

200925013A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

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)

平成 22 (2010) 年 4 月

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. 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 神奈木真理 ————— 8
2. 成人T細胞白血病の分子生物学的解析 松岡 雅雄 ————— 12
3. 成人T細胞白血病(ATL)に対するHTLV-1 Tax特異的T細胞応答賦活化
ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法第I相臨床試験 谷 憲三朗 ————— 16
4. 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 ————— 18
5. 成人T細胞白血病リンパ腫の同種造血幹細胞移植後の長期生存例に
おける末梢血HTLV-1プロウイルス 宇都宮 與 ————— 20
6. ATLを含めた悪性リンパ腫に対する同種移植の移植ソース別比較 谷口 修一 ————— 27
7. 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 ————— 31
8. ATLに対する同種移植療法におけるサイトメガロウイルス
抗原血症の意義 宮崎 泰司 ————— 35
9. 成人T細胞白血病(ATL)患者に対する骨髄非破壊的前処置法を用いた
同種造血幹細胞移植術の実施 鶴池 直邦 ————— 37
10. ATLに対する同種造血幹細胞移植の治療成績とウイルス遺伝子型に
関する研究 今村 雅寛 ————— 40
11. 末梢性T細胞リンパ腫とATLの細胞起源に関する免疫組織化学的研究 谷脇 雅史 ————— 42
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 ————— 45

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 47

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）
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

高齢者 ATL 患者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 21 年度は、血縁者間末梢血による第 3 期試験および非血縁骨髄ドナーを介した第 4 期試験（第 I 相）を実施した。また、エピトープが同定されている HTLV-1Tax を標的抗原とした特異的細胞傷害性 T 細胞（CTL）の活性化を目的として、エピトープペプチドと自家樹状細胞の組み合わせによる免疫療法の実施計画書を作成した。実施施設の 1 つである九州大学医学部倫理委員会において臨床試験が承認された。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. 神奈木真理 | 東京医科歯科大学 | 教授 |
| 2. 松岡 雅雄 | 京都大学ウイルス研究所 | 教授 |
| 3. 谷 憲三朗 | 九州大学生体防御医学研究所 | 教授 |
| 4. 豊嶋 崇徳 | 九州大学医学部 | 准教授 |
| 5. 宇都宮 與 | 慈愛会今村病院分院 | 院長 |
| 6. 谷口 修一 | 虎の門病院 | 部長 |
| 7. 田野崎隆二 | 国立がんセンター | 医長 |
| 8. 宮崎 泰司 | 長崎大学医学部 | 教授 |
| 9. 鷓池 直邦 | 九州がんセンター | 部長 |
| 10. 今村 雅寛 | 北海道大学大学院 | 教授 |
| 11. 谷脇 雅史 | 京都府立医科大学 | 教授 |
| 12. 山中 竹春 | 九州がんセンター | 室長 |

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 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）を実施した。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。また、血清学検査において、HLA 6/6 一致の血縁ドナーを有し、説明同意書を用いて同意を得た者とした。健康な HLA 一致血縁ドナーに対し G-CSF を 5 日間投与し、4 日目からアフエ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-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。

(1-2) 第1期/2期試験登録例の長期追跡：
すでに終了した第1期/2期試験(第1相)登録例について、その後の状況を解析した。

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)の開始：

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、前向き試験を開始した。これまで本研究班の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、予定登録数は15症例とした。

3) 免疫療法の検討：本臨床試験と連携した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-I 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-I特異的CTL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を作成した。HLA-A*0201、HLA-A*2402、HLA-A*1101のいずれかを有する既治療例のATL患者を対象に、アフェレーシスによって得られた末梢血単核球より接着細胞をGM-CSF、IL-4、逆転写酵素阻害剤(zidovudine)添加下で分化誘導後、TNF- α 、KLH、OK432で成熟化させた樹状細胞にTaxペプチドをパルスする。得られた樹状細胞は、出荷基準を確認後(生細胞数、表面形質)、2週毎に計3回皮下投与する。本臨床試験の主要エンドポイントとして、Tax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としてATL患者における樹状細胞製造の実現可能性、Tax特異的T細胞応答の誘導、抗ウイルス(HTLV-I)効果、抗白血病(腫瘍)効果を検討する。

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：

末梢血単核細胞(PBMC)からDNAを抽出し、HTLV-I 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Real-time PCR法(LightCycler)によりHTLV-I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) 宿主抗腫瘍免疫応答解析：

ペプチド添加樹状細胞(DC)ワクチンの臨床試験に応用するため、ATL患者からのDC誘導

方法の細部について検証を行なった。すなわち、DCの表面抗原（主要組織適合抗原（MHC）分子や副刺激分子）、貪食能、サイトカイン産生能、抗原提示能等を指標とした検討、逆転写酵素阻害剤ジドブデイン（AZT）、またはテノフォビル（TFV）のDC機能への影響の検討、誘導成熟させたDCにマイトマイシンC（MMC）およびγ線照射処理を行ない、DC機能への影響などを検討した。

（4-4）ATLの分子生物学的解析：

【対象】症例は研究班プロトコールに従い同種末梢血幹細胞移植が施行された症例に加え、HTLV-1キャリア、ATL症例を用いた。

【方法】末梢血あるいはリンパ節からゲノムDNAを抽出し、HTLV-1プロウイルスを増幅し、その全塩基配列を決定した。

（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(plasmacytoid DC; pDC)のGVHDにおける関与について、マウスモデルを用いて検討した。

