

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591417

研究課題名(和文) 同種造血細胞移植後閉塞性細気管支炎の早期診断を目指したモニタリング法の開発

研究課題名(英文) The development of a novel monitoring method for early diagnosis of bronchiolitis obliterans after allo-HSCT

研究代表者

藤井 伸治 (FUJII, NOBUHARU)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：60362977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：同種造血細胞移植後の閉塞性細気管支炎(BOS)の早期診断を目的としたバイオマーカーの探索を行った。対象は非感染性肺合併症に拡大した。検体として血清、気管支肺胞洗浄液、呼気濃縮液を用い、サイトカイン、ケモカイン、増殖因子を含む27種類を網羅的に検討した。最終的に計27名、計72ポイントの検体保存を収集、保存した。その中からBOS1例を含む計5例の移植後非感染性肺合併症患者の経時的に収集した検体を抽出しアッセイに用いた。現在解析途中であるが、血清MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF- α などが有用なバイオマーカーとして使用できる可能性が示唆された。今後、症例数を増やして再現性を検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：Bronchiolitis obliterans syndrome is a devastating complication of allogeneic hematopoietic cell transplantation. A novel method for early diagnosis before it reaches an irreversible stage is required. We performed cytokine/chemokine analysis using serum, bronchoalveolar lavage fluid, and exhaled breath condensate of our patients. As a result, serum MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α were selected as candidates of possible biomarkers for early diagnosis.

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：閉塞性細気管支炎 特発性肺炎症候群 同種造血細胞移植

1. 研究開始当初の背景

(1)同種移植後の閉塞性細気管支炎(BOS)は同種免疫反応による肺の慢性GVHDと考えられているが、病態の詳細は殆ど解明されていない。治療はステロイドを中心とした免疫抑制療法が用いられるが奏効することは少なく、3年BOS関連死亡率は65%と予後は極めて不良であり、この20年間で治療および予後には殆ど改善がない状況が続いている。良好なモニタリング検査の開発によりBOSの早期診断できれば、治療反応性と予後を大きく改善できる可能性がある。

(2)肺移植後拒絶反応としてBOSの病理組織像は同種移植後のものと酷似することは以前から知られており、同種免疫反応が気道細胞障害を起こす第一段階でのサイトカイン、免疫担当細胞の気道への遊走に關与するケモカイン、線維芽細胞増殖の段階に關与するGrowth Factorといった液性因子の關与が示唆されている。

2. 研究の目的

治療効果の期待できる可逆性の段階で BOS 発症を捉え、早期の治療介入を可能にするモニタリング法の確立を最終的な目的とした。

(1) 肺移植後の BOS におけるサイトカイン・ケモカインプロファイルについて呼気凝縮液を用いて解析した過去の報告に注目し、同種移植後の呼気凝縮液を用いて BOS の早期診断が可能かどうかを検討した。(検体を血清とした場合と併せて評価する。)

(2) 移植後の保存単核球、および血清を用いて、肺移植後 BOS 関連抗原として報告のある type V collagen と K- 1 tublin などに対する免疫反応を評価する。

3. 研究の方法

(1) 同種移植患者および健常人ドナーの呼気凝縮液および血清の採取と保存した。

(2) Bio-plex Pro サイトカインアッセイキッ

ト 27-Plex を用いて、サイトカイン、ケモカイン、Growth-factor のプロファイルの継続的な変化を検討した。

(3) Type V collagen、recombinant K- 1 tublin を用いた液性免疫反応を ELISA で検討する。

(4) 岡山大学移植グループにおける同種移植後閉塞性細気管支炎の臨床像を検討し、現行の診断・治療・予後を再評価した。

4. 研究成果

(1) 同種移植患者および健常人ドナーの呼気凝縮液および血清の採取と保存

岡山大学病院倫理委員会にて審査を受け承認後、患者からの同意取得および検体採取を開始し、最終的に 27 名・72 タイムポイントの呼気凝縮液および血清、さらに BOS を含む非感染性肺合併症患者においては気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取、保存を行った。

