

Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

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

担当責任者 神田 善伸 自治医科大学医学部 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。現在は承認申請に向けて準備を行っている。また、研究分担者の賀古らとともに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。13 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(任期：H27 年 3 月まで)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の移植で行わ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)に加えてアテ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)とアテ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。

アテ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 言を用い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に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継続して行う。

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、アテ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によってアテ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の期間はアテ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。

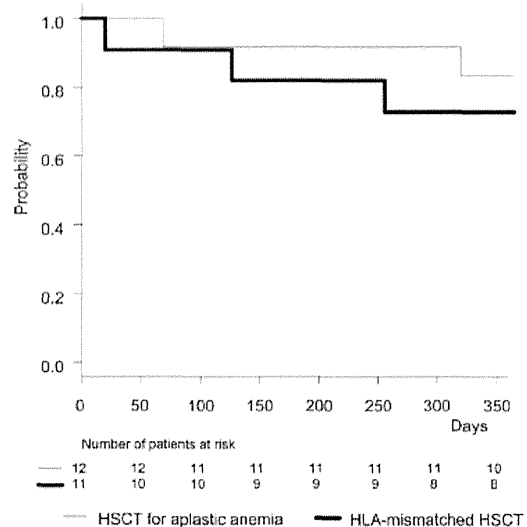


図 移植後生存曲線 (Am J Hematol 2013;88:294-300)

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、特に進行期腫瘍症例ではより低用量での投与が適切かもしれない。現在はさらにアテ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13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一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一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いうことが示された。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、当該論文は平成27年1月時点で既に100編以上の英文論文に引用されており、医学研究の発展に貢献している。

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、承認申請の準備を進めている。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と同時に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標とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nitta H, Terui Y, Yokoyama M, Mishima Y, Nishimura N, Ueda K, Kusano Y, Tsuyama N, Takeuchi K, Kanda Y, Hatake K. Absolute peripheral monocyte count at diagnosis predicts central nervous system relapse in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 100: 87-90,2015.
2. Kimura SI, Murata T, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Nakasone H, Kikuchi M, Yamazaki R, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. Economic evaluation of a preemptive treatment strategy for invasive fungal infection in neutropenic patients with hematological diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015.
3. Kikuchi M, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Sakamoto K, Kawamura K, Ishihara Y, Sato M, Ashizawa M, Terasako-Saito K, Kimura S, Yamazaki R, Kanda J, Kako S, Nishida J, Kanda Y. Risk factors for pre- and post-engraftment

- bloodstream infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2015.
4. Yamazaki R, Tanaka Y, Nakasone H, Sato M, Terasako-Saito K, Sakamoto K, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Yamasaki R, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Ashizawa M, Kimura SI, Kikuchi M, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. Allotype analysis to determine the origin of cytomegalovirus immunoglobulin-G after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 16: 904-913,2014.
 5. Terasako-Saito K, Nakasone H, Tanaka Y, Yamazaki R, Sato M, Sakamoto K, Ishihara Y, Kawamura K, Akahoshi Y, Hayakawa J, Wada H, Harada N, Nakano H, Kameda K, Ugai T, Yamasaki R, Ashizawa M, Kimura SI, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, Kanda Y. Persistence of recipient-derived as well as donor-derived clones of cytomegalovirus pp65-specific cytotoxic T cells long after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 16: 930-940,2014.
 6. Tanaka Y, Yamazaki R, Terasako-Saito K, Nakasone H, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Kimura S, Kikuchi M, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. Universal cytotoxic activity of a HTLV-1 Tax-specific T cell clone from an HLA-A*24:02(+) patient with adult T-cell leukemia against a variety of HTLV-I-infected T-cells. *Immunol Lett.* 158: 120-125,2014.
 7. Takami A, Yano S, Yokoyama H, Kuwatsuka Y, Yamaguchi T, Kanda Y, Morishima Y, Fukuda T, Miyazaki Y, Nakamae H, Tanaka J, Atsuta Y, Kanamori H. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis by the Adult Acute Myeloid Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20: 1785-1790,2014.
 8. 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, 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.
 9. Sakamoto K, Nakasone H, Tsurumi S, Sasaki K, Mitani K, Kida M, Hangaishi A, Usuki K, Kobayashi A, Sato K, Karasawa-Yamaguchi M, Izutsu K, Okoshi Y, Chiba S, Kanda Y. Prednisone versus high-dose dexamethasone for untreated primary immune thrombocytopenia. A retrospective study of the Japan Hematology & Oncology Clinical Study Group. *Journal of thrombosis and thrombolysis.* 37: 279-286,2014.
 10. Nakaya A, Mori T, Tanaka M, Tomita N, Nakaseko C, Yano S, Fujisawa S, Sakamaki H, Aotsuka N, Yokota A, Kanda Y, Sakura T, Nanya Y, Saitoh T, Kanamori H, Takahashi S, Okamoto S. Does the hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index (HCT-CI) predict transplantation outcomes? A prospective multicenter validation study of the Kanto Study Group for Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20: 1553-1559,2014.
 11. 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 S, Kikuchi M, Tanihara A, Kanda J, Kako S, Nishida J, Yamada S, Kanda Y. Impact of high-/middle-molecular-weight adiponectin on the synthesis and regulation of extracellular matrix in dermal fibroblasts. *Exp Hematol.* 42: 261-273,2014.
 12. Nakasone H, Tanaka Y, Yamazaki R, Terasako K, Sato M, 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 T-cell receptor-beta analysis of HLA-A*2402-restricted CMV- pp65-specific cytotoxic T-cells in allogeneic hematopoietic

- SCT. *Bone Marrow Transplant.* 49: 87-94,2014.
13. Muroi K, Fujiwara S, Tatara R, Sato K, Oh I, Ohmine K, Suzuki T, Nagai T, Ozawa K, Kanda Y. Two granulocytic regions in bone marrow with eosinophilia evaluated by flow cytometry. *J Clin Exp Hematop.* 54: 243-245,2014.
 14. Kodera Y, Yamamoto K, Harada M, Morishima Y, Dohy H, Asano S, Ikeda Y, Nakahata T, Imamura M, Kawa K, Kato S, Tanimoto M, Kanda Y, Tanosaki R, Shiobara S, Kim SW, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R, Hamajima N, Fukushima M, Tamakoshi A, Halter J, Schmitz N, Niederwieser D, Gratwohl A. PBSC collection from family donors in Japan: a prospective survey. *Bone Marrow Transplant.* 49: 195-200,2014.
 15. Kimura S, Wada H, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Yamasaki R, Ashizawa M, Machishima T, Sato M, Terasako K, Nakasone H, Kikuchi M, Okuda S, Kako S, Kanda J, Yamazaki R, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. D-index dose not predict the development of pulmonary infection in acute myeloid leukemia patients undergoing consolidation chemotherapy with high-dose cytarabine. *Hematology.* 19: 107-112,2014.
 16. Kimura S, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Nakasone H, Kikuchi M, Yamazaki R, Kako S, Kanda J, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. Antibiotic prophylaxis in hematopoietic stem cell transplantation. A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Infect.* 69: 13-25,2014.
 17. Kikuchi M, Nakasone H, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Sakamoto K, Kawamura K, Ishihara Y, Sato M, Ashizawa M, Terasako-Saito K, Kimura SI, Yamazaki R, Kako S, Kanda J, Nishida J, Sekiguchi N, Noto S, Kida M, Hangaishi A, Usuki K, Kanda Y. Reduced-dose (two-thirds) R-CHOP chemotherapy for elderly patients with non-Hodgkin lymphoma. *J Chemother.* 1973947814Y0000000219,2014.
 18. Kawamura K, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Machishima T, Terasako K, Kimura S, Kikuchi M, Nakasone H, Yamazaki R, Kanda J, Kako S, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. Prophylactic role of long-term ultra-low-dose acyclovir for varicella zoster virus disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Infect Dis.* 19: 26-32,2014.
 19. Kanda Y, Wada H, Yamasaki R, Kawamura K, Ishihara Y, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Machishima T, Terasako-Saito K, Kimura S, Nakasone H, Kikuchi M, Yamazaki R, Kanda J, Kako S, Nishida J, Tsunoda H, Omori Y, Nakazawa M, Tanaka O. Protection of ovarian function by two distinct methods of ovarian shielding for young female patients who receive total body irradiation. *Ann Hematol.* 93: 287-292,2014.
 20. 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 human leukocyte antigen allele mismatch combinations on the outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20: 526-535,2014.
 21. Kanda J, Ichinohe T, Fuji S, Maeda Y, Ohashi K, Fukuda T, Miyamura K, Iwato K, Eto T, Nakamae H, Kobayashi N, Mori T, Mori SI, Morishima Y, Atsuta Y, Kanda Y. The impact of HLA mismatch direction on the outcome of unrelated bone marrow transplantation: A retrospective analysis from the JSHCT. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014.
 22. Kanda J, Fuji S, Kato S, Takami A, Tanaka J, Miyamura K, Ohashi K, Fukuda T, Ozawa Y, Kanamori H, Eto T, Kobayashi N, Iwato K, Morishima Y, Sakamaki H, Atsuta Y, Kanda Y. Decision analysis for donor selection in stem cell transplantation-HLA-8/8 allele-matched unrelated donor vs HLA-1 AG mismatched related donor. *Blood Cancer J.* 4: e263,2014.
 23. Ishihara Y, Kanda J, Tanaka K, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Kawamura K, Sakamoto K, Ashizawa M, Sato M, Terasako-Saito K, Kimura S, Kikuchi M, Nakasone H, Yamazaki R, Kako S, Nishida J,

- Watanabe K, Kanda Y. Severe oral infection due to *Lactobacillus rhamnosus* during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 100: 607-610,2014.
24. Fuji S, Kanda J, Kato S, Ikegame K, Morishima S, Miyamoto T, Hidaka M, Kubo K, Miyamura K, Ohashi K, Kobayashi H, Maesako Y, Adachi S, Ichinohe T, Atsuta Y, Kanda Y. Impact of HLA allele mismatch on the clinical outcome in serologically matched related hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 49: 1187-1192,2014.
25. Ashizawa M, Akahoshi Y, Nakano H, Ugai T, Wada H, Yamasaki R, Ishihara Y, Kawamura K, Sakamoto K, Sato M, Terasako K, Kimura S, Kikuchi M, Nakasone H, Kako S, Kanda J, Yamazaki R, Tanihara A, Nishida J, Kanda Y. A combination of fludarabine, half-dose cyclophosphamide, and anti-thymocyte globulin is an effective conditioning regimen before allogeneic stem cell transplantation for aplastic anemia. *Int J Hematol.* 99: 311-317,2014.

