

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等政策研究事業  
(免疫アレルギー疾患等政策研究事業(移植医療基盤整備研究分野)))

(総合) 研究報告書

非血縁者間臍帯血移植における移植造血幹細胞数と移植成績の相関  
-移植用臍帯血有効利用への応用-

研究代表者 園田 精昭 関西医科大学教授

研究要旨

非血縁者間臍帯血移植(UCBT)は、非血縁者間骨髓移植と並び、本邦における造血幹細胞移植の中で重要な移植法として確立され、近年、本邦において年間1,200~1,300例実施されている。平成29年末までに累積で15,445例が実施されており、世界の臍帯血移植実施例数(40,000例)の1/3に達している。しかしながら、その根幹をなす臍帯血(CB)に含まれる造血幹細胞(HSC)の本体は、十分に明らかにされていない。その結果、生着不全や造血回復の遅延などの臨床的な課題は未だに克服されていない。本研究の目的は、移植用CBに含まれているHSC数を独自に開発した方法(Leukemia 28:1308,2014)により正確に測定し、移植成績(特に、生着不全や造血回復)との関連を明らかにすることにより、安全で効率的なUCBTを確立することである。

研究分担者:

藤岡龍哉(関西医科大学幹細胞生物学・講師)  
松岡由和(関西医科大学幹細胞生物学・助教)  
野村昌作(関西医科大学第一内科・教授)  
藤田真也(関西医科大学第一内科・講師)  
藤村吉博(日本赤十字社近畿ブロック血液センター・所長)  
木村貴文((日本赤十字社近畿ブロック血液センター及び大阪府赤十字血液センター・製剤部長)  
小川啓恭(兵庫医科大学血液内科・教授)  
井上雅美(大阪母子保健総合医療センター血液腫瘍科・主任部長)  
中前博久(大阪市立大学大学院医学研究科血液腫瘍制御学・准教授)  
畑中一生(大阪赤十字病院血液内科・副部長)  
中村文明(国立循環器病センター循環器統合情報センターデータ統合室・室長)

浅野弘明(京都府立医科大学大学院保健看護学研究科・准教授)

研究協力者:

松本加代子(日本赤十字社近畿ブロック血液センター製剤三課・課長)  
大谷智司(日本赤十字社近畿ブロック血液センター大阪分室・製剤副部長)

A. 研究目的

非血縁者間臍帯血移植(UCBT)は、非血縁者間骨髓移植、末梢血幹細胞移植(自家・同種)と並び、本邦における造血幹細胞移植の中で重要な移植法として確立されている。近年、本邦において年間1,200~1,300例実施され、平成29年末の累積移植数は15,445例に達している。しかしながら、その根幹をなす臍帯血(CB)に

含まれる造血幹細胞（HSC）の本体は、十分に明らかにされていない。その結果、生着不全や造血回復の遅延（特に、好中球及び血小板回復）、免疫再構築の遅延、などの臨床的な課題は未だに克服されていない。

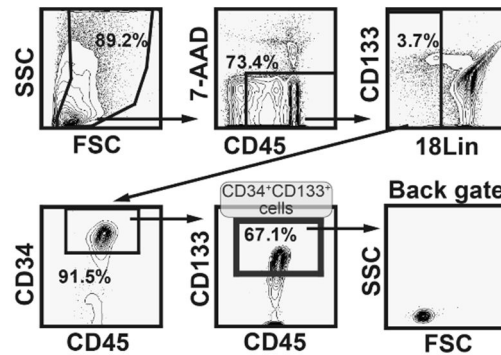
本研究の目的は、移植用 CB に含まれている CD34 抗原陽性（CD34<sup>+</sup>）HSC 数を独自に開発した方法（Leukemia 28:1308,2014 参照）により正確に測定し、移植成績（特に、生着不全や造血回復）との関連を明らかにすることにより、安全で効率的な UCBT を確立することである。

本研究の成果により、生着に必要な CD34<sup>+</sup> CD133<sup>+</sup> HSC 数の基準値が明らかになれば、従来、CBバンクの調整前基準以下で廃棄されていた多くの CB を移植に用いること（CBのリクルート）が可能になるものと期待される。その結果、CBバンクの事業経費の節減という大きなメリットも期待できる。加えて、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> HSC 数を用いる新たな CB 選択基準の確立と CB の品質保証（CBバンクHP上で含まれている CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を明記すること）が可能になると考えられる。

## B. 研究方法

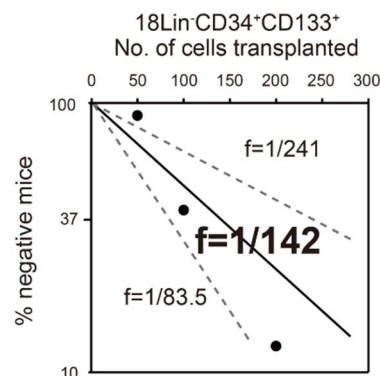
### （移植用 CB 中の CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数の測定法）

日本赤十字社近畿さい帯血バンク（以下、近畿さい帯血バンク）より提供された残余濃縮 CB より有核細胞（NC）を分離、回収する。次いで、回収した NC より免疫磁気ビーズを用いて 11 種類の分化抗原陽性細胞を除去し、11 種類の分化抗原陰性（11 Lin<sup>-</sup>）細胞を単離する。得られた 11Lin<sup>-</sup>細胞は、7-AAD、18 種類の分化抗原に対する抗体、CD34 抗原および CD133 抗原に対する抗体を用いて多重染色し、3 laser 5 color FACS 法を用いて 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞の割合を測定する（図 1）。



（図 1）18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞の測定法  
（3 laser 5 color FACS 法）

その後、総有核細胞（TNC）数と 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞の割合より、移植用 CB 中に含まれる 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞数を算定する。最終的に、新鮮 CB 由来の 18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞を標的細胞として用いる限界希釈実験の結果（図 2）（CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> HSC の頻度 1/142 個）に基づいて、移植用 CB 中に含まれる CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> HSC 数を算出する（Leukemia 28:1308-1315,2014 参照）。



（図 2）限界希釈実験結果

本課題研究では、18Lin<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>細胞分画に含まれている CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数の測定に焦点を絞って研究を進めた。

### （統計解析方法）

CB に含まれる CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を前述の方法（図 1）で測定し、従来の指標である TNC 数と CD34<sup>+</sup>細胞数との相関について統計

学的に解析した。最終的に、移植用 CB に含まれている CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数に基づいて、四分位を用いて 3 群に分類した。有意差検定は、積率相関係数と順位相関係数を用いて行った。

前向き臨床観察研究に関する統計解析方法は、Fine and Grey モデルを用いて調整したハザード比を推定する。Net Reclassification Index (NRI)を用いて、TNC 数や CD34<sup>+</sup>細胞数と比べて、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を使った場合に予後予測力に差があることを検定する。サンプルサイズは統計学的有意水準を 5%、検出力を 80%とした場合、約 150 例で 20%の差が、約 500 例で 10%の差が検出可能であった。以上より、200 例で中間解析を実施し、最終解析は 500 ~ 600 例を目標にすることとした。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、近畿さい帯血バンクで調製開始基準 (有核細胞数  $12 \times 10^8$  個以上、CD34<sup>+</sup>細胞数  $3 \times 10^6$  個以上) を満たすことが確認された CB を対象とした。調製段階 (濃縮後) において細胞数測定のために分取した検査用検体の残り (50 ~ 100  $\mu$ l の濃縮 CB (通常は廃棄される)) を用いて、含まれている CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を測定した。

従って、提供者よりの同意は各採取施設で予め得られている。また、前記した残余濃縮 CB が研究施設 (関西医科大学幹細胞生物学講座) に提供される際には、個々の CB には識別番号のみが記載されている。このため、CB 提供者の個人情報が研究施設で漏洩する危険性はないと考えられる。

CB 提供者には、近畿さい帯血バンクに登録された各 CB 採取施設において、UCBT の必要性や、採取に伴う母子の危険性が全くないこと、提供された CB が患者様への移植だけでなく、一部の CB は研究用にも使用されるという説明が担当医よりなされた上で、文書による同

意が得られている。従って、本研究に際して、研究担当者が直接に同意を求めることはないと考えられる。

また、本研究は、近畿さい帯血バンクにおいて NC の分離、濃縮、保存処理、及び TNC 数や CD34<sup>+</sup>細胞数の測定が行われる際の残余濃縮 CB (通常は廃棄される) を用いて実施する。従って、本研究が CB 提供者に直接の不利益をもたらすことはないと考えられる。

