

令和元年6月10日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09882

研究課題名(和文) 高い移植片対白血病効果を発現するヒト白血球抗原半合致移植の研究

研究課題名(英文) Study of HLA-haploidentical stem cell transplantation that enables high graft-versus-leukemia effects

研究代表者

小川 啓恭 (OGAWA, Hiroyasu)

兵庫医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：80194447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：MHC半合致移植のマウスモデルを用いて、ステロイドを併用したHLA半合致移植が、高いIGVL効果をもたらす機序を研究した。デキサメサゾン(Dex)の予防投与は、GVL効果に影響を与えることなく、GVHDを抑制した。ドナーT細胞は、2次リンパ節で抗原刺激を受けて増殖したが、Dexにより完全に抑制された。一方、GVLの場である骨髄では、ドナーT細胞はホメオスタティック増殖により増殖したが、Dexの影響を全く受けなかった。さらに、骨髄で増殖するドナーT細胞は、白血病に対するCTL活性を示した。このように、骨髄とリンパ節でのT細胞の増殖様式の相違が、GVHを伴わないIGVL効果をもたらすことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HLA半合致移植で高いIGVL効果が得られる機序を明らかにすることによって、非寛解期症例にも有効な新しい移植療法の実現が期待され、現在、救命できていない50-60%の治療抵抗性の患者の救命に貢献できるものと考えられる。HLA半合致移植のGVHDを制御できるということが、現時点で、世界的な造血幹細胞移植の到達地点であるが、本研究では、その先を行き、HLA半合致移植片のアロ免疫の強さに注目し、それを逆手にとり、治療抵抗性血液腫瘍を治そうという新しい発想の研究である。よって、細胞療法の分野で、HLA適合移植からHLA不適合移植への大きなパラダイムシフトをもたらす可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：We developed originally an HLA-haploidentical stem cell transplantation, which exerts a strong graft-versus-leukemia (GVL) effect. To clarify the mechanism, we originally established a haploidentical murine BMT model. Using the model, we showed a prophylactic dexamethasone (Dex) treatment suppressed GVHD with preserving GVL effects. In secondary lymphoid organs that cause GVH reaction, donor T cells grew by antigen-driven proliferation, and Dex suppressed donor T cell proliferation completely through suppressing the activation of dendritic cells. On the other hands, in bone marrow (BM), in which GVL effects occur, donor T cells were found to grow through homeostatic proliferation, which was not affected by Dex. Furthermore, we demonstrated that donor T cells proliferating in the BM had anti-leukemic effects in in-vitro study. In conclusion, we found that the differences in proliferation style of donor T cells resulted in exerting GVL effects not accompanied by GVH reactions.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：HLA半合致移植 移植片対白血病効果 移植片対宿主病 白血病 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

通常、HLA 適合ドナーを用いて移植される同種骨髄移植は、白血病などの "otherwise fatal" な、難治性血液疾患患者に治癒をもたらす、唯一の治療である。この治療では、造血幹細胞とともに、移植されたドナーのリンパ球が、アロ免疫反応を惹起する。その一つは、患者の正常組織を攻撃する移植片対宿主 (GVH) 反応であり、もう一つは、白血病細胞を攻撃する反応、すなわち移植対白血病 (GVL) 反応である。前者は、患者にとって不利益であり、後者は有益である。HLA 適合移植では、GVL 反応が GVH 反応を少し上回るため、この治療が成立している。その成功率 (長期無病生存率) は、寛解期 (通常の検査で腫瘍が検出できない状態) で移植を行うと 60-70% であるが、非寛解期 (白血病細胞が存在) では 10-20% と大きな差がある。そのため、移植は寛解期を中心に行われてきた。これは、上述した GVL の GVH に対するわずかな優位性だけでは、非寛解期に大量に残存する腫瘍を駆逐できないからである。一般に、GVL と GVH は、大部分重なり合っていて、免疫抑制剤の投与量の調節で分けることができない。すなわち、高い GVL 効果を求めると GVHD が重症化し、その GVHD を薬で抑えると GVL 効果が低下し、再発に至る。現在、急性白血病の 40-50% の患者は、化学療法および同種移植 (寛解期) により、治癒に至っているが、残りの 50-60% の患者は、最終的に治療抵抗性となり、死の転帰を取っている。つまり、治療抵抗性となった患者に対しては、現在の移植医療は無効であり、治癒を目指した治療法を提示できない。強い抗腫瘍効果を得るには、GVH から GVL の切り離しが必須である。世界的にも、この両反応の重なり合いを解離すべく、様々な努力がなされてきたが、現在までのところ、成功を見ていない。

2. 研究の目的

steroid 併用の HLA 半合致移植は、私共が独自に考案し築き上げてきた治療法である。炎症性 cytokine を抑制することで、高い GVL 効果を実現してきた。しかし、その詳細な機序は不明である。本研究の目的は、独自に構築した MHC 半合致移植のマウスモデルで、腸間膜リンパ節、脾、骨髄の 3 つのリンパ造血組織における、免疫細胞の homing とその活性化、機能を dynamic にかつ詳細に解析することによって、高い GVL 効果をもたらす機序を解明することである。

3. 研究の方法

MHC 半合致移植のマウスモデルでの解析: 本邦を含め世界的に、HLA 半合致移植が広がりを見せている。一方、従来から、同種骨髄移植のマウスモデルは、フルアロ (ドナー/レシピエント間で、完全に MHC が異なる) の系、マイナー抗原不適合の系、parent-to-F1 (純系の親から MHC 半合致の子への移植) の系は存在したが、臨床で実施されている HLA 半合致移植 (GVH/HVG 双方向に半合致) に相当するモデルは存在しなかった。そこで、私共は、以下に示すマウスモデルを樹立した。したがって、この系は、HLA 半合致移植に対する世界初の動物モデルである。

donor; BDF1(H-2^{b/d}), recipient; B6C3F1(H-2^{b/k})

移植前処置 全身放射線照射 (TBI) 5Gy と 13Gy

移植片 骨髄細胞 1 x 10⁷, 脾細胞 3 x 10⁷

この移植モデルでは、TBI 13Gy で致死的な GVHD が発生し、5Gy では、ドナー由来の生着は生じるが、recipient は全て生存する。すなわち、前処置の強度により、生じる GVHD の強さの調節が可能である。

さらに、GVL 効果をみるため、レシピエントの造血幹細胞に、キメラ遺伝子 (MLL-AF9) を導入することによって、移植可能なレシピエント由来の白血病細胞を樹立した。このモデルを用いて、dexamethasone (Dex) の予防的投与が、GVL および GVHD に与える影響を解析した。

4. 研究成果

Dex の投与は、GVL 効果に影響を与えることなく、GVHD を有意に抑制できることが判った。さらに、リンパ造血組織における免疫細胞の動態を解析したところ、GVH を惹起する場である腸間膜 LN などの secondary lymphoid organ では、樹状細胞から抗原提示を受け、donor T cell は増殖する (antigen-driven proliferation) が、Dex により完全に抑制され、事実上、donor T cell は anergy に陥った。一方、GVL 反応が生じる場である骨髄 (primary lymphoid organ) では、donor T cell は homeostatic cytokine によって誘導される homeostatic proliferation により増殖するが、Dex の影響を全く受けなかった。さらに、骨髄で増殖する donor T cell が、白血病に対する CTL 活性を有することを in vitro で証明した。このように、secondary lymphoid organ と primary lymphoid organ における donor T cell の増殖様式の相違が、GVH を伴わない GVL 効果をもたらすことが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Tamaki H, Ikegame K, Yoshihara S, [Kaida K](#), Yoshihara K, [Inoue T](#), Kato R, Nakata J, Fujioka T, Soma T, [Okada M](#), [Ogawa H](#). Low incidence of HHV-6 reactivation in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation with corticosteroid as graft-vs-host disease prophylaxis compared with cord blood transplantation. *Transpl Infect Dis*, in press. Mar 15:e13073. doi: 10.1111/tid.13073. 査読有
2. Fujiwara SI, Kanda J, Tatara R, [Ogawa H](#), Fukuda T, Okumura H, Ohashi K, Iwato K, Ueda Y, Ishiyama K, Eto T, Matsuoka KI, Nakamae H, Onizuka M, Atsuta Y, Kanda Y. Clinical significance of low-dose total body irradiation in HLA-mismatched reduced-intensity stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2019 Jan 22. doi: 10.1038/s41409-019-0434-3. 査読有
3. Miyamura K, Yamashita T, Atsuta Y, Ichinohe T, Kato K, Uchida N, Fukuda T, Ohashi K, [Ogawa H](#), Eto T, Inoue M, Takahashi S, Mori T, Kanamori H, Yabe H, Hama A, Okamoto S, Inamoto Y. High probability of follow-up termination among AYA survivors after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv*. 12; 3: 397-405, 2019. doi: 10.1182/bloodadvances.2018026039. 査読有
4. Yoshimitsu M, Utsunomiya A, Fuji S, Fujiwara H, Fukuda T, [Ogawa H](#), Takatsuka Y, Ishitsuka K, Yokota A, Okumura H, Ishii K, Nishikawa A, Eto T, Yonezawa A, Miyashita K, Tsukada J, Tanaka J, Atsuta Y, Kato K. A retrospective analysis of haplo-identical HLA-mismatch hematopoietic transplantation without posttransplantation cyclophosphamide for GVHD prophylaxis in patients with adult T-cell leukemia-lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2018 Dec 13. doi: 10.1038/s41409-018-0400-5. 査読有
5. [Ogawa H](#), Ikegame K, Daimon T, Uchida N, Fukuda T, Kakihana K, Eto T, Ozawa Y, Kanamori H, Hidaka M, Iwato Y, Ichinohe T, Takanashi M, Atsuta Y, Kanda Y. Impact of pretransplant leukemic blast% in bone marrow and peripheral blood on transplantation outcomes of patients with acute myeloid leukemia undergoing allogeneic stem cell transplantation in non-CR. *Bone Marrow Transplant*, 53(4): 478-482, 2018. doi: 10.1038/s41409-017-0028-x 査読有
6. Mori J, Yanada M, Uchida N, Fukuda T, Sakura T, Hidaka M, Watakabe-Inamoto K, Kanamori H, [Ogawa H](#), Ichinohe T, Tanaka J, Atsuta Y, Yano S. Outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia patients with abnormalities of the short arm of chromosome 17. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 23(8):1398-1404. 2017.Aug doi: 10.1016/j.bbmt.2017.04.020. 査読有
7. Yamashita T, Ikegame K, Kojima H, Tanaka H, [Kaida K](#), [Inoue T](#), [Ogawa H](#). Effective desensitization of donor-specific HLA antibodies using platelet transfusion bearing targeted HLA in a case of HLA-mismatched allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 52(5): 794-796, 2017. May doi: 10.1038/bmt.2017.10. 査読有
8. Konuma T, Kondo T, Yamashita T, Uchida N, Fukuda T, Ozawa Y, Ohashi K, [Ogawa H](#), Kato C, Takahashi S, Kanamori H, Eto T, Nakaseko C, Kohno A, Ichinohe T, Atsuta Y, Takami A, Yano S; Adult Acute Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). Outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients with acute myeloid leukemia harboring trisomy 8.

