

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

<研究課題名>

同種造血幹細胞移植治療の成績向上を目指した包括的臨床研究

平成 17 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 18 (2006) 年 4 月

## 【 目 次 】

### I. 総括研究報告

- P 1～6 高上 洋一 / 国立がんセンター中央病院  
『 同種造血幹細胞移植治療の成績向上を目指した包括的臨床研究 』

### II. 分担研究報告

- P 7～9 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と遺伝子治療の開発研究 』

- P 10～11 中尾 眞二 / 金沢大学大学院  
『 ドナーリンパ球輸注による白血病再発の治療と予防に関する研究 』

- P 12～14 河野 嘉文 / 鹿児島大学大学院  
『 小児造血幹細胞移植における治療薬剤承認の促進 』

- P 15～19 松井 利充 / 神戸大学大学院  
『 移植前処置関連毒性の検討 』

- P 20～22 金丸 昭久 / 近畿大学医学部  
『 細胞移植療法の適応拡大と効率化を目指した共同研究組織の構築 』

- P 23～24 林 邦雄 / 国家公務員共済組合京阪奈病院  
『 腫瘍細胞の細胞周期とGVL効果 』

- P 25～27 長藤 宏司 / 九州大学病院  
『 同種造血幹細胞移植における免疫能回復と抗腫瘍効果の機構解明 』

- P 28～29 宇都宮 與 / 慈愛会今村病院分院  
『 同種造血幹細胞移植後のウイルス感染症とGVHD病態の解明 』

- P 30 國頭 英夫 / 国立がんセンター中央病院  
『 細胞治療の臨床評価法の確立 』

### 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

### 研究要旨

骨髄移植などの同種造血幹細胞移植は、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場合には、通常の方法で移植を行うと早期死亡率が著しく高くなる。これを克服する方法として、ドナー由来のリンパ球を介する移植片対白血病 (GVL) 効果を利用したミニ移植がヒトゲノム・再生医療等研究事業(以下、本事業と略す)において開発されて普及している。しかし、合併症対策やミニ移植の応用治療に関する有効性は未だ確立しておらず、特に高齢患者が急増する現状では研究の拡大は不可欠である。このため、本研究ではミニ移植を含めた造血幹細胞移植の標準化と安全性の向上を目指した臨床試験、並びに患者診療に密接に関連した基礎研究を行う。その成果を移植医療の均てん化に利するために、全国の施設からの研修者教育にも力を注ぐ。

### A. 研究目的

ミニ移植を含めた各種の造血幹細胞移植の標準化を目指した臨床試験と、安全性向上のための合併症対策を、基礎的研究成果も参考にして検討する。

具体的には、本事業において現在遂行中の各種臨床試験を継続して治療の標準化、適正化を図る。臍帯血移植が急増しているが、その安全性や有効性は検証されていない。同種免疫反応には人種差があるため、欧米の試験成績をわが国の移植現場に直接当てはめることは不可能であり、その適切な予防と治療、あるいは増強には、我が国固有のエビデンスを必要としている。逆に、このような臨床試験の結果を速やかに海外にも公表することは、医療分野における国際貢献を果たすことにもなる。このため、他班と共同で臍帯血ミニ移植の開発試験を行う。本研究で行う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、既に稼動している臨床研究母体に拠って厳正なデータ管理を実施することである。これにより、我が国の移植領域における臨床試験体制の基盤を確立すると同時に、治療技術の伝播、医療の均てん化にも貢献する。

合併症の中でも、特に GVHD とサイトメガロウイルス (CMV) などの感染症は多くの患者に発生し、高齢者においては特に重篤化し易いため、重点対策を講じて移植治療の安全性を確保することは極めて重要である。しかし、GVHD は治療益もある GVL 効果も合わせ持つため、その完全な予防が必ずしも

治療成績の向上にはつながらない。よって、患者特性に合わせた GVHD 予防と治療法、あるいは安全な GVL 効果の増強法を開発する必要がある。このため、付随研究として移植後の CMV 感染の発症頻度と CMV 特異的 T 細胞動態を経時的に検討するなど、移植治療の特徴を基礎研究の側面から明らかにする必要がある。

### B. 研究方法

他に有効な治療法がない白血病、悪性リンパ腫や骨髄異形成症候群、あるいは難治性の種々の固形腫瘍患者を対象として、臨床試験と基礎研究を遂行する。骨髄非破壊的なミニ移植前処置として、プリン誘導体であるフルダラビン(30 mg/kg/day x 6 日)あるいはクラドリピン(0.11 mg/kg/day x 6 日)に加えてブスルファン(4 mg/kg x 4 日)を、また臍帯血移植の場合にはメルファラン(70 mg/kg x 2 日)と 4 Gy の全身放射線照射を投与するなどして、血縁者の末梢血幹細胞、非血縁者の骨髄あるいは臍帯血を用いた同種造血幹細胞移植を行い、得られた臨床データと患者検体などを用いて以下の点に関する研究を行う。現在、本事業において進行中の以下の臨床試験を完結させる。

- 1) 高齢者白血病・悪性リンパ腫に対するミニ移植臨床試験
- 2) HLA 一座不適合血縁ドナーを用いたミニ移植の安全性と有効性の検討
- 3) 各種の転移性固形腫瘍に対するミニ移植
- 4) GVHD 予防におけるシクロスポリンとタクロリムスとの比較試験
- 5) 非血縁者間骨髄を用いたミニ移植の開発研究
- 6) 臍帯血ミニ移植第 I 相試験
- 7) 移植後インターフェロン $\alpha$ 投与の再発予防効果
- 8) 自殺遺伝子を導入したドナーリンパ球輸注療法の開発研究
- 9) 学会と協働したウィルスや真菌感染症治療薬やサイトカインの適応拡大試験
- 10) 造血幹細胞移植後の様々な栄養・代謝障害を予防、治療するために、栄養・微量元素・ビタミンやサプリメント補充療法の有用性を臨床的、基礎科学的に検討する。
- 11) ミニ移植後免疫療法の研究

#### <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、米国ベルモントレポート等の国際的倫理原則、あるいは我が国のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、遺伝子治療臨床研究に関する指針に従い以下を遵守する。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る。この際に、患者の費用負担が増えることはないこと、この研究への参加は自由で、参加しなくても不利益は受けないこと、この研究へ参加した場合でも、いつでもやめられること、データの取り扱い上、患者氏名等直接個人が識別できる情報を用いず、かつデータベースのセキュリティを確保し、個人情報（プライバシー）保護を厳守することも説明する。

#### C. 研究結果

本年度は、以下のような成果を挙げた。

- 1) 高齢者白血病・悪性リンパ腫に対するミニ移植臨床試験  
本試験の中間解析結果に基づいて、現在、該当企業が適応拡大申請中である。学会と誌上発表を予定している。

- 2) HLA 一座不適合血縁ドナーを用いたミニ移植  
予定登録症例 30 例中 16 例を登録した。
- 3) 転移性固形腫瘍に対するミニ移植  
予定登録症例 30 例中 11 例を登録した。
- 4) GVHD 予防のためのシクロスポリンとタクロリムスの比較試験  
予定登録症例 70 例中 47 例を登録した。
- 5) 非血縁者間骨髄を用いたミニ移植の開発研究  
予定登録症例 27 例を登録して終了し、解析後に学会、誌上発表予定である。
- 6) 臍帯血ミニ移植  
予定登録症例 10 例中 4 例を登録した時点でプロトコル変更のために中止とし、新たに開始した第二次試験に予定登録症例 10 例中 3 例を登録した。
- 7) 移植後インターフェロン $\alpha$ 投与の再発予防効果  
開始して登録準備中。
- 8) 自殺遺伝子を導入したドナーリンパ球輸注療法の開発研究  
国立がんセンター倫理審査委員会に研究審査を申請
- 9) ウィルスや真菌感染症治療薬やサイトカインの適応拡大試験  
移植領域における適応外使用医薬品の承認を促進する対策を施すために、日本造血細胞移植学会と共同作業を行っている。
- 10) 栄養・代謝障害を予防、治療する研究  
腸管 GVHD を発症した患者における栄養学的検討結果を誌上発表するなど、研究を進めている。
- 11) ミニ移植後免疫療法の開発研究  
基礎研究は進んだが、臨床試験は未だ準備中である。

