

急性 GVHD に対する新規分子標的療法

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞制御領域

服部浩一

移植片対宿主病(GVHD)は、臍帯血移植をはじめとする造血幹細胞移植患者の quality of life と生命予後を左右する深刻な合併症の一つである。我々は、これまでの研究を通じて、急性 GVHD の発症に関与する TNF- α や Fas-ligand 等の炎症性サイトカインに各々標的臓器指向性が存在すること、またその多くが、金属要求性蛋白分解酵素で、組織中の構造蛋白、細胞基底膜を主な基質とするマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)による細胞外ドメイン分泌(プロセッシング)を経て産生されること、さらにリンパ球、単球・マクロファージ系細胞をはじめとする骨髄由来の炎症性細胞群の組織内浸潤が MMP の活性化を必須とすること等を明らかにしてきた(図 1)。

我々は、生体内の MMP 活性化—潜在型酵素 ProMMP から MMP への変換は、各種 MMP 間の相互活性化システムと血液線維素溶解系(線溶系)因子プラスミンの生成とによって制御されていること、またマウス生体への組織プラスミノゲンアクチベータの投与は、MMP の活性化を介し、Kit-ligand のプロセッシングを誘導し、骨髄造血、組織再生を促進することを見出した(Cell Stem Cell 1:658, 2007, Nat Med 12:557, 2006, Blood 115:4302, 2010, Blood 119:5405, 2012, Blood 119:6382, 2012)。このことは、線溶系の亢進が、各種炎症性サイトカインの分泌制御に寄与していることを示唆していると言えよう(図 2)。

本研究では、血液凝固・線溶系と炎症性疾患病態との関連性及びその相互作用に注目し、急性 GVHD の病態における MMP の活性制御と炎症性サイトカインをはじめとする生体因子の分泌産生の起点として、その上流に位置する線溶系因子群の機能解明を主たる目的とする。さらにこれを基礎とした、炎症性サイトカインのプロセッシング阻害に基づく、線溶系を標的とした免疫・炎症性疾患の病態制御、新規分子療法の開発までをその目的の範疇としている。

今年度までの研究で、近交系 C57BL6 マウスの脾臓細胞を (C57BL/BALB/c) F1 マウスへと輸注して作製した急性 GVHD のモデルマウスに線溶系阻害剤 YO-2 を 75 μ g/日で連日投与する群とその溶媒のみの投与する群とで比較を行った。実験結果について下記に列挙する。

- 1) 溶媒投与群では脾臓細胞移植後 21 日以内に全例死亡するのに対して、YO-2 投与群では移植後 28 日での生存率は 90%であった。また、溶媒投与群では、急性 GVHD 関連の体重減少を顕著に認めたが、YO-2 投与群では体重減少は軽微であった(図 3)。
- 2) 移植後 10 日目の肝臓、小腸の病理所見は YO-2 投与群では溶媒投与群と比較して、炎症性細胞の浸潤やアポトーシス像は軽微であった。また、移植後 14 日目の脾臓、骨髄、胸腺の病理所見は YO-2 投与群では溶媒投与群と比較して、炎症の最終像と考えられる著名な細胞減少と組織構造破壊像は軽微であった。
- 3) 急性 GVHD モデルマウスの血液を 3 日毎に採取し、ELISA にて各種線溶系因子、サイトカイン、造血因子を測定したところ、YO-2 投与群では溶媒投与群と比較して、線溶系因子(プラスミンやプラスミン-アンチプラスミン複合体)、サイトカイン(TNF- α や Fas リガンド)、造血因子の上昇が有意に抑えられていた(図 3)。
- 4) 急性 GVHD モデルマウスの脾臓、骨髄、胸腺細胞をフローサイトメーターにて解

析したところ、YO-2 投与群では、溶媒投与群と比較して、移植後早期 (day8) においてドナーリンパ球の組織内浸潤が有意に抑えられており、その結果、移植後 day14 ではYO-2 投与群はPBS 投与群と比較してレシピエントリンパ球細胞の減少が保たれていた。

今後の研究では、マウス病理所見等によるYO-2の有効性の確認、さらにはその毒性、生体投与における安全性、至適投与法、代謝経路等を精査する。さらにGVHD患者検体について血液凝固・線溶系因子の動態解析を進めると共に、トランスレーショナルリサーチとしての可能性について検討していきたい。