（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3期臨床試験の実施：参加23施設

の倫理委員会では実施計画書が承認された。これまでに20例が登録され、14例の移植が終了、13例は移植後6ヶ月以上経過した。13例は完全キメラを達成し、移植関連合併死亡（TRM）3例である（2010年3月現在）。本試験については、症例登録が遅れているため、効果安全性評価委員会において2年間の延長が承認された。

（1-2）第1期/2期試験登録例の長期追跡：

29例中10例がRIST後58～103ヶ月間（中央値82ヶ月）生存中であり、5年生存率は34%（95% confidence interval, 18-51%）、生存者全員の社会復帰が可能となり、PSもKarnofsky score>90%と良好であった。

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：本試験の開始後、現在までに13施設の倫理委員会では実施計画書が承認されている。1例目の移植から12ヶ月間で17例が仮登録され、8例の移植が終了した。移植関連合併死亡（TRM）が1例で観察された（2010年3月現在）。

3) 免疫療法の検討：臨床試験実施に向けて臨床試験実施計画書、患者説明および同意書を作成し、九州大学医学部倫理委員会へ提出し、2010年1月4日に承認された。また樹状細胞調整における前臨床試験より得られた知見から、臨床スケールに沿った大量細胞調整を行う上での問題点を検証するため、健常人ドナーからのアフエレーシス法によって得られた検体で同一工程の安全性、適格性を検証した。

4) 移植療法に伴う基礎的解析

（4-1）HTLV-Iプロウイルス量動態に関する研究：経時的に測定が可能であった45例中25例（56%）では、RIST後6カ月以内にプロウイルス量が検出限界以下となり、in vivoでHTLV-I感染ATL細胞の排除を誘導する抗HTLV活性の存在が示唆された。RIST後40カ月以上生存している生存例10例の長期追

跡結果では、キャリアから移植後、そのままキャリアレベルで推移する群、正常ドナーから移植後、いったん、測定感度以下となり、その後、再びキャリアレベルに戻る群、測定感度以下まで低下し、そのレベルにとどまる群の3パターンが観察された。

(4-2) RIST 後の造血細胞動態に関する研究: 第1-4期試験において評価が可能であった52例(血縁間移植44例、非血縁者移植8例)について、STRによる混合キメラ解析を実施した。全例で、ドナー・レシピエントの識別が可能であり、長期生存中の10例についても完全キメラが維持されていた。

(4-3) 宿主抗腫瘍免疫応答解析:

慢性ATL症例の末梢血単核球(PBMC)から成熟DCの誘導を確認し、DC誘導方法の細部について検証した。DC誘導培養中の感染および混入するATL細胞の生存を阻止するための方策として、培養液へのAZT等の逆転写酵素阻害剤添加やDC成熟後のマイトマイシンC(MMC)処理およびγ線照射の影響を調べた。いずれの処理もDCの抗原提示能には大きく影響しなかったが、HTLV-I感染細胞はγ線にやや抵抗性であったことから、AZT添加とMMC処理を採用することとした。その他、成熟条件や凍結保存の影響についても検討した。

(4-4) HTLV-Iの分子生物学的解析:

第1期/2期症例を解析し、プロウイルスのタイプと予後との相関は認めなかった。tax遺伝子の変異は非移植症例では11.9%、移植症例では1例(3.8%)に認めた。今年度は、腫瘍細胞中のプロウイルスの全塩基配列を決定しnonsense変異が多数存在することを明らかにした。HTLV-I bZIP factor(HBZ)遺伝子のみには検出されなかったことからATL発がん過程においてHBZが必須のウイルス遺伝子であることが示された。

(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: pDCは高いIFN-α産生能を保持し、GVHD誘導能は認められなかった。一方、移植前処置後に輸注されたpDC

は高いT細胞活性化能を獲得し、GVHDを誘導した。pDC細胞療法は移植前処置による影響をさけて移植後期に試みられるべきであると考えられた。

D. 考察

50才以上のATL患者を対象とした血縁者末梢血を幹細胞源とするRISTの第I相試験の結果、TRMは20%台へ減少し、29例中10例が生存中であり、5年生存率34%であった。また、過半数の症例では、プロウイルス量が検出限界以下まで減少することを証明した。これらの結果から、RISTの抗ATL効果および抗ウイルス療法としての有効性が、初めて前向き試験により示唆され、「RISTによるATLの治癒」の可能性が期待された。現在、血縁者末梢血幹細胞による第II相試験によりその有効性について検証中である。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。また、HTLV-I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自家樹状細胞の組み合わせによる免疫療法実施計画書を作成し、九州大学医学部倫理委員会の承認を受けた。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。すなわち、宿主抗腫瘍免疫応答の解析では、ATL患者からDCが誘導可能であり、個体差はあるものの、試験管内で成熟させたDCは抗原提示能が保たれていることが判明した。樹状細胞療法において、DC誘導中の非感染細胞へのHTLV-I感染やATL細胞の生存を極力避ける対策として、通常のDC誘導系にAZT添加やMMC処理の行程を加えるための基礎データが得られ、Taxペプチドを添加した樹状細胞療法の妥当性と実施方法の詳細がより明確になり計画書がほぼ完成した。HTLV-Iの分子生物学的解析では、キャリアの段階から既にナンセンス変異が存在していること、ナンセンス変異はAPOBEC3Gによって生じていることが明らかとなった。Taxを発がんに必要なとしない症例が少なからずあり、一方、HBZ

は全ての症例で保存されていたことから HBZ 遺伝子の発がん過程における重要性が示唆された。同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試みにより、pDC が移植前処置後の炎症環境下では GVHD 誘導的に作用する可能性が示された。この結果から、pDC 活性化あるいは輸注療法は移植前処置の影響の減弱した移植後期に考慮されるべきであると考えられた。

