

## II. 總括研究報告



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てる。

## 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。

厚生労働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<sup>+</sup> 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 SAMPI 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- 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、山内荘作、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.  
7<sup>th</sup> 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. 19<sup>th</sup> 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. 19<sup>th</sup> Annual Meeting of The PsychoNeuroImmunology (San Diego) 2012.6.7
- 5) Sanae Hasegawa-Ishii, Atsuyoshi Shimada, Muneo Inaba, Ming Li, Ming Shi<sup>5</sup>, 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