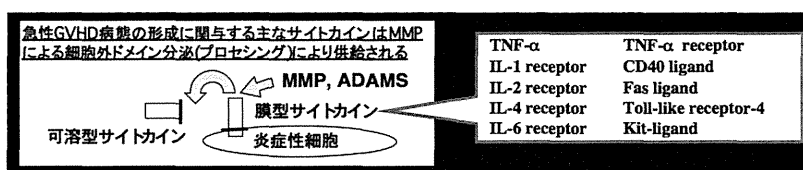


図1: MMPによる炎症性サイトカインの細胞外ドメイン分泌制御機構

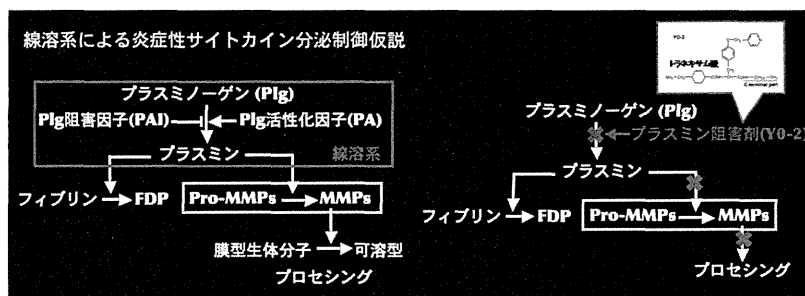


図2: 線溶系阻害剤の炎症性サイトカイン分泌抑制機序

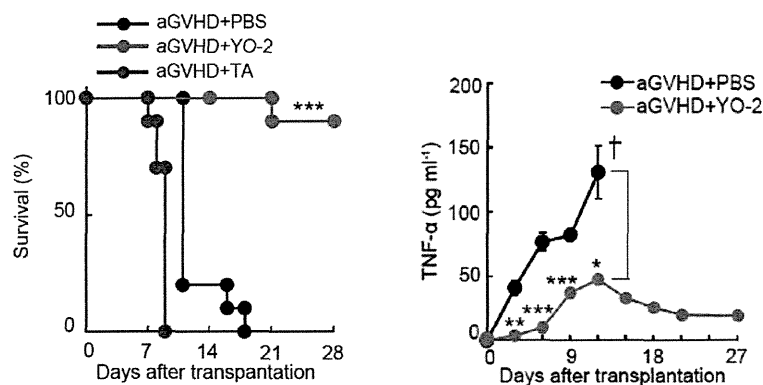


図3: 線溶系阻害剤の急性GVHDでの有効性とTNF-αの分泌抑制作用

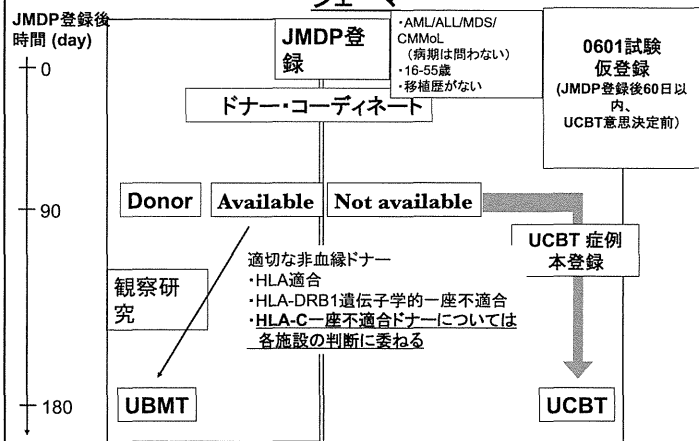
成人難治性血液悪性腫瘍に対する
非血縁者間臍帯血移植の有効性に関する研究
(臨床第Ⅱ相試験)
(C-SHOT 0601)

名古屋大学医学部附属病院 血液内科
寺倉精太郎 西田徹也

目的

- ・再発高リスク血液悪性疾患患者
- ・適切な血縁・非血縁ドナーが得られない患者
- ・寛解期患者または無治療MDS (IPSS Int-2 or high)
- ・均一な前治療 (Ara-C/CY/TBI with or without G-CSF)
および免疫抑制療法 (sMTX+Tacrolimus)
- ・UCBTの安全性と有効性を評価する。
- ・UCBTとUR-BMTの前方視的な比較

シエマ



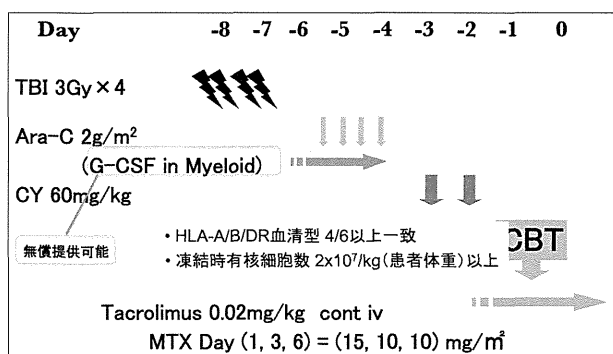
本登録適格基準

1. 原病の条件
 - ・急性白血病: ① 第一寛解期 染色体予後不良型など再発高リスク
② 第二寛解期以降の寛解期
 - ・MDS, CMML: IPSS Int-2 or high risk
無治療または化学療法により寛解となった症例
2. 年齢: 16歳以上55歳未満.
3. Performance status 0-1
4. HCT-CI 0点
5. 臍帯血ユニット: HLA-A/B/DR血清型 4/6以上一致
凍結時核細胞数 2×10^7 /kg (患者体重) 以上
6. 初回造血幹細胞移植.
7. 文書による同意が得られている.

主要評価項目

Day 180 生着生存

治療計画



Case 1: 初発時: JMDPドナー候補あり

AL 高リスクであり、初回寛解時にJMDP移植も含めて検討

・JMDP登録時に0601試験に仮登録

- ➡ JMDPに8/8アレルマッチ、7/8アレルマッチドナーが見つかり、バンク移植となる。
付随試験にて予後追跡
- ➡ JMDPに8/8アレルマッチ、7/8アレルマッチドナーが見つからず、臍帯血移植方向となる。
移植前スクリーニングを行い、本登録へ

Case 2: 初発時:JMDPドナー候補ほとんどなし(なし)

AL 高リスクであり、初回寛解時にJMDP移植も含めて検討するもドナー候補はほとんどなし(なし)

・JMDP登録時に0601試験に仮登録

- ➡ JMDPにドナー候補が0人になればいつでも臍帯血に移行
本登録へ
- ➡ JMDPに8/8アレルマッチ、7/8アレルマッチの可能性のあるドナーがはじめからなし。
- ➡ 寛解導入・地固め後に臍帯血移植へ移行・本登録へ

Case 3: 初発時:JMDPドナー検索を既に行った症例

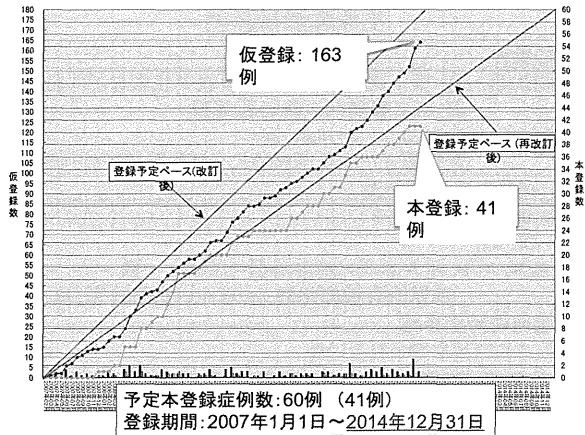
AL 中間リスクであり、初回寛解時にJMDP移植も含めて検討するも適切なドナーが選定されず、移植を行わず経過観察となる

再発: 今回再発時にもJMDPをサーチするもドナー候補はほとんどなし

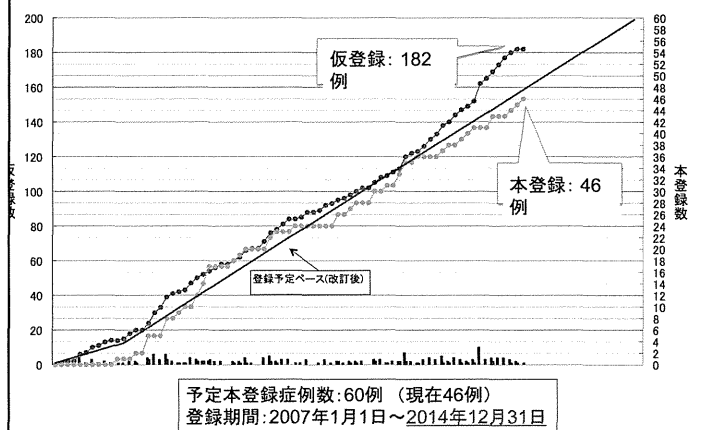
0601試験に仮登録:JMDP登録は任意

- ➡ JMDPにドナー候補が0人になればいつでも臍帯血に移行
本登録へ
- ➡ JMDPに8/8アレルマッチ、7/8アレルマッチの可能性のあるドナーがはじめからなし。
- ➡ 寛解導入・地固め後に臍帯血移植へ移行・本登録へ

登録進捗状況(2013年1月10日時点)



登録進捗状況(2013年6月30日現在)



