

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

研究分担者 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

HLA半合致移植の最大の問題点は、GVHDである。この移植を安全に実施可能にするためには、GVHDのmonitoring法を確立する必要がある。当科で、HLA半合致ドナーからRISTを受けた77人の患者のdataを用いて、sIL-2RのGVHD biomarkerとしての有用性を検討した。重症GVHDの発症は、sIL-2R高値時に限定されず、sIL-2R値の正常化後にも発症する例が存在することが判った。したがって、sIL-2Rの上昇は、急性GVHDの発症を危惧する要素となるものの、それを指し示すものではない。一方、GVHD患者の多くは、移植後早期に、高いsIL-2R値を示していた。そこで、移植早期のsIL-2R値と重症GVHDの発症との関係を解析したところ、多変量解析の結果、day 7 sIL-2Rが、唯一の有意な因子として検出された。よって、day 7 sIL-2RがHLA半合致RIST後のGVHDのpredictorとして、有用であることが判明した。

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、ほぼ血縁内に見つかるので、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。私共は、厚労省班研究の中で、HLA半合致ドナーからのRISTをprospectiveかつ多施設研究として、phase I/II studyを行い、生着率97.1%、100日生存率88.2%と、予後不良症例を対象としていることを考慮すると、良好な成績が得られた(論文執筆中)。ただ、このHLA半合致移植の問題点は、移植片対宿主病(graft-versus-host disease=GVHD)である。GVHDのコントロールの精度を上げるためには、GVHDの予測を的確に行う必要がある。同種移植後のGVHDのbiomarkerとしては、soluble interleukin-2 receptor (sIL-2R), tumor necrosis factor receptor-1, interleukin-8, hepatocyte growth factorなど、種々のマーカーが有用とされてきた。中でも、sIL-2Rは、最も優れたマーカーと報告されている。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。一般に、T細胞がいつ

たん活性化されると、T細胞は、細胞表面にIL-2Rを発現する。IL-2Rは、 α , β , γ の少なくとも3つのsubunitで構成されるが、ligandであるIL-2がつくことで、IL-2Rの α subunitが切り出され、末梢血中でsIL-2Rとして、検出される。したがって、血中のsIL-2Rは、T細胞の活性化の総量を反映していると考えられる。そのため、多くの移植の研究で、sIL-2RのGVHD biomarkerとしての有用性が証明されてきた。しかし、これらの研究は、主として、骨髄破壊の前処置を用いた、HLA適合移植で行われたものであり、HLA半合致ドナーからのRISTの条件下で、sIL-2RがGVHDのbiomarkerとして有用であるか否かについては、明らかになっていない。

そこで、最近、当科で実施したHLA半合致RIST症例のdataを用いて、sIL-2RのGVHD biomarkerとしての有用性を検討した。

B. 研究方法

対象：sIL-2Rは、重症感染症、VODや腫瘍性にも上昇することが知られている。そこで、2009年1月から2012年6月までの間に、兵庫医科大学病院でHLA半合致RISTを受けた患者の中で、ドナー由来の生着を示し、かつ上記に示す非特異的sIL-2Rの上昇のない177人の患者のdataを抽出し、後方視的にsIL-2RのGVHD biomarkerとしての有用性を解析した。対象患者の基礎疾患は、AML/MDS 39例、ALL 14例、Lymphoma 14例、CMLを含むその他の疾患 10例であった。移植前病期は、CR/MDS-RA/CML-CPのgood risk群 4例、PR/MDS-RAEB/CML-APのintermediate risk群 6例、non-CR/MDS-overt/CML-BCのpoor risk群 67例であった。HLA disparityについては、A抗原、B抗原、DR抗原に関して、GVH方向2抗原不適合 40例、

GVH方向3抗原不適合 37例であった。移植回数は、初回移植 44例、2回目以降の移植 33例であった。

移植前処置は、Flu+Bu+ATGをbaseにする regimen 20例、Flu+MeI+ATGをbaseにする regimen 59例、その他 8例であった。GVHD予防は、FK506+mPSL 1 mg/kgで行った。sIL-2Rは、ELISAキット(Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて、測定した。統計解析は、EZR (自治医大さいたま医療センター 神田善伸博士開発)を用いて、行った。

(倫理面への配慮)

「血縁者間HLA2-3抗原不適合移植」のプロトコールは、平成18年3月22日、兵庫医科大学の倫理委員会で承認を受けている。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

対象となった77例の移植患者のGVHDのgradeは、grade 0 38例、grade I 14例、grade II-III 25例であった。GVHDを発症しなかった患者のsIL-2Rは、移植後終始 740 U/ml以下の低値を示した。一方、II度以上のGVHDを発症した患者のsIL-2Rの中央値は、移植後上昇し、day 11にピーク値(1,663 U/ml)に達した後、下降に転じ、day 30以降は1,000 U/ml以下に低下した。重症GVHDの発症は、sIL-2R高値時に限定されておらず、sIL-2R値の正常化後に発症する例も存在した。一方、このような患者の多くは、移植後早期に、高いsIL-2R値を示していた。

このような状況を背景に、day 7 sIL-2RのGVHDのpredictorとしての有用性を解析した。day 7 sIL-2R値のROC解析から、810 U/mlがcutoff値となることが判った。donor source、患者の性別、患者年齢、移植前病期、移植回数、GVH方向のHLA disparity、原疾患、day 7 sIL-2Rを変数として、GVHD発症に関係する因子を、Cox proportional hazards modelを用いて多変量解析を行ったところ、day 7 sIL-2Rが、唯一の有意な因子として検出された。

D. 考察

sIL-2Rは、重症感染症、VOD、および腫瘍性にも上昇することが知られている。sIL-2Rが、T細胞の非特異的活性化を示すマーカーであるため、これらのGVHD以外でのsIL-2Rの上昇は避けられず、GVHD biomarkerとしての有用性を下げることにつながる。Ferraraらは、sIL-2Rのbiomarkerと

しての意義を解析する論文の中で、非特異的上昇を除くため、全症例の15%を除外した(Blood 2009; 113: 273-8)。私共は、非寛解期症例を多く含んでいたため、20%の症例を除外することになった。しかし、これらのsIL-2Rの上昇を伴う病的状態を、臨床的に同定することは比較的容易である。したがって、sIL-2RをGVHDのbiomarkerとして適用可能な症例を選別することが重要と思われる。

前述したように、重症GVHDの発症は、sIL-2R高値時に限定されておらず、sIL-2R値の正常化後に発症する例も存在したが、これらの患者の多くは、移植後早期に高いsIL-2R値を示していた。したがって、sIL-2Rの上昇は、急性GVHDの発症を危惧する要素とはなるものの、それを直接指し示すものではない。regenerating islet-derived 3-alphaなどの組織側の要因が、GVHDの発症に係っているためと考えられる。一方、移植早期のsIL-2R値、day 7 sIL-2Rは、GVHDのpredictorとして、有用であることが判明した。

E. 結論

sIL-2Rが、HLA半合致RISTにおいても、有用なGVHDのbiomarkerとなり得ることが明らかになった。特に、day 7 sIL-2Rは、GVHDのpredictorとして、有用である。

F. 健康危険情報

本研究は、その多くは非寛解期症例を対象としているが、通常に認められる移植後合併症以外に、特記すべき有害事象は観察されていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikegame K, Kato R, Fujioka T, Okada M, Kaida K, Ishii S, Yoshihara S, Inoue T, Taniguchi K, Tamaki H, Soma T, Ogawa H. Detection of donor-derived CMV-specific T cells in cerebrospinal fluid in a case of CMV meningoencephalitis after cord blood stem cell transplantation. *International Journal of Hematology* 97: 289-290, 2013.
- 2) Morishita S, Kaida K, Yamauchi S, Wakasugi T, Yoshihara S, Taniguchi K, Ishii S, Ikegame K, Kodama N, Ogawa H, Domen K. Gender differences in health-related quality of life, physical function and psychological status among patients in the early phase following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Psychooncology* 22: 1159-1166, 2013.
- 3) Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S,

- Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Nakata J, Ishii S, Soma T, Okada M, Ogawa H. 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.
- 4) Kurosawa S, 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 graft-versus-host disease and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-remission acute leukemia. *Bone Marrow Transplantation* 48: 1198-1204. 2013.
- 5) Morishita S, Kaida K, Yamauchi S, Sota K, Ishii S, Ikegame K, Kodama N, Ogawa H, Domen K. Relationship between corticosteroid dose and declines in physical function among allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients. *Support Care Cancer* 21: 2161-2169, 2013.
- 6) Eguchi R, Kubo S, Ohta T, Kunimasa K, Okada M, Tamaki H, Kaji K, Wakabayashi I, Fujimori Y, Ogawa H. FK506 induces endothelial dysfunction through attenuation of Akt and ERK1/2 independently of calcineurin inhibition and the caspase pathway. *Cellular Signalling* 25: 1731-1738, 2013.
- 7) Kawakami M, Taniguchi K, Yoshihara S, Ishii S, Kaida K, Ikegame K, Okada M, Watanabe S, Nishina T, Hamada H, Nakagawa M, Ogawa H. Irreversible neurological defects in the lower extremities after haploidentical stem cell transplantation: possible association with nelarabine. *American Journal of Hematology* 88: 853-857, 2013.
- 8) Nakasone H, Onizuka M, Suzuki N, Fujii N, Taniguchi S, Kakihana K, Ogawa H, Miyamura K, Eto T, Sakamaki H, Yabe H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Fukuda T. Pre-transplant risk factors for cryptogenic organizing pneumonia/bronchiolitis obliterans organizing pneumonia after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 48: 1317-1323, 2013.
- 9) Murata, M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Mori T, Kobayashi H, Nakaseko C, Yamagata N, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, MD, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with bone marrow, peripheral blood, or umbilical cord blood: An analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplantation* in press.
- 10) Kaida K, Ikegame K, Ikemoto J, Murata R, Irie R, Yoshihara S, Ishii S, Okada M, Inoue T, Tamaki H, Soma T, Fujimori Y, Kai S, Ogawa H. Soluble interleukin-2 receptor level on day 7 as a predictor of graft-versus-host disease after HLA-haploidentical stem cell transplantation using reduced intensity conditioning. *International Journal of Hematology* in press.

2. 学会発表

- 1) Yamahista T, Taniguchi S, Fukuda T, Ogawa H, Morishima Y, Nagamura T, Sakamaki H, Atsuta Y, Takami A. Clinical outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with intravenous busulfan-based reduced-intensity conditioning for acute myeloid leukemia: A nationwide retrospective study from the adult AML working group of JSHCT. The 39th EBMT annual meeting in 2013, 2013, 4.7-10, London, UK.
- 2) Murata M, Nishida T, Taniguchi S, Ohashi K, Ogawa H, Fukuda T, Morishima Y, Nagamura-Inoue T, Sakamaki H, Atsuta Y, Suzuki R, Naoe T. Transplantation for primary myelofibrosis using bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood: a retrospective analysis of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. The 39th EBMT annual meeting in 2013, 2013, 4.7-10, London, UK.
- 3) Tanaka J, Takahashi Y, Yabe T, Morishima Y, Oba K, Takahashi S, Taniguchi S, Ogawa H, Ohnishi Y, Miyamura K, Kato K, Kato S, Atsuta Y, Kanda Y. KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction did not affect outcomes of single umbilical cord blood transplantation without ATG for acute leukemia in complete remission: A Study From the HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). The

18th congress of European Hematology Association, 2013. 6.13-16, Stockholm, Sweden.

4) Kondo E, Mizuta S, Ito T, Ogawa H, Sakamaki H, Kato K, Morishima Y, Suzuki R, Suzumiya J. High dose chemotherapy with autologous stem cell support for Primary Mediastinal large B-cell Lymphoma: a retrospective analysis from the Adult Malignant Lymphoma Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). The 12th International Conference on Malignant Lymphoma, 2013, 6.19-22, Lugano, Switzerland.

5) 小川啓恭, 宮村耕一, 岡本真一郎. 本邦における同種造血幹細胞移植に用いる無菌室の実態調査. (一般口演) 第35回日本造血細胞移植学会総会 2013.3 金沢

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). (一般口演) 第35回日本造血細胞移植学会総会 2013.3 金沢

7) 石井慎一, 池亀和博, 海田勝仁, 岡田昌也, 井上貴之, 加藤るり, 玉置広哉, 藤盛好啓, 甲斐俊朗, 相馬俊裕, 小川啓恭. high risk悪性血液疾患患者に対する, 低容量ATGとステロイドを用いたHLA半合致ミニ移植の治療成績. (ポスターセッション) 第35回日本造血細胞移植学会総会 2013.3 金沢

8) Ikegame K, Kaida K, Ishii S, Yoshihara S, Taniguchi K, Kato R, Inoue T, Okada M, Tamaki H, Soma T, Ogawa H. Transition of conditioning regimen in haplo-mini in connection with survival results. (一般口演) 第75回日本血液学会学術集会 2013.10 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし