

## Ⅱ. 分担研究報告

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

臍帯血・臍帯由来 MSC の分離培養・凍結方法の確立とバンキングの研究

研究代表者 長村登紀子 東京大学医科学研究所 講師

研究要旨：本研究は、臍帯血及び臍帯由来間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells: MSC）を免疫細胞療法や再生医療等製品として難治性疾患に臨床応用することを目的とし、製剤化とバンキングの検討を行った。昨年に引き続き、臍帯由来 MSC の製剤化とバンキングにおいては、効率的分離培養方法・凍結方法と製剤化に必要な品質検査について検討した。分離培養方法では、臍帯の初期培養である explant 法を独自のデバイスで改良し、これまでよりも短期間に安定した細胞数が得られるようになった。また臍帯組織ごと凍結し、解凍後も新鮮と遜色なく MSC を回収できたことより追跡調査と初期コスト削減が可能となり、よりバンキング化しやすい体制が整った。製剤化に関しては、PMDA の薬事戦略相談（事前面談 2 回）や厚労省関連部署との相談を経ながら、手順書の作成と品質保証項目について検討を行い、院内審査委員会に臍帯採取と保管に関する申請を行った。

#### A. 研究目的

臍帯血は造血細胞ソースとして、臍帯は MSCs のソースとして注目されている。一方で、臨床応用のための系統的資源化（バンキング）のためには、GMP に準じた品質管理システムの構築が欠かせない。しかし、臍帯由来 MSCs(UC-MSCs)の分離・培養・凍結方法は未だ確立されていない。本研究では臍帯血・UC-MSC の分離培養・凍結方法やバンキングシステムを検討し、品質管理された製剤化を目指すことを目的とする。その過程で、医薬品医療機器総合機構（PMDA）に薬事戦略相談（事前面談）を受けることにより、早期に再生医療等製品としての承認を目指す。

これまで臍帯からの MSCs の分離培養方法について主に 2 つの方法、細切した組織片をディッシュに張り付ける explant 法と組織片をコラゲナーゼで処理する Collagenase

法がある。両者で有意差はなかったことから、我々は異種タンパクであるコラゲナーゼを用いない方法である explant 法を導入した。しかし、Explant 法においては、張り付いた組織片から細胞(MSCs)が遊走してくるため、組織片が浮遊した場合には、細胞が十分回収できない欠点があった。平成 25 年度は組織浮遊を防ぐことを目的として、ステンレス製のメッシュを検討開発した。

さらに、臍帯組織には、現在分離できない幹細胞が含まれている可能性があること、目的とする細胞が将来変わる可能性があること、培養液等の費用が高いことを考慮し、臍帯の一部を臍帯組織ごと凍結が可能かについても種々の凍害保護液を用いて検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 臍帯の処理方法の検討

臍帯受取後：臍帯を受取後、重さ、長さを測定後、50ml チューブに入れる。臍帯を入れたチューブに抗生剤入りPBS（抗真菌剤、抗生剤を加えて浸し、冷蔵庫で数時間置く。乾熱滅菌した

鉤つき鑷子とメスでみじん切り（約 1-2mm 程度）にする。

Explant 法：細かい間隔で細切した臍帯組織を組織培養用ディッシュ(Primaria, BD, CA) に貼り付ける。組織片が、Dish に貼りついた時点で、45 分間半濁きにして組織片を培養皿に貼り付ける。その後初期培養液で 37 度 CO<sub>2</sub> 5% で培養を開始する（図 1）。7 日毎に培養液を交換する。なるべく組織がはがれないように注意する。剥離すると細胞が遊走できず、その組織片からは MSCs が回収できない。

改良 explant 法：同様に組織上記組織がディッシュから剥離するのを防ぐ目的でステンレス製のメッシュ(cellamigo®)を組織片の上からかぶせて、すぐに培養液を注いで培養を開始した（図 1）。培養皿が semiconfluent になった時点でトリプシン処理して細胞を回収した。cellamigo の有無の検討では、cellamigo 群の細胞回収時にコントロール群（cellamigo 無し）も細胞を回収し細胞数、表面マーカー等を比較した。

さらに、臍帯組織には、現在分離できない幹細胞が含まれている可能性や目的とする細胞も将来的に変わる可能性、培養液等の費用が高いことを考慮し、臍帯の一部を臍帯組織ごと当該保護液に浸した後に凍結した。2 週間以上気相式窒素タンクで凍結保管した後、解凍し、細切した後に上記 cellamigo を用いた改良 explant 法にて分離培養した。

## 2. フローサイトメトリー

BD MSC 用抗体キットまたは必要に応じて市販の蛍光色素抗体を用いて、CANTO II にて測定し、Flow-Jo にて解析した。

## 3. 臍帯血と臍帯由来 MSC の安全性検査

臍帯血・臍帯由来 MSC の安全性検査として、表 1 に掲げる項目について検討した。

## 4. 臍帯組織の凍結

臍帯は PBS で抗菌処理後に 15cm 径培養ディッシュに取り出し、ディスポーザブルメス(メス)と鉤付き鑷子を用いて 5cm 分を初期培養用に取り分け、残りは血管に沿って臍帯を開き 2cm ごとに切り、凍害保護液(ステムセルバンカー®、日本全薬工業)に所定の時間浸した後に、緩徐に凍結した。凍結後は、気相式窒素タンクに移動して管理し、2 週間以上開けて改良 explant 法にて組織を播種した。

## 5. 混合リンパ球反応 (MLR)

臍帯血単核細胞または末梢血単核球を GM-CSF、IL4 にて 5 日間培養し、さらに TNF $\alpha$  にて 2 日間処理して成熟樹状細胞 (mDC) を得た。MLR は、抗 CD3 モノクローナル抗体を添加した 24 ウェル培養皿中で CFSE 標識 T 細胞と 50Gy 照射した上記準備した mDC を UC-MSc 添加の有無にて 4 日間共培養した後、フローサイトメトリーにて T 細胞の CFSE 輝度を観察した。

## 6. 染色体検査

UC-MSCs の安全性試験の一つとして working cells レベル(P3)の培養細胞の染色体検査 (外注) を実施した。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム倫理審査委員会承認の「臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化 (バンキング) とその応用に関する研究」ヒトゲノム倫理委員会承認 No. 24-53) にもとづいて実施した。

臍帯血・UC-MSCs の製剤化・バンキングおよび非臨床研究を含んだ基礎的検討を行うに当たっては、既に東大医科研および採取施設の倫理審査委員会の承認を得ている(ヒトゲノム倫理審査委員会承認 No. 24-53)。臨床用の細胞採取調製保存に関しては、H26年4月の東大医科研治験審査委員会(承認 No. 26-2)にて承認されている。なお、UC-MSCs の製造に当たっては、MSCs の安全性と品質検証のために、家族歴、問診票、感染症、HLA 検査、染色体検査、その他必要に応じてゲノム解析等、個人の病態に関与する検査・検討を含む。従って、同意書のヒトゲノム解析や遺伝子解析に関して「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に従い、ヒトゲノム倫理審査委員会および採取施設の倫理審査委員会に申請し、実稼働させる予定である。今回の承認範囲は臨床用細胞採取調製保存であり、臨床試験は含まれていない。本研究においては、可能な限り臨床用に製造した本製剤を用いて、非臨床試験を実施する。

一方、臍帯血・臍帯に付随する個人情報は採取施設にて ID (1<sup>st</sup> ID) を付与し、個人情報および ID が東京大学医科学研究所(東大医科研) 搬送され、符号化 (2<sup>nd</sup> ID)

され連結可能匿名化した。さらに研究使用するには 3<sup>rd</sup> ID を付与して個人情報の流出を防ぐ体制を整え実施した。その他、「個人情報保護法」および「臨床研究に関する倫理指針」に関する事項はこれを遵守して実施した。

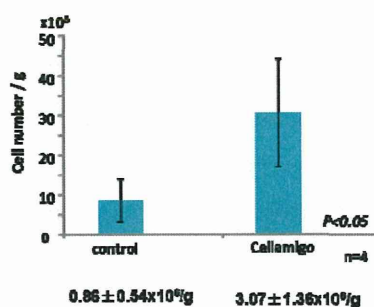
## C. 研究結果

### 1. 改良 Explant 法の検討

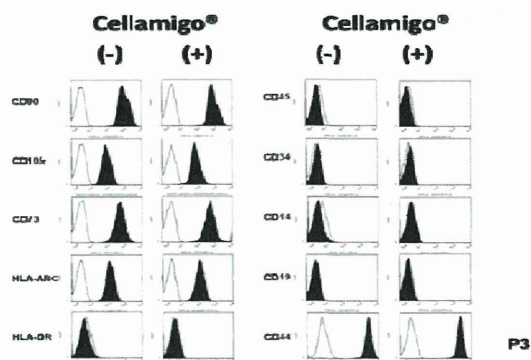
Cellamigono の有無にて臍帯の初期培養を行い、cellamigo 有の群で  $3.07 \pm 1.4 \times 10^6$  無しの群で  $0.86 \pm 0.5 \times 10^6$  (n=4) が得られた(図 2A)。得られた細胞は cellamigo の有無で特に差はなく、CD105+CD73+ CD90+HLA class I+ CD45-HLA-DR<sup>-</sup> (図 2B) を呈した。

図 2. Explants 法における Cellamigo® の有無の比較

#### A. 回収した細胞数/g



#### B. 表面マーカー



## 2. 臍帯組織の凍結

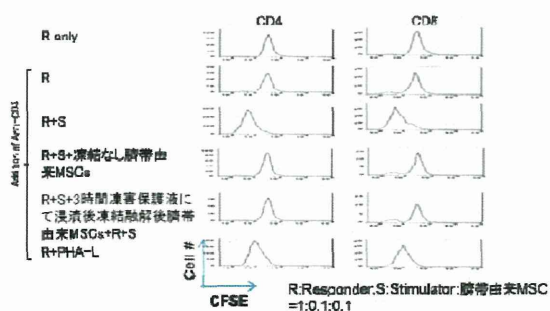
凍害保護液に浸漬後に凍結し、2週間以上凍結保管した後に解凍した臍帯組織から、新鮮臍帯に比較し同等またはそれ以上の生細胞数が得られた。なお、凍害保護液なしでは全く生細胞は得られなかった。

表 1. 臍帯組織の凍結・解凍後に改良 explant 法を実施した際の回収細胞数比

	Ratio versus fresh tissue without freezing (n=3)
Fresh*	1
Frozen-thaw without cryoprotectant	0±0
Frozen-thaw with cryoprotectant	1.26±0.31

得られた細胞は、CD105<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup>CD90<sup>+</sup>HLA class I<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>を呈し、同種 MLR 抑制能および分化能についても新鮮臍帯由来 MSC との差は認めなかった。また、凍結臍帯から、新鮮臍帯と同等またはそれ以上の MSCs の増殖能が認められたことは、凍結融解による何らかの増殖因子等の溶出が示唆された。また *in vitro* 同種リンパ球混合反応において、3<sup>rd</sup> party (ドナー) 臍帯由来 MSCs は、臍帯組織凍結の有無に関わらず、リンパ球 (CD4 および CD8 T 細胞) の増殖抑制効果を示した(図 3)。

図 3. 臍帯組織凍結後の臍帯・MSC による MLR リンパ球増殖抑制効果



## 3. 臍帯血と臍帯由来 MSC の品質管理項目の設定

臍帯血と臍帯由来 MSC の製剤化にあたり、品質項目の設定を行った。品質項目および全体フローは図 4 の通りである。なお、P3 培養中の染色体検査を行い、問題なく染色体分析ができることが分かった (n=3)。

また、PMDA と 2 回にわたり、薬事戦略相談 (事前相談) を受けた。1 回目は臍帯および臍帯血からの製剤化の流れと、医師主導治験を経た承認申請への流れと規制上の問題点について、研究者から説明と協議を行った。2 回目は主として細胞調製施設に関しての相談を行った。調査対象品目、製造所概要、GMP 組織図、配置図、図面、製造・品質管理に関する資料、バリデーション(機器)等治験約 GMP 準拠の資料の準備と運用実績を重ね、次年度には実地調査を前提として対面助言を行うこととした。

