

厚生労働科学研究費補助金

がん臨床研究事業

<研究課題名>

固形がんに対する同種細胞免疫療法を用いた標準的治療法の確立に関する研究  
～転移固形腫瘍を対象としたミニ移植の安全性と有効性の検討～

平成 16 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 17 (2005) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

がん臨床研究事業

〈研究課題名〉

固形がんに対する同種細胞免疫療法を用いた標準的治療法の確立に関する研究  
～転移固形腫瘍を対象としたミニ移植の安全性と有効性の検討～

平成 16 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 17 (2005) 年 4 月

## 【目次】

### I. 総括研究報告

- P 1~7 高上 洋一 / 国立がんセンター中央病院  
『固形がんに対する同種細胞免疫療法を用いた標準的治療法の確立に関する研究  
～転移固形腫瘍を対象としたミニ移植の安全性と有効性の検討～』

### II. 分担研究報告

- P 8~13 平家 勇司 / 国立がんセンター研究所  
『同種移植後免疫回復の解析に基づいた診断法・治療法の開発研究』
- P 14~15 國頭 英夫 / 国立がんセンター中央病院  
『細胞免疫療法の臨床評価』
- P 16~18 高橋 俊雄 / 東京都立駒込病院  
『膵癌に対するミニ移植の開発研究』
- P 19~21 豊嶋 崇徳 / 九州大学病院  
『泌尿器癌に対する同種細胞免疫療法の研究』
- P 22~23 富田 善彦 / 山形大学医学部  
『固形がんに対する同種細胞免疫療法における腫瘍細胞効果規定因子の検討』
- P 24~25 公文 裕巳 / 岡山大学大学院  
『転移性腎細胞癌を対象としたミニ移植の検討』
- P 26~27 並木 幹夫 / 金沢大学大学院  
『腎細胞癌に対するミニ移植の臨床研究』
- P 28~29 三木 恒治 / 京都府立医科大学  
『転移性腎細胞癌を対象としたミニ移植の検討』
- P 30~33 藤岡 知昭 / 岩手医科大学  
『進行性腎細胞癌（腎癌）に対する同種細胞免疫療法を用いた標準治療法の確立』
- P 34~36 山上 裕機 / 和歌山県立医科大学  
『消化器癌に対する同種細胞免疫療法の開発研究』
- P 37~38 岡島 英二郎 / 国立がんセンター中央病院  
『泌尿器癌に対する同種細胞免疫療法の研究』

### III. 研究成果の刊行に関する一覧

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

『 固形がんに対する同種細胞免疫療法を用いた標準的治療法の確立に関する研究  
～転移固形腫瘍を対象としたミニ移植の安全性と有効性の検討～ 』

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 部長

**研究要旨** 転移性の腎癌患者において、同種抗腫瘍免疫効果(graft-versus-tumor: GVT 効果)を引き出すことを主旨とした骨髄非破壊的移植(ミニ移植)の安全性と有効性を、厳正な医師主導臨床試験を行って評価する。現時点で多施設共同新 GCP 試験には 6 名を、また国立がんセンター中央病院における他に有効な治療を持たない転移性固形腫瘍患者を対象とした第 I 相臨床試験には、インターフェロン療法を含む前治療に不応の転移性腎癌 17 例を含む計 47 例を登録して試験を継続中である。腎細胞癌、大腸癌の一部などにおいては明らかな腫瘍縮小効果を観察している。班員施設でミニ移植を施行された腎癌患者について検討したところ、移植後 180 日以内の早期に死亡したのは診断時から転移巣を有する急速進行例や移植時全身状態の悪い患者であった。一方、これらを欠く患者では、長期の GVT 効果が得られることも判明した。付随研究の結果、GVT 効果には特異的免疫と非特異的免疫系の双方が関与する可能性が初めて示され、現在、標的抗原と効果担当細胞の解明を進めている。

分担研究者名 (所属機関名・職名)

平家勇司 (国立がんセンター研究所・主任研究官)  
國頭英夫 (国立がんセンター中央病院・医長)  
高橋俊雄 (東京都立駒込病院・名誉院長)  
豊嶋崇徳 (九州大学病院・助教授)  
富田善彦 (山形大学医学部・教授)  
公文裕巳 (岡山大学大学院・教授)  
並木幹夫 (金沢大学大学院・教授)  
三木恒治 (京都府立医科大学・教授)  
藤岡知昭 (岩手医科大学・教授)  
山上裕機 (和歌山県立医科大学・教授)  
岡島英二郎 (国立がんセンター中央病院・医員)

A. 研究目的

難治性の腎癌や膵癌などの固形腫瘍に対する有効な治療法を開発することは急務である。本研究では、インターフェロン療法も含めた従来の治療法をもってしては治癒が期待できない転移性の腎癌患者を対象として、強力な同種抗腫瘍免疫効果を引き出すことを主旨とした骨髄非破壊的移植、いわゆるミニ移植の安全性と有効性を、厳正な多施設共同第

I/II 相臨床試験を行って確認することを目指した。これによる波及効果として、我が国における移植領域の臨床試験体制の基盤整備も図った。

最近に至って、同種造血幹細胞移植のもつ抗腫瘍効果は、前治療として行う大量抗癌剤療法そのものよりも、むしろその後に患者体内で生着して増殖するドナー由来のリンパ球などを介して発生する GVT 効果と呼ばれる免疫学的効果の果たす役割が大きいことが明らかとなった。ただ通常と同種移植を行った場合には重度の副作用が多発するため、固形腫瘍患者に対しては施行されることはなかった。このため、前処置関連毒性を少なくすることで治療の安全性を著しく高めたミニ移植が開発された。本研究では、難治性固形腫瘍患者に対して、この同種細胞免疫療法の特徴を強調したミニ移植を用いた新たな治療法を開発する。質の高いエビデンスを得るために、厳正な臨床試験を行った。

B. 研究方法

本研究の対象となったのは、他に有効な治療法がない転移性の腎癌(第 I/II 相臨床試験、予定登録症例

30例)、あるいは膀胱癌や悪性黒色腫などの固形腫瘍患者(国立がんセンター中央病院における第I相臨床試験)である。説明同意を書面で得た後に、HLAの一致した血縁ドナーに顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を皮下注射して末梢血幹細胞を動員した後に、アフエレーシスを行って幹細胞を採取して凍結保存する。患者には、ドナーの造血幹細胞とリンパ球の生着を促進する目的で、当院で開発した骨髄非破壊的前処置としてプリン誘導体であるフルダラピン(30 mg/kg/day x 6日)とブスルファン(4 mg/kg x 4日)、並びに抗胸腺リンパ球抗体(ATG) 2.5 mg/kg/日を2日間投与する。前処置療法終了後に保存した細胞を解凍して輸注する。移植前後の合併症の程度、生着の速さ、感染症の頻度、急性及び慢性GVHDの頻度と程度、あるいは腫瘍縮小効果、長期生存と無病生存率などについて評価した。腎癌に対する第VII相試験は新GCPに基づいて実施するために、データ管理は特定非営利活動法人である日本臨床研究支援ユニット(代表、大橋靖雄)に委託した。その他の癌に対する第I相試験については、国立がんセンター中央病院に専任のデータマネージャーを配して設置したデータセンターで厳正に執り行った。

#### <倫理面への配慮>

本研究を実施するにあたっては、ヘルシンキ宣言や米国ベルモントレポート等の国際的倫理原則に従った。つまり、本研究に対する倫理審査委員会の承認が得られた施設からのみ患者登録を行う。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。