基礎研究としては、GVHD に伴う抗腫瘍免疫反応の機構解明のための各種研究を行った。加えて、ミニ移植後の免疫機能の評価として、同種移植で最も重要な感染症である CMV 感染を指標とし、その発症頻度および CMV 特異的 T 細胞の再構築などについて経時的に検討した。

本研究に関わる海外学会発表に関しては、ドナーの安全性、CMV 感染の免疫モニタリングおよび非血縁者間骨髄ミニ移植に関する計 3 題を造血幹細胞移植に関する学会としては世界最大の欧州骨髄移植

会議(2005年3月)において発表した。

また、血液領域では最高の権威を有する全米血液学会(2005年12月)において10題を発表して注目を集めた。国立がんセンター中央病院のレジデント以外に、全国の施設から4人の研修医を受け入れ、移植治療の均てん化と国民医療におけるがん医療水準の向上に寄与した。

#### D. 考察

同種免疫反応には人種差があるため、欧米の試験成績をわが国での移植現場に直接当てはめることは不可能である。本研究においては、ミニ移植を含めた各種の造血幹細胞移植の標準化のための厳正な臨床試験と安全性向上のための合併症対策の検討を、既に稼動している臨床研究母体に拠って推進し、我が国固有のエビデンスを蓄積することを目指した。同時に、科学的妥当性を備えた対策を打ち出して治療の安全性を高めるために、合併症の中でも特にGVHDとCMVなどの感染症に関する基礎研究を遂行した。移植医療の均てん化も目指して、全国の施設からの研修者を受け入れた。

各種の臨床研究を推進しているが、特に高齢患者を対象とした白血病ミニ移植開発試験に関しては、本班研究成果を基にミニ移植に必須の薬剤が適応拡大承認を得る見通しとなったことは、学会と協働して稀少的な医療領域に有用な薬剤を臨床導入する手法を示した点が画期的と考える。同時に、治療を受ける患者検体を用いる基礎研究を並行して行うことで、治療学的妥当性を与え、新規治療開発にも貢献すると考える。

#### E. 結論

造血幹細胞移植治療の標準化、新規治療の開発並びに安全性向上を目指した臨床試験と基礎研究を推進して一定の成果を挙げることができた。得られた成果をもとに、有用な薬剤を臨床導入する道筋をつけて国民医療の向上に寄与した。また、全国の施設からの研修者教育も行うことで、移植医療の均てん化にも寄与した。今後、さらに研究を拡大したいと考える。

#### 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。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Matsubara H, Makimoto A, Higa T, Kawamoto H, Sakiyama S, Hosono A,

- Takayama J, Takaue Y, Murayama S, Sumi M, Kaneko A, Ohira M: A multidisciplinary treatment strategy that includes high-dose chemotherapy for metastatic retinoblastoma without CNS involvement. *Bone Marrow Transplant*, 35:763-766, 2005.
7. Homma CI, Kami M, Masuo S, Sakiyama M, Kojima R, Hori A, Kusumi E, Katori H, Takeuchi K, Kishi Y, Murashige N, Kim SW, Takaue Y, Mitamura T: Graft-versus-host disease of the kidney after rapid tapering of cyclosporin following reduced intensity hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 35:929-930, 2005.
  8. Kishi Y, Murashige N, Kami M, Miyakoshi S, Shibagaki Y, Hamaki T, Takaue Y, Taniguchi S: Optimal initial dose of oral cyclosporine in relation to its toxicities for graft-versus-host disease prophylaxis following reduced-intensity stem cell transplantation in Japanese patients. *Bone Marrow Transplant*, 35:1079-1082, 2005.
  9. 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, Takashima S: Identification of serum proteins related to adverse effects induced by docetaxel infusion from protein expression profiles of serum using SELDI ProteinChip system. *Anticancer Res*, 25:1197-1203, 2005.
  10. Kusumi E, Kami M, Kanda Y, Murashige N, Kishi Y, Suzuki R, Takeuchi K, Tanimoto TE, Mori T, Muta K, Tamaki T, Tanaka Y, Ogawa H, Yamane T, Taniguchi S, Takaue Y: Reduced-intensity hematopoietic stem-cell transplantation for malignant lymphoma: A retrospective survey of 112 adult patients in Japan. *Bone Marrow Transplant*, 36:205-213, 2005.
  11. Kobayashi K, Kami M, Murashige N, Kusumi E, Kishi Y, Hamaki T, Hori A, Matsumura T, Yuji K, Masuo S, Mori S, Miyakoshi S, Tanosaki R, Mitamura T, Takaue Y, Taniguchi S, Tokyo SCT Consortium Institution: Outcomes of patients with acute leukaemia who relapsed after reduced-intensity stem cell transplantation from HLA-identical or one antigen-mismatched related donors. *Br J Haematol*, 129:795-802, 2005.
  12. Kojima R, Tateishi U, Kami M, Murashige N, Nannya Y, Kusumi E, Sakai M, Tanaka Y, Kanda Y, Mori S, Chiba S, Kusumoto M, Miyakoshi S, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Takaue Y: Chest computed tomography of late invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11:506-511, 2005.
  13. Hori A, Kami M, Ohnishi M, Murashige N, Kojima R, Takaue Y: Feasibility of early tapering of cyclosporine following reduced-intensity stem cell transplantation for advanced hematologic or solid malignancies. *Haematologica*, 90:1001-1003, 2005.
  14. 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, Kakizoe T: Expansion of  $\alpha$ -Galactosylceramide-stimulated V $\alpha$ 24+ NKT cells under non-FBS cultured the absence of animal materials. *J Immunotherapy*, 28:314-321, 2005.
  15. Ikarashi Y, Iizuka A, Heike Y, Yoshida M, Takaue Y, Wakasugi H: Cytokine production and migration of in vitro-expanded NK1.1(-) invariant Valpha14 natural killer T (Valpha14i NKT) cells using alpha-galactosylceramide and IL-2. *Immunol Lett*, 101:160-167, 2005.
  16. Teshima T, Matsuo K, Matsue K, Kawano F, Taniguchi S, Hara M, Hatanaka K, Tanimoto M, Harada M, Nakao S, Abe Y, Wake A, Eto T, Takemoto Y, Imamura M, Takahashi S, Ishida Y, Kanda Y, Kasai M, Takaue Y: Impact of human leucocyte antigen mismatch on graft-versus-host disease and graft failure after reduced intensity conditioning allogeneic