2. 学会発表

1. 斎藤桐子、仲宗根秀樹、田中ゆきえ、佐藤美樹、山崎理絵、赤星佑、中野裕史、鶴飼知嵩、和田英則、山崎諒子、石原優子、河村浩二、坂本佳奈、蘆澤正弘、木村俊一、菊地美里、奥田慎也、諫田淳也、賀古真一、西田淳二、神田善伸 造血幹細胞移植後 CMV 特異的細胞傷害性 T 細胞の受容体レパトアおよびキメリズム解析. 第76回日本血液学会学術集会 2014年11月 大阪
2. 賀古真一、赤星佑、原田尚憲、中野裕史、亀田和明、鶴飼知嵩、山崎諒子、和田英則、石原優子、河村浩二、坂本佳奈、佐藤美樹、蘆澤正弘、町島智人、寺迫 斎藤桐子、木村俊一、菊地美里、仲宗根秀樹、山崎理絵、諫田淳也、神田善伸 抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリン(ATG: サイモグロブリン)を用いた、進行期造血器腫瘍に対する HLA 不適合同種造血幹細胞移植の安全性と有効性に関する後方視的検討. 第37回日本造血細胞移植学会総会 2015年3月 神戸
3. 諫田淳也、前田嘉信、大橋一輝、福田隆浩、宮村耕一、森慎一郎、森島泰雄、熱田由子、神田善伸 非血縁者間骨髄移植における HLA 不適合方向が移植成績に及ぼす影響- JSHCT HLA ワーキンググループによる後方視的解析.

- 第37回日本造血細胞移植学会総会 2015年3月 神戸
4. 河村浩二、赤星佑、原田尚憲、中野裕史、亀田和明、鶴飼知嵩、和田英則、山崎諒子、石原優子、坂本佳奈、蘆澤正弘、佐藤美樹、斎藤桐子、木村俊一、菊地美里、仲宗根秀樹、山崎理絵、諫田淳也、賀古真一、神田善伸. 自家造血幹細胞移植後の低用量アシクロビルによる HSV および VZV 再活性化予防の後方視的研究. 第37回日本造血細胞移植学会総会 2015年3月 神戸
 - G. 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

少量 ATG とステロイドを GVHD 予防に用いた HLA 半合致 RIST の多施設前方向試験 に関する研究に関する研究

担当責任者 小川 啓恭 兵庫医科大学血液内科 主任教授

研究要旨

少量 ATG と steroid を GVHD 予防に用いる unmanipulated HLA 半合致ミニ移植を、多施設前方向試験の形で、第 I/II 相試験を行った。第 I 相試験の主要評価項目は、ドナー由来の生着であり、10 名を予定した。全員、ドナー由来の生着が得られたので、第 II 相試験に移った。第 II 相試験の主要評価項目は、100 日生存として、25 名の登録の予定であったが、1 名登録基準に合わず、24 名の登録となった。34 名を合わせて解析し、ドナー生着率は 97.1%、100 日生存は 88.2%であった。顆粒球および血小板の生着の中央値は、それぞれ、11 日と 17.5 日であった。重症の急性 GVHD および慢性 GVHD(extensive type)の発症率は、それぞれ、30.7%と 20%であった。移植 1 年時点での Transplant-related mortality は 26.5%であった。CR/CP 例、および non-CR 例の 1 年生存率は、それぞれ 62.5%と 42.3%であった。多変量解析では、移植前の病期が、唯一有意に再発を上昇させる因子として同定された ($p=0.0424$)。移植可能なドナーが timely に見いだされない場合には、少量 ATG と steroid を GVHD 予防に用いる HLA 半合致ミニ移植を考慮すべきである。

A. 研究目的

HLA の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。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。1980 年代後半、海外の移植施設において HLA 適合同胞間移植の場合と同様の移植方法、すなわち骨髄破壊的前処置と GVHD 予防 (シクロスポリン + 短期メソトレキセート) を用いて、HLA 半合致移植が多数実施された。その結果は、HLA 血清 1 抗原不適合移植では HLA 適合移植とほぼ同等の長期生存が得られるのに対し、血清 2-3 抗原不適合移植では予後は不良であった。不成功に終わった主な原因は、高頻度(80-90%)に発症する重症 GVHD にあった。

これを克服するため、イタリアの Perugia 大学の Martelli らは、イスラエルの Reisner とともに、移植片から T 細胞を除去して移植する、T 細胞除去移植について、精力的に研究し、最終的に、大量の CD34 陽性細胞の輸注とともに、輸注 CD3(+) T 細胞数を、 $1.0 \times 10^4/\text{kg}$ 患者体重まで下げることで、ドナー生着率 93.1%、急性 GVHD 発症率 8%、慢性 GVHD 発症率 7.1%

と優れた成績を得るに至った。一方、中国の北京大学の Dao-Pei Lu らは、抗ヒト T リンパ球抗体(ATG)を用いて、in vivo T cell purging を行うことで、T 細胞非除去 HLA 半合致移植を実施した。その結果、生着率 100%、急性 GVHD 40%、2 年での TRM 22%、再発率 18%であり、HLA 適合同胞ドナーからの移植に比べて、いずれのパラメーターでも有意差がなかったと報告した。さらに、最近になって、米国を中心に、移植直後に高容量 cyclophosphamide(Cy)を投与することで、免疫学的寛容に導入する、T 細胞非除去 HLA 半合致移植、すなわち post-transplant Cy 療法が盛んに行われるようになった。post-transplant Cy による HLA 半合致移植を複数臍帯血移植と比較する試験が行われた結果、post-transplant Cy と臍帯血の生着率は 96%と 94%、1 年生存率は 62%と 54%、急性 GVHD は 32%と 40%、1 年での TRM は 7%と 24%、1 年での再発率は 45%と 31%であり、両者はほぼ同等と考えられた。いずれの方法も、HLA 半合致移植において、ドナー生着と GVHD の克服という点において、成功を得ている。しかし、非寛解期例に対しては、再発が多く、依然 GVL 効果が高いという証拠は得られていない。

HLA 半合致移植に高い GVL 効果を期待する

には、GVL 反応を GVHD から分離する方法を考える必要がある。しかし、上述したドナー T 細胞の量を、量的にコントロールするだけでは、GVL と GVHD を分離することはできない。我々は、意図的に少量の ATG を用いることで、ドナー T 細胞を残しつつ、steroid を用いることで、炎症性 cytokine の産生を抑制し、この低濃度 cytokine milieu 下、同種免疫反応を起こすことで、GVHD を伴わない GVL 効果の実現を目指せると考えている。

厚労省班研究として実施した、HLA 半合致ドナーからの RIST の多施設前方向試験の結果を報告する。

B. 研究方法

1) 主要評価項目

第 1 相試験(10 人): 移植後 35 日以内のドナー生着率

第 2 相試験(25 人): 移植後 100 日時点での生存率

2) 副次的評価項目

- a) 急性 GVHD の頻度と重症度
- b) 慢性 GVHD の頻度と重症度
- c) 移植後 1 年時点での生存率など

3) 対象疾患:

- a) 慢性骨髄性白血病: 第 2 慢性期以降の慢性期、移行期、急性転化期、非慢性期再発で、芽球 30%未満
- b) 急性骨髄性白血病: 第 2 寛解期以降の寛解期、初回寛解導入不能、非寛解期で、芽球 30%未満
- c) 急性リンパ性白血病: 第 2 寛解期以降の寛解期、初回寛解導入不能、非寛解期で、芽球 30%未満
- d) 骨髄異形成症候群・骨髄異形成/増殖性疾患: IPSS にて intermediate-II または high
- e) 悪性リンパ腫:
 - i. 初回治療で PR に至らない症例
 - ii. 第 1 再発後の第 1 種類目の救援療法で PR に至らない症例
 - iii. 第 2 再発後の症例
 - iv. 造血幹細胞移植後も寛解に至らない症例または再発例

4) 適格条件

- i. 年齢: 登録時、35 歳以上 60 歳以下
- ii. HLA-A, -B, -DR の血清型一致または GVHD 方向 1 抗原以内不一致血縁ドナーを有しない
- iii. 骨髄バンク(JMDP)において HLA-A, -B, -DR の血清型一致かつ遺伝子型で HLA-A, -B, -DRB1 の不一致が 1 座以内の非血縁ドナーを有さないか、病勢が強く早期の移

植が必要であると考えられる症例

- iv. 血縁(兄弟、親または子)に HLA haplotype の一致した GVHD 方向 HLA 血清 2, 3 抗原不適合ドナーを有する症例
- v. Performance status が ECOG に基準で 0 または 1 の症例。

5) 移植前処置

- i. リン酸フルダラビン: 30 mg/m²/day, day -10 から day -5
- ii. プスルファン: 4 mg/kg/day, day -6 と day -5 の 2 日間に経口投与する
- iii. 抗ヒト T リンパ球ウサギ免疫グロブリン: 2 mg/kg, day -4 から day -1
- iv. シタラビン: 非寛解期症例で、芽球が 10% 以上 30%未満の場合に用いる。2 g/m²/day, day -10 から day -6

6) 造血幹細胞: 末梢血幹細胞を用いる。

7) GVHD 予防:

- i. タクロリムス: day -2 から、0.02 mg/kg で開始し、目標血中濃度は、day 0-20, 10-15 ng/ml; day 20-30, 8-12 ng/ml; day 30 以降、7-10 ng/ml
- ii. メチルプレドニゾロン: 1 mg/kg/day で day 1 から開始。Day 15 以降、sIL-2R 値などを参考にして、週 20%のスピードで減量する。

(倫理面への配慮)

「血縁者間 HLA 半合致ミニ移植(臨床第 I/II 相試験)」のプロトコールは、平成 17 年 10 月 18 日、兵庫医科大学の倫理委員会で承認を受けている。同様のプロトコールを、参加施設の倫理委員会で承認を受けた。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

この臨床試験は、本邦の 5 施設が参加して、前方向試験の形で行われた。第 I 相試験の結果、10 例全例でドナー由来の生着を得たので、第 II 相試験に入った。第 II 相試験では、予定通り 25 例の登録がなされたが、内 1 例で、criteria に合わなかったため、除外され、第 II 相試験として 24 例が行われ、第 II 相の 10 例と合わせて、計 34 例の解析が行われた。最終的なドナー生着率は、97.1%(33/34)であった。顆粒球および血小板の生着の中央値は、それぞれ 11 日と 17.5 日であった。Day 100 での生存率は、88.2%であった。重症の急性 GVHD の発症率、

慢性 GVHD(extensive type)の発症率は、それぞれ、30.7%と20%であった。移植1年時点での Transplant-related mortalityは26.5%であった。CR/CP例、およびnon-CR例の1年生存率は、それぞれ62.5%と42.3%であった。多変量解析では、移植前の病期が、唯一有意に再発を上昇させる因子として同定された(p=0.0424)。

D. 考察

少量ATGとsteroidをGVHD予防に用いるHLA半合致ミニ移植 regimenは、安定した高いドナー生着率が得られた。非寛解期症例が多かったにもかかわらず、100日生存率が、88.2%と高く、移植 regimenとしての安全性が示された。ただ、不成功に終わった原因の多くは、再発であったことから、今後、前処置 regimenの強化が求められる。

E. 結論

移植可能なドナーが timelyに見いださない場合には、少量ATGとsteroidをGVHD予防に用いるHLA半合致ミニ移植は、考慮すべき移植手段である。

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たが、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なかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. *International Journal of Hematology*. 99: 463-470, 2014.
2. 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. *Experimental Cell Research*. 323: 112-117, 2014.
3. 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.

4. 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, Naoe T. Allogeneic transplantation for primary myelofibrosis with bone marrow, peripheral blood, or umbilical cord blood: An analysis of the JSHCT. *Bone Marrow Transplantation*. 49: 355-360, 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. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. 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: 4484-4488, 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. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20: 2029-2033, 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. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 18: 396-399, 2014.
- ##### 2. 学会発表
1. The 19th European Hematology Association 2014.6.12-15, Milan, Italy. 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.
 2. 2015 BMT Tandem Meetings,

- 2015.2.11-15, 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.
3. 2015 BMT Tandem Meetings, 2015.2.11-15, 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.
4. 2015 BMT Tandem Meetings, 2015.2.11-15. 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.
5. 2015 BMT Tandem Meetings, 2015.2.11-15. 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.
6. 第 37 回日本造血細胞移植学会 2015.3.5-7, 神戸, Presidential symposium, 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
7. 第 37 回日本造血細胞移植学会 2015.3.5-7, 神戸, Workshop, 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
8. 第 37 回日本造血細胞移植学会 2015.3.5-7, 神戸, 口演, 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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
なし。

HLA不適合血縁者間移植の治療成績を向上し、
造血器疾患治療における位置づけを明らかにするための研究

担当責任者 田中 淳司 東京女子医科大学血液内科 主任教授

研究要旨

再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植では、重症度、年齢、罹病期間、輸血量、HLA抗体の有無などが予後に影響するとされているが、血縁・非血縁バンクドナーの存在しない非血縁臍帯血移植における生着不全は再生不良性貧血において重要な問題である。Post Cyを用いる血縁者間HLA半合致末梢血幹細胞移植は生着不全例に対して比較的早く準備ができ、効果が期待できる移植法である可能性が示唆された。

A. 研究目的

再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植では、重症度、年齢、罹病期間、輸血量、HLA抗体の有無などが予後に影響するとされている。本研究では当科における再生不良性貧血患者の臨床的特徴を解析し、移植成績を向上させるためにどのような移植前処置が有効であるのかを検討する事を目的とした。

B. 研究方法

再生不良性貧血患者の移植前のフェリチン値、HLA抗体の有無、ドナー、移植前処置と移植成績について解析するとともに、臍帯血移植後の生着不全に対して Post Cy を用いる血縁者間HLA半合致末梢血幹細胞移植を施行し生着を得られた症例について報告する。

C. 研究結果

当科では、再生不良性貧血患者 9 人に、計 10 回の同種造血細胞移植が行われていた。年齢中央値 33 歳(20~65 歳)、患者の年齢構成は 20 歳代 3 人、30 歳代 4 人、60 歳代 2 人であった。性別は男性 3 人、女性 6 人。発症から移植までの期間は中央値 60.2 カ月 (6.9~587 カ月) であり罹病期間の長い高齢者が多かった。移植前のフェリチン値は 2,190ng/mL (19~62,258 ng/mL), 総赤血球輸血が 50 単位を超える症例は

6 例 (最大約 600 単位)、HLA 抗体陽性例は 2 例であった。ドナーは HLA 一致同胞からの移植が 6 人、非血縁者骨髄移植が 2 人、1 例で非血縁臍帯血移植と生着不全のため HLA 半合致の血縁ドナーより移植が行われた。

前処置は cyclophosphamide (CY) 200mg/kg + total lymphoid irradiation (TLI) 5Gy が 4 例, CY + anti-thymocyte globulin (ATG) 1 例, fludarabine (Flu) + CY + ATG ± total body irradiation (TBI) 4 例, fludarabine (Flu) + Mel + total body irradiation (TBI) が 1 例で用いられていた。非血縁臍帯血移植後の生着不全が 1 例あったが、その他の 8 例は中央値移植後 20 日 (16~24 日) で好中球の生着が確認された。

18 歳時に他院で再生不良性貧血と診断され、2000 年頃より輸血依存となった 65 歳女性は 2013 年 6 月 HLA-C 2 座 + DR 1 座が不適合の血清型 5 / 8 一致非血縁ドナーより Flu + CY + ATG + TBI 2Gy を前処置として同種骨髄移植を行い移植後 Day21 で生着し、現在 1 年半を超え外来通院している。

最近経験した生着不全の症例は 20 歳の中国人女性。重症再生不良性貧血に ATG + CyA 療法を行うも無効。国内および中国のバンクにも至適ドナーが不在で、抗 HLA 抗体陽性、CyA 脳症を有していた。このため、2014 年 11 月 Flu 30mg/m² x 5 日間 + Mel 80mg/m² x 1 日間 + TBI 4Gy を前処置として、非血縁間臍帯血移植を施行した。免疫抑制剤は FK506 (脳症のため

PSL 1mg/kg に途中変更) + Short MTX を用いた。この際のドナーは血清学的には HLA-A, B, C 各一座不適合の 5/8 合致, DNA 型は DR のみ合致の 2/8 合致ドナーで、細胞数は患者体重あたり $2.51 \times 10^7/\text{kg}$, CD34 $0.51 \times 10^5/\text{kg}$ の臍帯血を移植した。しかし、生着不全となり初回移植後 Day 57 を 2 回目の Day0 として、HLA 半合致 (HLA 血清型 4/8 合致) の母親から Flu $30\text{mg}/\text{m}^2 \times 5$ 日間 + CPA $15\text{mg}/\text{kg} \times 2$ 日間 + TBI 2Gy の前処置に、post CY $50\text{g}/\text{kg} \times 2$ 日間 + MMF $15\text{mg}/\text{kg} \times 3/\text{日}$ + PSL $1\text{mg}/\text{kg}$ の免疫抑制で末梢血幹細胞移植を行った。母親の HLA 型に対する抗 HLA 抗体を有してはいたが、1 回目の移植前より 2 回目の移植時には力価が低下していて低～中力価になっていた。移植後 Day20 に好中球 $500/\mu\text{L}$ 以上に回復し生着が得られた。

D. 考察

当科における再生不良性貧血に対する移植の特徴として、罹病期間の長いことが挙げられる。中央値で約 5 年であるが、発症から 2 年以内の移植は 3 例にとどまり、最長は発症から約 49 年の症例があった。罹病期間の長い高齢者であっても Flu+CY+ATG+TBI 2Gy を前処置として同種骨髄移植を施行し生着が得られている。しかし輸血量の多さから抗 HLA 抗体を有する例も多く、血縁、非血縁バンクドナーの存在しない非血縁臍帯血移植における生着不全は再生不良性貧血において重要な問題である。

Clay らは再生不良性貧血 8 例 (うち 4 例は同種移植後の生着不全) に対して Post Cy を用いた HLA 半合致末梢血幹細胞移植を施行し 8 例中 6 例に生着が認められたと報告している。最近、我々も臍帯血移植後の生着不全に対して Post Cy を用いる血縁者間 HLA 半合致末梢血幹細胞移植を施行し生着を得られた症例を経験した。

E. 結論

Post Cy を用いる血縁者間 HLA 半合致末梢血幹細胞移植は生着不全例に対して比較的早く準備ができ、効果が期待できる移植法である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi R, Tanaka J, Hashino S, Ota S, Torimoto Y, Kakinoki Y, Yamamoto S, Kurosawa M, Hatakeyama N, Haseyama Y, Sakai H, Sato K, Fukuhara T. Etoposide-containing conditioning regimen reduces the occurrence of hemophagocytic lymphohistiocytosis after SCT. *Bone Marrow Transplant.* 49(2):254-257, 2014.
2. Hayase E, Fujimoto K, Mitsushashi 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.* 2014 Jan 15;97(1):e1-5. doi: 10.1097/01.TP.0000437912.60638.23.
3. 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.
4. Mizuta S, Matsuo K, Imai K, Nishiwaki S, Kanamori H, Ohashi K, Fukuda T, Onishi Y, Miyamura K, Takahashi S, Onizuka M, Suzuki R, Atsuta Y, Morishima Y, Kato K, Sakamaki H, Tanaka J. Pre-transplant administration of imatinib for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 123(15):2325-2332, 2014.
5. Sano H, Kobayashi R, Tanaka J, Hashino S, Ota S, Torimoto Y, Kakinoki Y, Yamamoto S, Kurosawa M, Hatakeyama N, Haseyama Y, Sakai H, Sato K, Fukuhara T. Risk factor analysis of non-Hodgkin lymphoma-associated haemophagocytic syndromes: a multicentre study. *Br J Haematol.* 165(6):786-792, 2014.
6. Kato H, Kawase T, Kako S, Mizuta S, Kurokawa M, Mori M, Ohashi K, Iwato K, Miyamura K, Hidaka M, Sakamaki H, Suzuki R, Morishima Y, Tanaka J. Analysis of outcomes following

autologous transplantation in adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia during the first complete remission.

Haematologica. 99(11):e228-30. doi: 10.3324/haematol.2014.108712.

7. Takami A, Yano S, Yokoyama H, Kuwatsuka Y, Yamaguchi T, Kanda Y, Morishima Y, Fukuda T, Miyazaki Y, Nakamae H, Tanaka J, Atsuta Y,¹ Kanamori H. Donor lymphocyte infusion for the treatment of relapsed acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective analysis by the Adult AML Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 20(11):1785-1790, 2014. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.07.010.

8. Aoki K, Ishikawa T, Ishiyama K, Aoki J, Itonaga H, Fukuda T, Kakihana K, Uchida N, Ueda Y, Eto T, Mori T, Kondo T, Iwato K, Morishima Y, Tanaka J, Atsuta Y, Miyazaki Y. Conditioning Regimen in Allogeneic Transplantation for Elderly Patients with Advanced Myelodysplastic Syndromes. Br J Haematol. 2014 Sep 17. doi: 10.1111/bjh.13124.

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. 2014 16(5):797-801. doi: 10.1111/tid.12283. 2014 Aug 25.

10. Kanda J, Fuji S, Kato S, Takami A, Tanaka J, Miyamura K, Ohashi K, Takahiro Fukuda², Ozawa Y, Kanamori H, Eto T, Kobayashi N, Iwato K, Morishima Y, Sakamaki H, Atsuta Y, Kanda Y. Decision Analysis for Donor 1 Selection in Stem Cell Transplantation -2 HLA-8/8 Allele-Matched Unrelated Donor vs. HLA-1 AG Mismatched Related Donor. Blood Cancer J. 4:e263. doi: 10.1038/bcj.2014.85.

2. 学会発表

1. 田中淳司

造血細胞移植の移植免疫学-NK細胞の役割-
第76回 日本血液学会総会 2014、10、
31-11、2:大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

ハプロ一致移植における骨髄由来培養間葉系幹細胞の有用性の検討

担当責任者 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：当科では、HLA ハプロ一致移植において、急性 GVHD や生着不全に対する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) および難治性ウイルス感染に対するウイルス特異的 T 細胞(CTL)療法といったドナー由来細胞療法を併用することで合併症の克服を目指した研究をすすめている。2004 年 5 月から 2014 年 6 月までに当科で行った HLA ハプロ一致移植 27 例を後方視的に解析した。27 例中 5 例でステロイド抵抗性 GVHD を発症し、全例に抗体療法が投与され、うち 2 例に MSC が投与され有効であった。難治性 CMV 感染に対しウイルス特異的 CTL を 3 例に投与し、1 例に有効、1 例に無効で、1 例が末梢血中 CMV-DNA は消失したものの、その後 CMV 脳炎を発症し亡くなった。リツキシマブ抵抗性 CD20 陰性 EBV-PTLD1 例に対して EBV 特異的 CTL を投与し有効であった。HLA ハプロ一致移植において、ドナー由来ウイルス特異的 CTL、MSC 療法の併用は、より安全な移植に寄与すると考えられた。一方、一方、非寛解期急性白血病患者は 8 例中全例再発し、うち 4 例で白血病細胞表面に不一致 HLA 発現を消失していたため、このような患者群においては、別のアプローチが必要と考えられた。

A. 研究目的

名古屋大学小児科では、HLA ハプロ一致移植において、急性 GVHD や生着不全に対する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) および難治性ウイルス感染に対するウイルス特異的 T 細胞(CTL)療法といったドナー由来細胞療法を併用することで合併症の克服を目指した研究をすすめている。

B. 研究方法

対象は 2004 年 5 月から 2014 年 6 月までに当科で行った HLA ハプロ一致移植 27 例を後方視的に解析した。年齢中央値は 9 歳 (0-15 歳)、疾患は AML6 例、ALL6 例、aplastic anemia7 例、JMML2 例、CMML2 例、RAEB2 例、CAEBV1 例、LCH1 例で、うち 13 例が非寛解期白血病、移植後拒絶または好中球 0 で感染を伴う再生不良性貧血といった緊急移植として行われた。骨髄および末梢血幹細胞を併用し、GVHD 予防は FK506 および short term MTX、ヒト胸腺グロブリンを計 15mg/kg 投与した。ドナーが CMV または EBV が既感染で HLA-A2 または A24 を持つ場合には、同意を得て移植前に末梢血 50ml よりウイルス特異的 CTL を、また骨髄 30ml より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て MSC を培養、凍結保存した。移植後リツキシマブ抵抗性

EBV-LPD または、抗ウイルス剤抵抗性 CMV 感染に対して、ウイルス特異的 CTL を初回量 $2 \times 10^5/\text{kg}$ より投与し、GVHD Grade II 以上と診断され、methylprednisolone (mPSL) 2mg/kg/day 治療開始 3 日間で病態の悪化を認めるかまたは 1 週間の時点で Grade II 以上の GVHD が不変である場合に、患者体重 1kg 当たり 1×10^6 個の MSC を静脈内に投与した。

(倫理面への配慮)

本研究は、名大病院倫理審査委員会で審査、承認を受けている。

C. 研究結果

27 例全例で生着が得られ (中央値 20 日 (14-29 日))、Day100 における死亡率は 0% であった。3 年無病生存率は、再生不良性貧血で 100%、寛解期急性白血病または慢性白血病で 57% であったが 8 例の非寛解期急性白血病患者は全例再発し、うち 4 例で白血病細胞表面に不一致 HLA 発現を消失していた。5 例でステロイド抵抗性 GVHD を発症したが、全例に抗体療法が、さらに 2 例に MSC が投与され、急性 GVHD による死亡はなかった。難治性 CMV 感染に対して特異的 CTL を 3 例に投与し、1 例に有効で、1 例が末梢血中 CMV-DNA は消失したものの、その後 CMV 脳炎を発症し、亡くなっ

た。リツキシマブ抵抗性 CD20 陰性 EBV-PTLD1 例に対して EBV 特異的 CTL を投与し有効であった。

D. 考察

ドナー由来細胞療法（ウイルス特異的 CTL、MSC）は安全に投与可能であり、一部の症例では有効であった。一方、非寛解期急性白血病患者は 8 例中全例再発し、うち 4 例で白血病細胞表面に不一致 HLA 発現を消失していたため、このような患者群においては、別のアプローチが必要と考えられた。

E. 結論

HLA ハプロロー致移植において、ドナー由来ウイルス特異的 CTL、MSC 療法の併用は、より安全な移植に寄与している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukano R, Mori T, Kobayashi R, Mitsui T, Fujita N, Iwasaki F, Suzumiya J, Chin M, Goto H, Takahashi Y, Hara J, Park YD, Inoue M, Koga Y, Inagaki J, Sakamaki H, Adachi S, Kawa K, Kato K, Suzuki R. Haematopoietic stem cell transplantation for relapsed or refractory anaplastic large cell lymphoma: a study of children and adolescents in Japan. *Br J Haematol*. 2015 Feb;168(4):557-63.
- 2) Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Choreito formula for BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Feb;21(2):319-25.
- 3) Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014 Aug;20(8):1145-1149.
- 4) Umeda K, Adachi S, Tanaka S, Ogawa A, Hatakeyama N, Kudo K, Sakata N, Igarashi S, Ohshima K, Hyakuna N,

Chin M, Goto H, Takahashi Y, Azuma E, Koh K, Sawada A, Kato K, Inoue M, Atsuta Y, Takami A, Murata M. Comparison of continuous and twice-daily infusions of cyclosporine A for graft-versus-host-disease prophylaxis in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62:291-298.

- 5) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe K, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor versus immunosuppressive therapy. *Haematologica*. 2014 Dec;99 (12) : 1784 -1791.

2. 学会発表

- 1) Takahashi Y. Hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor for childhood aplastic anemia: HLA haploidentical family donor vs HLA mismatched unrelated donor. 40th Annual Meeting of the EBMT. Apr. 9, 2014. Milano, Italia.
- 2) 高橋 義行. 造血細胞移植後にみられる感染症に対する治療の進歩. 第 117 回日本小児科学会学術集会. 2014 年 4 月 11 日. 名古屋.
- 3) 高橋 義行、関屋 由子、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、奥野 友介、入江 正寛、村松 秀城、濱 麻人、小島 勢二. Unmanipulated HLA haploidentical bone marrow transplantation combined with PBSC using high dose ATG. 第 76 回日本血液学会学術集会. 2014 年 10 月 31 日. 大阪.
- 4) 高橋 義行. KIR ligand incompatible allogeneic cord blood transplantation for high risk neuroblastoma as an KIR mismatched NK cell immunotherapy. 難治性神経芽腫に対する KIR リガンド不一致性同種臍帯血移植を用いたアロ NK 細胞免疫療法の試み. 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014 年 11 月 30 日. 岡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

担当責任者 前田 嘉信 岡山大学病院 血液・腫瘍内科 講師

研究要旨 悪性疾患に対する根治的治療として同種造血幹細胞移植が行われているが、致死の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 の発症時に IL-17 と IFN- γ を同時に産生する Th17/Th1 細胞が特異的に出現することを明らかにし、Th17 細胞の亜型である alternative Th17 が慢性 GVHD に関与している可能性が示唆された。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いるが、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。p40 抗体を投与した群では、IL-17 と IFN- γ を同時に産生する Th17/Th1 細胞が減少、さらに IL-17 産生細胞における T-bet の発現は低下していたが、ROR- γ t の発現はむしろ増加傾向にあった。p40 抗体は、Th17 が alternative からより免疫抑制的な classical Th17 にシフトさせることにより慢性 GVHD を軽減させることが示唆された。

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、致死の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。また、その効果のメカニズムについても検討した。

B. 研究方法

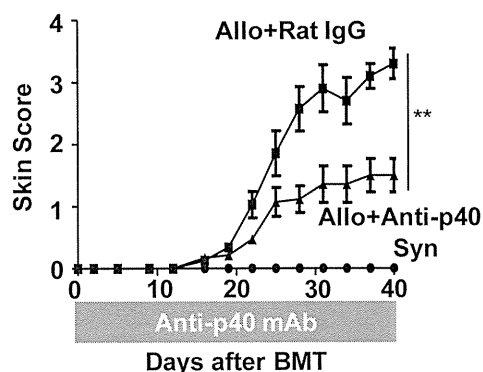
ドナーに B10.D2、ホストに BALB/c を使ったマウス慢性 GVHD モデルを作成した。骨髓幹

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、および T-bet と ROR γ t の発現を FACS 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。

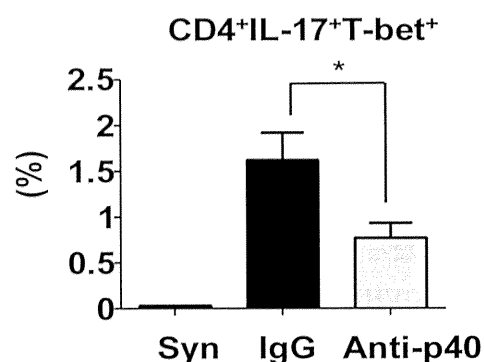
C. 研究結果

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。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。



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 も抑制されていなかった。一方、T-bet の発現は低



下、皮膚浸潤しているドナー細胞も IFN- γ の産生が低下しており、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。

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) 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- γ /IL-17-producing cells. **J Immunol**. 2015 in press
- 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**. 2014;20(2):183-91.
- 3) Maeda Y, Pathogenesis of graft-versus-host disease: innate immunity amplifying acute alloimmune responses. **Int J Hematol**. 2013 ;98(3):293-9.

- 4) 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
 - 5) 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
- ### 2. 学会発表
- 1) Taiga Kuroi, Sachiyo Okamoto, Kyosuke Saeki, Yujin Kobayashi, Hisakazu Nishimori, Hideaki Fujiwara, Ken-ichi Matsuoka, Nobuharu Fujii, Eisei Kondo, Mitsune Tanimoto, Yoshinobu Maeda Anti-IL-12/23 p40 Antibody Attenuates Chronic Graft Versus Host Disease Via Suppression of IFN- γ /IL-17-Producing Cells American Society of Hematology 56th Annual Meeting, San Francisco December 5, 2014
 - 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