

向けての問題点の整理を行い、移植医療に用いる臍帯血ユニットの安定供給が確保される体制を保持するために必要な議論を進めることを目標としている。

25年度までの到達状況、および26年度の目標は以下の通りである：

生着促進法の開発：東海大学を中心として開発されている新規PAI-1阻害剤は動物実験等で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にされた。ヒト第I相試験も進行中であり、臍帯血移植後に投与する臨床試験が計画されている(安藤・宮田)。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のヒト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な検討をおこなった。今後、臨床応用に向けた前臨床試験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進める予定である(岩間)。アロ造血幹細胞の混合物(5単位)を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が動物モデルを用いて示された。今後はヒト臍帯血を用いた実証を行い、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(大津)。

ウイルス感染症対策法の開発：米国ベイラー医科大学との連携を継続し、臨床応用に向け無血清培養系での多ウイルスに対する抗原特異的CTLの調製法を確立してきた。今年度は、臨床試験開始の準備を進めるとともに、第三者のHLA近似ドナーからのウイルス特異的免疫細胞製剤バンクの構築の準備のために、各CTLのHLA拘束性についての確認法を確立する(森尾・高橋)。

GVHDに対する新規治療開発：臨床検体を用いてGVHD病態における凝固・線溶系の機能解析を行い、併せてYO-2の有効性を動物モデルで探った。今後は、YO-2のヒト組織を含めた毒性、生体投与における安全性、至適投与法、代謝経路等を精査し、GVHDを含めた免疫・炎症性疾患に対する非臨床試験を進める予定である(服部)。

臍帯血バンク整備の支援：造血細胞移植新法の施行のもとで現況の問題点の整理と解決に向けての情報収集に加えた。今年度は、適正な細胞バンクとしての特殊性をさらに進化させるための検討についても議論を重ねる(高梨)。

臨床試験の遂行・支援：これまで現行の臍帯血移植における前処置・GVHD予防法の最適化を目指した観察研究および前向き臨床試験の支援を行ってきた。今年度はさらに、国内の登録データを用いた後方視的臨床研究を進めるとともに、その結果に基づいて次期前方視的臨床試験の準備を進める。さらにより大規模な臨床データを得るために、韓国・中国の血液学会、移植施設と連携して国際共同前方視的臨床試験計画の策定のための議論を進める。これらの臨床研究の支援を各研究横断的に行う体制を整える(山本・寺倉・山口)。

臍帯血移植合併症の克服に向けて、これらの新たな視点に立った基盤的研究を臨床応用するために分野横断的に連携を進め、新たな治療法開発を総合的に推進する予定である。

2014.7.5

厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業・移植医療技術開発研究分野)

適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究

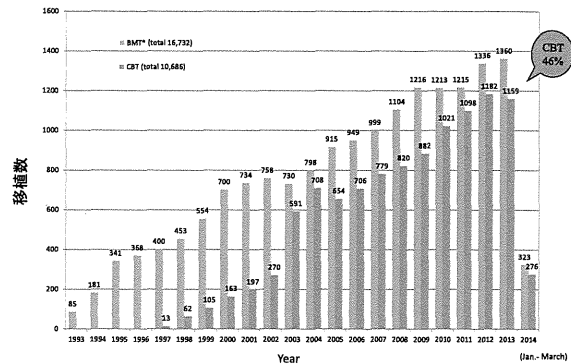
臍帯血バンク運営における問題整理



高梨 美乃子
日本赤十字社血液事業本部

1

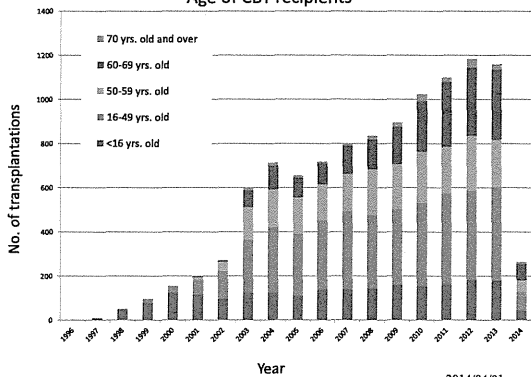
本邦の非血縁者間造血細胞移植



* The number of transplants via JMDP includes PBSCT cases (33 cases).

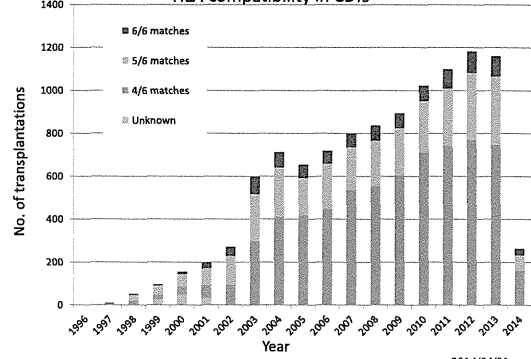
2

Age of CBT recipients



2014/04/01 3

HLA compatibility in CBTs



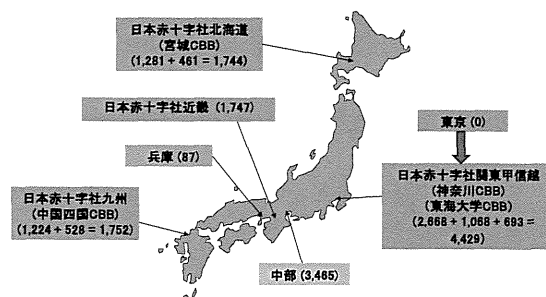
2014/04/01 4

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

- 目次
- 第一章 総則(第一条-第八条)
- 第二章 基本方針(第九条)
- 第三章 移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進のための施策(第十条-第十六条)
- 第四章 骨髄・末梢血幹細胞提供あっせん事業(第十七条-第二十九条)
- 第五章 臍帯血供給事業(第三十条-第四十三条)
- 第六章 造血幹細胞提供支援機関(第四十四条-第五十二条)
- 第七章 雑則(第五十三条-第五十四条)
- 第八章 罰則(第五十五条-第六十一条)
- 附則

