

2000 00148 A

別添 2

厚生科学研究研究費補助金
がん克服戦略研究事業

成人 T 細胞性白血病(ATL)への同種末梢血幹細胞による骨髄非破壊的移植療法の検討

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡村 純

平成 13 (2001)年 5 月

別添 3

目 次

I. 総括研究報告

成人 T 細胞性白血病(ATL)への同種末梢血幹細胞による

骨髄非破壊的移植療法の検討 岡村 純 1

II. 分担研究報告

1. 骨髄非破壊的移植療法後の造血細胞動態に関する研究

岡村 純 14

2. 成人 T 細胞白血病(ATL)患者の骨髄移植療法における

HTLV-I プロウイルス DNA 量の測定に関する研究

園田 俊郎 16

3. 成人 T 細胞白血病(ATL)への同種造血幹細胞療法の検討

朝長万左男 19

4. 宿主免疫と HTLV-I 腫瘍に関する研究

神奈木真理 21

5. 移植前後の T 細胞受容体(TCR)V レパートリーおよび

微小残存白血病の解析に関する研究

木村 暢宏 23

6. ATL への同種末梢血幹細胞による骨髄非破壊的移植療法

の実施および樹状細胞による免疫療法の試みに関する研究

河野 文夫 24

7. ATL 患者における同種造血幹細胞移植後の HTLV-I プロウイルス

量の変動に関する研究

宇都宮 興 25

8. 造血幹細胞移植、細胞免疫療法による ATL 治療法の開発

に関する研究

田野崎隆二 27

9. ATL への同種末梢血幹細胞による骨髄非破壊的移植療法の実施

増田 昌人 28

10. 成人 T 細胞白血病(ATL)に対する同種骨髄移植

鵜池 直邦 30

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 32

IV. 研究成果の刊行物・別刷

分野6：新しい治療法の開発に関する研究

成人T細胞性白血病(ATL)への同種末梢血幹細胞による骨髄非破壊的移植療法の検討

主任研究者 岡村 純 国立病院九州がんセンター・臨床研究部長

研究要旨：本研究は、予後が極めて不良である成人T細胞性白血病(ATL)患者に対して、新しい概念に基づく画期的な治療法を開発することを目的としている。すなわち骨髄非破壊的薬剤を用いる移植療法をATL患者に行って、同種骨髄移植に伴う治療関連毒性を軽減させることを目指す。本研究班では、同種末梢血幹細胞移植が合わせ持つ抗白血病効果とウイルスに対する免疫療法の効果をATL治療に活用するための、分子学的検索と治療研究を推進する。

(1) 移植実施計画書の作成：移植および研究実施方法を詳細に検討したのちに移植実施計画書を作成して倫理委員会へ提出し、全6移植施設において承認された。(2) ATLに対する同種移植結果の解析：宇都宮らは51歳以下のATL患者10例に対する同種骨髄移植結果を報告した。移植後再発は2例のみで観察され6例は生存中であり、GVHD発症の7例で現病の再発がなかったことからATLに対するGVLの存在が強く示唆された。さらに、研究班に参加している6施設における骨髄破壊的同種移植症例23例(2000年11月現在、うち3例は宇都宮の報告に含む)を集計・解析した。患者の移植時年齢は44才であり、9例が死亡、うち7例はGVHDなど移植合併症によるものであった。14例が生存中であり3年生存率47%と良好な結果であったが、対象がATLの平均発症年齢より若年であったにも関わらず移植関連合併死亡の頻度が高いという結果であり、本法の課題と考えられた。(3) 基礎的課題の検討：1) HTLV-Iウイルス動態の解析を目的として、ウイルス定量法を確立した。同種移植後では、ATL患者末梢血リンパ球中のプロウイルス量の減少が証明され、同種移植の抗ウイルス療法としての有効性が示唆された。2) マイクロサテライトマーカーを用いたキメリズム定量法を検討し、骨髄非破壊的移植後の血液/免疫回復動態の解析に有効な手段となることを示唆した。3) 移植前後の細胞性免疫応答の試験管内解析とアッセイ方法の確立を目的として、ATL患者の末梢血から細胞株の作成に着手した。4) 簡略Inverse RT-PCR法を用いてATLクローンの特定Vb/Vaレパートリーの判定、TCR遺伝子クローンの決定、微小残存細胞の判定法を開発した。本研究では、同種末梢血幹細胞を使用した骨髄非破壊的な術前処置による移植療法を行うため、移植関連合併症が軽微であることから、高齢者でも十分耐えうる事が予想され、ATLにおける移植対象の拡大やGVL効果の増強が予想される。さらに、本治療法の有効性と安全性が確認されれば、他のウイルス性疾患などへの新たな治療法としての展開も期待される。

分担研究者

- | | | |
|----------|--------------|----|
| 1. 岡村純 | 国立病院九州がんセンター | 部長 |
| 2. 園田俊郎 | 鹿児島大学医学部 | 教授 |
| 3. 朝長万左男 | 長崎大学医学部 | 教授 |
| 4. 神奈木真理 | 東京医科歯科大学 | 教授 |
| 5. 木村暢宏 | 福岡大学医学部 | 講師 |
| 6. 河野文夫 | 国立熊本病院 | 部長 |
| 7. 宇都宮興 | 慈愛会今村病院分院 | 部長 |
| 8. 田野崎隆二 | 国立がんセンター | 医長 |
| 9. 増田昌人 | 琉球大学医学部 | 助手 |
| 10. 鶴池直邦 | 国立病院九州がんセンター | 医長 |

A. 研究目的

成人T細胞白血病(ATL)は、病因ウイルスである human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1) の感染を契機として発症する疾患であるが、西日本沿岸地域出身の高年齢成人に好発し、罹患数は本邦全体で年間約 500 例と推定されている。種々の抗癌剤やインターフェロンなどによる治療研究にもかかわらず、予後はいまだに極めて不良である。ATL の臨床像は急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型の 4 病型に分類され(下山ら)、この病型は重要な予後因子の 1 つであるとされている。すなわち、生存期間中央値は、急性型、リンパ腫型、慢性型、くすぶり型の順に、各々 6 ヶ月、10 ヶ月、24 ヶ月、3 年以上であり、前 2 者の予後が極めて悪い。急性型、リンパ腫型 ATL に対しては、多施設共同研究により、新規抗癌剤や多剤併用による化学療法、さらに interferon など種々の治療法がこれまでに試みられてきた。しかしながら、いずれの治療研究においても、完全寛解率は 17%~42%、4 年生存率は 8%~12% と低いものであり、生存期間中央値も 3~6 ヶ月と非常に短い。これらの成績は、他の急性白血病における著しい生存率の向上と比較すると極めて不満足なものである。したがって ATL に対しては、異なった発想に基づく新しい型の治療体系の確立が急務である。近年、欧米および本邦において、HLA 一致血縁および非血縁ドナーから、少数(約 20 例)の若年 ATL 患者に対して同種骨髄移植が実施され、半数以上が無病生存中で、一部の症例では 2 年以

上の血液学的寛解が維持されているとの報告がある。また移植後に移植片対宿主反応(GVHD)を発症した症例では再発が見られないことや、患者体内における抗 HTLV-1 抗体価の減少やウイルスゲノムの消失も報告されていることから、ATL 細胞に対する GVL 効果の存在が示唆され、抗ウイルス療法としての有効性も期待されており、同種移植は ATL に対して有望な治療法であると考えられる。本研究班では、ATL に対して従来とは異なる概念に基づいた移植法を実施して、その安全性および有効性を検討することにより新たな治療体系の確立を目指す。具体的には、"骨髄非破壊的"な薬剤を用いる移植療法と同種末梢血幹細胞移植を組み合わせる方法を行うことによって抗白血病効果を期待するとともに、HTLV-1 ウイルスに対する免疫療法としての効果も検討し、今後の ATL 治療に活用するための分子学的検索と治療研究を推進する。

B. 研究方法

1. 詳細な移植実施計画書の作成と検討: 移植実施計画における研究対象と方法、主要評価項目、副次的評価項目、患者の適格条件、末梢血幹細胞採取、目標症例数、研究中止の条件、基礎的検討課題などについて、研究班において詳細に検討した。