- Annals of Hematology, 96(3):469-478, 2017. Mar doi: 10.1007/s00277-016-2909-2. 査読有
9. Kanda J, Morishima Y, Terakura S, Wake A, Uchida N, Takahashi S, Ohno Y, Onishi Y, Kanamori H, Aotsuka N, Ozawa Y, Ogawa H, Sakura T, Ohashi K, Ichinohe T, Kato K, Atsuta Y, Teshima T, Murata M. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after unrelated cord blood transplantation. *Leukemia*, 31: 663-668, 2017. doi: 10.1038/leu.2016.288. 査読有
 10. Yamasaki S, Hirakawa A, Aoki J, Uchida N, Fukuda T, Ogawa H, Ohashi K, Kondo T, Eto T, Kanamori H, Okumura H, Iwato K, Ichinohe T, Kanda J, Onizuka M, Kuwatsuka Y, Yanada M, Atsuta Y, Takami A, Yano S. Role of reduced-intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation in older patients with de novo acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*, 96: 289-297, 2017. doi: 10.1007/s00277-016-2872-y. 査読有
 11. Ikegame K, Imai K, Yamashita M, Hoshino A, Kanegane H, Morio T, Kaida K, Inoue T, Soma T, Tamaki H, Okada M, Ogawa H. Allogeneic stem cell transplantation for X-linked agammaglobulinemia using reduced intensity conditioning as a model of the reconstitution of humoral immunity. *Journal of Hematology and Oncology*, 9(1):9, 2016. doi: 10.1186/s13045-016-0240-y. 査読有
 12. Inoue T, Ikegame K, Kaida K, Okada M, Yoshihara S, Tamaki H, Fujimori Y, Soma T, Ogawa H. Host Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells act as a negative regulator of dendritic cells in the peritransplantation period. *Journal of Immunology*, 196: 469-483, 2016. doi: 10.4049/jimmunol.1402950. 査読有
 13. Kitamura K, Nishiyama T, Ishiyama K, Miyawaki S, Miyazaki K, Suzuki K, Masaie H, Okada M, Ogawa H, Imai K, Kiyoi H, Naoe T, Yokoyama Y, Chiba S, Hata T, Miyazaki Y, Hata Y, Takeuchi J, Nannya Y, Kurokawa M, Ueda Y, Koga D, Sugiyama H, Takaku F. Clinical usefulness of WT1 mRNA expression in bone marrow detected by a new WT1 mRNA assay kit for monitoring acute myeloid leukemia: a comparison with expression of WT1 mRNA in peripheral blood. *International Journal of Hematology*, 103(1): 53-62, 2016. doi: 10.1007/s12185-015-1882-1. 査読有
 14. Aoki J, Kanamori H, Tanaka M, Yamasaki S, Fukuda T, Ogawa H, Iwato K, Ohashi K, Okumura H, Onizuka M, Maesako Y, Teshima T, Kobayashi N, Yasuo M, Hirokawa M, Atsuta Y, Yano S, Takami A. Impact of age on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 91(3): 302-307, 2016. doi: 10.1002/ajh.24270. 査読有
 15. Ikegame K, Kaida K, Yoshihara S, Yoshihara K, Ishii S, Inoue T, Okada M, Tamaki H, Soma T, Kusunoki Y, Kojima H, Saji H, Ogawa H. Spousal hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*, 105(5): 646-657, 2017. doi: 10.1007/s12185-016-2168-y. 査読有
 16. Kanda J, Ikegame K, Fuji S, Kurokawa M, Kanamori H, Fukuda T, Ohashi K, Ishikawa J, Ogawa H, Inoue M, Ichinohe T, Atsuta Y, Kanda Y. Haploidentical and matched-sibling

donor hematopoietic cell transplantation for patients with HLA-homozygous haplotypes. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 22: 2031-2037, 2016. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.07.020. 査読有

17. Murata M, Ikegame K, Morishita Y, Ogawa H, Kaida K, Nakamae H, Ikeda T, Nishida T, Inoue M, Eto T, Kubo K, Sakura T, Mori T, Uchida N, Ashida T, Matsushashi Y, Miyazaki Y, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T. Low-dose thymoglobulin as second-line treatment for steroid-resistant acute GVHD: an analysis of the JSHCT. Bone Marrow Transplant, 52(2):252-257, 2017. Feb doi: 10.1038/bmt.2016.247. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 井上 貴之、池亀 和博、玉置 広哉、小川 啓恭、homeostatic proliferation を介して、steroid 抵抗性に増殖する骨髄ドナーT細胞は、GVHとGVLの解離を起こす、第41回日本造血細胞移植学会総会、2019年
2. 大杉夕子、海田 勝仁、池亀 和博、川口真理子、吉原 哲、福永 景子、吉原 亨子、井上 貴之、玉置 広哉、岡田 昌也、藤盛 好啓、小川 啓恭、AYA世代におけるHLA半合致移植-移植の成績と問題点、第41回日本造血細胞移植学会総会、2019年
3. 玉置 広哉、池亀 和博、海田 勝仁、丸山 聡、眞弓あずさ、井上 貴之、寺本 昌弘、吉原 哲、岡田 昌也、小川 啓恭、非寛解白血病に対するハプロミニ移植におけるWT1測定の意義:単施設解析。第40回日本造血細胞移植学会総会、2018年
4. 藤原 慎一郎、諫田 淳也、多々良 礼音、小川 啓恭、福田 隆浩、奥村 廣和、大橋 一輝、岩戸 康浩、上田 恭典、内田 直之、鬼塚 真仁、熱田 由子、神田 善伸、HLA不適合骨髄非破壊的移植における低線量TBIの臨床的意義。第40回日本造血細胞移植学会総会、2018年
5. Murata M, Ikegame K, Morishita Y, Ogawa H, Nakamae H, Ikeda T, Nishida T, Inoue M, Eto T, Ichinohe T, Atsuta Y, Teshima T, Low-dose thymoglobulin as second-line treatment for steroid-resistant acute GVHD: a JSHCT analysis, 第78回日本血液学会学術集会、2016年
6. 小川啓恭、非寛解期血液腫瘍に対する少量ATGとステロイドを用いるHLA半合致移植、日本輸血・細胞治療学会(招請講演)、2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岡田 昌也
ローマ字氏名：(OKADA, Masaya)
所属研究機関名：兵庫医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：00309452

研究分担者氏名：海田 勝仁
ローマ字氏名：(KAIDA, Katsuji)
所属研究機関名：兵庫医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：00441254

研究分担者氏名：井上 貴之
ローマ字氏名：(INOUE, Takayuki)
所属研究機関名：兵庫医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号(8桁)：20441256

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。