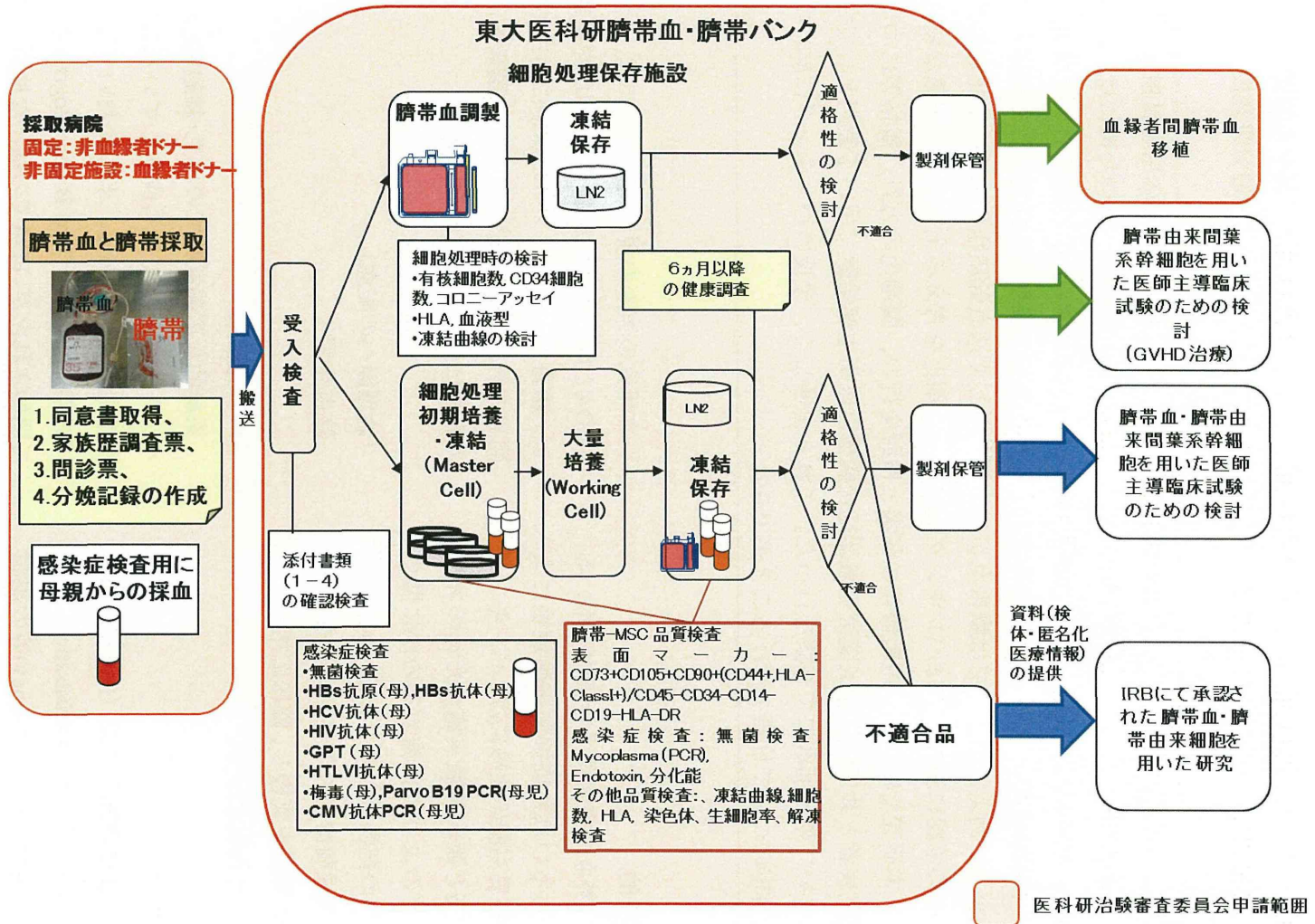


図4. 臍帯血・臍帯採取・細胞処理保存・検査・出庫までのフローチャート



臍帯・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・臍帯血由来間葉系幹細胞の難治性疾患への応用を目指しており、このための間葉系幹細胞のバンキング設立を検討している。設立のためには、臨床試験実施、特に医師主導治験の実施を前提とした非臨床試験の規制対応が必要となる。また、間葉系幹細胞のバンキングを可能にするためには、製剤化を前提として対応する必要がある。例えば、米国では臍帯血が生物製剤として造血幹細胞移植用に承認されており、その承認に至る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。本研究では、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と医師主導治験で用いる製剤としての開発について事前面談にて相談を行った。これらを通じて、今後のバンキングに向けての規制対応について目処を付けることができた。

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あるいは免疫抑制細胞療法による難治性疾患克服のためには、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をどのように実施するのかに関する規制状況の把握が必要である。本研究では国内外の規制情報の収集と分析を行い、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

医薬品医療機器総合機構（PMDA）、米国FDA (Food and Drug Administration)及びEMA (European Medicinal Agency)等の規制当局が発出している法規・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を行い、必要時学会等で規制当局の担当者と接触し意見の聴取を行った。

本研究の実際の規制対応としては、

PMDAとの薬事戦略相談・事前面談を実施し、臍帯・臍帯血バンクの構築に向けて、開発方針、必要な検討事項、細胞調製施設の査察に関する協議を行った。

（倫理面への配慮）

該当せず

C. 研究結果

系統的な広義意味での再生・細胞療法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、FDAでの様々な検討やガイドラインの発出と実施がなされ、2011年 New York Blood Center の臍帯血が”HemaCord”の商品名で生物製剤として承認された。製剤としては臍帯血1ユニット毎に含まれている有核細胞数・CD34陽

性細胞数が異なるという規格として統一されていない点が医薬品とは異なる。そのため、添付文書では1回の臍帯血移植に必要とされる細胞数を体重当たりで下回る場合には複数臍帯血が用いられることも記載されている。

バンキングあるいは製剤化では品質保証が検討課題の1つである。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。その結果、本バンキングで調製する細胞は、出荷に際して規格を設定する必要があるが、母体血 (HBsAg, HBsAb, HBcAb, HCV Ab, HIV Ab, HTLV/II, CMV(IgG/IgM), Syphilis,(TPHA), ParvoB19, GPT)、臍帯血 (PCR(HBV, HCV, HIV, HTLV/II, CMV, Syphilis, ParvoB19)、無菌検査、HLA-A, B, C, DRB1、血液型, NC, CD34+数, CFU, 血液型, Hb pathy, 凍結曲線)、臍帯由来間葉系幹細胞 (無菌検査, マイコプラズマPCR および培養検査, Endotoxin, HLA-A, B, C, DRB1、マスター細胞とWorking cell (~P4) Phenotype (CD73+, CD105+, CD90+, (CD44+, HLA-Class I+) /CD45-,CD34-,CD14-,CD19-,HLA-DR-), 解凍検査: 細胞数, 形態, 生細胞率 >95%, 染色体, 必要に応じたgenome check,分化能検査) を実施し、それぞれに対する基準を設定することとした。

本研究は、臍帯及び臍帯血のバンキングを行い、そこで調製された細胞を、難病に対する医師主導治験に提供し、それにより製剤化と将来的な承認取得を本研究では目指すが、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、特許出願に関して協議と助言を行

い、研究代表者が3件の出願をするに至った。これにより、将来的なバンキングについても産業化に関して可能性が出てきた。

医師主導治験においては、非臨床試験において実施する試験の種類と検討事項が問題となるが、大きく：採取及び調製する細胞の表現型、採取する細胞の部位・採取方法・無菌性の担保、実施する*ex vivo*操作の程度 (例：セレクション、精製、増殖、活性化)、投与後の細胞動態 (生着、移動、分化、造腫瘍性)、投与する調製細胞に対する宿主免疫応答の可能性、投与部位の移植による反応、標的及び/又は非標的組織における潜在的炎症反応の可能性、宿主内の制御されない・異常な細胞増殖の可能性に関して注目していくこととした。

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2回実施した。これにより生物由来原料基準確認等の必要資料作成に向けての助言を得て、対面助言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て、その際の検討項目について協議し、東大医科研セルリソースセンターの組織、手順書あるいは設備・構造について検討を行い、医薬品医療機器総合機構の査察への準備を行った。具体的には平成25年9月13日に行われた事前面談では開発方針の説明の後の協議で、臍帯・臍帯血から最終製剤まで単一施設で調製すべきであり投与施設では調製作業が無いこと、原材料についてマスターファイル登録の有無を含めた妥当性の確認、血縁

者と非血縁者用のバンクは分けて対応し PMDAとの協議では非血縁者とすること、等が確認された。また、1月29日の事前面談では細胞調製施設の適格性確認についての助言を仰ぎ、対面助言の申込み、搬入すべき標準業務手順書、資料の確認方法等についての情報を得て、具体的に準備する手順書及び施設・構造に関して必要な図面、動線、エアーシステムの概要に関して作成時の諸注意を受けた。その結果、指摘点に対して対応を行い、平成26年度にはPMDAに対面助言を申込み、実施することとした。

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。平成25年度は細胞を分離し、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たが、臍帯全体として凍結する手法を研究代表者が開発し、関連企業と特許出願を行ったことから、両方のソースを保存でき、どちらにも対応できるという他のバンクには無い特長をもつことが可能となった。

採取にあたっては、臍帯・臍帯血の確保が必要となる。いわゆる再生医療新法が成立し、その実施に関して詳細を示す省令の発出が待たれるところである。これにより、再生医療と細胞療法に法的規制がかけられるが、本研究では再生医療の細胞ソースとしてだけではなく、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病等に対する免疫抑制療法も視野に入れている。このような状況下で、研究の進展を行うために施設でどのよう

な承認が必要であるかは大きな問題であるが、各種法規・指針ならびに医科学研究所の各種審査委員会の状況と合わせて対応を研究代表者に助言し実施することができたかが、これからの省令や指針の発出により再考も考えられる。

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、効率的で知的財産権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。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のではないかと考えられる。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *Transplant Infect Dis* 15:181-6, 2013.
- 2) Matsmoto K, Sumino K, Fukahori H, Kitaoka K, Kamibeppu K, Nagamura F, Stressor Scale for Clinical Research

Coordinators: development and psychometric testing. *J Advan Nursing* 6:7; 1636-45, 2012

- 3) Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. *Leukemia Res* 36(2):128-31, 2012.
2. 学会発表
 - 1) 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
 - 2) 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
 - 3) 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

