

20112603/A

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上
のための包括的研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神田 善伸

平成 24 年 (2012) 3 月

厚生労働科学研究費補助金
免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業

HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上
のための包括的研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神田 善伸

平成 24 年 (2012) 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究
自治医科大学附属さいたま医療センター 血液科 神田善伸 ----- 3

II. 分担研究報告

1. HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究
－アレムツズマブを用いた HLA 不適合移植の開発・腫瘍・感染症特異的免疫の研究－
自治医科大学附属さいたま医療センター 血液科 神田 善伸 ----- 15
2. 多剤併用 GVHD 予防による HLA 不適合移植の開発・不適合移植後の HLA 抗体の解析
兵庫医科大学 内科学講座血液内科 小川 啓恭 ----- 18
3. 造血幹細胞移植後にシクロフォスファミドを用いた HLA 半合致移植に関する研究
筑波大学血液内科学 千葉 滋 ----- 22
4. 造血幹細胞移植後早期における MultiplexPCR を用いた多項目ウイルスモニタリング
の前方向視的検討
国家公務員共済組合連合会虎の門病院 血液内科 谷口 修一 ----- 24
5. HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究
－血縁 HLA 不適合移植における NK 細胞活性化と移植成績－
北海道大学大学院医学研究科内科学講座血液内科学分野 田中 淳司 ----- 26
6. CD34 陽性細胞選択 HLA 不適合移植・HSV-TK 遺伝子導入リンパ球輸注療法の開発
に関する研究
国立がん研究センター中央病院 血液腫瘍科・造血幹細胞移植科 平家 勇司 -- 29
7. T 細胞除去を用いない母子間移植と父子間移植の比較
佐賀大学医学部内科学講座 一戸 辰夫 ----- 31
8. ハプロ一致移植における T、NK 細胞による GVL 効果の検討
名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学 高橋 義行 ----- 35
9. マウスモデルを使った HLA 不適合移植後の免疫寛容の誘導に関する検討
岡山大学病院 血液・腫瘍内科 前田 嘉信 ----- 37
10. HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究
－造血幹細胞移植領域の臨床研究における生物統計学的手法－
横浜市立大学附属市民総合医療センター臨床統計学・疫学分野 森田 智視---- 40
11. HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究
－レジストリーデータの統計解析・活用のためのデータ整備－
名古屋大学大学院医学系研究科造血細胞移植情報管理・生物統計学 熱田 由子-46

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 49

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 55

V. 班会議記録 ----- 267

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業）

総括研究報告書

HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究

研究代表者 神田 善伸

自治医科大学附属さいたま医療センター 血液科 教授

研究要旨

同種造血幹細胞移植の至適ドナーは HLA 適合同胞であり、HLA 適合非血縁者と HLA 一抗原不適合血縁者がこれに次ぐ。いずれのドナーも得られない場合は HLA 二抗原以上不適合血縁者と非血縁者間臍帯血が候補となる。日本では体外での T 細胞除去を行わない独自の HLA 不適合移植方法として、母子間免疫寛容に基づいた移植、多剤併用の強力な GVHD 予防法を用いた移植、アレムツズマブを用いた移植などの最先端の開発研究が行われており、世界的にも類を見ない好成績が得られている。

本研究班では、HLA 不適合移植の全国規模の研究組織を構築し、様々な HLA 不適合移植法の利点、欠点を明確にするとともに、臍帯血移植との優劣についても評価する。また、HLA 不適合移植の治療成績を改善するための基礎的な研究、医療費や保険適応外使用調査などを含めて包括的な研究を行う。骨髄バンクやさい帯血バンクのドナープール拡大の負担軽減(申請者が委員を努める厚生科学審議会疾病対策部会造血幹細胞移植委員会で提言)、HLA 不適合移植のガイドライン作成などでも社会に貢献する。

平成 23 年度は、臨床研究については、様々な HLA 不適合移植法について各施設の方法を踏襲しながらより洗練された前方視的臨床試験を実施した。さらに、日常診療として行われている HLA 一抗原不適合移植の治療成績について後方視的解析を行い、今後の改善のための臨床試験を計画している。研究代表者が委員長を務める日本造血細胞移植学会「HLA と移植成績ワーキンググループ(WG)」と連携し、データベースを効率的に利用する統計プログラムを開発し、ホームページ上で無料配布することによって造血幹細胞移植領域の統計解析の促進に努めている。

基礎的研究は、白血病細胞表面の HLA 不適合抗原発現低下の意義、不適合抗原に対する細胞傷害性 T 細胞の誘導と HLA 不適合抗原発現低下の影響などをマウスの GVHD モデルの系を用いて評価する。病原微生物や腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。

研究分担者

小川 啓恭
兵庫医科大学内科学講座血液内科研究分野
教授

千葉 滋
筑波大学血液内科学 教授

谷口 修一
国家公務員共済組合連合会 虎の門病院
血液内科 部長

田中 淳司
北海道大学大学院医学研究科内科学講座
血液内科学分野 准教授

平家 勇司
国立がん研究センター中央病院
血液腫瘍科・造血幹細胞移植科 医長

一戸 辰夫
佐賀大学医学部内科学講座造血幹細胞移植
准教授

高橋 義行
名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学
准教授 (2011年10月1日～現在)

名古屋大学医学部附属病院小児科学 講師
(2011年4月1日～9月30日)

前田 嘉信
岡山大学病院血液・腫瘍内科 助教

森田 智視
横浜市立大学附属市民総合医療センター
臨床統計学・疫学分野 教授

熱田 由子
名古屋大学大学院医学系研究科
造血細胞移植情報管理・生物統計学 講師

A. 研究目的

HLA 型は自己と非自己を認識する最も重要な抗原であり、同種造血幹細胞移植に最も適したドナーは HLA 適合同胞である。次いで優先すべきは HLA 適合非血縁者と HLA 一抗原不適合血縁者であり、両者の移植成績が同等であることを、研究代表者の神田らが明らかにした (Kanda Y, Blood 2003)。これらのドナーが得られない場合には、HLA 二抗原以上不適合血縁者間移植と非血縁者間臍帯血移植が候補となる。臍帯血中の造血幹細胞数は限られているため生着不全の危険性が高い。一方、二抗原以上不適合血縁者間移植では、移植片対宿主病(GVHD)のコントロールが重要である。海外では体外でドナー幹細胞液から T 細胞