5

臍帯血供給事業者

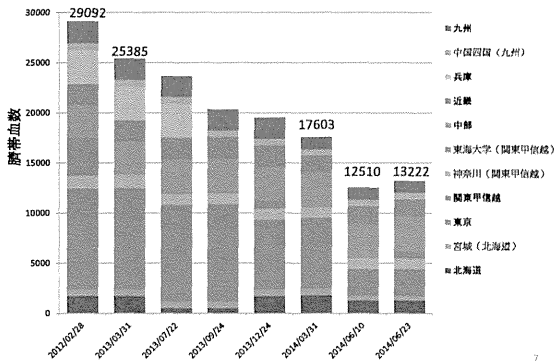


6バンク 公開検索対象:13,222

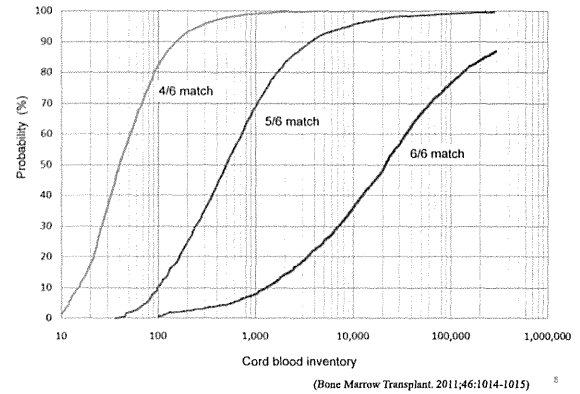
(2014/6/23)

6

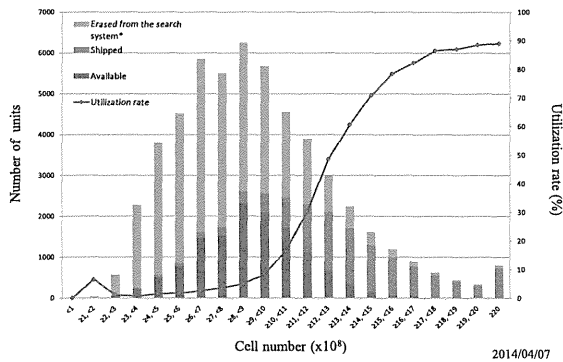
公開臍帯血数の推移



Cord Blood Bank Size in Japan, calculated in 2009

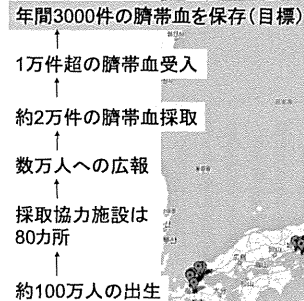


登録臍帯血の細胞数分布



*東海大学および東京臍帯血バンク分の一部は再公開される

広報の対象



造血幹細胞提供支援機関の業務

(法 第45条)

第1号業務

移植に用いる骨髄又は移植に用いる末梢血幹細胞を提供する意思がある者の登録その他造血幹細胞提供関係事業者の行う骨髄・末梢血幹細胞提供あつせん事業及び臍帯血供給事業に必要な協力をを行うこと。

第2号業務

造血幹細胞提供関係事業者の行う骨髄・末梢血幹細胞提供あつせん事業及び臍帯血供給事業について、必要な連絡調整を行うこと。

第3号業務

第1号の登録をした者に係る移植に用いる骨髄及び移植に用いる末梢血幹細胞に関する情報並びに第34条の規定により臍帯血供給事業者から提供された移植に用いる臍帯血に関する情報を一元的に管理し、並びにこれらの情報を造血幹細胞移植を行うとする医師その他の移植に用いる造血幹細胞を必要とする者に提供すること。

第4号業務

移植に用いる造血幹細胞の提供に関する普及啓発を行うこと。

改良型複数臍帯血移植法の開発

石田 隆・大津 真（東大医科研 幹細胞治療センター）

【背景】 臍帯血移植において、移植造血幹前駆細胞数の不足に起因する造血再構築の遅延は移植関連死亡に直結する克服すべき課題である。現在、2つのユニットを移植する複数臍帯血移植も行われているが、十分な dose effect は期待できない。一方、最大5ユニットまでを使用した複数臍帯血移植の臨床研究では、複雑な免疫応答によりむしろ生着不全を助長する結果が得られており (Laughlin, *et al.*, 2008)、多ユニットを利用した移植法の研究はその後ほとんど行われていない。

【目的】 本研究では、より多くのユニットを混合して行う新規複数臍帯血移植法の開発を目指し、第一段階としてマウス骨髄移植モデルを用いて proof-of-concept を得ることを目的とする。

【方法】 C57BL/6 (B6) マウスをレシピエントとし、4種のアロマウス (4-allo) と1種の B6 コンジュニックマウス (B6con)をドナーとする、5単位混合移植モデルを構築した。アロマウスはそれぞれ B6 との F1 種とし、移植片対宿主反応が起きない条件にて行った。成熟免疫細胞を除去した造血幹前駆細胞の混合移植をモデル化するため、純化した KSL 細胞を用いることとし、アロ細胞の混合物が B6con 細胞と同等の短期造血再構築能を有するかについて検討した。

【結果】 1) 致死量放射線照射マウスに対し、移植細胞が生存を支持する能力につき検討した。B6con KSL 細胞 500 個では全例が死亡し、2,500 個では全例が生存したことから、KSL 細胞 500 個を臍帯血1ユニット相当と定義し以下を進めた。

2) B6con KSL 細胞 500 個に 4-allo KSL 細胞 500 個ずつを混合 (計 2,000 個) して移植したところ、B6con KSL 細胞 2,500 個に相当する生存支持能が確認された。

3) 上記モデルにおいて、早期 (14 日まで) の造血回復について検討したところ、血小板数、白血球数ともに 4-allo 混合 2,000 個の KSL 細胞は同数の B6con KSL 細胞と同等の短期造血再構築能を発揮した。

