

201409055A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

標準的治療の確立が望まれる難治性疾患に対する
新規治療法の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 中西 洋一

平成27（2015）年3月

目 次

I. 総括研究報告

標準的治療の確立が望まれる難治性疾患に対する新規治療法の開発	1
--------------------------------	---

中西 洋一

II. 分担研究報告

1. 難治性全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植の臨床研究	6
--------------------------------	---

赤司 浩一

2. がんワクチンOCV-C01による標準療法不応進行再発胆道がんに対する第Ⅱ相医師主導治験に関する研究	10
--	----

谷 憲三朗

3. 低用量BCG膀胱腔内注入維持療法の再発予防効果ならびに安全性に関するランダム化比較試験	13
--	----

内藤 誠二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	17
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
総括研究報告書

標準的治療の確立が望まれる難治性疾患に対する新規治療法の開発

研究代表者 中西 洋一
九州大学病院 ARO 次世代医療センター長

研究要旨

有効な治療法のない難治性疾患に対し、企業の開発戦略に含まれないものの医療における必要性の高い以下 3 つの治療法について、医師主導治験、臨床試験の実施によりヒトでの有効性・安全性の評価を行い将来の実用化につなげる。本年度は以下のように、3 課題それぞれ、先進医療試験の準備、医師主導治験開始、臨床試験継続に至り順調に推移している。

課題1: 難治性全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植の臨床試験

5 年生存率が 50-60%と予後不良な高度の皮膚硬化と内臓病変を有する重症全身性硬化症(SSc)において自己造血幹細胞移植(自己 HSCT)の実用化を目指し、先進医療として臨床第 II 相試験を実施する。本年度は 1) 昨年度修正した臨床第 II 相試験のプロトコルを基に医薬品医療機器総合機構(PMDA)、厚生労働省と事前相談を行い先進医療申請の準備を進めること、2) SSc に対する自己 HSCT の有効性の機序を明らかにするため SSc の病態形成に関わる分子を同定する事を目的とした。PMDA、厚生労働省と事前相談を行った事により、プロトコルおよび先進医療実施届出書の内容がほぼ確定した。平成 26 年 11 月に再生医療新法が施行となり、特定認定再生医療等委員会での承認へ準備を開始した。リンパ球の遺伝子発現プロファイル解析により、SSc 患者と健常人で発現量が異なる遺伝子のうち、CD226 について機能解析を行った。CD226 は SSc 患者 CD8 陽性 T 細胞で高発現しており、CD226 陽性 CD8 陽性 T 細胞の割合は皮膚硬化や間質性肺炎の重症度と関連していた。CD226 高発現 CD8 陽性 T 細胞では向線維化サイトカイン IL-13 の産生が増加しており、SSc の病態形成に関与している事が示唆された。

課題2: がんワクチン OCV-C01 による標準療法不応進行再発胆道がんに対する第 II 相医師主導治験

2011 年には 18,186 人が胆道癌(肝外胆道癌, 胆嚢癌, 乳頭部癌)で死亡しており, 男女合わせたがん死亡原因において, 肺癌, 胃癌, 肝臓癌(肝内胆管癌を含む), 結腸癌, 膵癌について第 6 位となっている。また, 乳頭部癌では約 10%, 肝内外胆管癌では約 25%, 胆嚢癌では約 30%が診断時に切除不能な進行癌であることに加え, 5 年相対生存率も 20~25%であることから予後不良/難治性の悪性腫瘍の一つである。本研究では VEGFR-1、2 および KIF20A を標的とした HLA-A*24:02 拘束性カクテルペプチドがんワクチン OCV-C01 を用いた第 II 相医師主導治験を行う。本治験は既治療不応進行胆道癌患者を対象として、OCV-C01 皮下投与療法の有効性と安全性を検討し、主要評価項目は全生存期間(OS)である。平成 25 年 12 月 18 日に治験届を行い、平成 26 年 4 月より被験者募集を開始、平成 27 年 12 までの被験者登録期間を予定している。

課題3: 低用量BCG膀胱腔内注入維持療法の再発予防効果ならびに安全性に関するランダム化比較試験
中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱がん (Ta、T1) に対する TURBT 後の標準量 BCG 導入療法+低用量 BCG 維持療法が、標準的レジメである標準量 BCG 導入療法より再発・進展予防効果において優れ、かつ安全に、高い完遂率をもって実施できるかどうかを、前向き無作為化比較試験によって検証する。参加施設の選定と研究体制の整備を行い、平成 25 年 1 月に班会議を開催し、同月プロトコル、患者同意説明文書を完成した。現在、研究分担者施設25施設において症例登録を行っている。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

赤司 浩一 九州大学 教授
谷 憲三郎 九州大学 教授
内藤 誠二 九州大学 教授

A. 研究目的

有効な治療法のない難治性疾患に対し、企業の開発戦略に含まれないものの医療における必要性の高い以下 3 つの治療法について、医師主導治験・臨床試験の実施によりヒトでの有効性・安全性の評価を行い将来の実用化につ

なげる。

課題1:

全身性硬化症のうち高度のびまん性皮膚硬化と内臓病変を有する重症例の5年生存率は50－60%と予後不良であり、また皮膚硬化や間質性肺炎による呼吸困難などのため日常生活の質は著しく低下する。九大では2002年より難治性自己免疫疾患に対する自己末梢血幹細胞移植の安全性と有効性を検討する臨床第I/II相試験を行った。対象は難治性SSc19例で治療関連死は1例も認めなかった事より、本療法は安全に施行可能であることが示された。

本研究では難治性SScに対する自己HSCTの実用化を目指し、先進医療として第II相試験を実施する事が目的である。本年度は1)昨年度修正した第II相試験のプロトコルを基に医薬品医療機器総合機構(PMDA)、厚生労働省と事前相談を行い先進医療申請の準備を進めること、2)SScに対する自己HSCTの有効性の機序を明らかにするためSScの病態形成に関わる分子を同定し、その役割を明らかにする事を目的とした。

課題2:

既治療不応胆道癌患者を対象として、OCV-C01の皮下投与療法の有効性と安全性を検討する医師主導治験を実施する。

1. 主要目的(主評価項目)

既治療不応胆道癌と診断された患者を対象として、OCV-C01の皮下投与の全生存期間(OS)を検討する。

2. 副次目的(副評価項目)

1) 主要目的に準じて、無増悪生存期間(PFS)について検討する。

2) 固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン(RECIST v1.1日本語訳JCOG版)に基づき、測定可能病変を有する場合は腫瘍縮小効果を求め、奏効率、病勢コントロール率について検討する。

3) 有害事象の発現頻度、臨床検査値およびバイタルサインの変化から本剤の安全性を検討する。

4) 治療効果のバイオマーカーの探索を目的として、エルパモチド、OCV-101、OCV-105特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の変化等を比較検討する。

課題3:

中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱癌(Ta、

T1) に対するTURBT後の標準量BCG導入療法＋低用量BCG維持療法が、標準的レジメである標準量BCG導入療法より再発・進展予防効果において優れ、かつ安全に、高い完遂率をもって実施できかどうかを、前向き無作為化比較試験によって検証する。

B. 研究方法

課題1:

健常人5名とSSc患者9名の末梢血リンパ球をソーティングにより8分画に分けて回収し、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルと比較した。SSc患者CD8陽性T細胞において高発現しているCD226に着目し、以下の検討を行った。

a)SSc患者においてCD226が高発現しているリンパ球亜分画、b) CD226陽性CD8陽性T細胞の割合とSSc患者における皮膚硬化および間質性肺炎の重症度との関連、c) CD226高発現CD8陽性細胞におけるサイトカイン産生プロファイル、を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ており、全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

課題2:

1. 目標症例数

HLA-A*24:02 保持者13例 (HLA適合不明患者40例)

2. 試験物の概要

OCV-C01はOCV-105(KIF20A由来ペプチド)、エルパモチド(VEGFR-2由来ペプチド)、OCV-101(VEGFR-1由来ペプチド)のカクテル剤であり、同一の効能を有する市販薬はない。

調達法: 治験薬提供者(オンコセラピー・サイエンス社)にて原薬を海外から輸入し製造

3. 投与方法

治験薬を1.0 mL/bodyで、週1回、4週間投与を1コースとして可能な限り腋窩部あるいは鼠径部に皮下投与する。腋窩部あるいは鼠径部に投与できない場合は上腕、大腿あるいは腹部に皮下投与する。治験薬投与中止基準に該当するまで上記コースを繰り返す。最終投与日は最長で投与開始日から365日目までとする。

4. 対象疾患、適格基準

1) 肝内外胆管癌、胆嚢癌および乳頭部癌と診断されている。

2)肝外胆管癌,胆嚢癌,乳頭部癌の場合は,腺癌,腺扁平上皮癌,肝内胆管癌の場合は腺癌と組織学的に診断が得られている。

3)Stage II-IV 胆道癌で切除不能胆道癌である。測定可能病変の有無は問わない。

4)ゲムシタビンを含むレジメンに対して不応もしくはシスプラチンの投与が出来ないと判断されている。

5)放射線療法により生存期間の延長が期待できない。

他

5. 除外基準

1)過去に,いわゆる癌免疫療法(活性化リンパ球療法,樹状細胞療法,がんワクチン療法など)の受療歴を有する。

2)過去1年未満に重複癌を有する。ただし,上皮内癌および粘膜内癌病変は登録可とする。

3)原疾患が消化管等に浸潤しておりかつ出血が強く危惧される。

他

6. 治験実施予定期間:36ヶ月

7. 被験者登録予定期間:21ヶ月

8. 倫理面への配慮

本治験は,ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則に則って実施する。また,治験実施計画書,薬事法第14条第3項及び第80条の2,「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(GCP省令)」を遵守して実施する。

課題3:

中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱癌(Ta、T1)患者を以下の2群にランダム化する。A群:標準量 BCG 導入療法(80 mg/週×6回)、B群:標準量 BCG 導入療法(80 mg/週×6回)+低用量 BCG 維持療法(40 mg/週×3回×4コース)。主要評価項目は、無再発生存期間、副次評価項目は、無増悪生存期間、生存期間、プロトコル治療の完遂率、有害事象発現状況とした。登録予定患者は合計180例、登録期間は1.5年、追跡期間は最短3年とし、総研究期間は5年である。

効果・安全性評価委員会を設置し中間解析として二次登録が100例に達した時点でイベント(再発、増悪、死亡)の発現状況ならびに有害事象の発現状況の評価し、研究全体の継続に及ぼす影響を評価する。

(倫理面への配慮)

参加患者の安全性確保については、適格条件やプロトコル治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化されている。また、「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則に従っている。

C. 研究結果

以下の3課題とも、九州大学病院ARO次世代医療センターの主要メンバーから構成されるARO推進室会議において知財関連事項、薬事関連事項、当局対応、臨床試験や治験の実施に際して具体的な問題点や課題抽出など実務的な戦略策定を行った。課題1、2においてはPMDA薬事戦略相談をAROとともにに行った。その結果、課題によっては薬事戦略方針の修正、試験デザインの変更などが必要となり試験遂行上多いに進展した。

課題1:

1)先進医療申請準備

先進医療での実施を目指し、第II相試験のプロトコルを作成した。平成26年度は前年度助言を受けた点につきプロトコルを修正し、再度PMDAと薬事戦略相談事前面談を行った。また先進医療実施届出書を作成し、厚生労働省と事前相談を行った。先進医療実施に関し大筋で合意が得られたため、症例報告書の作成を開始した。平成26年11月に再生医療新法が施行となり特定認定再生医療等委員会での承認が必要となるためその準備を開始した。CD34陽性細胞の分離について平成26年1月に特定細胞加工物製造届を地方厚生局に提出した。

2)SScの病態形成に関わる分子の同定

健常人5名と強皮症患者9名の末梢血リンパ球を8分画に分け、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルを比較した所、各々のリンパ球亜分画において、発現レベルの異なる複数の遺伝子を認めた。この中でSSc患者CD8陽性細胞において高発現していたCD226について機能解析を行い、以下の結果を得た。

a)フローサイトメトリーを用いた検討で、SSc患者では健常人に比し、CD8陽性T細胞におけるCD226の発現が亢進していた。b)びまん型SScでは限局型SScに比べCD226陽性CD8陽性T細胞の割合が有意に多かった。間質性肺炎を有するSSc患者では、%VCとCD226陽性CD8陽性T細胞の割合の間に有意な負の相関を認めた。c) CD226高発現CD8陽性T細胞ではIL-13の産生が増加していた。

課題2:

1. 治験の実施状況

- ・2013年9月6日 薬事戦略相談(対面助言)
- ・2013年11月28日 九州大学病院臨床研究倫理審査委員会
- ・2013年12月18日 治験届け提出
- ・2014年4月 スタートアップミーティング、被験者募集開始
- ・2015年3月10日現在

- 1) 問い合わせ患者数 27名
福岡6、熊本、宮崎、大分、山口、徳島、奈良2、大阪2、兵庫2、愛知2、東京、神奈川、千葉2、台湾2、不明2 (うち死亡確認者数 6名)
- 2) 入院患者数 8名
 - ① 説明同意取得者数 5名
 - ② 登録被験者数 4名
(山口、兵庫、東京、大分)
- ③ 治験薬投与継続中 1名 中止後、後治療中 1名 現病悪化のため死亡 1名
- ④ 入院後適応外と判断された患者数 4名
(全身状態不良 1名 深部静脈血栓症 2名 門脈圧亢進症 1名)

課題3:

平成25年1月8日に第1回班会議を開催して、プロトコル作成の最終協議を行い、平成25年1月末にプロトコル及び患者同意説明文書を完成した。平成26年度には全ての参加施設のIRBの承認を得て、症例登録を開始した。しかし登録症例数が目標を下回っており、6つの新規参加施設を追加した。平成27年2月現在、総登録目標180例の内、47例の登録を得ている。当初の計画では、症例登録期間は平成26年10月までとしていたが、登録開始は計画より約1年遅れており、また登録数も伸び悩んでいたため、症例登録期間を平成27年10月まで延長した。

D. 考察

課題1:

プロトコルおよび先進医療実施届出書の内容がほぼ確定した。本研究は再生医療新法下での施行となるため平成27年度に特定認定再生医療等委員会への承認申請を行う。承認後、厚生労働省と再度事前相談を経て、先進医療申請を行う予定である。

SScでは皮膚や肺の病変部にCD8陽性T細胞が浸潤し、その程度が活動性と相関する事より、病的CD8陽性T細胞の存在が示唆されている。CD8陽性T細胞のマイクロアレイにおいて健常人とSSc患者間で異なる発現を示した遺伝子のうち、GWASで疾患関連遺伝子として抽出されたCD226に着目した。われわれはSSc患者CD8陽性細胞では蛋白レベル

でもCD226発現が亢進していることを確認した。SSc患者においてCD226陽性CD8陽性T細胞の割合は皮膚硬化や間質性肺炎の重症度と関連しており、新しいバイオマーカーの候補である。

課題2:

- ・被験者のうち1名は投与開始後約3ヶ月になるが、現在、有害事象は軽微で、投与を継続しており、効果が期待できる。
- ・治験薬と因果関係のある重篤な有害事象は発生していない。
- ・疾患の性格から、全身状態の変化が起こりやすいため、早期入院、治験開始が重要である。
- ・現在、前治療中に問い合わせをいただく例も増えており、その点では時機を逸することなく治験に入ることが出来るものと思われる。

課題3:

今年度も症例登録を促進する方策を取って、目標症例の登録を完了し、プロトコル治療並びにフォローアップを継続し、研究遂行に邁進したい。

E. 結論

以下のように3課題ともそれぞれプロトコル確定、治験開始、多施設臨床試験実施と当初の目標を達成している。PMDAとの薬事戦略相談等も終了し順調に進捗している。

課題1:

PMDAと薬事戦略相談事前面談、厚生労働省と事前相談を行う事により、プロトコルおよび先進医療実施届出書の内容がほぼ確定した。

SScの病態形成に関与する分子としてCD226を同定した。

課題2:

胆道癌に対する新たながんワクチン療法を開発する目的で、第Ⅱ相医師主導治験を計画し、治験届を行い、被験者募集を開始し、5名から説明同意を取得し4名に治験薬の投与を行った。内1名は約3か月間の投与を続けている。

課題3:

平成26年度は登録症例数が目標を下回っており、6つの新規参加施設を追加した。平成27年2月現在、総登録目標180例の内、47例の登録を得ている。最終患者登録後の観察期間は3年、症例集積、解析期間(2ヵ月)は当初の計画通りとするため、試験期間を平成30年12月までとした。

F. 健康危険情報

課題2

2015年3月15日時点で重篤な有害事象は低酸素症、腎前性腎不全、敗血症の3例であるが、いずれも治験薬との因果関係は否定された。

課題1については症例登録前であり、課題3については特に被験者に関して安全性の懸念を生じるような事象は生じていない。

G. 研究発表

1. 論文発表 特になし

2. 学会発表 特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし

2. 実用新案登録 特になし

3. その他 特になし

厚生労働科学研究費補助金(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

難治性全身性硬化症に対する自己造血幹細胞移植の臨床研究

研究者分担者 赤司浩一
九州大学病院 血液腫瘍内科 教授

研究要旨

全身性硬化症(SSc)において、高度の皮膚硬化と内臓病変を有する重症例は5年生存率が50-60%と予後不良である。本研究では難治性SScに対する自己造血幹細胞移植(自己HSCT)の実用化を目指し、先進医療として臨床第II相試験を実施する事が目的である。本年度は1)昨年度修正した臨床第II相試験のプロトコルを基に医薬品医療機器総合機構(PMDA)、厚生労働省と事前相談を行い先進医療申請の準備を進めること、2)SScに対する自己HSCTの有効性の機序を明らかにするためSScの病態形成に関わる分子を同定する事を目的とした。本年度PMDA、厚生労働省と事前相談を行った事により、プロトコルおよび先進医療実施届出書の内容がほぼ確定した。平成26年11月に再生医療新法が施行となり、今後設置される特定認定再生医療等委員会での承認が必要となったため、準備を開始した。リンパ球の遺伝子発現プロファイル解析により、SSc患者と健常人で発現量が異なる遺伝子のうち、CD226について機能解析を行った。CD226はSSc患者CD8陽性T細胞で高発現しており、CD226陽性CD8陽性T細胞の割合は皮膚硬化や間質性肺炎の重症度と関連していた。CD226高発現CD8陽性T細胞では向線維化サイトカインIL-13の産生が増加しており、SScの病態形成に関与している事が示唆された。

A. 研究目的

全身性硬化症(SSc)は皮膚硬化と血管病変を特徴とする全身性結合組織疾患で、病変は皮膚、肺、心臓、腎臓、消化管、関節等、広範囲に及ぶ。トポイソメラーゼIやセントロメアに対する自己抗体を認め、またこれらが病型とも関連している事より、その発症や病態形成に自己免疫学的機序が関与すると考えられている。SScは確立された有効な治療法がなく、高度の皮膚硬化と内臓病変を有する重症例は5年生存率が50-60%と予後不良であり、生存例においても日常生活の質は著しく低下する。

難治性SScへの新規治療法として、欧米で

は自己造血幹細胞移植(自己HSCT)が臨床応用されており、これまで臨床第III相試験が実施されてきたが、このうち欧州の臨床第III相試験において自己HSCT群では従来治療群に対し長期生存率が有意に向上する事が示された(van Laar JM, JAMA 2014; 311: 2490)。当施設でも2002年より、臨床第I/II相試験として難治性SSc19例に対し、自己HSCTを施行し、高い治療効果を得た。

本研究では難治性SScに対する自己HSCTの実用化を目指し、先進医療として臨床第II相試験を実施する事が目的である。本年度は1)昨年度修正した臨床第II相試験のプロトコルを基に医薬品医療機器総合機構(PMDA)、厚生労働省と事前相談を行い先進医療申請

の準備を進めること、2)SScに対する自己HSCTの有効性の機序を明らかにするためSScの病態形成に関わる分子を同定し、その役割を明らかにする事を目的とした。

B. 研究方法

健常人5名とSSc患者9名の末梢血リンパ球をソーティングにより8分画に分けて回収し、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルと比較した。SSc患者CD8陽性T細胞において高発現しているCD226に着目し、以下の検討を行った。

a)SSc患者においてCD226が高発現しているリンパ球亜分画、b)CD226陽性CD8陽性T細胞の割合とSSc患者における皮膚硬化および間質性肺炎の重症度との関連、c)CD226高発現CD8陽性細胞におけるサイトカイン産生プロファイル、を明らかにする。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学大学院医学研究院倫理委員会の承認を得ており、全例に対し、説明と同意の取得を行っている。

C. 研究結果

1)先進医療申請準備

当施設の先行試験の成績より難治性SScに対する自己HSCTは安全かつ有効な治療法であると考えられたため、先進医療での実施を目指し、臨床第II相試験のプロトコルを作成した。このプロトコルを基に平成25年度にPMDAと薬事戦略相談事前面談、厚生労働省と事前相談を行った。平成26年度は前年度助言を受けた点につき、プロトコルを修正し、再度PMDAと薬事戦略相談事前面談を行った。また先進医療実施届出書を作成し、厚生労働省と事前相談を行った。先進医療実施に

関し大筋で合意が得られたため、症例報告書の作成を開始した。本研究に関連し、平成26年11月に再生医療新法が施行となった。これに伴い、今後設置される特定認定再生医療等委員会での承認が必要となるためその準備を開始した。まずCD34陽性細胞の分離について平成26年1月に特定細胞加工物製造届を地方厚生局に提出した。

2)SScの病態形成に関わる分子の同定

健常人5名と強皮症患者9名の末梢血リンパ球を8分画に分け、マイクロアレイにより遺伝子発現プロファイルと比較した所、各々のリンパ球亜分画において、発現レベルの異なる複数の遺伝子を認めた。この中でSSc患者CD8陽性細胞において高発現していたCD226について機能解析を行い、以下の結果を得た。

a)フローサイトメトリーを用いた検討で、SSc患者では健常人に比し、CD8陽性T細胞におけるCD226の発現が亢進していた。CD4陽性T細胞およびB細胞ではSSc患者におけるCD226の発現亢進は認めなかった。b)びまん型SScでは限局型SScに比べCD226陽性CD8陽性T細胞の割合が有意に多く、また皮膚硬化の程度(スキンスコア)とCD226陽性CD8陽性T細胞の割合の間に有意な正の相関を認めた。間質性肺炎を有するSSc患者ではCD8陽性CD226陽性T細胞の割合が有意に多く、また%VCとCD226陽性CD8陽性T細胞の割合の間に有意な負の相関を認めた。c)CD226高発現CD8陽性T細胞ではIL-13の産生が増加していた。

D. 考察

平成26年度はPMDAと薬事戦略相談事前面談、厚生労働省と事前相談を行う事により、

プロトコールおよび先進医療実施届出書の内容がほぼ確定した。本研究は再生医療新法下での施行となるため平成27年度に特定認定再生医療等委員会への承認申請を行う。承認後、厚生労働省と再度事前相談を経て、先進医療申請を行う予定である。

本年度はSScの病態形成に関与する分子の同定を試みた。SScでは皮膚や肺の病変部にCD8陽性T細胞が浸潤し、その程度が活動性と相関する事より、病的CD8陽性T細胞の存在が示唆されている。この観点からまずCD8陽性T細胞に焦点を絞り、CD8陽性T細胞のマイクロアレイにおいて健常人とSSc患者間で異なる発現を示した遺伝子のうち、GWASで疾患関連遺伝子として抽出されたCD226に着目した。CD226は免疫グロブリンスーパーファミリーに属するI型膜糖蛋白でT細胞、単球、NK細胞等に発現する。われわれはSSc患者CD8陽性細胞では蛋白レベルでもCD226発現が亢進していることを確認した。SSc患者においてCD226陽性CD8陽性T細胞の割合は皮膚硬化や間質性肺炎の重症度と関連しており、新しいバイオマーカーの候補である。CD226高発現CD8陽性T細胞では向線維化サイトカインIL-13の産生が増加しており、SScの病態形成に関与している事が示唆された。重症SSc患者に対する自己HSCT後のCD8陽性T細胞におけるCD226発現を経時的に観察する事は有用と思われる。

E. 結論

PMDAと薬事戦略相談事前面談、厚生労働省と事前相談を行う事により、プロトコールおよび先進医療実施届出書の内容がほぼ確定した。

SScの病態形成に関与する分子としてCD226

を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyawaki K, Arinobu Y, Iwasaki H, Kohno K, Tsuzuki H, Iino T, Shima T, Kikushige Y, Takenaka K, Miyamoto T, Akashi K. CD41 marks the initial myelo-erythroid lineage specification in adult mouse hematopoiesis: Redefinition of murine common myeloid progenitor. *Stem Cells* 33: 976-987, 2015
2. Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity* 41: 402-413, 2014
3. Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Horiuchi T, Sunami S, Kamitani T, Jinnouchi M, Nagao M, Akashi K, Honda H. Evaluation of the extent of ground-glass opacity on high-resolution CT in patients with interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis: Comparison between quantitative and qualitative analysis. *Clin Radiol* 69: 758-764, 2014
4. Kato K, Choi I, Wake A, Uike N, Taniguchi S, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Nakamae H, Oku E, Murata M, Eto T, Akashi K, Sakamaki H, Kato K, Suzuki R, Yamanaka T, Utsunomiya A. Treatment of Patients with Adult T Cell Leukemia/Lymphoma with Cord Blood Transplantation: A Japanese Nationwide Retrospective Survey. *Biol Blood Marrow Transplant* 20: 1968-1974, 2014
5. Oryoji K, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Nihiro H, Shimoda T, Akashi K, Yanase T.

Reduced carotid intima-media thickness in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclosporine A. Mod Rheumatol 24: 86-92, 2014

6. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yuda J, Tochigi T, Yoshimoto G, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Mizuno S, Goto N, Akashi K. The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell. Exp Hematol 42: 955-965, 2014

2. 学会発表

1. 赤司浩一：「Cancer Stem Cell」第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月、福岡
2. Akashi K：「TIM-3, as a Target for Eradication of Cancer Stem Cells」The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014年6月、東京
3. 赤司浩一：「白血病幹細胞研究のすゝめ」第76回日本血液学会学術集会 2014年11月、大阪

G.知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

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(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
分担研究報告書

がんワクチン OCV-C01 による標準療法不応進行再発

胆道がんに対する第Ⅱ相医師主導治験に関する研究

研究分担者 谷 憲三郎

研究要旨:

悪性新生物(がん)は、1981年以降日本人の死亡原因の第1位となり、2011年にはがんによる死亡数は357,305人、死亡率は人口10万対283.2にのぼり、2011年のがん死亡者数は、1975年の約2.5倍にも増加している。その中で、2011年には18,186人が胆道癌(肝外胆道癌、胆嚢癌、乳頭部癌)で死亡しており、男女合わせたがん死亡原因において、肺癌、胃癌、肝臓癌(肝内胆管癌を含む)、結腸癌、膵癌について第6位となっている。また、乳頭部癌では約10%、肝内外胆管癌では約25%、胆嚢癌では約30%が診断時に切除不能な進行癌であることに加え、5年相対生存率も20~25%であることから予後不良/難治性の悪性腫瘍の一つである。本研究ではVEGFR-1、2およびKIF20Aを標的としたHLA-A*24:02拘束性カクテルペプチドがんワクチン OCV-C01を用いた第Ⅱ相医師主導治験を行う。本治験は既治療不応進行胆道癌患者を対象として、OCV-C01皮下投与療法の有効性と安全性を検討し、主要評価項目は全生存期間(OS)である。平成25年12月18日に治験届を行い、平成26年4月より被験者募集を開始、平成27年12までの被験者登録期間を予定している。

A. 研究目的:

既治療不応胆道癌患者を対象として、OCV-C01の皮下投与療法の有効性と安全性を検討する。

1. 主要目的(主評価項目)

既治療不応胆道癌と診断された患者を対象として、OCV-C01の皮下投与の全生存期間(overall survival, OS)を検討する。

2. 副次目的(副評価項目)

1) 主要目的に準じて、無増悪生存期間(progression free survival, PFS)について検討する。

2) 固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン(RECIST ガイドライン)―改訂版 version 1.1―日本語訳JCOG版 ver.1.0(略称:RECIST v1.1日本語訳JCOG版)に基づき、測定可能病変を有する場合は腫瘍縮小効果を求め、奏効率、病勢コントロール率について検討する。

3) 有害事象の発現頻度、臨床検査値およびバイタルサインの変化から本剤の安全性を検討する。

4) 治療効果のバイオマーカーの探索を目的として、エルパモチド、OCV-101、OCV-105特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の変化等を比較検討する。

B. 研究方法:

1. 目標症例数

HLA-A*24:02 保持者13例 (HLA適合不明患者40例)

2. 試験物の概要

OCV-C01はOCV-105(KIF20A由来ペプチド)、エルパモチド (VEGFR-2由来ペプチド)、OCV-101(VEGFR-1由来ペプチド)のカクテル剤であり、同一の効能を有する市販薬はない。

調達法: 治験薬提供者にて原薬を海外から輸入し製造
治験薬提供者: オンコセラピー・サイエンス社

品質: GMP

規格: 2007年6月、改良を加えた製造工程にて製造された治験薬は日本薬局法15改正の注射剤の不溶性微粒子試験の基準を満たすことが確認されている。

3. 投与方法

治験薬を1.0 mL/bodyで、週1回、4週間投与を1コースとして可能な限り腋窩部あるいは鼠径部に皮下投与する。腋窩部あるいは鼠径部に投与できない場合は上腕、大腿あるいは腹部に皮下投与する。治験薬投与中止基準に該当するまで上記コースを繰り返す。最終投与日は最長で投与開始日から365日目までとする。

