

凝固・線溶系を介した造血回復促進法の開発

研究分担者 安藤 潔 東海大学医学部 教授

研究協力者 八幡 崇 東海大学医学部 准教授
宮田敏男 東北大学医学部 教授

- A. 研究目的：より安全で成功率の高い臍帯血移植法を実現するために、昨年度我々は造血再生を促進する働きがある線維素溶解系（線溶系）に着目し、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に取り組んだ。線溶系を抑制する PAI-1 を阻害する低分子化合物を開発し、骨髄移植モデルマウスに投与することによって、造血系の早期回復の促進と長期造血の維持が達成することを明らかにした。そこで今年度は、PAI-1 阻害剤の臍帯血移植における有効性を明らかにすることを目的とした検討を行った。
- B. 方法：超免疫不全マウスである NOG マウスに放射線（2Gy）を照射し、臍帯血より分離した CD34⁺細胞を 1×10^5 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 PAI-1 阻害剤（10mg/kg）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造血増殖因子の発現量が亢進し、ドナー由来の造血細胞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、PAI-1 阻害剤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。
- D. 考察：PAI-1 阻害剤は、造血再生因子の発現を誘導し、臍帯血造血幹細胞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、PAI-1 阻害剤の投与によって誘導されるヒト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：PAI-1 阻害剤は臍帯血を利用したヒト造血再生の促進においても有効であることが明らかとなった。

新規複数臍帯血移植法の開発

研究分担者 大津 真（東京大学医科学研究所・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. 研究目的: 臍帯血移植で特に不利とされる移植後の生着遅延は、移植関連死亡に直結する克服すべき課題である。本研究においては、十分量の造血前駆細胞を複数の臍帯血ユニットを混合することで得て早期の造血回復を可能とし、かつ共移植する単一ドナー細胞からの長期キメリズム維持とを同時に実現する、新規複数臍帯血移植法を確立することを目的とする。
- B. 研究方法: マウス造血幹前駆細胞を用いて単一ユニットでは生着不全に陥る移植モデルを作製する。次に4種類のアロ細胞と1種類のコンジェニック細胞を混合して移植し、アロ細胞が生着促進活性を有するかにつき検証する。さらに単一ユニットの幹細胞が長期の造血構築を維持し、他の混合ユニットは移植早期の造血増強のみを補完するモデルの構築を図る。これらから得た知見をもとに HLA 既知の複数の臍帯血ユニットを得て、免疫不全マウスをレシピエントに実証研究を行う。
- C. 研究結果: 4種類のアロマウスから純化したマウス造血幹前駆細胞の混合物は、拒絶方向の主要組織適合抗原ミスマッチ条件にかかわらず、同数（4種の合計）のコンジェニック造血幹前駆細胞と遜色ない早期造血促進能を示した。レシピエントにおける不利な免疫反応は観察されなかったが、意外なことにアロ細胞は長期に渡り混合キメラを形成した。しかしながら、コンジェニック細胞を全骨髄細胞として移植することで、アロ細胞からの長期キメラ形成はほぼ抑制された。重要なことに、この条件下においても、アロ細胞は移植後早期の造血を補完することが示された。
- D. 考察: 以上よりアロ細胞は、造血幹前駆細胞として移植することで、致死量照射レシピエントの早期の造血回復に寄与しうることが示された。4種類のアロ細胞の混合によっても、複雑な免疫反応は観察されず、これは T 細胞や NK 細胞といった成熟免疫細胞を移植片中に含まないことによると考えられた。コンジェニックマウス造血幹前駆細胞を、同等の造血構築能に相当する数の全骨髄細胞に置換して移植することで、アロ造血幹前駆細胞からの長期造血構築が抑制されたことから、全骨髄中にコンジェニック幹細胞からの造血を増強する活性の存在が示唆された。結果、混合するアロ細胞によって早期の造血を補完し、長期には特定ユニットによる単一のドナーキメリズムを実現、維持する移植モデルの確立が可能であった。このことからアロ細胞ユニットにおいて、1) 免疫細胞を排除し、2) 早期造血補完能を維持/増強しつつ、3) 長期再構築能は減弱/欠落するよう、細胞の分画、培養等の介入を行うことで、上記 A に掲げる目的が達成されうると期待される。
- E. 結論: マウスモデルを用いてアロ細胞の混合物は、適切な形で用いることで移植後早期の造血回復を安全に補完できる可能性を示した。今後 HLA 既知のヒト臍帯血検体を用いて、ヒト細胞による実証研究を行い、細胞調製法の至適化を経て複数の臍帯血ユニットを製剤化し、臨床応用を目指す。

新規造血幹細胞増幅法の開発に関する研究

研究分担者 岩間 厚志 千葉大学大学院医学研究院

- A. 研究目的：本研究では臍帯血造血幹細胞を体外で増幅する技術の開発を通して、臍帯血を用いた造血幹細胞移植の安全性の担保と適応の拡大を目指す。
- B. 研究方法：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、以下の研究を行う。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ールの作製。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. 研究結果：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。本化合物は合成展開が今年度終了し、MISK303 を最終産物として絞り込み、その効果とともに安全性が確認された。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 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。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。また、既に解析が進んでいる thrombopoietin receptor agonist である TCA3-1 を用いた前臨床試験の準備を進めている。
- D. 考察：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。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。また、TCA3-1 を用いた前臨床試験の準備を進行中である。

