解となって UCBT を行う場合には治療関連死亡のリスク・再発死亡のリスクが高まり、UCBT の安全性・有効性を評価しにくいものにしてきた。本試験においては再発高リスク群の患者を対象とすることによって非血縁骨髄ドナーをサーチする期間を前方視的に限り、非寛解期に行ういわゆる「なだれ込み移植」になるのを避ける。これによって十分評価可能な時期に評価可能な対象に対して UCBT を行い、安全性・有効性を評価することを目的としている。同時に再発高リスク群を対象としていることから、再発率に関しても同時期に UBMT を施行した患者との比較において評価することが可能となるものと考えられる。

E 結語： 本臨床研究により UCBT の安全性が確立されることによって非血縁骨髄ドナーが得られず移植の時機を逸していた患者が適切な時期に UCBT を受けられるようになることが期待される。

HLA 近似同種ウイルス特異的免疫細胞バンクの開発

研究分担者 森尾友宏 東京医科歯科大学大学院・准教授

研究協力者 藤田由利子 東京大学医科学研究所・特任研究員

- A. 研究目的：造血幹細胞移植後のサイトメガロウイルス (CMV) , EB ウイルス (EBV) , アデノウイルス (AdV) などの重篤なウイルス感染症は予後に深く関与する。移植後免疫学的再構築が不十分な状態での化学療法に依存する現行の感染症治療では、長期投与による耐性や再発などが問題となる。それに代わる治療法としてウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 療法が世界的に開発されているが、最大の問題点は CTL 作成時間である。その対策として、予め用意された第三者ドナーからのウイルス特異的 CTL を投与する方策が考えられる。同療法は米国における臨床試験では、HLA 不一致であっても重症 GVHD の発症頻度が極めて低く、安全かつ有効な治療であることが明らかになりつつある。
- B. 方法 Baylor 医科大学で開発された複数ウイルス特異的 CTL 療法の技術を導入し検証した。ドナーPBMC を CMV 抗原 (IE-1, pp65)、EBV 抗原 (BZLF1, EBNA1, LMP2)、AdV 抗原 (Hexon, Penton) の peptide mixture で刺激した後に、サイトカイン (IL4 + IL7) 添加 CTL 培養液で約 10 日培養し、細胞数、表面マーカー、抗原特異的 IFN γ 産生能等について解析した。
- C. 結果 . 刺激後培養細胞は CD3 陽性細胞が大部分を占め、CD8、CD4 両分画が誘導され、セントラルメモリー細胞の維持、増幅を認めた調製した細胞は、全てのウイルス抗原に対し IFN γ を産生し、これらの特異的 T 細胞は PBMC と比較して 1-3log 増幅した。これらのアロ特異反応や標的細胞傷害能については今後検証予定である。
- D. 考察:わが国においてもウイルス特異的 CTL 療法の導入・検証と臨床展開が求められており、臨床応用に向け無血清培養系の確立を目指している。
- E. 結論 . ドナーPBMC を多種類ウイルス抗原ペプチドで刺激する方法によりウイルスベクターや遺伝子導入なしで簡便かつ効率的に約 10 日という短期間で複数ウイルス特異的 CTL の調製が可能であることが明らかになった。

移植成績の解析と臨床試験の支援・遂行に関する研究

研究分担者 山口拓洋 東北大学大学院医学系研究科教授

A 研究目的

移植データの統計解析においてはいわゆる競合イベントの問題が存在する。競合イベントに対する回帰モデルとしてよく用いられているのがFine and Gray (1999) が提案したSubdistribution hazard model であるが、一方でKlein and Andersen (2005) が競合イベントの累積発症率関数の擬似観察値に対する回帰モデル (Regression model of competing risks data based on pseudo-values of the cumulative incidence function) を提案しており有用な方法の一つと考えられている。本研究ではKleinら (2008) がSASマクロを提供していることから、それらを参考に実際の臍帯血移植データを用いて、試行的に解析を試み実データへの適用可能性について検討した。

B 方法

Kleinら (2008) をもとに、SASマクロを作成、実データに適用する。Fine and Gray (1999) の方法などとの比較も試みる。ソフトウェアのデータへの適用可能性について検討する。

C 結果

SASマクロを作成し、実データに適用した。Cumulative incidence function の推定などについては、Fine and Gray (1999) の方法などの方法と結果に大きな違いはみられなかった。

D 考察

Klein and Andersen (2005) の方法は Cumulative incidence function を直接モデル化する方法であり、モデルの自由度が大きい。パラメータ推定は一般化推定方程式 (GEE) を用いることで問題なく行うことが可能であり、また、GEEについてはたくさんの先行研究が存在することからその性能について十分明らかであるという利点がある。他の方法との比較検討結果については、Hallerら (2012) の結論と相違なかったが、今後も他のデータを用いるなどして他のモデルとの比較検討を続ける予定である。

E 結論

競合イベントの累積発症率関数の擬似観察値に対する回帰モデルの解析プログラムを作成し、実際の臍帯血移植データに適用した。

脳死ドナーにおける
多臓器摘出に関する
教育プログラムの確立

脳死ドナーにおける多臓器摘出に関する教育プログラムの確立

研究代表者氏名 古川博之 旭川医科大学 外科学講座消化器病態外科学分野 教授

| | | | | | | |
|-------|------|--------|-----|------|----------|-----|
| 研究分担者 | 河合隆史 | 早稲田大学 | 教授 | 後藤満一 | 福島県立医科大学 | 教授 |
| | 近藤 丘 | 東北大学 | 教授 | 相川 厚 | 東邦大学 | 教授 |
| | 高原史郎 | 大阪大学 | 教授 | 仁尾正記 | 東北大学 | 教授 |
| | 國土典宏 | 東京大学 | 教授 | 福寫教偉 | 大阪大学 | 教授 |
| | 上本伸二 | 京都大学 | 教授 | 劍持 敬 | 藤田保健衛生大学 | 教授 |
| | 伊達洋至 | 京都大学 | 教授 | 小野 稔 | 東京大学 | 教授 |
| | 江口 晋 | 長崎大学 | 教授 | 嶋村剛 | 北海道大学 | 准教授 |
| | 水田耕一 | 自治医科大学 | 准教授 | 谷口雅彦 | 旭川医科大学 | 准教授 |
| | 吉住朋晴 | 九州大学 | 准教授 | 上野豪久 | 大阪大学 | 助教 |

A 研究目的

臓器移植法改正後、臓器提供数が急速に増加しており、提供側・移植側での医療体制確立が求められる。我が国では1ドナーから多くの臓器が摘出される特徴があり、心臓、肺、肝臓、膵臓、腎臓が同時に摘出される多臓器摘出となるため手術の難易度が高く、現場での教育が困難であり、一部の経験ある術者にしか手術の遂行が難しい現状がある。これに対して、本研究では安全かつ的確な多臓器摘出に向けての教育プログラムを確立する。

B 方法

1) 新しいドナーの適応基準の確立

臓器移植ネットワークより脳死ドナーについての情報を収集し、各臓器の担当者がグラフト機能に影響するドナーの危険因子を分析し、これより各臓器毎に新しいドナーの基準を確立する。

2) 摘出手術手技に関する3DCGアニメーションの作成

3DCGアニメーションは、各臓器担当の分担者がブタを用いた臓器摘出のデモンストレーションを行い、2眼式の立体ビデオカメラで収録したものを参考にして、河合隆史研究分担者がクオリティ エクスペリエンス デザイン株式会社(QXD)と連携して制作を進めている。

3) 臓器摘出シミュレーション

24年度については、臓器摘出シミュレーションを、西日本は、11月17日に九州大学で、東日本は、11月24日に自治医科大学で、動物実験施設を用いて行う予定である。まず、指導者がブタを用いた臓器摘出のデモンストレーションを行い、この後に5-6人毎のグループがシミュレーションとしての臓器摘出を行う。そして、手術による習得実績は自己評価表に書き入れ、これを集約分析してeラーニングの構築に生かす。

4) eラーニング

インターネット上にeラーニング用のwebサイトに、新しく作成したドナー基準ならびに臓器摘出の3DCGアニメーションをコンテンツとして組み込む。これにより、参加者はいつでも当該サイトにアクセスでき、コンテンツの閲覧が可能になる。当該サイトの閲覧を通じた学習により、臓器摘出手術の理解が容易となり、大動物によるシ

ミュレーション、ならびに実際の脳死下臓器摘出が円滑に実施できることが期待される。

C 結果

1) 新しいドナーの適応基準の確立

日本の脳死臓器摘出185例のドナー・データの収集を終了しており、これを各臓器の分担者に分配してドナーの適応基準について検討しているところである。肝移植成人85例についての分析結果では、脳死肝移植レシピエントの3ヶ月生存を低下させるリスクとして冷阻血時間10時間以上、MELDスコア25以上、ドナー年齢55歳以上の3つが判明した。

2) 摘出手術手技に関する3DCGアニメーションの作成

9月2日と10月1日の2回にわたって、各臓器の臓器摘出デモンストレーションを実施し、その内容を立体ビデオカメラにて収録した。その後、3度の打ち合わせ会（9月19日、10月6日、11月6日）を開いて、肝臓単独摘出ならびに肝臓膵臓同時摘出のアニメーションの作成に沿ったシナリオと同時に、3DCGによる臓器のモデリングを進めている。