#### C. 研究結果

多施設共同新GCP試験には6名を、また国立がんセンター中央病院における他に有効な治療を持たない転移性固形腫瘍患者を対象とした第I相臨床試験には、インターフェロン療法を含む前治療に不応の転移性腎癌17例を含む計47例を登録して試験を継続中である。腎細胞癌、大腸癌の一部などにおいては明らかな腫瘍縮小効果を観察した。

班員施設でミニ移植を施行された腎癌患者について検討したところ、移植後180日以内の早期に死

亡したのは診断時から転移巣を有する急速進行例や移植時全身状態の悪い患者であった。一方、これらを欠く患者では、長期のGVT効果が得られることが判明した。付随研究の結果、GVT効果には特異的免疫と非特異的免疫系の双方が関与する可能性が初めて示され、現在、標的抗原と効果担当細胞の解明を進めている。

本臨床研究を遂行する過程で、参加各施設においても臨床試験を推進するための人的基盤作りを積極的に行った。具体的には、若手医師を対象として試験計画書、症例報告書や各種の標準手順書の具体的な作成方法に関する教育会合を開いた。同時に、主要登録施設である国立がんセンター中央病院に研修医あるいは見学者として全国各施設の若手医師やコメディカルを受け入れ、合併症を含めた治療法、患者管理方法や試験管理法を具体的に教示することで治療の均てん化に大きく寄与した。

#### D. 考察

本研究では厳正なデータ管理を行うため、本治療法の安全性と有用性を短期間に高い信頼性で検証し、海外を先導する研究成果を示すことが可能となる。これによって、現在は有効な治療法のない多くの患者に対する根治的治療法を開発することは意義深い。同時に、該当領域における我が国の臨床試験基盤を構築し、患者や社会に対する情報公開に努め、治療の均てん化も推進したことで厚生労働行政にも大きく寄与したと考える。付随基礎研究の成果は、今後の特異的免疫療法の開発にも応用可能である。

#### E. 結論

本研究の結果、難治性固形腫瘍に対する同種免疫反応を利用した治療が有効である可能性が示唆された。また、我が国における移植領域の臨床試験体制の基盤整備や均てん化の推進にも寄与したと考える。

#### F. 健康危機情報

現在までのところ、試験の中止に関わるような重大な有害事象の発生は認めていない。医薬品の適応拡大を目的とした医師主導臨床試験を計画・実施するうえでは、安全性情報の取扱いが最も重要な課題となる。このような質の高い臨床試験で得られる安

全性情報は、将来的に国内の共有情報としてデータベース化することにより、規制当局への報告の際の重要なデータソースになると共に、我々自身に重要な意味を持って還元される貴重なデータとなり得る。また、これは、抗癌剤を含めた医薬品、医療機器、及び生物由来製品などの臨床開発、適正使用に大きく寄与すると考えられ、海外との情報交換も可能な形式での蓄積が必要不可欠であるため、本研究の重要課題の一つとして取り組む。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Horii S, Heike Y, Takei M, Maruyama M, Inoue Y, Lee JJ, Kim HJ, Harada Y, Kawai H, Shimosaka A, Kami M, Tanosaki MD, Wakasugi H, Saito S, Takaue Y, Kakizoe T: Freeze-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14+ monocytes. *J Immunother*, 27:27-35, 2004.
2. Horii A, Kami M, Kim SW, Murashige N, Sakiyama M, Kojima R, Hamaki T, Makimoto A, Miyakoshi S, Masuo S, Taniguchi S, Kunitoh H, Takaue Y: Urgent need for a validated tumor response evaluation system for use in immunotherapy. *Bone Marrow Transplant*, 33:255-256, 2004.
3. Kawano Y, Chan LL, Watanabe T, Abe T, Okamoto Y, Makimoto A, Nakagawa R, Watanabe H, Suzuya H, Takaue Y: Cryopreservation of mobilized blood stem cells at a higher cell concentration without the use of a programmed freezer. *Ann Hematology*, 83:50-54, 2004.
4. 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: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from 2- or 3-loci-mismatched related donors in adult Japanese patients with high-risk hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 33:279-289, 2004.
5. Kamitsuji Y, Mori S, Kami M, Yamada H, Shirakawa K, Kishi Y, Murashige N, Kim SW, Heike Y, Takaue Y: Fatal deep vein thrombosis after allogeneic reduced-intensity hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of metastatic gastric cancer. *Ann Hematol*, 83:533-535, 2004.
6. Harashima N, Kurihara K, Utunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M, Ohashi T, Fukui F, Hasegawa A, Masuda T, Takaue Y, Okamura J, Kannagi M: Graft-versus-human T-cell leukemia virus type-I response in adult T-cell leukemia patients following non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res*, 64:391-399, 2004.
7. Horii A, Kami M, Kim SW, Chizuka A, Kojima R, Imataki O, Sakiyama M, Hamaki T, Onishi Y, Usubuchi N, Kishi Y, Murashige N, Tajima K, Miyakoshi S, Heike Y, Masuo S, Taniguchi S, Takaue Y: Development of early neutropenic fever, with or without bacterial infection, is still a significant complication after reduced-intensity stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 10:65-72, 2004.
8. 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.
9. Kusumi E, Kami M, Yuji K, Hamaki T, Murashige N, Kim SW, Heike Y, Ueyama J, Miyakoshi S, Tanosaki R, Morinaga S, Mineishi S, Muto Y, Takaue Y: Feasibility of reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched unrelated donor. *Bone Marrow Transplant*, 33:697-702, 2004.
10. Hamaki T, Kami M, Kim SW, Onishi Y, Kishi Y, Murashige N, Horii A, Kojima R, Sakiyama M, Imataki O, Heike Y, Tanosaki R, Masuo S, Miyakoshi S, Taniguchi S, Tobinai K, Takaue Y: Reduced-intensity stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor in patients with

- myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 33:891-900, 2004.
11. Lee JJ, Nam CE, Nam JH, Lee HC, Chung IJ, Park MS, Choi BH, Song WH, Lee IK, Park KS, Kook H, Hwang TJ, Takei M, Takaue Y, Kim HJ: Generation of cytotoxic donor CD8+ T cells against relapsing leukemic cells following allogeneic transplantation by stimulation with leukemic cell- or leukemic lysate pulsed donor cell-derived dendritic cells. *Leuk Res*, 28:517-524, 2004.
  12. Shimizu A, Sasaki H, Aoyagi K, Yoshida M, Kato K, Heike Y, Ikarashi Y, Shirakawa K, Takaue Y, Miyajima A, Terada M, Nagai H, Wakasugi H: The mouse natural killer T cell-associated antigen recognized by U5A2-13 monoclonal antibody is intercellular adhesion molecule-1. *Immunol Lett* 92:227-235, 2004.
  13. Imataki O, Kim SW, Kami M, Gotoh M, Komaba S, Kasai M, S Hashino S, Naito K, Masuda M, Anan K, Teshima H, Togitani K, Inoue T, Nishimura M, Adachi Y, Fukuhara T, Yamashita T, Uike N, Kobayashi Y, Hamaguchi M, Higuchi M, Kawakami K, Takaue Y: A nationwide survey of deep fungal infections and fungal prophylaxis after hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplant*, 33:1173-1179, 2004.
  14. Tanimoto TE, Yamaguchi T, Tanaka Y, Saito A, Tajima K, Karasuno T, Kasai M, Kishi K, Mori T, Maseki N, Morishima S, Miyakoshi S, Kasai M, Ohno Y, Kim SW, Numata A, Kami M, Takaue Y, Mori S, Harada M: Comparative analysis of clinical outcomes after allogeneic bone marrow transplantation versus peripheral blood stem cell transplantation from a related donor in Japanese patients. *Br J Haematol*, 125:480-493, 2004.
  15. Hori A, Kami M, Kim SW, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y: Balance between acute graft-versus-host disease and graft-versus-tumor effect after reduced-intensity transplantation for metastatic renal cell carcinoma. *Hematol J*, 5:276-278, 2004.
  16. Miyakoshi S, Yuji K, Kami M, Kusumi E, Kishi Y, Kobayashi K, Murashige N, Hamaki T, Kim SW, Ueyama J, Mori S, Morinaga S, Muto Y, Masuo S, Kanemaru M, Hayashi T, Takaue Y, Taniguchi S: Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with advanced hematological diseases. *Clin Cancer Res*, 10:3586-3592, 2004.
  17. Sekiguchi N, Nishimoto J, Tanosaki R, Kubota N, Yokota Y, Kobayashi Y, Watanabe T, Kami M, Takaue Y, Matsuno Y, Tobinai K: EBV-positive Burkitt lymphoma as a late-onset posttransplantation lymphoproliferative disorder after allogeneic stem cell transplantation. *Int J Hematol*, 79:387-389, 2004.
  18. Nakagawa T, Kami M, Hori A, Kim SW, Murashige N, Hamaki T, Kishi Y, Fujimoto H, Matsuoka N, Okajima E, Komiyama M, Tobisu K, Wakayama T, Uike N, Tajima K, Makimoto A, Mori S, Tanosaki R, Takaue Y, Kakizoe T: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity conditioning regimen for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: single institution experience with a minimum 1-year follow-up. *Exp Hematol*, 32:599-606, 2004.
  19. Kishi Y, Miyakoshi S, Kami M, Ikeda M, Katayama Y, Murashige N, Kusumi E, Yuji K, Kobayashi K, Kato D, Hamaki T, Matsumura T, Kim SW, Morinaga S, Mori S, Kanemaru N, Hayashi T, Takaue Y, Taniguchi S: Early central nervous system complications after reduced-intensity stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 10:561-568, 2004.
  20. Kojima R, Kami M, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Miyakoshi S, Tajima K, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y: Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*, 10:645-652, 2004.
  21. Sakiyama M, Kami M, Hori A, Imataki O, Hamaki T, Murashige N, Kobayashi K, Kishi Y, Kojima R, Kim SW, Kusumi E, Yuji K, Miyakoshi S, Mori S, Tanosaki R, Taniguchi S, Takaue Y: Regimen-related toxicity following

- reduced-intensity stem-cell transplantation: comparison between Seattle criteria and National Cancer Center Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) version 2.0. *Bone Marrow Transplant*, 34:787-794, 2004.
22. Kami M, Makimoto A, Heike Y, Takaue Y: Reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation (RIST) for solid malignancies. *Jap J Clin Oncol*, 34:707-716, 2004.
  23. Hori A, Kanda Y, Goyama S, Onishi Y, Komeno Y, Mitani K, Kishi Y, Ogawa S, Imataki O, Chiba S, Kojima R, Hamaki T, Sakiyama M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y, Hirai H: A prospective trial to evaluate the safety and efficacy of pravastatin for the treatment of refractory chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*, 79:372-374, 2004.
  24. Miyakoshi S, Kami M, Kishi Y, Murashige N, Yuji K, Kusumi E, Matsumura T, Onishi Y, Kobayashi K, Kim SW, Hamaki T, Takaue Y, Taniguchi S: Fatal hepatic failure associated with graft rejection following reduced-intensity stem-cell transplantation for chronic idiopathic myelofibrosis (CIMF). *Leuk Lymphoma*, 45:2513-2516, 2004.
  25. Kojima R, Kami M, Hori A, Murashige N, Ohnishi M, Kim SW, Hamaki T, Kishi Y, Tsutsumi Y, Masauzi N, Heike Y, Mori S, Kobayashi K, Masuo S, Tanosaki R, Takaue Y: Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation as an immunotherapy for metastatic colorectal cancer. *Transplantation*, 78:1740-1746, 2004.
  26. Kishi Y, Kami M, Murashige N, Tanaka Y, Fujisaki G, Kusumoto S, Mori S, Takaue Y, Tanosaki R: Hyperacute GVHD and emergence of peripheral CD3+CD56+ T-cells and activated natural killer cells are useful markers for early diagnosis of post-transplant hemophagocytic syndrome. *Bone Marrow Transplant*, 35:415-417, 2005.
  27. Hori A, Kanda Y, Goyama S, Onishi Y, Komeno Y, Mitani K, Kishi Y, Ogawa S, Imataki O, Chiba S, Kojima R, Hamaki T, Sakiyama M, Kami M, Makimoto A, Tanosaki R, Takaue Y, Hirai H; Japan Hematology and Oncology Clinical Study Group. A prospective trial to evaluate the safety and efficacy of pravastatin for the treatment of refractory chronic graft-versus-host disease. *Transplantation*, 79:372-374, 2005.
  28. Chizuka A, Kami M, Kanda Y, Murashige N, Kishi Y, Hamaki T, Kim SW, Hori A, Kojima R, Mori SI, Tanosaki R, Gomi H, Takaue Y: Value of surveillance blood culture for early diagnosis of occult bacteremia in patients on corticosteroid therapy following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 35:577-582, 2005.
  29. Akiyama Y, Tanosaki R, Inoue N, Shimada M, Hotate Y, Yamamoto A, Yamazaki N, Kawashima I, Nukaya I, Takesako K, Maruyama K, Takaue Y and Yamaguchi K: Clinical response in Japanese metastatic melanoma patients treated with peptide cocktail-pulsed dendritic cells. *J Transl Med*, 3:4, 2005.
  30. Kobayashi K, Kami M, Ikeda M, Kishi Y, Murashige N, Tanosaki R, Mori S, Takaue Y: Fulminant septicemia caused by *Bacillus cereus* following reduced-intensity umbilical cord blood transplantation. *Haematologica*, 90:ECR06, 2005.
2. 学会発表
1. Suzuya H, Watanabe T, Kawano Y, Nakagawa R, Wakata Y, Onishi T, Kaneko M, Watanabe H, Okamoto Y, Kuroda Y, Takaue Y: Analysis of factors associated with G-CSF induced PBSC yield in healthy donors. 10<sup>th</sup> Congress of The International Society of Hematology, Asian-Pacific Division. Nagoya, September 2-4, 2004.
  2. Saito AM, Takaue Y, Ohashi Y: Reassessment of current measures for collecting safety data in autologous hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for non-Hodgkin's lymphoma (NHL). The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #2194).
  3. Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Kanda Y, Takaue Y, Mizoguchi H, Kawakami Y: Measurement of functional cytomegalovirus (CMV)-specific T cells by Interferon-gamma-Enzyme-Linked Immunospot (IFN- $\gamma$ ELISPOT) assay specific for a single