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
高橋 聡 東京大学医科学研究所・准教授
研究協力者 藤田由利子 東京大学医科学研究所・リサーチレジデント
小野敏明 東京医科歯科大学・大学院生

- A. 研究目的：造血幹細胞移植後の予後に深く関与する重篤なウイルス感染症の治療法として、予め用意された第三者ドナーからのウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を用いた治療法を開発する。
- 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、さらに詳細に検討する。また、本年は細胞傷害活性やアロ反応性を検証する。これによりまず、ウイルス特異的T細胞の概念と安全性を確立する。
- C. 結果：EBV(LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV(pp65, IE6), AdV(penton, hexon)のoverlapping peptideを用いて刺激し、さらにIL-4, IL-7で培養することにより(合計12日前後)特異的T細胞を得た。細胞は個別抄録が示すようにCD3が95%以上であり、またCD4が優位となる。現時点では5名にて解析しているがCD4/CD8比率はドナーによっても大きく異なっている。大半の細胞はCD45RO+CD62L+CCR7+のcentral memory分画にあり、一部がeffector memory分画であることが明らかになっている。それぞれの細胞は細胞内IFN γ 染色およびELISPOTアッセイで特異的T細胞の存在が明らかになっており、合計するとほぼ35%程度が特異的T細胞、一方その他が非特異的T細胞という結果であった。
- D. 考察：実際に特異的なCTLが得られたかどうかの検証には、HLA拘束性についての検討が必要であり、現在ELISPOT法を用いた検討の開始を目指している。
- E. 結論：3ウイルス特異的T細胞の樹立方法をほぼ確立した。樹立した細胞についてはその性格を明らかにし、抗原特異的に細胞傷害活性があるという証左を得つつある。無血清化やIL-4, IL-7の低濃度化、気密容器の使用など、現実的な対応策についても検討にはいり、ほぼ条件が確立しつつある。

凝固・線溶系を介した新しい造血組織再生促進及び GVHD 治療法の開発に関する研究

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：本研究では造血幹細胞移植前処置後の組織再生、及びその副作用である難治性免疫性炎症性疾患-GVHD 病態における凝固・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. 研究方法：近交系 C57BL6 マウスの脾細胞及び骨髄細胞を、全身放射線照射後の F1 ハイブリッド (C57BL6/BALB/c)F1 へと輸注し、急性 GVHD のモデルマウスを作製する。ここに昨年度までの神戸学院大学との共同研究で、新しく開発された線溶系阻害剤 Y0-2 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測定し、放射線照射、前処置の影響を含めた急性 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、そして骨髄組織再生への影響を探る。さらに昨年に続いて、各種幹細胞移植後で急性及び慢性 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、造血組織再生と線溶系との関連性を明らかにする。
- C. 研究結果：今年度までの研究で、研究代表者らは、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、アポトーシス誘導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。今年度の研究で、放射線照射を伴った 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。また、プラスミン阻害剤そのものには、造血系細胞の増殖作用、組織再生促進作用は認められなかった。
- D. 考察：急性 GVHD の病態において、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再生と傷害とのバランス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、欧米での臨床治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たすものと考えている。また今年度の研究で、プラスミン阻害剤そのものには、細胞増殖、組織再生を促進する作用は認められなかったことから、炎症性サイトカインの分泌、及びアポトーシス誘導の阻害により、組織傷害を抑制し、最終的に骨髄組織の再生に寄与するとの考えに至った。このことは、研究者らの造血因子の分泌が、線溶系亢進によってむしろ促進すること、さらに骨髄組織の再生を促進するとの昨年度までの実験結果と合致している。今後の研究で、プラスミンの阻害が、組織再生自体の抑制にどの程度影響しているか、また薬剤の至適投与量や安全性についても慎重に精査する必要があると考えられた。
- 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

