

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

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 基準に則った多施設共同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期間を終了した。平成 24 年度には治療成績の解析を行い、安全な移植が実施可能であることを確認した。現在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遂行している。7 症例の移植が行われ、今のところ Grade II 以上の急性 GVHD の発症はない。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。造血幹細胞移植領域のエビデンス構築の促進のための統計ソフトウェアも完成し、ホームページで無料公開している。

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。

並行して研究代表者は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(HLA-WG)」責任者を務めており、この研究班を通して HLA-WG の研究を支援するとともに、データベースを効率的に利用するプログラムを作成することによって造血幹細胞移植領域のエビデンス構築の促進を図る。

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でさ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 非発症率の期待値が 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 非発症率の期待値が 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。

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、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。

また、データベースの効率的利用のために、無料の統計ソフトである R を基盤として Tcl/Tk 言を利用したプログラムを作成し、複雑なスクリプトの入力を必要とせずマウス操作だけで簡単に統計解析が可能になる統計ソフトウェアの開発を行う。

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。グレードII以上の急性GVHDは2例のみ、移植関連死亡は1例のみと、本治療法が安全な移植方法であることが確認された。

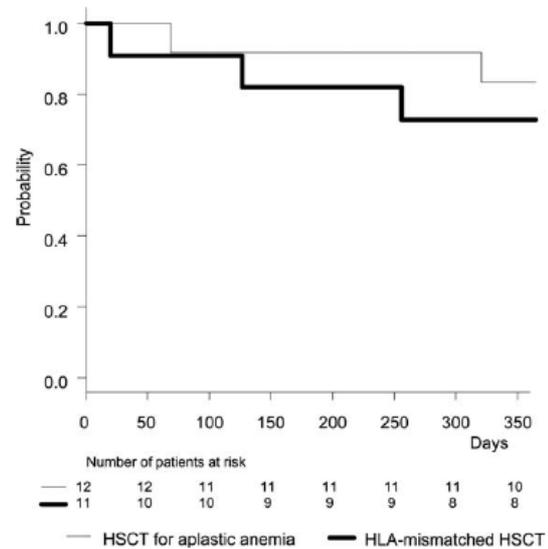


図 移植後生存曲線 (Am J Hematol 2013;88:294-300)

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から、現在はさらにアレムツズマブの投与量を減少(総量で0.5 mg/kg)した臨床試験を実施している。既に7症例の移植が行われ、今のところGradeII以上の急性GVHDの発症はなく、安全に移植が実施できている。

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前年度に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ことが示された。診断から移植までの期間の差異による影響を補正するために臨床決断分析を加えたが、それでも一抗原不適合血縁者間移植の成績はHLA-A、B、C、DRB1遺伝子型適合非血縁者間移植の成績よりも劣っていた。そこで、抗胸腺細胞抗体を併用することによって一抗原不適合血縁者間移植の治療成績が改善するかどうかを検証する前方視的臨床試験を日本造血細胞移植学会の主導臨床試験として平成25年度に開始した。

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。さらに細胞傷害性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ったところ、ドナー由来の細胞傷害性T細胞がサイトメガロウイルス再活性化の抑制に貢献していることや、細胞傷害性T細胞の形質によって抗ウイルス能が異なることが示唆された。

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(<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/>)で無料公開するとともに、HLA-WGで同ソフトを共有することによって統計解析の活性化を図っている。同ソフトウェアの開発を報告する論文がBone Marrow Transplantation誌に掲載され、当該論文のダウンロード数は同誌の論文の中で常に上位10位内を維持している。

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。骨髄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(ハプロタイプ)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、来年度中の承認申請を予定している。それまでに本研究班の自主臨床研究においてこの移植方法の安全性、有効性に関するエビデンスをさらに蓄積する。ウイルス特異的細胞傷害性T細胞のレパトアを同定することは将来の免疫療法の開発につながる。

E. 結論

本研究によってアレムツズマブを用いたHLA不適合移植法の利点、欠点を明確にすることができる。同時にHLA-WGの研究を推進し、HLA不適合移植を本当に必要とする患者層を同定し、ガイドラインを作成することを目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanda Y, Kanda J, Atsuta Y, Fuji S, Maeda Y, Ichinohe T, 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
2. 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 Kanda Y. Impact of high-/middle-molecular-weight adiponectin on the synthesis and regulation of extracellular matrix in dermal fibroblasts. ***Exp Hematol*** (in press)
3. Sato M, Nakasone H, Terasako-Saito K, Sakamoto K, Yamazaki R, Tanaka Y, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Ashizawa M, Kimura SI, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, and Kanda Y. Prediction of infectious complications by the combination of plasma

