

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）に対する同種幹細胞移植療法の開発と  
そのHTLV-1排除機構の解明に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

平成20（2008）年4月

主任研究者 岡村 純

（独立行政法人国立病院機構 九州がんセンター臨床研究部）

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する同種幹細胞移植療法の開発と  
その HTLV-1 排除機構の解明に関する研究 岡村 純 ----- 1

### II. 分担研究報告

1. 宿主抗腫瘍免疫応答解析 神奈木真理 ----- 9
  2. ATLの分子生物学的解析 松岡 雅雄 ----- 12
  3. ATLに対する同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試み  
豊嶋 崇徳 ----- 15
  4. 中枢神経浸潤を来した成人T細胞白血病・リンパ腫に対する  
同種造血幹細胞療法を検討 朝長万左男 ----- 17
  5. ATLに対する同種造血幹細胞移植後再発例の検討  
宇都宮 與 ----- 19
  6. 成人T細胞白血病リンパ腫(ATLL)に対する臍帯血移植の方向性  
谷口 修一 ----- 22
  7. 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研究班  
田野崎隆二 ----- 24
  8. ATLに対する骨髄非破壊的移植療法の実施 増田 昌人 ----- 26
  9. 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 ----- 28
  10. ATLに対する同種造血幹細胞移植 今村 雅寛 ----- 31
  11. ATLの分子細胞遺伝学的解析と治療効果の判定  
谷脇 雅史 ----- 33
  12. 臨床試験の計画と解析, ATLレトロスペクティブデータ  
山中 竹春 ----- 36
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 38

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

総括研究報告書

成人 T 細胞白血病（ATL）に対する同種幹細胞移植療法の開発と  
その HTLV-1 排除機構の解明に関する研究  
（H19-がん臨床-一般-013）

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

ATL に対して同種造血幹細胞を利用した骨髄非破壊的移植療法（RIST）の前向き試験を実施中である。平成 19 年度は、第 2 期試験と同一の前処置（フルダラビン・ブスルファン）による血縁者間末梢血による第 3 期試験臨床試験を実施した。試験は 21 施設の倫理委員会で承認され、平成 20 年 3 月現在、9 例の移植が実施された。また、高齢者 ATL 患者に対する非血縁ドナーを介した RIST の実施の可能性を検討する第 3 期試験（第 I 相）の実実施計画書を作成した。感染 HTLV-1 の分子生物学的特徴や移植後の T 細胞応答状況の解析と臨床経過との関連から、RIST における抗 HTLV-1 免疫の役割（すなわち排除機構）が明らかになりつつある。

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  | 京都大学ウイルス研究所 | 教授    |
| 4. 豊嶋 崇徳  | 九州大学医学部     | 准教授   |
| 5. 朝長万左男  | 長崎大学医学部     | 教授    |
| 6. 宇都宮 與  | 慈愛会今村病院分院   | 院長    |
| 7. 谷口 修一  | 虎の門病院       | 部長    |
| 8. 田野崎隆二  | 国立がんセンター    | 医長    |
| 9. 増田 昌人  | 琉球大学医学部     | センター長 |
| 10. 鵜池 直邦 | 九州がんセンター    | 部長    |
| 11. 今村 雅寛 | 北海道大学大学院    | 教授    |
| 12. 谷脇 雅史 | 京都府立医科大学    | 教授    |
| 13. 山中 竹春 | 九州がんセンター    | 研究員   |

A. 研究目的

本研究の目的は、極めて予後不良の ATL に対して、免疫機序を応用した革新的治療法を開発することである。これまでに得られた臨床試験結果を普遍化するため、本研究では、移植幹細胞源を非血縁者まで拡大して RIST の検証的臨床試験を行う。また ATL に対する RIST の HTLV-1 排除機構を解明して、新たな免疫療法の開発に応用する。

B. 研究方法

1) ATL に対する血縁者間末梢血幹細胞を利用した骨髄非破壊的前処置療法による同種造血幹細胞移植術（RIST、ミニ移植）の安全性と有効性に関する検討  
第 3 期臨床試験の実施：第 2 期試験と前処置を同一にした臨床試験（NST-3、臨床第 2 相）を開始した。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-1）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。

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）非血縁者間骨髄移植（UBMT）の検討：近年、日本骨髄バンク（バンク）を介しての非血縁者間骨髄移植でも骨髄非破壊的前

処置(RIST)症例が増えている。Day100 報告書により 1998-2005 年に行われた 81 例の ATL に対するバンク非血縁者間同種骨髄移植を後方視的に解析した。

(2-2) 非血縁者間骨髄を利用した RIST の前向き臨床試験(第 4 期試験)の検討: 骨髄バンクドナーを介した RIST の前処置で使用される薬剤や投与量等については、定まったレジメンがなく、安全性について検討されていないことから実験的な治療段階といわざるを得ない。したがって、骨髄バンクからの非血縁骨髄を幹細胞源とした RIST が、許容できる安全性を担保して実施可能なのは現時点で不明である。そこで、骨髄バンクドナーを介した高齢者 ATL 患者に対する RIST の実施可能性を検討する第 I 相試験が不可欠であると考え、実施計画書を計画した。

### 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  $\beta$ -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(Light Cycler)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。

(3-3) 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析: A) 骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植の前後および未治療慢性 ATL 患者の末梢

血単核球分画 (PBMC) を分離し、細胞表面マーカーを抗体で染色するとともに、HLA 型に応じてテトラマー染色を行ない、FACS で解析した。B) T 細胞活性の検定: Tax 蛋白あるいはペプチドを PBMC に加えて培養し、細胞内サイトカイン染色あるいは ELISA でインターフェロン産生を測定した。C) テトラマー: 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。一部のテトラマーは MBL(株)から購入した。D) PBMC を dish に付着させた後 GM-CSF と IL-4 で定法に基づき樹状細胞の誘導を行なった。

(3-4) ATL 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。

(3-5) 同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試み: レシピエントマウス(B6D2F1)を全身放射線照射 10Gy で前処置後、ドナーマウス(B6)より採取した骨髄細胞( $5 \times 10^6$ )および脾細胞( $5 \times 10^6$ )を移植した。白血病モデルとして、DBA/2 由来の P815 を静脈内投与( $5 \times 10^4$ )した。NKT 細胞リガンドである  $\alpha$ -galactosylceramide (KRN7000) 100 mg/kg あるいは vehicle を移植後 day 4.6.8 に腹腔内投与した。

#### (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ている。研究で得られた結果は、匿名化するとともに、日本臨床支援ユニットおよび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に対する血縁者間末梢血幹細胞を利用した骨髄非破壊的前処置療法による同種造血幹細胞移植術 (RIST、ミニ移植) の安全性と有効性に関する検討

