

mesenchymal stem cells.				
Effect of <i>in vivo</i> administration of reprogramming factors in the mouse liver.	Tomokuni A Tojo A, et al.	Oncology Letters	2013	国外
miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors.	Okuyama K, Tojo A, et al.	Proceedings of the National Academy of Sciences USA	2013	国外
The CD3 versus CD7 plot in multicolor flow cytometry reflects progression of disease stage in patients infected with HTLV-I.	Kobayashi S, Tojo A, et al.	PLoS One.	2013	国外
Therapeutic outcome of multifocal Langerhans cell histiocytosis in adults treated with the Special C regimen formulated by the Japan LCH Study Group.	Morimoto A, Tojo A, et al.	International Journal of Hematology	2013	国外
Stem cells bond our organs/tissues and engineering products.	Toyoda M, Umezawa A.	Circ J. 78(7):1582-1583	2014	国外
トランスレーショナルリサーチの重要性	長村文孝	病院	2014年7月	国内
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	Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Mori T, Kurokawa M, Taniguchi S,	Int. J. Hematol.	2014年9月	国外

Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis.	Ishikawa J, Morishima Y, Atsuta Y, and Sakamaki H.			
FDAにおける抗がん剤の審査	長村文孝	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)	2014年6月	国内
その他のがん	長村文孝	がん患者のところに寄り添うためにサイコオンコロジーの基礎と実践(真興交易(株)医書出版部)	2014年4月	国内
がん関連の臨床研究	長村文孝	がん患者のところに寄り添うためにサイコオンコロジーの基礎と実践(真興交易(株)医書出版部)	2014年4月	国内
同種間葉系幹細胞を用いた骨再生医療	大串始、弓場俊輔、竹谷健	日本整形外科学会雑誌	88巻 205-211頁, 2014年	国内
先天性骨系統疾患に対する同種間葉系幹細胞移植-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-	竹谷健、弓場俊輔、大串始	日本再生医療学会雑誌	13巻 400-406頁, 2014年	国内

「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 第 1 回 研究報告会

日時：平成 26 年 11 月 15 日（土）13:00-15:00

場所：東京大学医科学研究所 1 号館 2 階 会議室

厚生労働科学研究 長村班 H26年度第1回班会議 プログラム

日時：平成26年11月15日（土）13：00-15：00

場所：東京大学医科学研究所 1号館2階 会議室

研究課題名：「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」
(H26-再生-一般-010) 代表：東京大学医科学研究所 長村登紀子

挨拶 研究代表者 長村登紀子 (13：00-13：05)

1. 「臍帯血・臍帯由来間葉系細胞(MSC)の製剤化と臨床応用について」

(13：05-13：25)

長村登紀子、森有加、島津貴久、高橋敦子、向井丈雄、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／細胞リソースセンター

2. 「臍帯血と臍帯の安全な採取システムの確立」 (13：25-13：35)

角田 肇、NTT 東日本関東病院 産婦人科・山口 暁 成和会 山口病院

3. 「臍帯由来 MSC を用いた重症移植片対宿主病(GVHD)に対する治療開発」

(13：35-13：50)

東條有伸^{1&2}、島津貴久²、高橋敦子²、森有加²、向井丈雄^{1&2}、長村登紀子²

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター分療法分野¹ 附属病院セルプロセッシング
グ・輸血部／細胞リソースセンター²

4. 「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」 (13:50-14:00)

滝敦子、森丘千夏子、本多泉、小牧基浩、森尾友宏、森田育男

東京医科歯科大学医歯学総合研究科 分子細胞機能学・発生発達病態学・生殖機能協関学
(休憩) (14：00-14：15)

5. 「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間葉系細胞の非臨床
試験」 竹谷健 島根大学医学部附属病院輸血部 (14：15-14：25)

6. 「臍帯バンキングに関連する規制対応の研究」 (14：25-14：40)

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

7. 「臍帯・臍帯血由来間葉系幹細胞製剤の特性解析」

梅澤明弘、豊田雅士 国立成育医療研究センター研究所・再生医療センター

(14：40-14：50)

閉会

臍帯血・臍帯由来間葉系細胞(MSC)の製剤化と臨床応用について

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

長村登紀子

本研究は、臍帯血及び臍帯由来間葉系細胞 (Mesenchymal stromal cells: 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。臍帯血・臍帯バンクと一部の臨床応用に関しては、H24-25年度厚労省科研「希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化とその応用に関する研究 (H24 - 難治等(難) - 一般 - 016) を引き継ぐ内容となっている。今回、臨床応用の対象疾患は、重症移植片対宿主病(GVHD)、新生児脳性麻痺、低フォスファターゼ症を含む先天性骨代謝疾患に絞り、PMDAや厚労省関連部署との相談を進めながら、採取から製剤化まで一貫した管理体制を確立する。業務遂行に当たっては、共同研究等にて企業の協力を得ながら効率的に実施することとしている。このうち、東京大学医科学研究所(東大医科研)では、プロジェクトの総合的推進および臍帯血・臍帯由来MSCの製剤化に関わる技術開発と規制対応を行う。NTT東日本関東病院では臍帯血・臍帯の同時採取手技の確立、国立成育医療研究センターでは臍帯由来MSC製剤の特性解析項目を設定・解析し品質基準を確立する。また東大医科研では重症GVHD、東京医科歯科大学では脳性麻痺を対象として臍帯由来MSC投与効果について非臨床試験を実施する。島根大学では低フォスファターゼ症を含む骨代謝疾患モデルの作成と臍帯血と臍帯由来MSCを両者または単独で用いた非臨床試験を実施する。

我々は、これまで東大医科研細胞リソースセンターにて臍帯血・臍帯MSCの製剤化に当たり、臍帯血・臍帯MSCの採取、調製・培養・凍結保存の効率化、検査、情報の管理体制を構築し、改良 Explant 法等を考案導入しながら手順をほぼ固めてきた。今年度は、臍帯血・臍帯バンクとして臨床応用が最も近いと考えられる重症急性GVHDへの応用のための臍帯由来MSCを臨床用に調製・培養・凍結・保管することについて、2014年7月院内治験審査委員会の承認を得て、製剤化を開始した。また臍帯の一部は組織ごと凍結した。現在、ロット毎に品質評価を進めている。

一方、今年度から「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(造血幹細胞移植法)」と「再生医療を国民が迅速かつ安全に受けられるようにするために施策の総合的な推進に関する法律(再生医療新法)」および関連法、省令の規制対象となる。臍帯血は前者の対象となり、臍帯由来MSCは後者(同種は第1種、自家は第2種)の対象となるため、必要な申請に向けて、再度品質マニュアルの項目、品質項目の見直しを行っていく。

連結可能匿名化



受入れ時に1st IDを読み込み、細胞処理・保存施設にて2nd ID発行し、その後は2nd IDで運用する。

東大医科研 (同意書)
管理番号: A000011000_006
採取施設: NTT東日本関東病院
母親氏名: トウキョウナツコ様

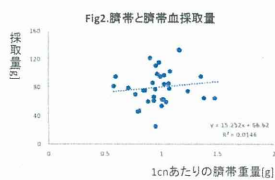
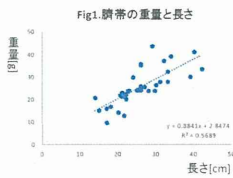
11003402000000A
同意書