臍帯血バンクの課題と将来構想

研究分担者 高梨美乃子 日本赤十字社血液事業本部

- A. 研究目的：2013年8月、本邦の臍帯血移植は累計10,000例となった。また2012年9月12日に公布された「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」に基づき、2013年10月1日、造血幹細胞提供支援機関として日本赤十字社が指定された。今年度は本法律の施行規則、法律の運用に関する指針(ガイドライン)の公布、更には各臍帯血バンクによる臍帯血供給事業者としての許可申請が予定されている。現在の臍帯血バンクの課題を整理する。
- B. 方法：昨年度に引き続き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) 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。今年度は HLA 検査取違い、凍結バッグ破損などの事故対応、バンク施設引越しのための一時的な公開停止、10 年以上経過した臍帯血の公開停止などが重なり、過去に 3 万件以上も公開臍帯血があったのが、一時 1 万 8 千件を切るまで公開数が落ち込んだ。しかしながら公開を中止した臍帯血は細胞数の小さなものが多かった。(2) 次年度にむけて承認申請を行うバンクは 7 か所と予想されている。(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。神奈川臍帯血バンク、宮城臍帯血バンクおよび東海大学さい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 か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。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比較試験を継続している。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。今後も支援機関業務として継続することが認められている。(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。欧米との基準の違いについての情報収集が必要である。
- 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) 事業運営の継続性については、今後は品質管理体制等の国による評価が要素となる。(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) 採取施設ごとの採取推進活動を確立することは長期的な目標であろう。(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、更に改善、発展することが期待される。(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注意が必要である。
- E. 結論：2014年1月には造血幹細胞移植のための法律、法律施行規則、臍帯血基準省令等が施行されることが予定されている。次年度からの新体制に向け激動の時期を迎えている。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。

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 名古屋第一日赤病院・部長
研究協力者 寺倉精太郎 名古屋大学・医員

- A. 研究目的：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と現状の問題点を明らかにする。
- B. 研究方法：非血縁者間臍帯血移植と非血縁者間骨髄移植との前方視的な比較を行うため、再発高リスク白血病患者で同種造血幹細胞移植の適応と考えられルニも関わらず、血縁ドナーの得られなかった症例を前方視的に登録し、臍帯血移植の有用性を検討するものである。登録症例の大半は非血縁骨髄移植ドナーが得られ、非血縁骨髄移植となるが、これらの症例は付随研究に移行し、後に臍帯血移植施行例と比較し、真の有用性を検討する試験計画となっている。
- C. 研究結果：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を検討するために、全国 45 施設が参加して臨床第Ⅱ相試験を実施している。予定本登録症例数 60 例のうち、2013 年 11 月末で仮登録 192 例、本登録 49 例である。登録期間は、2014 年 12 月 31 日までを予定し、現在症例登録を継続している。モニタリング検討会(2012 年 12 月 1 日開催)を行い、効果安全性評価委員に報告され、試験継続可、プロトコール修正不要との判断されたことを確認した。
- D. 考察：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(第Ⅱ相試験)の仮登録症例中、本登録して臍帯血移植を実施することができた症例は約 25%と少なかった。しかしながら、本登録できなかった症例の約半数が非血縁者間骨髄移植を実施しており、無作為化比較試験ではないが、今後、HLA 一致血縁ドナーがいない場合の代替ドナーとしての臍帯血の位置付けを明らかにすることができると考えている。症例登録の進捗状況はほぼ予定どおりであり、2014 年 12 月末までに完遂できるものと見込んでいる。
- E. 結論：「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(第Ⅱ相試験)」を完遂させ、HLA 一致血縁ドナーに代わる幹細胞ソースとしての臍帯血の位置づけを非血縁骨髄ドナーとの比較において明らかにするため、研究を進めている。

臍帯血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：Fludarabine/iv 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いる。当院における後方視的な解析では、FluBu に TBI もしくは Melphalan を加えることで安定した臍帯血生着が得られること、また FluBu4-based レジメンは高齢者ハイリスク集団に対しても、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。上記結果に基づき、現在当院において高齢者非寛解期骨髄系腫瘍を対象として、FluBu4 に Melphaln (80mg/m²) を加えた新規前処置を用いた臍帯血移植の Pilot Study が進行中である。本研究の目的は、FluBu4Mel を用いた臍帯血移植の安全性および有効性を検証することである。
- B. 方法：当院で施行した FluBu4Mel を用いた臍帯血移植 52 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 52 例の年齢中央値は 59 (19-70) 歳、HCT-CI は 3 (0-6) score であった。原疾患は AML 44 例、CML 5 例、MDS (RAEB-II) 3 例で、全例が非寛解期での移植であった。移植前処置として Fludarabine (125-180mg/m²) + iv Busulfan (12.8mg/kg) + Melphalan (80mg/m²) を用い、全例で単一臍帯血を輸注した。51 例中 46 例で好中球生着が得られ、累積好中球生着率は 90.2% であった。生着不全 5 例の内訳は、3 例が原病の早期再発、2 例が早期非再発死亡であり、拒絶はなかった。また生着例全例で移植後 28 日以内に全血および T cell 共に完全ドナー型キメリズムが得られた。2 年非再発死亡 (NRM) および再発の累積発症率は、それぞれ 23.9%, 20% であった。生存例の観察期間中央値は移植後 851 (391-2386) 日で、2 年全生存率および無増悪生存率は、共に 56.5% であった。
- D. 考察：本解析では、FluBu4Mel レジメンを用いた臍帯血移植において、高い臍帯血生着率が得られること、また高齢者非寛解期骨髄系疾患に対しても NRM を増やすことなく再発率を低下させ、優れた生存率が得られる可能性が示唆された。FluBu4Mel を用いた臍帯血移植の安全性および有効性に関する前向き試験を検討中である。
- E. 結語：FluBu4Mel レジメンは安全でかつ有効な臍帯血移植前処置になりうる可能性が示された。

