

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

「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究(臨床試験の実施)」

研究分担者 鈴宮 淳司 島根大学医学部附属病院腫瘍センター 教授

研究要旨

節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(ENKL)は難治性であるが有効な寛解導入療法が確立されていない。またこのリンパ腫は東アジアに多くみられるため、東アジアのセンター施設の参加による「未治療 IV 期、再発・難治 NK/T 細胞リンパ腫/白血病に対する SMILE 療法の第 II 相試験 (SMILE-II)」を計画し、2007 年 7 月から症例登録を開始し、65 施設（国内 61 施設、海外 4 施設）で IRB 承認が得られ、2009 年 10 月に 39 例で症例登録を予定より早く完遂した。一次評価項目と毒性の解析により本治療の有効性と安全性が確認された。本分担研究者は本試験の立案、作成作業に参加、臨床試験の実施を担当した。またアグレッシブ NK 細胞白血病 (ANKL) の日韓共同研究により 41 症例が登録され日韓合同の検討会を実施、その結果を 2010 年欧州血液学会年次総会に抄録を提出、英文誌に投稿予定である。

A. 研究目的

ENKL を含む NK 細胞性白血病・リンパ腫(以下、NK 細胞リンパ腫)は難治性であるが、日本および韓国の研究者により限局期 ENKL は病変部放射線治療と化学療法の同時併用治療により高い治癒率が報告されるようになった。しかし進行期および再発・難治例では有効な治療法が皆無であり、造血幹細胞移植を実施した少数の症例を除き、1 年以内にほぼ全例が死亡し、長期生存者はほとんどみられない。NK 細胞リンパ腫の病因や病態解析、診断方法の確立、治療方法の開発に日本の研究者が中心的な役割を果たし、今後もこの疾患に対する治療法を開発を進めることがわが国に期待されている。標準治療の確立が困難な理由のひとつとして NK 細胞リンパ腫が欧米に少なく、比較的頻度が高いといわれる東アジアでも、全リンパ腫の 3～8%と患者数の少ないリンパ腫であり、前方視的な臨床試験が日本国内だけでは難しいことが考えられた。

日本の研究者で構成される NK 腫瘍研究会で、ENKL および ANKL に対し有効性が期待されるエトポシド、L-アスパラギナーゼ、多剤耐性 (MRD)

非関連薬剤であるイホスファミド、メトトレキサートおよびデキサメタゾンの薬物動態を考慮し薬剤投与順序を決定した新規治療法(SMILE 療法)を考案し、香港・韓国・台湾の共同研究者との十分な事前検討後、ENKL の未治療 IV 期・再発・難治例および ANKL 例を対象として、SMILE 療法の推奨投与量の決定と安全性の評価を行うアジア多国間第 I 相試験 (SMILE-PI; UMIN 臨床試験登録番号 C000000018)を実施した。投与レベル 1 において完全奏効例を含む奏効が得られ、毒性は許容範囲内であったことが確認された。第 I 相臨床試験で登録のなかった ANKL を除く対象において SMILE 療法 2 コースの寛解導入療法としての有効性と安全性を評価することを目的とする SMILE 療法の第 II 相試験を実施することにした。

今回の対象から除外した ANKL はリンパ腫のなかでも最も難治性であることが、末梢性 T 細胞リンパ腫国際研究でも明らかにされ、また他の報告で SMILE 療法類似治療の効果が不十分ではないということが言われており、早急に有効な治療法の開発が必要である。しかし ANKL は極めて稀な腫瘍で

あり、その診断基準など不明な点が多い。そのため ANKL に有効な治療法開発のため、病態の解析および診断基準の確立を目的に日韓共同後方視研究を実施した。

また本研究班は東アジアに頻度の高い腫瘍に対する臨床試験により東アジアに多国間研究グループを構築することと稀少腫瘍に対する臨床試験実施のモデルを構築することも目的としている。

## B. 研究方法

本分担研究者は NK 腫瘍研究会で実施した第 I 相試験登録終了後よりプロトコールの検討ならびに作成を担当、実施した。本研究計画は 2007 年 5 月 12 日に NK 腫瘍研究会のプロトコール委員会でフルプロトコールの承認を受けた。

本臨床試験の一次評価項目は奏効率、二次評価項目は完全奏効率 (%CR)、1 年生存率、初発/再発/難治別の治療効果、再発例での先行レジメン別の治療効果、有害事象発生率とする。登録期間 3 年で 28 名を登録することを予定した。本試験は日本を中心に、香港・韓国・台湾・中国のセンター施設の参加による東アジア多国間共同研究として実施する。

### 対象症例

以下の全ての基準を満たすものを適格例として対象とする。

- (1) 生検または骨髄液・末梢血検査により WHO 分類の ENKL と診断
- (2) 以下のいずれかであること
  - ① Ann Arbor 病期分類 IV 期の新規診断例
  - ② 初回治療で寛解 (CR または PR) 後の再発例
  - ③ 初回治療で NC または PD であった例
- (3) 年齢 15 歳～69 歳
- (4) Performance status (ECOG) 0-2
- (5) 評価可能病変を有する
- (6) ステロイド全身治療中の患者は登録時にステロイド投与を中止できる
- (7) 十分な骨髄・肝・腎・心・肺機能
- (8) 患者本人よりの書面同意が得られている

### 治療計画

登録後 7 日以内にプロトコール治療を開始する。

## SMILE 療法 (Steroid, Methotrexate, Ifosfamide, L-asparaginase, Etoposide)

薬剤	投与量	投与方法	投与日 (Day)
メトトレキサート	2 g/m <sup>2</sup>	DIV (6h)	1
ロイコボリン	15 mg/回 x4	DIV or PO	2, 3, 4
イホスファミド	1,500 mg/m <sup>2</sup>	DIV (3h)	2, 3, 4
メスナ**	300 mg/m <sup>2</sup> x3	IV	2, 3, 4
デキサメタゾン	40 mg/body	DIV or PO	2, 3, 4
エトポシド	100 mg/m <sup>2</sup>	DIV (2h)	2, 3, 4
L-アスパラギナーゼ***	6,000 u/m <sup>2</sup>	DIV (2h)	8, 10, 12, 14, 16, 18, 20
G-CSF	治療開始後 6 日目より使用		

28 日毎をめぐりにくり返し 2 コース施行する。

### 予定症例数と研究期間、データ管理、附随研究

予定症例数 38 例、予定登録期間 3 年、追跡期間 1 年、総研究期間 4 年

データ管理業務は特定非営利活動法人血液疾患臨床研究サポートセンターに委託して実施し、付随研究として日本国内においてのみ ENKL における末梢血 EB ウイルス DNA 量の臨床的有用性に関する研究を実施する。

### (倫理面への配慮)

適切な症例選択基準と治療中止基準を設定することにより、被験者の安全性を確保する。またヘルシンキ宣言を遵守し、わが国での臨床研究に関する倫理指針あるいは海外各国ではそれに相当する指針に則って実施する。IRB 承認が得られた施設のみが参加可能で、説明文書により口頭で説明後に、文書で同意を得ることが登録の条件であり、試験登録後は、プロトコールを遵守し有害事象発生の防止に努めるとともに、対象患者のプライバシーの保護に十分な配慮を行う。

## C. 研究結果

本分担研究者は第 I 相試験に続いて、プロトコールの立案、臨床試験の実施を担当している。2007 年 7 月 2 日から症例登録が開始された。本分担研究者の前任地である福岡大学は 2007 年 6 月 12 日付で IRB 承認を得ている。最終的の IRB 通過施設は 65 施設 (国内 61 施設、海外 4 施設) である。

登録開始後の2例がGrade 4の好中球減少に引き続く感染症で死亡したため、安全性を含む問題の検討のため本試験の登録を一時休止し、2007年10月12日に国内および韓国、香港のコアメンバーによる緊急会議を開催した。討議によりリンパ球数低値の患者が重篤な感染症をきたしていることが明らかになったため、リンパ球数低値例を除外した。また感染症のリスクの高い患者に対して、登録ないし治療時に注意喚起を促す記載をプロトコールに追加し、G-CSFの早期使用を実施することなどのプロトコールを改訂後、本臨床試験の継続を決定し、効果安全評価委員会でも承認された。それを受け2007年11月26日より症例登録を再開し、予定の1.5倍の早いペースで登録が進んだため、検出力を80%から90%に高める目的で、登録予定数を28から38に増やすプロトコール改訂を申請し承認された。登録開始から2009年10月までの27ヶ月で39例が登録され、患者背景は年齢16-67歳(中央値47)、男:女=21:18、初発IV期21名、初回治療後再発13名、初回治療抵抗例5名であった。29名(74%)がプロトコール治療を完遂し、治療効果は完全奏効が15名(38%)、部分寛解14名(36%)、不変3名(8%)、増悪3名(8%)、早期死亡4名(10%)であった。一次評価項目の奏効率は74%(95% CI, 58-87)で、historical controlの35%を有意に大きく上回った。NCI-CTCAE v.3.0による毒性は、grade 4の好中球減少がほぼ全例で認められ、grade 4の非血液毒性は感染5名、高ビリルビン血症1名、ALT値上昇2名、脳症1名であった。最も頻度の高いgrade 3の非血液毒性は感染であった(41%)。これらの結果を2010年米国臨床腫瘍学会年次総会(ASCO 2010)および欧州血液学会に抄録提出した。病理中央診断を実施し、2010年10月に二次評価項目(1年生存率など)の解析後に英文誌投稿の予定である。

本分担研究者、本研究主任研究者である鈴木律朗(名古屋大学)、分担研究者の石田文宏(信州大学)、Kim, Won Seog(サムソン医療センター、韓国)、Ko, Young Hye(サムソン医療センター、韓国)と共同でANCLとして日韓両国より登録された41症例の中央検討会を実施し、形態的にはheterogenousであり3型に分けられること、EBV感染が全例にみられること、生存中央値51日という極めて予後不良であることを明らかにした。この結果は2010年欧州血液学会年次総会に抄録を提出、英文誌に

投稿予定である。

#### D. 考察

本試験は国内で実施されるリンパ腫の臨床試験に比較して症例登録のスピードが速く、検出力をあげるために症例数を10症例増やしても速やかに試験を終了することができた。他に競合する他の臨床試験がなかったことがその理由のひとつにあげられるが、予定登録症例数38症例に対して、研究登録施設が65施設と多く、通常の臨床試験としては奇異であるが、稀少腫瘍ではこのような方法をとることで登録症例数は確保可能であることを示した。さらにインセンティブの全くない臨床研究にこれほど多くの施設が参加するという事は、参加施設に制約をつけず、自由意志で参加したためNK細胞リンパ腫の治療法の開発に強い意欲をもっている施設が参加してことも要因と考えられる。本リンパ腫のような稀少腫瘍は登録患者数が少ないことを理由に、プロスペクティブな臨床試験は困難ということで実施をされてこなかったが、そのような対象の腫瘍でも地理的距離も人種も近い東アジアの国々と協力して臨床試験を実施することで新しい治療法の開発が可能であった。

参加施設を増やすこと、また多国間に参加施設を拡大することは研究体制の質の維持が問題になる。そのため本臨床研究でも第I相試験と同様に安全性確保のため、通常よりも厳格な有害事象報告規定を使用したことも質の維持には重要であると考えられた。さらに国内および国外参加施設へメーリングリストを通じた密な継続的な連絡をとることが大切と考えられた。このようにe-メールによるネットワークを使用することで、多国間で実施する臨床研究の問題の一部は解決できると考えられる。本研究は今後の稀少腫瘍の前向き臨床試験を実施するうえのモデルとなると考えられた。

ENKLはまれな腫瘍であり、さらに本試験の対象となる患者は少なく、福岡大学では2~3年に一人である。さらに本研究分担者は研究期間中に島根大学へ異動があったことも重なり、本試験に登録を努力したが、症例登録に至らなかった。今後は本研究班で、NK細胞腫瘍と同様に東アジアに多い末梢性T細胞リンパ腫の再発・難治例を対象としたSMILE療法の第II相試験が計画され、すでに症例登録が開始されているので、関連施設にも呼びかけこの試

験に症例登録を努めていく。

他に、基本となるデータが乏しい ANKL のような腫瘍の治療研究を立案するためには、地道な後方視研究が必要であると考えられる。この場合も国内だけでは症例数が得られないため韓国のセンター施設との共同研究が有効である。前方視的研究のみならず、人種的、地理的に近く、またレベルの高い韓国のセンター施設との共同研究が稀少腫瘍の研究には有効な手段となると考えられ、さらにこのような密な関係を発展する必要があると考えられ、厚生労働科研費など公的資金の援助が不可欠と考えられた。

#### E. 結論

進行期や再発・難治の ENKL に対する適切な治療方法は未確立であるが、完全奏効率 38%、奏効率は 74% (95% CI, 58-87) で、historical control の 35% を有意に大きく上回る治療成績を示し、本研究によりこの東アジアに多いリンパ腫の治療方法の大きな進歩があると考えられる。今後はこの優れた寛解導入率を生かした、SMILE 療法後の治癒を目指した治療法の開発を実施することが必要である。本研究の対象外である ANKL も対象とする試験の開発の準備を実施している。またこの SMILE 療法の高い治療効果を NK 細胞リンパ腫だけでなく、同様に標準治療が未確立の末梢性 T 細胞性リンパ腫に対する SMILE 療法の有効性と安全性を検証する第 II 相試験を開始している。

症例数の少ない腫瘍は、プロスペクティブな臨床試験が実施困難であるということ为解决可能な方法を本研究は示した。また国内ではメーリングリストと班会議を活用することで参加施設を増やしても質を保つことが可能であり、地理的距離と人種が近く、質の高い臨床研究が可能である韓国、香港、台湾、中国のセンター施設とであれば多国間の共同の臨床試験を組むことが可能であった。さらにこのような体制で臨床研究を進めていくためには、国内各施設に医師主導の自主研究を遂行する CRC を配置した臨床研究支援センターの設置、プロトコルの内容や有害事象などの情報をリアルタイムで共有できるシステムの構築をしていくことが必要である。厚生労働科研費の班研究としてだけでなく、治療法の開発をするという患者のいる各国の国民に対し高い国際貢献をしているということも本研究

の重要な点である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Seki R, Suzumiya J, et al. Rituximab in combination with CHOP chemotherapy for the treatment of diffuse large B cell lymphoma in Japan: a retrospective analysis of 1,057 cases from Kyushu Lymphoma Study Group. *Int J Hematol*. 2010 Jan 13. [Epub ahead of print]
- (2) Takata T, Suzumiya J, et al. Attenuated antibody reaction for the primary antigen but not for the recall antigen of influenza vaccination in patients with non-Hodgkin B-cell lymphoma after the administration of rituximab-CHOP. *J Clin Exp Hematop* 2009; 49: 9-13.
- (3) Kawano R, Suzumiya J, et al. Oncogene associated cDNA microarray analysis shows PRAME gene expression is a marker for response to anthracycline containing chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2009; 49: 1-7.
- (4) Seki R, Suzumiya J, et al. Prognostic impact of immunohistochemical biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Sci* 2009; 100: 1842-1847.
- (5) Takamatsu Y, Suzumiya J, et al.; the Kyushu Hematology Organization for Treatment Study Group (K-HOT). THP-COP regimen for the treatment of peripheral T-cell lymphoma and adult T-cell leukemia/lymphoma: a multicenter phase II study. *Eur J Haematol*. 2010 Jan 5. [Epub ahead of print]
- (6) Matsumoto T, Suzumiya J, et al. Am80 inhibits stromal cell-derived factor-1-induced chemotaxis in T-cell acute

lymphoblastic leukemia cells. Leuk Lymphoma. 2010;51:507-14.

