

項目の設定、特定解析項目の設定、不純物の安全性評価の他、培地充填試験、腫瘍形成試験、足場形成試験について検討した。

なお、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用採取調製が公的臍帯血バンクに限定されており、厚生労働省とも相談の上、検査および研究用として採取・保存・使用することとした。

B. 研究方法

1. 臍帯の処理方法の検討

臍帯受取後：臍帯を受取後、重さ、長さを測定後、50ml チューブに入れる。臍帯を入れたチューブに抗生剤入りPBS（抗真菌剤、抗生剤を加えて浸し、冷蔵庫で数時間置く。一部は、乾熱滅菌した鉤つき鑷子とメスでみじん切り（約1-2mm程度）にして、改良エクスプラント法に供する。

改良エクスプラント法：細かい間隔で細切した臍帯組織を組織培養用ディッシュ（Primaria, BD, CA）に貼り付け、ステンレス製のメッシュ（cellamigo®）を組織片の上からかぶせて、すぐに培養液を注いで培養を開始した（図1）。遊出してきた細胞でディッシュが semiconfluent になった時点でトリプシン処理して細胞を回収した。

臍帯組織の凍結：臍帯の一部を組織ごとの種々の凍害保護液に浸した後に凍結した。2週間以上気相式窒素タンクで凍結保管した後、解凍し、細切した後に上記 cellamigo を用いた改良 explant 法にて分離培養した。臍帯凍結の有無による細胞の回収率、表面マーカー、分化能、免疫抑制能について比

較検討した。

2. 臍帯組織の凍結

臍帯はPBSで抗菌処理後に15cm径培養ディッシュに取り出し、デイスポーズブルメス（メス）と鉤付き鑷子を用いて5cm分を初期培養用に取り分け、残りは血管に沿って臍帯を開き約2g(2cm)ごとに切り、凍害保護液（ステムセルバンカー®、日本全薬工業；セルバンカー1+、Dextran 40/DMSO/Plasma、90% FBS+10%DMSO）に所定の時間浸した後に、緩徐に凍結した。凍結後は、気相式窒素タンクに移動して管理し、2週間以上開けて改良 explant 法にて組織を播種した。

3. フローサイトメトリー

BD MSC 用抗体キットまたは必要に応じて市販の蛍光色素抗体を用いて、CANTO IIにて測定し、Flow-Joにて解析した。

4. 混合リンパ球反応（MLR）

MLRは、ResponderとしてCFSEにて染色した末梢血単核球または臍帯血単核球（一部凍結単核球）、Stimulatorとして臍帯血単核細胞または末梢血単核球由来成熟樹状細胞を用いて行った。MLR中のT細胞が増殖した場合には、Responder細胞のCFSEのピークの左方シフトすることを利用し、臍帯由来MSCs存在の有無によるCFSEの変化を解析した。

5. 染色体検査

UC-MSCsの安全性試験の一つとしてworking cells レベル(P3)の培養細胞の染色

体検査（外注）を実施した。

6. 臍帯血と臍帯由来 MSC の品質および安全性試験

PMDA 薬事戦略事前相談等にて臍帯血・臍帯由来 MSC の品質および安全性を確保する検査項目を設定し、既存の手順に準じて検討した。

（倫理面への配慮）

臍帯血・UC-MSCs の製剤化・バンキングおよび非臨床研究を含んだ基礎的検討を行うに当たっては、既に東大医科研および採取施設の倫理審査委員会の承認を得て実施している（「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」ヒトゲノム倫理委員会承認 No. 24-53）。臨床用の細胞採取調製保存に関しては、平成 26 年 4 月血縁者臍帯血の調製および免疫療法としての臍帯由来間葉系細胞調製を目的として「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)」として院内治験審査委員会にて承認された。さらに、臍帯由来 MSCs の製造に当たっては、MSCs の安全性と品質検証のために、家族歴、問診票、感染症、HLA 検査、染色体検査、その他必要に応じてゲノム解析等、個人の病態に関する検査・検討を含むため、同意書のヒトゲノム解析や遺伝子解析に関して「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に従い、ヒトゲノム倫理審査委員会に申請し、7 月に承認（26-24）を得た。採取施設に関しても倫理審査委員会の承認を得て開始した。

今回の承認範囲は臨床用細胞採取調製

保存であり、臨床試験は含まれていない。本研究においては、可能な限り臨床用に製造した本製剤を用いて、非臨床試験を実施する。

個人情報に関しては、臍帯血・臍帯に付随する個人情報に対して採取施設で ID(1st ID)を付与し、東京大学医科学研究所（東大医科研）搬送された後、さらに 2nd ID が付与して連結可能匿名化を行った。さらに研究使用する場合には 3rd ID を付与して個人情報の流出を防ぐ体制を整えた。その他、「個人情報保護法」および「臨床研究に関する倫理指針」に関する事項はこれを遵守して実施した。

C. 研究結果および D. 考察

1. 改良 Explant 法の検討

Cellamigono の有無にて臍帯の初期培養を行い、cellamigo 有の群で $2.9 \pm 1.4 \times 10^6/g$ 、無しの群で $0.66 \pm 0.53 \times 10^6/g$ (n = 6)が得られた(図 1A)。得られた細胞は、第 3 者ドナー由来臍帯由来 MSCs でも MLR 抑制効果を示した (図 1B)。表面マーカーも Cellamigo の有無で特に差はなかく、 $CD105^+CD73^+CD90^+HLA\ class\ I^+$
 $CD45^+HLA-DR^+$ を呈した。(Mori et al, *Tissue Eng Part C Methods*.21,1-6, 2014)

図 1. Explants 法における Cellamigo® の効果

図 1A. 回収した細胞数/g

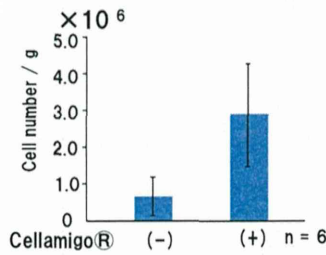
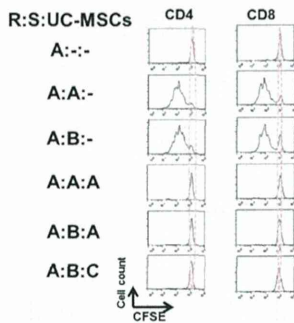


図 1B. 改良エクスプラント法によって得られた臍帯由来 MSCs を用いた MLR 抑制試験



R:Responder, S:Stimulator (樹状細胞)、UC-MSCs:臍帯由来 MSCs

2. 臍帯組織の凍結

凍害保護液に浸漬後に凍結し、2 週間以上凍結保管した後に解凍した臍帯組織から、新鮮臍帯に比較し同等またはそれ以上の生細胞数が得られた (表 1)。なお、凍害保護液なしでは全く生細胞は得られなかった。

表 1. 臍帯組織の凍結・解凍後に改良 explant 法を実施した際の回収細胞数比

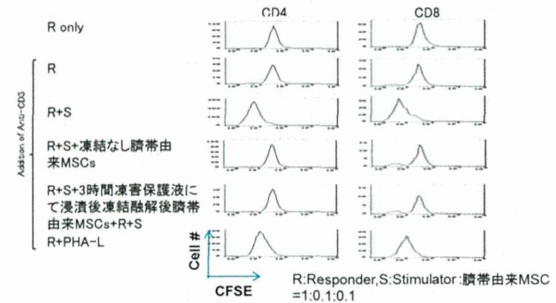
Cryoprotectants	Isolated Cell number ratio (Mean ± SD)	Absolute number ×10 ⁴ /g (Mean ± SD)
Fresh	1	1.0 ± 0.95
<i>Freezing methods</i>		
No cryoprotectant	0 ± 0	0 ± 0
CELLBANKER 1 plus	0.75 ± 0.80	1.38 ± 0.67
STEM-CELLBANKER®	1.5 ± 0.96	1.47 ± 0.31
DMSO/DEX.+ plasma	0.36 ± 0.55	0.59 ± 0.23
90% FBS + 10% DMSO	0.48 ± 0.76	0.86 ± 0.13

DEX.; dextran 40 solution, FBS; fetal bovine serum, DMSO; dimethyl sulfoxide. (n = 4), *P<0.05

得られた細胞は、CD105⁺CD73⁺CD90⁺

HLA class I⁺CD45⁺HLA-DR⁺を呈し、同種 MLR 抑制能および分化能についても新鮮臍帯由来 MSC との差は認めなかった。また *in vitro* 同種リンパ球混合反応において、3rd party (ドナー) 臍帯由来 MSCs は、臍帯組織凍結の有無に関わらず、リンパ球 (CD4 および CD8 T 細胞) の増殖抑制効果を示した (図 2A)。