E. 結論

本研究班による ATL への前方視的試験によって、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。これまでの結果から、生体内で HTLV-1 感染 ATL 細胞を排除する抗 HTLV 活性が作動し、RIST が有効な免疫療法および抗ウイルス療法としての意義を持つことが判明した。現在、RIST の有効性を検証する臨床試験および細胞源を拡大した臨床試験を実施中である。さらに既治療例に対して、自家樹状細胞による免疫療法を開発中であり、これらの細胞療法による ATL の根治を目指している。本研究班の臨床試験は臨床家と基礎研究者との協力により行っており、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 免疫の役割が明らかになりつつある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Tomonaga M, Harada M, Yamanaka T, Kannagi M and Okamura J. Long-term outcomes after hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective trials. Bone Marrow Transplantation, E-publish, 2010
- 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. Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. Cancer Sci., 100: 481-489, 2009
- Takatsuka N, Hasegawa A, Takamori A, Shimizu Y, Kato H, Ohashi T, Amagasa T, Masuda T, Kannagi M. Induction of IL-10 and IFN-g-producing T-cell responses by autoreactive T-cells expressing human T-cell leukemia virus type I Tax. Int. Immunol. 21: 1089-1100, 2009
- Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, Nishitsuji H, Furukawa H, Masuda T, and Kannagi M. Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type-1 expression in vitro and in vivo through type-I interferon. J. Virol. 83: 5101-5108, 2009
- 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, 113: 2755-2764, 2009
- Matsuoka M, and Green PL. HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. Retrovirology, 6: 71, 2009
- Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K, Matsuoka KI, Karube K, Niuro H, Harada M, Tanimoto M, Akashi K, Teshima T: Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. Blood 113(9): 2088-2095, 2009
- Yamamoto H, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, Tsuji M, Kato D, Matsuhashi Y, Seo S, Matsuno N, Masuoka K, Wake A, Yoneyama A, Makino S, Taniguchi S. Possiblegraft-versus-host disease involving the central nervous system soon after cord blood transplantation. Am J Hematol. Nov;84(11):764-6, 2009
- Matsuno N, Wake A, Uchida N, Ishiwata K, Araoka H, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H,

Kato D, Matsushashi Y, Seo S, Masuoka K, Miyakoshi S, Makino S, Yoneyama A, Kanda Y, Taniguchi S. Impact of HLA disparity in the graft-versus-host direction on engraftment in adult patients receiving reduced-intensity cord blood transplantation. *Blood*. 20;114(8):1689-95,2009

10. Kim SW, Mori SI, Tanosaki R, Fukuda T, Kami M, Sakamaki H, Yamashita T, Koderu Y, Terakura S, Taniguchi S, Miyakoshi S, Usui N, Yano S, Awano Y, Nagatoshi Y, Harada M, Morishima Y, Okamoto S, Saito AM, Ohashi Y, Ueda R, Takaue Y. Busulfex (i.v. BU) and CY regimen before SCT: Japanese-targeted phase II pharmacokinetics combined study. *Bone Marrow Transplant* 43:611-617,2009
11. Nakahata S, Saito Y, Hamasaki M, Hidaka T, Arai Y, Taki T, Taniwaki M, Morishita K. Alteration of enhancer of polycomb 1 at 10p11.2 is one of the genetic events leading to development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 48:768-776, 2009
12. 宇都宮與: 成人T細胞白血病/リンパ腫へのアプローチ. *血液・腫瘍科*, 58(4): 434-440, 2009
13. 油布祐二、鶴池直邦 成人T細胞白血病/リンパ腫の適切な初期治療は？臨床に直結する血液疾患診療のエビデンス(編者：神田善伸)、p295-298,2009 文光堂(東京)

2. 学会発表

《国際学会》

1. Hasegawa A, Shimizu Y, Takamori A, Takatsuka N, Utsunomiya A, Tanosaki R, Choi I, Uike N, Okamura J, and Kannagi M. Functional evaluation of monocyte-derived dendritic cells from patients with chronic type of adult T cell leukemia. 14th International Conference on Human Retrovirology. H21.7.1. Salvador, Brazil
2. Tanosaki R, et al. Long-term outcome of ATL patients who underwent reduced-intensity

stem cell transplantation (RIST): Suggested potent graft-versus-ATL and HTLV-1 effects. 51st annual meeting, American Society of Hematology. 米国ニューオーリンズ、2009年12月

《国内学会》

1. 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49回日本リンパ網内系学会総会、兵庫県淡路市、2009年7月9-11日
2. 西之原正昭、田野崎隆二、他. 成人T細胞白血病リンパ腫に対する非血縁者間同種骨髄ミニ移植の当院における経験. 第2回HTLV-1研究会. 2009年8月 東京都
3. 岡村 純: ATLに対する同種幹細胞移植療法臨床試験の現状と課題 第2回HTLV研究会 2009年8月29日、東京都
4. 末廣陽子、神奈木真理、鶴池直邦、宇都宮與、松岡雅雄、豊嶋崇徳、安部康信、三浦修、長谷川温彦、田野崎隆二、平家勇司、谷憲三朗、岡村純: 成人T細胞白血病(ATLL)に対するHTLV-I Tax特異的T細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法 第I相臨床試験. 第1回造血器腫瘍免疫療法研究会 学術集会 2009年8月29日-30日 大阪市
5. 清水由紀子、長谷川温彦、宇都宮與、田野崎隆二、崔日承、鶴池直邦、谷憲三朗、岡村 純、神奈木真理: 慢性ATL患者における樹状細胞の機能解析. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1-3日、横浜市
6. Takamori A, Hasegawa A, Shimizu Y, Utsunomiya A, Yamano Y, Choi I, Uike N, Tanosaki R, Masuda M, Okudaira T, Okamura J, and Kannagi M. Difference in the responsiveness of Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic ATL and HAM/TSP patients. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2-4日、大阪市

