

厚生労働科学研究費補助金  
がん臨床研究事業

固形がんに対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢  
血幹細胞移植療法の標準的治療の確立に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 原田実根

平成17(2005)年3月

## 目次

### I. 総括研究報告

固形がんに対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植療法の 標準的治療の確立に関する研究	.....	1
原田実根		

### II. 分担研究報告

1. 難治性固形がんに対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた 同種末梢血幹細胞移植療法の試み		
中野修治	.....	9
2. 進行期腎細胞癌に対する骨髄非破壊的同種臍帯血移植(臍帯血ミニ移植): 2例の経験		
中尾 眞二	.....	13
3. 固形がんに対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた 同種末梢血細胞移植療法の確立に関する研究		
豊嶋崇徳	.....	19
4. 膀胱癌患者における骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植時の 抗腫瘍効果発現メカニズムに関する研究		
牟田耕一郎	.....	21

III. 研究成果の刊行に関する一覧	.....	25
--------------------	-------	----

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

# I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

総括研究報告書

固形癌に対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植療法の標準的治療の確立に関する研究

主任研究者 原田 実根

九州大学大学院医学研究院・臓器機能医学部門内科学講座・病態修復内科学分野 教授

#### 研究要旨

標準的治療抵抗性固形腫瘍の患者に対する効果的な治療法の確立を目指し、骨髄非破壊的治療を移植前治療とする同種末梢血幹細胞移植を第1相臨床試験として施行し、その安全性と有効性を検討した。対象症例は全13例（膵癌7例、胃癌、大腸癌、腎癌、浸潤性胸腺腫、肝組織球肉腫、ユーイング肉腫各1例）である。100日以内の移植関連死亡はなく、評価可能な9例全例において完全キメラを認めた。13例中CR1例、PR3例、SD3例を認めた。Grade IIIまでの急性GVHDは4例に認め、うち3例は慢性GVHDを認めた。100日以内の腫瘍死は4例、100日以降が4例であった。以上より本療法は固形腫瘍患者に対しても安全に施行することが可能と考えられた。極めて予後不良である治療抵抗性進行膵癌において、7例中2例にPR以上の腫瘍縮小効果、2例の増殖抑制効果、および浸潤性胸腺腫でもPRという有望な成績が得られたことから、本療法の有効性が示唆され、今後の臨床研究の継続が望まれた。

## A. 研究目的

移植片対白血病 (graft-vs-leukemia, GVL) 効果を期待した同種造血幹細胞移植は、白血病に対する治癒的治療法として確立されている。同種末梢血幹細胞移植 (peripheral blood stem cell transplantation, PBSCT) を用い、骨髄非破壊的な移植前治療を利用する幹細胞移植 (non-myeloablative stem cell transplantation, NST) は、移植前治療の毒性が低く、従来同種造血幹細胞移植が困難であった高齢者白血病にも実施可能なことを示す成績が得られている。この NST は有効な治療法のない高齢者の難治性固形腫瘍に対する腫瘍特異的免疫療法としても期待されており、同時に移植片対腫瘍 (GVT) 効果誘導の至適条件や発現メカニズムの検討が待たれている。近年本療法により難治性の転移性腎癌に有効であったという重要な知見がもたらされたことから、本研究計画では標準的治療法に抵抗性で予後不良である様々な固形腫瘍患者に対して、HLA 一致同胞をドナーとし NST を用いた同種 PBSCT を試み、本療法の安全性と有効性を検討した。さらに治療効果向上のために GVT 効果の分子機構の解析も行った。

## B. 研究方法

標準的な化学療法および放射線療法に抵抗性である、進行あるいは再発の胃癌、大腸癌、膵癌、腎癌、肉腫等の固形腫瘍患者であり、組織診あるいは細胞診により確診が得られた症例で文書による同意を得た患者のみを対象とした。また同意を得た同胞の HLA タイピングを行い、ドナーを選択した。レシピエントは 65 歳以下で十分な主要臓器機能を有し (ECOG performance status 0~2、肝機能 T.Bil

≦1.5mg/dl、AST, ALT≦正常上限の2倍、腎機能 Creat. ≦1.5mg/dl、肺機能 PaO<sub>2</sub>≧60Torr、心機能 EF≧60%)、測定可能あるいは評価可能病変を持ち、かつ HLA の一致する同胞からの末梢血幹細胞採取可能な症例を選択した。ただし症状を有する脳転移例、間質性肺炎、重篤な心疾患、コントロール不良な糖尿病、重篤な感染症、その他主治医が不適と判断した症例は除外した。HLA 一致同胞に G-CSF (10μg/kg) を 5 日間皮下投与して PBSC を動員し、4、5 日目にアフエレーシスによって PBSC を採取し凍結保存した。一方、患者に対する移植前の骨髄非破壊的治療として (1) cyclophosphamide と fludarabine、(2) fludarabine と Buslfan、(3) fludarabine と TBI、のいずれかを前処置とし、day0 に PBSC を経静脈的に輸注した。移植目標は CD34 陽性細胞 2x10<sup>6</sup>/kg (レシピエント体重) とした。GVHD 予防には、標準的な methotrexate と cyclosporine の併用投与、または MMF と cyclosporine 併用投与を行った。支持療法や感染症予防は同種骨髄移植に準じて実施した。生着およびキメラ状態の解析には造血回復 (好中球 500/μl、血小板 20,000/μl) の他に、FISH 法による性染色体、PCR 法によるマイクロサテライト・マーカー (VNTR, STR) を利用した。GVT の評価は測定可能病変における腫瘍縮小率 (RECIST) を指標とした。

一方文書による同意を得たレシピエント、ドナーのマイナー抗原を PCR-SSCP 法によりタイピングし、移植後レシピエント末梢血中のマイナー組織適合抗原 (マイナー抗原) 特異的リンパ球の頻度を IFN-g ELISPOT 法により測定した。

(倫理面への配慮)

患者本人およびドナーに対して、1) 本研

究の目的とその方法、2) 造血幹細胞とその移植、3) 骨髄非破壊的前治療を併用した同種末梢血幹細胞移植、4) 治療法について、5) 予想される効果と副作用、6) 他の治療の有無と内容について、7) 同意しない場合も不利益を受けないこと、8) 同意後も撤回可能なこと、9) プライバシーの保護、などについて十分担当医師より説明文書を用いて説明し、同意を得ることを前提とする。また有害事象を認めた場合、患者及びドナーのリスクを最小限にするよう、速やかに適切な診断と処置を行う。試験責任医師または試験分担医師が、重篤な有害事象ならびに重要な副作用を知った場合、速やかにデータセンターに緊急報告を行う。本研究計画およびマイナー抗原タイピングに関する研究計画は九州大学医学部倫理委員会、同ヒトゲノム遺伝子解析倫理委員会により審査され実施に関する承認を受けている。

### C. 研究結果

本療法による治療を行った症例は計 13 例（膵癌 7 例、胃癌、大腸癌、腎癌、浸潤性胸腺腫、肝組織球肉腫、ユーイング肉腫各 1 例）である。100 日以内の移植関連死亡は認められず、評価可能 9 例中全例において完全キメラ状態を確認した。Grade III までの急性 GVHD は 4 例に認められたが免疫抑制剤にて改善した。また 3 例で全身型慢性 GVHD を認めた。客観的抗腫瘍効果としては、膵癌の 1 例では移植 37 日目の CT 検査上腫瘍が消失し CR に入ったことを認めた。しかし腫瘍消失に伴うステント挿入部の脆弱化が原因と思われる総胆管破裂を起こし 57 日目に死亡した。剖検にて膵頭部腫瘍のほぼ完全な消失を認めた。他

の膵癌症例では PR 1 例（189 日目に腫瘍死）、SD 2 例（122 日、200 日に腫瘍死）、PD 3 例（28 日、54 日、70 日目に腫瘍死）であった。胃癌症例は NC であったが、腫瘍によるイレウスが移植後に軽快し経口摂取可能となった。146 日目に PD にて死亡。大腸癌症例は PR となり 263 日目に慢性 GVHD にて死亡。腎癌症例では腫瘍増殖が緩慢となり 557 日に PD にて死亡。浸潤性胸腺腫では早期から PR、肝組織球肉腫では SD であり、H17.3.1 現在、共に治療中である（218、305 日）。ユーイング肉腫症例は PD にて 53 日目死亡。100 日以内の腫瘍死 4 例、100 日以降 4 例、慢性 GVHD による死亡 2 例、その他 1 例であった。以上より固形腫瘍患者に対する本療法は安全に施行可能と考えられ、さらに有効性も示唆された。

患者・ドナーの同意が得られた 5 組について、HA-1, CD31 exon3, CD31 exon8, CD49b, CD63L の 5 種のマイナー抗原タイピングを実施し、このうち 2 組において GVHD/GVT 方向のマイナー抗原タイプの不一致が検出された。これらの患者末梢血中のマイナー抗原特異的リンパ球の頻度を測定した結果、移植前に比較し移植後にはむしろ低下している傾向が示され、GVHD に対する免疫抑制療法との関連等が予想された。

### D. 考察

固形癌に対する本療法は国外でも臨床試験が行われており、腎細胞癌では良好な成績も報告されているが、他臓器由来の固形癌を含めその効果は未だ確立されていない。膵癌では本療法を施行した 7 症例中 2 例が PR 以上、2 例で NC と有望な成績が得られた。膵癌は従来の治療法でも極めて予後不良であり、現在の第一選択薬剤である gemcitabine に抵抗性

となった場合、本療法を積極的に考慮することは可能と考えられるため、臨床研究の継続が望まれる。胃癌、大腸癌、腎癌では長期生存を得た点、浸潤性胸腺腫、肝組織球肉腫においても病勢がコントロールされている点などから、少数例での検討ではあるが本療法の有効性が示唆された。

本研究にて移植後 100 日以内の腫瘍死が 4 例認められたことは、GVT が出現するまでの移植後 1-2 か月間の腫瘍増殖制御の必要性を示すものと考えられる。今後、(1) 癌種別の治療対象症例選択、(2) 移植前治療法の選択による完全キメラ状態への早期導入、(3) キメラ状態と GVT の相関、(4) 移植前後での既存の抗癌剤や分子標的薬剤の併用、(5) 移植後のイフェクター細胞移入などによる細胞治療の追加、などの点が今後も引き続き検討すべき項目と考えられる。

一方、本療法を受け急性または慢性 GVHD を生じたグループでの奏効率は 50%(4/8 例)であるのに対し、GVHD なしの群では 0%(0/5 例)であった。即ち本研究でも、同種造血幹細胞移植による GVT と GVHD とが密接に関連していることが明らかとなった。急性 GVHD 群はいずれも通常の免疫抑制剤にて改善を見ているが、慢性 GVHD 群ではその管理が長期予後改善に重要となることが明らかとなり、今後の治療を進める上で重要な情報と考えられる。

このように同種移植では GVHD と GVT とが関連しており、現在のところその機序はマイナー抗原を標的にする同種免疫反応と考えられている。移植後の患者末梢血中マイナー抗原特異的リンパ球の解析では、移植後患者でのマイナー抗原特異的リンパ球頻度はむしろ低下している傾向を認めたが、GVHD/GVT

