

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡村 純

平成19(2007)年4月

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	岡村 純-----	1
---	-----------	---

II. 分担研究報告

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-----	10
3. ATLに対する骨髄非破壊的移植療法の実施	原田 実根-----	13
4. 九州地区において実施されている成人T細胞白血病・リンパ腫(ATLL)に対する同種造血 幹細胞療法の検討	朝長万左男-----	16
5. 成人T細胞白血病とFoxp3遺伝子発現の研究	木村 暢宏-----	18
6. 成人T細胞白血病に対する同種造血幹細胞移植の当院における現状	宇都宮 與-----	21
7. 悪性リンパ腫に対する同種造血幹細胞移植	谷口 修-----	24
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-----	27
9. ATLに対する骨髄非破壊的移植療法の実施	増田 昌人-----	30
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を用いた同種造血幹細胞移植術 の実施	鶴池 直邦-----	33
11. ATL症例の非骨髄破壊的前処置による同種造血幹細胞移植後末梢血亜分画キメリズム解析	今村 雅寛-----	38
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-----	40
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	42
IV. 研究成果の刊行物・別刷		

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

課題名；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（H16-がん臨床-一般-038）

総括研究報告書

『成人 T 細胞白血病(ATL)に対するミニ移植療法』

主任研究者 岡村 純 国立病院機構九州がんセンター臨床研究部部長

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 18 年度には、終了した第 2 期試験を解析すると共に、第 2 相臨床試験を開始した。1) 第 2 期臨床試験（第 1 相試験）：生着は全例で速やかで、登録 14 例中 12 例が主要評価項目を達成した。完全キメラ達成までの期間は、ATG を加えた第 1 期試験より遅かった。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臨床試験を開始した。平成 19 年 3 月現在、参加予定の 21 施設中 18 施設の倫理委員会で承認され、参加予定の 21 施設中 18 施設の倫理委員会で承認された。平成 19 年 3 月現在、仮登録 7 例で、3 例の移植が実施された。3) 移植療法に伴う基礎的解析：Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）の存在が示唆され、移植後の寛解維持に貢献しているのではないかと思われた。

分担研究者

- | | | |
|----------|-----------|----|
| 1. 岡村純 | 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. 原田実根 | 九州大学医学部 | 教授 |
| 5. 朝長万左男 | 長崎大学医学部 | 教授 |
| 6. 木村暢宏 | 福岡大学医学部 | 講師 |
| 7. 宇都宮典 | 慈愛会今村病院分院 | 部長 |
| 8. 谷口修一 | 虎の門病院血液内科 | 部長 |
| 9. 田野崎隆二 | 国立がんセンター | 医長 |
| 10. 増田昌人 | 琉球大学医学部 | 講師 |
| 11. 鶴池直邦 | 九州がんセンター | 部長 |
| 12. 今村雅寛 | 北海道大学医学部 | 教授 |
| 13. 谷脇雅史 | 京都府立医科大学 | 教授 |

第 1 相、2006 年 2 月登録終了)の解析：50-70 才の急性型/リンパ腫型 ATL に対して、フルダラビン (30mg/m², 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とした。HLA 一致同胞ドナーに対し G-CSF を投与し、アフ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。

(1-2) 第 3 期臨床試験の開始(臨床第 2 相)：第 2 期試験と前処置を同一にしたプロトコールを作成した。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。

A. 研究目的

本研究では、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、ATL に対する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) ATL に対する同種 (血縁者間) 末梢血幹細胞を利用した RIST の安全性と有効性に関する検討

(1-1) 第 2 期臨床試験 (ATL-NST-2) (臨床

2) ATL に対する非血縁者間幹細胞を利用し

たRISTの検討

(2-1) 非血縁者間臍帯血ミニ移植 (RICBT) の検討: 23 例が対象、年齢中央値 56 才、23 例中 22 例が非寛解期の ATL 進行例で、前処置は、フルダラビン、メルファラン、全身放射線照射で行った。

(2-2) 非血縁者間骨髄移植 (UBMT) の検討: 日本骨髄バンクを通じて実施された ATL33 例に対する HTLV-1 陰性非血縁ドナーからの骨髄移植成績を解析した。年齢中央値は 49 才、RIST6 例、従来型前処置 27 例であった。

3) 移植療法に伴う基礎的解析

(3-1) 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 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 HTLV-1 プロウイルス量を測定した。

(3-2) 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 自動シークエンサーで測定した。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。

(3-3) 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 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。

(3-4) HTLV-I の分子生物学的解析:

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。方法は、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。tax 遺伝子の発現は RT-PCR 法により解析した。

(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。すべての基礎研究についても、各施設の倫理委員会での承認後に実施している。

C. 研究結果

1) ATL に対する同種 (血縁者間) 末梢血幹細胞を利用した RIST の安全性と有効性に関する検討

(1-1) 第 2 期臨床試験 (ATL-NST-2) (臨床第 1 相、2006 年 2 月登録終了) の解析: 登録 14 例。年齢中央値は 56 歳、ドナー 7 名が HTLV-1 キャリアであった。生着は全例で速やかで、完全キメラ達成までは、ATG を加えた第 1 期試験より遅かった。急性 GVHD は、II 度 4 例、III 度 3 例のみで、第 1 期と同等と判断した。6 例生存、8 例死亡。死因は腫瘍死 5 例、移植関連死亡 3 例。14 例中 8 例では、末梢血中 HTLV-1 Tax の PCR が陰性化した。

(1-2) 第 3 期臨床試験の開始 (臨床第 2 相): 参加予定の 21 施設中 18 施設の倫理委員会承認された。平成 19 年 3 月現在、仮登録 7 例で、3 例の移植が実施された。