- haematopoietic stem cell transplantation from related donors. *Br J Haematol*, 130:575-587, 2005.
17. Ikarashi Y, Iizuka A, Koshidaka Y, Heike Y, Takaue Y, Yoshida M, Kronenberg M, Wakasugi H: Phenotypical and functional alterations during the expansion phase of invariant V $\alpha$ 14 natural killer T (V $\alpha$ 14i NKT) cells in mice primed with  $\alpha$ -galactosylceramide. *Immunology*, 116:30-37, 2005.
  18. Morita Y, Hosokawa M, Ebisawa M, Sugita T, Miura O, Takaue Y, Heike Y: Evaluation of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-lymphocytes in patients with the HLA-A(\*)02 or HLA-A(\*)24 phenotype undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 36:803-811, 2005.
  19. Kojima R, Kami M, Kanda Y, Kusumi E, Kishi Y, Tanaka Y, Yoshioka S, Morishima S, Fujisawa S, Mori SI, Kasai M, Hatanaka K, Tajima K, Kasai M, Mitani K, Ichinohe T, Hirai H, Taniguchi S, Sakamaki H, Harada M, Takaue Y: Comparison between reduced intensity and conventional myeloablative allogeneic stem-cell transplantation in patients with hematologic malignancies aged between 50 and 59 years. *Bone Marrow Transplant*, 36:667-374, 2005.
  20. Hosokawa M, Kadota R, Shichijo S, Itoh K, Dmitriev I, Krasnykh V, Curiel DT, Takaue Y, Wakasugi H, Takashima S, Heike Y: Cell cycle arrest and apoptosis induced by SART-1 gene transduction. *Anticancer Res*, 25:1983-1990, 2005.
  21. Yuji K, Miyakoshi S, Kato D, Miura Y, Myojo T, Murashige N, Kishi K, Kobayashi K, Kusumi E, Narimatsu H, Hamaki T, Matsumura T, Kami M, Fukuda T, Masuo S, Masuoka K, Wake A, Ueyama J, Yoneyama A, Miyamoto K, Nagoshi H, Matsuzaki M, Morinaga S, Muto Y, Takaue Y, Taniguchi S: Reduced-intensity unrelated cord-blood transplantation for patients with advanced malignant lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*, 11:314-318, 2005.
  22. Suzuya H, Watanabe T, Nakagawa R, Watanabe H, Okamoto Y, Onishi T, Abe T, Kawano Y, Kagami S, Takaue Y: Factors associated with granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell yield in healthy donors. *Vox Sanguinis*, 89:229-235, 2005.
  23. Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Yamazaki R, Kanda Y, Takaue Y, Mizoguchi H, Kawakami Y: Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon- $\gamma$ -enzyme-linked immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br J Haematol*, 131:472-479, 2005.
  24. Takami A, Okumura H, Yamazaki H, Kami M, Kim SW, Asakura H, Endo T, Nishio M, Minauchi K, Kumano K, Sugimori N, Mori S, Takemoto Y, Shimadoi S, Ozaki J, Takaue Y, Nakao S: Prospective Trial of High-Dose Chemotherapy Followed by Infusions of Peripheral Blood Stem Cells and Dose-Escalated Donor Lymphocytes for Relapsed Leukemia after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Int J Hematol*, 82:449-455, 2005.
  25. Takama H, Tanaka H, Nakashima D, Ueda R, Takaue Y: Population pharmacokinetics of intravenous busulfan in patients undergoing hematopoietic stem cell plantation. *Bone Marrow Transplant*, 37:354-351, 2006.
  26. Kim SW, Tanimoto TE, Hirabayashi N, Goto S, Kami M, Yoshioka S, Uchida T, Kishi K, Tanaka Y, Kohno A, Kasai M, Higuchi M, Kasai M, Mori S, Izutsu K, Sao H, Ishikawa T, Ichinohe T, Takeuchi K, Tajima K, Tanosaki R, Harada M, Tobinai K, Hotta T, Takaue Y: Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell

- transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. *Blood*, in press.
27. Imataki O, Heike Y, Ishida T, Takaue Y, Ikarashi Y, Yoshida M, Wakasugi H, Kakizoe T: Efficient ex vivo expansion of V $\alpha$ 24<sup>+</sup> NKT cells derived from G-CSF-mobilized blood cells. *J Immunotherapy*, in press.
28. Kakugawa Y, Kami M, Kozu T, Kobayashi N, Shoda H, Matsuda T, Saito Y, Oda I, Hamaki T, Mineishi S, Takaue Y, Shimoda T, Saito D: Endoscopic evaluation for cytomegalovirus enterocolitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Gut*, in press.
29. Morita Y, Heike Y, Kawakami M, Miura O, Nakatsuka S, Ebisawa M, Mori S, Tanosaki R, Fukuda T, Kim SW, Tobinai K, Takaue Y: Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *International Journal of Cancer*, in press.
30. Watanabe H, Watanabe T, Suzuya H, Wakata Y, Kaneko M, Onishi T, Okamoto Y, Abe T, Kawano Y, Kagami S, Takaue Y: Peripheral blood stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor alone and engraftment kinetics following autologous transplantation in children and adolescents with solid tumor. *Bone Marrow Transplant*, in press.
31. Imataki O, Nakatani S, Hasegawa T, Kondo M, Ichihashi K, Araki M, Ishida T, Kim SW, Mori S, Fukuda T, Tobinai K, Tanosaki R, Makimoto A, Takaue Y: Nutritional support for patients suffering from intestinal GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Hematol*, in press.

#### 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



『同種移植後免疫回復の解析と遺伝子治療の開発研究』

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

造血器腫瘍に対する非血縁臍帯血移植後の免疫回復解析を行った。移植後、サイトメガロウイルスライセート (CMV) に対する反応は 100 日目までは検出されず、骨髄移植や末梢血幹細胞移植と比して回復が遅いことが示唆された。SELDI-TOF/MS 法にて、臍帯血移植後早期に見られる生着前症候群に関連する物質が検出できた。現在、その物質の同定を行っている。

A. 研究目的

- 1) 同種造血幹細胞移植は造血器腫瘍に対し完治を目指すことのできる唯一の治療であるが、ドナーが見つからない症例も多く存在する。ドナー不足の問題を解決するため、ハプロタイプ移植と臍帯血移植の開発が進められている。中でも、わが国においては臍帯血移植の開発が精力的に行われている。現在までに行われた臨床応用の結果より、臍帯血移植は骨髄移植や末梢血造血幹細胞移植とは違った臨床経過を取ることが徐々に明らかとなりつつある。そのうちの一つは、移植後のウイルス再活性化・感染症や真菌症がより遷延化し致命傷となる例が見られることである。その原因を解析し、予防法・治療法を開発することは臍帯血移植の安全性を向上させるために重要である。そこで、臍帯血移植後の CMV に対する特異的免疫回復の解析を行い、骨髄移植並びに末梢血幹細胞移植症例と比較検討した。
- 2) 臍帯血移植症例では、移植後 10 日頃に皮膚発赤、下痢、呼吸困難を伴う発熱 (通称、生着前症候群) が見られている。我々はこの現象を生着前症候群と読んでいたが、時に致命的となるため対策は重要である。そこで、生着前症候群の原因並びに機序を解明し、あらたな予防法、治療法の開発に繋げるため、生着前症候群に関連する因子の解析を行った。

B. 研究方法

- 1) 国立がんセンター・倫理審査委員会並びに国家公務員共済組合連合会・虎の門病院・倫理審査委員会で承認された研究計画書 (15-27 骨髄非破壊

的前処置を用いた非血縁者間臍帯血移植後の免疫回復解析研究) に基づき、国立がんセンター中央病院・幹細胞移植療法科並びに虎の門病院にて各種悪性腫瘍に対する同種造血幹細胞移植療法を行った患者を対照とした。研究計画にもとづいて、移植前、移植後 30 日、60 日、90 日目に末梢血の採血を行い、その単核球を用いて解析を行った。解析方法は、各種細胞表面マーカーの解析 (CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD161 等)、細胞内サイトカイン産生を指標とした CMV Lysate 並びに SEB に対するリンパ球反応性の解析、TREC、T 細胞レセプターレパトア解析、キメラ解析等を取り入れ、総合的に行った。それらの結果を骨髄移植並びに末梢血幹細胞移植における解析結果と比較検討し、両者の違いを解析した。

- 2) 臍帯血移植後早期に見られる生着前症候群に係る液性因子の解析を行った。当初、ELISA を用いた解析を行ったが一定の変動を示す蛋白が得られなかったため、本年度は SELDI TOF-MS を用いた解析を行った。