- (7) Suzuki R, Suzumiya J, et al.; for The NK-cell Tumor Study Group. Prognostic factors for mature natural killer (NK) cell neoplasms: aggressive NK cell leukemia and extranodal NK cell lymphoma, nasal type. Ann Oncol. 2009 Oct 22. [Epub ahead of print]
- (8) Suzuki R, Suzumiya J, et al. Differences between nasal and extranasal NK/T-cell lymphoma. Blood. 2009;113:6260-1;
- (9) Katsuya H, Suzumiya J, et al. Addition of rituximab to cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone therapy has a high risk of developing interstitial pneumonia in patients with non-Hodgkin lymphoma. Leuk Lymphoma 2009; 50: 1818-1823.
- (10) Suzumiya J, et al. The International Prognostic Index Predicts Outcome in Aggressive Adult T-cell Leukemia/Lymphoma: Analysis of 126 Patients from the International Peripheral T-cell Lymphoma Project. Ann Oncol 2009; 20: 715-721.

## 2. 学会発表

- (1) 鈴木淳司 悪性リンパ腫～WHO 病理分類の改訂（2008年）と臨床におよぼす影響：新WHO 分類 2008 におけるホジキンリンパ腫 第 47 回日本癌治療学会総会 10 月 22 日 - 24 日 横浜
- (2) 鈴木淳司、他 日本の慢性リンパ性白血病および類縁疾患の多施設登録研究 第 71 回日本血液学会総会 2009 年 10 月 23 日 - 25 日 京都
- (3) 青木定夫、鈴木淳司、他 日本における B 細胞性慢性リンパ性白血病のマーカー解析 第 71 回日本血液学会総会 2009 年 10 月 23 日 - 25 日 京都
- (4) 高松 泰、鈴木淳司、他 THP-COP regimen for the treatment of peripheral T-cell lymphoma and adult T-cell leukemia/lymphoma 第 71 回日

本血液学会総会 2009 年 10 月 23 日 - 25 日 京都

- (5) 鈴木律朗、鈴木淳司、他 Prospective evaluation of EBV-DNA in peripheral blood of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. 第 71 回日本血液学会総会 2009 年 10 月 23 日 - 25 日 京都
- (6) Suzuki R, Suzumiya J, et al. Prospective Measurement of EBV-DNA in plasma and peripheral blood mononuclear cells of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. 51st annual meeting of American Society of Hematology, December 5-8, 2009. New Orleans. (#135)
- (7) KIM S-W, Suzumiya J, et al. Autologous versus allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (SCT) for peripheral T-cell lymphomas (PTCLs): Japan and Korea Cooperative Study with 330 Patients. 51st annual meeting of American Society of Hematology, December 5-8, 2009 . New Orleans. (#2284)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK 細胞腫瘍の治療研究と東アジア研究組織の構築」

研究分担者 加納 康彦 栃木県立がんセンター 副病院長

研究要旨

NK 細胞腫瘍の今後の治療戦略を考える上で、臨床研究の実施とあわせて「Bendamustine と抗リンパ腫・白血病治療薬の併用効果」に関する研究を行った。Bendamustine はアルキル化剤と代謝拮抗薬の作用をもつユニークな新規抗がん剤で、慢性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等に対し従来の抗がん剤と比べ同等ないしそれ以上の効果を認めている。私たちは細胞株を用いて bendamustine と他の抗がん剤の併用効果を検討した。ヒトリンパ系白血病、リンパ腫、骨髄腫株化細胞として BALL-1、HBL-1、U266 を、培養液として RPMI1640 + 10%胎児ウシ血清を用いた。Bendamustine と他の抗がん剤を同時に加え 4-7 日間培養し、MTT assay で dose-response curve を得、IC<sub>50</sub> の併用効果を Steel らの Isobologram で分析した。その結果、何れの細胞を用いても bendamustine は cytarabine、gemcitabine 及び 4-hydroperoxy cyclophosphamide と相乗作用、doxorubicin、etoposide、F-ara-A、mitoxantrone、vincristine と相加効果、methotrexate と拮抗作用を示した。以上より bendamustine は多くの薬剤と併用しやすい抗がん剤であることがわかった。特に cytarabine、gemcitabine、cyclophosphamide との併用は臨床試験で検討する価値があり、一方、methotrexate との併用は避けた方が望ましいと思われる。これらのデータは bendamustine を含む新しいプロトコール作成に有用である。

A. 研究目的

Bendamustine は 1960 年代に東ドイツで開発されたアルキル化剤と代謝拮抗薬としての作用を有するユニークな二機能性抗がん剤で、他のアルキル化剤とは殆ど交叉耐性を持たない特徴をもつ。東ドイツで慢性リンパ性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、乳がん、肺がん等に対し日常臨床で広く用いられていたが、近年の欧米の臨床試験において、これらの疾患に対し優れた治療成績が証明され、FDA は慢性リンパ性白血病及び低悪性度非ホジキンリンパ腫に対する使用を承認した。さらに最近、低悪性度非ホジキンリンパ腫に対し、R(リツキサン)-bendamustine は標準的治療の R-CHOP 療法より治療成績が優れていることが報告され、現在、他

の悪性リンパ腫や固形がんに対し臨床試験が進められている。予後不良の T 細胞リンパ腫に対してもその効果が強く期待されている。アルキル化剤は多くのがんで他剤と併用で用いられているが、bendamustine は従来のアルキル化剤にかわりその第一選択薬になる可能性がある。Bendamustine の有害事象は骨髄抑制、発熱、消化器症状、皮診等だが、その程度は比較的軽いため、他の抗がん剤と併用しやすい薬剤と考えられる。現在、bendamustine は他の抗がん剤との併用で、様々のがんに対し臨床試験が行われているが、bendamustine の基礎併用研究は殆どおこなわれていない。私たちはヒトリンパ系腫瘍株化細胞を用いて、bendamustine と他の抗がん剤の併用効果を検討した。

## B. 研究方法

ヒトがん株化細胞として BALL-1 (B 細胞性白血病)、HBL-1 (マンツル細胞リンパ腫)、U266 (多発性骨髄腫)、培養液として RPMI1640 + 10%胎児ウシ血清を用いた。BALL-1 と HBL-1 の doubling time は 24-30 時間、U266 は 72 時間である。併用に用いた抗がん剤はリンパ系腫瘍に広く用いられている cytarabine, doxorubicin, etoposide, F-ara-A (fludarabine の active metabolite), gemcitabine, 4-hydroperoxy-cyclophosphamide (cyclophosphamide の active metabolite), mitoxantrone, methotrexate, vincristine である。BALL-1 と HBL-1 細胞は  $1 \times 10^5$ /ml、U266 細胞は  $5 \times 10^5$ /ml に調整し、細胞液 (100 $\mu$ l) を 96 穴組織培養プレートに分配し、翌日、種々の濃度の bendamustine (50 $\mu$ l) と併用薬剤 (50 $\mu$ l) を加え、BALL-1 と HBL-1 細胞は 4 日間、U266 細胞は 7 日間培養した。その後 50 $\mu$ l の MTT (1mg/ml) を各穴に加え 4 時間 incubation し、上清を捨て、DMSO を 150 $\mu$ l 加え MTT-formazan product を Titertek Multiscan をもちい 570 nm の吸光度で測定し、生細胞数を間接的に求めた。MTT アッセイで得られた bendamustine 単剤、他剤単剤及び併用時の dose-response curve から IC<sub>80</sub> における併用効果を isobologram (Steel and Peckham) で分析した。その結果、相乗作用を示した cytarabine と 4-hydroperoxy-cyclophosphamide について、HBL-2 細胞を用いて併用時の細胞周期の分析をおこなった。

