

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金  
がん臨床研究事業

成人 T 細胞白血病(ATL)をモデルとしたウイルス感染関連がんに対する革新的治療法の開発

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡村 純

平成 17(2005)年 4 月

## 別紙 2

### 目 次

#### I. 総括研究報告

成人 T 細胞白血病(ATL)をモデルとしたウイルス感染関連がんに対する革新的治療法の開発 —成人 T 細胞白血病(ATL)に対するミニ移植療法—

岡村 純 …………… 1

#### II. 分担研究報告

1. 成人 T 細胞白血病をモデルとしたウイルス感染に関連したがんに対する革新的治療法の開発

神奈木真理 …………… 4

2. 成人 T 細胞白血病の分子生物学的解析に関する研究

松岡 雅雄 …………… 7

3. ATL に対する骨髄非破壊的移植療法の実施

原田 実根 …………… 9

4. 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 プロウイルス陽性細胞の検討

朝長万左男 …………… 12

5. 免疫療法における成人 T 細胞白血病クローンとウイルス特異的 CTL クローンおよび制御性 T 細胞の研究

木村 暢宏 …………… 17

6. ATL に対する同種造血幹細胞移植の成績と移植後の HTLV- I プロウイルス動態

宇都宮 與 …………… 20

7. 成人 T 細胞白血病(ATL)に対する臍帯血ミニ移植

谷口 修一 …………… 23

8. ATL に対する骨髄非破壊的移植療法および樹状細胞療法の検討

田野崎隆二 …………… 26

9. ATL に対する骨髄非破壊的移植療法の実施

増田 昌人 …………… 31

10. 成人 T 細胞白血病(ATL)患者に対する骨髄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 …………… 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 39

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

研究要旨 高年層 ATL を対象に末梢血幹細胞を使用したミニ移植術を試みた。その結果、本療法は従来型の骨髄破壊的な移植術と比較して、治療関連毒性が明らかに軽度で、50 才以上の高年齢層 ATL に対して十分に実施可能であった。移植後に HTLV- I 特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導され、半数以上の患者では体内の HTLV- I ウィルスが消失することを証明した。平成 15 年度に本プロジェクトの第 2 期臨床試験(ATL-NST-2)を開始したが、新規研究班承認後（16 年度）の平成 17 年 3 月までに第 2 段階まで進行し、（予定 16 症例中）10 例の移植を完了、第 1 期試験と同様の安全性と効果を確認しつつある。本年度は、第 3 期臨床試験（第 2 相試験）のプロトコールコンセプトを作成した。臨床試験と平行して免疫学的、分子生物学的検討を行った。

### A. 研究目的

ATL は HTLV- I の感染を契機として高齢者に発症する極めて予後不良の疾患である。最近、主に若年層 ATL に対して同種骨髄移植の有効性が示されているが、従来型の移植では、移植関連毒性が強いため高年齢層に多い ATL 患者の大半は移植対象とはならない。そこで、本研究では、ATL へ対する免疫機序を応用した治療関連毒性が軽度なミニ移植療法の開発とその確立を目指し、さらに、ATL をモデルとした難治性ウイルス疾患に対する新規治療体系の開発を目指している。

### B. 研究方法

#### 1) ATL に対するミニ移植療法の実施

(1-1) ミニ移植後の長期生存例の追跡：第 1 期臨床試験（2002 年 12 月終了）における 5 例の臨床経過および HTLV-I 動態を解析した。

(1-2) 第 2 期臨床試験（ATL-NST-2）：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)を作成して、2003 年 6 月から登録を開始した。フルダラビン

（30mg/m<sup>2</sup>, 6 日間）、ブスルファン（4mg/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ている。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。また、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 日目からアフレーシスを行って末梢血幹細胞を採取した。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 ウィ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 ウィルスゲノム動態）、生存率、無病生存率などである。

(1-3) 第 3 期プロトコール案の作成（臨床第 2 相、2005 年開始予定）：前処置は第 2 期試験と同一としたプロトコールコンセプトを検討し、最終案を作成中である。主要評価項目は、本移植術による奏効率とし、予定症例数は 30 例である。プロトコール完成後は、各施設（16 施設が参加予定）の倫理委員会に申請し、承認後に登録を開始する。

(1-4) 臍帯血を利用したミニ移植療法の検討：血縁間ドナーの確保が困難な場合が多いことから、入手の迅速性と前処置軽減による移植耐用性の向上を考慮して、16 年度には臍帯血を利用したミニ移植の可能性を検討した。

#### 2) 移植療法に伴う基礎的解析

(2-1) HTLV-I プロウィルス量動態に関する研究：末梢血単核細胞(PBMC)から DNA を抽出し、HTLV-1 pX および  $\beta$ -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 HTLV-1 プロウィルス量を測定した。

(2-2) ミニ移植療法後の造血細胞動態に関する研究

Short tandem repeat polymorphism(STR) を利用した蛍光 PCR プライマーによる混合キメラの定量法を用いて、ATL に対する同種造血幹細胞移植におけるドナー・レシピエントのキメリズム動態を検討した。末梢血あるいは骨髄血からゲノム DNA を抽出し、各 STR polymorphism 領域（9 領域）を AmpF/STR Profiler PCR Amplification Kit (PE Applied Biosystems) を用いて PCR 法により増幅し、PCR 産物の蛍光強度を ABI310 自動シーケンサーで測定した。PCR 産物の蛍光強度の比率からドナー・レシピエントキメラ比率を算出した。

(2-3) T 細胞免疫応答の解析：ATL 患者由来の末梢血単核球分画を分離し、HTLV-I Tax およ

び Gag 蛋白に対するモノクロナル抗体で染色した。この他、CD4, CD8, CD25, CD80, CD86, CD40, CD40L, OX40, OX40L, MHC-I, -II に対するモノクロナル抗体で細胞表面を染色し FACS 解析した。また、未培養の ATL 細胞を染色した後、残りの細胞を 10% FCS RPMI1640 培地で 1 日培養し、同様に染色した。ウイルス抗原発現の認められた例ではさらに 3 日目まで培養した。さらに、すでに樹立されている Tax 特異的 CTL と、未培養あるいは培養 ATL 細胞をホルマリン固定したものを共培養し IFNg 産生を ELSA で測定した (CTL アッセイ)。未培養あるいは培養 ATL 細胞をホルマリン固定し、正常ラットの皮下に 2 週おきに 2 回接種し、1 ヶ月後に T 細胞応答を調べた。

(2-4) HTLV-I の分子生物学的解析：Long PCR、サザン法を用いて ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスのタイプ (完全型、1 型欠損型、2 型欠損型) を決定した。5'側 LTR-gag 部分、pX 部分を Real-time PCR で定量しキャリアでの 2 型欠損型プロウイルスを推測した。さらに ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスの組み込み部位を inverse PCR で決定した後、宿主ゲノム、プロウイルス内部のプライマーで PCR を行い欠失部分の塩基配列を決定した。

(2-5) 移植前後の T 細胞抗原受容体 (TCR) V レポートリーおよび微小残存白血病 (MRD) の解析：末梢血単核細胞群 (PBMC) を分離後 RNA を抽出した。その後、我々が開発した簡略化 inverse PCR 法をもちいて、サンプル RNA を cDNA とし、PCR により増幅。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 Vb 遺伝子や Va 遺伝子濃度を濃度測定器で計測し各 V レポートリーを % で表現した。高頻度 Vb レポートリーの Jb 遺伝子を 13 種類のプライマーを用いて V-Jb PCR 解析を行った。SSCP 法により特定 V fragment のバンドの有無を検討し、TCR の direct sequencing により CDR 3 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。希釈法による半定量的検討で MRD を算定した。

#### (倫理面での配慮)

各施設における倫理委員会での承認後、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。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。

### C. 研究結果

#### 1) ATL に対するミニ移植療法の実施：

(1-1) 長期生存例の追跡：第 1 期臨床試験に登録後に長期生存している 5 例では、移植後 3 年目以降新たなイベントは発生せず、完全ドナー型キメラが維持され、HTLV-I プロウイルス量は低値のまま推移した。

(1-2) 第 2 期臨床試験：目標 16 症例のうち 10 例が移植を終了した。早期移植関連合併症が 1 例に発生したが、第 1 期臨床試験と同様、生着や前処置関連毒性には問題なく経過している。平成 17 年度には終了の予定である。

(1-3) 第 3 期臨床試験案の作成 (臨床第 2 相)：前処置は第 2 期試験と同一としたプロトコールコンセプトを作成した。主要評価項目は、本移植術による奏功率とし、予定症例数は 30 例。

(1-4) ATL 患者における臍帯血幹細胞：生着はスムーズで、17 例中 14 例に治療後一時的な完全寛解が得られ、1 年全生存率は 23.9% であった。

#### 2) 移植療法に伴う基礎的解析

(2-1) HTLV-I プロウイルス量動態に関する研究：第 1,2 期試験の過半数例で、プロウイルス量が移植後 1~3 ヶ月で測定感度以下に低下し、本法による抗ウイルス効果が示唆された。

(2-2) ミニ移植療法後の造血細胞動態に関する研究：STR による混合キメラ解析により全例でドナー・レシピエントの識別が可能で、キメラ比率は生着の度合いを反映した。

(2-3) T 細胞免疫応答の解析：本移植後に、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。ATL 細胞の HTLV-I 抗原発現：19 例中 9 例で、1 日培養した末梢血 ATL 細胞に Tax および Gag 蛋白の発現が認められた。Tax 発現誘導のあった ATL 細胞では、CD80, CD86, OX40 等の costimulatory 分子の発現も顕著に誘導された。Tax 発現誘導の認められなかった ATL 細胞では、costimulatory 分子の発現誘導は乏しかったが、未培養でも CD86 や OX40 を発現する例が散見された。未培養あるいは培養した ATL 細胞をホルマリン固定して接種した正常ラットの脾臓 T 細胞を分離し、Tax 特異的 T 細胞応答を調べた。その結果、未培養 ATL 細胞で免疫したラット T 細胞は、Tax 発現細胞と HTLV-I 感染細胞に対してのみ高い IFNg 産生を示し、陰性細胞には反応しなかった。その IFNg 産生パターンとレベルは、培養細胞を接種したラットと同等であった。従って、これらのラットには、Tax 特異的応答が誘導されたと考えられた。

(2-4) HTLV-I の分子生物学的解析：ATL における HTLV-I の欠損型プロウイルスを解析した。5'側 long terminal repeat を欠く 2 型欠損型プロウイルスはキャリアに比べ ATL 症例で高頻度であり、ゲノムへの組み込み前に形成されている

ことが示された。

(2-5) : TCR Vレパートリーおよび微小残存白血病(MRD)の解析 : ab-T 細胞腫瘍の MRD を 10<sup>-4</sup>~10<sup>-6</sup> で認識できる半定量化システムを確立し、登録症例の ATL クローンの TCR Vb/Va 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 追跡を行ったところ、臨床各病期の病態とよく相関した。

#### D. 考察

50~70 才の ATL 患者を対象としたこれまでの研究結果から、ATL に対するミニ移植療法の安全性が確認されつつある。第 1 期試験において、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てきた。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。臍帯血ミニ移植は迅速な移植コーディネートが可能となるため、今回谷口班員らが検討した方法により生着に関しては問題がないことが証明されつつある。基礎的研究では、ATL 症例の約半数で ATL 細胞が Tax 発現能を保持していることが分かった。さらに、末梢血内で Tax 発現は抑制されており、その発現量は非常に低いが、生体内では T 細胞応答を惹起できるレベルであると考えられた。HTLV-I の分子生物学的解析は、ウイルスの複製機構、発がん機構を考える上で有益な情報を提供するものと考えられた。また、ATL クローンの TCR を利用した MRD 追跡法は有用であり、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と考えられた。

#### E. 結論

本研究において行う臨床試験とそれに付随する基礎的研究の成果は、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応用が可能となる可能性がある。また、ウイルスの薬剤耐性や薬剤の副作用などにより治療効果が得られない場合にも有効となる可能性も存在する。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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 for the ATL-RIST study group. Allogeneic stem cell

transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood, 2005 (in press, prepublished online January 21)

2. Fukushima F, Miyazaki Y, Honda S, Kawano F, Moriuchi Y, Masuda M, Tanosaki R, Atae Utsunomiya A, Uike N, Yoshida S, Okamura J, Tomonaga M. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation provides sustained long-term survival for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. Leukemia, 2005 (in press)
3. Kurihara K, Harashima N, Hanabuchi S, Masuda M, Utsunomiya A, Tanosaki R, Tomonaga M, Ohashi T, Hasegawa A, Masuda T, Okamura J, Tanaka Y, Kannagi M. Potential immunogenicity of adult T cell leukemia cells in vivo. Int J Cancer 114:257-67, 2005
4. Ishikawa F, Yasukawa M, Yoshida S, Nakamura KI, Nagatoshi Y, Kanemaru T, Shimoda K, Shimoda S, Miyamoto T, Okamura J, Shultz LD, Harada M. Human cord blood- and bone marrow-derived CD34+ cells regenerate gastrointestinal epithelial cells. FASEB J 18:1958-60, 2005
5. Harashima N, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Hanabuchi S, Masuda M, Ohashi T, Fukui F, Hasegawa A, Masuda T, Takaue Y, Okamura J, Kannagi M. Graft-versus- human Tax response in adult T cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. Cancer Res 64:391-9, 2004
6. Nagatoshi Y, Kawano Y, Okamura J. Comparison of the outcomes of allogeneic bone marrow transplantation from partially mismatched related donors, matched sibling donors and matched unrelated donors in Japanese pediatric patients: A single center result. Pediatr Transplant 8: 260-6, 2004
7. Nagatoshi Y, Nagayama J, Kawano Y, Okamura J. Treatment of isolated central nervous system relapse in high-risk lymphoid malignancy with allogeneic bone marrow transplantation and extended intrathecal therapy. Br J Haematol 125: 766-768, 2004

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

成人 T 細胞白血病をモデルとしたウイルス感染に関連したがんに対する革新的治療法の開発

分担研究者：神奈木真理 東京医科歯科大学 教授

## 研究要旨

ATL 患者への骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植では完全寛解例が経験されている。移植後の ATL 患者において HTLV-I Tax 特異的 CTL の著しい活性化が認められていることから、Graft-versus-Host 応答とともに Tax 特異的免疫応答も寛解とその維持に何らかの役割をになっている可能性が示唆されている。動物モデルでは Tax を標的とするワクチンが HTLV-I 腫瘍に有効である。しかし、ヒト ATL 細胞は生体内で HTLV-I 抗原をほとんど発現していないとされており、Tax 特異的 CTL の抗 ATL 効果については疑問が残る。この点を解明するため、本年度は、ATL 細胞のウイルス抗原発現状態について解析した。ATL 患者の末梢血 ATL 細胞を FACS で解析したところ、未培養ではウイルス抗原は検出できなかったが、約半数の症例で 1 日培養した末梢血 ATL 細胞に Tax および Gag 蛋白の発現が認められた。これらの細胞は Tax 発現とともに CD80, CD86, OX40 等の co-stimulatory 分子を発現したが、Tax 発現以前にこれらの抗原を発現する例もあった。Tax 特異的 CTL 株は培養後の ATL 細胞には反応したが未培養の細胞には反応しなかった。しかし、未培養の ATL 細胞をホルマリン固定して正常ラットに接種したところ、このラットに Tax 特異的 T 細胞応答が誘導された。これらの観察から、約半数の ATL 症例では ATL 細胞は Tax 発現能を保持していること、末梢血内で Tax 発現は抑制されているが、その発現量は FACS や CTL アッセイ等の *in vitro* の方法では検出感度以下だが、生体内では T 細胞応答を惹起できるレベルであると考えられた。

## A. 研究目的

我々は、これまでに造血幹細胞移植後の (ATL) 患者で HTLV-I Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL) 応答が活性化している例があることを報告した。HTLV-I 感染腫瘍の動物モデルでは Tax 特異的 CTL が抗腫瘍効果を持つことから、Tax を標的とする抗腫瘍免疫療法の可能性が示唆される。しかし、感染後長期を経て発症してくる ATL 細胞には、遺伝子変異が多く見つかっており、Tax 発現不可能となった場合は免疫治療の標的となり得ないことが指摘されている。本年度は、ATL 細胞が Tax 発現能を保持している ATL 症例の割合、およびその発現レベルを検討した。

## B. 研究方法

1. FACS 解析：ATL 患者由来の末梢血単核球分画 (PBMC) を分離し、メタノールあるいはサポニンを用いて膜透過処理を

行った後、HTLV-I Tax および Gag 蛋白に対するモノクロナル抗体で染色した (琉球大学田中勇悦博士より供与)。この他、CD4, CD8, CD25, CD80, CD86, CD40, CD40L, OX40, OX40L, MHC-I, -II に対するモノクロナル抗体で細胞表面を染色した。一部の実験では、細胞内ウイルス抗原と表面抗原の二重染色を行い FACS で解析した。

2. ATL 細胞の培養：未培養の ATL 細胞を染色した後、残りの細胞を 10% FCS RPMI1640 培地で 1 日培養し、同様に染色した。ウイルス抗原発現の認められた例ではさらに 3 日目まで培養した。
3. CTL アッセイ：すでに樹立されている Tax 特異的 CTL と、未培養あるいは培養 ATL 細胞をホルマリン固定したものを共培養し IFN $\gamma$  産生を ELSA で測定した。
4. ラットへの ATL 細胞接種：未培養ある

いは培養 ATL 細胞をホルマリン固定し、正常ラットの皮下に 2 週おきに 2 回接種し、1 ヶ月後に T 細胞応答を調べた。

【(倫理面への配慮)

検体供与にあたっては、インフォームドコンセントが得られている。検体は数字化された ID をもって取り扱う。

### C. 研究結果

1. ATL 細胞の HTLV-I 抗原発現：19 例中 9 例で、1 日培養した末梢血 ATL 細胞に Tax および Gag 蛋白の発現が認められた。内訳は、急性 ATL 4 例中 3 例、慢性 ATL 15 例中 6 例である。Tax 発現は 1 日で最大に達したが、Gag 発現は 3 日目の方が高く、発現の順序は、先ず調節蛋白 Tax、次いで構造蛋白 Gag であると思われた。これは、HTLV-I 遺伝子発現機序と矛盾しない。未培養では、どの例でもウイルス抗原は検出できなかった。
2. ATL 細胞の costimulatory 分子発現：Tax 発現誘導のあった ATL 細胞では、CD80, CD86, OX40 等の costimulatory 分子の発現も顕著に誘導された。CD4, MHC-I, -II の発現は陽性だが Tax 誘導による変化は少なく、CD25 は培養前から陽性だが Tax 誘導後さらに増強した。Tax 発現誘導の認められなかった ATL 細胞では、costimulatory 分子の発現誘導は乏しかったが、未培養でも CD86 や OX40 を発現する例が散見された。
3. ATL 細胞の CTL 感受性：Tax 特異的 CTL 株は、培養後の ATL 細胞には反応し IFN $\gamma$  を産生したが、未培養の細胞に対しては検出できるレベルの IFN $\gamma$  産生を示さなかった。
4. ATL 細胞の生体内免疫原性：未培養あるいは培養した ATL 細胞をホルマリン固定して接種した正常ラットの脾臓 T 細胞を分離し、Tax 特異的 T 細胞応答を調べた。ATL 細胞はヒト (異種) であるため、免疫応答検出には同系ラット由来の標的細胞を用いた。その結果、未培養 ATL

細胞で免疫したラット T 細胞は、Tax 発現細胞と HTLV-I 感染細胞に対してのみ高い IFN $\gamma$  産生を示し、陰性細胞には反応しなかった。その IFN $\gamma$  産生パターンとレベルは、培養細胞を接種したラットと同等であった。従って、これらのラットには、Tax 特異的応答が誘導されたと考えられた。

### D. 考察

ATL 症例の約半数では ATL 細胞が Tax 発現能を保持していることが分かった。さらに、末梢血内で Tax 発現は抑制されているが、その発現量は非常に低いが、生体内では T 細胞応答を惹起できるレベルであると考えられた。

末梢血の感染細胞が、数時間の培養後 HTLV-I 抗原を発現する現象は ATL に限らず、CTL 応答の明らかな HAM/TSP 患者や無症候キャリアにも認められる。末梢血における ATL 細胞の抗原発現レベルはただちに CTL に認識されるレベルではないことは、これが HTLV-I 持続感染する機序の一つである可能性を示唆している。

しかし同時に、生体内の他の組織では末梢血より高いレベルで発現している可能性も否定できず、Tax 特異的 CTL の効果は依然として残されている。これらの点に関して今後さらに検討したい。

### E. 結論

半数の ATL 症例では ATL 細胞は Tax 発現能を保持している。これらの ATL 細胞の Tax 発現は末梢血内で抑制されているが、そのレベルは *in vitro* アッセイでは検出感度以下だが、生体内では T 細胞応答を惹起できるレベルである

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

I. 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. Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res.* 64: 391-399, 2004
2. M. Nomura, T. Ohashi, K. Nishikawa, H. Nishituji, K. Kurihara, A. Hasegawa, R. Furuta, J. Fujisawa, Y. Tanaka, S. Hanabuchi, N. Harashima, T. Masuda, and M. Kannagi. Repression of Tax expression is associated both with resistance of human T-cell leukemia virus type 1-infected T cells to killing by Tax-specific cytotoxic T lymphocytes and with impaired tumorigenicity in a rat model. *J. Virol.* 78: 3827-3836, 2004.
  3. M. Kannagi, T. Ohashi, N. Harashima, S. Hanabuchi, A. Hasegawa. Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection. *Trends in Microbiology*, 12: 346-352, 2004.
  4. M. Kannagi, N. Harashima, K. Kurihara, A. Utsunomiya, R. Tanosaki, and M. Masuda. Future prophylaxis and immunotherapy for adult T cell leukemia. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 4: 369-376, 2004.
  5. K. Kurihara, N. Harashima, S. Hanabuchi, M. Masuda, A. Utsunomiya, R. Tanosaki, M. Tomonaga, T. Ohashi, A. Hasegawa, T. Masuda, J. Okamura, Y. Tanaka, and M. Kannagi. Potential immunogenicity of Adult T cell Leukemia cells in vivo. *Int. J. Cancer*, 114: 257-267, 2005.

## 2. 学会発表

### (国際学会)

1. M. Kannagi. Immunological approaches for prophylaxis and therapy of adult T cell leukemia: Experimental model toward clinical application. 6<sup>th</sup> AACR/JCA conference, Invited speaker. 2004 Jan., Hawaii.

### (国内学会)

1. 神奈木真理. 成人T細胞白血病/リンパ腫におけるT細胞応答. リンパ系樹状細胞系3学会合同学術会議京都大会、教育講演、2004年7月. 京都
2. 原嶋奈々江、栗原清、清水由紀子、神奈木真理. 同種造血幹細胞移植後ATL患者由来HTLV-I特異的CTLが認識する新しいTaxエピトープの同定. 第34回日本免疫学会、札幌、2004年12月.
3. 小森一哉、長谷川温彦、栗原清、原嶋奈々江、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の解析. 第34回日本免疫学会、札幌、2004年12月.
4. 栗原清、原嶋奈々江、大橋貴、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-I特異的細胞性免疫測定法の確立. 第34回日本免疫学会、札幌、2004年12月.
5. 小森一哉、長谷川温彦、栗原清、原嶋奈々江、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機序. 第52回日本ウイルス学会、横浜、2004年11月.
6. 原嶋奈々江、栗原清、神奈木真理. 同種造血幹細胞移植後ATL患者におけるCTL応答. 第63回日本癌学会シンポジウム、福岡、2004年9月.
7. 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. 同種造血幹細胞移植後ATL症例におけるHTLV-I特異的CTL応答. 第8回がん分子標的治療研究会、鹿児島、2004年5月.



厚生労働科学研究費補助金 (がん臨床研究事業)  
分担研究報告書

成人 T 細胞白血病の分子生物学的解析に関する研究

分担研究者：松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) におけるヒト T 細胞白血病ウイルス (human T-cell leukemia virus type I: HTLV-I) の欠損型プロウイルスを解析した。5'側 long terminal repeat を欠く 2 型欠損型プロウイルスはキャリアに比べ ATL 症例で高頻度であり、Tax に対する宿主免疫機構により Tax を発現していない細胞が選択されてきたことが推測された。また 2 型欠損型プロウイルスがゲノムへの組み込み前に形成されていることが示され、ウイルスの複製機構、発がん機構を考える上で有益な情報を提供するものと考えられた。

A. 研究目的

HTLV-I によってコードされる遺伝子の内、tax は腫瘍化に中心的な役割を果たすと考えられているが、細胞傷害性 T リンパ球の主要な標的抗原であるため ATL 細胞では、その発現が抑制ないしは失われていることが多い。この機序には 1) tax 遺伝子の遺伝的変化 (変異・欠失)、2) 5'側 long terminal repeat (LTR) の DNA メチル化による転写抑制、3) 5'側 LTR の欠失 が存在する。この内、5'側 LTR の欠失を有するプロウイルスは 2 型欠損型プロウイルスと呼ばれ、HTLV-I に特有であると考えられており ATL 細胞で高頻度に認められる。これは生体内で tax 遺伝子の発現を抑制することによって宿主免疫機構から逃避するためと推測される。今年度は 2 型欠損型プロウイルス生成の機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) HTLV-I プロウイルスタイピング：Long PCR、サザン法を用いて ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスのタイプ (完全型、1 型欠損型、2 型欠損型) を決定した。
- 2) HTLV-I キャリアにおける 2 型欠損型プロウイルスの頻度：5'側 LTR-gag 部分、pX 部分を Real-time PCR で定量しキャリアでの 2 型欠損型プロウイルスを推測した。
- 3) 2 型欠損型プロウイルスの欠失部位の決定：ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスの組み込み部位を inverse PCR で決定した後、宿主ゲノム、プロウイルス内部のプライマーで PCR を行い欠失部分の塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は京都大学医学研究科「医の倫理委員会」の承認を得て行っている。検体は非連結匿名化を行い、解析している。

C. 研究結果

- 1) ATL 症例における 2 型欠損型プロウイルス：ATL 症例 47 例における HTLV-I プロウイルスを long PCR、サザン法により、解析したところ、完全型 (複数のプロウイルスが組み込まれている症例も含む) が 26 例 (55%)、2 型欠損型 7 例 (15%)、2 型欠損型 (30%) であった。
- 2) HTLV-I キャリア、ATL 症例における 2 型プロウイルス：キャリア、ATL 患者における 2 型欠損型プロウイルスの頻度を比較することにより 2 型欠損型プロウイルスを有する細胞が腫瘍化の過程で選択されているかを確認した。キャリアでは 5'-LTR-gag 領域と pX 領域での定量結果が一致していた。すなわち 5'-LTR-gag 領域に欠損を有する 2 型プロウイルスは非常に少ないと結論できる。一方、ATL では 2 型欠損型プロウイルスは 30%存在しておりキャリアに比べ腫瘍細胞で増加していることが明らかになった。
- 3) 2 型欠損型プロウイルスの組み込み部位：inverse PCR で 2 型欠損型プロウイルスのゲノム組み込み部位を同定した。HTLV-I の組み込みの際に LTR の両端にゲノム配列が 6 塩基反復するが、その塩基配列の決定から env, pol 部分に直接、この繰り返し配列が結合しているケースが 2 例見出された。この結果は、2 型欠損型プロウイルスが組み込み前に生成されたことを示している。今後、組み込み前の線状プロウイルスにおいて 2 型欠損型の存在を証明するべく研究を計画している。

D. 考察

HTLV-I がコードするタンパク質の内、Tax はその強力な細胞増殖効果から腫瘍化に中心

的な働きをしていると考えられている。しかし、Tax は細胞傷害性 T リンパ球の主要な標的であり腫瘍化の過程で Tax の発現を抑制する選択圧が働くと考えられる。我々はこのような機構としては 1) tax 遺伝子の変異、2) 5'-LTR の DNA メチル化、3) 5'-LTR の欠失 (2 型欠損型プロウイルス) が存在することを報告した。2 型欠損型プロウイルスはレトロウイルスの中で HTLV-I の特徴的な構造であり、その生成機構としては組み込み後に欠失したと推測されていた。今回の解析結果から 2 型プロウイルスは組み込み前と後、両方の時期に形成されることが示された。これは従来のレトロウイルスの組み込み機構の常識を覆すものであり、今後の解析が必要である。組み込み前のこのような欠損型プロウイルスの形成から以下のような可能性が考えられる。2 型プロウイルスはウイルス遺伝子のプロモーター・エンハンサーである 5'-LTR を欠いており、組み込み後は、細胞側遺伝子のプロモーターをトラップするか、env に存在する内在性プロモーターにより転写が起これと考えられる。しかし、内在性プロモーターは DNA メチル化を受けやすく転写抑制が起これやすいことが予想され Tax の発現抑制が起これやすいという特性があり腫瘍化に遊離に働いていることが考えられる。