<倫理面への配慮>

研究計画書を作成し、国立がんセンター並びに虎の門病院の倫理審査会の承認を得て研究を行った。(15-27 骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁者間臍帯血移植後の免疫回復解析研究)

採血に際しては、当日の患者状態を診察し、患者に臨床上的不利益を与えないよう配慮を行った。また、研究検体並びに情報の移動・交換に際しては、氏名、患者 ID 番号など、被験者の特定につながる情報は使用しないことを徹底し、プライバシーの保護に努めた。

## C. 研究結果

研究計画に基づき、臍帯血移植後の免疫回復の解析を行った。移植後早期は末梢血細胞数が少ないため、全ての解析を実施することは困難であり、解析項目を絞り込んで行った。移植後 90 日目までの解析にて、骨髄移植や末梢血幹細胞移植症例で多く検出される CMV Lysate 刺激後の細胞内サイトカイン産生が、臍帯血移植では見られないことが明らかとなった。この現象は、CMV 抗体陽性ドナーからの骨髄移植、末梢血幹細胞移植と比して、回復が遅いことを示唆していると考えられる。

臍帯血移植後早期に見られる生着前症候群時の液性因子の解析を行った。最初に通常の ELISA による検討を行ったが、有意なサイトカインの産生上昇は認められなかった。そこで、SELDI-TOF/MS を用いて網羅的発現解析を行った。その結果、分子量 13,000 前後の蛋白が、生着前症候群発症時に合わせて上昇していることが明らかとなった。この分子は、腫瘍熱の際には発現していないが、呼吸器感染症時にも軽度上昇していた。現在その同定を行っているところである。

## D. 考察

臍帯血移植は、新たな移植ドナー源として注目を集めており、その移植法の開発が精力的に進められている。現在までの臨床経過の解析によって、臍帯血移植後には骨髄移植や末梢血幹細胞移植で見られない幾つかの特徴的な経過をたどる例があることが知られている。第一の特徴は、骨髄移植や末梢血幹細胞移植と比して、移植後早期のウイルス再活性化・発症や真菌感染症が遷延化する例が多いことである。今回のわれわれの解析結果では、移植後 90 日目までに CMV Lysate に反応するリンパ球の回復が見られなかった。このことは、臍帯血移植後の CMV 再活性化・感染症のコントロールが困難であることとの関係があるものと考えている。今後、強力な抗ウイルス剤の開発と共に、抗 CMV 免疫の誘導法の検討が必要と考える。

SELDI-TOF/MS を用いた解析にて、臍帯血移植後 10 日前後に見られる生着前症候群と関連する物質が検出できた。現在、そのアミノ酸配列を解析中であるが、この蛋白が同定されれば生着前症候群の機序が明らかとなると共に、その予防法・治療法の開発が可能となる。生着前症候群は時に致命的になることから、予防法・治療法の開発は臍帯血移植の安全性を高めることにつながると考えている。

## E. 結論

CMV Lysate 刺激を用いた細胞内サイトカイン産生解析にて、臍帯血移植症例は骨髄移植と末梢血幹細胞移植症例と比較し、CMV 反応性 T リンパ球の回復が遅れることが示唆された。この現象は、臍帯血移植後にウイルス再活性化・感染症並びに真菌症の発症頻度が高くかつ遷延化する例が見られることと関係していると考えられる。

臍帯血移植後約 10 日目に見られる生着前症候群に関連する物質が検出できた。現在この物質のアミノ酸配列の解析を行っており、生着前症候群の機序の解明につなげたいと考えている。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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*, 25: 1197-1204, 2005.
2. Harada Y, Imataki O, Heike Y, Kawai H, Shimsaka 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 V $\alpha$ 24+ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials. *Journal of Immunotherapy*, 28: 314-321, 2005.
3. Morita Y, Hosokawa M, Ebisawa M, Sugita T, Miura O, Takaue Y, and Heike Y: Evaluation of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-lymphocytes in patients with the HLA-A(\*)02 or HLA-A(\*)24 phenotype undergoing hematopoietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 36: 803-811, 2005.

4. Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Yamazaki R, Kanda Y, Takaue Y, Mizoguchi H, Kawakami Y: Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon- $\gamma$  -enzyme-linked immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. Br J Haematol, 131:472-479, 2005.
5. Imataki O, Heike Y, Ishida T, Takaue Y, Ikarashi Y, Yoshida M, Wakasugi H, Kakizoe T: Efficient ex vivo expansion of V $\alpha$ 24+ NKT cells derived from G-CSF-mobilized blood cells. J Immunotherapy, in press.
6. Morita Y, Heike Y, Kawakami M, Miura O, Nakatsuka S, Ebisawa M, Mori S, Tanosaki R, Fukuda T, Kim SW, Tobinai K, Takaue Y: Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. International Journal of Cancer, in press.

#### 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

『ドナーリンパ球輸注による白血病再発の治療と予防に関する研究』

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

予後不良の急性白血病は、強力な移植前処置後に同種造血幹細胞移植を行ったとしても、再発率が高いため、必ずしも予後が改善されるわけではない。また、再発後ではたとえ大量のドナーリンパ球輸注を行っても、寛解維持は困難である。Ogawa らは、骨髄の WT1 mRNA 発現量が移植後の再発と非常によく相関することを報告した。そこで、再発リスクの高い急性白血病および骨髄異形成症候群を対象として、骨髄の WT1 を経時的に測定し、一定量(1500 コピー/ $\mu$ gRNA)以上にコピー数が増えた場合に免疫抑制剤の減量・中止や予防的 DLI を行う多施設共同臨床試験を計画した。自験例の経過から、WT1 を指標に、腫瘍細胞がごく少数しか存在しない時期に免疫学的介入を行えば、急性白血病であっても再発を防げる可能性が示唆された。

A. 研究目的

移植後再発に対するドナーリンパ球輸注 (donor lymphocyte infusion, DLI) は、慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) の慢性期再発に対しては有効性が確立されている。しかし、急性白血病の再発に対しては、いずれの報告でも寛解導入率は低い。急性白血病に対する DLI の効果が乏しいのは、GVL 効果が全く誘導されないからではなく、GVL 担当 T 細胞が十分に増加する前に白血病細胞が圧倒的に増えてしまうことが原因と考えられる。

われわれは先に「寛解導入療法後の末梢血幹細胞輸注と大量 DLI による GVL 効果の誘導」を目的に「急性白血病に対する DLI」の多施設共同臨床試験を計画し、13 例に実施した。しかし、この方法でも grade II 以上の急性 GVHD の誘導率は高々 4 割であり、200 日以上長期寛解は 4 例に認められたものの、そのうち 3 例は骨再発をきたし、無病生存しているのは移植後 5 年目に再発した ALL の 1 例のみであった。これらの結果から、急性白血病ではひとたび再発してしまっただけでは、たとえ大量のドナーリンパ球を輸注しても寛解を維持することは困難であることが明らかになった。

大阪大学の Ogawa らは、骨髄の WT1 mRNA 発現量が移植後の白血病再発と非常によく相関することを報告した (Blood 101: 1698-1704, 2003)。そこで、移植後の再発リスクが高い急性白血病および骨

髄異形成症候群症例に対し、骨髄の WT1 mRNA レベルを指標とした免疫抑制剤 (シクロスポリンまたはタクロリムス) の早期減量・中止と予防的 DLI を行い、その安全性 (GVHD に関連した死亡の有無) と有効性 (WT1 レベルの低下と再発予防効果の有無) を検討する多施設共同臨床試験を計画した。

