

- 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.
 4. 第73回日本血液学会学術集会(名古屋) 2011.10.15 : (JSA-EHA Joint Symposium – Stem Cell Source) Ogawa H, Unmanipulated HLA-haploidentical stem cell transplantation.
 5. 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月15日(plenary)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

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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）
分担研究報告書

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
研究分担者 千葉 滋 筑波大学医学医療系 教授

研究要旨

HLA 半合致移植は、生着不全や重篤な GVHD、感染症や高い再発率が問題である。我々はこれらの合併症を克服するため、移植後早期にシクロフォスファミドを用いた HLA 半合致移植を計画した。1 例の経験では、生着は速やかであり、重篤な GVHD を認めなかった。同法を用いた HLA 半合致移植は安全に施行できるものと考えられた。

A. 研究目的

HLA 半合致移植（以下、ハプロ移植）は、HLA が合致した血縁ドナーや非血縁ドナーがいない造血器疾患患者における有望な選択肢のひとつである。しかしハプロ移植では、生着不全や重篤な GVHD の頻度が高く、また強い免疫抑制による感染症や高い再発率も問題であり、これらを克服するために様々な方法が試みられている。これら試みのひとつとして、移植後早期にシクロフォスファミドを投与（以下、移植後 CY）する方法でのハプロ移植が海外で開発されている。今回、報告されている方法のうち、骨髄破壊的前処置を用いる方法を、我が国の実態に合うよう修正した。この方法で移植を行い、安全性と効果を検討する。

B. 方法

（本研究における倫理面への配慮）

計画内容は筑波大学附属病院の研究倫理審査委員会で承認を受けた。レシピエントおよびドナーには研究の趣旨を理解してもらい、研究への参加は本人の自由意志によってのみ行われ、参加しない場合も何ら臨床的不利益を蒙らないことを保障する。提供者の個人を特定できる情報は、いかなる場所にも公表されない。

また効果・安全委員会を組織し、本研究の中止あるいは変更の必要性を諮る。

対象：血縁者および骨髄バンクに HLA 全合致ドナーが見つからず、ハプロ移植の適応につきグループ内会議で合意された造血器腫瘍および再生不良性貧血の患者。

ドナー：HLA-A, B, C, DRB1 各 2 座（計 8 座）のうち、ドナー、レシピエント間でアリル 4 座以上 6 座以下合致した血縁者。幹細胞ソースは末梢血幹細胞または骨髄とする。

前処置：症例および疾患背景により、いずれかを選択。

<前処置 1> 全身放射線照射（12 Gy/6 Fr），リン酸フルダラビン（150 mg/m²）

<前処置 2> 静注ブスルファン（12.8 mg/kg），リン酸フルダラビン（150 mg/m²），全身放射線照射（2 Gy）

免疫抑制：シクロフォスファミド（Day 3 および day 5、50 mg/kg × 2 日間），サイクロスポリン（Day -1 から持続静注），MMF（Day -1 から day 30 まで）2000 mg/日

C. 結果

39 歳男性（節外性 NK/T 細胞リンパ腫・鼻型，自家移植後再発例，on disease 移植）に対して、本レジメ

ンを用いた移植を行った。前処置 2 を用い、移植ソースとして抗原 2 座 (B, C), アリル 3 座 (B, C, DRB1) 不一致である弟の末梢血幹細胞を使用した。好中球生着は 15 日目、血小板生着は 22 日目であった。34 日目に再発を認めたため、免疫抑制剤 (サイクロスポリン) を 53 日目より減量、57 日目より中止した。しかし、その後も急性 GVHD を認めなかった。リンパ腫が増大したため、85 日目および 115 日目に DLI (各 5×10^6 cells/kg, 2×10^7 cells/kg) を行ったが、明らかな GVL 効果を認めることなく、127 日目に原病により死亡した。全経過を通じて、急性および慢性 GVHD を認めなかった。

D. 考察

骨髄非破壊的前処置と移植後 CY を用いたハプロ移植の報告 (Luznik, BBMT, 2008) において、GVHD (III-IV) は 6%, TRM 15%であったが、生着不全が 13%に生じた。また骨髄破壊的前処置と移植後 CY を用いた 18 例の報告 (Bacigalupo, EHA 学会, 2011) では、全例で生着し (好中球生着中央値: 24 日), GVHD (III-IV) はなく、1 年生存率も 60%と良好な成績であった。同報告では骨髄破壊的前処置と移植後 CY を用いたハプロ移植は、(1)移植した造血幹細胞への悪影響を生じないこと (2)生着不全を予防できること (3)重篤な GVHD を予防できること (4)移植後の免疫再構築に優れることが示唆された。我々の症例では明らかな GVL 効果を認めなかったものの、通常の HLA 合致移植と比較しても安全に施行できたものと考えられる。