## D. 考察

本研究では、臍帯血・臍帯バンキングを目指して特に UC-MSC の効率的な分離培養・臍帯凍結方法を検討した。改良 explant 法では、培養開始までの作業時間の短縮と培養期間の短縮が得られ、効率的に MSCs が得られるようになった。本方法は異種タンパクであるコラゲナーゼが不要であり、分離培養に導入しやすい。さらに、臍帯は組織ごと凍結が可能となったことは、トレーサビリティと原材料の保存の面からも非常に有用である。また疾患特異的臍帯の保管等への応用も可能であり、多様性のあるバンキングが可能と考えられた。

なお、PMDA との薬事戦略相談(事前相談)での課題は多いが、企業の参入や資金面

の確保も含めて項目ごとに戦略を立てていく必要がある。

#### E. 結論

臍帯血と臍帯 (UC-MSCs) はバンキングが可能であり、臨床応用が期待されるソースである。

#### F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、臍帯血・臍帯に伴うドナーへの健康上の問題は生じていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nagamura-Inoue T., and He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility, *World J Stem Cells* 2014, 6,195-202
- 2) He H. Nagamura-Inoue T., Tsunoda H., Yuzawa M., Yamamoto Y., Yorozu P., Agata H., Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Eng Part A*. 20,1314-24,2014
- 3) Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, Takahashi S, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in

adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol*. 25,435-41.,2014

- 4) Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Mori T, Kobayashi H, Nakaseko C, Yamagata N, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with BM, peripheral blood or umbilical cord blood: an analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplant*. 49, 355-60,2014
- 5) Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 49,228-35,2014
- 6) Kanamori H, Mizuta S, Kako S, Kato H, Nishiwaki S, Imai K, Shigematsu A, Nakamae H, Tanaka M, Ikegame K, Yujiri T, Fukuda T, Minagawa K, Eto T, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Suzuki R, Sakamaki H, Tanaka J. Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for patients aged 50 years or older with B-cell ALL in remission: a retrospective study by the Adult ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 48,1513-8,2013
- 7) Murata M, Nakasone H, Kanda J, Nakane T, Furukawa T, Fukuda T, Mori T,

- Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Hino M, Inoue M, Ogawa H, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Yabe H, Morishima Y, Sakamaki H, Suzuki R. Clinical Factors Predicting the Response of Acute Graft-versus-Host Disease to Corticosteroid Therapy: An Analysis from the GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19,1183-9, 2013
- 8) Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, Fukuda T. Recent decrease in non-relapse mortality due to GVHD and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-remission acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 48, 1198-22, 2013
- 9) Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M. A case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.; GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Transpl Int.* 26, 631-9, 2013
- 10) Nakasone H, Kurosawa S, Yakushijin K, Taniguchi S, Murata M, Ikegame K, Kobayashi T, Eto T, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Suzuki R, Fukuda T. Impact of hepatitis C virus infection on clinical outcome in recipients after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol.* 88,144-6, 2013
- 11) Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Onishi Y, Aotsuka N, Nagamura-Inoue T, Kato K, Kanda Y. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Haematologica.* 98,814-22, 2013.
2. 学会発表  
(国内)
- 1) 何海萍, 長村登紀子, 角田肇, 東條有伸ら. SSEA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs, 臍帯由来間葉系幹細胞における SSEA4 発現の意義について, 第75 日本血液学会学術集会総会 (北海道) 2013/10/11
- 2) 長村登紀子, 内丸薫、高橋聡、大井淳、加藤せい子、河北敏郎、大野伸広、湯地晃一郎、東條有伸, 当院における輸血後鉄過剰症診療の現状 Current Clinical Practice in Post-transfusion Iron Overload in IMSUT Hospital, 第75 日本血液学会学術集会総会 (北海道) 2013/10/12

- 3) 長村登紀子、岸野光司、上村知恵、造血細胞移植に必要な細胞処理・検査に関する技術講習会；こんな時どうする？ Q and A テクニカルセミナー第 61 回日本輸血・細胞治療学会(横浜)2013/5/16
- 4) 長村登紀子、何海萍、東條有伸、臍帯由来間葉系幹細胞の分離とその応用について 第 34 回日本炎症・再生医学会(京都) 2013/7/2 (海外)
- 1) H He., T Nagamura-Inoue, H Tsunoda, Y Yamamoto, Y Mori, and A Tojo, The Immunosuppressive Effect Of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells *in vitro*, ASH in Asia, Singapore, 2014/3/29
- 2) H He., T Nagamura-Inoue, H Tsunoda, Y Yamamoto, Y Mori, and A Tojo, The Immunosuppressive Effect Of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells *in vitro*, 55<sup>th</sup> ASH annual meeting, New Orleans 2013/12/8
- 3) R. Tanosaki, Y. Okuyama, T. Iseki, M. Handa, S. Kino, T. Kumazawa, S. Yoshida, K. Haraguchi, N. Schimizu, S. Sakai, N. Watanabe, T. Uemura, K. Ikuta, Y. Kawahara, K. Muroi, T. Nagamura-Inoue, M. Takanashi, for the HPC Study Group, the Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy (JST-MCT), ASH meeting, New Orleans 2013/12/7,
- 4) H. Itonaga, M. Iwanaga, K. Aoki, J. Aoki, K. Ishiyama, T. Kobayashi, T. Sakura, T. Fukuda, T. Yujiri, M. Hirokawa, Y. Morishima, T. Nagamura-Inoue, Y. Atsuta, T. Ishikawa, Y. Miyazaki. Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelomonocytic leukemia, New Orleans, 2013/12/7,
- 5) Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Kobayashi S , Yuzawa M, He H, Tsunoda H, and Tojo A. Impact of mTOR inhibitor, Everolimus on inducible regulatory T cells Derived from Cord Blood, International Society of Cellular Therapy (ISCT) Annual meeting, New Zealand, 2013
- 6) Nagamura-Inoue T, Kodo H, Quality Control for New type of Cord Blood/ Cord Bank for HSCT and others, WS-1, AisaCORD 2013, Kobe, Japan. April 2013
- 7) Nagamura-Inoue T, He H, and Tojo A. Wharton jelly is a rich source of mesenchymal stem cells Symposium 2-2, AisaCORD 2013, Kobe, Japan. April 2013
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
- 4) 長村 登紀子、森 有加、大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎 発明の名称：生体組織切断用抑え具，出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願，出願日：2013/10/02 特許 2013-006923



5) 長村 登紀子、森 有加、大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎、出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願、発明の名称：培養組織剥離防止プレート 出願日：2013/10/04 特許 2013-209095 および登録商標；cellamigo®、セルアミオーゴ®

佐瀬 孝一 出願人：国立大学法人東京大学 日本全薬工業との共同出願、発明の名称：臍帯組織の凍結保存方法、特許出願日：2013/12/27, 特願 2013-273536

2. 実用新案登録なし

6) 長村 登紀子、森 有加、島津 貴久、

図1. 臍帯からの MSCs の分離培養とその効率化

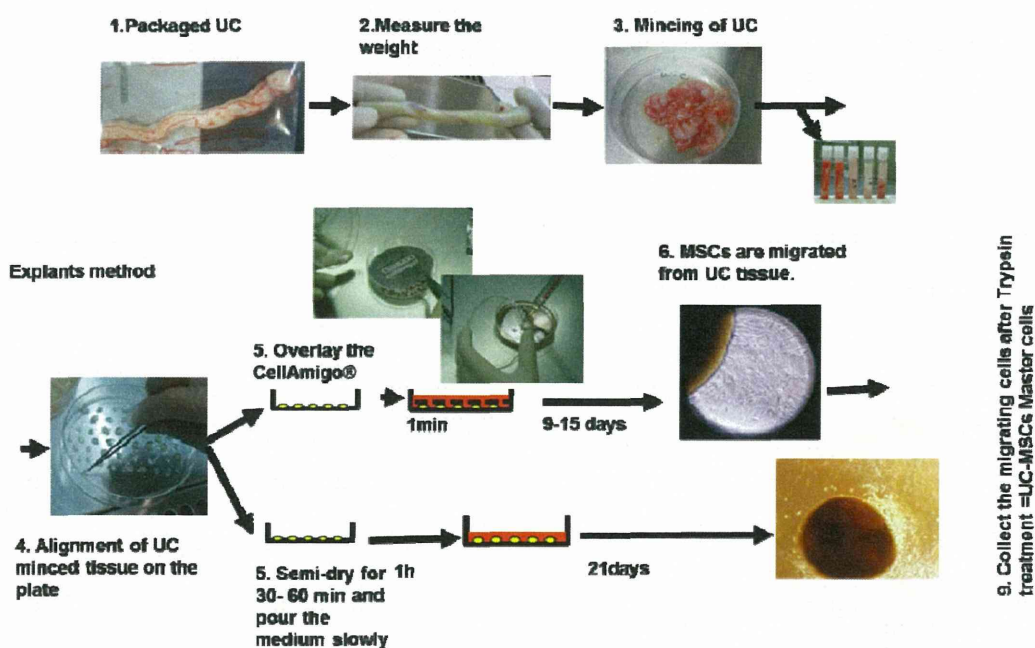
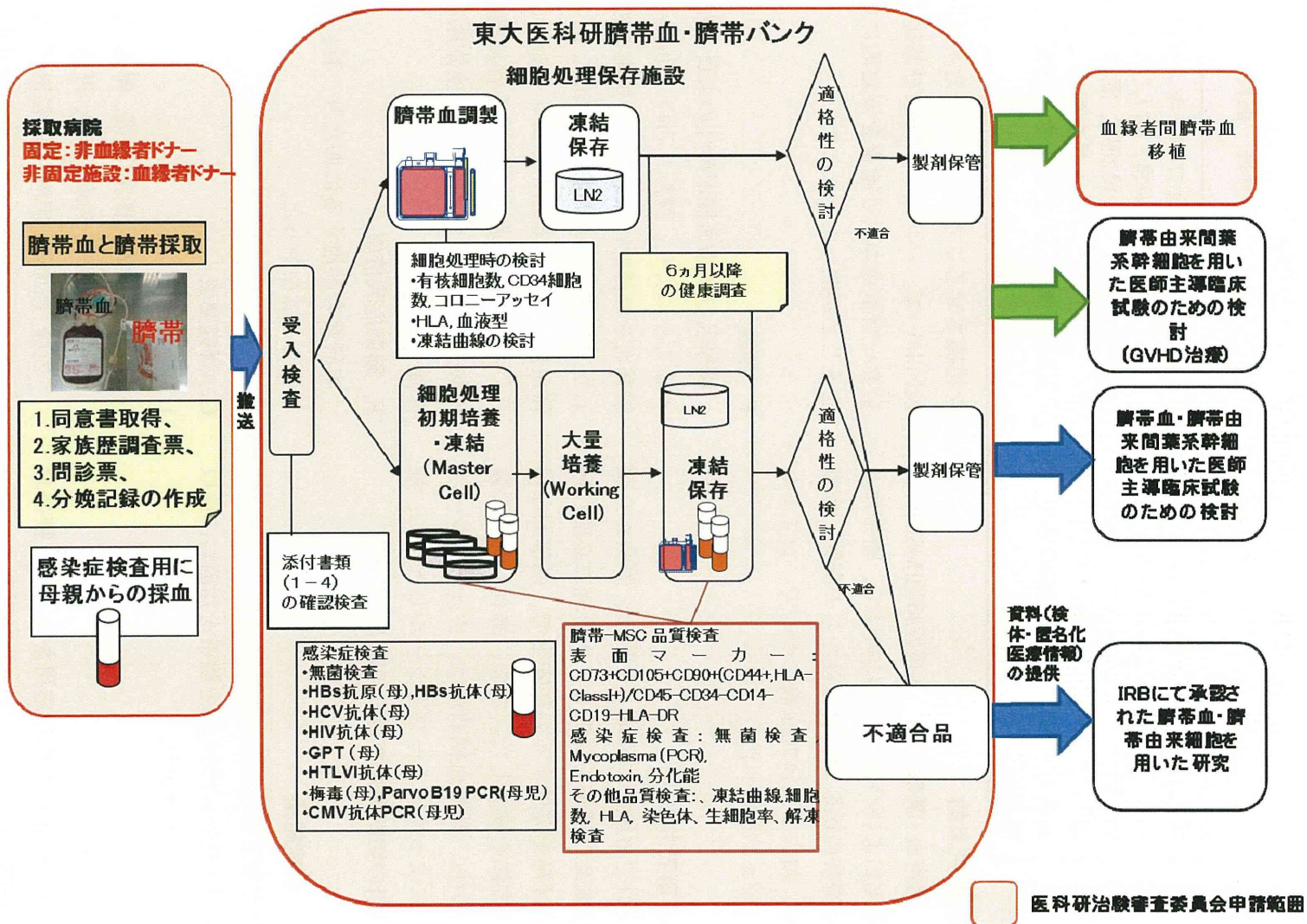


図4. 臍帯血・臍帯採取・細胞処理保存・検査・出庫までのフローチャート



臍帯血と臍帯の効率的採取方法の研究

研究分担者 角田 肇 NTT 東日本関東病院分娩部 部長

研究要旨：臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞(MSC)の製剤化およびバンキングに向けて、臍帯血及び臍帯の採取および母親からの問診、家族歴、および分娩記録について、シミュレーションを行った。予定帝王切開分娩前に、問診票、家族歴について聴取し、手術後、臍帯及び臍帯血採取専任の人員を配置し、臍帯と同時に胎盤娩出後に平均100ccの臍帯血を無菌的に採取できる技術を確認した。

**A. 研究目的**

臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞(MSC)の製剤化およびバンキングに向けて、臍帯血及び臍帯の採取および母親からの問診、家族歴、および母体血採取について、シミュレーションを行った。

**B. 研究方法**

当科で分娩時に採取した胎盤、臍帯から臍帯血及び臍帯を採取し、本研究に必要な研究材料を提供するのに安全で、効率的な採取方法を検討した。なお、針刺し防止の観点から、臍帯血採取後は、チューブシーラーによってチューブをシールした後に、採取針の切断廃棄を行う手順とした。

**C. 研究結果**

予定帝王切開分娩において、安定して十分量（約100ccの臍帯血と臍帯を無菌的に採取することができた。

**D. 考察**

希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化とその応用に関する研究には、安定的な臍帯血及び臍帯の採取が極めて重要である。採取者

を待機させることにより、予定帝王切開分娩において、バンキングおよび基礎研究に必要な臍帯血および臍帯を安定的に供給できることが明らかとなった。

**E. 結論**

臍帯及び臍帯血採取専任の人員を配置することにより、臍帯と同時に100ccの臍帯血を無菌的に採取できる技術を確認した。母親からの問診、家族歴、および母体血採取を追加したシミュレーションにより、臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞(MSC)の製剤化およびバンキングの検体採取手順を確認した。

**F. 健康危険情報**

本研究を実施するにあたり、特に問題となることはなかった。

**G. 研究発表**

1. 論文発表

- 1) 上野山 麻水, 喜多川 亮, 朝見 友香, 小島 美奈子, 佐藤 歩美, 近藤 一成, 佐藤 奈加子, 忠内 薫, 杉田 匡聡, 角田 肇. 当院における子宮平滑筋肉腫に対するドセタキセル/ゲムシタピン療法. 産科と婦人科. 80,657-661,2013.

- 2) He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P., Agata H., Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Engineering, Tissue Eng Part A*. 20,1314-24,2014
2. 学会発表  
(国内)
- 1) 何海萍, 長村登紀子, 角田肇, 東條有伸ら. SSEA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs, 臍帯由来間葉系幹細胞におけるSSEA4発現の意義について, 第75日本血液学会学術集会総会(北海道) 2013/10/11
- 2) 戸澤 晃子(聖マリアンナ医科大学産婦人科学), 清野 重男, 白山 岳史, 小林 則子, 田中 京子, 角田 肇, 仲村 勝, 高松 潔, 鈴木 直, 青木 大輔. 細胞診における精度管理と標準化にむけて 子宮頸部細胞診における精度管理 自動スクリーニング支援装置の有用性. 第52回日本臨床細胞学会, 2013/11/3(大阪)
- 3) 田中 京子, 清野 重男, 白山 岳史, 小林 則子, 角田 肇, 鈴木 直, 戸澤 晃子, 高松 潔, 仲村 勝, 青木 大輔. 子宮頸部病変検出における自動スクリーニング支援装置と手動鏡検との比較検討., 第54回日本臨床細胞学会春季総会2013/5/31 (東京)  
(海外)
- 1) H He., T Nagamura-Inoue, H Tsunoda, Y Yamamoto, Y Mori, and A Tojo, The Immunosuppressive Effect Of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells *in vitro*, ASH in Asia, Singapore, 2014/3/29  
H He., T Nagamura-Inoue, H Tsunoda, Y Yamamoto, Y Mori, and A Tojo, The Immunosuppressive Effect Of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells *in vitro*, 55<sup>th</sup> ASH annual meeting, New Orleans 2013/12/8
- 2) Nagamura-Inoue T, Yamamoto Y, Kobayashi S, Yuzawa M, He H, Tsunoda H, and Tojo A. Impact of mTOR inhibitor, Everolimus on inducible regulatory T cells Derived from Cord Blood, International Society of Cellular Therapy (ISCT) Annual meeting, New Zealand, 2013

分担研究報告書

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。そのための間葉系幹細胞のバンキングを設立し、臨床試験実施のための非臨床試験の規制状況の検討が必要となる。間葉系幹細胞のバンキング形成では、細胞調製と出庫のステップがあるので、製剤化の概念を導入する必要がある。このため、各国規制情報の収集と検討を行い、製剤化の方針、規格等について研究代表者と共に定め、医薬医療機器総合機構に医師主導治験で用いる製剤としての開発を前提として事前面談にて相談を行った。相談内容は、初回はバンキングの方針と各医師主導治験との関連及び開発方針であり、2回目は細胞調整施設の要件あるいは査察について信頼性保証部と行った。これにより今後の規制対応について目処をつけることができた。

