

200925013B

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～平成21年度 総合研究報告書

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

緒 言

ATL は human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1) の感染から長期の潜伏期間を経て、60才前後で発症する稀な造血器腫瘍で、治療への反応が悪く、いまだに予後は極めて不良である。そこで、この疾患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を目的として本研究を開始した。お手元にお届けするのは、厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）による研究班「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」班の平成19～21年度 3 年間の研究成果をまとめた報告書である。研究班では、同種幹細胞移植療法、特に、Reduced Intensity Stem-cell Transplantation (RIST)（いわゆるミニ移植）を試みて、その安全性と有効性を前向きに検討し、標準的治療としての可能性を追求している。それまでに実施した血縁者末梢血を移植幹細胞源とした RIST の臨床試験（第 1 期/2 期試験）結果を検証するため、平成19年度からも血縁者末梢血による第 3 期試験を引き続き実施するとともに、平成21年度には、移植幹細胞源を非血縁者骨髄まで拡大した RIST（第 4 期試験）を開始した。第 1 期/2 期試験の結果、RIST が50才以上の高齢者に対して、比較的 safely に実施可能であり、34%の患者が長期生存して「治癒」が期待できること、移植後、約60%の症例で、HTLV-1 ウイルスゲノムの著明な減少や消失が認められ、RIST が抗ウイルス療法としての側面を持つことなどを証明した。さらに長期生存者における HTLV-1 ウイルス動態には、多様なパターンが存在することが判明した。また、移植片対 ATL 効果の存在を示唆する RIST 後の臨床所見に加え、HTLV-1 排除機構の一つとして一部の患者に HTLV-1 Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されるという興味深い事実が明らかにされたことから、ATL 既治療例を対象として HTLV-1tax を標的抗原として樹状細胞を利用する免疫療法計画書を作成した。

本研究班では、当初から、ATL 治療に携わる全国の血液内科医と基礎研究者との連携チームにより研究を遂行してきた。ATL に対する同種移植の臨床試験および免疫療法の試みは、唯一本研究班でのみ実施されているため、日本および世界中に多数存在する HTLV 感染者にとって、その成果の発信は重要な情報となり、極めて貴重なものとなると考えられる。関係各位には、本研究班の活動に、これまで同様のご指導とご支援を賜れば幸いである。

平成22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

I 研究報告

平成19～21年度
総合研究報告書

目 次

I. 総合研究報告書

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 岡村 純 …………… 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 3

III. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 9

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

本研究の目的は、human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1) の感染を契機として高齢者に発症し、極めて予後不良の疾患である 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骨髄非破壊的移植療法 (Reduced-Intensity Stem Cell Transplantation, RIST) の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った。1. ATL に対する血縁者間末梢血幹細胞を利用した RIST の安全性と有効性に関する検討：(1) 第 1 期/2 期試験結果の解析と長期追跡：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。(Tanosaki R et al. *Biol BMT*, 2008) 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%)、全員社会復帰が可能となり、PS も Karnofsky score >90% と良好であった。(Choi I et al. *Bone Marrow Transplantation*, E-publish 2010) (2) 血縁者間末梢血による第 3 期臨床試験の実施：参加 23 施設の倫理委員会で実施計画書が承認され、20 例が登録、14 例の移植が終了、13 例は移植後 6 ヶ月以上経過した。(2010 年 3 月現在) 2. ATL に対する非血縁者間幹細胞を利用した移植法の検討：(2-1) 非血縁者間骨髄移植の検討 (後ろ向き解析)：81 例を解析した。前処置は、骨髄破壊の前処置 (CST) が 55 例、RIST 26 例。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。死因では、現病死は CST 13%、RIST 12% で、移植関連合併死亡 (TRM) は 29%、35% であった。多変量解析の結果では、50 歳以上の症例で、RIST、寛解期の移植、Grade 1 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：13 施設の倫理委員会で実施計画書が承認され、17 例が仮登録、8 例の移植が終了した。TRM が 1 例において観察された (2010 年 3 月現在)。3. 免疫療法の検討：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。臨床試験実施に向けて臨床試験実施計画書を作成し、九州大学医学部倫理委員会へ提出し、2010 年 1 月に承認された。4. 基礎的検討課題：(4-1) HTLV-1 プロウイルス動態の解析：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-1 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。(4-2) 移植後のキメラ解析：第 1~4 期試験で評価が可能であった 52 例 (血縁者移植 44 例、非血縁者移植 8 例) 全例で、ドナー・レシピエントの識別が可能であった。(4-3) 宿主抗腫瘍免疫応答解析：未治療の慢性 ATL 患者にもテトラマー陽性細胞が検出されたが、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乏しかった。GST-Tax 蛋白を抗原として用いた T 細胞応答を解析したところ、くすぶり型 ATL や一部の無症候 HIV-1 キャリアの段階で Tax 特異的 T 細胞応答の低下が認められる症例があった。(Shimizu Y et al. *Cancer Sci*. 2009) 慢性 ATL 患者