を除去して移植する方法が一般的であるが、拒絶や感染症が多発する。そこで、日本国内では体外での T 細胞除去を行わない(非 T 細胞除去)独自の HLA 不適合移植方法として、研究分担者の一戸らの母子間免疫寛容に基づいた移植法(Ichinohe T, Blood 2004)や、研究分担者の小川らによるタクロリムス、ステロイド併用の強力な GVHD 予防法を用いた移植法(Ogawa H, Biol Blood Marrow Transplant 2006)、研究代表者の神田らの抗 CD52 モノクローナル抗体アレムツズマブを用いた移植法(Kanda Y, Transplantation 2005)などが開発され、非 T 細胞除去 HLA 不適合移植の分野においては世界の最先端の開発研究が行われている。

しかし、臍帯血移植が厚生労働省研究班などで全国規模での研究が進んできたのに対し、HLA 不適合移植の開発は個々の施設単位での研究にとどまり、国際的に高い評価を受けているにもかかわらず、国内普及が進まなかった。そこで本研究では全国規模での研究組織によって様々な方法で行われている HLA 不適合移植の利点、欠点を明確にするとともに、臍帯血移植との優劣についても評価し、さらに HLA 不適合移植の治療成績を改善するための基礎的な研究、医療費、薬剤の保険適応外使用の対策、ガイドラインの発表を含め、包括的な研究を行う。

B. 方法

● 平成23年度に実施中の臨床試験

本邦から世界に発信されている様々な体外T細胞非除去HLA二抗原以上不適合移植法の開発と、海外の標準的手法であるCD34陽性細胞移植について、以下の臨床試験を実施している。さらに、既に日常診療として行われているHLA一抗原不適合移植の治療成績の向上や、移植後の免疫回復の促進をめざした臨床試験の計画を進めている。

(a) 研究分担者の一戸らによる母子間免疫寛容を利用したHLA不適合移植

【移植方法】標準的前処置にサイモグロブリン 2.5mg/kgをday -2、-1に加え、GVHD予防としてタクロリムスを用いる。【目標症例数】15例【主要評価項目】移植後100日目までの非再発死亡

(b) 研究分担者の小川らによる強力免疫抑制剤を併用したHLA不適合移植

【移植方法】減弱移植前処置にゼットブリン 2mg/kgをday -4～-1に加え、GVHD予防としてタ

クロリムスとメチルプレドニゾロンを用いる。【目標症例数】25例【主要評価項目】移植後100日の時点での生存率

(c) 研究代表者の神田らによるアテムツズマブを用いたHLA不適合移植(アテムツズマブの減量を試みる自主臨床試験)

【移植方法】標準的前処置加えるアテムツズマブの投与総量を0.5mg/kgに減量する。GVHD予防としてシクロスポリンとメソトレキサートを用いる。

【目標症例数】14例【主要評価項目】移植後60日目までの生存、生着、グレードIII以上の急性GVHDの発症

(d) 研究分担者の平家らによる体外でCD34陽性細胞を選択したHLA不適合移植およびHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法の臨床試験

【移植方法】標準的な移植前処置後にCD34陽性細胞選択造血幹細胞を輸注した後にHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法による免疫回復促進を図る。【目標症例数】10例【主要評価項目】免疫系再構築並びにGVHD発症頻度および制御能

(e) HLA一抗原不適合移植の至適化

【移植方法】GVHD予防法として少量サイモグロブリン併用の意義を単群で評価する。【目標症例数】35例【主要評価項目】生存、再発、グレード3以上の急性GVHDの発症、広範型慢性GVHDの発症の複合型評価項目

■ 平成23年度に実施中の臨床研究(非介入)

研究代表者が委員長を務める日本造血細胞移植学会「HLAと移植成績ワーキンググループ」と連携し、造血細胞移植学会のデータベースや各施設のHLA不適合移植症例データベースを用いて、HLA不適合移植の成否にかかわる様々な因子の影響について調査する。抗HLA抗体については前方視的にデータを収集することによって、より正確な解析を行う。

1. HLA不適合が移植成績に与える影響の検討

(a) HLA不適合の影響に関する学会データベースを用いた後方視的解析のアップデート

(b) 母子間免疫寛容の影響に関する学会データベースを用いた後方視的解析

(c) 移植片拒絶に対する再移植におけるHLA不適合移植と臍帯血移植の有用性の比較

2. 抗HLA抗体と生着不全の関係

(a) HLA不適合移植後の抗HLA抗体力価の経時的変化

(b) 抗HLA抗体と生着不全、GVHD、再発率との関連

◎ 平成23年度に実施中のHLA不適合移植の成績向上のための基礎研究

HLA不適合移植後の最大の問題である免疫回復の遷延について、移植後に問題となりやすい病原微生物や、腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。

(a) HLA不適合移植後の免疫不全状態における抗原特異的抗腫瘍・抗感染症療法の開発

(b) ELISPOTおよびFACSによる抗HLA抗体産生細胞の定量

(c) HLA不適合に伴うNK細胞の活性化と細胞傷害能の解析

C. 結果

研究分担者の一戸らによる母子間免疫寛容を利用したHLA不適合移植は佐賀大学における臨床試験として標準的前処置にサイモグロブリン 2.5 mg/kgをday -2、-1に加え、GVHD予防としてタクロリムスを用いるデザインで進行している。研究分担者の小川らによる強力免疫抑制剤を併用したHLA不適合移植は減弱移植前処置にゼットブリン 2 mg/kgをday -4~-1に加え、GVHD予防としてタクロリムスとメチルプレドニゾロンを用いた臨床試験から、体内T細胞除去薬をサイモグロブリンに変更し、その投与量を徐々に減量する臨床試験に移行している。研究代表者の神田らによるアテムツズマブを用いたHLA不適合移植(アテムツズマブの減量を試みる自主臨床試験)は、医師主導治験が2010年度に登録終了、2011年6月に観察期間も終了した。本研究においてアテムツズマブの投与量と免疫回復の有意な相関が認められたため、引き続き実施する自主臨床試験についてもプロトコールが完成し、倫理審査を受ける段階に進んでいる。研究分担者の千葉らは近年欧米で積極的に研究されている移植後シクロホスファミド投与によるHLA不適合移植の臨床試験を開始し、登録第一例は重篤なGVHDが出現することなくドナー造血の生着を得た。研究分担者の平家らによる体外でCD34陽性細胞を選択したHLA不適合移植およびHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注療法

の臨床試験は、国立がん研究センター中央病院で臨床試験が進行し、実際にHSV-TK遺伝子導入リンパ球輸注が2症例に行われた。現在のところ、輸注に関連する有害事象はみられず、一例では安定した免疫回復が得られている。

後方視的研究については、HLAの一抗原不適合の影響が移植成績に及ぼす影響について日本造血細胞移植学会データベースを用いた解析を行った。10年前の解析とは異なり、HLA一抗原不適合血縁者間移植の成績はHLA適合非血縁者間移植よりも有意に劣っていた。その原因としてはHLA適合非血縁者間移植が遺伝子レベルのタイピングによってHLA適合血縁者間移植と同等の成績まで向上していることが考えられた。また、HLA一抗原不適合血縁者間移植ではB座の不適合症例の成績が悪く、C座不適合との連鎖の影響が示唆された。この研究に基づいてHLA一抗原不適合血縁者間移植における至適なGVHD予防方法を模索する前方視的臨床試験を計画している。研究分担者の一戸らは同じく日本造血細胞移植学会データベースを用いた解析において母子間あるいは父子間のHLA不適合移植の成績を比較したところ、父親をドナーとする移植において移植関連死亡率が有意に高いということを示した。研究代表者の神田らも日本造血細胞移植学会データベースを用いて移植片拒絶に対する再移植におけるHLA不適合移植と臍帯血移植の有用性の比較を行っている。

また、研究分担者の小川らはステロイド抵抗性GVHD患者17人に対して異なるドナーからの造血幹細胞移植を行うことによって救命できる可能性を示した。ステロイド抵抗性GVHDは絶対的な予後不良疾患であり、新たな治療法として期待できる。田中らは北海道大学血液内科グループの多施設共同後方視的研究でHLA不適合移植の治療成績を解析した。するとHLA不適合の存在によってGVHDの発症が増加し、それが移植関連死亡率の上昇につながっていたため、GVHD対策を強化すべきであることが示唆された。谷口らはMultiplexPCRを用いた多項目ウイルスモニタリングを造血幹細胞移植後早期の患者に用いる前方視的試験を行った。同種移植94例、自家移植6例において471件(57.3%)の検体が陽性となり、内訳はHHV-6 69.6%, CMV 37.7%, BKV 13.2%, ADV 7.7%であった。ウイルス感染症に対するPCR陽性結果の感度、特異度、PPV、NPVは、ADV感染症に対して85.7%, 100.0%, 100.0%, 98.9%。BKV感染症に対して61.1%, 86.6%, 50.0%, 91.0%、HHV-6脳症(cut off 10000copies/ml)感染症に対して46.6%, 71.8%, 29.1%, 88.4%であり、本検査

法の有用性が示唆された。

統計ソフトウェア開発についてはマウス操作だけで一般的な名義変数、連続変数、生存期間の解析に加えて、移植領域の統計解析で必須となる時間依存性変数を扱う解析や競合イベントを扱う解析が実行できるソフトウェア(EZR)が完成し、自治医科大学附属さいたま医療センターのホームページで無料公開している。研究分担者で生物統計の専門家である森田らは造血幹細胞移植領域の統計解析にベイズ流統計手法を利用する可能性について検討、評価を行った。質の高い事前情報が得られる状況であれば事前情報を積極的に活用するベイズ流の手法が有効となると考えられた。同じく生物統計を専門とする研究分担者の熱田らは造血細胞移植登録一元管理プログラム(TRUMP)のデータベースを効率的に活用できるようにするために、解析データ構造の確定、変数の作成、入力不備の修正などの作業を行った。

特異的免疫能の評価系についてはサイトメガロウイルスおよびEBウイルスに特異的に働く細胞傷害性T細胞をテトラマーによって同定する系が確立された。今後は細胞傷害性T細胞を単一細胞に分離した上でT細胞受容体レパトアの解析を行い、強力な特異的細胞傷害活性を有するT細胞のレパトアを同定する。また、研究分担者の前田らはGVHD対策の抑制に重要な制御性T細胞(Treg)の再構築についてマウスモデルを用いた研究を行った。すると、移植後のTreg再構築には移植細胞に含まれる造血幹細胞から新たに出現するTregが重要であることが判明した。また、慢性GVHDのエフェクター細胞にはTh1とTh17が関与しており、Th1/Th17を抑制するレチノイン酸を投与することにより慢性GVHDを抑制できることが示された。研究分担者の高橋らはHLA不適合移植後に再発した白血病細胞において、不適合HLA抗原の欠失(HLA-LOH)を確認し、ドナー由来NK細胞は初診時白血病細胞に対しては傷害活性を示さないが、HLA-LOHをおこした白血病細胞には強い傷害活性を示すことを観察した。活性化NK細胞受容体であるNKG2Dリガンドを検査したところ、HLA-LOHを生じた白血病細胞でのみ発現が認められた。

D. 考察

様々な方法を用いた体外 T 細胞非除去 HLA 二抗原以上不適合移植法の臨床研究の進捗状況は良好である。日本造血細胞移植学会データベースを用いた解析についても日常診療にすぐに還元される成果が得られ、統計ソフトウェアの開発により、

今後はさらに解析が促進されることが期待できる。

基礎的研究については HLA 不適合移植において鍵をにぎる GVHD の制御と免疫回復の両面において新たな知見が得られた。

E. 結論

本研究班の初年度の研究は前方視的臨床試験、後方視的臨床研究、基礎的研究のいずれにおいても順調な進捗を示している。HLA 二抗原以上不適合の血縁ドナーは95%以上の患者が有するため、本研究でHLA不適合移植の有用性を明らかにすることで、将来的には骨髄バンク、さい帯血バンクのドナープール拡大の負担を軽減することが期待できる(研究代表者が委員を努める厚生科学審議会疾病対策部会造血幹細胞移植委員会で提言する)。また、様々なHLA不適合移植法の利点、欠点を明確にするとともに、臍帯血移植との優劣についても評価し、診療現場での治療選択に役立つ情報を提供する。医療経済的な観点からも比較することによって、社会と適合した健全な移植医療の発展が期待される。

多彩な造血幹細胞移植のソースが使用可能となり、移植適応についてもより明確にしていく必要があるため、ガイドラインを作成(あるいは研究代表者らが担当している造血細胞移植学会ガイドラインの改定)することによって幅広く情報を発信する。不必要な移植医療の削減は、倫理的観点のみならず、医療費の観点からも重要である。

本研究班の基礎的な研究成果は、HLA不適合移植のみならず、同じくHLA不適合の存在が前提となっている臍帯血移植の治療成績の改善にも応用することができる。また、HLA不適合移植における薬剤の適応外使用の現状についても把握することで、将来の治験のあり方、有害事象の解析方法についても展望する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1) 国内