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

Table1. 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



まとめ2014年

1. 臍帯血・臍帯採取にあたり、連結可能匿名化手順を確立した。
2. 臍帯は、平均1g/cmであった。
3. 臨床用の同意書に関して、IRBの承認を得た。

臍帯由来MSCを用いた重症移植片対宿主病 (GVHD) に対する治療開発

東大医科研先端医療研究センター 分子療法分野

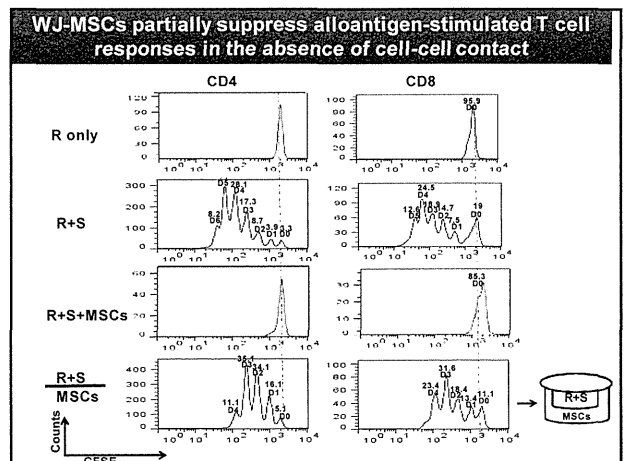
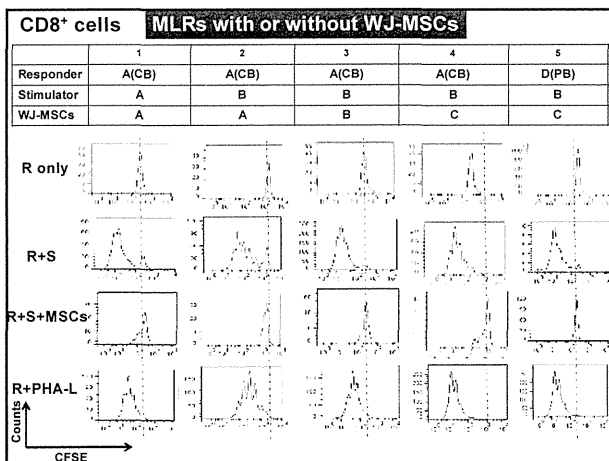
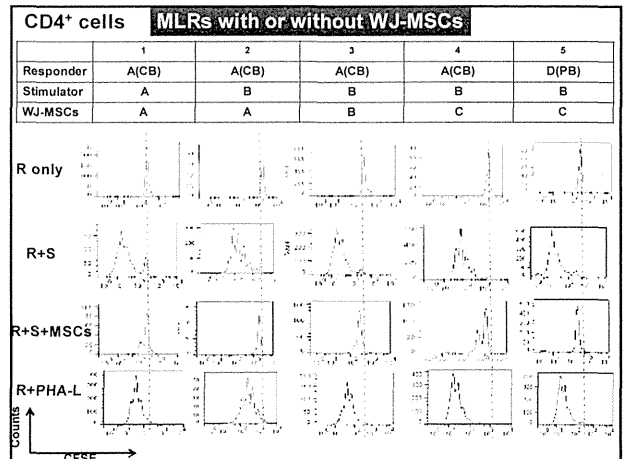
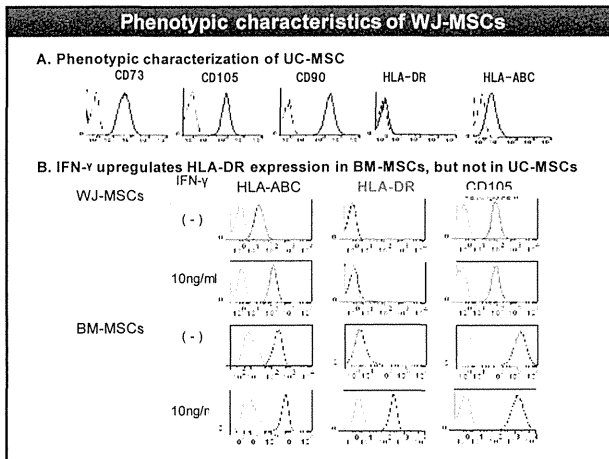
東條有伸、向井文雄

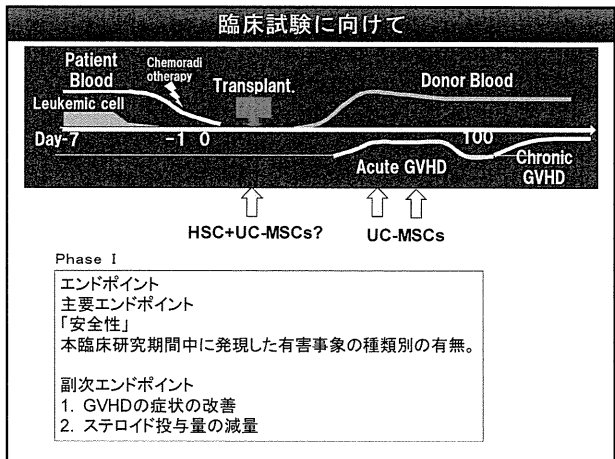
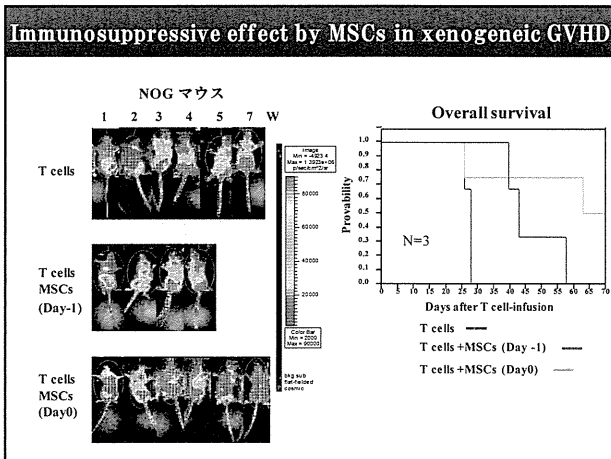
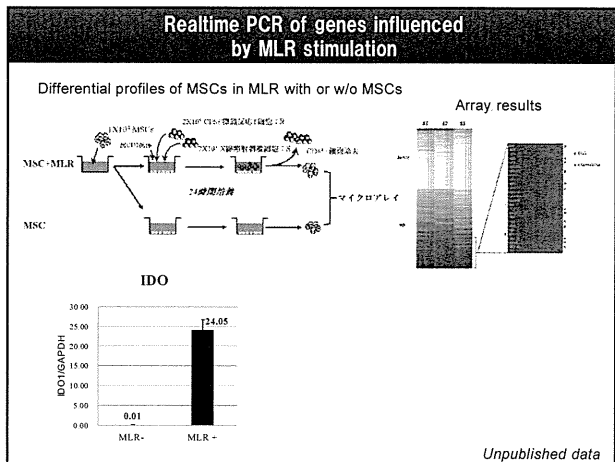
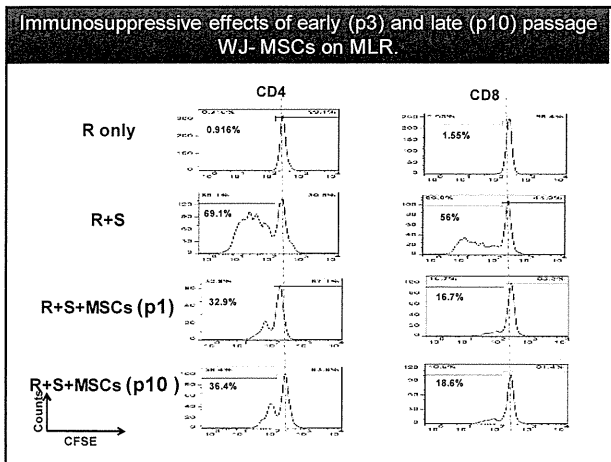
東大医科研病院 セルプロセッシング/輸血部

島津 貴久、高橋敦子、森 有加、長村登紀子

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

活性化ヒト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、臨床試験用のプロトコール案を作成する。





臨床試験案

項目	内容
対象	1. 20歳以上70歳以下 2. 生着していること 3. ステロイド抵抗性aGVHD grade III-IV (診断基準) 4. 男女は問わない 5. 移植ソースは問わない(CBT, BMT, Haplo-BMT, PBSCT) 6. 再発がないこと 7. コントロール不能な感染症がないこと
Dose	1→2x10 ⁶ /kg
病棟でFrozen-thawed	凍結バッグ: F025A(NIPRO) UC-MSCsはSTEM-CELLBANKER®に浮遊・凍結されている。本凍音保護液のヒトへの投与実績も検討。マウスでの実験では、凍結解凍したMSCsをSTEM-CELLBANKER浮遊状態のまま投与しても特に急性毒性は認めず(凝集なし)。
検査項目	末梢血血液検査、血液生化学検査、免疫血清学検査

- ### まとめ
1. 臍帯由来MSCは、骨髄由来MSCに比し、炎症性サイトカイン (IFN) によるHLA class IIの発現誘導が低い(抵抗抗原の可能性)
 2. 3rd partyの臍帯由来MSCでも、in vitroではMLRにおける活性化T細胞の増殖を抑制した。
 3. PHA-L刺激によるT細胞からのIFN産生が、臍帯由来MSCによって抑制された。但し、その抑制程度においてロット間格差があることが示唆された。
 4. 以上より、GVHD治療に適したロットを確保・増幅する必要が示唆された。
 5. 臍帯由来MSC臨床試験実施計画書の作成に向けて検討する。

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

東京医科歯科大学医歯学総合研究科

分子細胞機能学・発生発達病態学・生殖機能協関学

滝敦子、森丘千夏子、本多泉、小牧基浩、森尾友宏、森田育男

【目的】脳室周囲白質軟化症は早産児の予後を悪化させる重篤な合併症でありその成因に子宮内感染症が関与している。今回我々は、炎症による実験的脳室周囲白質損傷モデルに対して臍帯由来間葉系幹細胞（MSC）とその培養上清（MSC-CM）を投与し、その効果を検討した。

【方法】本研究は所属施設内の動物実験委員会の承認の下行われた。新生仔 SD ラット（日齢 4）に LPS15mg/kg を腹腔内投与し白質損傷モデルを作製した。対照群には同量の生理食塩水を投与した（saline 群）。白質損傷ラットに、日齢 4 に MSC（LPS-MSC 群）、日齢 4～7 に MSC-CM（LPS-MSCCM 群）をそれぞれ腹腔内投与し、コントロールとして細胞培養液のみを入れた群（LPS 無治療群）と比較した。脳室周囲白質量は日齢 12 の脳切片の Myelin Basic Protein（MBP）免疫組織染色を定量した。また、日齢 6 の脳組織の炎症性サイトカインレベルをリアルタイム PCR 法にて測定した。

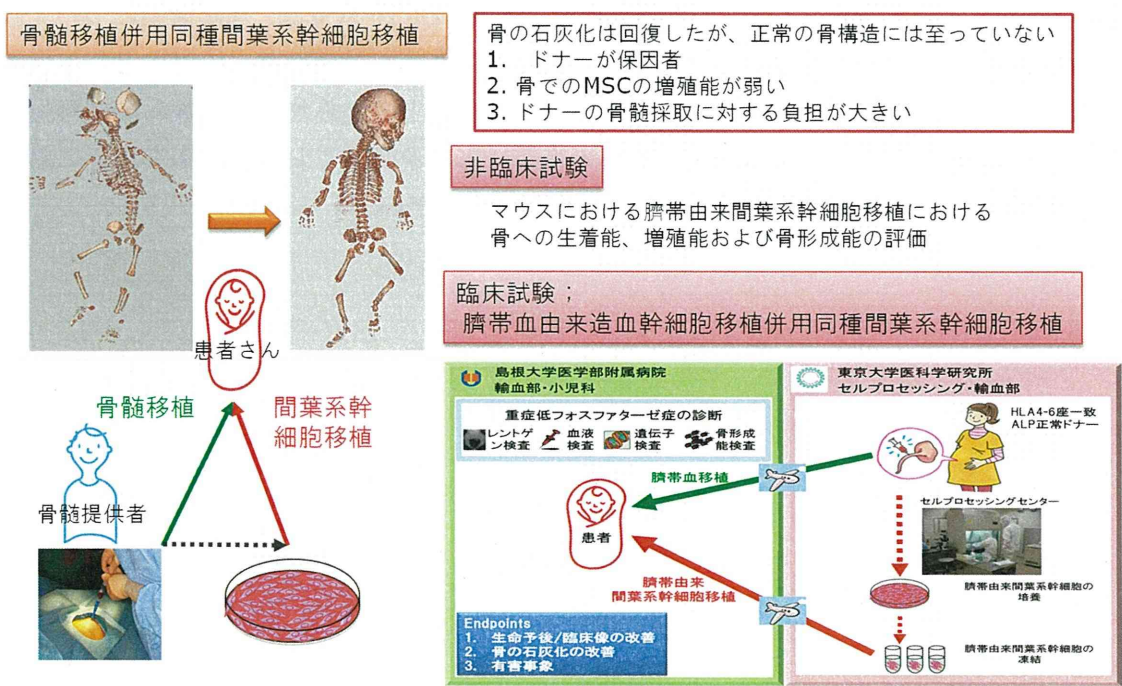
【結果】MBP 陽性領域は、LPS 無治療群では saline 群と比較して有意に減少し、LPS-MSC 群で改善が認められた。炎症性サイトカインは無治療群では有意に上昇したが、LPS-MSCCM 群、LPS-MSC 群で低下した。

【考察】炎症に起因する脳室周囲白質損傷に対して、MSC は治療効果を有することが示唆された。培養上清投与により炎症性サイトカインが低下したことから MSC の分泌因子は抗炎症効果を有すると考えられた。現在、抗炎症以外の MSC による白質量改善の機序についても検討中である。

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間葉系細胞の非臨床試験

島根大学医学部附属病院輸血部 竹谷健

先天性代謝疾患は小児の中でも希少疾患であり、そのほとんどの治療法が確立していない。その中でも骨化が障害される先天性骨代謝疾患は致命的な経過をとるか、著しく日常生活が障害されることが多い。これまで造血幹細胞移植が行われてきたが、その有効性は骨再生を行うに至っていない。そこで、我々は、骨芽細胞の起源である間葉系幹細胞 (MSC) からの骨化に至るまでの経路が障害されている先天性骨代謝疾患に対して、骨化能が正常な同種 MSC による骨再生医療を行っている。先天性骨代謝疾患で1つである、致命的低フォスファターゼ症に対して、これまで血縁者からの骨髄移植を行った後に骨髄由来 MSC を複数回投与する臨床研究を行い、骨形成と延命効果を得ることができたが、正常な骨構造に至っていない。その原因として、ドナーが保因者であること、骨での MSC の増殖能・生着能が低いことが挙げられる。また、骨髄採取に対する負担が大きいため、ドナーに負担がかかっている。臍帯由来 MSC は骨髄由来 MSC に比べて自己増殖能が高い。また、骨形成を継続させるには複数回の MSC 投与が必要であるため、ドナーへの負担を軽減することと遺伝子学的に正常な MSC が必要なことから、臍帯由来 MSC の有用性が高い。したがって、臍帯血移植後と同じドナーからの臍帯由来 MSC を投与する臍帯血由来造血幹細胞移植併用同種間葉系幹細胞移植が先天性骨代謝疾患に対する骨再生治療と有用かどうかを明らかにするために、非臨床試験を行っている。



臍帯バンキングに関連する規制対応の研究

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

長村文孝

平成 26 年は再生医療の規制動向からは大きな節目の年と言える。昨年、薬事法が「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」として大改正され、再生医療等製品が、医薬品・医療機器と共に位置づけられた。本年は省令として「再生医療等製品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 26 年厚生労働省令第 88 号、「再生医療等製品 GLP 省令）」、「再生医療等製品の製造管理および品質管理の基準に関する省令（平成 26 年厚生労働省令第 93 号、「GCTP 省令）」が発出された。また、医薬品医療機器総合機構（PMDA）では科学委員会 CPC 専門部会を設置し、アカデミア等で実施される治験段階での CPC の運用について検討を始めている。一方、治験以外の従来は「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」で規定されていた臨床試験は、昨年成立した「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」（通称、「再生医療新法」）を受けて、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令（平成 26 年政令第 278 号）」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則（平成 26 年厚生労働省令第 110 号）」が発出され、11 月 25 日より施行される。

本研究事業は、臍帯由来間葉系幹細胞のバンキング化ならびに臨床応用が主目的である。治験あるいは再生医療新法の第一種（他家移植の場合）での実施を想定して対応していく必要がある。前回の研究事業では CPC の設備・構造について PMDA の薬事戦略相談・対面助言を実施していく方針としており、継続課題である。GCTP 省令は、承認製剤について適応されるが、治験段階から全てが適応されるわけではなく、対面助言への対応としては特に品質リスクマネジメントの概念を反映することが課題と考えられる。治験および再生医療新法下の臨床試験共に、大きな規制動向の変革に影響を受けており、本事業遂行における留意点等について検討し、円滑な実施を目指していきたい。

臍帯・臍帯血由来間葉系幹細胞製剤の特性解析

国立成育医療研究センター研究所・再生医療センター

梅澤明弘

豊田雅士

再生医療が傷害や疾患による組織や器官（臓器）の機能不全を再生する医療システムとして、他に治療方法がない難治性疾患に対する治療や患者に対する身体的負担の軽減につながる新たな医療技術としての期待がもたれ、臨床応用への加速化が求められている。しかし現実として幹細胞を用いた再生医療を行うためには安全性を担保することが最も重要であり、またそれ以外にも多くの課題をクリアしていくことが必要である。そのために治療に用いる幹細胞の特性解析を行い品質の評価をしていくことになる。我々は、臍帯・臍帯血を含め、種々の組織から間葉系幹細胞を樹立し、その特性を比較してきた。そこでこれまで行ってきた臍帯・臍帯血由来間葉系幹細胞を中心に、主たる解析項目について述べるとともに、それらの結果を基盤として、本研究課題である臍帯・臍帯血由来間葉系幹細胞製剤を用いた免疫療法・再生医療に適した細胞の特性を見るために必要となる解析項目について考えていきたい。

UC-MSc GVHD キックオフミーティング

議事次第

- ・日時： 2月19日(木) 18:00~19:00
- ・場所： 臨床研究棟A 3F ミーティングルーム

【出席者予定】

研究代表者

- ・長村 登紀子 東京大学医科学研究所 准教授

研究分担者

- ・東條 有伸 東京大学医科学研究所 教授
- ・長村 文孝 東京大学医科学研究所 教授

研究協力者

- ・加藤 せい子 東京大学医科学研究所 助教
- ・小沼 貴晶 東京大学医科学研究所 助教
- ・森 有加 東京大学医科学研究所 学術支援専門職員
- ・高橋 敦子 東京大学医科学研究所 学術支援専門職員

【議事】

1. 代表者挨拶
2. 出席者紹介
3. 講演
 - (1) 臍帯由来 MSC の製剤化について (長村 登)
 - (2) 造血細胞移植における GVHD とその治療方法 (小沼先生)
 - (3) 実施体制と今後の予定 (東條先生)
 - (4) 再生医療等関連法規と支援体制 (長村 文)

企業の協力を得ながら進める
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

東京大学医科学研究所附属病院 長村登記子

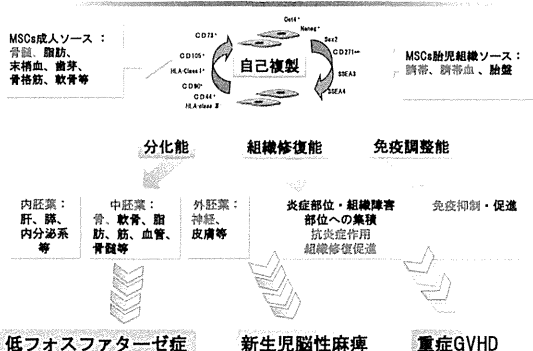


@東大医科研
2015年2月19日

1. 背景

1. 間葉系幹細胞(MSC)は、炎症部位や組織障害部位に集積し、抗炎症・免疫抑制能と組織修復能を有し、骨髄由来MSCを中心に国内外で臨床試験が進められている。
(新たな再生療法、免疫療法としての期待)
しかし、輸入製剤が主であり、トレーサビリティと安定供給の面から懸念あり。
(国内製剤化の必要性)
2. 臨床用公的臍帯血バンクが整備され、年間1,000例以上の移植実績があるが、臍帯血のMSCは少ない。一方で、臍帯からは、豊富なMSCが分離可能 (Ishige, Nagamura-Inoue et al, IJH, 2009)であり、臍帯血・臍帯は骨髄に替わるソースとして海外でも注目されている。
(新たなソースとしての臍帯・臍帯血の利用)

