

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
平成 25 年度分担研究報告書

HLA 不適合造血幹細胞移植後の免疫再構築に関する研究

研究分担者 一戸辰夫 広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野 教授
研究協力者 鈴木隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
大島久美 広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野 講師

研究要旨：近年、抗体医薬品による in vivo T 細胞除去術や移植後大量シクロホスファミドなどの新規技術の開発により、HLA 不適合血縁者間造血幹細胞移植の安全性は飛躍的に向上している。しかし、HLA 不適合血縁者間移植後の免疫系の再構築が、従来の移植法と比較してどのような特徴を有しているのかについては、まだ十分な知見が得られていない。本研究では、HLA 不適合造血幹細胞移植後に発生するさまざまな免疫学的合併症を高い精度で予測し、それらの合併症に対する医学的介入を適切なタイミングで実施することを可能とすることを旨として、次世代シーケンサーによる網羅的な免疫再構築解析技術の開発を試みた。

A. 研究の背景と目的

近年、抗体医薬品による in vivo T 細胞除去術や移植後大量シクロホスファミドなどの新規技術の開発により、HLA 不適合血縁者間造血幹細胞移植の安全性は画期的な向上を遂げている。しかし、HLA 不適合血縁者間移植後の移植片対宿主病(GVHD)、移植片対白血病(GVL)効果や感染症の制御、不適合 HLA に対するトレランスなどにかかわる免疫系の再構築が、HLA 適合血縁者・非血縁者からの移植と比較してどのような特徴を有しているのかについては、まだ十分な知見が得られていない。HLA 不適合造血幹細胞移植後に発生するさまざまな免疫学的合併症を高い精度で予測する技術が開発され、それらの合併症に対する医学的介入を適切なタイミングで実施することが可能となれば、移植成績のさらなる向上に

寄与することが予測される。

そこで、本研究では、造血幹細胞移植後の免疫再構築過程の俯瞰的かつ再現性の高い解析を可能とするために、末梢血中に含まれる T 細胞・B 細胞のレパートリーを高速 DNA シーケンサーを用いて網羅的かつ定量的に決定する技術の開発を試みた。

B. 研究方法

T 細胞受容体(TCR)、B 細胞受容体(BCR)の相補性決定領域(CDR3 領域) 遺伝子配列を、アダプターライゲーション PCR を用いて非バイアス増幅を行った後に、再度 PCR 増幅による DNA 断片の精製を行い、高速シーケンサーを用いて網羅的かつ定量的に同定する技術を開発した。

C. 研究結果

現在、上記の方法を用いて被験検体中に含まれる TCR, BCR の CDR3 領域配列を決定するための予備的な実験を実施中であり、移植後の免疫再構築の解析に応用するための研究プロトコルを「疫学研究に関する倫理指針」(平成 20 年 12 月 1 日一部改正版)に準拠して作成中である。

D. 考察 E. 結論

現在、造血幹細胞移植後の免疫再構築のモニタリング方法としては、細胞生物学的あるいは分子生物学的な手法による特定のリンパ球集団の経時的追跡や T 細胞受容体のレパトワ解析などが用いられている。しかし、これらの方法は煩雑で時間を要するため、臨床現場におけるリアルタイムの意思決定には有用ではない上に、すべての細胞集団を捕捉するための網羅性や再現性などの点に課題が残されている。次世代シーケンサーを用いた TCR レパトワの同定は、網羅性・定量性・再現性のいずれにおいても従来の方法よりすぐれていることが期待され、移植後の免疫再構築の解析にきわめて有用なツールとなり得ると考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき内容はない。

G. 研究発表

論文発表

Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Maeda Y, Ichinohe T, Ohashi K, Fukuda T, Koichi Miyamura K, Iida H, Mori T, Iwato K, Eto T, Kawa K, Morita S, Morishima Y. Impact of a single HLA allele mismatch on the outcome of unrelated bone marrow transplantation over two time

periods. A retrospective analysis of 3003 patients from the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol.* 161:566-577, 2013.

Hirokawa M, Fukuda T, Ohashi K, Hidaka M, Ichinohe T, Iwato K, Kanamori H, Murata M, Sakura T, Imamura M, Adachi S, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H; PRCA Collaborative Study Group. Efficacy and long-term outcome of treatment of pure red cell aplasia after allogeneic stem cell transplantation from major ABO-incompatible donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 19:1026-32, 2013.

Miura Y, Yoshioka S, Yao H, Takaori-Kondo A, Maekawa T, Ichinohe T. Chimerism of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation: is it clinically relevant? *Chimerism.* 4:78-83, 2013.

Yoshioka S, Miura Y, Yao H, Satake S, Hayashi Y, Tamura A, Hishita T, Ichinohe T, Hirai H, Takaori-Kondo A, Maekawa T. C/EBP β expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells regulates early B-cell lymphopoiesis. *Stem Cells.* 32:730-740, 2014.

Yoshihara M, Itamura H, Fukushima N, Itoh M, Furukawa K, Nagatomo D, Kamachi K, Kitamura H, Shindo T, Kubota Y, Sueoka E, Morita S, Ichinohe T, Kimura S. Therapeutic

management in cardiac lymphoma. *Leuk Lymphoma*. (in press)

Yao H, Miura Yoshioka S, Miura M, Hayashi Y, Tamura A, Iwasa M, Sato A, Hishita T, Higashi Y, Kaneko H, Ashihara E, Ichinohe T, Hirai H, Maekawa T. Parathyroid hormone enhances hematopoietic expansion via upregulation of cadherin-11 in bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. (in press)

学会発表

Ichinohe T. The expanding role of long-term fetal/maternal microchimerism in allogeneic hematopoietic cellular therapy. Symposium on chimerism, Graz, Austria, May 30, 2013.