《シンポジウム》

1. 崔日承、岡村純：ATL に対する移植療法
第 49 回日本リンパ網内系学会総会
2009 年 7 月 10 日、兵庫県淡路市
2. 岡村 純：ATL の根治を目指す幹細胞移植療法、日沼頼夫京都大学名誉教授文化勲章受章記念シンポジウム 2010 年 3 月 12 日、京都市

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

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

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

我々は、これまでの造血幹細胞移植例の免疫解析で得られた成果を基に、ATL 患者の Tax 特異的 CTL の活性化を目的とした、ペプチド添加樹状細胞（DC）ワクチンの臨床試験を計画している。本年度は、ATL 患者からの DC 誘導方法の細部について検証を行ない計画書に反映させた。慢性 ATL 症例の末梢血単核球（PBMC）から成熟 DC の誘導が可能であり、個体差はあるものの抗原提示能を保持していた。PBMC 中に存在する HTLV-I 感染細胞から培養中の非感染細胞への新たな感染を阻止するため、AZT 等の逆転写酵素阻害剤添加の影響を検討し、これらの薬剤を培養中に添加しても DC の抗原提示能が保たれていることを確かめた。さらに、混入する ATL 細胞を不活化するため DC 成熟後のマイトマイシン C（MMC）処理または γ 線照射の影響を検討した。どちらの処理も DC の抗原提示能には大きく影響しなかったが、HTLV-I 感染細胞は γ 線に比べ MMC に対してより感受性であった。以上から、DC 誘導過程における AZT 添加と DC 成熟後の MMC 処理が、DC 製造過程での感染や ATL 細胞生存の回避対策として採用できることが分かった。その他、成熟の刺激条件や DC の凍結保存の影響等についても検討した。さらに、生体内 ATL 細胞における低レベルのウイルス発現が、恒常的なウイルス転写と自然免疫による抑制との平衡の結果である化能性を示す基礎研究結果が得られた。これらから、Tax 特異的 CTL エピトープペプチドを抗原とする DC 療法の妥当性と実施方法の詳細がより明確になり計画書はほぼ完成した。

A. 研究目的

ATL 患者に対する Tax 特異的 CTL 応答の強化を目的として、CTL エピトープ部位のペプチドを付加した樹状細胞（DC）療法の実施するため、ATL 患者からの DC 製造条件の詳細について検討し、計画書を作成した。

B. 研究方法

1. HTLV-I 感染者および健常者由来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 DC の誘導を行なった。DC の表面抗原（主要組織適合抗原（MHC）分子や副刺激分子）、貪食能、サイトカイン産生能、抗原提示能等を指標として検討した。
2. 逆転写酵素阻害剤ジドブデイン（AZT）、またはテノフォビル（TFV）を DC 誘導開始時から成熟過程まで加え、DC 機能への影響を表面抗原およびリンパ球混合反応試験を指標として調べた。
3. 誘導成熟させた DC にマイトマイシン C（MMC）処理（50 μ g/ml, 37 $^{\circ}$ C, 30 分）および γ 線照射（25–35 Gy）処理を行ない、DC 機能への影響を表面抗原およびリンパ球混合反応試験を指標として調べた。また、ATL 由来の IL-2 依存性 T 細胞株に MMC 処理あるいは γ 線照射を行ない生存に対する影響をトリパンブルー色素排除試験で調べた。
4. 自然免疫による ATL 細胞のウイルス発現抑制機序を調べるため、ATL 細胞と上皮細胞を共培養し、ATL 細胞から産生される HTLV-I p19 量を ELISA で測定した。

C. 研究結果

1. 臨床試験計画書、説明書、同意書の作成
昨年度作成したプロトコールコンセプトを基に臨床試験計画書を試作し、適応症例条件、検査項目、試験日程、DC 製造過程について数人のプロトコール委員で討論を行ない、説明書、同意書も含め改訂を重ねた。
2. DC 分離、成熟方法に関する検討
慢性 ATL 患者およびくすぶり型 ATL の単核球分画からさらに密度勾配によって得られた単核球分画を付着させ、定法により誘導培養を行なったところ機能的な DC が得られたが、収量にはかなり個体差があった。また、健常者由来の DC を用いて、成熟刺激に用いる TNF- α 、OK432、KLH の添加条件をサイトカイン産生、アロ CD4 リンパ球混合試験で検討した結果、TNF- α 、KLH は DC 誘導開始から 6 日目に OK432 は 7 日目に加えるときが最も機能的な DC を誘導できることがわかった。
3. DC 誘導時の逆転写酵素阻害剤の影響
ATL 患者の PBMC 中に存在する ATL 細胞から、培養中あらたに HTLV-I 感染が拡大することを防ぐため、逆転写酵素阻害剤を培養中に添加する予定である。AZT あるいは TFV は HTLV-I 感染に対してそれぞれ 0.1 μ M \sim 2 μ M、0.01 \sim 0.1 μ M で抑制効果を示すことが知られている。そこでまず様々な濃度の薬剤存在下で誘導した DC の収率を検討したところ、AZT では 2 μ M 以上でわずかな収率の低下が見られた。一方 TFV では収率に変化はなかった。そこで、DC 誘導の最初の段階から成熟過程までこれらの薬剤を入れ続けた系と無添加の系で健常者由来の DC を誘導し機能を比較した。その結果、これらの薬剤存在下に誘導した DC の表面抗原発現レベル、アロリンパ球刺激能は無添加の DC と同等であった。
4. MMC 処理および γ 線照射の影響
DC 製造過程で混入する ATL 細胞を接種前に不活化させるための方法として、

MMC 処理または γ 線照射が候補に挙げられた。DC 機能への影響を調べるため、健常人由来の DC を誘導成熟させた後にこれらの処理を行なったところ、表面抗原の発現レベルにおいては MHC クラス II の弱い発現低下が認められたが、アロ CD4 リンパ球混合反応試験では DC 機能は保たれていた。

一方、IL-2 依存性 ATL 細胞株を MMC 処理した場合には、翌日には細胞数が半減し、1 週間以内に死滅した。これに対し、25 \sim 35 Gy の γ 線照射した場合は、細胞増殖は停止したものの 2 週間以上生存細胞が残存した。

5. 自然免疫による ATL 細胞のウイルス発現抑制
HTLV-I 抗原の発現は、末梢血から分離した ATL 細胞においては低レベルであり、培養により急激に増強することが知られている。ATL 患者 PBMC を単独で 1 日培養したものと、上皮細胞株と共培養したものを比較すると、上清中の HTLV-I p19 量は共培養により優位に抑制された。上皮細胞によるウイルス発現抑制は HTLV-I 感染細胞株でも再現され、感染細胞を上皮細胞から分離すると再び発現が回復することから、抑制は可逆的であることが分かった。

D 考察

本研究結果により、ATL 患者から DC が誘導可能であり、個体差はあるが、試験管内で成熟させた DC は抗原提示能が保たれていることがわかった。

患者が HTLV-I 感染者である以上、培養中に HTLV-I 感染細胞が存在することは避けられないが、少なくとも培養中での新たな感染を阻止するため、AZT、TFV 等の逆転写酵素阻害剤を添加することができる。これらの薬剤は感染抑制効果を示すと報告されている濃度では DC の抗原提示能を損なわないことがわかった。TFV による細胞毒性は AZT に比べ非常に少ないという利点がある一方で、個体によって有効性が異なるといった報告

があり、個体レベルでの検査が必要になるため、本臨床試験では AZT を選択するのが良いと思われる。

MMC 処理された DC では MHC クラス II の弱い発現低下が見られたが、抗原提示能には影響しなかったこと、本臨床試験では MHC クラス I 拘束性エピトープを抗原として使用することなどを考慮しても DC のアジュバント効果に影響はないものと思われる。HTLV-I 感染細胞は γ 線照射に対して増殖を停止し徐々に死滅するが、ある程度の抵抗性を持っているようである。本臨床試験の現段階の目的が安全性の確認であることから、ATL 細胞の不活化には MMC を選択することとした。

HTLV-I 感染細胞のウイルス発現が自然免疫により可逆的に抑制される現象は、末梢血から分離直後の ATL 細胞のウイルス発現の挙動と一致している。このことから、ATL 細胞では恒常的にウイルス転写がおこっており、自然免疫による抑制と平衡した結果、低い発現レベルに保たれている可能性が考えられる。これは、生体内におけるウイルス発現を支持する結果である。

E 結論

ATL 患者からも機能的 DC を試験管内で誘導できる。DC 誘導中の非感染細胞への HTLV-I 感染や ATL 細胞の生存を極力避ける対策として、通常の DC 誘導系に AZT 添加や MMC 処理の行程を加えることとした。生体内の感染細胞のウイルス発現を支持する新知見が得られた。これらの結果から、Tax ペプチドを添加した樹状細胞療法の妥当性と実施方法の詳細がより明確になり計画書はほぼ完成した。

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 N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, and Kannagi M. Impaired

Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-I in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. *Cancer Sci.*, 100: 481-489, 2009

2. Takatsuka N, Hasegawa A, Takamori A, Shimizu Y, Kato H, Ohashi T, Amagasa T, Masuda T, Kannagi M. Induction of IL-10 and IFN-g-producing T-cell responses by autoreactive T-cells expressing human T-cell leukemia virus type I Tax. *Int. Immunol.* 21: 1089-1100, 2009
3. Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, Nishitsuji H, Furukawa H, Masuda T, and Kannagi M. Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type-I expression in vitro and in vivo through type-I interferon. *J. Virol.* 83: 5101-5108, 2009

2. 学会発表

《国際学会》

1. Kannagi M, Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, Nishitsuji H, and Masuda T. Suppression of HTLV-I expression by stromal cells in vitro and in vivo through type-I interferon responses. 14th International Conference on Human Retrovirology. H21.7.1. Salvador, Brazil
2. Hasegawa A, Shimizu Y, Takamori A, Takatsuka N, Utsunomiya A, Tanosaki R, Choi I, Uike N, Okamura J, and Kannagi M. Functional evaluation of monocyte-derived dendritic cells from patients with chronic type of adult T cell leukemia. 14th International Conference on Human Retrovirology. H21.7.1. Salvador, Brazil

《国内学会》

1. 神奈木真理. HTLV-I と免疫：自然免疫と獲得免疫による HTLV-I 発現制御。第 49 回日本リンパ網内系学会総会シンポジウム。H.21. 7.10, 淡路
2. Shimizu Y, Hasegawa A, Utsunomiya A,

- Tanosaki R, Choi I, Uike N, Tani K, Okamura J, and Kannagi M. Functional study on monocyte-derived dendritic cells from chronic ATL patients. 慢性 ATL 患者における樹状細胞の機能解析. 第 68 回日本癌学会学術総会、H21.10.1、横浜
3. Hasegawa A, Takatsuka N, Masuda T, and Kannagi M. Basic study on bone marrow-derived dendritic cell-based immunotherapy using HTLV-1-infected rat model. HTLV-1 感染ラットモデルを用いた骨髄由来樹状細胞療法の基礎的研究. 第 68 回日本癌学会学術総会、H21.10.1、横浜
4. Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, Masuda T, and Kannagi M. Reversible suppression of HTLV-I expression by innate immunity in vitro and in vivo through type-I interferons. I 型インターフェロンを介した自然免疫による生体内の HTLV-I 発現抑制. 第 68 回日本癌学会学術総会、H21.10.2、横浜
5. 金原秀一、長谷川温彦、宇都宮與、西辻裕紀、古川裕之、増田貴夫、神奈木真理. 生体内における HTLV-I 発現抑制機序への自然免疫応答への関与. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、H21.10.27、東京
6. 長谷川温彦、高塚奈津子、清水由起子、高森絢子、曾娜、神奈木真理. HTLV-1 持続感染ラットモデルを用いたペプチド/樹状細胞ワクチンの基礎的研究. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、H21.10.27、東京
7. Takamori A, Hasegawa A, Shimizu Y, Utsunomiya A, Yamano Y, Choi I, Uike N, Tanosaki R, Masuda M, Okudaira T, Okamura J, and Kannagi M. Difference in the responsiveness of Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic ATL and HAM/TSP patients. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、H21.12.4、大阪
8. Kinpara S, Hasegawa A, Utsunomiya A, Masuda T, and Kannagi M. Potential involvement of type-I interferon responses by stromal cells in suppression of HTLV-1 expression in vivo. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、H21.12.4、大阪

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

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は感染後、一部のキャリアに成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を引き起こす。ATL は予後不良な血液悪性腫瘍であり、治療法の開発が望まれている。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。腫瘍細胞中のプロウイルスの全塩基配列を決定し nonsense 変異が多数存在することを明らかにした。Nonsense 変異は tax, rex, p12, p30, p13 など殆ど全てのウイルス遺伝子に存在したが、HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子のみには検出されなかった。塩基配列解析結果から non-sense 変異は APOBEC3G により組み込み前に生じていることが示唆された。この結果から ATL 発がん過程において HBZ が必須のウイルス遺伝子であることが示された。

A. 研究目的

ATL が独立した疾患として提唱され、その原因ウイルスである HTLV-1 が発見され約 30 年が経過したが ATL の治療成績は不良なままであった。しかし、最近の血液幹細胞移植はその治療成績を大きく改善しつつある。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本研究の目的である。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に加えて HTLV-1 キャリア、ATL 症例を用いた。

【方法】末梢血あるいはリンパ節からゲノム

DNA を抽出し、HTLV-1 プロウイルスを増幅し、その全塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) ATL 症例における HTLV-1 プロウイルス配列

ATL 症例におけるプロウイルスをタイピングし、5', 3' LTR を有するプロウイルスを増幅し direct sequence 法で塩基配列を決定した。その結果、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。tax 遺伝子には 60 例中、10 例でナンセンス変異、欠失等を認めた。

ナンセンス変異は同定された 29 変異の内、27

変異がトリプトファンに起こっていた。変異部分の塩基配列をみると TGG が TGA, TAG というストップコドンに変わっていた。この G to A 変異はレトロウイルスの逆転写反応の際に APOBEC3G によって起こる変異と一致しており、APOBEC3G の関与が疑われた。全プロウイルス中の塩基配列の解析から G to A 変異は TGG, CGG を標的にしており APOBEC3G の標的配列と一致していた。

2) HTLV-1 キャリアにおける変異の解析

ATL 細胞で認められたナンセンス変異が白血病発症以前に存在するかを確認するためにキャリアの解析を行った。ATL 細胞でナンセンス変異が多く認められた tax, pol 遺伝子の増幅を行った。サブクローニング後に塩基配列を決定したところキャリアにおいても tax, pol にナンセンス変異を認めた。tax にナンセンス変異を有するクローンが 21 クローン中、9 クローンで tax にナンセンス変異を認めるキャリアがあり Tax を発現していない場合もクローナルな増殖を起こすことが示唆された。

D. 考察

HTLV-1 による発がん機序では Tax が中心的な働きをすると考えられてきた。Tax は *in vitro* で T リンパ球を不死化できるだけでなくトランスジェニックマウスで様々な腫瘍を発生させることが報告されており、その機序として NF- κ B, AP-1, CREB 経路の活性化、p53 の機能的抑制などが知られている。ATL 細胞における Tax の発現を解析すると約 60% で発現していない。その機序としては 5'LTR の DNA メチル化、5'LTR の欠失、tax 遺伝子の変異が存在することを報告してきた。このような変異・変化はキャリアではなく ATL になった段階で生じると予想されてきた。しかし、今回の我々の解析結果はキャリアの段階から既にナンセンス変異が存在していることを示している。

今回の解析からナンセンス変異は APOBEC3G によって生じていることが明らかとなった。APOBEC3G はレトロウイルスの逆転写の段階でナイマス一本鎖 DNA をター

ゲットとして C-to-T 変異を起こす。このためプラス鎖では G-to-A 変異を起こし、ナンセンス変異をつくりウイルスの複製を阻害する。HTLV-1 プロウイルスの G-to-A 変異部位は APOBEC3G の標的配列と一致しており、これらの G-to-A 変異が逆転写の段階で APOBEC3G によって発生したことを示している。つまり ATL 患者、HTLV-1 キャリアの HTLV-1 プロウイルスに認められたナンセンス変異は逆転写の段階で生じており、tax 遺伝子にナンセンス変異を有する細胞では組み込み前から Tax の発現が失われていたことになる。

ATL 症例では HBZ 遺伝子にはナンセンス変異が認められなかった。これは APOBEC3G が逆転写の過程でマイナス鎖をターゲットとするためにマイナス鎖にコードされる HBZ にはナンセンス変異を起こさないためである。加えて HBZ コーディング領域には APOBEC3G の標的配列が少なくミスセンス変異も起こりにくいことが示された。

E. 結論

今年度の結果から Tax を発がんに必要なとしない症例が少なからずあり、一方、HBZ は全ての症例で保存されていたことから HBZ 遺伝子の発がん過程における重要性が示唆された。

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*, 113: 2755-2764, 2009
2. Matsuoka M, and Green PL. HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology*, 6: 71, 2009
3. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J-I, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load,

inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis(HAM/TSP).Retrovirology 6:19, 2009

4. Sato H, Oka T, Shinnou Y, Kondo T, Washio K, Takano M, Takata K, Morito T, Huang X, Tamura M, Kitamura Y, Ohara N, Ouchida M, Ohshima K, Shimizu K, Tanimoto M, Takahashi K, Matsuoka M, Utsunomiya A, Yoshino T. Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Am J Pathol* 176:402-415, 2010
5. Takahata M, Inoue Y, Tsuda H, Imoto I, Koinuma D, Hayashi M, Ichikura T, Yamori T, Nagasaki K, Yoshida M, Matsuoka M, Morishita K, Yuki K, Hanyu A, Miyazawa K, Inazawa J, Miyazono K, Imamura T. SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor- β signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 284: 3334-3344, 2009
6. Izumi K, Kodama E, Shimura K, Sakagami Y, Watanabe K, Ito S, Watabe T, Terakawa Y, Nishikawa H, Sarafianos SG, Kitaura K, Oishi S, Fujii N, Matsuoka M. Design of peptide-based inhibitors for HIV-1 strains resistant to T-20. *J Biol Chem* 53: 1013-1018, 2009
7. 松岡雅雄: ATL、HTLV-1 研究の軌跡と新たな潮流 分子細胞治療 8(6) 52-55, 2009
8. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型とユビキチン化 生体の科学 60(6) 551-555, 2009
2. 学会発表
1. Matsuoka M. The Roles of HTLV-1 bZIP Factor Gene in Oncogenesis. The 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses. Salvador, Brazil, July 1-4, 2009
2. Zhao T, Yasunaga J, Fujii M, Matsuoka M, Nakao M. HTLV-1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. Kyoto, Japan. September, 13-14, 2009
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 49 回日本リンパ網内系学会総会、兵庫県淡路市、2009 年 7 月 9-11 日
4. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルスによる病原性発現機構: 第 7 回 HAM 治療研究会、大阪、2009 年 7 月 31 日
5. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による病原性発現機構: 第 76 回発生工学・疾患モデル研究会例会、東京、2009 年 9 月 17 日
6. 松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor 遺伝子による発がん機構: 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
7. 萩屋啓太、佐藤賢文、安永純一朗、松岡雅雄: ATF3 は HTLV-1 bZIP factor と相互作用し、ATL 細胞の増殖に寄与する: 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 1-3 日
8. 松岡雅雄: ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん: 第 14 回遺伝子実験施設セミナー、熊本、2009 年 10 月 16 日
9. 佐藤賢文、安永純一朗、吉田美香、宮里パオラ、趙鉄軍、高井健、清水桂、大島孝一、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP Factor (HBZ) 遺伝子トランスジェニックマウスは慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する: 第 71 回日本血液学会学術集会、京都、2009 年 10 月 23-25 日
10. 櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄: レトロウイルス感染における DNA 修復酵素の新たな役割: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
11. 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄: CD4 陽性 T 細胞での HBZ 発現は IFN- γ 産生を抑制し、Listeria

monocytogenes 感染に対する細胞性免疫を障害する：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日

12. 田口奈々絵、佐藤賢文、Paola Miyazato、片桐晃子、木梨達雄、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor トランスジェニックマウスにおける炎症性疾患の解析：第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 25-27 日
13. 櫻井康晃、小松賢志、上松一永、松岡雅雄：HIV 感染過程における DNA 修復酵素の役割：第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋、2009 年 11 月 26 日-28 日
14. 佐藤賢文、MIYAZATO Paola、山口智之、小野昌弘、坂口志文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor(HBZ)遺伝子トランスジェニックマウスは Foxp3+制御性 T 細胞の機能及びホメオスタシスの異常を示し、慢性炎症疾患、T 細胞リンパ腫を発症する：第 39 回日本免疫学会総会・学術集会、大阪、2009 年 12 月 2 日-4 日
15. 松岡雅雄：HTLV-1 は何故、病気を起こすのか：平成 21 年度文部科学省特別教育経費「研究推進（大学間連携経費）」HTLV-1 関連疾患に対する発症予防と治療法確立に関する研究（研究成果発表会および一般向け講演会）、鹿児島、2010 年 1 月 22 日
16. Matsuoka M. Molecular mechanisms of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: T-CELL LYMPHOMA FORUM. Maui, Hawaii, January 28-30,2010

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（ATL）に対する HTLV-I Tax 特異的 T 細胞応答賦活化
ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法第 I 相臨床試験

研究分担者：谷 憲三郎 九州大学病院 先端分子・細胞治療科 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病（ATL）移植症例の中には移植片対ATL効果(GV-ATL)が観察される症例が認められATLに対する免疫療法の可能性が注目されている。本研究では、既治療例のATLに対してTax特異的細胞傷害性T細胞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で抗腫瘍効果を得ることを目的とした新規治療法開発のための臨床試験計画を本年度に作成した。

A. 研究の目的

本研究班の成人 T 細胞白血病（ATL）同種造血幹細胞移植症例での免疫学的解析で移植片対 ATL 効果(GV-ATL)が観察される症例が認められ、HTLV-1 を標的にした Tax 特異的 CTL 応答を賦活する免疫療法は ATL の治療に貢献できるものと期待されている。本臨床試験は、新規治療法開発を目的に既治療例の ATL 患者に対して、Tax ペプチドパルス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での抗腫瘍効果を期待する。本臨床試験は、樹状細胞用量漸増試験の安全性を検証する第 I 相臨床試験とし、樹状細胞製造の実現可能性、投与された患者における Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞応答および臨床効果についても検討する計画である。

B. 研究方法

HLA-A*0201、HLA-A*2402、HLA-A*1101 のいずれかを有する既治療例の ATL 患者を対象に、アフエレーシスによって得られた末梢血単核球より接着細胞を GM-CSF、IL-4、逆転写酵素阻害剤 (zidovudine) 添加下で分化誘導後、TNF- α 、KLH、OK432 で成熟化させた樹状細胞に Tax ペプチドをパルスする。得られた樹状細胞は、出荷基準を確認後（生細胞数、表面形質）、2 週毎に計 3 回皮下投与する。本臨床試験の主要エンドポイントとして Tax 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として ATL 患者における樹状細胞製造の実現可能性、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）効果を検討する。

（倫理面への配慮）

本臨床試験は、各共同施設での倫理委員会の承認を得る予定である。

C. 研究結果

現在臨床試験実施に向けて臨床試験実施計画書、患者説明および同意書を作成し、九州大学病院倫理委員会に申請準備中である。また樹状細胞調整における前臨床試験より得られた知見から、臨床スケールに沿った大量細胞調整を行う上での問題点を検証するため、健康人ドナーからのアフエレーシス法によって得られた検体で同一工程の安全性、適格性の検証を実施している（九州大学病院倫理委員会承認取得済み）

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Thacker EE, Nakayama M, Smith BF, Bird RC, Muminova Z, Strong TV, Timares L, Korokhov N, O'Neill AM, de Gruijl TD, Glasgow JN, Tani K, Curiel DT. A genetically engineered adenovirus vector targeted to CD40 mediates transduction of

canine dendritic cells and promotes antigen-specific immune responses in vivo. Vaccine, 2009 (in press).

2. Kametani Y, Suzuki D, Kohu K, Satake M, Suemizu H, Sasaki E, Ito T, Tamaoki N, Mizushima T, Ozawa M, Tani K, Kito M, Arai H, Koyanagi A, Yagita H, Habu S. Development of monoclonal antibodies for analyzing immune and hematopoietic systems of common marmoset. Exp Hematol 2009 (in press)

2. 学会発表等

1. 末廣陽子、神奈木真理、鵜池直邦、宇都宮與、松岡雅雄、豊嶋崇徳、安部康信、三浦修、長谷川温彦、田野崎隆二、平家勇司、谷憲三朗、岡村純：成人 T 細胞白血病 (ATLL) に対する HTLV-I Tax 特異的 T 細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法 第 I 相臨床試験. 第 1 回造血器腫瘍免疫療法研究会 学術集会 2009 年 8 月 29 日-30 日大阪

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INF- α などを大量に産生する能力を有することからその抗白血病効果が期待されている。しかしながらわれわれは造血細胞移植にはGVHDを誘導可能性を明らかにした。その機序を検討したところ、本来形質細胞様樹状細胞はアロ応答性T細胞活性化能が低いにもかかわらず、移植時に実施される移植前処置によって惹起される炎症環境によって本細胞が活性化し、ナイーブT細胞活性化能を獲得することが示唆された。これらの結果から同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を増強するための形質細胞様樹状細胞療法はGVHD増悪のリスクがあり、移植前処置の影響が減弱した移植後期に考慮されるものと考えられた。

A. 研究目的

本研究班のこれ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。われわれはその目的のために抗原特異性なく抗白血病作用を有するinterferon (IFN)- α やNKT細胞に着目してきた。前年度はIFN- α を大量に産生する形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid DC; pDC)のGVHDにおける関与をマウスモデルにおいて検討したところ、pDCにはGVHD誘導能があることが明らかになった。今年度はその機序の検討を行った。

B. 研究方法

MHC class II欠損B6マウス(II-/-)に野生型B6マウスより採取したpDCをadd-backし、全身放射線照射によるpDCの活性化への影響を検討した。また、MyD88/TRIF double

knockout miceより分離したpDCの活性化も検討した。さらに移植前処置を実施せずに、ドナーT細胞を輸注した場合のpDCのT細胞活性化能をconventional DC (cDC)のそれと比較検討した。

(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

pDCをマウスにadd-back後、全身放射線照射した後、pDCのMHC class IIの発現亢進が確認された。次いで全身放射線照射後にpDCをadd-backした場合にも同様なpDCのMHC class IIの発現亢進が確認された。この結果から、pDCの活性化は放射線照射の直接的な作用でなく、放射線照射によって惹起された炎症環境によって間接的に起きたことが示唆された。この活性化は、MyD88/TRIF double knockout miceより分離したpDCにもみられたことから、toll-like receptor (TLR)刺激は必須ではないことが示された。また、移植前処置を実施せずに、ドナーT細胞を輸注した場合にはpDCにはcDCのような強力なT細胞活性化能は観察されなかった。