PBMCからも樹状細胞が誘導可能であった。OK432, TNF-aにより成熟させた樹状細胞の表面抗原、抗原提示能、IL-12産生能は、健常者由来樹状細胞と遜色無く、細胞治療への使用は可能と考えられた。(4-4) HTLV-Iの分子生物学的解析：(4-4-1) 全HTLV-1プロウイルス塩基配列の解析：ATL症例の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報告を支持している。(4-4-2) 移植症例の解析：移植症例の内、tax遺伝子にnonsense変異を有する症例で、移植後、寛解を持続している症例が存在した。すなわち、Taxタンパク質を産生できないプロウイルスを有する症例でも長期寛解を保っており、Taxに対する免疫反応に依存しない抗ATL作用が示唆される。(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：NKT細胞リガンドである α -GC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、GVL効果の増強効果が可能であることを示した。また、形質細胞様樹状細胞は、その高いINF-a産生能によって抗腫瘍効果が期待され、これを高純度に分離する方法を確立した。そのGVHD誘導能を検討したところ、移植前処置によって形質細胞様樹状細胞が高度に活性化され、T細胞活性化能を獲得し、GVHDを誘導しうるということが明らかとなった (*Koyama Met al. Blood, 2009*)。結論：これまでの臨床試験の結果、RISTは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示唆され、ATLに対する極めて有望な治療法であることが明らかとなりつつある。ATLに対する同種移植の臨床試験および免疫療法の試みは、唯一本研究班でのみ実施されているため、日本および世界中に多数存在するHTLV感染者にとって、その成果の発信は極めて貴重な情報となり、成果の発信は極めて貴重なものと考えられる。

分担研究者

- 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 豊嶋 崇徳 九州大学医学部 準教授
- 4 朝長万左男 長崎大学医学部 教授 (2007-08)
- 5 宮崎 泰司 長崎大学医学部 教授 (2009)
- 6 谷 憲三朗 九州大学医学部 教授 (2009)
- 7 宇都宮 與 慈愛会今村病院分院 院長
- 8 谷口 修一 虎の門病院血液内科 部長
- 9 田野崎隆二 国立がんセンター 医長
- 10 増田 昌人 琉球大学医学部附属病院 がんセンター・がんセンター長 (2007-08)
- 11 鶴池 直邦 国立病院機構九州がんセンター 部長
- 12 今村 雅寛 北海道大学医学部 教授
- 13 谷脇 雅史 京都府立医科大学 教授
- 14 山中 竹春 国立病院機構九州がんセンター 室長

A. 研究目的

本研究の目的は、human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) の感染を契機として高齢者に発症し、極めて予後不良である 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骨髄非破壊的移植療 (Reduced-Intensity Stem Cell Transplantation, RIST) の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 1 期/2 期試験の比較解析結果：終了した 2 試験 (第 1 相) 登録例について解析した。対象は、50~70 才の急性型/リンパ腫型 ATL、

ドナーは 70 歳未満の HLA 一致同胞とした。前処置は、第 1 期試験では、フルダラビン、ブスルファン、ATG を使用し、第 2 期試験では、ATG を省いた。GVHD 予防はシクロスポリンで行った。主要評価項目は移植片の生着と早期 TRM の発症とした。

(1-2) 第 1 期/2 期試験の長期追跡結果：第 1 期/2 期試験 (第 1 相) 症例 (登録期間 2001.4-06.2) について、現在の状況を解析した。

(1-3) 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。HLA 一致血縁ドナーからアフ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。本試験から、データ管理を日本臨床研究支援ユニットに委託して、質的により厳密な臨床研究を実施している。

2. ATL に対する非血縁者間幹細胞を利用した移植法の検討

(2-1) 非血縁者間骨髄移植の後方視的解析：(衛藤、崔；研究協力者、山中班員) ATL では、患者や HLA 一致同胞が比較的高齢であるため、血縁者間移植が困難なことが多い。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 RIST 症例が増えている。そこで、

Day 100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、実施計画書を作成した。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。

3. 免疫療法の検討 (谷班員、神奈木班員ほか)
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-1Tax 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 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。

4. 基礎的検討課題

(4-1) HTLV-1 プロウイルス動態の解析: (岡村班員ほか) RIST の抗ウイルス療法としての効果を検討するために、RIST 前後の HTLV-1 プロウイルス動態を前方視的に検討した。方法: HTLV-1 プロウイルス量は末梢血単核細胞

(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) により測定した。下記の式により PBMC 1000 細胞あたりの HTLV-1 pX DNA コピー数を算出した。
$$\text{HTLV-1 proviral DNA 量} = [(\text{HTLV-1 pX コピー数}) / (\beta\text{-globin コピー数}) / 2] \times 1000.$$

(4-2) 移植後のキメラ解析: (岡村班員) RIST を行う際にはドナーリンパ球輸注の時期の決定や生着の確認のためにドナー・レシピエントキメラ比率の定量的測定が必須となる。そこで short tandem repeat (STR) polymorphism 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 RIST 実施時のドナー・レシピエントのキメリズム動態を検討した。方法) 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。なお細胞を T 細胞、顆粒球、総単核球の 3 つに分画し、細胞分画別の解析を併せて行った。

(4-3) RIST 後における特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析 (神奈木班員)

(4-3-1) Tax 特異的 T 細胞応答の解析: 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、Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の FACS 解析を行った。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。

(4-3-2) 免疫療法開発のための ATL 患者由来樹状細胞の検討：A) ATL 患者および健常者由来の PBMC から単球分画を分離し、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、貪食能、サイトカイン産生能、抗原提示能等を機能指標として検討した。B) ペプチドパルス樹状細胞療法の臨床試験プロトコール作成に当たり、方法の詳細部分を定めるため、培養中に用いる逆転写酵素阻害剤や、マイトマイシン C、ガンマ線照射の DC 機能への影響を調べた。

(4-3-3) ATL 細胞のウイルス発現抑制機序の検討：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、自然免疫のウイルス発現への影響を調べた。

(4-4) HTLV-1 の分子生物学的解析 (松岡班員)
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た症例の末梢血あるいはリンパ節からゲノム DNA を抽出し、inverse PCR により HTLV-I プロウイルスの組み込み部位を同定し腫瘍細胞特異的な PCR を構築した。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 (豊嶋班員)

目的：本研究班の今までの臨床成績から、移植後再発と移植関連合併症の克服が課題であることが明らかになった。そのためには 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り、その検討を行った。**研究方法：**マウスの白血病骨髄移植モデルを用いて研究を行った。NKT 細胞リガンドである α -galactosylceramide (α -GC) を移植前後に投与し、GVHD、GVL への影響を検討した。また、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC ; pDC) を純化する方法を開発し、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 したマウスをレシピエントとして用いることにより、pDC の T 細胞活性化能と GVHD 誘導能を co-

nventional DC (cDC) のそれと比較検討した。

(倫理面での配慮)

本研究は、臨床研究に関する倫理指針を遵守して行う。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 1 期/2 期試験の比較解析結果：前処置から ATG を省略した第 2 期試験では、ATG を加えた第 1 期試験と比較して、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。

(Tanosaki R et al. Biol BMT, 2008)

(1-2) 第 1 期/2 期試験の長期追跡結果：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%)、全員社会復帰が可能となり、PS も Karnofsky score > 90% と良好であった。

(Choi I et al. Bone Marrow Transplantation, E-publish 2010)

(1-3) 第 3 期臨床試験の実施：参加 23 施設の倫理委員会でも実施計画書が承認された。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、現病死 5 例、6 例は無病生存中である。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。(2010年3月現在)。

2. ATL に対する非血縁者間幹細胞を利用した移植法の検討

(2-1) 非血縁者間骨髄移植 (UBMT) の後方的解析: 男性49例、女性32例。前処置は、骨髄破壊の前処置 (CST) 55例、RIST 26例。年齢中央値は CST 46歳、RIST 55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。1 度以上の急性 GVHD は CST で77%、RSIT 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。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、Gradel 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: 13施設の倫理委員会で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 例において観察された (2010年3月現在)。

3. 免疫療法の検討

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。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月に承認された。対象は、HLA-A*0201、HLA-A*2402、HLA-A*1101のいずれかを有する既治療例の ATL 患者であり、アフエ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-a、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は、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は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) 効果である。本試験は、第1 相臨床試験、樹状細胞2 段階投与漸増試験とし、予定登録数はレベル1 (3 名) およびレベル2 (3 名) (計6例-12例) である。

4. 基礎的検討課題

(4-1) HTLV-1 プロウイルス動態の解析: 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-1 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。*(Choi I et al. Bone Marrow Transplantation, E-publish 2010)*

(4-2) 移植後のキメラ解析: 第1~4 期試験において評価が可能であった52例 (血縁者移植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) RIST 後における特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の解析 (神奈木班員)

(4-3-1) Tax 特異的 T 細胞応答の解析: 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乏しいことが分かった。

(4-3-2) 免疫療法開発のための ATL 患者由来樹状細胞の検討：GST-Tax 蛋白を抗原として用い T 細胞応答を解析したところ、完成された ATL だけでなく、くすぶり型 ATL や一部の無症候 HIV-1 キャリアの段階ですでに Tax 特異的 T 細胞応答の低下が認められる症例があった。(Shimizu Y et al. *Cancer Sci*, 2009)

(4-3-3)：全例ではないものの、慢性 ATL 患者 PBMC から樹状細胞が誘導可能であった。OK432、TNF- α により成熟させた樹状細胞の表面抗原、抗原提示能、IL-12産生能は、健康由来樹状細胞と遜色無く、細胞治療への使用は可能と考えられた。

(4-4) HTLV-I の分子生物学的解析

(4-4-1)：全 HTLV-1 プロウイルス塩基配列の解析：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報告を支持している。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。

(4-4-2) 移植症例の解析：移植症例の内、tax 遺伝子に nonsense 変異を有する症例で、移植後、

寛解を持続している症例が存在した。すなわち、Tax タンパク質を産生できないプロウイルスを有する症例でも長期寛解を保っており、Tax に対する免疫反応に依存しない抗 ATL 作用が示唆される。

(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

NKT 細胞リガンドである α -GC 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、GVL 効果の増強効果が可能であることを示した。また、形質細胞様樹状細胞は、その高い INF- α 産生能によって抗腫瘍効果が期待され、これを高純度に分離する方法を確立した。その GVHD 誘導能を検討したところ、移植前処置によって形質細胞様樹状細胞が高度に活性化され、T細胞活性化能を獲得し、GVHD を誘導しうるということが明らかとなった (Koyama M et al. *Blood*, 2009)。形質細胞様樹状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