MSCsの性状と応用



準備状況

1. 東京臍帯血バンクの調製・保存施設としての実績・国内初ISO9001 (1997-2004年)
2. 臍帯由来MSCについて、国内初の報告 (Ishige, Nagamura et al, IJH, 2009)
3. 2012-13年度 厚労科研 (難治性疾患等克服研究事業) 「希少疾患への治療応用を目指した臍帯および臍帯血由来細胞の系統的資源化とその応用に関する研究 (H24-難治等(難)一般-D16)」 (代表 長村登記子)
 - ①系統的資源化 (バンク化・製剤化) を推進し関連企業と共同特許出願3件+成立1件
 - ②基礎的研究にて幹細胞性、分化能、免疫抑制能について研究 基礎的研究にて幹細胞性、分化能、免疫抑制能について研究・報告 (Ito et al, Tissue Eng. Part A, 2014), (学会ASH2013: ISC2013; AsiaCORD2013; ISH2013 etc.)
 - ③PMDA薬事戦略相談 (事前面談) 2回
 - ④厚労省健康局疾病対策課移植医療対策推進室にて行政的対応
4. 製剤規格の策定と採取保存に関して、東大医科研治験審査委員会にて承認 基礎研究を含む非臨床試験に関して、ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会にて (26-30-0717) にて承認
5. 2014-16年度 厚労科研 企業の協力を得ながら進める「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 (26Z20201)」 (代表 長村登記子)
6. 2014-16年度 文科省科研費B 「動物モデルを用いた臍帯由来間葉系幹細胞による新規再生・免疫抑制療法の開発」 (長村 (井上) 登記子)

2. 目的・対象

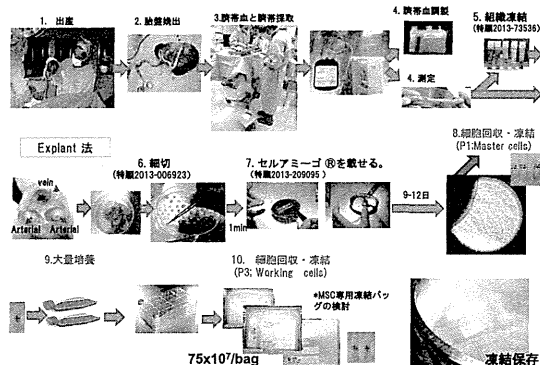
目的：臍帯血及び臍帯由来MSCを再生医療等製品として臨床応用するための製剤化に向けたPOCの取得と非臨床試験を実施する。

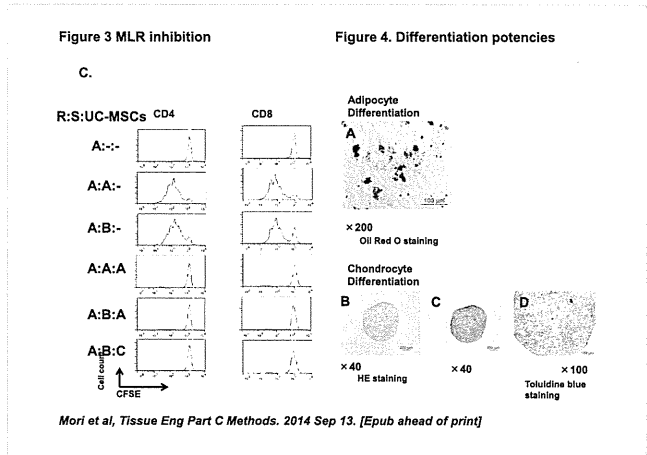
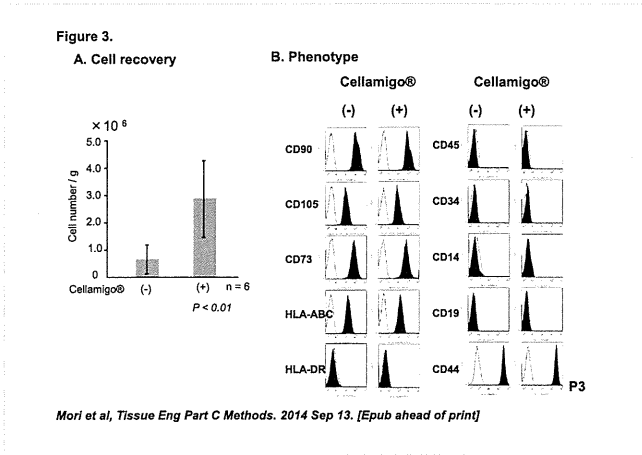
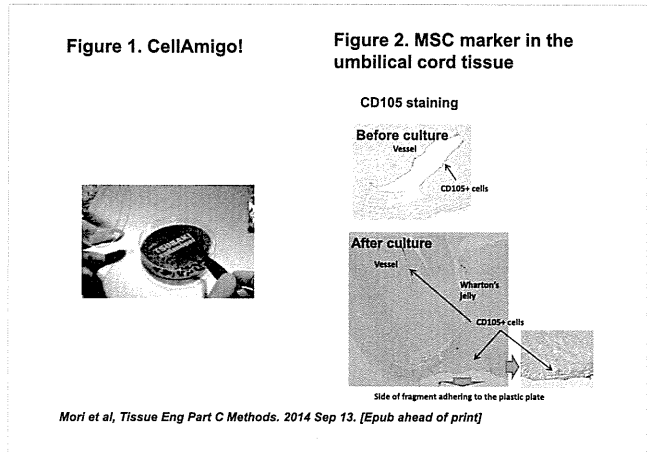
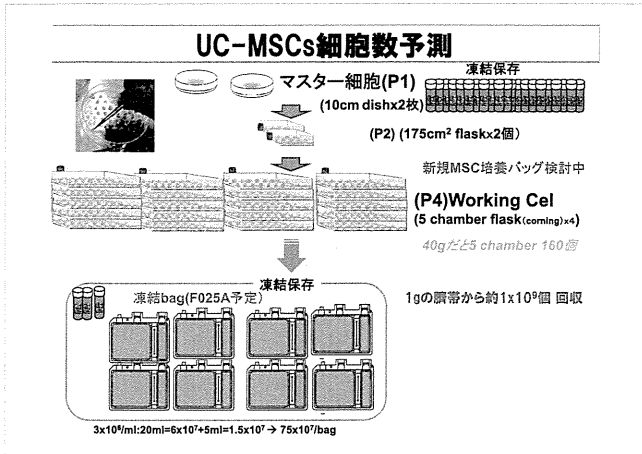
対象疾患：

- ①重症移植片対宿主病(GVHD)
- ②新生児脳性麻痺
- ③低フォスファターゼ症を含む骨形成不全症
- ④血友病の関節炎

製剤化は、企業との共同研究により、知財を獲得しながら、PMDA・厚労省とも相談しながら進め、治験実施を念頭においた非臨床試験を提案する。

3. 臍帯血および臍帯由来MSCの分離培養





SERUM- AND XENO-FREE CRYOPRESERVATION OF HUMAN UMBILICAL CORD TISSUE AS MESENCHYMAL STROMAL CELL SOURCE

Table 1. Isolated cell number yield from frozen-thawed umbilical cord stored in different cryoprotectants.

