

201432009A

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

**「臍帯血・臍帯由来間葉系細胞製剤を用いた
新規免疫療法・再生医療の開発」**

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 長村 登紀子

平成 27 年(2015 年)

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（再生医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人東京大学 総長 濱田 純一 代理人 国立大学法人東京大学医科学研究所 事務部長 紺野 喜久恵 が実施した平成26年度「臍帯血・臍帯由来間葉系細胞製剤を用いた新規免疫療法・再生医療の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
臍帯血・臍帯由来間葉系細胞製剤を用いた新規免疫療法・再生医療の開発-----1	
長村（井上）登紀子（東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部）	
資料 1. 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	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 臍帯血・臍帯由来 MSCs の製剤化-----15	
長村登紀子 （東京大学医科学研究所附属病院 セルプロセッシング・輸血部）	
2. 臍帯血と臍帯の安全な採取システムの確立-----23	
角田 肇 （N T T 東日本関東病院・分娩部）	
3. 臍帯由来 MSCs 製剤の特性解析項目の設定-----26	
梅澤 明弘（国立成育医療研究センター研究所）	
4. 臍帯血・臍帯由来 MSCs 製剤の臨床試験に向けたシステム構築と規制対応-----28	
長村 文孝（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・先端医療開発推進分野）	
5. 重症移植片対宿主病(GVHD)に対する臍帯由来 MSCs を用いた非臨床試験-----32	
東條 有伸（東京大学医科学研究所・先端医療研究センター・分子療法部）	
6. 脳性麻痺に対する臍帯由来MSCsを用いた非臨床試験-----40	
森田育男、研究所：東京医科歯科大学医歯学総合研究科分子細胞機能	
7. 低フォスファターゼ症を含む先天性骨代謝疾患に対する臍帯由来 MSCs の非臨床試験	
竹谷健、国立大学法人島根大学医学部附属病院-----42	
III. 学会等発表実績	
1. 学会等発表実績-----45	
2. 平成 26 年度第 1 回研究報告会-----57	
3. GVHD キックオフミーティング-----69	
IV. 研究成果の刊行物・別冊-----77	

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

研究課題：臍帯血・臍帯由来間葉系細胞製剤を用いた新規免疫療法・再生医療の開発

業務主任者：長村登紀子 東京大学医科学研究所附属病院

セルプロセッシング・輸血部 准教授

研究要旨：臍帯由来間葉系(幹)細胞 (Mesenchymal Stem/Stromal Cells;MSC) は、ドナーへの肉体的負担のない新規 MSC ソースであり、他の MSC 同様に炎症部位や組織損傷部位に遊走し、免疫抑制効果や組織修復能を有するとされている。本研究は、臍帯血及び臍帯由来 MSC を再生医療等製品として主に造血細胞移植後の重症急性移植片対宿主病 (GVHD)、新生児脳性麻痺および低フォスファターゼ症を含む骨軟骨形成不全症の治療へ応用するための製剤化に向けた POC の取得と非臨床試験実施を目的とする。H26 年度は、細胞調製において、東大医科研治験審査委員会での承認を得て、臨床用の臍帯の採取を開始した。製剤化に関しては、再生医療等の新法、新制度に考慮しつつ、PMDA と薬事戦略事前相談にて試薬の選定、品質検査、特性解析項目の選定について検討した。また、臨床試験を目指し、異種 GVHD モデルマウス、脳性麻痺のモデルラットを作成し、臍帯由来 MSC の投与効果を検討した。骨軟骨形成不全症は、モデルマウスが作成できた。

業務担当責任者：

氏名・所属研究機関名・所属研究機関・職名

- 1) 角田 肇・NTT東日本関東病院・産婦人科・部長
- 2) 梅澤 明弘・独立行政法人国立成育医療研究センター生殖・細胞医療研究部/再生医療センター研究・センター長
- 3) 長村 文孝・東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
- 4) 先端医療開発推進分野・教授
- 5) 東條 有伸・東京大学医科学研究所・先端医療研究センター 分子療法分野・教授
- 6) 森田 育男・東京医科歯科大学大学院 分子細胞機能学分野・教授
- 7) 竹谷 健・島根大学医学部 附属病院輸血部・講師

A. 研究目的：

間葉系幹細胞(MSCs)は、分化再生能に加え炎症・組織障害部位へ集積して抗炎症・免疫抑制能、組織修復能を示す能力が注目されている。また、骨形成不全症等の難治性疾患への移植や造血幹細胞移植後の移植片宿主病(GVHD)に対して 3rd party の骨髄由来 MSCs の臨床試験が行われ効果を挙げている。本研究は、非血縁同種臍帯血及び臍帯由来 MSC を再生医療等製品として主に造血細胞移植後の重症急性移植片対宿主病 (GVHD)、新生児脳性麻痺および低フォスファターゼ症を含む骨軟骨形成不全症の治療

へ応用するための製剤化に向けた POC の取得と非臨床試験実施を目的とする。

なお、本研究において同一ドナーから臍帯血と臍帯を同時に採取する意義は、臍帯血造血幹細胞や免疫細胞等を臍帯由来 MSCs の効果を高めるために利用できる点にある。これまでの研究から、臍帯血から制御性 T 細胞の誘導増幅が可能であり、同時に投与することにより臍帯由来 MSCs の生着促進または効果を延長できる可能性もある。但し、非血縁者間移植用臍帯血に関しては、現在、造血細胞移植に関する法律(「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」)

によって非血縁者ドナーからの臍帯血の臨床採取調製が公的臍帯血バンクに限定されており、検査および研究用として採取・保存・使用することとする。

さらに、薬事法は薬機法に改正された際に再生医療等製品が独立したカテゴリとなり、臨床研究は再生医療等の安全性の確保等の法律の制定により、規制環境が大きく変化した。このような状況で、規制情報の収集、医薬品医療機器総合機構(PMDA)との薬事戦略相談等により、適切な非臨床試験の策定、品質や製造の記載対応を行い、臨床試験あるいは医師主導治験へとつなげることを本研究の目的とする。

B. 方法：

1) 臍帯血と臍帯の効率的採取(角田)

帝王切開手術を予定している妊婦より臍帯血と臍帯採取に関する同意を書面で取得した。臍帯血は、公的臍帯血バンクでの調製に限られているため、検査用および研究用として採取の同意を得ている。出産後に胎盤と臍帯を別のトレーに取出し(胎盤娩出後採取)臍帯血・臍帯を各々採取バッグおよび専用プラスチック容器に採取し、東大医科研細胞リソースセンター搬送者が受け取りに来るまで、4℃の冷蔵庫で保管した。臍帯血・臍帯付随書類(同意書、問診票、家族歴および分娩記録)は検体とともに東大医科研細胞リソースセンターに搬送された。

2) 臍帯血・臍帯由来MSCの製剤化(長村登)

臍帯血は、検査用および研究用として調製し、臍帯は、抗生剤入りPBSにて洗浄後、改良explant法にて初期培養を行った。す

なわち、臍帯の一部2cm(約2g)を小切片を細切し、Cellamigo®を載せて培養液を加えて培養し、遊走してきた臍帯由来MSCを回収した。この細胞をP1細胞として検査用に使用し、残りは一旦凍結保存した。残りの臍帯は、6ヶ月以降の健康調査および臍帯由来MSCの安全性・品質試験を経て、大量培養行って凍結保管することとした。

3) 臍帯由来間葉系細胞製剤の特性解析項目の設定(梅澤)

本事業の対象となる疾患に対する治療としての細胞性医薬品として、臍帯由来MSCの各治療における臨床プロトコールに応じた適切な(安全性・有効性を担保し、コストや簡便性を考慮した)細胞特性解析項目の設定を行った。

4) 臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞(MSC)製剤の臨床試験に向けたシステム構築と規制対応(長村文)

a. 情報の収集と取り纏め

本事業に必要な規制情報と非臨床試験の情報、特に製剤化に関する情報を収集した。

b. 規制対応

PMDA 薬事戦略相談あるいは厚労省への対応調整を行った。

5) 重症移植片対宿主病(GVHD)に対する臍帯由来MSCを用いた非臨床試験(東條)

活性化ヒトリリンパ球を輸注した免疫不全マウスに生じる異種GVHDモデルにおいて、臍帯由来MSCがGVHDに及ぼす影響は投与のタイミングによって異なる。H26年度は、安全性と有効性を検証するため、異種GVHD発症マウスを用いて、臍帯由来MSCが免疫抑制作用を示す至適投与時期を検討した。また、臨床試験用のプロトコール案を作成した。

6) 脳性麻痺に対する臍帯由来 MSC を用いた非臨床試験 (森田)

子宮内感染や脳虚血性低酸素等の原因からなる炎症および神経損傷であり、未だ確立した治療法がない。

新生仔ラット腹腔内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) モデルを作成した。さらに日齢4に臍帯由来MSC、4、5、6、7に臍帯由来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。

7) 低フォスファターゼ症含む骨形成不全症に対する臍帯由来間葉系細胞の非臨床試験 (竹谷)

アルカリフォスファターゼ (ALP) 遺伝子変異により骨の石灰化障害をきたす低フォスファターゼ症 (Hypophosphatasia, HPP) のモデルマウスの作成を目的として、HPPの原因遺伝子である組織非特異的ALP (Tissue-nonspecific ALP, TNSALP) 遺伝子に変異を導入したマウスについて、Sanford-Burnham Medical Research Instituteで凍結受精卵から個体復元を行い、当該遺伝子についてヘテロ接合体の個体 (16週齢) を入手した。このヘテロ接合体固体 (ホモは致死的) を用いて、非臨床用モデルマウスの評価を行った。

(倫理面への配慮)

平成24年に東大医科研ヒトゲノム倫理審査委員会にて、「臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化 (バンキング) とその応用に関する研究 (24-53)」にて承認を得て、非臨床を含めた研究を開始した。採取施設でも同様に倫理委員会にて承認を得た。さらに、臨床試験を見据えて、臨床用のバンキングに関する該当委員会として、東大医科研治験審査委員会にて課題名:「臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞バンキングとその応

用に関する研究 (東大医科研臍帯血・臍帯バンク) (26-2)」として承認を得た後に、ヒトゲノム倫理審査委員会において、ヒトゲノム・遺伝子解析その他の非臨床試験や研究用の細胞提供も含めた審査を受け、承認後に臨床用の臍帯血・臍帯採取を開始した (26-24)。