(倫理面への配慮)

がん株化細胞をもちいた組織培養の研究なので、倫理面への配慮は必要なし。

## C. 研究結果

Bendamustine のこれらの細胞に対する IC<sub>80</sub> は 10-30  $\mu$ M であった。臨床における bendamustine の投与ではこの血中濃度は維持できない。これは bendamustine の培養液中の不安定さによるものと考えられる。Bendamustine の併用効果を isobologram で分析してみると、cytarabine、gemcitabine 及び 4-hydroperoxy cyclophosphamide との併用では、併用時の多くの data point は envelope of additivity の右側にはいっ

た。これは予想された以上に殺細胞効果があることを示しており、相乗作用と判定した。Doxorubicin、etoposide、F-ara-A、mitoxantrone、vincristine との併用では data point は envelope of additivity にはいり、これは予想どおりの殺細胞効果が得られることを示しており、相加効果と判定した。一方、methotrexate との併用は envelope of additivity の左側に位置し、予想された以下の殺細胞効果しか得られず、拮抗作用と判定した。IC<sub>80</sub> における併用効果も同様であった。さらに、相乗作用を示した cytarabine 及び 4-hydroperoxy cyclophosphamide との併用時の細胞周期分析をおこなった。Bendamustine 単剤では後期 S から G<sub>2</sub>/M 期、cytarabine 単剤では S 期に細胞が集積したが、併用するとこれらの細胞が減少し sub-G<sub>1</sub> 分画が増加した。4-hydroperoxy cyclophosphamide との併用でも同様の傾向が得られた。これらの結果は MTT assay の結果と一致したものである。

## D&E. 考察および結論

私達は新規抗がん剤の bendamustine と悪性リンパ腫、白血病に広く用いられている抗がん剤との併用効果を 3 種のヒトリンパ系腫瘍株化細胞を用いて検討した。Bendamustine は抗がん剤との併用において殆どの抗がん剤と相加作用以上の効果を示した。このことは、併用時に優れた抗腫瘍効果が期待できることを意味している。その中でも cytarabine、gemcitabine、4-hydroperoxy cyclophosphamide との併用は特に優れた抗腫瘍効果を示した。これらの薬剤との併用は臨床試験で検討する価値がある。一方、methotrexate との併用は明らかな拮抗作用を示し不適當と考えられる。In vitro の研究は臨床と薬理動態、細胞増殖態度が異なり、有害事象を調べられない等のことから、そのまま臨床に応用できるわけではないが、これらのデータは bendamustine 併用の臨床プロトコール作成に有益な情報になると考える。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Vu HA, Xinh PT, Kano Y, Tokunaga K, Sato Y. The juxtamembrane domain in ETV6/FLT3 is critical for PIM-1

- up-regulation and cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 383: 308-313, 2009
- (2) Noborio-Hatano K, Kikuchi J, Takatoku M, Shimizu R, Wada T, Ueda M, Nobuyoshi M, Oh I, Sato K, Suzuki T, Ozaki K, Mori M, Nagai T, Muroi K, Kano Y, Furukawa Y, Ozawa K. Bortezomib overcomes cell-adhesion-mediated drug resistance through downregulation of VLA-4 expression in multiple myeloma. *Oncogene.*28: 231-242, 2009
- (3) Mori K, Kobayashi H, Kamiyama Y, Kano Y, Kodama T. A phase II trial of weekly chemotherapy with paclitaxel plus gemcitabine as a first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64:73-78, 2009
- (4) Kano Y, Tanaka M, Akutsu M, Mori K, Yazawa Y, Mano H, Furukawa Y. Schedule-dependent synergism and antagonism between pemetrexed and docetaxel in human lung cancer cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64:1129-1137, 2009
- (5) Tanaka M, Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Izumi T, Yazawa Y, Miyawaki S, Mano H. The cytotoxic effects of gemtuzumab ozogamicin (mylotarg) in combination with conventional antileukemic agents by isobologram analysis in vitro. *Anticancer Res.* 29:4589-4596,2009

2. 学会発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

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

「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK 細胞腫瘍の治療研究と東アジア研究組織の構築(臨床試験の実施)」

研究分担者 石田 文宏 信州大学医学部内科（2） 准教授

研究要旨

節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型、の近縁疾患であるアグレッシブ NK 細胞白血病の病態解明および治療法確立に向けての情報収集のため、日本および韓国の諸施設参加による「アグレッシブ NK 細胞白血病に関する日韓多施設共同後方視的研究」(ANKL07) を計画し、症例を登録した。41 例の登録症例について中央標本検討会を実施し 34 例を適格症例とした。臨床病理学的検討で腫瘍細胞形態を 3 型に分類した。末梢血・骨髄の腫瘍細胞の多寡で病態に大きな差がないことを見いだした。

A. 研究目的

アグレッシブ NK 細胞白血病（以下 ANKL）は NK 細胞の全身性増殖を特徴とし、急速に進行する臨床経過をたどる疾患である。白血病・リンパ腫の中でも稀とされ、本邦の悪性リンパ腫に対する相対頻度では 0.1% である。東アジア地域に多く、また、青壮年に多い。治療としてアントラサイクリン系薬剤を含む多剤併用化学療法が比較的よく行われてきたが完全寛解到達率は 23% と低い。本邦症例の生存の中央値は 58 日と短く悪性リンパ腫の中でもっとも予後不良な疾患のひとつである。一方、自家末梢血幹細胞移植や同種造血幹細胞移植療法で寛解が得られたという症例報告がある。

ANKL は 節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(以下 ENKL)との類似性を指摘されており、ENKL で骨髄浸潤を伴う場合 ANKL と同義に扱うとする意見もあるが細胞遺伝学的には異なるとされる。ANKL に先行して慢性 NK 細胞増殖症 (CNKL) や慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) が認められたとする報告もある。また、現在、ENKL の未治療 IV 期・再発・難治例を対象として、エトポシド、L-アスパラギナーゼ、イホスファミド、メトトレキサート、デキサメタゾンによる新規レジメン (SMILE 療法) の第 II 相試験を実施中である。SMILE 療法第 I 相試験では ANKL も対象疾患に含

まれていた。ANKL 症例の登録はなく、第 II 相試験では対象疾患から ANKL を外した経緯もある。これまでの報告では NK 腫瘍研究会が行った多施設共同研究の 22 例、韓国のグループの 14 例の研究等がある。その他はほとんどが症例報告または単独施設からの症例研究である。ANKL を早期かつ適切に診断し、治療成績を高めるためには多数の ANKL 症例の情報を集積する必要がある。自家移植は類縁疾患の ENKL での有効性も報告されており、また、同種造血幹細胞移植は造血幹細胞ソースとして臍帯血の利用の増加、非骨髄破壊的前処置の導入といった変化もあり ANKL に対しての移植療法のあり方も変化してきている可能性がある。

ANKL の実態を正確に把握するには多施設での前向きコホート研究が必要であるが極めてまれな疾患であるため実施は困難である。そのため各施設でのこれまでに経験した症例の情報を後ろ向きに収集し調査することで ANKL の病像と治療状況を調べることが次善の方法になる。

以上の背景から ANKL の病像を明らかにする、ANKL 患者での化学療法の実施状況およびその影響を調べる、造血幹細胞移植の実施状況と予後との関連を調べることを主目的として本研究を考案した。本試験はこれまで ANKL 症例の大部分が報告されてきた日本・韓国の諸施設の参加による 2 国

による多施設共同研究として実施する。

## B. 研究方法

本臨床研究 (ANKL07) は 2007 年 7 月よりプロトコールコンセプトおよびプロトコールの作成を開始、2007 年 11 月 13 日に NK 腫瘍研究会のプロトコール委員会でプロトコールが承認され、参加予定施設に研究案内が通知された。

