

20030159

別添2

厚生労働科学研究費補助金
がん克服戦略研究事業

成人 T 細胞白血病(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 15 年度 総括・分担究報告書

主任研究者 岡村 純

平成 16(2004)年 4 月

別添 3

目 次

I. 総括研究報告

- 成人 T 細胞白血病(ATL)への同種末梢血幹細胞による骨髓非破壊的移植療法の検討 岡村 純 1

II. 分担研究報告

1. 宿主免疫と HTLV-I 腫瘍に関する研究 神奈木真理 9
2. 成人 T 細胞白血病の分子生物学的解析 松岡 雅雄 12
3. ATL ミニ移植患者における T 細胞抗原受容体(TCR)からの微少残存病変(MRD)と CTL 解析と制御性 T 細胞特異的 Foxp3 遺伝子発現
木村 暢宏 14
4. ATL への同種末梢血幹細胞による骨髓非破壊的移植療法
原田 実根 17
5. 成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)への同種造血幹細胞療法後の HTLV-I プロウイルス量並びに微少残存病変についての検討
朝長万左男 18
6. ATL に対する骨髓非破壊的同種末梢血幹細胞移植後の HTLV-I プロウイルス動態
宇都宮 與 21
7. 造血幹細胞移植、細胞免疫療法による ATL 治療法
田野崎隆二 23
8. 成人 T 細胞白血病(ATL)患者に対する骨髓非破壊的前処置法を用いた同種造血幹細胞移植術の実施
鵜池 直邦 24
9. ATL への同種末梢血幹細胞による骨髓非破壊的移植療法の実施
増田 昌人 28

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 31

厚生労働科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
総括研究報告書

分野 6：新しい治療法の開発に関する研究
＜成人 T 細胞白血病（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： ATL は human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) の感染を契機として九州地方の高齢者に発症する極めて予後不良の疾患であり、最近の治療研究においても、完全寛解率 35%、2 年生存率 31%と報告されている。一方、近年若年層 ATL に対して同種骨髄移植が試みられ、一部では長期にわたる血液学的寛解が維持されているとの報告があり移植症例数も急増しているが、移植関連毒性が強いため高年齢層に多い ATL 患者の大半は移植の対象とはならない上に、移植関連合併症死亡率 (TRM) (~50%) が極めて高いことが報告されている。そこで、我々は本研究班において ATL に対する同種末梢血幹細胞による骨髄非破壊的移植 (ミニ移植) 療法を試みてきた。ミニ移植術は、ドナーリンパ球を患者に生着させるための十分な免疫抑制を行うものの、強力な前処置は行わないという新しい移植概念に基づいた治療法であり、造血能や臓器への毒性が少ない。その結果、高年齢層に多い ATL 患者が移植適応となると考えた。1) ATL に対する骨髄非破壊的同種移植 (ミニ移植、NST) 療法の実施 1-1) 第 1 期 NST プロトコールの実施：移植対象は 50~70 才の急性型/リンパ腫型 ATL で、フルダラビン、ブスルファン、ATG による前処置後に、HLA 型一致同胞ドナーから末梢血幹細胞を移植し、本療法の安全性と有効性を検討した。主要評価項目は移植片生着と 100 日以内の TRM 発生とした。本登録 16 例中 15 例が評価可能で、主要評価項目から 13 例が成功と判断された。2004 年 4 月現在、死亡は 10 例、生存は 5 例で、2 年無病生存率と全生存率は各々 20%と 33%であり、急性 GVHD 発症例の全生存率がよい傾向であった。1-2) 第 2 期プロトコールの実施 (予定 16 症例)：第 1 期プロトコールを「成功」と判断し、ATG を省いた前処置以外は第 1 期と同一条件とした第 2 期プロトコール (ATL-NST-2) を作成、全参加施設の倫理委員会承認された後 2003 年 6 月に登録を開始した。2) 免疫療法プロトコールの検討：同種移植後に再発した ATL 症例に対する樹状細胞療法の臨床研究プロトコール (臨床第 I 相試験) について検討した。3) 基礎的検討：移植療法と並行して以下の解析を行った。3-1) HTLV-I プロウイルス量動態の解析：プロウイルス量は移植後著明に低下し、15 例中 8 例で測定感度以下 (単核球 1000 個当たり 0.5 コピー以下) となった。3-2) 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析：移植後患者末梢血中に CD8 陽性 HTLV-I Tax 特異的 CTL が存在し、その多くは単一のエピトープに強い反応性を示した。HLA-A2 と HLA-A24 に拘束される CTL が認識する 9 mer エピトープ (Tax11-19, Tax301-309) を同定した。(Harashima A, Cancer Res 2004) 3-3) HTLV-I の分子生物学的解析：移植例のプロウイルス型を解析し、プロウイルス型と移植後生存は相関しなかったが、Tax を発現できないと考えられる 2 型欠損型を持つ症例も長期生存していた。

分担研究者

1. 岡村純 国立病院九州がんセンター 部長
2. 神奈木真理 東京医科歯科大学 教授
3. 松岡雅雄 京都大学医学部 教授
4. 木村暢宏 福岡大学医学部 講師
5. 原田実根 九州大学医学部 教授
6. 朝長万左男 長崎大学医学部 教授
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 講師
10. 鶴池直邦 国立病院九州がんセンター医長

A. 研究目的

ATL は human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) の感染を契機として九州地方の高齢者に発症する極めて予後不良の疾患であり、罹患数は年間約 500 例と推定されている。多剤併用化学療法やインターフェロンなど種々の臨床試験にもかかわらず予後は不良で、最近の治療研究においても、完全寛解率 35%、2 年生存率 31%と報告されている。ATL に対しては、これまでとは異なった発想に基づく新規治療体系の確立が急務である。一方、近年若年層 ATL に対して同種骨髄移植が試みられ、一部では長期にわたる血液学的寛解が維持されているとの報告があり移植症例数も急増しているが、移植関連毒性が強いため高年令層に多い ATL 患者の大半は移植の対象とはならない。また、ATL を対象に従来の移植法を行った場合、移植関連合併症死亡率 (TRM) (~50%) が極めて高いことが報告されている。そこで、本研究班では「骨髄非破壊的前処置による同種移植療法を行って通常の同種移植に伴う治療関連毒性を軽減させる」という新しい概念に基づいた移植法を ATL 患者に対して実施し、新たな治療体系を確立することを目的としている。その結果、高年令層に対しても比較的安全に実施可能になれば、より多くの ATL 患者が移植適応となると考えた。また、骨髄非破壊的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ことによる抗白血病効果を期待し、

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ことを目指す。具体的には (1) 骨髄非破壊的前処置による移植療法の有効性と安全性の検討する。

(2) 移植後に再発した ATL に対する免疫療法の可能性の検討。(3) 本研究 (新規治療法) に伴う基礎的課題について、HTLV-I プロウイルス DNA 量の動態、骨髄非破壊的移植療法後の造血細胞動態、宿主免疫と HTLV-I 腫瘍の解析、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 (MRD) の解析などである。

B. 研究方法

1) ATL に対するミニ移植療法の実施

(1-1) 第 1 期プロトコール: (2001 年 4 月登録開始、2002 年 12 月終了、最終追跡 2004 年 3 月 31 日、移植後観察期間中央値 23 ヶ月) 2000 年に詳細な移植実施計画書を作成し、全参加施設の倫理委員会に提出して承認された。フルダラビン (30mg/m², 6 日間)、ブスルファン (4mg/kg, 2 日間)、ATG (2.5mg/kg, 2 日間) による前処置後に、HLA 型一致同胞ドナーから末梢血幹細胞を移植し、本療法の安全性と有効性を検討した。移植対象症例は、急性型およびリンパ腫型 ATL で、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とした。また、血清学検査において、HLA 6/6 一致血縁ドナーを有し、説明同意書を用いて同意を得た者とした。健康な HLA 一致同胞ドナーに対し G-CSF を 5 日間投与し、4 日目からアフエレーシスを行って末梢血幹細胞を採取した。CD34 陽性細胞の必要細胞数は患者体重 (kg) あたり 3.0 x 10⁶ 個以上を目標とした。基礎的検討課題: 移植前後の HTLV-I ウイルス動態、HTLV-1 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)、T 細胞レパートリー、造血能修復動態(キメリズム)を解析した。

主要評価項目は移植片生着と 100 日以内の移植関連合併症死亡 (TRM)。副次的評価項目は、移植片の生着、GVHD の程度、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)、抗ウイルス効果 (HTLV-1 ウイルスゲノム動態)、生存率、無病生存率などとした。

(1-2) 第 2 期プロトコル (ATL-NST-2) : 第 1 期プロトコルを「成功」と判断し、ATG を省いた前処置以外は第 1 期と同一条件とした第 2 期プロトコル(ATL-NST-2)を作成し、各参加施設の倫理委員会に申請して承認され、2003 年 6 月に登録を開始した。(予定症例 16 例)

2) 免疫療法プロトコルの検討

前年度までに、幹細胞移植適応のない慢性型 ATL に対する抗腫瘍療法として、HTLV-I 抗原や自家白血球細胞を標的とする免疫療法のプロトコルを作成し、研究班において検討してきた。しかし、in vitro 処理後の ATL 細胞を患者体内に返却することに関して、現時点では、倫理的な課題をクリアできないと判断し本計画を中止した。一方、第 1 期プロトコル登録例で移植後早期の再発が多かったこと、臨床的に移植片対 ATL 効果が強く示唆されたことおよび神奈木班員らのミニ移植前後の患者検体を用いた研究から、移植後の患者体内において強い HTLV-I Tax 特異的 CTL 応答が存在する場合が示されたことなどの理由から、同種移植後の再発 ATL に対して Tax 蛋白を標的とした自家樹状細胞療法を行うことには意義があると判断して研究班において検討してきた。

3) 本研究に伴う基礎的課題の検討

(3-1) HTLV-I プロウイルス量動態に関する研究 : 第 1 期プロトコルに登録された ATL16 例について移植前後の HTLV-I プロウイルス動態について検討した。方法 : HTLV-1 プロウイルス量は末梢血単核細胞(PBMC)から

DNA を抽出し、HTLV-1 pX および β -globin に特異的な 2 種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いたリアルタイム遺伝子定量装置 (LightCycler) により測定した。下記の式により PBMC 1000 細胞あたりの HTLV-1 pX DNA コピー数を算出した。HTLV-1 proviral DNA 量=[(HTLV-1 pX コピー数) / (β -globin コピー数) / 2] × 1000

(3-2) 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析 : ATL 患者へのミニ移植の抗 ATL 効果における HTLV-I 特異的 CTL 応答の関与を検証することを目的として、HLA 完全一致ドナーからの移植における細胞性免疫を解析した。研究方法 : 1) IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞 (ILT) の樹立 : 造血幹細胞移植前の ATL 患者の末梢血から分離した単核球分画 (PBMC) を PHA 刺激後 IL-2 存在下に長期培養し HTLV-I に感染細胞株を樹立した。2) CTL 応答の誘導 : 移植後の ATL 患者由来の PBMC を、移植前の自己 ILT 細胞株をホルマリン処理したものを抗原として刺激し、反応性に増殖してきた細胞を IL-2 存在下に培養した。3) CTL 活性の検定 : 細胞傷害能 (51Cr 遊離法) またはインタフェロン γ 産生能 (ELISA 法、ELISPOT 法)。4) Tetramer : 同定したエピトープ配列をもとにペプチドを合成し、Emory 大学の Tetramer Facility に PE 標識 HLA-A2/Tax11-19 ならびに HLA-A-24/Tax301-309 の合成を委託した。

(3-3) HTLV-I の分子生物学的解析 : HTLV-I がコードする蛋白質のうち、Tax は転写活性化や p53, p16, MAD1 などの機能的抑制により感染細胞の持続性増殖を起こし、腫瘍化において中心的な役割を果たしていると考えられている。しかし、同時に Tax タンパクは生体内において細胞傷害性 T リンパ球の主要認識抗原であり腫瘍化において正と負の作用を有している。このように Tax は発がんにおける中心的ウイルス蛋白質と考えられているが ATL 細胞における Tax の発現は未解明な部分が多く残されているため

ATL 細胞における tax 遺伝子の発現・構造を解析した。研究方法：研究班プロトコールに従いミニ移植が施行された 15 例の末梢血からゲノム DNA、RNA を抽出し、tax 遺伝子の塩基配列、発現を解析した。プロウイルスの型は long PCR を用いて完全型、1 型欠損型 (LTR は保たれ内部に欠失)、2 型欠損型プロウイルス (5'-LTR と内部に欠失) に分類した。5'-LTR のメチル化は sodium bisulfite 処理した DNA を methylation-specific PCR または塩基配列決定により解析した。

(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」を各移植施設の倫理委員会に提出し承認された。各施設での承認後、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および研究を実施した。これらの研究において得られた結果については研究班事務局において厳重に管理し個人のプライバシーに配慮している。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、研究班とは独立した委員による効果安全性評価委員会を設置した。本研究実施中は、上記の効果・安全性評価委員に班会議への出席を依頼して、進行状況を説明し、その継続の是非に関して諮問している。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ている。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) ATL に対するミニ移植療法

(1-1) 第 1 期プロトコールの実施と最終結果
症例：平成 13 年 3 月に患者登録を開始し、平成 14 年 12 月までに目標である 16 症例の移植が終

了したためプロトコールをクローズした。16 例中 15 例が評価可能であった。毒性：全例に短期間の 3、4 度血液毒性が発生し、非血液毒性は、4 度は 1 例もなく 3 度が 3 例に認められた。評価項目：全例で速やかな生着 (平均 12 日) が認められたが、1 例は早期再発のため完全キメラを達成しなかった。1 例は TRM (急性 GVHD) で移植後 71 日目に死亡したため、主要評価項目では 13 例で成功と判断された。GVHD；急性 GVHD は 10 例に発症、うち 4 例は重症型 (3、4 度) であった (累積発症率 64%)。慢性 GVHD は 100 日以上生存した 13 例中 6 例 (46%) に発症した。再発が 9 例に観察され、移植から再発までの期間は 14~171 日 (中央値 47 日) であった。TRM は 4 例に発生し (3 例は移植後 100 日目以降でいずれも GVHD に関連)、2004 年 4 月現在、死亡は 10 例、生存は 5 例 (うち 2 例は再発後) である。2 年無病生存率と全生存率は各々 $20 \pm 10\%$ と $33 \pm 12\%$ である。急性 GVHD 発症例 (10 例) と非発症例 (5 例) の全生存率は、 $50 \pm 16\%$ と 0% ($P=0.06$) であり、発症例の予後がよい傾向であった。また、再発した 9 例中 3 例が免疫抑制剤の急速減量・中止により、再び寛解し、うち 1 例はそのまま長期生存を続けている。

(1-2) 第 2 期プロトコール (ATL-NST-2) の作成と症例登録の開始

2004 年 3 月 31 日現在 6 例が仮登録され、本登録 5 例が移植を終了した。(2 例は移植直後) 3 例の生着は順調で TRM の発生はなく、現在まで移植後 5~6 ヶ月経過しており再発はない。

2) 免疫療法プロトコールの作成と検討

2003 年 12 月の班会議において、ミニ移植後の再発例に対する樹状細胞療法の概要を検討し、現在詳細なプロトコール (臨床第 I 相試験) を作成中である。

3) 本研究に伴う基礎的課題の検討

(3-1) HTLV-I プロウイルス量動態に関する研究

第1期プロトコール登録例16例中8例のドナーはHTLV-1キャリアであった。NST施行後2-4カ月では16例中8例において血中HTLV-1プロウイルス量は検出限度以下に低下した。また生存例5例中3例が検出限度以下を維持していた。血中HTLV-1プロウイルス量は正常ドナーからの移植8例中6例が検出限度以下になり、キャリアドナーからの移植では8例中2例のみが検出限度以下に低下した。再発した9例中5例にプロウイルス量の増加が確認できたが、リンパ節や皮膚のみでの再発例では末梢血中のプロウイルス量の増加はみられないか、みられても軽度であった。

(3-2) 細胞傷害性T細胞(CTL)の解析

1) 完全寛解が得られた症例の移植前のATL患者末梢血からIL-2依存性HTLV-I感染細胞(ILT)株を樹立し、移植後レシビエントの末梢血単核球分画(PBMC)をILT細胞で刺激し、反応性に増殖してきた細胞の機能と特異性を調べた。その結果、この反応性細胞は移植前のHTLV-I感染細胞を傷害するCD8陽性CTLであった。2) このCTLはHTLV-I Tax特異的CTLを多く含んでおり、その多くは単一のエピトープに強い反応性を示した。HLA-A2とHLA-A24に拘束されるCTLに認識される9merのエピトープ(Tax11-19, Tax301-309)を同定した。3) HLA-A2/Tax11-19ならびにHLA-A-24/Tax301-309テトラマーを作成し、*ex vivo*解析を試みたところ、調べた2例の移植後患者の末梢血中にもこれらのCTLが確認できた。4) 同様の解析を4人の移植後ATL患者について行ったところ、3人で自己ILT細胞に対するT細胞増殖を示し、HTLV-I特異的CTLの存在が確認できた。残り一人はILTに全く反応せず、移植半年後にリンパ腫の再発が見られた。CTLが誘導できた3例では完全寛解が維持されたが、1例はGVHDにより死の転帰をとった。