共同研究者においては、所属する機関の倫理審査委員会にて、承認を得た後、一部は東大医科研にてバンキングした細胞を供与して研究を実施した。

C. 結果

1) 臍帯血と臍帯の効率的採取 (角田)

帝王切開を予定している母親から書面にて同意書を得た後に、IDを発効して採取した。このID発行は、2次元コードラベルを用いた検体管理システムにて付与され、これによって検体および付随書類管理を行った。この1次IDは、東大医科研細胞リソースセンターでの受入れ検査時に2次元コードを読み取り、2次IDを付与される仕様である。H26年度は、2施設で22例採取し、東大医科研受入れ検査にて適合と判定された14例を臨床用として調製されたため、母体血の採血を行った。基本的には、臨床用公的臍帯血バンクと同様の対応にて母体採血等も実施した。

2) 臍帯血・臍帯由来MSCの製剤化 (長村)

平成26年度、重症GVHDの治療用に臨床用臍帯由来MSCの調製培養について治験審査委員会の承認を得て、平成27年3月末までに臨床用臍帯血・臍帯22例の採取より、受入検査にて適合した15例 (=ロット) の臍帯を臨床用として保存した。さらに感染症検査、染色体検査等にて、13例が適合し、6ヶ月経

過した5例に対して健診の問い合わせを実施し、1例の健康を確認している。現在、健康を確認できたロット順に、更なる適格性試験の評価を予定している（資料1）。また治験を想定した臍帯の製剤化に関しては、平成27年2月に通算第3回目のPMDA薬事戦略事前相談（長村登、長村文、東條）に行き、安全性試験、工程管理試験、特定項目等について示唆された部分に関して、持ち帰り検討することとした。

一方、臍帯血・臍帯バンキングにおける臍帯血の採取保管については、平成25年度に引き続いて平成26年4月および10月に厚労省（健康局疾病対策課移植医療対策推進室）と相談した（長村登、長村文、東條）。その結果、「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」および関連規制によって、同種非血縁臍帯血に関しては公的臍帯血バンクでの調製しか許可されていたことから、未だに臍帯血に関しては、検査用、研究用としか採取できない状況が続いている。

プロセスに関しては、Cellamigo®を導入した改良explant法では、従来法に比べて臍帯1gあたりから約4.4倍（ $2.9 \pm 1.4 \times 10^6$ 個）の細胞が回収できた（Tissue Engineering Part C Method, 2015）。さらに、臍帯ごと凍害保護液に凍結しても新鮮臍帯からの回収率と遜色ない細胞数（新鮮臍帯を1.0とした場合の回収率 1.5 ± 0.96 ）を回収できた（Cytotherapy in press）。特許に関しては、共同研究企業と検討しながら進めることとした。さらに、平成26年11月、関連企業参加のもと、第1回班会議を開催し、情報交換を行った。さらに平成27年2月に造血細胞移植医を含めてGVHDの臨床研究計画書策定の

ための会合を開き、現状の説明と今後の方向性について意見交換を行った。

3) 臍帯由来間葉系細胞製剤の特性解析項目の設定（梅澤）

平成26年度は、臍帯由来MSCを再生医療等製品として必要となる細胞特性解析項目を設定し、コスト面や本事業の対象となる疾患に対する治療法（免疫抑制作用）としての妥当性について検証を行った。

4) 臍帯血・臍帯由来MSC製剤の臨床試験に向けたシステム構築と規制対応（長村_文）

特に製剤化及び臨床試験実施に関する情報について、再生医療等の安全性確保等に関する法律を含めて提供した。また、業務主任者とともに、平成26年、2回に渡り厚労省と臍帯血の応用について相談し、臍帯の製品化に関しては、平成25年度に引き続き平成26年2月に3回目のPMDA薬事戦略事前相談に行った。その結果を踏まえて現在の作業工程の見直し点に関して、意見交換を行った。

5) 重症移植片対宿主病(GVHD)に対する臍帯由来MSCを用いた非臨床試験（東條）

異種GVHD発症マウスを用いて、臍帯由来MSCの有効性の検証を行い、GVHD発症早期に臍帯由来MSCを投与することとした。なお、in vitroリンパ球混合試験におけるT細胞増殖抑制試験では、どの臍帯血でも同様に増殖抑制効果を認めるが、PHA-L刺激においてT細胞から分泌されるIFN γ 量の分泌抑制効果で見るとロット格差があることがわかった。現在、業務主任者や他の研究分担者、移植医らとともに、臨床試験実施に向けプロトコル案作成を進めている。

6) 脳性麻痺に対する臍帯由来MSCを用いた非臨床試験（森田）

ラットの脳室周囲白質軟化症モデルに対して臍帯由来MSCを投与し、TNF- α , IL-1 β , MCP-1等炎症性サイトカインの発現低下傾向を認めた。現在、投与したMSCの脳内到達度を検討中である。

6) 低フォスファターゼ症を含む先天性骨代謝疾患に対する臍帯由来MSCの非臨床試験 (竹谷)

低アルカリフォスファターゼ症 (Hypophosphatasia, HPP) のヘテロ接合体モデルマウスを作成に成功した。HPPの原因遺伝子である組織非特異的ALP (Tissue-nonspecific ALP, TNSALP) 遺伝子のヘテロ接合体固体 (ホモは致死的) は、正常マウスに比べてALPの活性が低下していることが確認できた。

D. 考察

臍帯血および臍帯は同時に採取することが可能であり、臍帯の一部は改良 explant 法にてMSCsの培養を行い、残りの大半は組織ごと凍結可能となった。改良 explant 法においては、Cellamigo®を用いることによって、より多くの細胞が早く回収できることもバンキングにおいてはコスト的にも重要な要素となる。また協同研究企業から同機器が発売された。臍帯組織凍結に関しては、凍結の有無によって、改良エクスプラント法によっても回収率が変わらないこと、PMDAでの相談結果を踏まえて、プロセス原料を新鮮臍帯から凍結臍帯に統一することとした。また、臍帯由来MSCsの最終製品に影響を及ぼす特性解析項目、不純物の安全性評価等の

試験項目が確定した。

臍帯由来MSCsにおいて、最も有力で効果判定し易い治療対象は急性重症GVHDであると考えている。国内では既に骨髄由来MSCsによる治験が終了し、昨年秋に販売申請がなされている。しかし、海外からの輸入骨髄を原料とした細胞製剤であり、薬害エイズ問題等を経験した日本においては、国内ドナー、国産の細胞製剤が望まれる。臍帯由来MSCsの製剤化と国内外の急性GVHDへのMSCsの投与報告から、現時点では、まず薬剤抵抗性急性GVHD grade3-4を対症とした臨床試験を特定認定再生医療等委員会に提出するための準備を行うが、同時に共同研究企業を中心とした企業主導の治験に早期に移行できる体制を整えていく。

脳性麻痺や低フォスファターゼ血症を含めた骨形成不全症に対する臍帯由来MSCsのPOCを得るためには、それらのモデルを作成することが非常に重要である。

脳性麻痺モデルに関してはPVLモデルラットの作成に成功し、臍帯由来MSCsの投与によって、炎症性サイトカインの減少と脳室周囲白質量の改善傾向を認めた。但し、MSCs腹腔内投与であったことから、MSCsが実際に脳内に到達したか否かを今後検証する必要がある。なお、海外でも、臍帯由来MSCsが神経系疾患に投与され有効であったとの報告も出始めている (Dongmei et al, Cytotherapy, 2011)。MSCsの神経系への作用機序について、基礎的基盤を固めながら製剤の投与方法を検討していく。

低フォスファターゼ血症に対するMSCsの効果は、骨髄由来のものについては実証

されている。臍帯由来 MSCs では骨形成能は、骨髄由来 MSCs に比し低い、アルカリフォスファターゼ染色では陽性を示す細胞が得られている。ロット格差はあるものの、今後のマウスモデルでの結果が期待される。なお、投与する際に臍帯由来 MSCs 単独でも酵素活性が上昇するのか、造血幹細胞移植を加える必要があるのか？によっても前処置等が異なるため、一つづつ条件を検討する必要がある。

以上、概ね平成 26 年度の研究計画が実行されたと考えられる。現時点での臍帯血・臍帯由来 MSCs の製剤化と非臨床試験、品質評価体制を資料 1 に示す。

E. 結論

臍帯は、再生医療・免疫細胞療法のソースとして有用と考えられる。今後は、細胞製剤として製剤化するために医薬品医療機器総合機構(PMDA)と薬事戦略相談(事前相談)結果を踏まえて、品質検査、説く敵改正項目や規格等についてさらに検討していく。急性重症 GVHD は臨床試験への準備を整え、脳性麻痺および低フォスファターゼ症については、非臨床試験もモデル動物の効率的かつ慎重な解析が求められる。

F. 健康危険情報 なし。

G. 研究発表:

1. 論文発表:

1) Shimazu T, Mori Y, Takahashi A, Tsunoda H, Tojo A, Nagamura-Inoue T, Serum- and Xeno-free Cryopreservation of Human umbilical cord tissue as mesenchymal stromal cell source, *Cytherapy, in press*, 2015

- 2) Nagamura-Inoue T, and He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility, *World J Stem Cells* 6,195-202, 2014
- 3) Nakane T, Fukuda T, Kanda J, Taniguchi S, Eto T, Ohashi K, Nakamae H, Kurokawa M, Mori T, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Murata M., Age influences post-graft-versus-host disease non-relapse mortality in adults with acute graft-versus-host disease of varying severity following allogeneic hematopoietic cell transplant. *Leuk Lymphoma*. In press, 2015
- 4) Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kanamori H, Iwato K, Uchida N, Mori S, Nagamura-Inoue T, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T, Murata M. Impact of conditioning intensity and TBI on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2014 Dec 22. doi: 10.1038/bmt.2014.293. [Epub ahead of print]
- 5) Tanaka M, Miyamura K, Terakura S, Imai K, Uchida N, Ago H, Sakura T, Eto T, Ohashi K, Fukuda T, Taniguchi S, Mori S, Nagamura-Inoue T, Atsuta Y, Okamoto S. Comparison of Cord Blood Transplantation with Unrelated Bone Marrow Transplantation in Patients Older than Fifty Years. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Dec 8. pii: S1083-8791(14)01394-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.11.685. [Epub ahead of print]

- 6) Mori Y, Ohshimo J, Shimazu T, He H, Takahashi A, Yamamoto Y, Tsunoda H, Tojo A, Nagamura-Inoue T. Improved Explant Method To Isolate Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells And Their Immunosuppressive Properties. *Tissue Eng Part C Methods*.21,1-6, 2014
- 7) Konuma T, Ooi J, Uchida N, Ogawa H, Ohashi K, Kanamori H, Aotsuka N, Onishi Y, Yamaguchi H, Kozai Y, Nagamura-Inoue T, Kato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kato S, Asano S, Takahashi S. 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
- 8) Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Mori T, Kurokawa M, Taniguchi S, Ishikawa J, Morishima Y, Atsuta Y, Sakamaki H. Effect of graft sources on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome in adults with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis. *Int J Hematol*. 100, 296-306,2014
- 9) He H. Nagamura-Inoue T, Tsunoda H., Yuzawa M., Yamamoto Y., Yorozu P., Agata H., Tojo A. Stage-Specific Embryonic Antigen 4 in Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Engineering*, *Tissue Eng Part A*. 20,1314-24,2014
- 10) Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, Takahashi S, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation, Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol*. 25,435-41.,2014
- 11) Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Mori T, Kobayashi H, Nakaseko C, Yamagata N, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with BM, peripheral blood or umbilical cord blood: an analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplant*. 49, 355-60,2014
- 12) Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant*. 49,228-35,2014
- 13) 長村登紀子 公的臍帯血バンク, 臍帯血移植の基礎と臨床 医学書院 2014
- 14) Toyoda M, Umezawa A. Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ J*, 78(7):1582-1583, 2014.

- 15) 長村文孝 トランスレーショナルリサーチの重要性 病院 73:540-544, 2014
- 16) 長村文孝 米国 FDA における抗がん剤の審査 医薬品・医療機器 承認取得のためのデータ・情報の取得とまとめ方 技術情報協会 216-219, 2014
- 17) Konuma T, Kato S, Ishii H, Takeda R, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. HLA-DRB1 mismatch is associated with a decreased relapse in adult acute myeloid leukemia after single-unit myeloablative cord blood transplantation. *Ann Hematol.* 2015 Feb 25
- 18) Shimada N, Yuji K, Ohno N, Koibuchi T, Oyaizu N, Uchimaru K, Tojo A. Treatment of chronic lymphocytic leukemia with bendamustine in an HIV-infected patient on antiretroviral therapy: a case report and review of the literature. *Clin Case Rep.* 2015 Feb 20.
- 19) Kobayashi S, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Nakano K, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimaru K. Advanced HTLV-1 carriers and early-stage indolent ATLs are indistinguishable based on the CADM1 vs. CD7 plot in flow cytometry. *Cancer Sci.* 2015 Feb 20. doi: 10.1111/cas.12639. [Epub ahead of print]
- 20) Konuma T, Kato S, Ooi J, Ebihara Y, Mochizuki S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. 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]
- 21) Konuma T, Kato S, Yuji K, Ohno N, Uchimaru K, Takahashi S, Tojo A. Clearance of blasts from peripheral blood during induction chemotherapy using exponential decay model predicts complete remission and long-term survival in adult acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol.* 2014 Oct 12. doi: 10.1111/ijlh.12302. [Epub ahead of print]
- 22) Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation for acute lymphoblastic leukemia and lymphoma using an intensified conditioning regimen of total body irradiation, high-dose cytarabine, and cyclophosphamide. *Leuk Lymphoma.* 2014 Sep 8:1-3. [Epub ahead of print]
- 23) Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Myeloablative unrelated cord blood transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison with other graft sources from related and unrelated donors. *Ann Hematol.* 94(2):289-96, 2015
- 24) Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Shimazu H, Munakata S, Yagita H, Okumura K, Tsuda Y, Okada Y, Tojo A, Nakauchi H, Takahashi S, Heissig B, Hattori K. 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.* 29:145-56, 2015

- 25) Ishigaki T, Zaike Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchimaru K, Tojo A, Nakauchi H, Watanabe N. Quantification of adult T-cell leukemia/lymphoma cells using simple four-color flow cytometry. *Clin Chem Lab Med*. 2014 53(1):85-93, 2015
- 26) Kobayashi M, Tojo A. BRAF-V600E mutation in circulating cell-free DNA is a promising biomarker of high-risk adult Langerhans cell histiocytosis. *Blood*. 124(16):2610-1, 2014
- 27) Kawamata T, Ohno N, Sato K, Kobayashi M, Jo N, Yuji K, Tanosaki R, Yamano Y, Tojo A, Uchimaru K. A case of post-transplant adult T-cell leukemia/lymphoma presenting myelopathy similar to but distinct from human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy. *SpringerPlus*. 3:581, 2014
- 28) Kato S, Konuma T, Tojo A, Takahashi S. Hemorrhagic hepatic cyst after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 100(3):214-5, 2014
- 29) Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Kawamata T, Tojo A, Takahashi S. 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
- 30) Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimaru K. CADM1 expression and stepwise down-regulation of CD7 is closely associated with clonal selection of HTLV-1-infected T cells potentially evolving into adult T cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*. 20(11):2851-61, 2014
- 31) Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. 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
- 32) Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Pretransplant hyperferritinemia has no effect on the outcome of myeloablative cord blood transplantation for acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 93(6):1071-2, 2014
- 33) Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, Takahashi S. Effect of ABO blood group incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 20(4): 577-81, 2014
- 34) Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N,

- Kawamata T, Jo N, Uchimaru K, Asano S, Tojo A, Takahashi S. Single-unit cord blood transplantation after granulocyte colony-stimulating factor-combined myeloablative conditioning for myeloid malignancies not in remission. *Biol Blood Marrow Transplant*. 20(3):396-401, 2014
- 35) 長村文孝 FDAにおける抗がん剤の審査 医薬品/医療機器の承認申請書の上手な書き方・まとめ方 技術情報協会 216-219, 2014
- 36) 長村文孝 トランスレーショナルリサーチの重要性 病院 73:540-544, 2014
- 37)
2. 学会発表
(国内)
- 1) 島津貴久、森有加、高橋敦子、向井文雄、角田肇、東條有伸、長村登紀子，間葉系細胞のソースとなる臍帯の凍結方法の開発，第14回日本再生医療学会総会（横浜）2015/3/21
- 2) 長村（井上）登紀子，何海萍，森有加，高橋敦子，山本由紀，島津貴久，中井未来，東條有伸，臍帯血・臍帯由来間葉系幹細胞のセミパブリックバンク樹立について，第62回日本輸血・細胞治療学会(奈良)2014/5/16
- 3) He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Takahashi A, Yamamoto Y, Mori Y, and Tojo A. The Immunosuppressive Effect of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for the treatment of GVHD, 第76日本血液学会学術集会総会（大阪）2014/11/1
- 4) 東條有伸、許 泰一、山本一仁、高橋直人、中前博久、小林幸夫、田内哲三、岡本真一郎、宮村耕一、岩崎浩己、松村 到、薄井紀子、Yanase K、Hu S、Turner S、直江知樹. Update of a phase 1/2 study of ponatinib in Japanese patients with Philadelphia positive leukemia. 第76回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 5) 加藤せい子、小沼貴晶、川俣豊隆、城 憲秀、海老原康博、望月慎史、東條有伸、高橋 聡. Post-transplant lymphoproliferative disorders after cord blood transplantation. 第76回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 6) 二見宗孔、佐藤広太、中村貴史、東條有伸. Oncolytic virotherapy against multiple myeloma using a multi-regulated vaccinia virus. 第76回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 7) 石垣知寛、内丸薫、小林誠一郎、大野伸広、東條有伸. Establishment of a stroma-dependent ATL cell-line and analysis of its proliferation in vivo. 第76回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 8) 小沼貴晶、加藤せい子、湯地晃一郎、大野伸広、川俣豊隆、横山和明、城 憲秀、内丸 薫、高橋 聡、東條有伸. Impact of clearance of blasts from peripheral blood during induction chemotherapy in AML. 第76回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 9) 大島康雄、谷本哲也、湯地晃一郎、内丸薫、高橋 聡、東條有伸. Scouting risk factors for CMV reactivation in 4,361 non-transplant malignant lymphoma case. 第76回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪

- 10)川俣豊隆、内丸 薫、東條有伸. Differential diagnosis by flowcytometric analysis of post allo-SCT myelopathy; a case of ATL. 第76回日本血液学会学術集会、2014.10.31-11.2、大阪
- 11)石垣知寛、小林誠一郎、東條有伸. 急性型 ATL における細胞表面抗原の網羅的クラスタリング解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 第73回日本癌学会学術総会、2014.9.25-27、横浜
- 12)二見宗孔、中村貴史、東條有伸. Oncolytic virotherapy against multiple myeloma using a multi-regulated vaccinia virus. 第73回日本癌学会学術総会、2014.9.25-27、横浜
- 13)平野光人、大野伸広、小林誠一郎、石垣知寛、田野崎隆二、鴨居功樹、望月 學、内丸 薫、東條有伸. Simultaneous development of acute type ATL and HTLV-1 uveitis. 第1回日本 HTLV-1 学会学術集会 2014.8.23、東京
- 14)石垣知寛、内丸薫、小林誠一郎、大野伸広、東條有伸. 急性型 ATL における細胞表面抗原のクラスタリング解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 第1回日本 HTLV-1 学会学術集会 2014.8.23、東京
- 15)石垣知寛、内丸薫、小林誠一郎、大野伸広、東條有伸. 成人 T 細胞白血病(ATL)における細胞表面抗原の網羅的解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 成人 T 細胞白血病(ATL)における細胞表面抗原の網羅的解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 第24回日本サイトメトリ学会学術集会. 2014.6.28、大阪
- 16)竹田玲奈、平野光人、福山朋房、大野伸広、横山和明、中村聡介、川俣豊隆、大田泰徳、内丸 薫、東條有伸. MDS の治療中に合併した骨髄浸潤を伴う DLBCL の1例. 第54回日本リンパ網内系学会、山形
- 17)本多泉、須藤乃里子、久保田俊郎、森田育男. 脳質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、ポスター、第66回日本産科婦人科学会学術講演会、平成26年4月
- 18)森丘千夏子、本多 泉、滝 敦子、森尾 友宏、水谷修紀、森田 育男. 臍帯由来間葉系幹細胞を用いた脳室周囲白質軟化症の治療法の開発、口頭、第50回周産期新生児学会、平成26年7月
- 19)滝敦子、森丘千夏子、伊藤一之、杉江学¹、森尾友宏、森田育男、実験的子宮内感染症が臍帯由来間葉系幹細胞に及ぼす影響の検討、口頭、第59回未熟児新生児学会、平成26年11月
- 20)本多泉、滝敦子、森丘千夏子、大島乃里子、鳥羽三佳代、小牧基浩、森尾友宏、宮坂 尚幸、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仔の解析、ポスター、第22回日本胎盤学会、平成26年10月
- 21)竹谷健. 重症低フォスファターゼ症に対する骨髄移植併用同種間葉系幹細胞移植(口頭). 第50回日本周産期新生児医学会. 千葉. 2014年7月13-15日

