

20/4/5005A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業

(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 移植医療技術開発研究分野)

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

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 村田 誠

平成 27 年 (2015) 年 3 月



# 目 次

## I. 総括研究報告

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

村田 誠

1

## II. 分担研究報告

1. 放射線非照射による骨髄非破壊的前治療を用いた骨髄内臍帯血移植法の開発

村田 誠

11

2. 間葉系幹細胞を用いたステロイド不応性重症急性 GVHD に対する細胞治療法の開発

小澤 敬也

14

3. 臍帯血を洗浄せずに用いる骨髄内臍帯血ミニ移植の研究

小川 啓恭

16

4. 「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」に関する研究

豊嶋 崇徳

21

5. 同種造血幹細胞移植後合併症における HMGB1-RAGE 系の関与の検討

前田 嘉信

24

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

27

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

29

# I . 総括研究報告

## 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

名古屋大学医学部附属病院 血液内科 講師

### 研究要旨

造血幹細胞移植における生着効率の向上を目指して、臍帯血を直接骨髄内へ移植する骨髄内臍帯血移植の臨床試験を多施設で実施している。また間葉系幹細胞を併用する移植法を開発している。移植後免疫応答に関する基礎的解析を行っている。

### 研究分担者

村田 誠 名古屋大学医学部附属病院  
血液内科 講師

小澤敬也 東京大学医科学研究所附属  
病院長、先端医療研究セン  
ター・遺伝子治療開発分野  
教授

小川啓恭 兵庫医科大学内科学講座血  
液内科 教授

豊嶋崇徳 北海道大学大学院医学研究  
科血液内科学 教授

前田嘉信 岡山大学病院血液・腫瘍内  
科 講師

た新しい造血幹細胞移植法の実現を行  
う。

具体的には、骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植において、解凍した臍帯血を直接骨髄内へ移植する移植法の臨床試験を実施し、その安全性と有効性を確認する。この試験に成功すれば、臍帯血移植における生着不全を減らすことができるとともに、細胞数による制約が弱まり HLA 適合度のより高いユニットの選択が可能になり、GVHD 発症率が低下することも期待される。この移植法を骨髄移植や末梢血幹細胞移植に応用すれば、必要移植細胞数すなわち採取量を減らすことができ、その結果ドナーに掛かる負担を軽減することが可能になる。

また間葉系幹細胞を併用する移植法の実現を行う。これまで海外では、移植時に間葉系幹細胞を血管内へ輸注する臨床試験が行われたが、明確な生着促進効果を確認できていない。しかし間葉系幹細胞を骨髄内へ注入することで生着効率が高まることが動物実験で示されており、この結果をもとに間葉系幹細胞併用移植の開発基盤を作る。将来には骨髄内臍帯血移植と間葉系幹

### A. 研究目的

我が国における同種造血幹細胞移植件数は年々増加し、平成 24 年には 3500 件を超えた。同胞数が減少し非血縁ドナーからの移植が 3 分の 2 を占め、患者の高齢化が進み骨髄非破壊的前治療が多く用いられるようになった。これら非血縁ドナー、骨髄非破壊的前治療はいずれも生着不全の危険因子である。特に非血縁臍帯血移植において生着不全は約 2 割の頻度で発症し、生着効率向上の工夫が強く求められている。本研究班では、生着効率の向上を目指し

細胞輸注の併用も期待される。

## B. 研究方法

1. 成人血液悪性疾患に対する減量強度前治療を用いた骨髄内臍帯血移植法の臨床試験（村田、豊嶋、前田）

対象は減量強度前治療による同種臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者で、かつ選択基準（HLA-A, B, DR 血清型 4/6 以上一致、かつ凍結時の臍帯血有核細胞数が  $2.0 \times 10^7$ /患者体重 kg 以上）を満たす臍帯血ユニットが得られる患者。主として、フルダラビン+シクロフォスファミドによる前治療法と、短期メソトレキセート+タクロリムスによる GVHD 予防法を用いる。骨髄穿刺針を局所麻酔下で腸骨に穿刺し、解凍洗浄した臍帯血を注入する。試験デザインは臨床第 II 相試験で、主要評価項目は移植後 60 日の生着生存率。必要実施症例数は 21 例だが、不適格症例登録の可能性を考慮し予定登録数は 22 例とした。安全性への配慮として、生着不全、生着前早期死亡、骨髄内輸注に伴う grade 4 以上の有害事象の発生患者数で規定した試験早期中止基準を設定し、独立した効果安全性評価委員会を設置した。またモニタリングを定期開催し、その結果に基づき必要に応じて監査も適宜実施する。尚、全ての参加施設は倫理審査委員会の承認を得た上で実施している。

2. 臍帯血を洗浄せずに用いる骨髄内臍帯血ミニ移植の臨床試験（小川）

対象は初回臍帯血移植の適応となる 55~70 歳の血液悪性疾患患者で、かつ骨髄線維症を有しない患者に限る。フルダラビン+シクロフォスファミド+放射線全身照射による前治療法と、シクロスポリン+MMF による GVHD 予防法を用いる。試験デザインは臨床第

