

200500519A

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡村 純

平成 18(2006)年 4 月

I. 総括研究報告書

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 (ATL) に対するミニ移植療法 -  
岡村 純…………… 1

II. 分担研究報告書

1. 骨髄非破壊的移植療法および免疫療法における宿主抗腫瘍免疫応答解析  
神奈木真理…………… 6

2. 成人 T 細胞白血病の分子生物学的解析  
松岡 雅雄…………… 9

3. ATL に対する骨髄非破壊的移植療法の実施  
原田 実根……………11

4. 成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) に対する標準的前処置と強度を減弱  
した前処置による同種造血幹細胞療法の比較  
朝長万左男……………13

5. ミニ移植における成人 T 細胞白血病 MRD と CTL の研究  
木村 暢宏……………18

6. ATL に対する同種造血幹細胞移植後における graft-versus-ATL 効果  
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……………28

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……………32

11. ATL 症例の同種造血幹細胞移植における T 細胞受容体レパトワの解析  
今村 雅寛……………36

12. ATL の分子細胞遺伝学的解析と治療効果の判定  
谷脇 雅史……………38

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷

**研究要旨** 本研究班では、ATL に対する同種末梢血幹細胞による骨髄非破壊的移植療法の前向き試験を本邦で初めて実施している。平成 17 年度には、第 2 期試験を実施すると共に、第 3 期臨床試験を計画してプロトコルを検討した。1) 第 2 期臨床試験（第 1 相試験）：目標は 16 例で 14 例が移植を終了し、12 例で主要評価項目が達成された。2) 第 3 期臨床試験（第 2 相試験）：第 2 期試験と前処置を同一にしたプロトコルを作成して開始した。18 年 3 月末現在、9 施設の倫理委員会において承認された。3) 移植療法に伴う基礎的解析：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、その多くが単一のエピトープに強い反応性を示したことから、特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）の存在が示唆された。

## A. 研究目的

ATL は human T-lymphotropic virus type I（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。本研究では、ATL に対する免疫機序を応用した革新的治療法の開発とその確立を目指して、再発や移植関連合併症が少なく、安全で効果的な骨髄非破壊的移植療法（Reduced-Intensity Stem Cell Transplantation, RIST）を開発する。さらに、ATL をモデルとして難治性ウイルス疾患に対する革新的な新規治療体系の開発を目指す。

## B. 研究方法

### 1) 同種末梢血幹細胞による RIST の有効性の検討：

(1-1) 第 1 期臨床試験（第 1 相試験、2002.12 終了）における長期生存例の追跡：

15 例中 5 例の長期生存例について臨床経過、キメラ状況および HTLV-I 動態を解析した。

(1-2) 第 2 期臨床試験（ATL-NST-2）（第 1 相試験、2003.9 開始）の遂行：

50～70 才の急性型/リンパ腫型 ATL に対して、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。HLA 一致同胞ドナーに対し G-CSF を投与し、アフェレーシスにより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）とした。

(1-3) 第 3 期臨床試験（第 2 相試験）の計画と実施：

第 2 期試験と前処置を同一にしたプロトコルを作成した。主要評価項目は、本移植術による 2 年

全生存率で、副次的評価項目は、移植後 100 日時点での全生存率および無増悪生存率、生着・完全キメラの達成（移植後 day 90±7 でのドナー由来細胞が 90%以上）、移植後 180 日時点での全生存率、移植後 2 年時点での無増悪生存率、GVHD の頻度・重症度、GVHD の発症時期とキメラとの関係、GVHD と抗腫瘍効果、全生存率および無増悪生存率との関係、抗ウイルス（HTLV-I）効果、抗ウイルス効果との関係、混合キメラに対するドナーリンパ球輸注の効果と毒性などである。予定症例数は 35 例である。本試験から、データ管理を日本臨床研究支援ユニットに委託して、質的にもより厳密な臨床研究を目指すこととした

### 2) 同種臍帯血を利用した RIST の検討：

血縁間ドナーからの末梢血や骨髄については、HLA が適合した幹細胞を確保することが困難な場合が多い。一方、臍帯血は入手が迅速であること、またこれまでの谷口ら（虎の門病院）の経験から、非寛解期 ATL に対する実施可能性を検討する価値はあると考え、17 年度には臍帯血を利用した RIST 案（第 1 相試験）を作成してその可能性を検討した。目的は、進行期 ATL に対する臍帯血ミニ移植の安全性と有効性の向上であり、対象は、化学療法抵抗性の ATL 急性型又はリンパ腫型、適当な血縁ドナーが不在、非血縁骨髄ドナーが待てない、活動性感染症を有さない、移植前 PS が 2 以下、原病浸潤以外での明らかな臓器障害がないこととし、目標症例数 10 例とした。

### 3) ATL に対する従来型同種移植療法（骨髄破壊的移植）の検討：

1997～2002 年の期間に研究班参加の 7 施設で移植した 40 症例（年齢 28～53 才、中央値 44 才）の成績を後方視的に解析した。19 例が生存、21 例が死亡（うち移植関連合併症死亡 16 例）しており、生存期間中央値は 9.6 ヶ月、3 年生存率 45%（95%CI:31.8-58.8%）であった。

### 4) 移植療法に伴う基礎的解析

#### (4-1) HTLV-I プロウイ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りアルタイム遺伝子定量装置 (LightCycler) により HTLV-1 プロウイルス量を測定した。

#### (4-2) RIST 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。末梢血あるいは骨髓血からゲノム 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。

#### (4-3) T 細胞免疫応答の解析：

移植前の ATL 患者由来 CD4 陽性リンパ球末梢血単核球分画 (PBMC) を PHA 刺激後培養し自発的に HTLV-I 感染した T 細胞株を樹立した。これを不活化したものを移植後の同患者由来 CD8 陽性リンパ球培養に定期的に添加培養し、増殖してきた CTL の細胞傷害活性およびエピトープマッピングを行った。同定されたエピトープ部位のオリゴペプチドと HLA-A\*1101 から成るテトラマーを委託合成し (NIAID Tetramer Facility)、同患者 PBMC を未培養で蛍光標識した CD8 抗体とテトラマーで染色し FACS で解析した。