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

<研究分担者 小川 啓恭>

1. Ogawa H. JSA-EHA Joint Symposium – Stem Cell Source. 第73回日本血液学会学術

集会 名古屋 2011年10月

2. 池亀和博、吉原哲、海田勝仁、谷口享子、石井慎一、加藤るり、井上貴之、藤岡龍哉、玉置広哉、岡田昌也、相馬俊裕、小川啓恭 HLA haploidentical transplantation with reduced intensity conditioning regimen as first alloSCT 第73回日本血液学会学術集会 名古屋 2011年10月

<研究分担者 田中 淳司>

1. 田中淳司 GVHD/GVL制御とNK細胞 第33回日本造血細胞移植学会総会 松山 2011年3月

<研究分担者 高橋 義行>

1. 高橋義行、土居崎小夜子、村松 秀城、嶋田明、濱麻人、小島勢二 ハプロ不一致移植における患者・ドナー間不一致 HLA モニタリングによる GVL 効果の解析 第33回日本造血細胞移植学会総会 愛媛 2011年3月

<研究分担者 前田 嘉信>

1. 西森久和、前田嘉信、杉山暖子、小林孝一郎、山筋好子、門久幸代、谷本光音、竹内賢吾 ドナーの Th17 細胞と Th1 細胞が慢性 GVHD 発症に関与する 第33回日本造血細胞移植学会総会 松山 2011年3月

2) 海外

1. 論文発表

<研究代表者 神田 善伸>

1. Kanda Y, Sakamoto S, Ashizawa M, Sato M, Terasako K, Kikuchi M, Kimura SI, Okuda S, Kako S, Oshima K. Risks and benefits of ovarian shielding in female patients undergoing total body irradiation: A decision analysis. *Bone Marrow Transplantation* 48:1145-1147, 2011
2. Wada H, Terasako K, Kamiya Y, Sato M, Kimura SI, Okuda S, Kako S, Yamazaki R, Oshima K, Nishida J, Moriguchi M, Terai C, Kanda Y. Immune recovery after autologous peripheral blood stem cell transplantation without in vitro graft manipulation for refractory systemic lupus erythematosus.

Bone Marrow Transplantation 46:1450-1454, 2011

3. Yamazaki R, Nakasone H, Wada H, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako K, Kikuchi M, Kimura SI, Okuda S, Kako S, Tanaka Y, Tanihara A, Oshima K, Nishida J, Kanda Y. Recurrence of monoclonal gammopathy associated with donor-derived myelodysplastic syndrome after cord blood stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 39:1119-1123, 2011
4. Kanda J, Saji H, Fukuda T, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kurokawa M, Kanamori H, Mori T, Hidaka M, Iwato K, Yoshida T, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Kanda Y. Related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction and HLA 8/8-allele-matched unrelated transplantation: A nationwide retrospective study. *Blood* (in press)
5. Kimura SI, Wada H, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako K, Nakasone H, Kikuchi M, Okuda S, Kako S, Yamazaki R, Oshima K, Tanaka Y, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. L-index as a novel index to evaluate both the intensity and duration of lymphopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation Infectious Disease* (in press)

<研究分担者 小川 啓恭>

1. Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi Y, Kaida K, Inoue T, Okada M, Taniguchi K, Hasei H, Tamaki H, Fujioka T, Kato R, Soma T, and Ogawa H. Allogeneic stem cell transplantation as treatment for heavily-treated, refractory acute graft-versus-host disease after HLA-mismatched stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, 39: 880-890, 2011
2. Taniguchi K, Okada M, Yoshihara S, Sawada A, Tokugawa T, Ishii S, Kaida K, Ikegame K, Minagawa K, Matsui T, and Ogawa H. Strategy for bone marrow

transplantation in ecilizumab-treated paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *International Journal of Hematology*, 94: 403-407, 2011

3. Nakata J, Okada M, Tamaki H, Satake A, Kaida K, Yoshihara S, Kato R, Ikegame K, and Ogawa H. Dasatinib-induced rapid regression and complete molecular remission of multiple subcutaneous tumours presenting as relapsed chronic myeloid leukaemia after cord blood transplantation. *Leukemia Research*, 35: 1658-1659, 2011

<研究分担者 千葉 滋>

1. Kusakabe M, Hasegawa K, Hamada M, Nakamura M, Ohsumi T, Suzuki H, Mai TT, Kudo T, Uchida K, Ninomiya H, Chiba S, Takahashi S. c-Maf plays a crucial role for the definitive erythropoiesis that accompanies erythroblastic island formation in the fetal liver. *Blood* 118:1374-1385, 2011
2. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478:64-69, 2011
3. Nishikii H, Nakamura N, Kondo Y, Okoshi Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, Yokoyama Y, Sakata-Yanagimoto S, Enami T, Noguchi M, Chiba S. Treatment outcome of adult Burkitt lymphoma in Japanese patients with modified LMB protocol: a single center retrospective analysis. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 51:109-114, 2011

<研究分担者 谷口 修一>

1. Yamamoto H, Kato D, Uchida , Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, Nakano N, Tsuji M, Asano-Mori Y, Matsuno N, Masuoka K, Izutsu K, Wake A, Yoneyama A, Makino S, and Taniguchi S. Successful sustained engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. *Blood*. 117:3240-3242, 2011
2. Uchida N, Wake A, Nakano N, Ishiwata K, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Kato D, Matsuno N, Masuoka K, Araoka H, Asano-Mori Y, Izutsu K, Makino S, Yoneyama A, and Taniguchi S. Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. *Transplantation*. 92:366-371, 2011
3. Masuoka K, Uchida N, Ishiwata K, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Seo S, Matsuno N, Wake A, Makino S, Yoneyama A, and Taniguchi S. What is the upper age limit for performing allo-SCT? Cord blood transplantation for an 82-year-old patient with AML. *Bone Marrow Transplantation* 46:619-620, 2011

<研究分担者 田中 淳司>

1. Hayakawa S, Shiratori S, Yamato H, Kameyama T, Kitatsuji C, Kashigi F, Goto S, Kameoka S, Fujikura D, Yamada T, Mizutani T, Kazumata M, Sato M, Tanaka J, Asaka M, Ohba Y, Miyazaki T, Imamura M, Takaoka A. ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nature Immunology* 12: 37-44, 2011
2. Kobayashi T, Ishida J, Musashi M, Ota S, Yoshida T, Shimizu Y, Chuma M, Kawakami H, Asaka M, Tanaka J, Imamura M, Kobayashi M, Itoh H, Edamatsu H, Sutherland LC, Brachmann RK. p53 transactivation is involved in the

antiproliferative activity of the putative tumor suppressor RBM5. *International Journal of Cancer* 128:304-318, 2011

3. Tanaka J, Sugita J, Shiratori S, Shigematsu A, Asanuma S, Fujimoto K, Nishio M, Kondo T, Imamura M. Expansion of NK cells from cord blood with antileukemic activity using GMP-compliant substances without feeder cells. *Leukemia* (in press)
4. Kanda J, Saji H, Fukuda T, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kurokawa M, Kanamori H, Mori T, Hidaka M, Iwato K, Yoshida T, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Kanda Y. Related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction and HLA 8/8-allele-matched unrelated transplantation: A nationwide retrospective study. *Blood* (in press)
5. Sugita J, Matsushita T, Kashiwazaki H, Kosugi M, Takahashi S, Wakasa K, Shiratori S, Ibata M, Shono Y, Shigematsu A, Obara M, Fujimoto K, Endo T, Nishio M, Kondo T, Hashino S, Tanaka J, Asaka M, Imamura M. Efficacy of folinic acid in preventing oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients receiving MTX as prophylaxis for GVHD. *Bone Marrow Transplantation* (in press)
6. Kashiwazaki H, Matsushita T, Sugita J, Shigematsu A, Kasashi K, Yamazaki Y, Kanehira T, Yamamoto S, Kondo T, Endo T, Tanaka J, Hashino S, Nishio M, Imamura M, Kitagawa Y, Inoue n. Professional oral health care reduces oral mucositis and febrile neutropenia in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Support Care Cancer*. (in press)

<研究分担者 平家 勇司>

1. Morita-Hoshi Y, Mori SI, Soeda A, Wakeda T, Ohsaki Y, Shiwa M, Masuoka K, Wake A, Taniguchi S, Takaue Y, Heike Y. Identification of molecular markers for pre-engraftment immune reactions after cordblood transplantation by SELDI-TOF

<研究分担者 一戸 辰夫>

1. Sato T, Ichinohe T, Kanda J, Yamashita K, Kondo T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Clinical significance of subcategory and severity of chronic graft-versus-host disease evaluated by National Institutes of Health consensus criteria. *International Journal of Hematology* 93:532-541, 2011
2. Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood* (in press)

<研究分担者 高橋 義行>

1. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 156:316-325, 2012
2. Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikuta A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S. EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative diseases in nonimmunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood* 119:673-686, 2012

<研究分担者 前田 嘉信>

1. Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y,

Kadohisa S, Uryu H, Takeuchi K, Tanaka T, Yoshino T, Iwakura Y, and Tanimoto M. Synthetic Retinoid Am80 Ameliorates Chronic Graft-Versus-Host Disease by Downregulating Th1 and Th17 *Blood* 119:285-295, 2012

<研究分担者 森田 智視>

1. Yanagimachi M, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Miyamae T, Imagawa T, Mori M, Kaneko T, Morita S, Goto H, Yokota S. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *British Journal of Clinical Pharmacology* 71:237-243, 2011
2. Morita S. Application of the continual reassessment method to a phase I dose-finding trial in Japanese patients: East meets West. *Statistics in Medicine* 30:2090-2097, 2011
3. Mathew P, Wen S, Morita S, Thall PF. Placental Growth Factor and Soluble c-Kit Receptor Dynamics Characterize the Cytokine Signature of Imatinib in Prostate Cancer and Bone Metastases. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 31:539-544., 2011

<研究分担者 熱田 由子>

1. Atsuta Y, Morishima Y, Suzuki R, Nagamura-Inoue T, Taniguchi S, Takahashi S, Kai S, Sakamaki H, Kouzai Y, Kobayashi N, Fukuda T, Azuma H, Takanashi M, Mori T, Tsuchida M, Kawase T, Kawa K, Kodera Y. and Kato S. for the Japan Marrow Donor Program and the Japan Cord Blood Bank Network: Comparison of unrelated cord blood transplantation and HLA mismatched unrelated bone marrow transplantation for adults with leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (in press)
2. Kanda J, Saji H, Fukuda T, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kurokawa M, Kanamori H, Mori T, Hidaka M, Iwato K, Yoshida T, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa

K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y. and Kanda Y.: Related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction and HLA 8/8-allele-matched unrelated transplantation: A nationwide retrospective study. *Blood* (in press)

2. 学会発表

<研究分担者 小川 啓恭>

1. The 1st international scientific symposium on hematopoietic stem cell transplantation in emerging countries. 2011, 11.10-12, Hanoi, Vietnam. Ogawa H. Haplo-identical HCT from family members.
2. The 53th annual meeting of the American Society of Hematology, 2011, 12.10-13, San Diego, USA. Kaida K, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Ishii S, Kato R, Inoue T, Okada M, Tamaki H, Fujioka T, Soma T, Ogawa H. Unmanipulated HLA-haploidentical (2-3 antigen-mismatched) stem cell transplantation using myeliablative or reduced-intensity preconditioning regimen.
3. The 53th annual meeting of the American Society of Hematology, 2011, 12.10-13, San Diego, USA. Yano S, Yokoyama H, Nishimura R, Fukuda T, Ogawa H. Ohashi K, Kanamori H, Tanaka J, Sakamaki H, Atsuta Y, Takami A. Prognostic factors of reducing relapse in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation from related donor for acute myeloid leukemia: The Japan Society of Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT) AML working group.

<研究分担者 平家 勇司>

1. Heike Y. Phase-I Trial of cell-Depleted Haplo-Identical Stem Cell Transplantation (Haplo-SCT) Combined with HSV-TK Gene Modified T cell Add-Back, The fifth International Conference on Cell Therapy.

November1,2011

2. Heike Y. Phase-I trial of T cell-depleted haplo-identical stem cell transplantation(Haplo-SCT) combined with HSV-TK gene modified T cell add-back, Trend of gene & cell therapyas translational research in USA and JAPAN,2011
3. Heike Y. Phase-I trial of T cell-depleted haplo-identical stem cell transplantation (Haplo-SCT)combined with HSV-TK gene modified T cell add-back, The second Asian Cellular Therapy Organization (ACTO), 2011

<研究分担者 前田 嘉信>

1. Nishimori H, Maeda Y. Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y, Kadohisa S, Uryu H, Takeuchi K, Tanaka T, Yoshino T, Iwakura Y, and Tanimoto M. Donor Th17 and Th1 contribute to chronic graft-versus-host disease, BMT Tandem Meetings 2011年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