参加施設

1 名古屋大学医学部附属病院	血液内科	25 熊本医療センター	内科
2 安城更生病院	血液内科	26 中京病院	血液科
3 愛知県がんセンター中央病院	血液・細胞療法部	27 島根大学医学部附属病院	血液内科
4 愛知県厚生連昭和病院	血液化学療法科	28 九州がんセンター	血液内科
5 名古屋第一赤十字病院	血液内科	29 仙台医療センター	血液内科
6 名古屋第二赤十字病院	血液内科	30 愛知医科大学病院	血液内科
7 豊橋市民病院	血液内科	31 鳥取県立中央病院	血液内科
8 名鉄病院	血液内科	32 札幌医科大学附属病院	第1内科
9 トヨタ記念病院	血液内科	33 都立駒込病院	血液内科
10 三重大学医学部附属病院	血液内科	34 神奈川県立がんセンター	血液内科
11 岡崎市民病院	血液内科	35 佐世保市立総合病院	血液内科
12 東北大学医学部附属病院	血液リウマチ膠原病内科	36 横浜市立大学附属市民総合医療センター	血液内科
13 島根県立中央病院	血液腫瘍内科	37 市立旭川病院	血液内科
14 市立富山病院	内科	38 岐阜市民病院	血液内科
15 宮城県立がんセンター病院	血液内科	39 浜松医科大学附属病院	血液内科
16 札幌北極病院	血液内科	40 愛育病院	血液内科
17 金沢医科大学病院	血液・リウマチ膠原病科	41 信州大学	血液内科
18 国立国際医療センター	血液内科	42 岡山大学病院	血液・腫瘍・呼吸器内科
19 静岡県立総合病院	第一内科	43 大阪大学大学院医学系研究科	血液腫瘍制御学
20 札幌医科大学附属病院	第四内科	44 和歌山県立医科大学	血液内科学
21 北海道大学病院	第二内科	45 生長会 府中病院	血液疾患センター
22 徳島赤十字病院	血液科	(IRB承認書類到着順)	
23 愛媛県立中央病院	血液腫瘍内科		
24 岐阜大学付属病院	血液感染症内科		

研究代表者

名古屋第一赤十字病院 血液内科 宮村 耕一

効果安全性評価委員

名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科 加藤 剛二
千葉大学医学部附属病院 血液内科・輸血部 井関 徹

事務局

名古屋大学医学部附属病院 血液内科
寺倉 精太郎 tseit@med.nagoya-u.ac.jp
西田 徹也 tnishida@med.nagoya-u.ac.jp

データセンター

NPO 血液疾患臨床研究サポートセンター(C-SHOT)
support@c-shot.or.jp

骨髄内臍帯血ミニ移植第 II 相試験進捗状況

岡田昌也・小川啓恭（兵庫医科大学・血液内科）

本邦における非血縁者間臍帯血移植症例数は年々増加し、非血縁者間骨髄移植と肩を並べるようになってきている。また、成人に対する骨髄破壊的前処置を用いた臍帯血移植は 1990 年代後半から試みられるようになり、報告によっては非血縁ドナーからの骨髄移植に比肩する成績が得られている。臍帯血移植が骨髄移植に比して有利な点は、ドナーの負担がほとんど無いことや、コーディネートの時間が短いことなどがある。不利な点は、患者体重当たりの移植細胞数が骨髄移植の約 1/10 と少ないため、拒絶・生着不全のリスクが高く、血球回復が遅延することである。生着不全のリスクを低下させる方法の一つとして、臍帯血を造血の場である骨髄に直接移植する骨髄内臍帯血移植が試みられている。

骨髄内造血幹細胞移植の有用性を提示した動物実験モデルは、国内外で複数ある。その主要な点は尾静脈からの輸注に対し、骨髄に到達する細胞数が多くなることである。

ヒトでの臨床研究は最初にジェノバ大学の Frassoni らが 2007 年の EBMT annual meeting において、成人骨髄内臍帯血移植は生着不全のリスクを改善し血小板回復を速やかにするだけでなく、急性 GVHD の頻度を低下させると報告した。その後も彼らは精力的に臨床研究を継続している。一方、ミネソタ大学の Brunstein らは、複数臍帯血を用い骨髄内臍帯血移植の臨床試験を行っている。(骨髄内 vs 経静脈) 同時に静脈内に輸注した臍帯血に対し骨髄内投与された臍帯血の生着優位性は認めず、骨髄内移植の有効性については否定的としている。

骨髄内臍帯血移植について、臍帯血移植の最大の問題である生着不全を減らし、予後を改善するかについては結論が出ておらず、兵庫医科大学 血液内科では 55 歳から 70 歳の悪性血液疾患患者を対象として、臍帯血ミニ移植の第 I 相試験を行った。主要評価項目は、骨髄内へ臍帯血を移植することの安全性であった。予定の 10 例を終了し、移植時の合併症は認められず、骨髄内へ臍帯血を注入する際の疼痛も、大きな問題とならないことが確認された。現在、骨髄内臍帯血ミニ移植の有効性を検討する第 II 相試験を多施設共同研究の形で実施している。

臍帯血バンクおよび造血幹細胞提供支援機関について

高梨美乃子（日本赤十字社血液事業本部）

平成 24 年 9 月 12 日の「移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律」（以下「造血細胞移植推進法」）の公布後、1 年 6 ヶ月以内の施行の為に、各関係機関での準備調整が進められている。今後、各臍帯血バンクは臍帯血供給事業者、骨髄移植推進財団は骨髄・末梢血幹細胞提供あっせん事業者として必要な規制及び助成を受ける事になる。また、日本赤十字社は造血幹細胞提供支援機関として指定を受けるべく準備中である。

臍帯血バンク

「造血幹細胞移植委員会」にて移植用臍帯血基準が議論されている。新基準に従って新年には許認可の申請を行う予定である。現在は 8 バンクが活動している。4 カ所の血液センターにある臍帯血バンクは日本赤十字社、一組織としての申請を行う予定であり、おそらく総数 4 組織が許認可の申請をするであろうと予想される。

造血幹細胞提供支援機関

造血細胞移植推進法第 45 条に支援機関業務が定められている。9 月初旬には支援機関に係る規定が施行される予定である。

- (1) 骨髄・末梢血幹細胞ドナー登録、その他造血幹細胞提供関係事業者に必要な協力を行う。臍帯血の品質向上のための技術研修なども予定されている。
- (2) 造血幹細胞提供関係事業者の事業について必要な連絡調整を行う。骨髄バンク、臍帯血バンク、関係学会等との連絡調整の為に会議開催、またインシデント事例共有や臍帯血の調製検査についての技術的事項の検討などが含まれる。
- (3) 移植に用いる造血幹細胞に関する情報を一元的に管理し、医師その他の移植を用いる造血幹細胞を必要とする者に提供する。造血幹細胞移植関連システムの保守、運用及び開発、医療関係者向けのウェブ窓口の運営が想定されている。
- (4) 移植に用いる造血幹細胞の提供に関する普及啓発を行う。患者や国民が知りたい情報を手軽に入手できるポータルサイトの運営が想定されている。

