

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591434

研究課題名(和文) ヒト白血球抗原半合致移植の成立機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of successful 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：少量ATGとステロイドを用いるT細胞非除去HLA半合致ミニ移植療法を開発した。移植片対宿主病に関して、移植7日目の血清可溶性IL-2R濃度が、発症予測因子となることを明らかにした。多施設共同前方向試験でも、ドナー生着率100%、移植100生存率 88.2%と良好であり、本治療法の安全性、有効性を証明することができた。HLA半合致移植の成立機序を解析するために作成したマウスのMHC半合致移植モデルで、移植前後の腸間膜リンパ節におけるドナーおよび宿主の免疫細胞の解析により、宿主の制御性T細胞が樹状細胞を制御し、GVHDのコントロールに関わっていることが判明した。

研究成果の概要(英文)： We developed a new regimen for unmanipulated HLA-haploidentical stem cell transplantation using reduced intensity conditioning, low dose of anti-thymocyte globulin and steroids. As graft-versus-host disease is a major drawback in haploidentical transplantation, we found that soluble interleukin-2 receptor level on day 7 was important as a predictor of graft-versus-host disease. In a prospective multicenter trial, the rate of donor engraftment and survival on day 100 was 100% and 88.2%, respectively. These data showed that this regimen was safe and feasible.

To study cellular mechanisms of haploidentical transplantation, we independently developed a murine MHC-haploidentical stem cell transplantation model, and studied the kinetics of immune cells in mesenteric lymph nodes early in transplantation. As a result, host-derived regulatory T cells were found to negatively regulate host dendritic cells, resulting in inducing the tolerance between donor and recipients.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：造血幹細胞移植 HLA半合致移植 移植片対宿主病 可溶性IL-2受容体 白血病 制御性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

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、唯一の治療法である。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(HLA 半合致移植)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。一方、HLA 適合移植は、寛解期(臨床的に腫瘍が検出できない)症例に対する長期無病生存率は 60-70%であるが、非寛解期のそれは 10-20%と低い。私共は、1998 年以来、400 例以上の HLA 半合致移植を行い、臨床面での実績では国内最高である。この多数の臨床経験の中から、HLA 半合致移植が、移植片から T 細胞を除かずとも、安全に施行可能なこと、それだけでなく、HLA 適合移植に比して、より強い抗腫瘍効果が得られることを報告してきた。しかし、HLA 半合致移植は、その技術面の困難さから、本邦では普及していない。一方、HLA 半合致移植の成立機序も不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 多施設共同前方向試験の形で、HLA 半合致移植の臨床研究を実施することで、私どもが開発した HLA 半合致移植の国内での普及をはかる。この試験を通じて、上記治療法の安全性、有用性を確認する。

(2) HLA 半合致移植の普及を妨げる最大の障壁は、移植片対宿主病(graft-versus-host disease=GVHD)である。この合併症を的確に予測することが可能になれば、この移植法の安全性が向上し、普及につながる。そのため、HLA 半合致移植

以外の通常の移植で、GVHD の biomarker として有用とされてきた血清可溶性 interleukin-2 受容体(sIL-2R)濃度が、HLA 半合致移植後の biomarker として有用か否かについて検討する。

(3) T 細胞非除去 HLA 半合致移植の成立機序については明らかになっていない。そこで、当科で樹立した、MHC 半合致移植のマウスモデルを用いて、移植早期のドナー、レシピエントの免疫細胞の動態を解析することによって、GVHD の発症に關与する因子を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) HLA 半合致移植の多施設共同前方向試験は、当科を含む、全国 5 つの移植施設が参加し、造血器悪性疾患(急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、悪性リンパ腫)を有する、35 歳以上 60 歳未満の患者(臓器障害を有する場合は、18 歳以上も登録可)を対象に、実施した。血縁、非血縁に移植可能なドナーが存在しないことを登録の条件としたが、病勢の進行が速く、コーディネート期間を待てない患者も登録可能とした。移植前処置は、fludarabine、busulfan、ATG で行い、GVHD 予防は、tacrolimus と methylprednisolone 1 mg/kg で行った。第 I 相試験(10 例)の主要評価項目はドナー生着であり、第 II 相試験(25 例)の主要評価項目は移植後 100 日生存とした。

(2) 一方、HLA 半合致移植における GVHD の biomarker の研究は、当科で実施した HLA 半合致ミニ移植 77 例の data を用いて、血清 sIL-2R 値の GVHD の biomarker としての有用性について検討した。解析対象となった 77 人の患者の GVHD の発症状況に関して、33 人は GVHD の発症はなく、14 人は I 度の GVHD を、25 人は II 度以上の重症

GVHD を発症していた。これらの患者で、sIL-2R レベルを移植後、週 3 回モニタリングし、GVHD 発症との関係を解析した。

(3) HLA 半合致移植の成立機序の研究に関して、私どもが樹立した MHC 半合致移植のマウスモデル、BDF1(H-2<sup>b/d</sup>) から B6C3F1(H-2<sup>b/k</sup>)の系を用いて、検討した。この系では、前処置として、全身放射線照射 12 Gy または 5 Gy を用いて移植を行ったが、いずれも、ドナー由来の生着を得ることができる。前者は骨髄破壊的移植に相当し、レシピエントは全て 70 日以内に GVHD のため死亡する。後者は骨髄非破壊的移植に相当し、全例、重症 GVHD を発症することなく、100 日以上生存することを確認している。この系を用いて、移植早期の腸間膜リンパ節におけるドナーおよびレシピエント由来の免疫細胞の動態を解析し、GVHD 発症との関係を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) HLA 半合致移植の多施設共同前方向試験：ドナー生着率は 100%であった。好中球および血小板の生着は、それぞれ day 11 と 17.5 日であった。II 度以上の重症急性 GVHD の発症率は 30.7%であり、extensive type の慢性 GVHD の発症率は 20%であった。登録した 34 人中 14 人 (41.2%)が再発し、移植 1 年時点での移植関連死亡は 26.5%であった。移植後 100 日時点での生存率は 88.2%であった。移植後 1 年時点での生存率は、CR(完全寛解)患者で 62.5%、non-CR(非寛解)患者で 42.3%であった。多変量解析の結果、移植前病期(CR or non-CR)が、再発をもたらす唯一の有意な因子として抽出された。ほとんどの患者が進行期症例であったにも関わらず、良好な成績と考えられた (Biology of Blood and Marrow Transplantation, in press)。