〔症例選択規準〕

(1) 末梢血または骨髄に NK 細胞の免疫表面形質を持つ顆粒リンパ球の増加を認める。フローサイトメトリーで表面 CD3 陰性または T 細胞受容体遺伝子再構成が胚細胞型であることが必要である。

(2) ANKL は典型例では臨床的に急激な進行で臓器障害を呈する。細胞形態と臨床経過と合わせて適格と判断する。必ずしも、臨床経過で臓器障害を示さない場合も対象に含めることとする。その理由として臨床経過を判断基準に含めない場合 CAEBV 症例、CNKL 症例も含まれる可能性があるが、それぞれから ANKL に移行する症例の存在も考えられていることより検討対象に含める。

EB ウイルスは、in situ hybridization 法ないしは Southern Blot 法で検討すると ANKL 細胞に高率に陽性であるが、EB ウイルス陽性は診断の必須条件とはしない。

〔症例登録の概要〕

参加施設に該当する ANKL の症例があるか否かの調査用紙を配付する(一次調査)。該当症例がある場合、二次調査に協力できると答えた施設に、症例毎に情報を調査するための調査用紙を送付する(二次調査)。診断時の臨床情報、化学療法に関する情報、造血幹細胞移植に関する情報、予後に関する情報を収集する。病理組織標本として末梢血・骨髄穿刺標本を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は、後ろ向き調査研究で「疫学研究」に当たり「疫学研究の倫理指針」に従って実施する。本研究は各実施施設の倫理委員会での審査および承認または施設長の承認を受け実施している。登録に際しては、対象患者のプライバシーの保護に十分な配慮を行う。患者情報は連結匿名化して扱う。

## C. 研究結果

信州大学では研究事務局として 2008 年 1 月 24 日付けで医倫理委員会の承認を得た。2008 年 2 月 1 日から本研究の症例登録を開始した。国内参加施設は 14 施設、韓国 1 施設である。

国内 8 施設から 22 例、韓国 1 施設から 19 例が登録された。

2008 年 11 月の本邦症例の中央標本検討会に引き続き、2009 年 8 月 1 日に中央標本検討会および臨床データ検討会を開催し、日本から 3 名、韓国から 2 名の血液病理医を含めた血液専門医が参加した。最終的に 41 例中 34 例を適格症例とした。年齢中央値は 45 歳で、16 歳から 79 歳まで分布していた。男性 26 名、女性 8 例であった。4 例が先行疾患を伴っていた。肝腫、脾腫をそれぞれ 71%に認めた。白血球数の中央値 3,200/ $\mu$ l で、血小板減少、LDH 高値は高率に認められた。腫瘍細胞形態に関して成熟した形態の I 型、中間の II 型、幼弱形態の III 型 3 型に分類し、それぞれ 11 例、13 例、10 例であった。3 群間では血球貪食症候群の頻度以外に臨床的特徴には差はなかった。骨髄および末梢血で腫瘍細胞がいずれも 20%未満の群と 20%以上の群の 2 群間で比較すると生命予後を含め臨床所見に大差を認めなかった。

## D. 考察

ANKL07 研究は ENKL との異同が問題になっている ANKL の実態を把握し、ENKL と比較しても予後不良とされている本疾患での治療法の改善に向けての情報収集を目的に立案、実施されている。診断に関しては 2 度の中央標本検討会を実施することで正診率を高めるよう心がけ、登録症例中 34 例を適格症例とした。これらの症例を詳細に検討することで今後より明確な診断基準案の策定が可能になると考えられる。これまで ANKL は 100 例あまりの報告がなされているが、報告症例の多い順に本邦、韓国、中国、ニュージーランドとなっており、東アジアが大半を占め、欧米ではきわめて稀である。EBV ウイルスが高頻度に陽性であることとともに ENKL と共通する特徴である。東アジアにおいても ANKL に関する前向き研究はこれまでなされておらず、本疾患の希少性や SMILE-PI における登録状況からしてもその実施はきわめて困難と考え

後ろ向き研究を実施した。

中央検討会での検討の結果、腫瘍細胞は I 型から III 型まで多彩な細胞形態を示すことが判明し形態診断の困難さを伺わせた。また、ANKL の診断に関してこれまで腫瘍細胞の割合に関して規定されていなかったため末梢血および骨髄での腫瘍細胞割合が低い症例と 20%以上認める症例を比較検討した。2 群間で臨床的に有意な差に乏しく一連の疾患と判断された。以上より ANKL は形態的に多彩であるが成熟 NK 細胞形質を持つ腫瘍細胞が主に肝、脾、骨髄で増殖する疾患としてとらえるのが適切であると考えられた。

適格症例の治療内容と予後への影響は今後検討する予定である。

#### E. 結論

初発 IV 期・再発・難治 ENKL に対しては SMILE-P11 が進行中で症例登録は終了した。ANKL に関しては前向き研究の困難さを勘案し ANKL07 を計画、実施した。ANKL07 研究を日本主導により東アジアでの共同研究として行うことにより、ANKL の臨床病理学的特徴が明確になり、ENKL との相違点の理解、また、将来の治療法確立ならびに患者の予後改善につながる可能性がある。

ANKL07 研究は 2 国間の研究ではあるが、緊密に連絡を取り合うことで一定水準の臨床研究の質を確保している。本研究や SMILE-P11 を通じて、成人悪性リンパ腫における多国間診療研究の基盤形成につながっている。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Asano N, Yamamoto K, Tamaru J, Oyama T, Ishida F, Oshima K, Yoshino T, Nakumara N, Mori S, Yoshie O, Shimoyama Y, Morishima Y, Kinoshita T, Nakamura S. Age-related Epstein-Barr virus(EBV) associated B-cell lymphoproliferative disorders: comparison with EBV-positive classic Hodgkin lymphoma in elderly

patients. BLOOD 2009 113:2629-2636.

- (2) Ishida F, Nishina S, Asano N, Sasaki S, Sekiguchi N, Nakazawa H, Ito T, Shikama N. Late relapse of extranodal natural killer/T cell lymphoma, nasal type, after more than ten years. Leuk Lymphoma 2010 51:171-3.

##### 2. 学会発表

- (1) 中澤英之、伊藤俊朗、牧島秀樹、妹尾寧、仁科さやか、小林光、田中榮司、石田文宏. EBV 陽性NK/T細胞リンパ腫/白血病5例に対する臍帯血移植の検討. 第71回日本血液学会総会 2009
- (2) Asano N, Tamaru J, Ishida F, Yoshino T, Kagami Y, Morishima Y, Seto M, Kinoshita T, Nakamura S. Cytotoxic molecule(CM)-positive Hodgkin Lymphoma: a clinicopathologic study in comparison with nodal peripheral T-cell lymphoma of not otherwise specified type possessing CM expression. 第51回米国血液学会 2009

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK 細胞腫瘍の治療研究と東アジア研究組織の構築（臨床試験の実施）」

研究分担者 山口 素子 三重大学医学部附属病院 血液内科 講師

研究要旨

東アジアに多い難治性腫瘍である節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(ENKL)の初発 IV 期・再発・難治例に対する有効な寛解導入療法を開発するため、東アジアのセンター施設の参加による「未治療 IV 期、再発・難治 NK/T 細胞リンパ腫/白血病に対する SMILE 療法の第 II 相試験 (SMILE-II)」を計画し、2007 年 7 月から症例登録を開始した。本分担研究者は本試験の計画に参加し、現在研究事務局 (国内)を担当している。最終的に 65 施設 (国内 61 施設、海外 4 施設)で IRB 承認が得られ、2009 年 10 月に 39 例で症例登録を完遂した。Primary endpoint と毒性に関する解析の結果、試験治療の有効性と安全性が確認され、2010 年米国臨床腫瘍学会年次総会 (ASCO 2010)に抄録を提出した。今後、病理中央診断を行い、2010 年 10 月に残りの secondary endpoint (1 年生存率など)の解析後に英文誌に投稿の予定である。