2. 同種幹細胞移植成績の解析と問題点の検討:

(2-1) ATL に対する同種骨髄移植

班員の宇都宮らは、51 歳以下の ATL 患者 10 例に対する同種骨髄移植結果の解析を行い報告した。(BMT, 2001) その結果を踏まえて、今回は研究班に参加した 6 施設において、1997 年から 2000 年 11 月までの 4 年間に同種移植を行った 23 症例を対象として解析した。(うち 3 例は上記宇都宮の報告に含む)。ATL 病型は 19 例、リンパ腫型 4 例で男性 12 例、女性 12 例、移植時年齢は 36~54 才(中央値 44 才)、診断から移植までの期間は 2~70 ヶ月(中央値 7 ヶ月)であった。ドナーは、血縁 17 例、非血縁 6 例であり、5 例は HTLA-1 キャリアーであった。症例で全身放射線照射など

による骨髄破壊的前処置を実施した。

(2-2) 骨髄非破壊的移植術の検討

Cladribine/Busulfan(/ATG)および Fludarabine/Busulfan(/ATG)による骨髄非破壊的前処置法と同種末梢血幹細胞を用いた移植を 31 例に施行した。(国立がんセンター田野崎班員)

3. 本研究に伴う基礎的課題の検討

3-1 HTLV-I ウイルス動態の解析

(3-1-1) ATL 患者の骨髄移植療法における HTLV-I プロウイルス DNA 量の測定に関する研究

在住の ATL 患者 (42 名) と HTLV-I キャリア (92 名) を対象として、HTLV-I プロウイルス量測定趣旨を十分に説明し、同意を受けて採血をおこない末梢血リンパ球を分離し液体窒素内に凍結保存した。凍結保存リンパ球より高分子 DNA を抽出分離後、HTLV-I プロウイルス DNA (HTLV-I-pX 領域(7427-7456bp)) をリアルタイム PCR 定量装置 (LightCycler) で測定した。MT-2 細胞を HTLV-I 標準コントロールとして、常に被検サンプルの測定とともに定量した。さらにスタンダードヒトゲノム DNA 中の β -グロビン量を測定し、細胞 1000 個当たりの HTLV-I プロウイルス量を算出した。同種骨髄移植された ATL 患者の凍結保存末梢血リンパ球中の HTLV-I プロウイルス量は、同様に測定した。

(3-1-2) ATL 患者における同種造血幹細胞移植後の HTLV-I プロウイルス量の変動に関する研究

対象：1997 年 3 月-2000 年 9 月の 3.5 年間に参加 11 施設で同種造血幹細胞移植 (allo-SCT) を受けた ATL 患者 15 例。男性 9 例、女性 6 例、年齢は、16 歳~51 歳 (43 歳)。病型は、急性型 11 例、リンパ腫型 3 例、慢性型からの急性転化 1 例。ドナーは、血縁 11 例、非血縁 4 例。ドナーの HTLV-I 抗体陽性は 3 例。造血幹細胞移植からの生存期間は、1.7~45.0+ヵ月 (中央値 10.5+ヵ月) であった。8 例が生存で、7 例が死亡。7 例の死因は、再発後の腫瘍死 2 例、TMA 3 例、HUS、VOD 1 例、CMV 感染 1 例であった。

方法：末梢血単核球中の HTLV-I tax DNA 量を Light Cycler System を用いてリアルタイム PCR 法にて測定した (コピー/細胞 1000 個当たり)。

(3-2) 骨髄非破壊的移植療法後の造血細胞動態に関する研究

97~00 年に当施設 (一部他施設) で移植を受けたドナー/患者ペア 20 症例の末梢リンパ球からゲノム DNA を抽出し各リピート配列 (9 領域) を AmpFISTR Profiler PCR Amplification Kit を用いて PCR により増幅し、PCR 産物を ABI310 自動シーケンサーで解析した。

(3-3) 宿主免疫と HTLV-I 腫瘍に関する研究

ATL に対する骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植では、マイルドな化学療法と移植片による腫瘍細胞の攻撃を期待する。抗腫瘍効果を得るためには、宿主による移植片の拒絶あるいは GVHD (移植片対宿主病) を避け、GVL (移植片対白血病) をおこななければならない。このような治療法の評価には、生体内の宿主あるいは移植片の免疫応答の体外モニターが有用である。本研究では、移植前後の細胞性免疫応答の試験管内解析とアッセイ方法の確立を試みる。これには、個々の例について宿主の HTLV-I あるいはドナー特異的 T 細胞応答、ドナー HTLV-I あるいはレシピエント特異的 T 細胞応答を調べるため、事前に宿主・ドナーの双方から個体特異的な HTLV-I 感染あるいは非感染標的細胞株を樹立する必要がある。

(3-4) 移植前後の T 細胞抗原受容体 (TCR) V レパートリーおよび微小残存白血病 (ATL クローン) の解析

細胞は、試験管内の $\alpha\beta$ -T 細胞株である Jurkat 細胞、MOLT4 細胞および ATL 患者 2 例の末梢血 (1 例はアロ移植後完全寛解、他の 1 例は慢性増悪期の症例) を使用した。TCR 遺伝子を解析する対策として患者からのインフォームド・コンセントを得る。診断時、 $\alpha\beta$ -T 細胞である ATL クローンの V β /V α を木村らが開発した簡略 Inverse RT-PCR 法を用いて、ATL クローンの特定 V

$\beta/V\alpha$ レパートリーを判定し、13種類のJ β 遺伝子を用いたPCR (J β -PCR法) やSSCP法によりCDR3領域の単一性を検討する。TCRのdirect sequencingにより、CDR3領域におけるATL cloneに特異的clonotypic primerを作成する。さらに、各臨床病期での末梢血を採取し、希釈法による半定量的検討でクローン微小残存細胞量を算定する。

(倫理面での配慮)

「ATLを対象とした同種末梢血幹細胞による骨髄非破壊的移植療法の実施計画書」を研究班において作成・検討した後、各移植施設の倫理委員会に提出する。倫理委員会への申請後に、各施設で承認された場合には、実施計画書について患者およびドナーに対して十分に説明し書類による同意書を得てから移植を実施する。これらの研究において得られた結果については研究班において厳重に管理し個人のプライバシーに配慮する。本研究の遂行に当たっては、その効果と安全性を外部からも客観的に検討するため、研究班から独立した委員による効果安全性評価委員会を設置する。(構成委員は、研究班外の専門家3名) 本研究実施中は、その継続の是非に関して、上記の効果・安全性評価委員会に諮問する。研究実施に伴う血液および骨髄検体の採取についても患者本人およびドナーから書類による同意書を得た後に行う。また、ウイルス動態に関する研究では、HTLV-Iの取り扱いは、P2レベルのバイオハザード内で行い、遺伝子増幅産物は、測定終了後直ちに次亜塩素酸処理および高圧蒸気滅菌法にて廃棄処分した。

C. 研究結果

1. 詳細な移植実施計画書の作成と検討

初年度に開催した2回の班会議において、移植実施方法を詳細に検討し、移植実施計画書を作成した。実施計画書の概要：研究対象と方法：対象は、最も発症頻度の高い50歳から70歳の年齢層で、急性型およびリンパ腫型ATL。骨髄非破壊的前処置は、フルダラピン(6日間)、ブスルファン

(2日間)、ATG(2日間)の組み合わせで行う。引き続き同種末梢血幹細胞移植術を行い、本治療法の安全性および有効性に関する検討を行う。研究期間内には16症例の登録を予定する。主要評価項目：安全にドナー由来の造血を確立することであり、移植片の拒絶(移植後day90の時点でdonor由来細胞が90%未満)と移植関連死亡率(移植後100日以内の原疾患の増悪以外の原因による全ての死亡)とする。副次的評価項目：移植片の生着(移植後20日以内)、GVHDの程度の検討、完全キメラ達成までの期間、移植後の免疫能回復(HTLV-1ウイルス特異的細胞傷害性T細胞の動態)、DLIによる移植片拒絶の防止、抗腫瘍効果、抗ウイルス効果(HTLV-1ウイルスゲノム動態)、早期総括的安全性(移植後100日以内に移植片拒絶、移植関連死亡、Grade III以上のGVHD、確診されたウイルス感染症、腫瘍の増悪の全てを認めないこと)、生存率、無病生存率、抗腫瘍効果(部分寛解での移植の場合)とする。患者の適格条件：急性型およびリンパ腫型ATLと診断された患者のうち高齢であること(50歳-70歳)や臓器障害があるなどの理由で通常の血縁/非血縁者間同種造血幹細胞移植の適応にならない患者。血清学検査において、HLA 6/6一致の血縁ドナーを有し、説明同意書を用いて同意を得た者とし、重篤な臓器機能障害を持つ患者は対象から除外する。末梢血幹細胞採取：健康状態が良好であるHLA一致同胞から行う。健康状態良好とは自己免疫疾患、静脈血栓症などの既往がないこととする。末梢血幹細胞の動員・採取については、日本造血細胞移植学会・日本輸血学会のガイドラインに従う。ドナーに対しG-CSFを5日間投与し、4日目からアフレーシスを行って幹細胞を採取する。CD34陽性細胞の必要細胞数は患者体重(kg)あたり 3.0×10^6 個以上を目標とする。基礎的検討課題：移植前後にHTLV-Iウイルス動態、HTLV-1特異的細胞傷害性T細胞、T細胞レパートリー、造血能修復動態(キメリズム)を解析する。本移植実施計画書を研究班参加の6移植施設の倫理委員会に提出し、2001年3月までに全施設において承認された。

2. 同種幹細胞移植成績の解析と問題点の検討

(2-1) ATL に対する同種骨髄移植結果：23 症例中 1 例が生着前に感染症で死亡し、残る 22 例で生着が得られた。急性 GVHD は 10 例に発症し（1 度 3 例/2 度 2 例/3 度 3 例/4 度 1 例）、うち重症の 2 例は死亡した。慢性 GVHD は評価可能であった 17 例中 6 例 35% に発症した。23 例中 9 例が死亡、その原因は再発が 2 例で、残る 7 例は感染症、GVHD、TMA などの移植関連合併症によるものであった。解析の時点（2000 年 12 月）において 14 例が生存中であり、3 年生存率は 47% であった。

(2-2) 骨髄非破壊的移植術の検討：31 症例の観察期間中央値 83 日（6～444 日）の現時点で、6 例（19%）に早期死亡を認めた。死因は重症 GVHD 3 例、感染症 2 例、心不全 1 例で、HLA 不適合ドナーからの移植で多い傾向を認めた。多くの症例で、通常の移植に比較して RRT 特に粘膜障害が軽微で、高齢者でも十分に移植に耐えることができた。生着・造血回復に関しては、生着不全を 1 例（3.2%）に認めたが、大半の症例において DLI なしで血液細胞は早期に 100% ドナー・タイプとなった。

3. 本研究に伴う基礎的課題の検討

(3-1-1) ATL 患者の骨髄移植療法における HTLV-I プロウイルス DNA 量の測定に関する研究

ATL 患者と HTLV-I キャリアの HTLV-I プロウイルス DNA 量をそれぞれ測定した結果、ATL 患者の 1000 細胞当たりのプロウイルス量は 761.6 ± 875.2 コピー、HTLV-I キャリアのプロウイルス量は 64.9 ± 73.9 コピーであった。前者群は後者群に比し約 10 倍量の HTLV-I プロウイルス量であった。ATL 患者のなかで比較的 HTLV-I プロウイルス量が低い症例（5 例）はリンパ腫型であった。ATL 患者で同種骨髄移植された凍結保存末梢血リンパ球中の HTLV-I プロウイルス量を経時的に測定した結果、移植前の 318 コピーが 8.7-24.8 コピー（24 ヶ月）に減少し、HTLV-I キャリアの平均値以下のコピー数を維持していた。

(3-1-2) ATL 患者における同種造血幹細胞移植

後の HTLV-I プロウイルス量の変動に関する研究

同種骨髄を受けた ATL 15 例について allo-SCT 前後の HTLV-I プロウイルス量の結果は Table 1 に示した。allo-SCT 後 2-3 ヶ月では、ほとんどの例で HTLV-I プロウイルス量が検出限界以下まで低下していた。HTLV-I プロウイルス量が移植後 6 ヶ月以内に検出限界以下まで低下した 9 例中 5 例が死亡した。死因は、TMA 2 例、HUS・VOD 1 例、CMV 感染 1 例、再発腫瘍死 1 例であった。移植後 12 ヶ月以上で HTLV-I プロウイルス量を検索できた 5 例のうち 2 例は検出限界以下を維持し、2 例はキャリアレベル以下（うち 1 例は TMA にて死亡）であり、またキャリアドナーからの移植の 1 例は高ウイルス量でありながら無病生存している。

(3-2) 骨髄非破壊的移植療法後の造血細胞動態に関する研究

キメラ率の結果は 48 時間以内に得られ、検出限界は 5～10% であった。検討した 20 ペア全例でドナー/患者の定量的識別が可能であった。骨髄破壊的移植を行い、生着した症例では、移植 30 日後にはすべて完全キメラが成立していた。骨髄非破壊的移植の 2 例では移植 30 日後においてはレシピーエント細胞が残存し混合キメラの状態であった。また経時的に解析を行った例では混合キメラ率の変化が再発や拒絶などの臨床経過と関連した。

(3-3) 宿主免疫と HTLV-I 腫瘍に関する研究

慢性 ATL 患者、寛解 ATL 患者等の末梢血から、宿主免疫応答を調べる目的で種々の細胞株の作成に着手している。骨髄移植を予定している宿主及びドナーについての細胞性免疫応答は、GVH 反応に代表されるアロ免疫応答が加わるため、より複雑となる。しかも、ドナーの血球のみで構成される血液検体が得られるのは移植前の時点だけである。このため、臨床サイドと末梢血単核球の採取や保存方法を協議し始動した。現在、細胞株の樹立を行っている。

(3-4) 移植前後の T 細胞抗原受容体 (TCR) V レパートリーおよび微小残存白血病 (ATL クロ

ーン) の解析

1) ab-T細胞 cell line の Jurkat, Molt 4 を用いた希釈法による半定量的検討で、 10^{-4} ~ 10^{-6} でクローンが認識できた。

2) この方法で実際の ATL 患者 2 例で検討した。

1 例はアロ移植後完全寛解となつている。アロ BMT 前末梢血中に 30% いたクローンは、その時期 10^{-4} 以下となつていた。今後、経時的にそのクローンの量的変化と臨床像との相関を追跡する。

2 例目の ATL は、慢性増悪期の症例で末梢 WBC 3 万、70% が ATL 細胞であつたが、化学療法とサイトメガロウイルス感染症により ATL 細胞は 2.5%~+ へ減少し約 1 年その状態を維持している。半定量的結果もそれと同様であつた。

D. 考察

1. 詳細な移植実施計画書の作成と検討

今後は、本研究班の実施計画書に基づいた ATL 症例の登録を開始する。すなわち、候補症例が発生した移植施設においては、患者の適格性について事前の厳重な評価を行う。患者に移植適応が認められ、かつ HLA 完全一致の血縁ドナーが存在し、ドナーの術前評価においても適格性が認められた場合、患者およびドナー双方から文書による同意を得る。その後、研究事務局へ本登録して移植を実施する。目標症例数は 16 例である。すなわち、本プロトコル対象患者において、治療に関連した早期死亡および移植片の拒絶が発生しないことをもって成功と定義し、期待成功率 80%、閾値成功率 50% として Simon's minimax model によって $\alpha=0.10$; $\beta=0.10$ の条件下で必要症例数を計算すると、第一段階 7 例、第二段階 9 例の合計 16 例が必要となる。第一段階 7 例中成功例が 3 例以下であれば本法は無効と判断し以後の研究は中止し、4 例以上であれば第二段階へ進む。合計 16 例中 10 例以下の成功例であれば本法は無効、11 例以上の成功例であれば有効と判定する。