- immunodominant epitope enables the sensitive evaluation of immune recovery for CMV in patients after allogeneic stem cell transplantation (HSCT) with a reduced-intensity regimen (RIST). The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #3157).
4. Imataki O, Heike Y, Iizuka A, Kuwatani M, Ikarashi Y, Takaue Y, Wakasugi H: Efficient *ex vivo* expansion of V $\alpha$ 24+NKT cells from G-CSF-mobilized PBMC. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #2865).
  5. Morita M, Hosokawa M, Heike Y, Sasaki T, Ebisawa M, Mori S, Tanosaki R, Kami M, Nosaka K, Ohnishi M, Tobinai K, Takaue Y: Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) monitoring procedures with tetramer and intracellular IFN- $\gamma$  assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #3161).
  6. Morita M, Hosokawa M, Heike Y, Mori S, Tanosaki R, Kami M, Nosaka K, Ohnishi M, Takaue Y: Follow-up of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) with tetramer-based analysis after allogeneic stem cell transplantation (SCT) in patients with renal cell carcinoma (RCC). The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #2122).
  7. Teshima T, Matsuo K, Matsue K, Kawano F, Taniguchi S, Hatanaka K, Nakao S, Tanimoto M, Hara M, Eto T, Wake A, Abe Y, Ohno Y, Takemoto Y, Harada M, Takahashi S, Ishida Y, Kanda Y, Imamura M, Kasai M, Takaue Y: Impact of HLA mismatch on the incidence of acute graft-versus-host disease and rejection after reduced-intensity conditioning hematopoietic stem cell transplantation. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #2758).
  8. Kojima R, Heike Y, Narumi J, Yamagata S, Chizuka A, Nosaka K, Kami M, Mori S, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y: Analysis of chimerism induction following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with a reduced-intensity regimen. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #5027).
  9. Tanosaki R, Hotate Y, Shimada M, Inoue N, Onishi Y, SW Kim, Makimoto A, Hosono A, Kami M, Mori S, Tobinai K, Takaue Y: Collection of autologous peripheral blood stem cells (PBSC): Safety evaluations during the peri-apheresis period. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #5038).
  10. Kusumoto S, Tanosaki R, Onishi Y, Akahane D, Sugimoto K, Terada Y, Kim SW, Kami M, Mori S, Heike Y, Takaue Y, Tobinai K: High frequency of engraftment fever (EF) in patients with malignant lymphoma (ML) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with a reduced-intensity conditioning regimen. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #5039).
  11. Onishi Y, Mori S, Kusumoto S, Akahane D, Sugimoto K, Terada Y, Kim SW, Heike Y, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y: Attenuated preemptive therapy against cytomegalovirus (CMV) reactivation/disease consisting of a higher cutoff point and a lower initial dose of ganciclovir after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with an HLA-identical sibling donor. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #5068).
  12. Terada Y, Onishi Y, Kim SW, Kami M, Mori S, Heike Y, Takaue Y, Tanosaki R: Clinical Significance of Positive Clostridium Difficile (CD) Toxin in the stool of patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #5078).
  13. Akahane D, Onishi Y, Kim SW, Kami M, Mori S, Heike Y, Takaue Y, Tobinai K, Tanosaki R:

Hematopoietic recovery after allogeneic transplantation using G-CSF-mobilized and cryopreserved peripheral blood stem cells. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #5142).

14. Sugimoto K, Onishi Y, Kusumoto S, Kim SW, Kami M, Mori S, Heike Y, Takaue Y, Tobinai K, Tanosaki R: Reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) for non-Hodgkin lymphoma (NHL): A single-institute experience of 52 patients. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #5145).
15. Yuji K, Kami M, Kato D, Miura Y, Myojo T, Kusumi E, Narimatsu H, Kishi Y, Hamaki T, Matsumura T, Miyakoshi S, Ueyama J, Morinaga S, Takaue Y, Taniguchi S: Improvement of concurrent autoimmune diseases following reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) for hematological disorders: Graft-versus-autoimmunity (GVA) effect. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, December 4-7, 2004 (abstr #5183).
16. Onishi Y, Mori S, Kusumoto S, Sugimoto K, Akahane D, Kim S, Heike Y, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y: Conditioning with fludarabine and busulfan combined with 4 Gy of total body irradiation for unrelated bone marrow transplantation. The 31st Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Prague, Czech Republic, March 20-23, 2005. (abstr. 165)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

厚生労働科学研究費補助金 がん臨床研究事業  
分担研究報告書

『 同種移植後免疫回復の解析並びにその結果に基づいた診断法・治療法の開発研究 』  
分担研究者 平家 勇司 国立がんセンター研究所／薬効試験部 主任研究官

**研究要旨** 骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血幹細胞移植患者(ミニ移植)における、サイトメガロウイルス (CMV) 並びに腫瘍抗原に対する特異的 T リンパ球の免疫回復を Tetramer 法を用いて解析した。HLA-A02 症例において、移植後早期から CMV に対する CTL が誘導されることが観察された。CMV に対する CTL の出現は、移植片対宿主病 (Graft versus Host Disease: GVHD) やそれに対するシクロスポリン投与の影響を受けなかった。また、Tetramer 解析にて CMV 特異的 CTL の回復が認められているにもかかわらず、CMV 再活性化長期間持続する例においては、CMV 抗原刺激に対する活性化能 (IFN 産生能) が低下していることが明らかとなった。HLA-A24 症例に対しても、同一の方法を用いて解析を試みたが、今回用いた Tetramer では、CMV 特異的 T 細胞の回復は認められなかった。一方、HLA-A02 と A24 間で、他の HLA の分布の違いや、CMV 再活性化率、重傷度の程度に差がないことから、今回用いた A24 関連ペプチドが A02 関連ペプチドと比して活性が低いと考えられた。腫瘍抗原に関しては、PR-1、PRAME、WT-1 に関して A02 症例を対象として解析を行った。WT-1 に関しては抗原特異的 T 細胞が検出できる頻度が高かったことから、症例を選択して経時的に観察した。その結果、WT-1 に対する特異的 T 細胞は、移植後早期に GVHD の発症にあわせて出現するものの、その後消失する例があることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

同種造血幹細胞移植療法は、その治療効果の大半を同種免疫が担っていることが明らかとなっている。また、移植に伴う重症合併症である移植片対宿主病 (Graft versus Host Disease: GVHD) や移植後ウイルス・真菌感染症も、免疫によって引き起こされることが知られている。近年急速に普及している骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血幹細胞移植 (ミニ移植) は、大量化学療法や大量放射線療法による移植後早期の移植関連合併症の軽減を通じて移植成績の向上や移植適応患者の拡大に寄与したが、上記の免疫回復が深く関わる事象の改善には繋がっていない。移植療法の更なる向上のためには、移植後の免疫回復を詳細に解析し、治療効果を高め、副作用を減少させる取り組みが必要である。本研究は、これらの背景に基づき、ミニ移植後の CMV 及び腫瘍抗原に対する特異的免疫回復を解析することを目的に計画した。

#### B. 研究方法

研究方法 (患者検体の採取、詳細な解析方法を含む) を記載した研究計画書を作成し、国立がんセンター内倫理審査委員会にて承認を得た。具体的な研究方法は以下の通りである。

##### 1) CMV 特異的免疫の解析

①採血——ミニ移植を行った患者において、移植前、移植後 30 日目、60 日目、90 日目、120 日目、180 日目、240 日目、360 日目に 20ml の末梢血採血を行った。遷延する CMV 血漿や CMV 感染症が見られる例では、発症時点及び回復時点で同様の採血を行った。

②検体の処理——採血した検体は直ちに国立がんセンター中央病院・血液移植療法科・支援室に持ち込み、単核球を分離した。分離した単核球を CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD20, CD25, CD34, CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD161, V $\alpha$ 24 などの細胞表面分化マーカーで染色し、細胞表面マーカーの解

析を行うとともに、Tetramer 解析を行った。さらに、Tetramer 陽性例のうち、可能な症例に関しては Peptide 刺激後の細胞内 IFN 産生の解析を行った。