E. 結論

骨髄破壊的前処置と移植後 CY を組み合わせたハプロ移植 1 例において、生着不全と GVHD の予防が可能であった。今後の症例の集積が必要である。

F. 研究発表

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(5):1374-85, 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, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 478(7367):64-9, 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. *J Clin Exp Hematol* 51(2):109-114, 2011

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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）
分担研究報告書

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

研究分担者：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

研究要旨

2010年5月から12月まで当科にて造血幹細胞移植を施行した100例を対象に13種類のウイルス(HSV1～8, ParvovirusB19, HBV, JCV, BKV, ADV)について移植前から移植後8週まで週1回全血を用いPCRを施行した。年齢中央値は52(16-71)歳。同種移植94例、自家移植6例。陽性検体は471例(57.3%)であり、内訳はHHV-6 69.6%, CMV 37.7%, BKV 13.2%, ADV 7.7%であった(他のウイルスは3%以下であった)。HHV-6, CMV, BKV, ADVの累積陽性率は88.5%, 54.3%, 24.1%, 11.6%であった。31例(34%)が中央値18(-1～56)日でウイルス感染症を発症し、合計45エピソードの感染症が発症した。感染症の内訳はHHV-6脳症33.3%、ADV感染症22.2%、BKV膀胱炎35.6%であった。ADV感染症の感度、特異度、PPV、NPVは85.7%, 100.0%, 100.0%, 98.9%。BKVは61.1%, 86.6%, 50.0%, 91.0%。HHV-6脳症(cut off10000copies/ml)は46.6%, 71.8%, 29.1%, 88.4%であった。CMVはpre-emptive therapyが為されており除外した。本法は移植後早期のウイルス感染症のモニタリングの方法として有効な可能性がある。

A. 研究目的

ウイルス感染症は依然として移植後の重大な合併症である。今回前方向視的に13種類のウイルスを同時にPCRにてモニタリングし感染症との関連性について検討した。

B. 研究方法

2010年5月から12月まで当科にて造血幹細胞移植を施行した100例を対象に13種類のウイルス(HSV1～8, ParvovirusB19, HBV, JCV, BKV, ADV)について移植前から移植後8週まで週1回全血を用いPCRを施行した。HSV/VZV、HHV-6の予防にアシクロビルもしくはホスカルネット(FCV)を使用し、CMVに対してはpre-emptive therapyを行った。

(倫理上の問題点に対する配慮)

本研究実施計画書および説明文書は、虎の門病院研究委員会の承認を得ており、この説明文書を用いて十分な説明を行い、文書で同意が得られた者についてのみ施行した。

C. 研究結果

年齢中央値は52(16-71)歳。同種移植94例、自家移植6例。陽性検体は471例(57.3%)であり、内訳はHHV-6 69.6%, CMV 37.7%, BKV 13.2%, ADV 7.7%であった(他のウイルスは3%以下であった)。HHV-6, CMV, BKV, ADVの累積陽性率は88.5%, 54.3%, 24.1%, 11.6%であった。31例(34%)が中央値18(-1～56)日でウイルス感染症を発症し、合計45エピソードの感染症が発症した。感染症の内訳はHHV-6脳症33.3%、ADV感染症22.2%、BKV膀胱炎35.6%であった。ADV感染症の感度、特異度、PPV、NPVは85.7%, 100.0%, 100.0%, 98.9%。BKVは61.1%, 86.6%, 50.0%, 91.0%。HHV-6脳症(cut off10000copies/ml)は46.6%, 71.8%, 29.1%, 88.4%であった。CMVはpre-emptive therapyが為されており除外した。

D. 考察

本法を用い多種類のウイルスの動態を把握することができた。ADVにおいては感度、特異度ともに高くモニタリングが有用な可能性が示唆された。BKVとHHV-6については感度、特異度ともにADVほど高くはなかった。要因としては閾値が設定できていないこと、HHV-6に関してはホスカルネットの予防投与が関与している可能性がある。本法は移植後早期のウイルス感染症のモニタリングの方法として有効な可能性がある。

E. 結論

本法は移植後早期のウイルス感染症のモニタリングの方法として有効な可能性がある。

F. 研究発表

1.論文発表

1. Yamamoto H, Kato D, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, Taniguchi S, et al. Successful sustained engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Mar 17;117(11):3240-3242.
2. Uchida N, Wake A, Nakano N, Ishiwata K, Takagi S, Tsuji M, Taniguchi S, et al. Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone. *Transplantation*. 2011 Aug 15;92(3):366-371.
3. Masuoka K, Uchida N, Ishiwata K, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Taniguchi S, et al. What is the upper age limit for performing allo-SCT? Cord blood transplantation for an 82-year-old patient with AML. *Bone Marrow Transplant*. 2011 Apr;46(4):619-620.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

