



Title	造血細胞移植後の合併症を予測するバイオマーカーに関する研究
Author(s)	寺下, 友佳代
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14077号
Issue Date	2020-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k14077
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/80655
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2542
File Information	Yukayo_Terashita.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

造血細胞移植後の合併症を予測する
バイオマーカーに関する研究

(Study on predictive biomarkers for complications
after hematopoietic stem cell transplantation)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

寺下 友佳代

学 位 論 文

造血細胞移植後の合併症を予測する
バイオマーカーに関する研究

(Study on predictive biomarkers for complications
after hematopoietic stem cell transplantation)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

寺下 友佳代

目次

1. 発表論文目録および学会発表目録	1
2. 要旨	2
3. 略語表	5
4. 緒言	6
4-1 小児の造血細胞移植	6
4-2 移植関連合併症	7
4-3 化学療法後および造血細胞移植後の色素沈着	7
4-4 5S-システイニルドーパ	8
4-5 本研究の目的	9
5. 対象と方法	10
5-1 対象患者	10
5-2 血清 5S-システイニルドーパの測定	10
5-3 血清 5S-システイニルドーパの推移	11
5-4 血清 5S-システイニルドーパとの関連性を評価する項目	11
5-5 統計学的分析方法	14
6. 結果	15
6-1 患者の臨床的背景	15
6-2 移植関連合併症	15
6-3 血清 5S-システイニルドーパの推移	16
6-4 血清 5S-システイニルドーパとの関連性	17
7. 考察	26
8. 結論	30
9. 謝辞	31
10. 利益相反	31
11. 引用文献	32

1. 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Yukayo Terashita, Akihiro Iguchi, Minako Sugiyama, Yuko Cho, Houman Goudarzi, Isao Yokota, Atsushi Manabe
Serum 5-S-cysteinyldopa as a predictive biomarker for stem cell transplantation-related complications in children and young adults.
Pediatric Blood & Cancer (投稿中)(2019)
2. Yukayo Ukeba-Terashita, Ryoji Kobayashi, Daiki Hori, Satoru Matsushima, Hirozumi Sano, Daisuke Suzuki, Masahide Nakajima, Masahiko Suzuki, Michihiko Ueno, Shoji Fujita, Kunihiro Kobayashi
Long-term outcome of renal function in children after stem cell transplantation measured by estimated glomerular filtration rate.
Pediatric Blood & Cancer 66, e27478 (2019)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Yukayo Terashita, Mamoru Honda, Minako Sugiyama, Yuko Cho, Akihiro Iguchi
Serum levels of 5-S-cysteinyldopa is associated with stem cell transplantation related complications

45th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, 26th March, 2019, Frankfurt, Germany

2. 要旨

【背景と目的】造血細胞移植は小児領域において白血病などの血液疾患、悪性固形腫瘍、原発性免疫不全症などの多岐にわたる疾患に対して広く普及している治療法である。しかし、移植後 100 日以内の早期合併症は移植関連死亡の主な原因となっており、その対策は治療成績向上に極めて重要である。化学療法または造血細胞移植を受けた患者において、皮膚の色素沈着は頻度が高い副作用症状の一つである。化学療法後の色素沈着をきたす抗腫瘍剤としてアルキル化剤が代表的であり、薬剤投与後 1-4 週の間には身体全体から爪を含めた局所的に皮膚反応が観察される。一般的な色素沈着の機序はメラニンの合成亢進もしくは炎症などの基底膜破壊によりメラニンが真皮層に停滞した結果と考えられており、造血細胞移植後の色素沈着は移植前処置での抗腫瘍剤、特にアルキル化剤の使用や全身照射、移植片対宿主病 (GVHD) 等の移植関連合併症による皮膚傷害がメラニンの合成亢進もしくは基底膜を破壊することが原因と推測される。しかし、その機序は明らかにされておらず、他の移植関連合併症との関連性についての報告も少ない。今回、造血細胞移植後の皮膚の色素沈着に着目し、移植関連合併症や予後との関連性を推測した。しかし、視診では主観的な視覚、光源などの環境条件を一貫して保つことは困難であり、皮膚色の程度を一律に評価することは不可能である。そこで、客観的な指標として二種類のメラニンの内の一つであるフェオメラニンの前駆物質、5S-システイニルドーパ (5SCD) を用いることとした。5SCD は悪性黒色腫の病勢マーカーとして臨床的に広く使用されており、血清 5SCD は年齢に依存しないことが知られている。本研究の目的はこの血清 5SCD 値と移植関連合併症との関連性について検討することである。関連性が明らかとなれば、血清 5SCD 値を移植関連合併症のバイオマーカーとして用いることによって移植後早期の合併症の予防や制御に役立ち、より安全な移植治療の向上に寄与することができると考える。また、小児に限らず成人も含めた造血細胞移植の診療で日常行われる最も施行容易な皮膚の視診で移植合併症を予測することができる可能性を見出すことができると考える。

【対象と方法】2011 年 5 月から 2015 年 3 月まで北海道大学病院小児科で造血細胞移植を施行された 41 例 (移植時平均年齢 7.95 歳 (0-22 歳)、男児 27 例、女児 14 例) を対象とし、前向き観察研究を行った。各合併症の発症時期を考慮して、造血細胞移植日を day0 とし、血清 5SCD 値の測定ポイントを前処置開始前、day0、day5、day10、day15、day25、day40 の計 7 ポイントと

した。はじめに、上記 7 ポイントの各平均値を算出し、移植前後の血清 5SCD 値の推移を解析した。次に、前処置前を除いた day0 以降の 6 ポイントの値に加えて、7 ポイント中の最高値と、前処置前の値と最高値の差(上昇値)の計 8 つの値の血清 5SCD 値と移植関連合併症、前処置の強度・内容、造血細胞移植、ステロイドの使用、死亡もしくは再発のイベント、悪性疾患などの項目を更に細かくした 15 項目との関連性を解析した。統計学的解析方法は単変量ロジスティック解析を用いた単変量解析の結果の中から有意に関連性が示された移植合併症の項目についてロジスティック回帰解析を用いて多変量解析を行い、バイオマーカーとしての独立性を示した。

【結果】患者の臨床的背景は悪性疾患 32 例(血液悪性疾患 21 例、悪性固形腫瘍 11 例)に対して非悪性疾患 9 例、同種移植 34 例に対して自家移植 7 例、前処置強度は骨髄破壊的前処置 30 例に対して骨髄非破壊的前処置 11 例、同種移植 34 例に対して自家移植 7 例であった。移植関連合併症はウイルス再活性化 21 例、生着前症候群 18 例、急性移植片対宿主病(GVHD)19 例のうち、Grade II-IV の急性 GVHD は 12 例、急性皮膚 GVHD は 16 例であった。血清 5SCD 値の 7 ポイントの各々の平均値の推移は、day0 と day5 に向けてピークに達し以降は徐々に低下し、day40 には正常範囲内となった。血清 5SCD 値と評価項目間の単変量解析では、血清 5SCD の day0 値とウイルスの再活性化($p=0.044$)、day5 値と生着前症候群($p=0.041$)の間に有意に関連性が示された。同種移植患者($n=34$)に限定した場合、血清 5SCD の最高値、上昇値と急性 GVHD($p=0.030, 0.016$)、day5 値、上昇値と急性皮膚 GVHD($p=0.030, 0.026$)にそれぞれ有意な関連性が示された。以上の項目で多変量解析を行なった結果、血清 5SCD の day0 値とウイルスの再活性化($p=0.002$)、day5 値と生着前症候群($p=0.007$)、最高値、上昇値と急性 GVHD($p=0.014, 0.015$)、day5 値、上昇値と急性皮膚 GVHD($p=0.011, 0.005$)の間で独立した有意な関連性を示した。尚、血清 5SCD 値と前処置の強度や内容、同種・自家移植、予後との間には関連性はなかった。

【考察】本研究の結果から造血細胞移植に伴って血清 5SCD 値は上昇し、また血清 5SCD 値が急性 GVHD、生着前症候群、ウイルス再活性化など、免疫学的機序で発症する移植関連合併症を予測するバイオマーカーとなる可能性を見出した。血清 5SCD 値の上昇は治療薬による直接的な細胞傷害だけでなく、上記合併症と関連してフェオメラニンの合成が促進されることよると推測された。今回の研究ではメラニン合成経路の中で活性化される箇所については特定できなかった。また、それぞれの合併症と関連性が示された血清

5SCD 値のポイントは複数あったが、移植前後の血清 5SCD 値の推移で day0 と day5 に最高値となる傾向であったことから、移植前の値を基礎値として、day0 または day5 の値が合併症を予測するマーカーとしての意義があると考えた。血清 5SCD 値と前処置の強度や内容との関連性が示されなかったが、当然のごとく全ての症例で前処置が行われ、また 95%の症例でアルキル化剤を用いていることから、前処置とくにアルキル化剤が 5SCD に及ぼす影響は否定できなかった。本研究の結果から皮膚の色素沈着の程度が移植関連合併症と関連性がある可能性も見出したが、しかし、5SCD 上昇とメラニン産生の関係について検証するために、皮膚の病理所見上でのメラニン色素産生増加を確認する必要がある、今後の課題である。

【結論】血清 5SCD 値は急性 GVHD やウイルス再活性化などの免疫学的機序によって発症する移植関連合併症の予測バイオマーカーとなる可能性が示された。今回の結果を明確に実証するために更なる前向き研究が必要である。

3. 略語表

本文および図中で使用した略語は以下の通りである。

ATG	anti-thymocyte globlin
BU	busulfan
CI	confidence interval
CY	cyclophosphamide
GVHD	graft-versus-host disease
IQR	inter quartile range
L-PAM	melphalan
MAC	myeloablative conditioning
OR	odds ratio
RIC	reduced intensity conditioning
TBI	total body irradiation
5SCD	5-S-cysteinyldopa

4. 緒言

造血細胞移植は小児領域において白血病などの血液疾患、悪性固形腫瘍、原発性免疫不全症などの多岐にわたる疾患に対して広く普及している治療法である。しかし、移植後 100 日以内の早期合併症は移植関連死亡の主な原因となっており、その対策は治療成績向上に極めて重要である。

また、化学療法後や造血細胞移植後に皮膚に色素沈着などの皮膚反応を認めることは臨床的によく知られている。しかし、その機序や他の移植関連合併症との関連性については明らかになっていない。