2) ATL に対する非血縁者間幹細胞を利用した RIST の検討

(2-1) 非血縁者間臍帯血ミニ移植 (RICBT) の検討: 移植後 30 日以内の早期死亡 5 例以外の 18 例中 17 例が生着した。移植後 100 日以内に 13 例が死亡、うち移植関連死亡が 10 例であった。1 年生存率 22%、無再発生存率 10% であった。

(2-2) 非血縁者間骨髄移植 (UBMT) の検討: 移植後 20 日以内の早期死亡は 5 例で、28 例 (85%) が生着した。死亡 14 例中 9 例が移植関連死亡であった。1 年生存率 49.5%、無増悪生存率 49.2% で、多変量解析では、移植時の年齢が予後因子 (50 才以上が不良) であった。

3) 移植療法に伴う基礎的解析

(3-1) HTLV-I プロウイルス量動態に関する研究：第1期、2期試験の29例中16例(55%)でプロウイルス量が移植後に測定感度以下となり、本法による抗ウイルス効果が示唆された。

(3-2) 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り、4年半以上の長期寛解5例でも完全キメラが維持されていた。

(3-3) 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析：第1期試験で免疫解析が可能であった4例中2例でHTLV-1 Tax 特異的 CTL の活性化が確認された。3例目では、RIST後に再発し、その後の再寛解時に CTL 活性化が認められ以後寛解を維持している。4例目では明らかな CTL 活性は認められなかった。T 細胞応答の詳細な解析を目的として蛋白ベースの解析方法を試作した(*J Immunol Method*, 2006)。また、Tax 特異的 CTL の回復により HTLV-I プロウイルス量が減少すること、および48時間培養した自家リンパ球接種により Tax 特異的 CTL の活性化が可能であることを動物実験で示した(*J Virol*, 2006)。

(3-4) HTLV-I の分子生物学的解析：

ドナー由来 ATL の発症：HTLV-I キャリアドナーからの骨髓移植（非登録例）後、早期にドナー由来の HTLV-I 感染細胞が短期間で腫瘍化した症例を詳細に解析して報告した(*NEJM*, 2006)。移植症例を解析した結果、5'側 LTR の欠損した2型欠損型プロウイルスを有するものを同定した。このような場合、組み込み部位によってはゲノムに存在する細胞側遺伝子プロモーターをプロウイルスがトラップしている可能性がある。解析できたケースでは、プロウイルスは細胞側プロモーターをトラップしていなかった。このため tax 遺伝子の発現はないことが予想され、本症例は移植後に ATL を再発していた。

D. 考察

第2期試験では、前処置からATGを省いても安全性と生着に問題はなく、本研究は成功と判断された。第1期試験（前処置はフルダラビン、ブスルファン、ATG）と比較して、早期再発・死亡は少なく、GVHD発症、再発率、生存率に有意差を認めなかった。これまでの第1相臨床試験（1期、2期）の結果から、RISTは従来型の骨髓破壊の移植法と比較して、治療関連毒性が軽度で、高齢患者でも十分に実施可能なことが証明された。しかし、血縁者間移植では幹細胞を提供可能なドナーが限られ、ごく一部の患

者しかその恩恵を受けることができないため、幹細胞源を非血縁者に拡大してミニ移植の安全性と有効性を検証する必要があると考えた。そこで非血縁骨髄や臍帯血を使用する方法について後ろ向き解析を行った結果、RICBTは、今回検討した前処置では、生着には問題がないものの、移植後100日以内の治療関連死亡や再発が多く、非寛解期ATLに対する有効な治療法とは言えないと考えられた。UBMTはATLへの移植幹細胞源となり得ると考えられた。基礎研究の結果から以下のことが示唆された。すなわち、幹細胞移植直後の寛解には、Tax特異的CTL活性化は必須ではなく、移植前の化学療法やGVH応答がより強く影響すると考えられるが、寛解後に再発する例があること、それらの例ではTax特異的CTLの活性化と臨床経過の改善とが関連していることから、Tax特異的CTLは寛解の維持に貢献しているのではないかと思われる。ドナー由来ATLの発症例については、HTLV-Iキャリアドナーからの移植でドナー感染細胞が短期間に腫瘍となっている。ドナーにはATLの発症は認められず、ドナー体内では免疫系により増殖がコントロールされていたHTLV-I感染細胞クローンが移植という免疫抑制状態で短期間に悪性化したものと理解される。このような免疫抑制状態では免疫原性の高いTaxの発現が抑制を受けないことが予測される。本症例のATL細胞はtax遺伝子の発現が認められており、この仮定と一致する所見である。移植ATL症例での解析から、殆どの症例ではtax遺伝子を発現できるプロウイルスを有していた。しかし、5'側LTRが欠損するプロウイルス（2型欠損型）を有している症例も存在した。この内、1例で組み込み部位の同定でtax遺伝子の発現ができない構造であることが確認された。この症例は、移植後にATLが再発しており、抗ウイルス免疫反応がATL再発を抑制していることを示しているのかもしれない。今後、症例の蓄積によりウイルス遺伝子発現と移植療法との関連が明らかになることが期待される。