<研究分担者 田中 淳司>

(a)特許出願

発明の名称：NK細胞を増幅するための組成物及び方法

弊所整理番号：39541

出願番号：特願 2011-140504

提出日：平成 23 年 6 月 24 日

発明者：田中 淳司

特許出願人：テラ株式会社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

HLA 不適合血縁者間移植の安全性および有効性向上のための包括的研究

アレムツズマブを用いた HLA 不適合移植の開発・腫瘍・感染症特異的免疫の研究

研究代表者 神田 善伸 自治医科大学附属さいたま医療センター血液科 教授

研究要旨

東京大学医学部附属病院でパイロット試験として行ったアレムツズマブを用いた HLA 二座以上不適合血縁ドナーからの同種造血幹細胞移植療法の臨床試験の結果を受けて、平成 16 年 11 月から改正 GCP 基準に則った医師主導治験を開始した。平成 17 年度に第 1 コホート 3 症例を、平成 18 年度中に第 2 コホート 3 症例を完了した。平成 19 年度より連続再評価法(CRM)によってアレムツズマブの至適投与量を検討するとともに、当該用量において同種造血幹細胞移植が安全に実施することが可能であることを検討する段階に進んだ。平成 22 年 6 月に登録を完了し、平成 23 年度は治療後の観察を継続するとともにデータの固定を行った。良好な成績が得られており、平成 24 年度中に申請を行う予定である。今後はアレムツズマブの投与量をさらに減量した臨床試験を計画している。また、HLA 不適合移植で問題となる免疫抑制状態の遷延に対して様々な病原微生物に対する特異的な細胞傷害性 T 細胞を定量する系を開発している。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植の最大の合併症は移植片対宿主病(GVHD)である。特に HLA の不適合が存在する移植では致死的な GVHD の頻度が上昇する。そこで、我々はアレムツズマブに注目した。アレムツズマブはリンパ球などの細胞の表面に存在する CD52 に対するモノクローナル抗体である。移植前処置と併用することによって、拒絶と GVHD の両方を予防する薬剤としても注目されている。移植前処置とともに投与されたアレムツズマブはまずホストのリンパ球を抑制して拒絶を予防し、さらに移植後も 2 ヶ月程度有効血中濃度が維持されるため、ドナーのリンパ球を抑制して GVHD を予防する。そこで、他に有効な治療法を持たない造血器疾患患者で、かつ、HLA 適合または一座不適合の血縁・非血縁ドナーを有さない患者を対象として、アレムツズマブを用いて移植片拒絶と重症の移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)を防ぐことによって、HLA 二座以上不適合の血縁ドナーからの同種造血幹細胞移植を安全に行うことが可能であることを示すための臨床試験を行った。アレムツズマブは本邦未承認薬であるため、本臨床試験は改正 GCP(good clinical practice)基準に則って医師主導治験として実施した。本治験でアレムツズマブを用いた HLA 二座以上不適合血縁者間移植の安全性と有効性が証明された場合には、品質保証されたデータに基づい

てアレムツズマブの移植前処置薬としての適応承認申請を行い、多くの国民に利益をもたらすことが目的である。

また、HLA 不適合移植の問題点として、GVHD を予防するために免疫抑制を強化することが移植後の免疫抑制状態の遷延を招き、感染症や造血器腫瘍の再発が増加する可能性が危惧されている。そこで、病原微生物や、腫瘍抗原に対する特異的な免疫能の質的、量的評価を行う系を確立するとともに、腫瘍特異的免疫能を増強するための治療を開発する。

B. 方法

医師主導治験の対象とした患者は、他に有効な治療法を持たない造血器疾患を有するものの、HLA 適合または一座不適合の血縁・非血縁ドナーがいないがために、根治的な同種造血幹細胞移植を行うことができない 16~65 歳の患者であり、HLA 二座以上不適合の二親等以内の血縁ドナーを有する患者である。移植前処置は、自家移植の既往のない 55 歳未満の患者においては通常の移植で行われるシクロホスファミド(60 mg/kg を 2 日間)と全身放射線照射(2Gy を 1 日 2 回、3 日間)に加えてアレムツズマブを患者体重あたり 0.16~0.2 mg/kg を 6 日間併用(移植 8 日前から 3 日前まで)する。自家移植の既往のある患者あるいは 55 歳以上の高齢患者においては、リン酸フルダラビ

ン(30 mg/m²を6日間)、ブスルファン(4 mg/kgを2日間)、少線量全身放射線照射(2Gyを1日2回、1日間)とアレムツズマブを併用した。ドナーから採取した末梢血幹細胞を前処置終了後に輸注する。移植後の免疫抑制はシクロスポリンとメトトレキサートの併用で行った。

主要評価項目は移植後60日以内の生着不全およびグレードIII以上の急性GVHDの発症率とし、副次的評価項目として、移植後1年後の生存率、無増悪死亡率、移植前処置関連毒性、感染症発症率を評価した。

アレムツズマブの投与量は0.20 mg/kgを開始用量(第1コホート)として、GVHD非発現率の期待値が60%を超える確率が90%以上となることを基準としたCRM(Continual Reassessment Method、研究分担者の大橋靖雄らが開発した連続再評価法)による検討結果を参考として、3例ずつのコホート法により、0.16 mg/kg、0.20 mg/kg、あるいは0.25 mg/kgを投与し、CRMの開始用量を決定した。第3コホート以降のCRMにおいても、GVHD非発現率の期待値が60%を超える確率が90%以上となることを基準として用量選択を行い、最も早く必要症例数に達した用量を推奨用量と定め、その結果を主要変数の評価に用いることとした。

C. 結果

平成16年11月に治験届を提出し、平成16年12月に治験を開始した。平成17年に登録された3症例がいずれも治療の成功基準を満たしていることが確認されたため、アレムツズマブの投与量を0.16 mg/kg/dayに減量した。この第2コホートの3症例もいずれも成功基準を満たしたので、平成19年度よりCRMによってアレムツズマブの至適投与量を検討する段階に移行した。登録は緩徐ながらも着実に進行し、平成22年6月に登録を終了し、さらに平成23年6月に観察期間を終了した。

CRMの期間はアレムツズマブの用量が変更されることはなく、最終的に0.16 mg/kg/dayの投与を受けた11症例が主要評価項目の解析対象となり、9症例が成功基準を満たしたため、本治療法は有効と判断された。現在、詳細なデータの固定作業を行っている。しかし、移植後に免疫抑制に伴うサイトメガロウイルス(CMV)の再活性化が頻発したこと、GVHDの発症はほとんど問題にならなかったことから、今後はさらにアレムツズマブの投与量を減少した臨床試験の実施を計画している。