本項では、小児における造血細胞移植治療の位置付け、移植関連の合併症、化学療法や造血細胞移植後の皮膚の色素沈着、血清 5S-システイニルドーパ (5SCD: 5-S-cysteinyl-dopa) について言及し、本研究の目的について述べる。

4-1 小児における造血細胞移植

本邦における 20 歳未満の造血細胞移植の年間総数は約 600 例であり、うち約 500 例に同種移植が施行されている。小児の移植適応疾患は、急性白血病などの血液疾患、神経芽細胞腫などの悪性固形腫瘍、慢性肉芽腫症や Wiscott-Aldrich 症候群などの原発性免疫不全症、ムコ多糖症などの先天性代謝異常異常症など多岐にわたる。疾患別の割合は同種移植の半数以上が急性白血病(リンパ性:骨髄性=1.5:1)であり、次いで再生不良性貧血が約 10% を占める。自家移植では悪性固形腫瘍が圧倒的に占めており、大量化学療法による造血機能不全を救済するために行われている(日本における造血幹細胞移植の実績 2018 年度:日本造血細胞移植センター)。血液悪性疾患に関しては急性リンパ性白血病を代表として、化学療法による治療成績の向上を反映し、層別化された治療が発展しているため、移植適応に際しては以前よりも慎重になりつつある(Pulsipher et al. 2011; Biol Blood Marrow Transplant., 17, Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ), National Cancer Institute HP)。悪性固形腫瘍においては自家移植総数が 9 割を占めるが、難治性神経芽腫においては骨髄非破壊的前処置を使用して免疫効果を期待した同種臍帯血移植も施行され、予後の改善に寄与している(Paillard et al. 2013; Bone Marrow Transplant., 48, Illhardt et al. 2018; Biol Blood Marrow Transplant., 24)。原発性免疫不全症や先天性代謝異常症は他と比較して稀な疾患群であり、根本治療として同種移植が選択される。

本研究の対象となった北海道大学病院小児科においても移植適応は前述と同様、疾患は多岐にわたり、年間約 10-15 例の造血細胞移植が行われている。小児期は成長途上であり、今後の将来が長いことを考慮すると、造血細胞移植による合併症には特に配慮が必要である。

4-2 移植関連合併症

造血細胞移植に関連した合併症のうち、移植後 100 日以内に発症する早期の合併症として、ウイルスの再活性化、肝中心静脈閉塞症、血栓性微小血管障害症、同種移植においては移植片対宿主病 (GVHD: graft-versus-host disease) が挙げられる。これらの合併症を予防、制御することは移植関連死亡や原病の治癒に影響するため、極めて重要である。

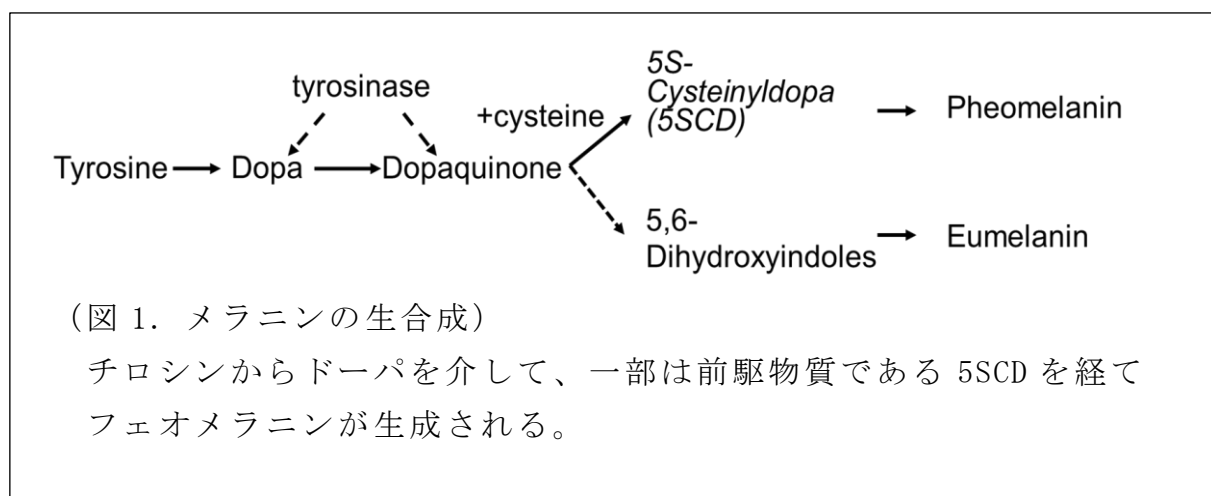
4-3 化学療法や造血細胞移植後の色素沈着

皮膚の色素沈着は化学療法または造血細胞移植を受けた患者に観察される頻度が高い副作用症状の一つである。化学療法後の色素沈着は抗腫瘍剤を投与後 1-4 週の間には身体全体から爪を含めた局所的に観察され、代表的な抗腫瘍剤としてシクロホスファミド (CY: cyclophosphamide)、イホスファミド、ブスルファン (BU: busulfan) およびチオテパなどのアルキル化剤が知られている (Reyes-Habito et al., 2014; J Am Acad Dermatol., 71, Susser et al., 1999; J Am Acad Dermatol., 40)。小児例ではチオテパを用いた自家移植患者の約 84% に紅斑、落屑、色素沈着などの皮膚症状が出現したとの報告がある (Rosman et al., 2009; J Am Acad Dermatol., 58)。

皮膚の色素沈着の機序はメラニンの合成亢進もしくは炎症などの基底膜破壊によりメラニンが真皮層に停滞した結果と考えられている (Chandra et al., 2012; Acta Derm Venereol., 92)。よって、造血細胞移植後の色素沈着は移植前処置に使用する抗腫瘍剤、特に色素沈着を来しやすい BU や CY 等のアルキル化剤や全身照射 (TBI: total body irradiation) の使用、GVHD 等の移植関連合併症による皮膚傷害がメラニンの合成亢進もしくは基底膜を破壊することが原因と推測される。しかし、成人を含め皮膚の色素沈着と移植関連合併症との関連についての報告は少なく、また色素沈着の詳細な原因と機序は明らかにされていない。

4-4 5S-システイニルドーパ (5SCD)

メラニンとはメラノサイトのメラノソームによって生成される。メラニンは、黒色メラニンであるユーメラニンと黄色メラニンであるフェオメラニンの2種類に分けられ、その比率で肌と髪の色を決定される。これら2種類のメラニンの生成の代謝経路を示した(図1)。チロシンがチロシナーゼによってドーパを介してドーパキノンに酸化された後、ユーメラニンは中間体として5,6-ジヒドロキシインドールを経て合成される。一方、フェオメラニンは前駆物質の5SCDを経て生成される(Ito et al., 2008; Photochem Photobiol., 84)。



5SCDの一部は、血液中に漏出し肝臓で代謝された後、尿中に排泄される。日本人の健常成人における平均値は尿中5SCD値で $0.4 \mu\text{mol/day}$ 、血清5SCD値で 4nmol/l 前後であり、尿中5SCD値は高齢者で低下し年齢によって変動する一方で、血清5SCD値はほとんど年齢に依存しないとされている(Horikoshi et al., 1994; Cancer., 73)。しかし、小児での測定値の検討はなされておらず、また人種差もあると推測されるが、そのデータは明らかではない。また、フェオメラニンは紫外線にさらされると活性酸素を生成する光増感剤として作用する可能性があるため、5SCDは紫外線の影響を受けるとの報告もある(Murakami et al., 2007; Blood Purif., 25, Murakami et al., 2009; Blood Purif., 28)。実臨床においては、血清5SCD値は悪性黒色腫の病勢マーカーとして広く使用されており(Brochez et al., 2000; Br J Dermatol., 143, Bánfalvi et al., 2003; Eur J Cancer., 39, Uemura et al., 2017; J Dermatol., 44)、また血液透析患者や腎不全の患者で上昇することも報告されている(Murakami et al., 2007; Blood Purif., 25, Murakami et al., 2009; Blood Purif., 28)。

4-5 本研究の目的

今回、造血細胞移植後の皮膚の色素沈着に着目し、移植関連合併症や予後との関連性の存在を推測した。しかし、視診では主観的な視覚、光源などの環境条件を一貫して保つことは困難であるため、皮膚色や色素沈着の程度の一律な評価は不可能である。そこで、客観的な指標として前述のメラニン合成過程で生成される 5SCD を用いることとした。本研究の目的はこの血清 5SCD 値と移植関連合併症との関連性について検討することである。関連性が明らかとなれば、血清 5SCD 値を移植関連合併症のバイオマーカーの可能性を見出すことができ、そのことで移植後早期の合併症の予防や制御に役立ち、より安全な移植治療の向上に寄与できると考える。また、小児に限らず成人も含めた造血細胞移植の診療で日常行われる最も施行容易な皮膚の視診で移植合併症を予測することができる可能性も見出すことができると考える。

5. 対象と方法

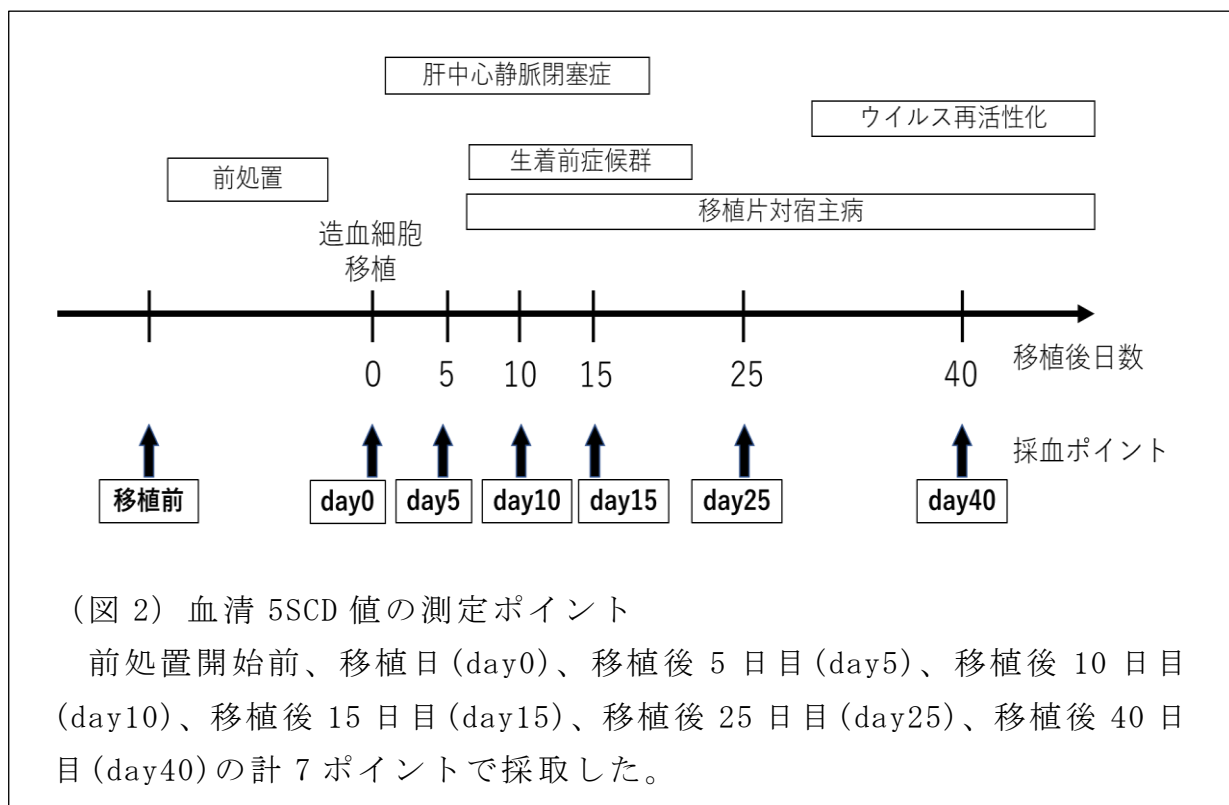
5-1 対象患者

2011年5月から2015年3月の間に北海道大学病院小児科で造血細胞移植を施行された41例（移植時平均年齢7.9歳、男児27例、女児14例）を対象に前向き観察研究とした。移植日からの観察期間は平均2056日（1319-3027日）であった。北海道大学病院の臨床研究審査委員会の承諾を得た後、全ての症例において本研究への登録について説明を行い、患者本人もしくは患者が未成年の場合は保護者から同意を得た。

5-2 血清5SCD値の測定

本研究は血清5SCD値と移植関連合併症との関連性を調査することを主目的としている。血清5SCD値の各種合併症の発症前後の変化をとらえるため、早期合併症を発症しやすい時期を考慮して、血清5SCD値の測定ポイントを次のように決定した(図2)。

造血細胞移植日をday0とし、前処置開始前、day0、day5、day10、day15、day25、day40の計7ポイントで測定する方針とした。



全ての患者が造血細胞移植前に中心静脈カテーテルが挿入されていたため、カテーテルからの逆流血を計 1ml 採取した。また日常の臨床で必要な血液検査と同時に施行したため患者への侵襲は極めて低かった。

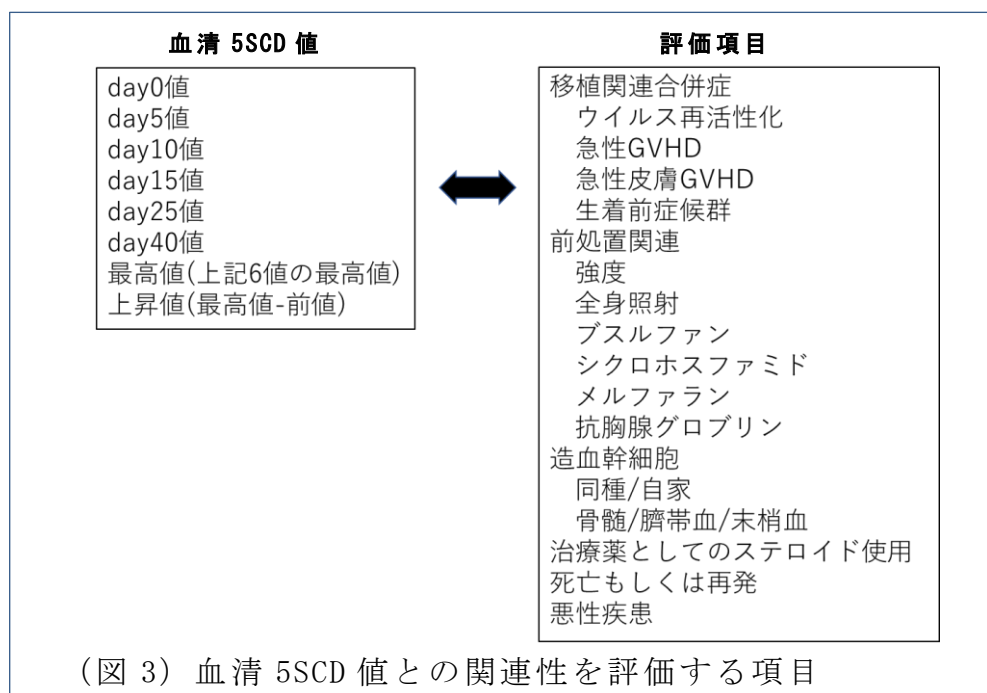
測定は株式会社エスアールエルに依頼した。検査法は HPLC(High Performance Liquid Chromatography)法、測定機器は HPLC システム(島津製作所、日立製作所、日本分光)、試薬は Wakosil-II 5C18HG(富士フィルム、和光純薬株式会社)を使用した(Wakamatsu et al., 1994; Clin Chem., 40)。血清 5SCD 値の小児の正常範囲のデータがないため、健常成人の正常範囲 1.5-8.0nmol/L を参考値とした。休日などで当日に検体を提出できない場合は血液を 15 分間 3,000rpm で遠心分離後に血清を-80℃で保存し、後日提出した。

5-3 血清 5SCD 値の推移

上記 7 ポイントの血清 5SCD の各平均値を算出し、造血細胞移植前後での血清 5SCD 値の推移をグラフ化した。

5-4 血清 5SCD 値との関連性を評価する項目

前処置前を除いた day0 以降の計 6 ポイントの値に加えて、7 ポイント中の最も高い値(最高値)と前処置前の値と最高値の差(上昇値)の合計 8 ポイントの各々の値と下記の評価項目との関連性を解析した(図 3)。



5-4-1 移植関連合併症

- 1) ウイルス活性化：発症時期として移植後早期から単純ヘルペスウイルス、移植後 3-4 週後からサイトメガロウイルスと EB ウイルス、移植後 3 か月後から水痘帯状疱疹ウイルスが再活性化しやすい(Boeckh et al., 2004; Blood, 103, Locksley et al., 1985; J Infect Dis., 152)。リスク因子として高年齢、抗胸腺グロブリン(ATG: anti-thymocyte globulin)の使用、臍帯血移植、ステロイドの使用が挙げられる(Boeckh et al., 2003; Biol Blood Marrow Transplant., 9)。全症例とも移植前 7 日から移植後 35 日目までにアシクロビルを内服している。
- 2) 急性 GVHD：皮膚、肝臓、消化管を標的とした症状が出現する。重症度 Grade I と Grade II-IV に分けて重症度の項目についても解析した。臓器障害 stage と Grade 分類は従来 of Glucksberg による分類法(Glucksberg et al., 1974; Transplantation, 18)を一部変更したものをを用いた(日本造血細胞移植学会による造血細胞移植ガイドライン GVHD(第 4 版))。症状が重症な症例はステロイドを使用する(Deeg H. J., 2007; Blood, 109)。今回指標として用いた 5SCD はメラニンの前駆物質であるため、皮膚に特に反応することが推測されたため、急性皮膚 GVHD についても解析した。
- 3) 生着前症候群：生着前後に発熱、皮疹、capillary leak syndrome 等を特徴とする。Spitzer の診断基準に準じた (Spitzer et al., 2001; Bone Marrow Transplant., 27)。急性 GVHD の症状との鑑別が困難な場合もあり、またその後に急性 GVHD の発症することもある。症状が顕著である場合はステロイドによる治療を行う (Lee et al., 1995; Bone Marrow Transplant., 16)。

なお、肝中心静脈閉塞症は 2 例、血栓性微小血管障害症は 1 例、細菌・真菌感染症は 3 例と少なかったため、いずれも評価項目に含めなかった。

5-4-2 前処置関連

- 1) 強度：前処置内容が TBI $\geq 8\text{Gy}$ 、BU $\geq 6.4\text{mg/kg}$ 、メルファラン(L-PAM: melphalan) $\geq 140\text{mg/m}^2$ を骨髄破壊的前処置(MAC: myeloablative conditioning)定義し、それ以外を骨髄非破壊的前処置(RIC: reduced intensity conditioning)とした(日本造血細胞移植学会による造血細胞移植ガイドライン：移植前処置)。基本的に悪性疾患の前処置は MAC、非悪性疾患の前処置は RIC を用いた。悪性疾患の中でも神経芽腫の同種移植や臓器障害などの背景から RIC を用いた症例もあった。

- 2) 全身照射：活発に増殖する皮膚の基底細胞は放射線の感受性が高く、照射範囲内に放射線皮膚炎を起こすことが明らかとなっている (Hymes et al., 2006; J Am Acad Dermatol., 54)。一般的な放射線治療線量と比較して低線量(2-12Gy)であるが、皮膚に影響を及ぼす可能性があると考えられたため評価項目に含めた。
- 3) 前処置の薬剤：アルキル化剤は色素沈着を含めた皮膚症状による副作用を発症する頻度が高いことが知られている。本研究では全 41 例中 40 例にアルキル化剤を使用していたため、アルキル化剤自体の評価は困難であり、アルキル化剤の中で BU、CY、L-PAM の各々を評価項目とした。ATG は T リンパ球を抑制する作用があるため、移植後のウイルス再活性化のリスク因子となり (Boeckh et al., 2003; Biol Blood Marrow Transplant., 9)、また GVHD の発症も抑制するため (Kumar et al., 2012; Leukemia, 26)、多因子にわたる関連性もあると考え、評価項目に含めた。