50~70才の急性型およびリンパ腫型 ATL 患者を対象とした血縁者間末梢血幹細胞による RIST の第1相試験（第1期/2期試験）の結果、我々は、高齢者 ATL に対して RIST を実施可能であることを初めて証明し、2つの試験への登録例中34%の症例が長期生存し、満足すべき QOL を維持していることを報告し、本治療法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を示唆した。また、一部の症例では、明らかな移植片対 ATL 効果が臨床的に観察され、HTLV-1tax を標的抗原とした特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されることも判明した。今後は、現在進行中の血縁者間移植の第3期試験（第2相）および非血縁者由来の幹細胞を利用した第4期試験（第1相）を完遂して、RIST の安全性と有効性を検証し、本治療法の普遍化を目指す。また、これまでの研究結果に基づいて、再発例を対象として HTLV-1tax を標的抗原とした樹状細胞を利用する免疫療法を新たに開始する。HTLV-1Tax を標

的とする免疫療法の成果は、今後、本邦で約110万人（世界では約2000万人）と推定されるHTLV-1感染者のうち、ATLの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。

E. 結論

これまでの臨床試験の結果、ATLに対する同種幹細胞移植療法、中でも RIST、は極めて有望な治療法であることが明らかとなりつつある。ATLに対する同種移植の臨床試験および免疫療法の試みは、唯一本研究班でのみ実施されているため、日本および世界中に多数存在すると推測されている HTLV 感染者にとって、その成果の発信は極めて貴重な情報となる。また、HTLV-1 感染症に対する有効性を確認することにより、他の難治性ウイルス感染症に対しても細胞療法の応用が可能となる可能性がある。現在、ATL に対するこのような臨床試験は、世界中で唯一本研究班でのみ実施されており、その成果については海外からも注目されている。従って、情報の発信は極めて貴重なものとなる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
神奈木真理	ATL と HTLV-I 感染免疫	渡辺 俊樹 上平 憲 山口 一成	HTLV-1 と疾患	文光堂		2007	194-196
宇都宮 與	成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATLL). 2. 移植療法の適応と治療成績は?	押味 和夫 別所 正美 岡本真一郎 加藤 淳	EBM 血液疾患の治療	中外医学社	東京	2007	297-301
崔 日承 岡村 純	成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する移植	神田善伸	みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床	医薬ジャーナル社	大阪	2008	455-459
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?	神田善伸	臨床に直結する血液疾患診療のエビデンス	文光堂	東京	2009	295-298

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okamura J, Uike N, Utsunomiya A, Tanosaki R.	Allogeneic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma.	IntJHematol	86	118-125	2007
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	581	5207-12	2007
Kannagi M	Immunologic control of HTLV-I and adult T-cell leukemia. (Review).	IntJHematol	86	113-117	2007
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
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
Yasunaga JI, Matsuoka M.	Leukaemogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I.	Rev Med Virol	17	301-311	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Satou Y, <u>Matsuoka M.</u>	Implication of the HTLV-I bZIP factor gene in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia.	Int J Hematol	86	107-112	2007
Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, <u>Teshima T</u>	Donor-derived hymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease.	Blood	109	1756-1764	2007
Hashimoto D, Asakura S, <u>Matsuoka K,</u> Sakoda Y, Koyama M, Aoyama K, Tanimoto M, <u>Teshima T</u>	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
Choi YL, <u>Tomonaga M,</u> et al.	A genomic analysis of adult T-cell leukemia.	Oncogene	26	1245-55	2007
Imanishi D, <u>Tomonaga M,</u> et al.	Donor-derived DNA in fingernails among recipients of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants.	Blood	110	2231-4	2007
Takasaki Y, <u>Tomonaga M,</u> et al.	Impact of cisceral involvements and blood cell count abnormalities on survival in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL).	Leuk Res	31	751-7	2007
Yamasaki R, <u>Tomonaga M,</u> 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
Tsukasaki K, <u>Tomonaga M,</u> et al.	VCAP-AMP-VECP Compared With Biweekly CHOP for Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma : Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801	J Clin Oncol	25	5458-5464	2007
Sagara Y, Inoue Y, Ohshima K, Kojima E, <u>Utsunomiya A,</u> 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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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	84(3)	316-22	2007
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	82 (10)	873-80	2007
Onishi Y, Mori S, Kusumoto S, Sugimoto K, Akahane D, Morita-Hoshi Y, Kim SW, Fukuda T, Heike Y, Tanosaki R, Tobinai K, Takaue Y.	Unrelated-donor bone marrow transplantation with a conditioning regimen including fludarabine, busulfan, and 4 Gy total body irradiation.	Int J Hematol	85	256-263	2007
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.	Comparable antileukemia/lymphoma effects in nonremission patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation with a conventional cytoreductive or reduced-intensity regimen.	Biol Blood Marrow Transplant	13	932-941	2007