キャリアの解析結果から 2 型プロウイルスはキャリアでは殆ど存在しないことが明らかとなった。しかし、腫瘍細胞では 30% と頻度が高く腫瘍に至る段階で 2 型プロウイルスを持った細胞が選択されていることが示された。これは Tax に対する細胞傷害性 T リンパ球など宿主の免疫機構による選択圧のためと考えられる。このような 2 型欠損型プロウイルスを有する ATL 症例に同種骨髄移植が有効か否かは移植療法の ATL に対する有効性で Tax が果たす役割を知る上で有益な情報を提供すると考えられる。

#### E. 結論

この研究はレトロウイルスの複製機構の詳細を明らかにするだけでなく ATL の発がん機構を考える上でも有用な情報を提供することが期待される。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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* 109: 559-567, 2004.

- 2) Yoshida M, Nosaka K, Yasunaga J-I, Morishita K, Nishikata I, Matsuoka M. Aberrant expression of the *MELIS* gene identified in association with hypomethylation in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 103: 2753-2760, 2004.
- 3) Okayama A, Stuver S, Matsuoka M, Ishizaki J, Tanaka G, Kubuki Y, Mueller N, Hsieh C, Tachibana N, Tsubouchi H. The role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 110: 621-625, 2004.
- 4) Satou Y, Nosaka K, Koya Y, Yasunaga J-I, Toyokuni S, Matsuoka M. Proteasome inhibitor, bortezomib, potently inhibits the growth of adult T-cell leukemia cells both *in vivo* and *in vitro*. *Leukemia* 18: 1357-1363, 2004.
- 5) Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Nosaka K, Yoshida M, Satou Y, Sakai T, Mitsuya H, and Matsuoka M. Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 64: 6002-6009, 2004.

#### 2. 学会発表

- 1) Yasunaga J, Taniguchi Y, Nosaka K, Yoshida M, Satou Y, Takai K, Sakai T, Mitsuya H and Matsuoka M. Aberrantly hypermethylated genes in adult T-cell leukemia cells: The implications in the leukemogenesis. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. San Diego, CA. Dec 4-7, 2004.
- 2) 松岡雅雄：シンポジウム「成人 T 細胞白血病発症の分子機構」：第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会、京都、2004 年 9 月 17-19 日
- 3) 安永純一郎、松岡雅雄：シンポジウム「成人 T 細胞白血病発がんの分子機構」：第 63 回日本癌学会総会、福岡、2004 年 9 月 29 日-10 月 1 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

成人T細胞白血病（ATL）をモデルとしたウイルス感染関連がんに対する革新的治療法の開発  
分担研究報告書

「ATLに対する骨髄非破壊的移植療法の実施」

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** 難治性血液腫瘍である ATL 患者で、HLA 一致同胞がいない 55 才以上の患者に対して、骨髄非破壊的な前治療を用いた非血縁骨髄移植を行った。移植前治療は、fludarabine + busulfan + TBI、GVHD 予防は tacrolimus + sMTX である。症例は 63 才女性、急性型の ATL で化学療法により PR となった。HLA<sub>A,B,DRb1</sub> 完全一致の非血縁ドナーより骨髄移植を行い、順調な経過である。今後、症例数を増やし、その安全性、有効性を検討する。

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。ATL 患者の半数以上が九州地方に分布する。ATL 患者の年齢は、25~95 才までに分布し、男女とも 60~70 才の間に患者数のピークがあり、平均年齢は男性 60.6 才、女性 60.1 才である。従来型の造血幹細胞移植の年齢上限は 55 才程度とされる。従って多くの患者は造血幹細胞移植の適応外となる。今回、HLA 一致同胞のいない 55 才~65 才の ATL 患者に対して、非血縁ドナーからの骨髄非破壊的な前治療による同種骨髄移植を行い、その安全性および有効性を検討する。

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)。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。従って、今回、55~65 才の ATL 患者に対する骨髄非破壊的な移植前治療による非血縁骨髄移植の安全性と有効性を検討することとした。

C. 研究結果

移植前治療は、fludarabine 30mg/m<sup>2</sup>x6, busulfan 4mg/kgx2, TBI 4Gy とする。GVHD 予防は、FK506 0.03mg/kg civ + MTX 3mg/m<sup>2</sup> x3 とした。Day5 より G-CSF を併用した。上記プロトコールで、63 才女性急性型 ATL 1ST PR 症例に対して、非血縁骨髄移植を行った。造血の回復は好中球 > 500 day15、血小板 > 5x10<sup>4</sup> day36 と速やかで、RRT も極めて軽微であった。移植後 CR となり、現在外来フォロー中である。今後症例数を蓄積する予定である。

D. 考察

発症年齢の高い ATL 患者では、同胞の年齢も上昇するため適格な血縁ドナーのいる可能性が少なくなる。造血幹細胞ドナーの年齢上限は、一般には 60 才程度と考えられる。従って非血縁骨髄移植の有用性を検討することは、極めて重要である。さらに移植後に、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 ウィ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

55~65 才の ATL 患者に対する骨髄非破壊的な前治療による非血縁骨髄移植を施行し、その安全性と有用性を検討中である。この研究により、より多くの ATL 患者に対して治療的な治療を行えるようになる可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki S, Ohno Y, Taniguchi S, Yoshida T, Hayashi S, Ogawa H, Shimazaki C, Takahashi S, Kasai M, Wake A, Nishimura M, Tokunaga K, Gondo H, Takaue Y, Harada M, Mineishi S, for Japanese group for blood and marrow transplantation: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from two-or three-loci-mismatched related donors in adult Japanese patients with high-risk hematologic malignancies. *Bone Marrow Transplant* 33 : 279-289,2004
  2. Kunisaki Y, Masuko S, Noda M, Inayoshi A, Sanui T, Harada M, Sasazuki T, Fukui Y, : Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor. *Blood* 103 : 3362-3364,2004
  3. Nagafuji K, Aoki K, Henzan H, Kato K, Miyamoto T, Eto T, Nagatoshi Y, Ohba T, Obama K, Gondo H, Harada M : Cidofovir for treating adenoviral hemorrhagic cystitis in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 34:909-914,2004
- 学会発表
1. Harada M : Hematopoietic stem cell transplantation for treatment of acute myelogenous leukemia, solid tumors and autoimmune diseases. 25 Anniversary Seminar of Inje University Medical college, June 2,2004,Busan,Korea
  2. 原田実根 : 骨髄移植療法の近未来、日本内科学会北陸支部第32回生涯教育講演会、2004年6月6日、金沢市
  3. Harada M: Hematopoietic stem cell transplantation for treatment of solid tumors and autoimmune diseases.2<sup>nd</sup> Annual Meeting of Asian Hematology Association, June 26,2004,Beijing, PR China
  4. 長藤宏司、高瀬謙、平安山英穂、宮本敏浩、塚本浩、堀内孝彦、原田実根 : 難治性自己免疫性疾患に対する自己末梢血純化 CD34 陽性細胞移植、第41回日本臨床分子医学会学術集会、2004年7月17日、福岡市
  5. Eto T, Tanimoto, Shimoda K, Yamaguchi T, Okuma T, Mizoguchi H, Omine M, Niho Y, Harada M : Prognostic Factors in Primary Chronic Myelofibrosis in Patients Aged Less Than 70 Years : A Report on 207 Patients with the Description of a Scoring system and Its Validation on 100 Other Patients. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The American society of Hematology. December 4,2004,San Diego, U.S.A
  6. Katagiri T, Shibata S, Furukawa T, Tsukada J, Nakao S, Wakano M, Muranaka E, Harada M : Incompatibilities of HA-1 and CD62L Polymorphic Adhesion Molecule Induce Graft-Versus- Leukemia Effect Rather Than GVHD Resulting in Long-Term Survival in HLA Identical Myeloablative Stem Cell Transplantation. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The American society of Hematology. December 4,2004,San Diego, U.S.A
  7. Yoshimoto G, Nagafuji K, Miyamoto T, Kamimura T, Ohno Y, Taniguchi S, Harada M : FLT3 Mutations in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission Treated with Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The American society of Hematology. December 4,2004,San Diego, U.S.A
  8. Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Yoshie M, Yamamoto M, Takeda K, Matsuda T,

Akira S, Ogawa K, Harada M. : The Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of The American society of Hematology. December 5, 2004, San Diego, U.S.A

下野信行、原田実根 : 同種造血幹細胞移植後の播種性トリコスポン症の 5 例、第 27 回日本造血細胞移植学会総会、2004 年 12 月 17 日、岡山市

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

9. 吉田周郎、石川文彦、下田和哉、原田実根 : ヒト臍帯血細胞によるインスリン産生の再生、第 66 回日本血液学会総会、第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年 9 月 17 日、京都市
10. 張華、石川文彦、吉田周郎、河野徳明、孔圓、深田光敬、下田和哉、大島孝一、安川正貴、原田実根 : 免疫不全マウスを用いたヒト臍帯血由来 T 細胞による異種 GVHD の作成、第 66 回日本血液学会総会、第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年 9 月 17 日、京都市
11. 牟田毅、権藤久司、加藤光次、衛藤徹也、渋谷恒文、上村智彦、林真、長藤宏司、宮本敏浩、福田隆浩、下田和哉、原田実根 : HLA 不一致の同種造血細胞移植後に合併した HHV-6 脳炎の 2 症例、第 66 回日本血液学会総会、第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年 9 月 17 日、京都市
12. 高瀬謙、沼田晃彦、山崎聡、福田隆浩、長藤宏司、下田和哉、原田実根 : 自己末梢血幹細胞移植後の再発に対し同種移植を施行した悪性リンパ腫の 9 例、第 27 回日本造血細胞移植学会総会、2004 年 12 月 17 日、岡山市
13. 福田隆浩、大野祐樹、衛藤徹也、谷本徹也、長藤宏司、青木健一、土持典子、

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 プロウイルス陽性細胞の検討

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 プロウイルス陽性細胞について、プロウイルス量、微小残存病変、並びにその起源を調べ Allo-HSCT の抗 ATL 機序を検討した。

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 22 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、inverse PCR 法を用いて ATL 細胞における HTLV-I 組み込み部位の遺伝子配列を決定し、腫瘍細胞特異的 PCR 反応系を 8 例で確立した。この 8 例では微小残存病変 (Minimal residual disease, MRD) が測定可能であった。

C 研究結果

1) 対象症例

対象となったのは、同種造血幹細胞

移植を受けた急性型又はリンパ腫型 ATLL 患者 22 名で、年齢は 30 から 63 才。年齢中央値は 48 才であった。14 例が骨髄破壊的移植を、8 例が骨髄非破壊的移植を受けていた。非血縁者間移植は 4 例であり、血縁者間移植を受けた 18 例のうち 8 例のドナーが HTLV-I キャリアであった。

2) 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  $2 \times 10^{-4}$  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 4 例でいずれも経過中に末梢血中のプロウイルスは再上昇し測定可能レベルとなっていた。1 例では慢性 GVHD 発症に伴った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 週間前までプロウイルスが測定感度以下であった。また、もう 1 例でも再発 1 ヶ月前までプロウ

ウイルス量は測定では感度以下であった。

移植後 7 年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。移植後 1 年を超えて生存している 8 例の最終確認時点でのウイルスは、骨髄非破壊的移植を受けた 1 例のみでウイルス量は測定感度以下となっている。

キャリアドナーから移植された例では非キャリアドナーからの移植と比較してプロウイルス量は有意に高値であった。このキャリアドナー移植での高プロウイルス量は再発の有無に関係しなかった。

末梢血中に HTLV-I プロウイルスが定量できた例のうち 8 例で inverse PCR を用いて初診時 ATLL 細胞におけるプロウイルスの組み込み部位を同定できた。これらの例では腫瘍細胞特異的 HTLV-I 組み込み部位を利用して ATLL 細胞特異的に MRD 検出系を設定できた。この検討では、移植後半年以上を経て採取された検体では、ドナーがキャリアであるかにかかわらず、全てにおいて初発時の微小残存病変は同定されなかった。

#### D 考察

ATLL に対する Allo-HSCT においては、殆どの報告で一定割合の長期無病生存が見られている。こういった機構で Allo-HSCT が ATLL に対して

長期寛解を付与するのか、又、長期生存者の中には「治癒」例が存在するのか、臨床的に重要な検討課題である。今回は、Allo-HSCT 後のプロウイルス量、微小残存病変を測定し、移植後の寛解状態を解析した。

キャリアドナーから移植を受けた例では、非キャリアドナーからの移植と比較して移植後プロウイルス量が有意に高かった。これは移植時に輸注されたプロウイルス陽性細胞を反映していると考えられた。しかし、このプロウイルス高値は ATLL 再発とは関連していなかった。非キャリアドナーから移植を受けた例でも末梢血中のウイルス陽性細胞量は変動し、一定の傾向は明らかではなかった。骨髄破壊的移植を受けた例では一旦プロウイルスが陰性化する場合も見られたが全ての例で再び陽性化した。但し、骨髄非破壊的移植を受けた例で 1 例であるが移植後 2 年が経過した時点でプロウイルス量は測定感度以下となっている。プロウイルス量の変化について今後も十分な検討が必要であると思われる。

こうした、移植後に残存したプロウイルス陽性細胞について、今回は inverse PCR を利用して ATLL 細胞特異的 PCR を樹立させ、それを用いてその帰属を検討した。検討できた 8 例では移植後一定の期間を過ぎると

プロウイルス陽性細胞は初発時の ATLL 細胞ではなかった。

移植後長期間を経て末梢血に検出されるプロウイルス陽性細胞は (1) ATL 細胞の残存、(2) HTLV-I に感染したドナー細胞、(3) 患者のキャリア状態にあるリンパ球の可能性が考えられる。これまでの検討では非キャリアドナーからの移植例では (2) が、又キャリアドナーからの移植ではドナーのプロウイルス陽性細胞そのものである可能性が高い。Allo-HSCT によっては、HTLV-I そのものではなく ATLL 腫瘍細胞が排除されて長期寛解を維持している可能性が高いと考えられる。しかし、少数ではあるが移植後にプロウイルスが測定感度以下に減少している例もあり、今後も観察を続ける必要がある。

#### E 結論

ATL に対する Allo-HSCT 後の HTLV-I プロウイルス定量は病態解析に有用であった。微小残存病変の解析には inverse PCR 法を利用して検出系を設定できた。同種移植の抗腫瘍効果を考える上で、移植後残存するプロウイルス陽性細胞の帰属を検討することが重要である。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Tsuji T, Sugahara K, Tsuruda K, Uemura A, Harasawa H, Hasegawa H, Hamaguchi Y, Tomonaga M, Yamada Y, Kamihira S.

Clinical and oncologic implications in epigenetic down-regulation of CD26/dipeptidyl peptidase IV in adult T-cell leukemia cells.

Int J Hematol. 2004 Oct;80(3):254-60.

2) Tsutsumi C, Ueda M, Miyazaki Y, Yamashita Y, Choi YL, Ota J, Kaneda R, Koinuma K, Fujiwara S, Kisanuki H, Ishikawa M, Ozawa K, Tomonaga M, Mano H.

DNA microarray analysis of dysplastic morphology associated with acute myeloid leukemia.

Exp Hematol. 2004 Sep;32(9):828-35.

3) Yoshizuka N, Moriuchi R, Mori T, Yamada K, Hasegawa S, Maeda T, Shimada T, Yamada Y, Kamihira S, Tomonaga M, Katamine S.

An alternative transcript derived from the trio locus encodes a guanosine nucleotide exchange factor with mouse cell-transforming potential.

J Biol Chem. 2004 Oct 15;279(42):43998-4004.

4) Sugahara K, Uemura A, Harasawa H, Nagai H, Hirakata Y, Tomonaga M, Murata K, Sohda H, Nakagoe T, Shibasaki S, Yamada Y, Kamihira S.



Clinical relevance of survivin as a biomarker in neoplasms, especially in adult T-cell leukemias and acute leukemias.

Int J Hematol. 2004 Jul;80(1):52-8.

5) Takeuchi S, Takeuchi N, Tsukasaki K, Yang Y, Fermin AC, Tomonaga M, Miller CW, Seo H, Koeffler HP. Related Articles, Links

Methylenetetrahydrofolate reductase genotype does not play a role in adult T-cell leukemia/lymphoma pathogenesis among human T-lymphotrophic virus type 1 carriers.

Leuk Res. 2004 Oct;28(10):1039-41.

6) Mori N, Krensky AM, Ohshima K, Tomita M, Matsuda T, Ohta T, Yamada Y, Tomonaga M, Ikeda S, Yamamoto N.

Elevated expression of CCL5/RANTES in adult T-cell leukemia cells: possible transactivation of the CCL5 gene by human T-cell leukemia virus type I tax.

Int J Cancer. 2004 Sep 10;111(4):548-57.

7) Ohnishi K, Ino A, Kishimoto Y, Usui N, Shimazaki C, Ohtake S, Taguchi H, Yagasaki F, Tomonaga M, Hotta T, Ohno R; Japan Adult Leukemia Study Group.

Multicenter prospective study of interferon alpha versus allogeneic stem cell transplantation for patients with new diagnoses of chronic myelogenous leukemia.

Int J Hematol. 2004 May;79(4):345-53.

8) Inoue Y, Tsukasaki K, Nagai K, Soda H, Tomonaga M.

Durable remission by sobuzoxane in an HIV-seronegative patient with human herpesvirus 8-negative primary effusion lymphoma.

Int J Hematol. 2004 Apr;79(3):271-5.

9) Mori N, Matsuda T, Tadano M, Kinjo T, Yamada Y, Tsukasaki K, Ikeda S, Yamasaki Y, Tanaka Y, Ohta T, Iwamasa T, Tomonaga M, Yamamoto N.

Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor FR901228 in human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells.

J Virol. 2004 May;78(9):4582-90.

10) Isomoto H, Maeda T, Akashi T, Tsuchiya T, Kawaguchi Y, Sawayama Y, Koida S, Ohnita K, Kohno S, Tomonaga M.

Multiple lymphomatous polyposis of the colon originating from T-cells: a case report.

Dig Liver Dis. 2004 Mar;36(3):218-21.

11) Tsukasaki K, Tanosaki S, DeVos S, Hofmann WK, Wachsmann W, Gombart AF, Krebs J, Jauch A, Bartram CR, Nagai K, Tomonaga M, Said JW, Koeffler HP.

Identifying progression-associated genes in adult T-cell leukemia/lymphoma by using oligonucleotide microarrays.

Int J Cancer. 2004 May 10;109(6):875-

81.

12) Tsutsumi C, Miyazaki Y, Fukushima T, Yoshida S, Taguchi J, Miyake C, Miyazaki M, Kohno S, Jinnai I, Tomonaga M.

Membranous nephropathy after allogeneic stem cell transplantation: report of 2 cases.

Int J Hematol. 2004 Feb;79(2):193-7.

13) Takenaka T, Itoh K, Suzuki T, Utsunomiya A, Matsuda S, Chou T, Sai T, Sano M, Konda S, Ohno T, Mikuni C, Deura K, Yamada T, Mizorogi F, Nagoshi H, Tomonaga M, Hotta T, Kawano K, Tsushita K, Hirano M, Shimoyama M; Lymphoma Study Group of the Japan Clinical Oncology Group.

Phase III study of ranimustine, cyclophosphamide, vincristine, melphalan, and prednisolone (MCNU-COP/MP) versus modified COP/MP in multiple myeloma: a Japan clinical oncology group study, JCOG 9301.

Int J Hematol. 2004 Feb;79(2):165-73.

14) Ozawa T, Itoyama T, Sadamori N, Yamada Y, Hata T, Tomonaga M, Isobe M.

Rapid isolation of viral integration site reveals frequent integration of HTLV-1 into expressed loci.

J Hum Genet. 2004;49(3):154-65. Epub 2004 Feb 26.

15) 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. 2004 Jan 1;103(1):236-41.

## 免疫療法における成人T細胞白血病クローンとウイルス特異的CTLクローンおよび制御性T細胞の研究

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

$\alpha\beta$ -T細胞腫瘍のMRD（微小残存病変）を $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$ で認識できる半定量システムを確立。その方法を用いてミニ移植登録症例のATLクローンのTCR V $\beta$ /V $\alpha$ 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、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、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。

### A. 研究目的

課題「成人T細胞白血病をモデルとしたウイルス関連難治がんに対する革新的治療法の開発」の分担研究として、免疫療法前後のATLクローンのMRDやCTLの量的状態を検討する。

T細胞抗原受容体（TCR）遺伝子の超可変部(CDR3)領域から特定T細胞クローンを同定し、ウイルス特異的CTLや腫瘍細胞を微小残存病変(MRD)レベルで検討する。同時に、制御性T細胞(T-reg)の動態とGVL/T効果やGVHDとの関連を検討する。ATLクローンの量的変化を $10^5$ 個細胞当たり1個の感度で追跡する。GVHDを抑え、また腫瘍免疫におけるCTL機能を抑制するとされる制御性T細胞(T-reg)の動態をT-reg特異的遺伝子Foxp3発現で経時的に検討する。この研究により、腫瘍再発、CTL出現、GVHD、T-reg細胞との関係が明らかとなり、革新的治療法へ重要な情報を提供すると考えられる。