5-4-3 造血幹細胞

- 1) 自家/同種移植：自家移植と比較して同種移植は急性 GVHD や免疫抑制剤を使用することで合併症が多い。複数の合併症と関連性があるため評価項目に含めた。
- 2) 骨髓血/臍帯血/末梢血：自家移植は全例末梢血の幹細胞、神経芽腫の同種移植は全例臍帯血を使用している。同種移植の末梢血は生着が早く抗腫瘍効果が期待できる一方で慢性 GVHD のリスクが高くなり (Nagafuji et al., 2010; Int J Hematol., 91)、臍帯血は生着不全やウイルス再活性化のリスク因子となるが急性 GVHD は発症しにくいなどそれぞれに特徴がある (Takahashi et al., 2004; Blood, 104)。以上から多くの因子と関連性が予測されるため評価項目に含めた。

5-4-4 その他の項目

- 1) ステロイドの使用：生着前症候群や急性 GVHD の治療薬としてステロイド薬を使用した症例があった。複数の合併症との関連性も推測され、またステロイドを使用することで内因性のステロイドが制御され、色素沈着を促す ACTH に影響を及ぼすことが懸念されたため項目に含めた。
- 2) 再発あるいは死亡のイベント：原病による再発や死亡、移植関連による死亡を含めた。今回は移植後 100 日以内に死亡した症例は 2 例と少な

かったため、評価には含めなかった。

- 3) 悪性疾患：造血細胞移植前に複数サイクルの化学療法を施行している場合が多いため、化学療法の影響を検討するため項目に含めた。

5-5 統計学的解析方法

評価項目においての各々の血清 5SCD の計 8 値の中央値と四分位点間距離 (IQR: inter quartile range) を算出した。単変量ロジスティック回帰分析を用いて、各 5SCD 値と各種評価項目で単変量解析を行った。Odds ratio (OR)、95%信頼区間 (CI: confidence interval)、P 値 (有意確率) を算出して関連性を評価した。尚、OR は血清 5SCD 値を /10nmol/L に設定した。そのうち、有意な関連性が判明した移植関連合併症の項目でロジスティック回帰分析を用いた多変量解析を行った。既知のリスク要因のうち、単変量解析で影響を及ぼす項目 ($p < 0.2$) を交絡因子とした。同様に OR、95%CI、P 値から独立性を評価し、OR は血清 5SCD 値を /10nmol/L に設定した。すべての統計分析は JMP バージョン 14 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) を使用し、統計学的有意水準を $p < 0.05$ 、95%CI 下限 1.0 に設定した。

6. 結果

6-1 患者の臨床的背景

本研究の登録症例は全 41 例、造血細胞移植時の平均年齢は 7.9 歳（0-22 歳）であった。疾患、移植細胞、前処置の強度と内容、GVHD 予防薬、ステロイドの使用の内訳を示す(表 1)。血清 5SCD 値の影響因子である腎不全や血液透析中の症例はなかった。

(表 1) 患者の臨床的背景

		n	%			n	%
性別	男/女	27/14	66/34	移植細胞	骨髓血	17	41
疾患	悪性疾患	32	78		臍帯血	14	34
	急性骨髄性白血病	10	24		末梢血	10	24
	急性リンパ性白血病	9	22	ドナー	自家	7	17
	若年性骨髄単球性白血病	2	4.9		同種	34	83
	悪性固形腫瘍	11	27		HLA一致	15	44
	神経芽腫	4	9.8		HLA不一致	19	56
	Ewing肉腫	1	2.4	前処置強度	骨髓破壊的前処置	30	73
	髄芽腫	1	2.4		骨髓非破壊的前処置	11	27
	横紋筋肉腫	1	2.4	前処置内容	全身照射	25	61
	胎児性癌	1	2.4		ブスルファン	14	34
	非悪性疾患	9	22		シクロホスファミド	16	39
	再生不良性貧血	2	4.9		メルファラン	22	54
	Diamond Blackfan貧血	1	2.4		抗胸腺グロブリン	14	34
	慢性肉芽腫症	3	7.3	GVHD予防	タクロリムス	20	49
	Wiskott-Aldrich症候群	1	2.4	(n=34)	シクロスポリン	8	20
	CD40リガンド欠損症	1	2.4		メソトレキサート	32	78
	慢性皮膚粘膜カンジダ症	1	2.4	治療	ステロイド使用	20	49

6-2 移植関連合併症

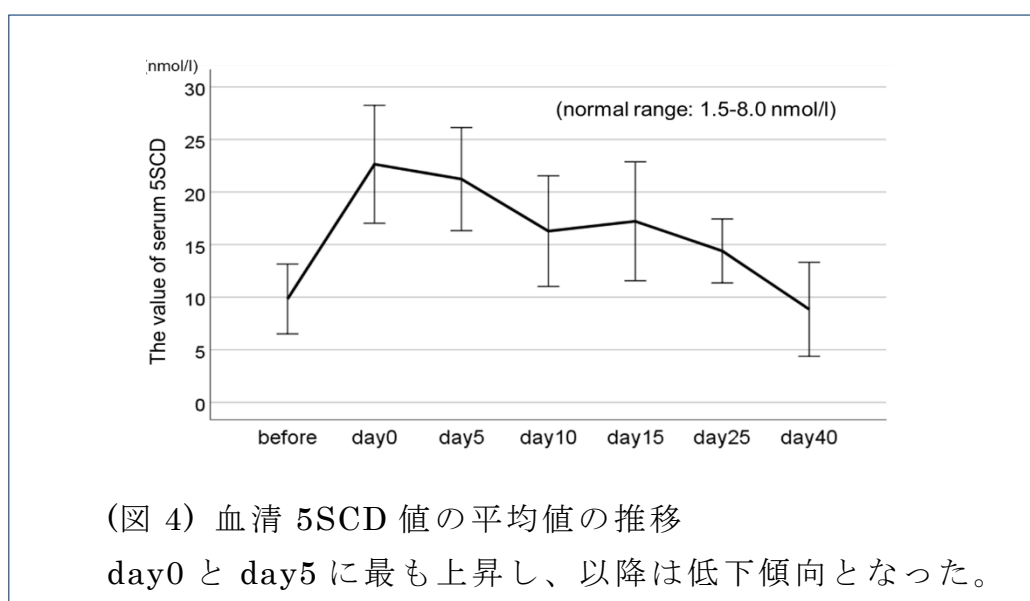
評価項目一つである移植関連合併症を発症した症例数を示した(表 2)。ウイルス性腸炎と消化管 GVHD の鑑別困難であった 1 例のみ腸管の生検術を施行した。皮膚の生検術を施行した症例はなかった。移植後 100 日以内に死亡した 2 例は、1 例は固形腫瘍の患者で 2 回目の自家造血細胞移植後に肝静脈閉塞症とアデノウイルス感染を発症し、移植後 60 日後に死亡した。もう 1 例は急性リンパ性白血病の患者で、重症急性 GVHD にアデノウイルス感染を併発し、移植後 87 日目に死亡した。

(表 2) 移植関連合併症の内訳

	n	%	
生着前症候群	18	44	
急性GVHD	19	56	(34人中)
皮膚GVHD	16	47	(34人中)
Grade II -IV	12	35	(34人中)
ウイルス再活性化	21	51	
サイトメガロウイルス	13	32	
EBウイルス	4	9.8	
水痘帯状疱疹ウイルス	4	9.8	
アデノウイルス	3	7.3	
再発または死亡	13	32	
移植後100日以内の死亡	2	4.9	

6-3 血清 5SCD 値の推移

血清 5SCD 値の 7 ポイントの各々の平均値を算出した。day0 と day5 をピークに以降は徐々に低下し、day40 に正常範囲となる推移を示した(図 4)。血清 5SCD 値は前処置前と比較して造血細胞移植に向けて上昇し、day10 以降から低下する傾向となることが明らかとなった。



6-4 血清 5SCD 値との関連性

6-4-1 単変量解析

血清 5SCD の計 8 値を評価項目毎に中央値と四分位点間距離 (IQR) を算出した。また評価項目毎に単変量解析を行い、OR、95%CI、P 値 (有意確率) を示した (表 3-1 から 3-16)。尚、示す結果が多いため、統計学的に有意性のある項目を太字で示した。

有意な関連性が示された項目

- ・血清 5SCD の day0 値とウイルスの再活性化 (p=0.044) (表 3-1)
- ・血清 5SCD の day5 値と生着前症候群 (p=0.041) (表 3-5)
- ・血清 5SCD の day25 値、day40 値と臍帯血 (p=0.037, 0.025) (表 3-13)
- ・血清 5SCD の最高値と悪性疾患 (p=0.038) (表 3-16)

同種移植患者 (n=34) のみにおいて

- ・血清 5SCD の最高値と急性 GVHD (p=0.030) (表 3-2)
- ・血清 5SCD の上昇値と急性 GVHD (p=0.016) (表 3-2)
- ・血清 5SCD の day5 値と急性皮膚 GVHD (p=0.030) (表 3-4)
- ・血清 5SCD の上昇値と急性皮膚 GVHD (p=0.026) (表 3-4)

・血清 5SCD 値と急性 GVHD、急性皮膚 GVHD との関連性はそれぞれ示されたが、GVHD の重症度とはいずれも関連性がなかった。

・血清 5SCD 値は前処置の強度や内容、同種/自家移植、予後に関するイベントとはいずれも関連性がなかった。

(表 3-1) ウイルス再活性化

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=21)	なし(n=20)			
day0	27.9(27.25)	11.90(27.45)	1.566	1.012-2.424	0.044
day5	22.90(20.20)	18.55(32.27)	1.045	0.731-1.493	0.810
day10	8.00(18.95)	13.45(21.90)	1.020	0.685-1.518	0.923
day15	12.70(18.95)	26.45(21.90)	0.852	0.572-1.270	0.433
day25	10.70(17.35)	15.90(16.87)	0.698	0.366-1.333	0.276
day40	4.35(11.15)	2.70(12.70)	0.805	0.456-1.421	0.454
最高値	29.80(25.90)	27.10(32.67)	0.899	0.637-1.240	0.488
上昇値	14.40(26.45)	19.05(30.52)	0.978	0.689-1.389	0.903

(表 3-2) 急性 GVHD (n=34)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=19)	なし(n=15)			
day0	27.90(30.05)	13.50(17.30)	1.493	0.916-2.433	0.108
day5	25.40(29.15)	12.10(16.80)	1.635	0.978-2.734	0.061
day10	7.40(39.20)	8.00(14.60)	1.242	0.803-1.921	0.330
day15	20.80(27.80)	9.90(14.80)	1.322	0.811-2.155	0.263
day25	17.00(19.65)	10.70(15.80)	1.143	0.595-2.198	0.688
day40	6.80(12.85)	1.00(9.70)	1.514	0.585-3.923	0.454
最高値	40.40(38.10)	18.20(25.80)	1.605	1.047-2.459	0.030
上昇値	32.60(35.35)	8.70(10.40)	1.817	1.116-2.959	0.016

