

臍帯由来 MSC による臍帯血移植における生着促進効果

研究分担者 麦島秀雄 日本大学医学部小児科学分野・教授

研究協力者 松本太郎 日本大学医学部医学科機能形態学系細胞再生・移植医学分野・教授

研究要旨：臍帯血移植における課題の一つに生着不全があり、非悪性疾患である希少疾患では重要である。本研究では臍帯血移植における臍帯などに由来する間葉系幹細胞(MSC)の投与による造血幹細胞生着促進効果を検討する。

A. 研究目的

臍帯血移植における課題の一つに生着不全があり、有効な治療法がないのが現状である。本研究では臍帯血移植における間葉系幹細胞(MSC)の投与による生着促進効果を検討する。

B. 研究方法

放射線照射した免疫不全(NOD/SCID)マウスにヒト臍帯血 CD34+細胞 (1~5 x 10⁴) を移植し、ヒト臍帯血生着不全モデルの作成を試みた。このモデルに脂肪細胞に由来する MSC 様細胞(DFAT, 5 x 10⁵)を尾静脈より同時移植し、臍帯血 CD34+細胞の生着促進効果の有無をフローサイトメーターにて評価した。

(倫理面への配慮)

ヒト臍帯血を用いた実験は、施設臨床研究審査委員会および東京臍帯血バンク倫理委員会にて承認を受け、実施した。

C. 研究結果

NOD/SCID マウスに 3 Gy の放射線照射を行った後、1 x 10⁴ のヒト臍帯血 CD34+細胞を移植することにより、再現性のある臍帯血生着不全モデルを作出することができた。このモデルに対して DFAT を同時移植した

結果、12 週後には CD34+細胞移植のみの群 (Control 群, n=12) に比べ、CD34+細胞と DFAT を同時移植した群 (DFAT 群, n=13) では、骨髄中のヒト造血幹細胞(CD34+)、B 細胞(CD19+)、単球マクロファージ(CD11b+)、ミエロイド細胞(CD13+)、巨核球(CD41a+) の割合が有意(p < 0.05)に増加した。また移植 12 週後の末梢血中のヒト CD45+細胞の比率も Control 群に比べ DFAT 群で有意(p < 0.05)に増加した。

D. 考察

臍帯血移植の際に、MSC を同時投与することにより、造血幹細胞の生着率を向上させる可能性が示された。近年、MSC が造血支持能を有し、骨髄内で造血幹細胞ニッチとしての役割を果たしていることや、造血幹細胞のホーミング因子を豊富に分泌することが明らかにされている。静脈内投与された MSC は、直接的または間接的に造血微小環境の修復を誘導したと考えられる。臍帯組織からは MSC が容易に調製でき、臍帯血移植時にはドナー由来の MSC も調製可能であるため、生着不全を回避する細胞治療の細胞ソースの候補として臍帯 MSC は有望であると思われる。

E. 結論

免疫不全マウスを用いたヒト臍帯血生着

不全モデルの作出に成功した。また臍帯血・MSC同時移植は、臍帯血移植における生着不全を予防する有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: a nationwide survey in Japan. Mol Genet Metab. 107, 513-20, 2012

2. 学会発表

1. 小高美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 麦島秀雄: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の造血細胞

生着促進効果に関する検討. 第11回日本再生医療学会総会, 横浜, 2012.

2. 風間美奈子, 松本太郎, 石毛美夏, 辻孝, 麦島秀雄: 脱分化脂肪細胞(DFAT)の臍帯血移植生着促進効果に関する検討. 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012.

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患克服研究事業))
分担研究報告書

先天性骨形成不全症、軟骨無形成症に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた
治療法の開発

研究分担者 辻浩一郎 東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター・
幹細胞プロセッシング分野・准教授

研究要旨

先天的に骨、軟骨に障害がある骨形成不全症、軟骨無形成症は、間葉系幹細胞移植による治療の可能性がある。その新たな間葉系幹細胞のセルソースとして、臍帯が付着する胎盤を使用することを検討した。その結果、胎盤から容易に胎児由来間葉系幹細胞を樹立することができた。樹立された胎盤由来間葉系幹細胞は、骨、軟骨への分化能を有していることが確認できたため、今後、骨形成不全症、軟骨無形成症に対する治療への応用が期待される。

A. 研究目的

骨形成不全症(Osteogenesis imperfecta)は、I型コラーゲン遺伝子の変異によるI型コラーゲンの量的、質的異常に起因する様々な結合組織の障害が出現する遺伝性疾患で、その発生頻度は約2万人に1人とされている。骨脆弱性に起因する易骨折性、四肢・脊柱・胸郭・頭蓋などの進行性骨変形、低身長などのほかに、青色強膜、歯牙形成不全、難聴、関節・皮膚の弛緩性、腱断裂、心大血管などの異常を合併することがある。これらの症状の組合せにより、4～6型の病型に分類される(Sillence Provisional 分類)。骨形成不全症に対して

は、骨髄移植や骨髄間葉系幹細胞移植の有効性が示されている。

一方、軟骨無形成症 (Achondroplasia) は、繊維芽細胞成長因子受容体3 (FGFR3)遺伝子の変異に起因する軟骨細胞の異常による骨形成不全で、その発生頻度は1～2万人に1人とされる。四肢(主に上腕骨、大腿骨)短縮型低身長、肘の進展障害、短い指(三尖手)、内反膝(O脚)、幼少時の胸腰椎突背、歩行開始とともに進展する腰椎の前弯曲、前額部が突出した大きな頭部、顔面中央部の低発育(鼻根部の陥凹)、大後頭孔狭窄に伴う神経症状などの症状を呈する。軟骨無形成症も間葉系

幹細胞移植による治療の可能性が期待されるが、いまだ具体的な治療法は開発されていない。

これらの難治性疾患に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた治療法の開発のための基盤研究として、臍帯と結合する胎盤から間葉系幹細胞を樹立し、その性状を検討した。

B.研究方法

1. 胎盤由来間葉系幹細胞の培養

ドナーの母親の同意を得た後、胎盤を採取した。胎盤中央の臍帯結合部付近の絨毛膜の一部(1 cm²)を切除し、細切後トリプシン処理して得られた単細胞を、15%ウシ胎仔血清を含む α メディウムで、37°C、5% CO₂ の条件下で、付着細胞を継代培養した。

2. 胎児由来間葉系幹細胞であることの確認

Y染色体をFISH法で確認することによって、胎児由来の間葉系幹細胞であるか否かを検討した。

3. 胎盤由来間葉系幹細胞の性状の解析

樹立された間葉系幹細胞について、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの解析、骨芽細胞・軟骨細胞・脂肪細胞などの間葉系細胞への分化能を検討した。

(倫理面への配慮)

胎盤のドナーとなる母親には、本研究について十分に説明を行った後に同意を得て、

胎盤を採取した。

C.研究結果

1. 胎盤由来間葉系幹細胞の樹立

培養開始後3～4週間で付着細胞が50%コンフルエントに達したため、トリプシン処理した後、1/4倍の濃度で再播種した。再播種後2～3週間後に付着細胞はほぼ100%コンフルエントとなった。付着細胞は10～20継代可能であり、その間は確実に増加し続けた(資料1)。

2. 胎児由来間葉系幹細胞であることの確認

Y染色体FISHにより、継代中の付着細胞が胎児由来であることが確認された(資料2)。

3. フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析により、これらの付着細胞は、CD45^{low}、CD31⁻、AC133⁻、CD54⁺、CD29⁺、CD44⁺であることが示された(資料3)。この細胞表面形質は、間葉系幹細胞に一致すると考えられた。

4. 間葉系細胞への分化能の解析

培養された付着細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化可能であったことより、間葉系幹細胞であることが確認された(資料4)。

D. 考察

臍帯を付着する胎盤を用いることにより、容易に胎児由来の間葉系幹細胞を樹立することができた。樹立された間葉系幹細胞は、骨、軟骨への分化能を有していることが確認できた。今後は、これらの間葉系幹細胞の性状を、臍帯由来間葉系幹細胞、骨髄由来間葉系幹細胞と比較検討することにより、骨形成不全症、軟骨無形成症に対する治療への応用について検討していく予定である。

E. 結論

臍帯を付着する胎盤を用いることにより、容易に胎児由来の間葉系幹細胞を樹立することができた。樹立された間葉系幹細胞は、骨、軟骨への分化能を有しており、骨形成不全症、軟骨無形成症に対する治療への応用が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(雑誌)

1. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Tsuda M, Yuji K, Uchimaru K, Tojo A, Tsuji K: Acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13)/TCF3-PBX1 fusion in an adult male with Down syndrome. Acta Haematol 128: 242-243, 2012.
2. Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Tojo A, Tsuji K: Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent and young adult patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. Leuk Res 36: 128-131, 2012.
3. Ebihara Y, Ma F, Tsuji K: Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. Int J Hematol 95: 610-616, 2012.
4. Singh VK, Tsuji K, Sharma PB, Chandra R: Multidimensional role of CD34 protein in hematopoietic stem cell biology. Int J Sci Tech Man, in press.
5. Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A: Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. Trans Inf Dis, in press.
6. Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, Tsuji K: Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. Haemophilia, in press.
7. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Takahashi S,

- Tojo A, Watanabe J, Sato K, Kimura F, Tsuji K: Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome. *Leukemia & Lymphoma*, in press.
8. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Nariai N, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils derived from severe congenital neutropenia-derived iPSCs. *Proc Natl Acad Sci USA*, in press.
- (著書)
1. 辻浩一郎: 骨髓異形性症候群. 今日の小児治療指針 (第15版), 大関武彦・古川漸・横田俊一郎・水口雅編, 医学書院 (東京), pp527-528, 2012.
2. 学会発表
- (学会)
1. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Eto K, Nakauchi H, Kobayashi K, Tsuji K: Suppressed neutrophil development in hematopoiesis of induced pluripotent stem cells derived from a severe congenital neutropenia patient with ELA2 mutation. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Yokohama, 2012.
2. Sakurai M, Kunimoto H, Fukuchi Y, Sadahira K, Yuasa S, Fukuda K, Yamazaki S, Nakauchi H, Ebihara Y, Tsuji K, Ito E, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H: Impaired hematopoietic differentiation of iPSCs derived from patients with FPD/AML. 54th Annual Meeting of American Society of Hematology, Atlanta, 2012.
3. 重症先天性好中球減少症患者由来のiPS細胞の樹立とその解析: 海老原康博、平本貴史、山本将平、望月慎史、辻浩一郎、溝口洋子、中村和洋、小林正夫. 第115回日本小児科学会、福岡、2012.
4. 重症先天性好中球減少症患者由来iPS細胞の遺伝子発現の検討. 重症先天性好中球減少症患者由来iPS細胞の樹立とその解析: 第2報. 平本貴史、海老原康博、馬峰、望月慎史、西濱夏海、花田佐智代、松坂恵美子、江藤浩之、中内啓光、辻浩一郎. 第33回炎症再生医療学会、福岡、2012.
5. 同種骨髓移植後に発症した air leak syndrome の2例. 海老原康博、山本将平、望月慎史、辻浩一郎. 日本小児呼吸器疾患科学会、2012.
6. Refractory 8p11 myeloproliferative syndrome : a case report. Shohei Yamamoto, Yasuhiro Ebihara, Shinji Mochizuki, Kohichiro Tsuji.

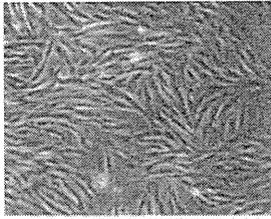
7. Toshiro Kawakita, Seiko Kato, Jun Ooi, Satoshi Takahashi, Arinobu Tojo, Junichi Watanabe, Ken Sato, Fumihiko Kimura. 第 74 回日本血液学会、京都、2012.
 8. Impaired hematopoietic differentiation of iPSCs derived from a patient with FPD/AML. Masatoshi Sakurai , Hiroyoshi Kunimoto, Naohide Watanabe, Yumi Fukuchi, Ken Sadahira, Shinsuke Yuasa , Keiichi Fukuda , Satoshi, Yamazaki , Hiromitsu Nakauchi , Yasuhiro Ebihara, Kohichiro Tsuji, Etsuro Ito , Yuka Harada , Hironori Harada, Shinichiro Okamoto, Hideaki Nakajima. 第 74 回日本血液学会、京都、2012.
 9. Acquired expression of c-Cbl Q367P mutation induces myeloid cell proliferation. Yuichiro Nakata, Takeshi Ueda, Norimasa Yamasaki, Akiko Nagamachi, Keiyo Takubo, Yasuhiro Ebihara, Toshiya Inaba, Masashi Sanada, Kohichiro Tsuji, Toshio Suda, Seishi Ogawa, Hiroaki Honda. 第 74 回日本血液学会、京都、2012.
 10. A20, a ubiquitin-modifying enzyme for NF-kappaB, plays an important role in normal hematopoiesis. Akiko Nagamachi, Takeshi Ueda, Norimasa Yamasaki, Yasuhiro Ebihara, Masashi Sanada, Kohichiro Tsuji, Toshiya Inaba, Seishi Ogawa, Hiroaki Honda.
 11. 第74回日本血液学会、京都、2012. 治療抵抗性8q11骨髄増殖症候群の1例. 山本将平、海老原康博、望月慎史、辻浩一郎.第54回日本小児血液がん学会、横浜、2012.
 12. 同種骨髄移植後に発症したair leak syndromeの2例. 海老原康博、山本将平、望月慎史、河北敏郎、加藤せい子、大井淳、高橋聡、辻浩一郎.第35回日本造血細胞移植学会、金沢、2013.
- (シンポジウムなど)
1. Takafumi Hiramoto, Yasuhiro Ebihara, Yoko Mizoguchi, Kazuhiro Nakamura, Kiyoshi Yamaguchi, Kazuko Ueno, Shinji Mochizuki, Shohei Yamamoto, Emiko Matsuzaka, Sachiyo Hanada, Masao Nagasaki, Yoichi Furukawa, Kenzaburo Tani, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Masao Kobayashi, and Kohichiro Tsuji. 第 12 回東大生命科学シンポジウム、東京、2012.
 2. 辻浩一郎 再生医療概論:体性幹細胞、ES細胞、iPS細胞とは. 再生医療における倫理講習会、東京、2013.
 3. 辻浩一郎 患者さんに役だつ iPS 細胞. 市民医療懇談会、東京、2013.
- H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）**
1. 特許取得
該当なし。

2. 実用新案登録

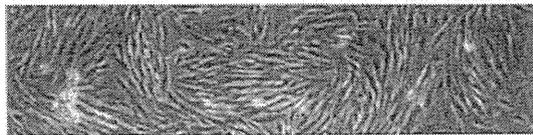
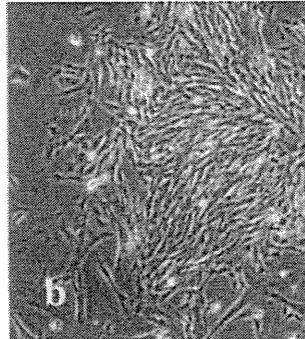
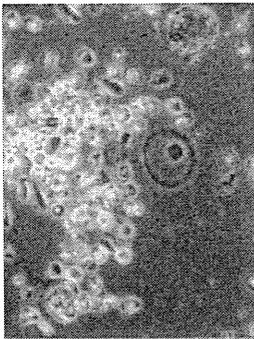
該当なし。