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

研究分担者 田中 淳司 北海道大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

HLA 不適合移植においては再発率の低下が認められる一方で GVHD などの移植関連合併症が増加してその生存率を低下させてしまう。従って、HLA 不適合移植後の生存率向上のためには GVHD のコントロールが重要と考えられる。

A. 研究目的

HLA 不適合移植では強い GVL 効果により再発率の低下が期待されるものの、GVHD を含めた移植関連死が増加するため必ずしも再発率の低下が生存率の向上には寄与しないことが知られている。

欧米人と日本人では GVHD のリスクが異なり、海外でのデータを単純に日本人に当てはめることはできないことから、日本人でのデータを集積することが重要である。そこで比較的移植条件等がそろっていると思われる、北海道大学血液内科グループ（当科および関連施設）の移植成績について HLA 適合度を中心に後方視的な解析を行った。

B. 研究方法

2000 年 1 月～2009 年 12 月に北海道大学血液内科グループ（北海道大学病院および札幌北楡病院）にて施行した臍帯血移植を除く初回同種移植症例 393 例（HLA 適合同胞間移植 135 例、HLA 適合非血縁者間移植 133 例、HLA 不適合移植 125 例）を対象とした。

HLA-A, B, DR1 座についての HLA 適合度を遺伝子型で評価し一座以上の不適合がある場合を HLA 不適合移植と定義した。AML, ALL の第一・第二寛解期、CML の第一・第二慢性期、MDS の RA, low grade lymphoma、非悪性疾患を standard risk、他はすべて High risk とした。

C. 研究結果

全生存率、無増悪生存率は HLA 適合同胞間移植、HLA 適合非血縁者間移植、HLA 不適合移植の 3 群間で有意差を認めなかった。しかし HLA 不適合移植症例では HLA 適合移植（血縁・非血縁）と比較して移植関連死亡は有意に多かった。

移植関連合併症として急性 GVHD(II-IV) および慢性 GVHD はともに HLA 不適合移植症例に多く認められた。一方、HLA 不適合移植症例では再発率が有意に低いために生存率としては有意差を認めないものと考えられた。

HLA 不適合移植症例では免疫抑制剤に tacrolimus を用いた群で重症 GVHD(grade III-IV)の発症は有意に少な

かった。

多変量解析では HLA-A 不適合が Hazard risk 1.70(95CI, 1.03-2.67, P=0.037)と有意に全生存率に悪影響を及ぼしていた。

D. 考察

HLA 不適合移植においては再発率の低下が認められる一方で GVHD などの移植関連合併症が増加してその生存率を低下させてしまう。従って、HLA 不適合移植後の生存率向上のためには GVHD のコントロールが重要と考えられる。

今回は NK 細胞活性に大きな影響を与えると考えられる HLA-C 適合度については十分なデータがなく解析できなかったが、今後日本造血移植学会一元化データを用いて解析を試みていく予定である。

E. 結論

HLA 不適合移植後の生存率向上のためには GVHD 制御が非常に重要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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)
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, 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)

3. 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 Transplant*. 2011 Mar 21. [Epub ahead of print]
4. 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*. 2011 Feb 15. [Epub ahead of print]
5. 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 Immunol* 12: 37-44, 2011.

6. 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. *Int J Cancer*. 128:304-318, 2011.

2. 学会発表

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
2011年3月9日-10日：松山

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

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

研究分担者 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

研究要旨

同種造血幹細胞移植が適応でありながら、適切なドナーが見つからない患者を対象として、ハプロ一致ドナーからのCD34選択移植+HSV-TK遺伝子導入リンパ球Add-back療法の臨床試験を実施している。現時点で2名を登録・実施し、内1名は免疫再構築を達成し、再発・感染症もなく外来通院中である。本症例では、遺伝子導入リンパ球の投与後、免疫再構築が達成すると同時に皮膚急性移植片対宿主病が出現したが、GCVの投与により速やかに治癒した。他の1名は免疫再構築前に、ウイルス感染症が原因で死亡した。

A. 研究目的

本研究の目的は、適切なドナーが見つからない同種造血幹細胞移植を要する造血器悪性腫瘍患者を対象に、ハプロ一致ドナーからのCD34細胞選択移植+HSV-TK遺伝子導入リンパ球療法の安全性と有効性を検証することである。

B. 研究方法

国立がん研究センター並びに遺伝子治療臨床研究中央評価会議にて承認された研究計画書に基づいて、対象となる患者を登録・治療し、その安全性と有効性を評価する。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、GCPなどの臨床研究に関する各指針に従って臨床研究・治験を実施するのは言うまでもなく、必要に応じて、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針」、「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針」、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「カルタヘナ法」を遵守する。