III 相試験で、安全性を評価する第 I 相試験は 10 例、有効性を評価する第 II 相試験は 30 例の登録数を予定した。

3. その他の施設における骨髄内臍帯血移植（村田）

上記の施設の他に、単施設で骨髄内臍帯血移植を試みている施設があり、これらの施設における研究の進捗状況を把握する。

4. 造血幹細胞移植における間葉系幹細胞の臨床応用（村田、小澤）

日本ケミカルリサーチ社による多施設共同臨床試験「同種造血幹細胞移植後に発症したステロイド抵抗性の急性移植片対宿主病（急性 GVHD）に対する JR-031 投与の第 II/III 相試験」（治験調整医師：小澤敬也）の評価を行う。対象はステロイド抵抗性の grade III-IV 急性 GVHD を合併した患者で、間葉系幹細胞（開発名：JR-031） $2 \times 10^6$  個/kg を週 2 回、4 週間投与する。必要症例数は 25 例。主要評価項目は 28 日間以上持続する CR とした。

5. 移植後免疫応答に関する基礎的解析（村田、豊嶋、前田）

マウス移植モデルを用いるなどして、移植後免疫応答に関する基礎的解析を行う。

## C. 研究結果

1. 成人血液悪性疾患に対する減量強度前治療を用いた骨髄内臍帯血移植法の臨床試験

これまでの試験実施症例数は計 19 例となった。臍帯血ユニットの解凍、洗浄、濃縮や、骨髄内への注入などは問題なく実施できている。今年度中に発生した至急報告義務のある有害事象は生着不全の 1 例。ただし通常の臍帯血移植後に一定の頻度で起こりうる事象であり、効果安全性評価委員によりそ

の後の試験継続は可と判断された。2014年7月6日にモニタリング検討会を開催した。臍帯血洗浄バッグの改良を製造元のニプロ株式会社と共同で行い、既に新しい規格の製品が市販化された。

### 2. 臍帯血を洗浄せずに用いる骨髄内臍帯血ミニ移植の臨床試験

安全性を確認する臨床第Ⅰ相試験に引き続いて、有効性を検討する第Ⅱ相試験を多施設で実施した。登録症例数は既に予定の30例に到達しており、現在は移植後観察期間に入っている。

### 3. その他の施設における骨髄内臍帯血移植の試み

単施設で骨髄内臍帯血移植を実施している2施設より、平成26年7月5日開催の班会議で実施状況の報告が行われた。

### 4. 造血幹細胞移植における間葉系幹細胞の臨床応用

ステロイド抵抗性 grade III-IV 急性 GVHD を合併した患者を対象とした臨床第Ⅱ/Ⅲ相試験を実施した。登録症例数は25例。初回投与時から24週までの期間に28日間以上継続したCRを達成した症例は12例(48%)だった。臓器別では、腸管20例中16例(80%)、皮膚12例中8例(67%)、肝6例中4例(67%)でCRとなった。間葉系幹細胞投与による輸注毒性、異所性組織形成は認めなかった。また間葉系幹細胞投与との因果関係を積極的に示唆する死亡例はなかった。

### 5. 移植後免疫応答に関する基礎的解析

マウス移植モデルを用いて、同種移植では同系移植と比べて移植後7日目の血清中 HMGB-1 濃度が有意に高いことを確認した。次に HMGB-1 の受容体である RAGE を欠損したマウスをレシピエントとした移植モデルにおいて、

野生型マウスをレシピエントとした場合と比べ、より重症の GVHD が発症することを確認した。さらに抗 HMGB-1 抗体の投与により急性 GVHD が減弱することを確認した。

移植後シクロフォスファミドを用いた HLA 半合致末梢血幹細胞移植後の生着不全3例について検討したところ、不適合 HLA を認識する1回目移植ドナーの GVHD 関連 T 細胞が2回目ドナー細胞に対して作用し生着不全に至った可能性が示唆された。

## D. 考察

冒頭で述べたように、我が国では非血縁者間移植や骨髄非破壊的移植が増加しているが、これらはいずれも生着不全の危険因子である。そして生着不全を来した患者の多くは死に至ることから、生着効率の高い新しい移植法の開発が望まれている。本研究では、放射線を用いない骨髄非破壊的前治療による骨髄内臍帯血移植法の臨床試験を進めており、開発に成功すれば生着率の高い、放射線性二次癌のない、小児成長障害の少ない、治療関連合併症の少ない臍帯血移植法が確立されるものと期待される。

一方、骨髄移植ではドナーから全身麻酔下での大量骨髄液採取を必要とし、また末梢血幹細胞移植では5日間の G-CSF 投与と場合によっては複数日に渡るアフエレーシスをドナーに強いる。骨髄内移植法や間葉系幹細胞を用いた新しい移植法を骨髄移植や末梢血幹細胞移植に応用することができれば、生着に必要な移植細胞数を減らすことができ、ドナーに掛かる身体的・精神的負担が軽減され、ドナー拡大も期待できる。



## E. 結論

臍帯血を洗浄した上で移植する骨髄内臍帯血移植と、洗浄しないで移植する骨髄内臍帯血移植の両試験を継続する。同時に、間葉系幹細胞を用いた新しい移植法の開発を進める。またそれらの開発の基盤となる基礎研究を進める。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

論文発表

<研究代表者：村田 誠>

1. Kato T, Nishida T, Ito Y, Murase M, Murata M, Naoe T. Correlations of programmed death 1 expression and serum IL-6 level with exhaustion of cytomegalovirus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Immunol.* 288 (1-2): 53-9, 2014.
2. Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, Shimada K, Tomita A, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M. Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3  $\zeta$  Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8+ T Cells. *J Immunol.* 194 (3): 911-20, 2015.
3. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T, Miyamura K, Sao H, Ichinohe T, Saji H, Kato S, Atsuta Y, Kawa K, Kodera Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donor Program. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone

marrow transplantation. *Blood.* 125(7): 1189-97, 2015.

<研究分担者：小澤敬也>

1. Suzuki T, Oh I, Ohmine K, Meguro A, Mori M, Fujiwara S, Yamamoto C, Nagai T, Ozawa K. Distribution of serum erythropoietin levels in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol.* 101(1): 32-6, 2015.
2. Okabe H, Suzuki T, Uehara E, Ueda M, Nagai T, Ozawa K. The bone marrow hematopoietic micro-environment is impaired in iron-overloaded mice. *Eur J Haematol.* 93(2): 118-28, 2014.
3. Fujiwara S, Muroi K, Tatara R, Ohmine K, Matsuyama T, Mori M, Nagai T, Ozawa K. Intrathecal administration of high-titer cytomegalovirus immunoglobulin for cytomegalovirus meningitis. *Case Rep Hematol.* 2014: 272458, 2014.

<研究分担者：小川啓恭>

1. 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. *Int J Hematol.* 99: 463-70, 2014.
2. Konuma T, Ooi J, Uchida N, Ogawa H, Ohashi K, Kanamori H, Aotsuka N, Onishi Y, Yamaguchi H, Kozai Y, Nagamura-Inoue T, Kato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kato S, Asano S, Takahashi S.

- Granulocyte colony-stimulating factor combined regimen in cord blood transplantation for acute myeloid leukemia: a nationwide retrospective analysis in Japan. *Haematologica*. 99: 264-8, 2014.
3. Eguchi R, Fujimori Y, Okada M, Tamaki H, Wakabayashi I, Ogawa H. Recombinant human soluble thrombomodulin attenuates FK506-induced endothelial dysfunction through prevention of Akt inactivation. *Exp Cell Res*. 323: 112-7, 2014.
  4. Yamahara K, Harada K, Ohshima M, Ishikane S, Ohnishi S, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Soma T, Ogawa H, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Harada-Shiba M, Kangawa K, Ikeda T. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 9: e88319, 2014.
  5. Nomura S, Ishii K, Maeda Y, Katayama Y, Yagi H, Fujishima N, Ota S, Seki M, Okada M, Ikezoe T, Hayashi K, Fujita S, Satake A, Ito T, Kyo T, Ishida Y, Chiba S, Ogawa H, Tanimoto M, Sawada K. The preventative effects of recombinant thrombomodulin on transplantation-associated coagulopathy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Stem Cell Res Ther*. 4: 247, 2014.
  6. Matsuda I, Okada M, Inoue T, Tokugawa T, Ogawa H, Hirota S. Primary follicular lymphoma of the spleen incidentally found in a patient with alcohol- and hepatitis C-related liver cirrhosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 7: 4484-8, 2014.
  7. Aoki J, Ishiyama K, Taniguchi S, Fukuda T, Ohashi K, Ogawa H, Kanamori H, Eto T, Iwato K, Sakamaki H, Morishima Y, Nagamura T, Atsuta Y, Takami A. Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia patients with central nervous system involvement. *Biol Blood Marrow Transplant*. 20: 2029-33, 2014.
  8. Ueki D, Ikegame K, Kozawa M, Miyamoto J, Mori R, Ogawa H. Risk analysis of falls in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin J Oncol Nurs*. 18: 396-9, 2014.
  9. Matsuoka Y, Nakatsuka R, Sumide K, Kawamura H, Takahashi M, Fujioka T, Uemura Y, Asano H, Sasaki Y, Inoue M, Ogawa H, Takahashi T, Hino M, Sonoda Y. Prospectively isolated human bone marrow cell-derived MSCs support primitive human CD34-negative hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, in press.
  10. Fuji S, Takano K, Uchida N, Ogawa H, Ohashi K, Eto T, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Fukuda T. Pretransplant diabetes mellitus is a risk factor for infection-related mortality, after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, in press.
- <研究分担者：豊嶋崇徳>
1. Nakasone H, Fukuda T, Kanda J, Mori T, Yano S, Kobayashi T, Miyamura K, Eto T, Kanamori H, Iwato K, Uchida N, Mori S, Nagamura-Inoue T, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T, Murata M. Impact of conditioning intensity and TBI



- on acute GVHD after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2014 Dec 22. [Epub ahead of print]
2. Koyama M, Hashimoto D, Nagafuji K, Eto T, Ohno Y, Aoyama K, Iwasaki H, Miyamoto T, Hill GR, Akashi K, Teshima T. Expansion of donor- reactive host T cells in primary graft failure after allogeneic hematopoietic SCT following reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.* 49(1): 110-5, 2014.
  3. Sugiyama H, Maeda Y, Nishimori H, Yamasuji Y, Matsuoka KI, Fujii N, Kondo E, Shinagawa K, Tanaka T, Takeuchi K, Teshima T, Tanimoto M. Mammalian target of rapamycin inhibitors permit regulatory T cell reconstitution and inhibit experimental chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(2): 183-91, 2014.
  4. Shono Y, Shiratori S, Kosugi-Kanaya M, Ueha S, Sugita J, Shigematsu A, Kondo T, Hashimoto D, Fujimoto K, Endo T, Nishio M, Hashino S, Matsuno Y, Matsushima K, Tanaka J, Imamura M, Teshima T. Bone marrow graft-versus-host disease: evaluation of its clinical impact on disrupted hematopoiesis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(4): 495-500, 2014.
  5. Shigematsu A, Kobayashi N, Yasui H, Shindo M, Kakinoki Y, Koda K, Iyama S, Kuroda H, Tsutsumi Y, Imamura M, Teshima T. High level of serum soluble interleukin-2 receptor at transplantation predicts poor outcome of allogeneic stem cell transplantation for adult T cell leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20(6): 801-5, 2014.
  6. Shiratori S, Wakasa K, Okada K, Sugita J, Akizawa K, Shigematsu A, Hashimoto D, Fujimoto K, Endo T, Kondo T, Shimizu C, Hashino S, Teshima T. *Stenotrophomonas maltophilia* infection during allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience. *Clin Transplant.* 28(6): 656-61, 2014.
  7. Iwasaki J, Kondo T, Darmanin S, Iyata M, Onozawa M, Hashimoto D, Sakamoto N, Teshima T. FIP1L1 presence in FIP1L1-RARA or FIP1L1-PDGFR $\alpha$  differentially contributes to the pathogenesis of distinct types of leukemia. *Ann Hematol.* 93(9): 1473-81, 2014.
  8. Takashima S, Eto T, Shiratsuchi M, Hidaka M, Mori Y, Kato K, Kamezaki K, Oku S, Henzan H, Takase K, Matsushima T, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T. The use of oral beclomethasone dipropionate in the treatment of gastrointestinal graft-versus-host disease: the experience of the Fukuoka blood and marrow transplantation (BMT) group. *Intern Med.* 53(12): 1315-20, 2014.
  9. Takahata M, Hashino S, Onozawa M, Shigematsu A, Sugita J, Fujimoto K, Endo T, Kondo T, Tanaka J, Imamura M, Teshima T. Hepatitis B virus (HBV) reverse seroconversion (RS) can be prevented even in non-responders to hepatitis B vaccine after allogeneic stem cell transplantation: long-term analysis of intervention in RS with vaccine for patients with previous HBV infection. *Transpl Infect Dis.* 16(5): 797-801, 2014.

10. Arai S, Arora M, Wang T, Spellman SR, He W, Couriel DR, Urbano-Ispizua A, Cutler CS, Bacigalupo AA, Battiwalla M, Flowers ME, Juckett MB, Lee SJ, Loren AW, Klumpp TR, Prockup SE, Ringdén OT, Savani BN, Socié G, Schultz KR, Spitzer T, Teshima T, Bredeson CN, Jacobsohn DA, Hayashi RJ, Drobyski WR, Frangoul HA, Akpek G, Ho VT, Lewis VA, Gale RP, Koreth J, Chao NJ, Aljurf MD, Cooper BW, Laughlin MJ, Hsu JW, Hematti P, Verdonck LF, Solh MM, Norkin M, Reddy V, Martino R, Gadalla S, Goldberg JD, McCarthy PL, Pérez-Simón JA, Khera N, Lewis ID, Atsuta Y, Olsson RF, Saber W, Waller EK, Blaise D, Pidala JA, Martin PJ, Satwani P, Bornhäuser M, Inamoto Y, Weisdorf DJ, Horowitz MM, Pavletic SZ; Graft-vs-Host Disease Working Committee of the CIBMTR. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation - A Report from CIBMTR. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014 Oct 30. [Epub ahead of print]
11. Hayase E, Fujimoto K, Mitsuhashi T, Hatanaka Y, Yoshida M, Takemura R, Iwasaki J, Shiratori S, Sugita J, Kondo T, Tanaka J, Imamura M, Matsuno Y, Teshima T. Epstein-barr virus-associated smooth muscle tumors after bone marrow transplantation. *Transplantation*. 97(1): e1-3, 2014.
12. Teshima T. JAK inhibitors: a home run for GVHD patients? *Blood*. 123(24): 3691-3, 2014.

<研究分担者：前田嘉信>

1. Okamoto S, Fujiwara H, Nishimori H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanaka T, Yoshimura A, Tanimoto M, Maeda Y. Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates experimental chronic graft versus host

disease via suppression of IFN- $\gamma$ /IL-17-producing cells. *J Immunol*. 194(3): 1357-63, 2015.

2. 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*. 20(2): 183-91, 2014.

学会発表

<研究代表者：村田 誠>

1. Watanabe K, Terakura S, Uchiyama S, Martens AC, van Meerten T, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M. Excessively high-affinity single-chain fragment variable region in a chimeric antigen receptor can counteract T-cell proliferation. The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Dec 2014, San Francisco, California.
2. Watakabe K, Miyamura K, Ozawa Y, Okada M, Yamashita T, Murata M, Ishikawa T, Uike N, Hidaka M, Kobayashi R, Imamura M, Tanaka J, Ohashi K, Taniguchi S, Ikeda T, Eto T, Mori M, Muroi K, Ozawa K. Efficacy of mesenchymal stem cells for the treatment of steroid-refractory aGVHD. The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Dec 2014, San Francisco, California.
3. Arai Y, Kanda J, Nakasone H, Kondo T, Uchida N, Fukuda T, Ohashi K, Ogawa H, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Hirokawa M, Atsuta Y, Murata M. Analysis of risk factors for hepatic acute graft-versus-host disease by using transplant registry data in

Japan. 2015 BMT Tandem Meetings. Feb 2015, San Diego, California.

<研究分担者：小川啓恭>

1. Ishiyama K, Miyawaki S, Kitamura K, Suzuki K, Ishikawa J, Ogawa H, Imai K, Naoe T, Chiba S, Miyazaki Y, Hatta Y, Kurokawa M, Ueda Y, Koga D, Sugiyama H, Takaku F. Clinical usefulness of WT1 mRNA expression in bone marrow detected using a new WT1 mRNA assay kit for monitoring acute myeloid leukemia: A comparison with peripheral blood WT1 mRNA expressions. The 19th European Hematology Association. Jun 12-15, 2014, Milan, Italy.

2. Ikegame K, Kaida K, Ishii S, Yoshihara S, Taniguchi K, Inoue T, Tamaki H, Okada M, Soma T, Ogawa H. Spousal hematopoietic stem cell transplantation for post-transplant relapse/rejection. 2015 BMT Tandem Meetings, Feb 11-15, 2015, San Diego, California.

3. Ueki S, Tsujitani M, Teranishi Y, Miyamoto J, Mori R, Ogawa H, Ikegame K. Prediction of skin trouble in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using generalized additive model. 2015 BMT Tandem Meetings, Feb 11-15, 2015, San Diego, California.

4. Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Kaida K, Inoue T, Okada M, Soma T, Ogawa H. Low incidence of human herpesvirus 6 reactivation in unmanipulated HLA-haploidentical related stem cell transplantation with corticosteroid as graft-versus-host disease prophylaxis. 2015 BMT

Tandem Meetings, Feb 11-15, 2015, San Diego, California.

5. 小川啓恭. 進行期血液腫瘍に対する、低容量 ATG とステロイドを用いた unmanipulated haploidentical RIST. 第 37 回日本造血細胞移植学会, Mar 5-7, 2015. 神戸, Presidential symposium.

6. 海田勝仁、池亀和博、井上貴之、岡田昌也、玉置広哉、相馬俊裕、藤盛好啓、小川啓恭. High tumor burden を有する HLA 半合致移植患者に対する、減量 GVHD 予防の有用性. 第 37 回日本造血細胞移植学会, Mar 5-7, 2015. 神戸, Workshop.

7. 海田勝仁、池亀和博、井上貴之、岡田昌也、玉置広哉、相馬俊裕、藤盛好啓、小川啓恭、ハプロタイプを共有しない血縁ドナーからの造血幹細胞移植. 第 37 回日本造血細胞移植学会, Mar 5-7, 2015. 神戸, 口演.

<研究分担者：豊嶋崇徳>

1. 豊嶋崇徳. 造血幹細胞移植：HLA バリアを超えて. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, May 15, 2014. 奈良.

<研究分担者：前田嘉信>

1. Kuroi T, Okamoto S, Saeki K, Kobayashi Y, Nishimori H, Fujiwara H, Matsuoka K, Fujii N, Kondo E, Tanimoto M, Maeda Y. Anti-IL-12/23 p40 antibody attenuates chronic graft versus host disease via suppression of IFN- $\gamma$ /IL-17 -producing cells. The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Dec 2014, San Francisco, California.

2. 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, Mar 7-9, 2014, 沖縄.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得	なし
実用新薬登録	なし
その他	なし

## II. 分担研究報告

## 放射線非照射による骨髄非破壊的前治療を用いた骨髄内臍帯血移植法の開発

研究分担者 村田 誠 名古屋大学医学部附属病院血液内科 講師

### 研究要旨

非血縁臍帯血移植における生着率の改善を目的として、解凍した臍帯血を直接骨髄内へ移植する骨髄内臍帯血移植の臨床第 II 相試験を実施している。対象は骨髄非破壊的臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者で、放射線非照射による前治療法を用いる。骨髄穿刺針を局所麻酔下で腸骨に穿刺し、解凍洗浄した臍帯血を注入する。主要評価項目は移植後 60 日の生着生存率。必要症例数は 21 例で、これまでの総実施症例数は 19 例となった。臍帯血ユニットの解凍、洗浄、濃縮や、骨髄内への注入に伴う重篤な有害事象はこれまで発生していない。今年度中に発生した至急報告義務のある有害事象は 1 例あるが、効果安全性評価委員よりその後の試験継続は可と判断された。引き続き本臨床試験を進める。

### A. 研究目的

我が国では患者の高齢化により、骨髄非破壊的前治療を用いた非血縁臍帯血移植件数が増加している。この骨髄非破壊的臍帯血移植における生着不全の発症頻度は約 2 割と高く、その多くは死に至ることから、生着効率を高めた新しい移植法の開発が望まれている。我々は非血縁臍帯血移植における生着率の改善を目的として、解凍した臍帯血を直接骨髄内へ移植する骨髄内臍帯血移植の臨床第 II 相試験を実施している。

### B. 研究方法

対象は骨髄非破壊的前治療による同種臍帯血移植の適応となる成人血液悪性疾患患者で、かつ選択基準 (HLA-A, B, DR 血清型 4/6 以上一致、かつ凍結時の臍帯血有核細胞数が  $2 \times 10^7$ /患者体重 kg 以上) を満たす臍帯血ユニットが得

られる患者。主として、フルダラビン + シクロフォスファミドによる前治療法と、短期メソトレキセート + タクロリムスによる GVHD 予防法を用いる。骨髄穿刺針を局所麻酔下で腸骨に穿刺し、解凍洗浄した臍帯血を注入する。主要評価項目は移植後 60 日の生着生存率。必要症例数は 21 例で不適格症例が 1 例登録されることを見込み予定登録数は 22 例とした。当初は単一施設で開始したが、現在は名古屋大学のほか、北海道大学、東北大学、新潟大学、金沢大学、岡山大学による多施設共同研究として実施している。全ての施設で倫理審査委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

今年度はこれまでに 2 例実施し、総実施症例数は 19 例となった。臍帯血ユニットの解凍、洗浄、濃縮や、骨髄内への注入などは問題なく実施出来てい



る。今年度中に発生した至急報告義務のある有害事象は生着不全の1例。ただし通常の臍帯血移植でも一定の頻度で起こりうる事象であり、効果安全性評価委員によりその後の試験継続は可と判断された。2014年7月6日にモニタリング検討会を開催した。臍帯血洗浄バッグの改良を製造元のニプロ株式会社と共同で行い、既に新しい規格の製品が市販化された。

#### D. 考察

本移植法の開発に成功すれば、臍帯血移植における生着不全を減らすことができ、また細胞数による制約が弱まることでHLA適合度のより高いユニットの選択が可能になり、GVHD発症率が低下することが期待される。また骨髄移植や末梢血幹細胞移植に応用することで、必要移植細胞数すなわち採取量を減らすことができ、ドナーに掛かる負担を軽減することが可能になると期待される。

#### E. 結論

引き続き、放射線照射を用いない骨髄非破壊的骨髄内臍帯血移植の臨床試験を進める。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Kato T, Nishida T, Ito Y, Murase M, Murata M, Naoe T. Correlations of programmed death 1 expression and serum IL-6 level with exhaustion of cytomegalovirus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cell Immunol.* 2014,

288(1-2): 53-9.

2. Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, Shimada K, Tomita A, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M. Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3  $\zeta$  Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol.* 2015, 194(3): 911-20.

3. Morishima Y, Kashiwase K, Matsuo K, Azuma F, Morishima S, Onizuka M, Yabe T, Murata M, Doki N, Eto T, Mori T, Miyamura K, Sao H, Ichinohe T, Saji H, Kato S, Atsuta Y, Kawa K, Kodera Y, Sasazuki T; Japan Marrow Donor Program. Biological significance of HLA locus matching in unrelated donor bone marrow transplantation. *Blood.* 2015, 125(7): 1189-97.

##### 2) 学会発表

1. Watanabe K, Terakura S, Uchiyama S, Martens AC, van Meerten T, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M. Excessively high-affinity single-chain fragment variable region in a chimeric antigen receptor can counteract T-cell proliferation. The 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Dec 2014, San Francisco, California.

2. Watakabe K, Miyamura K, Ozawa Y, Okada M, Yamashita T, Murata M, Ishikawa T, Uike N, Hidaka M, Kobayashi R, Imamura M, Tanaka J, Ohashi K, Taniguchi S, Ikeda T, Eto T, Mori M, Muroi K, Ozawa K. Efficacy of mesenchymal stem cells for the treatment of steroid-refractory aGVHD. The 56th Annual Meeting of the

American Society of Hematology, Dec 2014, San Francisco, California.

3. Arai Y, Kanda J, Nakasone H, Kondo T, Uchida N, Fukuda T, Ohashi K, Ogawa H, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Hirokawa M, Atsuta Y, Murata M. Analysis of risk factors for hepatic acute graft-versus-host disease by using transplant registry data in Japan. 2015 BMT Tandem Meetings. Feb 2015, San Diego, California.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得	なし
実用新薬登録	なし
その他	なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患等実用化研究事業）  
分担研究報告書

間葉系幹細胞を用いたステロイド不応性重症急性 GVHD に対する細胞治療法の開発

研究分担者 小澤敬也 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 間葉系幹細胞 (MSC) は、ステロイド不応性の重症急性 GVHD に対して効果があるものと考えられている。そこで、我が国で実施された急性 GVHD に対する MSC 治療の多施設第 II/III 相臨床試験の評価を行い、有効性を検討した。本臨床試験では、ステロイド抵抗性のグレード III- IV の急性 GVHD を発症した 25 例を対象とした。4 週後の時点で CR 6 例、PR 9 例、MR 4 例、NC 1 例であり、28 日間以上継続した CR を達成した患者は、12 例 (48%) であった。MSC 投与後 4 週の時点で高い治療効果 (OR 60%) が得られ、そのような症例の予後は極めて良好であった。MSC 投与との因果関係を積極的に示唆する有害事象はなく、MSC 投与による輸注毒性、異所性組織形成は認められなかった。その結果、MSC 治療の有効性と安全性が示唆された。

#### A. 研究目的

間葉系幹細胞 (MSC: mesenchymal stem/stromal cells) は、血管内投与を行うと組織傷害部位や炎症部位などに集積する性質があり、また免疫抑制作用があることから、ステロイド抵抗性の重症急性 GVHD に対して効果があるものと考えられている。ヨーロッパで実施された第 II 相臨床試験では、60~70% の有効性が認められたと報告されている。米国オサイリス社が実施した第 III 相臨床試験では、二次治療との併用という形で二重盲検試験が行われたが、MSC の有効性は確認されなかった。但し、肝 GVHD あるいは消化管 GVHD に限定してみると、MSC 併用群の方が良好な治療成績であった。我が国では、JCR ファーマ株式会社がヒト間葉系幹細胞 (JR-031) の臨床開発を進めており、前年度に報告したように、「同種造血幹細胞移植後に発症した標準治療抵抗性の急性移植片対宿主病 (急性 GVHD) に対する JR-031 投与の第 I/II 相試験」が 2007 年から開始された。対象患者は、ステロイド抵抗性の重症急性 GVHD で、14 例のうち、9 例がグレード II、5 例がグレード III の GVHD であった。14 例中 13 例で奏効 (8 例で CR、5 例で PR) が得られた。この臨

床試験で重症急性 GVHD に対する MSC 治療の有効性が示唆されたが、グレード II を含む非盲検試験であるため、明確な結論を出すには至らなかった。二次治療を行わない対照群をおいた二重盲検試験を行うことはできないため、次の段階として、自然経過での改善が期待しがたいグレード III とグレード IV のステロイド抵抗性急性 GVHD 患者を対象とした JR-031 投与の第 II/III 相試験が実施され、MSC の有効性及び安全性に関する検討が行われた。

本研究は、MSC を新たな造血幹細胞移植法の開発に役立てることを目的に、上記臨床試験の結果を調査する。

#### B. 研究方法

JCR ファーマ株式会社が実施した「同種造血幹細胞移植後に発症したステロイド抵抗性の急性移植片対宿主病 (急性 GVHD) に対する JR-031 投与の第 II/III 相試験」(治験調整医師: 小澤敬也) について評価を行った。2011 年 11 月から 2012 年 9 月にかけて allo-HSCT を施行され、ステロイド抵抗性のグレード III- IV の急性 GVHD を発症した 25 例を対象とした。MSC (開発名: JR-031) を  $2 \times 10^6$  cells/kg を週 2 回、4 週間投与 (症例によってはさら



に週1回投与を4週間継続)し、その他の二次治療は行わなかった。主要評価項目は、28日間以上持続するCRとした。副次主要評価項目は、4週後の時点でのOR (CR or PR)とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、既に実施された第II/III相臨床試験について、その結果の報告に基づいてMSC治療の評価を行うものであり、倫理的な問題が生ずることはない。

### C. 研究結果

年齢中央値は33.0歳(5-66)。男性15例、女性10例であった。急性GVHDグレードIII 22例、グレードIV 3例であった。4週後の時点でCR 6例(24%)、PR 9例(36%)、MR 4例(16%)、NC 1例(4%)であり、初回投与時から24週までの期間に28日間以上継続したCRを達成した患者は、12例(48%)であった。臓器別では腸管20例中16例(80%)、皮膚12例中8例(67%)、肝6例中4例(67%)でCRとなった。24週時点で生存している患者は、25例中15例(60%)であった。有害事象は、25例全例に認められ、「白血球数減少」12例(48%)、「血小板数減少」9例(36%)、「敗血症」、「貧血」、「血栓性微小血管症」、「肝機能異常」が各6例(24%)などであった。死亡した10例のうちJR-031との因果関係を完全には否定しえなかった死因は、TTP 1例、肺炎1例、敗血症1例、再発1例であったが、いずれもJR-031との因果関係を積極的に示唆するものではなかった。MSC投与による輸注毒性、異所性組織形成は認められなかった。

### D. 考察

自然経過での改善が期待しがたいグレードIII以上のステロイド抵抗性急性GVHDにおいても、JR-031投与により28日間継続するCRが48%の患者に認められ、これらの症例では、24週の観察期間中、急性GVHDの再燃はなかった。また、JR-031投与後4週の時点で高い治療効果(OR 60%)が得られ、そのような症例の

予後は極めて良好であった。以上の結果から、GVHDに対するMSC治療が有効であると判断され、2014年9月26日、日本初の細胞性医薬品としてJR-031の製造販売承認申請が行われた。

今後の新しい方向性としては、移植片の拒絶を防ぎ、生着を促進する効果を期待したMSC治療に興味を持たれる。このようなMSC併用造血幹細胞移植法は、特に臍帯血移植において有用と考えられ、骨髄内移植法への応用が期待される。

### E. 結論

ステロイド抵抗性の重症急性GVHDに対する治療として、MSC治療の有効性と安全性が示唆された。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Suzuki, T., Oh, I., Ohmine, K., Meguro, A., Mori, M., Fujiwara, S., Yamamoto, C., Nagai, T., and Ozawa, K.: Distribution of serum erythropoietin levels in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. *Int. J. Hematol.* 101(1): 32-36, 2015.
2. Okabe, H., Suzuki, T., Uehara, E., Ueda, M., Nagai, T., and Ozawa, K.: The bone marrow hematopoietic microenvironment is impaired in iron-overloaded mice. *Eur. J. Haematol.* 93(2): 118-128, 2014.
3. Fujiwara, S., Muroi, K., Tatara, R., Ohmine, K., Matsuyama, T., Mori, M., Nagai, T., and Ozawa, K.: Intrathecal administration of high-titer cytomegalovirus immunoglobulin for cytomegalovirus meningitis. *Case Rep Hematol.* 2014: 272458, 2014.

### H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

なし

臍帯血を洗浄せずに用いる骨髄内臍帯血ミニ移植の研究

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

臍帯血移植における、拒絶、生着不全という問題点を克服するための 1 つの方法として、骨髄内へ直接移植する骨髄内移植の有用性を検討した。高齢者にも適用することを考慮し、RIST の形で行った。臍帯血処理時の幹細胞の loss を少なくするため、臍帯血を洗浄せずに用いることとした。第 I 相試験(10 例)では、この手技の安全性を、第 II 相試験(30 例)では、有用性を検討した。第 I 相試験は、すでに終了したが、骨髄内への移植に関して、問題となる合併症は認められなかった。10 例中 9 例が生着し、ドナー由来の生着は速やかであった。それに引き続いて、第 II 相試験を、多施設共同前方向試験で実施した。予定した 30 例の患者登録はすでに完了し、現在、観察期間に入っている。骨髄内臍帯血ミニ移植は、臍帯血移植後の拒絶、生着不全を克服する手段と有用である可能性がある。

A.研究目的

臍帯血移植は、コーディネート期間をほとんど必要とせず移植ができる、ドナー/レシピエント間の HLA 不適合を許容できるなどの利点から、本邦では数多く施行されている。しかし、他の移植源に比べて、拒絶率が高い、移植後の造血能の回復が遅いという問題点が存在する。これらの問題点を解決するために、1) 複数臍帯血移植、2) 体外増幅臍帯血移植などの試みがなされているが、それぞれに問題点があり、臨床応用されるまでには至っていない。臍帯血移植の問題点の克服に向けて、我々は、骨髄内に直接臍帯血を移植する、骨髄内臍帯血移植を研究

してきた。造血幹細胞移植において、通常、造血幹細胞は、患者の静脈内へ移植されてきたが、動物実験によると、このように投与された造血幹細胞は、骨髄にまで到達するものは 10%程度で、残りは、肺などの非造血組織に trap されるということが示された。そのため、世界的にも、骨髄内臍帯血移植の臨床研究がなされてきた。その主なものは、イタリアの Frassoni らのグループのものと、米国ミネソタの Brunstein らのグループのものであるが、前者が、生着率が向上したと報告したのに対して、後者はそれを否定する内容のものであった。その違いを明らかにするため、本研究は、

reduced-intensity conditioning stem cell transplantation (RIST)の条件で、骨髄内臍帯血移植を行い、その有用性を明らかにすることを目的とする。さらに、少ない幹細胞をできるだけ失うことなく、骨髄内へ移植するため、臍帯血を洗浄することなく、移植することとし、その有用性、安全性についても検討を加える。

## B. 研究方法

1) 対象：安全性を検討する第 I 相試験は 10 例、有用性を検討する第 II 相試験は、30 例の予定で実施する。

2) 患者選択：

a) 年齢：55-70 歳の初回移植

b) 疾患：

- 1) 第 1 寛解期を除く急性白血病
- 2) Philadelphia 染色(+)の急性白血病
- 3) 第 1 慢性期を除く慢性骨髄性白血病
- 4) 化学療法抵抗性非ホジキンリンパ腫

5) IPSS scale で INT-2、あるいは high risk の骨髄異形成症候群

c) 他の条件：

- 1) HLA 適合ドナーが、血縁内、あるいは骨髄バンクに得られない。
- 2) 骨髄線維症がない。
- 3) 移植方法：前処置は、fludarabine 40 mg/m<sup>2</sup> x 5 日、cyclophosphamide 50 mg/kg x 1、TBI 3 Gy とした。臍帯血は、解凍後 4 つに分け、洗浄することなく、腸骨の 4 か所に分けて移植した。骨髄内投与時の疼痛に対して、局所麻酔薬のみ

の使用で行った。GVHD 予防は、cyclosporine と MMF で行った。

(倫理面への配慮)

「骨髄内臍帯血ミニ移植 臨床第 I/II 相試験」のプロトコールは、平成 19 年 7 月 7 日(第 I 相試験)と平成 23 年 1 月 21 日(第 II 相試験)に、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。また、第 II 相試験に関しては、各施設において、同様の倫理審査委員会で検討され、承認を受けた。

## C. 研究結果

第 I 相試験は、急性骨髄性白血病 5 例、急性リンパ性白血病 2 例、骨髄異形成症候群 1 例、悪性リンパ腫 2 例の計 10 例の患者に対して、行われた。臍帯血を洗浄せずに骨髄内移植を行ったが、問題となる合併症は認められなかった。その内、9 例でドナー由来の生着が得られた。好中球および血小板の生着日の中央値は、それぞれ 17 日と 41 日であった。full chimerism 達成の中央値は、T 細胞分画で 15 日、顆粒球分画で 20 日であった。II 度以上の重症 GVHD は、4 例で認めら