(2) Bio-plex Pro サイトカインアッセイキット 27-Plex を用いたサイトカイン、ケモカイン、Growth-factor の検討

検体集積期間において BOS 発症が 1 名のみであったため、対象を「同種移植後の非感染肺合併症」(特発性肺炎症候群(IPS)2 例、Air-leak syndrome 2 例、閉塞性細気管支炎 1 例)に拡大して検討を行った。

BALF および呼気凝縮液で検出可能なサイトカインの検討

BALF においては IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, FGF, G-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF, RANTES, TNF-a, VEGF が検出可能であった。呼気凝縮液については IL-1RA, IL-9, Eotaxin, GM-CSF, IP-10, RANTES, TNF-a が検出可能であった。これらの結果から、BALF で検出できない項目は呼気凝縮液でも検出困難と考えられた。

ドナーリンパ球輸注(DLI)後移植後 IPS 症例における検討

同種移植後のキメリズム悪化に伴う DLI 施行後に継時的に呼気濃縮液と血清にてサイトカイン・ケモカインの測定を行った。特に症状および治療効果と反映していた項目として血清 IL-1、IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, MIP-1, MIP-1, TNF- α が抽出された。呼気濃縮液では Eotaxin, GM-CSF などが測定可能であったものの、他は検出限界以下、あるいは臨床経過と合致した変化を認めなかった。

非感染性肺障害 (特発性肺炎症候群 2 名 Air-leak syndorme2 名、BOS1 名) における検討

肺合併症を来さなかった 3 名を含め計 8 名・56 検体 (血清 31 検体、BALF 4 検体、呼気濃縮液 21 検体) のアッセイを終えた。まず BOS 発症患者の呼気濃縮液に関して、移植前と BOS 発症時で明らかな増加を示したのは IL-1R と IL-7 の 2 種類のみであった。一方、血清においては IL-8, IL-9, IL-10, Eotaxin, IP-10, MIP-1, MIP-1, TNF- α の 8 項目に増加を認めた。BOS 以外の肺合併症に関しての詳細は現在データを解析中であるが、MIP-1, MIP-1, TNF- α などが発症早期のバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

(3) Type V collagen、recombinant K-1 tubulin を用いた液性免疫反応の検討
移植後の保存単核球、および血清は保存済みであり、今後アッセイを開始する予定である。

(4) 岡山大学移植グループにおける同種移植後閉塞性細気管支炎の臨床像の検討
2000 年から 2009 年までの同種移植症例 465 患者中、13 例が BOS を発症しており、5 年累発症率は 3.43%、発症時期の中央値は移植後 15 ヶ月であった。13 例中 7 例が初発症状として咳嗽単独であり注意を要すること、リスク因子は慢性 GVHD が存在することを検出し、論文にて報告した。(Fujii N *Int J Hematol.*

2014)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- 1.Sugiyama H, Maeda Y, Nishimori H, Yamasuji Y, Matsuoka K, **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.* 2014 Feb;20(2):183-91 査読あり
- 2.**Fujii N**, Nakase K, Asakura S, Matsuo K, Nawa Y, Sunami K, Nishimori H, Matsuoka K, Kondo E, Maeda Y, Shinagawa K, Hara M, Tanimoto M. Bronchiolitis obliterans with allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 10-year experience of the Okayama BMT Group. *Int J Hematol.* 2014 May;99(5):644-51. 査読あり
- 3.Asano T, **Fujii N**, Niiya D, Nishimori H, Fujii K, Matsuoka K-I, Ichimura K, Hamada T, Kondo E, Maeda Y, **Tanimoto Y**, Shinagawa K, Tanimoto M Complete resolution of steroid-resistant organizing pneumonia associated with myelodysplastic syndrome following allogeneic hematopoietic cell transplantation 2014, 3:3 doi:10.1186/2193-1801-3-3 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1. **藤井伸治** A case of Non-infectious pulmonary complication after DLI. Pulmonary GVHD or IPS? 第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 日、ロイトン札幌
2. 品川克至、**藤井伸治** 同種造血細胞移植後肺合併症、特に閉塞性細気管支炎の病態と治療の現状 第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 13 日、ロイトン札幌

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 伸治 (FUJII NOBUHARU)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：60362977

(2) 研究分担者

谷本 安 (TANIMOTO YASUSHI)

南岡山医療センター・臨床研究部・臨床研究

部長

研究者番号：60284098