2. 同種骨髄移植成績の解析と問題点の検討

従来の治療法では治癒が全く望めない ATL に対

して、同種幹細胞移植の効果を示唆する結果が得られた。しかし通常の骨髄破壊的前処置による移植方法では、移植関連合併死亡の頻度が高く (23 例中 7 例、30%) 何らかの工夫が必要と考えられた。これに対して、骨髄非破壊的前処置法を用いた同種末梢血幹細胞移植 (今回の対象には、ATL は含まない) では、多くの症例で、通常の移植に比較して移植関連合併症、特に粘膜障害が軽微で、高齢者でも十分に移植に耐えることができた。ATL 患者の平均年齢が約 60 才であることを考慮すると、通常の骨髄破壊的前処置による移植方法の対象となる症例は、ごく少数に限られてくることが予想される。その意味で、新しい移植術である骨髄非破壊的移植療法は、前処置に関連した移植合併症が少ないため、対象が 70 才程度まで拡大することから、ATL へ移植療法としては好都合と考えられ、そこに本研究の意義があると思われる。

3. 本研究に伴う基礎的課題の検討

(3-1-1) ATL 患者の骨髄移植療法における HTLV-I プロウイルス DNA 量の測定に関する研究

リアルタイム PCR 定量装置 LightCycler システムによる HTLV-I プロウイルスの測定方法は、迅速性、高感度、多検体処理を可能とし、ATL 骨髄移植後の HTLV-I プロウイルス量の測定に有用であることが明らかになった。

(3-1-2) ATL 患者における同種造血幹細胞移植後の HTLV-I プロウイルス量の変動に関する研究

移植後 HTLV-I プロウイルス量は、ほとんどの例で感度以下まで低下した。その後もキャリアドナーからの移植の 1 例を除いてキャリアレベル以下の HTLV-I プロウイルス量を維持していた。allo-SCT 施行後の HTLV-I プロウイルス量の測定は、移植後の ATL の minimum residual disease (MRD)、移植後の ATL の再発、ドナーリンパ球からの ATL の発症などを考える上で重要と思われる。

(3-2) 骨髄非破壊的移植療法後の造血細胞動態に関する研究

移植後の完全キメラの達成過程は、前処置法の

違いにより、すなわち骨髄破壊的か非破壊的かにより異なることが示唆された。このことは、抗白血病効果の発現様式とも関連してくるものと考えられる。また結果が迅速に得られることや解析は少数の細胞で可能であること、さらにドナーリンパ球輸注の必要性の判断などへの利用など臨床的に応用性が高いと考えられた。

(3-3) 宿主免疫と HTLV-I 腫瘍に関する研究

HTLV-I および EBV 感染による細胞株樹立には時間がかかるため、骨髄移植の前後に免疫解析が行えない。従って、どれほど良い状態で移植前の細胞が凍結保存できるかにより、今後の解析が左右される可能性がある。

(3-4) 移植前後の T 細胞抗原受容体 (TCR) V レパートリーおよび微小残存白血病 (ATL クローン) の解析

簡略 Inverse RT-PCR 法を用いて ATL クローンの特定 Vb/Va レパートリー判定、それに続く一連の検討による TCR 遺伝子クローンの同定、及び半定量法は微小残存細胞の判定に有効である。ATL の骨髄非破壊的移植において、ATL クローンの追跡、また ATL 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 研究との連携において、CTL クローンの増減をも追跡できるものと思われる。これにより、骨髄非破壊的移植における免疫療法の重要な情報を提供するものと思われる。

E. 結論

ATL の病因究明や診断方法については、ある程度の成果が挙げられてきた。しかし、種々の治療研究にも関わらず ATL の予後はいまだに極めて不良であり、異なる発想に基づく新しい型の治療体系の確立が求められている。近年、比較的若年の ATL 患者に対して同種骨髄移植が実施され、有望な治療法、抗ウイルス療法としての有効性が期待されている。本研究班において骨髄破壊的同種骨髄移植を実施した ATL23 症例の解析では、移植後の生存率は良好であり、園田班員らが確立した高感度 HTLV-I プロウイルス定量法を用いると、移植後の患者末梢血リンパ球中のプロウイル

ス量の減少が証明され、同種移植の抗ウイルス療法としての有効性が示唆された。しかし、移植の対象が ATL の平均発症年齢より若年であったにも関わらず、移植関連合併死亡が多いのが最大の課題であった。これに対して、骨髄非破壊的前処置法を用いた同種造血幹細胞移植 (対象には、ATL は含まない) では、多くの症例で、通常の移植に比較して移植関連合併症、特に粘膜障害が軽微で、高齢者でも十分に移植に耐えることができた。これらの結果を踏まえて、本研究班では、同種末梢血幹細胞を使用した骨髄非破壊的な術前処置による移植療法を ATL に対して行うことにより、抗白血病効果を期待するとともに、HTLV-1 ウイルスに対する免疫療法としての効果も検討することとしている。研究初年度は、今後の ATL 治療に活用するための分子学的検索と治療研究を推進するための詳細な実施計画書を作成した。また、本年度は、HTLV-I プロウイルス DNA 量の測定法、同種移植療法後の造血細胞動態、特にキメリズム解析法、宿主免疫と HTLV-I 腫瘍に関する研究および移植前後の T 細胞抗原受容体 (TCR) V レパートリーおよび微小残存白血病 (ATL クローン) に関する研究を併せて開始した。本研究の成功により、ATL における移植対象の拡大や他のウイルス性疾患などへの新たな治療法としての展開や提供も期待される。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. Honda K, Takada H, Nagatoshi Y, Akazawa K, Ohga S, Ishii E, Okamura J, Hara T. Thymus-independent expansion of T lymphocytes in children after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 25:647-52, 2000
2. Moritake, H, Taketomi A, Kamimura S, Ikuno Y, Seo Y, Fukuda T, Iguchi H, Okamura J. Renin-producing hepatoblastoma. J Pediatr Hematol Oncol., 22:78-80, 2000
3. Matsuzaki A, Eguchi H, Ikuno Y, Ayukawa H, Yanai F, Ishii E, Sugimoto T, Inada H, Anami K,

- Nibu K, Hara T, Miyazaki S, Okamura J. Treatment of childhood acute myelogenous leukemia with allogeneic and autologous stem cell transplantation during the first remission: A report from the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group in Japan. *Pediatr Hematol Oncol* 17: 623-634, 2000
4. Kojima S, Sako M, Kato K, Hosoi G, Ohara A, Koike K, Okimoto Y, Nishimura S, Akiyama Y, Toshikawa T, Ishii E, Okamura J, Yazaki M, Hayashi Y, Eguchi M, Tsukimoto I, Ueda K. An effective chemotherapeutic regimen for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down's syndrome. *Leukemia*, 2000 14: 786-791.
5. Suita S, Tajiri T, Sera Y, Takamatsu H, Mizote H, Nagasaki A, Kurosaki N, Hara T, Okamura J, Miyazaki S, Sugimoto T, Kawakami K, Eguchi H, Tsuneyoshi M Improved survival for patients with advanced neuroblastoma after high-dose combined chemotherapy based in part on N-myc amplification. *J Pediatr Surg* 35 : 1737-1741, 2000
6. Kigasawa H, Kato S, Akiyama Y, Imaizumi M, Ohira M, Kawa K, Hanada R, Matsuyama T, Ikuta K, Nishihira H, Yabe H, Tsuchida M, Okamura J, Mugishima H, Hoshi Y, Nagao T. National registry of hematopoietic stem-cell transplantation in children-1998. *Jpn J Pediatr Hematol* 14:317-327, 2000
7. Sonoda S, Fujiyoshi T, Yashiki S, Li HC, Lou H, Lema C. Genetic diversity of HLA in HTLV-I infection *Uirusu*. 2000;50:37-45.
8. Li HC, Yashiki S, Sonoda J, Lou H, Ghosh SK, Byrnes JJ, Lema C, Fujiyoshi T, Karasuyama M, Sonoda S. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. *Jpn J Cancer Res*. 2000 ;91:34-40.
9. Taguchi J, Miyazaki Y, Yoshida S, Fukushima T, Moriuchi Y, Jinnai I, Matsuo T, Kuriyama K, Tomonaga M. Allogeneic bone marrow transplantation improves the outcome of de novo AML with trilineage dysplasia (AML-TLD). *Leukemia* 14, 1861-1866, 2000
10. Tsukasaki K, Koeffler P, Tomonaga M. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Bailliere's Clinical Haematology* 13, 231-243, 2000
11. Matsuo Y, Iwanaga M, Mori H, Yoshida S, Kawaguchi Y, Yakata Y, Murata K, Nagai K, Jinnai I, Matsuo T, Kuriyama K, Tomonaga M. Recovery of hematopoietic progenitor cells in patients with severe aplastic anemia who obtained good clinical response with a combination therapy of immunosuppressive agents and recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. *Int. J. Hematol.* 72, 37-43, 2000
12. Weihong W, Matsuo T, Yoshida S, Mori H, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M. Colony forming unit megakaryocyte (CFU-meg) numbers and serum thrombopoietin concentrations in thrombocytopenic disorders: an inverse correlation in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 14, 1751-1756, 2000
13. Imanishi D, Yamamoto K, Tsushima H, Miyazaki Y, Kuriyama K, Tomonaga M, Matsuyama T. Identification of a novel

- cytokine-response element in the human IFN regulatory factor-1 gene promoter. *J. Immunol* 165, 3907- 3916, 2000
14. Yoshida S, Kuriyama K, Miyazaki Y, Taguchi J, Fukushima T, Honda M, Hayashara T, Nagai K, Atogami S, Toriya S, Soda H, Nonaka H, Momita S, Jinnai I, Amenomori T, Kusano M, Yoshida Y, Ikeda S, Matsuo T, Tomonaga M. De novo acute myeloid leukemia in the elderly; a consistent fraction of long-term survivors by standard-dose chemotherapy. *Leuk. Res.* 25, 33-38, 2000
 15. Kohno T, Moriuchi R, Katamine S, Yamada Y, Tomonaga M, Matsuyama T. Identification of genes associated with the progression of adult T cell leukemia (ATL). *Jpn J. Cancer Res* 91, 1103-1110, 2000
 16. Mori N, Ueda A, Ikeda S, Yamasaki Y, Yamada Y, Tomonaga M, Morikawa S, Geleziunas R, Yoshimura T, Yamamoto N. Human T-cell leukemia virus type I tax activates transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene through two nuclear factor-kappa B sites. *Cancer Res* 60, 4939-4935, 2000
 17. Kojima S, Nakano S, Tomonaga M, Hows J, Marsh J, Gerard S, Bacigalupo A, Mizoguchi H. Consensus conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol* 72, 118-123, 2000.
 18. Kamihira S, Dateki N, Sugahara K, Yamada Y, Tomonaga M, Maeda T, Tahara M. Real-time polymerase chain reaction for quantification of HTLV-1 proviral load: application of analyzing aberrant integration of the proviral DNA in adult T-cell leukemia. *Int J Hematol* 72, 79-84, 2000
 19. Yamada Y, Sugahara K, Tsuruda K, Nohda K, Mori N, Hara T, Maeda T, Hayashibara T, Joh T, Honda M, Tawara M, Tomonaga M, Miyazaki Y, Kamihira S. Lactacystin activates FLICE (caspase 8) protease and induces apoptosis in Fas-resistant adult T-cell leukemia cell lines. *Eur J Haematol* 64, 315+322, 2000
 20. Mori N, Fujii M, Iwaki K, Ikeda S, Yamasaki Y, Hata T, Yamada Y, Tanaka Y, Tomonaga M, Yamamoto N. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 95, 3915-3921, 2000
 21. Tsuruda K, Sugahara K, Dateki N, Ohishi E, Yamada Y, Tomonaga M, Moriuchi H, Tsuji Y, Kamihira S. Qualitative and quantitative characterization of Fas (CD95) expression and its role in primary human acute leukemia cells. *Leuk Res* 24, 437-444, 2000
 22. Honda M, Yamada Y, Tomonaga M, Ichinose H, Kamihira S. Correlation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: a pilot study. *Leuk Res* 24, 461-468, 2000
 23. Hanabuchi S, Ohashi T, Koya Y, Kato H, Takemura F, Hirokawa K, Yoshiki T, Yagita H, Okumura K, Kannagi M. Development of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-transformed tumor in rats following suppression of T cell immunity by CD80 and CD86 blockade. *J. Virol.*, 74: 428-435, 2000
 24. Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Tateno H,

- Takemura F, Tsukahara T, Koya Y, Hasegawa A, Masuda T, Kannagi M. Prevention of adult T cell leukemia-like lymphoproliferative disease in rats by adoptively transferred T cells from a donor immunized with human T cell leukemia virus type 1 Tax-coding DNA vaccine. *J. Virol.* 74: 9610-9616, 2000
25. Tsurutani N, Kubo M, Maeda Y, Ohashi T, Yamamoto N, Kannagi M, Masuda T. Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J. Virol.* 74: 4795-4806, 2000
26. Kannagi M, Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Koya Y, Hasegawa A, Masuda T, Yoshiki T. Immunological aspects of rat models of HTLV-type I infected T lymphoproliferative disease. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 1737-1740, 2000
27. Maeda M, Otsuka T, Kimura N, Kozu T, Fukuyama T, Uchida N, Sugio Y, Itoh Y, Iino T, Inaba S, Niho Y. Induction of MTG8 specific cytotoxic T-cell lines: MTG8 is probably a tumour antigen that is recognized by cytotoxic T cells in AML1-MTG8-fused gene-positive acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 111:570-579, 2000
28. Utsunomiya A, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Hanada S, Uozumi K, Yashiki S, Tara M, Kawano F, Saburi Y, Kikuchi H, Hara M, Sao H, Morishima Y, Koderu Y, Sonoda S, Tomonaga M. Improved outcome of adult T cell leukemia/lymphoma with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 27, 15-20, 2001
29. Saito, T, Tanosaki, R., et al. Non-myeloablative stem cell transplant using 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA) in a patient with myelodysplastic syndrome (MDS). *Exp Oncol* 22; 88-90, 2000
30. Suenaga K, Tanosaki R, et al. 2001. Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol.*(in press, 2001)
31. Takeyama, K., Seto, M., Uike, N., Hamajima, N, Ino T, Mikuni, C, Kobayashi, T., Maruta, A., Muto, Y., Maseki, N., Sakamaki, H., Saitoh, H., Shimoyama, M., Ueda, R. Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome: a large-scale Japanese study of clinical and cytogenetic features as well as prognostic factors. *Int J Hematol* 71:144-152, 2000
32. Okamoto T, Kanamaru A, Shimazaki C, Motoji T, Takemoto Y, Takahashi M, Fukushima T, Takeshita A, Kusumoto S, Kishimoto Y, Yorimitsu S, Tsukuda K. Uike N, Arima N, Ohono R. Combination chemotherapy with risk factor-adjusted dose attenuation for high-risk myelodysplastic syndrome and resulting leukemia in the multicenter study of the Japan adult leukemia study group (JALSG): results of an interim analysis. *Int J Hematol* 72:200-205, 2000
33. Itoh K, Ohtsu T, Sasaki Y, Ogura M, Morishima Y, Kasai M, Chou T, Yoshida K, Ohno T, Mizorogi F, Uike N, Sai T, Taniwaki M, Ikeda S, Tobinai K, and members of the lenograstim/Lymphoma Study Group. Randomized comparison of mobilization kinetics of circulating CD34+ cells between biweekly CHOP and dose-escalated CHOP

with the prophylactic use of lenograstim (Glycosylated rHuG-CSF) in aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia and Lymphoma* 38(5-6):521-532, 2000

34. Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, Kiyoi H, Seto M, Uike N, Ino T, Utsunomiya A, Maruta A, Jin-nai I, Kamada N, Kubota Y, Nakamura H, Shimazaki C, Horiike S, Koderu Y, Saito H, Ueda R, Joseph W, Ohno R. Analysis of genetic polymorphism in *NQO1*, *GST-M1*, *GST-T1*, and *CYP3A4* in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and *de novo* acute myeloid leukemia¹. *Clin. Cancer Res.* 6:4091-4095, 2000
35. Yatabe Y, Suzuki R, Tobinai K, Matsuno Y, Ichinohasama R, Okamoto M, Yamaguchi M, Tamaru J, Uike N, Hashimoto Y, Morishima Y, Suchi T, Seto M, Nakamura S. Significance of cyclin D1 overexpression for the diagnosis of mantle cell lymphoma: a clinicopathologic comparison of cyclin D1-positive MCL and cyclin D1-negative MCL-like B-cell lymphoma. *Blood*, 95(7):2253-2261, 2000
36. Toyoda K, Taniguchi J, Kikawa K, Uike N, Haraoka S, Ooshima K, Kikuchi M, Kawanishi H. Follicular dendritic cell sarcoma: Ultrastructural and immunohistochemical studies. *Int Med*, 39:950-955, 2000
37. Yufu Y, Kimura M, Kawano R, Noguchi Y, Takatsuki H, Uike N, Ohshima K. Epstein-Barr virus-associated T cell lymphoproliferative disorder following autologous blood stem cell transplantation for relapsed Hodgkin's disease. *Bone Marrow Transplant* 26:1339-1341, 2000

