

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591252

研究課題名(和文) ヒト白血球抗原半合致造血幹細胞移植療法の安全性確立に向けての研究

研究課題名(英文) Establishment of safety of HLA-haploidentical stem cell transplantation

研究代表者

小川 啓恭 (OGAWA HIROYASU)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80194447

研究成果の概要(和文)：

HLA 半合致ミニ移植の多施設共同前方向試験を行い、第 I 相の 10 例全例で生着が得られた。ステロイド抵抗性 GVHD に対して、再移植を行うことによって、GVHD を救済する「graft-versus-GVHD 療法」を独自に開発し、難治性 GVHD に対する治療への道を開いた。MHC 半合致移植のマウスモデルを用いて、前処置の強度を軽減することで、GVHD が軽くなることを示し、この系を用いて、ホスト由来の制御性 T 細胞が、移植後も残存し、GVHD の制御に関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：

A prospective, multiinstitutional study for HLA-haploidentical reduced-intensity stem cell transplantation was performed, and all recipients achieved donor type engraftment in the phase I study. To treat steroid-resistant graft-versus-host disease (GVHD), we developed a novel therapy, “graft-versus-GVHD”, in which patients with severe GVHD underwent re-transplantation using a graft from second donor. Furthermore, we established a murine model of MHC-haploidentical transplantation, in which recipients did not develop severe GVHD when receiving lower intensity of conditioning treatment. We found that host regulatory T cells were involved in the regulation of GVHD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 血液内科学

キーワード：①造血幹細胞移植 ②HLA 不適合移植 ③移植片対宿主病

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 同種骨髄移植は、白血病などの”otherwise fatal”な、難治性悪性血液疾患患者に治癒をもたらす、唯一の治療である。移植を行うには、ヒト白血球抗原(HLA)適合ドナーを必要とするが、同胞間でHLAが合う確率は25%であり、近年の少子化の影響も相まって、ドナー不在のため、移植ができない症例が急増している。親子間は、HLA半合致(半分一致、半分不一致)であるが、このようなドナーからの移植が可能になれば、骨髄移植におけるドナーの問題は解消される。移植において、ドナーの免疫細胞が宿主の正常組織を攻撃することによって生じる好ましくない反応は、移植片対宿主病(graft-versus-host disease=GVHD)と呼ばれる。ドナー/レシピエント間のHLAの不適合度に応じて、GVHDの頻度が上昇することが知られているので、HLA半合致移植では、GVHDが最大の障壁となる。

(2) 我々は、強度を軽減した前処置(reduced intensity conditioning = RIC)の使用やGVHD予防の工夫(ステロイド剤や抗Tリンパ球抗体の使用)によって、HLA半合致移植が実施可能なことを、一連の論文の中で明らかにしてきた(Transplantation, 2004; 78: 488, Biology and Blood and Marrow Transplantation, 2006; 12: 1073, Exp Hematol 2008; 36: 1)。しかし、HLA半合致移植が多くの移植施設に受け入れられ、普及することによって、多くの患者の救済に寄与するためには、この移植の最大の問題であるGVHDを完全に克服することが重要である。

(3) 上記のように、HLA半合致移植において、ステロイド剤や抗Tリンパ球抗体を使用することで、移植片からT細胞を除去せずとも、移植が可能と報告してきたが、そのmechanismは依然として不明である。

(4) ステロイド抵抗性の難治性GVHDは、極めて予後不良である。このGVHDは、主として、ドナーT細胞の病的な活性化によって、もたらされる。したがって、second donorから再移植を行うことで、この病的なT細胞を除くことができれば、また再移植ドナーの移植片によるGVHDが起きなければ、難治性GVHDを治すことができると考えられる。この可能性を確かめるため、マウスのGVHDモデルにおいて、second donorから、RICを用いて再移植を行った。その結果、GVHDマウスは全てGVHDを克服したので、この治療法を”graft-versus-GVHD”と呼んで、論文発表した(Experimental Hematology, 36: 1216, 2008)。