**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のための非臨床試験はどのように実施すべきかに関する規制状況の把握が必要である。本研究では国内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、臨床応用に結びつけることを目的とする

**B. 研究方法**

- ① 医薬品医療機器総合機構（PMDA）、米国FDA及びEMA等の規制当局の発出している法規・ガイドライン、審査報告書等の資料あるいは学会等での資料の収集と解析
- ② PMDAとの薬事戦略相談を通して、臍帯・臍帯血バンクの構築に向けた規制対応を行う。  
(倫理面への配慮)

公開情報の収集と解析あるいは規制当局対応なので特に倫理面での配慮を必要としない。

**C. 研究結果**

- ① 各国の規制当局の公開資料と米国における臍帯血製剤の情報あるいは学会における規制当局担当者との議論を基に、細胞製剤としての規格の概要及び製造工程について研究代表者と概要の決定を行った。バンキングについては諸外国ではプライベートバンクが先行して実施されているが、特に欧州ではアカデミアを中心に整備が始まっており、EMAの積極的な支援も始まっている。
- ② 医師主導治験を難病に対して実施し、それに必要な製剤としての承認を目指すものの、そのためには知財権の獲得が必要である。その観点から研究代表者と協議を行い、特許出願への方向を導いた。

③ 医師主導治験実施のための製剤化・バンキングについてPMDAとの薬事戦略相談・事前面談を実施した。これにより生物由来原料基準の確認等の必要資料作成に向けての助言を得て、対面助言に向けての準備を行うこととした。また、細胞調整施設に関しても薬事戦略相談の枠組の中で治験薬GMP準拠製造に問題がないか、設備・構造あるいは人的組織・手順書の整備の観点から助言を得ることとした。

#### D. 考察

臍帯のバンキングについては、臍帯全体の組織として保存するのか、ワルトンジェリー周囲の細胞を分離して保存するのか、どちらが優れているのか世界的にコンセンサスは得られていない。現在のところ細胞を分離し、マスターセルバンクを形成することを念頭に研究を進めているが、今後の情勢によっては両者に対応出来るよう対応を進めていく必要があると考えられる。また、これまでの研究により、難病に対する医師主導治験の実施と、そのために必要とされる製剤の規制要件の両者を満たして進展させることができると考えられる。

研究成果の学術的・国際的・社会的意義については、難病に対する再生療法あるいは免疫抑制療法の治療細胞ソースとして世界的にバンク化が進められているが、知財権を確保しており、国際競争力も有すると考えられる。

#### E. 結論

世界的に注目される臍帯由来間葉系幹細胞の細胞製剤とその保存に関する標準は

定まっておらず、規制要件を満たしつつ、効率的で知財の観点からも競争力が求められるが、そのための要件を整えてきていると考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1) 国内

###### 論文発表

長村文孝 米国 FDA における抗がん剤の審査 医薬品・医療機器 承認取得のためのデータ・情報の取得とまとめ方 技術情報協会 (印刷中)

###### 学会発表

長村文孝 細胞療法への臨床試験支援組織の取り組み～免疫療法を中心として 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会

藤田由利子、小野敏明、落合央、Ann M Lee、長村文孝、高橋聡、森尾友宏 実臨床応用に向けたウイルス特異的細胞障害性 T 細胞療法の開発 第 5 回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会

M Nojima, Y Aoki, H Yasui, R Maruyama, E Yamamoto, H Asaoku, T Tokino, F Nagamura, T Ishida, K Imai, Y Shinomura, H Suzuki 多発性骨髄腫における LINE-1 異常低メチル化と臨床遺伝子学的特徴の相関 第 72 回 日本癌学会学術総会

##### 2) 海外

###### 論文発表

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. <i>Transplant Infect Dis</i> 15:181-6, 2013.	2 実用新案登録 なし
	3 その他 なし
<b>H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）</b>	3.その他
1 特許取得	なし
なし	

分担研究報告書

難治性疾患患者の臍帯血と臍帯採取システムの開発

研究分担者：森尾友宏 東京医科歯科大学大学院 准教授

研究要旨：原発性免疫不全症の診断と検体の資源化の体制を整備し、確立することを目的として、PIDJ ネットワークを通じて相談及び依頼を受けた患者について、PIDJ database への登録を行い、免疫細胞亜群解析、B/T 新生能測定、候補遺伝子解析を実施した。2013 年 10 月までに 159 件の検体が集積した。これは全国の免疫不全症相談症例の内の約 27%であり、年間 20 名程度の新規登録があり、全国的には 100 例程度の発症と予想された。遺伝形式が明らかなものはこの 2/3 程度であり、遺伝様式を鑑みると、今後の資源化については、ヘテロ異常や正常者を含めた資源となることが予想される。今後より優れた治療法や理想的な診断手法の開発や、責任遺伝子探索には、モデル細胞の使用が重要であり、臍帯及び臍帯血由来細胞の資源化は重要である。

A. 研究目的

原発性免疫不全症の診断と検体の資源化の体制を整備し、確立することを目的とした。具体的には東京医科歯科大学に紹介される原発性免疫不全症患者のうち、特に治療などの上で検体の資源化が必要なものを策定することを目的とした。

B. 研究方法

PIDJ ネットワークを通じて相談及び依頼を受けた患者について、PIDJ database への登録を行い、また免疫細胞亜群解析、B/T 新生能測定、候補遺伝子解析を実施した。これらの内、今後新規患者の発生の可能性があるものについて検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では、遺伝子解析や免疫担当細胞の機能解析を実施するため、東京医科歯科大学医学部遺伝子解析に関する倫理審査委員会の承認を得て、十分な説明の元、同意を得て研究を実施した。

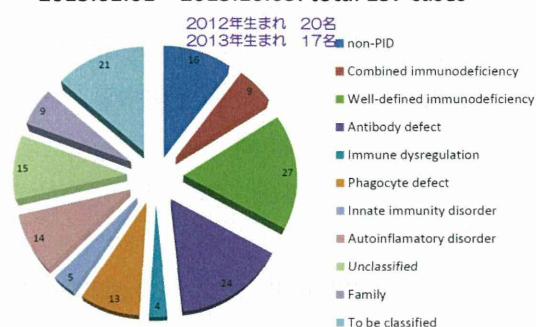
C. 研究結果

2013 年には 10 月までに 159 件の検体が集積した。これは全国に集まる免疫不全症相談症例の内の約 27%をしめている。これ

らの患者について、説明と同意の上、責任遺伝子解析を実施した（理研、かずさ DNA 研究所との共同研究）。図 1 に示すように、特徴的な所見を呈する免疫不全症や、抗体産生不全症が 1 位、2 位を占めた。

図 1：紹介患者の内訳

TMDU小児科へのconsultation:  
2013.01.01 – 2013.10.03: total 157 cases



これらの患者のうち、2012 年生まれは 20 名、2013 年生まれは 17 名であり、年間では当該施設だけでも約 20 名程度の新規原発性免疫不全症の登録があり、全国的には 100 例程度であろうと予想される。一方、遺伝形式が明らかなものはこの 2/3 程度であり、遺伝様式を鑑みると、今後の資源化については、ヘテロ異常や正常者を含めた



資源となることが予想される。

#### D. 考察

原発性免疫不全症は稀少疾患であり、年間の発症率は 10 万に対して 100 名程度とされている。その中で責任遺伝子が未知のものも多い。治療法としても根治的治療法として造血細胞移植や遺伝子治療が行われるものがある中、γグロブリン補充や対症療法が行われるものもある。今後より優れた治療の開発には、モデル細胞の使用、特に iPS 細胞の樹立などが重要になる。より理想的な診断手法の開発や、責任遺伝子探索と言った点からも、臍帯及び臍帯血由来細胞の資源化は重要である。原発性免疫不全症は本研究がその成果を発揮する 1 つのモデル疾患となりうるものと考えている。

#### 評価

##### 1) 達成度について

当初の目標であった、原発性免疫不全症の詳細な集計が実施された。一部の疾患については既に末梢血からの iPS 細胞樹立などに進んでいるが、今後は臍帯血・臍帯からの資源化に進む時期である。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

原発性免疫不全症においては国際的にもデータベース化が進んでいるが、臍帯血や臍帯の資源化が行われるということは、世界にも類をみない試みであり、診断法開発、治療開発、病態解明の点からも意義が高い。

##### 3) 今後の展望について

検討により、資源化を図るべき難治性疾患の一部である原発性免疫不全症について、今後の資源収集の目安がついたと考えてい

る。今後は遺伝診療医、小児科医、産婦人科医、事務局が連携して、資源化のパイプラインを構築する予定である。

##### 4) 研究内容の効率性について

疾患の数に限りがあり、年度ごとの症例蓄積には限界があるが、幅広く検体を集める段階で、工夫が必要である。

#### E. 結論

原発性免疫不全症という稀少疾患において、当該診療科への相談症例を中心に、診断、登録、検体保存体制を確立した。症例は全国の約 1/4 程度にあたり、今後全国展開のもとで臍帯・臍帯血由来細胞を資源化し、それをを用いた研究が行われることで、患者診療に資する部分は大きいと考えている。

#### F. 研究発表

##### 1. 研究発表（平成 25 年度）

###### 1) 国内

###### 論文発表

- 1) 渡辺恵理, 阿部素子, 工藤寿子, 浜田聡, 糸洲倫江, 中内啓光, 森尾友宏, 渡辺信和: 重症複合免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植後の混合キメリズムの遷延 CYTOMETRY RESEARCH 23:41-49, 2013.

###### 学会発表

1. Morio T. Cord blood transplantation for primary immunodeficiency in Japan. AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.
2. 森尾友宏: 悪性腫瘍を合併する免疫不全症、第 54 回日本小児血液・がん学会学

術集会(シンポジウム)、福岡、2013年11月29日-12月1日

3. 森尾友宏:原発性免疫不全症候群から学ぶ Human Immunology、第41回日本臨床免疫学会総会、山口、2013年11月27日-29日
4. 森尾友宏:易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症、平成25年度遺伝子病制御研究所研究集会、札幌、2013年10月25日
5. 森尾友宏:分類不能型免疫不全症(CVID)の多彩な病像と分子基盤、第75回日本血液学会学術集会、札幌、2013年10月11日-13日

## 2) 海外

### 論文発表

- 1) Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Leukoc Biol.* 2013 (in press)
- 2) Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using

a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol.* 98:355-60, 2013.

- 3) Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid Detection of Intracellular p47phox and p67phox by Flow Cytometry; Useful Screening Tests for Chronic Granulomatous Disease. *J Clin Immunol.* 33:857-64, 2013.
- 4) Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, Morio T, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol.* 131:587-90, 2013.
- 5) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsui N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Classification of common variable immunodeficiency by quantification of T cell receptor and Ig kappa-deleting recombination excision circles. *J Allerg Clin Immunol.* 131:1437-40, 2013.

学会発表

該当なし

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

該当なし

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

臍帯由来間葉系幹細胞の免疫制御作用の研究

研究分担者 東條 有伸 東京大学医科学研究所 教授  
研究協力者 長村登紀子 東京大学医科学研究所 講師  
研究協力者 何 海萍 東京大学医科学研究所 RA

研究要旨：臍帯 Wharton's Jelly 由来 MSC (WJ-MSC) の免疫抑制作用について解析した。その結果、WJ-MSC の免疫抑制作用は、①CD4/8 細胞に対して HLA 非拘束性に発揮されること、②継代数の影響を受けないこと、③インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) が主たる責任分子であること、④可溶性分子だけでなく細胞接着の関与もあること、が判明した。さらに、同種抗原で刺激したリンパ球と共培養した WJ-MSC の発現プロファイルの解析結果から、IDO の他に各種ケモカインの関与が示唆された。また、IDO 誘導の主因は IFN $\gamma$  であることが明らかになった。いっぽう、MLR によって IDO 同様 WJ-MSC に強く誘導される Hba/ $\beta$  については IFN $\gamma$  の関与はなく、その誘導機序と意義の解明は今後の課題である。さらに、免疫不全マウスにヒト活性化リンパ球を移植した *in vivo* モデルにおいて、WJ-MSC は異種移植片対宿主病 (xenoGVHD) を抑制する予備的結果を得た。