2. 学会発表

1. Sasaki H, Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, Okamura J, Koike K, Ohara A, Ishi E, Komada Y, Hibi S, Nakahata T. Myelodysplastic syndromes (MDS) in childhood: A retrospective study in Japan. 5th MDS symposium, Denmark, May, 2000
2. Ohara A, Okamura J, Kigasawa H, Asami K, Mabuchi O, Yabe M, Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, Koike K, Akiyama Y, Hara J, Ikushima S, Nakahata T. The blastic transformation of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). 5th MDS symposium, Denmark, May, 2000
3. Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, Okamura J, Koike K, Ohara A, Akiyama Y, Hara J, Ikushima S, Nakahata T. Allogeneic stem cell transplantation (SCT) for juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): A retrospective analysis of 27 children in Japan. 5th MDS symposium, Denmark, May, 2000
4. 岡村 純. 感染症検査はどこまでやらなければならないのか- 幹細胞移植の立場から. 第37回日本臨床病理学会九州支部例会 2000年2月19日、福岡市
5. 江口春彦、石井榮一、松崎彰信、生野茅子、古賀広幸、川上 清、鮎川浩志、神菌淳司、秋吉健介、玉井友治、杉本徹、宮崎澄雄、岡村 純. プロトコール AL90 による小児急性リンパ性白血病(ALL)の治療成績. 第62回日本血液学会総会. 2000年3月福岡
6. 永利義久、河野嘉文、渡辺力、古賀友紀、外山誠也、牧ひろみ、鈴谷浩子、中川竜二、阿部孝典、黒田泰弘、岡村 純. 小児における HLA 一致同胞間移植後の造血・免疫機能再構築- BMT

- vs PBSCT-. 第 23 回造血細胞移植学会総会, 2000 年 12 月、京都.
7. 安部康信、牟田耕一郎、崔日承、原敬一、松島孝充、南留美、名和田新、稲葉頌一、鵜池直邦、岡村 純. 骨髄非破壊的前処置(TBI200cGy)を用いた同種末梢血幹細胞移植. 第 23 回造血細胞移植学会総会. 2000 年 12 月、京都
8. Matsuzaki A, Ishii E, Eguchi H, Nibu K, Take H, Miyazaki S, Okamura J. Treatment of childhood acute leukemia : long-term outcome of protocols AL841, AL851 and ALHR88 of the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study group. 第 62 回日本血液学会総会(Asian session) 2000 年 3 月、福岡市
9. Kannagi M, Ohashi T, Hanabuchi S, Kato H, Koya Y, Yoshiki T. Induction of HTLV-I-Infected T-lymphoproliferative disease in animal models and its immunological aspects. Workshop on HTLV Molecular Biology and Pathogenesis, March 17-19, 2000, Virginia, U.S.A.
10. Ohashi T, Hanabuchi S, Masuda T, Kannagi M. Suppressive effects of HTLV-I tax-coding DNA vaccine on the development of ATL-like lymphoproliferative disease in a rat model. 12th International Workshop on Retroviral Pathogenesis, October 29 – November 1, 2000, Maryland, USA.
11. 大橋貴、花淵志野、神奈木真理. ラットの ATL 様疾患モデルを用いた Tax 発現 DNA ワクチンの効果解析. 第 59 回日本癌学会、横浜 2000 年、10 月
12. 大橋 貴、花淵志野、神奈木真理. Tax 発現 DNA ワクチン接種ラットより誘導した CTL 細胞株の HTLV-I 感染細胞に対する細胞傷害性の解析. 第 30 回日本免疫学会、仙台、2000、11 月
13. 花淵志野、大橋貴、小屋美博、竹村富美代、広川勝イク、吉木敬、八木田英雄、奥村康、神奈木真理. 抗 CD80/86 抗体を用いたラット ATL 様疾患誘導. 第 48 回日本ウイルス学会、津、2000 年、10 月
14. 花淵志野、大橋貴、竹村富美代、神奈木真理. ラット HTLV-I 腫瘍モデルにおける抗腫瘍免疫の認識抗原解析. 第 30 回日本免疫学会、仙台、2000、11 月
15. 館野広美、大橋貴、花淵志野、増田貴夫、神奈木真理. ヒト成人 T 細胞白血病ウイルスによる T 細胞の腫瘍化に関わる因子についてのラットを用いた解析. 第 48 回ウイルス学会、津、2000 年 10 月
16. 長谷川温彦、大橋貴、花淵志野、竹村富美代、増田貴夫、神奈木真理. ラットへの低量 HTLV-I 感染による抗体陰性 HTLV-I キャリアの作出. 第 48 回ウイルス学会、津、2000 年、10 月
17. 鶴谷直美、久保誠、大橋貴、山本直樹、神奈木真理、増田貴夫、HIV-1 インテグラーゼ蛋白の核移行シグナル領域の検討. 第 48 回ウイルス学会、津、2000、10 月
18. 久保誠、増田貴夫、鶴谷直美、大橋貴、岩本愛吉、神奈木真理. HIV キャリア CD8 陽性細胞の HIV-1 抑制効果に対する MHC-I 発現低下の影響. 第 48 回ウイルス学会、津、2000、10 月
19. 劉 慧寧、久保誠、増田貴夫、大橋貴、神奈木真理、非感染者由来アロ特異的 CTL による HIV-1 の増殖抑制. 第 14 回日本エイズ学会、京都、2000、11 月
20. 神奈木真理 HTLV-I リンパ腫瘍と免疫. 日

本癌学会ミニシンポジウム、京都、2000、12月。

21. 塚本敦子, 河野 文夫ら：同種幹細胞移植を施行した ATL 5 例 第 63 回日本血液学会総会 H13 年 4 月 19 日、名古屋市
22. 宇都宮 與, 高塚 祥芝, 魚住 公治, 花田 修一, 菊池 博, 今村 豊, 小寺 良尚, 河野 文夫, 谷口 修一, 原 雅道, 宮崎 泰司, 朝長 万左男. ATL 患者における allo-SCT 後の HTLV-I プロウイルス量の変動. 第 63 回 日本血液学会総会, 2001 年 4 月 19 日, 名古屋.
23. Shinjo T, Masuda M, et al. Involvement of mTOR/Bim, not Akt/Bad athway in cytokine-mediated cell survival signaling downstream of PI3-kinase in murine hematopoietic progenitors. Blood 96 (suppl) 568- 9a, 2000
24. Miyagi J, Masuda M, et al. Establishment of primary effusion lymphoma cell line and characterizing its growth in scid mice. Blood 96 (suppl) 227b, 2000
25. 鵜池直邦, 清永真理、河野理子、野口由美、高月 浩、油布祐二、斉藤 健、 小林幸夫、飛内賢正. クラドリピン(2-CdA)投与後に発症した治療関連 MDS の 2 例. 第 62 回日本血液学会総会
26. 鵜池直邦、立川義倫、嶋本正弥、高月 浩、油布祐二、小鶴三男. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する modified EPOCH 療法の効果. 第 41 回臨床血液学会総会

分担研究課題名：骨髄非破壊的移植療法後の造血細胞動態に関する研究

分担研究者：国立病院九州がんセンター臨床研究部

部長 岡村 純

研究要旨

同種移植では混合キメラの定量法が確立されていない。個体間で多型性に富むマイクロサテライト領域の一種である short tandem repeat (STR)に着目し、STR-PCR 法により同種移植後の混合キメラの定量法を確立することを目的とした。同種幹細胞移植を受けた 20 症例のドナーおよび患者細胞を使用し、AmpFISTR Profiler PCR Amplification Kit に含まれる 9 領域を用いて移植後混合キメラを解析した。少数の細胞（10000 個）でも、混合キメラ率測定が可能であり、結果は 48 時間以内に得られ、5～10%の混合キメラまで定量・検出可能であった。20 ペアすべてでドナー/患者の定量的識別が可能であった。本解析法は骨髄非破壊的移植後の血液/免疫回復動態の解析などに極めて有効な手段になると考えられる。