以上を踏まえて、本研究の実施に関して、関西医科大学倫理審査委員会に申請し、承認 (関医倫第 1428-2 号) されている。

また、図 2 に記載したように、移植用臍帯血中に含まれる CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を算出するために重症免疫不全 (NOG) マウスを用いて限界希釈実験を行った。動物実験については、関西医科大学動物実験委員会の承認 (承認番号 15-035, 16-047, 17-030) を得て、動物愛護法を遵守して行った。

## C. 研究結果

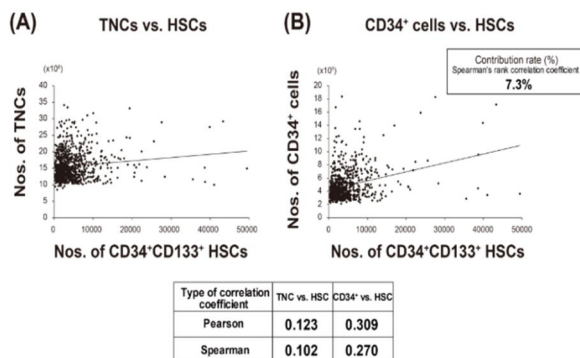
### 1) 移植用 CB 中の CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数の測定結果と従来指標 (TNC 数と CD34<sup>+</sup>細胞数) との関連

平成 27 年 6 月 ~ 平成 29 年 9 月に近畿さい帯血バンクが移植用に保存した CB から、通常は廃棄される残余濃縮 CB の提供を受け (倫理委員会承認済み)、個々の CB に含まれる CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を測定した。近畿さい帯血バンクより提供を受けた 1,093 本の CB の内、処理の途中に凝集塊を形成し解析が困難となったもの、および FCM での解析において CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>分画における評価可能なプロット数 (50 個以上) が得られなかった 258 本の CB を除いた 835 本より得られたデータについて以下の解析を行った。

これら 835 本の CB における TNC 数は 8.5 ~ 34.2 (中央値 14.8)  $\times 10^8$  個、CD34<sup>+</sup>細胞数は

2.1 ~ 18.4 (中央値 4.2)  $\times 10^6$  個であった。一方、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数は、146 ~ 49,450 (中央値 3,227) 個と幅広く分布し、最大値/最小値比は 339 と TNC 数や CD34<sup>+</sup>細胞数の最大値/最小値比の 4.0 ~ 8.8 と大きくかい離していた。

統計学的な解析(積率相関及び順位相関)を行ったところ、TNC 数と CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数、CD34<sup>+</sup>細胞数と CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数との間に有意な相関は認められなかった(図 3)。



(図 3)(A) 移植用 CB に含まれる TNC 数と CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数の相関、(B) 移植用 CB に含まれる CD34<sup>+</sup>数と CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数の相関

次に、CB に含まれている CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を四分位により下位(第 1 四分位未満)、中間(第 1 四分位以上 ~ 第 3 四分位未満)、上位(第 3 四分位以上)の 3 群に分けて解析した。下位群 (n=208) では、TNC 数は 8.5 ~ 29.0 (中央値 14.4)  $\times 10^8$  個、CD34<sup>+</sup>細胞数は 2.3 ~ 13.6 (中央値 3.8)  $\times 10^6$  個、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数は、146 ~ 1,738 (中央値 1,122) 個であった。中間群 (n=418) では、TNC 数は 9.0 ~ 34.2 (中央値 14.6)  $\times 10^8$  個、CD34<sup>+</sup>細胞数は 2.1 ~ 18.4 (中央値 4.0)  $\times 10^6$  個、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数は、1,740 ~ 5,757 (中央値 3,215) 個であった。上位群 (n=209) では、TNC 数は 10.0 ~ 33.2 (中央値 15.7)  $\times 10^8$  個、CD34<sup>+</sup>細胞数は 2.3 ~ 18.3 (中央値 5.2)  $\times 10^6$  個、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数は、

5,774 ~ 49,450 (中央値 8,588) 個であった。

以上の 3 群間の差異について統計学的な解析(積率相関及び順位相関)を行った。その結果、下位群、中間群においては、TNC 数と CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数、CD34<sup>+</sup>細胞数と CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数に全く相関を認めなかった。上位群においては、TNC 数と CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数には相関は認められなかった。一方、CD34<sup>+</sup>細胞数と CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数間の積率相関係数は 0.228 であり、弱い相関傾向が認められた。しかしながら、両者間における順位相関係数は 0.087 であること、また、散布図的にもその関連性は明瞭とは言えないことから、明確な関連性は示唆されなかった。

最後に、背景因子(採取から調整開始までの時間、採取液量および在胎週数)について検討した。解析を行った全 CB における、採取から調整開始までの時間は 2 ~ 24 時間(中央値 19 時間)、採取液量は 60 ~ 211 mL(中央値 93 mL)、在胎週数は 36 ~ 41 週(中央値 39 週)であった。前述の方法でグループ分けした、下位群、中間群および上位群間で各背景因子の比較を行った。その結果、いずれの背景因子も各グループ間で有意な差は認められなかった。このことから、これらの背景因子は CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数に影響を与えていない可能性が示唆された。

## 2) 前向き臨床観察研究(中間解析結果)

平成 27 年 6 月から平成 29 年 12 月までに CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を測定した CB 数は、合計 986 本であった。この内、移植に不適と判断された 78 本の CB を除いた 908 本が凍結保存された。平成 29 年 11 月 30 日現在で、この内の 475 本が公開されている。平成 28 年 5 月より、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数測定済みの CB の提供が開始され、平成 29 年 11 月 30 日の時点で 247 本の CB が移植用に提供されている。

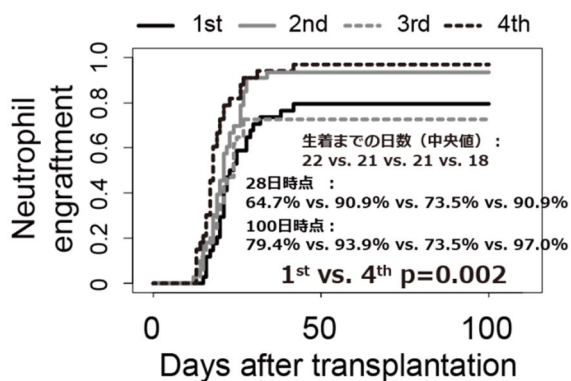
移植 100 日後の TRUMP データの報告は、平

成29年12月4日までに134症例分を回収した。対象者の年齢の中央値は、53.0 (IQR: 40.0-63.0) 歳、女性が34.4%を占めており、対象疾患はAMLが51.5%で最も多かった。

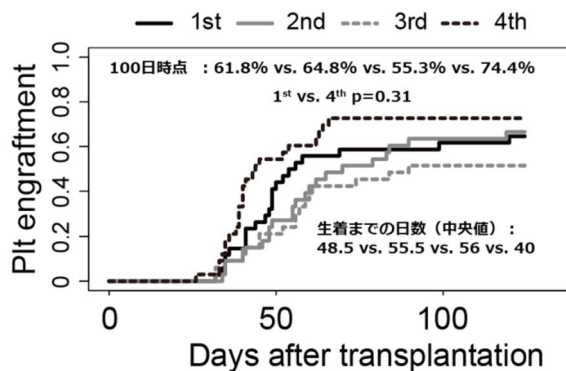
移植細胞数の中央値は、TNC数が $3.0 \times 10^7$  (IQR:  $2.5-3.7 \times 10^7$ ) 個/kg、CD34<sup>+</sup>細胞数が $0.9 \times 10^5$  (IQR:  $0.7-1.2 \times 10^5$ ) 個/kg、CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC数が中央値51.3 (IQR: 30.2-97.0) 個/kgであった。体重あたりのCD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC数とTNC数との順位相関係数は0.01、CD34<sup>+</sup>細胞数との相関係数は0.36であった。両者ともに実験室での測定結果と概ね同様であった。

移植例数134例での予備的解析の結果では、HSC数の中央値で分けた二群間に生着率の差は認められなかった。しかしながら、四分位の解析では、好中球生着までの期間がCD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC数の多い群で有意に早かった (P<0.002) (図4)。また、血小板生着までの期間もCD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC数の多い群で早い傾向が示唆された (図5)。

本研究の多数例における解析で、移植したCD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC数と造血回復の関係が明らかになることが期待される。一方、生着不全とCD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC数との関連については、今回の解析では症例数が少なく、解析できなかった。症例数の蓄積を待って解析を行う予定である。



(図4) 移植 CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数と 累積生着率(好中球) (四分位解析)



(図5) 移植 CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数と 累積生着率(血小板) (四分位解析)

#### D. 考察

今回の研究により、移植用 CB に含まれている CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数が、146~49,450 個 (中央値 3,227 個) (最大値/最小値比 339) と非常に幅広く分布していることが初めて明らかにされた。換言すると、CB 間の個体差が非常に大きいことが初めて確認されたと言える。

また、移植臨床の現場において移植用 CB を選択する際に、HSC 活性の指標として最も重要視されている TNC 数、CD34<sup>+</sup>細胞数が、CB に含まれている CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を適切に反映していない可能性が強く示唆された (論文投稿中)。

このことは、本邦において重要な移植法として確立されている UCBT の実地臨床において重要な意義を持っている。周知のように、UCBT は、骨髄移植や末梢血幹細胞移植に比べて生着不全が多く、造血回復や免疫回復が遅延するなど臨床的な課題が多い。そこで、これらの課題を克服するためには、臍帯血ユニットに含まれている CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>HSC 数を正確に測定し、移植後の成績 (特に、移植後 100 日までの生着不全、造血回復) との相関を明らかにする前向き臨床観察研究が必須不可欠と考えられる。

今回、移植例数 134 例での予備的解析の結果

で、移植した CD34+CD133+HSC 数と造血回復の正の相関傾向が示唆されたことから、多数例における解析で、移植した HSC 数と造血回復の関係が明らかになることが期待される。

**移植後の造血回復の改善は、感染症や出血のリスクを減少させることで、入院期間の短縮、抗生物質、G-CSF、血小板製剤の使用量の減少等により、大きな医療経済効果を生むものと思われる。**

本研究の成果により、UCBT における生着不全や造血回復の遅延などの臨床的な課題を克服する重要な手掛かりが得られ、安全で効率的な UCBT の確立が期待される。

## E. 結論

従来、UCBT における HSC 活性の指標であった TNC 数、CD34+細胞数は、個々の臍帯血ユニットに含まれている CD34+HSC 数を正確に反映していないことが明らかにされた。今後、移植 CD34+CD133+HSC 数と移植後の造血回復、生着不全との相関を明らかにする前向き臨床研究が極めて重要になると考えられた。

すでに CD34+ CD133+HSC 数を測定した臍帯血ユニットが、近畿さい帯血バンクで移植用に公開され、すでに提供が開始されている。平成 29 年 11 月末現在で、公開数 475 件、提供数 134 件となっている。今後、移植後 100 日の TRUMP データを用いて、200 例で中間解析、500～600 例で最終解析を行う予定である。

## F. 健康危険情報

該当事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当事項なし。

### 2. 学会発表

松岡由和、藤岡龍哉、角出啓輔、浅野弘明、松本加代子、藤村吉博、園田精昭：CD133 抗原を用いる移植用臍帯血の造血幹細胞活性評価法の開発 非血縁者間臍帯血移植への応用。第 38 回日本造血細胞移植学会総会、平成 28 年 3 月 4 日、名古屋。

園田精昭：ヒト造血幹細胞の純化と階層制の解明 造血幹細胞活性評価法の開発と臍帯血移植への応用。第 74 回大阪血液疾患談話会、特別講演、平成 28 年 7 月 16 日、大阪。

Matsuoka Y, Fujioka T, Sumide K, Hatanaka K, Nakamura F, Matsumoto K, Otani S, Kimura T, Fujimura Y, Asano H, Sonoda Y. Quantification of the actual numbers of transplantable CD34+CD133+ hematopoietic stem cells residing in the umbilical cord blood (UCB) units: A new indicator of quality assurance of UCB units. The 58<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, USA, December 3, 2016.

松岡由和、藤岡龍哉、角出啓輔、浅野弘明、大谷智司、木村貴文、藤村吉博、畑中一生、中村文明、園田精昭：CD133 抗原を用いる移植用臍帯血の造血幹細胞活性評価法の開発 移植用臍帯血ユニットに含まれる HSC 数の計測と臍帯血移植への応用。第 39 回日本造血細胞移植学会総会、平成 29 年 3 月 3 日、松江。

松岡由和、藤岡龍哉、角出啓輔、畑中一生、中村文明、大谷智司、木村貴文、浅野弘明、園田精昭：CD133 抗原を用いる移植用臍帯血の造血幹細胞活性評価法の開発 HSC 数の計測と臍帯血移植への応用。第 79 回日本血液学会総会、平成 29 年 10 月 20 日、東京。

松岡由和、藤岡龍哉、角出啓輔、浅野弘明、大

谷智司、木村貴文、藤村吉博、畑中一生、中村文明、藺田精昭：CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>造血幹細胞数の定量と移植用臍帯血の造血幹細胞活性評価法の開発。第40回日本造血細胞移植学会総会、平成30年2月2日、札幌。

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当事項なし。