第3期臨床試験の実施：参加予定の19施設の倫理委員会では実施計画書が承認された。1例目の登録から16ヶ月間で10例が登録され、9例の移植が終了した。6例が移植後6ヶ月以上経過し、3例は100日未満である。移植直後の1例を除く8例で生着が確認され、移植関連合併死亡 (TRM) は1例、現病死が3例である。4例は、移植後384日、327日、124日、115日で無病生存中である (2008年2月現在)。

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) 非血縁者間骨髄移植 (UBMT) の検討：男性49例、女性32例。前処置は、骨髄破壊的前処置 (CST) が55例、RIST26例。年齢中央値はCST46歳、RIST55歳。移植前処置はCSTでTBI/CY、RISTでFlu/Bu/TBIが主なものであったが、RISTの8/26例は非照射前処置で行われた。移植後16日以内の早期に死亡した8例を除き全例で生着を認めた。1度以上の急性GVHDはCSTで77%、RISTで67%と有意差はなかったが、発症時期がRISTで遅れる傾向にあった。6ヶ月全生存率・無再発生存率はCSTで64%、52%、RISTで52%、50%と有意差は認めなかった。50歳以上の症例でもCST:44%、38%、RIST:47%、46%と有意差は認めなかったが年齢中央値に差を認めた (51対56歳)。死因では、現病死はCST13%、RIST12%で、TRMは29%、35%であった。多変量解析の結果では有意差はなかったが、50歳以上の症例で、RIST、寛解期の移植、Grade1のGVHDが予後良好因子である可能性が示唆された

(2-2) 非血縁者間骨髄を利用したRISTの前向き臨床試験 (第4期試験) の検討：移

植前処置としては、これまでの本研究班のRISTで用いられてきたフルダラビン・ブスルファンを採用し、また生着をより確実にするために低線量放射線全身照射 (TBI) 2Gyを施行する。またGVHD予防については、非血縁者間移植で広く用いられているタクロリムス+短期メソトレキセートを使用することとした。対象は、50歳以上70歳未満の急性型あるいはリンパ腫型で、血縁ドナーが存在しない患者とし、100日の生存と完全キメラ達成を主要評価項目とした。

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：登録38例中36例がRIST後の末梢血中のHTLV-1プロウイルス量の評価が可能であった。RIST後4ヶ月以内に36例中21例でHTLV-1プロウイルス量が検出限界以下 (<0.5コピー/1,000PBMC) に低下した。RIST後12ヶ月以上生存した14例中8例が検出限界以下であった。

(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登録された38例全例でドナー・レシピエントの識別が可能であり、長期寛解例において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：

ATL患者におけるテトラマー解析：移植前のATL患者PBMCにTax特異的CTLがテトラマーで検出される例が散見されたため、未治療の慢性ATL患者に対象を広げ解析したところ、頻度は低い慢性ATL患者にもテトラマー陽性細胞が検出された。しかし、移植後の長期寛解例に検出されるCTLとは異なり、抗原刺激に対する増殖反応やサイトカイン産生応答が認められなかった。テトラマー解析のできない症例については、GST-Tax蛋白を抗原として用いて解析したところ、ATLの前段階ですでにTax特異的T細胞応答の低下している例が認められた。

ATL患者末梢血からの樹状細胞分離に関する検討：慢性ATL患者PBMCをdishに付

着させたと、付着細胞数は健丈者より少ないが、これは PBMC 中の ATL 細胞数が多いため非感染細胞が相対的に少なくなったためと考えられる。これらの細胞は GM-CSF と IL-4 を添加して培養した後に樹状細胞へ分化し、細胞治療への使用は可能と考えられた。

### (3-4) HTLV-I の分子生物学的解析：

**移植症例における tax 遺伝子：**移植症例における HTLV-I プロウイルスの解析と予後の関連を解析している。今年度は第二期移植の 11 症例を解析し、1 例で tax 遺伝子内に 1 塩基 (7407) の挿入を認めた。この挿入によりフレームシフトが起こり Tax と 30 アミノ酸が一致するが、その後は全く異なるアミノ酸配列となるタンパク質が産生され、Tax は産生されないと予想される。本症例が、この変異プロウイルスのみを有するのかは現在、解析中である。本症例は無再発生存中であり、少なくとも本症例における寛解維持には Tax に対する免疫応答は働いていないことが予想された。他に 5'側 long terminal repeat を欠くプロウイルスを有する症例があり、解析中である。ATL 細胞は Fas 抗原からのシグナルにも高感受性であり細胞傷害性 T リンパ球からの攻撃に弱いと予想される。このため移植後の GVHD により治療効果が得られている可能性がある。今後、Tax を始めとするウイルス抗原に対する免疫反応が移植治療効果にどのように関与するかを更に明らかにすべく移植症例の解析を継続していく予定である。

**移植症例における HBZ 遺伝子：**HTLV-I プロウイルスでマイナス鎖にコードされる HBZ 遺伝子の配列を検索し全ての症例で保存されていることを確認した。これまで HBZ に対する免疫応答は確認されていないが、今後、抗 ATL 免疫反応に関して検討を行う予定である。

**5'側 LTR を欠失する欠損型プロウイルスの解析：**5'側 LTR を欠失するプロウイルスがキャリアと比較して ATL に多く見られることを明らかにし、その組み込み部位の塩基配列の解析から、組み込み前に 5'側 LTR を欠失する場合と、組み込み後に 5'側 LTR を欠失するケースがあることを示した。組み込み前に欠失したプロウイルスで tax 遺伝子の第二エクソンを有しないものがあり、Tax 発現が発がんには必須ではないことが示唆された。また全ての症例で HBZ 遺伝子の配列は保たれており、発がん過程における HBZ 遺伝子の重要性が示された。

**(3-5) 同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試み：**KRN7000 投与群では非投与群と比較し、全生存率が有意に高く、GVHD 死亡率と白血病死亡率は有意に低かった ( $P < 0.05$ )。また KRN7000 投与群では急性 GVHD による胸腺傷害が軽減し、免疫再構築の改善がみられた。このように KRN7000 は GVHD を軽減し、GVL を増強させることにより移植成績を改善することが示された。

## D. 考察

これまでの第 1 相臨床試験の結果から、RIST は従来型の骨髄破壊の移植法と比較して、治療関連毒性が軽度で、高年齢の ATL 患者でも十分に実施可能なことが証明された。現在進行中の第 2 相臨床試験において、その有効性を検証中である。一方、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 RIST の安全性と有効性を検証する必要があると考えた。非血縁骨髄 (骨髄バンク) を使用する方法について後ろ向き解析を行った結果、非照射前処置例も含め、生着不全は問題とはならず、骨髄バンクドナーからの RIST の feasibility はあると考えられた。そこで、前向きの臨床試験により その安全性・有効性を確かめることが望ましいと考えられ、実施計画書を作成した。今後は、倫理委員会の承認を経て臨床試験を開始する予定である。