(表 3-3) 急性 GVHD(Grade II-IV)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=13)	なし(n=21)			
day0	26.60(23.10)	16.30(24.25)	1.621	0.662-1.576	0.925
day5	25.40(30.10)	18.20(22.70)	1.292	0.859-1.946	0.201
day10	6.50(42.20)	14.80(25.90)	1.000	0.656-1.523	0.999
day15	6.50(22.60)	12.70(22.15)	0.876	0.549-1.397	0.570
day25	13.90(15.60)	14.70(16.80)	0.786	0.396-1.557	0.482
day40	1.50(11.40)	4.10(11.45)	0.792	0.386-1.625	0.475
最高値	40.40(26.90)	25.00(26.55)	1.286	0.889-1.860	0.171
上昇値	28.30(31.90)	12.00(29.10)	1.242	0.854-1.805	0.249

(表 3-4) 急性皮膚 GVHD

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=16)	なし(n=18)			
day0	28.25(35.28)	14.50(21.33)	1.532	0.947-2.477	0.082
day5	28.05(30.03)	15.15(17.53)	1.795	1.059-3.044	0.030
day10	7.10(36.03)	11.40(25.50)	1.035	0.686-1.561	0.871
day15	19.60(28.48)	11.10(19.73)	1.266	0.801-1.999	0.313
day25	17.25(17.52)	10.30(17.48)	1.250	0.651-2.399	0.502
day40	4.35(11.38)	2.55(11.85)	1.289	0.661-2.516	0.457
最高値	37.00(38.95)	19.60(27.60)	1.359	0.932-1.984	0.096
上昇値	33.20(37.80)	9.35(15.85)	1.625	1.061-2.489	0.026

(表 3-5)生着前症候群

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=18)	なし(n=23)			
day0	27.90(14.30)	20.53(32.23)	1.194	0.805-1.770	0.377
day5	23.00(21.70)	14.15(26.50)	1.629	1.021-2.599	0.041
day10	16.70(36.20)	7.70(22.23)	1.177	0.787-1.761	0.428
day15	16.90(22.60)	12.80(20.90)	0.869	0.578-1.305	0.497
day25	14.70(15.60)	14.65(14.35)	0.981	0.524-1.835	0.951
day40	1.90(15.20)	5.45(10.07)	1.409	0.725-2.738	0.312
最高値	33.60(26.30)	27.10(30.53)	1.281	0.904-1.814	0.164
上昇値	26.60(27.10)	15.25(24.83)	1.261	0.876-1.815	0.212

(表 3-6) 前処置強度

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	MAC(n=30)	RIC(n=11)			
day0	23.60(28.60)	23.95(22.25)	0.999	0.643-1.530	0.962
day5	20.90(27.95)	21.30(17.20)	1.208	0.768-1.899	0.392
day10	7.40(23.05)	16.70(26.08)	0.922	0.587-1.499	0.726
day15	16.90(20.90)	12.50(27.65)	0.916	0.599-1.399	0.687
day25	16.40(15.00)	11.60(13.34)	1.299	0.621-2.718	0.486
day40	6.80(14.75)	1.45(9.25)	2.105	0.645-6.864	0.129
最高値	29.80(27.80)	31.25(25.98)	1.322	0.874-1.999	0.165
上昇値	22.00(24.40)	11.00(29.85)	1.190	0.784-1.830	0.390

(表 3-7) 前処置内容(全身照射)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=25)	なし(n=16)			
day0	16.60(28.55)	14.50(26.20)	1.201	0.801-1.801	0.367
day5	20.90(20.20)	20.15(26.05)	0.833	0.574-1.210	0.338
day10	7.40(33.90)	15.60(18.03)	0.915	0.611-1.371	0.666
day15	12.70(21.00)	16.95(22.45)	0.777	0.517-1.169	0.226
day25	14.70(17.10)	14.65(12.27)	0.544	0.273-1.085	0.084
day40	6.80(10.90)	2.70(14.80)	0.715	0.379-1.347	0.299
最高値	33.60(29.70)	29.50(29.63)	0.759	0.532-1.084	0.129
上昇値	14.40(29.85)	18.30(22.75)	0.804	0.558-1.159	0.242

(表 3-8) 前処置内容(BU)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=14)	なし(n=27)			
day0	7.70(27.10)	28.40(22.65)	0.549	0.328-0.917	0.220
day5	10.20(35.10)	22.40(18.63)	0.976	0.648-1.445	0.994
day10	7.40(15.00)	14.40(29.40)	0.995	0.651-1.523	0.983
day15	16.90(29.80)	14.20(20.43)	1.339	0.884-2.028	0.168
day25	13.90(16.90)	15.05(14.18)	1.450	0.746-2.820	0.273
day40	1.30(13.20)	8.15(11.35)	1.204	0.707-2.049	0.494
最高値	21.00(46.50)	34.80(24.35)	1.170	0.825-1.659	0.379
上昇値	15.50(31.10)	18.55(24.58)	1.195	0.827-1.729	0.343

(表 3-9) 前処置内容(CY)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=16)	なし(n=25)			
day0	13.50(23.65)	28.95(30.38)	0.778	0.514-1.179	0.237
day5	16.20(32.35)	21.50(18.77)	0.961	0.665-1.387	0.831
day10	3.40(16.65)	16.70(25.38)	0.734	0.470-1.145	0.173
day15	12.30(123.95)	16.30(18.50)	1.003	0.647-1.492	0.988
day25	16.40(19.15)	12.70(14.40)	1.297	0.628-2.463	0.428
day40	1.50(9.85)	8.95(12.13)	1.099	0.654-1.846	0.722
最高値	25.00(32.05)	34.80(26.68)	0.954	0.679-1.339	0.783
上昇値	15.50(27.90)	18.25(26.55)	0.989	0.690-1.417	0.952

(表 3-10) 前処置内容(LPAM)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=22)	なし(n=19)			
day0	28.75(29.13)	13.50(23.80)	1.441	0.945-2.197	0.089
day5	21.80(20.35)	16.20(31.30)	1.258	0.847-1.867	0.255
day10	16.95(31.12)	5.40(12.50)	1.400	0.905-2.165	0.131
day15	16.30(18.23)	12.30(22.90)	1.042	0.705-1.540	0.836
day25	15.05(14.55)	13.90(19.00)	1.175	0.625-2.207	0.617
day40	8.95(13.53)	1.30(11.40)	1.566	0.674-3.635	0.297
最高値	36.55(35.45)	25.00(31.90)	1.252	0.884-1.773	0.206
上昇値	21.55(31.00)	15.10(26.80)	1.196	0.831-1.720	0.335

(表 3-11) 前処置内容(ATG)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=14)	なし(n=27)			
day0	18.50(22.43)	26.60(29.60)	0.842	1.556-1.289	0.430
day5	22.25(22.55)	20.90(23.50)	0.920	0.619-1.367	0.680
day10	16.95(28.70)	6.80(19.50)	1.090	0.716-1.658	0.689
day15	11.30(25.35)	16.90(20.80)	0.967	0.640-1.462	0.874
day25	10.30(23.50)	16.40(14.00)	0.743	0.373-1.481	0.399
day40	7.80(10.98)	1.90(13.20)	1.237	0.713-2.144	0.450
最高値	32.45(30.38)	29.80(28.70)	0.806	0.557-1.168	0.255
上昇値	11.00(39.93)	22.00(20.10)	0.865	0.589-1.272	0.461

(表 3-12) 造血幹細胞(同種/自家)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	同種(n=34)	自家(n=7)			
day0	18.65(22.65)	29.80(38.3)	0.825	0.501-1.358	0.450
day5	20.40(24.78)	22.10(30.10)	1.182	0.692-2.017	0.521
day10	7.70(28.50)	16.40(18.30)	1.125	0.648-1.952	0.669
day15	12.50(22.30)	16.90(16.50)	0.878	0.542-1.419	0.602
day25	14.30(16.85)	15.40(13.60)	0.985	0.432-2.246	0.917
day40	3.0(11.15)	9.10(19.60)	0.929	0.512-1.689	0.816
最高値	28.40(33.17)	37.20(12.30)	0.805	0.521-1.244	0.326
上昇値	28.55(12.25)	22.00(7.80)	0.957	0.604-1.516	0.853

(表 3-13) 造血幹細胞(骨髓血/臍帯血/末梢血)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)			P値
	骨髓血(n=17)	臍帯血(n=14)	末梢血(n=10)	
day0	7.50(24.07)	27.75(24.53)	29.10(27.35)	0.061
day5	13.65(27.48)	25.70(20.43)	20.90(22.15)	0.202
day10	2.45(13.30)	24.95(27.82)	14.25(18.75)	0.060
day15	2.30(22.50)	18.70(15.57)	16.30(18.80)	0.083
day25	7.00(16.30)	20.25(11.68)	11.15(11.38)	0.037
day40	1.00(2.45)	10.70(13.40)	10.65(18.25)	0.025
最高値	18.20(31.45)	36.65(35.15)	33.50(23.98)	0.063
上昇値	8.7(28.60)	21.55(13.10)	21.55(13.10)	0.212

(表 3-14) ステロイドの使用

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=20)	なし(n=21)			
day0	14.50(22.58)	28.60(29.60)	0.818	0.550-1.215	0.319
day5	21.40(31.70)	21.30(21.00)	1.084	0.757-1.552	0.660
day10	7.10(24.70)	16.70(27.45)	0.851	0.567-1.278	0.437
day15	6.50(18.70)	18.30(21.50)	0.752	0.467-1.127	0.153
day25	9.90(15.00)	18.50(16.65)	0.554	0.279-1.103	0.093
day40	1.30(10.40)	8.95(15.80)	0.501	0.193-1.303	0.156
最高値	20.30(30.70)	34.80(20.80)	0.999	0.719-1.389	0.995
上昇値	14.40(29.20)	21.55(22.73)	0.982	0.691-1.394	0.919

(表 3-15) イベント(死亡あるいは再発)

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	あり(n=13)	なし(n=28)			
day0	26.60(28.60)	17.25(23.70)	1.236	0.811-1.885	0.324
day5	19.90(20.60)	22.40(23.35)	1.285	0.867-1.905	0.212
day10	16.40(36.50)	7.40(19.00)	1.300	0.852-1.983	0.244
day15	15.70(18.00)	14.60(27.03)	0.677	0.395-1.161	0.157
day25	14.70(14.00)	14.65(15.65)	0.776	0.386-1.558	0.457
day40	11.40(14.30)	1.15(8.03)	0.980	0.562-1.709	0.944
最高値	37.30(26.30)	29.50(27.90)	1.179	0.826-1.683	0.365
上昇値	22.00(23.00)	13.80(29.38)	1.208	0.830-1.757	0.323

(表 3-16) 悪性疾患

5SCD(nmol/l)	中央値(IQR)		Odds ratio	95%CI	P値
	悪性(n=32)	非悪性(n=9)			
day0	28.60(25.10)	7.50(15.55)	1.724	0.960-3.097	0.068
day5	22.10(20.90)	11.10(23.75)	1.339	0.788-2.275	0.281
day10	15.60(28.83)	6.70(19.02)	1.230	0.711-2.128	0.459
day15	16.90(20.30)	12.30(22.50)	1.033	0.641-1.664	0.895
day25	16.40(14.40)	9.90(14.85)	1.387	0.618-3.114	0.428
day40	7.50(14.30)	1.50(4.10)	2.671	0.815-3.786	0.084
最高値	33.60(24.80)	18.20(28.95)	1.784	1.033-3.082	0.038
上昇値	22.00(23.80)	12.00(22.10)	1.240	0.777-1.979	0.323

6-4-2 多変量解析

単変量解析において有意に関連性が示された項目の内、移植関連合併症の項目についてロジスティック回帰解析を用いて多変量解析を行った(図4)。交絡因子は既知のリスクのうち、各合併症に対して単変量解析で影響のあると思われる項目($p < 0.2$)とし補正を行った。

独立した関連性が示された移植関連合併症の項目

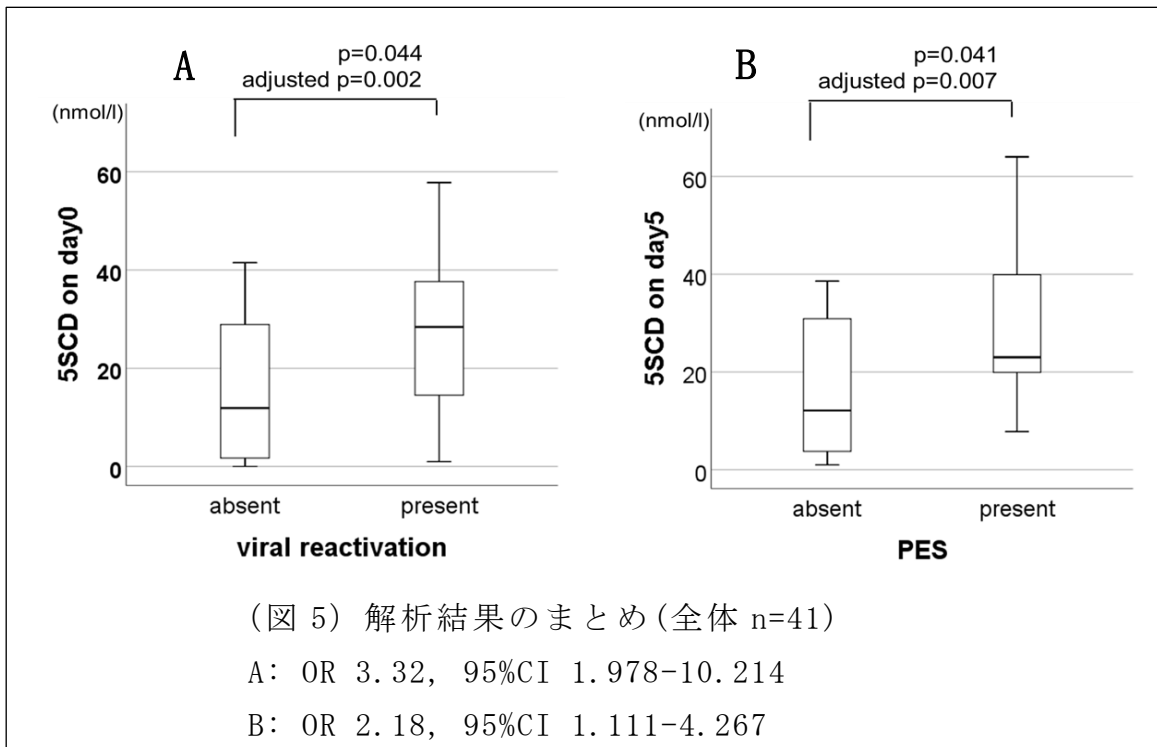
- ・血清 5SCD の day0 値とウイルスの再活性化($p=0.002$)
 - ・血清 5SCD の day5 値と生着前症候群($p=0.007$)
- 同種移植患者($n=34$)のみにおいて
- ・血清 5SCD の最高値と急性 GVHD($p=0.014$)
 - ・血清 5SCD の上昇値と急性 GVHD($p=0.015$)
 - ・血清 5SCD の day5 値と急性皮膚 GVHD($p=0.011$)
 - ・血清 5SCD の上昇値と急性皮膚 GVHD($p=0.005$)

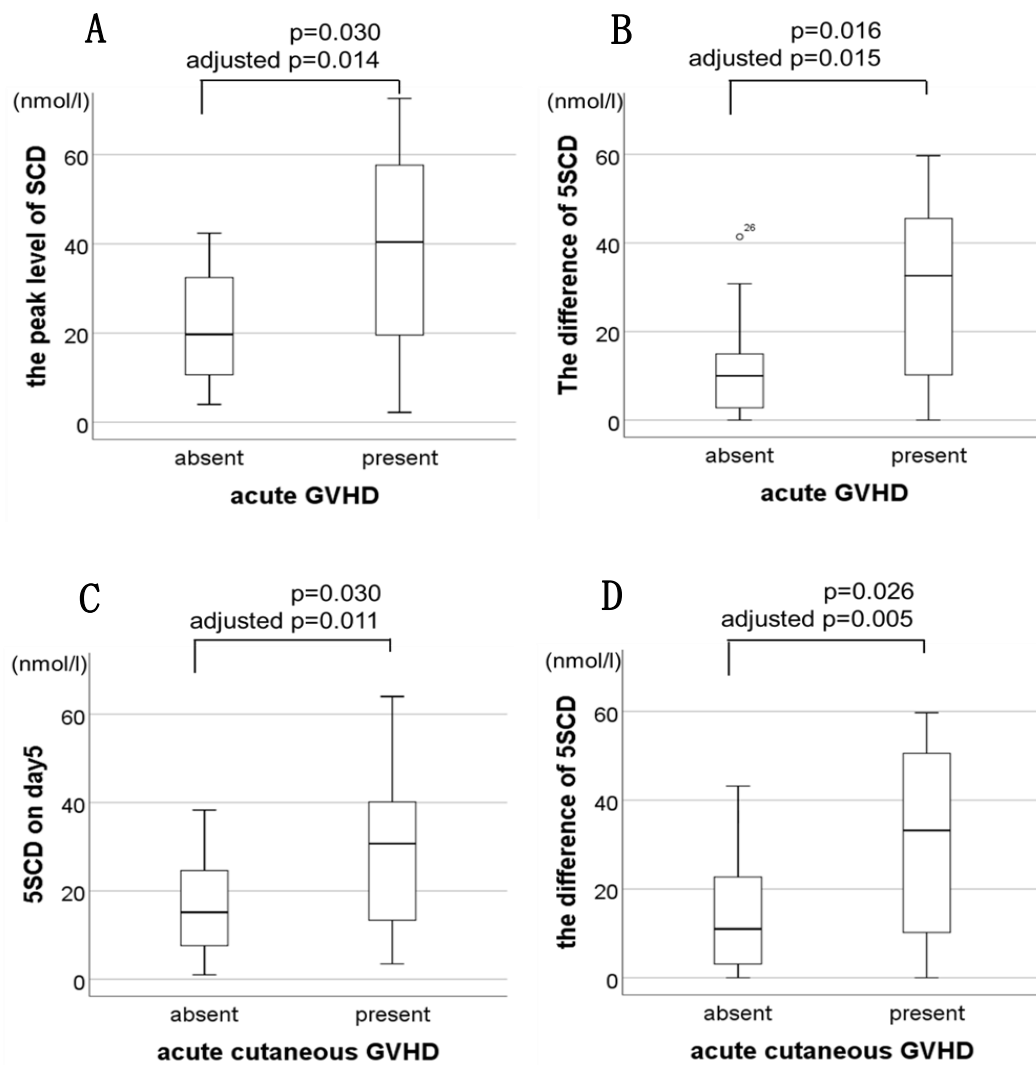
単変量解析で有意に関連性が示された項目全てが、多変量解析で独立した関連性が示された(表4)。

(表4) 多変量解析

	5SCD値	Odds Ratio	95%CI	P
ウイルス再活性化	day0	3.32	1.078-10.214	0.002
生着前症候群	day5	2.18	1.111-4.267	0.007
急性GVHD	頂値	2.01	1.064-3.792	0.014
	差	1.90	1.046-3.453	0.015
皮膚急性GVHD	day5	2.71	1.098-7.538	0.011
	差	2.34	1.111-4.521	0.005

移植合併症の項目で独立して有意な関連性が示された解析結果をグラフにまとめた(図 5, 6)。





(図 6) 解析結果のまとめ(同種移植 n=34)

A: OR 2.01, 95%CI 1.064-3.792

B: OR 1.90, 95%CI 1.046-3.453

C: OR 2.71, 95%CI 1.098-7.538

D: OR 2.34, 95%CI 1.111-4.521

7. 考察

造血細胞移植は多くの疾患、中でも小児領域においては血液疾患、悪性固形腫瘍、原発性免疫不全症などの多岐にわたる疾患に対して広く普及し、疾患の予後を改善してきた。ただし、造血細胞移植には早期から晩期まで多くの合併症を伴う。そのうち、早期の移植関連合併症は移植関連死亡の主因となり、また原病の制御にも影響する。そのため移植関連合併症の予測と制御は非常に重要である。今回、造血細胞移植後の患者において皮膚の色素沈着がよく観察されることに着目し、メラニン色素の一つであるフェオメラニンの前駆物質である 5SCD の移植関連合併症のバイオマーカーとしての可能性を検討した。