#### (4-4) HTLV-I の分子生物学的解析：

研究班プロトコールに従い同種末梢血幹細胞移植が施行された症例と移植後に経過を観察しえた症例の末梢血あるいはリンパ節からゲノム DNA を抽出し、inverse PCR により HTLV-I プロウイルスの組み込み部位を同定し腫瘍細胞特異的な PCR を構築した。DNA メチル化はゲノム DNA を sodium bisulfite で処理し塩基配列決定によりメチル化 CpG を決定した。簡便法として combined bisulfite restriction analysis (COBRA) 法による解析を行った。

#### (4-5) ATL 症例の同種造血幹細胞移植における T 細胞受容体レパトアの解析：

ATL 患者の末梢血よりモノクローナル抗体と Minimacs を用い、免疫磁気ビーズ法で回収し、RNA を抽出後、RT-PCR 法で cDNA を合成し、TCRV  $\beta$  CDR3 領域に特異的な primer を用いて PCR 法で TCR レパトワのクロナリティーを解析した。

#### (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髓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) 第1期臨床試験 (2002.12 終了) における長期生存例の追跡：

5 例の生存例は、移植後 46-59 ヶ月を経過して社会復帰されている。全例とも寛解中で完全ドナー型キメラを維持しており、うち4例では HTLV-I プロウイルス量は測定感度以下を維持している。

#### (1-2) 第2期臨床試験の遂行：

目標16例で14例が移植を終了した。主要評価項目：移植後早期の致命的移植関連合併症が2例に発生した (脳梗塞、肺合併症)。14例中12例で主要評価項目 (完全キメラ達成による生着と移植後100日以内の早期合併症死亡発生) が達成されており試験は成功と判断される。副次的評価項目：3度以上の前処置関連毒性は発生せず全例で生着が得られた。好中球数500までの期間は12日であった。急性GVHDは評価可能な12例中10例 (1度3例、2度4例、3度3例)、慢性GVHDは評価可能9例中6例に発症した。移植後30日目の抗ATL効果は、8例で評価が可能であり、4例において効果が見られた。平成18年3月29日現在、6例が死亡され (死亡原因は、移植関連合併症2例、原疾患の再発・増悪4例)、8例が生存 (うち5例が無病生存中) である。平成18年3月末にプロトコールを終了する予定である。

#### (1-3) 第3期臨床試験の計画と実施：

10 月に最終プロトコールが完成し、参加予定の21 診療科において倫理委員会に承認申請中である。平成18年3月27日現在、10 施設の倫理委員会において実施計画書が承認された。

#### 2) 臍帯血を利用した RIST の検討：

実施案を作成後、現在もその詳細について検討中である。

#### 3) ATL に対する従来型同種移植療法 (骨髓破壊的移植) の検討：

40 例中9例が生存中であり、21例が死亡した (うち移植関連合併症死亡16例)。生存期間中央値9.6 ヶ月、3 年生存率45% (95%CI:31.8-58.8%) であった。

#### 4) 移植療法に伴う基礎的解析：

(4-1) HTLV-I プロウイルス量動態に関する研究：第2期試験における移植後の HTLV-I プロウイルス量は、11例で評価が可能であり、キャリアドナーからの移植例6例中2例、正常ドナーから

の移植例5例全例においてプロウイルス量が測定感度以下となった。

(4-2) RIST 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あった。第1期試験15例における完全キメラ達成までの期間は、骨髄系細胞14日、T細胞系18.5日であったが、第2期試験13例の解析では、各々14日と60日であり、T細胞系細胞の完全キメラ達成が明らかに遅れる傾向が見られた。

#### (4-3) T細胞免疫応答の解析：

移植後ATL患者から誘導されたCD8陽性CTL株は、移植前に樹立した自己HTLV-I感染細胞に傷害性を示し、HLA-A11を共有するアロ由来HTLV-I感染T細胞と反応した。エピトープマッピングの結果、Tax 88-96とTax 272-280の2カ所に強い反応性が認められた。HLA-A\*1101/Tax 88-96およびHLA-A\*1101/Tax 272-280テトラマーで未培養のPBMCを染色したところ、それぞれ0.48%と0.71%の細胞が陽性であり、両テトラマーを混合して染色すると1.87%の細胞が陽性であった。

#### (4-4) HTLV-Iの分子生物学的解析：

組み込み部位の同定による腫瘍細胞特異的なPCRの構築により腫瘍細胞を高感度、かつ特異的に検出することが可能となった。Real-time PCRの併用により定量も可能であることが示された。ATL細胞から抽出したゲノムDNAを用いてsodium bisulfite法によりDNAメチル化の程度を決定したところ、5'-LTRのDNAメチル化の程度は症例により大きく異なり、tax遺伝子発現との相関ではDNAメチル化と逆相関していた。Sodium bisulfite法とCOBRA法の比較により両者は極めて良く相関していることが明らかとなり迅速なDNAメチル化解析が可能となった。末梢血スミアからDNAを回収しtax遺伝子の解析が可能であることが明らかとなった。

#### (4-5) ATL症例の同種造血幹細胞移植におけるT細胞受容体レパトアの解析：

ATL発症時の末梢血CD4+CD25+T細胞のTCRレパトワ解析で、Vβファミリーの多くが検出不能であった。化学療法により一時ポリクローナルパターンを示すT細胞の増加を認めたが、同種造血幹細胞移植6ヵ月後、1年後、3年後と長期にわたりオリゴクローナルパターンあるいはモノクローナルパターンを示すT細胞も持続的に認められていた。

### D. 考察

第2期試験では、第1期試験の前処置からATGを省いた以外は全く同様の条件（ドナー、幹細胞源、GVHD予防法など）で試験を実施してきた。これまでの観察では、第1期試験と第2期試験を比較した場合、前処置関連毒性については、ほぼ

同程度であると考えられる。GVHDについては、ATGを省いたにも関わらず、その頻度や重症度について増加や重症化傾向は観察されていない。移植関連合併症死亡については、移植後100日以内の早期移植関連合併症死亡が前者で1例、後者では2例であり、全体では前者で4例、後者は2例である。RISTの有効性については、第2期試験登録例においても、第1期試験と同様に、半数以上の患者でプロウイルスの消失が証明されるとともに、ATL効果も観察されており、本移植法の抗ウイルス療法としての有効性が示唆されている。今後は、平成17年10月に開始した第3期試験（第2相）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。また、同胞ドナーが得られない患者に対しては、臍帯血や非血縁ドナーからの幹細胞を利用した移植法について検討する予定である。基礎的研究では、神奈木らによるT細胞免疫応答の解析において、新規に同定されたHLA-A11拘束性の2個のエピトープは別々のCTL集団に認識されており、両集団が同等の増殖能を持つため培養中に優位に誘導されてきたと考えられる。これらのエピトープは、HLA-A2、A24のメジャーエピトープと並び、HTLV-I感染におけるT細胞免疫応答の診断や免疫治療法開発に有用な材料を提供すると考えられた。HTLV-Iの分子生物学的解析では、松岡らが確立したCOBRA法は迅速に微量のDNAで5'側LTRのDNAメチル化の程度を決定することが可能であり、今後、移植症例の解析を行うことで移植においてTaxに対する免疫機構の関与を明らかにできるものと考えられ、組み込み部位の迅速な決定による残存ATL細胞の検出・定量系の確立は今後の移植症例のフォローに有用な方法であると考えられる。また、末梢血スミアから解析に必要なDNAを回収できたため今後は多くの症例での解析が可能になるものと期待される。50〜70才のATL患者を対象としたこれまでの本研究班における結果から、ATLに対するRISTの安全性が確認されつつあると考えられ、本療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。HTLV感染症罹患者数は、本邦では断乳の効果により減少傾向にあるとされているものの、海外、特に南米諸国においては有効な予防法が実施困難であるため、罹患者数は爆発的に増加していると報告されている。また、海外におけるATLの治療の現状については、AZTやインターフェロンによる治療が主体であり、同種幹細胞移植を臨床試験として実施している国は存在しない。しかし、ATLの治療法の中で「治癒」を期待できるのは、現在同種幹細胞移植療法のみである。その意味において、本邦における臨床試験は重要な役割を担っていると考えられる。

### E. 結論

ATLに対する同種幹細胞移植療法、中でも RIST、は極めて有望な治療法であることが明らかとなりつつある。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、ATL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。

## 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. Allogeneic stem cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 105: 4143-45, 2005
2. 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
3. Fukushima T, Miyazaki Y, Honda S, Kawano F, Moriuchi Y, Masuda M, Tanosaki R, 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* 19: 829-34, 2005
4. Kannagi M, Harashima N, Kurihara K, Ohashi T, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Tomonaga M, Okamura J. Tumor immunity against adult T-cell leukemia cells. *Cancer Sci* 96:249-55, 2005
5. Harashima N, Tanosaki R, Shimizu Y, Kurihara K, Masuda T, Okamura J, Kannagi M. Identification of two new HLA-A\*1101-restricted Tax epitopes recognized by cytotoxic T-lymphocytes in an adult T-cell leukemia patient after hematopoietic stem cell transplantation. *J Virol* 79:10082-92, 2005
6. Kanegane H, Kasahara Y, Okamura J, Hongo T, Tanaka R, Nomura K, Kojima S, Miyawaki T. Identification of DKC1 gene mutations in Japanese patients with X-linked dyskeratosis congenita. *Br J Haematol* 129: 432-4, 2005
7. Yokoyama T, Okamura S, Asano Y, Kamezaki K, Numata A, Kakumitsu H, Shide K, Nakashima H, Kanaji T, Sekine Y, Mizuno Y, Okamura J, Matsuda T, Harada M, Niho Y,

Shimoda S. A novel mutation in the juxtamembrane intracellular sequence of the granulocyte colony-stimulating factor(G-CSF) receptor gene in a patient with severe congenital neutropenia augments G-CSF proliferation activity but not through the MAP kinase cascade. *Int J Hematol* 82:28-34, 2005

8. Shimonodan H, Nagayama J, Nagatoshi Y, Hatanaka M, Takada A, Iguchi H, Okamura J. Refractory acute lymphocytic leukemia in adolescence with multiple osteolytic lesions and hypercalcemia: a possible mechanism mediated by lymphoblast-producing parathyroid hormone-related peptide. *Pediatric Blood & Cancer* 45:333-339 2005
9. Matsuzaki A, Nagatoshi Y, Inada H, Nakayama H, Yanai F, Ayukawa H, Kawakami K, Moritake H, Suminoe A, Okamura J. Prognostic factors for relapsed childhood acute lymphocytic leukemia: Impact of allogeneic stem cell transplantation. A report from the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group. *Pediatric Blood & Cancer* 45:111-120, 2005

### 2.学会発表

- 1 Okamura J, Utsunomiya A, Tanosaki R, Uike N, Sonoda S, Kannagi M, Tomonaga M, Harada M, Kimura M, Masuda M, Kawano F, Yufu Y, Hiroyoshi Hattori H, Hiroshi Allogeneic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. 12th International Conference on Human Retrovirology, June 22-25, Montego Bay, Jamaica
- 2 Harashima N, Kurihara K, Shimizu Y, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Miyazaki Y, Okamura J, Kannagi M. Major target epitopes recognized by Tax-specific CTL activated in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation 12th International Conference on Human Retrovirology, June 22-25, Montego Bay, Jamaica
- 3 Tsuchida M, Sao H, Sakamaki H, Kawa K, Yoshinobu Y, Kato K, Hara M, Ishii, M, Kikuchi A, Okamura J, Maruta, I, Takaue Y, Kasai, M, Yabe H, Morishima Y, Kato S, Koderu Y. Unrelated Donor Marrow Transplantation for Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan. A Japan Marrow Donor Program Experience between 1993 and 2003. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology, December 10-13, 2005, Atlanta, Georgia, USA
- 4 Tanosaki R, Nosaka K, Mineishi S, Mori S, Kim SW, Kami M, Kannagi M, Sonoda S, Okamura J, Fukuda T, Tobinai K, Takaue Y. Long-term durable remission with decreased HTLV-I proviral load after reduced-intensity

stem cell transplantation(RIST) using  
fludarabine and busulfan in patients with adult  
T-cell leukemia/lymphoma(ATL)  
47<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of  
Hematology, December 10-13, 2005, Atlanta,  
Georgia, USA

- 5 Nagatoshi Y, Suminoe A, Matsuzaki A, Ueda K,  
Inada H, Kawakami K, Yanai F, Nakayama H,  
Moritake H, Itonaga N, Fujita K, Kawano Y,  
Okamura J. Outcome of ALL-96 protocol for  
childhood ALL from the Kyushu-Yamaguchi  
Children's Cancer Study Group. 47<sup>th</sup> Annual  
Meeting of American Society of Hematology,  
December 10-13, 2005, Atlanta, Georgia, USA

#### セミナー

- 1 Okamura J. Allogeneic stem cell  
transplantation with reduced-intensity  
conditioning (RIST): New treatment strategy  
for adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL).  
Seminar at the Department of  
Hematology-Oncology, St Jude Children's  
Research Hospital,

#### 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

平成 17 年度分担研究報告書  
厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)

分担課題名：骨髄非破壊的移植療法および免疫療法における  
宿主抗腫瘍免疫応答解析

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

研究要旨：HLA 完全一致ドナーから骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植を受けた ATL 患者末梢血リンパ球の細胞性免疫を解析した。我々はこれまでに、移植前の ATL 患者末梢血から樹立した IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞 (ILT) 株を抗原刺激として用いる方法で、HLA-A2 拘束性 Tax11-19 および HLA-A24 拘束性 Tax301-309 エピトープが ATL 患者由来の CTL に認識されることを見いだした。テトラマーを用いたこれまでの解析の結果、これらのエピトープは HLA-A2 あるいは A24 陽性症例の約半数に検出され、メジャーエピトープと考えられる。本年度は、別の移植後 ATL 症例から Tax 特異的 CTL を誘導し、新規の HLA-A11 拘束性メジャーエピトープを同定した。これらの CTL エピトープは、Tax 特異的 CTL 応答賦活を目的とする免疫療法の標的抗原候補と考えられる。

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後の抗 HTLV-I 特異的 CTL 応答抗原エピトープを解析し、抗 ATL 効果への関与を検証する。

B. 研究方法

移植前の ATL 患者由来 CD4 陽性リンパ球末梢血単核球分画 (PBMC) を PHA 刺激後培養し自発的に HTLV-I 感染した T 細胞株を樹立した。これを不活化したものを移植後の同患者由来 CD8 陽性リンパ球培養に定期的に添加培養し、増殖してきた CTL の細胞傷害活性およびエピトープマッピングを行った。同定されたエピト

ープ部位のオリゴペプチドと HLA-A\*1101 から成るテトラマーを委託合成し (NIAID Tetramer Facility)、同患者 PBMC を未培養で蛍光標識した CD8 抗体とテトラマーで染色し FACS で解析した。

C. 研究結果

移植後 ATL 患者から誘導された CD8 陽性 CTL 株は、移植前に樹立した自己 HTLV-I 感染細胞に傷害性を示し、HLA-A11 を共有するアロ由来 HTLV-I 感染 T 細胞と反応した。エピトープマッピングの結果、Tax 88-96 と Tax 272-280 の 2 カ所に強い反応性が認められた。HLA-A\*1101/Tax 88-96 および HLA-A\*1101/Tax 272-280 テ

トラマーで未培養の PBMC を染色したところ、それぞれ 0.48 % と 0.71 % の細胞が陽性であり、両テトラマーを混合して染色すると 1.87 % の細胞が陽性であった。

#### D. 考察

骨髄非破壊的造血幹細胞移植後の HLA-A2 および HLA-A24 陽性 ATL 患者で認められたと類似の HTLV-I Tax 特異的 CTL 応答の活性化が、HLA-A11 陽性の別の症例で確認された。HLA-A11 拘束性の 2 個のエピトープは別々の CTL 集団に認識されており、両集団が同等の増殖能を持つため培養中に優位に誘導されてきたと考えられる。これらのエピトープは、同じ HLA を持つ患者で共通のメジャーエピトープとなっている可能性が高い。新規に作成した HLA-A\*1101/Tax 88-96 および HLA-A\*1101/Tax 272-280 テトラマーにより、抗原刺激を加えない新鮮 PBMC にもこれらのエピトープを認識する CTL が確認された点で、これらのエピトープが生体内でも発現および認識されることが確認できた。

#### E. 結論

新規に同定された HLA-A11 拘束性の 2 個のエピトープは、HLA-A2、A24 のメジャーエピトープと並び、HTLV-I 感染における T 細胞免疫応答の診断や免疫治療法開発に有用な材料を提供する。

#### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Harashima, N., Tanosaki, R., Shimizu, Y., Kurihara, K., Masuda, T., Okamura, J., and Kannagi, M.: Identification of two new HLA-A\*1101-restricted tax epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes in an adult T-cell leukemia patient after hematopoietic stem cell transplantation. *J Virol.* 2005, *79*, 10088-10092.
2. Kannagi, M., Harashima, N., Kurihara, K., Ohashi, T., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Masuda, M., Tomonaga, M., and Okamura, J. : Tumor immunity against adult T-cell leukemia. *Cancer Sci.* 2005, *96*, 249-255.
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., and Kannagi, M. : Potential immunogenicity of adult T cell leukemia cells in vivo. *Int J Cancer* 2005, *114*, 257-267.
4. 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., and Saburi, Y.: Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for

adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2005, 105, 4143-4145.

5. 神奈木真理. 感染免疫 6.レトロウイルス感染. 臨床免疫 (上) 山本一彦編. 日本臨床社. 2005、508-516.

#### 学会発表

(国際学会)

1. N. Harashima, K. Kurihara, Yukiko Shimizu, Atea Utsunomiya, Ryuji Tanosaki, Masato Masuda, Yasushi Miyazaki, Jun Okamura, and M. Kannagi. Major target epitopes recognized by Tax-specific CTL activated in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation. 第12回国際ヒトレトロウイルス会議, July 2005, Jamaica.
2. M. Kannagi. A crossing of infection and tumor immunity against adult T-cell leukemia. Japan-US-Japan Collaborative Meeting for Cancer immunosurveillance and cCancer Vaccinr Clinical Trials. Aug. 2005, Sapporo.