C. 研究結果

現時点で、2例の症例を登録、治療した。1例目は、遺伝子導入リンパ球の投与後に免疫再構築を達成すると同時に、皮膚の急

性移植片対宿主病を発症した。研究計画書に従い、GCVの投与を行ったところ、左記急性移植片対宿主病は速やかに治癒した。末梢血中の遺伝子導入細胞の割合、および皮膚急性移植片対宿主病片部の生検材料を用いたHSV-TK遺伝子の定量PCRの結果、GCV投与により、遺伝子導入リンパ球が速やかに減少していることが明らかとなった。このことは、HSV-TK遺伝子が機能していることを示唆している。本症例は、再発、感染もなく、現在も外来通院中である。2症例目は、CD34陽性細胞移植後にEBウイルス感染症が悪化、HSV-TK遺伝子の投与を2回行うも、免疫再構築を達成することなく患者は死亡した。

D. 考察

2症例のみの経験であるが、内1例は理想的な経過をたどり、CD34陽性細胞移植にHSV-TK遺伝子導入リンパ球Add-backによって、1) 免疫再構築が促されること、2) add-backによって引き起こされる急性移植片対宿主病がGCVによって治癒できること、が確認できた。一方、2例目は、2回のHSV-TK遺伝子導入リンパ球のAdd-backにも関わらず免疫回復を達成することなく、ウイルス感染症で死亡した。先行するイタリア・モルメド社のデータ、並びに当院の患者経過を解析すると、1 x 10e7/kg以上のHSV-TK遺伝子導入細胞の投与によって、免疫再構築を早く誘導する

ことが、本治療法の有用性を生かすために重要であることが示唆された。

E. 結論

同種移植を必要としつつも、適切なドナーがない造血器悪性腫瘍患者において、ハプロ一致ドナーからのCD34選択移植とHSV-TK遺伝子導入リンパ球Add-back療法の有用性が期待できる。その際、HSV-TK遺伝子導入リンパ球の投与によりできるだけ早く免疫再構築を促すことが、重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 MS. *Bone Marrow Transplant*.45(11):1594-1601,2010

2. 学会発表

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

G. 知的財産等の出願・登録状況

1.特許取得

該当事項なし

2.実用新案登録

該当事項なし

3.その他

該当事項なし

厚生労働科学研究補助金（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
分担研究報告書

T 細胞除去を用いない母子間移植と父子間移植の比較

研究分担者 一戸 辰夫 佐賀大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科
研究協力者 諫田 淳也 自治医科大学附属さいたま医療センター 血液科

研究要旨：日本造血細胞移植学会の一元化データベースを用いて、1999 年から 2008 年までに白血病・骨髄異形成症候群を対象として T 細胞除去を用いずに実施された母子間移植（母親をドナーとする移植）と父子間移植（父親をドナーとする移植）の成績を比較した。HLA-A, -B, -DR に抗原型レベルで GVH 方向に不適合が存在しない場合には、母ドナー群と父ドナー群の移植後生存率に有意差は検出されなかったが、GVH 方向に 1 抗原以上の不適合が存在する場合には、母ドナー群の生存率が良好である傾向が認められた。また、移植後の原疾患の再発リスクは両群間で有意差を認めなかったが、II 度以上急性 GVHD の発症リスクは母ドナー群で高い傾向を認め、治療関連死亡のリスクは父ドナー群で有意に高かった。今後、母ドナー群の生存率が良好であった機序を明らかにするため、さらなる検討が必

A. 研究の背景と目的

難治性造血器疾患に対して迅速な移植の実施を考慮する場合には、さい帯血と並び HLA 不適合血縁者は依然として重要な幹細胞ソースである。2001 年、玉木らは、国内で 1990 年から 1998 年までに実施された親から子に対する移植の後方視的な解析を行い、母親をドナーとする場合の移植成績が父親をドナーとする場合よりもすぐれている可能性を報告した。また、その後、イタリアのグループから、純化 CD34 陽性細胞を移植片に用いた HLA 不適合親子間移植においても、母親をドナーとする移植では、父親をドナーとする移植よりも再発率・移植後死亡率が低かったことが報告されている。これらの報告は、妊娠中に相互の同種抗原への曝露を経験している母子間の特殊な免疫環境が、母親をドナーとする移植における免疫学的合併症

や原疾患再発のリスクに影響を与えていることを示唆するものと考えられる。本研究では、さらに多数の移植例を対象として上記の先行研究で得られた知見を検証し、今後 HLA 不適合血縁ドナーを選択する際の適切な指針を得ることを目的とする。

B. 研究方法

日本造血細胞移植学会の一元化造血細胞移植登録データベース (TRUMP) に登録が行われている HLA 不適合血縁者間移植で、急性骨髄性白血病・急性リンパ性白血病・慢性骨髄性白血病・骨髄異形成症候群のうちいずれかの疾患を対象として 1999 年から 2008 年までに移植が実施され、患者の母親あるいは父親がドナーとなっている例のうち、前処置に ATG など T 細胞除去を目的とする薬剤が使用された例や ex vivo T 細胞除去が用いられた