3) 臓器摘出シミュレーション

脳死肝移植実施施設22施設を対象に臓器摘出シミュレーションを行う予定であり、この際にアンケート調査、ならびに自己評価を行い来年度実施予定のe-ラーニングによる教育の効果を判定する基礎データとする。

4) e-ラーニング

各臓器とも次の7項目について、webサイトを通して閲覧・学習が可能とする。1) 解剖 2) 術前準備 3) 開胸・開腹の実際 4) 各臓器の評価 5) 血管・臓器の剥離・授動 6) カニューレーション、灌流 7) 臓器摘出。将来的には、テスト機能を付加することで、移植認定医の資格試験の一部として運用することを目指す。

D 考察

1) 新しいドナーの適応基準の確立

脳死肝移植レシピエントの早期予後に影響を与える3因子の中でMELDスコア高値のレシピエントや高齢者ドナーを除外するのは現実的でない。冷阻血時間を最小にすることがレシピエントの成績を上げるもっとも確実な方法であり、ドナーとレシピエントの手術時間を冷阻血時間が最短になるように設定すべく、ドナー術者とレシピエント術者の密な連携が重要である。

2) 摘出手術手技に関する3DCGアニメーションの作成

多臓器摘出の手術手技を現場で教育用にビデオ撮影することは、多いときには5-6チーム10数人の医師が摘出手術に参加するため十分な撮影視野を得ることが難しく、また、手術の重要部分が胸腔・腹腔の深部で行われるため、手術手技を理解するためほとんど不可能である。このため、3Dアニメーションの作成が手術手技理解のために最適な手段と考えられる。

3) 臓器摘出シミュレーション

これまでも2010年、2011年の2年にわたって、脳死肝移植施設に関しては、臓器摘出シミュレーションを行って来た。これまでほぼ全員の外科医が、臓器摘出手術を学ぶ上で臓器摘出シミュレーションが役だったと答えており、年に1-2回のシミュレーションを希望している。今後は、e-ラーニング施行の後に、シミュレーションを行い学んだ技術が確実に実行できるかを検証していることが重要である。

4) e-ラーニング

アニメーションを組み込んだeラーニングを作成することにより、外科医が臓器摘出に関する高度かつ十分な知識を日本中どこでも得ることができるようになり、理想的な教育システムといえる。

E 結論

このプログラムにより教育を受けたドナー術者による的確な臓器の評価と正確な臓器摘出術の施行は、手術の安全性をたかめ、グラフト不全を減少させ、移植成績の向上につながる。転じて、再移植を減少させ、より多くの患者が移植の恩恵にあずかることができる。このような系統的なドナー手術の教育システムの構築は、世界には例がなく今後、モデル・ケースとなる可能性がある。

【 若手育成型 】

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

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 研究員

A. 研究目的

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。現在までに、我が国においては、50,000例以上の造血幹細胞移植が実施されている（1991年～2010年：造血細胞移植学会 平成23年度 全国調査報告書）。このように、造血幹細胞移植は種々の疾患に対する根治療法として実施されているが、高齢者や合併症をもった患者（レシピエント）へ適応例は少ない。それは、全身放射線照射や大量のアルキル化剤の投与といった移植前処理が、レシピエントに対して大きな負担となっているためである。また、この前処理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）が破壊されていることも推察される。そのため、上記の問題を克服するには、骨髄非破壊的な造血幹細胞移植法の開発が必要不可欠である。一方、骨髄非破壊状態では骨髄に多くの血液細胞が残存しているためドナー造血幹細胞の生着率の低下が懸念される。したがって、造血幹細胞移植の適応拡大には、骨髄非破壊的、かつ高生着を可能とする造血幹細胞移植法の開発が重要である。

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。今年度は主に、以下の研究を実施した。

- ①機能遺伝子を発現するAdベクターを作製してヒトCD34陽性細胞への遺伝子導入を行い、その後の増殖に与える影響を解析した。
- ②VEGF発現Adベクター投与マウスの骨髄において、造血幹細胞が減少するメカニズムの解明を試みた。
- ③GFPマウス由来骨髄細胞（ドナー細胞）を、G-CSF発現Adベクター投与マウス（レシピエント）へ移植することで、ドナー細胞がレシピエントへ生着するか否か検討した。

B. 研究方法

- ・各種Adベクターの作製

サイトカイン発現Adベクター (Ad-G-CSF、Ad-VEGF) やヒトCD34陽性細胞への遺伝子導