Cryoprotectants	Isolated Cell number ratio (Mean ± SD)	Absolute number ×10 ⁶ /g (Mean ± SD)	P
Fresh	1	1.0 ± 0.95	
Freezing			
No cryoprotectant	*0 ± 0	0 ± 0	**P<0.05
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	*P<0.05

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

Shimazu et al, in revise

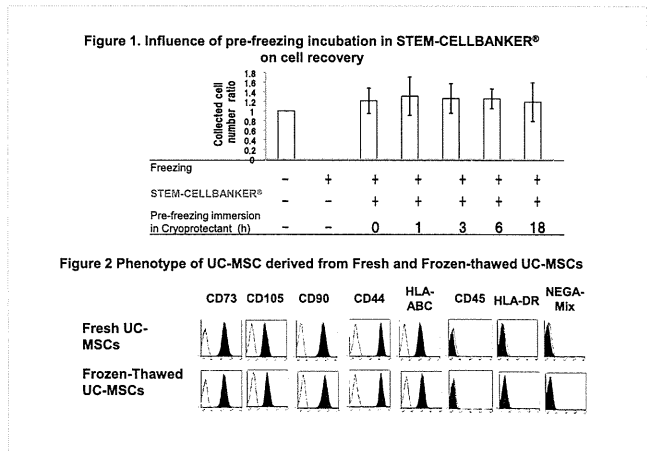


Figure 3. Immunosuppressive effect of Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (UC-MSCs) derived from frozen-thawed UC.

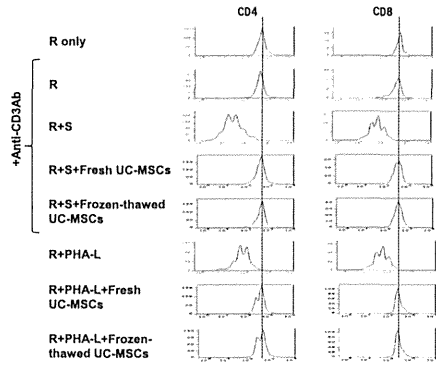
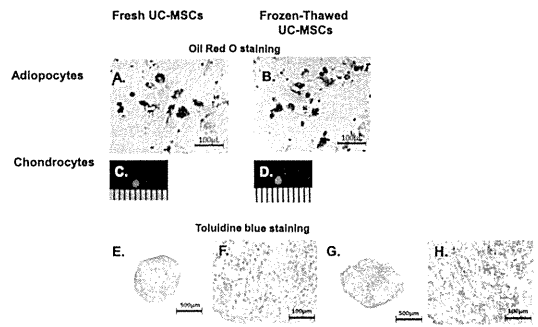
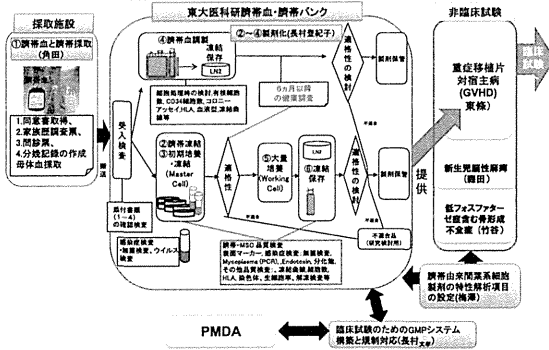


Figure 4 Adipocyte, and chondrocyte differentiation ability of Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (UC-MSCs) derived from frozen-thawed UC.



2. 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



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

基礎的検討 → **非臨床試験**

造血幹細胞移植後にドナーリンパ球が患者組織抗原に反応して活性化することによる組織障害。

重症GVHDは、ステロイド抵抗性の炎症（皮膚、肝障害、下痢）

リンパ球混合反応 (MLR) は *in vitro* の評価系

3rd party ドナー由来臍帯由来MSCにおいてもリンパ球増殖抑制を示す。IDOは主要な液性因子だが、炎症細胞との細胞接着が必要。一細胞性抑制の必要性。製品の *off-the-shelf* 性。

非臨床試験

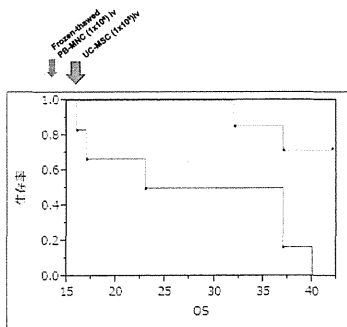
- xenoGVHDマウス作成
- 臍帯由来MSCへマーカー遺伝子導入
- MSC投与時期による免疫抑制効果とその作用機序（液性・細胞性因子）の検討

臨床試験：臍帯由来同種間葉系幹細胞輸注（案）

東大医科研究科
東大医科研究科リソースセンター
MSU-CORD
臍帯由来MSCsの製剤化

臨床試験のためのGMPシステム構築と規制対応(後付)

Xeno-GVHD model



急性移植片対宿主病(GVHD)の臨床

2015年2月19日
 東京大学医科学研究所附属病院
 血液腫瘍内科
 小沼貴晶

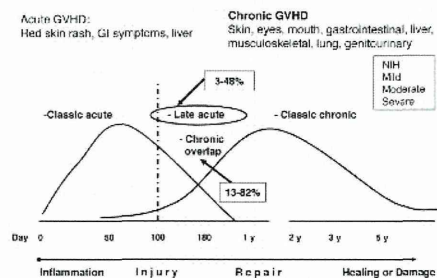
同種造血細胞移植

- 骨髄移植、末梢血幹細胞移植および臍帯血移植を含めた同種造血細胞移植は、難治性造血器疾患の根治療法として確立している。
- 日本造血細胞移植学会の全国調査では、2011年の1年間で本邦において実施された同種造血細胞移植は、3395例であった。

GVHD

- 移植片対宿主病(GVHD: graft-versus-host disease)は、同種造血細胞移植後の主要な合併症のひとつである。
- 移植片の免疫担当細胞(主にT細胞)が宿主を非自己と認識することによる免疫学的反応がGVHDの本態である。

発症時期によるGVHDの分類



急性GVHDの症状と診断

- 急性GVHDは、移植後100日未満にみられ、主症状としては皮疹、黄疸、下痢がある。
- 病理組織学的には、リンパ球浸潤やアポトーシスの所見が認められる。



造血細胞移植 now & future (<http://www.hsct.jp/home.php>)

急性GVHDの重症度分類

表3. 移植後下痢のstage

Stage	定義	肝	下痢%
I	<2%	胆ビリルビン値<0.3	下痢<10% 胆ビリルビン値<1.0mg/dl または胆ビリルビン値<17μmol/L または胆ビリルビン値<1.0mg/dl
II	2%-5%	0.3-0.9	胆ビリルビン値1.0-1.9mg/dl または胆ビリルビン値17-32.5μmol/L
III	>5%	0.3-1.0	胆ビリルビン値<1.0mg/dl または胆ビリルビン値<17μmol/L
IV	胆ビリルビン値>1.0mg/dl または胆ビリルビン値>17μmol/L	>0.9	胆ビリルビン値<1.0mg/dl または胆ビリルビン値<17μmol/L

表4. 急性GVHDのgrade

Grade	皮膚stage	GI stage	肝	胆ビリルビン
I	1-2	0	0	0
II	3	or 1	or 1	1
III	-	2-3	or 2	2-4
IV	4	or 4	or 4	4