例等を除いた 362 例を解析対象とした(表1・表2)。主要エンドポイントは移植後3年目の時点における生存とし、母親をドナーとして実施された移植を基準とする場合の、父親をドナーとして実施された移植の移植後死亡に関する補正ハザード比を Cox 比例ハザードモデルを用いて算出した。また、両親のいずれがドナーであるかが(母ドナー、父ドナー)が死亡以外の移植後の主要なアウトカムに与える影響は、競合リスクも考慮した上で Fine と Gray の比例ハザードモデルを用いて検討した。

C. 研究結果

父親をドナーとする移植群では、母親をドナーとする移植群よりも、移植後の死亡リスクが有意に高かった(HR=1.36, 95%CI: 1.03-1.80, P=0.03)。また、HLA-A, -B, -DR の GVH 方向の不適合抗原数別に解析を行うと、GVH 方向に HLA の不適合が存在しないグループでは両群の死亡リスクに有意差は認められなかったが、GVH 方向に不適合が存在するグループでは、母ドナー群の死亡リスクが低くなる傾向が見られた(表3)。母ドナー群の移植後生存率が良好であった原因を探索するために、GVH 方向に不適合が存在する移植例のみを対象に、好中球の生着、急性 GVHD、慢性 GVHD、治療関連死亡、原疾患の再発に与えるドナー選択の影響をそれぞれの競合リスクを考慮した上で検討したところ、母ドナー群において急性 GVHD、広範型慢性 GVHD の発症リスクが高い傾向があり、父ドナー群において治療関連死亡リスクが有意に高いという結果が得られた。また、原疾患再発のリスクは両群間で有意差を認めなかった(表4)。

D. 考察

母ドナー群の移植後生存率が父ドナー群よりも良好である根拠として、海外における T 細胞

除去を用いた移植の解析では、母ドナーが配偶者由来抗原に感作されているために再発率が低下する可能性が示唆されている。しかし、今回の解析では、母ドナー群において GVHD が発症しやすい傾向が確認されたものの、再発への影響は明らかではなかった。父ドナー群における移植後早期の治療関連死亡が多かった理由についても、その詳細についてはさらなる検討が必要である。

E. 結論

日本造血細胞移植学会に登録された移植例を対象として、T 細胞除去を用いずに実施された母子間移植と父子間移植の成績の比較を行い、HLA-A, -B, -DR に GVH 方向に 1 抗原以上の不適合が存在する場合には、母親ドナーからの移植後生存率が良好である傾向を確認した。

F. 研究発表

論文発表

1. 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* 2012 Jan 10 [Epub ahead of print]
2. 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. *Int J Hematol* 93:532-541, 2011

G. 知的財産権の出願状況
特になし。

Characteristics	Donor		P
	Mother (n=236)	Father (n=126)	
Age group, n (%)			0.269
0-15 years	121 (51)	73 (58)	
16 years or older	115 (49)	53 (42)	
Sex, n (%)			0.373
Male	98 (42)	59 (47)	
Female	138 (59)	67 (53)	
Diagnosis, n (%)			0.204
AML	108 (46)	46 (37)	
ALL	99 (42)	66 (52)	
CML	19 (8)	7 (6)	
MDS	10 (4)	7 (6)	
Disease status at transplantation, n (%)			0.347
Standard risk*	102 (43)	64 (51)	
High risk	127 (54)	60 (48)	
Unknown	7 (3)	2 (2)	

表1: 解析移植例の背景

Characteristics	Donor		P
	Mother (n=236)	Father (n=126)	
Stem cell source, n (%)			0.085
Marrow	142	90	
Peripheral blood	89	35	
Peripheral blood+marrow	5	1	
HLA mismatch in GVH vector, n(%)			<0.001
0 antigen	23	22	
1 antigen	122	80	
2 or 3 antigen	91	24	
Conditioning, n(%)			0.288
Myeloablative	169	100	
Reduced-intensity	40	16	
Unknown	27	10	
GVHD prophylaxis, n (%)			0.642
Cyclosporine-based	55	32	
Tacrolimus-based	175	89	
Others	6	5	
Year of transplantation, n (%)			0.077
1999-2004	127	55	
2005-2008	109	71	

表2: 移植方法の比較

Outcome	N	HR* (95%CI)	P value
Overall mortality			
All patients	362	1.36 (1.03-1.80)	0.030
0 GVH mismatch	45	1.17 (0.47-2.87)	0.737
1 GVH mismatch	202	1.39 (0.96-2.02)	0.085
2-3 GVH mismatch	115	2.02 (1.17-3.50)	0.012

*母ドナー群に対する父ドナー群のハザード比

表3: 移植後死亡リスクについての多変量解析
(全例を対象として解析)

Outcome	HR* (95%CI)	P value	Other significant factors
Neutrophil recovery	0.83 (0.63-1.09)	0.174	Recipient age; Diagnosis; Disease status; Stem cell source
Grade 2-4 acute GVHD	0.72 (0.51-1.00)	0.050	Recipient age; Conditioning; Number of GVH mismatch
Grade 3-4 acute GVHD	0.68 (0.42-1.11)	0.128	Recipient sex; Disease status
Chronic GVHD	0.77 (0.51-1.17)	0.216	Conditioning; Stem cell source
Extensive chronic GVHD	0.60 (0.36-0.99)	0.048	Recipient age; Conditioning; Number of GVH mismatch
Treatment-related mortality	1.80 (1.17-2.78)	0.008	
Relapse	0.74 (0.48-1.15)	0.186	Diagnosis; Disease status

*母ドナー群に対する父ドナー群のハザード比

表4: 死亡以外のアウトカムに関する多変量解析
(GVH 方向に不適合抗原が存在する例のみを対象として解析)

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）

分担研究報告書

血縁者間HLA不適合移植に関する研究

ハプロ一致移植におけるT、NK細胞によるGVL効果の検討

研究分担者 高橋 義行 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学/成長発達医学 准教授

研究要旨： HLAハプロ一致移植後に再発した白血病細胞を患者・ドナー間不一致HLA抗原をフローサイトメトリー法により再発白血病細胞にHLA欠失がないか検討した。またHLA欠失前後の白血病細胞をドナー由来NK細胞と混合培養しCr release 法により細胞障害活性の変化の解析を行なった。ドナーから採取したNK細胞は初診時白血病細胞に対し傷害活性を示さなかったが、HLA-LOHをおこした白血病細胞には強い傷害活性を示した。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をきたした白血病細胞でのみ発現が認められた。

A. 研究目的

イタリアのグループおよび我々は HLA ハプロ一致移植後に、白血病細胞が不一致 HLA をハプロタイプロス (HLA-LOH) により不一致 HLA を標的とする CTL からエスケープし、その原因が 6 番染色体の Uniparental dysomy と報告した。AML においてはドナー由来のアロ反応性 NK 細胞が移植後再発を減少させ有意に生存率を上昇させるが、HLA 分子が NK 細胞の抑制性 KIR 受容体のリガンドそのものであり、HLA をロスした白血病に NK 細胞感受性の変化が起こるかどうかは重要である。

B. 研究方法

HLA ハプロ一致移植後に再発した白血病細胞を患者・ドナー間不一致 HLA 抗原をフローサイトメトリー法により測定し再発白血病細胞に HLA 欠失がないか検討する。また白血病細胞を細胞表面抗原に対する抗体で標識し、BD FACS

Aria セルソーターを用いた cell sorting により白血病細胞を純化して DNA を抽出し、SNP アレイ解析を行った。ドナーNK 細胞に障害活性を示す白血病細胞でNKG2D リガンド(ULBP1-3)について HLA 欠失前後で発現の変化について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部倫理審査委員会の承認を得ておこなう。

C. 研究結果

12歳女兒、AML MO。寛解導入不能のため HLAハプロ一致の父より緊急で血液幹細胞移植を実施し寛解が得られた。移植後15ヶ月後に再発しドナーリンパ球輸注 (DLI) にて再寛解を得た。DLI後9ヶ月間の寛解後に再発した白血病細胞にHLAアレルのDNAタイピングで不一致 HLAのハプロタイプロスが確認され、SNPアレ

イによる解析で、6番染色体短腕上のHLA遺伝子領域に局限してドナー由来アレルの欠失と残存アレルの重複 (Uniparental disomy)がみつかった。移植ドナー細胞より樹立した不一致HLA分子反応性CTLクローンは初診時白血病細胞を傷害したが、HLA-LOHをおこした白血病は傷害できなかった。一方、ドナーから採取したNK細胞は初診時白血病細胞に対し傷害活性を示さなかったが、HLA-LOHをおこした白血病細胞には強い傷害活性を示した。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をきたした白血病細胞でのみ発現が認められた。

D. 考察

HLAハプロ一致移植後に再発した白血病細胞において50-60%と高頻度に患者・ドナー間での不一致HLAが欠失する。このことはドナーT細胞によるGVL効果からのエスケープを意味するものと考えられるが、同時にHLAロスした白血病細胞がNK細胞感受性が高まる場合がある。抑制性KIR受容体のリガンドがHLAクラス1であるが、HLAハプロタイプロスではこのNK感受性増加現象を説明できない。Stress induced proteinでもあるNK活性化受容体リガンドがHLA欠失白血病細胞にて上昇していたことでドナー由来NK細胞の感受性が変化していた可能性が高いと考えられた。

E. 結論

HLAハプロ一致移植後の再発白血病に対して再発白血病細胞のHLAロスの有無の検索はドナーリンパ球輸注が適応となるかどうかを決定するうえで重要である。またドナーNK細胞による再発白血病に対する細胞障害試験、およびNK細胞受容体関連分子発現の検討はNK細胞による

GVL効果の関与およびその機序の解明に有用と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. *Br J Haematol.* 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

2. 学会発表

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、2011.3.7

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
研究分担者 前田 嘉信 岡山大学病院 血液・腫瘍内科

研究要旨 同種造血幹細胞移植は、白血病などの悪性疾患に対する根治的治療として確立しているが、致命的合併症である移植片対宿主病 (GVHD) は今日なお克服すべき課題である。GVHD の抑制には、移植後免疫寛容の誘導が重要であるが、制御性 T 細胞 (Treg) は能動的に免疫寛容に関与する。我々は、まず移植後の Treg 再構築についてマウスモデルを使って検討した結果、移植片に混入する Treg ではなく、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明らかとなった。免疫抑制剤であるシクロスポリンと mTOR 阻害剤が Treg 再構築に及ぼす影響を検討した結果、シクロスポリンはその再構築を阻害し慢性 GVHD 発症の基礎的病態を形成させているのに対し、mTOR 阻害剤は Treg 再構築を阻害しないことが明らかとなった。次に、慢性 GVHD のエフェクター細胞について検討した結果、Th1 と Th17 細胞が関与しており、Th1/Th17 を抑制するレチノイン酸が慢性 GVHD 抑制に効果的であることが明らかとなった。mTOR 阻害剤およびレチノイン酸は移植後免疫寛容を誘導し、GVHD の抑制に重要な治療薬となり得ることが示唆された。

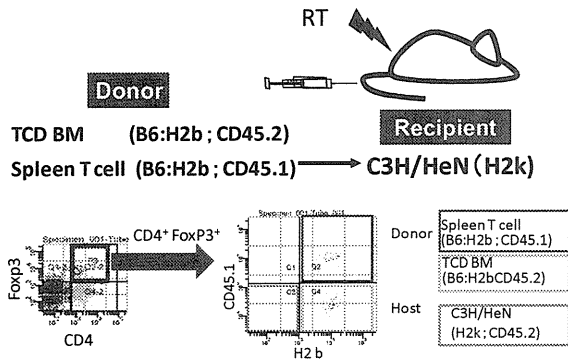
A. 研究目的

同種造血幹細胞移植は、白血病などの悪性疾患に対する根治的治療として確立しているが、致命的合併症である移植片対宿主病 (GVHD) は今日なお克服すべき課題である。GVHD は急性 GVHD と移植後期に発症する慢性 GVHD に大別される。慢性 GVHD は急性 GVHD と発症時期が異なるだけでなく、その病態も異なると考えられている。急性 GVHD の基本的メカニズムは次第に明らかとなってきており、急性 GVHD のエフェクター細胞が Th1 細胞であるのに対し、これまで慢性 GVHD については Th1/Th2 細胞で病態が十分に説明できていない。そこで我々は Th1、Th2 細胞に続く第三の免疫担当細胞である Th17 細胞の慢性 GVHD への関与を、マウス

モデルを用いて明らかにする。また、Th1/Th17 の活性化と相反の関係にある制御性 T 細胞 (Treg) は減弱しており慢性 GVHD を十分に抑制できていないことを明らかにする。

B. 研究方法

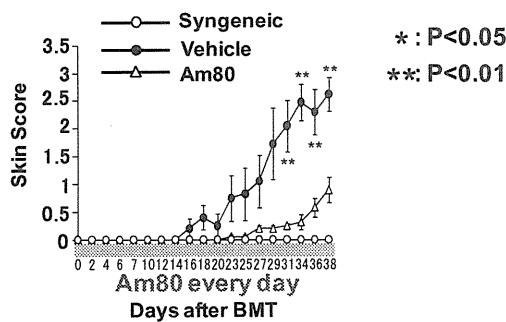
マウス造血幹細胞移植モデル B6(H2b CD45.1orCD45.2) ⇒ C3H/Hen (H2k Ly9.1) を使い骨髄移植後に存在するドナー Treg の由来を時系列 (0-12W) フローサイトメトリーで測定し、体内の新規 Treg による長期の免疫寛容再構築動態を検討する。免疫抑制剤 (シクロスポリン、m-TOR(mammalian target for rapamycin) 阻害剤のエバロリムス、ラパマイシン) の骨髄由来 Treg に対する影響は、キメラマウスモデルを使用して確認する。



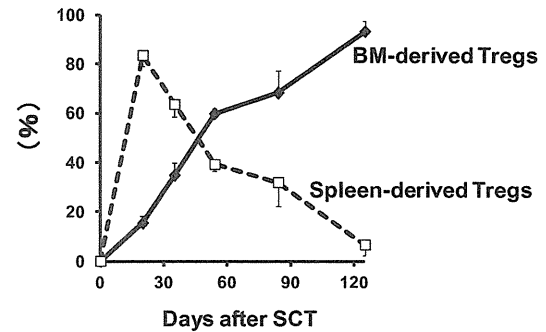
以上から移植後長期の Treg の活性と免疫抑制剤の影響を調べることで慢性 GVHD の予防・治療の可能性を検討する。次に、ドナーに B10.D2、ホストに BALB/c を使ったマウス慢性 GVHD モデルにおいて、IL-17 欠損マウスをドナーに用いて慢性 GVHD 発症が抑制されるかを検討する。次に Th17 細胞への分化を抑制するレチノイン酸を投与し GVHD の抑制、治療効果を明らかにする。

C. 研究結果

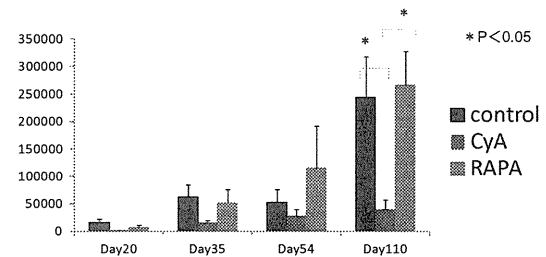
IL-17 欠損マウスによって慢性 GVHD は、組織学的、臨床的指標でコントロール群と比較し有意に抑制された。レチノイン酸を投与することにより慢性 GVHD が抑制され予防・治療効果を認め、Th17 細胞の慢性 GVHD への関与が明らかとなった。



また、逆に慢性 GVHD 発症マウスは新規 Treg による長期の免疫寛容再構築が不十分であり、m-TOR 阻害剤は免疫寛容再構築を進め、慢性 GVHD の発症を抑えた。



number of Tregs in the thymus



D. 考察

慢性 GVHD は新規 Treg による免疫寛容の再構築が不十分であることと合わせ Th17 細胞が増加する状態「Treg/Th17 バランスの崩れ」が発症に関与していることが示唆された。

E. 結論

Treg/Th17 バランスの崩れが慢性 GVHD 発症に関与し、バランスを改善させ移植後の免疫寛容を誘導するには、レチノイン酸と m-TOR 阻害剤が有効であると考えられた。

F.研究発表

1. 論文発表

- 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

2. 学会発表

- 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) 2011/2

- 2)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 2011/3

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。

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）
分担研究報告書

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
分担研究「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」

研究分担者 森田 智視 横浜市立大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：造血幹細胞移植領域において臨床試験を計画・実施するにあたって重要な事項がデータベースの構築と集積したデータの有効活用である。そのための最適な統計的方法の一つがベイズ流統計手法である。そこで、本分担研究ではベイズ流統計手法の利用可能性について検討・評価を行った。

A. 研究目的

新治療法開発のためのエビデンスを得るためには前向きに臨床試験を実施するのがもっとも望ましい。しかしながら、臨床的な理由により前向き臨床試験の実施が困難な場合がある。また、現実の臨床現場ではエビデンスが乏しいもとでも様々な治療法が手探りに使用される側面がある。そのような場合には、日常診療で得られた情報をデータベース化し、その中からデータ解析によりエビデンスの充実化を図ることが要求される。新規治療法の評価においては、データベースから得られるヒストリカルコントロールとの比較が有用であるが、そのための最適な統計的方法はベイズ流統計手法であり、米国で一、二を争う M.D. アンダーソン癌センターにおいても実際の臨床試験において頻用されている[参考文献 1,2]。この方法を用いてヒストリカルコントロールとの比較解析を有効性および安全性に関して実施することで、限られたリソ

ース（人的資源、症例数、研究費など）を“効率的”に利用することが可能となる。造血幹細胞移植領域においては最も望ましい手法であると考えられる。

ベイズ流”アプローチの特徴は複雑化する様々な臨床的要求に対して柔軟に対応できる点や事前情報を積極的に活用できることから、ヒストリカルコントロールデータを取り込んだデータ解析にとっても馴染みやすく、適用事例もますます増えてきている。本研究では、データベース情報を用いた解析手法を検討するための準備として、過去に実施された臨床試験の結果を事前情報として用いるベイズ流統計手法が積極的に用いられているがん第 I 相および第 II 相臨床試験について検討する。

B. 研究方法

主要な臨床統計のジャーナルである、Biometrics、Statistics in Medicine、Biostatistics、Clinical Trials などに出版された論文あるいは著書を対象として、