A. 研究目的

ENKL はかつて致死性正中肉芽腫などと呼ばれ、鼻腔を中心に周辺破壊性に進行し死亡する難治性リンパ腫である。限局期 ENKL に対しては診断後早期での病変部放射線照射の有効性が報告され、近年急速に予後が改善されつつあるが、ENKL の約 10%を占める進行期および再発・難治例では有効な治療法が皆無であり、1 年以内にほぼ全例が死亡し、長期生存者はない。これらの NK 細胞腫瘍は日本など東アジア諸国では両者合わせて全悪性リンパ腫の 3~8%を占める一方、欧米では 1%未満であり、有効な治療法の開発を行うことがわが国に期待されている。

日本の NK 腫瘍研究者で構成される NK 腫瘍研究会では、香港・韓国・台湾の共同研究者との十分な事前検討の結果、近年の基礎研究の成果から ENKL および ANKL に対し有効性が期待されるエトポシド、L-アスパラギナーゼに、多剤耐性(MDR)非関連薬剤であるイホスファミド、メトトレキサート、およびデキサメタゾンを加え、これら 5 剤の薬物動態を考慮して薬剤投与順序を決定した新規

レジメン(SMILE 療法)を考案し、ENKL の未治療 IV 期・再発・難治例および ANKL 例を対象として、SMILE 療法の推奨投与量の決定と安全性の評価を行うアジア多国間第 I 相試験(SMILE-PI; UMIN 臨床試験登録番号 C000000018)を実施した。その結果、投与レベル 1 において完全奏効を含む奏効が得られ、毒性は許容範囲内であることが確認された。

以上より本研究では第 I 相試験で登録のなかった ANKL を除外した対象において SMILE 療法の第 II 相試験を行い、SMILE 療法 2 コースの寛解導入療法としての有効性と安全性を評価する。Primary endpoint は奏効率 (overall response rate)、secondary endpoints は完全奏効率 (%CR)、1 年生存率、初発/再発/難治別の治療効果、再発例での先行レジメン別での治療効果、有害事象発生率とする。登録期間 3 年で 28 名を登録することを予定する。本試験は日本に加えて香港・韓国・台湾・中国のセンター施設の参加による国際間多施設共同研究として実施し、国外参加施設は SMILE 第 I 相試験参加施設を中心に構成する。本研究班は本治療研究すなわち東アジアに頻度の高い腫瘍に対す

る臨床試験を通じて、東アジアにおける多国間研究グループを構築することを目標としている。

## B. 研究方法

本臨床試験は 2006 年 10 月の第 I 相試験登録終了後よりプロトコールコンセプトおよびフルプロトコールの作成を開始した。2007 年 5 月 12 日に NK 腫瘍研究会のプロトコール委員会でフルプロトコールが承認され、同月内に NK 腫瘍研究会の参加施設に試験案内が通知された。

臨床試験計画の概要は以下の通りである。

### [症例選択規準]

以下の全てを満たすものを適格例とする。

- (1) 生検または骨髄液・末梢血検査により WHO 分類の ENKL と診断
- (2) 以下のいずれかであること
  - ① Ann Arbor 病期分類 IV 期の新規診断例
  - ② 初回治療で寛解 (CR または PR) 後の再発例
  - ③ 初回治療で NC または PD であった例
- (3) 年齢 15 歳～69 歳
- (4) Performance status (ECOG) 0-2
- (5) 評価可能病変を有する
- (6) ステロイド全身治療中の患者は登録時前にステロイド投与を中止できる
- (7) 十分な骨髄・肝・腎・心・肺機能
- (8) 患者本人よりの書面同意が得られている

### [プロトコール治療]

登録後 7 日以内にプロトコール治療を開始する。

化学療法 (SMILE 療法: Steroid, Methotrexate, Ifosfamide, L-asparaginase, Etoposide)

薬剤	投与量	投与方法	投与日 (Day)
メトトレキサート	2 g/m <sup>2</sup>	DIV (6h)	1
ロイコボリン	15 mg/回 x4	DIV or PO	2, 3, 4
イホスファミド	1,500 mg/m <sup>2</sup>	DIV (3h)	2, 3, 4
メスナ	300 mg/m <sup>2</sup> x3	IV	2, 3, 4
デキサメタゾン	40 mg/body	DIV or PO	2, 3, 4
エトポシド	100 mg/m <sup>2</sup>	DIV (2h)	2, 3, 4
L-アスパラギナーゼ	6,000 u/m <sup>2</sup>	DIV (2h)	8, 10, 12, 14, 16, 18, 20
G-CSF	適応承認量	SC	Day 6 より開始

28 日毎をめぐりにくり返し 2 コース施行する。

### [予定症例数と研究期間、データ管理、附随研究]

予定症例数 28 例、予定登録期間 3 年、追跡期間 1 年、総研究期間 4 年

データ管理業務は特定非営利活動法人血液疾患臨床研究サポートセンターに委託して行う。

本試験では日本国内のみにおいて ENKL における末梢血 EB ウイルス DNA 量の臨床的有用性に関する附随研究を実施する。

### (倫理面への配慮)

本試験に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言を遵守し、わが国での臨床研究に関する倫理指針あるいは海外各国ではそれに相当する指針に則って実施する。登録に際しては、予め参加施設の IRB 承認が得られた説明文書を渡し、臨床試験の内容を口頭で詳しく説明する。試験登録後は、プロトコールを遵守し有害事象発生の防止に努めるとともに、対象患者のプライバシーの保護に十分な配慮を行う。

## C. 研究結果

本臨床試験は 2007 年 7 月 2 日から症例登録が開始された。本分担研究者は第 I 相試験に続いて研究事務局 (国内担当) を担当している。当施設では 2007 年 7 月 2 日付で IRB 承認が得られた。最終的に参加施設 (IRB 承認施設) は 65 施設であった。最初の 2 例が Grade 4 の好中球減少に引き続く感染症で死亡したため、登録を一時休止し、2007 年 10 月 (日本血液学会・日本臨床血液学会合同総会会期中) に国内外のコアメンバーを招集し urgent meeting が開催された。討議の結果、第 I 相試験登録患者も含めて重篤な感染症を来した症例で高率に認められたリンパ球数低値例を除外するとともに、感染症リスクの高い患者における治療上の注意事項を加えることを主な内容とするプロトコール改訂を行った上で試験継続することが決定された。この研究者判断は効果安全評価委員会の審査を受け承認された。2007 年 11 月 26 日より症例登録が再開され、その後治療関連死亡は生じなかった。

予定の 1.5 倍のペースで症例登録が進捗したことから、2009 年 3 月に検出力を 80% から 90% に高める目的で、登録予定患者数を 28 から 38 へ増加するプロトコール改訂を申請し承認された。最終的

に、2007年7月から2009年10月までの27カ月間に計39例が登録された。主な登録患者背景は年齢16-67歳(中央値47), 男:女=21:18, 初発IV期21名、初回治療後再発13名、初回治療抵抗例5名であった。29名(74%)がプロトコル治療を完遂した。WHO効果判定基準による総合効果は完全寛解(CR)が15名、部分寛解が14名、不変3名、増悪3名であり、早期死亡は4名であった。Primary endpointである奏効率は74% (95% CI, 58-87)であり、historical controlの35%を有意に大きく上回る結果となった。CR率は38%であった。NCI-CTCAE v.3.0で評価された毒性に関しては、grade 4の好中球減少がほぼ全例で認められ、grade 4の非血液毒性は感染5名、高ビリルビン血症1名、ALT値上昇2名、脳症1名であった。最も頻度の高いgrade 3の非血液毒性は感染であった(41%)。これらの結果を2010年米国臨床腫瘍学会年次総会(ASCO 2010)に抄録提出した。今後、病理中央診断を行い、2010年10月に残りのsecondary endpoint(1年生存率など)の解析後に英文誌投稿の予定である。