## 2. 研究の目的

(1) HLA半合致ミニ移植を、多施設共同で前方向試験を行うことによって、この治療法の安全性、有用性を証明する。

(2) “graft-versus-GVHD”療法の、臨床的にも、ステロイド抵抗性難治性GVHDに対して、有用かどうか、検討する。

(3) HLA半合致移植で、GVHDを免れる機序を、マウスの移植モデルを用いて、解明する。

## 3. 研究の方法

(1) 多施設共同研究：多施設共同で、HLA半合致移植の安全性を検討する。対象疾患は、慢性骨髄性白血病(第2慢性期以降)、急性骨髄性白血病(第2寛解期以降、非寛解期、初回寛解導入不能)、急性リンパ性白血病(病期は、急性骨髄性白血病と同一)、骨髄異形成症候群(IPSSで、intermediate-IIまたは、high)、悪性リンパ腫(同種移植以外の方法では、治癒が得られないと考えられる症例)である。年齢が35歳以上55歳以下の症例。または、18歳以上35歳未満であるが自家ないし同種造血幹細胞移植の実施歴を有する

症例。前処置は、フルダラビン 30 mg/m<sup>2</sup> x 6、ブスルファン 4 mg/kg x 2、ゼットブリン 2 mg/kg x 4、」さらに、腫瘍量の多い症例には、シタラビン 2 g/m<sup>2</sup> x 4 を追加した。GVHD予防は、FK506 とメチルプレドニゾロン 1 mg/kg を用いた。第 1 相試験 10 例の主要評価項目は、移植後 35 日以内のドナー由来の生着、第 2 相試験 25 例の主要評価項目は、移植後 100 日以内の生存とした。

(2) 難治性 GVHD 患者に対する、“graft-versus-GVHD” 療法：HLA 不適合移植後、重症 GVHD を発症し、ステロイド抵抗性となった 16 名 17 回の難治性 GVHD に対して、HLA 半合致ドナーからの再移植を行うことによって、GVHD を救済できるかどうかを検討した。再移植の前処置として RIC を用い、再移植後の GVHD 予防は、FK506 と methylprednisolone 1 mg/kg を用いた。

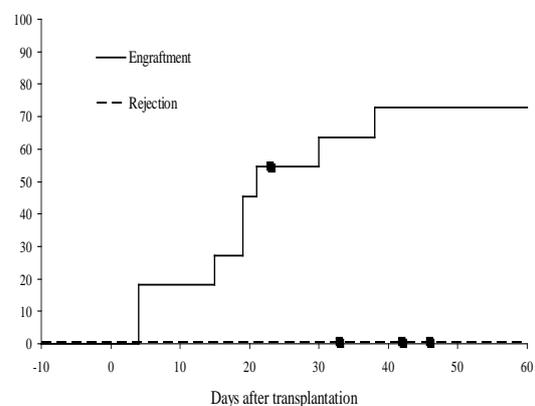
(3) MHC 半合致移植マウスモデルでの GVHD 制御の研究：MHC 半合致移植のマウスモデル、BDF1 (H-2<sup>b/d</sup>)→B6C3F (H-2<sup>b/k</sup>) を樹立した。この系では、前処置の全身放射線 (total body irradiation = TBI) の線量を 13 Gy にすると、全てレシピエントが移植後 60 日以内に、GVHD のために死亡するのに対して、TBI 5 Gy の照射を受けたレシピエントは、全てドナー由来の生着が得られるものの、GVHD による死亡は生じなかった。TBI 13 Gy は、骨髄破壊的前処置 (myeloablative conditioning (MAC))、TBI 5 Gy は、RIC に相当する。これらの系を用いて、前処置の強度を軽減した半合致移植で、GVHD が生じなくなる機序を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 多施設共同研究：第 1 相試験 10 例の解析では、全例でドナー由来の生着が得られた。第 2 相試験も、予定された 25 例の登録は完了し、現在、data を解析中である。

(2) 難治性 GVHD 患者に対する、“graft-versus-GVHD” 療法：評価可能な 15 例中 11 例で second donor の移植片が生着し、4 例は拒絶に至った。図 1 に示すように、生着例では、81.8% という高い response rate (8 例で完全寛解、2 例で部分寛解) が得られた。拒絶例では、50% の response rate (いずれも部分寛解) にとどまった。graft-versus-GVHD 療法を成功させるためには、second donor の生着が必要であることが示された (Experimental Hematology, 2011: 39:880-890)。

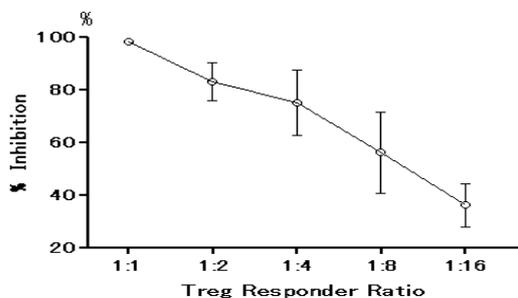
図 1



(3) MHC 半合致移植マウスモデルでの GVHD 制御の研究：RIC を受けたレシピエントは、MAC を受けたレシピエントに比べて、移植直後 (1 週間) に、数多くの host 由来の制御性 T 細胞 (Treg) が残存していることが判った。さらに、この Treg が、in vitro および in vivo で、mixed lymphocyte culture (図 2) や GVHD 反応を抑える能力があることから、機能を有していることが確認された。さらに、抗 CD25 抗体を用いて、移植前に、host 由来の Treg を除去しておく、GVHD が悪化することから、MHC 半合致移植において、host 由来の Treg が GVHD の制御に大きな働きを有していることを示された。また、Treg の GVHD を制御する機序に関して、Treg が、host の抗原提示

細胞 (APC) の CD80、CD86 の発現を抑えることから、APC の成熟を抑えることにより、GVHD の制御に関わっていることが示された。現在、論文執筆中である。

図 2



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 42 件)

1. Yoshihara S, Maruya E, Taniguchi K, Ogawa H, et al. (17人中17番) 査読有 Risk and prevention of graft failure in patients with preexisting donor-specific HLA antibodies undergoing unmanipulated haploidentical SCT. Bone Marrow Transplantation, in press. (doi:10.1038/bmt.2011.131)
2. Yoshihara S, Ikegame K, Kaida K, Ogawa H, et al. (11人中11番) 査読有 Incidence of extramedullary relapse after haploidentical SCT for advanced AML/myelodysplastic syndrome. Bone Marrow Transplantation, in press. (doi:10.1038/bmt.2011.163)
3. Okada M, Yoshihara S, Taniguchi K, Ogawa H, et al. (12人中12番) 査読有 Intra-bone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment: A phase I study. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 18; 633-639, 2012. (doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.12.508)
4. Wada N, Zaki MA, Kohara M, Ogawa H, et al. (12人中4番) 査読有 Diffuse large B cell lymphoma with an interfollicular pattern of proliferation shows a favourable prognosis: a study of the Osaka Lymphoma Study Group.

- Histopathology, 60: 924-932, 2012. (doi/10.1111/j.1365-2559.2011.04161.x)
5. Tamaki H, Hashimoto M, Naito Y, Ogawa H, et al. (7人中6番) 査読有 Curative resection of double primary lung cancer after 15-month bortezomib administration. Onkologie, 35: 216-217, 2012. (doi:10.1159/0000337417)
  6. Eguchi R, Kubo S, Takeda H, Ogawa H, et al. (8人中6番) 査読有 Deficiency of Fyn protein is prerequisite for apoptosis induced by Src family kinase inhibitors in human mesothelioma cells. Carcinogenesis, 33: 969-975, 2012. (doi:10.1093/carcin/bgs109)
  7. Kikuchi-Taura A, Taguchi A, Ogawa H, et al. (13人中12人) 査読有 Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. Cytotherapy, 14: 441-450, 2012. (doi:10.3109/14653249.2012.658911)
  8. Morishita S, Kaida K, Ikegame K, Ogawa H, et al. (9人中8人) 査読有 Impaired physiological function and health-related QOL in patients before hematopoietic stem-cell transplantation. Supportive Care in Cancer, 20; 821-829, 2012. (doi:10.1007/s00520-011-1156-2)
  9. Yoshihara S, Ikegame K, Taniguchi K, Ogawa H, et al. (13人中13番) 査読有 Salvage haploidentical transplantation for graft failure using reduced-intensity conditioning. Bone Marrow Transplantation, 47; 369-373, 2012. (doi:10.1038/bmt.2011.84)
  10. Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi Y, Ogawa H, et al. (13人中13番) 査読有 Allogeneic stem cell transplantation as treatment for heavily-treated, refractory acute graft-versus-host disease after HLA-mismatched stem cell transplantation. Experimental Hematology, 39; 880-890, 2011. (doi:org/10.1016/j.exphem.2011.05.007)
  11. Taniguchi K, Okada M, Yoshihara S, Ogawa H, et al. (11人中11番) 査読有 Strategy for bone marrow transplantation in eculizumab-treated paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. International Journal of Hematology, 94; 403-407, 2011.

- (doi:10.1007/s12185-011-0931-7)
12. Nakata J, Okada M, Tamaki H, Ogawa H, et al. (9人中9番) 査読有 Dasatinib-induced rapid regression and complete molecular remission of multiple subcutaneous tumours presenting as relapsed chronic myeloid leukaemia after cord blood transplantation. *Leuk Res*, 35: 1658-1659, 2011.  
(doi.org/10.1016/j.leukres.2011.07.005)
13. Okada M, Satake A, Kaida K, Ogawa H, et al. (10人中10番) 査読有 Successful treatment with nilotinib after imatinib failure in a CML patient with a four-way Ph chromosome translocation and point mutations in BCR/ABL gene. *International Journal of Hematology*, 93: 243-246, 2011.  
(doi:10.1007/s12185-011-0769-z)
14. Kako S, Morita S, Sakamaki H, Ogawa H, et al. (20人中4番) 査読有 A decision analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult patients with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia in first remission who have an HLA-matched sibling donor. *Leukemia*, 25: 259-265, 2011.  
(doi:10.1038/leu32010.260)
15. Satake A, Inoue T, Kubo S, Ogawa H, et al. (15人中15番) 査読有 Separation of antileukemic effects from graft-versus-host disease in MHC-haploidentical murine bone marrow transplantation: participation of host immune cells. *International Journal of Hematology*, 91: 485-497, 2010.  
(doi:10.1007/s12185-010-0545-5)
16. Tamaki H, Naito Y, Lee-Kawabata M, Ogawa H, et al. (9人中9番) 査読有 Sustained improvement in cardiac function with persistent amyloid deposition in a patient with multiple myeloma-associated cardiac amyloidosis treated with bortezomib. *International Journal of Hematology*, 92: 655-658, 2010.  
(doi:10.1007/s12185-010-0710-x)
17. Satake A, Okada M, Asada T, Ogawa H, et al. (8人中8番) 査読有 Dasatinib is effective against optic nerve infiltration of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Lymphoma*, 51: 1920-1922, 2010.  
(doi:10.3109/10428194.2010.509453)
18. Nishiwaki S, Inamoto Y, Sakamaki H, Ogawa H, et al. (19人中6番) 査読有 Allogeneic stem cell transplantation for adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphocytic leukemia: comparable survival rates but different risk factors between related and unrelated transplantation in first complete remission. *Blood*, 116: 4368-4375, 2010.  
(doi:10.1182/blood-2010-02-269571)
19. Asakura M, Ikegame K, Yoshihara S, Ogawa H, et al. (16人中16番) 査読有 Use of foscarnet for cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from a related donor. *International Journal of Hematology*, 92: 351-359, 2010.  
(doi:10.1007/s12185-010-0657-y)
20. Nagai Y, Ikegame K, Mori M, Ogawa H, et al. (14人中13番) 査読有 Hepatosplenic alphabeta T cell lymphoma. *Int J Clin Oncol*, 15: 215-219, 2010.  
(doi:10.1007/s10147-010-0028-y)
21. Tamaki H, Yoshihara S, Fujioka T, Ogawa H, et al. (6人中6番) 査読有 Molecular detection of AML1-MTG8-positive cells in peripheral blood from a patient with isolated extramedullary relapse of t(8;21) acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 23: 424-426, 2009.  
(doi:10.1038/leu.2008.220)
22. Kuwatsuka Y, Miyamura K, Suzuki R, Ogawa H, et al. (14人中6番) 査読有 Hematopoietic stem cell transplantation for core binding factor acute myeloid leukemia: t(8;21) and inv(16) represent different clinical outcomes. *Blood*, 113: 2096-2103, 2009.  
(doi:10.1182/blood-2008-03-145862)
23. Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, Ogawa H, et al. (17人中7番) 査読有 Incidence and risk factor of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15: 439-446, 2009.  
(doi.org/10.1016/j.bbmt.12.508)
24. Wada N, Ikeda J, Kohara M, Ogawa H, et al. (11人中4番) 査読有 Diffuse large B-cell lymphoma with a high number of epithelioid histiocytes (Lymphoepithelioid B-cell lymphoma): A study of Osaka Lymphoma Study Group.