B. 研究方法

試験方法を以下に示す。

- 1) 移植後 day 21 より原則的に 2 週間おきに骨髄穿刺を行い骨髄中の WT1 mRNA の発現量を測定する。
- 2) WT1 mRNA が 1500 コピー/ $\mu$ gRNA を超えた時点で分子再発と診断し、直ちに免疫抑制剤 (シクロスポリンやタクロリムス) を減量・中止する。
- 3) 移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) の徴候を認めず、2 週間後の再検査で WT1 mRNA の低下が認められなかった場合、患者の体重あたり  $1 \times 10^7$ /kg の CD3 陽性細胞を含むバッフィーコート輸注する。
- 4) この間、grade II 以上の急性 GVHD を発症した場合は、直ちにステロイド剤 (メチルプレドニゾン 2 mg/kg) を開始する。
- 5) 移植後 day 147 の時点で、GVHD 関連死亡の有無と performance status (PS) および WT1 mRNA のレベルを評価する。

## <倫理面への配慮>

文書を用いて説明の上、同意をとった。患者の登録にあたっては、各参加施設において連結可能な匿名化を行い、患者個人を特定できるような情報の記入は求めなかった。

## C. 研究結果

目標症例数16例に対し、現在のところ3施設から計5例の登録があった。自験例の経過を示す。

【症例】48才、男性。MDSから病型移行したAML(無治療、非寛解)に対し、HLA一致の姉からBMTを実施した。移植前のWT1 mRNA値は75000コピー/ $\mu$ gRNAであった。移植後day 21のWT1は150コピー/ $\mu$ gRNAまで低下していた。Day 22にgrade Iの急性GVHDを合併した。Day57に骨髓のWT1が1600コピー/ $\mu$ gRNAまで増加したため、免疫抑制剤(シクロスポリン)を中止したところ、extensive typeの慢性GVHDを発症し、WT1は560コピー/ $\mu$ gRNAまで低下した。その後、慢性GVHDに対してステロイド療法を開始したが、WT1の上昇は認めていない。現在、移植後1年を経過しているが、寛解を維持している。

## D. 考察

GVHDと移植後再発率との関係を検討したHorowitzらの報告によれば、同種造血幹細胞移植後のGVHDが急性白血病に対して再発予防効果を持つことは明らかである。しかし、移植後に急性白血病がひとたび再発すると、たとえDLIを行っても永続的な効果はほとんど期待できない。急性白血病に対するDLIの効果が乏しいのは、GVL効果が全く誘導されないからではなく、GVL効果を担うT細胞が十分に増加する前に白血病細胞が圧倒的に増えてしまうことが主な原因と考えられる。したがって、白血病細胞がごく少数しか存在しない分子再発を早期に診断し、grade IIまでの急性GVHDを首尾よく誘導できる程度のDLIを行えば、急性白血病であっても再発を防げる可能性があると考えられる。

これまでに報告されているDLIの成績は再発例を対象としたものがほとんどであり、予防的DLIの有効性についてはその実施時期や投与量も含めてほとんど検討されていない。

今回の経験から、骨髓のWT1 mRNA発現量を経

時的に測定し、一定量(1500コピー/ $\mu$ gRNA)以上にコピー数が増えた場合に免疫抑制剤の早期減量・中止や少量のDLIを行うことにより、AMLの再発を予防できる可能性が示唆された。

## E. 結論

WT1を指標とした予防的DLIは、予後不良の急性白血病に対する移植後療法として有用な可能性がある。このことを明らかにするためには、現在進行中の多施設共同臨床試験を遂行する必要がある。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takami A, Mochizuki K, Asakura H, Yamazaki H, Okumura H, Nakao S: High incidence of cytomegalovirus reactivation in adult recipients of an unrelated cord blood transplant. *Haematologica*, 90: 1219-1293, 2005.
2. Takami A, Mochizuki K, Okumura H, Ito S, Suga Y, Yamazaki H, Yamazaki M, Kondo Y, Asakura H, Nakao S: Mycophenolate mofetil is ineffective and well tolerated in the treatment of refractory acute and chronic graft-versus-host disease. *Int J Hematol*, 83: 80-85, 2006.
3. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S: Minor population of CD55-CD59-blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood*, 107: 1308-1314, 2006.

## 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

『小児造血幹細胞移植における治療薬剤承認の促進』

分担研究者 河野 嘉文 鹿児島大学大学院／歯学総合研究科 小児発達機能病態学分野 教授

研究要旨

本研究は難治性小児腫瘍疾患患児において純化造血幹細胞を用いた移植術を施行することにより、小児がん治療成績の飛躍的向上を目指している。従来、純化細胞として CD34 陽性細胞が用いられてきたが、本研究では新たに造血幹細胞のマーカーとして認識されてきた CD133 陽性抗原を標的とし、純化 CD133 陽性細胞移植術の臨床応用を計画した。純化 CD133 陽性細胞移植施行症例は世界的にも少ない。特に小児においてはほとんど報告がないので、第一段階として自家移植で純化 CD133 陽性細胞を移植片として用いた。実際には、小児がんの中で最も頻度が高い急性リンパ芽球性白血病(ALL)で、体内の腫瘍細胞を減量するための自家移植を実施し、続いて同種移植の前処置を軽減する方法を考案して、同種移植術後の再発率の減少をはかるダブルトランスプラント療法を立案した。

A. 研究目的

ALL など急性白血病の同種移植術後の原病再発は、造血細胞移植術の治療成績を左右する最も大きな問題である。一般に、小児 ALL で造血細胞移植術が適応となる患児の長期生存率は 50-60% と言われている。現実の臨床現場では「移植術に辿り着くという」形式の造血幹細胞移植術がよく行われる。このような「移植さえすれば」と考える移植術では、治療成績の向上はこれ以上困難であり、同時にそのような現実が治療成績の向上を阻んでいる。小児がんの中で頻度が高い ALL では、免疫療法的な移植片対白血病効果 (GVL) の発現を期待できないことが知られており、その治療成績は移植直前の骨髄の寛解の深さ、言い換えれば体内に残存する白血病細胞量に依存する。従来の移植方法では、同種移植のワンチャンスに治癒の期待をかけ、いたずらに強力かつ有害な大量化学療法になりがちであった。

本研究では、小児 ALL 治療における同種移植術の治療成績向上を目指し、1 回の毒性が強い治療で根治を目指すのではなく、移植直前の体内腫瘍細胞量を可能な限り少なくするための手段として、小児 ALL 患児の腫瘍細胞に発現しない CD133 抗原を利用した。これによって腫瘍細胞の混入がない移植片を自家移植術に用いることになり、従来の同種移植に近い条件で腫瘍量減少のための自家移植が実施できる。引き続き、毒性を軽減した前処置で同種移植術を実施することによって、比較的风险が大き

い同種移植術を安全に施行できる。結果として、同種移植術の治療成績向上に寄与できる。

以上のような条件の下、純化細胞移植術の利用で移植成績の向上を図ることを目的とした。

B. 研究方法

1) 造血幹細胞純化

従来からの研究テーマであった純化 CD34 陽性細胞の手技にしたがって、検討すべき標的細胞を CD133 陽性細胞とした。純化のためのキット類は Milteyni 社 (ドイツ) から購入した。小児がん患者の自家移植術に使用することを目的として、G-CSF 動員末梢血幹細胞 (CD34 陽性細胞と CD133 陽性細胞) を含む単核球をアフエレーシスで採取し、抗原抗体反応を利用して CliniMACS で純化した。目標細胞数は従来の知見に基づき純化細胞として  $3 \times 10^6/\text{kg}$  とし、採取できるまでアフエレーシス・純化を繰り返すこととした。純化後に  $3-5 \times 10^6/\text{kg}$  /バッグにして  $-130^\circ\text{C}$  で凍結保存した。