図 2A. 凍結解凍臍帯由来 MSCs によるリンパ球混合試験における T 細胞抑制効果



さらに凍結解凍臍帯由来 MSCs は、新鮮臍帯と同様の分化能を呈した (図 2B)。

図 2B. 凍結解凍臍帯由来 MSCs の分化能

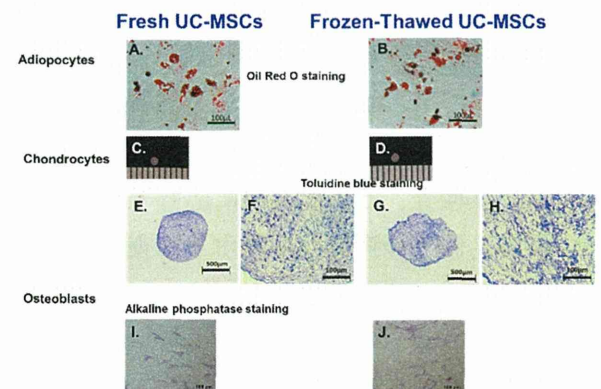


図 2B において、左列が新鮮臍帯由来 MSCs、右が凍結解凍臍帯由来 MSCs であり、上段; 脂肪細胞染色 (Oil red O 染色)、中段; 軟骨ペレット法での誘導 (Toluidine blue 染色)、下段; 骨芽細胞への分化 (Alkaline phosphatase 染色) を示す。

臍帯の凍結保管によって、①培養・分離

コストの削減、②MSC 原材料の保存、③現在分離抽出できない幹細胞が将来分離できる可能性、④すぐに対応できない難治性疾患患者の臍帯保存の可能性（遺伝子治療、iPS 細胞化等）等のメリットが考えられ、今後の MSC ソースとして有用であると考えられた。

3. 臍帯血と臍帯由来 MSC の品質および安全性試験

培地に関して、これまでオーストラリア産の FBS を使用していたが、異種血清が少ないまたは無血清の方が、ヒトへの投与を考えた場合に安全と考え、無血清培地の検討を行った。現在、数社から無血清培地が試供または市販されており、4 種類（A 社、B 社、C 社、D 社）の無血清培地を別々に従来法（10%FBS+ α MEM）と比較検討した。その結果、A および B 社の無血清培地では、ディッシュへの付着性が悪いものの、FBS を 1% 添加することによって、10% FBS+ α MEM よりも優れた増殖曲線が得られた。C 社製は増殖が悪く、D 社製は血清添加なしで高い増殖が得られた。しかしながら、いずれも PMDA での対応は現時点では困難とのことであり、無血清培地の導入は難しい状況であった。こうした培養液に関して、規制対応がどれだけ製造元で可能か、また組成（の一部）を開示できるかが今後の課題である。たとえマスターファイル化されても安全性は異なるものであり、製造企業との連携が必要となる。こうした背景から、平成 26 年度は、培養液を一時無血清培地に変更したものの、最終的には FBS 入りの従来培地に戻すこととなり、種々の検査の再試験を実施することとなっ

た。これまで、安全性試験、工程管理項目の設定、特定解析項目の設定を行い、培地充填試験は終了した。今後、試薬の変更に伴い、不純物（残留 BSA）の安全性の評価、腫瘍形成試験、足場形成試験について再評価を行う予定である。

4. 規制対応

薬事戦略相談（事前面談）（通算 3 回目）を受け、プロセス方法および使用する試薬類について概ね確定した。今後、重症急性 GVHD への治療目的のための特性解析項目と投与までの手順を含めた製品標準書を完成させる予定である。

E. 結論

臍帯血と臍帯、特に臍帯は組織ごとバンキングが可能であり、幅広い利用が期待されるソースである。

F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、臍帯血・臍帯に伴うドナーへの健康上の問題は生じていない。

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

2. 学会発表

(国内)

2. 学会発表

(国内)

- 1) 島津貴久、森有加、高橋敦子、向井丈雄、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**
(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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 長村 登紀子、森 有加、長村 登紀子、森 有加、大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎 発明の名称：生体組織切断用抑え具、出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願、出願日:2013/10/02 特許 2013-006923
- 2) 長村 登紀子、森 有加、長村 登紀子、森 有加、大志茂 純、中川栄一、村田 究、小山真太郎、出願人：国立大学法人東京大学 椿本チェーンとの共同出願、発明の名称：培養組織剥離防止プレート 出願日:2013/10/04 特

許 2013-209095 および登録商
標;cellamigo®,セルアミオーゴ®

- 3) 長村 登紀子、森 有加、島津 貴久、
佐瀬 孝一 出願人：国立大学法人東京
大学 日本全薬工業との共同出願、
発明の名称：臍帯組織の凍結保存方法、
特許出願日：2013/12/27, 特願
2013-273536

- 4) 長村登紀子、東條有伸、白数昭雄、芳
川義洋、中谷奈穂美、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
2. 実用新案登録
なし

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：臍帯血と臍帯の安全な採取システムの確立

担当責任者：角田 肇 NTT 東日本関東病院分娩部 部長

協力者：山口 暁 医療法人成和会山口病院 院長

研究要旨：臍帯は、臍帯由来MSC製剤の原材料であり、原材料の無菌性の維持と品質管理は重要である。臍帯血・臍帯由来間葉系細胞(MSC)の臨床試験用製剤化に向けて、倫理委員会の承認を得て臍帯血及び臍帯の採取および母親からの問診、家族歴、および分娩記録を聴取を開始した。予定帝王切開時に、臍帯及び臍帯血採取専任の人員を配置し、胎盤娩出後に臍帯血採血と臍帯採取を行った。問診票、家族歴について聴取し、臍帯と同時に胎盤娩出後に平均100ccの臍帯血を無菌的に採取できる技術を確立した。

A. 研究目的

臍帯血・臍帯採取は、母児の安全性と倫理性の上に成り立っている。臍帯は、臍帯由来 MSC 製剤の原材料であり、原材料の無菌性の維持と品質管理は重要である。また、原材料の品質の判断材料となる問診票、家族歴および分娩記録等の付随書類の取得には、時間と労力を要す。本研究では、臍帯血・臍帯の安全かつ効率的採取と付随書類の正確かつ効率的な取得システムの確立を目指すことを目的として、採取方法の検討を行った。

B. 研究方法

帝王切開を予定している母親から同意書、家族歴調査票、問診票を得た。帝王切開時に採取した胎盤、臍帯から臍帯血及び臍帯を採取した。臍帯血は採血バッグに採取してチューブシーラーにてシールし、臍帯は専用のプラスチックボトルに入れ、搬送まで4℃保存した。分娩記録にも、必要事項を記載し、書類をまとめて所定の場所に保管した。さらに、東大医科研臍帯血・臍帯

バンクでの受け入れ検査で、「適合」と判定されて、分離を開始した旨の連絡があった場合には、翌日母親からの採血を行った。受入れ検査項目としては、同意書、問診票、家族歴、分娩記録に問題がないこと、臍帯重量>20cmかつ臍帯血重量>40gの場合に適合として、分離調製の効率化を図った。

万一、検査結果で、母体に健康上何らかの問題がみられる、もしくはその可能性がある場合には、バンクから採取施設である産婦人科へ連絡される体制とした。

C. 研究結果

平成26年度は倫理審査委員会の承認を得て、2施設（NTT東日本関東病院および山口病院）にて臨床用同意書の取得、胎盤娩出後の臍帯血・臍帯採取を開始した。平成27年3月末まで、臨床用臍帯血・臍帯を22例より採取し、受入検査にて適合した15例（＝ロット）の臍帯が保存され、母体血の採取を行った。臍帯血、臍帯および付随書類には、母親氏名を入力すると自動で発行される2次元コードIDラベルを添付し、取り違い防止に努

めた(図1)。なお、東大医科研にて受入れ時のデータ(2013年10月~2014年10月2施設)より、臍帯1cmは約1g(1.0±0.2g/cm, n=37)であった(表1)。臍帯の重さと長さは当然ながら有意に相関(図2A)が認められたが、臍帯の太さ(g/cmで換算)と臍帯血量(図2B)は相関しなかった。なお、臍帯の播種培養は重量換算で細胞の回収率を算出しているため、今後は長さよりも重量を重視する方向で調整する予定である。経験的には肉眼的にさまざまな太さの臍帯があるものの、現場における臍帯採取量の指標となる。

D. 考察

臨床用臍帯由来MSCs製剤に向けて、安定的な臍帯血及び臍帯の採取が極めて重要である。採取者を待機させることにより、予定帝王切開分娩において、バンキングおよび基礎研究に必要な臍帯血および臍帯を安定的に供給できることが明らかとなった。

E. 結論

臍帯及び臍帯血採取専任の人員を配置することにより、安全かつ無菌的に臍帯を採取できる手順を確立した。

F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、特に問題となることはなかった。

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, *in press*, 2015

- 2) 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
2. 学会発表
 - 1) 島津貴久、森有加、高橋敦子、向井丈雄、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) 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(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

表1.臍帯・臍帯血採取実績 2013年10月～2014年10月

臍帯 n=37	
	Mean ± SD
重量 [g]	25.5 ± 7.8
長さ [cm]	25.7 ± 6.7
1cmあたりの重量 [g/cm]	1.0 ± 0.2
→1cmあたり約1g	
臍帯血	
重量 [g]	81.6 ± 24.7