4) 予想に反し、上記マウスは長期間 B6con 細胞と 4-allo 細胞の混合キメリズムを維持した。

5) 長期の造血再構築には単一ユニットによる維持が望ましいため、混合キメリズムから単一キメリズムに収束する移植モデルの構築を試みた。上記 KSL 細胞 500 個混合移植において、B6con 細胞のみを 50,000 個の全骨髄細胞へと置換することで、長期造血は混合キメリズムから B6con 単一キメリズムへと転じた。B6con 全骨髄細胞 50,000 個移植単独でマウスは死亡することから、アロ混合細胞が早期造血回復を支持しつつ、長期造血には寄与しない、独自の移植モデルを実現した。

【結論】 アロ細胞であっても、成熟免疫細胞を排した造血幹前駆細胞として混合することで、自己細胞と同等の早期造血支持能を有することが示された。これにより長期に維持される混合キメリズムは、特定のユニットに免疫細胞を含めることで単一キメリズムへと収束させうる可能性も示された。

ウイルス特異的細胞性免疫療法

藤田由利子・高橋 聡(東大医科研 分子療法分野)、小野敏明・森尾友宏(東京医科歯科大 発生発達病態分野)

【背景】 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である。特に移植後の 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(CTL)療法が移植医療に導入され、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 は HLA 不一致であっても grade II 以上の GVHD 頻度は低く、安全かつ有効な治療として認識されている(Gerdemann,U,2013)。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りその対策として迅速培養法が開発された(Gerdemann,U,2013)。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術である。

【目的】 我々はこの CTL 迅速培養法の技術を導入し、CMV、EBV、AdV、HHV-6、BKV、JCV、VZV の 7 種ウイルス特異的 CTL 生成を、無血清培養系で安定して行うことを目指した。

【方法】 (1) 20×10^6 個の末梢血単核球(PBMC)に CMV、EBV、AdV ウイルス抗原の混合 overlapping peptide(OLP)を加え、IL4,7を添加した、含血清あるいは無血清培養系で 9-12 日間増幅した。

(2)さらに HHV-6、BKV、JCV、VZV を加えた 7 種類のウイルス特異的 CTL の作成を試みた。

【結果】 (1) CMV、EBV、AdV ウイルスの混合 OLP 刺激後培養細胞は含血清培養液で $144.9(67.5-211.2) \times 10^6$ 個、無血清培養液で $92.0(33-155.1) \times 10^6$ 個となった(n=4)。細胞表面マーカーは両者で大きな差は見られなかった。細胞内サイトカイン染色による抗原特異的 IFN γ 産生は前者で 9.8(4.2-13.1)%, 後者で 7.9(1.1-18.7)%であった。(2) CMV、EBV、AdV、HHV-6、BKV、JCV、VZV ウイルスの混合 OLP 刺激後、無血清培養液培養細胞は平均 $112.7(32.4-251) \times 10^6$ 個となった (n=12)。細胞表面マーカーは平均して CD3+ 95.6%、CD4+ 74.1%、CD8+ 20.8%、CD3+CD62L+CD45RO+ 80% であった(n=5)。IFN γ ELISpot でこれらの細胞はすべての抗原に対して特異性を示した(n=12)。

【考察】 本研究成果を基に現在、HLA 一部一致血縁ドナーを用いた臨床研究を計画しており、その後は第三者ドナーからの CTL バンクの樹立を目指す。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ており(Leen, AM, 2013)、我が国においても CTL バンク整備に向けて幅広い分野との意見交換やコンセンサス形成、支援を得る事が重要と考える。

【結論】 簡便かつ安全に多ウイルス特異的T細胞を無血清培養系で生成が可能であった。

GVHD に対する新規分子標的療法とその白血病抑制作用

服部 浩一 (順天堂大 ゲノム・再生医療センター/東大医科研 幹細胞制御)

我々は、移植片対宿主病(GVHD)の発症に関与する TNF- α や Fas-ligand 等の炎症性サイトカインの多くが、金属要求性蛋白分解酵素で、組織中の構造蛋白、細胞基底膜を主な基質とするマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)による細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)を経て産生されること、さらにリンパ球、単球・マクロファージ系細胞をはじめとする骨髄由来の炎症性細胞群の組織内浸潤が MMP の活性化を必須とすること等を明らかにした。また、我々は、こうした MMP の活性化-潜在型酵素 ProMMP から MMP への変換は、各種 MMP 間の相互活性化システムと血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミンの生成とによって制御されていること、またマウス生体への組織プラスミン-ゲンアクチベータの投与は、MMP の活性化を介し、Kit-ligand(stem cell factor)の細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)を誘導し、骨髄造血、組織再生を促進することを見出した(Cell Stem Cell 1:658, 2007, Nat Med 12:557, 2006, Blood 115:4302, 2010, Blood 119:5405, 2012, Blood 119:6382, 2012)。このことは、線溶系の亢進が、各種炎症性サイトカインの分泌制御に寄与していることを示唆している。

本研究で、我々は、急性 GVHD の病態における MMP の活性制御と炎症性サイトカインをはじめとする生体分子の分泌産生の起点として、その上流に位置する血液凝固・線溶系因子群の機能解明を進めた(Leukemia in press, 2014)。本研究では、さらにこれを基礎とした、炎症性サイトカインのプロセッシング阻害に基づく、線溶系を標的とした免疫・炎症性疾患の病態制御、新規分子療法の開発までをその目的の範疇としている。

これまでの研究で、我々は急性 GVHD のモデルマウスに対し、線溶系阻害剤 YO-2 を 75 μ g/日で連日投与することにより、有意な生存率の改善、さらに TNF- α や Fas リガンドをはじめとする炎症性サイトカインの分泌阻害に伴う、炎症性細胞浸潤をはじめとする GVHD 病変の抑制作用を明らかにした。その後の今年度までの研究で明らかとなった点を列挙する。