(海外)

- 1) Mori Y, Nagamura-Inoue T, Ohshimo J, Shimazu T, He H, Takahashi A, Tsunoda H, and Tojo A., Improved explant method to isolate umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their immunosuppressive properties, ISCT, Paris, 2014/4/23-27
- 2) Ishigaki T, Uchimaru K, Kobayashi S, Ohno N, Tojo A. Comprehensive Analysis of Surface Antigens on Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL) Cells and Search for ATL-Initiating Cell Markers. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA
- 3) Kobayashi M, Tojo A. BRAF-V600E mutation on circulating cell-free DNA is a promising biomarker of high-risk adult Langerhans cell histiocytosis. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA
- 4) Tsuda M, Nishiwaki K, Sugimoto K-J, Yokoyama H, Igarashi T, Shimizu S, Yujiri T, Wakita H, Tojo A. Impact of Ph⁺ stem cell burden on clinical findings and molecular responses to first-line nilotinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: the results from the interim analysis of N-road, a multi-center phase II study. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA
- 5) Izawa K, Yamamoto M, Tojo A. Enforced HoxB4 sustains CD45-c-kit⁺ pre-hematopoietic stem cells (HSCs) derived from murine induced-pluripotent stem cells, which develop long-term and short-term repopulating HSCs according to GATA2 expression level. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA
- 6) Futami M, Sato K, Nakamura T, Tojo A. Thymidine kinase-deleted, let7a-regulated vaccinia virus specifically infects and lyses myeloma cells in a mouse myeloma model. 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014.12.6-9, San Francisco CA, USA
- 7) Noriko Fujiwara, Fumitaka Nagamura, Kazufumi Matsumoto, Naohide Yamashita, Yukie Takemura, Kiyoko Kamibeppu. Nursing Education Program on Translational Research as a Master's Course. International Association of Clinical Research Nurses. 2014
- 8) Taketani T. Mihara A, Oyama C, Tanabe Y, Yamamoto K, Kobayashi K, Kanai R, Onigata K, Fukuda S, Yamaguchi S, Katsube Y, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Yuba S, Ohgushi H. Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells with bone marrow transplantation Improved Osteogenesis in Patients with severe Hypophosphatasia. (Poster). 12th annual meeting of International Society for Stem Cell Research, June 18-21, 2014
- 9) Taketani T. Regenerative medicine for pediatric disorders using somatic stem cells (Oral). Japan-Tai Academic Corporation Seminar 2014 in Khon Kaen University, December 10-13, 2014