ウイルス特異的細胞性免疫療法 -CTLバンクの構築を目指して-

藤田由利子・高橋 聡（東大医科研 分子療法）・森尾友宏（東京医科歯科大 小児科）

化学療法薬や造血細胞移植療法が高度に複雑化する中、感染症対策は重要な課題になっている。特に造血細胞移植後の CMV, EBV, HHV6 などのヘルペス属ウイルスに加え、BKV, AdV などによる重篤なウイルス感染症は予後に深く関与する。化学療法に依存する現行の感染症治療では、移植後のような免疫学的再構築が不十分な場合、長期投与による耐性や再発などが問題となっている。

世界的には、様々なウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)治療が移植医療に導入されており、多種ウイルス特異的 CTL 療法も治療や予防として実践されている。ドナー由来ウイルス特異的 CTL 療法は、HLA 不一致であっても grade II 以上の GVHD 頻度は極めて低く、安全かつ有効な治療として認識されている。また医療経済的にも有利との試算や報告もある。

一方、作成に時間がかかる問題点があり、その対策として迅速培養法が開発されつつあり、更には CTL バンクの樹立も模索されている。第三者からの CTL を安価かつ容易に樹立し、保存しておくことができれば必要時に、あるいは臍帯血移植、非感染ドナーからの移植レシピエントに投与することが可能であり、既に米国における探索的研究ではその安全性も検証されつつある。わが国においてもウイルス特異的 CTL 療法の導入・検証と展開が求められる。

我々は Baylor 医科大学で開発を進めている 7 種類のウイルスに対する多種ウイルス特異的 CTL 療法の技術を導入し、樹立方法の検証を開始した。多ウイルスの多種類の peptide mixture を用いて抗原刺激とし、さらにサイトカインにて増幅する方法であり、手法の最適化によりウイルスフリーかつ遺伝子導入不要で、短期間で投与可能な技術とされている。

我々はこの手法を用いて、造血移植後の罹患率、死亡率の高い CMV, EBV, AdV3 ウイルスを対象に CTL 生成を行った。20×10⁶ 個の PBMC から開始し、約 12 日間で 100-150×10⁶ 個の細胞数を得ることができ、これらは 9 割以上が CD3 陽性細胞であり、約 20% の細胞が抗原刺激に対し IFN γ を産生しその特異性を確認した。我々はさらに日本での臨床応用の際の規制対応も見越して無血清培養系での、同方法での CTL 生成を安定して行えることを確認した。今後はこれらの CTL の異種反応や細胞傷害活性を確認し、さらに対象ウイルスを HHV6 と BKV を加えた 5 種類に拡大する予定である。

一方で、日本における CTL バンク整備については、幅広い分野との意見交換とコンセンサス形成、支援を得ることが死活的に重要と考えている。

VI. 第2回造血細胞移植合同班会議次第・抄録

平成26年1月11日

(国立がんセンター・国際研究交流会館・国際会議室)

初日 平成 26 年 1 月 11 日 (土)

10 時 00 分～12 時 45 分

10 : 00～11 : 30 本邦における造血細胞移植一元化登録研究システムの確立 (研究代表者 熱田 由子)

11 : 30～12 : 45 成人難治性造血器腫瘍に対する同種造血幹細胞移植療法の治療成績向上につながる基盤整備のための多施設共同研究 (研究代表者 福田 隆浩 : 開発費)

13 時 45 分～19 時 00 分

13 : 45～15 : 15 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 (研究代表者 神田 善伸)

15 : 15～16 : 15 適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究 (研究代表者 高橋 聡)

16 : 15～17 : 00 新たな造血幹細胞移植法の開発 : 生着効率の向上を目指して (研究代表者 村田 誠)

17 : 00～17 : 30 臓器移植・造血幹細胞移植後の日和見感染に対する有効かつ安全な多ウイルス特異的な T 細胞療法の開発と導入に関する研究 (研究代表者 森尾 友宏)

17 : 30～19 : 00 移植細胞源を異にする非血縁造血細胞移植の組織適合性に基づく成績向上と移植選択アルゴリズムの確立に関する研究 (研究代表者 森島 泰雄)

2 日目 平成 26 年 1 月 12 日 (日)

9 時 00 分～12 時 30 分

9 : 00～10 : 30 非血縁者間同種末梢血幹細胞移植開始におけるドナーおよびレシピエントの安全性と移植成績向上に関する研究 (研究代表者 宮村 耕一)

10 : 30～11 : 00 造血細胞移植における肝中心静脈閉塞症 (VOD) に対する本邦未承認薬 defibrotide の国内導入のための研究 : 第 I 相および第 II 相試験 (医師主導治験) (研究代表者 菊田 敦)

11 : 00～12 : 30 難治性造血器腫瘍に対する造血幹細胞移植の治療成績向上を目指した未承認・適応外薬のエビデンス確立に関する研究 (研究代表者 福田 隆浩 : がん臨床)

14 時 00 分～16 時 00 分

公開シンポジウム (予定)

1月11日(土)

15時15分～16時15分

適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究

(H24-難治等(免)-一般 008)

研究代表者 高橋 聡

- 15:15-15:20 **当研究グループの概要**
高橋 聡 (東大医科研)
- 15:20-15:35 **造血再生促進薬の開発**
安藤 潔 (東海大学)
- 15:35-15:45 **成人難治性血液悪性腫瘍に対する非血縁者間臍帯血移植の有効性に関する研究(臨床第Ⅱ相試験) (C-SHOT 0601)**
寺倉 精太郎・西田 徹也 (名古屋大学)
・宮村 耕一 (名古屋第一日赤)
- 15:45-16:00 **造血幹細胞移植後消化管検体における bradyrhizobium enterica の検討**
三春 祐太・田中 幸久・大田 泰徳 (東大医科研)
- 16:00-16:15 **ウイルス特異的細胞性免疫療法**
藤田 由利子・高橋 聡 (東大医科研)
小野敏明・森尾 友宏 (東京医科歯科大)

本研究グループの概要

高橋 聡 (東大医科研)

本研究グループは、臍帯血移植の先進化による安全性と成績の向上を本研究の目的とする。最も深刻な合併症である生着不全、ウイルス感染症、GVHD についての基盤研究を継続しつつ臨床研究に発展させる。同時に臨床研究遂行・支援、および臍帯血バンク運営の将来構想に関する議論に向けて更なる情報収集を進める予定である。

25 年度には、生着不全対策として計画している各種凝固・線溶系制御剤による移植後造血再構築促進効果、主要なアポトーシス誘導因子である TNF- α シグナル遮断による造血幹細胞の保護、および新規低分子化合物による造血幹細胞増幅に関して、それぞれ動物モデルを用いて前臨床試験を進める。ウイルス感染症対策については、米国ベイラー医科大学との連携を継続し、臨床応用に向け無血清培養系での多ウイルスに対する抗原特異的 CTL の調製法を確立するとともに、臨床試験の開始のための準備を進める。また、GVHD に対する新規治療開発としては臨床検体を用いて GVHD 病態における凝固・線溶系の機能解析を行い、併せて YO-2 の有効性を動物モデルで探る。

臍帯血バンク整備の支援については、現況の問題点の整理と解決に向けての情報収集に加え、細胞バンクとしての特殊性をさらに進化させるための検討についても議論を重ねる。さらには、現在行われている臨床研究への支援を継続するとともに、上記の開発研究を臨床応用する際に生じる規制対応上の問題点を整理し、予め臨床研究を開始する際の障害を可能な限り少なくする。また、移植成績の統計解析や急性白血病症例の治療方針決定のアルゴリズムに関する調査研究の実施に向けて、宮村班および日本造血細胞移植学会、日本さい帯血バンクネットワークと連携をとり、進める。

凝固・線溶系を介した造血回復促進法の開発

安藤 潔・八幡 崇（東海大学）、宮田敏男（東北大学）

研究目的：より安全で成功率の高い臍帯血移植法を実現するために、昨年度我々は造血再生を促進する働きがある線維素溶解系（線溶系）に着目し、移植初期における造血回復を可能な限り効率よく迅速に達成させる方法の確立に取り組んだ。線溶系を抑制する PAI-1 を阻害する低分子化合物を開発し、骨髄移植モデルマウスに投与することによって、造血系の早期回復の促進と長期造血の維持が達成することを明らかにした。そこで今年度は、PAI-1 阻害剤の臍帯血移植における有効性を明らかにすることを目的とした検討を行った。

方法：超免疫不全マウスである NOG マウスに放射線（2Gy）を照射し、臍帯血より分離した CD34⁺ 細胞を 1×10^5 個経静脈的に移植した。移植当日から 5 日間、1 日 1 回の割合で PAI-1 阻害剤（10mg/kg）を経口投与した。対照群には生理食塩水を経口投与した。移植後に末梢血と骨髄細胞を回収し、細胞数や造血幹細胞の存在比率について解析した。

結果：新規 PAI-1 阻害剤投与群は、生理食塩水投与群に比べて造血増殖因子の発現量が亢進し、ドナー由来の造血細胞の有意に高い回復が認められた。また、総骨髄細胞数も新規 PAI-1 阻害剤投与によって迅速な回復が誘導されていた。さらに、生理食塩水投与群と比べて、PAI-1 阻害剤投与群の方が造血幹細胞の存在比率と細胞数共に有意に増加していた。

考察：PAI-1 阻害剤は、造血再生因子の発現を誘導し、臍帯血造血幹細胞移植後の迅速で効率よい造血回復反応が誘導されるということを明らかにした。また、PAI-1 阻害剤の投与によって誘導されるヒト造血回復の促進効果は、成熟造血細胞の回復のみならず、造血幹細胞の増幅も促進しているということが明らかとなった。

結論：PAI-1 阻害剤は臍帯血を利用したヒト造血再生の促進においても有効であることが明らかとなった。

成人難治性血液悪性腫瘍に対する非血縁者間臍帯血移植の有効性に関する研究 (臨床第Ⅱ相試験) (C-SHOT 0601)

寺倉精太郎 西田徹也 (名古屋大学)・宮村耕一(名古屋第一赤病院)

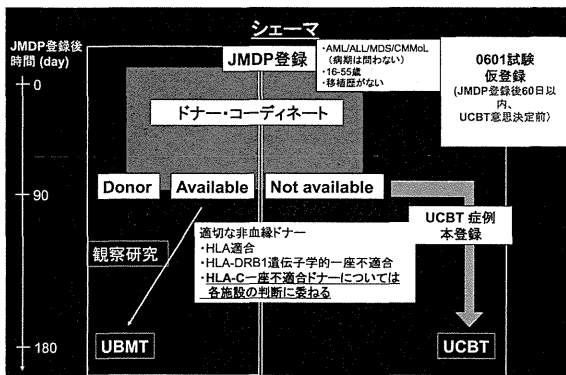
厚生労働科学研究 高度アレルギー疾患等予防・治療研究事業
『難治性血液悪性腫瘍の移植の先進的な治療向上と普及に関する研究』(高橋裕)
2014年1月11日 於 国立がんセンター研究所

成人難治性血液悪性腫瘍に対する 非血縁者間臍帯血移植の有効性に関する研究 (臨床第Ⅱ相試験) (C-SHOT 0601)

名古屋大学医学部附属病院 血液内科
寺倉精太郎 西田徹也
名古屋第一赤十字病院 血液内科
宮村耕一

目的

- ・再発高リスク血液悪性疾患患者
- ・適切な血縁・非血縁ドナーが得られない患者
- ・寛解期患者または無治療MDS (IPSS Int-2 or high)
- ・均一な前治療 (Ara-C/CY/TBI with or without G-CSF)
および免疫抑制療法 (sMTX+Tacrolimus)
- ・UCBTの安全性と有効性を評価する。
- ・UCBTとUR-BMTの前方視的な比較

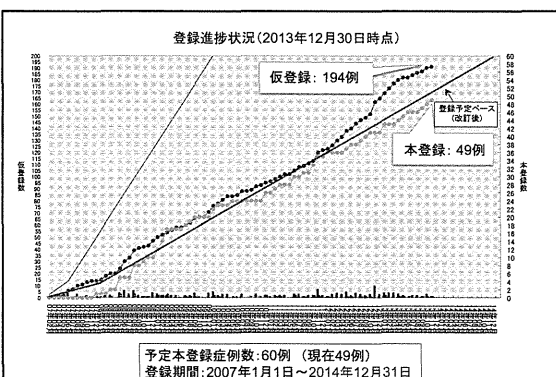
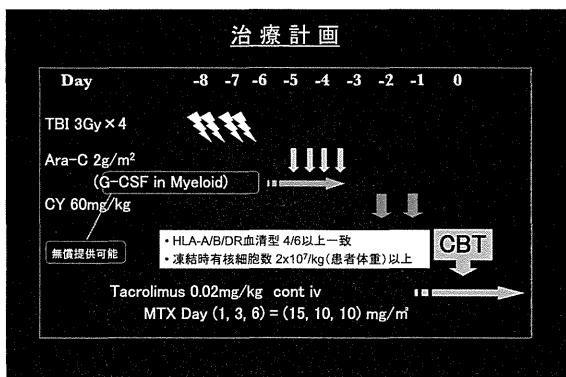


本登録適格基準

1. 原病の条件
 - ・急性白血病: ① 第一寛解期 染色体予後不良型など再発高リスク ② 第二寛解期以降の寛解期
 - ・MDS, CMML: IPSS Int-2 or high risk 無治療または化学療法により寛解となった症例
2. 年齢: 16歳以上55歳未満
3. Performance status 0-1
4. HCT-CI 0点
5. 臍帯血ユニット: HLA-A/B/DR血清型 4/6以上一致 凍結時核細胞数 2×10^7 /kg (患者体重) 以上
6. 初回造血幹細胞移植
7. 文書による同意が得られている。

主要評価項目

Day 180 生着生存



参加施設

<p>1 名古屋大学医学部附属病院 血液内科</p> <p>2 安城更生病院 血液内科</p> <p>3 愛知県がんセンター中央病院 血液・細胞療法部</p> <p>4 愛知県厚生連昭和病院 血液化学療法科</p> <p>5 名古屋第一赤十字病院 血液内科</p> <p>6 名古屋第二赤十字病院 血液内科</p> <p>7 豊橋市民病院 血液内科</p> <p>8 名鉄病院 血液内科</p> <p>9 トヨタ記念病院 血液内科</p> <p>10 三重大学医学部附属病院 血液内科</p> <p>11 岡崎市民病院 血液内科</p> <p>12 東北大学医学部附属病院 血液リウマチ膠原病内科</p> <p>13 豊橋県立中央病院 血液腫瘍内科</p> <p>14 市立西宮病院 内科</p> <p>15 宮城県立がんセンター病院 血液内科</p> <p>16 札幌北病院 血液内科</p> <p>17 金沢医科大学病院 血液・リウマチ膠原病科</p> <p>18 国立国際医療センター 血液内科</p> <p>19 静岡県立総合病院 第一内科</p> <p>20 札幌医科大学附属病院 第四内科</p> <p>21 北海道大学病院 第二内科</p> <p>22 徳島赤十字病院 血液科</p> <p>23 愛媛県立中央病院 血液腫瘍内科</p> <p>24 岐阜大学附属病院 血液感染症内科</p>	<p>25 熊本医療センター 内科</p> <p>26 中京病院 血液科</p> <p>27 鳥取大学医学部附属病院 血液内科</p> <p>28 九州がんセンター 血液内科</p> <p>29 仙台医療センター 血液内科</p> <p>30 愛知医科大学病院 血液内科</p> <p>31 鳥取県立中央病院 血液内科</p> <p>32 札幌医科大学附属病院 第一内科</p> <p>33 都立駒込病院 血液内科</p> <p>34 神奈川県立がんセンター 血液内科</p> <p>35 佐世保市立総合病院 血液内科</p> <p>36 横浜市立大学附属 市立総合医療センター 血液内科</p> <p>37 市立旭川病院 血液内科</p> <p>38 岐阜市民病院 血液内科</p> <p>39 浜松医科大学附属病院 血液内科</p> <p>40 愛育病院 血液内科</p> <p>41 信州大学 血液内科</p> <p>42 岡山大学病院 血液・腫瘍・呼吸器内科</p> <p>43 大阪市立大学大学院医学系研究科 血液腫瘍病態学</p> <p>44 和歌山県立医科大学 血液内科学</p> <p>45 生長会 府中病院 血液内科</p> <p>患者センター (IRB承認書類到着順)</p>	<p>研究代表者 名古屋第一赤十字病院 血液内科 宮村 耕一</p> <p>効果安全性評価委員 名古屋第一赤十字病院 小児血液腫瘍科 加藤 剛二 千葉大学医学部附属病院 血液内科・輸血部 井関 徹</p> <p>事務局 名古屋大学医学部附属病院 血液内科 寺倉 精太郎 tsuka@med.nagoya-u.ac.jp 西田 徹也 trshida@med.nagoya-u.ac.jp</p> <p>データセンター NPO 血液疾患臨床研究サポートセンター(C-SHOT) support@c-shot.or.jp</p>
--	--	---

次期臍帯血移植臨床試験について

High

Int

Low

SCT

Chemo

→ A案: 非寛解のAL症例にCBT

→ C-SHOT 0601: 再発高リスク群 ALに対して前向き登録・寛解期に CBT

→ B案: 再発中間リスク群ALに対して前向き登録・寛解期に CBT

Single-unit cord blood transplantation following G-CSF-combined myeloablative conditioning for myeloid malignancies not in remission.

OS

Relapse

TRM

BBMT 2013 Konuma T et al.

至適免疫抑制は?

C-SHOT 0601: sMTX (15, 10, 10/m², Day 1, 3, 6) +LV and Tacrolimus

医科研方式 : sMTX (15, 10, 10/m², Day 1, 3, 6) +LV and CyA (2分割)

虎ノ門方式 : MMF and Tacrolimus

⇒ 後方視的試験を行ってはどうか。

- ・免疫抑制療法の詳細について調査
- ・TRUMP data と結合して解析
- ・来年末までには結論を得て、臨床試験を計画

計画している後方視的研究の概略

適格症例:

1. 移植時患者年齢16歳以上
2. TRUMP data baseへの登録の同意があること
3. 2000年1月～2012年12月までに行われた初回臍帯血移植

研究組織: 参加表明して下さった施設

造血幹細胞移植後消化管検体における *bradyrhizobium enterica* の検討

三春 祐太・田中 幸久・大田 泰徳 (東大医科研)

造血幹細胞移植は血液系腫瘍において唯一根治が期待できる治療法である。臍帯血移植は造血幹細胞移植の中の一つであり、現在、本邦ではその数が増加している。造血幹細胞移植では移植後に様々な合併症がおこるが、消化器症状は合併症の中でも大きな問題の一つとなっている。造血幹細胞移植後の消化器合併症の原因としては GVHD やサイトメガロウイルス感染、TMA などが挙げられるが、原因がはっきりしないものも存在している。

2011年に Herrera らが Cord colitis syndrome (CCS) なる疾患を提唱した (N Engl J Med 2011; 365:815-824)。Herrera らによると、CCS は臍帯血移植後症例の 10%程度に認められる疾患であり、臍帯血移植後 100 日程度で発症する。持続する下痢を主訴とし、GVHD やその他の既知の感染症を除外して、診断される。病理組織学的には大腸生検にて肉芽腫を観察するという特徴があり、全例がメロニダゾールの 2 週間程度の投与で軽快している。

その後、CCS については他施設からの報告が散見される程度であり、あまりまとまった報告はなく、その疾患体系そのものについて懐疑的な見方もあった。しかし、2013 年に同じグループから CCS 検体において、shotgun DNA sequencing を行ったところ、特異的に *Bradyrhizobium* 属の細菌に似た sequence が認められ、FISH でも存在が確認されたという報告がなされた (N Engl J Med 2013; 369:517-528)。

Bradyrhizobium 属は根粒菌の一種であり、マメ科植物の根に広く認められる菌体である。この菌は世界中に広く存在しており、その遺伝子配列も解読され、NCBI bioproject に登録されている。そのため、本邦においても同様の菌体の感染から CCS を発症している症例が存在している可能性がある。

CCS について、本邦からは組織学的な検討が多少なされているが、上記のような細菌学的な検討は全くされていない。そのため、我々は NCBI に公開されている *Bradyrhizobium* 属の遺伝子配列を解析し、*Bradyrhizobium* 属の共通配列を元にプライマーを作成した。このプライマーを用いることにより、PCR 法を用いて、*Bradyrhizobium japonicum* が検出可能であることを確認した。

続いて東京大学医科学研究所附属病院にて造血幹細胞移植を行い、移植前もしくは移植後に消化管生検を行った 57 症例 89 検体について、ホルマリン固定・パラフィン包埋検体から DNA を抽出し、PCR を行ったところ、*Bradyrhizobium* 属は一例からも検出されなかった。

今後、症例数を増やして解析を行い、本邦における CCS の頻度及びその特徴について解析する必要があると思われる。

ウイルス特異的細胞性免疫療法 -CTLバンクの構築を目指して-

藤田由利子・高橋 聡 (東大医科研)、小野敏明・森尾友宏(東京医科歯科大)

化学療法薬や造血細胞移植療法が高度に複雑化する中、感染症対策は重要な課題になっている。特に造血細胞移植後の CMV, EBV, HHV6 などのヘルペス属ウイルスに加え、BKV, AdV などによる重篤なウイルス感染症は予後に深く関与する。化学療法に依存する現行の感染症治療では、移植後のような免疫学的再構築が不十分な場合、長期投与による耐性或再発などが問題となっている。

世界的には、様々なウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)治療が移植医療に導入されており、多種ウイルス特異的 CTL 療法も治療や予防として実践されている。ドナー由来ウイルス特異的 CTL 療法は、HLA 不一致であっても grade II 以上の GVHD 頻度は極めて低く、安全かつ有効な治療として認識されている。また医療経済的にも有利との試算や報告もある。

一方、作成に時間がかかる問題点があり、その対策として迅速培養法が開発されつつあり、更には CTL バンクの樹立も模索されている。第三者からの CTL を安価かつ容易に樹立し、保存しておくことができれば必要時に、あるいは臍帯血移植、非感染ドナーからの移植レシピエントに投与することが可能であり、既に米国における探索的研究ではその安全性も検証されつつある。わが国においてもウイルス特異的 CTL 療法の導入・検証と展開が求められる。

我々は Baylor 医科大学で開発を進めている 7 種類のウイルスに対する多種ウイルス特異的 CTL 療法の技術を導入し、樹立方法の検証を開始した。多ウイルスの多種類の peptide mixture を用いて抗原刺激とし、さらにサイトカインにて増幅する方法であり、手法の最適化によりウイルスフリーかつ遺伝子導入不要で、短期間で投与可能な技術とされている。

我々はこの手法を用いて、造血移植後の罹患率、死亡率の高い CMV, EBV, AdV3ウイルスを対象に CTL 生成を行った。20×10⁶ 個の PBMC から開始し、約12日間で 100-150×10⁶ 個の細胞数を得ることができ、これらは9割以上が CD3 陽性細胞であり、約 20%の細胞が抗原刺激に対し IFN γ を産生しその特異性を確認した。我々はさらに日本での臨床応用の際の規制対応も見越して無血清培養系での、同方法での CTL 生成を安定して行えることを確認した。今後はこれらの CTL の異種反応や細胞傷害活性を確認し、さらに対象ウイルスを HHV6と BKV を加えた5種類に拡大する予定である。

一方で、日本における CTL バンク整備については、幅広い分野との意見交換とコンセンサス形成、支援を得ることが死活的に重要と考えている。

VII. H25年度研究成果報告会・抄録

平成 26 年 1 月 21 日

(東邦大学医療センター 大森病院・臨床講堂)

適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究

研究代表者：高橋 聡

東京大学医科学研究所・准教授

研究分担者：

安藤 潔

東海大学・教授

岩間 厚志

千葉大学大学院・教授

大津 真

東京大学医科学研究所・
准教授

高梨 美乃子

日本赤十字社・主幹

谷口 修一

虎の門病院・部長

服部 浩一

東京大学医科学研究所・
特任准教授

宮田 敏男

東北大学大学院・教授

宮村 耕一

名古屋第一赤十字病院・
部長

森尾 友宏

東京医科歯科大学・准教授

山口 拓洋

東北大学大学院・教授

研究協力者：

藤田 由利子

東京大学医科学研究所・
リサーチレジデント

山本 久史

虎の門病院・医員

寺倉 精太郎

名古屋大学・医員

中内 啓光

東京大学医科学研究所・
教授

長村 文孝

東京大学医科学研究所・
教授

A. 研究目的

臍帯血移植の安全性・成績向上と適応拡大を目指して移植合併症に対する新たな治療法の臨床開発と臍帯血バンク整備の支援を行う。特に、臍帯

血移植における最も深刻な合併症である生着不全、ウイルス感染症、GVHD についてのこれまでの基盤研究を継続しつつ臨床研究に発展させる。さらに、現行の移植方法の有効性の検証を目的とした前方視的臨床試験を支援すると共に、15年にわたる臍帯血バンク事業の問題点を総括し、新法の下で骨髓バンクと連携しながら移植細胞ソースを必要としている患者への安定供給を担保するための将来構想を考案する。

B. 方法

1. 線維素溶解系（線溶系）の作用を介した生着・造血回復促進法の開発（安藤・宮田）：線溶系を負に制御する PAI-1 を阻害する新規低分子化合物を開発し、PAI-1 阻害剤の臍帯血移植における有効性を明らかにする。
2. 新規低分子化合物による造血幹細胞増幅（岩間）：これまで複数同定してきた臍帯血造血幹細胞の体外増幅効果を持つ化合物について、合成展開による化合物の最適化とその評価、および培養系ならびに免疫不全マウスへの移植を用いた化合物による造血幹細胞増幅率の評価をおこなう。
3. 新規複数臍帯血移植の開発（大津・中内）：単一ユニットでは生着不全に陥るマウス造血幹前駆細胞を用いた移植モデルを作製して、4種類のアロ細胞と1種類のコンジェニック細胞を混合して移植し、アロ細胞が生着促進活性を有するかにつき検証する。これらをもとに、免疫不全マウスをレシピエントに実証研究を行う。
4. HLA 近似同種ウイルス特異的免疫細胞バンクの開発（森尾・高橋・藤田・長村）：米国ベイラー医科大学と連携をとり、移植後患者が感染症を発症した際の治療用細胞製剤として利用するための

CMV、EBV、アデノウイルス、BKV、HHV6 特異的細胞傷害性 T 細胞ラインを作成し、その際の 1) 血清添加あるいは無添加、2) CO₂ 透過性フィルター付きフラスコあるいは通常フラスコの差異を検討し、また 3) IL-4, IL-7 の濃度を替えて最低量のサイトカイン量を明らかにする。

5. 凝固・線溶系に作用する新規分子標的製剤による GVHD 治療法の開発 (服部) : GVHD モデルマウスを用い、凝固・線溶系因子プラスミンの新規阻害剤 Y0-2 の投与効果を確認し、急性 GVHD の病態における線溶系の機能解析、また線溶系を標的とした GVHD の分子療法の有効性、そして骨髓組織再生への影響を探る。さらに、各種幹細胞移植後で急性及び慢性 GVHD と診断された患者について、経時的に血中の一般検査所見、各種サイトカイン濃度、MMP、線溶系酵素活性、血液・組織中の各種組織細胞表面マーカーの発現等を精査し、急性 GVHD の重症度、臨床所見、造血組織再生と線溶系との関連性を明らかにする。

6. 移植成績の収集・解析と臨床試験の立案・遂行、および臍帯血バンクの活性化 (谷口・山本、宮村・寺倉、山口、高梨) : 虎の門病院で行われている高齢患者に対する前処置至適化に向けた臨床解析、および全国展開している前方視的研究である「成人難治性血液悪性腫瘍に対する非血縁者間臍帯血移植の有効性に関する研究」などの臨床試験の実施を支援する。さらに、東アジア (韓国、中国) との臍帯血移植臨床研究を立案する。また、造血移植支援新法施行後における臍帯血グラフトの品質向上・均一化に向けた議論を進め、臍帯血・骨髓バンクの連携関係の構築をも目指す。

C. 結果

臍帯血移植における合併症 (生着不全、GVHD) 克服を目指した凝固・線溶系を標的とした新規治

療法の開発に関しては、線溶系を制御する新規低分子化合物である PAI-1 阻害剤による移植細胞の生着促進作用 (安藤・宮田)、およびプラスミン阻害剤である Y0-2 による GVHD 病変の改善作用 (服部) について、それぞれの動物モデルにおいて有効性を明らかにした。前者においては、新規 PAI-1 阻害剤投与群は対照群に比べて造血増殖因子の発現量が亢進し、ドナー由来の造血細胞の有意に高い回復が認められた。また、総骨髓細胞数も新規 PAI-1 阻害剤投与によって迅速な回復が誘導されていた。さらに、生理食塩水投与群と比べて、PAI-1 阻害剤投与群の方が造血幹細胞の存在比率と細胞数共に有意に増加していた (安藤)。後者に関しては放射線照射を伴った F1 ハイブリッドのマウスモデルにおける急性及び慢性 GVHD の誘導に成功し、急性 GVHD マウスモデルの血液中においても同様の MMP の活性化とサイトカイン血中濃度増加が認められること、さらに MMP 阻害剤、加えて MMP 活性を上流から制御する線溶系因子プラスミンの活性阻害剤の投与により、GVHD によって形成される各種臓器中の組織病変、脾臓、末梢血中のリンパ球構成、症状・重症度が、有意に改善することを明らかにした。(服部)。

また、臍帯血中の造血幹細胞の増幅を目指した研究では、無血清培養条件でサイトカインとして SCF と TPO を加えて 7 日間培養したところ、MISK303 添加群において CD34+CD38-造血幹細胞は未添加群の約 2 倍に増加することが確認された。次に、上記の培養条件で 2 週間培養した細胞を免疫不全マウスに移植し、移植細胞数を限外希釈して MISK303 による造血幹細胞の増幅活性を評価したところ、機能的な造血幹細胞が約 3 倍に増加していることが確認された。(岩間)。「新規複数臍帯血移植」法の開発に関しては、4 種類のア

ロ Maus から純化したマウス造血幹前駆細胞の混合物は、拒絶方向の主要組織適合抗原ミスマッチ条件にかかわらず、同数（4種の合計と）のコンジェニック造血幹前駆細胞と遜色ない早期造血促進能を示した。レシピエントにおける不利な免疫反応は観察されなかったが、アロ細胞は長期に渡り混合キメラを形成した。コンジェニック細胞を全骨髄細胞として移植することで、アロ細胞からの長期キメラ形成はほぼ抑制された。（大津）。

多ウイルス特異的 T 細胞療法の開発に関しては、EBV (LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV (pp65, IE6), AdV (penton, hexon) の overlapping peptide を用いて刺激し、さらに IL-4, IL-7 で培養することにより（合計 12 日前後）特異的 T 細胞を得た。細胞は個別抄録が示すように CD3 が 95% 以上であり、また CD4 が優位となる。現時点では 5 名にて解析しているが CD4/CD8 比率はドナーによっても大きく異なっている。大半の細胞は CD45RO+CD62L+CCR7+ の central memory 分画にあり、一部が effector memory 分画であることが明らかになっている。それぞれの細胞は細胞内 IFN γ 染色および ELISPOT アッセイで特異的 T 細胞の存在が明らかになっており、合計するとほぼ 35% 程度が特異的 T 細胞、一方その他が非特異的 T 細胞という結果であった（森尾・高橋）。

臨床試験としては、虎の門病院での臍帯血ミニ移植における後方視的解析結果を基に、高齢者 AML/MDS を対象に FB4+TBI4Gy を用いた臍帯血移植の安全性・有効性に関する多施設前向き試験を進行中であり（谷口・山本）、名古屋グループにおける成人を対象とした標準的強度の前処置を用いた臍帯血移植の臨床試験も着実に症例数の築盛 k が進んでいる（宮村・寺倉）。また、国際共同臨床試験についても研究計画についての議論を進めた

（山口）。さらには、臍帯血バンクの問題点について、国際的な情報収集を進めると共に将来構想の確立に向けた議論を重ねた（高梨）。

D. 考察

臍帯血移植は、造血器腫瘍に対する根治療法として広く普及してきたが、依然として移植後合併症の発症率が高い傾向にあるため、早期の移植がより良好な臨床成績が得られるにもかかわらず、ギリギリまで移植時期が延ばされる、という背反するジレンマに陥っている。移植前処置法や移植細胞ルートの改良などの臨床試験を進めることにより、既存の方法を用いながら、その適正化を目指す一方で、最も深刻な問題である拒絶に対して、当研究グループでは幹細胞増幅や多種類の造血幹細胞使用、骨髄ニッチへの生着促進など様々なアプローチで移植細胞の生着率を向上させる方法の開発を進めている。前臨床試験は順調に進んでおり、今後は移植後の造血再構築促進効果を確認するための臨床研究の早期開始を目指す。さらに頻度の高い合併症としては、ウイルス感染症および GVHD が問題であり、QOL 低下のみならず二次性生着不全の誘因となる場合もある。現在、我々が取り組んでいる第三者ドナーからの多ウイルス特異的 CTL 療法、および新規プラスミン阻害剤による GVHD 抑制は既存の治療法とは全く異なる機序であり、臨床的有用性が強く期待される。また、新法のもとで、臍帯血バンクシステムの更なる安定化が求められる。

E. 結論

合併所克服のための新規治療法の開発により、臍帯血移植の安全性が高まることにより、必要な患者が早期に移植を決断できることで成績の向上と、高齢者への適応拡大が安全に進むことが強く期待される。