(3-3) HTLV-Iの分子生物学的解析

移植症例15例中は完全型9例、1型欠損型1例、2型欠損型プロウイルス5例であった。

D. 考察

1) ATLに対するミニ移植療法

50~70才のATL患者を対象とした第1期プロトコールによって、ミニ移植の安全性が確認されつつある。移植片対宿主反応(GVHD)を発症した症例の予後がよく、半数以上の患者でプロウイルスの消失が証明されたことから、移植片対ATL効果の存在や抗ウイルス療法としての有効性が示唆された。

2) 免疫療法プロトコールの作成と検討

第1期NSTプロトコールにおいて、HTLV-I特異的CTL応答の存在が示唆されたことからATLのHTLV-I抗原が移植片対ATL効果の抗原となる可能性があり、免疫療法検討の根拠になり得ると考えられた。本療法と並行して再発ATLに対して実施予定の樹状細胞療法では、将来的には、肝がんなどウイルス関連がんなどへも適応が広がる可能性がある。

3) 本研究に伴う基礎的課題の検討

(3-1) HTLV-I プロウイルス量動態に関する研究

HTLV-1プロウイルス量の測定はNST後の末梢血中のMRDを検出するのみでなく、末梢血再発や末梢血中のGV-ATL効果の確認に有用である。さらにT細胞キメラ検査と組み合わせると感染細胞の割合のみでなく、感染細胞がレシビエント由来かドナー由来かを区別するのに有用であると考えられた。

(3-2) 細胞傷害性T細胞(CTL)の解析

HTLV-I特異的CTL応答が移植後のATL患者において非常に活性化される場合があることが分か

った。GVL 効果の標的となることは従来から指摘されているが、ATL では Minor histocompatibility antigen に加え HTLV-I 抗原も GVL 抗原となる可能性がある。Tax 特異的 CTL が GV-ATL 効果に貢献したかどうかは結論付けられないが、少なくとも、レシピエント体内に非常に強い HTLV-I 抗原提示が存在したことが伺われる。また、緩解の維持された ATL 患者にこれらの反応が見られたことから、再発防止に貢献している可能性も考えられた。

(3-3) HTLV-I の分子生物学的解析

本研究による ATL 移植症例の解析ではプロウイルスのタイプと生存に有意な差は認められなかったが、Tax を発現できないと考えられる 2 型欠損型プロウイルスを有する症例も長期生存しており腫瘍細胞の Tax 発現と移植の効果の関連は今後、更に検討が必要であると考えられた。

E. 結論

第 1 期、第 2 期プロトコールの実施結果から ATL に対するミニ移植の安全性が確認されつつある。移植片対宿主反応 (GVHD) を発症した症例の予後がよく、半数以上の患者でプロウイルスの消失が証明されたことから、移植片対 ATL 効果の存在や抗ウイルス療法としての有効性が示唆され、本移植法が極めて有望な治療法であることが明らかとなった。今後は、研究を継続して本療法の標準化を目指す計画であり、移植対象の拡大が予測される。本療法と並行して実施する樹状細胞を用いた CTL 誘導法が肝がんなど同様のウイルス関連がんなどへも適応が広がる可能性がある。基礎的研究結果からは、ミニ移植後寛解に至った ATL 症例には移植後に強い HTLV-I Tax 特異的 CTL 応答を示すものがあつた。ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスの解析は腫瘍細胞における Tax の意義を明らかにできるだけでなく宿主免疫機構との関連も明らかにでき、ATL の移植における Tax に対する免疫応答の意義を明らかにする上で有用な情報を提供できるものと考えられた。本療法は、がん

疾患のみならず、移植後ウイルス感染症、HIV や C 型肝炎などの難治感染症に対してもそのまま応用することができる可能性がある。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Okamura J, Utsunomiya A, Tanosaki R, Uike N, Sonoda S, Kannagi M, Tomonaga M, Harada M, Kimura N, Masuda M, Kawano F, Yufu Y, Hattori H, Kikuchi H, Saburi, Y. Non-myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (NST) for adult T-cell leukemia/lymphoma- Multicenter phase 1 clinical trial. *Blood* 102:2704a, 2003
- 2) Harashima A, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M, Ohashi T, Fukui F, Hasegawa A, Masuda T, Takae Y, Okamura J, Kannagi M. Graft-versus-human Tax response in adult T cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res* 2004 ; 64: 391-9
- 3) Koga Y, Nagatoshi Y, Kawano Y, Okamura J. Methotrexate versus cyclosporine A for graft-versus prophylaxis in patients with hematological malignancy underwent allogeneic bone marrow transplantation from HLA-identical siblings: a single center analysis in Japan : *Bone Marrow Transplant* 32:171-176, 2003
- 4) Kozuka T, Ishimaru F, Fujii K, Masuda K, Kaneda K, Imai T, Fujii N, Ishikura H, Kongo S, Watanabe T, Shinagawa K, Ikeda K, Niiya K, Harada M, Tanimoto M. Plasma stromal cell-derived factor-1 during granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 31;651-654,2003
- 5) Yamasaki M, Henzan H, Ohno Y, Yamanaka T, Iino T, Ito Y, Kuroiwa M, Maeda M, Kawano N, Kinukawa N, Miyamoto T, Nagafuji K, Shimoda K, Inaga S, Hayashi S, Taniguchi S, Shibuya T, Gondo H, Otuska T, Harada M. for Fukuoka Blood and Marrow Transplantation Group: Influence of transplanted dose of CD56+ cells on development of graft-versus-host disease in patients receiving G-CSF-mobilized peripheral blood progenitor cells from HLA-identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant* 32;505-510,2003
- 6) Makita M, Azuma T, Hamaguchi H, Miiya H, Kojima K, Fujita S, Tanimoto M, Harada M, Yasukawa M. Leukemia-associated fusion proteins, dek-can and bcr-able, represent immunogenic HLA-DR-restricted epitopes recognized by fusion peptide-restricted epitopes

recognized by fusion peptide-specific CD34+ T lymphocytes. *Leukemia* 16;2400-2407,2003

- 7) Tsuchiya T, Ohshima K, Karube K, Yamaguchi T, Suefuji H, Hamasaki M, Kawasaki C, Suzumiya J, Tomonaga M, Kikuchi M. Th1, Th2, and activated T-cell marker and clinical prognosis in peripheral T-cell lymphoma, unspecified: comparison with AILD, ALCL, lymphoblastic lymphoma, and ATLL. *Blood*. 103:236-41, 2004
- 8) Matsuo T, Kuriyama K, Miyazaki Y, Yoshida S, Tomonaga M, Emi N, Kobayashi T, Miyawaki S, Matsushima T, Shinagawa K, Honda S, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group The percentage of myeloperoxidase-positive blast cells is a strong independent prognostic factor in acute myeloid leukemia, even in the patients with normal karyotype. *Leukemia*1538-43, . 2003
- 9) Ohnita K, Isomoto H, Maeda T, Jubashi T, Nakamura H, Misuta Y, Murase K, Tomonaga M, Kohno S. Two cases of adult T-cell leukemia/lymphoma involving the terminal ileum. *Leuk Lymphoma*. 44:973-6, 2003
- 10) Takasaki Y, Yamada Y, Sugahara K, Hayashi T, Dateki N, Harasawa H, Kawabata S, Soda H, Ikeda S, Tomonaga M, Kamihira S. Interruption of p16 gene expression in adult T-cell leukaemia/lymphoma: clinical correlation. *Br J Haematol*. 122:253-9, 2003
- 11) Suzuki R, Murata M, Kami M, Ohtake S, Asou N, Kodera Y, Tomonaga M, Masaki Y, Kusumoto S, Takeuchi J, Matsuda S, Hirai H, Yorimitsu S, Hamajima N, Seto M, Shimoyama M, Ohno R, Morishima Y, Nakamura S. Prognostic significance of CD7+CD56+ phenotype and chromosome 5 abnormalities for acute myeloid leukemia M0. *Int J Hematol*. 77:482-9, 2003
- 12) Yamada Y, Tomonaga M. The current status of therapy for adult T-cell leukaemia-lymphoma in Japan. *Leuk Lymphoma*. 44:611-8, 2003
- 13) Tawara M, Maeda T, Yamada Y, Harasawa H, Tsuruda K, Sugahara K, Moriuchi R, Tomonaga M, Kamihira S. Aberrant processing of Fas transcripts in adult T-cell leukemia: a possible role in tumor cell survival. *Cancer Lett*. 19:235-42, 2003
- 14) Tsukasaki K, Tobinai K, Shimoyama M, Kozuru M, Uike N, Yamada Y, Tomonaga M, Araki K, Kasai M, Takatsuki K, Tara M, Mikuni C, Hotta T; Lymphoma Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. Deoxycoformycin-containing combination chemotherapy for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9109). *Int J Hematol*. 77:164-70, 2003
- 15) Bessho M, Hotta T, Ohyashiki K, Takahashi T, Mizoguchi H, Asano S, Ikeda Y, Sakurai M, Tojo A, Kizaki M, Iwanaga M, Tomonaga M, Hirashima K. Multicenter prospective study of clonal complications in adult aplastic anemia patients following recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) administration. *Int J Hematol*.;77:152-8, 200
- 16) Fukushima T, Miyazaki Y, Tsushima H, Tsutsumi C, Taguchi J, Yoshida S, Kuriyama K, Imaizumi Y, Murota H, Kanda S, Hishikawa Y, Koji T, Taguchi T, Tanaka Y, Yamada Y, Ikeda S, Kohno T, Yamamoto K, Mori N, Tomonaga M, Matsuyama T. Expression of the c-Met proto-oncogene and its possible involvement in liver invasion in adult T-cell leukemia. *Clin Cancer Res*.9:181-7, 2003
- 17) Miyazaki Y, Kuriyama K, Miyawaki S, Ohtake S, Sakamaki H, Matsuo T, Emi N, Kobayashi T, Matsushima T, Shinagawa K, Ohno R, Tomonaga M; Japan Adult Leukaemia Study Group. Cytogenetic heterogeneity of acute myeloid leukaemia (AML) with trilineage dysplasia: Japan Adult Leukaemia Study Group-AML 92 study. *Br J Haematol*. 120:56-62, 2003
- 18) Hayashibara T, Yamada Y, Mori N, Harasawa H, Sugahara K, Miyanishi T, Kamihira S, Tomonaga M. Possible involvement of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult T-cell leukemia (ATL) leukemogenesis: constitutive activation of AhR in ATL. *Biochem Biophys Res Commun*. 300(1):128-34, 2003
- 19) Hasegawa A, Ohashi T, Hanabuchi S, Kato K, Takemura F, Masuda T, M. Kannagi. Expansion of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) reservoir in orally infected rats: Inverse correlation with HTLV-I-specific cellular immune response. *J. Virol.*, in press, 2003.
- 20) Kannagi M, Hanabuchi S, Ohashi T. A rat model of ATL and tumor-vaccine, Two Decades of Adult T cell leukemia and HTLV-I research. *Gann Monograph on Cancer Research No. 50* (Edited by K. Sugamura, et al.), pp219-230, 2003.
- 21) Harashima N, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M, Ohashi T, Fukui F, Hasegawa A, Masuda T, Takaue Y, Okamura J, M. Kannagi. Reactivation of strong HTLV-I-specific CTL response in ATL patients following non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *AIDS Research and Human Retroviruses*, Suppl. 19: S-9, 2003.
- 22) Hasegawa A, Ohashi T, Hanabuchi S, Kurihara K, Komori K, Kato K, Harashima N, Masuda T, M. Kannagi. Inverse correlation of persistent HTLV-I load with HTLV-I-specific CTL immune response in rats: Oral infection as a risk factor for HTLV-I-infected lymphoproliferation. *AIDS Research and Human Retroviruses*, Suppl. 19: S-34, 2003.
- 23) Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y,

- Yasunaga J-I, Nosaka K, Tanaka Y, Matsuoka M. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* (2004, in press)
- 24) Yasunaga J, Matsuoka M. Leukemogenesis of adult T-cell leukemia. *Int J Hematol*. 2003 ; 78: 312-20.
- 25) Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene*22: 5131-40, . 2003
- 26) Tobinai K, Ujike N, Saburi Y, Chou T, Etoh T, Masuda M, Kawano F, Matsuoka M, Taguchi H, Makino T, Asano Y, Tamura K, Ohashi Y; Cladribine/ATL Study Group, Japan. Phase II study of cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) in relapsed or refractory adult T-cell leukemia-lymphoma. *Int J Hematol*77: 512-7, . 2003
- 27) Chuman Y, Takata T, Sameshima H, Takeuchi S, Takatsuka Y, Makino T, Blaser MJ, Utsunomiya A. *Campylobacter fetus* bacteremia in a patient with adult T cell leukemia. *Clin Infect Dis*. 36: 1497-1498, 2003
- 28) Ishida T, Utsunomiya A, Iida S, Inagaki H, Takatsuka Y, Kusumoto S, Takeuchi G, Shimizu S, O Ito M, Komatsu H, Wakita A, Eimoto T, Matsushima K, Ueda R. Clinical significance of CCR4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma: its close association with skin involvement and unfavorable outcome. *Clin Cancer Res*. 9: 3625-3634, 2003
- 29) Hasui K, Utsunomiya A, Izumo S, Goto M, Yonezawa S, Sato E, Kanzaki T, Murata F. An immunohistochemical analysis of peripheral blood tissue specimens from leukemia cells: Leukemic cells of adult T-cell leukemia/lymphoma express p40Tax protein of human T-cell lymphotropic virus type 1 when entering re proliferation. *Acta Histochem Cytochem*. 36: 345-352, 2003
- 30) Nakai K, Mineishi S, Kami K, Saito T, Hori A, Kojima R, Imataki O, Hamaki T, Yoshihara S, Ohnishi M, Kim SW, Ando T, Arima F, Kanda Y, Makimoto A, Tanosaki R, Kanai S, Heike Y, Ohnishi T, Kawano Y, Wakasugi H, Takaue Y. Anti-Thymocyte Globulin Affects the Occurrence of Acute and Chronic Graft-Versus-Host Disease After a Reduced-Intensity Conditioning Regimen by Modulating Mixed Chimerism Induction and Immune Reconstitution. *Transplantation*. 75:2135-2143, 2003.
- 31) Kami M, Hamaki T, Miyakoshi S, Murashige M, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y, Taniguchi S, Hirai H, Ozawa K, Kasai K. 2003. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Br J Haematol*. 120; 304-309, 2003
- 32) Mineishi S, Kanda Y, Saito T, Nakai K, Makimoto A, Kami M, Tanosaki R, Wakasugi H, Tobinai K, Takaue Y. Impact of graft-versus-host disease in reduced-intensity stem cell transplantation(RIST) for patients with hematological malignancies. *Br J Haematol*. 121; 296-303, 2003
- 33) Yamamoto R, Kusumi E, Kami M, Yuji K, Hamaki T, Saito A, Murashige N, Hori A, Kim SW, Makimoto A, Ueyama J, Tanosaki R, Miyakoshi S, Mori S, Morinaga S, Heike Y, Taniguchi S, Masuo S, Takaue Y, and Muto Y. Late hemorrhagic cystitis after reduced-intensity hematopoietic stem cell transplantation (RIST). *Bone Marrow Transplant*. 32; 1089-1095, 2003
- 34) Urahama N, Tanosaki R, Kami M, Iijima K, Chizuka A, Kim SW, Hori A, Kojima R, Imataki , Makimoto A, Mineishi S, Takaue Y. Transfusion-related acute lung injury (TRALI) after the infusion of bone marrow cells in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Transfusion* 43; 1553-1557, 2003.
- 35) Kojima R, Kami M, Kim S-W, Murashige N, Kishi Y, Hori A, Imataki O, Hamaki T, Sakiyama M, Masuo S, Fujisawa Y, Makimoto A, Heike Y, Tanosaki R, Takaue Y. Induction of graft-versus-autoimmune (GVA) disease effect against refractory psoriasis by complete donor-type chimerism and graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 32; 439-442, 2003.
- 36) Hori A, Kami M, Kim SW, Makimoto A, Tanosaki R, MD, Takaue Y. Balance between acute graft-versus-host disease (GVHD) and graft-versus-tumor (GVT) effect after reduced-intensity transplantation (RIST) for metastatic renal cell carcinoma. *Hematology Journal* (in press, 2004)
- 37) Tsukasaki K, Tobinai K, Shimoyama M, Kozuru M, Ujike N, Yamada Y, Tomonaga M, Araki K, Kasai M, Takatsuki K, Tara M, Mikuni C, Hotta T; Lymphoma Study Group of the Japan Clinical Oncology Group. Deoxycoformycin-containing combination chemotherapy for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9109). *Int J Hematol*. 77:164-70, 2003.

2. 刊行物

- 1) 厚生労働科学研究費研究成果等普及啓発事業 (がん医療均てん) 成人 T 細胞白血病 (ATL) の基礎と臨床-新規治療法の開発に向けて- 編集: 鶴池直邦、岡村 純、長寿科学振興財団東京事務所、東京、平成 15 年

分担研究課題名：宿主免疫と HTLV-I 腫瘍に関する研究

分担研究者：東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授 神奈木真理

概要

我々は、ヒト ATL 患者への HLA 完全一致ドナーからの骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植における細胞性免疫を解析した。完全緩解が得られた症例の移植前の ATL 患者末梢血から IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞 (ILT) 株を樹立し、移植後レシピエントの末梢血単核球分画 (PBMC) を ILT 細胞で刺激し、反応性に増殖してきた細胞の機能と特異性を調べた。その結果、緩解に至った ATL 症例では、移植後に強い HTLV-I Tax 特異的 CTL 応答を示すものがあった。

A. 研究目的

ATL 患者への骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植の抗 ATL 効果における HTLV-I 特異的 CTL 応答の関与を検証する。

B. 研究方法

1. IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞 (ILT) の樹立：造血幹細胞移植前の ATL 患者の末梢血から分離した単核球分画 (PBMC) を PHA 刺激後 IL-2 存在下に長期培養した。これらの細胞は自発的に HTLV-I に感染していた。
2. CTL 応答の誘導：移植後の ATL 患者由来の PBMC を、移植前の自己 ILT 細胞株をホルマリン処理したものを抗原として刺激し、反応性に増殖してきた細胞を IL-2 存在下に培養した。
3. CTL 活性の検定：細胞傷害能 (51Cr 遊離法) またはインタフェロ γ 産生能 (ELISA 法、ELISPOT 法)。
4. Tetramer：同定したエピトープ配列をもとにペプチドを合成し、Emory 大学の Tetramer Facility に PE 標識 HLA-A2/Tax11-19 ならびに HLA-A-24/Tax301-309 の合成を委託した。

C. 研究結果

1. 完全緩解が得られた症例の移植前の ATL 患者末梢血から IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞 (ILT) 株を樹立し、移植後レシピエントの末梢血単核球分画 (PBMC) を ILT 細胞で刺激し、反応性に増殖してきた細胞の機能と特異性を調べた。その結果、この反応性細胞は移植前の HTLV-I 感染細胞を傷害する CD8 陽性 CTL であった。
2. この CTL は HTLV-I Tax 特異的 CTL を多く含んでおり、その多くは単一のエピトープに強い反応性を示した。HLA-A2 と HLA-A24 に拘束される CTL に認識される 9 mer のエピトープ (Tax11-19, Tax301-309) を同定した。
3. HLA-A2/Tax11-19 ならびに HLA-A-24/Tax301-309 テトラマーを作成し、ex vivo 解析を試みたところ、調べた 2 例の移植後患者の末梢血中にもこれらの CTL が確認できた。
4. 同様の解析を 4 人の移植後 ATL 患者について行ったところ、3 人で自己 ILT 細胞に対

する T 細胞増殖を示し、HTLV-I 特異的 CTL の存在が確認できた。残り一人は ILT に全く反応せず、移植半年後にリンパ腫の再発が見られた。CTL が誘導できた 3 例では完全緩解が維持されたが、1 例は GVHD により死の転帰をとった。

D 考察

今回の研究結果から、HTLV-I 特異的 CTL 応答が移植後の ATL 患者において非常に活性化される場合があることが分かった。が GVL 効果の標的となることは従来から指摘されているが、ATL では Minor histocompatibility antigen に加え HTLV-I 抗原も GVL 抗原となる可能性がある。Tax 特異的 CTL が GV-ATL 効果に貢献したかどうかは結論付けられないが、少なくとも、レシピエント体内に非常に強い HTLV-I 抗原提示が存在したことが伺われる。また、緩解の維持された ATL 患者にこれらの反応が見られたことから、再発防止に貢献している可能性も考えられる。

E 結論

骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植の後緩解に至った ATL 症例には、移植後に強い HTLV-I/Tax 特異的 CTL 応答を示すものがある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. N. Harashima, K. Kurihara, A. Utsunomiya, R. Tanosaki, S. Hanabuchi¹, M. Masuda, T. Ohashi, F. Fukui, A. Hasegawa, T. Masuda, Y. Takaue, J. Okamura, and M. Kannagi. Graft-versus-human Tax response in adult T cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res.* In press, 2004 Jan.
2. A. Hasegawa, T. Ohashi, S. Hanabuchi, H. Kato, F. Takemura, T. Masuda, and M. Kannagi. Expansion of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) reservoir in orally infected rats: Inverse correlation with HTLV-I-specific cellular immune response. *J. Virol.*, in press, 2003.
3. Mari Kannagi, Shino Hanabuchi, and Takashi Ohashi. A rat model of ATL and tumor-vaccine, Two Decades of Adult T cell leukemia and HTLV-I research. *Gann Monograph on Cancer Research No. 50* (Edited by K. Sugamura, et al.), pp219-230, 2003.
4. N. Harashima, K. Kurihara, A. Utsunomiya, R. Tanosaki, S. Hanabuchi, M. Masuda, T. Ohashi, F. Fukui, A. Hasegawa, T. Masuda, Y. Takaue, J. Okamura, and M. Kannagi. Reactivation of strong HTLV-I-specific CTL response in ATL patients following non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *AIDS Research and Human Retroviruses*, Suppl. 19: S-9, 2003.
5. A. Hasegawa, T. Ohashi, S. Hanabuchi, K. Kurihara, K. Komori, H. Kato, N. Harashima, T. Masuda, and M. Kannagi. Inverse correlation of persistent HTLV-I load with HTLV-I-specific CTL immune response in rats: Oral infection as a risk factor for HTLV-I-infected lymphoproliferation. *AIDS Research and Human Retroviruses*, Suppl. 19: S-34, 2003.

2. 学会発表

(国際学会)

1. A. Hasegawa, T. Ohashi, S. Hanabuchi, K. Kurihara, K. Komori, H. Kato, N. Harashima, T. Masuda, and M. Kannagi. Inverse correlation of persistent HTLV-I load with HTLV-I-specific CTL immune response in rats: Oral infection as a risk factor for HTLV-I-infected lymphoproliferation. 第 11 回国際ヒトレトロウイルス会議, June 2003, SF
2. M. Kannagi. Role of T-cell immunity in human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I) leukemogenesis. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Aug. 2003, Awaji.

(国内学会)

1. 神奈木真理. ATL に対する腫瘍免疫療法.第 51 回日本ウイルス学会シンポジウム, H15 年 10 月、京都
2. 原嶋奈々江、栗原清、宇都宮與、田野崎隆二、増田昌人、大橋貴、岡村純、神奈木真理.骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植後の ATL 患者生体内における HTLV-I Tax 特異的 CTL 数の増加.第 62 回日本癌学会、H15 年 9 月、名古屋
3. 栗原清、原嶋奈々江、増田昌人、宇都宮與、朝長万左男、大橋貴、田中勇悦、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病細胞の T 細胞応答誘導能:HTLV-I Tax ならびに costimulatory 分子の自発的誘導による免疫原性の増大.第 62 回日本癌学会、H15 年 9 月、名古屋
4. 大橋貴、花淵志野、神奈木真理. ラットモデルにおける Tax 発現低下が HTLV-I 感染 T 細胞に及ぼす影響の解析.第 62 回日本癌学会、H15 年 9 月、名古屋
5. 野村真知子、大橋貴、西辻裕紀、栗原清、藤沢順一、原嶋奈々江、増田貴夫、神奈木真理. ラットモデルにおける Ta に対する siRNA による HTLV-I 感染 T 細胞の腫瘍原性の変化. 第 51 回日本ウイルス学会、H15 年 10 月、京都
6. 原嶋奈々江、栗原清、宇都宮與、田野崎隆二、増田昌人、大橋貴、高上洋一、岡村純、神奈木真理. 骨髄非破壊的造血幹細胞移植後 ATL 患者由来 HTLV-I Tax 特異的 CTL の単一エピトープに対する選択的増殖.第 7 回基盤的癌免疫研究会、H15 年 7 月
7. 栗原清、原嶋奈々江、大橋貴、増田貴夫、田中勇悦、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞の CTL 標的抗原発現能と免疫原性.第 33 回日本免疫学会、H15 年 12 月、福岡
8. 原嶋奈々江、栗原清、大橋貴、長谷川温彦、神奈木真理. 同種造血幹細胞移植後 ATL 症例における生体内 HTLV-I 特異的 CTL の誘導.第 33 回日本免疫学会、H15 年 12 月、福岡
9. 小森一哉、長谷川温彦、栗原清、野村真知子、大橋貴、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-I 経口感染ラットにおける免疫不応答とその回復. 第 33 回日本免疫学会、H15 年 12 月、福岡
10. 野村真知子、大橋貴、西辻裕紀、栗原清、藤沢順一、原嶋奈々江、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-I 感染 T 細胞における Tax 発現抑制が感染細胞と Tax 特異的 CTL 細胞に与える影響の解析.第 33 回日本免疫学会、H15 年 12 月、福岡

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I) のコードする蛋白質の中で Tax は発がん機構に中心的な役割を果たしていると考えられている。成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) 細胞における *tax* 遺伝子の解析を行った。Tax の発現は 1) *tax* 遺伝子の欠失、変異、2) 5'側 long terminal repeat (LTR) のメチル化、3) 5'-LTR の欠失等により多くの症例で不活性化されていた。移植症例の解析から Tax を発現できない症例でも移植が有効である可能性が示唆された。ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスの解析は腫瘍細胞における Tax の意義を明らかにできるだけでなく宿主免疫機構との関連も明らかにでき、ATL の移植における Tax に対する免疫応答の意義を明らかにする上で有用な情報を提供できるものとする。