### B. 研究方法

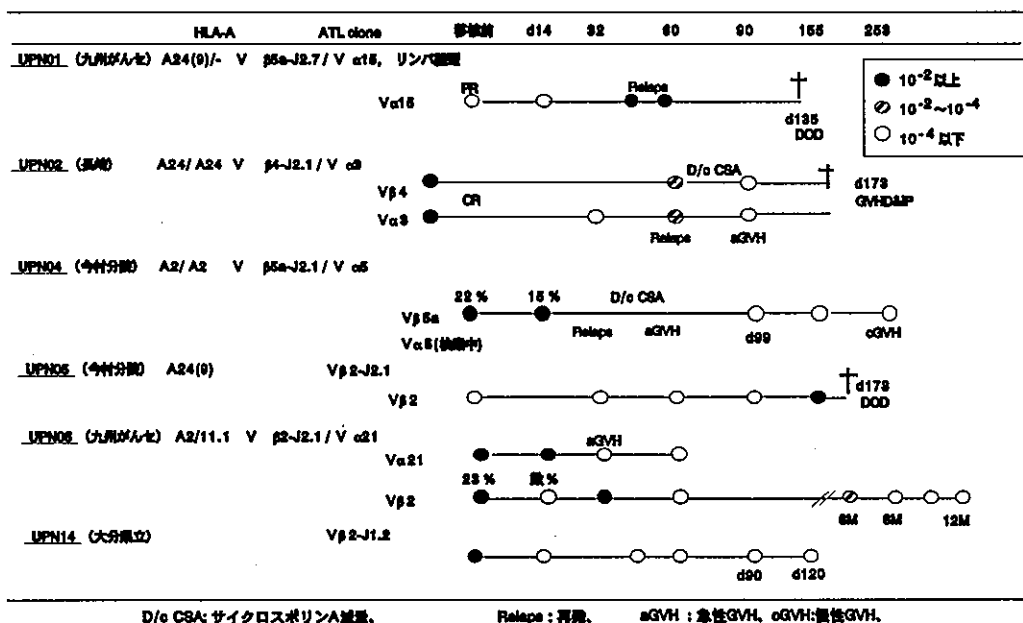
- 登録症例検体：臨床各病期に患者より末梢血(PB)を採取し、フィコールによる比重遠心法にて単核細胞群(MN)を分離回収し、RNAを抽出。
- TCRVレパートリーの解析：我々の開発した簡略化 inverse PCR法をもちいて、サンプルRNAをcDNAとし、さらにligationし、それぞれ2種類のプライマーを用いてPCRを行い、TCR $\alpha$ 鎖や $\beta$ 鎖の未知の割合の可変部（V）領域を均等に増幅。Vを含む一部の遺伝子産物を $^{32}$ P-dCTPでラベルし、20種類のヒトV $\beta$ 遺伝子やV $\alpha$ 遺伝子が敷かれたフィルター上でプロットを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

- 高頻度V $\beta$ レパートリーのJ $\beta$ 遺伝子を13種類のプライマーを用いてV-J $\beta$ PCR解析。
- 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Vfragmentのバンドの有無を検討。
- 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。
- 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。
- 制御性T細胞特異的Foxp3遺伝子の発現をATL症例で検討。

### 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ないこと。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こと。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。

### ATLミニ移植後のMRD



# UPN14 ATL clone (578)

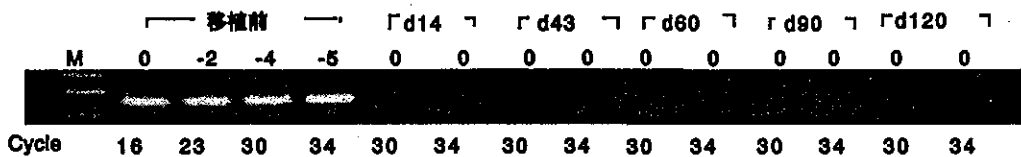
578UPN14ATL:Vβ2-J1.2

TAC ATC TGC AGT GCT/ CAG CAG GTA CCG AGG/ GGC TAC AC

D1.1

Jβ 1.2

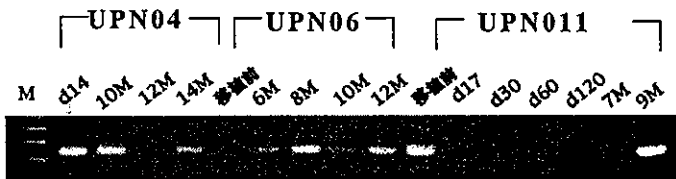
578Vb2J1.2 Ant Pr: GCC CCT CGG TAC CTG CTG AGC



## C. 研究結果

- 1 登録症例6例を検討し、特異的Vβ/Vαレパートリーを認識できた。
- 2 一部でVβ/Vαの一方でATLクローンを認識できた。
- 3 MRDの感度は $10^{-4}$ ~ $10^{-6}$ 。
- 4 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。
- 5 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。
- 6 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ことを示す。
- 7 急性GVHD発症後CRとなった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。GVL効果として、tax 特異的CTLクローンが働いている可能性が示唆された。
- 8 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。
- 9 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。
- 10 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。

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



## D. 考察

簡略 Inverse RT-PCR法を用いてATLクローンの特定Vβ/Vα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の判定に有効である。この方法を用いれば、免疫療法・ワクチン療法においてATLクローンのMRDや反応性CTLの出現の良いモニターとなり、よりよい効果的な免疫療法の開発が期待される。

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細胞低頻度（15%以下）の症例では困難であった。今後診断時、リンパ節や血液から高頻度のATL細胞を保存し、腫瘍ATLクローンのTCRVを確実におさえることが必要である。

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。HLA-A2以外にも、日本人に最も多いのHLA-A24例においても同様にHTLV-1特異的CTLのTCRVの分析をする必要がある。

今後、多くの症例を分析すること、またワクチン療法前後・経時的検討により、mini移植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。

## 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。この結果分析より、よりよい効果的な免疫療法の開発が期待される。

## F. 健康危険情報

特記なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 木村暢宏, リンパ球の遺伝子再構成とsomatic hypermutation. 悪性リンパ腫のすべて. 血液・腫瘍科 49巻31-37p, 2004年.
- 2) 木村暢宏. 48~59章. 血液/腫瘍学シーケツト (監修: 奈良信雄). 2004年8月20日発行. 発行社メデイカル・サイエンス・インターナショナル.

### 2. 学会発表

- 1). Foxp3遺伝子発現とATL. 木村暢宏, 一瀬一郎, 宇都宮與, 吉田哲也, 岡村精一, 田村和夫, 鶴池直邦, 岡村純, 竹下盛重. 第66日本血液学会総会・第46会日本臨床血液学会総会 (於京都) (H16年9月17-19日)。
- 2) Hydroxyureaによる皮膚潰瘍の3例. 若松信一, 鈴宮淳司, 尾畑由美子, 鈴木恵子, 一瀬一郎, 高松泰, 木村暢宏, 田村和夫. 第66日本血液学会総会・第46会日本臨床血液学会総会 (於京都) (H16年9月17-19日)