

200824040A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

平成 21 (2009) 年 4 月

研究代表者 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-I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	7
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	13
4. ATLに対する臍帯血移植の検討	朝長万左男	15
5. 成人T細胞白血病に対する同種造血幹細胞移植後の再発・再増悪例のGv-ATL効果	宇都宮 與	18
6. リンパ系疾患に対する臍帯血ミニ移植	谷口 修一	21
7. ATLに対する骨髓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	24
8. ATLに対する骨髓非破壊的移植療法の実施	増田 昌人	26
9. ATL患者に対する骨髓非破壊的前処置法を用いた同種造血幹細胞移植術の実施	鶴池 直邦	28
10. ATLに対する同種造血幹細胞移植とGVL効果	今村 雅寛	32
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	34
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	38

III. 研究成果の刊行に関する一覧表		40
---------------------	--	----

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）

研究代表者：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 20 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 期試験を実施した。21 施設の倫理委員会で承認され、平成 21 年 2 月現在、10 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 4 期試験（第 1 相）を開始し、13 施設の倫理委員会で承認された。また、慢性型 ATL を対象とする免疫療法案を検討した。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 による抗 HTLV-1 免疫の役割が明らかになりつつある。

研究分担者

- | | | |
|-----------|-------------|-------|
| 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 典 | 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. 鶴池 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

（1-1）第 2 期試験の解析：すでに終了した第 2 期試験（NST-2）の結果を解析し、第 1 期試験（NST-1）と比較した。また、移植後 3 年以上経過している症例についてその現状を解析した。

（1-2）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、第 2 相）を開始した。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。また、血清学検査において、HLA 6/6 一致血縁ドナーを有し、説明同意書を用いて同意を得た者とした。健康な HLA 一致血縁ドナーに対し G-CSF を 5 日間投与し、4 日目からアフェレーシスを行って末梢血幹細胞を採取した。主要評価項目は、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:

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、NST-4)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か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、実施計画書を作成した。

3) 免疫療法の検討:

これまでの神奈木らの研究から、RIST 後に長期寛解を維持した一部の症例では、抗腫瘍免疫機構が発動し、HTLV-1 Tax を標的抗原とした特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されることが証明されており、そのエピトープが同定されている。そこで、HTLV-1 特異的 T 細胞応答の活性化を目的として、Tax の CTL エピトープペプチドと樹状細胞の組み合わせによる免疫療法実施計画書案を検討した。

4) 移植療法に伴う基礎的解析:

(4-1) HTLV-1 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。

(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。

(4-3) 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析:

免疫療法の臨床試験を実施する準備段階として、これまでの研究成果に基づきプロトコルコンセプトの作成を行なった。さらにプロトコルの詳細を検討するため、アジュバンドの最有力候補である患者由来の樹状細胞の、誘導方法およびアジュバンド機能について予備実験を開始した。

(4-4) ATL の分子生物学的解析:

対象症例は研究班プロトコルに従い同種末梢血幹細胞移植が施行された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-1 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。

(4-5) 同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試み:

形質細胞様樹状細胞は臓器移植においては、寛容導入に関与するとされているが、造血細胞移植での役割は明らかにされていない。単一の細胞群の GVHD 誘導能を検討できるマウスモデルを用いて GVHD の発症に対する影響を検討した。

(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

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

(1-1) 第2期試験の解析：前処置からATGを省略した第2期試験(NST-2)では、ATGを加えた第1期試験(NST-1)と比較して、RIST後の完全キメラ達成までの期間が延長したものの、急性GVHDは重篤化しなかった。また、早期再発は減少したが、後期再発のため、3年生存率は同等であった。登録全例の解析では、grade I/IIの急性GVHD発症が予後良好の因子であり、移植片対ATL効果の存在が示唆された。また、10例(34%)がRIST後41~87ヶ月間長期生存中であり、QOLも良好であることが確認された。

(1-2) 第3期臨床試験の実施：参加予定の21施設の倫理委員会で実施計画書が承認された。これまでに15例が登録され、10例の移植が終了した。9例が移植後6ヶ月以上経過し、1例は100日未満である。10例中9例は完全キメラを達成し、その後、移植関連合併死亡(TRM)1例、現病死が3例発生した。5例は、移植後12~25ヶ月経過して無病生存中である(2009年2月現在)。

2) ATLに対する非血縁者間骨髄細胞を利用したRISTの検討

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, NST-4)の開始：本試験

では、これまでの本研究班のRISTで用いてきたフルダラビン・ブスルファンを移植前処置として採用し、さらに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を施行することにした。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。実施計画書は、現在までに13施設の倫理委員会で承認され、3例が仮登録、1例が本登録された(2009年2月現在)。

3) 免疫療法の検討：本臨床試験の対象は、慢性型ATL患者であり、Tax特異的CTLエピトープペプチドを添加した成熟自己樹状細胞を投与し、抗ウイルス免疫効果を誘導することによる抗腫瘍免疫効果を期待する、新規免疫細胞療法の安全性を検証する第I相臨床試験である。本臨床試験では、樹状細胞用量漸増試験とすることで、患者の安全性を十分に考慮した臨床試験とした。副次目的として、投与された患者におけるTax特異的細胞傷害性T細胞応答の活性化効果および臨床効果についても検討する。試験デザインは第I相臨床試験、樹状細胞2段階投与漸増試験であり、主要エンドポイントは、慢性ATL患者におけるペプチドパルス樹状細胞ワクチン投与の安全性の検討、副次エンドポイントは、Tax特異的T細胞応答の誘導、抗ウイルス(HTLV-1)効果、抗白血病(腫瘍)効果、予定登録数は、レベル1(3名)、レベル2(3名)(計6例~12例)である。次年度早期に実施計画書を倫理委員会へ提出し、試験を開始する。

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：登録39例中36例においてRIST後の末梢血中のウイルス量の評価が可能であった。RIST後4カ月以内に36例中22例(61%)でウイルス量が検出限界以下(<0.5コピー/1,000P BMC)に低下した。RIST後40カ月以上生存している10例中3例(30%)が検出限界以下であった。

(4-2) RIST 後の造血細胞動態に関する研究：登録後、評価可能であった 39 例全例について、STR による混合キメラ解析により、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。