4. 対象疾患、適格基準

1) 肝内外胆管癌、胆嚢癌および乳頭部癌と診断されている。

2) 肝外胆管癌、胆嚢癌、乳頭部癌の場合は、腺癌、腺扁平上皮癌、肝内胆管癌の場合は腺癌と組織学的に診断が得られている。

3) Stage II-IV 胆道癌で切除不能胆道癌である。測定可能病変の有無は問わない。

4) ゲムシタビンを含むレジメンに対して不応もしくはシスプラチンの投与が出来ないと判断されている。

5) 放射線療法により生存期間の延長が期待できない。

6) 中枢神経への転移がない。

7) 中等度以上の腹水、胸水を認めない。

8) Performance Status (ECOG) 0, 1のいずれかである。

9) 登録時の年齢が20歳以上である。

10) 主要な臓器機能が保持され、以下のすべての基準を満たしている。

11) その他治験責任(分担)医師の判断により、治験薬投与が困難となるような事象の発現がない。

12) 本試験の参加に関して、患者本人からの文書による同意が得られている。

5. 除外基準

1) 過去に、いわゆる癌免疫療法(活性化リンパ球療法、樹状細胞療法、がんワクチン療法など)の受療歴を有する。

2) 過去1年未満に重複癌を有する。ただし、上皮内癌および粘膜内癌病変は登録可とする。

3) 原疾患が消化管等に浸潤しておりかつ出血が強く危惧される。

4)間質性肺炎または肺線維症の既往または合併を有する。

5)コントロール困難な中等度以上の腹水、胸水を認める(中等度以上の腹水とは、骨盤腔を越える場合を目安とし、中等度以上の胸水とは立位単純胸部X線における胸水量が左右いずれかの肺野の3分の1を越える場合を目安とする)。また、ピンパニールを用いた胸膜癒着術を行っている場合は抗悪性腫瘍薬使用として扱う。

6)穿刺排液処置を要する心嚢水を有する。

7)重症感染症を有する、または疑われる。

8)脳転移が判明している、または臨床症状により脳転移が疑われる。

9)重度の精神障害または重度の神経障害を有する。

10)コントロール不良の心疾患、肺疾患、腎疾患、肝疾患を有する。

11)grade 4 の事象(臨床検査値異常も含む)を有するまたはその他コントロール不良の併存疾患を有する。

12)治験薬投与開始前 12 ヶ月以内の心筋梗塞、重度不安定狭心症、冠動脈・末梢動脈バイパス術、うっ血性心不全、脳血管障害、肺塞栓症、深部静脈血栓症、その他重大な血栓塞栓症の既往を有する。

13)治癒に至っていない外傷性病変(骨折を含む)を有する。

14)出血素因(破裂により致死性になる可能性がある動脈瘤を含む)または過度の凝固障害を有する、若しくはそれらの既往を有する。

15)アスピリン以外の抗血栓薬の継続投与を要する。

16)適切な治療を受けているにもかかわらずコントロール不良な高血圧を有する。

17)治療を要する心不全を有する。

18)治験薬投与期間中に以下の薬剤の全身投与を必要とする。①副腎皮質ステロイド剤(2週間に1回以上の継続的な投与)②免疫抑制剤、免疫賦活剤 ③G-CSF(M-CSF)製剤 ④EPO 製剤

19)他の治験や臨床研究に参加中である(介入を伴わない試験は除く)。

20)予めHLA-A*24:02の結果が判明している。

21)妊娠中または治験薬投与開始日から治験薬最終投与後 120 日まで授乳を中止できない。また、本人またはパートナーに避妊の意志(男性は同意取得日から治験薬最終投与日後 180 日まで、女性は同意取得日から治験薬最終投与日後 120 日までの期間)がない。

22)その他、治験責任(分担)医師が不適格と判断した患者。

6. 治験実施予定期間:2014年1月~2016年12月(24ヶ月)

7. 被験者登録予定期間:2014年4月~2015年12月(21ヶ月)

8. 倫理面への配慮

本治験は、ヘルシンキ宣言に基づく倫理原則に則って実施する。また、治験実施計画書、薬事法第14条第3項及び第80条の2、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(GCP 省令)」を遵守して実施する。

C. 研究の結果

1. 治験の実施状況

・2013年3月14日 医薬品医療機器総合機構(PMDA)事前面談(第1回) 治験の概要の戦略相談

・2013年7月17日 同事前面談(第2回) 医師主導治験計画書等、詳細な内容に関する戦略相談

・2013年9月6日 薬事戦略相談(対面助言)

・2013年11月28日 九州大学病院臨床研究倫理審査委員会

・2013年12月18日 治験届け提出

・2014年3月 治験クリティカル・パス完成

・2014年4月 スタートアップミーティング、被験者募集開始

・2015年3月10日現在

1) 問い合わせ患者数 27名

福岡6、熊本、宮崎、大分、山口、徳島、奈良2、大阪2、兵庫2、愛知2、東京、神奈川、千葉2、台湾2、不明2(うち死亡確認者数 6名)

2) 入院患者数 8名

① 説明同意取得者数 5名

② 登録被験者数 4名

(山口、兵庫、東京、大分)

③ 治験薬投与継続中 1名 中止後、後治療中 1名 現病悪化のため死亡 1名

④ 入院後適応外と判断された患者数 4名 (全身状態不良 1名 深部静脈血栓症 2名 門脈圧亢進症 1名)

D. 考察:

・被験者のうち1名は投与開始後約3ヶ月になるが、現在、有害事象は軽微で、投与を継続しており、効果が期待できる。

・治験薬と因果関係のある重篤な有害事象は発生していない。

・疾患の性格から、全身状態の変化が起こりやすいため、早期入院、治験開始が重要である。

・現在、前治療中に問い合わせをいただく例も増えており、その点では時機を逸することなく治験に入ることが出来るものと思われる。

E. 結論:

胆道癌に対する新たながんワクチン療法を開発する目的で、第Ⅱ相医師主導治験を計画し、治験届を行い、被験者募集を開始し、5名から説明同意を取得し4名に治験薬の投与を行った。内1名は約3か月間の投与を続けている

F. 健康危険情報

2015年3月15日時点で重篤な有害事象は低酸素症、腎前性腎不全、敗血症の3例であるが、いずれも治験薬との因果関係は否定された。

G. 研究発表

1. 論文発表:

2. 学会発表等:

- 1) 土方康基、鶴田敏久、谷憲三朗他、進行固形腫瘍患者に対する化学療法併用新規免疫細胞療法第1相臨床研究、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、横浜
- 2) 土方康基、谷憲三朗他、RNF43ペプチドパルス樹状細胞ならびにRNF43ペプチド特異的活性化リンパ球を用いた進行固形腫瘍患者に対する強化養子免疫療法第I相臨床試験、第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会、2013年8月24日、名古屋
- 3) 土方康基、当科における難治性悪性腫瘍に対する免疫療法臨床試験の現状、第11回日本免疫治療学研究会学術集会、2014年2月22日、東京
- 4) 鶴田敏久、谷憲三朗他、既治療不応進行胆道癌患者を対象としたカクテルペプチド癌ワクチンOCV-C01療法:第Ⅱ相医師主導治験 文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラム、厚生労働省早期・探索的臨床試験拠点整備事業・臨床研究中核病院整備事業 平成25年度成果報告会 2014年3月1日、東京
- 5) 鶴田敏久、谷憲三朗他、医師主導治験へのクリティカル・パス導入の試み:第16回日本医療マネジメント学会 2014年6月13-14日 岡山
- 6) 鶴田敏久、谷憲三朗他、医師主導治験へのユニットパス導入の試み 日本臨床試験学会 第7回学術総会総会 2014年2月20日、東京
- 7) 鶴田敏久、谷憲三朗他、がんワクチンOCV-C01療法による標準療法不応進行再発胆道がんに対する第Ⅱ相医師主導治験 文部科学省・厚生労働省 革新的医療技術創出拠点プロジェクト 平成26年成果報告会 2015年3月5-6日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:特になし、
2. 実用新案登録:特になし
3. その他:特になし

分担研究報告書

低用量BCG膀胱腔内注入維持療法の再発予防効果ならびに安全性に関するランダム化比較試験

研究分担者 内藤 誠二

研究要旨

平成25年5月にIRB承認を得て試験を開始し、現在、研究分担者施設25施設において症例登録を行っている。

研究分担者氏名： 内藤 誠二
所属機関名、職名：九州大学大学院医学研究院
泌尿器科学分野、教授

現状を評価し、研究全体の継続に及ぼす影響を評価し、科学性と倫理性的の確保に努める。

A. 研究目的

中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱癌（Ta、T1）に対する TURBT 後の標準量 BCG 導入療法＋低用量 BCG 維持療法が、標準的レジメである標準量 BCG 導入療法より再発・進展予防効果において優れ、かつ安全に、高い完遂率をもって実施できかどうかを、前向き無作為化比較試験によって検証する。

B. 研究方法

中・高再発リスクの筋層非浸潤性膀胱癌（Ta、T1）患者を以下の2群にランダム化する。A群：標準量 BCG 導入療法（80 mg/週×6回）、B群：標準量 BCG 導入療法（80 mg/週×6回）＋低用量 BCG 維持療法（40 mg/週×3回 ×4コース）。主要評価項目は、無再発生存期間、副次評価項目は、無増悪生存期間、生存期間、プロトコル治療の完遂率、有害事象発現状況とした。登録予定患者は合計180例、登録期間は1.5年、追跡期間は最短3年とし、総研究期間は5年である。

（倫理面への配慮）

参加患者の安全性確保については、適格条件やプロトコル治療の中止変更規準を厳しく設けており、試験参加による不利益は最小化されている。また、「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言などの国際的倫理原則に従い以下を遵守している。

- 1) 研究実施計画書の IRB 承認が得られた施設のみから患者登録を行う。
- 2) すべての患者について登録前に十分な説明と理解に基づく自発的同意を本人より文書で得る。
- 3) データの取り扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報（プライバシー）保護を厳守する。
- 4) 研究の第三者的監視として、効果・安全性評価委員会を設置する。この委員会は中間解析として二次登録が100例に達した時点でイベント（再発、増悪、死亡）の発現状況ならびに有害事象の発

C. 研究結果

平成25年1月末にプロトコル、患者同意説明文書を完成し、平成26年度には全ての参加施設のIRBの承認を得て、症例登録を開始した。しかし、平成26年度は登録症例数が目標を下回っており、6つの新規参加施設を追加した。平成27年2月現在、総登録目標180例の内、47例の登録を得ている。当初の計画では、症例登録期間は平成25年5月から平成26年10月までとしていたが、症例登録開始は計画より約1年遅れており、また登録症例数も伸び悩んでいたため、症例登録期間を平成27年10月まで延長した。

D. 考察

今年度も症例登録を促進する方策を取って、目標症例の登録を完了し、プロトコル治療並びにフォローアップを継続し、研究遂行に邁進したい。

E. 結論

平成26年度は登録症例数が目標を下回っており、6つの新規参加施設を追加した。平成27年2月現在、総登録目標180例の内、47例の登録を得ている。最終患者登録後の観察期間は3年、症例集積、解析期間（2ヵ月）は当初の計画通りとするため、試験期間は平成30年12月までとなった。引き続き、登録症例数を伸ばす方策を取り、症例登録の推進を図っていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

研究成果の刊行に関する一覧表

氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyawaki K, Arinobu Y, Iwasaki H, Kohno K, Tsuzuki H, Iino T, Shima T, Kikushige Y, Takenaka K, Miyamoto T, <u>Akashi</u> <u>K.</u>	CD41 marks the initial myelo-erythroid lineage specification in adult mouse hematopoiesis: Redefinition of murine common myeloid progenitor.	Stem Cells	33:	976-987	2015
Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-Hora M, <u>Akashi K.</u> Yamasaki S.	Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria.	Immunity	41	402-413	2014
Yabuuchi H, Matsuo Y, Tsukamoto H, Horiuchi T, Sunami S, Kamitani T, Jinnouchi M, Nagao M, <u>Akashi</u> <u>K.</u> , Honda H.	Evaluation of the extent of ground-glass opacity on high-resolution CT in patients with interstitial pneumonia associated with systemic sclerosis: Comparison between quantitative and qualitative analysis.	Clin Radiol	69	758-764	2014

氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kato K, Choi I, Wake A, Uike N, Taniguchi S, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Nakamae H, Oku E, Murata M, Eto T, <u>Akashi K</u> , Sakamaki H, Kato K, Suzuki R, Yamanaka T, Utsunomiya A.	Treatment of Patients with Adult T Cell Leukemia/Lymphoma with Cord Blood Transplantation: A Japanese Nationwide Retrospective Survey.	Biol Blood Marrow Transplant	20	1968-1974	2014
Oryoji K, Kiyohara C, Horiuchi T, Tsukamoto H, Niuro H, Shimoda T, <u>Akashi K</u> , Yanase T.	Reduced carotid intima-media thickness in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclosporine A.	Mod Rheumatol	24	86-92	2014
Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yuda J, Tochigi T, Yoshimoto G, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Mizuno S, Goto N, <u>Akashi K</u> .	The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell.	Exp Hematol	42	955-965	2014

CD41 Marks the Initial Myelo-Erythroid Lineage Specification in Adult Mouse Hematopoiesis: Redefinition of Murine Common Myeloid Progenitor

KOHTA MIYAWAKI,^a YOJIRO ARINOBU,^b HIROMI IWASAKI,^b KENTARO KOHNO,^a HIROFUMI TSUZUKI,^a TADAFUMI IINO,^b TAKAHIRO SHIMA,^a YOSHIKANE KIKUSHIGE,^a KATSUTO TAKENAKA,^{a,b} TOSHIHIRO MIYAMOTO,^a KOICHI AKASHI^a

Key Words. Common myeloid progenitors • Hematopoietic stem cells • GATA-1 transcription factor • CD41 • Sepsis • Myeloid leukemia

ABSTRACT

Previous studies have predicted that reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 regulates myelo-erythroid versus myelo-lymphoid lineage commitment in early hematopoiesis. Such PU.1-activating myelo-lymphoid progenitors exist within the lymphoid-primed multipotent progenitor (LMPP) population at the primitive Lineage[−]Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) stage. We here show that the counterpart of GATA-1-activating myelo-erythroid progenitor resides also at the LSK stage, expressing CD41 at a high level. Purified CD41^{hi} LSK cells showed exceedingly strong and prolonged myelo-erythroid-restricted reconstitution, and primed myelo-erythroid gene expression with a more primitive molecular signature as compared to the original common myeloid progenitor (CMP). The CD41^{hi} LSK cells more strongly contributed to emergent and malignant myelo-lymphopoiesis than LMPPs, and produced the original CMP by downregulating Sca-1 and CD41, suggesting that they are the earliest CMPs. Thus, the hematopoietic developmental map should be revised by integrating the primary branchpoint comprised of the new, isolatable CD41^{hi} CMP and the LMPP populations. *STEM CELLS* 2015;33:976–987

INTRODUCTION

In murine hematopoiesis, cells multipotent for all hematopoietic lineages have been found within the Lin[−]Sca-1⁺c-Kit⁺ (LSK) fraction [1–3]. CD34[−] and/or Thy-1^{lo} LSK cells (LSKs) are hematopoietic stem cells (HSCs) that can reconstitute all lineage cells for a long-term, and CD34⁺ or Thy-1[−] LSKs mainly contain multipotent progenitors (MPPs) that show multilineage reconstitution only transiently [4]. In contrast, the oligopotent or bipotent lineage-restricted progenitors such as common myeloid progenitors (CMPs), megakaryocyte-erythrocyte progenitors (MEPs), granulocyte-macrophage progenitors (GMPs), and common lymphoid progenitors (CLPs) do not express Sca-1, and therefore reside outside the LSK fraction [5, 6].

