

## 灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法の安全性、 有用性を目指した研究

分担研究者 小川 啓恭（兵庫医科大学 内科学講座血液内科 教授）

### 研究要旨

灌流法による骨髄細胞の採取とそれを用いた骨髄内骨髄移植は、サルなどの動物実験のデータから、通常の骨髄移植と比べて、移植片の骨髄への生着率の飛躍的な向上、移植片対宿主病発症率の低下など、様々な利点が考えられた。本研究では、この治療法のヒトへの応用に際して、その安全性、有用性の検討を行った。灌流法による骨髄細胞の採取を、2例で実施したが、通常の吸引法による骨髄採取と比べて、赤血球の混入が多い、採取した細胞成分に差がないという結果であった。したがって、灌流法による骨髄細胞の採取法の技術面の改善が必要という結論である。一方、採取した骨髄細胞を骨髄内移植するためには、赤血球を除去し、20-24ml に濃縮して移植を行う必要があり、この骨髄内移植の後半部分の研究を同時に進める必要性がある。

### A. 研究目的

関西医科大学、池原らによって考案された「灌流法による骨髄細胞の採取とそれを骨髄内に移植するという新しい骨髄移植法」は、膨大な量の動物実験データより、その有効性が示唆されている。たとえば、灌流法による骨髄細胞の採取は、1) 末梢血の混入が少なく、その結果、移植片対宿主病 (graft-versus-host disease=GVHD) を惹起する T 細胞の混入が少ない、2) 通常の吸引法に比べて、赤血球の混入が少なく、遠心法のみで骨髄細胞浮遊液の容積を大幅に減らすことができること、また、骨髄内への移植は、静脈内への移植に比べて、3) 造血幹細胞が高率に骨髄へ生着することが期待されること、4) 骨髄は、免疫が抑制された環境にあるため、GVHD が少なく、MHC 不適合移植片でも許容される可能性があることなどの有用性が示されている。しかし、ヒトでの安全性および有用性は不明である。したがって、本研究は、この新規移植法のヒトにおける安全性と有効性を検討することを目的にした。

同時に、骨髄内に移植片を直接投与することの安全性を検討する目的で、骨髄内臍帯血移植を行った。

### B. 研究方法

「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法」の臨床研究に関して、対象患者は、慢性骨髄性白血病（第 2 慢性期以降）、急性骨髄性白血病（初回寛解期を除く）、急性リンパ性白血病（初回寛解期を除く）、骨髄異形成症候群 (IPSS で intermediate-II または high)、悪性リンパ腫（治療抵抗性も低悪性度リンパ腫、化学療法抵抗性の中等度リンパ腫、初回寛解期を除いた高悪性度リンパ腫）とした。ただし、白血病においては、芽球 30% 以下の症例を対象とした。患者年齢は、12 歳以上 65 歳以下とした。患者の performance status は、ECOG の基準で 0-1 とした。ドナーは、血縁ドナーとし、HLA 適合または、GVH 方向 3 抗原不適合までのドナーとした。関西医科大学で、灌流法による骨髄採取を行い、それを兵庫医科大学に運び、患者に移植を行うこととした。

臨床第 I 相試験では、安全性の検討を行うこととした。ドナーに関する主要評価項目は、「灌流法による骨髄採取に伴う安全性」、レシピエントに対しては、「骨髄内投与法(骨髄内骨髄移植)の安全性」とした。

一方、骨髄内骨髄移植の安全性/有用性を検討する目的で、「骨髄内臍帯血ミニ移植」の臨床研究を別途行った。対象患者は、骨髄線維症を除外することを除いて、上記と同様の対象患者である。方法は、通常通りの fludarabine+cyclophosphamide+TBI の前処置を行った患者に対して、臍帯血ユニットを解凍し、4 分割して、腸骨に輸注した。

### (倫理面への配慮)

「灌流法により採取された骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植療法」のプロトコールは、関西医科大学と兵庫医科大学の倫理委員会で承認された。患者とドナーから、書面による informed consent を得た後、試験は実施された。移植の前処置が開始されるまでであれば、いつでも患者の自由意思で撤回することが可能であった。また、試験結果が公表される際は、患者個人が特定できないように、匿名化がなされるなど、ヘルシンキ宣言に基づいて、試験は実施された。

### C. 研究結果

灌流法による骨髄採取を 2 例施行した。骨髄細胞の採取に際しては、左右の腸骨で、採取される細胞成分に関して、灌流法による骨髄採取と通常吸引法による骨髄採取を比較検討した。その結果、CD34 陽性細胞率、T 細胞の混入率において、両者の間で差を認めなかった。さらに、灌流法による骨髄採取においては、赤血球の混入率が高く、プロトコールに記載されているように、遠心分離法による血球成分の濃縮だけでは、骨髄内骨髄移植に用いることができなかった。このため、同時並行で、前処置を行っていた患者に対しては、吸引法で採取した

骨髄を、通常の方法に準じて、静脈内へ輸注することにより、移植を行った。

2 例の灌流法による骨髄採取の経験から、採取される細胞成分において、灌流法と吸引法とで、差を認めなかったことから、灌流法による骨髄採取の手技において、改良を加える必要があることが判明した。また、赤血球の混入が多いことから、灌流法で採取した後、赤血球を除去する行程が必要なことが判明した。骨髄内に移植した骨髄移植を、骨髄腔内に留め置くためには、骨髄内臍帯血移植の経験から、両側腸骨の 4 か所に、注入するとして、1 か所当たり、5-6 ml の volume に抑える必要がある。したがって、容量として、20-24 ml 以内に採取した骨髄細胞を濃縮する必要がある。

骨髄内臍帯血ミニ移植に関しては、予定していた第 I 相試験の 10 例を終了した。肺塞栓を含めて、1 例も有害事象を認めなかった。この結果については、論文報告を行った(Biology of Blood and Marrow Transplantation, 18; 633-639, 2012)。現在、第 II 相試験として、生着率の改善が得られるかという有用性の検討に入っている。

結論として、上記の問題点を解決するため、1) 灌流法による骨髄採取の手技を改善すること、2) 幹細胞を失うことなく、赤血球を除去する方法の開発を合わせて進める必要がある。灌流法による骨髄採取法が完成した後に、スムーズに骨髄内骨髄移植ができるように、通常吸引法で採取した骨髄細胞を濃縮し、それを骨髄内へ移植する部分の開発を同時に行う必要がある。さらに、灌流法で採取した骨髄細胞を用いた骨髄内骨髄移植法の有用性を証明するためには、吸引法で採取した骨髄細胞と比較する必要がある。そのためにも、この研究は重要と考える。

### D. 健康危険情報

灌流法による骨髄採取において、合併症は認められなかった。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1). Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Ikegame K, Kato R, Tamaki H, Inoue T, Soma T, Kai S, Kato S, Ogawa H. Intrabone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment: a phase I study. *Biology of blood and Marrow Transplantation*, 18; 633-639, 2012.
- 2). Ikegame K, Kaida K, Yoshihara S, Fujiwara M, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, Kamikonya N, Saji H, Hirota S, Ogawa H. Feasibility of unmanipulated haploidentical stem cell transplantation using standard GVHD prophylaxis for HLA-homozygous patients. *International Journal of Hematology*, 96; 101-108, 2012.
- 3). Yoshihara S, Ikegame K, Kaida K, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, Ogawa H. Incidence of extramedullary relapse after haploidentical SCT for advanced AML/myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplantation*, 47; 669-676, 2012.
- 4). Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Okada M, Soma T, Hayashi K, Fujii N, Onuma T, Kusunoki Y, Saji H, Ogawa H. Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT. *Bone Marrow Transplantation*, 47; 508-515, 2012.
- 5). Yoshihara S, Ikegame K, Taniguchi K, Kaida K, Kim EH, Nakata J, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Tamaki H, Okada M, Soma T, Ogawa H. Salvage haploidentical transplantation for graft failure using reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplantation*, 47; 369-373, 2012.
- 6). Taniguchi K, Yoshihara S, Tamaki H, Fujimoto T, Ikegame K, Kaida K, Nakata J, Inoue T, Kato R, Fujioka T, Okada M, Soma T, Ogawa H. Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. *Ann Hematol*, 91; 1305-1312, 2012.
- 7). Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi Y, Kaida K, Inoue T, Okada M, Taniguchi K, Hasei H, Tamaki H, Fujioka T, Kato R, Soma T, 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.
- 8). Okada M, Satake A, Kaida K, Taniguchi K, Yoshihara S, Ikegame K, Tamaki H, Soma T, Fujimori Y, Ogawa H. Successful treatment with nilotinib after imatinib failure in a CML patient with a four-way Ph chromosome translocation and point mutations in BCR/ABL gene. *International Journal of Hematology*, 93; 243-246, 2011.
- 9). Taniguchi K, Okada M, Yoshihara S, Sawada A, Tokugawa T, Ishii S, Kaida K, Ikegame K, Minagawa K, Matsui T, Ogawa H. Strategy for bone marrow transplantation in eculizumab-treated paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *International Journal of Hematology*, 94; 403-407, 2011.
- 10). Satake A, Inoue T, Kubo S, Taniguchi Y, Imado T, Fujioka T, Horiuchi M, Xu Y, Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Tamaki H, Okada M, Okamura H, Ogawa H. Separation of antileukemic effects from graft-versus-host disease in MHC-haploidentical murine bone marrow transplantation: participation

of host immune cells. International Journal of Hematology, 91: 485-497, 2010.

- 11). Nishiwaki S, Inamoto Y, Sakamaki H, Kurokawa M, Iida H, Ogawa H, Fukuda T, Ozawa Y, Kobayashi N, Kasai M, Mori T, Iwato K, Yoshida T, Onizuka M, Kawa K, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Miyamura K. Allogeneic stem cell transplantation for adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia: comparable survival rates but different risk factors between related and unrelated transplantation in first complete remission. Blood, 116; 4368-4375, 2010.
- 12). Asakura M, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi S, Mori T, Etoh T, Takami A, Yoshida T, Fukuda T, Hatanaka K, Kanamori H, Yujiri T, Atsuta Y, Sakamaki H, Suzuki R, Ogawa H. Use of foscarnet for cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a related donor. International Journal of Hematology, 92; 351-359, 2010.

## 2. 学会発表

- 1). The 54th annual meeting of the American Society of Hematology, 2012, 12.8-11, Atlanta, USA. Okada M, Fujimori Y, Oku N, Tamekane A, Takafuta T, Nakajima T, Tokugawa T, Sawada A, Ishii S, Kaida K, Ikegame K, Soma T, Ogawa H. FDG-PET/CT early after 90Y-ibritumomab tiuxetan therapy predicts outcome in relapsed or refractory indolent B-cell lymphoma.
- 2). The 54th annual meeting of the American Society of Hematology, 2012, 12.8-11, Atlanta, USA. Ishii S, Ikegame K, Kaida K, Yoshihara S, Okada M, Kato R, Inoue T, Tamaki H, Fujimori Y, Soma T, Ogawa H. A novel regimen of unmanipulated HLA-haploidentical transplantation using a small dose of anti-T-lymphocyte globulin for patients in high tumor burden.
- 3). 2013 Tandem BMT Meetings, 2013, 2.13-17, Salt Lake City, USA. Ikegame K, Taniguchi Y, Yoshihara S, Kaida K, Taniguchi K, Ishii S, Inoue T, Kato R, Okada M, Tamaki H, Fujioka T, Soma T, Ogawa H. From murine model to clinical trial of graft-versus-GVHD, a second transplantation from another donor for the rescue from refractory acute GVHD.
- 4). Shinichi Ishii, Kazuhiro Ikegame, Katsuji Kaida, Ruri Kato, Takayuki Inoue, Satoshi Yoshihara, Masaya Okada, Toshihiro Soma, Hiroyasu Ogawa : HLA-haploidentical myeloablative stem cell transplantation using anti-T-lymphocyte globulin、第 74 回日本血液学会学術集会、京都、2012 年 10 月 20 日
- 5). Masaya Okada, Naohiko Oku, Akira Tamegane, Toshiro Takafuta, Toshiyuki Nakajima, Tazuko Tokugawa, Akihiro Sawada, Shinichi Ishii, Katsuji Kaida, Kazuhiro Ikegame, Toshihiro Soma, Yoshihiro Fujimori, Hiroyasu Ogawa : FDG-PET/CT early after Zevalin therapy predicts outcome in relapsed indolent B-cell lymphoma, 第 74 回日本血液学会学術集会、京都、2012 年 10 月 21 日
- 6). 池亀和博, 海田勝仁, 石井慎一, 吉原哲, 谷口享子, 加藤るり, 井上貴之, 岡田昌也, 相馬俊裕, 小川啓恭 . 血縁 HLA 半合致ミニ移植 (haplo-mini) の他施設前向き臨床試験 (第 / 相試験) . 第 35 回日本造血細胞移植学会総会 2013.3 金沢
- 7). 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. Haplo-identical HCT from family members.
- 8). 第 73 回日本血液学会学術集会(名古屋) 2011.10.15 : Ogawa H, (JSA-EHA Joint Symposium – Stem Cell Source) Unmanipulated HLA-haploidentical stem cell transplantation
  - 9). 第 73 回日本血液学会学術集会(名古屋) 2011.10.14 井上貴之、池亀和博、吉原 哲、海田勝仁、谷口享子、玉置広哉、藤岡龍哉、岡田昌也、加藤るり、山本庸子、相馬俊裕、小川啓恭 : Host regulatory T cells contribute to the regulation of GVHD in murine MHC haploidentical BMT models
  - 10). 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 myeloablative or reduced-intensity preconditioning regimen.
  - 11). 第 34 回日本造血細胞移植学会(大阪)2012.2.24: Presidential Symposium, Cord blood stem cell transplantation: from the bench to the bed, Intra-bone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment.
  - 12). 2011 BMT Tandem Meetings. Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Taniguchi K, Kato R, Nakata J, Okada M, Tamaki H, Taniguchi Y, Fujioka T, Satake A, Inoue T, Soma T, Ogawa H. Unmanipulated haploidentical stem cell transplantation using myeloablative or reduced-intensity preconditioning regimen.
  - 13). The 52th annual meeting of the American Society of Hematology, 2010, Orlando. Inoue T, Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Taniguchi K, Tamaki H, Fujioka T, Okada M, Kato R, Yamamoto Y, Soma T, Ogawa H. Mechanism of marked reduction in the severity of graft-versus-host disease by reduced-intensity conditioning in murine MHC-haploidentical BMT model.
  - 14). The 15th Congress of Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation, 2010, 10. 29-31, Phuket, Thailand. R. Kato, H. Tamaki, K. Ikegame, S. Yoshihara, K. Kaida, T. Inoue, J. Nakata, K. Taniguchi, T. Fujioka, M. Okada, H. Ogawa. One-HLA-antigen-mismatched related hematopoietic stem- cell transplantation using graft-versus-host disease prophylaxis with methylprednisolone.
  - 15). Yoshihara S, Maruya E, Kaida K, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Fujioka T, Ikegame K, Tamaki H, Okada M, Soma T, Kusunoki K, Hayashi Y, Saji H, Ogawa H : High risk of graft rejection in cases with HLA antibodies undergoing haploidentical SCT without TCD、第 72 回日本血液学会学術集会、横浜、2010 年 9 月 25 日(plenary)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。