(資料1) 胎盤から培養された間葉系幹細胞

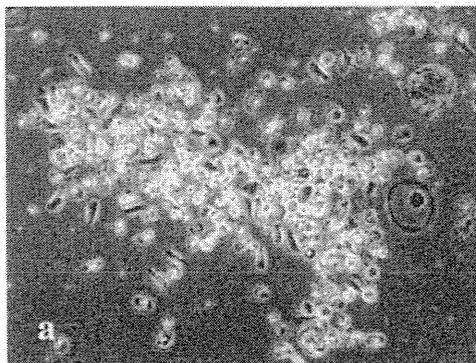
培養3週間目



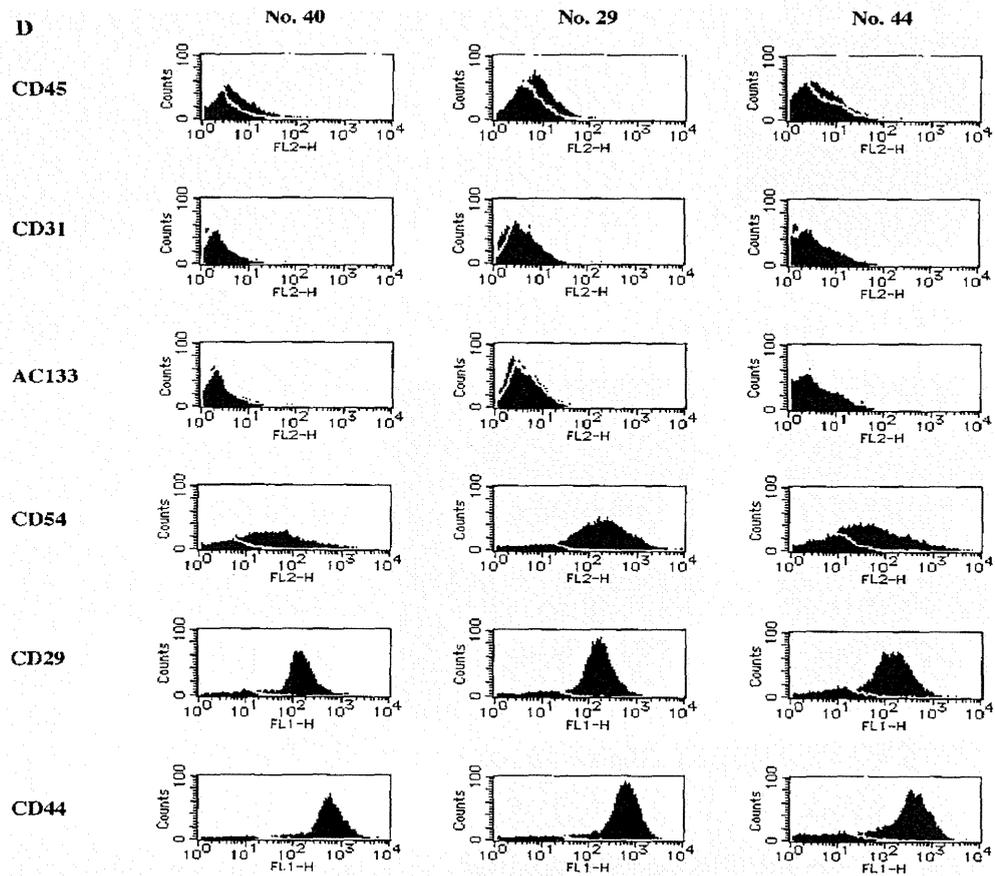
培養6週間目



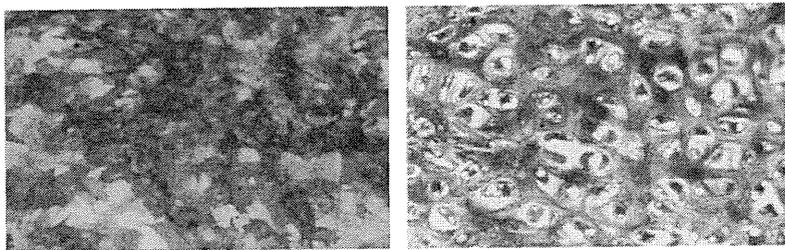
(資料2) 胎盤から培養された間葉系幹細胞で確認された Y 染色体 (FISH 法)
緑色のシグナルが Y 染色体、黄色のシグナルが X 染色体を示す。



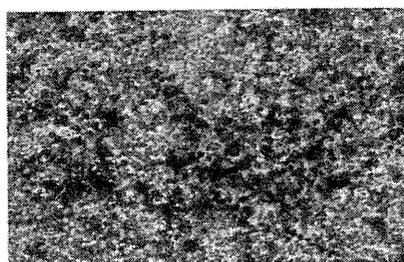
(資料3) 胎盤由来間葉系幹細胞 (3クローン) の細胞表面マーカーの解析



(資料4) 胎盤由来間葉系幹細胞の間葉系細胞への分化能



osteoblastic differentiation chondrocytic differentiation



adipocytic differentiation

臍帯由来間葉系幹細胞(hCMSC)の骨分化能解析と骨系統疾患治療への応用可能性検討
研究分担者：縣 秀樹（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・
特任助教）

研究要旨：骨系統疾患とは、骨、軟骨、靭帯などの骨格を形成する組織の成長や発達に異常をきたす疾患の総称であり、低身長、骨格の変形、運動機能異常、易骨折性を主症状とする希少疾患である。骨系統疾患に分類される疾患は現在 400 種類以上あるが、そのほとんどが遺伝子異常に起因する疾患であるため、本質的な治療は困難と考えられてきた。しかしながら、近年の細胞生物学、再生医学研究の進歩により、骨格形成に重要な細胞（間葉系幹細胞）の単離・培養が可能となったため、骨系統疾患治療の新たな切り札として他家間葉系幹細胞移植が注目を集めている。実際、代表的な骨系統疾患である骨形成不全症や低フォスファターゼ症に対して骨髄由来間葉系幹細胞(hBMMSC)移植が有効であることが報告されている。しかしながら、骨髄からの間葉系幹細胞採取は痛みや侵襲を伴うため、ドナーの安定した確保は困難であり、骨系統疾患の細胞治療を実現するには新たな細胞源の開拓が必要である。そこで、本研究では臍帯由来間葉系幹細胞(hCMSC)の骨系統疾患治療への応用可能性について検討を行うことにした。臍帯組織に間葉系幹細胞が存在することは以前から知られており、採取もドナーの肉体的負担なく行えることから、他家移植に使用する間葉系幹細胞の理想的な細胞源と考えられる。しかしながら、hCMSC の特性、特に骨分化能については不明な点が多く、骨系統疾患治療に用いるためのエビデンスは十分とは言えない。そのため、本年度は hBMMSC との比較を通じて hCMSC の骨分化能について解析を行ってきた。その結果、hCMSC は hBMMSC に比べて、より未分化な細胞であるため、hBMMSC 用の骨分化誘導培地(dexamethasone, ascorbic acid, β -glyCerophosphate, rhBMP-2 含有培地)では効率的に骨分化誘導できないことが明らかになった。今後は hCMSC に適した骨分化誘導法の開発を行っていく予定である。

A. 研究目的

本研究は、臍帯由来間葉系幹細胞(hCMSC)の骨分化能を詳細に解析し、骨系統疾患治療への応用可能性を検討することを目的とする。

B. 研究方法：

臍帯から間葉系幹細胞(hCMSC)を単離・培養し、骨芽細胞への分化能（骨分化能）を *in vitro*, *in vivo* で解析を行った(図 1)。ポジティブコントロールは、骨髄由来間葉系幹細胞(hBMMSC)を用いた。

(倫理面への配慮)

臍帯は、研究の目的、内容に関してドナー

母親の同意が得られたものを使用した。臍帯から得られた間葉系幹細胞は匿名化して使用した。

C. 研究結果

本年度は、*in vitro* での骨分化能解析を中心に行った。骨髄由来間葉系幹細胞(hBMMSC)の骨分化誘導には dexamethasone, ascorbic acid, β -glycerophosphate(DAG)添加培地での培養が有効であることが知られている(図 2 A)。そこで、まず 3 名のドナー由来の hCMSC を DAG 添加培地、または DAG+100ng/mL rhBMP2 (DAG+BMP2)添加培地で 1 週間培養し、骨分化の指標であ

るアルカリフォスファターゼ(ALP)活性の上昇について検討を行った。その結果、ALP活性の上昇は2例のhCMSCで認められたが(図2B, 2C)、その値は同条件で培養したhBMSCより有意に低かった(図2A)。続いて、全46サンプルのhCMSCのDAG+BMP2添加培地に対する反応性を解析したところ(図3)、hCMSCがDAG+BMP2添加培地でALP陽性細胞(骨芽細胞様細胞)に分化する能力には個体差があるが、その効率は一様に低いことが明らかになった(表1)。

D. 考察

hCMSCはhBMSCと異なり、DAG添加培地、またはDAG+BMP2添加培地では効率的に骨分化しないことが明らかになった。この理由は不明であるが、hCMSCはhBMSCより未分化な細胞であると考えられているため、DAG+BMP2添加培地hCMSCの骨分化誘導に適していない可能性が考えられる。そのため、次年度は活性化ビタミンD3や副腎皮質ホルモン、血小板由来成長因子などを添加することでhCMSCを効率的に骨分化させられるか検討を行っていく予定である。

E. 結論

hCMSCは他家移植に有用な間葉系幹細胞と考えられるが、骨系統疾患治療に用いるにはhCMSCの骨分化能をさらに詳細に解析し、hCMSCに適した骨分化誘導法を

明らかにする必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Agata H. Isolation of bone marrow stromal cells: cellular composition is technique-dependent. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, InTech - Open Access Publisher (Croatia), in press

2. Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H., Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, & Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *Plos One*, in press

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1. 臍帯由来間葉系幹細胞(hCMSC)の骨分化能解析方法

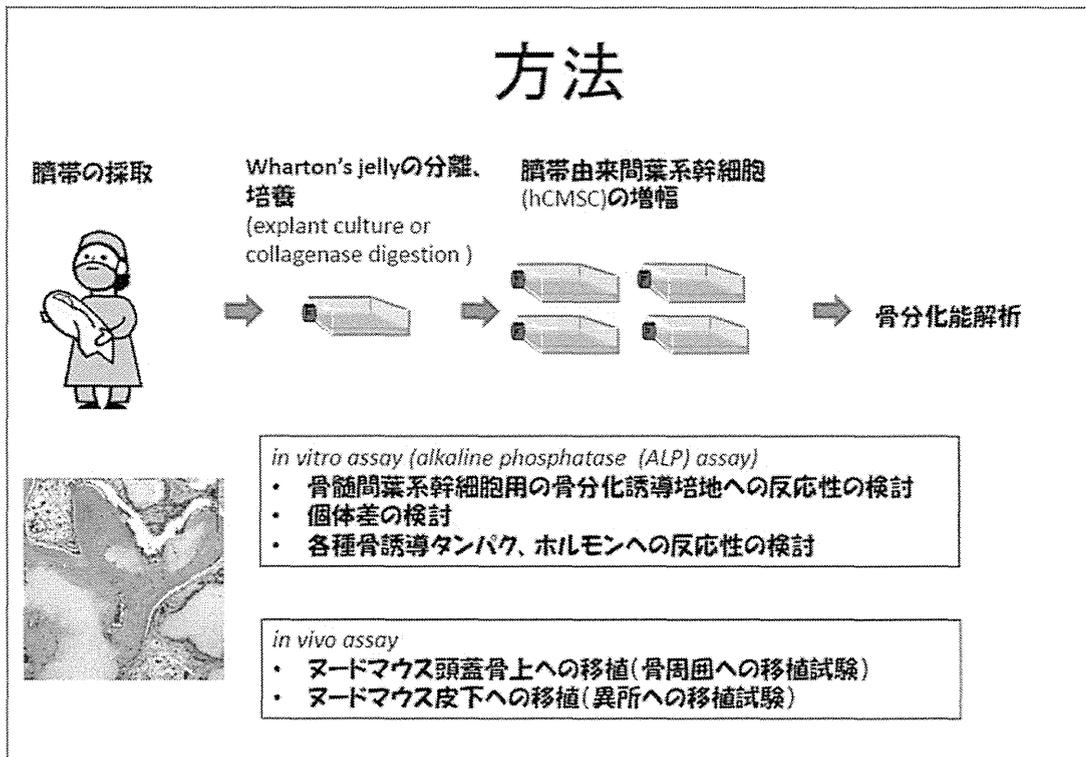


図2. 骨分化誘導培地(DAG)または骨分化誘導培地+100ng/mL rhBMP-2(DAG+BMP2)で1週間分化誘導後のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