- 4) 大木桃代 長村文孝 他 臨床研究参加患者の心理状態と対応策の検討(1) 第25回日本健康心理学会年次大会
- 5) 小室美子、長村文孝 他 東京大学におけるトランスレーショナルリサーチの支援強化領域の検討と支援強化に向けた体制整備 第2回レギュラトリーサイエンス学会
- 6) 加藤直也、長村文孝 他 日本人を被験者とした肝障害患者薬物動態試験 第2回レギュラトリーサイエンス学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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 γ であることが明らかになった。一方、MLRによってIDO同様WJ-MSCに強く誘導されるHb α / β についてはIFN γ 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 α 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 2×10^5 個のCFSE標識T細胞と50Gy照射した 2×10^4 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-MS C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)

本研究は、当施設倫理審査委員会にて承認された研究課題21-18「臍帯血と臍帯由来細胞の基礎的研究」にもとづいて実施した。

C. 研究結果

1. WJ-MS Cの免疫抑制作用

臍帯血単核細胞より調整したmDCは、同種CD4陽性およびCD8陽性T細胞の増殖を刺激し、4日間共培養後のフローサイトメトリーにおいてT細胞を標識したCFSEの蛍光強度は顕著に低下することが確認された。

いっぽう、WJ-MS Cを播種した培養皿中で同じく共培養を行った場合、CD4陽性およびCD8陽性T細胞の増殖は抑制され、CFSEの蛍光強度はほとんど変化しなかった(図1)。なお、混合リンパ球(T細胞+mDC)とWJ-MS Cの直接接触を膜フィルターにより分断すると、CFSE蛍光強度の低下傾向が認められた。

WJ-MS Cとの共培養の代わりにWJ-MS C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2)。また、1-MTの添加は濃度依存性にWJ-MS CのT細胞増殖抑制作用を阻害した(図3)。

図1 WJ-MS CによるMLRの抑制効果

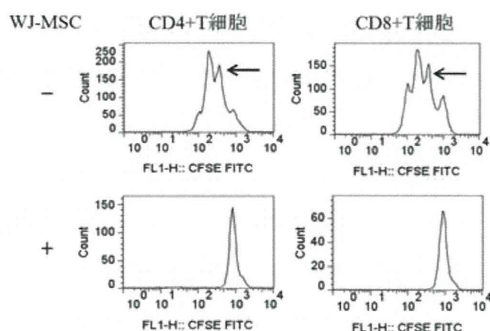


図2 MSC培養上清のMLR抑制効果

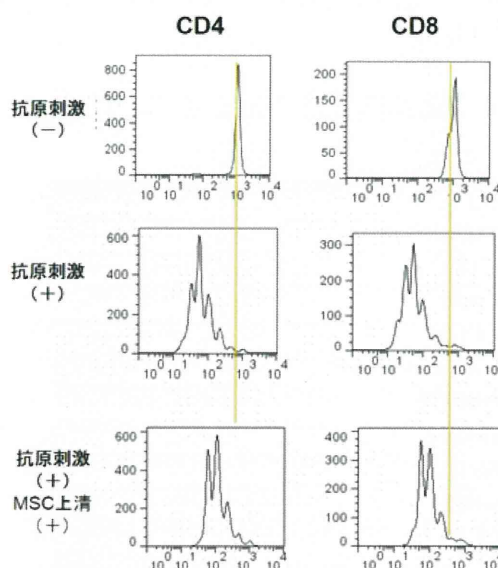
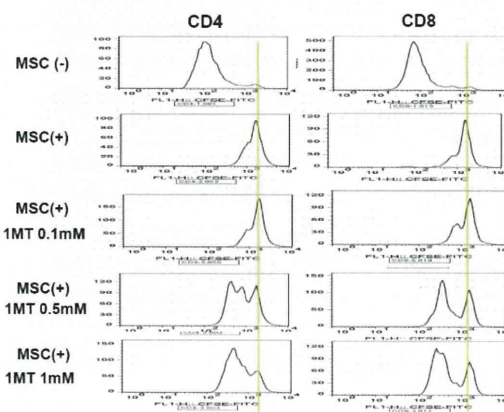


図3 MSCのT細胞増殖阻害作用に及ぼすIDO阻害剤の効果

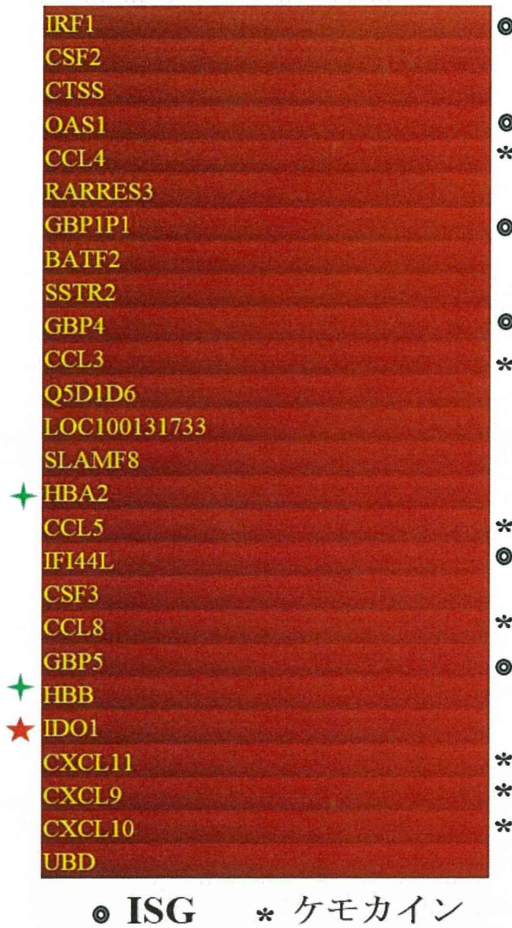


2. MLR刺激によるWJ-MS Cの発現変化

MLR刺激によるWJ-MS C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。

図3 MLRによるWJ-MSCの発現変化

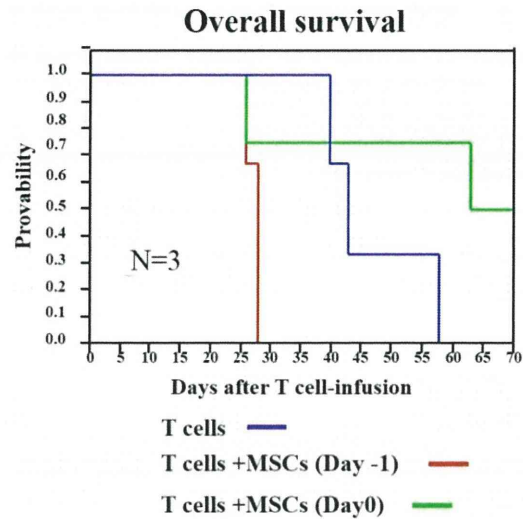


3. *in vivo*におけるWJ-MSCの免疫抑制作用
各群3匹という少数での予備的検討であったが、Tリンパ球と同日にWJ-MSCを投与した群では、対照群と比較してT細胞増殖が抑制され、生存期間が延長する傾向が見られた。いっぽう、前日に投与した群では寧ろ対照群より生存期間は短縮した(図4)。

E. 結論

WJ-MSCは、炎症局所で産生されるIFN γ が誘導するIDO等の可溶性分子を主たるエフェクター分子として免疫抑制作用を発揮する。

図4 WJ-MSCの*in vivo*効果



D. 考察

WJ-MSCの免疫抑制作用の要因は、環境中のIFN γ によって誘導されるIDO等の可溶性分子であり、その発現はIFN γ 濃度依存性であることから、WJ-MSCの生体における効果を*ex vivo*におけるプライミングによって増強できる可能性が示唆された。なお、ケモカインの役割はエフェクターT細胞の局所へのリクルート作用と考えられるが、IFN γ で誘導されないHba/βの意義と併せて今後の検討課題である。

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, **Tojo A**. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Eng Part A**. 20(7-8): 1314-24, 2014
 - 2) Yokoyama K, Yokoyama N, Izawa K, Kotani A, Harashima A, Hozumi K, ***Tojo A**. *In vivo* leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor- α mutant in hematopoietic stem/progenitor cells.

- Blood.** 22(26):4259-63, 2013
- 3) Tomokuni A, Eguchi H, Hoshino H, Dewi DL, Nishikawa S, Kano Y, Miyoshi N, **Tojo A**, Kobayashi S, Gotoh N, Hinohara K, Fusaki N, Saito T, Suemizu H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Ishii H, Nagano H. Effect of *in vivo* administration of reprogramming factors in the mouse liver. **Oncol Lett.** 6(2):323-8, 2013
 - 4) Ohno N, Kobayashi S, Ishigaki T, Yuji K, Kobayashi M, Sato K, Watanabe N, **Tojo A**, Uchimaru K. Loss of CCR4 antigen expression after mogamulizumab therapy in a case of adult T cell leukaemia-lymphoma. **Br J Haematol.** 163(5):683-5, 2013
 - 5) 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 Natl Acad Sci USA.** 110(33):13410-5, 2013
 - 6) Chen MH, Soda Y, Izawa K, Kobayashi S, Tani K, Maruyama K, **Tojo A**, Asano S. A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. **Int J Pharm.** 454(1):478-85, 2013
 - 7) Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, **Tojo A**, Uchimaru K. The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I. **PLoS One.** 8(1):e53728, 2013
 - 8) Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, **Tojo A**, Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. **Int J Hematol.** 97(1):103-8, 2013
 - 9) Ebihara Y, Takedani H, Ishige I, Nagamura-Inoue T, Wakitani S, **Tojo A**, Tsuji K. Feasibility of autologous bone marrow mesenchymal stem cells cultured with autologous serum for treatment of hemophilic arthropathy. **Hemophilia.** 19:e87-9, 2013
 - 10) Oshima Y, Tsukamoto H, **Tojo A**. Association of hepatitis B with antirheumatic drugs: a case-control study. **Mod Rheumatol.** 23(4):694-704, 2013
 - 11) 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. **Transplant Infectious Disease.** 15(2):181-6, 2013
 - 12) Morimoto A, Shimazaki C, Takahashi S, Yoshikawa K, Nishimura R, Wakita H, Kobayashi Y, Kanegane H, **Tojo A**,