造血細胞移植学会 GVHDガイドライン

急性GVHDの予防

シクロスポリン(A)(CSA)または
タクロリムス(TAC) With/without メトトレキサート(MTX)または
ミコフェノール酸モフェチル(MMF)

Study	Regimen	N	Donor	Transplantation	Grade I-IV	Grade III-IV	cGVHD	OS
Randomized								
Storb ⁴¹	CSA + MTX	43	MRD	MAC BMT	54%	25%	38%	53% @ 1.3 y
	CSA + MTX	43	MRD	MAC BMT	58%	7%	37%	50%
					$P = .014$			
Storb ⁴¹	MTX	24	MRD	RIC BMT (AA)	68%	37%	25%	80% @ 2 y
	CSA + MTX	22	MRD	RIC BMT (AA)	18%	9%	11%	87%
					$P = .012$			
Chazot ⁴²	CSA + MTX + ETO	79	MRD	MAC BMT	9%	NA	97%	61% @ 2 y
	CSA + ETO	74	MRD	MAC BMT	22%	NA	80%	56%
					$P = .02$			
Reisenhanthorn ⁴³	TAC + MTX	165	MRD	MAC BMT	28%	13%	56%	47% @ 2 y
	CSA + MTX	164	MRD	MAC BMT	44%	17%	50%	57%
					$P = .01$			
Chazot ⁴²	CSA + MTX	96	MRD	MAC BMT	22%	19%	45%	53% @ 2 y
	CSA + MTX + ETO	96	MRD	MAC BMT	18%	8%	43%	72%
Nash ⁴⁴	TAC + MTX	96	URD	MAC BMT	56%	18%	70%	54% @ 2 y
	CSA + MTX	96	URD	MAC BMT	74%	15%	70%	50%
					$P = .0002$			
Rubin ⁴⁵	CSA + MMF	21	MRD	MAC BMT	48%	NA	83%	82% @ 6 mo
	CSA + MTX	18	MRD	MAC BMT	37%	NA	84%	66%
Finn ⁴⁶	CSA + MTX + ATG	109	URD	MNC = 80% GMT	82%	12%	21%	54% @ 2 y
	CSA + MTX	98	URD	30% BSC	81%	24%	59%	52%
					$P = .004$			
Pavletic ⁴⁷	TAC + MMF	40	MRD w/d	MAC	78%	12%	38%	54% @ 3 y
	TAC + MTX	47	URD	MAC	78%	4%	42%	42%
					$P = .03$			

Pavletic, et al. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012

急性GVHDの一次治療

- 治療適応は原則として、重症度II度以上。
- プレドニゾン(PSL)1~2mg/kgが標準治療。

Table 2. Selected studies of aGVHD frontline therapy

Study	Design	Regimens tested*	N	Response day	CR	CR/PR	NRM	OS
MacMillan ⁴⁸	Retrospective cohort	PDN	664	28	53%	57%	36%	NA
Caha ⁴⁹	Randomized	Hydrocortisone + PDN vs Prednisone + PDN	36/34	20	44%/54%	71%/63%	NA	@ 1 y: 66%/59%
Venl ⁵⁰	Randomized	Hydrocortisone + PDN vs PDN	46/47	NA	NA	71%/65%	37%/26%	@ 3 y: 62%/63%
Crage ⁵¹	Randomized	Hydrocortisone + PDN vs PDN	50/46	42	NA	76%/76%	54%/55%	@ 2 y: 40%/50%
Lee ⁵²	Randomized	Dexamethasone + PDN vs Prednisone + PDN	58/40	42	43%/49%	61%/53%	39%/28%	@ 1 y: 28%/50%
Levine ⁵³	Phase 2 Single arm	Clarecept + PDN	61	28	69%	NA	NA	@ 6 mo: 58%
Connel ⁵⁴	Randomized	Infliximab + PDN vs PDN	20/28	29	55%/54%	62%/58%	52%/36%	@ 2 y: 17%/29%
Alousi ⁵⁵	Phase 2 4-arm randomized	Clarecept + PDN vs MMF + PDN vs Dexamethasone + PDN vs Prednisone + PDN	45/45/47/42	28	20%/100%/53%/38%	48%/78%/60%/52%	NA	@ 8 mo: 47%/04%/48%/47%
Piddala ⁵⁶	Pilot single arm	Sildenafil (w/ PDN)	10	Best	50%	NA	0%	@ 16 mo: 79% 16 mo

Missing quality criteria per American Society for Blood and Marrow Transplantation recommendations.⁵⁷
PDN indicates prednisone or equivalent dose of another corticosteroid; NA, not available; and HD PDN, high-dose prednisone or equivalent.
*All typically admits steroid in addition to a calcineurin inhibitor.

Pavletic, et al. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2012

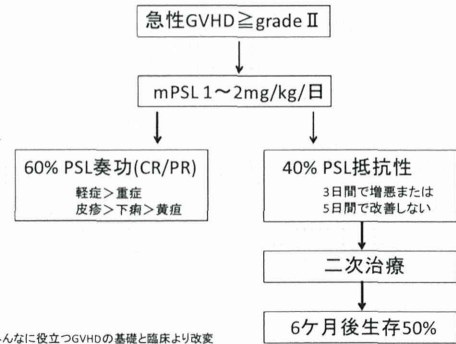
移植ソース別の急性GVHDに対する PSD奏効率

Stem Cell Source	No. of Cases	Patients with Improved Response, n (%)
MRD-BM	445	328 (73.7)
MRD-PB	481	312 (64.9)
MUD-BM	783	468 (59.8)
UCB	839	614 (73.2)
MMRD-BM	155	66 (42.9)
MMRD-PB	161	78 (48.4)
MMUD-BM	572	324 (56.6)
Total	3436	2190 (63.7)

MRD-BM indicates HLA-matched related donor bone marrow; MRD-PB, HLA-matched related donor peripheral blood stem cells; MUD-BM, HLA-matched unrelated donor bone marrow; UCB, umbilical cord blood; MMRD-BM, HLA-mismatched related donor bone marrow; MMRD-PB, HLA-mismatched related donor peripheral blood stem cells.

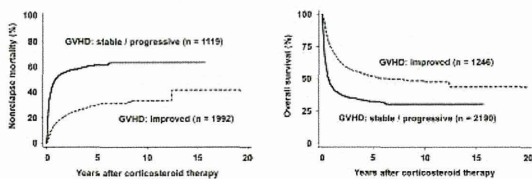
Murata, et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2013