E. 結論

本研究班による ATL の前方視的試験により、ATL 患者に対する血縁者間末梢血を利用したミニ移植療法の安全性が確立されつつある。過半数例でプロウイルスの消失が観察され、一部の症例でその状態が持続していることから、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示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Imamura M, Asano S, Harada M, Ikeda Y, Kato K, Kato S, KawaK, Kojima S, Morishima Y, Morishita Y, Nakahata T, Okamura J, Okamoto S, Shiobara S, Tanimoto M, Tsuchida M, Atsuta Y, Yamamoto K, Tanaka J, Hamajima N, Koderu Y. Current status of hematopoietic cell transplantation for adult patients with hematologic diseases and solid tumors in Japan. *Int J Hematol* ;83:164-78, 2006
- 2 Kurihara K, Utsunomiya A, Okamura J, Kannagi M et al. Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I)-specific T-cell responses detected using three-divided glutathione -S-transferase (GST)-Tax fusion proteins. *J Immunol Methods* 313: 61-73, 2006.
- 3 Komori K, Hasegawa A, Kannagi M et al. Reduction of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) proviral loads in rats orally infected with HTLV-1 by reimmunization with HTLV-1-infected cells. *J Virol*, 80: 7375-7381, 2006.
- 4 Satou Y, Matsuoka M et al. The HTLV- I bZIP factor gene mRNA supports proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 720-725, 2006.
- 5 Tamaki H, Matsuoka M. Donor-derived adult T-cell leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *N Eng J Med* 354: 1758-1759, 2006.
- 6 Miyazato P, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, and Matsuoka M. De Novo Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of Human Lymphocytes in NOD-SCID, Common g-Chain Knockout Mice. *J Virol*, 80: 10683-10691, 2006.
- 7 Kato K, Taniguchi S, Utsunomiya A, Harada M et al. Allogeneic Bone Marrow Transplantation from Unrelated HTLV-I-negative Donors for Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Retrospective Analysis of Data from the Japan Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant* 13;90-99, 2007
- 8 Dewan M.Z., Tomonaga M, et al. : Efficient

intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood* 107(2) : 716-724, 2006

- 9 Morita Y, Heike Y, Kawakami M, Miura O, Nakatsuka S, Ebisawa M, Mori S, Tanosaki R, Fukuda Tawara M, Tomonaga M, et al.: Impact of p53 aberration on the progression of Adult T-cell Leukemia/ Lymphoma. *Cancer Lett* 234(2) : 249-55, 2006
- 10 T, Kim SW, Tobinai K, Takaue Y. Monitoring of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Cancer* 119:1360-1367, 2006

2. 学会発表

- 1 Utsunomiya A and Okamura J. Allogeneic stem cell transplantation in ATL: the Japanese experience. International Symposium of HTLV in Brasil. September, 19-22, 2006, Belo Horizonte, Brasil
- 2 Matsuoka M. Molecular mechanisms of leukemogenesis in HTLV-1 induced adult T-cell leukemia. THE 19TH INTERNATIONAL SYPOSIUM Infection, Cancer and Prevention. Tokyo, Japan, Feb 21-23, 2006.
- 3 Matsuoka M. Molecular mechanisms of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type I. FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON VIRAL ONCOLOGY RESEARCH. Padova, Italy, Apr 27-29, 2006.
- 4 Kawano N, Shimoda K, Ishikawa F, Taketomi A, Yoshizumi T, Shimoda S, Yoshida S, Uozumi K, Shinsuke S, Maehara Y, Harada M: ATL development from an HTLV-I carrier after a living-donor liver transplantation. *Transplantation* 82; 840-843, 2006
- 5 Tanosaki R, et al. A Retrospective Single Institute Analysis of 127 Lymphoma Patients Who Underwent Allogeneic Stem Cell Transplantation: Impact on Peripheral T-cell Lymphoma (PTCL) including ATLL. ASH 48th Annual Meeting, Dec 2006, Orlando, USA (Poster)
- 6 清水由紀子、栗原清、高森絢子、原嶋奈々江、宇都宮與、岡村純、神奈木真理. Tax-GST 融合タンパクに対する HTLV-I 感染者 T 細胞応答の多様性. 第 65 回に本癌学会学術総会 2006 年 9 月 28 日～30 日、横浜.
- 7 高森絢子、栗原清、清水由紀子、原嶋奈々江、崔日承、鶴池直邦、田野崎隆二、宇

都宮與、岡村純、神奈木真理.成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者における HTLV-I 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の機能不全. 第 65 回日本癌学会学術総会 2006 年 9 月 28 日～30 日、横浜.

- 8 高森絢子、栗原清、清水由紀子、原嶋奈々江、崔日承、鵜池直邦、田野崎隆二、宇都宮與、岡村純、神奈木真理.成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者における HTLV-I 特異的 T 細胞応答. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日～21 日、名古屋.
- 9 清水由紀子、栗原清、高森絢子、原嶋奈々江、宇都宮與、岡村純、西垣一男、増田貴夫、神奈木真理.無症候 HTLV-I 感染者における HTLV-I 特異的 T 細胞応答. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日～21 日、名古屋.
- 10 神奈木真理、成人 T 細胞白血病に対する抗腫瘍免疫の基礎と臨床.第 5 回大分血液講演会. 平成 18 年 4 月 15 日、大分
- 11 神奈木真理、免疫による HTLV-I 制御の基礎と臨床. 血液免疫腫瘍(HIT)カンファレンス. 平成 18 年 4 月 21 日、福岡。

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 18 年度厚生労働科学研究費補助金
(がん臨床研究事業) 研究報告書

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

概要

我々は、移植前の ATL 患者末梢血から樹立した IL-2 依存性 HTLV-I 感染細胞株を抗原刺激として用いる方法で、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、臨床経過との関係を検討した。第一期試験の長期寛解例 5 例のうち 4 例で免疫解析が可能であった。HTLV-I Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化は移植後 3 例で確認され、その時期は症例ごとに大きく異なり、2 例では再発を経て回復後に CTL 活性が検出された。4 例目では明らかな CTL 活性は認められなかった。初めの 3 例では移植前の自己末梢血単核球分画 (PBMC) から自発的に HTLV-I 感染細胞株の樹立が可能であった症例で、最後の 1 例は自発的な HTLV-I 感染細胞株ができなかったため HLA の一致した HTLV-I 感染細胞株を抗原に用いた症例である。これとは別に、4 人の HLA-A2, A24, あるいは両方を持つ未治療の急性 ATL 患者の ATL 細胞で、メジャーエピトープ Tax11-19 (HLA-A2 拘束) および Tax301-309 (HLA-A 24 拘束) 部位のアミノ酸配列を調べた。その結果、エピトープ配列はほぼ保存されており、そのうち 3 人の ATL 細胞は Tax 発現能も保持していた。以上から、ATL 細胞の HTLV-I 発現能が移植後の CTL 活性化に影響する可能性が示唆された。移植後 Tax 特異的 CTL の活性化が見られた症例では CTL 活性化と臨床経過の改善が関連しており、同定された CTL エピトープは免疫賦活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ンガンマ産生能 (ELISA 法) で評価した。