移植成績の解析と臨床試験の支援・遂行に関する研究：国際共同臨床試験計画の策案

研究分担者 山口拓洋 東北大学・教授

- A. 研究目的：臍帯血移植の成績は施設間での差が大きい。前処置、GVHD 予防法の至適化がなされていないこともその一因である可能性。医科研と同じ前処置、GVHD 予防法を用いることによって、臍帯血移植成績が向上することが示唆されている一方で、GVHD 予防に用いる MTX は粘膜障害や造血抑制作用により代替薬への変更も検討課題とされている。さらに、BU を用いた非照射前処置法は、骨髄・末梢血移植では照射レジメンを上回る成績も報告されており、虎の門病院や合肥医科大学（中国）では、臍帯血移植においても良好な生着率が得られている。臍帯血移植における照射・非照射の前処置法、および CSA+MTX・MMF による GVHD 予防法の安全性と効果の評価を目的とする臨床計画を策案する。
- B. 方法：試験デザインを前向きコホート研究とした場合の臨床試験サンプルサイズを検討する。対象患者は、日本、韓国、中国の移植施設で移植を行う 12 歳以上 60 歳以下の患者で、骨髄性悪性疾患（AML、MDS、CML）および急性リンパ性白血病で病期は問わず、とする。治療計画としては、以下の前処置および GVHD 予防法の組み合わせ（A～C）の中でいずれかを選択し、臍帯血移植をおこなう。すなわち、(A) TBI+(G-CSF/) AraC+CY、および CsA+MTX、(B) TBI+ (G-CSF/) AraC+CY、および CsA+MMF (C) FLU+ BU+ MEL、および CsA+MMF、とする。
- C. 結果：主要評価項目を、生着/生着不全の割合・造血回復までの期間とし、副次的評価項目を、非再発死亡割合（1 年）、生存割合（1 年）・期間、無病生存割合（1 年）・期間、急性 GVHD の頻度と重症度、慢性 GVHD の頻度と重症度、再発割合、移植後 30 日までの粘膜障害の頻度と重症度、その他の重症有害事象（口内炎など）の種類と頻度、非再発死亡割合の施設間差の要因に関する解析、とした場合、各群 60 例（合計 180 例）となった。研究実施期間は、登録期間 2 年+観察期間 2 年とした。
- D. 考察： サンプルサイズの設定根拠としては、研究の実現可能性などを考慮し、本研究での主要な関心は、MTX 群と MMF 群との比較とした。Bolwell ら（2004）を参照に、生着（好中球増加）までの期間の中央値を MMF 群で 11 日、MTX 群で 18 日と見積もり、被験者の登録期間を 2 年、その後の追跡期間を 2 年、有意水準片側 5%、検出力 80%と仮定した場合、群あたり 53 人が必要となる。1 割程度の被験者の脱落等を考慮し、各群 60 例を目標登録者数とした。
- E. 結論：東アジアにおける臍帯血移植についての国際共同前方視的臨床試験の策案に際して、サンプルサイズの計算を行った。

VIII. 分担研究報告書

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 移植医療研究分野)
研究分担者報告書

凝固・線溶系を介した造血回復促進法の開発

研究分担者 安藤 潔 東海大学医学部血液・腫瘍内科
研究分担者 宮田敏男 東北大学大学院・医学系研究科

研究要旨

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。我々は造血再生を促進する働きがある線維素溶解系（線溶系）の働きに着目し、線溶系を阻害する PAI-1 を抑制する低分子化合物が臍帯血移植の効率を高めることを見いだした。

A. 研究目的

より安全で成功率の高い臍帯血移植法を実現するために、我々は造血再生を促進する働きがある線維素溶解系（線溶系）の役割に着目し、線溶系を阻害する PAI-1 を抑制する低分子化合物をマウス骨髄移植モデルに投与することによって、造血系の早期回復の促進と長期造血の維持が達成することを明らかにした。そこで、PAI-1 阻害剤の臍帯血移植における有効性を明らかにすることを目的とした検討を行った。

B. 研究方法

超免疫不全マウスである NOG マウスに放射線（2Gy）を照射し、臍帯血より分離した CD34⁺細胞を 1×10^5 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 PAI-1 阻害剤（10mg/kg）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. 研究結果

新規 PAI-1 阻害剤投与群は、生理食塩水投与群に比べて造血増殖因子の発現量が亢進し、ドナー由来の造血細胞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、PAI-1 阻害剤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。

D. 考察

PAI-1 阻害剤は、造血再生因子の発現を誘導し、臍帯血造血幹細胞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示した。また、PAI-1 阻害剤の投与によって誘導されるヒト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