急性GVHDに対するステロイド治療



豊嶋ら. みんなに役立つGVHDの基礎と臨床より改善

急性GVHDに対するステロイド反応性が 生存率に与える影響



Murata, et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2013

急性GVHDの二次治療

- 標準的治療法は確立していない。

Reference	Agent	Phase	No. of Patients	Response Assessment	CR Proportion	CR or PR Proportion	6-Month Survival
[34]	Hydrocortisone	Retros	12	Day 28 ^b	0.42	0.38	0.38
[35]	MMF	Retros	13	Best	0.15	0.46	0.46
[36]	MMF	Retros	19	Best	0	0.60	0.57
[37]	MMF	Retros	48	Best	0.31	0.79	0.47
[37]	MMF	Retros	27	Best	0.26	0.52	0.52
[37]	ECP	Retros	33	Best	0.55	0.76	0.76
[37]	ECP	Retros	23	Best	0.48	0.48	0.57
[38]	Brexpiprazole	2	23	Day 2 ^c	0.17	0.83	0.55
[39]	Dexamethasone	2	41	Day 43	0.37	0.51	0.51
[40]	Dexamethasone	2	12	Day 28 ^d	0.08	0.50	0.33
[39]	Dexamethasone	Retros	37	Day 43	0.33	0.54	0.28
[41]	Infliximab	2	14	Best	0.14	0.43	0.36
[42]	Dexamethasone + infliximab	1	32	Best	0.38	0.53	0.53
[43]	Dexamethasone + infliximab	2	22	Best	0.18	0.27	0.27
[27]	Alectinib	2	18	Day 28 ^e	0.33	0.83	0.71
[24]	Alectinib	2	10	Best	0.20	0.50	0
[30]	Alectinib	Retros	18	Day 56 ^f	0.38	0.62	0.61
[33]	Infliximab	Retros	22	Day 28	0.07	0.18	0.18
[34]	Infliximab	Retros	58	Day 21 ^g	0.49	0.28	0.17
[35]	Infliximab	Retros	79	Day 28	0.20	0.54	0.44
[44]	Infliximab	2	47	Best	0.32	0.57	0.45
[45]	Infliximab	2	27	Best	0.23	0.56	0.55
[46]	Etoposide	Retros	13	Day 36	0.38	0.46	0.37
[39]	Infliximab	Retros	21	Day 7 ^h	0.42	0.67	0.52
[47]	Infliximab + etoposide	Retros	16	Best	0.49	0.81	0.54
[47]	Dexamethasone + etoposide	2	21	Best	0.39	0.67	0.37
[21]	Dexamethasone + infliximab	Retros	22	Day 42 ⁱ	0.45	0.82	0.88
[31]	Dexamethasone + infliximab	Retros	12	Best	1.00	1.00	0.73
[48]	Sildenafil	Retros	34	Best	0.46	0.76	0.48

Martin, et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2012

間葉系幹細胞(MSC)による免疫調整

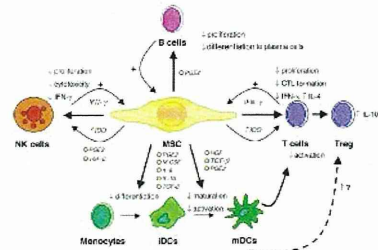


Figure 1. Immunomodulatory effects of MSCs. CTL, indicates cytotoxic T cell; HGF, hepatocyte growth factor; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; PGE2, prostaglandin E2; and TGF- β , transforming growth factor β . Illustration by Pauliëte Dennis.

Nauta, et al. Blood 2007.

GVHDに対するMSCによる臨床試験

First author (ref)	Phase	Number	Treatment	Outcome	Comments
Li et al. (10)	I	1	IV	CR (33%)	Phase I study of oral therapy. MSCs in acute GVHD patients.
Yoshida et al. (11)	I	30	Preemptive	CR (33%)	Preemptive therapy of GVHD with MSCs in acute GVHD patients.
Nguyen et al. (12)	I	4	III/IV	CR (25%)	MSCs in acute GVHD patients with steroid resistance.
Li et al. (13)	I	15	III/IV	CR (60%)	CR (60%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Nguyen et al. (14)	I	5	III/IV	CR (40%)	CR (40%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Yoshida et al. (15)	I	2	III/IV	CR (50%)	CR (50%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Nguyen et al. (16)	I	10	Preemptive	CR (30%)	Preemptive therapy of GVHD with MSCs in acute GVHD patients.
Adachi et al. (17)	I	10	III/IV	CR (70%)	CR (70%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Lee et al. (18)	I	14	III/IV	CR (50%)	CR (50%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Nguyen et al. (19)	II	100	III/IV	CR (30%)	Phase II study of oral therapy. MSCs in acute GVHD patients.
Yoshida et al. (20)	I	30	Preemptive	CR (33%)	Preemptive therapy of GVHD with MSCs in acute GVHD patients.
Nguyen et al. (21)	I	11	III/IV	CR (55%)	CR (55%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Yoshida et al. (22)	I	5	Oral	CR (40%)	CR (40%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Yoshida et al. (23)	I	12	III/IV	CR (50%)	CR (50%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Zhou et al. (24)	I	4	Oral	CR (75%)	CR (75%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Nguyen et al. (25)	I	10	Oral	CR (50%)	CR (50%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Nguyen et al. (26)	I	2	IV	CR (50%)	CR (50%) in acute GVHD patients with steroid resistance.
Nguyen et al. (27)	I	27	Preemptive	CR (33%)	Preemptive therapy of GVHD with MSCs in acute GVHD patients.

Kim, et al. Ann Hematol 2013.

欧州におけるphase II 臨床試験

- 55名のステロイド抵抗性急性GVHD
- 骨髄(血縁一致、ハプロ、非血縁不一致)由来MSCを中央値 1.4×10^6 /kg投与
- 投与回数 1回:27名、2回:22名、3-5回:6名、投与開始日103(27-533)日

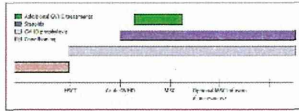


Figure 2. Timeline of the phase II clinical trial. The x-axis represents time in days, with markers for Day 0, Day 10, Day 20, and Day 30.

Condition	Number of patients (n)	Number of patients (n)	All patients (n)
GVHD (steroid resistant)	12	13	25
Acute GVHD	4	5	9
Subacute GVHD	1	1	2
Chronic GVHD	7	11	18
Overall response	21	28	49
Survival	13	8	21
CR (steroid resistant)	2	0	2
CR (steroid resistant)	4	2	6

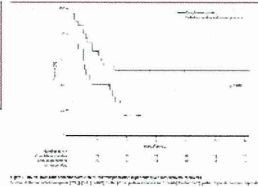


Figure 3. Survival plot showing the survival rate over time for patients receiving MSCs. The x-axis is Time after HLA/SC transplant (days) and the y-axis is Survival probability (%).

Le Blanc, et al. Lancet 2008.

本邦におけるphase I / II 臨床試験

- 14名のステロイド抵抗性急性GVHD
- 骨髄(非血縁)由来MSC 2×10^6 /kg (Osirisist)
- 週2回4週間投与、PR/MRで4週間追加投与、投与開始日 47日
- 14名中、8名がCR、5例がPR

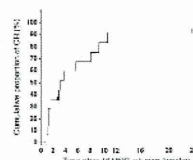


Figure 1. Cumulative response rate over time for patients receiving MSCs.

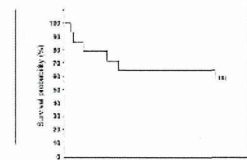


Figure 2. Survival plot showing the survival rate over time for patients receiving MSCs.

Muroi, et al. Int J Hematol 2013.

結論

- II度以上の重症急性GVHDの一時治療としてのステロイド投与は、60%に有効である。
- 40%のステロイド抵抗性急性GVHDの標準的治療は確立していない。
- 骨髄由来MSCの臨床試験での有効性が報告されており、今後、臍帯由来MSCにより、有効性が改善される可能性があり、臨床試験で検証していく。