(2) HLA 半合致移植後の GVHD biomarker としての血清 sIL-2R の解析：

GVHD を発症しなかった患者の sIL-2R レベルは、移植後 740 U/ml 以下を推移した。一方、II 度以上の重症 GVHD を発症した患者の sIL-2R レベルは、移植後、徐々に、あるいは急峻に上昇し、day 11 に peak 値(中央値 1663u/ml)に達した。その後、day 30 までに正常域に低下した。多変量解析の結果、day 7 の sIL-2R レベル(> 810 U/ml)が、重症 GVHD の発症をもたらす、唯一の有意な因子として抽出された(International Journal of Hematology, 2014, 99: 463)。

(3) MHC 半合致移植のマウスモデルでの解析：移植後 2 週間まで、host 制御性 T 細胞(Treg)は残存していた。残存するだけでなく、一時的に増幅し、機能も有していた。この host Treg の host 樹状細胞(DC)に対する比が、DC の成熟の程度に逆比例することから、dose-dependent に、host DC の成熟を抑制することが示唆された。In vivo および in vitro の解析から、host Treg は放射線に抵抗性であり、直接的および間接的に cytokine などを介して、DC を制御していることが判った。以上のことから、host Treg は、DC の negative regulator として、働いていることが判明した (manuscript in preparation)。

#### 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 46 件)

Ikegame K, Yoshida T, Yoshihara S, T Daimon, Shimizu H, Maeda Y, Ueda Y, Kaida K, Ishii S, Taniguchi K, Okada M, Tamaki H, Okumura H, Kaya H, Kurokawa T, Kodera Y, Taniguchi S, Kanda Y, Ogawa H. Unmanipulated haploidentical RIST using fludarabine, busulfan, low-dose ATG and steroid for

patients in non-CR or at high risk of relapse: a prospective multicenter phase I/II study in Japan Biology of Blood and Marrow Transplantation, in press, 査読有 doi:10.1016/j.bbmt.2015.04.012

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, 査読有 9: e88319, 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0088319

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. 査読有 2014;323:112-117 Doi:10.1016/j.yexcr.2014.02.023

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, 査読有 99: 463-470, 2014, doi: 10.1007/s12185-014-1542-x

Fujioka T, Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, Taniguchi K, Kaida K, Kato R, Inoue T, Nakata J, Ishii S, Soma T, Okada M, Ogawa H. Frequency of CD4(+)FOXP3(+) regulatory T-cells at early stages after HLA-mismatched allogeneic hematopoietic SCT predicts the incidence of acute GVHD. Bone Marrow Transplant 査読有 2013;48:859-864

Doi:10.1038/bmt.2012.232

Morishita S, Kaida K, Yamauchi S, Wakasugi T, Yoshihara S, Taniguchi K, Ishii S, Ikegame K, Kodama N, Ogawa H, Domen K. Gender differences in health-related quality of life, physical function and psychological status among patients in the early phase following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Psychooncology. 査読有 2013;22:1159-1166 Doi:10.1002/pon.3128

Ikegame K, Kato R, Fujioka T, Okada M, Kaida K, Ishii S, Yoshihara S, Inoue T, Taniguchi K, Tamaki H, Soma T, Ogawa H. Detection of donor-derived CMV-specific T cells in cerebrospinal fluid in a case of CMV meningoencephalitis after cord blood stem cell transplantation. Int J Hematol 査読有 2013 ; 97 : 287-290 Doi:10.1007/s12185-012-1231-6.

Yoshihara S, Ando T, Ogawa H. Extramedullary relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an easily overlooked but significant pattern of relapse. Biol Blood Marrow Transplant 査読有 2012;18:1800-1807 Doi:10.1016/j.bbmt.2012.05.010.

〔学会発表〕(計 40件)

井上貴之 池亀和博 海田勝仁 岡田昌也 玉置 広哉 相馬俊裕 小川啓恭  
樹状細胞の成熟はホスト由来制御性T細胞により抑制される:GVHD発症における重要な役割について 第37回日本造血細胞移植学会総会 2015年3月6日 神戸国際会議場 兵庫県神戸市

小川啓恭 進行期血液腫瘍に対する、低用量 ATG とステロイドを用いた Unmanipulated haploidentical RIST(招待講演) 第37回日本造血細胞移植学会総会シンポジウム 2015/3/6 神戸ポートピアホテル 兵庫県 神戸市

池亀和博 Based on haplo, beyond haplo(招待講演) 第37回日本造血細胞移植学会総会シンポジウム 2015/3/5 神戸ポートピアホテル 兵庫県 神戸市

〔図書〕(計 1件)

岡田昌也 小川啓恭 造血幹細胞 骨髄内臍帯血ミニ移植の臨床開発. Annual Review 血液 2013. 東京: 中外医学社 2013; 248(29-35)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp>

## 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

岡田 昌也 (OKADA, Masaya)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 00309452

海田 勝仁 (KAIDA, Katuzi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00441254

池亀 和博 (IKEGAME, Kazuhiro)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20372609

井上 貴之 (INOUE, Takayuki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20441256