2) 対象と方法

大量化学療法が必要な小児固形腫瘍、再発小児 ALL を対象として、化学療法後の骨髄回復期に G-CSF を投与して末梢血幹細胞を動員した。基本的に血小板が  $10 \text{ 万}/\mu\text{l}$  に達する時点から 5 日間投与し、5 日目と 6 日目にアフエレーシスを施行した。アフエレーシスの 2 日目に CliniMACS を用いて CD34 陽性細胞と CD133 陽性細胞を純化し、 $-130^\circ\text{C}$  の冷凍

庫内に保存した。凍害防止液は DMSO の最終濃度が 5% になるように調整した。プログラムフリーザーは使用しなかった。

腫瘍細胞量を減少させるための大量化学療法を施行後、凍結純化細胞を 37°C で急速に融解し、そのまま中心静脈ラインから点滴静注した。

#### <倫理面への配慮>

すべての治療は鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床倫理委員会の審査を経て実施した。また、患者およびその家族には研究的な面を有する治療法であることを説明し、文書による同意をえた後に実施した。

#### C. 研究結果

##### 1) 細胞の動員および純化

CD133 陽性細胞純化は CliniMACS を用いて、CD34 陽性細胞純化と同様に効率的に実施できた。CD133 陽性細胞の算定を CD34 陽性細胞と同じ方法で行ったが、3 例の実施で 70%、97%、99% と満足できる純度の細胞が得られた。フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞と同一の測定方法が適切かどうかについては不明であったが、本研究により少なくとも臨床的に用いることに問題はないことが確認できた。採取細胞数は、再発 ALL 症例では  $1 \times 10^9$  以上の細胞が採取純化できたが、固形腫瘍では体重あたり  $5 \times 10^6$  kg を採取することは困難であった。

##### 2) 移植結果

小児固形腫瘍患児 3 例 (4 回)、小児 ALL 患児 2 例に、CD34 あるいは CD133 陽性細胞移植術を施行した。移植前治療で腎不全を合併した一例を除き、観察できた 4 例では好中球の回復は速やかであった。しかし、血小板数の回復過程では、自家末梢血幹細胞移植術でよく観察されてきた二相性の回復にはならず、血小板数が  $5$  万/ $\mu$ l を超えても徐々に増加する傾向にあった。感染症の発症については問題なかった。

ダブルトランスプラントを実施した固形腫瘍患児では、30 日程度のインターバルであったが、全身状態も変化なく順調な生着が確認された。しかし、同じ細胞数を投与したにもかかわらず、2 回目の血小板回復がやや遷延した。

#### D. 考察

CD133 抗原はヒトに特有の血球分化抗原で、非常に幼弱な造血前駆細胞に発現することが知られている。CD34 抗原のようにマウスに発現していないため、前臨床段階の動物試験ができないが、80% 程度が CD34 抗原とダブルポジティブである。したがって、CD34 陽性細胞移植術の知見で十分対応できることが予測されたが、本研究によって実際に移植術に使用できることが証明された。小児に最も多い腫瘍である急性リンパ芽球性白血病では、腫瘍細胞に CD34 抗原が高頻度に発現するため、CD34 抗原を利用した自家移植は腫瘍細胞混入の観点から問題があり、CD133 抗原を利用することの意義は大きい。

本研究の結果から、CD133 陽性細胞も従来の純化 CD34 陽性細胞と同様に安全に移植細胞として利用できることが判明した。移植細胞としての機能も問題なかった。自家移植だけでダブルトランスプラントを施行した症例において、二等分した保存細胞であるにもかかわらず、2 回目の移植後の血小板数回復が遅れた。輸血依存性を脱却してからの回復過程のことなので臨床的に問題ならなかったが、より未熟な CD133 陽性細胞と、より成熟した CD34 陽性細胞の違いが示されている可能性がある。

CD133 陽性細胞を同種移植術の分野でどのように利用するかについては今後の検討を待たねばならないが、白血病の自家移植術ではダブルトランスプラントの第一段階での利用が見込まれ、同種移植術では生着後にドナーキメラリズムが変動した場合の「造血幹細胞追加輸注」が考慮される。ドナーリンパ球輸注(DLI)の安全性が確立しないことと、非悪性腫瘍性疾患における DLI 後の GVHD 再燃の危険性を考えると、純化 CD133 陽性細胞の追加輸注療法は利用価値があると考えられた。

#### E. 結論

CliniMACS を用いた細胞純化方法は安全かつ正確に実施できることを確認した。純化 CD133 陽性細胞は、純化 CD34 陽性細胞と同様に自家移植術に使用できた。造血前駆細胞としての機能が確認でき、CD34 陽性細胞移植術で開発された臨床知見から、純化 CD133 陽性細胞の同種移植術への応用も問題ないと思われた。純化 CD133 陽性細胞移植術後には、自家末梢血幹細胞移植術後のような急速な血小

板数回復は認めず、通常 of 骨髄移植後に認められる着実な血小板回復パターンを示した。これは、CD133 陽性細胞という極めて幼弱な造血前駆細胞ゆえの特徴であると推測された。

純化 CD133 陽性細胞を同種造血細胞移植術の戦略でいかに利用するかが、小児がん患者における造血細胞移植術の治療成績向上の鍵を握っている。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Suzuya H, Watanabe T, Nakagawa R, Watanabe H, Okamoto Y, Onich T, Abe T, Kawano Y, Kagami S, Takaue Y: Factors associated with granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell yield in healthy donors. *Vox Sanguinis*, 89: 229-235, 2005.

##### 2. 学会発表

1. Shuji Ishikawa, Yoshifumi Kawano, Yoshihisa Nagatoshi, Osamu Ijichi, Yuichi Shinkoda, Takayuki Tanabe, Takuro Nishikawa, Yasuhiro Okamoto, Jun Nagayama, Jun Okamura: Pre-engraftment noninfectious fever after bone marrow transplantation due to major antigen mismatch of HLA. The 3<sup>rd</sup> congress of the International Pediatric Transplant Association, Innsbruck (Austria) August 6-9, 2005
2. Osamu Ijichi, Shuji Isikawa, Yuichi Shinkoda, Takayuki Tanabe, Hideo Takamatsu,, Yukihiro Inomata, Yoshifumi Kawano: Response of hepatoblastoma heavily treated and relapsed in the transplanted liver to single-agent therapy with irinotecan hydrochloride (cpt-11). The 3<sup>rd</sup> congress of the International Pediatric Transplant Association, Innsbruck (Austria) August 6-9, 2005
3. Yoshifumi Kawano: Role of hematopoietic stem cell transplantation in patients with ALL not in remission. International Commemorative

Symposium of 500 Stem Cell Transplantations in Chonnam National University Hospital. Gwangju, Korea, November 3, 2005

4. Nagatoshi Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Ueda K, Inada H, Kawakami K, Yanai F, Nakayama H, Moritake H, Itonaga N, Ayukawa H, Fujita K, Kawano Y, Okamura J: Outcome of the ALL-96 protocol for childhood ALL from Kyushu-Ymaguchi Children's Cancer Study Group. The 47<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta, December 10-13, 2005

#### 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



『移植前処置関連毒性の検討』

分担研究者 松井 利充 神戸大学大学院/医学系研究科応用分子医学講座血液・腫瘍内科 助教授

研究要旨

同種造血幹細胞移植後急性 GVHD 予防として、ミコフェノール酸モフェチル (MMF) を用いた患者に対し、その活性本体であるミコフェノール酸 (MPA) 血中濃度を測定し、急性 GVHD 予防により有用な MMF の投与方法ならびに MPA の体内動態に影響を与える臨床的要因について解析した。急性 GVHD 予防として MMF の投与を行った 6 症例について、定期的な MPA の測定を行ったところ、急性 GVHD 発症と血中濃度時間曲線下面積 (AUC) との間に明らかな関係は見出せなかった。また、前年度に引き続き、SOS (Sinusoidal Obstruction Syndrome) の治療薬 Defibrotide (DF) の安全性・有用性につき、今年度新たに用いた 3 症例を加え検討した。

A. 研究目的

「移植前処置関連毒性」(Regimen-related toxicities: RRT) の克服は「同種造血幹細胞移植治療の成績向上」につながるばかりか、これまで移植の適応とならなかった高齢者や臓器障害を有する患者への移植適応の拡大にもつながる。「骨髄非破壊的前処置」は RRT 軽減法の 1 つだが、前処置の軽減が腫瘍性疾患の移植成績に負に作用する可能性があり、骨髄破壊的前処置に伴う RRT の克服は依然重要な課題である。急性 GVHD 予防としてこれまで本邦で広く用いられてきたメトトレキサート (MTX) が、RRT による消化管粘膜障害を強め、重症口腔粘膜障害を高頻度に来たし、発熱性好中球減少症の原因となる。欧米では近年、口腔粘膜障害が少ない MMF が急性 GVHD の予防に使用されるようになっている。腎・心・肝など臓器移植において使用される MMF の拒絶反応抑制効果は、その代謝物かつ活性本体である MPA の AUC に依存し、 $AUC_{0-12h}$  を 30~60mg・hr/ml にコントロールすることが推奨されている。一方、同種造血幹細胞移植においては、MPA の血中濃度とそれによる GVHD の発症あるいは生着不全の予防効果について、有効とされる設定値を明確に定めた報告はない。さらに本邦で市販されている MMF は経口剤であり、その体内動態は個人間格差が大きいと予想され、一日投与量から単純に薬物体内動態を推測することは困難である。今回私たちは、RRT 軽減を目的に同種造血幹細胞移植後急性 GVHD の予防法として MMF の経口投与を行う患者に対し、

定期的な MPA の血中濃度測定を行うことにより、急性 GVHD 予防としてより有効と考えられる MMF の投与方法ならびに MPA の体内動態に影響を与える臨床的要因について検討した。

また、放射線照射や化学療法による肝内細静脈や類洞の内皮細胞障害に伴う凝固系の活性化が血栓性静脈閉塞を惹起し、二次的に起こる肝小葉ゾーン 3 の中心静脈障害を病理組織学的特徴とするため、かつて肝中心静脈閉塞症 (hepatic veno-occlusive disease; VOD) と呼ばれてきた、致死的 RRT の一つである類洞閉塞症候群 (SOS: Sinusoidal Obstruction Syndrome) の治療および予防薬として最近注目されている Defibrotide (DF) の安全性・有用性について前年度に引き続き検討した。

B. 研究方法

症例は、平成 17 年 5 月から平成 18 年 2 月までの間、急性 GVHD 予防として MMF の経口投与を行った、以下の造血器悪性腫瘍患者 6 例である。

症例	疾患	病状	移植源	前処置	併用薬
1	ATL	PR	同胞末梢血	Flu+Bu+ATG	CyA
2	MDS	RAEBI	非血縁骨髄	TBI+CY	FK506
3	CML	CR2	非血縁骨髄	TBI+CY	FK506
4	MDS	RA	非血縁骨髄	TBI+CY	FK506
5	AML (M4)	CR1	非血縁骨髄	TBI+CY	FK506
6	AML (M3)	再発 PR	非血縁骨髄	Flu+MeI	FK506

移植当日 (Day0) の 21 時より、MMF 1 回 15mg/kg を 1 日 2 回 (9 時および 21 時) の量で、経口投与を開始した。投与は移植後 Day30 の 21 時まで継続し、以後中止とした。日内変動および投与期間内の血中濃度変化をモニタリングするため、移植後 2、9、16 日目に内服前 (トラフ値: 9 時)、内服 1、2、4、8 および 12 時間後に MPA の血中濃度測定を行った。また MMF 投与終了後の体内消失をモニタリングするために、投与終了翌日、4、7 日目の 9 時にも測定した。血中濃度測定は High-performance liquid chromatographic method (HPLC 法) を用いて行い、MPA の血中濃度曲線下面積 (AUC) と MMF の急性拒絶反応抑制効果および急性 GVHD 発症予防効果との関係を検討した。好中球生着日は、顆粒球 > 500/ml が 2 日連続で認められた場合の初日と定義し、急性 GVHD の評価は、Przepiorka et al. (1995) の判定基準に基づき、stage および grade を決定した。その他、サイトメガロウイルス感染等の感染症の有無についても検討した。

2005年3月から2006年2月までの間に、同種造血幹細胞移植後SOSに対してDFを投与した3症例を追加解析対象とした。移植後20日以内に、①黄疸 (総ビリルビン2mg/dl以上)、②肝腫大と右上腹部痛、③腹水などによる2%以上の原因不明の体重増加のうち2項目以上該当した場合にSOSと診断した。DFは1日投与量10~40mg/kgを4分割し、生食100mlに溶解して点滴静注し、投与期間中は定期的に体重および血液検査にて肝腎機能、凝固能等を評価した。DFの反応性については、「完全寛解」を「総ビリル

ビンが2.0mg/dl以下に低下し、他の臓器障害が完全に消失したものと定義し、DFは最低14日間投与して完全寛解が得られれば漸減中止とした。DFの治療毒性は米国がん研究所の共通毒性規準(ver.3)に従い評価した。DF投与に伴う治療関連毒性と主治医が判断した場合は投与中止または50%減量することとした。

#### <倫理面への配慮>

薬物血中濃度測定の際に、患者ならびに家族への説明を行うとともに、文書による同意を得た。重症 SOS は必ずしも頻度は高くないが、致死率の高い緊急性疾患である。現在、確立された救命的治療法がなく、安全性が高いとされる DF の使用は倫理的には問題が少ないと考えられるが、患者ならびに家族への説明と文書による同意を得た受けるうえで、主治医の責任において DF を輸入した。DF の緊急輸入に当たっては、厚生労働省に正式な手続きを行ったうえで、患者限定の使用を前提に利害関係を持たない第 3 者の業者の仲介により輸入した。

#### C. 研究結果

MMF 投与患者において、MTX 投与で高頻度に見られる Grade III 以上の口腔粘膜障害の発症は 6 症例中 1 例のみであった (症例 4)。また MMF 内服によるものと考えられる副作用の合併は見られなかった。MMF 経口投与による吸収効率は比較的高く、前処置にともなう下痢等の消化器症状有無により、MPA の体内動態・AUC は影響を受けにくいものと考えられた。

症例番号	1	2	3	4	5	6
AUC <sub>0-12h</sub> (trough/peak)						
移植後 2 日	21.5(0.46/4.3)	2.2(0.02/0.86)	26.1(0.03/12.28)	5.3(0.02/1.35)	12.5(0.03/2.77)	8.5(0.17/1.32)
移植後 9 日	29.4(0.83/4.9)	4.3(0.02/2.88)	23.1(0.45/5.44)	6.3(0.07/1.17)	19.1(0.05/2.07)	4.9(0.04/1.06)
移植後 16 日	20.3(0.51/3.05)	7.3(0.11/1.65)	14.4(0.12/5.86)	9.0(0.04/1.83)	22.2(0.79/3.03)	16.7(0.03/4.57)

多くの症例において、MPA 血中濃度のピークは、経口投与開始より 1~2 時間で見られる。ピーク値が 4 時間で見られた症例 1 では、その後重篤な腸管 GVHD が出現した。症例 3 および 5 では SOS の合併が見られ、特に症例 5 では致死的な重症症例であった。しかし、このような症例においても、MPA の体内動態・AUC は、他の症例と比較し明らかな違いが見られず、肝障害時においても体内動態に影響を受けないと考えられた。6 症例中 5 例で (1 例は現時点では未実施) サイトメガロウイルス抗原血症が見られた。

今年度 DF を用いた 3 症例を加えた全 7 例の SOS 合併患者の年齢は 17~58 歳 (中間値 38 歳) で、2~19 日目 (中間値 11 日目) に発症した。DF の投与量は 1 日 480~1600mg/日であったが、減量を必要とする重篤な有害事象は認めなかった。これまで 2 例が完全寛解に至り、3 例にビリルビンの低下など肝機能の改善傾向をみとめ、内 1 例につき組織学的に治癒が確認された。今年度使用した 3 症例はいずれも移植後早期死亡をきたしたが、死因は重症 SOS、劇症型生着症候群、敗血症であり、DF に起因するものではなかった。

#### D. 考察

MMF 投与後 MPA は約 8 時間で底値となる。従って MMF の 1 日 3 回分服が適切かと考えられるが、1 日 2 回の経口投与でも急性 GVHD 予防効果は得られており、AUC の維持が急性 GVHD 予防に必須かどうかは明らかでない。経口 MMF 剤の吸収に関しては、内服を繰り返すたびに初回通過効果が低くなり、MPA の AUC は上昇する傾向にある。AUC 減少傾向の見られた症例 3 では、他の症例と比較し好中球生着が遅れる傾向にあったが、AUC と急性 GVHD 発症あるいは好中球生着までの期間との間に有意な相関は見られなかった。また AUC の上昇が SOS 発症のリスクとは考えられなかった。ピーク値が 4 時間で見られた症例は重篤な腸管 GVHD を合併し、MPA 血中濃度ピーク値の遅れが腸管 GVHD 発症の予測因子となる可能性がある。

急性 GVHD 予防薬として MMF を用いることにより、好中球の生着日を早める可能性があるが、急性 GVHD 予防に有効な MPA の血中濃度等については不明である。

重症肝不全をきたした SOS 合併症例の MPA 体内動態・AUC は、非合併症例と比較し明らかな相違は認められず、肝障害時においても体内動態に影響を受けない可能性がある。また多くの症例で、サイトメガロウイルス抗原血症が見られ、MPA の体内動態・AUC にかかわらず、MMF 投与はサイトメガロウイルス再活性化のリスク要因と考えられた。

最近、ブタの粘膜から抽出した単鎖の大きな核酸分子である DF は副作用がなく、重症 SOS に有効であるのみならず、予防的投与がその発症を抑制したと報告されている (Blood 92:737,1998、Blood 100:4337,2002、Blood 103:1968,2004、Biol Blood Marrow Transplant 10:347,2004)。これまで私共が使用した 7 症例においても、明らかな副作用は認めなかったが、その治療効果は完全寛解から無効まで様々であった。重篤な状態にもかかわらずデフィブロタイド自身による有害事象の発生はなく、安全性には問題ないと考えている。今年度経験した症例のように重症 SOS の致死率は高く、救命困難であり、本臨床治験の継続は有用と判断している。

#### E. 結論

経口薬による MMF の投与は、MTX に代わる急性 GVHD 予防薬として、合併症の頻度も少なく安全に行える予防法の一つとなり得る。本邦では経口薬のみ市販されているが、吸収効率は消化器症状の有無にかかわらず高く、注射剤と同様、急性 GVHD に対する一定の予防効果を十分に発揮しうるものと思われる。内服を繰り返す内に初回通過効果が減少する点や、重篤な肝障害を有する患者においても MPA の AUC はさほど影響を受けない点などは、非常に興味深く、また臨床上有用性も高い。今回の検討症例においては重篤な急性 GVHD の発症は見られなかったが、急性 GVHD 抑制効果と血中濃度との因果関係は見られなかった。しかし、好中球生着までの期間を短縮させる傾向がみられ、生着不全あるいは GVHD 予防に有用な MPA 血中濃度値については、今後も詳細な検討が必要である。

DF の欧米での報告では 3 分の 1 以上の症例に寛解が得られ、多臓器不全を来した症例についても重篤な有害事象を認めることなく効果が期待できる。嘔気・一過性の血圧低下・発熱などが DF の有害事象として報告されているが、これまでに私たちが経験した 7 症例においても明らかな副作用は確認され

ず、3症例において有効性が認められた。現在で、DFはSOSの治療薬として唯一期待される薬剤であるにもかかわらず、日本では未だ認可されていない。試験薬剤の供給体制の確立と診断・治療・効果判定のプロトコールの作成による本邦での臨床試験の立ち上げが今後期待される。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Matsuoka H, Obama H, Kelly M, Matsui T, and Nakamoto M: Biphasic functions of the kinase-defective EphB6 receptor in cell adhesion and migration. *J Biol Chem*, 280: 29355-29363, 2005.
2. Urahama N, Ito M, Sada A, Yakushijin K, Yamamoto K, Okamura A, Minagawa K, Hato A, Chihara K, Roeder RG, Matsui T: The role of transcriptional coactivator TRAP220 in myelomonocytic differentiation. *Genes to Cells*, 10: 1127-1137, 2005.
3. Yamamoto K, Okamura A, Hato A, Yakushijin K, and Matsui T: A novel translocation t(2;3)(q11;q27) involving the *BCL6* gene in follicular lymphoma with dup(12q) and t(14;18). *Cancer Genetics Cytogenetics (Letter)*, 159: 184-186, 2005.
4. Yamamoto K, Ito M, Minagawa K, Urahama N, Sada A, Okamura A, and Matsui T: A novel translocation der(13)t(7;13)(p13;q14) involving 13q14 with monoallelic loss of *RBI1* and *D13S319* in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genetics Cytogenetics*, 162: 160-165, 2005.
5. Yakushijin K, Matsui T, Okamura A, Yamamoto K, Ito M, and Chihara K: Successful treatment with defibrotide for sinusoidal obstruction syndrome after hematopoietic stem cell transplantation. *Kobe J Med Sci*, 51: 55-65, 2005.
6. Yamamoto K, Nishikawa S, Minagawa K, Yakushijin K, Okamura A, Matsui T: Therapy-related myelodysplastic syndrome

with inv(16)(p13q22) and I type *CBFβ/MYH11* after autologous transplantation: undetectable fusion transcript in pretransplant progenitor cells. *Leukemia Res*, 30: 354-361, 2006.

7. Okamura A, Iwata N, Tamekane A, Hamaguchi M, Fukui C, Yamamoto K, and Matsui T: Casein kinase Iε down-regulates phospho-Akt via PTEN following genotoxic stress-induced apoptosis in haematopoietic cells. *Life Science*, 78: 1624-1629, 2006.
8. Tanaka Y, Kurata M, Togami K, Fujita H, Watanabe N, Matsushita A, Maeda A, Nagai K, Sada A, Matsui T, and Takahashi T: Chronic eosinophilic leukemia with FIP1L1-PDGFRα fusion gene in a patient with a history of combination chemotherapy. *Int J Hematol*, 83: 152-155, 2006.

##### 2. 学会発表

1. 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会(横浜) 2005年9月  
①山本克也、松井利充 他5名  
Auto-PBSCT後に発症したinv(16),I型 CBFβ/MYH11陽性tMDS:移植前幹細胞中にCBFβ/MYH11は検出されない  
②岡村篤夫、松井利充 他8名  
ケイシンキナーゼIεによる造血細胞の細胞生存調節機構  
③浦浜憲永、松井利充 他10名  
骨髓球系前駆細胞の分化における転写共役因子TRAP220の役割  
④横山和明、松井利充 他8名  
初診時に巨大縦隔腫瘍を合併した急性前骨髄性白血病の一例  
⑤薬師神公和、松井利充 他10名  
ephrins B1, B2はT細胞レセプター(TCR)シグナル伝達の強力な負の制御因子である
2. 第64回日本癌学会学術総会(札幌) 2005年9月  
伊藤光宏、松井利充 他1名  
基本的転写共役因子TRAP220による骨髓系細胞の分化調節