#### D. 考察

本試験はきわめて順調な症例登録ペースで推移した。その理由として、対象疾患において他に有効な治療法が存在しなかったこと、競合する他の臨床試験や新薬治験がなかったこと、海外および国内ともにNK細胞腫瘍の治療に意欲的な65もの施設が、約40例規模の臨床試験としては多数、ほぼ制限なく参加できたことが挙げられる。当初、2例の治療関連死亡を生じたが、適切な対応とプロトコル改訂により以後治療関連死亡を生じず完遂できたことは、第I相試験の時から築かれつつあるこの多国籍臨床試験体制の質の向上を示したと考えられる。

Primary endpointの解析の結果、試験治療での奏効率は74% (95% CI, 58-87)と、historical controlの35%をはるかに凌ぐきわめて良好な結果であった。実際、SMILE療法は第I相試験の結果公表(Yamaguchi M, et al. Cancer Sci 2008)以来、国内外でNK/T細胞リンパ腫の初発進行期および再発・難治例に対して用いられつつあり、2010年1月に公開されたNCCN guidelineではNK/T細胞腫瘍に対する推奨治療の一つとして掲載されている。このように、すでに日常診療において良好な抗

腫瘍効果が実感されつつある試験治療であることから、今後、病理中央診断や残りのendpointに対する評価を綿密に行い、質の高いevidenceとして発信する必要がある。

当施設ではENKLの2/3以上を占める限局期鼻NK/T細胞リンパ腫に対して、前向き臨床試験(JCOG0211-DI)の結果から高い有効性が示された放射線治療・化学療法同時併用療法(RT-2/3DeVIC療法; Yamaguchi M, et al. J Clin Oncol 2009)を開発し実施しており、本試験登録期間中には再発・難治例がなく、進行期例は本試験の対象とならない高齢者あるいは全身状態不良患者のいずれかで、結果的に本第II相試験への症例登録に至らなかった。このようにENKL全体の治療成績が近年劇的に改善しつつあることから、今後はNK細胞腫瘍と同様に東アジアに多い末梢性T細胞リンパ腫の難治例に向けた治療開発を重要な研究課題として取り上げるべきである。このような背景から、本研究組織では末梢性T細胞リンパ腫の再発・難治例を対象としたSMILE療法の第II相試験が計画され、すでに症例登録が開始されている。

#### E. 結論

ENKLにおいては診断後早期の放射線治療と化学療法の追加あるいは同時併用により限局期例の予後が急速に改善しているのに対し、初発IV期・再発・難治ENKLに対する適切な研究計画に基づく前向き治療研究の報告は皆無であり、有効な治療法は存在しない。初発IV期・再発・難治ENKLに対する本格的な前向き臨床試験は本研究に先立って実施されたSMILE療法の第I相試験が世界初であり、本臨床試験がそれに続くものである。

本試験のPrimary endpointである奏効率は74% (95% CI, 58-87)と、historical controlの35%をはるかに凌駕する結果であった。今後は、ENKLにおいては得られた奏効をどのように治癒へと導くかの新たな課題に対する治療研究(SMILE療法後に移植療法を行う第II相試験など)、SMILE療法が実施できない全身状態不良患者における導入的化学療法の検討、さらにはNK細胞腫瘍と類似点の多い末梢性T細胞リンパ腫でのSMILE療法の有効性検討、などによる新たな治療開発が将来の標準治療確立につながるものと期待される。

本試験ではプロトコルでの規定を遵守した有

害事象報告を始めとして、質の高い臨床試験運営が実現された。成人の悪性リンパ腫における日本と多国間での治療研究は一部の新薬治験を除いてほとんど行われていない。本試験を通じて築かれた東アジアでの人的交流はますます活発化しつつあり、国際学会やグローバル治験の場において交流が深められつつある。今後継続的に本研究組織において本試験に続く臨床試験を計画し実施することで、目標とする成人リンパ腫における恒久的な多国間治療研究グループの形成が達成されると期待される。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Shimada K, Murase T, Matsue K, Okamoto M, Ichikawa N, Tsukamoto N, Niitsu N, Miwa H, Asaoku H, Kosugi H, Kikuchi A, Matsumoto M, Saburi Y, Masaki Y, Yamamoto K, Yamaguchi M, Nakamura S, Naoe T, Kinoshita T for the IVL Study Group in Japan. Central nervous system involvement in intravascular large B-cell lymphoma: a retrospective analysis of 109 patients. *Cancer Sci* 2010 (in press)
- (2) Watanabe T, Kinoshita T, Itoh K, Yoshimura K, Ogura M, Kagami Y, Yamaguchi M, Kurosawa M, Tsukasaki K, Kasai M, Tobinai K, Kaba H, Mukai K, Nakamura S, Ohshima K, Hotta T, Shimoyama M, on Behalf of Japan Clinical Oncology Group (JCOG) - Lymphoma Study Group (LSG). Pretreatment serum total protein is a significant prognostic factor to predict outcome of peripheral T/NK-cell lymphoma patients. *Leuk Lymphoma* 2010 (in press)
- (3) Suzuki R, Suzumiya J, Yamaguchi M, Nakamura S, Kameoka J, Kojima H, Abe M, Kinoshita T, Yoshino T, Iwatsuki K, Kagami Y, Tsuzuki T, Kurokawa M, Ito K, Kawa K, Oshimi K; for The NK-cell Tumor Study Group. Prognostic factors for mature natural killer (NK) cell neoplasms:

aggressive NK cell leukemia and extranodal NK cell lymphoma, nasal type. *Ann Oncol* 2009 Oct 22. [Epub ahead of print]

- (4) Yamaguchi M, Tobinai K, Oguchi M, Ishizuka N, Kobayashi Y, Isobe Y, Ishizawa K, Maseki N, Itoh K, Usui N, Wasada I, Kinoshita T, Ohshima K, Matsuno Y, Terauchi T, Nawano S, Ishikura S, Kagami Y, Hotta T, Oshimi K. Phase I/II study of concurrent chemoradiotherapy for localized nasal NK/T-cell lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0211. *J Clin Oncol* 27: 5594-600, 2009
- (5) 山口素子: 鼻 NK 細胞リンパ腫の治療法は？ 押味和夫、ほか編、EBM 血液疾患の治療 2010-2011、中外医学社、東京、2009、pp398-403
- (6) 山口素子: NK 細胞リンパ腫. *Annual Review 血液* 2009: 158-165, 2009
- (7) 山口素子: 治療選択に有用な疾患単位認識と WHO 分類改訂. *血液・腫瘍科* 58: 568-574, 2009
- (8) 山口素子: 鼻 NK/T 細胞リンパ腫. *カレントセラピー* 27: 696-701, 2009
- (9) 山口素子: 成熟 T 細胞・NK 細胞腫瘍. *臨血* 50: 253-260, 2009
- (10) 山口素子、小口正彦: RT+DeVIC 療法. 飛内賢正ほか編、悪性リンパ腫治療マニュアル改訂 第 3 版、南江堂、東京、2009、pp259-264

### 2. 学会発表

- (1) Yamaguchi M, Tobinai K, Oguchi M, Isobe Y, Ishizawa K, Maseki N, Wasada I, Ishizuka N, Hotta T, Oshimi K, Japan Clinical Oncology Group Lymphoma Study Group (JCOG-LSG). Phase I/II study of concurrent chemoradiotherapy for localized nasal NK/T-cell lymphoma: Final results of JCOG0211. General Poster Session, #8549, ASCO 2009, May 30, Orlando, USA
- (2) Miyazaki K, Yamaguchi M, Suzuki R, Niitsu N, Ennishi D, Tamaru J, Kagami Y, Katayama N, Kinoshita T, Nakamura S, CD5+ DLBCL in the R-era project. Retrospective analysis of CD5-positive