H. 知的財産権の出願状況

準備中。

造血幹細胞移植における間葉系幹細胞による新規治療法の安全性と有効性に関する臨床研究

研究分担者 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

研究要旨： 牛胎児血清の代わりにヒト由来の血小板融解産物を用いることで、より安全な骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の培養系を確立した。この MSC の強い免疫抑制作用、造血促進作用を利用し、移植後に見られるステロイド抵抗性 GVHD の治療を目的とした MSC 療法の臨床第 1 相試験を行った。3 例めまで登録と投与が終了し、投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、3 例ともに明らかな効果 (下痢量の低下、ビリルビンの低下) を認めた。

A. 研究目的

同種幹細胞移植後の合併症として、ステロイド抵抗性 GVHD、生着不全や拒絶は解決されていない問題であり、致命的な転帰をたどる場合が多い。近年、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) が強力な免疫抑制作用を有することが判明し、欧米では、ステロイド抵抗性 GVHD 患者に投与し、良好な成績が報告されている。しかし、従来の報告では MSC の培養系に牛胎児血清が用いられていることからプリオン病など Biohazard の問題が指摘されている。

当科では、牛胎児血清の代わりにヒト由来の血小板融解産物を用いることで、より安全な MSC の培養系を確立した。この MSC の強い免疫抑制作用、造血促進作用を利用し、移植後に見られるステロイド抵抗性 GVHD、生着不全、拒絶、ドナー型汎血球減少といった血液幹細胞移植後の致命的合併症を改善する目的とした MSC 療法の臨床第 1 相試験を行う。

B. 研究方法

移植ドナーの血液から血液成分分離装置を用いて濃厚血小板 (PC) 10 単位 (約 2000ml) を採取する。採取後、直ちに -80°C で凍結する。翌日、

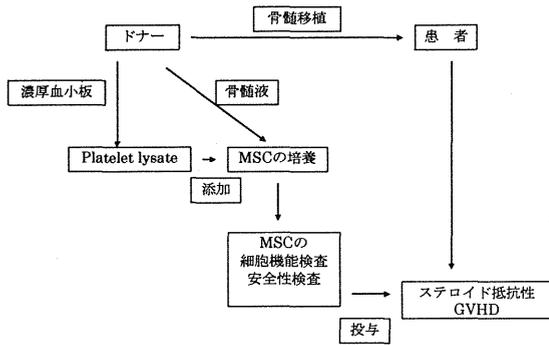
凍結した濃厚血小板を解凍して培養に用いる血小板融解産物 (Platelet lysate) を調製する。移植ドナーから MSC 培養用の骨髄液 30ml を採取し、単核球を分離する。骨髄単核球を Platelet lysate を添加した培養液を用いて約 3 週間培養することによって MSC を調製する。

細胞の調製はクリーンルームを有する細胞調製室 (Cell Processing Center; CPC) 内で ISO13485 による品質管理下で、調整工程は適正製造基準 (Good Manufacturing Practice; GMP) に準拠して調製を行う。調製された細胞製剤は細胞機能検査 (細胞数、表面抗原解析等)、細菌検査、ウイルス検査、エンドトキシン検査等の所定の検査に合格したことを確認する。治療は 1 回の治療当たり患者体重 1kg 当たり $1\sim 2\times 10^6$ 個の MSC を静脈内に投与する。調製された残りの MSC は凍結保存され、効果と副作用をみながら 1 週間毎に追加投与するかどうか決定する。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部バイオ先端臨床研究審査委員会の承認後、ドナーから文書による同意を得ておこなう。

臨床試験の概要:

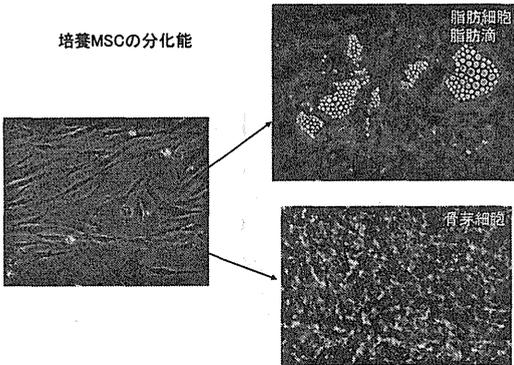


C. 研究結果

牛胎児血清を用いず血小板融解産物による培養方法で得られたヒト骨髄由来MSCは脂肪、骨芽細胞へ分化能を有し、PHAによって刺激された活性化T細胞の増殖抑制能を示した。(下図)

