

厚生科学研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

<研究課題名>

骨髄非破壊的前処置療法を用いた
同種造血幹細胞移植の開発

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高上 洋一
(所属機関 国立がんセンター中央病院)

平成 14 (2002) 年 4月

【 目 次 】

I. 総括研究報告

国立がんセンター中央病院 高上 洋一
骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植の開発
・・・P 1~5

II. 分担研究報告

金沢大学医学部 中尾 眞二
Graft-versus-leukemia効果の標的となる
マイナー組織適合抗原の同定・・・P 6~8

東京大学大学院 大橋 靖雄
骨髄非破壊的前処置療法の有用性、ならびに急性GVHDの
予防方法に関する検討・・・P 9~13

九州大学大学院 権藤 久司
免疫学的治療としての末梢血幹細胞移植法の評価に関する研究
・・・P14~17

都立駒込病院 森 慎一郎
医師主導型臨床研究による市販後臨床試験の基盤整備に関する研究
・・・P18~20

自治医科大学 小澤 敬也
ドナーリンパ球輸注療法のための細胞制御遺伝子の開発
・・・P21~24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表
・・・P25~28

IV. 研究成果の刊行物・別刷

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括 研究報告書
骨髓非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植の開発

主任研究者 高上 洋一 国立がんセンター中央病院 薬物療法部 医長

研究要旨

我々は、これまで同種移植の恩恵を受けることができなかった高齢者や臓器障害を有する患者に対する根治的治療法としての同種ミニ移植を開発し、85名を対象とした単一施設第I相臨床試験を実施した。その結果、移植前処置に伴う毒性は極めて軽度で、通常の移植術に見られるような重篤な副作用は発生しなかった。他に有効な治療方法を有さない患者を対象としたにもかかわらず、その1年生存率は70%であり、生存患者のQOLも良好に保たれている。しかし、移植片対宿主病(GVHD)対策の重要性が認識され、その改善を目指した第II相多施設共同臨床試験が新GCPに準拠して進行中である。

A.研究目的

本研究では、これまで同種移植を受けることができなかった高齢者や臓器障害を有する患者に対する根治的治療法として、骨髓非破壊的前処置療法を用いたミニ移植法を開発する。その安全性を国立がんセンター中央病院単施設で行う第I相臨床試験で評価すると同時に、その有効性を評価する多施設共同無作為比較第II相臨床試験を行う。

その背景として、同種造血幹細胞移植は有効な治療法ではあるが、一方では治療関連合併症が多く発生する危険な治療でもある。特に患者の年齢が50歳を超える場合や、移植前に既に臓器の働きが低下している患者では、現在の方法で移植を行うと早期死亡率が著しく高くなるために禁忌となる。そこで移植前処置の抗がん剤を減量し、免疫抑制力の強い薬剤を組み合わせることによって、副作用を抑えつつドナー造血幹細胞・リンパ球の生着を図り、抗腫瘍効果は主として同種免疫効果に期待するという新たな移植法がミニ移植である。ミニ移植の適用によって、これまで同種移植の恩恵を受けることができなかった高齢者や臓器障害を有する患者にも、根治的治療法としての同種移植を行える可能性が開かれ、画期的な治療開発研究として期待される。

本第II相臨床試験の最大の特徴は、質の高いエビデンスを得るために、公正で公開された班研究を行い移植、細胞医療に適し

たデータベースを作成し、医師主導研究としては我が国では初めて新GCPに準拠した厳正な前方視的研究を実施することである。これにより、我が国の移植、細胞治療の臨床試験体制の基盤を確立すると同時に、得られたデータを用いて新規開発医薬品、適応外医薬品あるいは細胞治療法の臨床承認申請を可能とする道を開くものである。

B.研究方法

我々は、新たなプリン誘導体であるクラドリピンあるいはフルダラビンとブスルファンを併用するミニ移植を開発し、国立がんセンター中央病院においてその第I相臨床試験を行った。対象となったのは、造血器腫瘍患者のうち、他の治療では治癒や長期生存を期待できないような疾患や病状であるにもかかわらず、年齢制限(55歳)や各種の臓器機能障害があるために通常血縁/非血縁者間同種造血幹細胞移植を行うことができない患者である。ドナーはHLA一致あるいは一座位不一致の血縁ドナーとし、G-CSF 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を1日2回連日皮下注射し、4日目からCOBESpectraを用いて1回約10リッターの血液を処理して、CD34陽性細胞として 3×10^6 個/kgを目標に採取して凍結保存し、前処置終了後に急速に解凍して輸注した。移植後GVHDの予防はcyclosporine単剤で行った。移植後6日目から好中球数が $0.5 \times 10^9/\text{L}$ を超えるまでの間、G-CSF(5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を連日点滴静注し

た。主要評価項目は移植後 100 日以内の早期移植関連死亡とドナー型完全キメラの達成とした。

またミニ移植における最適の移植片宿主病(GVHD)予防法を検討する目的で、同様の治療プロトコルを用いて多施設共同無作為比較第 II 相臨床試験を開始し、移植した後にシクロスポリン単剤と、シクロスポリンとメトトレキサートの併用による方法の 2 群に無作為に割り付ける(各群 30 例、計 60 例)。この試験は、ミニ移植に必要な薬剤の適応拡大承認を得る必要性からも新 GCP で行う。

対象患者については、いずれも患者本人に説明同意文書の内容を極力分かり易い言葉で説明し、説明同意文書 2 部を作製して本人に渡したうえで文書による同意を得た。説明同意文書に本人の自由意志で同意の署名がなされた後に、この文書の 1 部を本人に提供することで倫理性も確保した。本研究は、参加各施設の倫理審査委員会における審査を受けて承認されることが条件となる。

C.研究結果

国立がんセンター中央病院における第 I 相臨床試験は 2002 年 3 月現在、合計 85 名の患者を登録した。高リスク患者が対象となったにもかかわらず、移植後 100 日以内の移植関連死亡者は 11 名のみであった。また 1 年生存率は 70% であり、生存患者の QOL も良好に保たれている。加えて固型腫瘍治療に関しては、腎がんと骨肉腫患者においては腫瘍の縮退を、またメラノーマ症例においては腫瘍増殖の鈍化を観察し、ミニ移植はこれら難治がんに対しても有効な治療となり得る可能性が示唆された。

次に多施設共同第 II 相臨床試験に関しては、我が国における医師主導研究としては初めて、新 GCP に基づいた厳正で透明性のある臨床試験を行うことを計画し、まず生物統計に精通した若手班員を中心として、データ管理業務を行う特定非営利活動法人と共同で臨床試験計画書と症例報告書を含むデータベース案を作成し、次いで公開されたメーリングリスト上で意見を募ってその妥

当性を検証した。その後、本研究の実行可能性を検証する目的で、国立がんセンター中央病院において模擬患者登録を繰り返し、その過程で発見された試験計画書や症例登録表の不備を倫理審査委員会報告事項としての minor modification として追加する作業を行った。施設の訪問監査も実施する体制が整い、2002 年 2 月から患者登録を開始した。このデータベースの基本構造は、今後行われる各種疾患に対する移植、細胞療法の臨床試験に汎用が可能である。

D.考察

本研究では、他に有効な治療方法を有さない高リスク患者を対象としたにもかかわらず、その 1 年生存率は 70% ほどとなり、ミニ移植が画期的な最終的、根治的救済療法となりえることを示した。同種造血幹細胞移植では、超大量化学療法や全身放射線照射によって抗腫瘍効果を強め、その副作用として生じる壊滅的な骨髄傷害を、ドナーの造血幹細胞を輸注することによって補うという概念で始められた治療方法である。しかし最近に至り、移植の治療効果は大量化学療法や放射線照射だけでなく、むしろ同種免疫効果、すなわちドナー由来のリンパ球が抗腫瘍効果(graft-versus-leukemiaあるいは tumor; GVL/GVT)を発揮することに由来することが判明した。そこで、移植前処置の抗がん剤を減量し、副作用を抑えつつドナー造血幹細胞の生着を図り、抗腫瘍効果は主として GVL/GVT 効果に期待するというミニ移植の概念が提案された。GVT 効果は抗がん剤耐性の固形がんにおいても観察されている。

我々は、国立がんセンター中央病院における第 I 相臨床試験の結果から、高齢者あるいは臓器障害を有するなどの理由で、従来の移植法では移植を行うことができなかった患者にも、比較的安全に根治療法を行うことが可能なことを示した。特に、HLA 一致ドナーからの移植においてはミニ移植の安全性が高いため、難治がん治療における本治療の意義は大きいと考える。しかし、急性 GVHD の合併率は通常移植と同程度であったことから、その改善を目指した第 II

相臨床試験を行うことの意義は大である。

E. 結論

ミニ移植後の副作用は通常の移植と比較して軽微であるため、根治的治療法を持たなかった多くの患者を救済できる可能性が示された。今後、治療法のさらなる改善を目指した第 II 相臨床試験を進めて、その有効性を評価する。

F. 健康危険情報

特記すべきものはない。

G. 研究発表

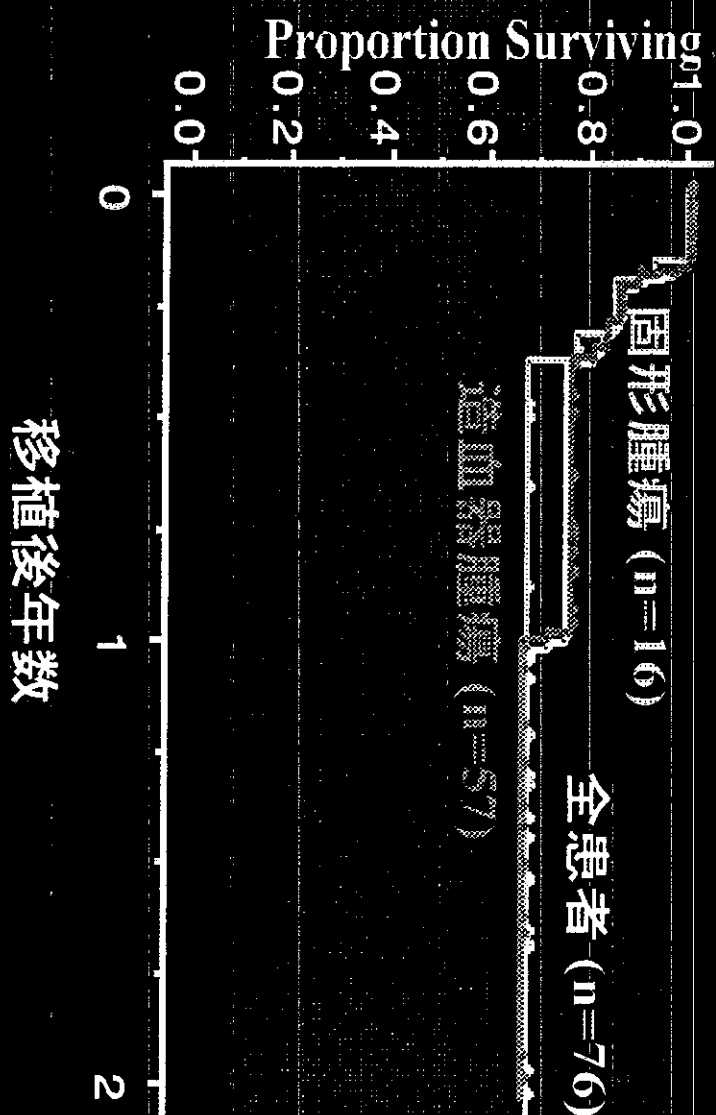
論文発表

1. Mineishi S, Takaue Y. et al: Delayed recovery of neutrophil counts after peripheral stem cell transplantation which improved with minimal dose of G-CSF administration. JJCO, 31:43-45, 2001.
2. Matsubara H, Takaue Y. et al: Suggested clinical benefits of the use of peripheral blood stem cells over bone marrow in allogeneic transplantation settings for the treatment of childhood leukemia. JJCO, 31:30-34, 2001.
3. Asada-Mikami R, Takaue Y. et al: Efficient gene transfection by RGD-fiber modified recombinant adenovirus to dendritic cells. JJCR, 92:321-327, 2001.
4. Kanda Y, Takaue Y. et al: Pre-emptive therapy against cytomegalovirus (CMV) diseases guided by CMV antigenemia assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience in Japan. Bone Marrow Transplant, 27:437-444, 2001.
5. Suenaga K, Takaue Y. et al: Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Exp Hematol, 29:639-642, 2001.
6. Kanda Y, Takaue Y. et al: Frequent detection of rising cytomegalovirus antigenemia after allogeneic stem cell transplantation following a regimen containing anti-thymocyte globulin. Blood, 97:3676-3677, 2001.
7. Saito T, Takaue Y. et al: Early onset *Pneumocystis carinii* pneumonia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Am J Hematol, 67:206-209, 2001.
8. Saito T, Takaue Y. et al: Possible place of non-myeloablative regimen in second transplantation with a mismatched related donor for relapsing and refractory leukemia after initial unrelated donor transplantation. Haematologica, 86:780-781, 2001.
9. Niiya H, Takaue Y. et al: Early full donor myeloid chimaerism after reduced-intensity stem cell transplantation using a combination of fludarabine and busulfan. Haematologica, 86:1071-1074, 2001.
10. Kato K, Takaue Y. et al: T cell conditioned medium efficiently induces the maturation and function of human dendritic cells. J Leukocyte Biol, 70:941-949, 2001.
11. Inoue Y, Takaue Y. et al: Induction of tumor-specific T lymphocytes in prostate cancer patients using prostatic acid phosphatase (PAP)-derived HLA-A2402-binding peptide. J Urol, 166:1508-1513, 2001.
12. Watanabe T, Takaue Y. et al: Decrease in circulating hematopoietic progenitor cells by trapping in the pulmonary

- circulation. *Cytotherapy*, 3:461-466, 2001.
13. Shimokawa T, Takaue Y. et al: Successful umbilical cord blood transplantation in an infant with ALL who failed initial autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Med Pediatr Oncol*, 38:60-61, 2002.
 14. Kanda Y, Takaue Y. et al: Response-oriented pre-emptive therapy against cytomegalovirus disease with low-dose ganciclovir: a prospective evaluation. *Transplantation*, in Press,
 15. Kanda Y, Takaue Y. et al: Long-term low-dose acyclovir against varicella-zoster virus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, in Press,
 16. Ohnishi M, Takaue Y. et al: Limited efficacy of lamivudine against hepatitis B virus infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transplantation*, in Press,
 17. Kami M, Takaue Y. et al: Effect of fluconazole prophylaxis on fungal blood cultures: an autopsy-based study involving 720 patients with hematological malignancy. *Br J Haematol*, in Press,
 18. Nakai K, Takaue Y. et al: Suggested delayed immune recovery against cytomegalovirus after allogeneic blood stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen. *Bone Marrow Transplant*, in Press,
 19. Saito T, Takaue Y. et al: Therapeutic potential of a reduced-intensity preparative regimen for allogeneic transplantation with cladribine, busulfan and anti-thymocyte globulin against advanced/refractory acute leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res*, in Press,
 20. Hamaki T, Takaue Y. et al: Successful allogeneic blood stem cell transplantation for aplastic anemia in a patient with renal insufficiency requiring dialysis. *Bone Marrow Transplant*, in Press,
 21. Watanabe T, Takaue Y. et al: Partially matched transplants with allogeneic CD34⁺ blood cells. *Leuk Lymphoma*, in Press,
 22. Kanda Y, Takaue Y. et al: Impact of stem cell source and conditioning regimen on erythrocyte recovery kinetics after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation from an ABO-incompatible donor. *Br J Haematol*, in Press,
 23. Kami M, Takaue Y. et al: Gastrointestinal tract is a common target of invasive aspergillosis in patients receiving cytotoxic chemotherapy for hematological malignancy. *Clin Inf Dis*, in Press,
 24. Hamaki T, Takaue Y. et al: Successful allogeneic blood stem cell transplantation for aplastic anemia in a patient in a patient with renal insufficiency requiring dialysis. *Bone Marrow Transplant*, in Press,
 25. Kami M, Takaue Y. et al: Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Br J Haematol*, in Press,
- H.知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
特になし

三二移植の治療成績

Overall Survival (1999年9月～2002年2月)



Graft-versus-leukemia 効果の標的となるマイナー組織適合抗原の同定

分担研究者 中尾 眞二 金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学 教授

研究要旨 Graft-versus-leukemia (GVL) 効果の標的となるマイナー組織適合抗原 (mHA) を同定するため、移植後再発に対してドナーリンパ球輸注 (DLI) を受けた慢性骨髄性白血病患者の末梢血から GVL 効果担当 T 細胞を同定し、T 細胞レセプター (TCR) β 鎖の CDR3 領域のアミノ酸配列を決定した。この T 細胞の CDR3 モチーフ QDR は、myelin-basic protein (MBP) を認識する T 細胞クローンのモチーフと一致していた。そこで、MBP 特異的 T 細胞が認識する MBP の変性ペプチドに含まれる蛋白の一つ、CD49b について、TCR 結合部位の多型性を検索したところ、ドナーでは CD49b 遺伝子の 814 位 A が T に変わる 1 塩基多型 (SNP) のため、コドン 256 のアミノ酸 Ile が Val に置換されていた。ドナー由来の GVL 担当 T 細胞は、ホスト型の CD49b ペプチド (CD49b²⁵²⁻²⁶⁶) に対して特異的な増殖反応を示した。したがって CD49b²⁵²⁻²⁶⁶ は、GVL 効果の標的となる新たな mHA と考えられた。

A. 研究目的

mHA の不一致は移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) の原因となるが、血液細胞だけが選択的に発現している mHA の不一致は、GVHD を惹起せずに GVL 効果だけを誘導する。このため、血液細胞に特異的な mHA は、抗白血病免疫を誘導する上でもっとも理想的な抗原と考えられている。しかし、このような mHA はこれまでのところごく少数しか同定されていない。同種免疫の効力を多くの白血病治療に適用するためには、新たな mHA の同定が不可欠である。われわれは、同種骨髄移植後の慢性骨髄性白血病再発に対して DLI を受けた患者の末梢血 T 細胞レパトアを経時的に観察することにより、GVL 効果の出現に一致して、一部の T 細胞が一過性にクローン性増殖を示すことを見いだした (Kondo Y, et al., *Exp Hematol*, 29: 471, 2001)。この T 細胞の標的抗原は、新たな mHA の可能性がある。そこで、この T 細胞のクロナタイプからエピトープを推測する新たな方法を試みた。

B. 研究方法

GVL 効果担当 T 細胞クローンの β 鎖 CDR3 モチーフ (QDR) を持つ T 細胞を Genbank 中に検索した。血液細胞が選択的に発現している分子について、ホストおよびドナー由来の cDNA を特異的なプライマーを用いて増幅し、Single strand conformation polymorphism 解析を行うことにより多型性の有無を検索した。多型が認められた CD49b の cDNA については全塩基配列を決定した。ドナー由来の末梢血単球から樹状細胞を誘導し、ホスト型の CD49b ペプチドをパルスした樹状細胞で T 細胞を刺激することにより、多型ペプチドに対する T 細胞クローンの増殖反応を検討した。採血と DNA 検査に関しては、患者およびドナーに研究の意義を説明したのち文書にて同意を得た。

C. 研究結果

GVL 効果担当 T 細胞の CDR3 モチーフ (QDR) は, HLA-DRB1*1501 によって提示される myelin-basic protein (MBP) の 85-99 ペプチドを認識する T 細胞と一致していた. この MBP 特異的 CD4 陽性 T 細胞が反応しうる変異ペプチドのうち, 血液細胞が選択的に発現し, かつ多型性があることがすでに知られている分子を検索したところ, CD49b の I domain 中の 252-266 ペプチド (CD49b²⁵²⁻²⁶⁶) が同定された. このペプチド領域については多型の存在は知られていなかったため, 患者由来の白血病細胞とドナーの単核細胞由来の CD49b cDNA をシークエンスしたところ, T 細胞レセプターの結合部位にあたるコドン 256 部位が, 患者では通常の Ile であったのに対し, ドナーでは 814 位 A の T への置換のため Val に変わっていた. 寛解時に得られた患者の (ドナー由来) 骨髄単核細胞を, ホスト型の CD49b²⁵²⁻²⁶⁶ で刺激したところ, 最初に同定した GVL 効果担当細胞と同じクロナタイプの T 細胞の増殖が確認された. また, この T 細胞を含む培養 T 細胞は, ホスト型の CD49b²⁵²⁻²⁶⁶ をパルスした HLA-DRB1*1501 L 細胞に対して特異的な増殖反応を示した.

D. 考察

CD49b は $\beta 2$ インテグリンとも呼ばれ, 血小板や単球などの血液細胞に選択的に発現されている接着分子である. CD49b には, 505 位や 807 位の SNP があることが知られており, 505 位の多型は mHA として機能しうることも示されている.

一般に mHA を同定するためには, 発現クローニングや多型解析などの多大の労力と時間を要するアッセイが必要であった. 今回われわれは, *in vivo* で GVL 効果を担当していると考えられる

T 細胞クローンのクロナタイプから, 抗原が分かっている既存の T 細胞を同定し, この T 細胞が認識する変性ペプチドの中から, 血液細胞が選択的に発現している多型分子をスクリーニングするという新たな方法をとった. その結果, これまでは報告されていなかった CD49b の新しい多型部位が同定された. 患者の末梢血には, この多型部位を含む CD49b²⁵²⁻²⁶⁶ を特異的に認識する T 細胞が存在することから, CD49b²⁵²⁻²⁶⁶ は CML 患者において GVL 効果の標的となる mHA であると考えられた.

E. 結論

CD49b²⁵²⁻²⁶⁶ は, CML に対する GVL 効果の標的となる新たな mHA と考えられる.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kondo Y, Shiobara S, Nakao S. Identification of T-cell clones showing expansion associated with graft-versus-leukemia effect on chronic myelogenous leukemia in vivo and in vitro. *Exp Hematol* 29: 471-476, 2001
2. Takami A, Chuhjo T, Feng X, Kondo Y, Yamauchi H, Yasue S, Shiobara S, and Nakao S: Non-myeloablative stem cell transplantation for accelerated-phase chronic myeloid leukaemia: circumvention of graft rejection with donor leukocyte infusion early after transplantation. *Br J Haematol* 115: 483-484, 2001

3. Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Sommer M, Lefell S, Ueda M, Nakao S, and Hess AD.
Characterization of the T-cell repertoire in autologous graft-versus-host disease (GVHD): evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in the development of autologous GVHD. Blood 98: 868-876, 2001

2. 学会発表

Kondo Y, Kotani T, Feng X, Shiobara S, Nakao S. Identification of a novel polymorphism in the I domain of CD49b: a candidate minor histocompatibility antigen as a target of graft-versus-leukemia effect on chronic myeloid leukemia. The American Society of Hematology 43rd Annual Meeting and Exposition. December 7-11, 2001. Orlando, Florida

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
3. その他
なし

平成 13 年度厚生科学研究費助成金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書
骨髓非破壊的前処置療法の有用性、ならびに急性 GVHD の予防方法に関する検討

分担研究者 大橋 靖雄 東京大学医学系研究科生物統計学 教授

研究要旨：本研究では、従来の前処置療法と比較して、治療関連毒性が軽い骨髓非破壊的前処置療法を用いて 50 歳以上 70 歳未満の患者を対象としたミニ移植術を行い、高齢者における本治療法の有用性（安全性・有効性）を検討する。又、GVHD 予防法に関して、本研究の前処置で広く用いられるシクロスポリン単剤による方法とシクロスポリンとメソトレキサート併用による方法の 2 群で比較・検討する。本研究のデータセンターは非営利活動法人（NPO）日本臨床研究支援ユニット内（J-CRSU）におかれ、一切のデータマネジメント業務と質保証を担当する。本研究の有用性が確認された場合、前処置で用いた薬剤（リン酸フルダラビン）の適応症申請も想定しており、新 GCP を遵守した高い質管理を目指すとともに、移植医療の特殊性も考慮しつつ移植関連における研究者主導研究のプロトタイプ作りを目標とする。

A. 研究目的

従来の前処置療法と比較して、治療関連毒性が軽い骨髓非破壊的前処置療法を用いて 50 歳以上 70 歳未満の患者を対象としたミニ移植術を行い、高齢者における本治療法の有用性（安全性・有効性）を検討する。又、GVHD 予防法に関して、本研究の前処置で広く用いられるシクロスポリン単剤による方法とシクロスポリンとメソトレキサート併用による方法の 2 群で比較・検討する。本研究においてミニ移植の有用性が確認された場合、前処置で用いた薬剤（リン酸フルダラビン）の輸入販売会社に対し、適応症申請を要請し、研究成果の社会への還元を図る。

現在改訂が検討されている薬事法（案）においては、適応外薬剤の研究者への提供と成果の申請利用が謳われている。後者の条件は GCP 遵守による質保証であるが、その具体的レベルは現時点では明らかではない。移植医療の特殊性を鑑みると、現在医薬品機構において実施されている信頼性保証のレベルを本領域の研究者主導研究で実施・保証することは現実的ではなく、かつ科学的には over-quality と言わざるをえない。今後の研究者主導研究のプロトタイプ作りを、理念のみで

はなく実務・SOP レベルで行うことが本研究の目的である。

B. 研究方法

1. 対象：他治療では治癒や長期生存の確率が低く、同種造血幹細胞移植の適応であると考えられる状態であるにも関わらず高齢であるが故に適応外となる患者である。対象疾患は、急性骨髓性・リンパ性白血病（第一・第二寛解期）、慢性骨髓性白血病（第一・第二慢性期）、あるいは骨髓異形成症候群（FAB 分類の RA, RARS, RAEB のうち、抗がん剤治療不要で 3 ヶ月以上の安定した状態を維持するもの）であり、HLA 完全一致の同胞ドナーを有し、50 歳以上 70 歳未満の症例を対象とする。

2. 方法：試験の対象者（ドナー・レシピエント）に、試験への参加に関する文書による同意を得る。造血幹細胞移植は、ドナーより造血幹細胞を採取する作業と、採取した造血幹細胞をレシピエントへ輸注する作業の二つよりなるため、登録も仮・本登録の 2 段階登録制を用いる。仮登録後、ドナーより末梢血幹細胞を採取する。ここで、採取細胞数が必要細胞数（レシピエントの体内で生着する為

に必要とされている細胞数)に到達した場合に、本登録可能となる。本登録の際に、GVHD 予防に関するシクロスポリン単独群とシクロスポリン・メソトレキサート併用群の 2 治療群ヘランダム割付を行う。割付調整因子として、基礎疾患、施設、年齢、性別を用いる。

3. 症例数：各群 30 症例、合計 60 症例である。

4. 研究期間：平成 13 年 7 月より平成 15 年 12 月まで。

5. 収集するデータ：

問診：生年月日、性別、既往歴、家族歴、治療歴、使用中の薬剤など

身体所見：全身状態、身長、体重、体温、血圧、脈拍、食事摂取量、自覚所見

原疾患の評価：血液検査、骨髄検査

臓器機能評価：肝臓・腎臓、心臓、呼吸器などの臓器機能評価、活動性感染症の鑑別、血液検査

治療関連臓器毒性（前処置に伴う毒性の評価）：Bearman の毒性 grading に従い、心臓、膀胱、腎臓、肺、肝臓、中枢神経、胃腸の毒性を評価する。

有効性の評価：生着（血液検査による造血回復の評価）、キメリズム解析（造血細胞がドナー由来か、レシピエント由来かを評価する）、免疫能の推移、血液検査・骨髄検査などによる原疾患の評価。

移植に伴う合併症評価：急性・慢性 GVHD、VOD、感染症などを評価する。

安全性の評価：試験を通じて生じたあらゆる有害事象を評価する。

6. 試験のデータマネージメントと質管理（NPO 法人 J-CRSU で担当）：

プロトコル作成段階から第三者機関としてのプロトコル review

調査票・データベース作成

登録・割付業務

質管理・保証：試験説明会開催、試験説明用ビデオ作成、新 GCP など臨床試験を中心とした啓蒙活動、データの質管理（不審確認・問合せ、進捗管理など）、質保証（施設訪問監査等による）

有害事象ハンドリング

解析計画書作成、統計解析、報告書作成

C. 試験進捗状況

1. 研究開始時期：平成 13 年 11 月より登録開始、平成 13 年 1 月に第一例目が登録された。平成 13 年 3 月現在、登録症例数は 3/60 例。

2. プロトコル、調査票、データベースの改定：プロトコルの改定は最小限にとどめるべきであるが、移植医療領域における特殊性を考慮した研究システムを構築するのは、我が国でははじめての試みでもあり、その観点から、適切な手順を踏みつつ、必要なプロトコル、調査票、データベースの改定を行った。具体的には、試験説明会での質疑応答で生じた問題点、試験実施途中で発生した問題点に関して、メーリングリストなどで意見を収集し、改定の必要性が明らかになった場合には、総括責任医師及びプロトコル委員が改定の是非について決定することとした。J-CRSU では、プロトコル改定の妥当性に関し検討を加え、議案の経緯と最終的な決定事項に関する報告書の作成を行い、参加施設へ配布すると共に、その議事録を保管することとした。調査票及びデータベースに関しても同様である。今後も手順書の作成と見直しを行いつつ、必要なプロトコル等の改訂を行っていく予定である。

3. 質管理・保証：

試験説明会の開催：国立がんセンター、東京大学医学部附属病院、九州地区で約 1.5-2 時間/回行った。問題点が発生した場合は、先に述べた手順でプロトコル改定や申し合わせ事項を作成した。

試験説明用ビデオ作成：全国規模の試験実施にあたり、少ない人手で試験説明会のために全国を訪問することには限界があることから作成した。東京大学医学部附属病院 UMIN 事務局の協力を得た。平成 13 年 1 月に完成し、IRB 承認施設に配布した。

試験説明用ホームページ作成：症例のリクルートの目的、試験の公開の目的で平成 13 年 1 月に作成・公開した。

中央モニタリング：進捗管理、検査会社、製薬企業などとの連絡網作成、有害事象管理などを行っている。

調査票 review：未施行であるが、調査票が回収できた段階で定期的開催し、問題点の抽出につとめる予定である。医師によるレビューとデータマネージャーによるレビューの組み合わせのタイミングが検討課題である。

施設訪問監査：各施設登録第 1 症例目の観察が終了した時点で全例行い、その状況に応じて、2 例目以降の監査の必要性を決定する予定である。

4. 有害事象の取り扱い：

有害事象、中でも前処置関連毒性の評価の取り扱いは、造血幹細胞移植領域における市販後の臨床試験を考える上で重要な課題である。造血幹細胞移植療法の有害事象を考える上での最大の特徴は、治療薬として複数の薬剤が組み合わされて用いられること、これまで造血幹細胞移植前処置薬で保険承認薬がメルファラン以外に一剤もないことである。この異常な状況の中で、「査定されない」が故に、長きに渡り、この問題点が重要視されることなく移植医療が行われてきた背景がある。本試験では、この状況を打破することを目的の一つに掲げている。

(1) 問題点：

使用する薬剤の添付書類に記載されている副作用を既知、それ以外は未知の有害事象として扱い、既知の有害事象に関しては、重篤なもの、未知中等度以上の有害薬物反応を緊急・詳細報告の対象として扱うことがプロトコル上、規定されている。通常採用されている NCI-CTC グレード 2 を中程度の基準としてこれに従った場合、移植医療では、緊急報告の対象となる有害事象が莫大になり、実務上システムが膠着し、さらには重要な安全性上の問題を見のがす危険さえ発生する可能性がある。緊急有害事象報告を行う本来の目的は、迅速な情報把握により試験継続やプロトコル改定の是非を科学的根拠に基づき速やかに決定し、現在あるいは将来の対象症例のリスクを最低限にすることにある。試験開始後、データセンターで受ける緊急有害事象報告は非常に多い一方、これらの毒性は移植前処置によるものとして予測可能であり重症度も高くないことが明らかとなってきた。移植前処置関連毒性として構築された

Bearman の毒性評価と、今回有害事象報告の指標として用いることになっている NCI-CTC ver2.0 JCOG 日本語版の毒性 grade の設定にずれがあることも明らかとなった（付表 1）。

(2) 問題解決の為の課題：

既知・未知の定義

単剤の場合は、用いる薬剤の添付書類に記載があれば既知、それ以外は未知として扱うことが可能である。抗がん剤に代表されるように複数の薬剤を組み合わせる一つの治療法として評価する場合、発生した有害事象が単剤の薬剤に起因するものであることを証明することは極めて困難である。現時点では、既知・未知の定義は単剤にならない、又、いずれかの添付文書に記載されていない項目は未知扱いとしてデータを収集する地道な作業が必要である。

造血幹細胞移植における有害事象の特徴：

1988 年、Bearman SI らにより、移植前処置による毒性評価の為のシステムが構築された。これは、白血病に対し骨髄移植が施行された 195 症例の retrospective な解析に基づいており、移植に特有の 8 つの臓器・症状などに着目し、0（正常）～4（致命的なもの）の 5 段階に分類したものである。解析対象全症例で少なくとも 1 つの臓器に grade I の毒性を認め、30 以上に grade III~IV の致命的な有害事象を認めている。又、day100 での生存は、全体で 66%(128/195)、maximum toxicity が grade I/II/III で 84.8% / 74.2% / 10.5%であることが示されている。更に、この Bearman の毒性規準における grade I は、NCI-CTC version 2.0（JCOG 日本語版）においては、概ね grade 2 に相当することが示された（付表 1）。以上より、移植前処置関連毒性として、NCI-CTC version 2.0（JCOG 日本語版）の grade 2 以上の未知有害事象が移植領域ではほぼ全例で生じる可能性と、これが試験継続に関わる決定的な問題にはならない可能性が示された。但し、造血幹細胞移植にはいくつかの薬剤の組み合わせもあり、本試験を含め、今後予定されている試験を併せ、有害事象に関するデータを集積し、参照可能なデータベースを作

り、社会への還元を図ることが重要であると思われる。

D. 今後の課題・予定

1. 登録奨励：登録開始後約 5 ヶ月で登録症例数 3/60 と少ない。既に国立がんセンターの医師らが中心となり、症例のリクルート活動（班会議や学会を利用）を行っている。但し、症例のリクルート活動が盛んになれば、当然ながらデータの取り扱いが問題となる（紹介元が IRB 未承認施設である場合のデータの利用に関する問題など）。各種必要書類を作成する必要がある。
2. 質管理・保証：調査票 review や施設訪問監査の手順書などを作成する必要がある。
3. 有害事象取り扱いに関するデータベースの構築

E. 研究発表

現時点では未発表

付表 1 Bearman RRT – NCI toxicity

心毒性		grade0	grade1	grade2	grade3	grade4
Bearman	総合評価	正常				致死毒性
	臨床検査data					
	生理検査		治療不要のECG軽度異常	治療を要するECG軽度異常/治療不要だが継続的なモニタリングが必要/ジギタリスや利尿剤に反応するうつ心性心不全	治療に全くあるいは部分的にしか反応しない重度のECG異常/治療に全くあるいは少ししか反応しない心不全/50%以上のvoltage低下	
	画像検査		臨床症状なしのXP心拡大			
NCI	毒性評価	grade0	grade2に相当	grade3に相当	grade3-4に相当	grade 4に相当
肺毒性		grade0	grade1	grade2	grade3	grade4
Bearman	総合評価	正常				致死毒性
	臨床症状		抗がん剤投与最終日から2日以内の肉眼的血尿(+)かつ膀胱炎症状(-)かつ感染(-)	抗がん剤投与最終日から7日以内の肉眼的血尿(+)かつ感染(-)/抗がん剤投与最終日から2日以内の肉眼的血尿(+)かつ膀胱炎症状(+)かつ感染(-)	明らかな出血性膀胱炎(+)かつ硬化剤を用いた硬膜部分的介入や膀胱摘出、その他の外科的処置が必要なもの	
	臨床検査data					
	生理検査					
NCI	毒性評価	grade0	grade 2-3に相当	grade 2-3に相当	grade 3に相当	grade 4に相当
腎毒性		grade0	grade1	grade2	grade3	grade4
Bearman	総合評価	正常				致死毒性
	臨床検査data		Cre:ベースライン値(前処置開始直前の値)の2倍	Cre:ベースライン値(前処置開始直前の値)の2倍以上であるが、透析不要	透析必要	
	生理検査					
	画像検査					
NCI	毒性評価	grade0	grade 2に相当	grade 3-4に相当	grade 3-4に相当	grade 4に相当
呼吸性		grade0	grade1	grade2	grade3	grade4
Bearman	総合評価	正常				致死毒性
	臨床症状		画像変化(-)の呼吸困難かつ感染(-)かつうつ心性心不全(-)/画像で浸潤影(+)又は軽度間質性変化(+)かつ臨床症状(-)かつ感染(-)かつうつ心性心不全(-)	広範囲の浸潤影(+)or中等度の間質性変化(+)かつ呼吸困難(+)かつ感染(-)かつうつ心性心不全(-)/人工呼吸器不要のPO2低下(ベースライン値より>10%)<50%の酸素マスク投与を要するPO2低下(ベースライン値より>10%)かつ感染(-)かつうつ心性心不全(-)	人工呼吸器を要するPO2低下<50%の酸素マスク投与を要するPO2低下かつ感染(-)かつうつ心性心不全(-)	
	臨床検査data					
	生理検査					
NCI	毒性評価	grade0	grade1-2に相当	grade2-3に相当	grade4に相当	grade 4に相当
肝毒性		grade0	grade1	grade2	grade3	grade4
Bearman	総合評価	正常				致死毒性
	臨床症状		非心原性の体重増加(ベースライン値の>2.5%~<5%)	臨床的胆水貯留/非心原性の体重増加(ベースライン値の>5%)	肝性脳症/呼吸機能に影響する胆水貯留	
	臨床検査data		軽度肝機能低下: Bil >=2mg%~<=6mg%/SGOT上昇(前処置直前の最低値の)	中等度肝機能低下: Bil >6mg%~<20mg%/SGOT上昇(前処置直前の最低値の>x5)	重度肝機能低下: Bil >20mg%/SGOT上昇(前処置直前の最低値の>x5)	
	生理検査			腹水貯留		
NCI	毒性評価	grade0	grade 2-3に相当	grade 3-4に相当	grade 3-4に相当	grade 4に相当
中枢神経毒性		grade0	grade1	grade2	grade3	grade4
Bearman	総合評価	正常				致死毒性
	臨床症状		すぐに寛解し、寛解後適応可能な眠気	寛解後錯乱を伴う眠気/意識障害を伴わないその他の新たな中枢神経症状かつ薬剤性(-)かつ出血(-)かつCNS感染(-)	痙攣又は昏睡かつ薬剤性(-)かつ出血(-)かつCNS感染(-)	
	臨床検査data					
	生理検査					
NCI	毒性評価	grade0	grade 2に相当	grade 2-3に相当	grade 3-4に相当	grade 4に相当
骨髄		grade0	grade1	grade2	grade3	grade4
Bearman	総合評価	正常				致死毒性
	臨床症状		麻薬性薬剤の持続静注不要の疼痛or潰瘍	麻薬性薬剤の持続静注(モルヒネ静注)を要する疼痛or潰瘍	予防的挿管を要する重度の潰瘍or粘膜炎/挿管(+)に伴う誤飲性肺炎	
	臨床検査data					
	生理検査					
NCI	毒性評価	grade0	grade 2に相当	grade 3に相当	grade 3-4に相当	grade 4に相当
腸管毒性		grade0	grade1	grade2	grade3	grade4
Bearman	総合評価	正常				致死毒性
	臨床症状		毎日水様性下痢 >500mL~<2000mLかつ感染(-)	毎日水様性下痢>2000mLかつ感染(-)/循環動態に影響を及ぼさない肉眼的血便かつ感染(-)/サイブレウスかつ感染(-)	イレウス管による吸引や外科的処置を要するイレウスかつ感染(-)/循環動態に影響を及ぼし、輸血を要する出血性腸炎かつ感染(-)	
	臨床検査data					
	生理検査					
NCI	毒性評価	grade0	grade 2に相当	grade 3に相当	grade 4に相当	grade 4に相当

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

免疫学的治療としての末梢血幹細胞移植法の評価に関する研究

分担研究者 権藤 久司 九州大学大学院病態修復内科学 助手

研究要旨 骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植（ミニ移植）後の免疫機能の特徴を明らかにするために、サイトメガロウイルス（CMV）感染・感染症の発症頻度、および CMV 特異的 T 細胞数について経時的に検討した。CMV 感染が 6 例中 2 例に確認されたが、CMV 感染症の合併は認められなかった。CMV 感染を認めた 2 例の初回検出時は day 45 と day38 であり、移植後やや遅れて検出された。CMV 特異的 T 細胞は、移植後 1 ヶ月目の早期に 5 例中 2 例で検出された。いずれも HLA 一致同胞からの移植例であった。CMV 特異的 T 細胞数と CMV 感染・感染症との間には、症例数が少なく一定の関連性は見出せなかった。今後の症例の集積が望まれた。

A. 研究目的

骨髄非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植（以下、ミニ移植）は、超大量放射線化学療法を併用したこれまでの移植法とは異なり、前治療を減量し、移植片の免疫学的機序に基づく抗腫瘍効果を応用した治療法である。しかしながら、その作用機序の基礎となる免疫学的機能、およびその再構築に関する検討はなされていない。そこで、同種移植後に合併するサイトメガロウイルス（CMV）感染・感染症、および CMV 特異的 T 細胞数を指標として、ミニ移植後の免疫機能について検討を行った。

B. 研究方法

ミニ移植を実施した症例を対象に、移植後、定期的な CMV 感染・感染症のモニタリングと、CMV 特異的 T 細胞数の測定を行った。ミニ移植の前処置は、fludarabine (Flu) 25 mg/m², 5 日間と

cyclophosphamide (CY) 30mg/kg, 2 日間を 5 例に、Flu 30 mg/m², 6 日間と busulfan (BU) 4 mg/kg, 2 日間を 1 例に用いた。GVHD 予防には、cyclosporine 3mg/kg/day と methotrexate 10mg/m², day 1; 7 mg/m², day 3, day 6 を投与した。CMV 感染の検出は、移植後、毎週、抗原血症検査（HRP-C7）と real-time PCR（GeniQ CMV）を用いて行った。CMV 抗原陽性細胞が 1 個以上検出された場合、および CMV DNA が 2x10² copies/mL 以上検出された場合を CMV 感染と診断した。CMV 感染症は、臓器所見を認め組織学的に CMV 感染が確認された場合に診断した。CMV 特異的 T 細胞の測定は、HLA A24 を有している症例を対象とし、HLA A2402 に特異的なテトラマーを用い FACS にて行った。ミニ移植の実施、また CMV 特異的 T 細胞の検査は、informed consent が得られた症例を対

象とした。

C. 研究結果

1) 移植成績

2001年5月から2002年2月までに造血器腫瘍の6例にミニ移植を行った。表1に対象症例を示す。幹細胞は、G-CSF投与にて末梢血中に動員された末梢血幹細胞を用いた。移植時病期は、標準リスクが3例、進行期が3例であった。HLA一致同胞間移植が4例、不一致血縁者移植が2例であった。

生着に関しては、UPN 2で完全キメラ(90%以上)が得られず、その後、再発しドナー細胞は拒絶された。残りの5例では完全キメラが確認された。

生存率に関しては、6例中2例(いずれも進行期移植)が早期に再発し死亡した。残りの4例は無病生存中である。なかでもUPN1は、第3再発期での移植であったが、移植後、完全寛解が10ヶ月間持続し、remission inversionが得られ、ミニ移植の有効性が示唆された。

2) CMV感染・感染症とCMV特異的T細胞

移植前、レシピエント、ドナーともCMV抗体は陽性であった。また、ドナーはいずれもHLA A24を有していた。CMV感染は、UPN1でday 45に、UPN3でday 38に確認された。いずれもganciclovirを投与し、CMV抗原陽性細胞およびCMV DNAは消失した。CMV感染症の発症は認められなかった。6例中4例には、CMV感染が認められなかった。CMV特異的T細胞は、UPN3およびUPN4で、移植後1ヶ月目の早期

にリンパ球中の0.2%以上に認められた。いずれもHLA一致同胞からの移植であった。CMVの再活性化とCMV特異的T細胞数との関連は明らかではなかった。

D. 考察

Flu/CYの前治療を用いたCMMoL症例で完全キメラ状態が得られず、その後、移植片は拒絶された。CMLに対しFlu/CYを用いた米国からの報告でも、生着不全、不完全キメラ、拒絶などの合併症が多く認められており、腫瘍量の多い疾患に対するFlu/CYの前治療は、完全キメラ達成のためには不十分な前治療と考えられた。

CMV感染は6例中2例に認められた。HLA一致同胞間移植では50-60%、それ以外の移植では90%以上のCMV感染率が報告されており、それらの結果と比較すると、観察期間が短いものの、ミニ移植後はCMV感染率が低い可能性が示唆された。

CMV特異的T細胞は、HLA一致同胞から移植した3例中2例で、移植後1ヶ月目の早期から検出されたのに対し、HLA不一致血縁者間移植の2例では、CMV特異的T細胞が検出されず、再構築は遅延していた。Cwynarskiらは、HLA一致同胞間移植と非血縁者間移植で同様な成績を報告しており、HLA一致度が移植後のCMV特異的T細胞の再構築に関与していることが推測された。

いずれも検討症例数が少なく、結論を導くことは危険であった。今後の症例の集積が望まれた。

E. 結論

ミニ移植後の免疫機能の解析において、CMV 特異的 T 細胞の測定は有力な手段となる可能性が示唆された。ミニ移植後の免疫機能の特徴を明らかにするためにも、今後の症例の集積が望まれた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1)K Yakushiji, H Gondo, K Kamezaki, et al: Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. Bone Marrow Transplant 2002 (in press)

2)M Harada, H Gondo, F Kawano: High-dose chemotherapy with autologous PBSCT as post-remission therapy for AML. Bone Marrow Transplant 27: 347, 2001.

3)S Shiobara, S Nakao, M Ueda, et al: Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: Indications and dose escalation. Therapeutic Apheresis 5: 40-45, 2001.

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
3. その他：なし

I. その他

CMV 特異的 T 細胞の測定は、愛知県がんセンター腫瘍ウイルス学部葛島清隆博士、鶴見達也博士、および大塚アッセイ研究所との共同研究である。

骨髓非破壊的前処置療法を用いた同種造血幹細胞移植の治療成績

UPN	年齢/性	疾患/病期	ドナー	幹細胞	前治療	CMV 感染		CMV 特異的 T 細胞 (%)*		転帰**
						抗原血症	PCR	1ヶ月	3ヶ月	
1)MT	64/女	AML/3relapse	不一致(DR)娘	PBSC	Flu/CY	day 45	day 45	NE	0.01	無病生存 (day 280)
2)FT	58/男	CMML/1relapse	一致同胞	PBSC	Flu/CY	-	-	NE	NE	死亡 (day 97)
3)MY	68/男	AML/1CR	一致同胞	PBSC	Flu/CY	day 38	day 45	0.68	0.61	無病生存 (day 168)
4)AF	59/女	NHL/2relapse	一致同胞	PBSC	Flu/CY	-	-	0.26	NE	死亡 (day89)
5)KK	38/男	NHL/CRu	不一致(B)同胞	PBSC	Flu/CY	-	-	0.01	NE	無病生存 (day 45)
6)SR	25/女	CML/1CP	一致同胞	PBSC	Flu/BU	-	-	0.00	NE	無病生存 (day 39)

*CMV 特異的 T 細胞、リンパ球中の比率

**平成 14 年 3 月 1 日現在

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）

分担研究報告書

医師主導型臨床研究による市販後臨床試験の基盤整備に関する研究

分担研究者 森 慎一郎 東京都立駒込病院 血液内科 医員

研究要旨 医師主導型研究による市販後の臨床試験を実施する際に、その倫理性、科学性及び信頼性を確保する上で、GCP を遵守した試験を遂行し、適切な試験データの質管理を行うことが重要であり、その基盤を作り上げることが急務であることが明らかとなった。また、この課題を進めるうえで、電子メールによるメーリングリストなどの方法を用いて、参加資格なしの公開の議論を実施することが極めて有用であることが明らかとなった。

A.研究目的

我が国の公的な研究事業の委託研究等により実施される、医師主導型研究による市販後の臨床試験を実施する際に、その倫理性、科学性及び信頼性を確保する上での問題点とその解決法等を明らかにする

B.研究方法

本研究班の研究事業である、「骨髄非破壊的前処置法を用いた同種造血幹細胞移植に関する研究」の試験計画書を作成するにあたり、電子メールによるプロトコールディスカッショングループを 2000 年 6 月に設置し、共同作業によってプロトコール案を作成。その過程で本研究を実施し、結果を速やかに患者に還元するうえでの問題点、およびその解決法を明らかにした。全国の施設からの参加を呼びかけプロトコール会議を実施。本会議では 1 つの研究課題を十分な時間をかけて討論し、議事録を作成した。また、会議は公開を原則とし、厚生労働省担当者、生物統計学教室、製薬

企業など各方面からの参加を求めた。この過程でさらに試験実施上の問題点を明らかにした。

次に登録資格制限のないメーリングリストを設置し、プロトコールの検討を実施し、参加施設の臨床試験実施基盤の整備体制などを考慮したうえで、具体的な問題点とその解決法を明らかにした。

（倫理面への配慮）

特定の企業や団体との不透明な関係を排除し、議論の透明性を排除するために、すべての議論は発言者を特定できる形で原則として公開とした。また、議論への参加資格は設けなかった。

C.研究結果

プロトコールディスカッショングループ（4 名の若手医師から構成）のディスカッション（平均 100 通/月のペースで電子メール上の討論を行った）により、市販後臨床試験としての本研究の以下の問題点とその解決策が明らかとなった。