に関与する抗原の同定等の検討が更に必要である。

#### E. 結論

標準的治療に抵抗性の固形腫瘍患者に対して、骨髄非破壊的治療を用いた同種末梢血幹細胞移植を安全に施行し得た。膵癌を含む複数の癌種において有効症例を認め、本療法の有効性が示唆された。本療法の有効性の確立のための臨床研究の継続が望まれる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fujii K, Ishimaru F, Kozuka T, Matsuo K, Nakase K, Kataoka I, Tabayashi T, Shinagawa K, Ikeda K, Harada M, Tanimoto M : Elevation of serum hepatocyte growth factor during granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. Br J Haematol 124 : 190-194,2004
2. Yamasaki S, Ohno Y, Taniguchi S, Yoshida T, Hayashi S, Ogawa H, Shimazaki C, Takahashi S, Kasai M, Wake A, Nishimura M, Tokunaga K, Gondo H, Takaue Y, Harada M, Mineishi S, for Japanese group for blood and marrow transplantation: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from two-or three-loci-mismatched related donors in adult Japanese patients with

- high-risk hematologic malignancies. Bone Marrow Transplant 33 : 279-289,2004
3. Tanaka K, Yamada M, Ono T, Noguchi Y, Uenaka A, Ota S, Hata H, Harada M, Tanimoto M, Nakayama E : Inhibition of RL male 1 tumor growth in BALB/c mice by introduction of the Rlakt gene coding for antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes and the GM-CSF gene by in vivo electroporation. Cancer Sci 95 : 1-6,2004
  4. Mori T, Mori S, Kanda Y, Yakushiji K, Mineishi S, Takaue Y, Gondo H, Harada M, Sakamaki H, Yajima T, Iwao Y, Hibi T, Okamoto S : Clinical significance of cytomegalovirus(CMV) antigenemia in the prediction and diagnosis of CMV gastrointestinal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 33 : 431-434,2004
  5. Kozuka T, Ikeda K, Teshima T, Yoshida C, Shinagawa K, Kojima K, Matsuo K, Bessho A, Sunami K, Hiramatsu Y, Maeda Y, Noguchi T, Yamamoto K, Fujii N, Imai T, Kusumoto-Kaneda K, Masuda K, Takenaka K, Ishimaru F, Niiya K, Koide N, Tanimoto M, Harada M : Peripheral blood circulating immature cell counts predict CD34+ cell yields in G-CSF-induced PBPC mobilization in healthy donors. Transfusion 44 : 526-532,2004
  6. Kunisaki Y, Masuko S, Noda M, Inayoshi A, Sanui T, Harada M, Sasazuki T, Fukui Y, : Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor. Blood 103 : 3362-3364,2004
  7. Mitsugi K, Nakamura T, Kashiwabara N, Ariyama H, Tanaka R, Baba E, Nakamura M, Harada M, Nakano S : Protection against methotrexate toxicity by a soybean-protein-and  $\omega$ -3 fatty acid containing diet : Comparative study with a casein-containing diet. Oncology Reports 12 : 41-45,2004
  8. Karube K, Oshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawano R, Suzuyama J, Utsunomiya A, Harada M, Kikuchi M : Expression of FoxP3, a key molecule in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. Br J Haematol 126 : 81-84,2004
  9. Fujishima H, Kikuchi I, Miyanaga O, Ueda A, Baba E, Mitsugi K, Harada M, Nakano S : Phase I study of CPT-11 and bolus 5-FU/l-leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. Int J Clin Oncol 9 : 92-97,2004
  10. Ogawa H, Ikegame K, Kawakami M, Takahashi S, Sakamaki H, Karasuno T, Sao H, Kodera Y, Hirabayashi N, Okamoto S, Harada M, Iwato K, Maruta A, Tanimoto M, Kawa K, Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation : Impact of cytogenetics on outcome of stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first remission : A



- Large-Scale retrospective analysis of data from the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Int J Hematol* 79 : 495-500,2004
11. Haro T, Shimoda K, Kakumitsu H, Kamezaki K, Numata A, Ishikawa F, Sekine Y, Muromoto R, Matsuda T, Harada M : Tyrosine kinase 2 interacts with and phosphorylates receptor for activated C kinase-1, a WD motif-containing protein. *J Immunol* 173 : 1151-1157,2004
  12. Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Matsuda T, Nakayama K-I, Harada M : The role of Tyk2, Stat1 and Stat4 in LPS-induced endotoxin signals. *International Immunology* 16 : 1173-1179,2004
  13. Nagafuji K, Aoki K, Henzan H, Kato K, Miyamoto T, Eto T, Nagatoshi Y, Ohba T, Obama K, Gondo H, Harada M : Cidofovir for treating adenoviral hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 34:909-914,2004
  14. Ohtsubo K, Takase K, Nagafuji K, Henzan K, Henzan H, Tanimoto T, Fukuda T, Miyamoto T, Inaba S, Harada M : Nonmyeloablative allogeneic bone marrow transplantation for treatment of myelodysplastic syndrome complicated by recent intracerebral hemorrhage. *Am J Hematol* 77 : 400-404,2004
  15. Ishikawa F, Yasukawa M, Yoshida S, Nakamura K, Nagatoshi Y, Kanemaru T, Shimoda K, Shimoda S, Miyamoto T, Okamura J, Shultz LD, Harada M : Human cord blood-and bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> cells regenerate gastrointestinal epithelial cells. *The FASEB Journal/FJ Express*
  16. Hiraki A, Fujii N, Murakami T, Kiura K, Aoe K, Yamane H, Masuda K, Maeda T, Sugi K, Darzynkiewicz Z, Tanimoto M, Harada M : High frequency of allele-specific down-regulation of HLA class I expression in lung cancer cell line. *Anticancer Res* 24 : 1525-1528,2004
  17. Ogawa Y, Ouchida M, Yoshimoto T, Ito S, Takimoto H, Shiote Y, Ishimaru F, Harada M, Tanimoto M, Shimizu K : Prevalent hyper-methylation of the CDH13 gene promoter in malignant B cell lymphoma. *Int J Oncol* 25: 685-691,2004
  18. Gondo H, Himeji D, Kamezaki K, Numata A, Tanimoto T, Takase K, Aoki K, Henzan H, Nagafuji K, Miyamoto T, Ishikawa F, Shimoda K, Inaba S, Tsukamoto H, Horiuchi T, Nakashima H, Otsuka T, Kato K, Kuroiwa M, Higuchi M, Shibuya T, Kamimura T, Kuzushima K, Tsurumi T, Kanda Y, Harada M : Reconstitution of HLA-A\*2402-restricted cytomegalovirus-specific T-cells following stem cell transplantation. *Int J Hematol* 80 : 441-448,
  19. Isobe T, Tanimoto TE, Nakaji G,

- Miyamoto T, Yamasaki S, Takase K, Mumata A, Fukuda T, Nagafuji K, Inaba S, Harada M : Autoimmune thrombocytopenia with clonal expansion of CD8-positive T cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma.. Bone Marrow Transplant(on live version) 2004
20. Henzan H, Yoshimoto G, Okada A, Nagasaki Y, Hirano G, Takase K, Tanimoto T, Miyamoto T, Fukuda T, Nagafuji K, Harada M : Myeloid/natural killer cell blast crisis representing an additional translocation, t(3;7)(q26;q21)in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. Ann Hematol 83 : 784-788,2004
  21. Tatsugami K, Eto M, Harano M, Nagafuji K, Omoto K, Katano M, Harada M, Naito S : Dendritic-cell therapy after non-myeloablative stem-cell transplantation for renal-cell carcinoma. Lancet Oncol 5 : 750-52,2004
2. 学会発表
  3. Harada M : Hematopoetic stem cell transplantation for treatment of acute myelogenous leukemia, solid tumors and autoimmune diseases. 25 Anniversary Seminar of Inje University Medical college, June 2,2004,Busan,Korea
  4. 原田実根 : 骨髓移植療法の近未来、日本内科学会北陸支部第32回生涯教育講演会、2004年6月6日、金沢市
  5. Harada M: Hematopoietic stem cell transplantation for treatment of solid tumors and autoimmune diseases.2<sup>nd</sup> Annual Meeting of Asian Hematology Association, June 26,2004,Beijing, PR China
  6. 長藤宏司、高瀬謙、平安山英穂、宮本敏浩、塚本浩、堀内孝彦、原田実根 : 難治性自己免疫性疾患に対する自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植、第41回日本臨床分子医学会学術集会、2004年7月17日、福岡市
  7. Eto T, Tanimoto, Shimoda K, Yamaguchi T, Okuma T, Mizoguchi H, Omine M, Niho Y, Harada M : Prognostic Factors in Primary Chronic Myelofibrosis in Patients Aged Less Than 70 Years : A Report on 207 Patients with the Description of a Scoring system and Its Validation on 100 Other Patients. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The American society of Hematology. December 4,2004,San Diego, U.S.A
  8. Katagiri T, Shibata S, Furukawa T, Tsukada J, Nakao S, Wakano M, Muranaka E, Harada M. : Incompatibilities of HA-1 and CD62L Polymorphic Adhesion Molecule Induce Graft-Versus- Leukemia Effect Rather Than GVHD Resulting in Long-Term Survival in HLA Identical Myeloablative Stem Cell Transplantation. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The American society of Hematology. December 4,2004,San Diego, U.S.A
  9. Yoshimoto G, Nagafuji K, Miyamoto T, Kamimura T, Ohno Y, Taniguchi S, Harada M. : FLT3 Mutations in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission Treated with Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of

- The American society of Hematology.  
December 4,2004,San Diego, U.S.A
10. Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Yoshie M, Yamamoto M, Takeda K, Matsuda T, Akira S, Ogawa K, Harada M. : The Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The American society of Hematology. December 5,2004,San Diego, U.S.A
  11. 吉田周郎、石川文彦、下田和哉、原田実根 : ヒト臍帯血細胞によるインスリン産生の再生、第 66 回日本血液学会総会、第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年 9 月 17 日、京都市
  12. 張華、石川文彦、吉田周郎、河野徳明、孔圓、深田光敬、下田和哉、大島孝一、安川正貴、原田実根 : 免疫不全マウスを用いたヒト臍帯血由来 T 細胞による異種 GVHD の作成、第 66 回日本血液学会総会、第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年 9 月 17 日、京都市
  13. 牟田毅、権藤久司、加藤光次、衛藤徹也、渋谷恒文、上村智彦、林真、長藤宏司、宮本敏浩、福田隆浩、下田和哉、原田実根 : HLA 不一致の同種造血細胞移植後に合併した HHV-6 脳炎の 2 症例、第 66 回日本血液学会総会、第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年 9 月 17 日、京都市
  14. 高瀬謙、沼田晃彦、山崎聡、福田隆浩、長藤宏司、下田和哉、原田実根 : 自己末梢血幹細胞移植後の再発に対し同種移植を施行した悪性リンパ腫の 9 例、第 27 回日本造血細胞移植学会総会、2004 年 12 月 17 日、岡山市
  15. 福田隆浩、大野祐樹、衛藤徹也、谷本徹也、長藤宏司、青木健一、土持典子、下野信行、原田実根 : 同種造血幹細胞移植後の播種性トリコスポロン症の 5 例、第 27 回日本造血細胞移植学会総会、2004 年 12 月 17 日、岡山市
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## Ⅱ. 分担研究報告書

難治性固形がんに対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植療法の試み

分担研究者 中野 修治 九州大学大学院・病態修復内科 助教授

### 研究要旨

治療抵抗性固形腫瘍の患者を対象に、骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植を施行した。症例は計9名（膵癌3例、胃癌、大腸癌、腎癌、組織球肉腫、悪性胸腺腫、ユーイング肉腫各1例）で、全例において完全キメラの状態を確認した。GVHDは急性4例、慢性は4例に認められたが、移植前治療による治療関連毒性は軽微で移植後100日以内の移植関連死亡はなかった。5例の増殖速度の遅い癌に対してGVTに起因すると思われる抗腫瘍効果が認められ延命効果があったが、3例がGVHDで死亡した。浸潤性胸腺腫には極めて有望な治療法であることが示唆された。今後生存率を上げるためにはGVHDとGVTの機序の違いを明らかにし、GVT効果のみを引きだす治療法の開発が待たれる。

#### A. 研究目的

同種骨髄移植は白血病に対する治癒的治療法として確立しているが、その治癒的治療効果は移植前の骨髄破壊的治療に使用する大量抗がん剤による直接的な抗白血病殺細胞効果だけでなく、ドナーリンパ球による抗腫瘍効果(Graft-versus-Tumor: GVT 効果)により起因することが指摘され、同種骨髄移植は白血病特異的免疫療法と考えられている。近年になって腎癌や乳癌などの固形腫瘍に対しても同種骨髄移植や同種末梢血幹細胞移植が試みられ、GVT 効果が観察されている。一方、同種骨髄幹細胞移植後のドナー細胞の生着には、フルダラピンを使用した免疫抑制療法を主体とする骨髄非

破壊的治療で十分であり、毒性および移植関連死が少ないことが明らかにされた。したがって本研究では抗がん剤の効果が乏しい固形腫瘍に対し、GVT 効果をねらった骨髄非破壊的幹細胞移植を施行し、本邦における安全性と有効性を検討する。

#### B. 研究方法

化学療法および放射線療法に抵抗性を示し、予後不良の固形腫瘍患者を対象に十分な説明と同意を得たうえで、HLA 一致同胞をドナーとする骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植を施行し、移植関連毒性、移植後キメラ、GVHD、GVT 効果などを検討した。コンディショニングにはフルダラピン/エ

ンドキサン、フルダラビン/ブスルファン  
のいずれかを前処置とし、シクロスポリン  
/メソトレキサートによる GVHD 予防を行  
った。

倫理面においては、患者本人およびドナ  
ーに対して配慮し、1) 本研究の目的と方  
法、2) 骨髄非破壊的前治療を併用した同  
種末梢血幹細胞移植、3) 予想される効果  
と副作用、4) 他の治療法との比較、5)  
同意撤回、などについて十分担当医師より  
文書で説明し、同意を文書で得ることを前  
提とする。尚、本研究は九州大学医学部倫  
理委員会の審査を受け、実施に関する承認  
を受けている。

### C. 研究結果

症例は9名（膵癌3例、胃癌、大腸癌、腎  
癌、組織球肉腫、浸潤性胸腺腫、ユーイング  
肉腫の各1例）施行した。全例評価可能で、  
すべて完全キメラの状態を確認した。移植後  
100日以内の移植関連死亡は認められず、  
また100日以内の腫瘍死はユーイング肉腫  
の1例で見られたのみであった。GVHDは  
急性4例、慢性は4例に認められた。また  
移植前治療による治療関連毒性は、軽微だ  
った。以上より本療法は固形腫瘍患者に対  
しても安全に施行することが可能であった。

腎癌はPDであったが明らかに移植前と比  
べ、腫瘍増殖速度は遅く557日目にGVHDで死  
亡した。膵癌は1例がSDで209日目に腫瘍死、  
1例はPDで70日目に腫瘍死、1例はPRを持続し  
ていたが189日目にやはり慢性GVHDで死亡  
した。胃癌症例は移植後、イレウスの改善に  
より一時的に経口摂取が可能となり退院でき  
たが、PDで146日目に死亡した。大腸癌の症  
例はGVHDの増悪とともに肺の転移腫瘍はほ

ぼ消失したが、最終的にはGVHDによる細気  
管支炎による呼吸不全が原因で死亡した。

組織球肉腫の症例はSDであるが、移植後  
305日目も生存中であるが最近、新病変が出現  
し、PDとなっている。また浸潤性胸腺腫は現  
在まで放射線および同種末梢血細胞移植併用  
超大量化学療法を含めたあらゆる治療を行っ  
た症例であるが、本治療に反応しPRとなり、  
GVHDに相応して腫瘍縮小効果が発現してお  
り、移植後218日目でもPSもよく外来通院中  
である。

### D. 考察

本法は固形癌に対して国内外で臨床試験が  
行われており、腎癌では有効性が報告され  
ている。しかし他の固形癌に対しての効果  
は不明のままである。進行膵癌は極めて予  
後が悪いが、今回3例中1例がPRという有  
望な成績が得られた。また大腸癌でもPR  
を得られた。組織球肉腫の症例は移植後305  
日目も生存中であり、明らかに無治療に比べ  
腫瘍増殖速度を低下させていると考えられる。  
また浸潤性胸腺腫は、超大量化学療法を含め  
たあらゆる治療に抵抗性となった症例であ  
るが、本治療に反応し、しかもGVHDに相  
応して腫瘍縮小効果が発現しており、GVTに  
起因する抗腫瘍効果と考えられる。この効果  
は移植後218日目でも効果は持続中であり、  
このため胸腺腫には極めて有望な治療とな  
りうる可能性がある。しかし今回腎癌、膵  
癌、大腸癌の症例にたいして本治療は効果  
があったと思われるがGVHDが死亡原因にも  
なった。今後生存率を上げるためにはGVHD  
とGVTの機序の違いを明らかにし、GVT  
効果のみを引き出す治療法の開発が待た  
れる。

### E. 結論

難治性固形癌に対し非骨髄破壊的前治療による同種末梢血幹細胞移植は安全に施行可能であり、増殖速度の遅い癌に対してGVTに起因すると思われる抗腫瘍効果が認められ延命効果があった。とくに浸潤性胸腺腫には極めて有望な治療法であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

#### H. 論文発表

22. Fujishima H, Kikuchi I, Miyanaga O, Ueda A, Mitsugi K, Harada M and Nakano S. Phase I Study of CPT-11 and Bolus 5-FU//Leucovorin in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 9:92-97, 2004.
  23. Tarumoto T, Nagai T, Ohmine K, Miyoshi T, Nakamura M, Kondo T, Mitsugi K, Nakano S, Muroi K, Komatsu N, Ozawa K. Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line. *Exp. Hematology* 32:375-381, 2004.
  24. Tanaka R, Ariyama H, Qin B, Takii Y, Baba E, Mitsugi K, Harada M, Nakano S. In vitro Schedule-Dependent Interaction between Paclitaxel and Oxaliplatin in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Chemother. Pharm.* 2005 in press.
  25. Tanaka R, Takii Y, Shibata Y, Ariyama H, Qin B, Baba E, Kusaba H, Mitsugi K, Harada M, Nakano S. In Vitro Sequence-dependent Interaction between Nedaplatin and Paclitaxel in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Chemother. Pharm.* 2005 in press.
  26. Qin B, Kato K, Mitsugi K, Nakamura M, Tanaka R, Baba E, Ariyama H, Kuroiwa T, Harada M, Nakano S. Feasibility study of ambulatory continuous infusion of 5-fluorouracil followed by cisplatin through hepatic artery for metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother. Pharma.* 2005 in press.
  27. Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Ideda Y, Sakaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody and castleman's disease. *Blood*, 2005 in press
- #### 2. 学会発表
1. Muta K, Ito H, Abe Y, Nagafuji K, Baba E, Matsushima T, Mitsugi K, Nakano S, Nawata H, Harada M. Non-myeloablative allogeneic transplantation as immunotherapy for pancreatic cancer and other solid tumors. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. New Orleans, LA. 2004 (Proc. ASCO Vol.23, 2539, 2004)
  2. Fujishima H, Uchino K, Miyanaga O, Ueda K, Baba E, Mitsugi K, Harada M, Nakano S. A multicenter phase II study of irinotecan and 5-fluorouracil/l-leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer; Interim results. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Clinical Oncology. New Orleans, LA (Proc. ASCO Vol.23, 3667, 2004).
  3. Ariyama H, Baba E, Shibata Y, Mitsugi K, Harada M, Nakano S. ZD1839, a selective

epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, induces apoptosis through enhanced expression of Bax protein. 95<sup>th</sup> Annual Meeting of American Association for Cancer Research. Orlando, FL, 2004 (Proc. AACR Vol 45, 4656, 2004).

4. 馬場英司、長藤宏治、宮本敏浩、福田隆浩、三ツ木健二、安部康信、伊藤鉄英、

牟田耕一郎、名和田新、中野修治、原田実根。固形腫瘍に対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植療法の検討。第42回日本癌治療学会総会ワークショップ、京都(2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし。



進行期腎細胞癌に対する骨髄非破壊的同種臍帯血移植(臍帯血ミニ移植)：

2例の経験

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

骨髄非破壊的末梢血幹細胞移植後の graft-versus-tumor (GVT)効果が、転移を伴う進行期腎細胞癌にも期待できることが明らかとなりつつある。しかし、従来、血縁ドナーからの移植に限定されていたため、対象患者は一部に過ぎなかった。最近、成人の血液悪性疾患患者を対象に、非血縁者の臍帯血を用いた骨髄非破壊的移植法が開発された。腎細胞癌患者に対しても、血縁ドナーからの移植と同様の抗腫瘍効果が誘導できるか否かを検討するため、多発性転移を伴う進行期腎細胞癌患者2例（いずれも69歳男性）に骨髄非破壊的同種臍帯血移植(臍帯血ミニ移植)を行った。2例目は1回目の臍帯血ミニ移植が拒絶に終わったため、1回目の移植から3か月後に臍帯血ミニ移植を再度実施した。移植(2例目は再移植を指す)後の好中球の回復は速やかで、2例とも移植後4週以内に完全ドナーキメラ化した。いずれも皮膚・腸管のⅡ度急性GVHDを発症したが、免疫抑制療法の強化により軽快した。1例目は移植後一貫して stable disease を維持していたが、カリニ肺炎・多剤耐性緑膿菌による肺炎を合併し、移植146日目に死亡した。2例目は移植137日目以降 stable disease となり、移植後9か月を経て外来通院中である。今回の検討から、臍帯血ミニ移植は、進行期腎細胞癌に対しても有望な治療となる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

従来の同種造血幹細胞移植は、大量の抗がん剤や放射線照射を用いた移植前処置によって、ホストの血液細胞と腫瘍細胞を根絶しなければ成功しないと考えられていた。しかし、近年、免疫抑制効果の強い前処置を行えば移植片の生着が得られること、同種造血幹細胞移植による強力な抗腫瘍効果が、移植の前処置よりむしろドナーのリンパ球による graft-versus-tumor (GVT)効果によってもたらされることが明らかとなってきた。このよう

な移植は、骨髄非破壊的造血幹細胞移植(ミニ移植)と呼ばれている。従来の骨髄破壊的移植に比べミニ移植は治療関連毒性が少ないため、従来同種移植の適応外と考えられていた高齢者や臓器障害のある患者にまで移植の適応が拡大されつつある。さらに、ミニ移植は、血液悪性疾患だけでなく、化学療法の効果が期待できない各種の固形腫瘍に対しても次々に試みられている。なかでも腎細胞癌は、今のところ最も強い抗腫瘍効果が報告されている。腎細胞癌は化学療法抵抗性であるものの、

一部の症例は免疫療法に反応することから、様々な免疫療法が試みられてきた。ところが、有効性が最も高いインターフェロンやインターロイキン2でさえ、有効率は10-20%程度と低い。特に、このような治療が奏効しない多発性の転移を伴う進行期例に対しては、有効な治療法はなかった。1999年、アメリカ国立衛生研究所のChildsらが進行期腎細胞癌に対するミニ移植の成功例を報告(J Clin Oncol 1999)して以来、欧米・日本を中心に症例が蓄積されつつある。今のところ奏効率は20-40%程度にとどまっているが、もともと長期生存が期待できない進行癌患者を対象にしていることから、画期的な治療法であることに疑いはない。一方、このようなミニ移植は、従来、HLA一致の血縁ドナーからの移植に限定されていた。HLA一致の血縁ドナーが見いだせる患者の割合は約30%に過ぎないため、ミニ移植による治療が期待された患者の大半は、移植を受けることができなかった。

最近の研究から、非血縁臍帯血を用いても、ミニ移植が可能であることがわかってきた(Barker et al. Blood 2003; Miyakoshi et al. Clin Cancer Res 2004; Barker et al. Blood 2005)。この方法を用いれば、血縁ドナーがいない患者の多くに、同種移植の機会をもたらすことができる。さらに、臍帯血は採取後冷凍保存されているため、臍帯血バンクを通じて適合した臍帯血が見つければ、比較的短時間で移植を実施できるという利点もある。固形腫瘍患者に関しても、同様の方法によって骨髄非破壊的前処置後に臍帯血を移植すれば、血縁ドナーの末梢血幹細胞を移植した場合と同様の抗腫瘍効果を誘導できる可能性がある。今回、進行期腎細胞癌患者2名を対象に、骨髄非破壊的前治療を用いた同種臍帯血移植(臍

帯血ミニ移植)を行い、安全性と有効性を検討した。

## B. 研究方法

### (1)臍帯血

移植に用いる臍帯血は、日本臍帯血バンクネットワーク (<http://www.j-cord.gr.jp/ja/>)を通じて入手した。臍帯血は、移植直前に37℃の恒温槽を用いて急速解凍し、その後速やかに輸注した。解凍後の臍帯血細胞の生細胞比率はトリパンブルー染色法により測定した。

### (2)キメリズム解析

移植後のキメリズム解析は、ドナーと移植前の患者末梢血単核球、移植後の患者末梢血T細胞および顆粒球よりDNAを抽出し、個人識別に関わるVNTR領域(MCT118、YNZ22、vWF)をPCR法で増幅して行った。

### (3)症例報告

[症例1]69歳・男性。

平成14年10月、リンパ節および骨への転移、静脈内腫瘍血栓を伴う左腎細胞癌(clear cell type)と診断された。左腎の摘出術ののち、インターフェロン・アルファ、インターロイキン2による免疫療法を受けたが、ともに効果はなかった。転移性病変は徐々に増大し、新たに多発性肺転移も出現。平成15年8月の時点で、無治療で経過をみた場合、良好なquality of life (QOL)を保てるのは2か月程度、余命は4か月程度と予想された。非血縁者の臍帯血を用いた骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植の施行を目的として、平成15年9月、金沢大学医学部附属病院に入院した。

移植前処置は、Barkerらの報告(Blood 2003)にのっとり、フルダラビン 200 mg/m<sup>2</sup>お

よびシクロホスファミド 50 mg/kg に 2 Gy の全身放射線照射を加える方法で行った。拒絶および GVHD 予防は、シクロスポリンとミコフェノール酸モフェチルを組み合わせで行った。平成 15 年 9 月に臍帯血ミニ移植を実施した。患者・臍帯血の血液型はそれぞれ B(+)・A(+)。HLA は表現型・DNA 型ともに完全一致であった。輸注細胞数は  $1.4 \times 10^7$ /患者体重 kg、臍帯血保存時からの収率は 73%。臍帯血解凍直後の細胞の生細胞比率は 99%。患者体重 kg あたりの CD34 陽性細胞数・CFU-GM はそれぞれ、 $2.9 \times 10^4 \cdot 1.6 \times 10^3$ 。

[症例 2]69 歳、男性

平成 3 年 3 月、右腎細胞癌(clear cell type)と診断。右腎摘出術ののちインターフェロン・アルファによる予防的免疫療法を受けた。平成 8 年 4 月右上顎洞に再発。右上顎洞腫瘍切除に加え、インターフェロン・アルファ、インターフェロン・ガンマ、インターロイキン 2 による免疫療法、5-FU による化学療法を受けたが無効。脾、両副腎、後腹膜、両肺、胸膜、皮下、左腎に新たな転移巣が出現し、いずれも増大した。平成 16 年 2 月の時点で、無治療で経過をみた場合、良好な quality of life (QOL)を保てるのは 3 か月程度、余命は 6 か月程度と予想された。臍帯血ミニ移植の実施を目的として、平成 16 年 3 月、金沢大学医学部附属病院に入院。

移植前処置と拒絶・GVHD 予防は症例 1 と同じ方法で行った。平成 16 年 3 月 HLA 一致の非血縁臍帯血(有核細胞数  $1.4 \times 10^7$ /kg、血液型 O(+))を輸注したが、拒絶に終わった。そのため、1 回目の移植から 3 か月後、臍帯血ミニ移植を再度実施した。再移植時の移植前処置は、Miyakoshi らの報告(Clin Cancer Res

2003)にのっとり、フルダラビン  $125 \text{ mg/m}^2$  およびメルファラン  $80 \text{ mg/m}^2$  に 4Gy の全身放射線照射を加える方法で行った。拒絶および GVHD 予防は、タクロリムス単独で行った。患者・臍帯血の血液型はともに B(+)。HLA は表現型・DNA 型ともに 2 座不一致であった。輸注細胞数は  $2.2 \times 10^7$ /患者体重 kg、臍帯血保存時からの収率は 96%。臍帯血解凍直後の細胞の生細胞比率は 94%であった。患者体重 kg あたりの CD34 陽性細胞数・CFU-GM はそれぞれ、 $7.5 \times 10^4 \cdot 1.7 \times 10^3$ 。

なお、本治療実施計画は、金沢大学医学部内倫理委員会での審査・承認を受けた。また、今回の治療実施に際しては、2 例とも、匿名性を維持したまま後日研究発表に利用される点も含め十分に説明し、文書による同意を取得した。

## C. 研究結果

### (1) 血液回復・キメリズム

症例 1・2 ともに移植後の好中球回復は速やかで、移植後 15 日目に  $500/\mu\text{l}$  を超えた。一方、輸血非依存性で血小板数  $5 \text{ 万}/\mu\text{l}$  以上・網状赤血球数  $5 \text{ 万}/\mu\text{l}$  以上の回復には、症例 1 では移植から 69 日・94 日、症例 2 では 46 日・39 日を要した。

症例 1 において、移植後 13 日目・20 日目・27 日目のドナー細胞の割合は、T 細胞で 63%・53%・100%、顆粒球では 17%・40%・100%と、ドナー造血の生着は良好であった。移植後 88 日目の解析でも、T 細胞・顆粒球ともに完全ドナー型を維持していた。症例 2 では、移植 20 日目のキメリズム解析において、末梢血 T 細胞・顆粒球ともにすでに完全にドナー型キメラの獲得に成功していた。

## (2)GVHD

症例1は、移植26日目に皮膚・腸管にⅡ度の急性GVHDを発症したが、プレドニゾロンおよびシクロスポリンにより軽快した。症例2も、移植47日目に皮膚・腸管にⅡ度急性GVHDを発症したが、タクロリムス増量だけで改善した。

## (3)抗腫瘍効果・転帰

症例1は、移植114日目にカリニ肺炎を合併し、さらに多剤耐性緑膿菌による肺炎を併発。これにより、移植146日目に死亡した。抗腫瘍効果に関しては、移植後転移巣の増大はなく、一貫してstable diseaseの状態が維持された。症例2の転移巣は移植後も増大を続けたが、移植137日目以降はstable diseaseの状態にある。現在移植9か月を経て、外来通院中である。

## D.考察

ミニ移植では、患者がドナーの血液細胞を受け入れるために必要最小限の抗がん剤投与・放射線照射しか行わないため、移植にともなう臓器毒性が少ない。このため、今回の2症例のように従来は同種移植の適応外と考えられていた高齢の患者や臓器障害を有する患者に対しても施行できる。ミニ移植は、血液悪性疾患だけでなく、腎細胞癌をはじめ一部の固形腫瘍例の中にも有効例が報告されている。Childsらの報告(N Engl J Med 2000)によると、肺やリンパ節、肝などに転移を伴う難治性腎細胞癌の19例に血縁ドナーからの骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植が行われ、このうち3例に完全寛解、7例に部分寛解が得られた。この抗腫瘍効果は、ドナー由来のTリンパ球が、腎細胞癌を攻撃したために起

こったと考えられる。

最近、成人の血液悪性疾患患者を対象に、骨髄非破壊的前処置後に非血縁者の臍帯血を輸注する移植法(臍帯血ミニ移植)が開発され、国内外で成果が報告されている。もともと臍帯血移植の対象は小児患者が中心であった。臍帯血中に含まれている造血細胞は、骨髄や末梢血中の造血細胞よりも高い増殖能を有している。そのため、骨髄移植や末梢血幹細胞移植の約10分の1程度の細胞数でも移植が可能である。このことが、成人に対する臍帯血移植を成立させている背景にあると思われる。さらに、臍帯血移植では致死的GVHDが起りにくいため、HLA1座または2座不一致の臍帯血を用いても、安全に移植が行えるという利点がある。

Barkerらは、HLA1-2座不一致移植20例を含む血液悪性疾患22例を対象に、骨髄非破壊的同種臍帯血移植を施行した(Blood 2003)。いずれも長期生存が期待できない治療抵抗例であったにもかかわらず、22名中94%の患者に生着が得られ、1年生存率39%、GVHDの発症頻度もわずか9%という優れた成績であった。

臍帯血ミニ移植の場合、骨髄や末梢血を用いたミニ移植と比べて、拒絶のリスクが高まる可能性が懸念される。今回の検討でも、症例2において、1回目の臍帯血ミニ移植が拒絶に終わった。しかし、別の臍帯血を入手し再移植を実施したところ、1回目の移植から3か月しか経っていなかったにもかかわらず、再移植後の経過は良好で、重篤な合併症や後遺症はみられなかった。このような臍帯血ミニ移植の利便性・低侵襲性を考えれば、最終的には拒絶の問題はほぼ解決できると思われる。

今回の2例はいずれも4か月以上stable