本研究において、血清 5SCD 値が急性 GVHD、生着前症候群、ウイルス再活性化など、免疫学的機序で発症する移植関連合併症の予測バイオマーカーとなる可能性があることを見出した。今回の結果から、血清 5SCD 値の上昇は治療薬による直接的な細胞障害だけでなく、上記合併症に関連してフェオメラニンの合成が促進されると推測された。メラニン合成経路の内、活性化される箇所に関しては、フェオメラニンが黄色メラニンであり色素沈着の直接的な原因物質ではないことを考慮すると、チロシン以下の上流の部位のいずれかで合成亢進されていると推測されたが、今回はユーメラニンの前駆物質を測定することができなかつたため、活性箇所の特定はできなかつた。

また、今回それぞれの合併症と関連性が示されたのは血清 5SCD の day0 値、day5 値、最高値、上昇値など複数ポイントであったが、造血細胞移植前後の血清 5SCD 値の推移から day0 と day5 に最高値となる傾向があると判明したことから、移植前の値を基礎値として、day0 または day5 の値が合併症を予測するバイオマーカーとしての意義があると考えた。

生着前症候群は造血細胞移植後に、急性 GVHD は同種移植後に見られる免疫反応による主要な合併症である。生着症候群は生着前後の発疹、毛細血管漏出症候群による、皮膚の病理では接合部の浮腫が主体でマクロファージの浸潤をみる (Cornell et al., 2015; Biol Blood Marrow Transplant, 21)。急性 GVHD の皮膚所見は斑状丘疹の発疹を特徴とし、皮膚の病理ではリンパ球の浸潤を主体とした炎症と壊死をみる (Strong Rodrigues et al., 2018; Am J Clin Dermatol. 19)。臨床的には双方の鑑別が困難な場合があるが、いずれも免疫学的機序で皮膚の炎症をもたらす、そのことがメラノサイトを

活性化し、フェオメラニン産生を促進して血清 5SCD 値が上昇すると推測される。この推測を実証するためには急性皮膚 GVHD および生着前症候群の患者における皮膚の病理所見でメラニン色素の観察が必要であるが、今回は小児にとって侵襲性が高く、時に鎮静処置を要すること、また本研究では GVHD 等の皮膚病変の鑑別診断に生検を要した症例はなかったため、病理所見を確認できなかった。また、移植後の皮膚所見の経過として、GVHD 等による炎症から色素沈着後、晩期には色素脱失を伴う丘疹などがみられる慢性皮膚 GVHD が出現するため、移植後 100 日以上に観察期間を広げて 5SCD を測定することで、より皮膚反応と 5SCD の関連性を明確にできたと考えるが、今回は早期合併症に焦点を当てたためできなかった。

本研究では急性 GVHD と急性皮膚 GVHD 双方ともバイオマーカーとして血清 5SCD の可能性を示したが、本研究においては、急性 GVHD の 19 例中 16 例 (84%) と大半に皮膚症状を認めたため、血清 5SCD 値が消化管 GVHD と肝臓 GVHD のバイオマーカーとなり得るか判断できなかった。また、急性 GVHD の重症度との関連性もなかったため、血清 5SCD 値は重症度を予測するマーカーとはなり得なかった。

今回、ウイルス再活性化と関連性が示されたのは血清 5SCD の day0 値であり、サイトメガロウイルスおよび EB ウイルスの再活性化は造血細胞移植後の約 3 週間後に、水痘帯状疱疹ウイルスの再活性化は約 3 ヶ月後に発症しやすいことから (Boeckh et al., 2004; Blood, 103, Locksley et al., 1985; J Infect Dis., 152)、血清 5SCD 値はウイルス再活性化を予測するバイオマーカーとなる可能性が示された。しかし、単変量解析において、血清 5SCD はウイルス再活性化の時期にむしろ低くなる傾向を示したことから、同種/自家移植混合でかつ疾患も多岐にわたる集団であったため、データの信頼性を疑う余地はあり、統一した集団での再検討を要すると考える。また、ウイルスの再活性化の危険因子には、ATG の使用、ステロイドの使用、臍帯血移植などが挙げられる (Boeckh et al., 2003; Biol Blood Marrow Transplant., 9)。今回、臍帯血と血清 5SCD の day25, 40 値の関連性が単変量解析で示されたが、時期が遅かったため生着などの異なった要因が考えられ、また ATG とステロイドに関しては関連性が示されなかった。

悪性疾患の患者は造血細胞移植前に複数サイクルの化学療法を施行されており、今回は血清 5SCD の最高値との関連性が示された。前処置は多くが MAC であったが (32 人中 28 人 : 87.5%)、血清 5SCD 値が前処置強度と関連性がなく、さらに移植前の血清 5SCD 値と悪性疾患の間に関連性がなかった。

以上から移植前の化学療法は移植というイベントを通して血清 5SCD 値がより上昇することが明らかとなり、複数の化学療法によって臓器障害をはじめとした合併症が発症しやすいことが原因とも推測された。

アルキル化剤は皮膚の色素沈着を引き起こす代表的な抗腫瘍剤であるが (Reyes-Habito et al., 2014; J Am Acad Dermatol., 71, Susser et al., 1999; J Am Acad Dermatol., 40)、本研究では前処置に使用した CY、LPAM、および BU と各々の血清 5SCD 値との間に関連性は示されなかった。しかし、ほとんどの患者 (41 例中 39 例 : 95%) がアルキル化剤を含む前処置内容であったため、血清 5SCD 値とアルキル化剤の関連性を明確にすることはできなかった。今回は前処置の強度と血清 5SCD 値の間にも関連性はなかったが、造血細胞移植後の血清 5SCD 値の上昇はアルキル化剤が一因であった可能性は否定できない。これは、アルキル化剤と他の薬剤を用いた化学療法での血清 5SCD 値を比較、解析することで解明できると考える。

これまで造血細胞移植関連の合併症の重症度および予後因子として多数のバイオマーカーが報告されている。ST-2 (Soluble stimulation-2)、IL-2R α (Interleukin-2 receptor α chain)、TNFR-1 (tumor necrosis factor receptor-1) は急性 GVHD の予後のマーカーとして報告されており (Vander Lugt et al., 2013; N Engl J Med. 369, Paczesny, 2018; Blood. 131, Paczesny et al., 2009; Blood. 113, McDonald et al., 2015; Blood. 126)、皮膚の elafin 発現は、急性皮膚 GVHD の予後マーカーとして報告されている (Brüggen et al., 2015; J Invest Dermatol. 135)。プロカルシトニンが生着症候群のバイオマーカー、プロテイン C が肝中心静脈閉塞症のバイオマーカーとの報告もある (Shah et al., 2016; Pediatr Blood Cancer. 64, Iguchi et al., 2010; Pediatr Blood Cancer. 54)。今回用いた血清 5SCD は上記のマーカーと比較して臨床現場で広く一般的に使用されており、更に複数の移植関連合併症を予測するバイオマーカーとしての可能性が明らかとなった。今後は validation cohort を含めた検証が必要である。

以下に本研究の限界について述べる。第一に、皮膚の色素沈着の程度と移植関連の合併症との関係を直接示すことはできなかった。血清 5SCD 値と皮膚の病理所見上でのメラニンとの関係を調べるためには皮膚生検が必要である。しかし、今回は前述の通り、皮膚生検を施行した症例はいなかった。村上らは melanin index と erythema index の測定値を用いて血液透析患者の色素沈着の程度を調べた結果、色素沈着の程度は血清 5SCD 値と有意に相関することが明らかになり、フェオメラニンが皮膚に蓄積することを指摘し

ている (Murakami et al., 2009; Blood Purif. 28)。melanin index と erythema index は医学的にはあまり用いられていない手法ではあるが、このことから、本研究の結果は色素沈着が移植関連合併症の予測因子となる可能性を見出した。今後更なる研究がこの可能性を高め、移植関連死の予防かつ予後の改善につながることを期待する。第二に、単施設で小児に限定した研究であったため、サンプルサイズが小さく、疾患も多様であり統一性のある集団ではなく、データの信用性が低くなることは言わざるを得ない。多施設または成人を含むより大きな統一性のある集団での研究で更に今回の結果が明確に実証できると考える。第三に、今回は黒色メラニンであるユーメラニンの前駆物質を測定することができなかつたため、メラニン合成経路の内、活性化される箇所を特定できなかつた。このことが明らかとなれば色素沈着と 5SCD の関連性について更に科学的に解明できると考える。最後に、フェオメラニンは紫外線によって活性酸素を生成する光増感剤として作用する可能性があるため、血清 5SCD 値は紫外線によって影響を受けることが報告されているが (Takeuchi et al., 2001; Proc Natl Acad Sci USA. 42, Wakamatsu et al., 1995; Pigment Cell Res. 8)、本研究において全症例が同じ個室で造血細胞移植治療を受けてはおらず、また季節変動が血清 5SCD 値に及ぼす影響まで考慮することは困難であったが、影響は少ないと考えている。

8. 結論

本研究から得られた成果を総括し、今後の課題、展開、将来的展望を記すことにより、本学位論文の結びとする。

① 本研究から得られた知見：

- ・造血細胞移植後 0-5 日目に血清 5SCD 値が最も上昇する。
- ・本研究において血清 5SCD 値が急性 GVHD、生着前症候群、ウイルス再活性化などの造血細胞移植後の移植関連合併症の予測バイオマーカーとなる可能性が示された。

② 新知見の意義：

- ・造血細胞移植後 0-5 日目の血清 5SCD 値が移植関連合併症の予測バイオマーカーとなり、合併症の予防もしくは制御を可能とする。
- ・フェオメラニン産生が造血細胞移植後の炎症または免疫学的機序により誘導され、結果的に血清 5SCD 値が上昇すると推測できる。
- ・色素沈着が移植関連合併症の予測因子となる可能性を見出した。

③ 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開され得るか：

- ・血清 5SCD 値の測定と並行して皮膚の病理所見を照合し、血清 5SCD 値が上昇する機序や原因についての研究
- ・多施設または成人を含むより大きなサンプルサイズを集団として、今回の研究結果を更に検証し、また血清 5SCD 値の測定ポイントの明確性を示す研究
- ・移植後の観察期間を晩期まで長期間とし、移植関連合併症について更に検討する研究