Virchow Archives, 455; 285-293, 2009.  
(doi:10.1007/s00428-009-0827-6)

[学会発表] (計 52 件)

- 1) Ogawa H. Cord blood stem cell transplantation: from the bench to the bed, Intra-bone marrow transplantation of unwashed cord blood using reduced-intensity conditioning treatment. (Presidential Symposium) 第 34 回日本造血細胞移植学会 大阪 2012. 2. 24:
- 2) Kaida K, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Ishii S, Kato R, Inoue T, Okada M, Tamaki H, Fujioka T, Soma T, Ogawa H. Unmanipulated HLA-haploidentical (2-3 antigen- mismatched) stem cell transplantation using myeliablative or reduced- intensity preconditioning regimen. The 53th annual meeting of the American Society of Hematology, 2011, 12.10-13, San Diego, USA.
- 3) Ogawa H. Haplo-identical HCT from family members. The 1st international scientific symposium on hematopoietic stem cell transplantation in emerging countries. 2011, 11.10-12, Hanoi, Vietnam.
- 4) Ogawa H. (JSA-EHA Joint Symposium - Stem Cell Source) Unmanipulated HLA-haploidentical stem cell transplantation. 第 73 回日本血液学会学術集会(名古屋) 2011. 10. 15
- 5) 井上貴之、池亀和博、吉原 哲、海田勝仁、谷口享子、玉置広哉、藤岡龍哉、岡田昌也、加藤るり、山本庸子、相馬俊裕、小川啓恭. Host regulatory T cells contribute to the regulation of GVHD in murine MHC haploidentical BMT models. 第 73 回日本血液学会学術集会(名古屋) 2011. 10. 14

[図書] (計 2 件)

- 1) 池亀和博、小川啓恭、HLA半合致移植、血液疾患 最新の治療 2011-2013、316-321, 2010 南江堂
- 2) 池亀和博、小川啓恭、GVH反応とGVL反応に

おけるT細胞の異なった役割、臨床免疫・アレルギー科、56: 202-205, 2011 科学評論社

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 啓恭 (OGAWA HIROYASU)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80194447

### (2) 研究分担者

玉置 広哉 (TAMAKI HIROYA)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70416254

池亀 和博 (IKEGAME KAZUHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20372609

藤岡 龍哉 (FUJIOKA TATSUYA)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70403045

吉原 哲 (YOSHIHARA SATOSHI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90461037

### (3) 連携研究者

なし