

令和元年5月27日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16194

研究課題名(和文)複数臍帯血ユニットを用いた新規移植法の開発

研究課題名(英文) Development of hematopoietic stem cell products by using multiple cord blood units

研究代表者

石田 隆 (Ishida, Takashi)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：90596470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は臍帯血移植で問題となる血球回復遅延を克服すべく、複数の臍帯血から一度に効率的に造血幹細胞を採取し、移植へ応用する方法の開発を行った。本研究では、一貫して閉鎖系で細胞を採取することにより、清潔かつ簡便な細胞採取のプロセスとなるよう留意した。この方法で得られた造血幹細胞は、感染防御に必要な好中球、止血に必要な血小板、全身に酸素を運搬する赤血球の造血能力を有することが実験的に示唆された。本法により、複数の臍帯血から効率的に十分な造血幹細胞を採取することができれば、移植時の補助製剤として用いることで、移植後血球回復遅延への貢献が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、臍帯血移植後の造血、免疫再構築を促進する新規治療法の開発研究である。この研究成果により、含有細胞数不足の為にdead stockとなっていた大半の臍帯血を移植時の早期造血回復に活用することで、安全な移植医療の実現や臍帯血移植の適応拡大につながる可能性がある。特に血小板や好中球の早期回復は治療関連合併症の軽減に結び付く為、喫緊の課題である。さらに、本法により輸血や抗生剤、サイトカイン療法などの使用頻度が軽減されれば、医療経済効果も期待される。

研究成果の概要(英文)：Because of the highly incidence of the delay of hematopoietic recovery in umbilical cord blood transplantation, treatment related complications are one of the important problems. The low cell dose within each umbilical cord blood unit should be one of the main causes for this clinical problem and limit the use of cord blood. We therefore sought to develop a novel therapeutic approach by using multiple cord blood units, eventually aiming at better transplantation outcomes.

In this research, we developed a novel method to extract viable hematopoietic stem/progenitor cells from multiple cord blood units at one time through a closed system. We also tested a potential of these cells by conducting in vitro colony assay. We observed colony formation of myeloid, erythroid and megakaryocyte progenitors, suggesting that cells collected by our strategy could potentially yield blood cells and shorten myelosuppression phase associated with cord blood transplantation.

研究分野：血液内科学、再生医療学

キーワード：生着改善 複数臍帯血移植 幹細胞増幅 早期血球回復 好中球回復 血小板回復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臍帯血は、様々な利点から年々、移植医療の細胞源として、その需要が高まっている一方で、他の細胞源に比して、移植後の生着不全の割合が高いことが臨床上的問題となっている。この生着不全の最大の原因の一つとして、臍帯血に含まれる細胞数の絶対的な不足が挙げられる。日本臍帯血バンクネットワークが公表した移植に足る十分な細胞数を含む臍帯血ユニットは全体の登録臍帯血のうちの一部のみであり、大部分の臍帯血がdead stock となっている。従って、十分な有核細胞を含まない臍帯血を造血細胞移植に利用する方法を開発することは、移植適応にありながら移植治療を享受することのできない患者に移植を受ける機会を提供すると同時に、現行の少ない細胞数での臍帯血移植を受けている患者にとって、より生着不全を少なくし得る移植方法を提供することにつながるものと考えられる。

これまでに、2つの臍帯血をそのまま混合する事で細胞数を増して、移植する方法が試みられているが、その有用性については否定的な見解がなされている(N Engl J Med. 2014 Oct 30;371(18):1685-94.)。さらに、過去には、3から5ユニットの臍帯血をそのまま混合して有核細胞数の増幅を試みた臨床事例があるが、早期の造血回復には至らなかったと報告された(Leukemia. 2008, 22, 1786-1790)。また、臍帯血を培養により増幅する方法も試みられているが、期待される活性を得るまでに長期の培養期間(14日程度)を要し、大量のサイトカインを使用する等の費用の問題もあり、さらにはユニットごとに培養後の最終産物中の移植細胞活性にばらつきが予想される等、人為的な体外操作の要素が影響し得る。

2. 研究の目的

本研究においては、3つ以上の複数の臍帯血を組み合わせ有効活用する事で、臍帯血移植における血球回復遅延を克服する事を目的とするが、その中で本研究では汎用性を重視し、移植ユニット数を増やす事で細胞数不足の問題を解消し、それにより必要な体外操作を最小限に抑え、かかるコストの低減と最終調製産物における細胞活性の均一化を目指す。現状では移植に足る十分な細胞数を含む臍帯血ユニットは全体の登録臍帯血のうちの一部のみであり、大部分の臍帯血がdead stock となっている背景を踏まえると、十分な有核細胞を含まない臍帯血を造血細胞移植に利用する方法を開発することは、移植適応にありながら移植治療を享受することのできない患者に移植を受ける機会を提供すると同時に、現行の少ない細胞数での臍帯血移植を受けている患者にとって、より生着不全を少なくし得る移植方法を提供することにつながるものと考えられる。さらには医療経済学的効果も期待される。

3. 研究の方法

これまでも我々は、複数ユニットのヒト臍帯血からCD34陽性細胞を採取する試みを行ってきたが、これまでの細胞採取法は、CliniMACS Prodigy(Miltenyi Biotec)という細胞分離機器を用いて凍結臍帯血から有核細胞までを分離し、以降のプロセスは用手的に採取を行うものであった。そこで、今回、我々は、CliniMACS Prodigyにより凍結臍帯血からCD34陽性細胞までを一貫して閉鎖系にて採取する方法の確立を試みることで、より実臨床を目指した方法を模索する。

また、本法の安全性について検討すべく、複数の臍帯血から一度に採取したCD34陽性細胞をアログラフトの関係にあるCD3陽性T細胞と共にinvitroで共培養し、混合リンパ球刺激試験を行う。

さらに、この方法で得られた細胞の造血能力を評価するため、invitroのコロニーアッセイを行う。臍帯血移植では好中球や血小板回復の遅れが予後に大きく影響し、臨床的に極めて重要な問題点であるため、得られた複数臍帯血由来のCD34陽性細胞の骨髄球系、赤芽球系並びに巨

核球系コロニーの形成能を評価する。特に血小板造血を反映する巨核球コロニーについては専用の培地と染色を行い、別途、重点的に評価する。

4．研究成果

我々は臍帯血移植で問題となる血球回復遅延を克服すべく、複数の凍結臍帯血から一度に効率的に造血幹細胞を採取する方法の開発を行った。本研究では、一貫して閉鎖系で採取することにより、清潔かつ簡便な細胞採取のプロセスとなるよう留意した。

臍帯血移植では好中球だけでなく特に血小板回復の遅れが予後を規定することもあり、臨床的に極めて重要な問題点であるため、得られた複数臍帯血由来の CD34 陽性細胞の骨髓球系、赤芽球系並びに巨核球系コロニーの形成能に焦点を当て、in vitro のコロニーアッセイを行い、造血活性を評価した。本法により複数の臍帯血ユニットから得られた造血幹細胞を用いて、コロニーアッセイを行ったところ、骨髓球系や赤芽球だけではなく巨核球のコロニー形成能も十分に有していることが確認された。以上より、この方法で得られた造血幹細胞は、感染防御に必要な好中球、止血に必要な血小板、不足すると貧血になる赤血球の3種類の必須な血液成分の造血能力を有していることが示唆され、本法により、複数の臍帯血から効率的に十分な造血幹細胞を採取することができれば、補助製剤として用いることで移植後血球回復遅延への貢献が期待される。

また、本法による CD34 陽性細胞の取り残しがないかを検討する為、造血幹細胞以外の細胞分画も全て bag 内に回収しているが、この細胞の中に CD34 陽性細胞の残存は少なく、さらには骨髓球系、赤芽球系並びに巨核球系のコロニー形成能も有していないことが確認された。

本研究は、臍帯血移植後の造血、免疫再構築を促進する新規治療法の開発研究である。この研究成果により、含有細胞数不足の為に dead stock となっていた大半の臍帯血を移植時の早期造血回復に活用することで、安全な移植医療の実現や臍帯血移植の適応拡大につながる可能性がある。特に血小板や好中球の早期回復は治療関連合併症の軽減に結びつく為、喫緊の課題である。また、本研究は同時に既報の造血細胞増幅法と互いに補完し得る技術となることも期待される。さらに、本法により輸血や抗生剤、サイトカイン療法などの使用頻度が軽減されれば、医療経済効果も期待される。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

． [Ishida T](#), Ohashi K, Okina C, Ohashi S, Okina S, Miyazaki K and Suzuki T. (These authors contributed equally to this work.): Characteristics of palliative home care for patients with hematological tumors compared to those of patients with solid tumors. International Journal of Hematology, 査読有り, in press, DOI 未定

． [Ishida T](#), Miyazaki K, Okina S, Miyata T, Hayama K, Higashihara M, Suzuki T.: The clinical outcomes of chronic myeloid leukemia patients harboring alternatively spliced BCR-ABL variants. Hematology, 査読有り, 24(1):49-51, 2019 Dec, DOI:10.1080/10245332.2018.1507883

． [Ishida T](#), Akagawa N, Miyata T, Tominaga N, Iizuka T, Higashihara M, Suzuki T, Miyazaki

K.: Dasatinib-associated reversible demyelinating peripheral polyneuropathy in a case of chronic myeloid leukemia. International Journal of Hematology, 査読有り, 107(3), 373-377, 2018, DOI: 10.1007/s12185-017-2339-5

〔学会発表〕(計 8 件)

. Ogura S, Akiya M, Horigome Y, Yoshida I, Okina S, Tadera N, Ishida T, Michishita Y, Yokoyama M, Kamata H, Miyazaki K, Murakumo Y, Suzuki T, Expression of adhesion molecules in intravascular lymphoma: histopathological review of our cases. ポスター発表, 第 80 回 日本血液学会学術総会, 2018, 大阪, (臨床血液, 59, 1655, 2018)

. Ohashi K, Ishida T, Okina C, Ohashi S, Okina S, Miyazaki K and Suzuki T: Characteristics of palliative home care for hematological tumors in comparison with solid tumors, 一般口演, 第 80 回 日本血液学会学術総会, 2018, 大阪, (臨床血液, 59, 1540, 2018)

. 大津真、第 77 回神奈川血液研究会 招待講演『血液免疫難病の克服を目指す幹細胞研究』、2018 年 2 月 17 日 神奈川

. 石田 隆, 第 43 回北里医学会総会, Multiple allogeneic progenitors in combination function as a unit to support early transient hematopoiesis in transplantation, 2017 年 11 月 18 日, 北里大学相模原キャンパス

. Iwase R, Ishida T, Hayama K, Kawada K, Michishita Y, Ogura S, Horigome Y, Tadera N, Okina S, Higashihara M, Miyazaki K and Suzuki T: Successful management of CML-AP with thrombocytopenia harboring T315I mutation by ponatinib. ポスター発表, 第 79 回 日本血液学会学術総会, 2017, 東京, (臨床血液, 58, 1625, 2017)

. Shiono Y, Ishida T, Yokoyama M, Okina S, Michishita Y, Ogura S, Horigome Y, Tadera N, Miyazaki K and Suzuki T: Ibrutinib ameliorated refractory immune-mediated thrombocytopenia associated with CD8⁺CD19⁺ B-CLL. ポスター発表, 第 79 回 日本血液学会学術総会, 2017, 東京, (臨床血液, 58, 1621, 2017)

. 石田隆、第 5 回 血液学アカデミー 一般講演『混合臍帯血ユニット由来移植補助剤の開発』2017 年 9 月 2 日 東京

. 石田隆、第 15 回 先端血液学セミナー 一般講演『混合臍帯血ユニット由来移植補助剤の開発』2017 年 6 月 10 日 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 隆浩
ローマ字氏名：Suzuki Takahiro
所属研究機関名：北里大学
部局名：医学部血液内科学
職名：教授
研究者番号（8桁）：40345210

研究協力者氏名：宮崎 浩二
ローマ字氏名：Miyazaki Koji
所属研究機関名：北里大学
部局名：医学部輸血・細胞移植学
職名：教授
研究者番号（8桁）：90261966

研究協力者氏名：高橋 聡
ローマ字氏名：Takahashi Satoshi
所属研究機関名：東京大学医科学研究所
部局名：先端医療研究センター 分子療法分野
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60226834

研究協力者氏名：大津 真
ローマ字氏名：Otsu Makoto

所属研究機関名：東京大学医科学研究所

部局名：幹細胞研究センター 幹細胞プロセッシング分野

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30361330

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。