H. 知的財産の出願・登録状況(予定を含む)

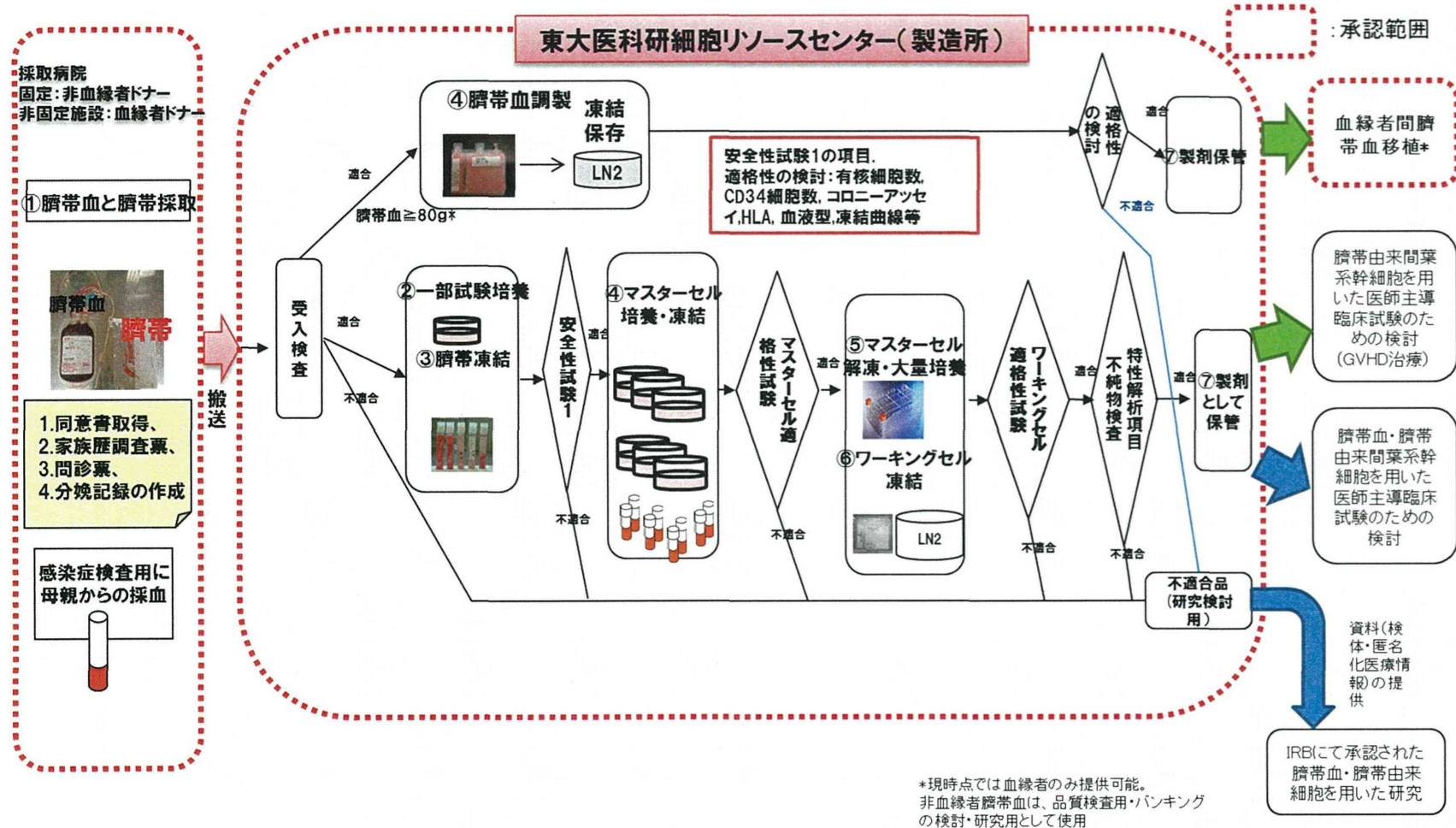
1.特許取得

1) 発明の名称：メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ-2 阻害薬に対する反応性を予測する方法、東京大学知財部管理番号：25B148002-1、発明者：東條有伸、後藤典子、出願人：国立大学法人東京大学
出願日：2014/12/3、出願番号：特願2014-244956、出願国：日本

2) 発明の名称：制御性 T 細胞製造方法及び制御性 T 細胞増幅装置、特許権者：国立大学法人東京大学、ニプロ株式会社、特許第 5464641 号、平成 26 年 1 月 31 日

3.その他、
特記なし。

資料1. 臍帯血・臍帯由来間葉系細胞の製剤化と非臨床試験、品質評価体制



Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

業務項目：臍帯血・臍帯由来間葉系細胞の製剤化

担当責任者：長村登紀子 東京大学医科学研究所附属病院

セルプロセッシング・輸血部 准教授

研究要旨：本研究は、臍帯血及び臍帯由来 MSC を骨髄に替わる再生、抗炎症（免疫抑制）療法のための新規再生医療等製品として難治性疾患等に臨床応用するための製剤化に向けた Proof of Concept (POC)の取得と非臨床試験実施を目的とし、臨床試験実施に向けた基盤形成と産業化を目指す。H26年度は、臨床用臍帯血・臍帯の採取調製について、院内治験審査委員会およびヒトゲノム倫理委員会の承認を得て採取を開始した。2施設で採取し、22例より採取し、受入検査にて適合した14例（＝ロット）を臨床用として保存し、さらに11ロットが感染症検査、染色体検査等での適合を確認している。現在、6ヶ月経過した5例に対して、児の健康の確認中である。なお、臍帯の調製方法に関して、改良エクスプラント法により臍帯からの細胞の回収率(P1)が向上し、臍帯凍結の導入により、初期コストの削減と効率的バンキングが可能となった。またPMDAの薬事戦略相談（事前面談 2回）や厚労省関連部署との相談を経て、原材料を凍結解凍した臍帯を基本として分離を実施することとした。今後、企業治験への移行も考慮しつつ、臍帯由来 MSC による急性重症 GVHD 治療に対する特定解析項目、再生医療等安全性確保法等に基づく、臨床試験計画書の作成に重点的に取り組み、特定認定再生医療等委員会へ提出する。

A. 研究目的

本研究は、臍帯血及び臍帯由来間葉系(幹)細胞(Mesenchymal Stem/Stromal Cells;MSC)を再生医療等製品として臨床応用するための製剤化に向けた POC の取得と非臨床試験実施を目的とする。担当責任者 長村らは、臍帯由来 MSC を用いた治療の可能性を国内で初めて報告し (IJH,2009, 90:261)、2012年度より希少難治性疾患を対象とした臍帯由来 MSC 投与の基礎的検討と製剤化について、PMDA の薬事戦略相談（事前面談）や厚労省関連部署との相談を経ながら準備を進めてきた(厚労科研 H24 - 難治等(難) - 一般 - 016)（主任研究者：長村^登）。

臍帯由来 MSCs 分離調製工程においては、

共同研究企業（椿本チェーン）とともにステンレス製のメッシュ(Cellamigo®)をエクスプラント法に導入することによって、従来法に比べて処理時間の短縮と初期培養における細胞の回収率の向上が得られた（改良エクスプラント法）。

一方、臍帯を全て受入れ時にエクスプラント法で分離処理すると、時間とコストがかかること、せっかく培養しても異常が見つかり、培養や培養液等が無駄になる可能性があった。これを克服するために、臍帯を組織ごと凍結する方法について検討した。

このような分離培養・凍結方法の検討とともに臍帯由来 MSCs を再生医療等製品として確立するため、安全性試験、工程管理