A. 研究目的

同種移植では混合キメラの定量法が確立されていない。そこで、個体間で多型性に富むマイクロサテライト領域の一種である short tandem repeat (STR)に着目し、同種移植後の混合キメラの定量法を STR-PCR 法により確立することを目的とした。

B. 研究方法

97～00 年に当施設（一部他施設）で移植を受けたドナー/患者ペア 20 症例の末梢リンパ球からゲノム DNA を抽出し各リピート配列（9 領域）を AmpFISTR Profiler PCR Amplification Kit を用いて PCR により増幅し、PCR 産物を ABI310 自動シーケンサーで解析した。

（倫理面への配慮）

患者本人とドナーまたは保護者から検体の保存と使用について文書での同意を得ている。結果については個人の守秘義務を厳守する。

C. 研究結果

キメラ率の結果は 48 時間以内に得られ、検出限界は 5～10%であった。検討した 20 ペア全例でドナー/患者の定量的識別が可能であった。骨髄破壊的移植を行い、生着した症例では、移植 30 日後にはすべて完全キメラが成立していた。骨髄非破壊的移植の 2 例では移植 30 日後においてはレシピーエント細胞が残存し混合キメラの状態であった。また経時的に解析を行った例では混合キメラ率の

変化が再発や拒絶などの臨床経過と相関した。

D 考察

移植後の完全キメラの達成過程は、前処置法の違い、すなわち骨髄破壊的か非破壊的かにより異なることが示唆された。このことは、抗白血病効果の発現様式とも関連してくるものと考えられる。

E 結論

本解析法は、今後骨髄非破壊的移植後の血液/免疫回復動態の解析などに極めて有効な手段になると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honda K, Takada H, Nagatoshi Y, Akazawa K, Ohga S, Ishii E, Okamura J, Hara T. Thymus-independent expansion of T lymphocytes in children after allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant, 2000 25:647-52.
- 2) Moritake, H, Taketomi A, Kamimura S, Ikuno Y, Seo Y, Fukuda T, Iguchi H, Okamura J. Renin-producing hepatoblastoma. J Pediatr Hematol Oncol, 2000 22:78-80.
- 3) Matsuzaki A, Eguchi H, Ikuno Y, Ayukawa H, Yanai F, Ishii E, Sugimoto T, Inada H, Anami K, Nibu K, Hara T, Miyazaki S, Okamura J. Treatment of childhood acute myelogenous leukemia

with allogeneic and autologous stem cell transplantation during the first remission: A report from the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group in Japan. *Pediatr Hematol Oncol*, 2000 17: 623-634.

4) Kojima S, Sako M, Kato K, Hosoi G, Ohara A, Koike K, Okimoto Y, Nishimura S, Akiyama Y, Toshikawa T, Ishii E, Okamura J, Yazaki M, Hayashi Y, Eguchi M, Tsukimoto I, Ueda K. An effective chemotherapeutic regimen for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down's syndrome. *Leukemia*, 2000 14: 786-791.

5) Suita S, Tajiri T, Sera Y, Takamatsu H, Mizote H, Nagasaki A, Kurosaki N, Hara T, Okamura J, Miyazaki S, Sugimoto T, Kawakami K, Eguchi H, Tsuneyoshi M. Improved survival for patients with advanced neuroblastoma after high-dose combined chemotherapy based in part on N-myc amplification. *J Pediatr Surg*, 2000 35: 1737-1741.

6) Kigasawa H, Kato S, Akiyama Y, Imaizumi M, Ohira M, Kawa K, Hanada R, Matsuyama T, Ikuta K, Nishihira H, Yabe H, Tsuchida M, Okamura J, Mugishima H, Hoshi Y, Nagao T. National registry of hematopoietic stem-cell transplantation in children-1998. *Jpn J Pediatr Hematol* 2000 14:317-327.

2. 学会発表 (国際学会)

1) Sasaki H, Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, Okamura J, Koike K, Ohara A, Ishii E, Komada Y, Hibi S, Nakahata T. Myelodysplastic syndromes (MDS) in childhood: A retrospective study in Japan. 5th MDS symposium, Denmark, May, 2000.

2) Ohara A, Okamura J, Kigasawa H, Asami K, Mabuchi O, Yabe M, Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, Koike K, Akiyama Y, Hara J, Ikushima S, Nakahata T. The blastic transformation of juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). 5th MDS symposium, Denmark, May, 2000.

3) Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, Okamura J, Koike K, Ohara A, Akiyama Y, Hara J, Ikushima S, Nakahata T. Allogeneic stem cell transplantation (SCT) for juvenile myelomonocytic leukemia (JMML): A retrospective analysis of 27 children in

Japan. 5th MDS symposium, Denmark, May, 2000.

(国内学会)

1) 岡村 純. 感染症検査はどこまでやらなければならないのか- 幹細胞移植の立場から. 第37回日本臨床病理学会九州支部例会 2000年2月19日、福岡市

2) 江口春彦、石井榮一、松崎彰信、生野茅子、古賀広幸、川上 清、鮎川浩志、神菌淳司、秋吉健介、玉井友治、杉本徹、宮崎澄雄、岡村 純. プロトコル AL90 による小児急性リンパ性白血病(ALL)の治療成績. 第62回日本血液学会総会. 2000年3月福岡

3) 永利義久、河野嘉文、渡辺力、古賀友紀、外山誠也、牧ひろみ、鈴谷浩子、中川竜二、阿部孝典、黒田泰弘、岡村 純. 小児における HLA 一致同胞間移植後の造血・免疫機能再構築- BMT vs PBSCT-. 第23回造血細胞移植学会総会 2000年12月、京都.

4) 安部康信、牟田耕一郎、崔日承、原敬一、松島孝充、南留美、名和田新、稲葉頌一、鶴池直邦、岡村 純. 骨髄非破壊的前処置 (TBI200cGy)を用いた同種末梢血幹細胞移植. 第23回造血細胞移植学会総会. 2000年12月、京都

5) Matsuzaki A, Ishii E, Eguchi H, Nibu K, Take H, Miyazaki S, Okamura J. Treatment of childhood acute leukemia: long-term outcome of protocols AL841, AL851 and ALHR88 of the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study group. 第62回日本血液学会総会(Asian session) 2000年3月、福岡市

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）分担研究報告書
分担研究課題名：成人T細胞白血病（ATL）患者の骨髄移植療法における
HTLV-Iプロウイルス DNA量の測定に関する研究

分担研究者 鹿児島大学医学部ウイルス学講座

教授 園田 俊郎

研究要旨

ATL の骨髄移植療法における HTLV-I プロウイルス量の測定は、予後経過観察に重要と思われる。従来の HTLV-I プロウイルス量の測定はサザンプロット法、PCR 産物の限界希釈法などが用いられていたが、煩雑さに加え測定時間が長く正確さに欠けていた。本研究では、迅速性、高感度、多検体処理を可能にすることを目的として、新規に HTLV-I プロウイルスの測定方法を開発し、ATL 骨髄移植後の HTLV-I プロウイルス量の測定を可能にした。

A. 目的

ATL 患者の骨髄移植後の HTLV-I プロウイルス量を測定するため、PCR 定量装置 LightCycler システムによる測定方法を開発し、その有用性について検討をおこなった。

B. 研究方法

鹿児島県在住の ATL 患者 (42 名) と HTLV-I キャリア (92 名) の方を対象として、HTLV-I プロウイルス量測定 of 趣旨を十分に説明し同意を受けて採血をおこない末梢血リンパ球を分離し液体窒素内に凍結保存した。凍結保存リンパ球より高分子 DNA を抽出分離後、HTLV-I プロウイルス DNA (HTLV-I-pX 領域 (7427 - 7456bp) をリアルタイム PCR 定量装置 (LightCycler) で測定した。MT-2 細胞を HTLV-I 標準コントロールとして、常に被検サンプルの測定とともに定量した。さらにスタンダードヒトゲノム DNA 中の β -グロビン量を測定し、細胞 1000 個当たりの HTLV-I プロウイルス量を算出した。同種骨髄移植された ATL 患者の凍結保存末梢血リンパ球中の HTLV-I プロウイルス量は、同様に測定した。