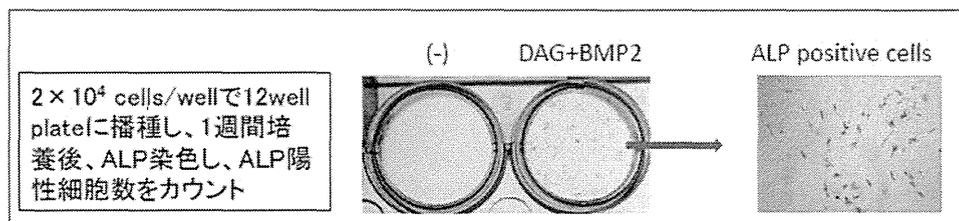
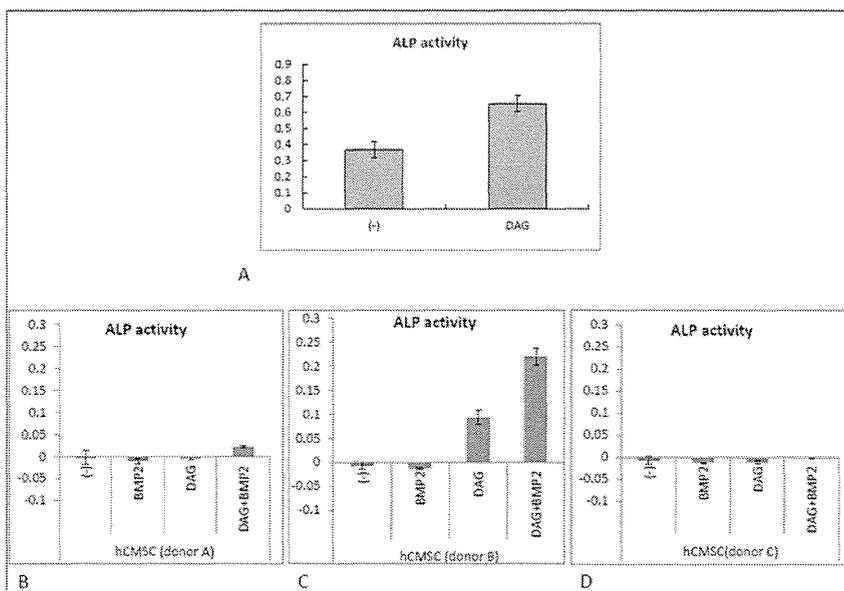


図3. ALP染色法を用いた骨分化能解析



(A)骨髄由来間葉系幹細胞(hBMMSC)のALP活性、(B-D)臍帯由来間葉系幹細胞(hCMSC)のALP活性

表 1. ALP染色法を用いたhCMSCの骨分化能解析結果

	Donor (cord No.)	Isolation technique	ALP-positive cell number in non-induction medium	ALP-positive cell number in DAG+BMP2
1	NTT-CD0002	Explant culture	0~1 cells/ well	2~3 cells/ well
2	NTT-CD0004	Explant culture	0~1 cells/ well	3~4 cells/ well
3	NTT-CD0005	Explant culture	1~2 cells/ well	20~30 cells/ well
4	NTT-CD0006	Explant culture	0 cells/ well	5~7 cells/ well
5	NTT-CD0007	Explant culture	0 cells/ well	5~6 cells/ well
6	NTT-CD0009	Explant culture	0 cells/ well	4~5 cells/ well
7	NTT-CD00010	Explant culture	1~2 cells/ well	20~25 cells/ well
8	NTT-CD00013	Explant culture	10~15 cells/ well	15~20 cells/ well
9	NTT-CD00016	Explant culture	0 cells/ well	5~6 cells/ well
10	NTT-CD00017	Explant culture	0 cells/ well	1~2 cells/ well
11	NTT-CD00018	Explant culture	0 cells/ well	1~2 cells/ well
12	NTT-CD00019	Explant culture	0 cells/ well	1~2 cells/ well
13	NTT-CD00022	Explant culture	0 cells/ well	4~5 cells/ well
14	NTT-CD00023	Explant culture	0 cells/ well	1~2 cells/ well
15	NTT-CD00024	Explant culture	0 cells/ well	3~5 cells/ well
16	NTT-CD00027	Explant culture	0 cells/ well	1~2 cells/ well
17	NTT-CD00028	Explant culture	4~5 cells/ well	15~20 cells/ well
18	NTT-CD00029	Explant culture	0 cells/ well	0 cells/ well
19	NTT-CD00030	Explant culture	0 cells/ well	2~3 cells/ well
20	NTT-CD00032	Explant culture	0~1 cells/ well	1~2 cells/ well
21	NTT-CD00033	Explant culture	100~150 cells/ well	5~10 cells/ well
22	NTT-CD00034	Explant culture	0 cells/ well	10~15 cells/ well
23	NTT-CD00035	Explant culture	5~10 cells/ well	20~25 cells/ well
24	NTT-CD00036	Explant culture	1~2 cells/ well	3~5 cells/ well
25	NTT-CD00037	Explant culture	5~10 cells/ well	15~20 cells/ well
26	NTT-CD00038	Explant culture	0 cells/ well	3~5 cells/ well
27	NTT-CD00041	Explant culture	1~2 cells/ well	10~15 cells/ well
28	NTT-CD00043	Explant culture	5~10 cells/ well	25~30 cells/ well
29	NTT-CD00044	Explant culture	0~1 cells/ well	10~15 cells/ well
30	NTT-CD00044	Collagenase digestion	0~1 cells/ well	20~30 cells/ well
31	NTT-CD00045	Explant culture	0~1 cells/ well	5~10 cells/ well
32	NTT-CD00045	Collagenase digestion	2~3 cells/ well	400~500 cells/ well
33	NTT-CD00046	Explant culture	0~1 cells/ well	40~50 cells/ well
34	NTT-CD00046	Collagenase digestion	1~2 cells/ well	20~30 cells/ well
35	NTT-CD00047	Explant culture	5~10 cells/ well	15~20 cells/ well
36	NTT-CD00048	Explant culture	0 cells/ well	1~2 cells/ well
37	NTT-CD00049	Explant culture	2~3 cells/ well	50~60 cells/ well
38	NTT-CD00051	Explant culture	2~3 cells/ well	2~3 cells/ well
39	NTT-CD00052	Explant culture	0 cells/ well	1~2 cells/ well
40	NTT-CD00053	Explant culture	2~3 cells/ well	10~15 cells/ well
41	NTT-CD00054	Explant culture	0 cells/ well	2~3 cells/ well
42	NTT-CD00056	Explant culture	1~2 cells/ well	10~15 cells/ well
43	NTT-CD00057	Explant culture	1~2 cells/ well	40~50 cells/ well
44	NTT-CD00058	Explant culture	1~3 cells/ well	50~70 cells/ well
45	NTT-CD00059	Explant culture	0 cells/ well	2~3 cells/ well
46	NTT-CD00060	Explant culture	5~10 cells/ well	40~50 cells/ well