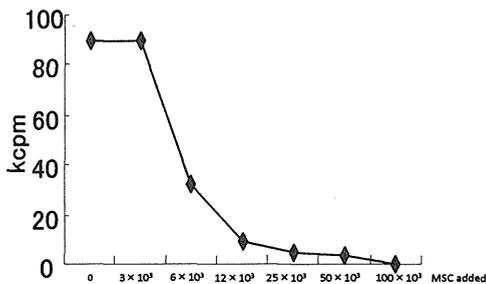
非臨床データ

培養MSCの分化能



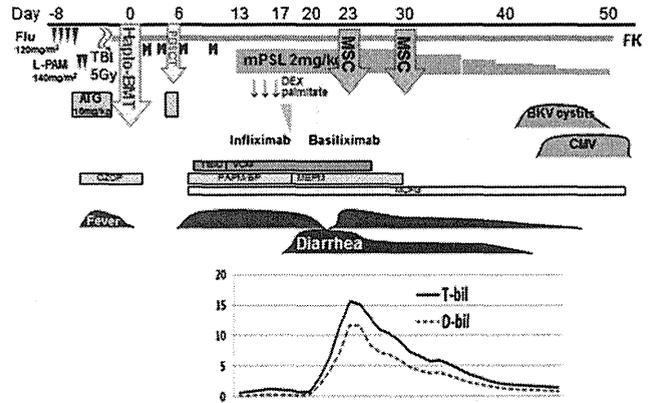
培養MSCの効力に関する非臨床データ

MSCによるPHA刺激T細胞増殖抑制試験



造血細胞移植のドナー骨髄液MSC培養を行い、ステロイド抵抗性GVHD患者3名に対しMSCの投与が終了した。投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、3例ともに明らかな臨床上的効果(下痢量の低下、ビリルビンの低下)を認めた。MSC投与後明らかな黄疸の減少を認めたGVHD 4度の症例経過を示す(下図)。

症例2: 5歳男児(RAEB, HLAハプロ一致移植)



D. 考察

骨髄移植ドナーから3-4週間の培養期間でMSCを臨床応用可能なレベルまで培養増幅することができた。

当院倫理委員会での承認後、臨床第1相試験が開始され、ステロイド抵抗性GVHDを発症した患者3名に安全に投与でき、明らかな効果を認めた。HLAハプロ一致移植などGVHDリスクの高い移植患者ではあらかじめドナーより培養し凍結しておくことが望ましいと考えられた。

E. 結論

臨床第1相試験が開始された。まだ投与例が少なく、今後さらに症例数を増やす必要があるものの、安全に投与可能であり、明らかな効果の見られた症例も認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y,

- Kimura H and Kojima S. Long-Term Parvovirus B19 Infections With Genetic Drift After Cord Blood Transplantation Complicated by Persistent CD4+ Lymphocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014 Jan;36(1):e65-8.
- 2) Kato M, Takahashi Y, Tomizawa D, Okamoto Y, Inagaki J, Koh K, Ogawa A, Okada K, Cho Y, Takita J, Goto H, Sakamaki H, Yabe H, Kawa K, Suzuki R, Kudo K, Kato K. Comparison of intravenous with oral busulfan in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with myeloablative conditioning regimens for pediatric acute leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2013.Dec;19(12).1690-4.
 - 3) Lundqvist A, Smith AL, Takahashi Y, Wong S, Bahceci E, Cook L, Ramos C, Tawab A, McCoy JP Jr, Read EJ, Khuu HM, Bolan CD, Joo J, Geller N, Leitman SF, Calandra G, Dunbar C, Kurlander R, Childs RW. Differences in the Phenotype, Cytokine Gene Expression Profiles, and In Vivo Alloreactivity of T Cells Mobilized with Plerixafor Compared with G-CSF. *J Immunol.* 2013 Dec 15 ;191(12):6241-9.
 - 4) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S and Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013 Aug;45(8):937-941.
 - 5) Narita A, Muramatsu H, Sakaguchi H, Doisaki S, Tanaka M, Hama A, Shimada A, Takahashi Y, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Kudo K, Furukawa-Hibi Y, Yamada K and Kojima S. Correlation of CYP2C19 phenotype with voriconazole plasma concentration in children. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2013 Jul;35(5):e219-223.
 - 6) Hirabayashi Y, Takahashi Y, Xu Y, Akane K, Villalobos IB, Okuno Y, Hasegawa S, Muramatsu H, Hama A, Kato T and Kojima S. Lack of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells is associated with resistance to intravenous immunoglobulin therapy in patients with Kawasaki disease. *Eur J Pediatr.* 2013 Jun;172(6):833-837.
 - 7) Daikoku T, Saito K, Aihara T, Ikeda M, Takahashi Y, Hosoi H, Nishida T, Takemoto M, Shiraki K. Rapid detection of human cytomegalovirus UL97 and UL54 mutations for antiviral resistance in clinical specimens. *Microbiol Immunol.* 2013 May;57(5):396-9.
 - 8) Shinzato A, Tabuchi K, Atsuta Y, Inoue M, Inagaki J, Yabe H, Koh K, Kato K, Ohta H, Kigasawa H, Kitoh T, Ogawa A, Takahashi Y, Sasahara Y, Kato S, and Adachi S. PBSCT is associated with poorer survival and increased chronic GvHD than BMT in Japanese paediatric patients with acute leukaemia and an HLA-matched sibling donor. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 Sep;60(9):1513-9.
 - 9) Kato K, Otake H, Tagaya M, Takahashi Y, Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S and Nakashima T. Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child. *Am J Otolaryngol.* 2013 Jan-Feb;34(1):89-92.
 - 10) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S and Japan Childhood

Aplastic Anemia Study G. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. Blood. 2013 Jan 31;121(5):862-863.

2. 学会発表

- 1) Takahashi Y, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Nakanishi K, Hama A, Kojima S. HLA haploidentical stem cell transplantation for children with aplastic anaemia in urgent need of stem cell transplantation. 39th Annual Meeting of the EBMT. Apr. 9, 2013. London, UK.
- 2) Takahashi Y, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Muramatsu H, Hama A, Kojima S. Unmanipulated HLA Haploidentical Bone Marrow Transplantation Combined With PBSC With The Options Of Donor Virus Specific CTLs and Mesenchymal Stem Cells Infusion. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. Dec.7, 2013. New Orleans, USA.
- 3) 高橋 義行、川島 希、成田 敦、坂口 大俊、土居崎 小夜子、村松 秀城、中西 康詞、濱 麻人、小島 勢二. HLA haploidentical SCT with the options of donor's virus specific CTLs and mesenchymal stem cells. 第75回日本血液学会学術集会. 2013年10月13日. 札幌.
- 4) 高橋 義行. 小児重症再生不良性貧血に対する代替ドナーからの造血幹細胞移植:HLA不一致非血縁ドナー vs HLAハプロ一致血縁ドナー. 第36回日本造血細胞移植学会総会. 2014年3月8日. 沖縄.

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）
研究分担報告書

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

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 は急性 GVHD と移植後期に発症する慢性 GVHD に大別される。急性 GVHD の基本的な発症メカニズムは次第に明らかとなってきたが、慢性 GVHD は病態の解明が遅れている。我々は、マウスモデルを用い、慢性 GVHD の発症に Th2 細胞だけでなく Th1 細胞と Th17 細胞も関与していることを明らかにしてきた。特に IL-17 と IFN- γ を同時に産生する Th17/Th1 細胞が特異的に出現しており、Th17 細胞の亜型である alternative Th17 が慢性 GVHD に関与する可能性が示唆された。alternative Th17 および Th1 細胞の両方を抑制する目的で、IL-12/IL-23 p40 抗体の有効性を検討した。その結果、p40 抗体を投与した群では、臨床的かつ病理組織学的に慢性 GVHD が有意に軽減された。IL-17 産生細胞の T-bet 発現を検討した結果、Th17 が alternative からより免疫抑制的な classical Th17 にシフトしており、p40 抗体の慢性 GVHD 抑制のメカニズムであると考えられた。ヒトに対する p40 抗体は、Ustekinumab としてクローン病や乾癬に対する臨床試験の結果が報告されており、慢性 GVHD にも臨床応用できる可能性が示唆された。

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。我々は、慢性 GVHD の発症に Th2 細胞だけでなく Th1 細胞と Th17 細胞も関与していることを明らかにしてきた。特に IL-17 と IFN- γ を同時に産生する Th17/Th1 細胞（alternative Th17）が特異的に出現しており、Th17 細胞の亜型

である alternative Th17 が慢性 GVHD に関与する可能性が示唆された。alternative Th17 および Th1 細胞の両方を抑制する目的で、IL-12/IL-23 p40 抗体の有効性を検討した。

B. 研究方法

ドナーに B10.D2、ホストに BALB/c を使ったマウス慢性 GVHD モデルを作成した。骨髓幹細胞（T 細胞除去した BM 8×10^6 ）と脾臓から採取した T 細胞（ 2×10^6 ）を 5.8Gy 照射したマウスに移植。p40 抗体は 500 μ g を day0 から投与し、慢性 GVHD 発症が抑制されるかを検討した。慢性 GVHD は皮膚所見の臨床的

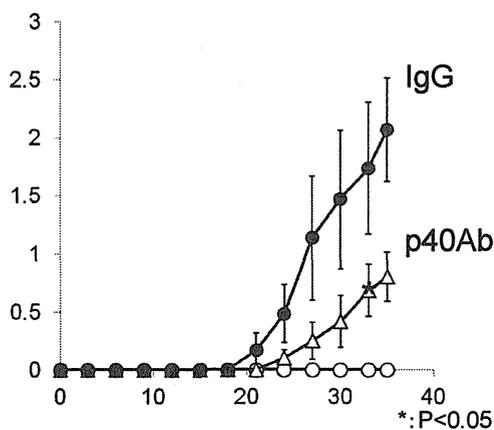
GVHD スコア、病理スコアにて評価し、Th 細胞への影響は、細胞内サイトカインを FAC にて解析した。

本実験計画は岡山大学実験動物実験委員会に承認済みである。すべての実験動物は動物愛護の観点から、計画的にできるだけ少ない個体数での実験とした。

C. 研究結果

p40 抗体を投与した群は、慢性 GVHD 発症が臨床的スコア、皮膚、唾液腺の病理スコアが有意に改善した。

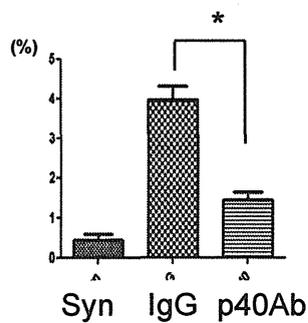
Clinical Score



また、移植後 28 日目のドナー T 細胞を FACS にて解析した結果、Th1 細胞の抑制とともに INF- γ /IL-17 同時に産生細胞 (alternative Th17) が有意に減少していた。一方、IL-17 単独陽性の細胞は減少しておらず、ROR γ t も抑制されていないが、T-bet の発現が低下しており、alternative Th17 細胞が抑制されている所見を支持する結果であった。以上から p40 抗体により IL-12 および IL-23 を介した経路

を遮断することにより慢性 GVHD が抑制されることが示唆された。また、移植後 15 日目の慢性 GVHD が発症する時期からの投与でも軽減させることがわかり治療としての有効性が示唆された。