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 に委託して PE 標識 HLA-A0201/Tax11-19 ならびに HLA-A-2402/Tax301-309、HLA-A1101/Tax88-96、HLA-A1101/Tax272-280 を合成した。一部の末梢血サンプルの tetramer 解析は SRL に委託した。
5. DNA 配列：PBMC から DNA を抽出し Tax 領域を PCR 法で増幅したのち、エピトープ部位のシーケンシングを行いアミノ酸配列を決定した。

C. 研究結果

1. 長期寛解例の CTL 応答

第一期試験の長期寛解例 5 例のうち 4 例で免疫解析が可能であった。このうち 3 例では移植前の自己末梢血単核球分画 (PBMC) から自発的に HTLV-I 感染細胞株の樹立が可能であったが、1 例では細胞株ができなかったため HLA 完全一致ドナー (非感染) 由来の PBMC に試験管内で HTLV-I 感染させた細胞株を樹立し、抗原として用いた。HTLV-I Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化は移植後 3 例で確認され、その時期は症例ごとに大きく異なり、2 例では再発を経て回復後に CTL 活性が検出された。4 例目では明らかな CTL 活性は認められなかった。この症例は自己 HTLV-I 感染細胞株がとれなかった症例である。

2. ATL 細胞の Tax 発現能と CTL エピトープ配列

移植症例の中に急性期の ATL 細胞が入手できるものが無かったため、他の 5 例の HLA-A2、A24、あるいは両方を持つ未治療の急性 ATL 患者の ATL 細胞を用いて、Tax11-19 と Tax301-309 部位のアミノ酸配列を調べた。Tax 領域が PCR で増幅可能であった 4 人のうち 4 人とも HLA-A24 陽性であり、このうち 3 人の Tax301-309 は保存されていた。1 人で 304S→N のアミノ酸変異が認められたが、この症例は HLA-A2 も陽性であり Tax11-19 の配列は保存されていた。Tax11-19 は 4 人全例 (このうち HLA-A2 陽性は 2 例) で保存されていた。これら 4 例の内 3 例の ATL 細胞で、1 日培養による Tax 発現能を保持していることを確認した。

D 考察

長期寛解例 5 例のうち 3 例では経過中に Tax 特異的 CTL の活性化が観察された。CTL 活性の出現時期はまちまちであるが、2 例では一旦再発した後の寛解時であり、CTL 活性はそれ以降も持続した。一方、1 例では長期寛解を維持しているが Tax 特異的 CTL 活性化は認められ

ない。再発後に Tax 特異的 CTL の活性化が認められた症例においても、移植後 1 回目の寛解時には CTL 活性は認められなかった。移植直後の寛解時にはまだ免疫抑制剤投与の影響があることも理由の一つであろう。従って、造血幹細胞移植直後の寛解には Tax 特異的 CTL 活性化は必須ではなく、移植前の化学療法や GVH 応答がより強く影響すると考えられる。しかし、最初の寛解の後に再発する例があること、それらの例では Tax 特異的 CTL の活性化と臨床経過の改善とが関連していることから、Tax 特異的 CTL は寛解の維持に貢献しているのではないかと思われる。

また、CTL の活性化が、移植前に自発的 HTLV-I 感染細胞株が樹立された症例にのみに認められ、自発的 HTLV-I 感染細胞株が樹立できなかった症例では CTL 活性化が認められなかった点も興味深い。本研究で用いた実験系では、移植前の HTLV-I 感染細胞株は、末梢血中の感染細胞が HTLV-I を発現しなければ樹立できない。従って、ATL 細胞が Tax 発現能を保持しているかどうか、CTL 活性化に影響した可能性が考えられる。

残念ながら、移植症例は移植施設のある病院へ転院されてくるため急性期の血液検体は保存されていないことが多く、今回の症例の ATL 細胞が Tax 発現能を保持していたかどうかは知ることができない。別途行った急性 ATL 細胞の Tax アミノ酸配列の解析では、これらのエピトープのアミノ酸配列が概ね保存されていることが分かった。しかも、3/5 例では Tax 発現能も保持していた。これらの結果から、ATL 症例は Tax 発現能を保持しているものと失っているものに大別され、前者は Tax 特異的 CTL 応答を活性化し CTL による監視の対象となる可能性があると考えられた。