③抗原特異的 T 細胞の解析は、Tetramer 法を用いて行った。(昨年度は、ELISPOT 法を用いて行ったが、抗原非特異的反応が完全にのぞけないことが明らかとなったため、本年度は Tetramer 法を用いて解析し、昨年度の ELISPOT の解析結果と比較検討することとした)。CMV 特異的抗原として、HLA-A02 症例に対しては NLVPMVATV を、HLA-A24 症例に対しては QYDPVAALF を用いた。HLA-A02 症例で可能な例においては、Genotype を解析し、A0201 で同定された抗原ペプチドが A0206 でも共通の抗原ペプチドとして働くか否かを検討した。

## 2) 腫瘍抗原特異的免疫の解析

①採血 CMV と同様の採血ポイントに加え、GVL/GVT が観察された時点で追加採血を行った。

②検体の処理 CMV と同様。解析は HLA-A02 を持つ症例に絞り、PR1、PRAME、WT-1 に対する Tetramer 法を用いて解析した。腎細胞がん 2 例に関しては、WT-1 特異的 T 細胞を経時的に解析した。

## <倫理面への配慮>

研究計画書を作成し、国立がんセンター内の倫理審査委員会の承認を得て行った。採血に際しては、同日の患者状態を診察し、患者に臨床不利益を与えないよう配慮を行った。

## C. 研究結果

### 1) CMV 特異的免疫の解析

同一の方法を用いて、HLA-A02 並びに HLA-A24 症例を解析を行った。HLA-A02 症例の多くで CMV 特異的 T 細胞が検出されたのに対して、HLA-A24 症例では検出されないか、検出されても陽性細胞の割合は低かった。HLA-A02 と-A24 両陽性検体を用いた解析においても、両者の差は明らかであった。両者間で CMV の再活性化率、重症化率に差が見られないこと、HLA-B7 を始めとする他の HLA-A,B,C,DR の分布に差がないことから、現在知られている HLA-A24 上に提示される抗原ペプチド以外に、活性の強いペプチドが存在する可能性が示唆された。

HLA-A02 の一部症例で、テトラマー陽性細胞が十分見られているにもかかわらず、CMV の再活性

化が遷延したり感染症が発症する例が見られた。これらの症例では、Tetramer 陽性にもかかわらず、抗原刺激による細胞内 IFN 産生能が低いことが明らかとなった。

### 2) 腫瘍抗原特異的免疫の解析

CMV と同様の方法を用いて、HLA-A02 症例を対象として PR1、PRAME、WT-1 に対する CTL の解析を行った。PRAME と WT-1 に対する CTL が検出され、中でも WT-1 に対する CTL は、急性骨髄性白血病症例をはじめとする複数の造血器腫瘍と、腎がん症例 2 例において陽性となった。腎がん症例に関しては経時的な解析を行い、WT-1 に対する CTL は移植後早期から出現すること、GVHD の出現に伴い出現すること、GVHD の軽快と共に消失するか或いは自然に消失する例がみられた。

## D. 考察

### 1) CMV 特異的免疫の解析

CMV に対する CTL の解析によって、現在報告されている HLA-A02 関連抗原ペプチドと HLA-A24 関連ペプチドではその活性に差があり、HLA-A24 関連ペプチドを用いた免疫回復モニタリングは難しいと考えられた。今後、新たな HLA-A24 関連ペプチドの検索が必要と考えられる。また、HLA-A02 においても、テトラマーで解析した CMV 特異的 CTL の頻度と臨床所見は必ずしも相関せず、臨床像を反映するには、抗原刺激後の IFN 産生などの活性化の解析を含めた総合評価が必要であると考えられた。

この結果から、移植後にみられる抗ウイルス剤抵抗性の CMV 再活性化に対しては、CMV Lysate などで活性化した CD4 細胞を用いた免疫治療の戦略が必要であると考えられた。また、その際 HLA-A02 症例に関しては、CD8T 細胞を含めたモニタリングを併せ行うことと、HLA-A24 症例に対しては新たな抗原検索を併せ行うことが必要と考えられた。

### 2) 腫瘍抗原特異的免疫の解析

腫瘍抗原に対する特異的 T 細胞の解析では、我々の検討した範囲で WT-1 に対する免疫反応が最も強く検出された。CTL は移植後 100 日以内に検出されることから、ドナー体内にすでに存在していたメモリーが末梢性に増殖したものと考えられる。WT-1 に対する CTL は健常者の末梢血から誘導されることは既に報告されており、我々の結果はそれを裏付け

ている。WT-1 に対する CTL は、急性 GVHD 発症にあわせて出現するが、その消失は GVHD の消失に伴う場合もあれば、自然に消失するものもある。腫瘍の画像診断と比較すると、WT-1 に対する CTL が検出される時期に増大速度が遅く、検出されなくなると急速に増大する例が経験された。この症例において、WT-1 に対する CTL が腫瘍増大抑制に寄与しているのか、抗腫瘍免疫の反映に過ぎないのかは不明である。左記疑問は、ミニ移植とペプチドワクチン療法、樹状細胞療法、抗原特異的リンパ球療法との併用療法によって明らかとすることが可能であると考えられる。

#### E. 結論

移植後に CMV に対する免疫は比較的早期に回復する例があり、HLA-A02 においてはそのモニタリングが可能である。ただし、ステロイド治療中の例では高い CTL が検出できるにもかかわらず、CMV 感染症が遷延する例が見られるなど、臨床検査として行うには現時点での解析には限界がある。今後、細胞内 IFN 産生など活性化の指標と組み合わせた検討を行う必要があると考える。HLA-A24 における抗原に関しては、現時点で報告されている抗原ペプチドは活性が十分ではなく、新たな抗原検索をすすめていくことが必用と考えられた。

移植後の腫瘍抗原特異的 CTL の検討では、WT-1 に対する CTL が検出できる例が多数見られた。CTL は、GVHD の発症に伴い出現するが、その消失は GVHD の消失に伴う例と、GVHD に関係なく消失する例が見られている。WT-1 に対する CTL が単独で治療効果に寄与するかは不明であるが、CTL の出現・消失と、治療効果には関連が見られる例があることから、今後ミニ移植にペプチドワクチン療法や樹状細胞療法、抗原特異的リンパ球療法を組み合わせた治療法が検討課題となると思われる。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hori, A., Kami, M., Kim, S. W., Chizuka, A., Kojima, R., Imataki, O., Sakiyama, M., Hamaki, T., Onishi, Y., Usubuchi, N., Kishi, Y., Murashige, N., Tajima, K., Miyakoshi, S., Heike, Y., Masuo, S., Taniguchi, S., and Takaue, Y. Development of early neutropenic fever, with or without bacterial infection, is still a significant complication after reduced-intensity stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 10: 65-72, 2004.
2. Hori, S., Heike, Y., Takei, M., Maruyama, M., Inoue, Y., Lee, J. J., Kim, H. J., Harada, Y., Kawai, H., Shimosaka, A., Kami, M., Tanosaki, M. D., Wakasugi, H., Saito, S., Takaue, Y., and Kakizoe, T. Freeze-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14+ monocytes. *J Immunother*, 27: 27-35, 2004.
3. Kusumi, E., Kami, M., Yuji, K., Hamaki, T., Murashige, N., Hori, A., Kojima, R., Kishi, Y., Kim, S. W., Ueyama, J., Miyakoshi, S., Tanosaki, R., Morinaga, S., Mori, S., Heike, Y., Muto, Y., Masuo, S., Taniguchi, S., and Takaue, Y. Feasibility of reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched unrelated donor. *Bone Marrow Transplant*, 2004.
4. Hamaki, T., Kami, M., Kim, S. W., Onishi, Y., Kishi, Y., Murashige, N., Hori, A., Kojima, R., Sakiyama, M., Imataki, O., Heike, Y., Tanosaki, R., Masuo, S., Miyakoshi, S., Taniguchi, S., Tobinai, K., and Takaue, Y. Reduced-intensity stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor in patients with myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 2004.
5. Shimizu, A., Sasaki, H., Aoyagi, K., Yoshida, M., Kato, K., Heike, Y., Ikarashi, Y., Shirakawa, K., Takaue, Y., Miyajima, A., Terada, M., Nagai, H., and Wakasugi, H. The mouse natural killer T cell-associated antigen recognized by U5A2-13 monoclonal antibody is intercellular adhesion molecule-1. *Immunol Lett*, 92: 227-235, 2004.
6. Kami, M., Makimoto, A., Heike, Y., and Takaue, Y. Reduced-intensity Hematopoietic Stem Cell

- Transplantation (RIST) for Solid Malignancies. *Jpn J Clin Oncol*, 34: 707-716, 2004.
7. Kojima, R., Kami, M., Hori, A., Murashige, N., Ohnishi, M., Kim, S. W., Hamaki, T., Kishi, Y., Tsutsumi, Y., Masauzi, N., Heike, Y., Mori, S., Kobayashi, K., Masuo, S., Tanosaki, R., and Takaue, Y. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation as an immunotherapy for metastatic colorectal cancer. *Transplantation*, 78: 1740-1746, 2004.
  8. Shimizu, A., Sasaki, H., Aoyagi, K., Yoshida, M., Kato, K., Heike, Y., Ikarashi, Y., Shirakawa, K., Takaue, Y., Miyajima, A., Terada, M., Nagai, H., and Wakasugi, H. The mouse natural killer T cell-associated antigen recognized by U5A2-13 monoclonal antibody is intercellular adhesion molecule-1. *Immunol Lett*, 92: 227-235, 2004.
  9. Hamaki, T., Kami, M., Kim, S. W., Onishi, Y., Kishi, Y., Murashige, N., Hori, A., Kojima, R., Sakiyama, M., Imataki, O., Heike, Y., Tanosaki, R., Masuo, S., Miyakoshi, S., Taniguchi, S., Tobinai, K., and Takaue, Y. Reduced-intensity stem cell transplantation from an HLA-identical sibling donor in patients with myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 33: 891-900, 2004.
  10. Kusumi, E., Kami, M., Yuji, K., Hamaki, T., Murashige, N., Hori, A., Kojima, R., Kishi, Y., Kim, S. W., Ueyama, J., Miyakoshi, S., Tanosaki, R., Morinaga, S., Mori, S., Heike, Y., Muto, Y., Masuo, S., Taniguchi, S., and Takaue, Y. Feasibility of reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched unrelated donor. *Bone Marrow Transplant*, 33: 697-702, 2004.
  11. Hori, A., Kami, M., Kim, S. W., Chizuka, A., Kojima, R., Imataki, O., Sakiyama, M., Hamaki, T., Onishi, Y., Usubuchi, N., Kishi, Y., Murashige, N., Tajima, K., Miyakoshi, S., Heike, Y., Masuo, S., Taniguchi, S., and Takaue, Y. Development of early neutropenic fever, with or without bacterial infection, is still a significant complication after reduced-intensity stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 10: 65-72, 2004.
  12. Kamitsuji, Y., Mori, S., Kami, M., Yamada, H., Shirakawa, K., Kishi, Y., Murashige, N., Kim, S. W., Heike, Y., and Takaue, Y. Fatal deep vein thrombosis after allogeneic reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of metastatic gastric cancer. *Ann Hematol*, 83: 533-535, 2004.
  13. Hori, S., Heike, Y., Takei, M., Maruyama, M., Inoue, Y., Lee, J. J., Kim, H. J., Harada, Y., Kawai, H., Shimosaka, A., Kami, M., Tanosaki, M. D., Wakasugi, H., Saito, S., Takaue, Y., and Kakizoe, T. Freeze-thawing procedures have no influence on the phenotypic and functional development of dendritic cells generated from peripheral blood CD14+ monocytes. *J Immunother*, 27: 27-35, 2004.
  14. Heike, Y., Hosokawa, M., Osumi, S., Fujii, D., Aogi, K., Takigawa, N., Ida, M., Tajiri, H., Eguchi, K., Shiwa, M., Wakatabe, R., Arikuni, H., Takaue, Y. and Takashima, S. Identification of Serum Protein Related to Adverse Effects Induced by Docetaxel Infusion from Protein Expression Profiles of Serum Using SELDI ProteinChip System. *AntiCancer Res*. In press
  15. Harada, Y., Imataki, O., Heike, Y., Kawai, H., Shimosaka, A., Mori, S., Kami, M., Tanosaki, R., Ikarashi, Y., Iizuka, A., Yoshida, M., Wakasugi, H., Saito, S., Takaue, Y., Takei, M., and Kakizoe, T. Expansion of  $\alpha$ -Galactosylceramide-Stimulated Va24+ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials. *Journal of Immunotherapy*. In press
- ## 2. 学会発表
1. 五十嵐美德、飯塚明、金田知詞、平家勇司、若杉尋、体外で増殖・活性化したVa14i NKT細胞の抗腫瘍活性：第1回日本癌学会カンファレンス 2004年
  2. 今滝修、平家勇司、五十嵐美德、飯塚明、桑谷将城、原田ゆきえ、高上洋一、若杉尋、PBSCT donorにおけるVa24NKT細胞増殖の効率化G-CSF mobilizationの役割：第8回基盤的癌免疫研究会総会 2004年
  3. 五十嵐美德、飯塚明、桑谷将城、今滝修、平家勇司、若杉尋、体外で $\alpha$ -galactosylceramide で増殖・活性化したマウス脾細胞の抗腫瘍活性：第8回基盤的癌免疫研究会総会 2004年