付随的な研究としてHLA不適合移植の将来の発展のための基礎研究においても成果が得られた。移植後にしばしば問題となるCMVに対して特異的に働く細胞傷害性T細胞を解析するために、テトラマーを用いて特異的CTLを単離し、single-cell RT-PCRでT細胞受容体レパトアを調べたところ、CMV特異的CTLのレパトアはかなり限定されており、それは移植前のドナーからも検出された。今後、これらのCTLが実際にどの程度の細胞傷害能を発揮するかについて評価する予定である。同様の手法でEBウイルスに対する特異的CTLの解析も進行している。

また、通常の移植方法で日常診療として行われているHLA-抗原不適合移植の治療成績について日本造血細胞移植学会のデータベースを用いて解析した。その結果、HLA-抗原不適合血縁者間移植の治療成績はHLA適合血縁者間移植やHLA-A、B、C、DRB1遺伝子型適合非血縁者間移植よりも有意に劣るということが示された。そこでHLA-抗原不適合血縁者間移植群を詳細に解析したところ、HLA-A、DR不適合群の成績はHLA適合血縁者間移植と大きな違いはなく、HLA-B不適合群だけが有意に劣ることが判明した。今後、抗胸腺細胞抗体を併用することによって治療成績が変わるかどうかを検証する前方視的臨床試験を実施する。

統計ソフトウェア開発についてはマウス操作だけで一般的な名義変数、連続変数、生存期間の解析に加えて、移植領域の統計解析で必須となる時間依存性変数を扱う解析や競合イベントを扱う解析が実行できるソフトウェア(EZR)が完成し、自治医科大学附属さいたま医療センターのホームページ(<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/>)で無料公開している。今後、造血細胞移植学会のデータベースを用いた統計解析の促進が期待できる。

D. 考察

HLA適合血縁ドナーからの同種造血幹細胞移植は、他に有効な治療を持たない造血器疾患の根治的な治療として確立されているが、少子化の進む先進国においてHLA適合血縁ドナーが得られる確率は30%にすぎない。骨髓バンクにもドナーが見つからない、あるいはバンク登録から移植までに約半年を要するために最適な移植時期を逸することも多い。このように移植に適したドナーが見つからないような場合には、臍帯血移植がひとつの選択肢となりえるが、移植片拒絶の危険が高いことと、造血回復までに長期間を要することが問題となっている。一方、親子間ではA、B、DR座などの重要なHLA座はひとかたまり(Hプロタ

イブ)として遺伝するため、A、B、DR 座の各 2 座の合計 6 座のうち、少なくとも 3 座は適合していることになる。そこで、HLA が二座あるいは三座不適合であっても安全な同種造血幹細胞移植が可能となる方法が開発されれば、ほとんどの患者が同種造血幹細胞移植療法の恩恵を受けることができるということになる。

本臨床試験は改正 GCP(good clinical practice)に則って医師主導治験として行うことにより、より信頼性の高いデータを得るとともに、本試験で品質保証されたデータに基づいて適応承認申請を行い、多くの国民に利益をもたらす。平成 22 年に登録終了、平成 23 年 6 月に観察期間を終了した。良好な成績が得られており、平成 24 年度中の承認申請を予定している。

E. 結論

研究代表者の初年度の研究は医師主導治験、基礎的研究のいずれにおいても順調な進捗を示している。来年度は新たな臨床試験を開始するとともに、造血細胞移植学会のデータベースを用いた後方視的研究や基礎的研究をさらに充実させ、HLA不適合移植の成績向上に取り組む予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanda Y, Sakamoto S, Ashizawa M, Sato M, Terasako K, Kikuchi M, Kimura SI, Okuda S, Kako S, Oshima K. Risks and benefits of ovarian shielding in female patients undergoing total body irradiation: A decision analysis. *Bone Marrow Transplantation* 48:1145-1147,2011
2. Wada H, Terasako K, Kamiya Y, Sato M, Kimura SI, Okuda S, Kako S, Yamazaki R, Oshima K, Nishida J, Moriguchi M, Terai C, Kanda Y. Immune recovery after autologous peripheral blood stem cell transplantation without in vitro graft manipulation for refractory systemic lupus erythematosus. *Bone Marrow Transplantation* 46:1450-1454, 2011
3. Yamazaki R, Nakasone H, Wada H, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako K, Kikuchi M, Kimura SI, Okuda S, Kako S, Tanaka Y, Tanihara A, Oshima K, Nishida J,

Kanda Y. Recurrence of monoclonal gammopathy associated with donor-derived myelodysplastic syndrome after cord blood stem cell transplantation. *Experimental Hematology* 39:1119-1123, 2011

4. Kanda J, Saji H, Fukuda T, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kurokawa M, Kanamori H, Mori T, Hidaka M, Iwato K, Yoshida T, Sakamaki H, Tanaka J, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Kanda Y. Related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction and HLA 8/8-allele-matched unrelated transplantation: A nationwide retrospective study. *Blood* (in press)
5. Kimura SI, Wada H, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako K, Nakasone H, Kikuchi M, Okuda S, Kako S, Yamazaki R, Oshima K, Tanaka Y, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. L-index as a novel index to evaluate both the intensity and duration of lymphopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation Infectious Disease* (in press)

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

研究要旨 T 細胞非除去 HLA 半合致移植の成功を阻む最大の要因は、GVHD である。なかでも、ステロイド抵抗性重症 GVHD に対しては、現在のところ、有効な治療法が存在しない。今年度は、下記に述べるように、graft-versus-GVHD 療法に絞って報告を行う。我々は、このステロイド抵抗性 GVHD 患者 17 人に対して、異なるドナーから再移植を行うことによって、GVHD の救済が可能であることを示した。この効果を、graft-versus-GVHD 効果と称している。同時に、今回、graft-versus-GVHD 効果を得るためには、second donor 由来の移植片の生着が必須であることを明らかにした。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、化学療法抵抗性の悪性血液疾患患者を治癒に導く唯一の治療法である。しかし、移植を必要とする患者で、HLA 適合同胞が存在するのは、25%程度に過ぎず、さらに昨今の少子化の影響もあり、今後、ますます血縁で HLA 適合ドナーが見つかる可能性は低くなると考えられる。このドナー不足を補うため、骨髄バンクや臍帯血バンクが設立されているが、それぞれ、ドナーのコーディネート期間が長い、拒絶の頻度が高いといった問題点が存在する。

一方、HLA が半分だけ合っているドナー (HLA 半合致ドナー) は、ほぼ血縁内に存在するので、このような HLA 半合致ドナーからの移植が安全に施行可能になると、同種移植においてドナーの問題が解消されることになる。一方、HLA 半合致移植の問題点は、移植後の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease=GVHD) などの移植関連毒性である。GVHD は、移植時の

幹細胞とともに入るドナーリンパ球が、host の正常組織を免疫学的に攻撃する反応である。重症 GVHD に対しては、ステロイド剤などにより、救済を試みるが、保険で認可されている免疫抑制剤が限られていることもあり、コントロールできず、死に至る例も多い。膠原病などの自己免疫疾患は、病的な自己反応性 T 細胞の活性化により生じると考えられるが、同種造血幹細胞移植を行うことで、この病的なリンパ球を除去され、治癒に至ることが、動物実験 data と臨床研究により、示されている。この効果を、“graft-versus-autoimmunity” と呼ばれる。同様に、移植後の GVHD においては、上述したように、病的に活性化したドナーリンパ球により、もたらされるので、理論上、異なるドナーから再移植を行うことで、first donor 由来のリンパ球を駆逐し、治癒をもたらすことができると考えられる。我々は、マウスの MHC 半合致移植において、この strategy が実行可能であることを証明し、“graft-versus-GVHD”

と命名した (Experimental Hematology, 2008; 36: 1216)。

上記のマウスでの実験結果を受けて、ステロイド抵抗性重症 GVHD 患者に対して、second donor から再移植を行うことで、重症 GVHD の治療が可能かどうかにつき、検討した。

B. 研究方法

対象：2001 年以降、大阪大学医学部附属病院、ならびに兵庫医科大学病院で、HLA 不適合移植を受け、ステロイド抵抗性の重症 GVHD を発症した 16 人、計 17 回の移植を対象とした。具体的には、methylprednisolone 2 mg/kg に反応しない患者、あるいは、この量にいったん反応するも、methylprednisolone 1 mg/kg 以上の dose で再燃する患者を対象とした。graft-versus-GVHD 療法の臨床効果は、以下のような基準で評価した：complete response, GVHD 症候が全て消失：partial response, 1 grade 以上の改善：stable disease, GVHD grade に変化なし：progressive disease, GVHD の悪化。

方法：移植前処置は、fludarabine 30 mg/m² x 3 (day -6 から day -4)、抗ヒト T リンパ球抗体(Fresenius) 2 mg/kg x 4 (day -4 から day -1)、全身放射線照射 3 Gy (day 0)とした。移植片として、GVH 方向で 0-3 抗原不適合ドナーからの末梢血幹細胞を用いた。GVHD 予防は、FK506 と methylprednisolone 1 mg/kg で行った。

主要評価項目：GVHD の改善

副次的評価項目：

- 1) 6 か月時点での生存、
- 2) ドナー/レシピエントのキメラリズム

(倫理面への配慮)

同プロコールは、大阪大学医学部倫理委員会、ならびに兵庫医科大学倫理委員会で承認を受けた後、ドナーとレシピエントに対するインフォームドコンセントの取得に関しては、下記の内容について口頭と文書による説明を行った。

- 1) 治療内容の説明
- 2) 試験への参加は自由意思に基づくこと
- 3) 本治療の代替治療法
- 4) プライバシーの保護

C. 研究結果

15 回の治療につき、graft-versus-GVHD 療法の評価が可能であった。second donor 由来の移植片は、その内 11 例で生着し、4 例で拒絶された。生着した 11 例における GVHD の response rate は 90.9%(complete response 8 例、partial response 2 例、stable disease 1 例)であった。完全寛解を得た 8 人中 6 人は、GVHD の徴候なく、観察期間の中央値 2128 日で、無病生存している。再移植による新たな GVHD は、1 例も認められなかった。また、原病である血液腫瘍の再発も認められなかった。逆に、拒絶した 4 例は、長期生存しなかった。

D. 考察

重症 GVHD の治療として、ペントスタチン、インフリキシマブ、各種モノクローナル抗体(抗 CD25 抗体、抗 CD52 抗体、抗 LFA3 抗体、抗 TNF 抗体など)や、間葉系幹細胞など、種々の試みがなされている。しかし、これらの治療は GVH を特異的に抑制するものではないため、GVHD のコントロールに成功したとしても、重症の免疫

不全や血栓性微小血管症などの合併症のため、治療が行き詰まることもある。また、効果が一時的で GVHD の再燃を生じたり、原病の血液腫瘍の再発が起こる場合も多い。

一方、重症 GVHD に対して、自家造血幹細胞移植を行うことにより治そうという試みが以前からある。しかし、この方法では、移植後 GVL 効果が消失するため、GVHD のコントロールに成功しても、ほとんどの例で、原病である血液腫瘍の再発が生じる。そこで、我々は、GVHD を恒久的にコントロールしつつ、血液腫瘍の再発を抑制するために、second donor から同種移植(救済移植)を行うことを考案した。評価が可能であった 15 症例の検討では、GvGVHD 効果を得るためには、second donor 移植片の生着が必須であることが明らかになった。拒絶例においては、一時的な GVHD の改善が認められても、その効果は永続することなく再燃し、救命には結びつかなかった。HLA の検討では、second donor 移植片の生着を得るためには、初回の移植の GVH 反応の対応 HLA 抗原を second donor が保持しないことが重要であることが判った。

E. 結論

ステロイド抵抗性の重症 GVHD 患者に対して、異なるドナーから再移植を行い、生着が得られれば、高い確率(90.9%)で GVHD の改善が得られ、その大半で治癒に至ることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi Y,

Kaida K, Inoue T, Okada M, Taniguchi K, Hasei H, Tamaki H, Fujioka T, Kato R, Soma T, and Ogawa H. Allogeneic stem cell transplantation as treatment for heavily-treated, refractory acute graft-versus-host disease after HLA-mismatched stem cell transplantation. *Experimental Hematology*, 39; 880-890, 2011.

2. Taniguchi K, Okada M, Yoshihara S, Sawada A, Tokugawa T, Ishii S, Kaida K, Ikegame K, Minagawa K, Matsui T, and Ogawa H. Strategy for bone marrow transplantation in ecilizumab-treated paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *International Journal of Hematology*, 94; 403-407, 2011.

3. Nakata J, Okada M, Tamaki H, Satake A, Kaida K, Yoshihara S, Kato R, Ikegame K, and Ogawa H. Dasatinib-induced rapid regression and complete molecular remission of multiple subcutaneous tumours presenting as relapsed chronic myeloid leukaemia after cord blood transplantation. *Leukemia Research*, 35; 1658-1659, 2011.

2. 学会発表

1. The 1st international scientific symposium on hematopoietic stem cell transplantation in emerging countries. 2011, 11.10-12, Hanoi, Vietnam. Ogawa H, Haplo-identical