E 結論

骨髓非破壊的同種末梢血幹細胞移植後の長期寛解例のうち免疫解析の施行できた 4 例

中 3 例では経過中に Tax 特異的 CTL の活性化が観察された。このうち 2 例では再発後の再寛解時に Tax 特異的 CTL の活性化がおこり以後維持されたことから、これらの CTL は生体内の Tax 発現に応答して出現し寛解維持に貢献するのではないかと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- i) Komori, K., Hasegawa, A., Kurihara, K., Honda, T., Yokozeki, H., Masuda, T., and Kannagi, M. Reduction of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) proviral loads in rats orally infected with HTLV-1 by reimmunization with HTLV-1-infected cells. *J Virol*, 80: 7375-7381, 2006.
- ii) Kurihara, K., Shimizu, Y., Takamori, A., Harashima, N., Noji, M., Masuda, T., Utsunomiya, A., Okamura, J., and Kannagi, M. Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I)-specific T-cell responses detected using three-divided glutathione-S-transferase (GST)-Tax fusion proteins. *J Immunol Methods*, 313: 61-73, 2006.
- iii) Kubo, M., Nishitsuji, H., Kurihara, K., Hayashi, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by arginine deiminase of *Mycoplasma arginini*. *J Gen Virol*, 87: 1589-1593, 2006
- iv) Kanzawa, N., Nishigaki, K., Hayashi, T., Ishii, Y., Furukawa, S., Niuro, A., Yasui, F., Kohara, M., Morita, K., Matsushima, K., Le, M. Q., Masuda, T., and Kannagi, M. Augmentation of chemokine production by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF-kappaB activation. *FEBS Lett*, 580: 6807-6812, 2006.
- v) Hamamoto, S., Nishitsuji, H., Amagasa, T., Kannagi, M., and Masuda, T. Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates

efficient viral cDNA synthesis in vivo. *J Virol*, 80: 5670-5677, 2006.

- vi) Nishitsuji, H., Kohara, M., Kannagi, M., and Masuda, T. Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *J Virol*, 80: 7658-7666, 2006.
- vii) 神奈木真理. ATL における腫瘍免疫研究の進歩と臨床応用の可能性. *血液・腫瘍科*, 52 (2) 134-141, 2006.
- viii) 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. *日本エイズ学会誌*, 8 : 82-84, 2006.

2. 学会発表

- i) 清水由紀子、栗原清、高森絢子、原嶋奈々江、宇都宮與、岡村純、神奈木真理. Tax-GST 融合タンパクに対する HTLV-I 感染者 T 細胞応答の多様性. 第 65 回日本癌学会学術総会 2006 年 9 月 28 日～30 日、横浜.
- ii) 高森絢子、栗原清、清水由紀子、原嶋奈々江、崔日承、鶴池直邦、田野崎隆二、宇都宮與、岡村純、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者における HTLV-I 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の機能不全. 第 65 回日本癌学会学術総会 2006 年 9 月 28 日～30 日、横浜.
- iii) 高森絢子、栗原清、清水由紀子、原嶋奈々江、崔日承、鶴池直邦、田野崎隆二、宇都宮與、岡村純、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者における HTLV-I 特異的 T 細胞不応答. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日～21 日、名古屋.
- iv) 清水由紀子、栗原清、高森絢子、原嶋奈々江、宇都宮與、岡村純、西垣一男、増田貴夫、神奈木真理. 無症候 HTLV-I 感染者における HTLV-I 特異的 T 細胞応答. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月 19 日～21 日、名古屋.
- v) 神奈木真理. 成人 T 細胞白血病に対する抗

腫瘍免疫の基礎と臨床.第5回大分血液講演会.
平成18年4月15日、大分

vi) 神奈木真理、免疫による HTLV-I 制御の基礎と臨床. 血液免疫腫瘍(HIT)カンファレンス.
平成18年4月21日、福岡。

vii) 神奈木真理、ATL と CTL 活性.HTLV-I 関連疾患に関する連続公開講座、第7回。平成19年1月27日、東大医科学研究所。

viii) 神奈木真理、抗ウイルス療法としての同種移植療法：ATL. 第29回日本造血細胞移植学会総会、特別セミナー2. 平成19年2月17日、福岡。

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、ゲノムに組み込まれた HTLV-I プロウイルスは ATL 細胞に残る唯一の感染の証拠である。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ことも期待される。今回、移植後にドナーの HTLV-I 感染細胞に由来する ATL が発症した症例の解析から、宿主免疫能の重要性、tax 遺伝子発現の意義が示された。また移植症例の解析から tax 遺伝子の発現が障害されている症例で移植後に再発が認められ、移植後の抗ウイルス免疫の重要性が示唆された。

A. 研究目的

ATL 細胞に残る HTLV-I 感染の証拠はプロウイルスであり、その解析は病態のみならず造血幹細胞移植療法有効性の分子基盤を明らかにし、移植療法の予後予測への応用も期待される。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。これは生体内では Tax は主要な細胞傷害性 T リンパ球の標的分子であるため Tax を発現しない ATL 細胞が選択されてきたものと考えられる。本研究では移植症例における HTLV-I プロウイルスの解析を通じて移植療法の有効性とウイルス遺伝子発現の関連を明らかにする。また移植後は強い免疫抑制状態にあるためにウイルス発がんが懸念されるが、ドナー HTLV-I 感染細胞に由来する ATL 発症を明らかにした。

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。tax 遺伝子の発現は RT-PCR 法により解析した。

(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

1) ドナー由来 ATL の発症：

再発したリンパ腫型 ATL 患者に HLA 一致同胞 (HTLV-I 陽性者) からの移植を行った。移植後に ATL が再発したが、この時の T リンパ球のキメリズム解析でドナー型であることが示された。この ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスを解析したところ、完全型プロウイルス 1 コピーがゲノムに組み込まれていた。組み込み部位を使った腫瘍特異的 PCR により腫瘍細胞の検出を行った所、移植後 3 週間で ATL 細胞が出現していることが示された。また、ドナー体内におけるこの HTLV-I 感染クローンの存在を解析してみるとドナー末梢血単核球中にこのクローンの存在が証明された。このことから、この HTLV-I 感染細胞はドナー体内に存在しており、移植に伴いレシピエント体内に移入され ATL となったことが示された。また、この ATL 細胞のプロウイルス DNA メチル化の解析からプロウイルス内部に DNA メチル化の蓄積を認め、ドナー体内にある期間存在した HTLV-I 感染細胞であることが示唆された。