- Imamura T, Imashuku S; Japan LCH Study Group. Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group. **Int J Hematol.** 97(1):103-8, 2013
- 13) Chi HT, Ly BT, Kano Y, **Tojo A**, Watanabe T, Sato Y. ETV6-NTRK3 as a therapeutic target of small molecule inhibitor PKC412. **Biochem Biophys Res Commun.** 429:87-92, 2012
- 14) Oshima Y, Yuji K, **Tojo A**. Eltrombopag in refractory aplastic anemia. *New Engl J Med.* 367:1162-3, 2012
- 15) Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, **Tojo A**, Kagami H. Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed, or Ficoll-treated marrow. **Cytotherapy.** 14:791-801, 2012
- 16) Hinohara K, Kobayashi S, Kanauchi H, Simizu S, Nishioka K, Tsuji E, Tada K, Umezawa K, Mori M, Ogawa T, Inoue J, **Tojo A**, Gotoh N. ErbB/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer. **Proc Natl Acad Sci USA.** 109:6584-9, 2012
- 17) Usuki K, **Tojo A**, Maeda Y, Kobayashi Y, Matsuda A, Ohyashiki K, Nakaseko C, Kawaguchi T, Tanaka H, Miyamura K, Miyazaki Y, Okamoto S, Oritani K, Okada M, Usui N, Nagai T, Amagasaki T, Wanajo A, Naoe T. Efficacy and safety of nilotinib in Japanese patients with imatinib-resistant or -intolerant Ph+ CML or relapsed/refractory Ph+ ALL: a 36-month analysis of a phase I and II study. **Int J Hematol.** 95:409-19, 2012
- 18) Kawamata T, Jun L, Sato T, Tanaka M, Nagaoka H, Agata Y, Toyoshima T, Yokoyama K, Oyaizu N, Nakamura N, Ando K, **Tojo A**, Kotani A. Imatinib mesylate directly impairs class switch recombination through downregulation of AID. **Blood.** 119:3123-7, 2012
- 19) Dong Y, Kobayashi S, Tian Y, Ozawa M, Hiramoto T, Izawa K, Bai Y, Soda Y, Sasaki E, Itoh T, Maru Y, Takahashi S, Uchimarui K, Oyaizu N, **Tojo A**, Kai C, Tani K. Leukemogenic fusion gene (p190 BCR-ABL) transduction into hematopoietic stem/progenitor cells in the common marmoset. **Open J Blood Dis.** 2:1-10, 2012
- 20) Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, **Tojo A**, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. **Leuk Res.** 6:128-31, 2012
2. 学会発表
(海外)
1) 第55回米国血液学会学術集会 2012/12/07-10 ニューオーリンズ
●何 海萍、長村登紀子、東條有伸、他。「The immunosuppressive effect of Wharton Jelly-derived mesenchymal stem cells in vitro.」
●伊澤清子、東條有伸、他. Long-term ex vivo maintenance of murine iPSC-derived

hematopoietic stem/progenitor cells by conditional HoxB4.

2) 第54回米国血液学会学術集会

2012/12/08-11 アトランタ

●臼杵憲祐、東條有伸、他。「Sustained molecular response with maintenance dose of interferon alfa after imatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukemia」

●幸谷 愛、東條有伸、他。「Mir-126 and Mir-195-mediated control of B cell fate in leukemic and normal cells as a potential alternative for transcriptional factor」

●湯地晃一郎、東條有伸、他。「Possible association between acute myelogenous leukemia and thrombopoietin receptor agonist in immune thrombocytopenia patients: a preliminary signal report」

(国内)

1) 第72回日本癌学会学術総会. 2013.10.3-5. 横浜

二見 宗孔、中村 貴文、東條有伸. マイクロ RNA 制御性ワクシニアウイルスは多発性骨髄腫細胞選択的に細胞死をもたらす.

2) 第 75 回日本血液学会学術集会、2013.10.11-13、札幌

●大野伸広、東條有伸、他. Significance of the allogeneic HSCT in the treatment of the aggressive ATL patients.

●湯地晃一郎、東條有伸、他. Mantle cell lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites in the elderly: a distinct entity Mantle cell lymphoma with hypersensitivity to mosquito bites in the elderly: a distinct entity.

●城 憲秀、東條有伸、他. Mogamulizumab treatment for ATL patients in IMSUT hospital.

●佐藤広太、東條有伸、他. Marked

Eosinophilia Caused by

Interleukin-5-producing Cardiac Myxoma.

●小林真之、東條有伸、他. Clinical profile of adult Langerhans cell histiocytosis: A single-institute experience in Japan

●何 海萍、長村登紀子、東條有伸、他. SS EA4 is not a marker for proliferation and pluripotency in Wharton's Jelly-derived MSCs.

3) 第74回血液学会学術集会. 2013.10/19-21. 京都

●小林誠一郎、東條有伸、他. 口演 「CD7 vs CADM1 in FACS reflects multi-step oncogenesis of ATL and discriminates HTLV-1 infected cells」

●塚田端夫、東條有伸、他. ポスター 「リウマチ性多発筋肉痛症を合併したt(1;7)を伴う骨髄異形成症候群の一例」

●何 海萍、東條有伸、他. ポスター 「Characterization of stem cell in human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells」

●Chanda Bidisha、東條有伸、他. 「Impairment of T cell development in chronic myeloid leukemia, partial explanation by in vitro model」

●大野伸広、東條有伸、他. 「CD3とCD7の展開によるATL細胞の同定：急性型ATLの治療反応性とTCRレパトア解析」

3. その他、専門医、一般医等医療従事者への情報提供（シンポジウムの開催、講演等での発表）

1) 東條有伸 「プライマリケアにおける血液疾患診療のコツと医療連携」江東区医師会学術講演会2013/04/17（火）

2) 東條有伸「血液疾患を疑う症状と所見の見方～専門医との連携について」川崎市医師会主催講演会 2012/05/15（火）

治療」再生つばさの会 札幌医療講演会
2012/09/01 (土)