A. 目的

HTLV-I がコードする蛋白質の内、Tax は転写活性化や p53, p16, MAD1 などの機能的抑制により感染細胞の持続性増殖を起し、腫瘍化において中心的な役割を果たしていると考えられている。しかし、同時に Tax タンパクは生体内において細胞傷害性 T リンパ球の主要認識抗原であり腫瘍化において正と負の作用を有している。このように Tax は発がんにおける中心的ウイルス蛋白質と考えられているが ATL 細胞における Tax の発現は未解明な部分が多く残されていた。ATL 細胞における *tax* 遺伝子の発現・構造を解析し *tax* 遺伝子の腫瘍化における意義の解明を行った。

B. 研究方法

【対象】症例はATL47例と研究班プロトコルに従い同種末梢血幹細胞移植が施行された15例である。

【方法】末梢血あるいはリンパ節からゲノムDNA、RNAを抽出し、*tax* 遺伝子の塩基配列、発現を解析した。プロウイルスの型はlong PCRを用いて完全型、1型欠損型(LTRは保たれ内部に欠失)、2型欠損型プロウイルス(5'-LTRと内部に欠失)に分類した。5'-LTRのメチル化はsodium bisulfite処理したDNAをmethylation-specific PCRまたは塩基配列決定により解析した。

C. 研究結果

ATL47例の解析では5例に*tax* 遺伝子の遺伝的変異(変異、欠失、挿入)を認め4例で5'-LTRのほぼ完全なメチル化を検出した。一方、*tax* 遺伝子転写産物は34%で認めた。5'-LTRのメチル化は多くの場合は部分的なメチル化であった。*tax* 遺伝子の遺伝的変異が認められたケースでは高率(3/4)に転写産物を見出し

た(Table 1)。移植症例15例中では完全型9例、1型欠損型1例、2型欠損型プロウイルス5例であった。

D. 考察

本研究によりATLでは1) *tax* 遺伝子の遺伝的変異、2) 5'-LTRのメチル化によりTax蛋白質の産生が阻害されていることが明らかとなった。特に*tax* 遺伝子の遺伝的変異の存在する症例では転写産物を高率に認めた事実は、この転写抑制という機構が生体内でウイルス抗原発現を抑制することで宿主免疫機構からの回避に働いていることを示唆している。また*tax* 遺伝子の転写抑制は新鮮白血病細胞の約2/3に認められ、その一部は5'-LTRのメチル化によるものであるが、メチル化によらない転写抑制の機序の存在が示唆された。移植症例の解析ではプロウイルスのタイプと生存に有意な差は認められなかったが、Taxを発現できないと考えられる2型欠損型プロウイルスを有する症例も長期生存しており腫瘍細胞のTax発現と移植の効果の関連は今後、更に検討が必要である。

E. 結論

ATL細胞におけるHTLV-Iプロウイルスの解析は腫瘍細胞におけるTaxの意義を明らかにできるだけでなく宿主免疫機構との関連も明らかにでき、ATLの移植におけるTaxに対する免疫応答の意義を明らかにする上で有用な情報を提供できるものとする。

F. 研究発表

Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y, Yasunaga J-I, Nosaka K, Tanaka Y, and Matsuoka M. Genetic and epigenetic inactivation of *tax* gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* (in press)

Table 1 Mutations of *tax* genes in 47 ATL cases

Case No	ATL	Types of provirus	Methylation of 5'LTR	<i>tax</i>	<i>tax</i> expression
1	A	C	U	I	++
2	A	C	P	I	+
3	A	C	P	I	ND
4	A	C	ND	I	ND
5	A	C	U	I	-
6	A	C	P	I	+
7	A	C	P	I	+
8	A	C	M	I	-
9	A	C	P	I	-
10	A	C	P	I	-
11	A	C	P	I	++
12	A	C	U	I	-
13	A	C	P	I	-
14	A	C	M	I	-
15	A	C	P	G7464A (W56*)	+
16	A	C (multiple)	ND	G7464G/A (W56W/*)	-
17	A	C (multiple)	ND	I	ND
18	A	C (multiple)	ND	I	ND
19	A	DT1	U	I	-
20	A	DT1	U	253bp deletion	++
21	A	DT1	P	1bp insertion	ND
22	A	DT2	ND	I	-
23	A	DT2	ND	I	++
24	A	DT2	ND	I	-
25	A	DT2	ND	NA	ND
26	A	DT2	ND	NA	-
27	A	DT2	ND	NA	-
28	A	DT2	ND	NA	-
29	A	DT2	ND	G7346C (V17L)	-
30	A	DT2	ND	I	++
31	L	C	U	I	-
32	L	C	P	I	-
33	L	DT1	P	I	+
34	L	DT2	ND	NA	-
35	Ch	C	M	I	+
36	Ch	C	P	I	-
37	Ch	C	M	I	-
38	Ch	C	U	I	-
39	Ch	C	U	G8040A (W248*)	++
40	Ch	C (multiple)	ND	G7464G/A (W56W/*)	+
41	Ch	DT1	P	I	-
42	Ch	DT1	M	I	-
43	Ch	DT1	U	G7464A (W56*), 8bp deletion	-
44	Ch	DT2	ND	I	-
45	Ch	DT2	ND	I	+
46	Ch	DT2	ND	I	-
47	Ch	DT2	ND	I	-

ND: not determined; NA: not amplified; I: intact; A: acute; L: lymphoma; Ch: chronic; C: complete provirus; DT1: defective type1; DT2: defective type2; M: methylated; U: unmethylated; P: partial methylated. Bold characters showed loss of expression or functions of Tax.

ATLミニ移植患者におけるT細胞抗原受容体（TCR）からの微少残存病変（MRD）とCTL解析と制御性T細胞特異的Foxp3遺伝子発現

分担研究者 木村 暢宏 所属・職名 福岡大学
病院第一内科・講師

研究要旨

平成13年度、αβ-T細胞腫瘍のMRD（微少残存病変）を 10^{-4} ~ 10^{-6} で認識できる半定量システムを確立した。平成14年と今年度、その方法を用いてミニ移植登録症例のATLクローンのTCR Vβ/Vαを確定し、MRDを半定量化した。さらにHLA-A2拘束性Tax特異的CTL追跡をおこない臨床各病期の病態との相関を検討した。これらの結果は、きわめて臨床状態と相関した。MRDとCTLの分子生物学的検討は、ミニ移植などの免疫療法・ワクチン療法の効果判定に重要なモニターとなることが証明された。
また、制御性T細胞特異的Foxp3遺伝子の高発現を一部のATLクローンに認めた。

A. 研究目的

αβ-T細胞系腫瘍についてのMRD測定のみとまつた報告はなかつた。平成13年度ATLのミニ移植の抗腫瘍効果を、腫瘍クローンの微少残存細胞(MRD, minimal residual disease)レベルで把握できる方法を開発確立した。平成14年と15年度ミニ移植登録症例において臨床状態との相関の有無を検討。さらに、HLA-A2拘束性HTLV-1 Tax11-19特異的CTL細胞株のTCRVを解析確定し、このCTLクローンの出現状況を、移植前後、急性GVHD、腫瘍再発時などの臨床病態を経時的に検討することを目的とした。更に、制御性T細胞特異的Foxp3遺伝子発現をCD4+CD25+の類似の表面マーカーを示すATLで検討する。

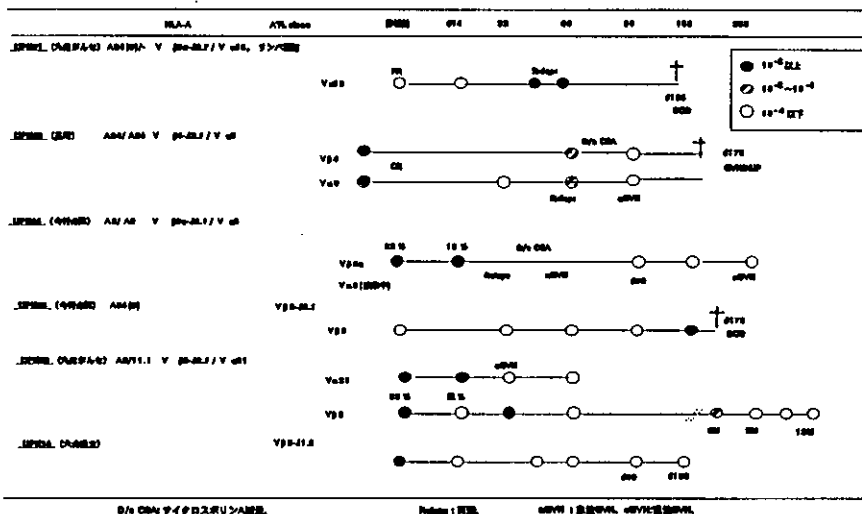
4. TCRのPCR増幅産物のCDR3領域単一性あるいはクローン性を検討するためにSSCP法により特定V fragmentのバンドの有無を検討した。
5. SSCP法によりバンドを認めた場合、TCRのdirect sequencingによりCDR3領域の塩基配列を決定し、T細胞のTCR cloneの特異的clonotypic primerを作成した。
6. 登録症例の各臨床病期（移植前後）での末梢血を採取。希釈法による半定量的検討でMRDを算定する。
7. 制御性T細胞特異的Foxp3遺伝子の発現をATL症例で検討した。
8. (倫理面への配慮)

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。骨髄・末梢血よりリンパ球細胞分画を採取し、Tリンパ球が細胞性免疫として働くT細胞抗原受容体 (T-cell receptor, TCR) 遺伝子の発現状態を分析することで、特定のクラスのTリンパ球の増減が病態に影響しているかどうかを研究する理由を説明する。この研究への参加は自由で、参加しなくても不利益は受けにくいこと。プライバシーや医療記録は守秘されること。決して、本人や家族・血縁者に損害が及ぶことがないことを制約、成績の公表前であればいつでも参加を取り下げることができる。また、今後この疾患と関わる遺伝子が判明した場合、TCR遺伝子以外の遺伝子を研究することがある事などを記載した同意文書を作成し、同意文書に自署による署名を得る。

B. 研究方法

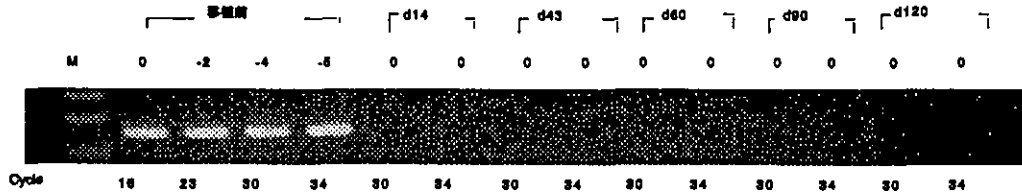
1. 登録症例検体：臨床各病期に患者より末梢血(PB)を採取し、フイコールによる比重遠心法にて単核細胞群(MN)を分離回収し、RNAを抽出した。
2. TCR Vレパートリーの解析：我々の開発した簡略化inverse PCR法をもちいて、サンプルRNAをcDNAとし、さらにligationし、それぞれ2種類のプライマーを用いてPCRを行い、TCRα鎖やβ鎖の未知の割合の可変部(V)領域を均等に増幅。Vを含む一部の遺伝子産物を32P-dCTPでラベルし、20種類のヒトVβ遺伝子やVα遺伝子が敷かれたフィルター上でプロットを行う。濃度を濃度測定器で計測し各Vレパートリーを%で表現した。
3. 高頻度VβレパートリーのJβ遺伝子を13種類のプライマーを用いてV-Jβ PCR解析を行った。

ATLミニ移植後のMRD



UPN14 ATL clone (578)

578UPN14ATL:V β 2-J1.2
 TAC ATC TGC AGT GCT / CAG CAG GTA CCG AGG / GGCTACAC
 D1.1 J β 1.2
 578V β 2J1.2 AatPr: GCC CCT CGG TAC CTG CTG AGC

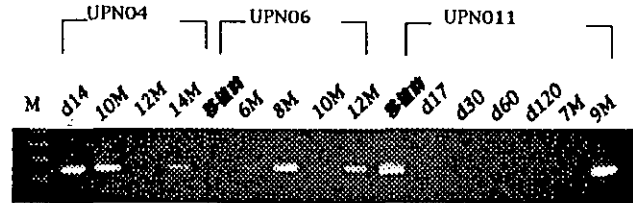


C. 研究結果

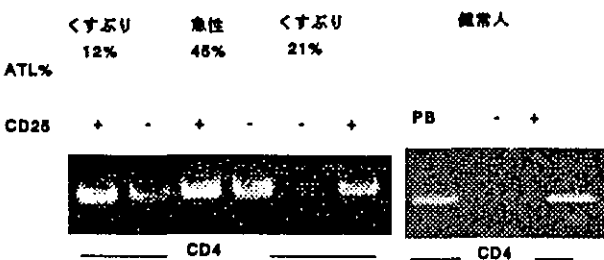
- この方法で登録症例6例を検討し、特異的V β /V α レパートリーを認識できた。
- 一部でV β /V α の一方でATLクローンを認識できた。
- MRDの感度は $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 。
- MRD解析結果は臨床状態（再発・CyA減量・急性GVHD）と相関し、MRD追跡の最良の方法と思われた。
- ミニ移植後の完全寛解でATLクローンは 10^{-4} 以下であった。
- 移植後14日にも数%レベルで腫瘍クローンは存在しその後消失。この事は、明らかにミニ移植療法が免疫療法であるという明らかな所見である。
- 急性GVHD発症後で臨床的にCRとなつた1例を経験した。この時期tax特異的CTLクローンが増加していた。このことはGVL効果が、マイナーHLAに対する反応クローンよりも、tax特異的CTLクローンが働いている可能株が示唆された。これは細胞療法が可能であることを示唆している。
- HTLA-A2患者の急性型、慢性型、くすぶり型の殆どに、診断時、化学療法後にもCTLが存在した。
- MRDとCTLの分子生物学的検討は、ミニ移植や細胞療法などの免疫療法・ワクチン療法の効果判定に重要なモニターとなる。
- 制御性T細胞特異的Foxp3遺伝子の高発現を一部のATLクローンに認めた。

HLA-A2以外のHLA-A24拘束性においても同様HTLV-1特異的CTLのTCRVの分析をする必要がある。今後、多くの登録症例を分析することにより、ミニ移植の臨床効果判定基準を作成できる。同時にmini移植法における免疫療法の重要な情報・ミニ移植療法の改善情報を提供し、今後の治療戦略に大いに役立つものと思われる。

Expression of V β 13 clonotypic CTL (No.4) for tax11-19 restricted with HLA-A2



¹ATLのCD4,CD25分画におけるFoxp3の発現



D. 考察

簡略 Inverse RT-PCR法を用いてATLクローンの特定V β /V α 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MRDの判定に有効であった。急性型・リンパ腫型を対象に移植前PBからATLのTCRVクローンを追跡したが、ATL細胞15%以下の症例では困難であった。できれば、今後診断時の高いATLの%の時に細胞を保存しておくことが必要である。2例のHLA-A2患者において、ATLクローンとHTLAV-1 tax特異的CTLとが追跡できた。移植後14日にも数%レベルでATLクローンが残存し、その後急性GVHD発症やCyA減量によりCTLが特異的にGVL効果を果たすことが示唆された。

E. 結論

ATLクローンのTCRからのMRD追跡法は有用で、臨床状態と相関した。また、MRDとCTLの分子生物学的検討は、ミニ移植などの免疫療法・ワクチン療法の効果判定に重要なモニターとなる。一部のATLクローンは制御性T細胞の特徴を示した。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

- 論文発表
 - Zhang Y, Nagata H, Ikeuchi T, Mukai H, Oyoshi MK, Demachi A, Morio T, Wakiguchi H, Kimura N, (他2名, 9番目). Common cytological and cytogenetic features of Epstein-Barr virus (EBV)-positive natural killer (NK) cells and cell lines derived from patients with nasal T/NK-cell lymphomas, chronic active EBV infection, and hydroa vacciniforme-like eruptions. *Br J Haematology* 121:805-814, 2003.
 - Oyoshi MK, Nagata H, Kimura N, (他10名, 3番目). Preferential expansion of V γ -J γ P/V δ 2-J δ 3 γ δ -T cells in nasal T-cell lymphoma and chronic active Epstein-Barr virus infection. *Am J Pathol* 162 (5):1629-1638, 2003.

3) Demachi A, Nagata H, Morio T, Oyoshi MK, Zhang Y, Tabata N, Kimura N, (他2名, 7番目).

Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-positive NK cells isolated from hydroa vacciniforme-like eruptions. *Microbiol Immunol* 47(7):543-552, 2003.

4) Ishii E, Yasukawa M, Kimura N, Yamamoto K, Imashuku S. Current review on the pathogenesis of primary hemophagocytic lymphohistiocytosis.

Recent Res. Devel. Haematol. 1:13-25, 2003.