厚生労働科学研究費補助金（難治疾患克服研究事業）
分担研究報告書

臍帯血・臍帯の品質管理と搬送システムの確立

研究分担者 幸道秀樹 献血供給事業団 東京臍帯血バンク部 部長

研究要旨

白血病などの血液学的悪性疾患の治療として臍帯血移植は広く行われており、臍帯血バンクの充実にもなって、成績も向上している。これらは、大量のドナーバンク（現在約3万の臍帯血が保管されている）と多くの必要とする患者が前提となって成立しているものである。しかるに希少疾患を対象とした臍帯血および臍帯由来細胞の利用はほとんど行われておらず、系統的資源化も行われていない。このような希少疾患に対する臍帯血資源の応用を広げるためには、二系統が想定される。すなわち患者あるいは患児自身の臍帯血細胞を利用する自家細胞治療と非血縁者の細胞を利用する同種細胞治療である。実際に治療としてもっとも可能性のあるのはすでに存在しているような臍帯血バンクのような非血縁者の臍帯血の利用であろう。

しかしながら、同種細胞の利用には免疫の壁が存在する。臍帯血は比較的その壁が低いとされているが、現在のバンクシステムのように、any donor to any patient のようにシステムではなく、this patient needs some donor cells の関係になる。この問題の解明のために、現存の臍帯血バンクの結果を応用して、臍帯血の生着に関する条件について検討した。

A. 研究目的

白血病などの血液学的悪性疾患の治療として臍帯血移植は広く行われており、臍帯血バンクの充実にもなって、成績も向上している。これらは、大量のドナーバンク（現在約3万の臍帯血が保管されている）と多くの必要とする患者が前提となって成立しているものである。

しかるに希少疾患を対象とした臍帯血および臍帯由来細胞の利用はほとんど行われておらず、系統的資源化も行われていない。このような希少疾患に対する臍帯血資源の応用を広げるためには、二系統が想定される。すなわち患者あるいは患児自身の臍帯血細胞を利用する

自家細胞治療と非血縁者の細胞を利用する同種細胞治療である。実際に治療としてもっとも可能性のあるのはすでに存在しているような臍帯血バンクのような非血縁者の臍帯血の利用であろう。しかしながら、同種細胞の利用には免疫の壁が存在する。臍帯血は比較的その壁が低いとされているが、現在のバンクシステムのように、any donor to any patient のようにシステムではなく、this patient needs some donor cells の関係になる。この問題の解明のために、現存の臍帯血バンクの結果を応用して、臍帯血の生着に関する条件について検討した。

B. 研究方法

東京臍帯血バンクにて調整・保存された臍帯血を移植された600例の血液学的悪性疾患を対象とした。すべて成人である。臍帯血の生着における各要素を解析した。年齢の中央値は49歳であり、性差なく、AML 305, ALL 109, 他の白血病 32, リンパ腫 73, MDS 81 例であった。移植された臍帯血の総細胞数は $2.52 \times 10^7/\text{kg}$, CD34 $0.79 \times 10^5/\text{kg}$ であり、CD34/TNC 0,31%であった。

C. 研究結果

1. HLA 適合度と生着

レシピエントからみたHLAの不適合度と生着の関係を図1に示す。全体的に適合度が低下する生着率も低下するような傾向が見られたが、統計学的な有意差はなかった。

2. 臍帯血の性状と生着

図2に総細胞数と生着の関係を検討した結果を示す。現在臍帯血移植の基準とされている $2.0 \times 10^7/\text{kg}$ の増減では生着に影響は見られなかった。

造血幹細胞の指標とされているCD34陽性細胞数の増減は生着に有意な影響が見られた。

米国のFDAがひとつの指標として提示しているCD34細胞数を総細胞数で除した数も生着に強い影響を与えていた。

3. 結果のまとめ

表1に示す。生着に関して統計的に有意な影響をもたらす因子はCD34とCD34/TNCであり、総細胞数や患者側の因子には影響は見られなかった。

D. 考察

臍帯血においてHLAなどの患者側の因子は重要でなく、臍帯血の因子、CD34を含む因子が非常に重要である。造血幹細胞の多くがCD34陽性の分画に含まれていることはすでに広く知られており、CD34陽性細胞数が移植後の生着率と密接に関連しているのは当然の結果である。

総細胞数には、unitにより差がおおきいが、顆粒球がほぼ半数を占めている。当然のことながら顆粒球は造血に関連はなく、顆粒球を多く含む総細胞数が生着に影響をもたらさないのはこれまでも想定できたことであった。

造血幹細胞移植のなかでも骨髄移植はHLAの制約が非常に強いことが知られている。HLAの適合度をあげればあげるほど成績はよくなることが知られており、HLAの測定法の進歩にも助けられて、最近ますますドナーの選択をするようになってきた。一方、臍帯血移植はHLAの制約がゆるいことがいぜんより知られており、その詳細な理由は解明されていない。臍帯血の方がよりniveeと言われているが、そのことですべてのことが説明されるわけではない。骨髄移植の方ではHLA-Cの重要性が高まってきているが、臍帯血移植の領域では明らかではない。幸いにもHLA-Cを測定できる環境にあるので、研究の方向性としてHLA-Cを中心に検討していく予定である。