2) 移植症例の解析

移植症例の内、5'側 LTR の欠損した 2 型欠損型プロウイルスを有するものを同定した。このような場合、組み込み部位によってはゲノムに存在する細胞側遺伝子プロモーターをプロウイルスがトラップしている可能性がある。解析できたケースでは、プロウイルスは細胞側プロモーターをトラップしていなかった。このため tax 遺伝子の発現はないことが予想され、本症例は移植後に ATL を再発していた。

D. 考察

移植による免疫抑制によりウイルス発がんが促進されることは Epstein-Barr virus (EBV), Kaposi-sarcoma associated herpesvirus (KSHV) などで報告されている。また後天性免疫不全症候群では、EBV, KSHV による発がんだけでなく HPV による子宮頸癌などの発症促進も報告されている。これは免疫系による腫瘍細胞の増殖抑制が無くなるのが大きな原因として考えられている。HTLV-I においても慢性腎不全キャリアに腎臓移植を行った後に ATL 発症が報告されている。本症例は HTLV-I キャリアドナーからの移植でドナー感染細胞が短期間に腫瘍となっている。ドナーには ATL の発症は認められず、ドナー体内では免疫系により増殖がコントロールされていた HTLV-I 感染細胞クローンが移植という免疫抑制状態で短期間に悪性化したものと理解される。このような免疫抑制状態では免疫原性の高い Tax の発現が抑制を受けないことが予測される。本症例の ATL 細胞は tax 遺伝子の発現が認められており、この仮定と一致する所見である。

移植 ATL 症例での解析から、殆どの症例では tax 遺伝子を発現できるプロウイルスを有していた。しかし、5'側 LTR が欠損するプロウイルス (2 型欠損型) を有している症例も存在した。この内、1 例で組み込み部位の同定で tax 遺伝子の発現ができない構造であることが確認された。この症例は、移植後に ATL が再発しており、抗ウイルス免疫反応が ATL 再発を抑制していることを示しているのかもしれない。今後、症例の蓄積によりウイルス遺伝子発現と移植療法の関連が明らかになることが期待される。

E. 結論

今年度の解析から HTLV-I 陽性ドナーからの移植に関しては、ドナー細胞からの発症にも注意を要することが明らかになり、移植療法の適応は慎重に検討する必要がある。また、tax 遺伝子発現と移植成績・予後に関して今後、蓄積される症例の解析は、移植療法の適応を考える意味からも必要なデータであることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Satou Y, Yasunaga J-I, Yoshida M, and Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene

mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 720-725, 2006.

Miyazato P, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, and Matsuoka M. De Novo Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of Human Lymphocytes in NOD-SCID, Common γ -Chain Knockout Mice. J Virol, 80: 10683-10691, 2006.

Tamaki H, Matsuoka M. Donor-derived T-cell leukemia after bone marrow transplantation. N Engl J Med 354(16):1758-9, 2006.

Ahsan MK, Yamaguchi Y, Kim Y-C, Nishinaka Y, Maeda M, Yodoi J, Nosaka K, Matsuoka M. Masutani H. Loss of interleukin-2-dependency in HTLV-I-infected T-cells on gene silencing of thioredoxin-binding protein-2. Oncogene 25:2181-91, 2006.

Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I. The Lymphomas SECOND EDITION. p464-475, 2006.

2. 学会発表

Matsuoka M. Transmission and natural course of HTLV-I infection. THE 19TH INTERNATIONAL SYPOSIUM Infection, Cancer and Prevention. Tokyo, Japan, Feb 21-23, 2006.

Matsuoka M. Molecular mechanisms of leukemogenesis in HTLV-I induced adult T-cell leukemia. THE 19TH INTERNATIONAL SYPOSIUM Infection, Cancer and Prevention. Tokyo, Japan, Feb 21-23, 2006.

Matsuoka M. Molecular mechanisms of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type I. FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON VIRAL ONCOLOGY RESEARCH. Padova, Italy, Apr 27-29, 2006.

Matsuoka M. IX International Symposium on HTLV in Brasil. Belo Horizonte, Brasil, Sep 19-22, 2006.

Satou Y, Yasunaga J-I, Yoshida M, Ohshima K, and Matsuoka M. HTLV-I bZIP Factor Gene, Encoded by the Minus Strand of HTLV-I Provirus, Is Critical for Pathogenesis of HTLV-I Associated Diseases. The American Society of Hematology 48th Annual Meeting and Exposition. Orlando, Florida, Dec 9-12, 2006.

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

なし

「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、日本骨髄移植推進財団を介した非血縁骨髄移植の結果を解析した。33 症例の移植結果は、移植後一年の、全生存率 49.5%、非進行生存率 49.2%、ATL 進行 18.6%、移植関連死亡 32.3%であった。移植前治療において、骨髄破壊的前治療 27 例、骨髄非破壊的前治療 6 例であり、単変量解析で移植前治療は有意な予後因子とは同定されなかった。

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。患者が比較的高齢であるため、HLA一致同胞からの移植が困難なことが多い。今回、日本骨髄移植推進財団（JMDP）を介したATLに対する移植成績を後方視的に解析した。

B. 研究方法

1999年から2004年までに、JMDPを介して行われた33例の移植を後方視的に解析した。

C. 研究結果

患者年齢の中央値は49歳（24-59）、ATL診断から移植まで期間中央値は8ヶ月、移植時病期は、CR13例、PR2例、NR14例であった。移植前治療は、骨髄破壊的27例、そのうち22例は放射線照射を使用、骨髄非破壊的6例であった。

生着は89%の症例で確認された。GradeII-IVの急性GVHDは61%に発症した。移植後一年の、全生存率49.5%、非進行生存率49.2%、ATL進行18.6%、移植関連死亡32.3%であった。

死亡は14例であり、その原因はATL進行2例、不明3例、移植関連死亡9例であった。

予後を単変量解析すると、患者年齢と移植時病期が有意な予後因子として同定され、多変量解析では、患者年齢が有意な予後因子として同定された。患者年齢50歳以上の50歳未満に対する相対危険度(relative risk),3.47; 95% CI, 1.03-11.6; P=.044). であった。移植時病期の相対危険度は(NR vs CR or PR; relative risk, 3.17; 95% CI, 0.96-10.5; P=.059)と統計学的に有意な

傾向があった。

移植前治療において、骨髄破壊的前治療 27 例、骨髄非破壊的前治療 6 例であり、単変量解析で移植前治療は有意な予後因子とは同定されなかった。

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。

今回の検討で、ATL に対する非血縁骨髄移植が実施可能であることが明らかとなった。また少数例の検討であるが、移植前治療は有意な予後因子として同定されず、高齢者に多い ATL において非血縁ドナーからの骨髄非破壊的前治療による骨髄移植の有用性を示唆した。

ただし、移植時病期が CR が多かったことは、JMDP からのコーディネイト期間が平均 5 ヶ月間要することを勘案すると、コントロールの良い ATL 症例がより多く非血縁骨髄移植が可能であったセレクションバイアスが存在する可能性を示唆する。

E. 結論

難治性血液腫瘍である ATL 患者で、日本骨髄移植推進財団を介した非血縁骨髄移植の結果を解析した。33 症例の移植結果は、移植後一年の、全生存率 49.5%、非進行生存率 49.2%、ATL 進行 18.6%、移植関連死亡 32.3%であった。

この結果は有望であるが、今後、前向きの臨床試験により JMDP からの骨髄非破壊的前治療による骨髄移植の有用性を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato K, Kanda Y, Eto T, Muta T, Gondo H, Taniguchi S, Shibuya T, Utsunomiya A, Kawase T, Kato S, Morishima Y, Kodera Y, Harada M; Japan Marrow Donor Program. Allogeneic bone marrow transplantation from unrelated human T-cell leukemia virus-I-negative donors for adult T-cell leukemia/lymphoma: retrospective analysis of data from the Japan Marrow Donor Program. *Biol Blood Marrow Transplant* 13;90-99, 2007
2. Shide K, Shimoda K, Kamezaki K, Kakumitsu H, Kumamo T, Numata A, Ishikawa F, Takenaka K, Yamamoto K, Matsuda T, Harada M: Tyk2 mutation homologous to V617F Jak2 is not found in essential thrombocythaemia, although it induces constitutive signaling and growth factor independence. *Leuk Res.* (in press)
3. Kim SW, Tanimoto TE, Hirabayashi N, Goto S, Kami M, Yoshioka S, Uchida T, Kishi K, Tanaka Y, Kohno A, Kasai M, Higuchi M, Mori S, Fukuda T, Izutsu K, Sao H, Ishikawa T, Ichimohe T, Takeuchi K, Tajima K, Tanosaki R, Harada M, taniguchi S, Tobinai K, Hotta T, Takaue Y: Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. *Blood* 108: 382-389, 2006
4. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Miyamoto T, Aoki K, Takase K, Henzan H,

Himeji D, Koyoma T, Miyake K, Inoue Y,
Nakashima H, Otsuka T, Tanaka Y, Nagasawa
K, Harada M: A phase - trail of autologous
peripheral blood stem cell transplantation in
the treatment of refractory autoimmune
disease. Ann Rheum Dis 65; 508-514,2006

5. Kawano N, Shimoda K, Ishikawa F, Taketomi
A, Yoshizumi T, Shimoda S, Yoshida S,
Uozumi K, Shinsuke S, Maehara Y, Harada
M: ATL development from an HTLV-I carrier
after a living-donor liver transplantation.
Transplantation 82; 840-843, 2006

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

九州地区において実施されている成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATLL)に対する
同種造血幹細胞療法の検討
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

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は、国内、中でも九州地区を中心に実施されていると考えられる。本研究班を中心としてATLLに対する減弱した前処置 Reduced intensity conditioning, RIC) を用いた同種造血幹細胞移植の臨床第I, II層試験が実施される一方で、臨床現場では通常強度を持つ前処置 (Standard conditioning transplantation, SCT) 後に実施される通常同種造血幹細胞移植、RICともにATLLに対する通常診療のひとつとして実施されているものと考えられる。これまでに国内より複数のATLLに対する同種造血幹細胞移植成績が報告されているがいずれも母数が少なく、全体像を伺うことはできない。今回、国内でも最も移植が行われていると思われる九州地区においてどの程度の移植が行われ、その成績がどの邸であるかを調査した。

B 研究方法

九州内の主な移植施設にアンケート調査を行い、2003年から2005年にかけて実施された同種造血幹細胞移植の症例数調査を行った。その後、ATLL に対する同種造血幹細胞移植についての二次調査を実施した。

C 研究結果

1) 3年間における九州内での同種造血幹細胞移植数。

九州内の13施設より一時アンケートに対する回答を得られた。これらの13施設で3年間に実施された同種造血幹細胞移植の総数は582で、急性骨髄性白血病に対する移植が最もおおく186例であった。ATLLに対する移植がそれに次ぎ98例であった。この98例についてさらに調査を行い、移植成績を解析した。

2) ATLL に対する同種造血幹細胞移植 98 例のなかで、全身放射線照射 12Gy もしくはブスルファン 16mg/kg 相当を含む、いわゆる骨髄破壊的前処置を受けたのは 52 例 (53.1%) で、RIC 移植は 46 例 (47%) に行われていた。前処置法の違いによって患者年齢中央値は異なっており SCT 群で 48 才 (26 から 57 才)、RIC 群で 56 才 (41 から 67 才) であった。移植前の化学療法に寛解・部分寛解を示したのは (化学療法感受性あり)、SCT 群で 32/52 例 (61.5%)、RIC 群で 31/44 例 (70%) であった。非血縁ドナーは SCT, RIC 群でそれぞれ 25 例、18 例であり、全体的に見ても 40%以上が非血縁ドナー (つまりバンクを介する) 移植であった。治療後死亡は SCT, RIC それぞれ 34 例と 28 例であり、死因の多くは治療関連死亡と再発によるものであった。3年前生存率は SCT で 30.7%、RIST で 30.1%であり、3年DFSは46.2%と42%であった。生存に関しては両者に差を認めなかった。

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。

今回の調査で、九州内では積極的に ATLL に対する同種造血幹細胞移植が実施されている状況が浮き彫りになった。前処置の強度によって DFS, OW いずれも著変なく、同種移植後の ATLL コントロールには前処置の強度は大きな影響を持たない可能性が示唆された。しかし今回の調査はあくまで後方視的なものであり、治療成績を明らかにするには前向き試験が必要であると考えられた。

E 結論

九州内で実施された ATL に対する標準的前処置並びに RIST による Allo-HSCT の調査を行った。ATLL に対して積極的に移植が実施されている様子が明らかとなった。

G 研究発表

1. 論文発表

1. Dewan M.Z., Tomonaga M, et al. : Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult T-cell leukemia cells by an HIV protease inhibitor, ritonavir. *Blood* 107(2) : 716-724, 2006
2. Inoue Y, Tomonaga M, et al: Chemokine expression in human erythroid leukemia cell line AS-E2 : macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 is induced by inflammatory cytokines. *Exp Hematol* 34(1) : 19-26, 2006
3. Tsukasaki K, Tomonaga M, et al.: Comparative genomic hybridization analysis of Japanese B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with clinical course. *Leuk Lymphoma* 47(2) : 261-266, 2006
4. Tawara M, Tomonaga M, et al.: Impact of p53 aberration on the progression of Adult T-cell Leukemia/ Lymphoma. *Cancer Lett* 234(2) : 249-55, 2006
5. Taguchi J, Tomonaga M, et al. : Expression of the myeloperoxidase gene in AC133 positive leukemia cells relates to the prognosis of acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 30(9) : 1105-1112, 2006
6. Harasawa H, Tomonaga M, et al : Survey of chemokine receptor expression reveals frequent co-expression of skin-homing CCR4 and CCR10 in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma* 47(10) : 2163-73, 2006

成人T細胞白血病とFoxp3遺伝子発現の研究

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

免疫療法において、病巣部位における免疫反応細胞の働きは重要である。成人T細胞性白血病（ATL）細胞は、制御性T細胞に類似する表面形質（CD4+、CD25+）を有する。制御性T細胞に特異的であるとされるFoxp3遺伝子発現を成人T細胞性白血病症例で検討した。ATL症例のFoxp3遺伝子発現状態にばらつきを認めたが、明らかに高いFoxp3発現のATL細胞が存在する。その発現量の個々の違いが、ATLの易感染性や経過の違いと関係しているのかも知れない。ATLは制御性T細胞の癌化ではない。

A. 研究目的

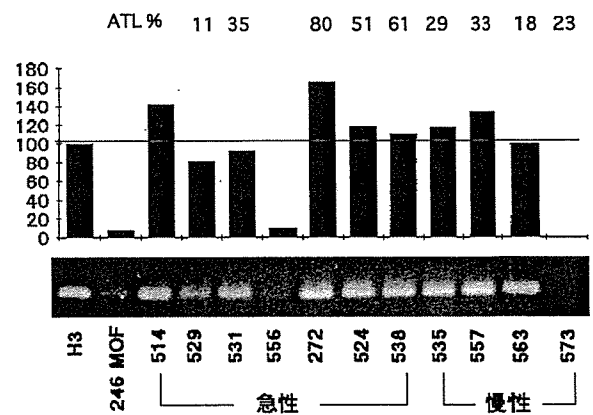
制御性T細胞は、表面形質でCD4+CD25+で、胸腺CD4の5%、末梢血CD4の5~10%を占め、Foxp3遺伝子を特異的に高発現し、自己反応性リンパ球を抑制することで免疫的自己寛容をもたらす機能を有するとされている。

乳癌および膵臓癌の担癌患者では制御性T細胞が末梢血CD4+リンパ球の中に多いために免疫が低下して癌の排除ができない。臨床における具体例として報告されている。

成人T細胞性白血病（ATL）細胞は、制御性T細胞に類似する表面形質（CD4+、CD25+）を有している。

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、今回、制御性T細胞に特異的であるとされるFoxp3遺伝子発現を成人T細胞性白血病症例で検討した。

ATL患者の急性、慢性におけるFoxp3発現比較



B. 研究方法

1. ATL患者検体：22例（急性/リンパ性14例、慢性4例、くすぶり型4例）でFoxp3遺伝子発現を検討した。ATL細胞株MT-2、Hut 102も検討した。
2. 末梢血MNC、リンパ節（LN）あるいは腫瘍生検組織からRNAを抽出、cDNAを作成し、Foxp3 primerで40 cycle PCRを行った。
3. ピーズ法にてCD4細胞、CD25細胞分離をおこなった。
4. Foxp3遺伝子発現量をdensitometryで計測し、健康人PB中のMNCと比較検討した。
5. 細胞増殖抑制反応を、PHA、SEB刺激にて増殖するCD4+CD25-細胞に、CD25+細胞を加えて検討した。
6. (倫理面への配慮)

Foxp3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。リンパ節（LN）あるいは腫瘍生検組織・末梢血よりリンパ球細胞分画を採取し、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。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。

急性ATLにおけるFoxp3の発現