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okudaira T, Hirashima M, Ishikawa C, Makishi S, Tomita M, Matsuda T, Kawakami H, Taira N, Ohshiro K, Masuda M, Takasu N and Mori N.	A modified version of galectin-9 suppresses cell growth and induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines.	Int J Cancer	120	2251-2261	2007
Ishikawa C, Matsuda T, Okudaira T, Tomita M, Kawakami H, Tanaka Y, Masuda M, Ohshiro K, Ohta T and Mori N.	Bisphosphonate incadronate inhibits growth of human T-cell leukaemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukaemia cells by interfering with the mevalonate pathway.	Br J Haematol	136	424-432	2007
Shimizu D, Taki T, Utsunomiya A, Nakagawa H, Nomura K, Matsumoto Y, Nishida K, Horiike S, Taniwaki M.	Detection of NOTCH1 mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma and peripheral T-cell lymphoma.	Int J Hematol	85(3)	212-218	2007
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」	46	31-36	2007
鶴池 直邦 岡村 純	血液 5 潜伏感染ウイルスによる血液疾患 ATLL の治療法	新しい診断と治療のABC	46	32-39	2007
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
Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J-I, Fujisawa JI, Matsuoka M.	Transcriptional control of spliced and unspliced <i>HTLV-1 bZIP factor</i> gene.	J Virol	82	9359-9368	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	Int J Hematol	88(3)	324-330	2008
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
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
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 gtaft-versus-leukemia/lymphoma effect.	Biol Blood Marrow Transplant	14	817-823	2008

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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, <u>Taniwaki M</u> , Higashi Y, Morishita K.	Down-regulation of TCF8 is involved in the leukemogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma.	Blood	112 (2)	383-393	2008
Shimizu Y, Takamori A, <u>Utsunomiya A</u> , Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, <u>Kannagi M</u> .	Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages.	Cancer Science	100	481-489	2009
Takatsuka N, Hasegawa A, Takamori A, Shimizu Y, Kato H, Ohashi T, Amagasa T, Masuda T, <u>Kannagi M</u> .	Induction of IL-10- and IFN- γ -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, <u>Utsunomiya A</u> , Nishitsuji H, Furukawa H, Masuda T, and <u>Kannagi M</u> .	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, <u>Matsuoka M</u> .	Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B.	Blood	113	2755-2764	2009
<u>Matsuoka M</u> , Green PL.	HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis.	Retrovirology	6	71	2009

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koyama M, Hashimoto D, Aoyama K, Matsuo KI, Karube K, Niino 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.	Possible graft-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, Matsuhashi 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	114 (8)	1689-95	2009
Kim SW, Mori SI, Tanosaki R, Fukuda T, Kami M, Sakamaki H, Yamashita T, Kodera 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
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