- 1) 急性 GVHD モデルマウスの肝臓、小腸の病理所見では、YO-2 投与群では溶媒投与群と比較して、炎症性細胞の浸潤やアポトーシスが有意に抑制されていた。また、脾臓、骨髄、胸腺の病理所見では、YO-2 投与群で、溶媒投与群と比較して、炎症の最終像と考えられる細胞減少と、これに伴う組織構造の破壊が、軽微であった。
- 2) 急性 GVHD モデルマウスの脾臓、骨髄、胸腺細胞をフローサイトメーターにて解析したところ、YO-2 投与群では、溶媒投与群と比較して、ドナー好中球、あるいは炎症性単球の組織内浸潤が有意に抑えられていた。
- 3) 急性 GVHD モデルマウスの血液を 3 日毎に採取し、ELISA にて各種線溶系因子、MMP 活性を測定したところ、YO-2 投与群ではその溶媒投与群と比較して、これらプロテアーゼの活性が、有意に抑えられていた。これら各種プロテアーゼの活性は、TNF- α や Fas リガンドをはじめとする炎症性サイトカインの血中濃度の推移と相関しており、線溶系活性が、炎症性サイトカイン分泌を制御することを示唆した。
- 4) 急性 GVHD と同様に、TNF- α が関与する敗血症性ショックのモデルマウスにおいても、溶媒投与群と比較して、YO-2 投与群では、有意な生存率の改善を認めた。このことは、本薬剤が、TNF- α 関連免疫・炎症性疾患、サイトカイン病の一群に対し、一定の有効性を有する可能性を示唆する。
- 5) 急性 GVHD の患者血中の線溶系因子レベルと重症度の推移との相関性を精査したところ、GVHD の重症度の上昇に応じて、有意な α 2 プラスミン阻害因子-プラスミン複合体(PIC)の増加が認められた。このことは、モデルマウスで得られた実験結果の、ヒト病態における有用性を確認するものと考えられた(図 1)。

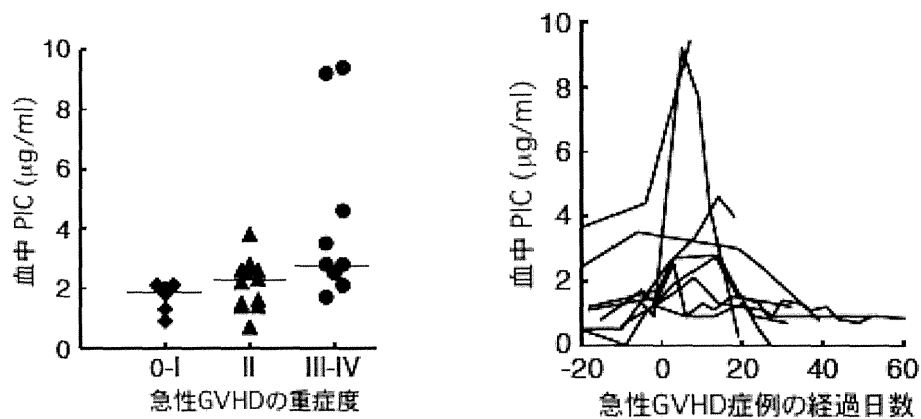


図1: 急性GVHD患者の重症度と凝固・線溶系因子活性

今後の研究では、YO-2 のヒト組織を含めた毒性、生体投与における安全性、至適投与法、代謝経路等を精査し、GVHD を含めた免疫・炎症性疾患に対する非臨床試験を見据えたトランスレーショナルリサーチとしてのさらなる可能性について検討していきたいと考えている。

従来より、MMP は、がん細胞の組織内浸潤、転移等の病態制御因子として広く知られている。近年、白血病病態において活性型の MMP が、いわゆる「悪性ニッチ」の構成分子として機能しており、本研究でも明らかとなった、造血系細胞の増殖因子である Kit-ligand のプロセッシング促進を通じて、白血病細胞増殖を惹起するとの報告があった(Colmone A et al. Science 322:1861, 2008)。我々は、昨年度からの東京大学のセンター内の共同研究で、MMP-9 の活性阻害が、慢性骨髄性白血病(CML)の急性転化モデルマウスにおいて、Kit-ligand の分泌障害を通じて、急性転化による芽球増殖を抑制することを明らかにした(図2)。このことは、MMP 活性阻害作用を有する YO-2 が、サイトカイン・造血因子のプロセッシングの抑制を通じて、白血病細胞の増殖、白血病自体の病勢抑制作用を有する可能性を示唆するものと考えられた(Blood 123:3932, 2014)。

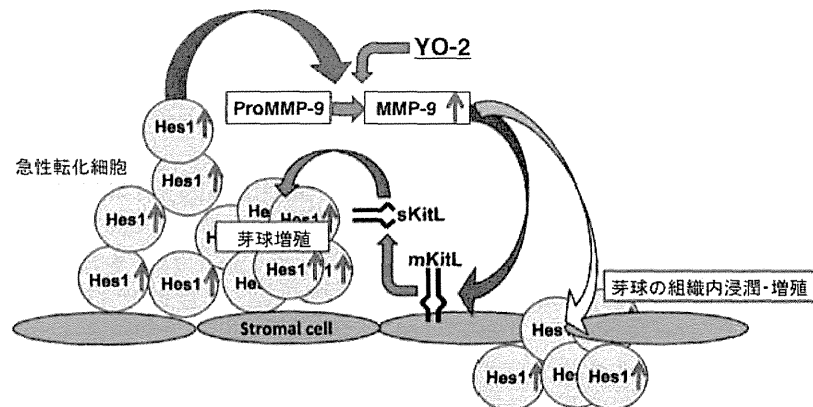


図2: MMP による CML 急性転化細胞の動態制御機構仮説

V. 第2回造血細胞移植合同班会議次第・抄録

平成27年1月10日

(国立がんセンター・国際研究交流会館・国際会議室)

1 日目 平成 27 年 1 月 10 日 (土)

10 時 00 分～10 時 45 分

臓器移植・造血幹細胞移植後の日和見感染に対する有効でかつ安全な多ウイルス特異的な T 細胞療法の開発と導入に関する研究
(H25-難治等(免)-一般-105) 研究代表者 森尾 友宏

10 時 45 分～11 時 30 分

造血幹細胞移植に用いる細胞の安全な処理・保存・品質管理体制の確立に関する研究
(H26-難治等(免)-一般-105) 研究代表者 田野崎 隆二

11 時 30 分～12 時 30 分

HLA 不適合血縁者間移植の治療成績を向上し、造血管疾患治療における位置づけを明らかにするための研究
(H26-難治等(免)-一般-109) 研究代表者 神田善伸

12 時 30 分～13 時 40 分

昼食、WG、その他 (1 時間)

13 時 40 分～14 時 55 分

本邦における造血細胞移植一元化登録研究システム及び研究データ質管理システムの確立
(H26-難治等(免)-一般-108) 研究代表者 熱田由子

14 時 55 分～15 時 45 分

同種造血幹細胞移植治療確立のための基盤研究
(がん研究開発費 26-A-26) 研究代表者 福田 隆浩

15 時 45 分～16 時 30 分

新たな造血幹細胞移植法の開発：生着効率の向上を目指して
(H25-難治等(免)-一般-104) 研究代表者 村田 誠

16 時 30 分～17 時 30 分

適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究
(H24-難治等(免)-一般-008) 研究代表者 高橋 聡

17 時 30 分～19 時 00 分

免疫遺伝情報に基づく非血縁移植統合データベースの構築と最適なドナー・さい帯血の選択
(H26-難治等(免)-一般-106) 研究代表者 森島 泰雄

適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究
(H24-難治等(免)-一般-008)

研究代表者 高橋 聡

- 16:30- 16:45 低分子化合物による臍帯血造血幹・前駆細胞増幅
岩間 厚志 (千葉大)
- 16:45 - 17:00 複数臍帯血ユニットを活用した新規造血細胞移植法の確立
大津 真・石田 隆 (医科研)
- 17:00 - 17:15 臍帯血移植臨床研究の進捗状況と次期研究構想
寺倉 精太郎 (名古屋大学)・小沼 貴晶 (医科研)
- 17:15 - 17:30 「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」3年間の総括
高橋 聡 (医科研)

低分子化合物によるヒト造血幹細胞の体外増幅の可能性

岩間厚志（千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学）

造血幹細胞を操作し治療に用いる上で、造血幹細胞の体外増幅の実現化は大きな課題である。その臨床的な有用性としては、臍帯血造血幹細胞からの造血幹細胞・前駆細胞の増幅や、造血幹細胞を用いた遺伝子治療への応用等があげられる。これまでに、サイトカインによって増幅された造血前駆細胞・分化細胞を移植に併用することにより、造血抑制からの早期回復が得られることが示されている。近年では、低分子化合物を用いた増幅法が盛んに行われ、低分子銅キレート化合物、アリルヒドロカーボン受容体 (AhR) 阻害剤 (SR-1)、pyrimodoinole 誘導体、ニコチンアミドなどの有用性が報告され、臨床研究が行われている。われわれは、トロンボポイエチン受容体の低分子化合物アゴニスト (NR-101) をトロンボポイエチンの代わりに用いることにより、造血幹細胞を 3 倍に増幅することに成功した。このアゴニストはトロンボポイエチンと比較して STAT5 を持続的に活性化するものの、トロンボポイエチンで活性化される STAT3 を活性化しないなど、蛋白製剤とは異なるシグナル制御を行うことが明らかとなった。この知見は低分子化合物によるサイトカインシグナル操作の可能性を示唆するものである。NR-101 の誘導体である TCA3-1 の検討より、AhR 阻害剤 (SR-1) に匹敵する効果が得られつつあり、SR-1 との併用効果を検証中である。これらの化合物を併用することにより造血幹細胞増幅効率のさらなる向上が期待される。細胞治療に向けた造血幹細胞操作の状況を報告したい。

臍帯血移植臨床研究の進捗状況と次期研究構想

寺倉 精太郎（名古屋大学）・小沼 貴晶（東京大学医科学研究所）

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（C-SHOT 0601 試験）の進捗状況について

2007年から8年にわたって行ってきた上記試験については目標本登録数60例のところ、59例まで本登録が進行している。これまでの報告では2014年12月までを登録期間としていたが、現在のところ完遂に至っておらず、6ヶ月間の登録期間の再延長を行った。試験にご参加頂いている施設においてはもうしばらくの間、引き続きご協力をお願いしたい。

次期プロトコールの構想について

これまでC-SHOT 0601試験においては、医科研方式の骨髄破壊的前治療を行う臍帯血移植による生存率が、従来報告されたような成績を再現しうるかに加えて、試験への登録時期をJMDFドナー検索開始段階におくことによって、非血縁骨髄移植（バンク移植）と臍帯血移植の成績が同程度であるのかどうかをも検証するデザインをとってきた。8年前の臨床現場の状況から、臍帯血移植を選択する対象として妥当だと考えられた高リスク白血病患者を対象としている。

今回C-SHOT 0601試験の終了にあたり、次期プロトコールの検討を行っているが、これまでの流れに出来るだけ沿った形で3案ほどを検討している。これらはそれぞれ、以下の結果に基づくものである：

1. 本邦の臍帯血移植データの後方視的解析において、G-CSFを併用した骨髄破壊的前治療を用いた場合に有意に生着が速やかで生存も良好であった。（Haematologica 2014, Konuma T et al.）
2. 同じく後方視的解析において、AMLでは寛解期においても非寛解期においてもHLA 8/8一致バンク移植と臍帯血移植はOSに有意差が見られず、HLA 7/8一致バンク移植よりも良好であった。（JSH 2014, Terakura S et al.）
3. AML/MDSなどの骨髄性疾患においては非寛解期移植であっても医科研方式の移植を用いる限り、50%を超える長期生存を得ている。（BBMT 2014, Konuma T et al.）

以上の観察をもとに、以下の疑問に答えるような臨床試験を検討する：

1. G-CSFを併用する骨髄破壊的前治療においてG-CSFを併用しない場合に比して、生着が早まり、生存率が増すか？
2. 予後中間リスク群においても臍帯血移植とバンク移植は同等の成績を示すか？
3. 医科研からの報告で示されるような生存率が、非寛解急性骨髄性白血病・MDSにおいて再現されるか？

以上の3案について議論を深め、次期プロトコール策定に向けて進めていきたいと考えている。

ご参加を検討頂けるご施設の先生は遠慮なくご連絡をお願いします。

名古屋大学血液内科 寺倉精太郎 tseit@med.nagoya-u.ac.jp

複数臍帯血ユニットを活用した新規造血細胞移植法の確立

石田 隆・大津 真（東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター）

【背景】我々は、臍帯血移植における課題である造血再構築の遅延を克服すべく、3単位以上の複数ユニットを利用する新規移植法の確立を目指し研究を継続しており、昨年夏の本会議にてその成果の一部を報告した。

【目的】マウス骨髄移植モデルを用いて得た知見を基に、ヒト臍帯血を用いた移植実験までを行い、アロ造血前駆細胞の混合物中に、早期の造血再構築に寄与する能力を検証し、移植補助製剤として使用可能であるとの proof-of-concept を得る事を目的とする。

【方法】致死量放射線照射した C57BL/6 (B6) レシピエントマウスに、単一ユニット (B6 congenic) を全骨髄細胞として移植し、4種のアロマウス (4-allo) の造血幹前駆細胞を混合して補助的に移植する系を基本モデルとした。これにより、単一ユニットが長期単一キメラを形成する条件と、4種のアロ混合移植補助細胞において早期造血再構築能、特に血小板数の早期回復能を強化する方法を検討した。また、HLA 既知のヒト凍結臍帯血に関して、融解から単核球分離、CD34 陽性細胞純化までを行う方法を検討し、NOG マウスへの混合移植実験の至適化を行った。

【結果】1) B6 congenic 細胞の分画実験により、本グラフト中の成熟 T 細胞の存在が単一ドナーキメリズム形成を規定することを証明した。2) アロ混合移植補助細胞においては、造血幹細胞活性の残存が血小板数の早期回復補助能の維持に重要であることを示した。3) 凍結臍帯血から良好な生細胞率を保持しつつ CD34 陽性細胞を分離する方法を確立した。4) NOG マウスを用いて、複数ユニット (HLA 既知の異なる 4 ユニット) の混合 CD34 陽性細胞を移植し、dose effect を検証する実験系を確立した。

【結論】複数のアロ細胞であっても、成熟免疫細胞を排した造血幹前駆細胞として混合することで、予期せぬ免疫反応による不利益を生むことなく、早期造血支持能が期待できることを証明した。また、ヒト凍結臍帯血から CD34 陽性細胞を分離して行う移植実験系を確立し、複数臍帯血ユニットを移植補助製剤として臨床応用するために必要な実証研究にも着手した。

「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」 3年間の総括

高橋 聡（東京大学医科学研究所分子療法）

当研究班では、さらに増加している高齢患者への普及をより現実的に可能にするために臍帯血移植技術の先進化による安全性及び成績の向上をめざしてきた。具体的には、①臍帯血移植の移植合併症に対する新たな治療法の臨床開発、②移植成績の収集・解析と臨床試験の立案・遂行、③臍帯血バンク事業整備の支援、の大きな3本の柱について、専門家である各分担研究者が定期的に集まり、各自の研究内容・進捗状況を紹介しながらお互いに議論を重ね、本研究班の目的である臍帯血移植の先進化に向けて、それぞれのプロジェクトの効率的な推進を支援してきた。

3年間の研究期間は終了の時期を迎え、以下のような進捗を得ている：

- ① 移植合併症に対する新たな治療法の開発については、新規 PAI-1 阻害剤の臨床応用（東海大 安藤潔先生・東北大 宮田敏男先生）が最も進んでおり、本剤の第 I 相試験はまもなく終了予定で移植後投与の第 II 相試験の準備が進んでおり、来年度の開始が予定されている。新規低分子化合物による造血幹細胞増幅法（千葉大 岩間厚志先生）、および新規複数臍帯血移植の開発（医科研 大津真先生）も我が国オリジナルの方法を用いており、前臨床試験が確実に進んでいるが、再生医療新法への対応などもあり、今年度中の臨床研究への到達は厳しい状況にある。抗原ペプチドを用いたウイルス特異的 CTL 療法（医科歯科大 森尾友宏先生・医科研 高橋 聡）は臨床研究計画書の作製に至っている。新規プラスミン阻害剤による GVHD 制御法（順天堂大/医科研 服部浩一先生）は、臨床検体を用いた確証が得られ、前臨床研究を進めている。
- ② 臨床研究に関しては、全国登録データを用いた臨床解析は期間内に完遂したもの（UBMT との比較、および至適前処置）と現在進行中（至適 GVHD 予防）のものがあ、り、また単一施設内での後方視的解析も複数が研究期間内に完遂し、既に論文化されている。前方視的多施設共同臨床研究（C-SHOT601）順調に登録が進み、観察期間を経て解析が行われる予定となっている（名古屋大 寺倉精太郎先生、虎の門病院 山本久史先生、東北大 山口拓洋先生、医科研 小沼貴晶先生）。
- ③ 臍帯血バンク支援については、初年度となる法制化のもとでの新体制における様々な課題の明確化・整理が行われており、臨床サイドとの連携を取りつつ、安定した臍帯血の供給体制確立に向けて議論を進めた（日赤 高梨美乃子先生）。

現時点において、新規治療開発の中に規正法への対応も含めて臨床研究計画には到達できなかった研究がいくつかある一方で、PAI-1 阻害剤の開発のようにロードマップ通り、あるいは複数の臨床観察研究では予定以上の解析を進めることができた。当研究班は、定期的な研究者間会議を行うことによって情報交換および研究支援のプラットフォームとして効率的に臍帯血移植の臨床成績向上という目的達成に寄与したと考えている。

VI. 分担研究報告書

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 教授

研究分担者 宮田敏男 東北大学 大学院医学系研究科・教授

研究要旨

臍帯血移植の効率化を目指した検討を行い、移植初期に PAI-1 阻害剤を投与すると、ケモカインの産生が誘導され、造血幹細胞が骨髄へ辿り着く活性が亢進し、造血再生が効率化することを明確にした。

A. 研究目的

新規PAI-1 阻害剤の造血再生促進効果に着目し、その機序の解明に取り組んだ。

B. 研究方法

マウスに放射線照射し、臍帯血や骨髄由来の造血幹細胞細胞を経静脈的に移植した。

移植後にPAI-1阻害剤を投与し、マウス骨髄到達した造血幹細胞の割合を計測した。

(倫理面への配慮)

臍帯血は機関内の医の倫理委員会の承認のもと、研究利用について説明を行い同意を得たものを使用した。動物実験についても実験動物安全委員会の承認を得たうえで実施した

C. 研究結果

PAI-1阻害剤投与群では、ケモカインである SDF-1 の産生や細胞表面酵素である MT1-MMPの発現が誘導され、移植した造血幹細胞が骨髄に辿り着く(ホーミング)活性が亢進することが明らかとなった。

D. 考察

PAI-1 阻害剤は、線溶系を活性化するので、造血増殖因子だけでなくケモカインの産生

も誘導することが明らかとなった。また、そのケモカインは造血幹細胞の細胞表面酵素や接着因子の発現を増強し、造血の場への遊走能を亢進させることも明らかにした。

E. 結論

PAI-1阻害剤の造血再生促進作用の機序として造血幹細胞のホーミング能を亢進させる作用があることが明確になった。このことは、細胞数に限りのある臍帯血移植において有利に作用することが期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yahata T, Onizuka M, Dan T, Van Ypersele De Strihou C, Miyata T, Ando K. Inhibition of plasminogen activator inhibitor type-1 activity enhances rapid and sustainable hematopoietic regeneration. *Stem Cells*. 2014, 32(4):946-958.

2. Yamakawa N, Okuyama K, Ogata J, Kanai A, Helwak A, Takamatsu M, Imadome K, 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 42: 5285-5301,
2014

3. Suzuki R, Matsushita H, Kawai H,
Matsuzawa H, Tsuboi K, Watanabe S,
Kawada H, Ogawa Y, Ando
K. Identification of a novel SEPT9-ABL1
fusion gene in a patient with T-cell
prolymphocytic leukemia. Leukemia
Research Report 3: 54-57, 2014
4. Murayama H, Matsushita H, Obayashi Y,
Ando K. Erythrophagocytosis by blasts in
acute myeloid leukaemia harboring the
BCR-ABL1 fusion gene.. Brit. J Haematol.
In press

2. 学会発表

他は別紙 4 に記載

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

安藤 潔、他。PAI-1阻害剤の新規用途
PCT/JP2014/060760 (出願)

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
(難治性疾患等実用化研究事業 (移植医療技術開発研究分野))
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・准教授

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法の確立を目指し行った。平成25年度にマウス移植モデルを用いて得た proof-of-concept に続いて、平成26年度には、本目的に合致したヒト臍帯血の加工法を試行し、ほぼその確立を終えた。こうして得られた加工物を用いて免疫不全マウスへ移植を行い、アロ混合造血前駆細胞による早期造血回復補助を証明した。

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

HLA 既知の凍結臍帯血を日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センターより入手し用いた。比重遠心法により単核球分画を得た後、マイクロビーズを用いて CD34 陽性細胞を純化した。単一ユニットからの純化が可能になった後、全臍帯血のまま最大3ユニットを事前に混合し、CD34 陽性細胞の

純化を試みた。これらアロ混合造血前駆細胞ユニットによる、造血細胞生着増強効果を確認するため、NOG マウスに半致死量の放射線照射を行い、HLA タイプで区別が可能な単一ユニット由来 CD34 陽性細胞と共に移植した。2-3 週後にマウス骨髄中のヒト造血キメリズムを抗 HLA 抗体、細胞分化マーカーともに、フローサイトメトリー法にて解析した。

C. 研究結果

はじめに凍結臍帯血から用手的に比重遠心法にて単核球の抽出と CD34 陽性細胞の純化を試みたが、純度、回収率、生細胞率いずれにおいても実用化レベルでの回収に至らなかった。次に Miltenyi Biotec 社製 CliniMACS Prodigy を用いて種々の試行を繰り返したところ、生細胞率良く単核球分離が可能となった。さらに、全臍帯血とし

て3ユニットを混合した場合でも、アロ混合により懸念される不利益は生じずに、混合単核球分画を得ることに成功した。これらからマイクロビーズを用いて CD34 細胞を純化したところ、90%を超える純度、回収率を実現できた。

次に NOG マウスを用いた移植を行った。ひとつのユニットと、それとは HLA-FACS 解析で区別可能な3ユニットを選択し、上記の方法により CD34 陽性細胞を得た。以下の3グループ(1群5-6匹)を設定し1.2 Gy の照射後に経静脈的に移植を行った。a) 単一ユニット $\sim 3 \times 10^4$ 個のみ; b) 単一ユニット $\sim 1.2 \times 10^5$ 個(グループ a) の4倍量); c) 単一ユニット $\sim 3 \times 10^4$ 個に加え、3ユニット混合 $\sim 9 \times 10^4$ 個。結果、3週目の骨髄中ヒト造血キメリズムにおいて、有意差をもって a) < b)、a) < c) を証明した。HLA タイピングにて、アロ混合ユニットがこのキメリズム増強に寄与していることもあわせて証明した。

D. 考察

以上よりヒト臍帯血においても、アロ細胞の混合物を造血幹前駆細胞として移植することで、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。合計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。マウスで検討しえた、単一ユニットへのT細胞の add-back 効果は、1度試行した条件下(上記のグループ c) においてさらに $\sim 3 \times 10^5$ 個の単一ユニット由来 T 細胞を移植) では、T 細胞のみが骨髄内で増殖する結果となり、目的の達成には至らなかった。過剰なヒト T 細

胞の NOG マウスへの投与は、xeno-GvHD の発症につながることから、至適 dose の調整が必要と考えられた。

今後、混合するアロユニットの個数を増やした試行で、より早期の造血生着増強がみられるか、また、レシピエントマウスの長期観察によるキメリズの推移の観察等、いくつかの追加実験を行い、臨床研究の妥当性を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

ヒト凍結臍帯血を用いて、アロ細胞の混合物が、免疫細胞を排した造血前駆細胞の形で用いることで移植後早期の造血回復の遅れを補完できる可能性を示した。これにより複数の臍帯血ユニットを製剤化し、臨床に用いるための道筋が明確となった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokoi K, Akiyama K, Kaneshiro E, Higuchi T, Shimada Y, Kobayashi H, Akiyama M, Otsu M, Nakauchi H, Ohashi T, Ida H. Effect of donor chimerism to reduce the level of glycosaminoglycans following bone marrow transplantation in a murine model of mucopolysaccharidosis type II. *Journal of inherited metabolic disease* 2014.
2. Nakahara F, Kitaura J, Uchida T, Nishida C, Togami K, Inoue D, Matsukawa T, Kagiya Y, Enomoto Y, Kawabata KC, Chen-Yi L, Komeno Y, Izawa K, Oki T, Nagae G, Harada Y, Harada H, Otsu M, Aburatani H, Heissig B, Hattori K, Kitamura T. Hes1 promotes blast crisis in chronic myelogenous leukemia through MMP-9 upregulation in leukemic cells. *Blood* 123: 3932, 2014
3. Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Yoshida K, Otsu M, Shiraishi Y, Miyano S, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function

- but not to myelodysplasia. *Leukemia* 28: 1844, 2014.
4. Lee H, Lee JK, Park MH, Hong YR, Marti HH, Kim H, Okada Y, Otsu M, Seo EJ, Park JH, Bae JH, Okino N, He X, Schuchman EH, Bae JS, Jin HK. Pathological roles of the VEGF/SphK pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Nature communications* 5: 5514, 2014.
 5. Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Otsu M, Nakauchi H. Stage-specific roles for CXCR4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation. *Stem Cells* 32: 1929, 2014.
 6. Itaba N, Wairagu PM, Aramaki N, Yasui T, Matsumi Y, Kono Y, Phan AN, Otsu M, Kunisada T, Nakamura Y, Okano H, Jeong Y, Shiota G. Nuclear receptor gene alteration in human induced pluripotent stem cells with hepatic differentiation propensity. *Hepatology research* 44: E408, 2014.
 7. Hosoi M, Kumano K, Taoka K, Arai S, Kataoka K, Ueda K, Kamikubo Y, Takayama N, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Kurokawa M. Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples. *Experimental hematology* 42: 816, 2014.
 8. Higuchi T, Kawagoe S, Otsu M, Shimada Y, Kobayashi H, Hirayama R, Eto K, Ida H, Ohashi T, Nakauchi H, Eto Y. The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from patients with infantile and late-onset types of Pompe disease and the effects of treatment with acid-alpha-glucosidase in Pompe's iPSCs. *Molecular genetics and metabolism* 112:44, 2014.
 9. Akiyama K, Shimada Y, Higuchi T, Otsu M, Nakauchi H, Kobayashi H, Fukuda T, Ida H, Eto Y, Crawford BE, Brown JR, Ohashi T. Enzyme augmentation therapy enhances the therapeutic efficacy of bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type II mice. *Molecular genetics and metabolism* 111: 139, 2014.
 10. Abdul Razak SR, Baba Y, Nakauchi H, Otsu M, Watanabe S. DNA Methylation Is Involved in the Expression of miR-142-3p in Fibroblasts and Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cells international* 2014:101349, 2014.
2. 学会発表
 1. Takashi Ishida, Makoto Otsu, Satoshi Takahashi, Masaaki Higashihara, Hiromitsu Nakauchi. A New Strategy to Overcome the Cell Dose Barrier to Umbilical Cord Blood Transplants: A Proof of Early Hematopoietic Reconstitution By Combined Multiple Units of Allogeneic Stem/Progenitor Cells. *56th ASH Annual Meeting and Exposition*, December 6-9, 2014. San Francisco, U.S.A
 2. Huan-Ting Lin, Makoto Otsu, Hideki Masaki, Tomoyuki Yamaguchi, Axel Schambach, Kerstin Kaufmann, Manuel Grez, Taizo Wada, Akihiro Yachie, Hiromitsu Nakauchi. Ectopic gp91phox expression is detrimental to XCGD iPSC cell-derived neutrophils. *The XXIIInd Annual ESGCT Congress*. 2014.10.23-26. Hague, Netherlands.
 3. Mozghan Khalaj Amirhosseini, Tomohiro Morio, Kohsuke Imai, Hiromitsu Nakauchi, Makoto Otsu. Modeling Platelet Abnormality in Wiskott Aldrich Syndrome using Patient-derived induced Pluripotent Stem Cells. *The XXIIInd Annual ESGCT Congress*. 2014.10.23-26. Hague, Netherlands.
 4. Makoto Otsu. Patient-Specific iPSC Cells as an Ideal Model System for Optimizing Gene Therapy Procedures. *33th International Congress of the ISBT*. 2014. 2014.6.1-5. Seoul, Korea.
 5. Lai C-Y, Yamazaki S., Onodera M., Kakuta S., Iwakura Y., Otsu M., Nakauchi H.: Roles for Cxcr4 signaling in murine hematopoietic stem progenitor cells in bone marrow repopulation. *第76回日本血液学会学術集会* 10月31日～11月2日、2014年、大阪
 6. Ishida T., Otsu M., Suzuki S., Higashihara M., Nakauchi H.: Stem cell protection in the inflammatory marrow environment. *第76回日本血液学会学術集会* 10月31日～11月2日、2014年、大阪