臍帯血を利用したヒト造血再生の促進において PAI-1 阻害剤の投与が有効であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kojima M, Nishikii H, Takizawa J, Aoki S, Noguchi M, Chiba S, Ando K, and Nakamura N. MYC rearrangements are useful for predicting outcomes following rituximab and chemotherapy: multi-center analysis of Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma*, 54:2149-54., 2013 IF2.34
2. Kawada H, Kaneko M, Sawanobori M, Uno T, Matsuzawa H, Nakamura Y, Matsushita H, Ando K. High concentrations of L-ascorbic acid specifically inhibit the growth of human leukemic cells via downregulation of HIF-1 α transcription. *PLOS ONE*, 8(4), e2717, 2013, doi:10.1371/journal.pone.0062717 IF3.16
3. Harada Y, Inoue D, Ding Y, Imagawa J, Doki N, Matsui H, Yahata T, Matsushita H, Ando K, Sashida G, Iwama A, Kitamura T, and Harada H. RUNX1/AML1 mutant collaborates with BMI1 overexpression in the development of human and murine myelodysplastic syndromes. *Blood*, in press, 2013 IF10.6
4. Harkensee C, Oka A, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K and Morishima Y. Scanning of the immunogenome with microsatellite markers for non-HLA associations with graft-versus-host disease in haematopoietic stem cell transplantation. *Immunogenetics*, in press, 2013 IF2.99
5. Kojima M, Machida S, Miyamoto M, Moriuchi M, Ohbayash Y, Ando K. Deferasirox treatment improved hematopoiesis and led to complete remission in a patient with pure red cell aplasia. *Int J Hematol*, 98:719-22. 2013 IF1.16
6. Kantarjian H, Martinelli G, Jabbour E, Quintás-Cardama A, Ando K, Bay J-O, Wei A, Gröpper S, Papayannidis C, Owen K, Pike L, Schmitt N, Stockman P, Giagounidis A, on behalf of the SPARK-AML1 investigators. Stage I findings of a two-stage Phase II study to assess the efficacy, safety and tolerability of barasertib (AZD1152) compared with low dose cytosine arabinoside in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*, in press, 2013 IF3.16
7. Ogawa Y, Suzuki K, Sakai A, Iida S, Ogura M, Tobinai K, Matsumoto M, Matsue K, Terui Y, Ohashi K, Ishii M, Mukai H, Ando K, Hotta T. A phase I/II study of VMP (bortezomib-melphalan-prednisolone) for previously untreated patients with multiple myeloma in Japan. *Cancer Sci*, in press, 2013 IF3.9
8. Okuyama K, Ikawa T, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K,

- Gertner B, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. *Proc Nat Acad Sci.* in press, 2013 IF9.43 136.
- Murayama H, Matsushita H, Ando K. Atypical chronic myeloid leukemia harboring NUP98-HOXA9. *Int J Hematol*, 98,143-144, 2013 IF1.16
9. Ogawa Y, Ogura M, Suzuki T, Ando K, Uchida T, Shirasugi Y, Tobinai K, Lee JW, Kase M, Katsura K, Hotta T. A phase I/II study of ofatumumab (GSK1841157) in Japanese and Korean patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Hematol*, in press, 2013 IF1.16
 10. Kikuchi T, Tokunaka M, Kikuti Y, Carreras J, Ogura G, Takekoshi S, Kojima M, Ando K, Hashimoto Y, Abe M, Takata K, Yoshino T, Muto A, Igarashi K, Nakamura N. Over-expression of Bach2 is related to ongoing somatic hypermutation of the immunoglobulin heavy chain gene variable region of de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology International*, 63,339-344, 2013 IF1.7
 11. Muroi K, Miyamura K, Ohashi K, Murata M, Eto T, Kobayashi N, Taniguchi S, Imamura M, Ando K, Kato S, Mori T, Teshima T, Mori M, Ozawa K. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cell for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. *Int J Hematol*. 98,206-213, 2013 IF1.16
 12. Ohnishi H, Sasaki H, Nakamura Y, Kato S, Ando K, Narimatsu H, Tachibana K. Regulation of cell shape and adhesion by CD34. *Cell Adhesion & Migration*, Volume 7, Issue 5. 2013 141. Ohgiya D, Machida S, Tsuchiya T, Ichiki A, Amaki J, Aoyama Y, Kawai H, Miyamoto M, Murayama H, Onizuka M, Ando K. Strong effect of mogamulizumab on splenic residual disease of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann Hematol*. 2013 IF2.91
 13. Kanakura Y, Ohyashiki K, Shichishima T, Okamoto S, Ando K, Ninomiya H, Kawaguchi T, Nakao S, Nakakuma H, Nishimura J, Kinoshita T, Bedrosian CL, Ozawa K, Omine M. Long-term efficacy and safety of eculizumab in Japanese patients with PNH: AEGIS trial. *Int J Hematol*. 2013 in press IF1.16
 14. Ibrahim AA, Yahata T, Takanashi T, Hiyama K, Onizuka M, Dan T, van Ypersele de Strihou C, Miyata T, and Ando K. Inhibition of plasminogen activator inhibitor type-1 activity enhances rapid and sustainable hematopoietic regeneration. *Stem Cells* 2013 Oct 24. doi:10.1002/stem.1577. IF7.7
 15. Ogura M, Ishida T, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, Fujimoto K, Yamamoto K, Miyamoto T, Uike N, Tanimoto M, Tsukasaki K, Ishizawa K, Suzumiya J, Inagaki H, Tamura K, Akinaga S, Tomonaga M, Ueda R. Multicenter phase II study of

- mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-CCR4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2013 in press IF17.8
16. Suzuki T, Yamauchi T, Ando K, Nagai T, Kakihana K, Miyata Y, Uchida T, Tabata Y, Ogura M. Phase I Study of Clofarabine (JC0707) in Adult Japanese Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) in Japan. *JJCO* 2013 in press
17. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Noji H, Kitamura K, Eto T, Ando T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama T, Hase M, Li L, Johnson K, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y. A Rare Genetic Polymorphism in C5 Confers Poor Response to the Anti-C5 Monoclonal Antibody Eculizumab by Eleven Japanese Patients with PNH. *New Eng J Med.* 370, 632-639. 2014 IF51.66
18. Miyamoto M, Onizuka M, Machida S, Toyosaki M, Amaki J, Aoyama Y, Kawai H, Sato A, Hayama N, Ogawa Y, Kawada H, Ando K. ACE deletion polymorphism is associated with a high risk of non-infectious pulmonary complication after stem cell transplantation. *Int J Hematol*, 99(2):175-83, 2013 IF1.16
19. Ogura M, Ando K, Suzuki T, Ishizawa K, Oh SY, Ito K, Yamamoto K, Au WA, Tien HF, Matsuno Y, Terauchi T, Yamamoto K, Mori M, Tanaka Y, Shimamoto T, Tobinai K, Kim WS. A Multicenter Phase II Study of Vorinostat in Patients With Relapsed or Refractory Indolent B-cell Non-Hodgkin Lymphoma or Mantle Cell Lymphoma. *Brit J Haematol*, in press, 2013 IF4.50
20. Katakami N, Kunikane H, Takeda K, Takayama K, Sawa T, Saito H, Harada M, Yokota S, Ando K, Saito Y, Yokota I, Ohashi Y, Eguchi K. Prospective study on the incidence of bone metastasis and skeletal-related events in patients with stage IIIB and IV lung cancer-CSP-HOR13. *J Thorac Oncol.* In press, 2013 IF4.47
21. Yamakawa N, Okuyama K, Kanai A, Helwak A, Takamatsu M, Ogata J, Takakura K, Chanda B, Kurosaki N, Yamamoto H, Ando K, Matsui H, Inaba T, Kotani A. Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago 1. *Nucleic Acid Research*, in press, 2014 IF7.48
- Negishi N, Ito R, Irie N, Matsuo K, Suzuki D, Yahata T, Nagano K, Aoki K, Ohya K, Hozumi K, Ando K, Tamaoki N, Ito M, Habu S. Effective expansion of engrafted human hematopoietic stem cells in bone marrow of mice expressing human Jagged-1. *Exp Hematol*, in press, 2014 IF3.4
2. 学会発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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 移植医療研究分野)
研究分担者報告書

新規複数臍帯血移植法の開発

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克服すべき課題である。造血回復の促進には移植幹前駆細胞の数を増やす手法、すなわち幹細胞増幅が試みられているが、その成績は必ずしも満足できるものではない。次なる手段として、複数の臍帯血ユニットの混合が考えられるが、5単位までの混合でも良い成果は得られていない。本研究は、真に臨床応用可能な複数臍帯血移植の確立を目指し行った。平成25年度は、マウスモデルを用いた移植研究により proof-of-concept を得ることに成功した。ここから得られた知見をもとに既にヒト臍帯血を用いた基礎的検討を開始しており、平成26年度には、さらなる確証を得て本目的に合致したヒト臍帯血の加工法を確立し、臨床研究への展開を試行する予定である。

A. 研究目的

臍帯血移植で不利とされる移植後の生着及び造血回復の遅延は、移植関連死亡に直結する課題である。本研究においては、複数の臍帯血ユニットを混合し十分な数の造血前駆細胞を得ることで、早期の造血回復と、共移植する単一ドナー細胞からの長期キメリズム維持とを同時に実現する、安全性、有効性に優れた新規複数臍帯血移植法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

純化したマウス造血幹前駆細胞を用いて単一ユニットにおける生着不全を模倣した不全移植モデルを作製する。次に4種類のアロ細胞と1種類のコンジェニック細胞を混合して移植し、アロ細胞であっても生着促進活性を有するかにつき検証する。さら

に単一ユニットの幹細胞が長期の造血構築を維持し、他の混合ユニットは移植早期の造血回復のみを補強するモデルを構築する。これらから得た知見をもとに HLA 既知の複数臍帯血ユニットを用いて、免疫不全マウスをレシピエントにヒト細胞での実証研究を行う。

C. 研究結果

アロ抗原の異なる4系統のマウスから純化したマウス造血幹前駆細胞の混合物は、拒絶方向の major ミスマッチ条件でありながら、同数(4種の合計)のコンジェニック造血幹前駆細胞と同等の早期造血促進能を示した。アロ抗原の異なる複数の細胞の移植でもレシピエントにおける不利な免疫反応は観察されなかった。しかしながら長期にはコンジェニック由来造血に収束する

との予想に反し、アロ細胞が様々な割合で混合キメラを形成した。興味深いことにコンジェニック細胞を全骨髄細胞として移植することで、上記のアロ細胞による長期混合キメラ形成はほぼ完全に抑制された。移植するコンジェニック全骨髄細胞数を減じて、不全移植モデルとした場合においても、コンジェニック造血への収束と、アロ混合造血幹前駆細胞による移植後早期の造血補完が確認された。

D. 考察

以上よりアロ細胞は、造血幹前駆細胞として移植することで、致死量照射レシピエントの早期の造血回復に寄与しうることが示された。4種類のアロ細胞の混合によっても、複雑な免疫反応は観察されず、これはT細胞やNK細胞等の成熟免疫細胞を移植片中から除去したことによると考えられた。コンジェニック細胞を造血幹前駆細胞として共移植すると、アロ細胞の造血幹前駆細胞と長期に渡り混合キメラを維持することは意外であった。しかしながら、コンジェニック細胞を全骨髄細胞として移植することで、アロ細胞からの長期造血構築が抑制され、コンジェニック造血に収束したことから、全骨髄中に同系統の幹細胞造血を補強する活性の存在が示唆された。

以上から、混合するアロ細胞が早期の造血を補完し、長期には特定ユニットからの単一ドナーキメリズムを実現、維持する移植モデルの確立に成功し、上記Aに掲げる目的を達成するための proof-of-concept を得た。

E. 結論

マウスモデルを用いてアロ細胞の混合物が、適切な形で用いることで移植後早期

の造血回復を補完できる可能性を示した。今後 HLA 既知のヒト臍帯血検体を用いて、ヒト細胞による実証を行い、細胞調製法の至適化、複数の臍帯血ユニットの製剤化を実現し、臨床応用を目指す

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther* 2013;21:1424-1431.
2. Saka K, Kawahara M, Teng J et al. Top-down motif engineering of a cytokine receptor for directing ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Biotechnol* 2013;168:659-665.
3. Saito T, Yano F, Mori D et al. Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. *PLoS One* 2013;8:e74137.
4. Razak SR, Ueno K, Takayama N et al. Profiling of microRNA in human and mouse ES and iPS cells reveals overlapping but distinct microRNA expression patterns. *PLoS One* 2013;8:e73532.
5. Nishimura S, Manabe I, Takaki S et al. Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation. *Cell Metab* 2013.
6. Lin HT, Otsu M, Nakauchi H. Stem cell therapy: an exercise in patience and prudence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;368:20110334.
7. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K et al. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 2013;92:431-438.
8. Kon A, Shih LY, Minamino M et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*

2013;45:1232-1237.

9. Hirose S, Takayama N, Nakamura S et al. Immortalization of Erythroblasts by c-MYC and BCL-XL Enables Large-Scale Erythrocyte Production from Human Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Reports 2013;1:499-508.
10. Hirata S, Takayama N, Jono-Ohnishi R et al. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. J Clin Invest 2013;123:3802-3814.
11. Hamanaka S, Ooehara J, Morita Y et al. Generation of transgenic mouse line expressing Kusabira Orange throughout body, including erythrocytes, by random segregation of provirus method. Biochem Biophys Res Commun 2013;435:586-591.

2. 学会発表

1. Translation of stem cell science from bench to bedside.
Makoto Otsu
First International Medi-Bio Symposium of SIMS-IMSUT-WIS. 2013, Asan, Korea.
2. Pleiotropic nature of hematopoietic stem cell responses to an inflammatory niche environment.
Makoto Otsu.
The 2nd Joint Global COE Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE, The Univ of Tokyo and Chiba Univ Global COE. 2013, Tokyo.

G. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：造血幹細胞移植用の組合せ細胞製剤および生着促進剤並びにこれらの製造方法

- 1、分類：製剤、製法
- 2、出願国：日本
- 3、出願日：2013年10月10日
- 4、出願番号：特願2013-213024
- 5、出願人：国立大学法人東京大学

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 移植医療研究分野)
研究分担者報告書

新規造血幹細胞増幅法の開発

研究分担者 岩間 厚志

所属 千葉大学大学院医学研究院

研究要旨

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 TCA3-1 と MISK303 の造血幹細胞に対する活性を、*in vitro* の培養系と免疫不全マウスへの移植の系において詳細に検討した。今後、臨床応用に向けた前臨床試験を開始する予定であり、それに向けたサイトカインの組み合わせや培養液などの最適化を推進中である。

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. 研究方法

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. 研究結果

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の中で、既に合成展開により最適化が終了したトロンポポイチン受

容体アゴニスト TCA3-1、ならびに作用標的分子は未だ同定されていないが、活性が確認されている 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、TPO、FLT3L を加えて 14 日間培養後、免疫不全マウスに移植したところ、MISK303 添加群において機能的な造血幹細胞が約 5 倍に増加していることが確認された。また、MISK303 に加えて、既に効果が報告されている AhR アンタゴニストである低分子化合物 SR1 を加えたところ、造血幹細胞は 10 倍に増加していることが確認された。TCA3-1 については造血幹細胞の増幅率を現在検証中である。また、これらの低分子化合物を用いた臨床試験を実施するために、サイトカインの組み合わせや培養液などの最適化を推進中である。

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。本化合物は合成展開による化合物の最適化が終了し、現在はその作用標的分子の検索を行っ

ている。TCA3-1については造血幹細胞増幅率をいち早く定量し、MISK303とともに、臨床応用に向けた基礎的検討をいち早く終了したい。

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。TCA3-1に関しては現在検証中である。次年度上半期までにはこれらの解析を終了し、臨床応用に向けた標準プロトコール作製の準備を開始する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nakajima-Takagi Y, Osawa M, and Iwama A. Manipulation of hematopoietic stem cells for regenerative medicine. (Review) **Anat Rec** 297:111-120, 2014.

Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H and Iwama A. The Tif1 β -Hp1 system maintains transcriptional integrity of hematopoietic stem cells. **Stem Cell Reports** 2:145-152, 2014.

Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, and Iwama A. Concurrent loss of *Ezh2* and *Tet2* cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. **J Exp Med** 210:2627-2639, 2013.

2. 学会発表

岩間 厚志 (2012) 「ヒストン修飾による造血幹細胞の機能制御」シンポジウム「幹細胞の転写制御、エピジェネティック制御」第33回日本炎症・再生医学会 7月5日6日 (福岡)

Iwama A. (2013) Role of polycomb proteins in hematopoietic stem cells and myeloid malignancies. Stem Therapy Minisymposium at Lund University. May 8 (Lund, Sweden)

岩間 厚志 (2013) Regulation of hematopoietic stem cells by histone modifications. 第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞系譜とエピゲノムダイナミクス」12月(神戸)

Oshima M, Miyagi S, Koide S, Suzuki Y, Iwama A. (2013) Genome-wide mapping of histone modifications mediated by the polycomb-group complexes in fetal liver and adult bone marrow hematopoietic progenitor cells. 42nd Annual Scientific Meeting of the ISEH. August 22-25 (Vienna, Austria, Netherlands) (Poster)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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 移植医療研究分野)
研究分担者報告書

ウイルス特異的細胞性免疫療法に関する研究

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・リサーチレジデント
	小野敏明	東京医科歯科大学・大学院生

研究要旨

臍帯血移植後合併症としてウイルス感染症は未だ大きな位置を占め、有効な治療法が欠如するウイルスが多いこと、治療薬がある場合でも長期薬剤投与による耐性獲得、費用対効果などが解決を要する問題となっている。共同研究施設である Baylor 医科大学で開発を進めている 3 種類のウイルスに対する特異的 CTL 療法の技術を導入し、樹立方法の検証を行った

A. 研究目的

化学療法薬や造血細胞移植療法が高度に複雑化する中、感染症対策は重要な課題になっている。特に造血細胞移植後の CMV, EBV, HHV6 などのヘルペス属ウイルスに加え、BKV, AdV などによる重篤なウイルス感染症は予後に深く関与する。化学療法に依存する現行の感染症治療では、移植後のような免疫学的再構築が不十分な場合、長期投与による耐性や再発などが問題となっている。世界的には、様々なウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞治療が移植医療に導入されており、多種ウイルス特異的 CTL 療法も治療や予防として実践されている。ドナー由来ウイルス特異的 CTL 療法は、HLA 不一致であっても grade II 以上の GVHD 頻度は極めて低く、安全かつ有効な治療として認識されている。また医療経済的にも有利との試算や報告もある。一方、作成に時間がかかる問題点があり、その対策として迅速培養法が開発されつつあり、更には CTL バンクの

樹立も模索されており、第三者からの CTL を安価かつ容易に樹立し、保存しておくことができれば必要時に、あるいは臍帯血移植、非感染ドナーからの移植レシピエントに投与することが可能であり、既に米国における探索的研究ではその安全性も検証されつつある。わが国においてもウイルス特異的 CTL 療法の導入・検証と展開が求められており、我々は長期抗ウイルス薬使用の抑制、耐性ウイルス増加要因の抑制による移植成績の向上を目指して、多ウイルス特異的 T 細胞療法の開発と臨床への導入を目指して本研究を進めている。

B. 研究方法

我々は Baylor 医科大学で開発を進めている 7 種類のウイルスに対する多種ウイルス特異的 CTL 療法の技術を導入し、樹立方法の検証を開始した。多ウイルスの多種類の peptide mixture を用いて抗原刺激とし、さらにサイトカインにて増幅する方法であり、手法の最適化によりウイルスフリーかつ遺伝子導入不要で、短期間で投与可能な技