However, recent studies have shown that LSKs are heterogeneous, containing early lineage-restricted progenitor populations with strong expansion potential [7]. For example, lymphoid-primed multipotent progenitor (LMPP), a subpopulation of CD34⁺ LSK with a high level of Flt3 expression, has been isolated,

and this population differentiates mainly into granulocyte/monocyte (GM) and lymphoid, but not into megakaryocyte/erythroid (MegE) lineage [1–3, 8]. Importantly, the competitive interplay of GATA-1 and PU.1 plays a critical role in lineage commitment at the CD34⁺ LSK stage [7, 9, 10]. In mice harboring a green fluorescent protein (GFP) reporter knocked into the PU.1 locus [11], a fraction of the CD34⁺ LSK population expressed a high level of GFP, and this population was capable of differentiation into both GM and lymphoid, but not into MegE cells. The PU.1-GFP^{hi} CD34⁺ LSK population was Flt3⁺, belonging to the CD34⁺Flt3⁺ LMPP population. These data suggest that the first myelo-lymphoid lineage restriction initiates within the LMPP fraction [10].

In contrast, in mice having a transgenic GFP reporter driven by a GATA-1 promoter [12], GFP expression was found in Flt3[−] fraction of the CD34⁺ LSK population [10]. GATA-1-expressing CD34⁺Flt3[−] LSKs have GM and MegE potential but are unable to produce lymphoid cells as CMPs do, while their expansion after transplantation was much stronger than that of CMPs, suggesting that the GATA-

^aDepartment of Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan; ^bCenter for Cellular and Molecular Medicine, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan

Correspondence: Koichi Akashi, M.D., Ph.D., Professor of, Department of Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan.
Telephone: 81-92-642-5225;
Fax: 81-92-642-5247;
e-mail: akashi@med.kyushu-u.ac.jp

Received May 9, 2014; accepted for publication October 30, 2014; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* November 29, 2014.

© AlphaMed Press
1066-5099/2014/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.1906>

1-expressing CD34⁺Flt3⁻ LSK population is more immature than the original CMP. Collectively, the GATA-1-GFP⁺CD34⁺Flt3⁻ LSK population appeared to be more primitive CMP, and this population and LMPP (or PU.1^{hi} LSK) might constitute an early myelo-erythroid versus myelo-lymphoid lineage branchpoint [10], presumably based on competitive interplay of GATA-1 and PU.1 [7, 9, 13].

We wished to prospectively isolate the population corresponding to the GATA-1-GFP⁺CD34⁺Flt3⁻ LSK CMP from wild-type mouse bone marrow (BM). By differential expression analysis using cDNA microarray, we here identified CD41 as a positive marker for this population. Purified CD41^{hi} LSKs displayed robust myelo-erythroid lineage potential and gave rise to the original CMP, suggesting that this population should be the earliest CMP. Successful identification of the redefined primitive CMP in wild-type mouse BM should facilitate further analysis of developmental mechanisms in early hematopoiesis.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Eight to twelve-week-old mice were used in this study. Mice were bred and maintained in the Research Animal Facility at Kyushu University Graduate School of Medical Sciences in accordance with the guidelines. C57BL/6J (Ly5.2) and congenic B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ (Ly5.1) mice were purchased from Charles River Laboratories Japan, Inc. C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) mice were purchased from Japan SLC, Inc. All experiments were conducted following the guideline in the Institutional Animal Committee of Kyushu University.

Antibodies, Cell Staining, and Sorting

Mouse BM cells were obtained from ilia, femurs, tibias, and humeri. In order to isolate hematopoietic stem/progenitor populations, BM cells were stained with FITC-conjugated anti-CD34 (RAM34) (eBioscience, San Diego, CA, www.ebioscience.com) monoclonal antibodies, PE- or Brilliant Violet 421-conjugated anti-CD41 (MWRReg30), PE/Cy7-conjugated anti-Sca-1 (D7), APC-conjugated anti-Flt3 (A2F10), APC/Cy7-conjugated anti-c-Kit (2B8), PE-conjugated anti-FcγRII/III (93), and PerCP/Cy5.5-conjugated rat antibodies specific for IL-7Rα (A7R34) and the following lineage markers: CD3 (17A2), CD4 (RM4-5), CD8a (53-6.7), B220 (RA3-6B2), Gr-1 (RB6-8C5), CD11b (M1/70), TER-119 (TER-119), and CD19 (6D5) (BioLegend, San Diego, CA, www.biolegend.com). LT-HSCs were defined as CD34⁻ LSK and LMPPs were sorted as 25% highest Flt3⁺ LSK. Myeloid progenitors were sorted as IL-7Rα⁻Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁺FcγRII/III^{lo} (CMPs), IL-7Rα⁻Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁺FcγRII/III^{hi} (GMPs), and IL-7Rα⁻Lin⁻Sca-1⁻c-Kit⁺CD34⁻FcγRII/III^{lo} (MEPs). These stem/progenitor populations were double-sorted using BD FACS Aria III cell-sorting system (BD Biosciences, San Jose, CA, www.bdbiosciences.com).

In Vitro Cultures

To test myelo-erythroid potential, single cells were sorted directly into 60-well Terasaki plates with Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) containing 20% fetal bovine serum (FBS). Cytokines such as murine Stem Cell Factor (SCF, 20 ng/ml), IL-3 (20 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml), Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF, 10 ng/ml),

Thrombopoietin (TPO, 10 ng/ml), and human Erythropoietin (EPO, 4 unit/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, www.rndsystems.com) were added at the initiation of cultures. Cell components of each cultures were determined morphologically and cytochemically by May-Giemsa staining. To evaluate B-cell differentiation potential, cells were sorted onto irradiated (25Gy) OP9 stromal layers in the presence of IL-7 (20 ng/ml) and SCF (20 ng/ml). To test T-cell differentiation potential, cells were sorted onto irradiated (25 Gy) OP9-DL1 stromal layers in the presence of IL-7 (5 ng/ml) and Flt3L (5 ng/ml) [14]. To evaluate the lineal relationships, 200 cells of HSC (CD34⁻ LSK) were cultured in 96-well plates with IMDM containing 20% FBS in the presence of SCF (50 ng/ml) and TPO (50 ng/ml). Ten thousand cells of CD41^{hi} LSK or LMPP were cultured on OP9 stromal layers in 96-well plates with IMDM containing 20% FBS in the presence of myelo-erythroid cytokines. All cultures were incubated at 37°C in a humidified chamber under 5% CO₂.

In Vivo Reconstitution Assays

Five hundred cells of each population (Ly5.1) were transplanted via intrafemoral injection into congenic mice (Ly5.2) after lethal irradiation (10 Gy). In some experiments, 250 LSKs purified from recipient-type (Ly5.2) mice were cotransplanted to rescue transplanted mice. For competitive transplantation assay, we used Ly5.1/5.2 hybrid mice as recipient. Absolute cell numbers of progeny in blood were calculated as leukocyte count (cells per microliter) × GM frequency (%) × chimerism (%) / 100.

The CeLP Surgery

The cecal ligation and puncture (CeLP) as a model for bacterial infection was performed according to previously reported procedures [15]. Briefly, under general anesthesia, the cecum was extracted through 1-cm-long incision site of abdomen. The cecum was ligated about 15 mm proximal to the cecal pole and then punctured once with a 23-gauge needle, confirming that the needle penetrated both sides of cecal wall. The procedure was completed with abdominal closure.

The Mouse Model for Human Chronic Myelogenous Leukemia

To generate human chronic myelogenous leukemia (CML) model, BCR-ABL oncogene was transferred to LSK cells. For transfection, retroviruses carrying p210 BCR-ABL were preloaded onto RetroNectin-coated plates (Takara Shuzo, Shiga, Japan, www.takara-bio.co.jp) and centrifuged at 3,000g for 120 minutes. After discarding supernatant, preincubated LSK cells, which were sorted from Ly5.1 murine BM cells and cultured in the presence of SCF (100 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), sIL-6R (100 ng/ml), and Leukemia Inhibitory Factor (LIF, 20 ng/ml), were cocultured with RetroNectin-bound retroviruses at 37°C for 24 hours. Ly5.1 LSKs carrying BCR-ABL were intravenously injected into lethally irradiated Ly5.2 mice with rescue Ly5.2 BM cells. Three weeks after transplantation of transfected Ly5.1 LSK cells into Ly5.2 mice, BM cells were analyzed and neoplastic BCR-ABL⁺ cells could be identified as Ly5.1⁺ Ly5.2⁻ GFP⁺ cells.

cDNA Microarray Analysis

Target populations ranging in number from 2,000 to 5,000 cells were sorted directly to Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, www.lifetechnologies.com). Total RNA extracted and purified

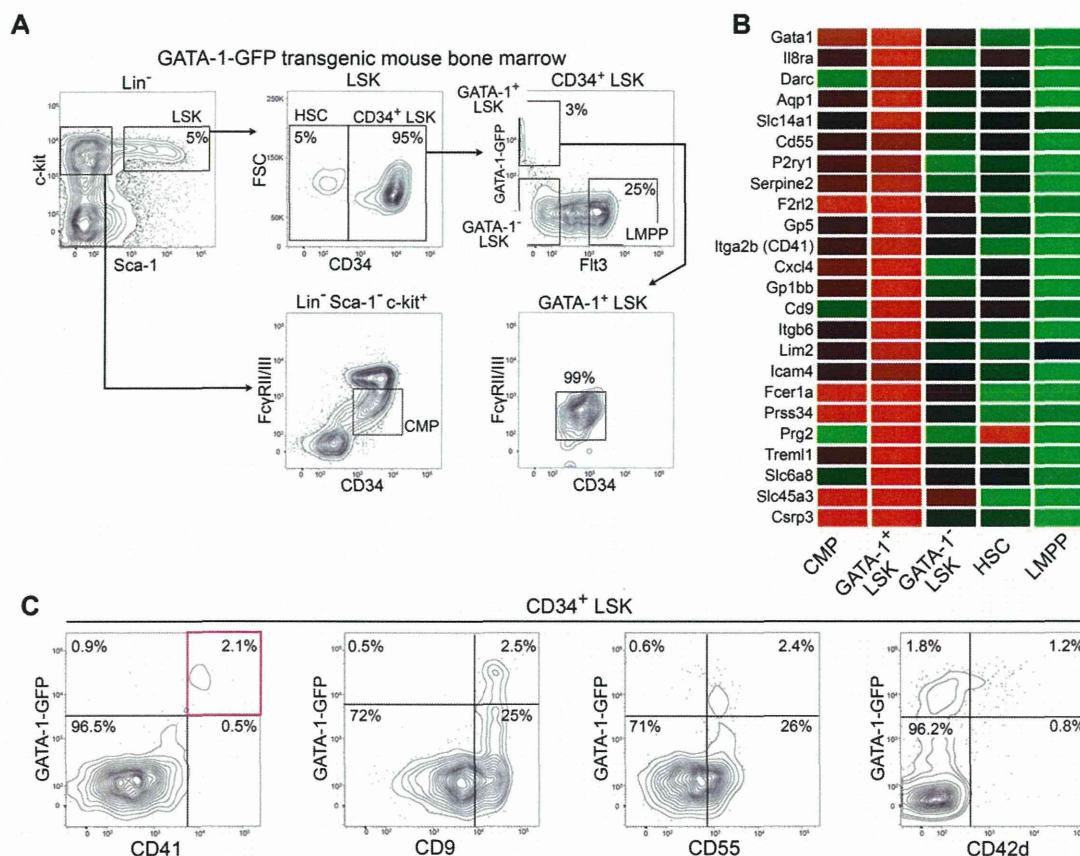


Figure 1. CD41 is the specific surface marker for GATA-1⁺ LSKs. **(A):** Phenotypic characteristics of early stem and progenitor populations in GATA-1-GFP transgenic reporter mice. Note that in contrast to LMPP that resides in the CD34⁺ Flt3⁺ LSK fraction, GATA-1-GFP⁺ cells are found exclusively in the CD34⁺ Flt3⁻ LSK fraction. **(B):** Microarray analysis of stem/progenitor populations purified from the bone marrow of GATA-1-GFP transgenic reporter mice. Candidate genes highly expressed (red) in GATA-1⁺ LSKs as compared to GATA-1⁻ LSKs were shown. Note that most of them were downregulated (green) in LMPP population (Supporting Information Fig. S1). **(C):** The expression pattern of candidate cell surface proteins in GATA-1-GFP⁺ LSKs. Among 18 proteins tested, only CD41 is exclusively expressed in GATA-1-GFP⁺ LSKs. Numbers in the quadrants indicate the percentage of the corresponding populations. Representative dot plots of three independent experiments are shown (Supporting Information Table S1). Abbreviations: CMP, common myeloid progenitor; GFP, green fluorescent protein; HSC, hematopoietic stem cell; LMPP, lymphoid-primed multipotent progenitor; LSK, Lineage⁻Sca-1⁺c-Kit⁺.

using RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands, www.qiagen.com) was subjected to mRNA amplification by MessageAmp II aRNA Amplification Kit and Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Carlsbad, CA, www.lifetechnologies.com/us/en/home/brands/ambion.html). cRNA (1.5 µg) from each sample was hybridized to the Illumina BeadChip. Gene expression data were imported and analyzed using GeneSpring GX software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, www.agilent.com). The microarray data are deposited into Gene Expression Omnibus as GSE55076. Genes that serve as key regulators of lineage determination were selected as lineage affiliated genes from the review articles [9, 16]. Genes actively expressed in HSCs but not in downstream progenitor populations were obtained by Expression Pattern Search function of Gene Expression Commons (<http://gexc.stanford.edu>) [17], comprehensive web-based open platform, which contained microarray data of highly purified hematopoietic stem/progenitor populations in BM and enabled absolute gene expression profiling [18–20]. With this platform, genes actively expressed in HSCs but inactive in all other populations except MPPs were searched and 159 genes were matched to the query (<https://gexc.stanford.edu/model/3/pattern/gene/IfjO170tHkA>).

Single-Cell Gene Expression Profiling

Single cells of target populations were sorted into each well of 96-well PCR plates. After sorting, reverse transcription and pre-amplification were performed with CellsDirect One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Waltham, MA, www.lifetechnologies.com/us/en/home/brands/invitrogen.html). Then cDNA sample was loaded onto Fluidigm Dynamic Array Integrated Fluidic Chip and subjected to quantitative Real-Time PCR by Biomark system (Fluidigm, South San Francisco, CA, www.fluidigm.com). Expression of 18s rRNA gene was used for normalization. Primers and probes used in this assay are obtained from Applied Biosystems (Mm01352636_m1 for Gata1 and Mm00488140_m1 for PU.1).

Statistical Analysis

Data were presented as the mean ± SD. The significance of the differences between groups was determined by Student's *t* test for comparing differences between two groups, and one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference (HSD) test for comparing differences between multiple groups. In some experiments, Dunnett's test was performed. Statistical analysis was performed with JMP (version 10.0, SAS Institute, Cary, NC, www.sas.com) software.