4. 患者、家族、患者会や一般市民への情報
提供 (シンポジウムの開催、講演等での発表、
マスコミでの発表など)

- 1) 東條有伸 「骨髓異形成症候群 (MDS)
の病態と治療」再生つばさの会札幌講演
会 2013/08/31 (土)
- 2) 東條有伸 「iPS細胞の話」東京都難病
相談・支援センター医療講演会
2013/10/06 (日)
- 3) 東條有伸 「骨髓異形成症候群の病態と

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

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	森田育男	東京医科歯科大学大学院	教授
研究協力者	小牧基浩	東京医科歯科大学大学院	助教
研究協力者	滝 敦子	東京医科歯科大学大学院	助教
研究協力者	本多 泉	東京医科歯科大学大学院	大学院生
研究協力者	森丘千夏子	東京医科歯科大学大学院	大学院生

（研究協力者：全て 2012 年度）

研究要旨:2012 年度は森田育男先生の教室において、「臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療開発」に関する研究を実施した。同教室においてはラット羊水腔内 LPS 投与による実験的子宮内感染症に起因する脳室周囲白質軟化症 (PVL) モデルとし、出生後新生仔で同モデルを作成した。さらに臍帯由来 MSC を用いた治療を行い、日齢 14 における脳室周囲白質用の改善傾向を認めた。

2013 年度は原発性免疫不全症の診断と検体の資源化体制を確立することを目的として、東京医科歯科大学に紹介された患者につき簡易診断、遺伝子診断、検体採取を行い、集計を行った。また今後の臍帯血あるいは臍帯由来細胞の系統的資源化にあたっての課題について検討を行った

A. 研究目的

1) 脳室周囲白質軟化症、慢性肺疾患は早産児の予後を悪化させる主要な合併症であり、その成因に子宮内感染症が関与している。ここでは、実験的子宮内感染症モデルを用いて、子宮内感染症に起因する脳室周囲白質軟化症、慢性肺疾患の病態における内在性幹細胞の障害と疾患成立への関与を検討し、間葉系幹細胞を用いた新たな治療法を開発することを目的とする。最終的には安全で効率的な再生治療法の開発を目指し、治療の鍵となる生理活性物質を同定すること、新たな創薬につなげることが目標である。

2) 原発性免疫不全症では 240 以上の責任遺伝子が判明し、300 前後の疾患が存在するが、それぞれの頻度は高くない。この研究ではそ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する。2013 年度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

1) 脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療開発 (2012 年度)

1. 妊娠 16 日 SD ラットの羊水腔内に LPS

0.2 μ g を投与し、子宮内感染症を誘発する。子宮内感染の評価として、妊娠 20 日において、胎盤組織学的評価を行った。

2. 子宮内感染症に起因する PVL・CLD の程度を評価した。日齢 14 新生仔を対象として、HE 染色、Myelin basic protein 組織免疫染色を行い、脳の器質的変化および白質量を評価した。肺の病理学的検査としては、HE 染色、Masson' Trichrome 染色を行い、RAC(radial alveolar count)法により肺損傷を定量的に評価した。

3. 妊娠 20 日ラット臍帯から out growth 法により MSC を培養した。出生後の仔に対する治療として、1 \times 10⁵ 個の UCMSC および 24 時間無血清培地で培養した MSC 培養上清を採取し、日齢 1 および 7 の新生児に静脈内投与した。治療効果判定のために、日齢 14 新生児を対象として、肺および脳の組織学的評価を行った。炎症の評価としてじゃ、組織におけるマクロファージ、リンパ球、好中球などの炎症性細胞浸潤を調べ、RT-PCR 法にて IL-1 β 、IL-6、IL-10、TNF- α 、MCP-1、MCP-3 などの炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を検討した。

2) 原発性免疫不全症における臍帯血、臍帯の資源化に関する研究 (2013 年度)

PIDJ(primary immunodeficiency database in Japan)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 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。また動物を用いた実験に関しては、東京医科歯科大学動物実験委員会のガイドラインに従った。文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」などの各種指針を遵守した研究を行い、動物は研究に最小限の匹数を用い、飼育保管基準をふまえて管理を行い、麻酔により最小の苦痛となるように配慮して行った。研究計画は既に倫理審査委員会の審査・承認を得て実施された。

C. 研究結果

1) 脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療開発 (2012 年度)

LPS 羊水腔内投与に惹起される子宮内感染の評価として、妊娠 20 日における胎盤組織における好中球数、CD68 陽性細胞数、MPO 陽性細胞数を測定したところ、いずれも上昇していた。

1. 日齢 14 の新生児において脳室周囲白質量を Myelin basic protein の陽性面積で調べたところ、LPS 投与群ではコントロール群と比較して有意に低下した。また肺における RAC 数は低下していた。LPS 投与により白質損傷と肺損傷が惹起されたと判断した。

2. 母体羊水腔内 LPS 投与脳室周囲白質損傷ラットに対して、MSC、または MSC 培養上清を投与したところ、日齢 14 において MBP 陽性領域は増加する傾向を認めた。一方、肺損傷に対しては改善傾向は認められなかった。日齢 7 の新生仔脳における炎症性サイトカイン・ケモカインの発現については、MSC による炎症抑制効果は明らかではなかった。

2) 原発性免疫不全症における臍帯血、臍帯の資源化に関する研究 (2013 年度)

2013 年においては 10 月までに 159 件の検体 (全国検体の約 27%) が集積した。これらの患者について、説明と同意のもとで、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)。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

1) 子宮内感染に起因する脳室周囲白質損傷に対して、出生後の UCMSC 投与が有効である可能性が示されたが、有意差は出ておらず今後の最適化が重要と考えている。また今後、MSC の効果機序として日齢 7 でのオリゴデンドロサイト前駆細胞の数や細胞死数、マイクログリア数などを検討したい。

2) 原発性免疫不全症由来の臍帯及び臍帯血の資源化では、患者の選択が重要である。その点で今後は X 連鎖性遺伝形式をとる疾患や、常染色体優性遺伝形式をとる疾患において、健常者やヘテロ接合体を含めた資源化が重要と考えられる。また今後の治療応用という点に関しては、遺伝子治療などに際してのモデル細胞としての利用などが考えられる。

E. 結論

1) 脳室周囲白質損傷 (子宮内感染症に起因するもの) のモデルシステムを構築した。出生後の UCMSC の投与は、治療効果を発揮する可能性がある。

2) 原発性免疫不全症における臍帯及び臍帯血の資源化について、実際に診断にあたる施設で simulation を行った。今後の体制作りに有用となると思われる。

F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、当該観点からは特に問題となることはない。

G. 研究発表

1. 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.* In press, 2013
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, Mitsuiki 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
2. 学会発表
(国内)
1. 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 2013/11/29-12/1
 2. 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 2013/11/27-11/29
 3. 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 2013/10/25
 4. 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回国日本血液学会学術集会 札幌 2013/10/11-13 (海外)
 5. Morio T. Cord blood transplantation for primary immunodeficiency in Japan. AsiaCORD2013. Kobe, Japan. April 2013.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
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））

総合研究報告書

臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療法の開発

研究分担者	森田育男	東京医科歯科大学大学院	教授
研究協力者	小牧基浩	東京医科歯科大学大学院	助教
研究協力者	滝 敦子	東京医科歯科大学大学院	助教
研究協力者	本多 泉	東京医科歯科大学大学院	大学院生
研究協力者	森丘千夏子	東京医科歯科大学大学院	大学院生
研究協力者	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院	准教授

研究要旨：臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質軟化症・気管支肺異形成症の治療開発を目的として、ラット羊水腔内 LPS 投与による実験的子宮内感染症モデルを作成、また出生後新生仔 LPS 投与により同様に脳室周囲白質軟化症モデルを作成した。さらに臍帯由来 MSC を用いた治療を行い、日齢 12 における脳室周囲白質量の改善傾向を認めた。

A. 研究目的

脳室周囲白質軟化症、慢性肺疾患は早産児の予後を悪化させる主要な合併症であり、その成因に子宮内感染症が関与している。ここでは、実験的子宮内感染症モデルを用いて、子宮内感染症に起因する脳室周囲白質軟化症における内在性幹細胞の障害と疾患成立への関与を検討し、間葉系幹細胞を用いた新たな治療法を開発する。最終的には安全で効率的な再生治療法の開発を目指し、治療の鍵となる生理活性物質を同定すること、新たな創薬につなげることが目標である。

B. 研究方法

1) 日齢 4 の新生仔ラットはヒトの妊娠 28 週前後に相当することを利用し、日齢 4 のラットに LPS15mg/kg を腹腔内投与し新生児白質損傷モデルを作成した。さらに日齢 4、5、6、7 に MSC の培養上清を腹腔内

投与し、日齢 6、12 の脳を採取し評価した。

また MSC はヒト胎盤の絨毛や臍帯ワルトンジェリーから採取した。

2) また、妊娠中に羊水腔内に LPS を投与し、子宮内炎症環境に曝された臍帯より得た MSC と、炎症に曝されていない正常子宮内環境より得られた臍帯 MSC を、増殖率を細胞カウント法にて、表面マーカーを FACS にて、遺伝子発現 DNA アレイにて比較した。

（倫理面への配慮）

本研究は動物を対象とした実験であり、東京医科歯科大学動物実験委員会のガイドラインに従った。文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」などの各種指針を遵守した研究を行い、動物は研究に最小限の匹数を用い、飼育保管基準をふまえて管理を行い、麻酔により最小の苦痛となるように配慮して行った。研

究計画は既に倫理審査委員会の審査・承認を得ている。

C. 研究結果

1) LPS 投与により日齢 6 の新生仔脳における炎症性サイトカインの上昇、日齢 12 における脳室周囲白質量の低下を確認した。

MSC 培養上清投与により、炎症性サイトカインは減少し、脳室白質量は増加する傾向がみられた。

2) 子宮内炎症にさらされた臍帯から得た MSC は、正常子宮内環境より得られた臍帯 MSC よりも増殖が盛んであった。これに一致して細胞増殖に関連する遺伝子発現の増加をみとめた。また、表面マーカーにおいて CD44 の発現が低下した。DNA アレイでも上皮関連の遺伝子発現の上昇を認め、上皮間葉移行の傾向が示唆された。DNA アレイにおけるパスウェイ解析にて免疫原性上昇の可能性が示唆された。