(国内学会)

1. 神奈木真理. 成人 T 細胞白血病の発症予防と免疫治療の展望. 第19回日本エイズ学会シンポジウム、H17年12月、熊本.
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の ATL 患者における CTL メジャ

ーエピトープ. 第64回日本癌学会、H17年9月、札幌

3. 栗原清、原嶋奈々江、神奈木真理. リコンビナント Tax 蛋白を用いた HTLV-I 特異的 T 細胞応答の検出. 第64回日本癌学会、H17年9月、札幌

4. 小森一哉、長谷川温彦、栗原清、原嶋奈々江、神奈木真理. HTLV-I 経口感染ラットにおける HTLV-I 特異的免疫応答制御とその回復. 第64回日本癌学会、H17年9月、札幌

5. 神奈木真理、原嶋奈々江、田野崎隆二、清水由紀子、栗原清、岡村純、増田貴夫. 成人 T 細胞白血病 (ATL) への造血幹細胞移植によって活性化された Tax 特異的 CD8 陽性 T 細胞の HLA-A11 拘束性メジャーエピトープ. 第53回日本ウイルス学会、H17年11月、横浜

分担研究課題名：成人 T 細胞白血病の分子生物学的解析

分担研究者：京都大学ウイルス研究所

教授 松岡 雅雄

#### 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) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスであり、全ての ATL 細胞はゲノム中に HTLV-I プロウイルスを有する。HTLV-I プロウイルスの解析は残存 ATL 細胞の検出のみならずウイルスタンパク発がんへの関与を明らかにする上で重要である。今回、残存腫瘍検出系を確立すると共に HTLV-I プロウイルスの DNA メチル化の簡便な検出法を樹立した。以上の研究は移植後の ATL 細胞の動態を明らかに出来ると共にプロウイルス DNA メチル化の迅速な検出を可能にするものと考えられる。

#### A. 研究目的

全ての ATL 細胞はゲノム中に HTLV-I プロウイルスを有し、その組み込み部位はランダムであるため組み込み部位の同定は腫瘍細胞の同定に繋がる。組み込み部位を同定し腫瘍細胞特異的 PCR を行うことにより腫瘍細胞の検出のみならず定量も可能である。HTLV-I がコードするタンパクの内、Tax は中心的な働きをしていると考えられているが ATL 細胞では、しばしば Tax の発現が失われている。この Tax の発現を阻害する機構には、1) tax 遺伝子の遺伝的変化、2) 5'側 long terminal repeat (LTR) の欠失、3) 5'側 LTR の DNA メチル化である。これらの内、5'側 LTR の DNA メチル化は検出が困難であり、簡便な検出法の確立が必要であった。実際の臨床サンプルでは、しばしば DNA がなく解析できないことが多い。このため末梢血スミアから DNA を回収し解析する方法の確立を目指した。今年度の研究では以上の点に関して研究を行った。

#### B. 研究方法

【対象】症例は研究班プロトコールに従い同種末梢血幹細胞移植が施行された症例と移植後に経過を観察しえた症例である。

【方法】末梢血あるいはリンパ節からゲノム DNA を抽出し、inverse PCR により HTLV-I プロウイルスの組み込み部位を同定し腫瘍細胞特異的な PCR を構築した。DNA メチル化はゲノム DNA を sodium bisulfite で処理し塩基配列決定によりメチル化 CpG を決定した。簡便法として

combined bisulfite restriction analysis (COBRA)法による解析を行った。

(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」の承認を得て行われる。検体は非連結匿名化を行い、解析している。

#### C. 研究結果

組み込み部位の同定による腫瘍細胞特異的な PCR の構築により腫瘍細胞を高感度、かつ特異的に検出することが可能となった。Real-time PCR の併用により定量も可能であることが示された。ATL 細胞から抽出したゲノム DNA を用いて sodium bisulfite 法により DNA メチル化の程度を決定したところ、5'-LTR の DNA メチル化の程度は症例により大きく異なり、tax 遺伝子発現との相関では DNA メチル化と逆相関していた。Sodium bisulfite 法と COBRA 法の比較により両者は極めて良く相関していることが明らかとなり迅速な DNA メチル化解析が可能となった。末梢血スミアから DNA を回収し tax 遺伝子の解析が可能であることを明らかにした。

#### D. 考察

昨年度までに移植症例における tax 遺伝子の塩基配列を決定し、またプロウイルス 5'側 LTR の欠失を解析した。その結果、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 発現の更なる解析が必要であるということが明らかとなった。Tax 発現を抑制する機序として 5'側 LTR の DNA メチル化は方法上の制約により解析

できなかったが、今回、我々が確立した COBRA 法は迅速に微量の DNA で 5'側 LTR の DNA メチル化の程度を決定することが可能であり、今後、移植症例の解析を行うことで移植において Tax に対する免疫機構の関与を明らかにできるものと考えられる。組み込み部位の迅速な決定による残存 ATL 細胞の検出・定量系の確立は今後の移植症例のフォローに有用な方法であると考えられる。また、末梢血スミアから解析に必要な DNA を回収できたため今後は多くの症例での解析が可能になるものと期待される。

#### E. 結論

ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスの DNA メチル化を含む詳細な解析は移植成績と tax 発現の関連を明らかにすることによって何故、ATL に移植療法が有効であるのかという問題に迫ることができるものと期待される。組み込み部位の決定による残存 ATL の検出系は再発の早期診断だけでなく腫瘍細胞の体内動態も明らかにできると考える。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology** 2: 27, 2005.

Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type I at age 25: a progress report. **Cancer Res** 65: 4467-70, 2005.

Doi, K, Wu X, Taniguchi Y, Yasunaga J-I, Satou Y, Okayama A, Nosaka K, Matsuoka M. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus integration sites in leukemic versus carrier states. **Blood** 106:1048-53, 2005.

Taylor GP, Matsuoka M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. **Oncogene** 24: 6047-57, 2005.

Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J-I, Maeda M, Mueller N, Okayama A, Matsuoka M. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms.

**Retrovirology** 2: 64, 2005.

##### 2. 学会発表

Matsuoka M. Molecular mechanism of leukemogenesis from HTLV-I infection to onset of ATL. The 12th International Conference on Human Retrovirology. Montego Bay, Jamaica. Jun 22-25, 2005.

Satou Y, Wu X, Doi K, Yasunaga J, Taniguchi Y and Matsuoka M. Different Preference of HTLV-I Provirus Integration between Carrier State and ATL. The 12th International Conference on Human Retrovirology. Montego Bay, Jamaica. Jun 22-25, 2005.

Miyazaki M, Matsuoka M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y. Mechanism generating defective HTLV-I provirus. The 12th International Conference on Human Retrovirology. Montego Bay, Jamaica. Jun 22-25, 2005.

松岡雅雄: シンポジウム「ヒト T 細胞白血病ウイルスの生き残り戦略」: 第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、2005 年 9 月 14 日-9 月 16 日

宮崎真紀、松岡雅雄、谷口裕子、安永純一朗: 5'側 LTR 欠損型プロウイルスの生成機序と発がん機構: 第 67 回日本血液学会、横浜、2005 年 9 月 17 日-9 月 19 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

分担研究報告書

分担研究課題名：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, A, B, DRβ1 完全一致の非血縁ドナーより骨髄移植を行い、移植後 1 年まで順調な経過である。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 一致同胞がいない 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、tacrolimus 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 も軽微であった。移植後 CR となり、day85 に末梢血 HTLV-1 DNA 陰性を PCR で確認した。Day85 より tacrolimus の減量を開始した。day205 に急性 GVHD 様の皮疹、AST/ALT の上昇を伴う肝障害が出現した。皮疹の生検は急性 GVHD であった。プレドニンの投与を開始し、皮疹および肝障害が軽快した。Day255 に帯状疱疹を発症し ACV の投与で治癒した。経過中 CMV 抗原血症は陽性化しなかった。Day380 の現在 CCR で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 PCR でフォローすることで、移植後の GVL 効果を測定できた。順調な経過だが免疫抑制剤減量中 day200 頃に急性 GVHD 様の GVHD を発症した。非血縁移植であることと骨髄非破壊的な前治療であることが、遅発性の GVHD に関与した可能性がある。

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. Tanimoto TE, Hirano A, Nagafuji K, Yamasaki S, Hashiguchi M, Okuma T, Kamezaki K, Takase K, Numata A, Miyamoto T, Fukuda T, Harada M: Mismatched unrelated cord blood transplantation in a patient with T-cell prolymphocytic leukemia(Correspondence). *Leukemia* :
2. Horiuchi T, Gondo H, Miyagawa H, Otusuka J, Inaba S, Nagafuji K, Takase K, Tsukamoto H, Koyama T, Mitoma H, Tanimoto Y, Miyagawa H, Tahira T, Hayasi K, Hashimura C, Okamura S, Harada M: Association of MBL gene polymorphisms with major bacterial infection in patients with high-dose chemotherapy and autologous PBSCT. *Genes and Immunity* 6:162-166,2005
3. Karube K, Oshima K, Tsuchiya T, Yamaguchi T, Kawano R, Suzumiya J, Harada M, Kikuchi M: A "floral" variant of nodal marginal zone lymphoma. *Human Pathology* 36:202-206,2005
4. 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: Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 105: 4143-4145, 2005
5. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD, Harada M: Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor  $\gamma$  hain<sup>nuU</sup> mice. *Blood* 106: 1565 - 1573,2005
6. Kawano N, Ishikawa F, Shimoda K, Yasukawa M, Nagafuji K, Miyamoto T, Baba E, Tanaka T, Yamasaki S, Gondo H, Otsuka T, Ohsima K, Shultz LD, Akashi K, Harada M: Efficient engraftment of primary adult T-cell leukemia cells in newborn NOD/SC1D/ $\beta$ 2-microglobulin<sup>null</sup> mice. *Leukemia* 19:1384-1390,2005
7. Imamura R, Miyamoto T, Yoshimoto G, Kamezaki K, Ishikawa F, Henzan H, Kato K, Takase K, Numata A, Nagafuji K, Okamura T, Sata M, Harada M, Inaba S: Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol* 175:2647-2654,2005

2. 学会発表

1. Harada M, Tsukamoto H, Nagafuji K, Nakashima H, Horiuchi T : A phase I/II trial of autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of refractory autoimmune disease. The 10<sup>th</sup> Congress of the Asian-Pacific Bone Marrow

Transplantation, Hangzhou, China, October 13-16, 2005

2. Masamichi Hara, Katsuji Shinagawa, Kenji Imajo, Koji Nagafuji, Takahiro Fukuda, Chihiro Shimazaki, Tetsuya Eto, Hisashi Gondo, Fumio Kawano, Mine Harada for Japan Study Group for Cell Therapy and Transplantation(JSCT): Randomized phase II study of maintenance chemotherapy versus high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation as postremission therapy of AML. The 10<sup>th</sup> congress of Asia-Pacific Bone Marrow Transplantation, October 13-16,2005, Hangzhou, China
3. 原田実根：造血幹細胞移植－最近の取り組み、名古屋 BMT グループ特別講演会、2005 年 1 月 21 日、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 「再生型人工組織作製」  
(平成 14 年 11 月 15 日出願)  
出願番号：特願 2002-332530
2. 「白血病細胞のアッセイ法」  
(平成 15 年 5 月 16 日出願)  
出願番号：特願 2003-136409
3. 「ヒト由来免疫担当細胞の製造方法」  
(平成 15 年 6 月 16 日出願)  
出願番号：特願 2003-171420  
平成 16 年 6 月 16 日 PCT 国際出願  
出願番号：PCT/JP2004/008784

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・リンパ腫(ATL)に対する標準的前処置と強度を減弱した前処置による同種造血幹細胞療法の比較

研究分担者 教授 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

成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)に対する骨髄破壊的同種移植療法の成績は、全国7移植施設40症例の後方視的解析で3年全生存率が45.3%と報告されている。選択された一群に対してではあるが化学療法と比較して良好な成績であり、そこにはGraft versus ATLL (GvATLL) 効果の存在も示唆される (Leukemia 19, 2005)。

一方ATLLの平均発症年齢は60才前後であり、標準的移植の適応とならない例が多い。そこでGvATLL効果を応用し、前処置強度を減弱した同種移植療法(RIST)が、高齢者および臓器障害を有する症例を対象として試みられており、有効性が期待されている。本班において実施された第I相臨床試験の結果、ATLLに対してRISTが安全に施行可能であった。(Blood 105, 2005) RISTと標準的前処置によるAllo-HSCTの成績をを比較した。

B 研究方法

長崎大学及びその関連施設(佐世保市立総合病院、国立病院機構長崎医療センター)で施行された骨髄破壊的(標準的)同種移植(sHSCT)24症例と前処置強度を減弱した同種移植(RIST)16症例との間で治療成績の解析を行い、比較検討した。

C 研究結果

1) 対象症例と移植法

対象となったのは、同種造血幹細胞移植を受けた急性型、リンパ腫型又は予後不良因子を有する慢性型の ATLL 患者 40 名で、長崎大学原研内科、佐世保市立総合病院、国立病院機構長崎医療センターで移植を受けていた。sHSCT 患者 24 例の年齢は 30 から 53 才で年齢中央値は 44 才であった。一方 RIST を受けていた患者 16 例の年齢中央値は 55 才 (41~67 才) と有意に高かった。sHSCT 患者のうち 19 例が急性型、4 例がリンパ腫型で 1 例が予後不良因子を持つ慢性型であった。RIST では、12 例が急性型、4 例がリンパ腫

型であった。移植時の Performance status (PS) はほとんどが 1 であり (38 例)、両者に差はなかった。移植時病期は sHSCT で病勢のコントロールがなされていた (第 1、2 寛解期、部分寛解期) のは 13/24 例で、NC 2 例、PD 9 例であった。一方 RIST では病勢コントロールがなされての移植は 10/16 例で、NC で 4 例、PD で 2 例が移植されていた。幹細胞は sHSCT では骨髄 20 例、末梢血幹細胞 3 例、臍帯血 1 例で RIST では骨髄 4 例、末梢血幹細胞 10 例、臍帯血 2 例であった。骨髄バンクを介した移植が sHSCT で 9 例に、RIST で 3 例に実施されていた。sHSCT の移植では全身放射線照射が 14 例に、ブスルファン (16mg/kg) が 10 例に投与されていた。RIST においては全例でフルダラビンが用いられ、メルファラン、ブスルファン、シクロホスファミドなど様々な投与がなされていた。GVHD 予防は血縁間移植では CsA を中心に、非血縁者では Tacrolimus を中心に使用されていた。

## 2) 移植結果

移植細胞数は sHSCT 骨髄で中央値  $3.15 \times 10^8$ /kg、末梢血幹細胞 CD34 陽性細胞数で  $4.25 \times 10^6$ /kg が、また RIST では骨髄細胞で  $2.72 \times 10^8$ /kg、末梢血幹細胞で  $2.73 \times 10^6$ /kg といずれも十分量が輸注されていた。どちらも 1 例ずつの評価不能例を除くと全例で生着

が得られ、生着までの期間は sHSCT で中央値 17 日、RIST で 14 日であった。急性 GVHD は sHSCT で評価可能 23 例中 12 例に見られ 3 度以上は 5 例であった。RIST では評価可能 15 例中 7 例に見られ 3 度以上は 2 例であった。慢性 GVHD は sHSCT と RIST それぞれ 9/18 例、6/12 例に見られている。

## 3) 生存成績

sHSCT 例の内 14 例が、RIST 例の内 7 例が死亡していた。3 年の全生存率は sHSCT で 42.6%、RIST で 53.3%であった。

## D 考察

ATLL に対する Allo-HSCT では、いずれの報告を見ても一定割合の長期無病生存例が存在する。同種造血幹細胞移植後の長期生存例を増やしていくには、同種移植においてどういったメカニズムが ATLL のコントロールに係わっているのかといったいわゆる GvATLL 機構の解明と同時により成功率の高い移植法の開発が求められる。今回、骨髄破壊的な前処置を行う sHSCT と前処置強度を減弱した RIST の違いを検討した。後方視的検討のため症例背景並びに移植時の前処置の詳細については症例間の幅が大きかった。しかし、当班の第 1 相試験の報告にも見られるように RIST 例の中にも一定の割合で長期生存が見られることは注目に値する。今後は死因の違

いや再発などを詳細に検討し、今後前方向的な比較試験の必要性や実施可能性を考える必要がある。当班の目的である RIST による治癒を目指した ATLL 治療の可能性が示唆されたと考えられる。

#### E 結論

ATL に対する標準的前処置並びに RIST による Allo-HSCT の成績を比較した。RIST 例の中にも一定の長期生存が期待された。今後は両者の違いを詳細に検討する必要がある。

#### F 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Imaizumi Y, Iwanaga M, Tsukasaki K, Hata T, Tomonga M, and Ikeda S. Natural course of HTLV-1 carriers with monoclonal proliferation of T lymphocytes (“pre-ATL”) in a 20-year follow-up study. Blood 105: 903-04, 2005

2) Hasegawa H, Yamada Y, Harasawa H, Tsuji T, Murata K, Sugahara K, Tsuruda K, Ikeda S, Imaizumi Y, Tomonaga M, Masuda M, Takasu N and Kamihira S. Sensitivity of adult T-cell leukaemia lymphoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Br J Hematol. 128:253-65, 2005

3) Kurihara k, Harashima N, Hanabuchi S, Masuda M,

Utsunomiya A, Tanosaki R, Tomonaga M, Ohashi T, Hasegawa A, Masuda T, Okumura J, Tanaka Y and Kannagi M.