図1. 2次元コードIDの導入と臍帯血・臍帯付随資料へのラベル添付

東大産科研 同意書
管理コード: A000011000-006
採取施設: NTT 東日本産科病院
母親氏名: トリキウハナコ様

110031402000000A
同意書

同意書
問診票
家族歴
分娩記録
などの書類は
細胞採取保存施設のみ
1st IDと2nd IDの両方を
貼付し管理。

細胞処理・保存工程、
外注検査等は
2nd IDを使用

図2A. 臍帯の重量と長さ

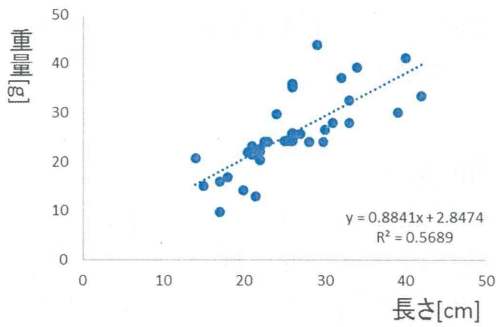
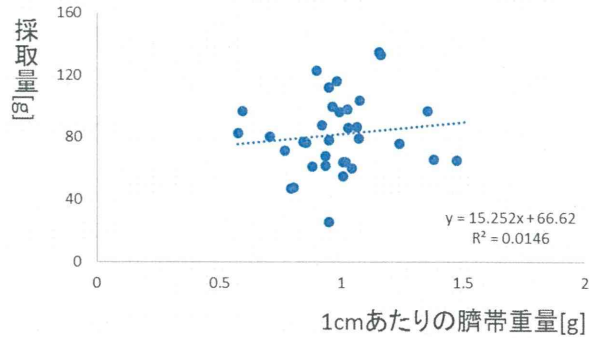


図2B. 臍帯と臍帯血採取量



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：臍帯由来間葉系細胞製剤の特性解析項目の設定

担当責任者：梅澤 明弘、国立成育医療研究センター研究所 センター長

研究要旨：間葉系幹細胞(MSC)は分化再生能に加え、炎症部位・組織障害部位に集積して抗炎症・免疫抑制能と組織修復能を有する。本研究課題では臍帯由来MSCを再生医療等製品として難治性疾患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ている。その際には臨床応用を念頭とした細胞製剤化工程での細胞の特性解析を行うことが求められる。当分担課題においては、安全性を担保しかつ有効性を見出すための細胞特性項目を設定し検証していく。本年度は製剤化の一般的な製造工程に関わる特性項目を選定した上で、本課題が対象とする疾患治療にむけた製造・臨床プロトコール作成において実施可能性についての検証を進めた。

A. 研究目的

本研究課題では臍帯由来間葉系細胞を再生医療製品として製剤化して難治性疾患に対する臨床研究を行うためのPOCの取得と非臨床試験を実施していくことを目的としている。そこでは、用いる細胞の安全性を担保するとともに、治療の有効性を示していくことが求められ、そのための細胞製剤の製造工程・臨床プロトコールが必要となる。また、細胞の採取から移植までの間の細胞の特性を評価・判定する必要がある。本研究分担課題では、そうした細胞の特性を評価・判定するための項目を選定し、臨床研究に適したものであるとして設定していくための検討を進めていく。

B. 研究方法

間葉系細胞を用いた臨床研究は国内外で実施されている。一方で今後は再生医療新法の制定に伴う新たな枠組みで行われる必要

がある。そこで、臨床研究を安全かつ有効に実施するために、必要となる細胞の特性解析項目を上げる。その上で本課題が対象とする治療に適した細胞製剤を作るための特性項目を選定していく。その中では将来の臨床研究を念頭に簡便性やコスト面についても勘案していく。

C. 研究結果

間葉系幹細胞の製剤化においては、細胞の採取から移植までの一連の工程の中で目的とする治療に適したものであるかを評価・判定する必要がある。その前提として安全性を担保することが第一となる。これにはゲノムの変異などを感度よく検出する項目、造腫瘍性の検証が必須となる。いずれにおいても目的とする細胞製剤製造工程を精査し、その過程で必要と考えられる特性項目を選定した。さらに臍帯由来MSCがもつ特性として国内外で実施されている骨髄由来

MSCと違いを示すための特性項目、また同種移植となるために必要とされる項目などを合わせて選定した。

D. 考察

本研究課題では、臍帯由来間葉系細胞製剤を、複数の難治性疾患への治療として用いることを計画している。細胞製剤化に伴う間葉系細胞の特性項目には、製造工程での共通項目、例えば安全性確保のためのゲノム変異検出のための解析などは、現在の技術で可能な最もよいとされる方法で設定した。今後、POC取得や非臨床試験を実施していく中で、製造工程・臨床プロトコルが対象疾患に応じて決まってくる。こうした過程で、今回選定した特性項目が治療目的に応じた安全性を担保できるかを検証し、かつ臨床研究の場でできるだけ簡便に低コストで実施できるかを検討していく必要がある。

E. 結論

間葉系細胞の再生医療製品としての製剤化において必要となる細胞特性項目の選定はめどがついた。今後臨床研究を前提として、対象疾患ごとの製造工程を確認した上で、目的に適した特性項目を選定し、実施する時期・回数やそれにかかるコスト、手間などを考慮して、特性項目の絞り込みを行っていくことが求められる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toyoda M, Umezawa A. Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ J*, 78(7):1582-1583, 2014.

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

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 MSC 製剤の臨床試験に向けたシステム構築と規制対応

担当責任者：長村 文孝 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨：本事業は臍帯・臍帯血由来間葉系幹細胞を再生医療等製品としてバンキング化し、医師主導治験を含めた臨床試験で実施することを目指している。設立のためには、臨床試験実施、特に医師主導治験の実施を前提とした非臨床試験の規制対応が必要となる。今年度は、再生医療等の安全性の確保等に関する法律が 11 月に施行され、再生医療等製品は、同法律および省令等の関連法規で実施されることとなった。また、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（薬機法）が制定され、再生医療等製品が独立したカテゴリーとなった。このような大きな変革期にあたり、事業を円滑かつ適切に進めるために規制情報を収集・検討すると共に、医薬品医療機器総合機構(PMDA)薬事戦略相談事前面談を行い、非臨床試験および品質について検討を行った。

A. 研究目的

臍帯・臍帯血由来間葉系幹細胞を用いる再生医療あるいは免疫抑制細胞療法を目指したバンキング体制の構築と臨床試験実施のためには、薬機法と再生医療の安全性の確保等に関する法律への対応が必要である。本研究では国内外の規制情報の収集と分析を行い、両法下での実施に必要な非臨床試験、品質に関する対応を検討し、本事業での医師主導治験を含めた臨床試験の実施を支援し、臨床に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

再生医療等の安全性の確保等に関する法

律およびその関連法規、薬機法およびその関連法規を収集し、実際の対応の検討を行う。また、厚生労働省と医薬品医療機器総合機構より発出されているガイドライン、情報等を収集し、上記法規と合わせて内容を検討する。医薬品医療機器総合機構(PMDA)、米国FDA (Food and Drug Administration)及びEMA (European Medicinal Agency)等の規制当局が発出している法規・ガイドライン、審査報告書等の資料あるいは学会等での資料の収集と解析を行う。

また、PMDAとの薬事戦略相談事前面談を実施し、バンキングの品質および非臨床試験について相談を行った。

(倫理面への配慮)

公表された法規、ガイドライン、文献を基に行うため特に倫理的配慮を必要としない。

C. 研究結果

本研究事業は、臍帯及び臍帯血のバンキングを行い、そこで調製された細胞を、再生医療等の医師主導治験を含む臨床試験を実施することを目指す。そのためには、非臨床試験の種類とデザインが問題となる。そのため、国内外の実施状況や規制状況を収集し、本研究に必要な情報を収集した。

本研究事業では臍帯および臍帯血由来間葉系幹細胞(MSC)を使用するが、世界的には大手製薬企業が各種組織由来MSCを用いた臨床開発を積極的に進めており、一部はカナダ等で承認を取得し、日米で承認審査を受けている製品も存在する。このような開発の情報は、我々が開発する際にも参考となる情報であり、国内開発でのガイドラインが乏しいなかで貴重な情報である。これらを論文あるいは学会会議を通じて収集し、本研究事業での参考となるものを研究代表者に提供した。

細胞調製施設は、再生医療等の完全性の確保等に関する法律では、主に「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則(厚生労働省令第110号)」にて規定され、薬機法では「再生医療等製品の製造管理及

び品質管理の基準に関する省令(GCTP省令)」にて規定されており、その両者への対応が必要となる。GCTP省令は承認細胞等製品の製造に係わるものであり、治験段階の製造施設を規定するものではないものの、医薬品におけるGMPと治験薬GMPの関係のように、治験段階ではGCTP省令の設備および構造に関する規定は今後「治験再生医療等製品GCTP」が発出されたとしてもほぼ同様であると考え、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」とGCTP省令の対照表およびチェックリストを作成して本研究での細胞調整施設の適合について研究代表者と共に検討を行った。また、GCTP省令はリスクベースとアプローチの概念を積極的に導入使用としており、その概念は米国におけるcGMPの概念とも一致していることが米国の専門家とも意見交換からも確認することができた。

医師主導治験を実施するための製剤について平成27年2月27日にPMDAと薬事戦略相談事前面談を実施した。これにより足場形成試験、造腫瘍試験の非臨床試験としての位置づけ、品質・製造としての使用予定である原材料の生物由来原料基準確認等と合わせた位置づけ、製剤としての規格化等の助言を得て、指摘事項を確認のうえ、安全性試験および製造・品質について対面助言を行うことで合意し、そのために必要な資料についても助言を得た。