#### A. 研究目的

本研究では、自家及び他家の臍帯 Wharton's Jelly 由来間葉系幹細胞 (WJ-MSC) を免疫制御目的で臨床応用することを見据え、その作用機序の解明を目的として細胞生物学的ならびに分子レベルでの研究を行った。また、投与法の適正化を図る目的で動物モデルにおいて WJ-MSC の免疫抑制作用の検証を試みた。

#### B. 研究方法

##### 1. 混合リンパ球反応 (MLR)

WJ-MSC は explant 法にて分離培養し、CD4 ならびに CD8 陽性 T 細胞は免疫磁気ビーズ法を用いて末梢血より分離した。また、臍帯血単核細胞を GM-CSF、IL4 および TNF $\alpha$  で処理して成熟樹状細胞 (mDC) へ分化誘導した。MLR は、抗 CD3 モノクロー

ナル抗体を添加した 24 ウェル培養皿中で  $2 \times 10^5$  個の CFSE 標識 T 細胞と 50Gy 照射した  $2 \times 10^4$  個の DC を WJ-MSC フィーダー層の存在または非存在下で 4 日間共培養した後、フローサイトメトリーにて T 細胞の増殖を観察した。MSC 培養上清をフィーダーの代替とする実験では、培養液の 60% 量になるよう添加した。また、IDO の特異的阻害剤である 1-methyltryptophan (1-MT) は終濃度 0.1~1mM になるよう添加した。

##### 2. DNA マイクロアレイ解析

前述の MLR と同様の条件で 24 時間培養後、免疫磁気ビーズ法により CD45 陽性細胞を除去した MSC 分画より RNA を抽出した。無刺激の MSC より抽出した RNA を対照として TaKaRa バイオ社の Agilent Expression Array 解析を施行し、解析ソフト GeneSpring

を用いて解析した。初代培養細胞のロット差による影響を考慮して、3つの異なるロットのMSCを実験に供した。

### 3. 動物実験

CD3モノクローナル抗体で刺激した末梢血Tリンパ球をF-Luc遺伝子導入後にNOGマウスの腹腔内に投与し、異種GVHDを惹起した。培養WJ-MSCをリンパ球投与の前日（Day-1）または当日（Day0）に腹腔内投与し、対照群と併せて生体イメージング法により経過を観察した。

（倫理面への配慮）

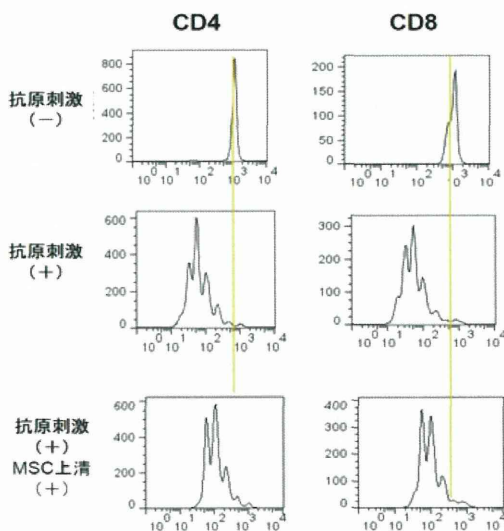
臍帯血・臍帯由来MSCの製剤化・バンキングおよび非臨床研究を含んだ基礎的検討を行うに当たっては、既に東大医科研および採取施設の倫理審査委員会の承認を得ている（ヒトゲノム倫理審査委員会承認No. 24-53）。

## C. 研究結果

### 1. WJ-MSCの免疫抑制作用

WJ-MSCとの共培養の代わりにWJ-MSCの培養上清を添加した実験では、細胞そのものより作用は低下するもののCD4陽性およびCD8陽性T細胞の増殖を有意に抑制した（図1）。また、1-MTの添加は濃度依存性にWJ-MSCのT細胞増殖抑制作用を阻害した（図2）。

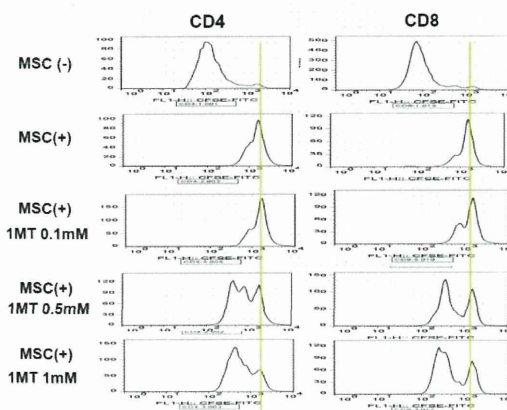
図1 MSC上清のT細胞増殖抑制効果



### 2. MLR 刺激による WJ-MSC の発現変化

MLR 刺激による WJ-MSC の発現変化に関する DNA マイクロアレイ解析では、用いた 3 つのロット間の差はほとんどなく、均一なデータが得られた。図 3 に示すように、マウス MSC で報告された結果に相応して IDO ならびにケモカインファミリーの発現

図2 MSCのT細胞増殖阻害作用に及ぼすIDO阻害剤の効果



上昇が顕著である他、

interferon-stimulated gene (ISG) と Hba/β の発現が強く誘導された。なお、この結果を定量的RT-PCRにより検証した結果、インターフェロンγ (IFNγ) はIDO発現誘導の主たる責任分子であるが、

Hba/β の発現には関与していないことが判明した。

### 3. in vivo における WJ-MSC の免疫抑制作用

各群 3 匹という少数での予備的検討であったが、Tリンパ球と同日にWJ-MSCを投与した群では、対照群と比較してT細胞増殖が抑制され、生存期間が延長する傾向が見られた。いっぽう、前日に投与した群では寧ろ対照群より生存期間は短縮した（図4）。