Potential immunogenicity of adult T-cell leukemia cells in vivo. Int J Cancer 114: 257-67, 2005

4) 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, and Saburi Y. Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood 105: 4143-45, 2005

5) Fukushima T, Miyazaki Y, Honda S, Kawano F, Moriuchi Y, Masuda M, Tanosaki R, Utsunomiya A, Uike N, Yoshida S, Okamura J and Tomonaga M. Allogenic hematopoietic stem cell transplantation provides sustained long-term survival for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. Leukemia 19: 829-34, 2005

6) Tawara M, Simon J. Hogerzeil, Yamada Y, Takasaki Y, Soda H, Hasagawa H, Murata K, Ikeda S, Imaizumi Y, Sugahara K, Tsuruda K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Hirakata Y, Kamihira S. Impact of p53 aberration on the progression of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma Cancer Letters xx :1-7, 2005

7) Kannagi M, Harashima N, Kurihara

K, Ohashi T, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Tomonaga M and Okamura J.

Tumor immunity against adult T-cell leukemia. *Cancer Sci* 96:249-55, 2005

8) Kohno T, Yamada Y, Akamatsu N, Kamihira S, Imaizumi Y, Tomonaga M and Matsuyama T.

Possible origin of adult T-cell leukemia/lymphoma cells from human T lymphotropic virus type-1-in-infected regulatory T cells. *Cancer Sci* 96: 527-33, 2005

9) Dewan Z, Uchihara JN, Terashima K, Honda M, Sata T, Ito M, Fujii N, Uozumi K, Tsukasaki K, Tomonaga M, Kubuki Y, Okayama A, Toi M, Mori N, Yamamoto N.

Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood* Sep20 2005

## 2 学会発表

宇都宮 興、塚崎邦弘、福島卓也、池田柊一、増田昌人、河野文夫、田村和夫、飛内賢正、福田治彦、下山正徳、堀田知光、朝長万左男：9月17日(土)から19日(月・祝日)：第67回日本血液学会、第47回日本臨床血液学会合同総会：パシフィコ横浜：ワークショップ2-3(9/17・18日)：aggressive ATLL に対する VACP-AMP-VECP 療法と biweekly CHOP

療法のランダム化第Ⅲ相比較試験：JCOG9801：発表誌名(臨床血液 第46巻第8号 172頁 2005年)

福島卓也、宮崎泰司、森内幸美、吉田真一郎、田口潤、堀尾謙介、澤山靖、山崎励至、波多智子、朝長万左男：9月17日(土)から19日(月・祝日)：第67回日本血液学会、第47回日本臨床血液学会合同総会：パシフィコ横浜：ワークショップ30-3(9/19・3日)：成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)に対する骨髄破壊的同種移植と骨髄非破壊的同種移植との比較(Clinical analysis of Allo-HSCT for ATLL with standard or reduced intensity conditioning)：発表誌名(臨床血液 第46巻第8号 207頁 2005年)

武本重毅、塚崎邦弘、田口博國、増田昌人、池田柊一、吉田真一郎、鈴島仁、鵜池直邦、佐分利能生、朝長万左男：9月17日(土)から19日(月・祝日)：第67回日本血液学会、第47回日本臨床血液学会合同総会：パシフィコ横浜：ワークショップ33-5(9/19・3日)：成人T細胞白血病リンパ腫(ATL)における微少残存病変(MRD)検査法の臨床応用についての研究(Clinical methodology for detection of minimal residual disease in adult T-cell leukemia/lymphoma)：発表誌名(臨床血液 第46巻第8号 212頁 2005年)

鬼丸康之、塚崎邦弘、今泉芳孝、雀 永林、村田健、山田恭暉、上平憲、間野博行、朝長万左男：9月17日（土）から19日（月・祝日）：第67回日本血液学会、第47回日本臨床血液学会合同総会：パシフィコ横浜：優秀ポスター3-45（9/19・3日目）：肝細胞増殖因子(HGF)/ C-MET のオートクライン / パラクライン機構による aggressive ATLL 細胞の増殖 (Autocrine and / or paracrine growth of aggressive ATLL cells by HGF and c-MET)：発表誌名 (臨床血液 第46巻第8号 391頁 2005年)

山崎励至、福島卓也、宮崎泰司、塚崎邦弘、堤千寿子、田口潤、本多幸、吉田真一郎、森内幸美、朝長万左男：11月19日（土）第271回 日本内科学会九州地方会：ロワジールホテルオキナワ：長崎県で行われた成人T細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) に対する同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) の治療成績および微小残存病変 (MRD) に関する検討：発表誌名 (第271回日本内科学会九州地方会 (プログラム・抄録集)55頁 2005年)

## ミニ移植における成人T細胞白血病MRDとCTL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 $10^4\sim 10^6$ 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を検討した。さらにHLA-A2拘束性Tax特異的CTL追跡をし臨床各病期の病態との相関を検討した。CTLは、移植後常には存在しない。CR時期に陰性か低い発現を、再発やGVHD時期に高出現する傾向を認めた。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。

### 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、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<sup>32</sup>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(13種類)のプライマーを用いてV $\beta$ -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V fragment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遺伝子の発現を検討。
- (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(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事ができること。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。

### C. 研究結果

- 登録症例6例を検討し、ATLの特異的V $\beta$ /V $\alpha$ 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。
- ミニ移植後の完全寛解でATLクローンは $10^4$ 以下。
- 移植後14日にも数%レベルでATL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唆した。
- 急性GVHD発症後CRとなった例を経験した。この時期 tax 特異的CTLクローンが増加。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。
- CTLは、移植後常には存在しない。CR時期に陰性か低い発現を、再発・GVHD時期に高出現する傾向を認めた。

### D. 考察

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、よりよい効果的免疫療法の開発が期待される。

ATL低頻度(15%以下)症例ではATL特定のV $\beta$ /V $\alpha$ 遺伝子決定は困難である。診断時、高頻度のATL細胞を保存し、ATLクローンのTCRVを確実に決めることが必要である。

テトラマー法によるCTL数検討では、抗原への高アフィニティーCTLも低高アフィニティーCTLも全てを含むため細胞数とCTL応答の強さとは必ずしも相関しない。我々は高アフィニティーCTLと思われるTCRV遺伝子を追跡している。CR時の陰性化はそのためかも知れない。

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。