④ 今後の課題

- ・主観的な評価の色素沈着の程度で移植合併症を予測できる可能性を検証するために、血清 5SCD 値と色素沈着の程度の相関性を示したいが、その方法、手段について検討が必要である

9. 謝辞

本研究を行う機会を与えて頂くと共に、大学院での研究期間中多大なるご支援とご指導を頂いた、有賀正名誉教授（北海道大学大学院医学研究科小児科学講座・名誉教授）、真部淳教授（北海道大学大学院医学研究科小児科学講座・教授）、井口晶裕先生（北海道大学病院・講師）、そして小児科血液腫瘍研究グループの皆さまに心より感謝申し上げます。また、基礎論文執筆にあたり、統計学的解析等に関して多大なるご支援を頂いた、Houman Goudarzi 先生（北海道大学大学院医学研究科医学教育・国際交流推進センター・助教）、横田勲准教授（北海道大学大学院医学研究科医学統計学講座・准教授）に心より感謝申し上げます。

10. 利益相反

開示すべき利益相反状態はありません。

11. 引用文献

1. Bánfalvi T., Glide K., Gergye M., Boldizsár M., Kremmer T., Otto S. (2003). Use of serum 5-S-CD and S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur. J. Cancer.* 39, 164-169
2. Boeckh M., Nichols W.G., Papanicolaou G., Wingard J.R., and Zaia J. (2003). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 9, 543-558
3. Boeckh M. and Nichols W.G. (2004). The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 103, 2003-2008
4. Brochez L., Naeyaert J.M. (2000) Serological markers for melanoma. *Br. J. Dermatol.* 143, 256-268
5. Brügggen M.C., Petzelbauer P., Greinix H., Contassot E., Jankovic D., French L., Socie G., Rabitsch W., Kuzmina Z., Kalhs P et al. (2015). Epidermal elafin expression is an indicator of poor prognosis in cutaneous graft-versus-host disease. *J. Invest. Dermatol.* 135, 999-1006
6. Chandra M., Levitt J, and Pensabene C.A. (2012) Hydroquinone therapy for post-inflammatory hyperpigmentation secondary to acne: not just prescribeable by dermatologist. *Acta Derm. Venereol.* 92, 232-235
7. Cornell R.F, Hari P, and Drobyski W.R. (2015). Engraftment Syndrome after Autologous Stem Cell Transplantation: An Update Unifying the Definition and Management Approach. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 21, 2061-2068
8. Deeg H.J. (2007). How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 109, 4119-4126
9. Glucksberg H., Storb R., Fefer A., Buckner C.D., Neiman P.E., Clift R.A., Lerner K.G., and Thomas E.D. (1974). Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients

- of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 18, 295-304.
10. Horikoshi T., Ito S., Wakamatsu K., Onodera H., Eguchi H. (1994). Evaluation of melanin-related metabolites as markers of melanoma progression. *Cancer* 73, 629-636
 11. Hymes S.R., Strom E.A., and Fife C. (2006) Radiation dermatitis: clinical presentation, pathophysiology, and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 54, 28-46.
 12. Iguchi A., Kobayashi R., Kaneda M., and Kobayashi K. (2010). Plasma protein C is a useful clinical marker for hepatic veno-occlusive disease (VOD) in stem cell transplantation. *Pediatr. Blood Cancer* 54, 437-43
 13. Illhardt T., Toporski J., Feuchtinger T., Turkiewicz H.M., Ebinger M., Schwarze C.P., Holzer U., Lode H.N., Albert M.H., et al. (2018). Haploidentical Stem Cell Transplantation for Refractory/Relapsed Neuroblastoma. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 24, 1005-1012,
 14. Ito S. and Wakamatsu K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis: pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* 84, 582-592
 15. Kumar A., Mhaskar A.R., Relijic T., Mhaskar R.S., Kharfan-Dabaja M.A., Anasetti C., Morty M., and Djulbegovic B. (2012). Antithymocyte globulin for acute-graft-versus-host-disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review. *Leukemia* 26, 582-588
 16. Lee C.K., Gingrich R.D., Hohl R.J., and Ajram K.A. (1995). Engraftment syndrome in autologous bone marrow and peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 16, 175-182.
 17. Locksley R.M., Flournoy N., Sullivan K.M., and Meyers J.D. (1985). Infection with varicella-zoster virus after marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* 152, 1172-1181
 18. McDonald G.B., Tabellini L., Storer B.E., Lawler R.L., Martin P.J., and Hansen J.A. (2015). Plasma biomarkers of acute GVHD and nonrelapse mortality: predictive value of measurements before GVHD onset and treatment. *Blood* 126, 113-120

19. Murakami K., Wakamatsu K., Nakanishi Y., Takahashi H., Sugiyama S., Ito S. (2007). Serum levels of pigmentation markers are elevated in patients undergoing hemodialysis. *Blood Purif.* 25, 483-489
20. Murakami K., Nakanishi Y., Wakamatsu K., Yamamoto K., Kohriyama N, Hasegawa M., Tomita M., Nabeshima K., Hiki Y., Asano S. et al. (2009). Serum levels of 5-S-Cysteinyldopa are correlated with skin colors in hemodialysis patients but not in peritoneal dialysis patients. *Blood Purif.* 28, 209-215
21. Nagafuji K., Matsuo K., Teshima T., Mori S., Sakamaki H., Hidaka M., Ogawa H., Koderu Y., Kanda Y., Maruta A. et al. (2010). Peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors in patients with leukemia: a propensity score-based comparison from the Japan Society for Hematopoietic Stem Cell Transplantation registry. *Int. J. Hematol.* 91, 855-64
22. Paczesny S., Krijanovski O.I., Braun T.M., Choi S.W., Clouthier S.G., Kuick R., Misek D.E., Cooke K.R., Kitko C.L., Weyand A. et al. (2009). A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 113, 273-278.
23. Paczesny S. (2018). Biomarkers for posttransplantation outcomes. *Blood* 131, 2193-2204
24. Paillard C., Rochette E., Lutz P., Bertrand Y., Michel G., Bordigoni P., Dalle J.H., Rohrich P., Vannier J.P., Perel Y., Plantaz D., et al. (2013). Reduced-intensity conditioning followed by allogeneic transplantation in pediatric malignancies: a report from the Société Française des Cancers de l'Enfant and the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Bone Marrow Transplant.* 48, 1401-1408
25. Pulsipher M.A., Peters C., and Pui C.H. (2011) High risk pediatric acute lymphoblastic leukemia : to transplant or not to transplant. *Biol. Blood Marrow Transplant* 17 (1 Suppl) , S137-S148
26. Reyes-Habito C.M., and Roh E.K., (2014). Cutaneous reactions to chemotherapeutic drugs and targeted therapies for cancer: part1.

- Conventional chemotherapeutic drugs. *J. Am. Acad. Dermatol.* 71, 203.e1-203.e12
27. Rosman I.S., Lloyd B.M., Hayashi R.J., and Bayliss S.J. (2008). Cutaneous effects of thiotepa in pediatric patients receiving high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *J. Am. Acad Dermatol.* 58, 575-578
 28. Shah N.N., Watson T.M., Yates B., Liewehr D.J., Steinberg S.M., Jacobsohn D., Fry T.J., (2017). Procalcitonin and cytokine profiles in engraftment syndrome in pediatric stem cell transplantation. *Pediatr. Blood Cancer.* 64, e26273
 29. Spitzer T. R. (2001). Engraftment syndrome following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 27, 893-898.
 30. Strong Rodrigues K., Oliveira-Ribeiro C., de Abreu Fiuza Gomes S., and Knobler R. (2018). Cutaneous Graft-Versus-Host Disease: Diagnosis and Treatment. *Am. J. Clin. Dermatol.* 19, 33-50
 31. Susser W.S., Whitaker-Worth D.L., and Grant-Kels J.M. (1999). Mucocutaneous reactions to chemotherapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* 40, 367-398
 32. Takahashi S., Iseki T., Ooi J., Tomonari A., Takasugi K., Shimohakamada Y., Yamada T., Uchimarui K., Tojo A., Shirafuji N. et al. (2004). Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. *Blood* 104, 3813-3820
 33. Takeuchi S., Zhang W., Wakamatsu K., Ito S., Hearing V.J., Kraemer K.H., and Brash D.E. (2004). Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15076-15081
 34. Uemura H., Yamasaki O., Kaji T., Otsuka M., Asagoe K., Takata M., Iwatsuki K. (2017). Usefulness of serum 5-S-cysteinyl-dopa as a biomarker for predicting prognosis and detecting relapse in patients with advanced stage malignant melanoma. *J. Dermatol.* 44, 449-454
 35. Vander Lugt M.T., Braun T.M., Hanash S., Ritz J., Ho V.T., Antin

- J.H., Zhang Q., Wong C., Wang H., Chin A., et al. (2013). ST2 as a marker for risk of the therapy-resistant graft-versus-host disease and death. *N. Engl. J. Med.* 369, 529-539.
36. Wakamatsu K. and Ito S. (1994). Improved HPLC determination of 5-S-cysteinyl-dopa in serum. *Clin. Chem.* 40, 495-496
37. Wakamatsu K. and Ito S. (1995). Seasonal variation in serum concentration of 5-S-cysteinyl-dopa and 6-hydroxy-5-methoxyindole-2-carboxylic acid in healthy Japanese. *Pigment. Cell Res.* 8, 132-134
38. National Cancer Institute HP: Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ _)
(<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/childALL/HealthProfessional/page2>)
39. 日本造血細胞移植学会 HP: 日本造血細胞移植学会による造血細胞移植ガイドライン 移植前処置
(https://www.jshct.com/uploads/files/guideline/06m_zenshochi.pdf)
40. 日本造血細胞移植学会 HP: 日本造血細胞移植学会による造血細胞移植ガイドライン GVHD (第4版)
(https://www.jshct.com/uploads/files/guideline/01_02_gvhd_ver04.pdf)
41. 日本造血細胞移植学会 HP: 日本における造血幹細胞移植の実績 2018年度、日本造血細胞移植データセンター
(http://www.jdchct.or.jp/data/slide/2018/transplants_2018_JDCHCT_20190329.pdf)