本研究事業では、研究代表者らが細胞調製・保存に関して関連企業と特許出願を行っているが、今後の事業展開として必要な特許戦略についてバイオ専門の弁理士と今後の特許戦略について相談をおこなった。

D. 考察

再生医療あるいは他家の細胞を免疫抑制・抗炎症に用いる細胞療法は、薬機法と再生医療等の安全性の確保等に関する法律の制定と関連法規の整備、あるいは世界的に進むMSCの臨床応用により、開発に必要とする情報は急激に増えている。本研究事業では他家細胞のバンキング化という特徴を有しているが、国内外の大手製薬企業で開発が進むMSC製品は他家製品であり、本件事業のバンキング化が製剤化とて進められているのが現状であり、計画の実現性の追い風となっている。また、薬事戦略相談も順調に進んでおり、来年度早期の対面助言を経て、安全性試験の概要も決定し、また、製剤としての規格についても相談を進め来年度中での目処をつけることを確実な状況とすることができている。

。

E. 結論

再生医療等製品の医師主導治験を含めた臨床試験の実施は、法律の制定・整備により平成26年度は大きな転換期となった。今年度の研究では、対照表等の資料を作成し、

検討してきたが、本研究にとっては必要な規制情報が含まれていることが判明し、臨床試験の実施に向けての追い風となっている。

PMDA の薬事戦略相談も今後の検討事項と対面助言に向けた動きも具体的な小盲目を含めて相談することができ、来年度でのバンキングおよび製剤化、またこれを用いての臨床試験の実施について実現に目処をつけることがきたものと考えられる。一方、課題としては、ほとんどの試験がGLP準拠施設で実施することは困難であることから、非臨床試験のデザインと質の保証をどのようにして担保するかが来年度の課題として挙げられる。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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
- 3) 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

2. 学会発表

(国内)

なし

(海外)

- 1) 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

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

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：臍帯由来間葉系幹細胞の免疫制御作用の研究

担当責任者：東條 有伸 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/先端医療研究センター 分子療法分野 教授

協力者 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：重症 GVHD は、ドナーリンパ球が患者臓器を異物として攻撃する炎症反応であり、炎症の抑制と組織修復が望まれる。これまで同種または異種刺激に対するリンパ球の増殖反応において *in vitro* で第3者臍帯由来 MSC でも抑制効果があることを確認した。平成 26 年度は、異種 GVHD モデルマウスに GVHD 発症時期に臍帯由来 MSCs を静脈内投与し、生存率の改善を認めた。重症急性 GVHD 治療への臍帯由来 MSCs の投与に向けた臨床試験計画の検討を行った。

A. 研究目的

本研究では、同種非血縁臍帯由来間葉系幹細胞 (MSCs) を造血細胞移植後の重症急性移植片対宿主病 (GVHD) に臨床応用するための投与法の適正化およびその作用機序の解明を目的として、*in vitro* および *in vivo* 異種 GVHD マウスモデルにおける臍帯由来 MSCs の免疫抑制 (増殖抑制) 効果について検討する。

B. 研究方法

1. 混合リンパ球反応 (MLR)

臍帯由来 MSC は改良 explant 法にて分離培養した。Responder は末梢血または臍帯血単核球、Stimulator は臍帯血樹状細胞を凍結臍帯血単核球から誘導して用いた。すなわち臍帯血単核細胞を GM-CSF および IL4、さらに TNF α 存在下で培養し、成熟樹状細胞 (mDC) へ分化誘導した。MLR は、抗 CD3 モノクローナル抗体を添加した 24 ヲ

エルディッシュに 2×10^5 個の CFSE 標識 T 細胞と 50Gy 照射した 2×10^4 個の DC を臍帯由来 MSC フィーダー層の存在または非存在下で 4 日間共培養した後、フローサイトメトリーにて T 細胞の増殖を観察した。

2. 異種 GVHD マウスモデルにおける臍帯由来 MSCs 投与効果の検討

末梢血単核球を凍結解凍した細胞を NOG マウスに静脈内投与し、異種 GVHD モデルとした。マウス体重に減少傾向が見られた時期を GVHD 発症として、凍結していた臍帯由来 MSC を解凍し、静脈内投与した。生存および体重変化を経時的に観察した。

3. 臍帯由来 MSCs の増殖抑制能におけるロット差の検討

MSCs による免疫抑制効果は、刺激の強

さにより異なるとの報告があることから、臍帯由来 MSCs に IFN- γ を投与して、Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), Superoxide dismutase 2(SOD2), iNOS の遺伝子発現を realtime PCR にて解析した。

(倫理面への配慮)