D. 考察

今回の実験での MSC 培養上清が抗炎症作用を有していることが示された。また感染に起因する脳室周囲白質損傷に対して、出生後の MSC 培養上清の投与が有効である可能性が示された。しかし、有意差がでなかったことより、効果的な MSC の採取法の検討、投与量の検討、培養上清ではなく MSC そのものを投与することなどを検討したい。またその後 MSC の効果機序として、オリゴデンドロサイト前駆細胞の数や細胞死数、マイクログリア数、グルタミン酸濃度などを検討したい。

また、網羅的遺伝子解析の結果より、子宮内炎症にさらされているか否かで、MSC の遺伝子発現が異なることがわかった。遺伝

子発現の違いが治療効果の違いにつながるか検討したい。

E. 結論

子宮内感染に起因する脳室周囲白質損傷に対して、出生後の MSC 培養上清投与は治療効果を有する可能性がある。

F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、当該観点からは特に問題となることはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hatano Y, Nakahama K, Isobe M, Morita I. Tumor associated osteoclast-like giant cells promote tumor growth and lymphangiogenesis by secreting vascular endothelial growth factor-C. *Biochem Biophys Res Commun*. 446(1):149-54, 2014
- 2) Tateishi N, Kakutani S, Kawashima H, Shibata H, Morita I. Dietary supplementation of arachidonic acid increases arachidonic acid and lipoxin A4 contents in colon, but does not affect severity or prostaglandin E2 content in murine colitis model. *Lipids Health Dis*. 13(1):30., 2014
- 3) Hashida Y, Nakahama KI, Shimizu K, Akiyama M, Harada K, Morita I. Communication-dependent mineralization of osteoblasts via gap junctions. *Bone*. 61C:19-26. 2014
- 4) Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Honda I, Kimura Y, Takeda M, Akazawa K, Oda S, Izumi Y,

- Morita I. Periodontal regeneration using periodontal ligament stem cell-transferred amnion. *Tissue Eng Part A.*;20(3-4):693-704, 2014.
- 5) Akiyama M, Nakahama K, Morita I. Impact of docosahexaenoic acid on gene expression during osteoclastogenesis in vitro--a comprehensive analysis. *Nutrients.*;5(8):3151-62.,2013
- 6) Saitoh M, Shirakihara T, Fukasawa A, Horiguchi K, Sakamoto K, Sugiya H, Beppu H, Fujita Y, ○Morita I. Miyazono K, Miyazawa K. Basolateral BMP signaling in polarized epithelial cells. *PLoS One.*;8(5):e62659. 2013.
- 7) Kato K, Morita I. Promotion of osteoclast differentiation and activation in spite of impeded osteoblast-lineage differentiation under acidosis: effects of acidosis on bone metabolism. *Biosci Trends.* 7(1):33-41, 2013 (Review).
- 8) Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, Takeda M, Oda S, Izumi Y, Morita I. Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *J Periodontol.* 84(10):1425-33. ,2013
2. 学会発表
(国内)
- ①本多泉、滝敦子、小牧基浩、岩崎剣吾、森田育男.ラット子宮内感染モデルを用いた新生児脳室周囲白質軟化症及び慢性肺疾患に対する臍帯由来間葉系幹細胞を用いた治療の検討.第 33 回日本炎症・再生医学会 2012.07.06 福岡
- ②本多泉、滝敦子、森丘千夏子、杉江学、土井庄三郎、水谷修紀、宮坂尚幸.LPS 羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルを用いた研究 第 1 報：胎盤および新生児合併症の解析.第 48 回周産期・新生児医学会 2012.07.09 大宮
- ③滝敦子、本多泉、森丘千夏子、杉江学、宮坂尚幸、土井庄三郎、水谷修紀.LPS 羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルと用いた研究：第 2 報：間葉系幹細胞を用いた治療法の開発.第 48 回周産期・新生児医学会.2012.07.08.大宮
- ④本多泉、須藤乃里子、久保田俊郎、森田育男. LPS 羊水腔内投与によるラット子宮内感染モデルにおける胎盤および新生児合併症の解析. 第 65 回日本産科婦人科学会 .2013.05.11.札幌
- ⑤須藤乃里子、本多泉、久保田俊郎、森田育男. リンパ管再生に向けた基礎的検討. 第 21 回日本血管生物医学会学術集会. 2013.09.26-28. 大阪
- ⑥Oshima-Sudo N, Honda I, Obayashi S, Terauchi M, Nakahama K, Kubota T, Morita I. Optimized method for cultureing endothelial colony forming cells from human umbilical cord blood and tissue engineered capillary vessels using printing technology. 5th Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation. 2013. 10. 18-20. Tokyo
- ⑦Izumi Honda, Chikako Morioka, Atsuko Taki, Noriko Oshima-Sudo, Motohiro Komaki, Toshiro Kubota, Ikuo Morita. Assessment of placenta and neonatal complication in rat

model of intra-uterine inflammation induced by intra-amniotic injection of lipopolysaccharide. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014.04.14-17. Kyoto.

⑧ Noriko Oshima-Sudo, Isumi Honda, Ken-ichi Nakahama, Toshiro Kubota, Ikuo Morita. Tissue engineered lymphatic microvessels using cell-printing technology. The 18th International Vascular Biology Meeting. 2014.04.14-17. Kyoto.

⑨本多泉、須藤乃里子、久保田俊郎、森田育男. 脳室周囲白質軟化症の新規治療法開発に向けた新生仔ラットモデルの作成と解析. 第 66 回日本産科婦人科学会学術集会. 2014.04.18-20. 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし