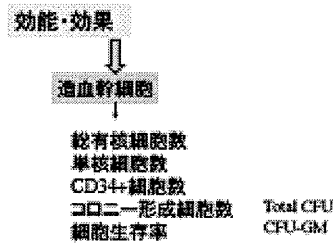


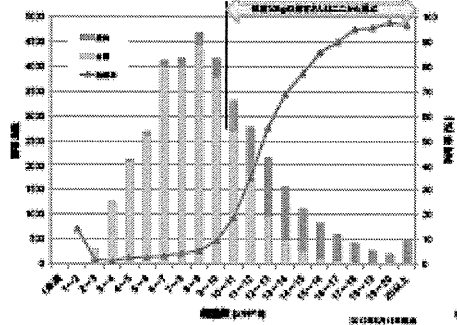


難治性疾患等克服研究事業（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）研究事業  
「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」

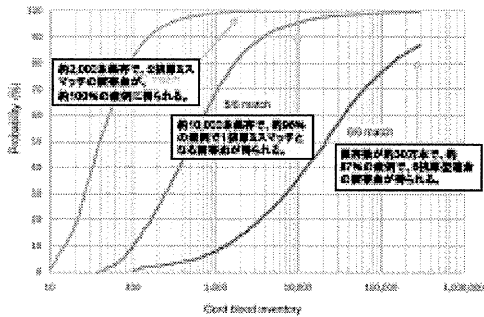
臍帯血の品質管理



登録臍帯血、各種臍帯血の分布と利用率



Cord Blood Bank Size In Japan, calculated in 2009



課題

補助金依存事業

事業を完遂させる経済力(品質の向上が困難)

2012年4月より、BMT中に付き  
408,000円を補助金に依存

成人に使用可能な臍帯血の保存

広域化

国際化

広報

広報の対象

- 年間3000件の臍帯血を保存
- ↑
- 約1万件の臍帯血受入
- ↑
- 約2万件の臍帯血採取
- ↑
- 数万人への広域
- ↑
- 採取協力施設は約100カ所
- ↑
- 約100万人の出生



第一八〇條  
孝第二〇号

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(第一條-第八條)
- 第二章 基本方針(第九條)
- 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(第十條-第十六條)
- 第四章 骨髓・末梢血幹細胞提供あっせん事業(第十七條-第二十九條)
- 第五章 臍帯血供給事業(第三十條-第四十三條)
- 第六章 造血幹細胞提供支援機関(第四十四條-第五十二條)
- 第七章 雑則(第五十三條-第五十四條)
- 第八章 罰則(第五十五條-第六十一條)
- 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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- $\alpha$ -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- $\alpha$  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)。

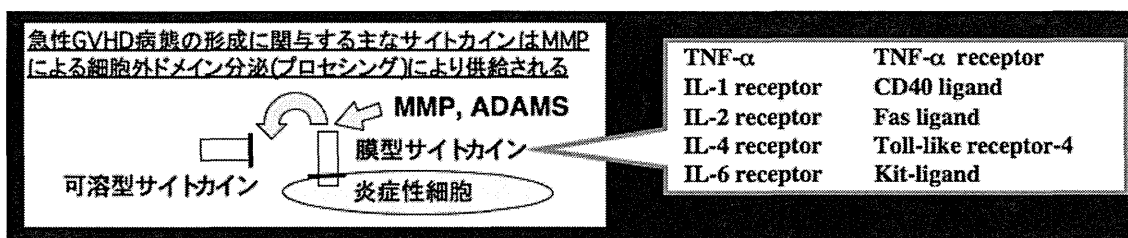


図 1: MMP による炎症性サイトカインの細胞外ドメイン分泌制御機構

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。

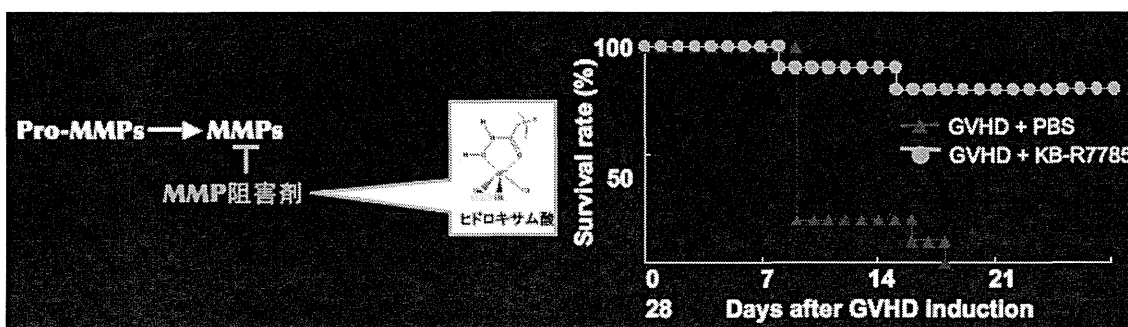


図 2: MMP 阻害剤の急性 GVHD に対する有効性

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)。

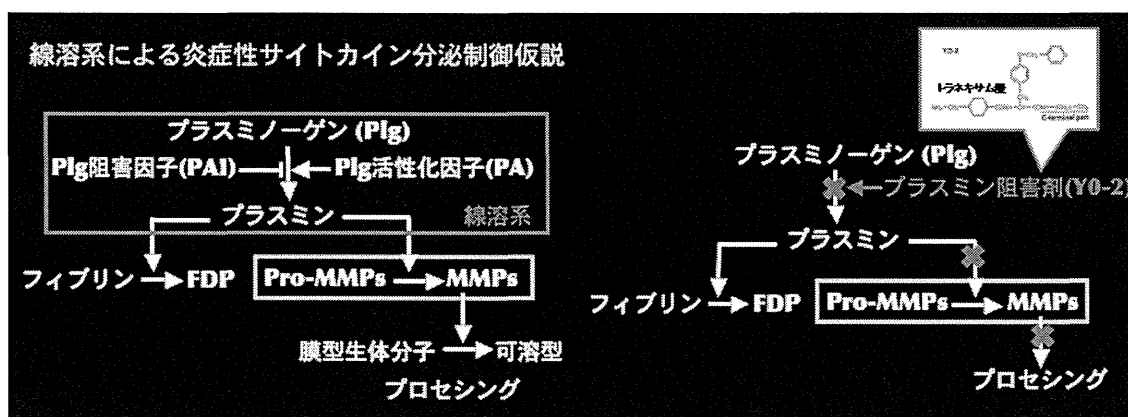


図3：線溶系阻害剤の炎症性サイトカイン分泌抑制機序

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/m<sup>2</sup>) / Melphalan(80mg/m<sup>2</sup>) / 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/m<sup>2</sup>) / 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/m<sup>2</sup>)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/ $\mu$ 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られる。

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。

V. 第2回合同班會議次第・抄録



平成 25 年 1 月 14 日

11:30~12:00

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

### プログラム

11:30~11:40

本研究の概要と進捗状況

高橋 聡（医科研）

11:40~11:50

低分子化合物によるヒト造血幹細胞の体外増幅の可能性 岩間 厚志（千葉大）

11:50~12:00

骨髄内臍帯血ミニ移植 臨床 II 相試験

岡田 昌也、小川 啓恭（兵庫医大）

## 「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」の概要と進捗状況

高橋 聡 東京大学医科学研究所先端医療研究センター分子療法分野

本研究グループは、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を主目的として、グラフト生着・造血回復の促進、免疫抑制剤を用いないGVHD治療、ウイルス特異的免疫再構築、などの課題について取り組んでいる研究者が各テーマについての臨床研究を効率的に進めるために課題横断的に議論の場の提供も含めたプラットフォームになることを目指している。従来のアプローチとは全く異なる視点によるこれらの研究の有効性が確認されれば、これまでの治療法との相乗効果が期待でき、加えて造血器疾患患者の中で多数を占める高齢患者に対する安全性の向上につながるため、その適応拡大が期待できるのみならず、日本発の新たな創薬につながることを期待できる。

各研究課題の進捗状況の概要については、以下の通りである：

- ① 生着不全・造血回復遅延に対する新規対応策の開発：
  1. 線溶系制御薬剤の開発(安藤潔、宮田敏男)：新規 PAI-1 阻害剤のマウス移植モデルへの投与により移植後の迅速で効率よい末梢血での造血回復反応が誘導されると共に、骨髄での造血幹細胞の増幅の促進効果も明らかにした。
  2. TNF- $\alpha$  シグナル遮断による移植前処置後に投与されたグラフト内造血幹細胞保護による造血回復促進法の開発(大津真)：動物モデルを用いて炎症骨髄環境での造血幹細胞機能に対し負に影響する候補因子として TNF- $\alpha$  を同定し、その作用機序についても確認を行った。
  3. 新規低分子化合物を用いた臍帯血造血幹細胞増幅法の開発(岩間厚志)：本抄録・次項を参照。
- ② HLA 近似第三者ドナーからの多ウイルス抗原特異的 CTL 療法の開発(森尾友宏、高橋聡、小島勢二、高橋義行)：複数ウイルス特異的 CTL 療法の技術を検証しており、予定通り本法で抗原特異的 T 細胞の誘導が確認され、10 日間の培養で 1-3log の増幅が確認された。
- ③ 新規プラスミン阻害剤による炎症性サイトカイン抑制を介した GVHD に対する新規分子療法の開発(服部浩一)：急性 GVHD マウスモデルにおいて YO-2 の効果を確認するとともに、GVHD 患者検体から血液凝固・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を確認中である。
- ④ 臨床試験の支援(谷口修一、宮村耕一、山口拓洋、小川啓恭、岡田昌也、長村

文孝) : 現在の行われている臍帯血移植において前処置法の検討を行った。さらに成人患者への移植の安全性と効果を確認するための前方視的臨床試験を進めるとともに、統計解析の手法に関する検討を進めた。

- ⑤ 臍帯血バンク支援 (高梨美乃子) : 将来にわたっての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整理を行い、議論を進めた。

## 低分子化合物によるヒト造血幹細胞の体外増幅の可能性

岩間厚志 千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学

造血幹細胞を操作し治療に用いる上で、造血幹細胞の体外増幅の実現化は大きな課題である。その臨床的な有用性としては、臍帯血造血幹細胞のように十分量の造血幹細胞が得られない供給源からの造血幹細胞増幅や、造血幹細胞を用いた遺伝子治療への応用等があげられる。これまでに、サイトカインによって増幅された造血前駆細胞・分化細胞を移植に併用することにより、造血抑制からの早期回復が得られることが示されている。近年では、低分子化合物を用いた増幅法が試みられつつあり、DNA メチル化酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、低分子銅キレート化合物、アリルヒドロカーボン受容体 (AhR) 阻害剤などの有用性が報告されている。われわれは、トロンボポイエチン受容体の低分子化合物アゴニストをトロンボポイエチンの代わりに用いることにより、造血幹細胞を 3 倍に増幅することに成功した。このアゴニストはトロンボポイエチンと比較して STAT5 を持続的に活性化するものの、トロンボポイエチンで活性化される STAT3 を活性化しないなど、蛋白製剤とは異なるシグナル制御を行うことが明らかとなった。この知見は低分子化合物によるサイトカインシグナル操作の可能性を示唆するものである。さらに、天然化合物ガルシノールがそのヒストンアセチル化阻害活性を介して造血幹細胞の増幅を促進することを見いだし、造血幹細胞のエピジェネティック操作の可能性も見えてきた。新規の有効な低分子化合物も開発中であり、AhR 阻害剤 (SR-1) に匹敵する効果が得られつつある。これらの化合物を併用することにより造血幹細胞増幅効率のさらなる向上が期待される。細胞治療に向けた造血幹細胞操作の状況を報告したい。

## VI. 分担研究報告書

新規造血再生促進薬の開発に関する研究

研究分担者 安藤 潔

所属 東海大学医学部 血液・腫瘍内科

研究要旨

本研究課題では移植後の造血再生を促進するために、造血環境を構成している PAI-1 の阻害剤 TM5275 を利用することにより、造血回復期間の短縮が実現するか否かを検討することと同時に、長期造血構築能の維持を達成する事を明らかにした。

A. 研究目的

近年臍帯血幹細胞移植が普及してきたが、他の造血源と比較して造血回復が遅いことが課題となっている。本研究課題では造血再生を促進するために、造血環境を構成している繊維素溶解系（線溶系）に着目した。宮田（東北大学）らによって開発された TM5275 は t-PA 活性を負に制御している plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) を阻害する。すなわち t-PA 活性を高い状態で維持することを実現した化合物である。本研究では、PAI-1 阻害剤 TM5275 を利用することにより、造血回復期間の短縮が実現するか否かを検討することと同時に、長期造血構築能の維持を達成する事を明らかにした。

B. 研究方法

マウスに致死量放射線を照射した 2 日後に、血漿を回収し ELISA で線溶系因子 (plasminogen(plg)/plasmin および t-PA) の発現量を定量化した。造血動態の測定、骨髄の組織学的解析を行った。

C. 研究結果

PAI-1 阻害剤投与群は、vehicle と t-PA 投与群に比較して、白血球や血小板の早期回復が認められ、高い生存率を示し、radioprotection 能力が増加することを見いだした。PAI-1 阻害剤の投与によって、移植後の HSC 早期回復反応が活性化されたことを明らかにした。

D. 考察

本研究で使用した化合物を改良した PAI-1 阻害剤は大型動物を用いた安全性試験を終え、臍帯血移植後の造血促進効果を期待した第一相臨床試験を開始する予定である。

E. 結論

骨髄移植後に PAI-1 阻害剤を投与することで、造血再生を促進することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG,

Inoko H, Hirayasu K, Yabe T, Nakaoka H, Ando K, Gennery AR, Morishima Y. Single Nucleotide Polymorphisms and outcome risk in unrelated Haematopoietic Stem Cell Transplantation: An exploration study. Blood, 119, 6365-6372, 2012

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

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、新規 GVHD 治療法の開発  
に関する研究

研究分担者 宮田 敏男

所属 東北大学 分子病態治療学分野

研究要旨

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、移植前処置による健常組織の傷害とその損傷修復、そして移植後の円滑な組織再生プロセスが治療の成否を左右する。本研究では血液線維素溶解系(線溶系)亢進を起点とした組織再生機構の解明を目的とし、薬剤投与による線溶系酵素群の活性化と、マウス生体に作製された虚血性壊死組織の再生、血管新生と血流回復の状況を評価した。結果として、線溶系因子プラスミノゲンアクチベータ(PA)あるいは PA 抑制因子阻害剤は、マウス生体中で、骨髄由来細胞の動員を介し、血管新生及び組織再生を促進したことから、本研究成果は、新しい組織再生促進療法の可能性を提示したものである。

A. 研究目的

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、移植前処置による健常組織の傷害とその損傷修復、そして移植後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、セリンプロテアーゼに含まれるプロテアーゼの一群である血液線維素溶解系(線溶系)因子群による MMP の活性制御機構の存在が明らかとなった。本研究では線溶系亢進を起点とした組織再生の基盤となる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開発の基礎研究までをその目的の範疇とする。

B. 研究方法

1. 各種 MMP 及びプラスミノゲン(Plg)遺伝子欠損及びその野生型マウスに組織型 Plg アクチベータ(tPA)あるいは PA 抑制因子(PAI-1)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 ないしはウロキナーゼ型 PA(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



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. 研究結果

今年度の研究で、研究者らは、マウス生体中に人為的に作製された虚血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・線溶の調節に関与しているセリンプロテアーゼに属するプラスミンという因子が、組織中の骨髄由来細胞の移動や、間質細胞からの血管新生因子、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。マウス生体へのPAI-1阻害剤(TM5275)の投与は、出血等の副作用を呈することなく、生体内の内的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有意に促進した。

### D. 考察

本研究成果は、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、これらが用量依存的な出血等の危険性を有しているのに対し、PAI-1 阻害剤による組織再生促進は、これまでのところ、マウス実験において明らかな有害事象を認めないことから、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潜在性を有していると言えよう。

### E. 結論

線溶系の亢進は、生体内組織再生の起点として機能しており、各種プロテアーゼの活性が、虚血壊死組織の再生に関与する組織再生機構の存在が確認された。また、これを誘導する tPA あるいは PAI-1 阻害剤の投与は、新しい組織再生促進療法を構築する可能性を有している。

### F. 研究発表

1. Ichimura A, Matsumoto S, Suzuki S, Dan T, Yamaki S, Sato Y, Kiyomoto H, Ishii N, Okada K, Matsuo O, Hou FF, Vaughan DE, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. A Small Molecule Inhibitor to Plasminogen Activator Inhibitor 1 Inhibits Macrophage Migration Arterioscler Thromb Vasc Biol. In press

2. Giuseppe Remuzzi, Arrigo Schieppati, Robert W. Schrier, Bernardo Rodriguez-Iturbe, Zhi-Hong Liu, Fredric Finkelstein, Marcello Tonelli, Jean-Pierre Grunfeld, Norberto Perico, Toshio Miyata, Richard P. Lifton, Ivor Katz. Renal failure worldwide: what we want to achieve in 10 year time and which barriers to overcome Lancet In press
3. Huang WT, Vayalil PK, Miyata T, Hagood J, Liu RM. herapeutic value of small molecule inhibitor to plasminogen activator inhibitor-1 for lung fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 46:87-95, 2012.
4. Tashiro Y, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ohki-Koizumi M, Ishihara M, Sato A, Gritli I, Komiyama H, Sato Y, Tomiki Y, Sakamoto H, Dan T, Miyata T, Okumura K, Nakauchi H, Heissig B, and Hattori K Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice Blood 119 (26) 6382-6393, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

TNF- $\alpha$  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

所属 東京大学 医科学研究所

研究要旨

移植後における造血回復の遅れは臍帯血移植成績の低下に直結する深刻な課題である。私たちは同種移植において前処置に伴い惹起される骨髄環境内炎症が、移植造血幹細胞機能を大きく損ねるとの仮説に基づき、新規の移植法の開発を目指している。マウス骨髄中に照射後に産生される炎症性サイトカインのスクリーニング、造血幹細胞増殖に及ぼす影響の検討等より TNF- $\alpha$ に着目して研究を展開した。結果、照射後骨髄環境に暴露した造血幹細胞は短時間のうちにその骨髄再構築能が低下すること、この抑制効果には TNF- $\alpha$ が主要な役割を演じることを見出した。予備検討において、TNF- $\alpha$ 刺激は造血幹・前駆細胞に活性酸素産生を誘導すること、またこの活性酸素増加が骨髄再構築能に影響を与えるとのデータを得ており、今後このシグナル制御によって目的とする改良型移植法の確立が期待できる。

A. 研究目的

本研究では、骨髄環境に誘導される機能抑制性因子から移植造血幹細胞を保護することで造血回復促進を可能にする、新規の改良型移植療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. C57BL/6 マウス（以下、B6 マウス）に放射線照射を行い、経時的に骨髄ストローマ細胞を単離し、遺伝子発現解析を行う。
2. B6 マウス骨髄から造血幹細胞を分離し、上記スクリーニングより抽出した炎症性サイトカインの存在下にコロニーアッセイを行う。
3. 上記アッセイにて造血幹細胞のコロニー形成能を抑制したサイトカインについて

て KO マウスを入手し、5 の実験に供する。

4. 造血幹細胞の骨髄環境曝露モデルを確立する。照射骨髄への *in vivo exposure* を実現するため、純化造血幹細胞を移植後、~24 時間後に骨髄細胞を採取し、別レシピエントを用いて競合的骨髄再構築能アッセイを行う。照射後にテスト造血幹細胞を移植するタイミングを変えて比較検討し、骨髄環境の炎症状態と造血幹細胞に与える影響との関係を明らかにする。
5. 上記で造血幹細胞への負の影響が最大となるモデルを用いて、サイトカイン KO 骨髄環境が負の影響をキャンセルしうるか検討する。
6. 上記 5 までが証明された後、当該サイトカインが造血幹細胞機能を損ねるメカニズムを解析する。

7. メカニズム解析に基づいて、その抑制効果を遮断する手法を見出し、目的とする造血幹細胞保護法を確立する。

### C. 研究結果

照射後骨髄ストローマ細胞において、1日後にはいくつかの炎症性サイトカインが誘導されることが明らかとなった。その中で造血幹細胞のコロニー形成を抑制するものとして TNF- $\alpha$ が抽出された。造血幹細胞の炎症環境への *in vivo* exposure モデルで、照射後骨髄環境における~24 時間の暴露によって移植造血幹細胞の再構築能が抑制されること、その抑制効果は 2-3 日目の照射後骨髄において最大となることが明らかとなった。KO マウスを用いた検討で、照射骨髄環境から TNF- $\alpha$ を除くことで、この抑制効果が大部分キャンセルされることを証明した。TNF- $\alpha$ が造血幹細胞において再構築能を損ねる分子機構について予備検討を加えた結果、造血幹細胞、造血前駆細胞において、TNF- $\alpha$ 刺激が濃度依存性に活性酸素種の産生を誘導することを明らかとした

短時間の活性酸素の蓄積が、純化した造血幹細胞に与える影響、および TNF- $\alpha$ シグナル下流の一過性の抑制による造血幹細胞保護効果について現在、詳細に検討中である。

### D. 考察

本研究で使用したのは B6 マウス congenic 移植系であり、同種移植モデルではない。炎症の誘導は放射線照射のみで行っており、炎症性サイトカインも末梢血中には検出されない。すなわち骨髄環境における微少炎症モデルといえるが、それ

にも関わらず~24 時間程度の暴露で造血幹細胞機能を抑制することは意外であった。同種移植では TNF- $\alpha$ の産生は全身的にみられることは既知であり、造血幹細胞にとってはさらに厳しい環境への暴露が宿命となるため、ここで主張する造血幹細胞保護法の実現を目指すことは理に適うと考えている。しかしながら、同種移植における炎症は、graft-versus-host reaction 等によりさらに遷延することが予想されるため、短時間のシグナル遮断が十分な保護効果につながるかは不明である。現時点では、造血幹細胞に対する炎症環境中の抑制効果は、ニッチに生着するまでの行程 (1-2 日以内に完了すると考えられる) に限定され、生着後の造血幹細胞はニッチにおいて炎症に対する抵抗性を獲得するとの仮説に基づき、シグナル介入による人為的保護は 24-48 時間の持続で十分であると考えている。この仮説をアロ移植モデルおよびヒト細胞を用いた Xeno 移植モデルにおいて検証することが次なる重要課題である。

### E. 結論

照射後骨髄環境中には炎症が生じ、そこに暴露される移植後造血幹細胞は短時間のうちに造血再構築能を損なうことが明らかとなった。そこでは TNF- $\alpha$ が主要な役割を演ずることから、このシグナルから造血幹細胞を保護する手法が、造血回復の促進を可能にする新規移植法の開発につながるなどの確証を得るに至った。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M,