臍帯血・臍帯由来 MSC の製剤化・バンキングおよび非臨床研究を含んだ基礎的検討を行うに当たっては、既に東大医科研および採取施設の倫理審査委員会の承認を得ている(ヒトゲノム倫理審査委員会承認 No. 24-53 および No26-24)。

C. 研究結果

1. 臍帯由来 MSCs による免疫抑制作用

MLR において、自家、同種ドナーによる mDC 刺激 (S) を加え、それに対する Responder (R) の分裂増殖を CFSE の輝度の低下で確認した (図 1)。R と同一臍帯由来 MSCs でも (図 1 R:S:UC-MSCs=A:A:A)、第 3 者 (図 1 A:B:C) においても、臍帯由来 MSCs は R の増殖を抑制した。

2. IFN- γ 刺激による臍帯由来 MSCs の免疫抑制因子の発現

IFN- γ 刺激による臍帯由来 MSCs の発現変化を realtime PCR にて解析した結果を図 2 に示す。IDO および iNOS は、濃度 IFN- γ 濃度依存性にまたは TNF- α との共刺激によってより強く誘導された。一方、SOD2 は IFN- γ または TNF- α 単独では誘導されないが、共刺激によって初めて高く誘導された。なお、ロットによって、誘導効率に差が認められた。

また、末梢血単核球における PHA-L 刺激に

よる出てくる IFN- γ が、臍帯由来 MSCs に よって抑制される程度を、Elispot assay にて解析した。その結果、異なる 9 ロット において、IFN- γ 発現抑制程度に差が認められた。

3. *in vivo* における臍帯由来 MSCs の免疫抑制作用

MSCs を投与する時期は、末梢血単核球を投与して異種 GVHD が発症した時期 (マウスの体重減少時期) と定めて、検討を行った。臍帯由来 MSCs 静脈投与群では有意に生存率の延長を認めた。この臍帯由来 MSCs は、GVHD を起こしている単核球とは別のドナーである (同種 MSCs)。しかし、短回投与のみでは、生存率の延長は認められたものの、最終的に寛解には至らなかった。

D. 考察

臍帯由来 MSCs は、同種ドナーであっても免疫抑制効果が MLR および異種 GVHD モデルマウスにおいても免疫抑制効果が認められた。

MSCs による免疫抑制効果は、環境の違いによって異なるとの報告がある (Bernardo *ME, et al. Cell Stem Cell* 13,392, 2013)。すなわち、炎症反応が強い場合、IFN- γ や TNF- α 濃度が高い場合には、IDO 等の炎症を抑える働きの遺伝子が高く発現し、弱い刺激では IDO の誘導が弱い。これまで GVHD に対する MSCs の臨床試験においても、消化管や肝臓に障害がある grade III~IV の重症急性 GVHD において、その有効性が確認されている。これまでのわれわれの *in vitro* および *in vivo* マウスの検討結果から、臍帯由

来 MSCs は強い炎症性の刺激(IFN- γ)においてIDOの発現が認められ、また異種GVHDマウスモデルにおいて単核球と同時または前日に投与しても、GVHD予防効果はなかった(平成25年度厚労省科研費H24-難治等(難治)一般016長村班報告書)。そこで、平成26年度は強い炎症反応が生じているGVHD発症時にMSCsを投与した。現在複数回投与の影響を検討中である。

臍帯由来MSCsの免疫抑制作用の要因は、環境中のIFN γ によって誘導されるIDO等の可溶性分子が主体であり、その発現はIFN γ 濃度依存性であることから、臍帯由来MSCsの生体における効果をex vivoにおけるプライミングによって増強できる可能性が示唆された。

次年度は、製剤の特性解析項目を確定するとともに、他の研究者らとともに、臨床試験計画を策定し、特定認定再生医療等委員会へ提出する予定である。現時点での臨床試験概略を表1に示す。

E. 結論

同種臍帯由来MSCsは、in vitro および in vivo において、免疫抑制効果を認めた。臨床試験に向けて、さらに非臨床試験を進める。

F. 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 stem cell source. *Cytotherapy*. 2015 Mar 2

- 2) 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
- 3) 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]
- 4) 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]
- 5) 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]
- 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*. 2014 Sep 13 [Epub ahead of print]
- 7) 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]
- 8) 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
- 9) 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
- 10) Ishigaki T, Zaike Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchamaru 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
- 11) 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
- 12) Kawamata T, Ohno N, Sato K, Kobayashi M, Jo N, Yuji K, Tanosaki R, Yamano Y, Tojo A, Uchamaru 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
- 13) Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Ishikawa J, Morishima Y, Mori T, Atsuta Y, Sakamaki H, on behalf of Choric Myeloid Leukaemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. 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(3):296-306, 2014
- 14) Kato S, Konuma T, Tojo A, Takahashi S.