5) 特集II. 血球貪食症候群：遺伝性（家族性）血球貪食症候群の異質性. 石井栄一、木村暢宏、他2名。炎症と免疫 11巻3号：296-301, 2003年。

2. 学会発表

1). ランゲルハンス細胞組織球症における病巣内T細胞のオリゴクローナリティー。

木村暢宏、他5名。

第65回日本血液学・会第45回日本臨床血液学会（於大阪）平成15年8月28日-31日

2). LGL増多を呈しMOFで死亡した Perforin遺伝子異常のFHLにおける $\alpha\beta$ -T細胞クローンの解析。

迫正廣、木村暢宏、他4名。

第65回日本血液学・会第45回日本臨床血液学会（於大阪）平成15年8月28日-31日

3). 成人T細胞性白血病(ATL)に対する骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植術の検討。

岡村 純、宇都宮 興、田野崎 隆二、中村 研、鷺池直邦、園田俊郎、神奈木真理、朝長万左男、原田実根、木村暢宏、他6名。

第65回日本血液学・会第45回日本臨床血液学会（於大阪）平成15年8月28日-31日

4). Rituximab投与後に細胞障害性T細胞と考えられるCD8陽性大型リンパ球増多を来した非ホジキンリンパ腫の一例。

小川亮介、塚田順一、町田真一郎、東丈裕、岩重淳司、河野一郎、太田貴徳、窪田歩、木村暢宏、田中良哉。

第65回日本血液学・会第45回日本臨床血液学会（於大阪）平成15年8月28日-31日

5) $\alpha\beta$ -T細胞腫瘍のMRDの検討：とくにATLについて。

木村暢宏、他6名。第62回日本癌学会総会（於名古屋）平成15年9月25日-27日

6) 四倍体の異常核型を有する縦隔原発lymphoblastic lymphoma細胞株の樹立と解析。

一瀬一郎、木村暢宏、他2名。第62回日本癌学会総会（於名古屋）平成15年9月25日-27日

7) Clonality analysis of lesional $\alpha\beta$ T-cells in patients with langerhans cell histiocytosis(LCH).

Sako M, Kimura N, et 4 persons. The 19 annual meeting of the histiocyte society. (Philadelphia, USA, Sep 10-12, 2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記なし。
2. 実用新案登録
特記なし。
3. その他
特記なし。

がん克服戦略

「成人T細胞性白血病(ATL)への同種末梢血幹細胞による骨髓非破壊的移植法の検討」

分担研究報告書

分担研究者 原田 実根

九州大学大学院医学研究院・臓器機能医学部門内科学講座・病態修復内科学分野 教授

研究要旨 現在までの研究で、ATLに対する同種造血幹細胞移植は強い抗腫瘍効果を持つことが明らかになってきた。しかし、移植例のみの解析ではバイアスの存在を否定できない。そのため、ATL患者を、HLA適合血縁ドナーの有無でgenetical randomizationを行い、化学療法群と同種洞穴幹細胞移植群に分け、その成績を前方視的に検討することで、同種造血幹細胞移植のATL治療における位置付けを明らかにする臨床研究を計画している。

A. 研究目的

成人T細胞性白血病(ATL)は、ある程度化学療法に感受性を示すが(化学療法による完全寛解率は約40%)、早期に治療抵抗性となり予後は極めて不良である(4年生存率は約15%、生存期間中央値は約6ヶ月)。しかし、最近本邦および欧米において少数ではあるが進行期のATLに同種造血幹細胞移植(HSCT)が試みられ一部の症例では長期に亘る血液学的寛解が維持されている。本研究では、同種造血幹細胞移植のATL治療における位置付けを明らかにする。

B. 研究方法

最近本邦および欧米において少数ではあるが進行期のATLに同種造血幹細胞移植(HSCT)が試みられ一部の症例では長期に亘る血液学的寛解が維持されている(2年生存率は約50%、生存期間中央値は約18ヶ月)。九大一内科を中心とした福岡BMTグループにおけるfTBI+VP-16+Cyを中心とした前処置を行った十数例のHSCTの成績も同様の効果を認めている(1年生存率は約50%、生存期間中央値は約10ヶ月)。これらの成績をふまえて、同種造血幹細胞移植の有効性を明らかにするための臨床研究プロトコルを作成した。さらにこの研究を計画中に、岡村班のATLミニ移植の成績から、ATLのgraft versus leukemia(GVL)効果に対する高い感受性が示唆され、さらに同種移植による抗ATL効果が期待される。

C. 研究結果

(1)ATLに対する同種造血幹細胞移植の有効性をより多数例の前向き研究で検証すること、(2)fTBI+VP-16+Cyによる前処置の有効性と安全性とを確認すること、を目的としたプロトコルを提唱し、

- 急性型およびリンパ腫型のATL発症早期から同種造血幹細胞移植を組み込んだ前向きの治療プロトコルを行う
- HLA一致もしくは一座不一致血縁ドナーの有無で、genetical randomizationを行い、同

種造血幹細胞移植の有効性を検証する。

- 主要評価項目(primary endpoint)は、3年無病生存率で、ドナー有り、ドナー無しの間で比較する。
- 付随研究として、HTLV-1 DNAを定量的PCRでフォローし、その治療経過との相関を検討する。

このプロトコルを作成したが、その後、ミニ移植の有用性、臍帯血移植の有用性などの報告があり、現在、移植前治療の再検討、臍帯血移植の導入などを検討している。

D. 考察

現在まで、ATLに対する造血幹細胞移植の前向き研究の報告はなく、この研究の結果は、ATLの治療戦略としての、造血幹細胞移植の位置付けを明らかにするため、極めて重要である。移植後に、HTLV-1を定量的PCRでフォローすることで、移植後のGVL効果を測定する予定である。さらに移植後のHTLV-1ウイルス量を測定することで、同種移植による抗ウイルス作用を評価することができる。

E. 結論

ATLに対する同種造血幹細胞移植を組み込んだ前向きの臨床試験プロトコルを作成した。極めて難治性であるATLに対する同種造血幹細胞移植の有用性を明らかにするこのプロトコルの臨床的な意義は大きい。

ATLは、九州に多くみられる疾患であり、この臨床プロトコルは九州地区を主体とした多施設共同研究となる予定であり、現在、参加施設を調整している。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文作成中

F. 知的財産権の出願・登録状況

予定なし

成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)への同種造血幹細胞療法後の
HTLV-I プロウイルス量並びに微小残存病変についての検討

研究分担者 朝長万左男

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科附属原爆後障害医療研究施設
分子医療部門分子治療研究分野

A 研究目的

ATL に対する同種造血幹細胞移植療法(Allo-HSCT)後の HTLV-I プロウイルス量並びに微小残存病変を測定することで、Allo-HSCT の治療効果について検討する。

B 研究方法

当科並びに関連施設において Allo-HSCT を受けた ATL 13 例において、移植後の末梢血単核球を用いて HTLV-I プロウイルス量を測定した。プロウイルス量の定量にはロッシュ社の RightCycler によるリアルタイム PCR 法を用いた。また、1 例では腫瘍細胞の持つ T 細胞受容体 γ 鎖 N 領域の特異的配列を指標として微小残存病変の検討を行った。

C 研究結果

1) 対象症例

対象となったのは男性 8 名、女性 5 名の合計 13 名で、年齢は 30 から 63 才。年齢中央値は 48 才であった。ATL の病型では急性型が 10 例、リンパ腫型が 3 例で、10 例が骨髄破壊的移植を、3 例が骨髄非破壊的移植を受けていた。非血縁者間移植は 2 例であり、血縁者間移植を受けた 11 例のうち 3 例のドナーが HTLV-I キャリアであった。

2) 移植成績

Grade III & IV の acute GVHD が 2 例で、再発が 4 例で見られた。死亡例は 5 例あり、GVHD 関連死亡、原病死がそれぞれ 2 例ずつ、感染症死が 1 例であった。全例の 3 年 Overall survival は 58.3%、relapse free survival は 37.5% であった。

3) 移植後のプロウイルス量の変化

RightCycler を用いたプロウイルス量定量の感

度は 2×10^4 であった (ウイルス陽性細胞を 1/5000 細胞まで定量可能)。移植後のプロウイルス量は骨髄破壊的移植を受けた例では一旦測定感度以下に低下する例が多かったが、非キャリアドナーから移植を受け 2 年以上再発なく経過した 2 例でいずれもプロウイルスは測定可能レベルとなっていた。1 例では慢性 GVHD 発症に伴い末梢血中のプロウイルス量減少が観察された。再発直前に複数回測定できていた 2 例のうち 1 例では再発 2 週間前にプロウイルスが測定可能となったが、その直前の測定では感度以下であった。また、もう 1 例でも再発 1 ヶ月前の測定では感度以下となっていた。

移植後 6 年以上無病生存を継続している例で、末梢血プロウイルスが 10^3 レベルで存在していた。本例では対象に腫瘍細胞の持つ T 細胞受容体 γ 鎖 N 領域の特異的配列を決定できた。今後この配列を用いた微小残存病変検出を実施する予定である。

骨髄非破壊的移植を受けた 3 例のうち 6 ヶ月以上生存した 2 例では測定感度以下がそれぞれ 6 ヶ月、1 年以上持続している。

D 考察

ATL に対する Allo-HSCT の効果については様々な報告があるが、いずれも一定の割合で長期無病生存が見られている。化学療法による長期寛解が得られにくい ATL において Allo-HSCT がどのような機序で長期寛解を付与しているのかは臨床的に重要な検討課題である。今回は、移植後の寛解状態を解析する目的で移植後の HTLV-I プロウイルス量を検討した。

キャリアドナーから移植を受けた 2 例では、移植後もプロウイルス陽性が持続していたが、