(4-3) 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析：個体差はあるものの慢性 ATL 症例の末梢血単核球から機能性樹状細胞の誘導が可能であった。また、Tax 蛋白を抗原として Tax 特異的 T 細胞応答を調べたところ、くすぶり型 ATL 患者においても T 細胞応答の減弱が認められた。

(4-4) HTLV-I の分子生物学的解析：造血幹細胞移植を受けた ATL 患者の腫瘍細胞解析から、発症時に比べ 5' long terminal repeat (LTR) のメチル化が少ないことを見出し、治療によって 5' LTR のメチル化が変化している可能性が示唆された。また腫瘍細胞の全プロウイルス塩基配列の解析から HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子のみが保存されていることを明らかにした。

(4-5) 同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試み：Negative control である B 細胞を add-back したマウスには GVHD は発症せず、positive control である cDC を add-back したマウスでは GVHD を発症した。形質細胞様樹状細胞を add-back したマウスも GVHD を発症した。この GVHD は臨床スコア、病理学的スコアで有意差をもってその発症が証明された。この結果から、形質細胞様樹状細胞療法は GVHD 増悪のリスクがあると考えられた。

D. 考察

ATL 患者を対象とした血縁者間末梢血幹細胞による第 1 相試験 (NST-1/NST-2) の結果、RIST が従来型移植と比較して、治療関連毒性が軽度で、高齢層 ATL に対しても十分に実施可能であること、RIST 後に、HTLV-1 tax を標的抗原とした特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されること、RIST の抗ウイルス療法としての有効性が明らかとなった。第 1 相試験 (NST-1, NST-2)

に登録された症例の 1/3 が移植後 3 年半以上生存中であり、QOL も良好に保たれていたことから「RIST による治癒」が期待される。現在第 2 相臨床試験 (NST-3) 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ための第 1 相試験 (NST-4) を開始した。

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、末梢血リンパ球の増加を伴わないくすぶり型 ATL や無症候キャリアにおいても Tax 特異的 T 細胞応答が減弱している例があり、HTLV-I 感染細胞の制御不全を伴うことを示した。このことは、T 細胞応答の低下が腫瘍細胞の増加による二次的な影響ではなく早期からあること、従って、免疫療法による Tax 特異的 T 細胞応答の活性化は早期の感染者にも有効であることが示唆された。松岡班員による研究から、移植症例では tax 遺伝子を発現できることが多く、これが移植療法の有効性を発揮する分子基盤となっていることが示唆された。また腫瘍細胞で保存されている遺伝子は HBZ であり、その発がん過程における重要性が確認された。豊嶋班員の検討から、形質細胞様樹状細胞が単独で GVHD の発症に関与することが直接的に証明された。今後 GVL に対する影響を検討する必要があるものの、形質細胞様樹状細胞の活性化あるいは輸注療法は GVHD 増悪のリスクがあるものと考えられた。

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。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。慢性型を対象とした免疫療法の成果は、約 2000 万人と推定される ATL 発症ハイリスクキャリアの予防的治療へ発展する可能性がある。現在、ATL に対する同種移植の臨床試験は、世界中で唯一本研究班でのみ実施されており、その成果および情

報の発信は極めて意義のあるものとなる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Masuda M, Tomonaga M, Eto T, Hidaka M, Harada M, Choi I, Yamanaka T, Kannagi M, Matsuoka M, Okamura J. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning for adult T-Cell leukemia/lymphoma: impact of antithymocyte globulin on clinical outcome. *Biol BMT* 14:702-708, 2008
2. Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima H, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. *Cancer Science*, in press, 2008.
3. Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. *Blood*, (in press).
4. Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Fujisawa JI, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced *HTLV-1 bZIP factor* gene. *J Virol*, 82: 9359-9368, 2008.
5. Yamasaki S, Heike Y, Mori S, Fukuda T, Maruyama D, Kato R, Usui E, Koido K, Kim S, Tanosaki R, Tobinai K, Teshima T, Takaue Y: Infectious complications in chronic graft-versus-host disease: a retrospective study of 145 recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced- and conventional-intensity conditioning regimens. *Transplant Infectious Disease* 10(4): 252-259, 2008
6. Kim S-W, Matsuo K, Fukuda T, Hara M, Matsue K, Taniguchi S, Eto T, Tanimoto M, Wake A, Hatanaka K, Nakao S, Ishida Y, Harada M, Utsunomiya A, Imamura M, Kanda Y, Sunami K, Kawano F, Takaue Y, Teshima T: Reduced-intensity unrelated donor bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *International Journal of Hematology* 88(3): 324-30.
7. Karube K, Aoki R, Sugita Y, Yoshida S, Nomura Y, Shimizu K, Kimura Y, Hashikawa K, Takeshita M, Suzumiya J, Utsunomiya A, Kikuchi M, Ohshima K: The relationship of FOXP3 expression and clinicopathological characteristics in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Mod Pathol* 21(5): 617-625, 2008.
8. Yonekura K, Utsunomiya A, Takatsuka Y, Takeuchi S, Tashiro Y, Kanzaki T, Kanekura T: Graft-versus -adult T-cell leukemia/lymphoma effect following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 41(12): 1029-1035, 2008.
9. Uchida N, Wake A, Takagi S, Yamamoto H, Kato D, Matsuhashi Y, Matsumura T, Seo S, Matsuno N, Masuoka K, Kusumi E, Yuji K, Miyakoshi S, Matsuzaki M, Yoneyama A, Taniguchi S. Umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning for elderly patients with hematologic diseases. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14(5): 583-90, 2008
10. Kim SW, Matsuo K, Fukuda T, Hara M, Matsue K, Taniguchi S, Eto T, Tanimoto M, Wake A, Hatanaka K, Nakao S, Ishida Y, Harada M, Utsunomiya A, Imamura M, Kanda Y, Sunami K, Kawano F, Takaue Y, Teshima T. Reduced-intensity unrelated donor bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Int J Hematol*. 2008 Oct;88(3):324-30.
11. Shiratori S, Yasumoto A, Tanaka J, Shigematsu A, Yamamoto S, Nishio M, Hashino S, Morita R, Takahata M, Onozawa M, Kahata K, Konodo T, Ota S, Wakasa K, Sugita J, Koike T, Asaka M, Kasai

- M and Imamura M: A retrospective analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL): clinical impact of grafted-versus-leukemia/lymphoma effect. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14: 817-823. 2008.
12. Hidaka T, Nakahata S, Hatakeyama K, Hamasaki M, Yamashita K, Kohno T, Arai Y, Taki T, Nishida K, Okayama A, Asada Y, Yamaguchi R, Tsubouchi H, Yokota J, Taniwaki M, Higashi Y, Morishita K. Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood.* 2008 Jul 15;112(2):383-393.
13. Murashige N, Kami M, Mori S, Katayama Y, Kobayashi K, Onishi Y, Hori A, Kishi Y, Hamaki T, Tajima K, Kanda Y, Tanosaki R, Takaue Y. 2008. Characterization of acute graft-versus-host disease following reduced-intensity stem-cell transplantation from an HLA-identical related donor. *Am J Hematol* 83:630-634.
14. Saito B, Fukuda T, Yokoyama H, Kurosawa S, Takahashi T, Fuji S, Takahashi N, Tajima K, Kim SW, Mori S, Tanosaki R, Takaue Y, Heike Y. 2008. Impact of T cell chimerism on clinical outcome in 117 patients who underwent allogeneic stem cell transplantation with a busulfan-containing reduced-intensity conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:1148-1155.
15. 宇都宮 典、岡村 純. ATLL 移植後の HTLV-1 プロウイルス動態. *血液・腫瘍科* 56 : 354-360, 2008
16. 油布祐二、岡村 純. ATL 患者に対するミニ移植に関する研究成果と今後の課題. (特集 ; ATL と HTLV-1 研究の最近の進展) .*血液・腫瘍科* 56 : 549-555, 2008
17. 崔日承、岡村 純. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する移植. 455-459 頁、『みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床』神田善伸編著. 医薬ジャーナル社、

2008 年、8 月

2. 学会発表

《国際学会》

1. Okamura J, Tanosaki R, Utsunomiya A, Uike N, Yamanaka T. Long-term survival of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) by reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) from HLA-matched sibling donors (MSD): The Japanese ATL-RIST study. The 33rd European Society for Medical Oncology, Stockholm, Sweden, September 13, 2008

2. セミナー

Okamura J. Reduced-Intensity Stem Cell Transplantation (RIST) for Adult T-cell Leukemia /Lymphoma(ATL): Results of the Japanese trials. Children's Memorial Hospital, Northwestern University's Feinberg School of Medicine Chicago, USA June 2, 2008

《国内学会》

1. 諫田淳也、菱澤方勝、宇都宮典、谷口修一、衛藤徹也、森内幸美、田野崎隆二、河野文夫、宮崎泰司、長藤宏司、原 雅道、熱田由子、川瀬孝和、長村登紀子、松尾恵太郎、加藤俊一、森島泰雄、岡村 純、小野良尚、内山 卓. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する同種造血幹細胞移植—幹細胞源による比較第 30 回日本造血細胞移植学会(ワークショップ) 2008 年 3 月 1 日、大阪市
2. シンポジウム
崔日承、宇都宮典、岡村 純. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する骨髓非破壊的同種末梢血幹細胞移植後の HTLV-1 プロウイルス動態 第 56 回日本輸血・細胞治療学会総会、2008 年 4 月 25-27 日、福岡市

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

骨髄非破壊的移植療法及び免疫療法における宿主抗腫瘍免疫応答解析

研究分担者：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 症例の中に Tax 特異的 CTL が活性化されるものがある。また、移植前の ATL 患者では Tax 特異的 CTL がテトラマーで検出されても機能不全状態である。これらのことから、Tax のメジャーエピトープは生体内で発現されているが、これを認識する T 細胞は免疫抑制下にあると考えられる。従って、適切なアジュバントを用いれば、エピトープ部位のペプチドを標的抗原とするワクチンが Tax 特異的 CTL を活性化させ、ATL 患者の抗腫瘍免疫を強化する免疫療法となる可能性がある。本年度は、免疫療法の臨床試験を実施する準備段階として、これまでの研究成果に基づきプロトコールコンセプトの作成を行なった。さらにプロトコールの詳細を検討するため、アジュバントの最有力候補である患者由来の樹状細胞の、誘導方法およびアジュバント機能について予備実験を開始した。この結果、個体差はあるものの慢性 ATL 症例の末梢血単核球から機能性樹状細胞の誘導が可能であった。また、Tax 蛋白を抗原として Tax 特異的 T 細胞応答を調べたところ、くすぶり型 ATL 患者においても T 細胞応答の減弱が認められた。これは、将来的に免疫療法の適応を早期の患者に広げる根拠となる所見である。

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 応答を活性化する抗 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後およびその他の HTLV-I 感染者の PBMC を分離し、Tax 特異的 T 細胞応答、ウイルス抗原産生量を調べた。
2. Tax 特異的 T 細胞活性の検定には、リコンビナント 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。培養前の PBMC を PE 標識 HLA-A0201/Tax11-19, HLA-A-2402/Tax301-309, HLA-A1101/Tax88-96, あるいは HLA-A1101/Tax272-280 と PE-Cy5 標識 CD8 抗体で二重染色し FACS 解析を行なった。
3. PBMC 中の ATL 細胞を除去した場合の免

疫応答への影響を調べるため、PBMC を CCR4 抗体で処理した後、抗マウス Ig 抗体の結合した磁気ビーズで陽性細胞を除去した。

4. 免疫療法の臨床試験を実施する準備段階としてこれまでの研究成果に基づきプロトコールコンセプトの作成を行なった。数人の委員から構成されるプロトコール作成委員会を開いて討論を行なった。
5. 慢性 ATL 患者の末梢血単核球分画 (PBMC) からさらに密度勾配法を用いて単核球分画を分離し、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。樹状細胞の表面マーカーは FACS で、樹状細胞機能の検定には、種々の costimulatory molecule の発現、貪食能、サイトカイン産生能、リンパ球混合反応等を指標とした。

C. 研究結果

1. ATL 患者における Tax 特異的 T 細胞活性. HTLV-I Tax 蛋白を抗原としたアッセイを用いて種々の患者で T 細胞応答を調べた結果、未治療の慢性 ATL やくすぶり型 ATL においても HTLV-I 特異的 T 細胞応答の低下が認められた。これらの症例では、CD8 陽性 Tax 特異的 CTL がテトラマーで検出されないか、あっても反応性を欠いており、培養中の HTLV-I 抗原産生を抑制しなかった。

くすぶり型 ATL や無症候キャリアの中には、無刺激の PBMC 培養中で非特異的にインターフェロン γ を産生する例も多く認められた。CCR4 陽性細胞を除く事によって感染細胞を減少させるとインターフェロン γ が低下することから、インターフェロン γ を産生する感染細胞があると考えられた。このような非特異反応の強い群には、Tax 特異的 T 細胞応答の認められる例と減弱している例の両方が含まれていた。減弱している例では HTLV-I 抗原産生に対する抑制も減弱していた。PCR を用いた解析では、PBMC から CCR4 陽性細胞を除く事によって感染細胞は減少するが一部残存することが分かった。

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 患者およびくすぶり型 ATL の単球分画から得られた付着細胞に GM-CSF と IL-4 を添加して培養し、さらに成熟させるためいくつかの刺激方法を試みた。一度に回収できる単球数に限りがあるため同一検体での比較が難しいが、TNF- α による標準的な方法で、健全者と遜色ない機能を持つ樹状細胞が得られた。しかし、樹状細胞機能は症例ごとに異なり、さらに検討が必要である。

D 考察

ATL における Tax 特異的 T 細胞応答の低下の機序は不明である。これまでに、白血病細

胞の増加による相対的な正常細胞の減少、他の進行悪性腫瘍で見られる免疫低下と同等のもの、ATL が Treg に由来する腫瘍である等の種々の説がある。我々は今回、末梢血リンパ球の増加を伴わないくすぶり型 ATL や無症候キャリアにおいても Tax 特異的 T 細胞応答が減弱している例があり、HTLV-I 感染細胞の制御不全を伴うことを示した。このことは、T 細胞応答の低下が腫瘍細胞の増加による二次的な影響ではなく早期からあることを示唆している。従って、免疫療法による Tax 特異的 T 細胞応答の活性化は早期の感染者にも有効であることが示唆される。

樹状細胞の機能には個体差があるので、今後、誘導条件や症例適応について検討を進める。

E 結論

Tax 特異的 T 細胞応答の減弱は、進行した ATL だけでなくくすぶり型 ATL にも認められ、早期から存在することが示唆された。慢性型やくすぶり型 ATL からも培養中に機能的な樹状細胞を誘導することのできる症例があった。今後、さらに検討を加える事により、Tax 特異的 CTL エピトープペプチドを抗原とする免疫療法プロトコールの細部を詰めていきたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima H, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. *Cancer Science*, in press, 2008.
2. Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Masuda M, Tomonaga M, Eto T, Hidaka M, Harada M, Choi I, Yamanaka T, Kannagi M, Matsuoka M, Okamura J. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using reduced-intensity

conditioning for adult T cell leukemia/lymphoma: impact of antithymocyte globulin on clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Jun;14(6):702-8.

3. Washiyama M, Nishigaki K, Ahmed N, Kinpara S, Ishii Y, Kanzawa N, Masuda T, Kannagi M. IL-2 withdrawal induces HTLV-I expression through p38 activation in ATL cell lines. *FEBS Lett.* 2007 Nov 13;581(27):5207-12. Epub 2007 Oct 12.

2. 学会発表

1. 神奈木真理. HTLV-I 感染者における T 細胞応答と疾患. 第 29 回日本炎症・再生医学会シンポジウム, H. 20. 7. 10、東京
2. 神奈木真理、長谷川温彦、高塚奈津子. HTLV-I 感染者における免疫応答と疾患発現. 3 学会合同集会「自然免疫の最前線」ワークショップ, H. 20. 7. 11、札幌
3. 神奈木真理、清水由紀子、高森絢子、長谷川温彦、宇都宮典、田野崎隆二、山野嘉久、高塚奈津子、小森一哉、栗原 清、原島奈々江、渡辺俊樹、菱澤方勝、栗村真由美、岡村 純. ATL およびその前段階における Tax 特異的 T 細胞の低応答性: 免疫学的 ATL 危険因子とその回避. 第 1 回 HTLV-I 研究会, H20. 8. 23
4. 神奈木真理. 成人 T 細胞白血病(ATL)と免疫. H20 年度文部科学省科学研究費「がん特定」青少年市民講座, H20. 10. 5 鹿児島
5. Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, and Kannagi M. Insufficient Tax-specific T-cell response and elevated proviral load in some HTLV-I carriers and smoldering ATL patients. 一部の HTLV-I キャリアとくすぶり型 ATL は Tax 特異的 T 細胞応答の減弱と高プロウイルス量を示す. 第 67 回日本癌学会総会, H20.10.28-30、名古屋
6. 高塚奈津子、長谷川温彦、天笠光雄、増田貴夫、神奈木真理. Auto-reactive T-cell activation in HTLV-I infection and their potential for induction of regulatory T-cells. HTLV-I 感染における自己応答性 T 細胞の活性化とその制御性 T 細胞への影響. 第 67 回日本癌学会総会, H20.10.28-30、名古屋
7. 高森絢子、長谷川温彦、清水由紀子、宇都宮典、崔日承、鶴池直邦、田野崎隆二、山野嘉久、岡村純、東みゆき、増田貴夫、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病 (ATL) と HTLV-I 随伴脊髄症/熱帯性瘧疾性対麻痺 (HAM/TSP) に検出される Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞の活性. 第 56 回ウイルス学会学術集会, H20. 10. 26-28、岡山
8. 金原秀一、長谷川温彦、古川裕之、西辻裕紀、増田貴夫、神奈木真理. Type-I interferon による HTLV-I 発現の抑制. 第 56 回ウイルス学会学術集会, H20. 10. 26-28、岡山
9. 三浦ふみ、金原秀一、長谷川温彦、増田貴夫、神奈木真理. HTLV-I 感染マウスの腸管における HTLV-I 感染の検討. 第 56 回ウイルス学会学術集会, H20. 10. 26-28、岡山
10. Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, and Kannagi M. Low T-cell responsiveness against human T-cell leukemia virus type I as an immunological risk factor of adult T-cell leukemia. 成人 T 細胞白血病の免疫学的リスクファクター. 第 38 回日本免疫学会総会, H20. 12. 1-3、京都
11. Takatsuka N, Hasegawa A, Amagasa T, Masuda T, and Kannagi M. Induction of regulatory T-cells by immunizing autoreactive T-cells derived from a HTLV-I-infected rat: HTLV-I 感染ラット由来の自己反応性 T 細胞の免疫による抑制性 T 細胞の誘導. 第 38 回日本免疫学会総会, H20. 12. 1-3、京都

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

成人 T 細胞白血病の分子生物学的解析

研究分担者：松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) 感染によって惹起される悪性度の高い腫瘍である。白血病細胞ゲノムに組み込まれた HTLV-1 プロウイルスは ATL 細胞に残る唯一の感染の証拠であり、HTLV-1 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発がん機構を明らかにすることも期待される。造血幹細胞移植を受けた ATL 患者の腫瘍細胞解析から、発症時に比べ 5' long terminal repeat (LTR) のメチル化が少ないことを見出し、治療によって 5'LTR のメチル化が変化している可能性が示唆された。また腫瘍細胞の全プロウイルス塩基配列の解析から HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子のみが保存されていることを明らかにした。

A. 研究目的

難治性血液腫瘍である ATL は、予後不良であったが、最近の血液幹細胞移植は大きく治療成績を改善しつつある。ATL 細胞に残る唯一の感染の証拠であるプロウイルスを解析し、その有効性の機序を明らかにすることが目的である。これまでの解析から ATL 細胞では、しばしば Tax の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 遺伝子の遺伝的变化、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。

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-1 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) 移植症例におけるプロウイルス解析結果
第一期、第二期の 26 例を対象とした。まずプロウイルスのタイピングを行い、完全型、1 型欠損プロウイルス、2 型欠損プロウイルスに分類した。以前の我々の研究結果を対照として用いた。その結果、プロウイルスのタイプには移植症例で偏りはなく、また予後との相関も認められなかった。次に 5'LTR の DNA メチル化に関して解析したところ、非移植症例では 32.1% がメチル化されていなかったのに対して移植症例では 84.2% の症例が全くメチル化されていなかった。この結果から移植症例では有意に非メチル化が多いことが明らかとなった ($p < 0.001$)。tax 遺伝子の変異は非移植症例では 11.9% に認められたのに対して移植症例では 1 例 (3.8%) のみであった。しかし、有意差は認めていない。この tax 遺伝子に変異を有する症例は移植後も長期生存しており、この結果から、このケースでは Tax に対する細胞性免疫応答は寛解に関連してい

ないことが示唆された。このため Tax 以外のウイルス抗原、あるいはマイナー抗原に対する免疫応答が抗 ATL 効果に関係している可能性が示唆された。

2) ATL 症例における全プロウイルスゲノム解析
ATL 細胞における HTLV-1 プロウイルスの全体像を明らかにするために、44 例の ATL 症例で HTLV-1 プロウイルスの全塩基配列を決定した。gag, pol, env の構造遺伝子だけでなく、tax, rex の調節遺伝子、p12, p13, p30 のアクセサリ遺伝子に多くの non-sense 変異、欠失が見出されたが、HBZ 遺伝子には全くそのような変異・欠失は認められなかった。この結果は HBZ 遺伝子が ATL 細胞の増殖に極めて重要であるという我々の以前の結論を支持している。一方、tax 遺伝子には 44 例中、9 例でナンセンス変異、欠失等を認めた。

D. 考察

HTLV-1 は外来性病原体であるために宿主免疫反応により排除機構が働いている。ウイルスタンパク質の中でも Tax は細胞傷害性 T リンパ球の主要な認識抗原であることが明らかになっている。このため腫瘍細胞では、しばしば Tax を発現できないような変異・欠失・メチル化が認められる。これは ATL 細胞が宿主免疫機構から逃避するための変化であると考えられてきた。移植症例の解析では、一例で Tax を発現できない症例が移植により長期生存していたことから、この症例では Tax は細胞傷害性 T リンパ球の認識抗原だったのではなく、他のウイルス抗原あるいはマイナー抗原が抗腫瘍免疫として有効であった可能性が示唆される。従って ATL への移植療法では Tax のみではない免疫原が有効性の基盤になっていることが示された。

移植症例の 5'LTR の DNA メチル化は非移植例と比較して有意に非メチル化が増加していた。このような ATL 細胞は tax 遺伝子の転写が可能であると予想される。以前の我々の報告では約 15% の ATL 症例では 5'LTR の DNA メチル化によりウイルス遺伝子の転写

が抑制されており、この転写抑制により宿主免疫機構から逃避していることが考えられていた。移植症例の 5'LTR における DNA メチル化が少ない機序としては以下の 3 つが考えられる。1) 免疫抑制により Tax を発現できる環境が生じ、このため Tax を発現できる ATL 細胞が選択された。2) 化学療法により DNA メチル化が減少し、やはり Tax を発現できる細胞が選択された。3) 移植可能な時期まで治療が有効な症例では 5'LTR がメチル化されていないことが多い。移植症例で tax 遺伝子が発現可能な症例が多いという結果は移植において腫瘍細胞が Tax を良く発現でき、宿主免疫応答により抗腫瘍効果が得られ易い症例が多いのかもしれない。これは ATL における移植療法の有効性を説明できる可能性がある。

ATL 細胞における全プロウイルスゲノムの解析により HBZ 遺伝子のみが、変異欠失がなく遺伝子配列が保たれていることが明らかになった。この結果から腫瘍化の最終段階で必要なウイルス遺伝子は HBZ であることが再確認された。

E. 結論

今年度の結果から移植症例では tax 遺伝子を発現できることが多く、これが移植療法の有効性を発揮する分子基盤となっていることが示唆された。また腫瘍細胞で保存されている遺伝子は HBZ であり、その発がん過程における重要性が確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Zhao T, Yasunaga J-I, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. Blood, (in press).
2. Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Fujisawa JI, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced HTLV-1 bZIP factor gene. J Virol, 82: 9359-9368, 2008.
3. Yeung ML, Yasunaga J-I, Bennasser Y,

- Dusetti N, Harris D, Ahmad N, Matsuoka M, Jeang K-T. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and TP53INP1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by HTLV-1. *Cancer Res*, 68:8976-8985, 2008.
4. Takai K, Sakamoto S, Sakai T, Yasunaga J-I, Komatsu K and Matsuoka M, A Potential link between alternative splicing of the *NBS1* gene and the DNA damage/environmental stress. *Radiation Res*, 170:33-40, 2008.
 5. Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Masuda M, Tomonaga M, Eto T, Hidaka M, Harada M, Choi I, Yamanaka T, Kannagi M, Matsuoka M, and Okamura J. Adult T-cell leukemia/lymphoma; Hematopoietic stem cell transplantation; allogeneic; reduced intensity transplantation; anti-thymocyte globulin; graft-versus-ATLL effect. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 14: 702-708, 2008.
 6. Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, Watanabe Y, Ohata Y, Doi S, Sato M, Kano M, Ikeda S, and Matsuoka M. Broad Anti-Retroviral Activity and Resistance Profile of a Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor, Elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol*. 82: 764-774, 2008.
2. 学会発表
 1. Matsuoka M, Sakurai Y, Komatsu K. Lentivirus integration and DNA repair. *Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008*. Otsu, Japan, Apr 22-26, 2008.
 2. Matsuoka M. Molecular pathogenesis and host immune response. *IID 2008 Satellite Workshop "Virus-associated Lymphomas"*. Kyoto, Japan, May 13, 2008.
 3. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構: 第 48 回日本リンパ網内系学会総会、札幌、2008 年 6 月 13-14 日
 4. 吉田美香、佐藤賢文、安永純一郎、藤澤順一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor 遺伝子プロモーター領域の同定と解析: 第 1 回 HTLV-1 研究会、東京、2008 年 8 月 23-24 日
 5. 趙鉄軍、安永純一郎、中尾光善、藤井雅寛、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses classical NF-kB pathway: 第 1 回 HTLV-1 研究会、東京、2008 年 8 月 23-24 日
 6. 趙鉄軍、安永純一郎、中尾光善、藤井雅寛、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor 遺伝子による定型的 NF-kB 経路の選択的抑制: 第 70 回日本血液学会総会、京都、2008 年 10 月 10-12 日
 7. 松岡雅雄: ATL, HTLV-1 研究の進歩: 第 70 回日本血液学会総会、京都、2008 年 10 月 10-12 日
 8. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルスの病原性発現機構: 第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 日
 9. 田邊順子、宇都宮興、田野崎隆二、鶴池直邦、佐藤賢文、岡村純、松岡雅雄: 造血幹細胞移植療法で治療された ATL 患者における HTLV-1 プロウイルスの解析: 第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008 年 10 月 28-30 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

同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試み

研究分担者：豊嶋 崇徳 九州大学遺伝子細胞・療法部 准教授

研究要旨

形質細胞様樹状細胞は臓器移植においては、寛容導入に関与するとされているが、造血細胞移植での役割は明らかにされていない。われわれは、単一の細胞群のGVHD誘導能を検討できるマウスモデルを開発しており、本モデルを用いてGVHDの発症に対する影響を検討した。その結果、形質細胞様樹状細胞は、通常の樹状細胞と同様に、GVHDの発症に関与しうることが示された。この結果から、形質細胞様樹状細胞療法はGVHD増悪のリスクがあると考えられた。

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。われわれは今まで NKT 細胞リガンド投与によって NKT 細胞を刺激することにより GVHD の軽減をはかりつつ (Hashimoto: J Immunol 2005)、GVL 効果の増強効果が可能であることを示した。今年度は、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC; pDC) の GVHD、GVL における関与をマウスモデルにおいて検討した。pDC は臓器移植においては寛容導入に作用することが示されているが、造血細胞移植における役割は明らかでない。

B. 研究方法

レシピエントマウスとして MHC class II を発現しない B6 マウス (II-/-) を用いた。これを全身放射線照射 10Gy で前処置後、野生型 B6 マウスより採取した pDC を add-back した。

Negative control として B 細胞を、positive control として cDC を add-back した。その後 BALB/c マウスからの CD4+ T 細胞を移植した。移植後、GVHD の発症を臨床スコア、病理学的スコアを用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は九州大学動物実験施設の承認を得ている。

C. 研究結果

Negative control である B 細胞を add-back したマウスには GVHD は発症せず、positive control である cDC を add-back したマウスでは GVHD を発症した。pDC を add-back したマウスも GVHD を発症した。この GVHD は臨床スコア、病理学的スコアで有意差をもってその発症が証明された。

D. 考察

pDC は臓器移植では、寛容導入に関与することが示唆されており、造血細胞移植においても GVHD 抑制的に作用する可能性を示唆する報告もある。今回の検討では pDC は単独で GVHD の発症に関与することが直接的に証明された。今後は GVL に対する影響を検討する必要があるものの、pDC 活性化あるいは輸注療法は GVHD 増悪のリスクがあるものと考えられる。

E. 結論

形質細胞様樹状細胞が GVHD の発症に関与していることがはじめて示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki S, Heike Y, Mori S, Fukuda T, Maruyama D, Kato R, Usui E, Koido K, Kim S, Tanosaki R, Tobinai K, Teshima T, Takaue Y: Infectious complications in chronic graft-versus-host disease: a retrospective study of 145 recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced- and conventional-intensity conditioning regimens. *Transplant Infectious Disease* 10(4): 252-259, 2008
2. Eto M, Kamiryo Y, Takeuchi A, Hirano M, tatsugami K, Harada M, Kiyoshima K, Hamaguchi M, Teshima T, Tsuneyoshi M, Yoshikai Y: Posttransplant administration of cyclophosphamide and donor lymphocyte infusion induces potent antitumor immunity to solid tumor. *Clinical Cancer Research* 14(9):2833-40, 2008.
3. Orita Y, Tsujigiwa H, Nishizaki K, Teshima T, Yoshinobu J, Orita Y, Takeuchi A, Takeda Y, Nagatsuka H, Nagai N: The engraftment of transplanted bone marrow-derived cells into the inner ear. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, online, 2008
4. Kim S-W, Matsuo K, Fukuda T, Hara M, Matsue K, Taniguchi S, Eto T, Tanimoto M, Wake A, Hatanaka K, Nakao S, Ishida Y, Harada M, Utsunomiya A, Imamura M, Kanda Y, Sunami K, Kawano F, Takaue Y, Teshima T: Reduced-intensity unrelated donor bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *International Journal of Hematology* 88(3): 324-30.
5. Nonami A, Miyamoto T, Kuroiwa M, Kunisaki Y, Kamezaki K, Takenaka K, Harada N, Teshima T, Harada M, Nagafuji K: Successful treatment of primary plasma cell leukemia by allogeneic stem cell transplantation from haploidentical sibling. *Jap J Clin Oncol.* 37(12), 969-972, 2007.
6. Nonami A, Yamamoto H, Nakamura M, Nagafuji K, Teshima T: An unexpected cause of a febrile patient with huge splenomegaly. *Clin Rheumatol.* 27(7): 941-943, 2008.
7. Shima T, Yoshimoto G, Nonami A, Yoshida S, Kamezaki K, Iwasaki H, Takenaka K, Miyamoto T, Harada N, Teshima T, Akashi K, Nagafuji K: Successful treatment of parainfluenza virus 3 pneumonia with oral ribavirin and methylprednisolone in a bone marrow transplant recipient. *International Journal of Hematology* 88(3):336-340, 2008.
8. Sumida Y, Nakamura K, Kanayama K, Akiho H, Teshima T, Takayanagi R: Preparation of functionally preserved CD4+ CD25high regulatory T cells from leukapheresis products from ulcerative colitis patients, which are applicable to regulatory T cell-transfer therapy. *Cytotherapy* 10(7): 698-710, 2008.

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 に対する臍帯血移植の検討

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 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATL）に対する臍帯血移植の結果について、長崎県内の例を対象に後方視的に検討した。2008 年までに 14 例の ATL に対して臍帯血移植が実施されていた。解析時点で 14 例中 4 例が生存しており、うち 2 例は部分寛解で移植されたものの移植後 2 年以上の長期生存例であった。また、移植時病期が移植後成績と関連する可能性が示された。死亡した 10 例のうち 7 例が移植関連死亡で、感染症が 5 例を占めていた。以上より、ATL に対し臍帯血移植は、一定の治療効果をもたらすものの、より安全な移植法の開発が必要であると考えられた。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病・リンパ腫（ATL）に対する同種造血幹細胞移植が一定の治療効果をもたらすことは、当班の研究を始目として明らかになりつつある。しかし、同種移植に用いられる幹細胞源や前処置法などについては未だ確立しておらず、今後の詳細な検討が必要と考えられる。

臍帯血は、同種造血幹細胞移植の幹細胞源として造血器疾患に広く用いられており、それぞれの疾患に対して一定の治療効果が報告されている。特に国内では移植数も多く、成人に対しても十分に使用可能な移植細胞源であるが、ATL に対するまとまった治療成績の解析は少ない。そこで、ATL に対する同種移植の幹細胞源として臍帯血を用いるとどのような成績になるのか検討することを目的として、長崎県下で実施された ATL に対する臍帯血移植の成績を後方視的に解析した。

B. 研究方法

長崎大学医学部・歯学部附属病院、佐世保市立総合病院にて実施された ATL に対する同種造血幹細胞移植症例のデータを、データ記入シートを用いて収集した。収集されたデータを用いて、患者背景、移植関連情報、治療成績、有害事象、等について解析を行った。

（倫理面への配慮）

患者データは、匿名化番号にて収集され、個人が直接同定される情報は含まないように配慮した。また、研究中に個人情報漏洩することの内容十分に注意した。

C. 研究結果

これまでに、上記に施設において ATL62 例（年齢中央値 50 才）に対して同種造血幹細胞移植が実施されていた。急性型 ATL48 例、リンパ腫型 14 例である。移植時の病期は完全寛解 8 例、部分寛解 26 例、不変時 10 例、増悪期 18 例であり、移植幹細胞源は血縁骨髄 20 例、血縁末梢血幹細胞 18 例、非血縁骨髄 10 例、臍帯血 14 例であった。移植前処置に関しては、標準的（骨髄破壊的）と減弱した前処置がそれぞれ 31 例ずつであった。

全体の成績は 62 例中 38 例の死亡があり、3 年の全生存率が 38.7%であった。

臍帯血移植を受けた 14 例の年齢中央値は 51 才（43-62 才）。ATL 病型は、急性型 9 例、リンパ腫型 5 例で、移植時病期は寛解 3 例、部分寛解 4 例、不変 3 例、増悪期 4 例。骨髄破壊的前処置と減弱した前処置がそれぞれ 7 例ずつ実施されていた。

現在 4 例が生存しており移植後 3 年の全生存率は 28.6%であった。いずれも 1 年を超える

生存例で、このうち2例は2年以上の生存期間が観察されている。10例の死因は、病状悪化3例、移植関連有害事象7例で感染症5例が含まれる。移植後100でおよそ半数が死亡している。移植時病期が増悪であった4例は全員死亡しており、移植成績と関連する因子の可能性があった。また、移植前の化学療法が強力な場合(mLSG15)は5例全例が死亡していた。一方移植前処置に関しては、生存している4例いずれも減弱した前処置後の移植であり、必ずしも骨髄破壊の前処置が必要ではないと考えられた。

D. 考察

移植時に非寛解であって症例においても、減弱した前処置後の臍帯血移植において1年を超える生存例が見られることより、臍帯血移植も必ずしも前処置の強度に依らない、おそらくは免疫学的機序を介した抗ATL効果を示している可能性がある。一方で、治療関連死亡、中でも感染症関連死亡が多いこと、移植後早期の死亡が多発することなど、これまでにATLに対する同種造血幹細胞移植において指摘されていた問題点が、同じように存在している。一方で臍帯血移植の利点である、移植までのコーディネート期間が短縮できる点が移植成績に有利に働く可能性もある。

E. 結論

臍帯血移植はATLに対して一定の効果があると思われる。一方で移植関連有害事象も多く、有害事象を減らす、より適切な適応を設定するなど成績向上のためにさらなる検討が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Niino D, Tomonaga M, et al.: Human Herpes virus 8-negative primary effusion lymphoma with BCL6 rearrangement in a patient with idiopathic CD4 positive T-lymphocytopenia. *Haematologica*, 93(1), e21-3, 2008.
2. Wakui M, Tomonaga M, et al.: Diagnosis of

acute myeloid leukemia according to the WHO classification in the Japan Adult Leukemia Study Group AML-97 protocol. *Int J Hematol*, 87(2), 144-51, 2008.

3. Sawayama Y, Tomonaga M, et al.: Expression of myeloperoxidase enhances the chemosensitivity of leukemia cells through the generation of reactive oxygen species and the nitration of protein. *Leukemia*, 22(5), 956-64, 2008.
4. Matsuda A, Tomonaga M, et al.: Proposals for a Grading System for Diagnostic Accuracy of Myelodysplastic syndromes. *Clinical Leukemia*. 2(2); 102-106, 2008.
5. Tanosaki R, Tomonaga M, et al.: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning for adult T cell leukemia/lymphoma: impact of antithymocyte globulin on clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14(6):702-8, 2008.
6. Suzuki T, Tomonaga M, et al.: Japanese epidemiological survey with consensus statement on Japanese guidelines for treatment of iron overload in bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol*, 88(1), 30-5, 2008.
7. Onimaru Y, Tomonaga M, et al.: Autocrine and/or paracrine growth of aggressive ATLL cells caused by HGF and c-Met. *Int J Oncol*. 33(4): 697-703, 2008.
8. Lee SH, Tomonaga M, et al.: International Council for Standardization In Hematology. : ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol*. 30(5):349-64, 2008.
9. Mufti GJ, Tomonaga M, et al.: Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica* in press.
10. Iwanaga M, Tomonaga M, et al.: Relationship

between Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and radiation exposure in Nagasaki Atomic Bomb Survivors. Blood in press.

11. Fukushima T, Tomonaga M, et al.: Successful cord blood transplantation for Mycosis fungoides. Int J Hematol in press.

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

成人 T 細胞白血病に対する同種造血幹細胞移植後の再発・再増悪例の Gv-ATL 効果

研究分担者：宇都宮 興 慈愛会 今村病院分院 院長

研究要旨

当院において ATL に対して造血幹細胞移植を施行し、移植後 100 日以上生存した 27 症例のうち、再発・再増悪した 15 例について、後方視的に解析を行った。移植後再発は、皮膚が 9 例と最も多かった。再発・再増悪後は 15 例全例で免疫抑制剤を中止し、12 例に急性 GVHD を認め、そのうち 9 例に再寛解が得られた。9 例中 5 例は免疫抑制剤中止のみで CR が得られ、Gv-ATL 効果と考えられる。しかしながら、免疫抑制剤中止によって得られた寛解後の GVHD や再々発により予後は不良であり、再寛解後の対策が急務である。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) に対する同種造血幹細胞移植は、治癒が期待される治療として注目されている。特に ATL においては同種移植後に graft-versus-ATL (Gv-ATL) 効果を認めることが知られている。

ATL の同種移植後再発・再増悪に対するよりよい治療戦略の確立をめざし、移植後の Gv-ATL 効果に着目し、その発現頻度や功罪について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1998 年 6 月から 2007 年 12 月までの期間において、当院にて同種造血幹細胞移植を施行した ATL のうち移植後再発・再増悪をきたした 15 例について、再発部位・再発後経過に着目し後方視的に解析を行った。

なお移植後 100 日以内の早期死亡 7 例については対象から除外した。

(倫理面への配慮)

同種移植の実施にあたっては患者に十分な説明を行い、自由意志に基づき、文書による同意を取得した。

C. 研究結果

同種造血幹細胞移植を施行した ATL 34 例中 100 日以上生存例は 27 例で、そのうち再発・再増悪症例は 15 例であった。男性 11 例、女性 4 例で、年齢中央値 50 歳 (38-62 歳) で

あった。移植前処置は骨髄破壊の前処置が 8 例、骨髄非破壊の前処置が 7 例で、HLA 適合移植が 10 例、HLA 不適合移植が 5 例であった。移植前寛解状態は完全寛解 (CR) 2 例、部分寛解 (PR) 2 例、不変 (SD) 5 例、増悪 (PD) 6 例であり、移植後は非 CR13 例中 7 例に CR が得られた。

移植後再発部位は皮膚 9 例で、そのうち 4 例は移植前に皮膚病変を認めなかった。その他再発部位は、末梢血 6 例、リンパ節 5 例、中枢神経 2 例、骨 1 例、眼 1 例であった。

再発・再増悪後は 15 例全例で免疫抑制剤を中止し、12 例に急性 GVHD を認めた (G-I 2 例、G-II 5 例、G-III 3 例、G-IV 2 例)。GVHD の認められた 12 例中 9 例に再寛解 (CR 8 例、PR 1 例) が得られた。9 例中 5 例は免疫抑制剤中止のみで CR が得られ、そのうち 2 例は CR 継続中 (移植後 68.5+、81.0+か月) であった。また、その 5 例中 4 例で GVHD 出現に先行し Gv-ATL 効果が確認できた(表)。

表 免疫抑制剤中止のみで CR となった 5 症例

症例番号	再発部位	Gv-ATL 効果までの日数	GVHD 発症までの日数	免疫抑制剤中止後の GVHD	転帰/死因
1	皮膚	6	10	Grade II	生存 CR
2	皮膚	14	3	Grade II	生存 CR
3	リンパ節	6	13	Grade IV	aGVHD 死
4	皮膚	7	9	Grade II	腫瘍死
5	末梢血	1	5	Grade II	肺炎死

(各日数は免疫抑制剤中止日を基準日とする)