C. 研究結果と考察

ATL 患者と HTLV-I キャリアの HTLV-I プロウイルス DNA 量をそれぞれ測定した結果、ATL 患者の 1000 細胞当たりのプロウイルス量は 761.6 ± 875.2 コピー、HTLV-I キャリアのプロウイルス量は 64.9 ± 73.9 コピーであった。前者群は後者群に比し約 10 倍量の HTLV-I プロウイルス量であった。ATL 患者のなかで比較的 HTLV-I プロウイルス量が低い症例 (5

例) はリンパ腫型であった (図 1)。

ATL 患者で同種骨髄移植された凍結保存末梢血リンパ球中の HTLV-I プロウイルス量を経時的に測定した結果、移植前の 318 コピーが 8.7-24.8 コピー (24 ヶ月) に減少し、HTLV-I キャリアの平均値以下のコピー数を維持していた (図 2)。

D. 結論

以上、リアルタイム PCR 定量装置 LightCycler システムによる HTLV-I プロウイルスの測定方法は、迅速性、高感度、多検体処理を可能とし、ATL 骨髄移植後の HTLV-I プロウイルス量の測定に有用であることが明らかになった。

E. 健康危険情報

HTLV-I の取り扱いには、P2 レベルのバイオハザード内でおこなった。遺伝子増幅産物は、測定終了後直ちに次亜塩素酸処理および高压蒸気滅菌法にて廃棄処分した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Utsunomiya A, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Hanada S, Uozumi K, Yashiki S, Tara M, Kawano F, Saburi Y, Kikuchi H, Hara M, Sao H, Morishima Y, Kadera Y, Sonoda S, Tomonaga M. Improved outcome of adult T cell leukemia/lymphoma with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2001;27(1):15-20.

Sonoda S, Fujiyoshi T, Yashiki S, Li HC, Lou

H, Lema C. Genetic diversity of HLA in HTLV-I infection Uirusu. 2000;50(1):37-45.

Li HC, Yashiki S, Sonoda J, Lou H, Ghosh SK, Byrnes JJ, Lema C, Fujiyoshi T, Karasuyama M, Sonoda S. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood T

lymphocytes of adult T-cell leukemia patients. Jpn J Cancer Res. 2000 ;91(1):34-40.

2. 学会発表：なし

G. 知的財産権の出願・登録状況：なし

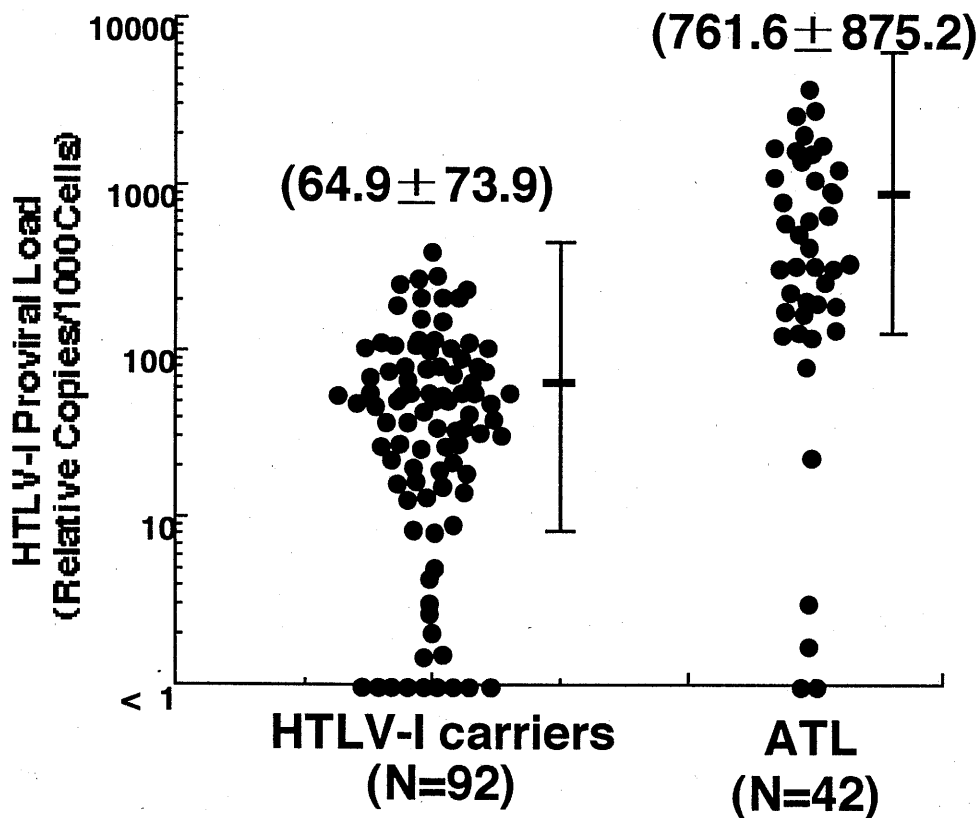


図1 ATL患者とHTLV-IキャリアのHTLV-Iプロウイルス量

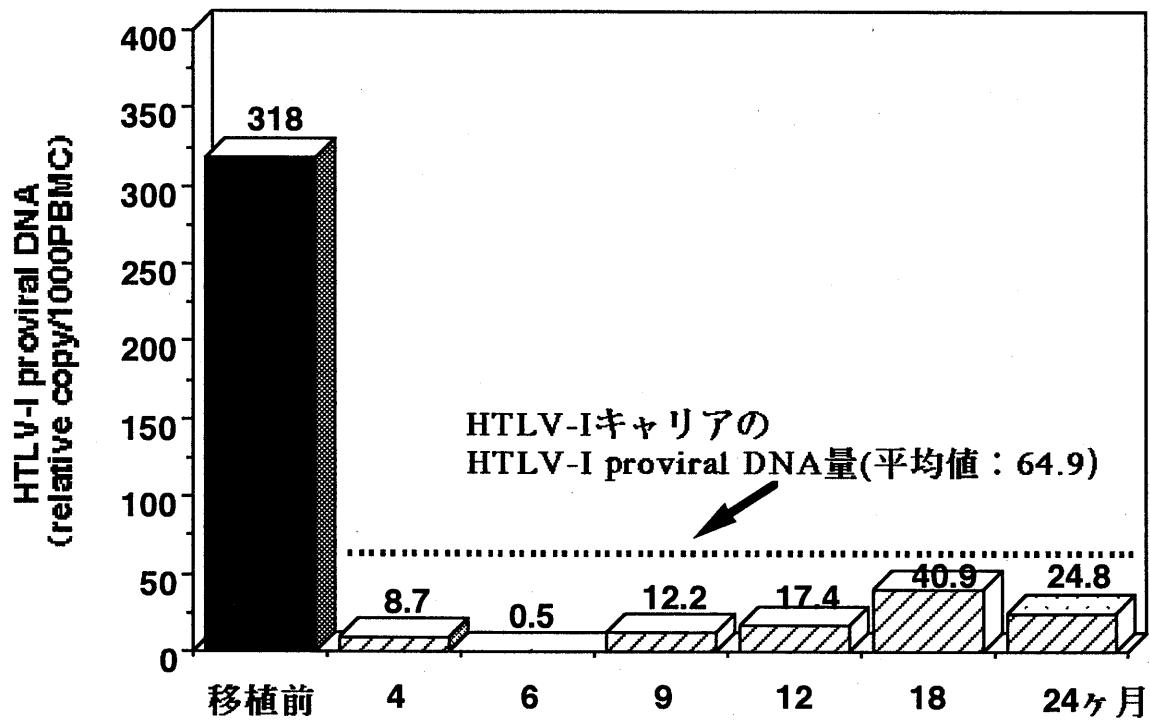


図2 骨髄移植後のHTLV-Iプロウイルス量の変動