図1. HLA 不適合度と生着率の関係

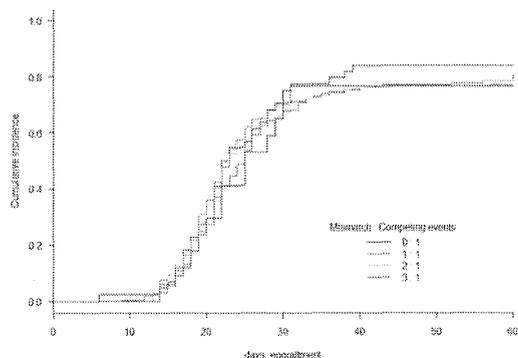
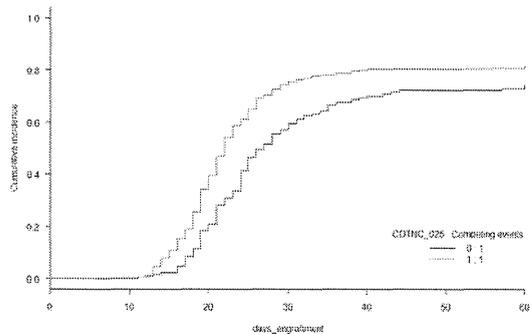


図4. CD34/TNC 0.25% で解析



$P < 0.05$

図2. 臍帯血中の総細胞数と生着率
($2.0 \times 10^7/\text{kg}$ 以上と以下にて解析)

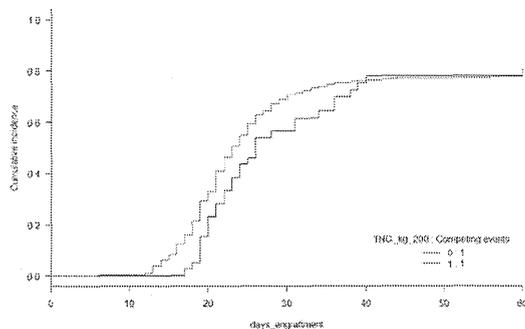
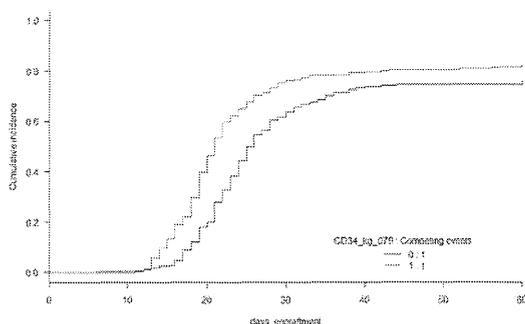


表1. 結果のまとめ

		有意差	
		なし	あり
患者側	HLA不一致度		疾患 (急性白血病は有利)
	性差		
臍帯血側	年齢 (49歳)		
	年齢 (60歳)		
臍帯血側	TNC ($2.00 \times 10^7/\text{kg}$)		CD34 ($0.79 \times 10^5/\text{kg}$)
	($2.52 \times 10^7/\text{kg}$)		($0.90 \times 10^5/\text{kg}$)
			CD34/TNC (0.25%)

東京血液内科病棟病棟委員会 東京脐帯血バンク

図3. 臍帯血中の総 CD34 陽性細胞数と生着率 (中央値 $0.79 \times 10^5/\text{kg}$ 以上と以下にて解析)



$P < 0.05$

E. 結論

生着に関して統計的に有意な影響をもたらす因子は CD34 と CD34/TNC であり、総細胞数や患者側の因子には影響は見られなかった。

F. 健康危惧情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

1. 幸道秀樹, 高橋敦子, 長村登紀子, 菅有紗, 笠根萌美, 星野茂角, 松本太郎, 表

島秀雄, 勝村秀樹 初回移植における
生着率 The rate of engraftment in the
first cord blood transplantation is higher
than those in later. 第 74 回日本血液学会
学術集会総会 2012/10/21

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

臍帯・臍帯血由来幹細胞臨床応用に必要な非臨床試験及び規制に関する研究

研究分担者 長村 文孝 東京大学医科学研究所先端医療開発推進分野教授

研究要旨: 本事業は臍帯・臍帯血由来幹細胞の難治性疾患への応用を目指している。実現のためには、間葉系幹細胞のバンキングと臨床試験実施に必要な非臨床試験の規制状況の検討である。幹細胞のバンキングは製剤化と重なる点が多い。米国では臍帯血が生物製剤として承認されており、その承認までの資料はバンキングに向けて製剤化を考える上で非常に貴重な資料となる。本年度は資料を収集し、内容の検討を開始し、その他の細胞ソースのバンキングの情報と合わせて配慮されている点をまとめ始めた。この結果、“Guidance”として発出されている内容が、どのような規制面での検討によりまとめられてきたのかという背景が明らかとなってきた。また、米国食品医薬品局(FDA)の公開情報や非臨床試験に関するセミナー及び欧州医薬品庁(EMA)の公開情報を基に非臨床試験に関する規制面での現状についてまとめた。

A. 研究目的

臍帯・臍帯血由来間葉系幹細胞を用いる再生医療による難治性疾患克服のためには細胞のバンキング体制の構築と臨床試験実施に必要な非臨床試験はどのような項目になるのかに関する規制状況の把握が必要である。本研究では特に先行する海外の規制情報の収集と解析を行い、本事業での実施を支援し、臨床として実現性を確実にすることを目的とする

B. 研究方法

情報収集は、①FDA及びEMAの法規・ガイドライン、審査資料、審査報告書等の公開資料、②関連文献、③関連セミナー・学会への出席とインタビュー、により実施する。これらを取りまとめ、バンキング化に必要な情報と検討課題を抽出し、また、臨床試験実施に向けた非臨床試験について

検討を行う。

(倫理面への配慮)

該当せず

C. 研究結果

系統的な広義の再生医療のバンキングとして最も成功しているのは臍帯血バンクである。米国においては、1989年に National Cord Blood Program として開始されたが、1992年に National Heart Lung Blood Institute/National Institute of Health のプログラムとして採用されたところから、臨床試験申請である Investigational New Drug Application に相当するか検討されてきたが、1996年には exemption に相当すると FDA から判断された。1998年には “Request for Proposed Standards – Minimally manipulated unrelated