

2014/5001B

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))

(H24-難治等(免)-一般008)

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

平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 高橋 聡

平成 27 (2015) 年 3 月

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))

(H24-難治等(免)-一般008)

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

平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 高橋 聡

平成 27 (2015) 年 3 月

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
（H24-難治等(免)-一般 008）

研 究 組 織

	研究者名	所属・職名	役割分担
研究代表者	高橋 聡	東京大学医科学研究所・准教授	研究の統括、移植成績の解析と臨床試験の支援、同種ウイルス特異的CTLバンクの構築、新規GVHD治療法の開発
研究分担者	安藤 潔	東海大学医学部・教授	凝固・線溶系を介した造血回復促進法の開発
	宮田敏男	東北大学 大学院医学系研究科・教授	凝固・線溶系を介した造血回復促進法および組織再生促進法の開発
	大津 真	東京大学医科学研究所・准教授	アポトーシスシグナル遮断法を用いた造血幹細胞保護による造血回復促進法の開発
	岩間厚志	千葉大学大学院・医学研究院・教授	新規造血幹細胞増幅法の開発
	森尾友宏	東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授	同種ウイルス特異的CTLバンクの構築
	服部浩一	順天堂大学・医学系研究科・先任准教授	凝固・線溶系を介した造血回復促進法および組織再生促進法の開発、新規GVHD治療法の開発
	高梨美乃子	日本赤十字社・血液事業本部・副本部長	臍帯血バンク運営における問題整理と将来構想の策定
	宮村耕一	名古屋第一赤十字病院・血液内科・部長	臨床試験の遂行、および臍帯血・骨髄バンクの連携関係の構築
	谷口修一	国家公務員共済組合 虎の門病院・部長	臨床解析および臨床研究の支援・遂行
	寺倉精太郎	名古屋大学医学部附属病院・病院助教	臨床データ解析および臨床試験の遂行
研究協力者	山本久史	国家公務員共済組合 虎の門病院・医員	臨床研究の支援・遂行
	山口拓洋	東北大学大学院医学系研究科・教授	移植成績の解析と臨床試験の支援・遂行
	小川啓恭	兵庫医科大学 血液内科・教授	骨髄内臍帯血ミニ移植（臨床第II相試験）の遂行
	岡田昌也	兵庫医科大学 血液内科・講師	骨髄内臍帯血ミニ移植（臨床第II相試験）の遂行
	小島勢二	名古屋大学医学部小児科・教授	ウイルス特異的CTLを用いた臨床研究
	高橋義行	名古屋大学医学部小児科・准教授	ウイルス特異的CTLを用いた臨床研究
	長村文孝	東京大学医科学研究所・教授	臨床試験における規制への対応
	藤田由利子	東京大学医科学研究所・リサーチレジデント	ウイルス特異的CTLの作成
	小野敏明	東京医科歯科大学・大学院生	ウイルス特異的CTLの作成
田中ゆきえ	東京大学医科学研究所・特任研究員	ウイルス特異的CTLの作成	

目 次

I. 総合研究報告	1
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 研究代表者 高橋 聡（東京大学医科学研究所）	
II. 分担研究報告	11
研究分担者	
安藤 潔（東海大学医学部）	
宮田敏男（東北大学 大学院医学系研究科）	
大津 真（東京大学医科学研究所）	
岩間厚志（千葉大学大学院医学研究院）	
森尾友宏（東京医科歯科大学大学院）	
服部浩一（順天堂大学医学系研究科）	
高梨美乃子（日本赤十字社 血液事業本部）	
山口拓洋（東北大学 大学院医学系研究科）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	30
IV. 研究成果の刊行物・別刷	42

I . 総合研究報告書

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

研究要旨

本研究においては、移植合併症に対する新たな治療法の臨床開発と、臍帯血移植の特性を生かしながら現行の移植手技の適正化を目指した臨床研究を包括的に行うことで、臍帯血移植の安全性、さらには成績の向上を目指した。

造血回復促進については、①新規 PAI-1 阻害剤を用いた臨床試験の開始の準備を進め、②新規低分子化合物による造血幹細胞増幅法の臨床開発、③複数（3 個以上）の臍帯血を造血促進薬として用いた新たな移植法の臨床開発を進めた。免疫再構築の促進によるウイルス感染症対策については、血縁 HLA 近似ドナー由来のウイルス特異的 T 細胞療法 of 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を推進した。移植後炎症病態対策としては、新規プラスミン阻害剤の臨床応用を目指した知見を積んだ。

また、現行の臍帯血移植と非血縁骨髓移植を比較する前向き臨床試験を支援し症例登録の終了を目指した。登録データを用いた後方視的臨床観察研究によって得られた GVHD 予防法に関する知見を基にして、臍帯血移植の特性を生かし、かつ前処置等の移植手技の最適化を目指した次期前方視的臨床試験計画の策定を進めた。

またバンクにおける臍帯血の質的、量的確保の安定化を維持するために、適正なバンク規模の算定と維持、および公開検索システムの機能改善による臍帯血品質確認および患者管理機能の付与などを目指した。

本研究においては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した。

研究代表者： 山本 久史 虎の門病院・医員
高橋 聡 東京大学医科学研究所・准教授 山口 拓洋 東北大学大学院・教授

研究分担者：		研究協力者：	
安藤 潔	東海大学・教授	小川 啓恭	兵庫医科大学・教授
宮田 敏男	東北大学大学院・教授	岡田 昌也	兵庫医科大学・講師
岩間 厚志	千葉大学大学院・教授	小島 勢二	名古屋大学・教授
大津 真	東京大学医科学研究所・ 准教授	高橋 義行	名古屋大学・准教授
森尾 友宏	東京医科歯科大学・教授	長村 文孝	東京大学医科学研究所・ 教授
服部 浩一	順天堂大学・先任准教授	藤田 由利子	東京大学医科学研究所・ リサーチレジデント
高梨 美乃子	日本赤十字社・副本部長	小野 敏明	東京医科歯科大学・ 大学院生
宮村 耕一	名古屋第一赤十字病院・ 部長	田中 ゆきえ	東京大学医科学研究所・ 特任研究員
寺倉 精太郎	名古屋大学・病院助教		
谷口 修一	虎の門病院・部長		

A. 研究目的

我が国における血縁ドナー以外からの同種移植の 4~5 割は臍帯血を用いて行われており、臍帯血移植が占める割合は世界の中でとびぬけて多い。患者にとって安心して移植を受けることができるように、本研究班では臍帯血移植の安全性・成績向上と適応拡大を目指して移植合併症に対する新たな治療法の臨床開発と臍帯血バンク整備の支援を行う。特に、臍帯血移植における最も深刻な合併症である生着不全、ウイルス感染症、GVHD についてのこれまでの基盤研究を継続しつつ臨床研究に発展させる。さらに、現行の移植方法の有効性の検証を目的とした前方視的臨床試験を支援すると共に、15 年にわたる臍帯血バンク事業の問題点を総括し、新法の下で骨髓バンクと連携しながら移植細胞ソースを必要としている患者への安定供給を担保するための将来構想を考案することを目的として、開発研究者と臨床現場の移植医が一体となるプラットフォームの構築により、基盤的研究の臨床応用の効率化およびスピード化を目指した。

B. 研究方法

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

- (ア) 凝固・線溶系に作用する新規分子標的製剤による生着・造血回復促進法（安藤、宮田）： マウス移植モデルへの投与により新規 PAI-1 阻害剤の移植後の造血回復の促進効果と安全性について更に検討を進め、臨床試験の施行に

向けて基盤を固めるとともに、翌 H26 年度以降にその実施を予定している臨床試験計画の作成に向けて、規制対応も含めて問題点の検討をも行った。

- (イ) TNF- α シグナル遮断による移植前処置後に投与されたグラフト内造血幹細胞保護による造血回復促進法の開発および新規複数臍帯血移植（大津）：動物モデルを用いて炎症骨髓環境での造血幹細胞機能に対し負に影響する原因として同定された TNF- α を特異的に遮断するペプチドを合成し、その主な作用機序として明らかになった細胞内活性酸素（ROS）に関連する種々のインヒビターとの比較において、TNF- α 刺激下の造血幹前駆細胞への作用について検討を進めた。独自に確立した生体内暴露モデルと、TNF- α ノックアウトマウスの使用によって、本法の妥当性を支持する実験結果が蓄積しているが、実際の生体内での影響についての証明のために、予期される抑制からの遮断効果の検証をもって行う必要があり、さらなる移植実験、およびヒト細胞を用いた検討をおこなった。

- (ウ) 新規低分子化合物を用いた臍帯血造血幹細胞増幅法の開発（岩間）：次年度は MISK303 の合成展開産物の活性の MISK303 との比較検討による最適化を進めるこ

とによって、今後さらに効果のある化合物が得られる可能性が期待される。H25 年度には合成展開による化合物の最適化を終了するとともに、MISK303 の作用標的分子の同定に向けた検証を進めた。H26 年度以降には最適化した化合物による造血幹細胞増幅法の標準プロトコールの作製の準備に移行した。

(エ) HLA 近似第三者ドナーからの多ウイルス抗原特異的 CTL 療法の開発 (森尾、高橋)：複数ウイルス特異的 CTL 療法の技術の前臨床試験を進めることによって、アロ特異反応や標的細胞傷害能についての検証を行った。さらには、MTA を取り交わした米国ベイラー医科大学細胞遺伝子治療センター (M. ブレンナー博士、A. リーン博士ら) と連携をとり、米国にて先行している臨床試験について、日本でも同様の方式での臨床応用に向けた計画の立案を進めた。その際に生じることが予想される規制対応については本研究グループ内で横断的に議論を進め、他の研究課題での臨床研究の際にも応用された。H26 年度には、臨床試験の開始に向けた準備を更に進めた。

(オ) 新規プラスミン阻害剤による炎症性サイトカイン抑制を介した GVHD に対する新規分子療法の開発 (服部)：新たに慢性 GVHD

マウスモデルを作成し、その病態における YO-2 の効果を確認するとともに、GVHD 患者検体の収集をさらに進め、血液凝固・線溶系因子の動態が MMP 活性、炎症性サイトカイン分泌を通じ、GVHD の重症度や病勢への関与について解析を行った。

2. 移植成績の収集・解析と臨床試験の立案・遂行 (谷口、山本、宮村、寺倉、高橋、山口)

「骨髄非破壊的前処置法を用いた骨髄内への移植法」を含めて、現在の行われている臍帯血移植に関する複数の臨床試験の支援を進めるとともに、新たな統計解析の手法に関する検討を進め、当研究グループで行っている臨床試験の結果解析および、単一移植施設および日本造血細胞移植学会の一元化データベースを用いた臍帯血移植データの統計解析に応用した。

3. 臍帯血バンク事業整備の支援 (高梨)

2012 年 9 月には初めて制定公布された造血幹細胞移植のための法律により大きな転換期を迎えている本邦の臍帯血バンクを巡る状況にあわせ、適切な臍帯血バンク規模の達成に向けての問題点の整理を行った。また品質管理においては海外の情報を収集しつつ議論を進めた。

C. 研究結果

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 阻害剤の臨床応用が最も進んでおり、第 I 相試験はまもなく

終了予定であり移植後投与の第 II 相試験の準備を進めており、2015 年度の開始を予定している。造血幹細胞増幅法、および新規複数臍帯血移植の開発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。

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。

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。

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

- ① 凝固・線溶系に作用する新規分子標的製剤による生着・造血回復促進法（安藤、宮田）： PAI-1 阻害剤の投与により、骨髄へのホーミング活性の甲信や総白血球数の増加などの造血再生の迅速化と造血幹細胞の増幅による長期造血維持能の向上が達成

されることを見出した。健常人第 I 相試験は 1 月に終了予定であり、臍帯血移植での最適化を目指した第 II 相臨床試験が来年度より実施するための臨床研究計画書作成等の準備を進めている。

- ② 新規低分子化合物による造血幹細胞増幅（岩間）： 同定した低分子化合物 TCA3-1 に関して、無血清培養条件で SCF, Flt3L を加えて 7 日間培養したところ、CD34+CD38-造血幹細胞は未添加群の約 2 倍に増加することが確認された。現在培養による造血幹細胞の増幅率を異種移植の系で検定中である。
- ③ 新規複数臍帯血移植（大津）： 関東甲信越臍帯血バンクより HLA 既知の研究用凍結臍帯血の提供を受け、融解後に CD34 陽性細胞分離を行う手技の最適化を行い、用手的には生細胞率の高い単核球を得ることは困難であるという問題点を閉鎖系回路中で比重遠心分離を行う機械（CliniMACS® Prodigy）によって、ほぼ目的どおりの生細胞を得ることが可能であることを確認した。この方法を用いて異種動物モデルでの前臨床試験が進んでいる。
- ④ HLA 近似同種ウイルス特異的免疫細胞バンクの開発（森尾、高橋）： 実臨床を見据えて無血清培地を用いた CMV、EBV、アデノウイルス、BKV、HHV6 特異的 CTL の調製法はほぼ確立に至り、アロ CTL の臨床応用に必要な HLA 拘束性の簡易決定法とアロ反応確認法の確立を進めている。現在、臨床

試験計画書を作成中である。

- ⑤ 凝固・線溶系制御による「前処置により傷害を受けた組織」の再生促進法の開発および、凝固・線溶系に作用する新規分子標的製剤による GVHD 治療法の開発（服部）： ヒト検体及びマウス急性 GVHD において凝固・線溶系が、炎症性細胞動員、そして炎症性サイトカイン分泌を制御していること、さらに一部の白血病細胞の増殖に関与していることを示唆した。また線溶系因子を分子標的とした新規プラスミン阻害剤の有効性を急性 GVHD のマウスモデルにて見出し、論文報告をおこなった。

3. 移植成績の収集・解析と臨床試験の立案・遂行（山本、寺倉、高橋、山口）

全国データを用いた非血縁骨髄移植と臍帯血移植の比較は日本血液学会 2014 年次総会で報告され(plenary session に採択)、現在、論文投稿中である。前処置法の至適化に関する臨床解析は終了し、論文化が行われた。臍帯血移植後の GVHD 予防法の至適化を探るための全国データを用いた後方視的臨床解析試験についてもデータ申請が承認され、データ解析に入っており、今年度中の解析終了を目指している。前方視的臨床研究としては「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-SHOT0601)」は目標本登録症例数 60 例に対して 57 例（仮登録 222 例）に到達し（2014 年 10 月末現在）、今年度中には目標

に到達する見込みである。虎の門病院における難治性血液疾患に対する臍帯血移植の最適化の探索目的とした「同種移植後再発症例に対する臍帯血移植の有効性および安全性の評価」に関する後方視的観察研究については、約 100 例の後方視的な臨床データの集計が終了し現在データ解析中であり、同様の前方視的臨床試験も目標 10 例のうち 4 例まで登録が進んでいる。東大医科研における臍帯血移植の後方視的臨床研究については、複数の臨床解析が期間内に終了し、各々が論文化された。

4. 臍帯血バンク事業整備の支援（高梨）

新体制への移行の中で本邦の公開臍帯血数が減少したことから、いかに臍帯血バンク事業を充実させていくかが喫緊の課題である。4 月時点よりはわずかずつ公開臍帯血数が増加しており、また 2014 年度の臍帯血移植数も 2012-2013 年度並みに推移している。造血幹細胞提供支援機関（日本赤十字社）との共同事業も開始されている。

D. 考察

我が国における臍帯血移植は、造血器腫瘍に対する根治療法として広く普及してきたが、依然として移植後合併症の発症率が高い傾向にあるため、早期の移植がより良好な臨床成績が得られるにもかかわらず、ギリギリまで移植時期が延ばされる、という背反するジレンマに陥っている。移植前処置法や移植細胞ルートの改良などの臨床

試験を進めることにより、既存の方法を用いながら、その適正化を目指す一方で、最も深刻な問題である拒絶に対して、当研究グループでは幹細胞増幅や多種類の造血幹細胞使用、骨髄ニッチへの生着促進など様々なアプローチで移植細胞の生着率を向上させる方法の開発を進めている。PAI-1阻害剤については、ホーミングが亢進する機序が不明であったが、ケモカイン受容体や細胞接着因子あるいは細胞表面酵素の発現制御に PAI-1 が関与している可能性の検討がおこなわれた。新規低分子化合物による造血幹細胞増幅については、Pyrimidoindole 誘導体である新規の低分子化合物が優れた造血幹細胞増幅能を有することが報告され (Science 345:1509, 2014)、その化合物との比較検討が必要な状況にある。新規複数臍帯血移植については、機械 (CliniMACS® Prodigy) を使用しての単核球分離はコストが問題となった。複数の臍帯血を同時に分離する対応策を検討している。今後、複数の臍帯血由来 CD34 陽性細胞を用いた前臨床実験も 12 月から開始された。ウイルス感染症対策として作成された CTL のアロ反応性の確認法はほぼ確立したが、HLA 拘束性の決定法の確立については予定より時間を要している。再生医療新法下における臨床試験の遂行については、森尾班 (「臓器移植・造血幹細胞移植後の日和見感染に対する有効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」) と連携した対応を予定している。GVHD 対策については、線溶系因子を分子標的とした GVHD に対する新規薬剤の至適投与量、またこれに依存した毒性の有無等を精査する必要がある。またヒト細胞に対す

る毒性、ヒト GVHD 病態に対する有効性についてさらに確認をする必要がある。移植成績の収集・解析と臨床試験の立案・遂行については、前方視的臨床試験における登録症例数の蓄積、および全国データの取得手続き等に予想以上の時間を要し、若干の遅れが生じたが、研究期間内での報告、および解析終了の目処がたちつつある。GVHD データの統計解析、特に競合イベントの取り扱いについて更なる検討の必要性が指摘されている。また、基盤的研究内容の臨床現場への還元のスピード化については更なる努力が必要である。また、臍帯血バンク事業整備の支援に関しては、臍帯血バンクの業務拡大には臍帯血採取の協力が不可欠である。対応策として、造血幹細胞提供支援機関 (日本赤十字社) との共同事業として臍帯血採取技術研修会の開催などが開始された。さらなる臍帯血採取施設への働きかけと各臍帯血供給事業者の業務量拡大への対応とのバランスをとる必要がある。

E. まとめ

臍帯血移植の安全性が高まることにより、必要な患者が早期に移植を決断できることで成績の向上と、高齢者への適応拡大を安全に推進することを目指して、合併所克服のための新規治療法を開発を進めた。さらには、現在進行中の臨床試験の支援を継続するとともに、次期臨床研究策定の基礎データとすべく臨床解析を進めた。開発研究者と臨床現場の移植医が一体となるプラットフォームを構築しながら、基盤的研究の臨床応用の効率化およびスピード化を図った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 国内

主な原著論文による発表 1 件

それ以外（レビュー等）の発表 1 件

1. 森尾友宏、宮坂あかね、小野敏明、落合 央、藤田由利子、高橋 聡
移植後ウイルス感染に対する多ウイルス特異的CTL療法 The Japanese Journal of Pediatric Hematology Oncology 50 (3) 335-340, 2013
2. 高梨美乃子. 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」施行後の血液事業. 日本輸血細胞治療学会誌 総説 16-Dec-14.

2) 海外

主な原著論文による発表

1. Konuma T, Takahashi S. et al. Third allogeneic stem cell transplantation (SCT) using unrelated cord blood for relapsed acute leukemia after second allogeneic SCT. Int J Hematol. 2015 Feb 6. [Epub ahead of print] PMID: 25655380
2. Konuma T, Takahashi S. et al. Myeloablative unrelated cord blood transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison with other graft sources from related and unrelated donors. Ann Hematology. 94: 289-296, 2015.
3. Atsuta Y, Takahashi S. et al. 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(2) 435-41, 2014.
4. Mizuta S, Takahashi S. et al. Pre-transplant administration of imatinib for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with

BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. Blood.123: 2325-2332,2014.

5. Sato A, Takahashi S., Hattori K.etal. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. Leukemia (2015) 29, 145–156; doi:10.1038/leu.2014.151
6. Konuma T, Takahashi S. et al. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. Bone Marrow Transplant 49(5) 634-9.2014.
7. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. Leukemia 29(1) 145-56. 2015.
8. Konuma T, Takahashi S. et al. Comparable long-term outcome of unrelated cord blood transplantation with related bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation for patients aged 45 years or older with hematologic malignancies after myeloablative conditioning. Biol Blood Marrow Transplant. 20(8) 1150-5.2014.
9. Nakaya A, Takahashi S. et al. Does the hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index (HCT-CI) predict transplantation outcomes? A prospective multicenter validation study of the Kanto Study Group for Cell Therapy. Biol Blood Marrow Transplant.20: 1553-9,2014.
10. Konuma T, Takahashi S. et al. Granulocyte colony-stimulating factor

- combined regimen in cord blood transplantation for acute myeloid leukemia: a nationwide retrospective analysis in Japan. *Haematologica*.99: e264-8,2014.
11. Nakauchi Y, Takahashi S. et al. Effective treatment against severe Graft-versus-Host Disease with allele-specific anti-HLA monoclonal antibody in a humanized-mouse model. *Exp Hematol*.43: 79-88,2015.
 12. Kato S, Takahashi S. et al. Hemorrhagic hepatic cyst after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol*.100: 214-5,2014.
 13. Konuma T, Takahashi S. et al. Single-unit cord blood transplant for acute lymphoblastic leukemia and lymphoma using an intensified conditioning regimen of total body irradiation, high-dose cytarabine and cyclophosphamide. *Leuk Lymphoma*.8: i-3,2014.
 14. Takahashi S. Here comes the cord. *Blood Res*. 49: 209-10,2014.
 15. Mori T, Takahashi S. et al. Prospective multicenter study of single-unit cord blood transplantation with myeloablative conditioning for adult patients with high-risk hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 19(3):486-91, 2013
 16. Atsuta Y, Takanashi M, Takahashi S. et al. Transplantation. Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. *Hematologica*. 2013
 17. H. Mae, J. Takahashi S. et al. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transpl Infect Dis*. Dec 20. doi: 10.1111/tid. 12038. 2012
 18. Kanda J, Takahashi S. et al. Impact of the direction of HLA mismatch on transplant outcome in single unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 19(2) 247-54: 2013
 19. Nishimura T, Takahashi S. et al. Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*. Jan 3;12(1): 114-26, 2013
 20. Konuma T, Takahashi S. et al. Effect of ABO Blood Group Incompatibility on the Outcome of Single-Unit Cord Blood Transplantation after Myeloablative Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Apr;20(4):577-81. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.12.563. Epub 2013 Dec 22.
 21. Nishiwaki S, Taniguchi S, Takahashi S. et al. Impact of a donor source on adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis from the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Ann Oncol*. 2013 Jun;24(6):1594-602. doi: 10.1093/annonc/mds655. Epub 2013 Jan 31.
 22. Tanaka J, Takahashi S. Taniguchi S, et al. Effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission. *Blood Cancer J*. 2013 Nov 29;3:e164. doi: 10.1038/bcj.2013.62.
 23. Ebihara Y, Takahashi S. et al. Pneumothorax in an early phase after

- allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Rep.* 2013 Jun 28;5(2):34-5. doi: 10.4081/hr.2013.e10. Print 2013 Jun 2
24. Doki N, Takahashi S, et al. Visceral varicella zoster virus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2013 Jun;15(3):314-8. doi: 10.1111/tid.12073. Epub 2013 Apr 1.
 25. Morimoto A, S Takahashi S, et al. 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.* 2013 Jan;97(1):103-8. doi: 10.1007/s12185-012-1245-0. Epub 2012 Dec 16.
 26. Kurosawa S, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, et al. Recent decrease in non-relapse mortality due to graft-versus-host disease and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-remission acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2013 Apr 8. doi: 10.1038/bmt.2013.42. [Epub ahead of print]
 27. Nishiwaki S, Miyamura K, Taniguchi S, Takahashi S, et al. Impact of a donor source on adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: a retrospective analysis from the Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Ann Oncol.* 2013 Jan 31. [Epub ahead of print]
 28. Yamamoto S, Takahashi S, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 myeloproliferative syndrome. *Leuk Lymphoma.* 2013 Feb 16. [Epub ahead of print]
 29. Oshima K, Takahashi S, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with mildly reduced renal function as defined based on creatinin clearance before transplantation. *Ann Hematol.* 2013 Jan;92(2):255-60.
 30. Nishimura T, Takahashi S, Otsu M, et al. Generation of monoclonal TCR-expressing human T-lineage cells from induced pluripotent stem cells of single peripheal T-lymphocyte origin. *Cell Stem Cell.* 2013 Jan 3;12(1):114-26
 31. Morimoto A, Takahashi S, et al. 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.* 2013 Jan;97(1):103-8. doi: 10.1007/s12185-012-1245-0. Epub 2012 Dec 16.
 32. Dong Y, Takahashi S, et al. Leukemogenic Fusion Gene (p190 BCR-ABL) Transduction into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells in the Common Marmoset. *Open Journal of Blood Diseases*, 2012, 2, 1-10. doi:10.4236/ojbd.2012.21001 Published Online March 2012
 33. Matsumura T, Taniguchi S, , Takahashi S, , et al. Allogeneic cord blood transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: retrospective survey involving 256 patients in Japan. *Leukemia.* 2012;26(7):1482-6
 34. Kanda J, Taniguchi S, Takahashi S, et al. Unrelated cord blood transplantation vs related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the

- graft-versus-host direction. *Leukemia*. 18-Jul doi: 10.1038/leu.2012.203. 2012
35. Atsuta Y, Taniguchi S, Takanashi M, Takahashi S. et al. Comparison of Unrelated Cord Blood Transplantation and HLA-Mismatched Unrelated Bone Marrow Transplantation for Adults with Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 18(5): 780-787. 2012
36. Matsumura T, Taniguchi S, Takahashi S. et al. Allogeneic cord blood transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: retrospective survey involving 256 patients in Japan. *Leukemia*. 26(7)1482-6: 2012
37. Ebihara Y, Takahashi S. et al. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent and young adult patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. *Leuk Res*. 36(2)128-31,2012
- G.知的財産権の出願・登録状況
1. 発明の名称： 炎症性疾患治療剤
出願番号： 特願 2011-211450
発明人： 服部浩一、津田裕子、服部・ハイジツヒ・ベアテ
出願日： 2013年9月27日
2. 発明の名称： PAI-1 阻害剤の新規用途
(Novel use of PAI-1 inhibitor)
分類： 国際出願
出願国： 日本
出願日： 2014年4月15日
出願番号： PCT/JP2014/060760
出願人： 東海大学 (安藤潔、八幡崇、宮田敏男)
3. 発明の名称： 造血幹細胞の製造方法
(Method for producing hematopoietic stem cells)
出願国： 日本
出願日： 2014年6月13日
出願番号： 特願 2011-131657
(PCT/JP2011/063537)
出願人： 千葉大学 (岩間厚志、西野泰斗)
4. 発明の名称： 造血幹細胞移植を補助することに用いるための医薬組成物およびその製造方法
分類： 製剤、製法
出願国： 日本
出願日： 2014年11月21日
出願番号： 特願 2014-236476
出願人： 東京大学 (大津真、中内啓光、高橋 聡、石田 隆、頼貞儀、笹本賢一)

II. 分担研究報告書

安藤 潔 (東海大学医学部)

宮田敏男 (東北大学 大学院医学系研究科)

大津 真 (東京大学医科学研究所)

岩間厚志 (千葉大学大学院医学研究院)

森尾友宏 (東京医科歯科大学大学院)

服部浩一 (順天堂大学医学系研究科)

高梨美乃子 (日本赤十字社 血液事業本部)

研究分担者 安藤 潔(東海大学血液・腫瘍内科 教授)

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、造血再生因子の産生が誘導され、造血系の迅速な再生と長期造血維持能が亢進することを明確にした。本研究成果をもとに、PAI-1 阻害剤の臍帯血移植への適応を目指した臨床試験を開始した

A. 研究目的

より安全で成功率の高い臍帯血移植法を実現するために造血再生を促進する作用がある線維素溶解系（線溶系）を活性化させる新規PAI-1阻害剤に着目し、移植後の造血回復を効率よく迅速に達成させる方法の確立に取り組んだ。

B. 研究方法

マウスに放射線照射し、臍帯血や骨髓由来の造血幹細胞細胞を経静脈的に移植した。移植後に5日間PAI-1阻害剤を投与した。

（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、線溶系が活性化し、造血因子の産生亢進、ホーミングや造血回復の促進、さらに、造血幹細胞の増幅と長期造血維持が確認された。

D. 考察

PAI-1阻害剤は、臍帯血造血幹細胞移植後の迅速で効率よい造血回復反応を誘導するということが明らかとなった。また、その効果は造血系の早期回復のみならず長期造血維持にも有効であることが分かった。

E. 結論

PAI-1阻害剤は、臍帯血移植後の造血再生を促進することが明確になった。この結論をふまえて、本剤の臍帯血移植への適応を目指した臨床試験を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ibrahim AA, et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor type-1 activity enhances rapid and sustainable hematopoietic regeneration. *Stem Cells*. 2014, 32(4):946-958.

2. 学会発表

Ibrahim AA, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1 is a negative regulator of hematopoietic regeneration.

臨床血液、第54巻第9号、p. 312、
2013年

G. 知的所有権の取得状況

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。

研究分担者報告書

造血細胞保護法および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

現代医学において臍帯血移植の有用性は疑いないが、一方で移植後における造血回復の遅れは克服すべき課題である。本計画においては、移植後造血幹細胞を骨髄炎症環境から保護する方法および、複数の臍帯血ユニットを混合して細胞数を確保する方法の2つのアプローチにより、成績の改善につながる改良型移植法の開発を目指した。平成24年度には主として前者を、後半2年間には後者を中心に研究を行った。結果、それぞれの研究テーマにおいてマウスモデルおよびヒト細胞を用いて proof-of-concept を取得した。

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。本研究では、初年度には骨髄環境に誘導される機能抑制性因子から移植造血幹細胞を保護することで造血回復促進を可能にする、新規の改良型移植療法の開発を主たる目的とした。平成25年度からは、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主たる目的とした。

B. 研究方法

1. C57BL/6 マウス (以下、B6 マウス) に放射線照射を行い、経時的に骨髄ストローマ細胞を単離し、遺伝子発現

解析を行い、発現上昇がみられたサイトカインを抽出する。これらについて、B6 マウス骨髄造血幹細胞からのコロニー形成への抑制能を検証する。次に、造血幹細胞の骨髄環境曝露モデルを確立する。照射骨髄への *in vivo exposure* を実現するため、純化造血幹細胞を移植後、~24 時間後に骨髄細胞を採取し、競合的骨髄再構築アッセイを行う。照射後にテスト造血幹細胞を移植するタイミングを変えて比較検討し、骨髄環境の炎症状態と造血幹細胞に与える影響との関係を明らかにする。これにより確立した造血幹細胞への負の影響が最大となるモデルを用いて、サイトカイン KO 骨髄環境が負の影響をキャンセルするか検討する。これらが証明された後、当該サイトカインが造

血幹細胞機能を損ねるメカニズムを解析する。メカニズム解析に基づいて、その抑制効果を遮断する手法を見出し、目的とする造血幹細胞保護法を確立する。

2. 純化したマウス造血幹前駆細胞を用いて単一ユニットにおける生着不全を模倣した不全移植モデルを作製する。次に4種類のアロ細胞と1種類のコンジェニック細胞を混合して移植し、アロ細胞であっても生着促進活性を有するかにつき検証する。さらに単一ユニットの幹細胞が長期の造血構築を維持し、他の混合ユニットは移植早期の造血回復のみを補強するモデルを構築する。これらから得た知見をもとに HLA 既知の複数臍帯血ユニットを用いて、免疫不全マウスをレシピエントにヒト細胞での実証研究を行う。
3. 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

1. 照射後骨髄ストローマ細胞において、1 日後にはいくつかの炎症性サイトカインが誘導されることが明らかとなった。その中で造血幹細胞のコロニー形成を抑制するものとして TNF- α が抽出された。造血幹細胞の炎症環境への *in vivo exposure* モデルで、照射後骨髄環境における~24 時間の暴露によって移植造血幹細胞の再構築能が抑制されること、その抑制効果は 2-3 日目の照射後骨髄において最大となることが明らかとなった。KO マウスを用いた検討で、照射骨髄環境から TNF- α を除くことで、この抑制効果が大部分キャンセルされることを証明した。TNF- α が造血幹細胞において再構築能を損ねる分子機構について予備検討を加えた結果、造血幹細胞、造血前駆細胞において、TNF- α 刺激が濃度依存性に活性酸素種の産生を誘導することを明らかとした。短時間の活性酸素の蓄積が、純化した造血幹細胞に負の影響を与えることを証明した。最後に、TNF- α 刺激が NADPH oxidase を介して活性酸素種の蓄積につながる経路を特異的に阻害するペプチドを用いて造血幹細胞保護効果を検証し、その効果を確認した。
2. アロ抗原の異なる 4 系統のマウスから純化したマウス造血幹前駆細胞の混合物は、拒絶方向の major ミスマッチ条件でありながら、同数 (4 種の合計) のコンジェニック造血幹前駆細胞

胞と同等の早期造血促進能を示した。アロ抗原の異なる複数の細胞の移植でもレシピエントにおける不利な免疫反応は観察されなかった。しかしながら長期にはコンジェニック由来造血に収束するとの予想に反し、アロ細胞が様々な割合で混合キメラを形成した。興味深いことにコンジェニック細胞を全骨髄細胞として移植することで、上記のアロ細胞による長期混合キメラ形成はほぼ完全に抑制された。移植するコンジェニック全骨髄細胞数を減じて、不全移植モデルとした場合においても、コンジェニック造血への収束と、アロ混合造血幹前駆細胞による移植後早期の造血補完が確認された。

- 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ラリズムにおいて、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ラ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

- 本研究では B6 マウス congenic 移植系を使用しており、アロ同種移植モデルでの試行は行っていない。そのため、炎症の誘導は放射線照射のみによるものとなり、炎症性サイトカインも末梢血中には検出されず、骨髄環境中における微少炎症モデルともいえるものであるが、それにも関わらず ~ 24 時間の暴露で造血幹細胞機能を抑制することは意外であった。同種移植では TNF- α の産生は全身的にみられることが知られており、造血幹細胞にとってはさらに厳しい環境への暴露が不可避となる。また、同種移植における炎症は、graft-versus-host reaction によりさらに遷延することが予想されるため、短時間のシグナル遮断が十分な保護効果につながるかは不明である。現時点では、造血幹細胞に対する炎症環境中の抑制効果は、ニッチに生着するまでの行程(1-2日以内に完了すると考えられる)に限定され、生着後の