IFN- γ ⁺/IL-17⁺



*:P<0.05

D. 考察

p40 抗体により INF- γ /IL-17 同時産生細胞 (alternative Th17) が有意に減少しており、IL-17 単独陽性の classical Th17 細胞は減少していないことから、全ての Th17 細胞ではなく、subset を抑制することで慢性 GVHD が制御できる可能性が示唆された。IL-12 および IL-23 を介した経路が今後、慢性 GVHD の治療標的となり得ることが明らかとなった。

E. 結論

p40 抗体により Th1 および alternative Th17 が抑制され、慢性 GVHD が改善した。今後、慢性 GVHD の治療薬としての効果が期待される。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiyama H, Maeda Y, Nishimori H, Yamasuji Y, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Shinagawa K, Tanaka T, Takeuchi K, Teshima T, and Tanimoto M. mTOR inhibitors permit regulatory T cell reconstitution and inhibit chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013 (in press)
- 2) Maeda Y, Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. *Int J Hematol*. 2013 ;98(3):293-9.
- 3) Nishimori H, Maeda Y, Tanimoto M. Chronic graft-versus-host disease: disease biology and novel therapeutic strategies. *Acta Med Okayama*. 2013;67(1): 1-8
- 4) 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(1):285-95, 2012
- 4) Teshima T, Maeda Y, Ozaki K.

Regulatory T cells and IL-17-producing cells in acute graft-versus-host disease. *Immunotherapy*. 2011;3(7):833-52

2. 学会発表

- 1) Fujiwara H, Maeda Y, Kobayashi K, Nishimori H, Nishinohara M, Okamoto S, Matsuoka K, Kondo E, Fujii N, Shinagawa K, Tanimoto M. PD-1 pathway of donors and recipients modulate chronic graft-versus-host disease through Th1 and Th17 in mouse model. 日本造血幹細胞移植学会 2014 3/7-9 沖縄
- 2) H Fujiwara, K Kobayashi, H Nishimori, M Nishinohara, S Okamoto, K Matsuoka, E Kondo, N Fujii, K Shinagawa, M Tanimoto and Y Maeda. Contribution of the PD-1-PD-L pathway to chronic graft-versus-host disease. (BMT Tandem Meetings) 2013 2/15-18 Salt Lake
- 3) H Fujiwara, Y Maeda, K Kobayashi, H Nishimori, K Matusoka, M Azuma, Y Hideo, L Chen, and M Tanimoto. Host tissue PD-1 pathway contribute to murine chronic graft-versus-host disease via Th1+Th17+ cells. ASH 2013 12/6-10 New Orleans
- 4) 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

H.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

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 京都大学大学院医学研究科 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。データの有効活用には統計的な手法が果たす役割が大きいだろう。最近その適用が増えている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

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。集積データあるいはヒストリカルデータを試験デザインのみならず実際の当該試験のデータ解析にも取り込む研究が盛んに行われている。その主なものがベイズ流統計手法を用いたものである。そこでの利用可能性について検討・評価を行う。

B. 研究方法

ベイズ流統計手法の特徴の一つは、事前情報のデータ解析への取り込みにある。その事前情報のまとめ方について、最近公表された試験デザインに関する論文をレビューし、有用だと思われるものをまとめる。対象としたジャーナルは臨床試験デザインを多く取り上げている臨床統計に関するものに限定した。

C. 研究結果

ベイズ流統計とは、まず、有効性や安全性に関して調べたい興味のあるパラメー

タ (θ) を考える。 θ は1つの値に決まったものとして考えず、ランダムな変数であると考え。過去の臨床的データをもとにした θ に関する知識あるいは不確からしさを統計的な確率分布を用いて‘事前分布’として表す。新たに実施する研究/試験で観察されたデータを事前情報に加えて θ の推定精度を高めていく。このプロセスのことを観察データで事前分布を‘更新する (update)’ と呼ぶ。データで更新された後の θ に関する情報を‘事後分布’として表す。

第II相試験では、試験治療法の有効性を評価し、最終的検証ステージである第III相試験への移行に値するかどうかを調べるのが主目的である。第II相試験におけるベイズ流デザインの適用事例として、米国 MD アンダーソンがんセンター (MDACC) の Estey ら [1] がある。AML 患者を対象とし、エンドポイントに CR 率を用いて、Liposomal daunorubicin (LD) + ara-C や LD + Topotecan ら4つの新治療を既存の標準療法と比較するランダム化第II相試験を実施した。MDACC でそれまでに蓄積さ

れた591例分の標準療法のヒストリカルデータ：CR率49%（291/591例）を比較対照として、試験治療群それぞれの効果を調べた。さらに、有効性と毒性を一つの評価指標にまとめて同時にモニタリングを行うといったデザインも提案されている[2-4]。ベイズ流統計手法でもちいる事前情報分布に関する最近の研究として、Neuenschwanderら[5]やHobbsら[6]がある。

D. 考察

事前情報を積極的に活用するベイズ流統計手法を適切に用いるためには、事前情報のもとになるデータの質の高さが鍵となる。臨床試験デザインを検討する上で、基礎研究および先に実施された臨床試験のデータを詳細に解析することは重要である。検証的な第Ⅲ相試験でのベイズ流アプローチの適用には今後のさらなる議論が必要である。

E. 結論

今後の臨床試験デザインを検討するに際し事前情報を活用し、効率的に臨床開発を推進することに貢献できるベイズ流アプローチの適用を考えることは重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hironaka S, Ueda S, Yasui H, Nishina H, Tsuda M, Tsumura T, Sugimoto T, Shimodaira H, Tokunaga S, Moriwaki T, Esaki T, Nagase M, Fujitani K, Yamaguchi K, Ura T, Hamamoto Y, Morita S, Okamoto I, Boku N, Hyodo I. A Randomized, Open-label, Phase III Study Comparing Irinotecan with Paclitaxel in Advanced Gastric Cancer Patients without Severe Peritoneal Metastasis

after Failure of Prior Combination Chemotherapy using Fluoropyrimidine plus Platinum: WJOG4007 Trial. *J Clin Oncol* (in press)

2. Yamada A, Ishikawa T, Ota I, Kimura M, Shimizu D, Tanabe M, Chishima T, Sasaki T, Ichikawa Y, Morita S, Yoshimura K, Takabe K, Endo I. High expressions of ATP-binding cassette transporter ABC11 in the breast tumors are associated with aggressive subtypes and worse disease-free survival. *Breast Cancer Research and Treatment* 137:773-782, 2013.
3. Shitara K, Morita S, Fujitani K, Kadowaki S, Takiguchi N, Hirabayashi N, Takahashi M, Takagi M, Tokunaga Y, Fukushima R, Munakata Y, Nishikawa K, Takagane A, Tanaka T, Sekishita Y, Kang Y, Sakamoto J, Tsuburaya A. Combination Chemotherapy with S-1 plus Cisplatin for Gastric Cancer that Recurs after Adjuvant Chemotherapy with S-1: Multi-institutional Retrospective Analysis. *Gastric Cancer* 15: 245-251, 2012

2. 学会発表

なし

H. 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

[参考文献リスト]

- 1) Estey EH, Thall PF (2003). New designs for phase 2 clinical trials. *Blood*, 102, 442-448.
- 2) Thall PF, Sung HG (1998). Some extensions and applications of a Bayesian strategy for monitoring multiple outcomes in clinical trials. *Stat Med*, 17, (1563-1580).
- 3) Thall PF, Cook JD. Dose-finding based on efficacy-toxicity trade-offs. *Biometrics* 2004;60: 684-693.
- 4) Bekele, B.N. and Shen, Y. (2005) A Bayesian approach to jointly modeling toxicity and biomarker expression in a phase I/II dose-finding trial. *Biometrics* 60 343-354.
- 5) Neuenschwander B, Branson M, Spiegelhalter DJ. A note on the power prior. *Statistics in Medicine* 2009; 28:3562–3566.
- 6) Hobbs BP, Carlin BP, Mandekar SJ, Sargent DJ. Hierarchical commensurate and power prior models for adaptive incorporation of historical information in clinical trials. *Biometrics* 2011; 67:1047–1056.

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
研究課題 「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」

研究分担者 熱田 由子 名古屋大学大学院医学系研究科

研究要旨

本研究班では、非介入の臨床研究として造血細胞移植登録一元化データベースを用いた後方視的解析が重要な役割を果たす。造血細胞移植登録一元化データベースとは、日本造血細胞移植学会、日本小児血液学会、骨髄移植推進財団（骨髄バンク）、日本さい帯血バンクネットワークが協力して造血細胞移植登録の一元化・電子化を2006年より行っている造血細胞移植登録一元管理プログラム（TRUMP）データベースを示す。このデータベースは、データ収集を目的としたデータ構造であり、解析を目的としたデータ構造への変換には多くの手間を要する。本研究班で実施される後方視的解析の効率と質を向上することを目的とし、解析データ構造の確定および変数の作成（HLAを含み他変数の入力不備の修正を含む）を実施した。本研究班では、前向き臨床試験が重要な位置づけを担っているが、ここにおけるデータ管理でのTRUMPデータの利用に関しても検討するとともに、効率的な臨床試験実施体制に関しても検討を実施し運用を開始した。

A. 研究目的

本研究班では、非介入の臨床研究として造血細胞移植登録一元化データベースを用いた後方視的解析が重要な役割を果たす。造血細胞移植登録一元化データベースとは、日本造血細胞移植学会、日本小児血液学会、骨髄移植推進財団（骨髄バンク）、日本さい帯血バンクネットワークが協力して造血細胞移植登録の一元化・電子化を2006年より行っている造血細胞移植登録一元管理プログラム（TRUMP）データベースを示す。2005年までに上記各組織が別々に紙調査票で収集した移植情報は2011年までにTRUMPに統合された。このデータベースは、データ収集を目的としたデータ構造であり、解析を目的としたデータ構造への変換には多くの手間を要する。本研究班で実施される後方視的解析の効率と質を向上することを目的とした。また、本研究班では、前向き臨床試験が重要な位置づけを担っているが、ここにおけるデータ管理でのTRUMPデータの利用に関しても検討した。

B. 研究方法

解析を目的としたデータ構造への変換のために解析に用いる基本項目を定めそのデータ構造を作成した。これに基づいた変数作成を実施した。血縁者間造血幹細胞移植のHLAデータは、入力不備データの確認および修正を昨年度に引き続き実施し、HLA座の入力不備の修正、非血縁者間移植においては各臍帯血バンクなどから提供されたHLA情報の反映、およびHLA一致度判定プログラムを作成した。

TRUMPは、日本造血細胞移植学会への年次報告に用いるプログラムであり、その場合は日本造血細胞移植学会データセンターでのみ解読が可能な暗号化を行ったデータセットが提出される。TRUMPの機能として、施設内での利用のために、汎用形式でのデータの出力が可能であり、1例での書き出しも出来る。臨床試験を実施における困難な点として、参加施設の報告書記入などの負担が挙げられるが、TRUMP dataを併用することにより負担を軽減する方法の検討し、その方法を用いた造血幹細胞移植臨床試験における効率的なデータ収集を開始した。

C. 研究結果

解析データセット構造および、HLA を含み他変数の入力不備の修正も行った上での変数作成スクリプトを、今年度データセット用に変更し、日本造血細胞移植学会ホームページで公開した。本スクリプトでは、血縁者間造血幹細胞移植の HLA データは、HLA 座の入力不備の修正、非血縁者間移植においては各臍帯血バンクなどから提供された HLA 情報の反映、および HLA 一致度判定まで一度に実施するスクリプトである。

また、本研究班で開始された臨床試験のデータ収集に TRUMP data でのデータ収集の併用を適応した。

D. 考察

造血細胞移植登録一元化データベースは、他の観察研究データベースと同様、継続的な新規症例の登録および既登録症例の生存・疾患状況・晩期合併症情報の更新が必要であり、常に変化し続けているデータベースである。さらに、調査項目も研究の重要あるいは定義の変化などに応じて変更し続けて行く必要がある。こういった living database における質の管理および質の高い研究が行えるための統計解析におけるサポートは一度行えば事足りるものではなく、継続的に集中して取り組まなければならない。同時に、施設負担を減らし合理的に研究を行えるよう、臨床試験において TRUMP の利用を増やせる工夫が今後必要である。

E. 結論

造血細胞移植登録一元化データベースを用いて本研究班で検討したい後方視的研究を実施するためのデータベース基盤整備を実施した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, Takahashi S, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T,

Morishima Y, Sakamaki H. and Kodera Y.: Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol.* ;25(2):435-41,2014

2. Kanda J, Nakasone H, Atsuta Y, Toubai T, Yokoyama H, Fukuda T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Eto T, Miyamura K, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Murata M. Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant.* 49(2):228-35,2014
3. Tanaka J, Morishima Y, Takahashi Y, Yabe T, Oba K, Takahashi S, Taniguchi S, Ogawa H, Onishi Y, Miyamura K, Kanamori H, Aotsuka N, Kato K, Kato S, Atsuta Y, Kanda Y. Effects of KIR ligand incompatibility on clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission. *Blood Cancer J.* (in press)
4. Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H, Taniguchi S, Miyamura K, Takahashi S, Eto T, Ogawa H, Kurokawa M, Tanaka J, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Morishima Y, Sakamaki H, Fukuda T. Recent decrease in non-relapse mortality due to GVHD and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-remission acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 48(9):1198-204, 2013
5. Nakasone H, Kanda J, Yano S, Atsuta Y, Ago H, Fukuda T, Kakihana K, Adachi T, Yujiri T, Taniguchi S, Taguchi J, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Mori T, Murata M; GVHD Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. A

- case-control study of bronchiolitis obliterans syndrome following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Int.* 26(6):631-9, 2013
6. Shinzato A, Tabuchi K, Atsuta Y, Inoue M, Inagaki J, Yabe H, Koh K, Kato K, Ohta H, Kigasawa H, Kitoh T, Ogawa A, Takahashi Y, Sasahara Y, Kato SI, Adachi S. PBSCT Is Associated With Poorer Survival and Increased Chronic GvHD Than BMT in Japanese Paediatric Patients With Acute Leukaemia and an HLA-Matched Sibling Donor. *Pediatr Blood Cancer.* 60(9):1513-9, 2013
 7. Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Maeda Y, Ichinohe T, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Iida H, Mori T, Iwato K, Eto T, Kawa K, Morita S, Morishima Y. Impact of a single human leucocyte antigen (HLA) allele mismatch on the outcome of unrelated bone marrow transplantation over two time periods. A retrospective analysis of 3003 patients from the HLA Working Group of the Japan Society for Blood and Marrow Transplantation. *Br J Haematol.* 161(4):566-77, 2013
2. 学会発表
 1. 熱田由子 造血幹細胞移植後の二次性固形腫瘍および晩期死亡, 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月13日,札幌
 2. Yoshiko Atsuta, Junya Kanda, Minoko Takanashi, Yasuo Morishima, Shuichi Taniguchi, Tokiko Nagamura-Inoue, Koji Kato, Yoshinobu Kanda. Effect of HLA disparity on outcomes after cord blood transplantation in patients with leukemia. 第74回日本血液学会学術集会 京都 2012.10
 3. Yoshiko Atsuta, Minoko Takanashi, Yasuo Morishima, Shuichi Taniguchi, Satoshi Takahashi, Tokiko Nagamura-Inoue, Koji Kato, and Yoshinobu Kanda, on behalf of the HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation; Different effect of HLA disparity on transplant outcomes after single unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. EBMT 2012; Oral session "Stem cell source and donor"; 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Wednesday, 4 April 2012; Geneva, Switzerland
 - G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

刊行に関する一覧 (in press 含む)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>Kanda Y</u> , Kanda J, <u>Atsuta Y</u> , Fuji S, <u>Maeda Y</u> , <u>Ichinohe T</u> , Takanashi M, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Mori T, Sao H, Kobayashi N, Iwato K, Sawada A, Mori S.	Changes in the clinical impact of high-risk HLA allele mismatch combinations on the outcome of unrelated bone marrow transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant	20	526-535	2014
Nakasone H, Terasako-Saito K, Yamazaki R, Sato M, Tanaka Y, Sakamoto K, Kurita M, Yamasaki R, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Machishima T, Ashizawa M, Kimura SI, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, Yamada S, and <u>Kanda Y</u> .	Impact of high-/middle-molecular-weight adiponectin on the synthesis and regulation of extracellular matrix in dermal fibroblasts.	Exp Hematol	42	261-273	2014
Nakasone H, Tanaka Y, Yamazaki R, Sato M, Terasako K, Sakamoto K, Yamasaki R, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Machishima T, Ashizawa M, Kimura SI, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, <u>Kanda Y</u> .	Single-cell analysis of T-cell receptor- β repertoire of HLA-A*2402-restricted cytomegalovirus pp65-specific cytotoxic T-cells in donor-patient pairs undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Bone Marrow Transplant	49	87-94	2014
Yamazaki R, Nakasone H, Tanaka Y, Sato M, Terasako K, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Machishima T, Kimura SI, Kikuchi M, Okuda S, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, <u>Kanda Y</u> .	Allotype analysis to distinguish the origin of varicella-zoster virus immunoglobulin G after allogeneic stem cell transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant	19	1013-1020	2013
Ikegame K, Kato R, Fujioka T, Okada M, Kaida K, Ishii S, Yoshihara S, Inoue T, Taniguchi K, Tamaki H, Soma T, <u>Ogawa H</u> .	Detection of donor-derived CMV-specific T cells in cerebrospinal fluid in a case of CMV meningoencephalitis after cord blood stem cell transplantation	Int J Hematol	97	287-290	2013
Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Nakata J, Ishii S, Soma T, Okada M, <u>Ogawa H</u> .	Frequency of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD.	Bone Marrow Transplant	48	859-864	2013
Kawakami M, Taniguchi K, Yoshihara S, Ishii S, Kaida K, Ikegame K, Okada M, Watanabe S, Nishina T, Hamada H, Nakagawa M, <u>Ogawa H</u> .	Irreversible neurological defects in the lower extremities after haploidentical stem cell transplantation: possible association with nelarabine.	Am J Hematol	88	853-857	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Fukuda K, Kurita N, Sakamoto T, Nishikii H, Okoshi Y, Sugano M, <u>Chiba S.</u>	Post-transplant gastric antral vascular ectasia after intravenous busulfan regimen.	Int J Hematol	98	135-138	2013
Sakamoto T, Obara N, Kurita N, Sakata-Yanagimoto M, Nishikii H, Yokoyama Y, Suzukawa K, Hasegawa Y, <u>Chiba S.</u>	Effectiveness and safety of rabbit anti-thymocyte globulin in Japanese patients with aplastic anemia.	Int J Hematol	98	319-322	2013
Nagafuji K, Miyamoto T, Eto T, Kamimura T, <u>Taniguchi S.</u> Okamura T, Ohtsuka E, Yoshida T, Higuchi M, Yoshimoto G, Fujisaki T, Abe Y, Takamatsu Y, Yokota S, Akashi K, Harada M.	Monitoring of minimal residual disease (MRD) is useful to predict prognosis of adult patients with Ph-negative ALL: results of a prospective study (ALL MRD2002 Study).	J Hematol Oncol		in press	
Kai S, Wake A, Okada M, Kurata M, <u>Atsuta Y.</u> Ishikawa J, Nakamae H, Aotsuka N, Kasai M, Misawa M, <u>Taniguchi S.</u> Kato S.	Double-unit Cord Blood Transplantation after Myeloablative Conditioning for Patients with Hematological Malignancies: a Multicenter Phase II Study in Japan.	Biol Blood Marrow Transplant	19	812-819	2013
<u>Tanaka J.</u> Morishima Y, <u>Takahashi Y.</u> Yabe T, Oba K, <u>Takahashi S.</u> <u>Taniguchi S.</u> <u>Ogawa H.</u> Onishi Y, Miyamura K, Kanamori H, Aotsuka N, Kato K, Kato S, <u>Atsuta Y.</u> <u>Kanda Y.</u>	Effects of KIR-ligand incompatibility on clinical outcomes of umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission.	Blood Cancer J		in press	2013
<u>Tanaka J.</u> Kanamori H, Nishiwaki S, Ohashi K, Taniguchi S, Eto T, Nakamae H, Minagawa K, Miyamura K, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishimoto N, Oba K, Masauzi N.	Reduced-intensity versus myeloablative conditioning allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients aged over 45 years with acute lymphoblastic leukemia (ALL) in remission: A study from the Adult ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT).	Bone Marrow Transplant	48	1389-1394	2013
Kanamori H, Mizuta S, Kako S, Kato H, Nishiwaki S, Imai K, Shigematsu A, Nakamae H, Tanaka M, Ikegame K, Yujiri T, Fukuda T, Minagawa K, Eto T, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Suzuki R, Sakamaki H, <u>Tanaka J.</u>	Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation for patients aged 50 years or older with B-cell ALL in remission: a retrospective study by the Adult ALL Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.	Bone Marrow Transplant	48	1513-1518	2013
Hiramoto N, Kurosawa S, Tajima K, Okinaka K, Tada K, Kobayashi Y, Shinohara A, Inoue Y, Ueda R, Tanaka T, Kim SW, <u>Yamashita T.</u> Heike Y and Fukuda T.	Positive impact of chronic graft-versus-host disease on the outcome of patients with de novo myelodysplastic syndrome after allogeneic hematopoietic cell transplantation: a single-center analysis of 115 patients.	Eur J Hematol	92	137-146	2014