臨床試験に付随した基礎研究の結果からは以下のことが示唆された。神奈木班員は、未治療 ATL にも、Tax の CTL メジャーエピトープが生体内で発現され、これを認識する CTL が維持されている例が存在することを明らかにした。しかし、これらの CTL は機能不全状態にある。従って、これらの症例では、メジャーエピトープ配列のペプチドを標的とする免疫療法により、Tax 特異的 CTL 応答が回復する可能性があると考えられた。松岡班員による、5'側 LTR を欠失するプロウイルスの解析から、感染時から Tax を発現できない構造のプロウイルスを有する ATL 症例が存在し、Tax は必ずしも腫瘍化には必須ではないことが示された。

一方、プロウイルスのマイナス鎖にコードされるHBZ遺伝子の構造・発現は保存されており、HBZ遺伝子の発がんにおける重要性が示された。登録移植症例の解析からは、Taxに対するCTLによる免疫応答が抗腫瘍効果に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。しかし、今回の解析からTaxを発現できない症例でも寛解が維持されており、Tax以外の抗原に対する免疫応答の重要性が浮かび上がってきた。そのような抗原としてはTax以外のウイルス抗原やアロ抗原が考えられる。プロウイルスと移植成績・予後に関して、臨床試験により蓄積される症例の解析は、その有効性を明らかにする上で重要である。豊嶋班員は、NKT細胞を利用してGVHDとGVLの分離が達成できる可能性を初めて示した。今後、その機序の解明をすすめる予定である。

## 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の末梢血を利用した RIST の安全性が確立された。現在第3期臨床試験において、その有効性を検証中である。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長期に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。また、感染 HTLV-1 の分子生物学的特徴および移植後の T 細胞応答の状況を解析と臨床経過との関連から、RIST における抗 HTLV-1 免疫の役割が明らかになりつつある。今後は、ウイルス抗原を標的とした ATL に対する免疫療法のデザインおよび適応指針の作成を目指す。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Okamura J, Uike N, Utsunomiya A, Tanosaki R. Allogeneic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma (review). *Int J Hematol* 86:118-125, 2007
2. Washiyama M, Nishigaki K, Ahmed N,

Kinpara S, Ishii Y, Kanzawa N, Masuda T, and Kannagi M. IL-2 withdrawal induces HTLV-1 expression through p38 activation in ATL cell lines. *FEBS Letters* 2007; 581: 5207-12.

3. Kannagi M. Immunologic control of HTLV-1 and adult T-cell leukemia. (Review). *Int. J. Hematol.*86: 113-117, 2007.
4. Tamaki H, Taniguchi Y, Kikuchi A, Yamagami T, Soma T and Matsuoka M. Development of adult T-cell leukemia in donor-derived human T-cell leukemia virus type I-infected T cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* 21: 1594-1596, 2007.
5. Matsuoka M and Kuan-Teh Jeang. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* 7: 270-80, 2007.
6. Yasunaga JI, Matsuoka M. Leukaemogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I. *Rev Med Virol.* 17: 301-311, 2007.
7. Satou Y, Matsuoka M. Implication of the HTLV-1 bZIP factor gene in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia. *Int J Hematol,* 86:107-112, 2007.
8. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, Teshima T; Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 109:1756-1764, 2007.
9. Hashimoto D, Asakura S, Matsuoka K, Sakoda Y, Koyama M, Aoyama K, Tanimoto M, Teshima T: FTY720 enhances the activation-induced apoptosis of donor T cells and modulates graft-versus-host disease. *European Journal of Immunology* 37(1):271-281, 2007
10. Imanishi D, Tomonaga M, et al. Donor-derived DNA in fingernails among recipients of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants. *Blood* 110:2231-4, 2007.
11. Takasaki Y, Tomonaga M, et al. Impact of visceral involvements and blood cell count abnormalities on survival in adult T-cell leukemia/lymphoma(ATLL). *Leuk Res* 31;751-7,

- 31;751-7, 2007.
12. Yamasaki R, Tomonaga M, et al. Small number of HTLV-1-positive cells frequently remains during complete remission after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation that are heterogeneous in origin among cases with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* 21;1212-7, 2007.
  13. Tsukasaki K, Tomonaga M, et al. VCAP-AMP-VECP Compared With Biweekly CHOP for Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma : Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *J Clin Oncol* in press
  14. Sagara Y, Inoue Y, Ohshima K, Kojima E, Utsunomiya A, Tsujimura M, Shiraki H, Kashiwagi S: Antibody to the central region of human T-lymphotropic virus type 1 gp46 is associated with the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer Science* 98(2):240-245, 2007
  15. 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(1): 90-99, 2007
  16. Miyakoshi S, Kami M, Tanimoto T, Yamaguchi T, Narimatsu H, Kusumi E, Matsumura T, Takagi S, Kato D, Kishi Y, Murashige N, Yuji K, Uchida N, Masuoka K, Wake A, Taniguchi S. Tacrolimus as prophylaxis for acute graft-versus-host disease in reduced intensity cord blood transplantation for adult patients with advanced hematologic diseases. *Transplantation*. 2007 Aug 15;84(3):316-22.
  17. Saito AM, Kami M, Mori S, Kanda Y, Suzuki R, Mineishi S, Takami A, Taniguchi S, Takemoto Y, Hara M, Yamaguchi M, Hino M, Yoshida T, Kim SW, Hori A, Ohashi Y, Takaue Y. Prospective phase II trial to evaluate the complications and kinetics of chimerism induction following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with fludarabine and busulfan. *Am J Hematol*. 2007 Oct;82(10):873-80.
  18. Maruyama D, Fukuda T, Kato R, Yamasaki S, Usui E, Morita-Hoshi Y, Kim SW, Mori S, Heike Y, Makimoto A, Tajima K, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y. 2007. Comparable antileukemia/lymphoma effects in non-remission patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation with a conventional cytoreductive or reduced-intensity regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 13:932-941.
2. 学会発表  
《国際学会》
1. Utsunomiya A, Tanosaki R, Uike N, Masuda M, Saburi Y, Tomonaga M, Etoh T, Kikuchi H, Harada M, Kawano F, Choi I, Matsuoka M, Kannagi M, Sonoda S, Okamura J. Kinetics of HTLV-1 proviral loads after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using reduced intensity conditioning for adult T-cell leukemia/lymphoma. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses. May, 25-25, 2007, Hakone, Japan
  2. Uike N, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Saburi Y, Tomonaga M, Etoh T, Kikuchi H, Harada M, Hidaka M, Choi I, Yufu Y, Matsuoka M, Kannagi M, Okamura J. Comparable Outcome of Reduced-Intensity Conditioning with or without Antithymocyte Globulin in Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adult T-cell Leukemia: The Results of Two Prospective Studies. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses. May, 25-25, 2007, Hakone, Japan



3. Takamori A, Kurihara K, Shimizu Y, Harashima N, Choi I, Uike N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Okamura J, Kannagi M. Presence of Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in adult T-cell leukemia patients and their functional failure. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses. May, 25-25, 2007, Hakone, Japan
4. Harashima N, Shimizu Y, Takamori A, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Okamura J, Kannagi M. Positive conversion of Tax-specific CTL response in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses. May, 25-25, 2007, Hakone, Japan
5. Shimizu Y, Kurihara K, Takamori A, Harashima N, Utsunomiya A, Okamura J, Nishigaki K, Masuda T, Kannagi M. Diversity in Tax specific T-cell responses among asymptomatic HTLV-I carriers 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses. May, 25-25, 2007, Hakone, Japan
6. Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi T, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Nagafuji K, Hara M, Yoshida F, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Kawase T, Nagamura-Inoue T, Matsuo K, Kato S, Morishima Y, Okamura J, Kadera Y, Uchiyama T. Allografting for adult T-cell leukemia/lymphoma: a nationwide retrospective analysis. 49th Annual Meeting of American Society of Hematology, December, 2007, San Diego, USA
7. Komori K, Hasegawa A, Kurihara K, Masuda T, Kannagi M. HTLV-I proviral load at equilibrium in orally infected rats can be reduced by restoration of HTLV-I-specific T-cell response following re-immunization. 第 13 回国際ヒトレトロウイルス会議, 2007 年 5 月, 箱根.
8. Harashima N, Shimizu Y, Takamori A, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Okamura J, Kannagi M : Positive conversion of Tax-specific CTL response in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation. 第 13 回国際ヒトレトロウイルス会議, 2007 年 5 月, 箱根.
9. Shimizu Y, Kurihara K, Takamori A, Harashima N, Utsunomiya A, Okamura J, Nishigaki K, Masuda T, Kannagi M : Diversity in Tax specific T-cell responses among asymptomatic HTLV-I carriers. 第 13 回国際ヒトレトロウイルス会議, 2007 年 5 月, 箱根.
10. Takamori A, Kurihara K, Shimizu Y, Harashima N, Ilseung Choi, Uike N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Okamura J, Kannagi M : Presence of Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in adult T-cell leukemia patients and their functional failure. 第 13 回国際ヒトレトロウイルス会議, 2007 年 5 月, 箱根.
11. Utsunomiya A, Tanosaki R, Uike N, Masuda M, Saburi Y, Tomonaga M, Etoh T, Kikuchi H, Harada M, Kawano F, Choi I, Matsuoka M, Kannagi M, Sonoda S, Okamura J: Kinetics of HTLV-1 proviral loads after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using reduced intensity conditioning adult T-cell leukemia/lymphoma. 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV AND RELATED VIRUSES in Hakone, 21-25.9.2007
12. Yonekura K, Utsunomiya A, Nakano N, Takeuchi S, Itoyama T, Takatsuka Y, Tashiro Y, Kanzaki T, Kanekura T: Graft-versus-adult T-cell leukemia/lymphoma (Gv-ATL) Effect in ATL patients after allogeneic stem cell transplantation. 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV AND RELATED VIRUSES in Hakone, 21-25.9.2007
13. Harashima N, Shimizu Y, Takamori A, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R,

Masuda M, Okamura J, Kannagi M: Positive conversion of Tax-specific CTL response in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation. 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV AND RELATED VIRUSES in Hakone, 21-25.9.2007

14. Uike N, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Saburi Y, Tomonaga M, Etoh T, Kikuchi H, Harada M, Kawano F, Choi I, Yufu Y, Matsuoka M, Kannagi M, Sonoda S, Okamura J. Comparable Outcome of Reduced-Intensity Conditioning with or without Antithymocyte Globulin in Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adult T-cell Leukemia: The Results of Two Prospective Studies. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses. May, 21-25, 2007 Hakone Prince Hotel, Japan.

#### 《国内学会》

1. 岡村 純: 造血細胞移植の現状と動向-2006年全国統計から: 第 29 回日本造血細胞移植学会(会長報告)、2007 年 2 月 17 日、福岡市
2. 崔日承、岡村 純: 成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)への同種末梢血幹細胞による骨髓非破壊的移植療法(RIST)の多施設共同臨床試験: 第 29 回日本造血細胞移植学会(特別セミナー)2007 年 2 月 17 日、福岡市
3. 田野崎隆二、鵜池直邦、宇都宮與、佐分利能生、増田昌人、朝長万左男、衛藤徹也、日高道広、崔日承、高田豊、原田実根、神奈木真理、松岡雅雄、木村暢宏、岡村 純(厚生労働省 成人 T 細胞白血病リンパ腫研究班): 成人 T 細胞白血病リンパ腫に対する減量前処置法による血縁同種末梢血幹細胞移植: 多施設第 I 相臨床試験(第 2 期; ATL-NST-2)の報告: 第 29 回日本造血細胞移植学会(ワークショップ) 2007 年 2 月 16 日、福岡市
4. Kannagi M, Shimizu Y, Takamori A, Kurihara K, Harashima N, Utsunomiya A. Insufficient HTLV-I-specific T-cell response as an ATL risk factor.(ATL 発症の免

疫学的危険因子)第66回日本癌学会,シンポジウム,2007 年 10 月,横浜

5. Harashima N, Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Tanosaki R, Okamura J, Kannagi M. Detection of circulating Tax-specific CTL by tetramers and in vitro induction of the CTL from post-HSCT ATL patients. 第 66 回日本癌学会,2007 年 10 月,横浜
6. 松岡雅雄: Molecular mechanism of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type I: 第 12 回慶應医学賞記念シンポジウム、東京、2007 年 12 月 5 日
7. 安永純一朗: HTLV-I bZIP factor (HBZ)による T 細胞増殖促進の分子機構: 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日-15 日
8. 宇都宮與、田野崎隆二、鵜池直邦、増田昌人、佐分利能生、朝長万左男、衛藤徹也、菊池博、原田実根、日高道弘、崔日承、松岡雅雄、神奈木真理、園田俊郎、岡村 純: ATLL に対する骨髓非破壊的前処置を用いた同種末梢血幹細胞移植後の HTLV-1 プロウイルス動態. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会,2007 年 10 月 11 日-13 日
9. JMDP を介した成人 T 細胞白血病リンパ腫に対する非血縁者間骨髓移植(RIST/CST)の後方視的解析) 衛藤徹也、崔日承、山中竹春、高瀬 謙、沼田晃彦、平安山英穂. 第 69 回日本血液学会総会 (横浜)平成 19 年 10 月 11 日-13 日

#### 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

# 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

### 宿主抗腫瘍免疫応答解析

分担研究者：神奈木真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

#### 研究要旨

造血幹細胞移植を受け寛解した ATL 症例に関するこれまでの研究で明らかにした HLA-A2, A24, A11 に拘束される Tax 特異的 CTL のメジャーエピトープをもとにテトラマーを作成し、ATL 患者の末梢血サンプル中の CTL の同定解析を行なった。この結果、頻度は低い但未治療の ATL 患者にもテトラマーに結合する Tax 特異的 CTL を持つ症例が存在することが分かった。しかし、移植後寛解例における Tax 特異的 CTL と異なり、未治療例の CTL は機能不全状態であることが示唆された。未治療 ATL 患者における CTL の存在は、これを維持するに十分な Tax のメジャーエピトープが生体内で発現されており宿主がそれらを提示および認識し得ることを示している。さらに、HTLV-I 特異的な免疫抑制機序の存在も示唆された。以上のことは、CTL メジャーエピトープ部位のペプチドが免疫療法に用いる標的として妥当であることの根拠となる所見である。現在、これらの所見を踏まえ、樹状細胞をアジュバンドとするペプチド免疫療法の実施に向けて準備段階に入っている。

#### A. 研究目的

ATL 患者の HTLV-I 特異的 T 細胞応答および樹状細胞機能を解析し、Tax 特異的 CTL 応答を賦活する抗 ATL 免疫療法を開発する。

#### B. 研究方法

1. 骨髄非破壊的同種末梢血幹細胞移植の前後および未治療慢性 ATL 患者の末梢血単核球分画 (PBMC) を分離し、細胞表面マーカーを抗体で染色するとともに、HLA 型に応じてテトラマー染色を行ない、FACS で解析した。
2. T 細胞活性の検定: Tax 蛋白あるいはペプチドを PBMC に加えて培養し、細胞内サイトカイン染色あるいは ELISA でインターフェロン産生を測定した。
3. テトラマー: 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。一部のテトラマーは MBL(株)

から購入した。

4. PBMC を dish に付着させた後 GM-CSF と IL-4 で定法に基づき樹状細胞の誘導を行なった。

#### C. 研究結果

##### 1. ATL 患者におけるテトラマー解析

移植前の ATL 患者 PBMC に Tax 特異的 CTL がテトラマーで検出される例が散見されたため、未治療の慢性 ATL 患者に対象を広げ解析したところ、頻度は低いが慢性 ATL 患者にもテトラマー陽性細胞が検出された。しかし、移植後の長期寛解例に検出される CTL とは異なり、抗原刺激に対する増殖反応やサイトカイン産生応答が認められなかった。テトラマー解析のできない症例については、GST-Tax 蛋白を抗原として用いて解析したところ、ATL の前段階ですでに Tax 特異的 T 細胞応答の低下している例が認められた。

##### 2. ATL 患者末梢血からの樹状細胞分離に関する検討

慢性 ATL 患者 PBMC を dish に付着させた

ところ、付着細胞数は健丈者より少ないが、これは PBMC 中の ATL 細胞数が多いため非感染細胞が相対的に少なくなったためと考えられる。これらの細胞は GM-CSF と IL-4 を添加して培養した後に樹状細胞へ分化し、細胞治療への使用は可能と考えられた。

#### D. 考察

移植前の ATL 患者では化学療法が行なわれているが、慢性 ATL 患者は未治療である。これらの患者にテトラマー陽性細胞が見つかり、しかもそれらが機能不全に陥っている現象は、他の腫瘍で報告されている tumor infiltrating T lymphocytes (TIL) に類似しており、腫瘍特異的な免疫抑制機序の存在を伺わせる。CTL の機能不全機序は、ATL の病態を理解する上で重要な鍵であり、今後免疫療法がこの抑制をくつがえせるかどうかで効果が左右されると考えられる。

未治療 ATL 患者における Tax 特異的 CTL の存在は、少なくとも生体内で抗原発現があることと、宿主がそれらを提示および認識し得ることを示している。従って、これらのエピトープ部位のペプチドが免疫療法に用いる標的として妥当であることの根拠となる。今後は、ATL 患者からの樹状細胞誘導条件を検討し ATL に対する免疫療法を確立したい。

#### E. 結論

未治療 ATL にも、Tax の CTL メジャーエピトープが生体内で発現され、これを認識する CTL が維持されている例が存在する。しかし、これらの CTL は機能不全状態にある。従って、これらの症例では、メジャーエピトープ配列のペプチドを標的とする免疫療法により、Tax 特異的 CTL 応答が回復する可能性があると考えられた。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Washiyama M, Nishigaki K, Ahmed N, Kinpara S, Ishii Y, Kanzawa N, Masuda T,

and Kannagi M. IL-2 withdrawal induces HTLV-1 expression through p38 activation in ATL cell lines. FEBS Letters 2007; 581: 5207-12.

2. Kannagi M. :Immunologic control of HTLV-I and adult T-cell leukemia. (Review). Int. J. Hematol.86: 113-117, 2007.
3. 神奈木真理. ATL と HTLV-I 感染免疫. 「HTLV-1 と疾患」渡辺俊樹,上平憲, 山口一成編,分光堂 pp 194-196, 2007
4. 神奈木真理. ATL における腫瘍免疫.新しい診断と治療の ABC 46「潜伏感染ウイルスによる血液疾患」河敬世編, 最新医学別冊,pp 31-36, 2007
5. 神奈木真理. HTLV-I に対する T 細胞免疫応答. Virus Report, 4 (1) : 36-42, 2007

##### 2. 学会発表

###### 《国際学会》

1. Komori K, Hasegawa A, Kurihara K, Masuda T, Kannagi M. HTLV-I proviral load at equilibrium in orally infected rats can be reduced by restoration of HTLV-I-specific T-cell response following re-immunization. 第 13 回国際ヒトレトロウイルス会議, 2007 年 5 月,箱根.
2. Harashima N, Shimizu Y, Takamori A, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Okamura J, Kannagi M : Positive conversion of Tax-specific CTL response in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation.第 13 回国際ヒトレトロウイルス会議, 2007 年 5 月,箱根.
3. Shimizu Y, Kurihara K, Takamori A, Harashima N, Utsunomiya A, Okamura J, Nishigaki K, Masuda T, Kannagi M : Diversity in Tax specific T-cell responses among asymptomatic HTLV-I carriers. 第 13 回国際ヒトレトロウイルス会議, 2007 年 5 月,箱根.
4. Takamori A, Kurihara K, Shimizu Y, Harashima N, Ilseung Choi, Uike N,

Tanosaki R, Utsunomiya A, Okamura J, Kannagi M : Presence of Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in adult T-cell leukemia patients and their functional failure. 第 13 回国際ヒトレトロウイルス会議, 2007 年 5 月, 箱根.

ける T 細胞の自己応答性)。第 37 回日本免疫学会, 2007 年 11 月, 東京

#### 《国内学会》

1. 清水由紀子, 高森絢子, 宇都宮與, 山野嘉久, 栗原 清, 岡村 純, 増田貴夫, 神奈木真理. 無症候 HTLV-I キャリアにおける T 細胞の低応答性. 第 55 回日本ウイルス学会, 2007 年 10 月, 札幌
2. 高塚奈津子, 清水由紀子, 高森絢子, 増田貴夫, 天笠光雄, 神奈木真理. HTLV-I 感染ラットから樹立された自己反応性 T 細胞の性状. 第 55 回日本ウイルス学会, 2007 年 10 月, 札幌
3. 鷺山美樹, 西垣一男, 金原秀一, 神澤範行, 西辻裕紀, 増田貴夫, 神奈木真理. 成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞におけるストレスシグナルを介した HTLV-1 発現誘導の解析. 第 55 回日本ウイルス学会 2007 (札幌)
4. Kannagi M, Shimizu Y, Takamori A, Kurihara K, Harashima N, Utsunomiya A. Insufficient HTLV-I-specific T-cell response as an ATL risk factor. (ATL 発症の免疫学的危険因子) 第 66 回日本癌学会, シンポジウム, 2007 年 10 月, 横浜
5. Harashima N, Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Tanosaki R, Okamura J, Kannagi M. Detection of circulating Tax-specific CTL by tetramers and in vitro induction of the CTL from post-HSCT ATL patients. 第 66 回日本癌学会, 2007 年 10 月, 横浜
6. Takatsuka N, Shimizu Y, Takamori A, Masuda T, Amagasa T, Kannagi M. Auro-reactive property of HTLV-I-negative T-cells established from a HTLV-I-infected rat. (HTLV-I 感染にお

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  
ATL の分子生物学的解析

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

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。造血器幹細胞移植を受けた ATL 患者の腫瘍細胞解析から tax 遺伝子に変異があるが、長期生存している症例を同定した。この結果から Tax 以外に対する免疫応答も幹細胞移植療法において抗腫瘍効果に関与することが示唆された。

A. 研究目的

HTLV-I プロウイルスは、ATL 細胞に存在する感染の証拠であり、その解析は多くの情報を提供している。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我々は ATL 細胞で、しばしば Tax 発現が失われていることを明らかにしてきた。Tax 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 メチル化の 3 つの機序が存在する。Tax は生体内で主要な細胞傷害性 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結果と考えられる。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。

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) 移植症例における tax 遺伝子

移植症例における HTLV-I プロウイルスの解析と予後の関連を解析している。今年度は第二期移植の 11 症例を解析し、1 例で tax 遺伝子内に 1 塩基 (7407) の挿入を認めた。この挿入によりフレームシフトが起こり Tax と 30 アミノ酸が一致するが、その後は全く異なるアミノ酸配列となるタンパク質が産生され、Tax は産生されないと予想される。本症例が、この変異プロウイルスのみを有するのかは現在、解析中である。本症例は無再発生存中であり、少なくとも本症例における寛解維持には Tax に対する免疫応答は働いていないことが予想される。他に 5'側 long terminal repeat を欠くプロウイルスを有する症例があり、解析中である。ATL 細胞は Fas 抗原からのシグナルにも高感受性であり細胞傷害性 T リンパ球からの攻撃に弱いと予想される。このため移植後の GVHD により治療効果が得られている可能性がある。今後、Tax を始めとするウイルス抗原に対する免疫反応が移植治療効果にどのように関与するかを更に明らかにすべく移植症例の解析を継続していく予定である。

2) 移植症例における HBZ 遺伝子

HTLV-I プロウイルスでマイナス鎖にコードされる HBZ 遺伝子の配列を検索し全ての症例で保存されていることを確認した。これまで HBZ に対する免疫応答は確認されていないが、今後、抗 ATL 免疫反応に関して検討を行う予定である。

### 3) 5'側 LTR を欠失する欠損型プロウイルスの解析

5'側 LTR を欠失するプロウイルスがキャリアと比較して ATL に多く見られることを明らかにし、その組み込み部位の塩基配列の解析から、組み込み前に 5'側 LTR を欠失する場合と、組み込み後に 5'側 LTR を欠失するケースがあることを示した。組み込み前に欠失したプロウイルスで tax 遺伝子の第二エクソンを有しないものがあり、Tax 発現が発がんにも必須ではないことが示唆された。また全ての症例で HBZ 遺伝子の配列は保たれており、発がん過程における HBZ 遺伝子の重要性が示された。

## D. 考察

HTLV-I がコードする遺伝子産物の中で Tax は、その多彩な生物活性から注目されてきた。一方、Tax は生体内で細胞傷害性 T リンパ球に認識される主要な抗原であるため、Tax 発現は生体内では抑制されていると考えられてきた。我々の ATL 細胞における HTLV-I プロウイルスの解析から ATL 細胞では、しばしば Tax を産生できないようになってきていることを明らかにしてきた。これは生体内で宿主免疫機構から逃れるために Tax を発現できない ATL 細胞が発がん過程で選択された可能性が考えられてきた。しかし、5'側 LTR を欠失するプロウイルスの解析から感染時より Tax を発現できない構造のプロウイルスを有する ATL 症例が存在し、Tax は必ずしも腫瘍化にも必須ではないことが示された。一方、プロウイルスのマイナス鎖にコードされる HBZ 遺伝子の構造・発現は保存されており、HBZ 遺伝子の発がんにおける重要性を示している。

移植症例の解析から Tax に対する細胞傷害

性 T リンパ球による免疫応答が抗腫瘍効果に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた。しかし、今回の我々の解析から Tax を発現できない症例でも寛解が維持されており、Tax 以外の抗原に対する免疫応答の重要性が浮かび上がってきた。そのような抗原としては Tax 以外のウイルス抗原やアロ抗原が考えられる。ATL 細胞は活性化した末梢性 T リンパ球の腫瘍であるがアポトーシスシグナルに高感受性であることが知られている。Fas 抗原を高発現する一方、Fas リガンドの発現は抑制されアポトーシスを回避していると考えられている。従って ATL 細胞は細胞傷害性 T リンパ球に高感受性であり、移植により惹起された免疫反応が腫瘍細胞を傷害し、寛解に寄与していることが予想される。一方、解析した症例で Tax を発現できない症例は 1 例であり、他は全て Tax を発現できるようになっており、そのような症例では Tax に対する免疫応答が重要な役割を果たしている可能性がある。

## E. 結論

今年度の解析から Tax を発現できないタイプのプロウイルスを有する ATL 移植症例でも寛解が維持されており、Tax 以外のウイルス抗原あるいはアロ抗原が標的となっている可能性が示され、今後の解析が必要であることが明らかとなった。プロウイルスと移植成績・予後に関して今後、蓄積される症例の解析は、その有効性を明らかにする上での重要である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Miyazaki M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, and Matsuoka M. Preferential Selection of HTLV-1 Provirus Lacking the 5'LTR during Oncogenesis. *J Virol*, 81: 5714-5723, 2007.

2. Tamaki H, Taniguchi Y, Kikuchi A, Yamagami T, Soma T and Matsuoka M. Development of adult T-cell leukemia in donor-derived human T-cell leukemia virus type I-infected T cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Leukemia* 21: 1594-1596, 2007.
  3. Matsuoka M and Kuan-Teh Jeang. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* 7: 270-80, 2007.
  4. Mitchell MS, Bodine ET, Hill S, Princler G, Lloyd P, Mitsuya H, Matsuoka M, Derse D. Phenotypic and genotypic comparison of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase from infected T-cell lines and patient samples. *J Virol*, 81: 4422-4428, 2007.
  5. Yasunaga JI, Matsuoka M. Leukaemogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I. *Rev Med Virol*. 17: 301-311, 2007.
  6. Satou Y, Matsuoka M. Implication of the HTLV-I bZIP factor gene in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia. *Int J Hematol*, 86:107-112, 2007.
  7. Higuchi M, Tsubata C, Kondo R, Yoshida S, Takahashi M, Oie M, Tanaka Y, Mahieux R, Matsuoka M, Fujii M. Cooperation of NF- $\kappa$ B2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2 independent growth transformation of a T cell line. *J Virol* 81:11900-11907, 2007.
2. 学会発表
1. Matsuoka M. HTLV-I bZIP Facotr Gene and Oncogenesis by HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
  2. Satou Y, Yasunaga JI, Ohshima K, Miyazato P, Yoshida M, Takai K, Zhao T and Matsuoka M. HBZ transgenic mice mimic skin and lung diseases associated with HTLV-I. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
  3. Yoshida M. Characterization of the promoter region for HBZ gene and functional analyses of spliced and unspliced HBZ genes. The 13th International Conference on Human Retrovirology. Hakone, Japan. May 22-25, 2007.
  4. 松岡雅雄: HTLV-I による発がん機構と移植: 第 29 回日本造血細胞移植学会総会、福岡、2007 年 2 月 16-17 日
  5. 松岡雅雄: Leukemogenesis associated with HTLV-I bZIP factor gene in ATL: 第 66 回日本癌学会学術総会、横浜、2007 年 10 月 3-5 日
  6. 松岡雅雄: Molecular mechanism of pathogenesis by human T-cell leukemia virus type I: 第 12 回慶應医学賞記念シンポジウム、東京、2007 年 12 月 5 日
  7. 安永純一郎: 欠損型プロウイルスの解析からみた発がんにおける HTLV-I bZIP factor の重要性: 69 回日本血液学会総会・第 49 回日本臨床血液学会総会、横浜、2007 年 10 月 11 日-13 日
  8. 安永純一郎: HTLV-I bZIP fctor (HBZ) による T 細胞増殖促進の分子機構: 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日-15 日
  9. 佐藤賢文、片桐晃子、ミヤザトパオラ、木梨達雄、松岡雅雄: HTLV-I bZIP factor 遺伝子のトランスジェニックマウスは HTLV-I 関連皮膚疾患、肺疾患に類似した病態を示す: 第 37 回日本免疫学会総会、東京、2007 年 11 月 20-22 日
  10. 佐藤賢文、ミヤザトパオラ、松岡雅雄: HTLV-I 病原性における HBZ 遺伝子の機能解析: 第 55 回日本ウイルス学会総会、札幌、2007 年 10 月 21-23 日
- 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



# 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

### ATL に対する同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試み

分担研究者：豊嶋 崇徳 九州大学病院・遺伝子・細胞療法部 准教授

#### 研究要旨

造血幹細胞移植後に a-galactosylceramide を投与し、NKT 細胞を活性化することで急性 GVHD の抑制と移植片対腫瘍効果の増強が達成できる可能性がマウスモデルにおいて示された。移植成績の向上につながる成績として期待される。

#### A. 研究目的

本研究班の今までの臨床成績から明らかになった、成人 T 細胞性白血病 (ATL) に対する同種造血幹細胞移植の主たる課題は、移植後の再発率が高いこと、移植関連合併症の頻度が高いことである。この一つの原因は、進行例に対して移植が行われているため、これは ATL に限らず、進行期白血病・リンパ腫に対する同種造血幹細胞移植の共通の課題である。このためには graft-versus-host disease (GVHD) を増悪させることなく、graft-versus-leukemia (GVL) 効果を高めることが必要である。NKT 細胞は Th1 型免疫応答を抑制する作用を有し、これを利用して GVHD の軽減が図れることが、米国におけるパイロット臨床試験で示されている(Lowsky: N Engl J Med, 2005)。われわれは、より簡便で実用的な方法として、NKT 細胞リガンドを投与することにより、GVHD の抑制が達成できることをマウス・モデルにおいて示した(Hashimoto: J Immunol 2005)。さらに、NKT 細胞は抗腫瘍効果を有することが知られており、NKT 細胞リガンド投与の GVL 効果に対する影響を白血病マウスモデルを用いて研究した。その結果、GVHD が抑制される一方で、GVL 効果の増強効果が観察された。今後、その機序の解明を行う。

#### B. 研究方法

レシピエントマウス(B6D2F1)を全身放射線照射 10Gy で前処置後、ドナーマウス(B6)より採取した骨髓細胞( $5 \times 10^6$ )および脾細胞

( $5 \times 10^6$ )を移植した。白血病モデルとして、DBA/2 由来の P815 を静脈内投与( $5 \times 10^4$ )した。NKT 細胞リガンドである a-galactosylceramide (KRN7000) 100 mg/kg あるいは vehicle を移植後 day4.6.8 に腹腔内投与した。

#### C. 研究結果

KRN7000 投与群では非投与群と比較し、全生存率が有意に高く、GVHD 死亡率と白血病死亡率は有意に低かった( $P < 0.05$ )。また KRN7000 投与群では急性 GVHD による胸腺傷害が軽減し、免疫再構築の改善がみられた。このように KRN7000 は GVHD を軽減し、GVL を増強させることにより移植成績を改善することが示された。

#### D. 考察

NKT 細胞を利用して GVHD と GVL の分離が達成できる可能性が初めて示された。今後、その機序の解明をすすめたい。

#### E. 結論

NKT 細胞を利用して GVHD と GVL の分離が達成できる可能性が初めて示された。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, Te-shima T; Donor-derived thymic-dependent T

- cells cause chronic graft-versus-host disease. Blood 109:1756-1764, 2007.
2. Hashimoto D, Asakura S, Matsuoka K, Sakoda Y, Koyama M, Aoyama K, Tanimoto M, Teshima T: FTY720 enhances the activation-induced apoptosis of donor T cells and modulates graft-versus-host disease. European Journal of Immunology 37(1):271-281, 2007
  3. Maeda Y, Tawara I, Teshima T, Liu C, Hashimoto D, Matsuoka K, Tanimoto M, Reddy P: Lymphopenia induced proliferation of donor T cells reduces their capacity for causing acute graft-versus-host disease. Experimental Hematology 35(2):274-286, 2007
  4. Matsuo Y, Takeishi S, Miyamoto T, Nonami A, Kikushige Y, Kunisaki Y, Kamezaki K, Tu L, Hisaide H, Takenaka K, Harada N, Kamimura T, Ohno Y, Eto T, Teshima T, Gondo H, Harada M, Nagafuji K: Toxoplasmosis encephalitis following severe graft-vs. host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 17 yr experience in Fukuoka BMT group. European Journal of Haematology 79 (4) 317-321, 2007
  5. Nonami A, Takenaka K, Sumida C, Aizawa K, Kamezaki K, Miyamoto T, Harada N, Nagafuji K, Teshima T, Harada M: Successful treatment of myelodysplastic syndrome (MDS)-related intestinal Behçet's disease by up-front cord blood transplantation. Intern. Med. 46: 1753-1756, 2007

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許登録番号 US No. 10/444, 198  
名称 Compositions and Methods Related to Graft-versus-host disease (申請中)

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  
中枢神経浸潤を来した成人 T 細胞白血病・リンパ腫に対する  
同種造血幹細胞療法の検討

分担研究者：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 教授

#### 研究要旨

成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) は、全身への浸潤を来しやすく、中でも中枢神経浸潤例も多い。中枢神経浸潤 ATLL 症例に対する同種造血幹細胞移植の効果を後方視的に検討した。その結果、中枢神経浸潤例では治療関連有害事象が多く生存例が少ないこと、中枢神経浸潤に対しては従来の治療を更に改良する必要があることが明らかとなった。

#### A 研究目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATLL)は中枢神経(CNS)浸潤を来しやすく、こうした症例が同種造血幹細胞移植の適応となるかについては、一定した見解が出ていない。ATLLに対する同種造血幹細胞移植が積極的に進められる中、非血縁者間骨髄移植ドナーコーディネート途中でCNS浸潤を来した症例に対して移植が実施される場合もみられる。CNS浸潤例に対する同種造血幹細胞移植をどのように取り扱うべきかを検討するため、長崎県内で実施されたCNS新準用政令に対する移植の成績を解析した。

#### B 研究方法

長崎県内の移植施設を対象に、CNS 浸潤 ATLL 例に対する同種造血幹細胞移植のアンケート調査を行った。

#### C 研究結果

9 例 (男性 4 例、女性 5 例) に対して骨髄破壊的前処置で 6 例、減弱した前処置により 3 例が同種造血幹細胞移植を受けていた。ドナーは同胞 6 例、臍帯血 3 例で、移植時病期は CR2 例、PR4 例、NC1 例、PD2 例である。この 9 例のうち 4 例において移植後 1 年以上の生存がみられ、3 例は調査時点で生存中であった (519-1316 日)。1 年以上の生存が得られた 4 例のうち 3 例では全身放射線照

射 (12 グレイ) または全脳+全脊髄照射が行われていた。死亡 6 例のうち 4 例は移植後 100 日以内のいわゆる移植関連死亡であり (うち 1 例は CNS 再発有り)、その他の 2 例は中枢神経再発 1 例、全身性再発 1 例の原病死であった。

#### D 考察

CNS 浸潤を持つ ATLL に対する同種造血幹細胞移植では、治療関連死亡が多かった。長期生存している例のうち例では放射線を用いての前処置が行われていた。また 1 例では多数回の髄腔内抗がん剤注入が行われていた。

#### E 結論

同種造血幹細胞移植を実施する際は ATLL の CNS 浸潤に対して十分な対策を検討する必要がある。

#### F 研究発表

1. 論文発表  
1. Choi YL, Tomonaga M, et al. A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene*.26;1245-55,2007.
2. Matsuo E, Tomonaga M, et al. Imatinib provides durable molecular and cytogenetic responses in a practical setting for both newly diagnosed and previously treated chronic myelogenous leukemia:a study in

Nagasaki prefecture, Japan. *Int J Hematol* 85;132-9,2007.

3. Imanishi D, Tomonaga M, et al. Donor-derived DNA in fingernails among recipients of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants. *Blood* 110:2231-4, 2007.
4. Takasaki Y, Tomonaga M, et al. Impact of visceral involvements and blood cell count abnormalities on survival in adult T-cell leukemia/lymphoma(ATLL). *Leuk Res* 31;751-7, 2007.
5. Yamasaki R, Tomonaga M, et al. Small number of HTLV-1-positive cells frequently remains during complete remission after allogeneic hemotopoietic stem cell transplantation that are heterogeneous in origin among cases with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* 21;1212-7, 2007.
6. Hasegawa H, Tomonaga M, et al. A novel natural compound, a cycloanthranilyl-proline derivative (Fuligocandin B), sensitizes leukemia cells to apoptosis induced by tumor necrosis factor related apotpsis-inducing ligand (TRAIL) through 15-deoxy-Delta12, 14 prostaglandin J2 production. *Blood* 110;1664-74, 2007.
7. Tsukasaki K, Tomonaga M, et al. VCAP-AMP-VECP Compared With Bi-weekly CHOP for Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma : Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *J Clin Oncol*, 2007.