4. 五十嵐美德、飯塚明、平家勇司、吉田光二、若杉尋、 $\alpha$ -galactosylceramideによって体外で誘導されるNK細胞の抗腫瘍活性：第63回日本癌学会学術総会 2004年
5. 今滝修、平家勇司、原田ゆきえ、飯塚明、五十嵐美德、白川一男、石田秀行、高上洋一、若杉尋、ヒトV $\alpha$ 24陽性NKT細胞体外増殖の効率化を目指した細胞分離操作：第63回日本癌学会学術総会 2004年
6. 今滝修、平家勇司、桑谷将城、五十嵐美德、高上洋一、若杉尋、健康人ドナーおよび担がん患者におけるV $\alpha$ 24陽性NKT細胞増殖効率の比較と培養液中のG-CSFが与える影響：第34回日本免疫学会総会 2004年
7. 五十嵐美德、飯塚明、平家勇司、若杉尋、 $\alpha$ -galactosylceramide投与後のV $\alpha$ 14iNKT細胞の増殖期におけるサイトカイン産生の増強：第34回日本免疫学会総会 2004年
8. 大西康、田野崎隆二、山田実奈美、宮村耕一、井上泰宏、岡本真一郎、金成元、上昌広、森慎一郎、平家勇司、峯石真、高上洋一、急性白血病・リンパ腫の同種造血幹細胞移植後の腫瘍形成髄外再発に対する放射線療法の検討：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. 楠本茂、森慎一郎、野坂生郷、片山雄太、大西康、白淵規子、岸友紀子、村重直子、田野崎隆二、上昌広、平家勇司、渡辺隆、飛内賢正、高上洋一、2回の臍帯血移植施行後に $\gamma\delta$ 型LGL白血病を発症した急性骨髄性白血病の1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
10. 平家勇司、ミニ移植効果の臨床的・基礎的解析：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
11. Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Kanda Y, Takaue Y, Mizoguchi H, Kawakami Y: Measurement of functional cytomegalovirus (CMV)-specific T cells by Interferon-gamma-Enzyme-Linked Immunospot (IFN- $\gamma$ ELISPOT) assay specific for a single immunodominant epitope enables the sensitive evaluation of immune recovery for CMV in patients after allogeneic stem cell transplantation (HSCT) with a reduced-intensity regimen (RIST). The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, 2004 (abstr #3157).
12. Imataki O, Heike Y, Iizuka A, Kuwatani M, Ikarashi Y, Takaue Y, Wakasugi H: Efficient *ex vivo* expansion of V $\alpha$ 24+NKT cells from G-CSF-mobilized PBMC. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, 2004 (abstr #2865).
13. Morita M, Hosokawa M, Heike Y, Sasaki T, Ebisawa M, Mori S, Tanosaki R, Kami M, Nosaka K, Ohnishi M, Tobinai K, Takaue Y: Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) monitoring procedures with tetramer and intracellular IFN- $\gamma$  assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, 2004 (abstr #3161).
14. Morita M, Hosokawa M, Heike Y, Mori S, Tanosaki R, Kami M, Nosaka K, Ohnishi M, Takaue Y: Follow-up of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) with tetramer-based analysis after allogeneic stem cell transplantation (SCT) in patients with renal cell carcinoma (RCC). The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, 2004 (abstr #2122).
15. 平家勇司、森田百合子、細川麻美、高上洋一、ミニ移植におけるCMV特異的免疫再構築：第17回日本バイオセラピー学会集会総会 2004年
16. 細川麻美、森田百合子、大西康、田野崎隆二、森慎一郎、上昌広、金成元、飛内賢正、高上洋一、平家勇司、サイトメガロウイルス (CMV) 特異的CD4陽性T細胞誘導法の確立：第27回日本造血細胞移植学会総会 2004年
17. 森田百合子、細川麻美、梶田紀明、海老原知子、田野崎隆二、森慎一郎、上昌広、三浦修、高上洋一、平家勇司、同種造血幹細胞移植におけるCMV特異的免疫の解析：第27回日本造血細胞移植学会総会 2004年
18. 大西康、上野真由美、楠本茂、金成元、上昌広、平家勇司、森慎一郎、高上洋一、田野崎隆二、飛内賢正、フルダラビン (Flu) +ブスルファン (Bu) +全身放射線照射 (TBI) 4Gyを前処置として用いた非血縁者間骨髄ミニ移植17例

の後方視的検討：第27回日本造血細胞移植学会  
総会 2004年

19. 大西康、森慎一郎、楠本茂、金成元、上昌広、平家勇司、高上洋一、飛内賢正、田野崎隆二、フルダラピン (Flu) +ブスルファン (Bu) + 全身放射線照射 (TBI) 4Gyを前処置として用いた臍帯血移植14例の後方視的検討：第27回日本造血細胞移植学会総会 2004年

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

**研究要旨** 固形癌に対する治療効果の判定基準としては、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST criteria)が現在の世界標準とされているが、免疫治療の判定方法としては不適切なところが多い。しかしながら現在適切な評価方法は確立されていない。一定の時期（移植後半年及び1年）での腫瘍縮小例もしくは非増悪例の割合を代替指標として用いる方法を提唱した。重要なことは、皆が共通の同じ指標を持つことであり、グループ間のコミュニケーションを持たねばならないと考える。

#### A. 研究目的

固形癌に対するミニ移植（とくにその早期臨床試験段階）において、抗腫瘍効果を表す適切な指標を作成する。

#### B. 研究方法

現在まで国立がんセンター中央病院などで施行された固形癌に対するミニ移植症例の臨床経過をreviewし、その抗腫瘍効果（腫瘍マーカーおよび画像的な縮小/増大）の経時的な特徴をまとめてこれを臨床試験における代表値（指標）に集約する方法を検討する。これを同様の研究を行う他グループにも提示し、共通の指標を作成するよう努力する。

昨年度までの検討にて、以下のように結論された。ミニ移植後の腫瘍縮小効果は緩徐に現れることが理論上推測され、また実際の症例でも示唆されているため、一定の時期（移植後半年及び1年）での腫瘍縮小例もしくは非増悪例の割合を代替指標として用いる方法を考えた。この場合、上記の理由で、レスポンスの持続期間の記載は行わない。重要なことは、皆が共通の同じ指標を持つことであり、グループ間のコミュニケーションを持たねばならないと考える。

本年度は、この方針に基づき症例を集積し臨床評価を積み重ねるとともに、その過程で出た問題点を分析していく。

#### <倫理面への配慮>

各症例に対しては、この治療法が臨床試験であること、ならびにそれに伴う事項について十分な説明がなされ、自発的な文書での同意が取れている。その同意には、治療経過などにつき将来的な研究に応用されることも含まれている。

#### C. 研究結果

現時点でこの方法論に特段の問題点は認められず、海外の研究者にも同様の評価法でデータを提示されるよう働きかけている。早期に状態が悪化する例においては十分な評価はできないことが多かった、化学療法の効果判定の新規準となっているRECISTでも、NE (not evaluable) はPD (progressive disease) よりも効果は「下」の扱いとなっているので、これについては評価法の問題とはならないと思われる。

#### D. 考察

従来はミニ移植は比較試験が実施不可能であるとも考えられていたが、分子標的治療等の進歩により、ミニ移植などの免疫療法と、そのような新薬との比較試験が十分ありうる状況になってきた。したがって早期臨床試験において有望とされるかどうかの有効性の指標作りは、今後とも重要性を増していると考えられる。

一方、肺癌の分子標的剤の比較試験の結果から、奏効のみならず腫瘍増大のない「不変」を含めた集

団にも生存へのインパクトはあることが示唆された。早期試験の有効性指標の代表値として腫瘍縮小をもってくることは可としても、それ以外の「治療効果」を如何に表すか、免疫療法以外の領域でも議論が続いている。

## E. 結論

免疫療法における早期臨床試験の方法論は、これからデータに基づき議論を重ね、修正を加えて確立すべき分野であると考えられるが、共通の指標をもつことがきわめて重要である。とともに、他領域の治療法の評価とのすりあわせも今後の問題となってくる。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hori A, Kami M, Kim S-W, Murashige N, Sakiyama M, Kojima R, Hamaki T, Makimoto A, Miyakashi S, Masuo S, Taniguchi S, Kunitoh H, Takaue Y. Urgent need for a validated tumor response evaluation system for use in immunotherapy. Bone Marrow Transplantation, 33:255-256, 2004.

### 2. 学会発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金 がん臨床研究事業  
分担研究報告書

『 膵癌に対するミニ移植の開発研究 』

分担研究者 高橋 俊雄 東京都立駒込病院／名誉院長

**研究要旨** 消化器癌の中で最も難治性である切除不能膵癌6例とスキルス胃癌2例、切除不能進行直腸癌、胆管細胞癌、胆嚢癌各1例、計11例に対してミニ移植を行った。対象は男7例、女4例、年齢40～68才（平均58.2才）である。HLA一致の同胞から末梢血造血幹細胞を採取し患者に移植した。移植CD34陽性細胞数は $2.43 \times 10^6/\text{kg}$ 、好中球 $500/\mu\text{l}$ 以上までの日数7日、血小板5万以上/ $\mu\text{l}$ までの日数9日、T細胞の完全キメラ化までの日数17.5日、全白血球の完全キメラ化までの日数154日（何れも中央値）であった。GVT効果は腫瘍マーカー低下6例、腫瘍縮小2例に認められた。抗腫瘍効果はPR1例（膵癌）、SD6例（うち膵癌3例）、PD4例（うち膵癌2例）であった。6例に急性GVHD、5例に慢性GVHDの発症を認めた。これらの結果から、ミニ移植は難治性消化器癌に対してGVT効果を発揮することが明らかになった。

#### A. 研究目的

消化器癌の中でも膵癌、スキルス胃癌、胆道癌は外科、化学、放射線療法に抵抗する難治性癌である。それ故、これらの癌に対しては新しい治療Modalityの開発が急務である。ミニ移植は白血病に対して強い抗腫瘍効果を示すだけでなく、腎細胞癌、乳癌など固形癌に対しても抗腫瘍効果(GVT効果)を示すことが最近明らかにされた。しかし、これら難治性消化器癌に対するGVT効果は、まだ明らかにされていない。本研究の目的は、難治性消化器癌とくに膵癌に対してもミニ移植によってGVT効果が引き起こされるかどうかを明らかにすると同時に、ミニ移植が新しい膵癌治療のModalityになりうるかどうか検討することにある。

#### B. 研究方法

対象は切除不能膵癌6例とスキルス胃癌2例、切除不能進行直腸癌、胆管細胞癌、胆嚢癌各1例、計11例に対してミニ移植を行った。男7例、女4例、年齢40～68才（平均58.2才）である。HLA一致の同胞から末梢血造血幹細胞を採取し患者に移植した。移植CD34陽性細胞数は $2.43 \times 10^6/\text{kg}$ であった。ミニ移植前処置としてサイクロフォスファミド $60\text{mg}/\text{kg}$ をday-6,-7に投与し引き続きフルダラビン

$25\text{mg}/\text{m}^2$ を5日間投与した。HLA一致の兄弟（姉妹）にG-CSFを投与し、末梢血造血幹細胞を採取しこれを患者に投与した。

#### <倫理面への配慮>

本研究は駒込病院倫理委員会で承認され（2001年3月6日）、全ての患者およびDonorに対しては、本治験の意義、必要性、効果の不確実性、危険性について十分説明し、納得を得た上で書面にて同意書に署名押印を得た。

#### C. 研究結果

ミニ移植後、好中球が $500/\mu\text{l}$ 以上に達するまでの日数は7日、血小板5万以上/ $\mu\text{l}$ までの日数は9日、T細胞の完全キメラ化までの日数は17.5日、全白血球の完全キメラ化までの日数は154日（何れも中央値）であった。GVT効果は腫瘍マーカー低下6例、腫瘍縮小2例に認められた。効果発現までの期間は、105日（中央値）であった。抗腫瘍効果はPR1例（膵癌）、SD6例（うち膵癌3例）、PD4例（うち膵癌2例）であった。移植後生存期間は155.5日（52～568日）であった。移植関連合併症として、急性GVHDは6例（Grade II 3例、Grade III 3例）、慢性性GVHD5例（全身肩）の発症を認めた。急逝腎不全 2例、

他に間質性肺炎、急性肺障害、Engraftment syndrome、12 指腸穿孔、閉塞性細気管支炎が、各々1 例認められた。

ミニ移植で Donor から採取された CD34 陽性細胞数をみると、 $4.18 \pm 3.84 \times 10^6$  Cells/kg(中央値)であり、最も多いのは  $1 \sim 1.99 \times 10^6$  Cells/kg(中央値)であった。輸注 CD34 細胞数と造血機能回復との関係を見ると、両者に相関は認められなかった。また、生存率、再発率、GVHD 発症率の間にも相関はなかった。

#### D. 考察

ミニ移植の固形癌に対する GVT 効果は、これまで腎癌、乳癌についての報告はあるが、消化器癌についての報告はなかった。本研究では、切除不能消化器癌とくに難知性の膵癌、スキルス胃癌などに対するミニ移植を施行し、GVT 効果は腫瘍マーカー低下 6 例、腫瘍縮小 2 例に認められた。抗腫瘍効果は PR 1 例(膵癌)、SD 6 例(うち膵癌 3 例)、PD 4 例(うち膵癌 2 例)であった。6 例に急性 GVHD、5 例に慢性 GVHD の発症を認めた。興味あるのはサイクロスポリンやステロイドなど GVHD に対する免疫抑制剤の投与と腫瘍マーカーの関係である。これらの免疫抑制剤の投与によって、腫瘍マーカー値は上昇し、投与中止によって再び腫瘍マーカー値は減少した。これは GVT 効果の存在を示唆する所見と考えられる。

T cell キメリズムは全ての例で発現したが、腫瘍縮小のみられた例ではいずれも T cell 完全キメリズムが発現後に認められた。これは Donor T cell による GVT 効果を示唆する所見である。

6 例に急性 GVHD、5 例に慢性 GVHD の発症を認めた。急性 GVHD は 5 例中 2 例(Grade II, Grade III)が発症した。GVT 効果のあった症例すべてに GVHD が起こったわけではない。このことから GVT 効果と GVHD を引き起こす Donor cell antigens については、今後十分検討が必要であり、ミニ移植の最も大きな副作用である GVHD を防止する鍵であると考えられる。

ミニ移植による GVT 効果は、腫瘍縮小、疼痛寛解、胸腹水の減少などを含み、時には劇的効果を示す場合もある。従って、治療の最も困難な難治癌である膵癌の新しい治療の modality となりうる可能性がある。しかし、ミニ移植は GVHD という時には致命的副作用が発現することあることに十分留意す

べきである。今後は、いかにして GVHD を抑え GVT 効果を引き出すかが課題である。

さらに、GVT 効果は通常ミニ移植後ある程度遅れて起こることが多く、効果発現まで時間を要するので、転移・浸潤の激しい高度進行膵癌では時間的余裕のないこともあり、ミニ移植の患者の選択も重要である。

#### E. 結論

本研究における膵癌 6 例と切除不能進行消化器癌 5 例に対するミニ移植の成績から、ミニ移植はこれまで報告された腎癌、乳癌などの固形癌と同様に GVT 効果を引き起こすことが明らかとなった。膵癌において、GVT 効果を明らかにしたのは、本研究が最初である。

膵癌に対するミニ移植は腫瘍縮小、疼痛寛解、胸腹水の減少など臨床的に著しい効果を示す場合もあり、治療の最も困難な難治癌の代表格ある膵癌治療の新しい一つの治療 Modality となる可能性がある。

膵癌のミニ移植を安全に行うためには、如何にして GVHD を抑え GVT 効果を引き出すかが今後の課題である。

#### F. 健康危機情報

ミニ移植には、GVHD という時には致命的副作用がある。これに対してはこれまで、白血病に対する骨髄移植などで種々検討されている。従って、ミニ移植の実施に当たっては、現時点ではこれらの十分な経験のある施設で行うべきである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Takahashi T, Omuro Y, Sakamaki H, Maeda Y, Hiruma K, Matusmoto G., Tsuruta, K., Sasaki T. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for patients with unresectable pancreatic cancer *Pancreas* 2004, 28:(3) e65-e69,
2. 高橋俊雄. 骨髄非破壊的同種幹細胞(ミニ移植)による悪性腫瘍の治療、Bio ベンチャー、2003 1-2, 35-38