

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) 分担研究報告書
HLA不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究

造血幹細胞移植における間葉系幹細胞による新規治療法の安全性と有効性に関する臨床研究
研究分担者 高橋 義行 (名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学 准教授)

研究要旨: 牛胎児血清の代わりにヒト由来の血小板融解産物を用いることで、より安全な骨髓由来間葉系幹細胞(MSC)の培養系を確立した。このMSCの強い免疫抑制作用、造血促進作用を利用し、移植後に見られるステロイド抵抗性GVHDの治療を目的としたMSC療法の臨床第1相試験を行った。3例めまで登録と投与が終了し、投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、3例ともに明らかな効果(下痢量の低下、ビリルビンの低下)を認めた。

A. 研究目的

同種幹細胞移植後の合併症として、ステロイド抵抗性GVHD、生着不全や拒絶は解決されていない問題であり、致死的な転帰をたどる場合が多い。近年、骨髓由来間葉系幹細胞(MSC)が強力な免疫抑制作用を有することが判明し、欧米では、ステロイド抵抗性GVHD患者に投与し、良好な成績が報告されている。しかし、従来の報告ではMSCの培養系に牛胎児血清が用いられていることからプリオン病などBiohazardの問題が指摘されている。

当科では、牛胎児血清の代わりにヒト由来の血小板融解産物を用いることで、より安全なMSCの培養系を確立した。このMSCの強い免疫抑制作用、造血促進作用を利用し、移植後に見られるステロイド抵抗性GVHD、生着不全、拒絶、ドナー型汎血球減少といった血液幹細胞移植後の致死的合併症を改善する目的としたMSC療法の臨床第1相試験を行う。

B. 研究方法

移植ドナーの血液から血液成分分離装置を用いて濃厚血小板(PC)10単位(約2000ml)を採取する。採取後、直ちに-80℃で凍結する。翌日、

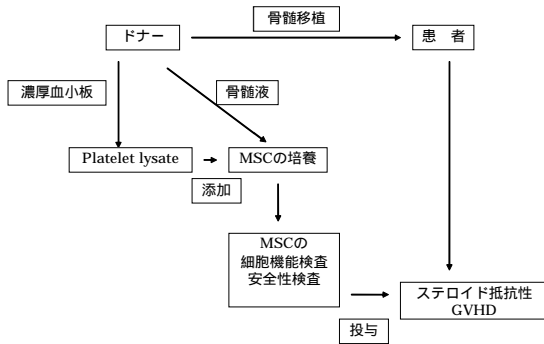
凍結した濃厚血小板を解凍して培養に用いる血小板融解産物(Platelet lysate)を調製する。移植ドナーからMSC培養用の骨髓液30mlを採取し、単核球を分離する。骨髓単核球をPlatelet lysateを添加した培養液を用いて約3週間培養することによってMSCを調製する。

細胞の調製はクリーンルームを有する細胞調製室(Cell Processing Center;CPC)内でISO13485による品質管理下で、調整工程は適正製造基準(Good Manufacturing Practice;GMP)に準拠して調製を行う。調製された細胞製剤は細胞機能検査(細胞数、表面抗原解析等)、細菌検査、ウイルス検査、エンドトキシン検査等の所定の検査に合格したことを確認する。治療は1回の治療当たり患者体重1kg当たり $1\sim 2\times 10^6$ 個のMSCを静脈内に投与する。調製された残りのMSCは凍結保存され、効果と副作用をみながら1週間毎に追加投与するかどうか決定する。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部バイオ先端臨床研究審査委員会の承認後、ドナーから文書による同意を得ておこなう。

臨床試験の概要:

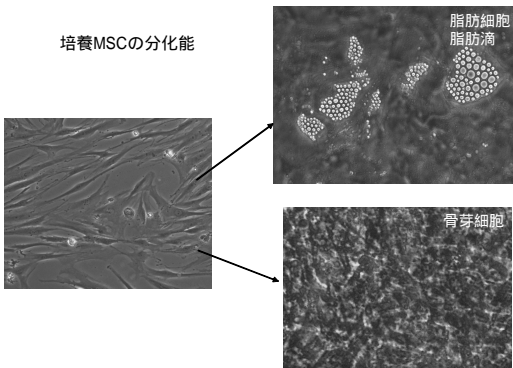


C. 研究結果

牛胎児血清を用いず血小板融解産物による培養方法で得られたヒト骨髄由来MSCは脂肪、骨芽細胞へ分化能を有し、PHAによって刺激された活性化T細胞の増殖抑制能を示した。(下図)

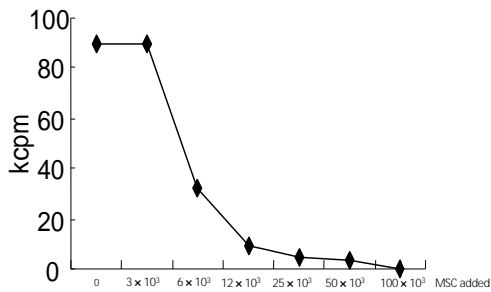
非臨床データ

培養MSCの分化能



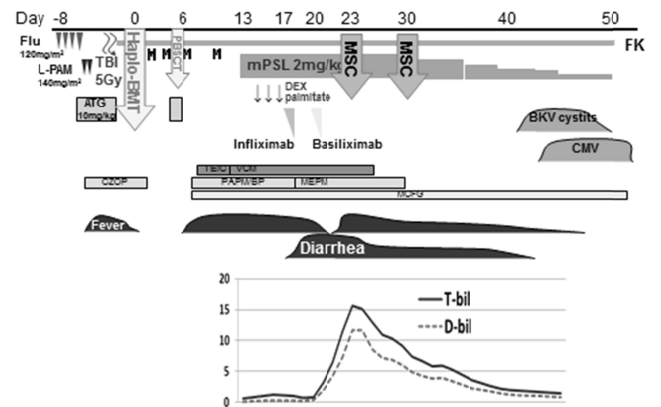
培養MSCの効力に関する非臨床データ

MSCによるPHA刺激T細胞増殖抑制試験



造血細胞移植のドナー骨髄液MSC培養を行い、ステロイド抵抗性GVHD患者3名に対しMSCの投与が終了した。投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、3例ともに明らかな臨床上的効果(下痢量の低下、ビリルビンの低下)を認めた。MSC投与後明らかな黄疸の減少を認めたGVHD 4度の症例経過を示す(下図)。

症例2: 5歳男児(RAEB, HLAハプロ一致移植)



D. 考察

骨髄移植ドナーから3-4週間の培養期間でMSCを臨床応用可能なレベルまで培養増幅することができた。

当院倫理委員会での承認後、臨床第1相試験が開始され、ステロイド抵抗性GVHDを発症した患者3名に安全に投与でき、明らかな効果を認めた。HLAハプロ一致移植などGVHDリスクの高い移植患者ではあらかじめドナーより培養し凍結しておくことが望ましいと考えられた。

E. 結論

臨床第1相試験が開始された。まだ投与例が少なく、今後さらに症例数を増やす必要があるものの、安全に投与可能であり、明らかな効果の見られた症例も認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M,

- Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H and Kojima S. Long-Term Parvovirus B19 Infections With Genetic Drift After Cord Blood Transplantation Complicated by Persistent CD4+ Lymphocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014 Jan;36(1):e65-8.
- 2) Kato M, Takahashi Y, Tomizawa D, Okamoto Y, Inagaki J, Koh K, Ogawa A, Okada K, Cho Y, Takita J, Goto H, Sakamaki H, Yabe H, Kawa K, Suzuki R, Kudo K, Kato K. Comparison of intravenous with oral busulfan in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with myeloablative conditioning regimens for pediatric acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013.Dec;19(12).1690-4.
 - 3) Lundqvist A, Smith AL, Takahashi Y, Wong S, Bahceci E, Cook L, Ramos C, Tawab A, McCoy JP Jr, Read EJ, Khuu HM, Bolan CD, Joo J, Geller N, Leitman SF, Calandra G, Dunbar C, Kurlander R, Childs RW. Differences in the Phenotype, Cytokine Gene Expression Profiles, and In Vivo Alloreactivity of T Cells Mobilized with Plerixafor Compared with G-CSF. *J Immunol*. 2013 Dec 15 ;191(12):6241-9.
 - 4) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S and Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):937-941.
 - 5) Narita A, Muramatsu H, Sakaguchi H, Doisaki S, Tanaka M, Hama A, Shimada A, Takahashi Y, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Kudo K, Furukawa-Hibi Y, Yamada K and Kojima S. Correlation of CYP2C19 phenotype with voriconazole plasma concentration in children. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013 Jul;35(5):e219-223.
 - 6) Hirabayashi Y, Takahashi Y, Xu Y, Akane K, Villalobos IB, Okuno Y, Hasegawa S, Muramatsu H, Hama A, Kato T and Kojima S. Lack of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells is associated with resistance to intravenous immunoglobulin therapy in patients with Kawasaki disease. *Eur J Pediatr*. 2013 Jun;172(6):833-837.
 - 7) Daikoku T, Saito K, Aihara T, Ikeda M, Takahashi Y, Hosoi H, Nishida T, Takemoto M, Shiraki K. Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical specimens. *Microbiol Immunol*. 2013 May;57(5):396-9.
 - 8) Shinzato A, Tabuchi K, Atsuta Y, Inoue M, Inagaki J, Yabe H, Koh K, Kato K, Ohta H, Kigasawa H, Kitoh T, Ogawa A, Takahashi Y, Sasahara Y, Kato S, and Adachi S. PBSCT is associated with poorer survival and increased chronic GvHD than BMT in Japanese paediatric patients with acute leukaemia and an HLA-matched sibling donor. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Sep;60(9):1513-9.
 - 9) Kato K, Otake H, Tagaya M, Takahashi Y, Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S and Nakashima T. Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child. *Am J Otolaryngol*. 2013 Jan-Feb;34(1):89-92.
 - 10) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R,

Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S and Japan Childhood Aplastic Anemia Study G. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. Blood. 2013 Jan 31;121(5):862-863.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2 . 学会発表

- 1) Takahashi Y, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Nakanishi K, Hama A, Kojima S. HLA haploidentical stem cell transplantation for children with aplastic anaemia in urgent need of stem cell transplantation. 39th Annual Meeting of the EBMT. Apr. 9, 2013. London, UK.
- 2) Takahashi Y, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Muramatsu H, Hama A, Kojima S. Unmanipulated HLA Haploidentical Bone Marrow Transplantation Combined With PBSC With The Options Of Donor Virus Specific CTLs and Mesenchymal Stem Cells Infusion. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. Dec.7, 2013. New Orleans, USA.
- 3) 高橋 義行、川島 希、成田 敦、坂口 大俊、土居崎 小夜子、村松 秀城、中西 康詞、濱 麻人、小島 勢二. HLA haploidentical SCT with the options of donor's virus specific CTLs and mesenchymal stem cells. 第75回日本血液学会学術集会. 2013年10月13日. 札幌.
- 4) 高橋 義行. 小児重症再生不良性貧血に対する代替ドナーからの造血幹細胞移植:HLA不一致非血縁ドナー vs HLAハプロ一致血縁ドナー . 第36回日本造血細胞移植学会総会 . 2014年3月8日 . 沖縄 .