- procalcitonin level and localized infection before allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Bone Marrow Transplant** 49:553-560,2014
4. Sakamoto K, Nakasone H, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Machishima T, Kimura SI, Kikuchi M, Kako S, Kanda J, Yamazaki R, Tanihara A, Nishida J, and Kanda Y. Evaluation of the validity of preemptive therapy against Cytomegalovirus disease based on antigenemia assay with a cutoff of 20 positive cells per two slides. **PLoS One** (in press)
 5. 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, Kanda Y. 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
 6. Sato M, Nakasone H, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Sakamoto K, Kawamura K, Ashizawa M, Machishima T, Terasako K, Kimura SI, Kikuchi M, Tanihara A, Yamazaki R, Tanaka Y, Kanda J, Kako S, Nishida J, and Kanda Y. Prediction of infectious events by the high-sensitivity C-reactive protein level before autologous hematopoietic cell transplantation for lymphoma and multiple myeloma. **Transplant Infectious Disease** 15:E169-171,2013
 7. Kako S, Morita S, Sakamaki H, Iida H, Kurokawa M, Miyamura K, Kanamori H, Hara M, Kobayashi N, Morishima Y, Kawa K, Kyo T, Sakura T, Jinnai I, Takeuchi J, Miyazaki Y, Miyawaki S, Ohnishi K, Naoe T, Kanda Y. The role of HLA-matched unrelated transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first remission. A decision analysis. **Bone Marrow Transplant.** 48:1077-1083,2013
 8. 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, Kanda Y. 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
 9. 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 M. 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
 10. Sato M, Nakasone H, Oshima K, Ishihara Y, Wada H, Sakamoto K, Kawamura K, Ashizawa M, Machishima T, Terasako K, Kimura SI, Kikuchi M, Okuda S, Tanihara A, Yamazaki R, Tanaka Y, Kanda J, Kako S, Nishida J, Kanda Y. Prediction of transplant-related complications by C-reactive protein levels before hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant.** 48:698-702,2013
 11. Kanda Y, Oshima K, Kako S, Fukuda T, Uchida N, Miyamura K, Kondo Y, Nakao S, Nagafuji K, Miyamoto T, Kurokawa M, Okoshi Y, Chiba S, Ohashi Y, Takaue Y, Taniguchi S. In vivo T-cell depletion with alemtuzumab in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Combined results of two studies on aplastic anemia and HLA-mismatched haploidentical transplantation. **Am J Hematol.** 88: 294-300,2013
 12. Kako S, Kanamori H, Kobayashi N, Shigematsu A, Nannya Y, Nakamae M, Shigeno K, Suzukawa K, Takeuchi M, Tsuzuki M, Usuki K, Hatanaka K, Ogawa K, Mitani K, Nawa Y, Hatta Y, Mizuno I, and Kanda Y. Outcome after

特になし

- first relapse in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol.** 16:95-103,2013
13. Kanda Y. Investigation of the freely-available easy-to-use software "EZR" (Easy R) for medical statistics. **Bone Marrow Transplant.** 48:452-458,2013
14. Kanda J, Ichinohe T, Kato S, Uchida N, Terakura S, Fukuda T, Hidaka M, Ueda Y, Kondo T, Taniguchi S, Takahashi S, Nagamura-Inoue T, Tanaka J, Atsuta Y, Miyamura K, Kanda Y. Unrelated cord blood transplantation vs. related transplantation with HLA 1-antigen mismatch in the graft-versus-host direction. **Leukemia** 27:286-294,2013
15. Kanda J, Atsuta Y, Wake A, Ichinohe T, Takanashi M, Morishima Y, Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Ohashi K, Ohno Y, Aotsuka N, Onishi Y, Kato K, Nagamura-Inoue T, and Kanda Y, on behalf of the HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of the direction of HLA mismatch on transplant outcome in single unrelated cord blood transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant.** 19:247-254,2013
16. Ashizawa M, Oshima K, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Sato M, Terasako K, Machishima T, Kimura SI, Kikuchi M, Nakasone H, Okuda S, Kako S, Kanda J, Yamazaki R, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. Hyperbilirubinemia in the early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Prognostic significance of the alkaline phosphatase / total bilirubin ratio. **Bone Marrow Transplant.** 48:94-98,2013

2. 学会発表
特になし

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