- diffuse large B-cell lymphoma (CD5+ DLBCL) treated with chemotherapy with or without rituximab. General Poster Session, #8551 ASCO 2009, May 30, Orlando, USA
- (3) Suzuki R, Yamaguchi M, Izutsu K, Takada K, Harabuchi Y, Gomyo H, Koike T, Okamoto M, Suzumiya J, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K, The NK-cell Tumor Study Group. Prospective evaluation of EBV-DNA in peripheral blood of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. Simultaneously Oral Session, #125, ASH 2009, December 6, 2009, New Orleans, USA
- (4) 山口素子. Hematologic malignancies: Lymphoma, leukemia, and myeloma. Best of ASCO in Japan 2009 2009年7月5日 東京ビックサイト、東京
- (5) 山口素子. 悪性リンパ腫～WHO 病理分類の改訂(2008年)と臨床におよぼす影響: TおよびNK細胞リンパ腫の臨床とWHO分類改訂. 第47回日本癌治療学会学術集会 パネルディスカッション 2 2009年10月22日 パシフィコ横浜、横浜
- (6) 山口素子. Concurrent chemoradiotherapy for localized nasal NK/T-cell lymphoma. 第71回日本血液学会学術集会 シンポジウム 3 2009年10月23日、京都国際会議場、京都
- (7) Isobe Y, Yamaguchi M, Tobinai K, Oguchi M, Ishizuka N, Kobayashi Y, Ishizawa K, Maseki N, Itoh K, Usui N, Suzuki T, Masaki Y, Nosaka K, Takayama N, Fukushima N, Ohmachi K, Morimoto H, Tsukamoto N, Sakai T, Yakushijin Y, Wasada I, Kinoshita T, Ohshima K, Matsuno Y, Terauchi T, Nawano S, Ishikura S, Kagami Y, Hotta T, Oshimi K. Phase I/II study of RT-DeVIC therapy for localized nasal NK/T-cell lymphoma (JCOG0211-DI). 第71回日本血液学会学術集会 口演 2009年10月25日、京都国際会議場、京都
- (8) Miyazaki K, Yamaguchi M, Suzuki R, Kobayashi Y, Niitsu N, Ennishi D, Tamaru J, Ishizawa K, Kashimura M, Kagami Y, Sunami K, Yamane H, Nishikori M, Kosugi H, Yujiri T, Nakamura N, Masaki Y, Itoh K, Nawa Y, Hyo R, Sakai A, Tsukamoto N, Yano T, Katayama N, Kinoshita T, Nakamura S. Retrospective analysis of CD5+ DLBCL treated with chemotherapy with or without rituximab. 第71回日本血液学会学術集会 口演 2009年10月25日、京都国際会議場、京都
- (9) Suzuki R, Yamaguchi M, Izutsu K, Yamamoto G, Takada K, Harabuchi Y, Isobe Y, Gomyo H, Koike T, Okamoto M, Suzumiya J, Nakamura S, Kawa K, Oshimi K. Prospective evaluation of EBV-DNA in peripheral blood of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. 第71回日本血液学会学術集会 口演 2009年10月25日、京都国際会議場、京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

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

「NK 細胞腫瘍に対する東アジア多国間治療研究」班

分担研究課題 「NK 細胞腫瘍の治療研究と東アジア研究組織の構築  
（末梢血 EB ウイルス量測定）」

研究分担者 木村 宏 名古屋大学大学院医学系研究科 微生物免疫学 准教授

研究要旨

節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(ENKL)に対する有効な寛解導入療法を開発するため、東アジアのセンター施設の参加による「未治療 IV 期、再発・難治 NK/T 細胞リンパ腫/白血病に対する SMILE 療法の第 II 相試験 (SMILE-PII)」を 2007 年 7 月から開始した。本分担研究者は、微小残存病変評価および予後予測因子としての末梢血 Epstein-Barr ウイルス量測定を担当している。本臨床試験は 2009 年 10 月に 39 例（国内登録症例 27 例、海外 12 例）で症例登録が完遂した。国内で登録された 27 例に対してウイルス量測定を行い、うち 21 症例については測定を終了している。今後、全登録症例に対してのウイルス量結果が判明したら、末梢血中ウイルス量測定の臨床的有用性と、全血法と血漿法の優劣を検討していく。

A. 研究目的

本研究の目的は、節外性 NK/T 細胞リンパ腫、鼻型(ENKL)において、末梢血中の Epstein-Barr virus (EBV) DNA 測定が微小残存病変評価および予後予測因子として有用かどうかを検証することである。さらに全血・血漿のうちいずれの検体が、臨床的に適しているかについても明らかにする。

EBV 関連腫瘍において、患者血清中に EBV-DNA が存在することは、鼻咽頭の扁平上皮がん、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫や胃がんなどで報告されている。末梢血検体における EBV 陽性細胞の同定には、これまで単核球 DNA を用いた PCR が行われてきた。さらにリアルタイム PCR 法で検討することにより、DNA の正確な定量が可能となった。測定に用いる検体の種類については全血、細胞成分、血漿を用いた報告がある。全血 DNA を用いた場合、単核球 DNA と DNA 定量結果はよく相関するが、血清を用いた場合はいずれとも相関は低いと報告されている。バーキットリンパ腫・臓器移植後患者・HIV 感染者を対象とした血清と全血サンプルの比較研究で、全血の方がサ

ンプルとして適当であるとする報告もあるが、これらの報告では単に検出感度のみを見ており、臨床的有用性が検討されているとは言い難い。EBV 関連リンパ増殖性疾患、慢性活動性 EBV 感染症、伝染性単核球症の診断に対する定量的 competitive PCR の有用性の検討では、感度は単核球を用いた方が高いが、特異度では血清を用いた方が高いとする報告もある。

以上の背景から、ENKL における EBV-DNA 定量はまだ少数例での検討しかないものの、難治である本疾患において腫瘍細胞の特性を生かした将来有望な予後予測マーカーと考えられる。また ENKL において、検体として全血と血漿とでどちらが臨床的有用性において優れているかも不明である。よって、本試験においては EBV-DNA 定量の臨床的有用性と、全血法と血漿法の優劣を検討することとした。

B. 研究方法

今回、本研究分担者は国内登録症例についてのみ、EBV-DNA 定量を行う。国外の参加施設については、それぞれ独自に採用しているリアルタイム PCR 法

を用いて、EBV-DNA 定量を行うこととする。用いるシステムの違いにより、感度・標準値が異なるため、すべての症例の解析終了後、国内症例と国外症例についての比較行う予定である。

国内の末梢血 EB ウイルス量定量研究の概要は以下の通りである。

#### [症例選択規準]

以下の適格規準すべてを満たす患者を登録適格例とする。

- 1) SMILE phase II study の適格基準を満たす症例。
- 2) 附随試験への参加についても患者本人（15歳以上 20歳未満の場合は患者本人および保護者）から文書で同意が得られた症例。

#### [測定の時期]

本試験では、1症例あたり計3回の検体採取を行う。時期は治療開始直前、SMILE 2コース後、一連の治療（移植ありまたはなし）終了後とする。ただし、造血細胞移植を実施した症例では、移植後の免疫能低下に伴うEBVの再活性化を認めることがあるので、3回目の測定時期は移植後 day 180頃とする。

#### [測定方法]

患者より採取した EDTA 加全血を、測定施設である名古屋大学大学院医学系研究科まで送付してもらう。検体を受領後直ちに、全血分画と遠心後上清の血漿分画に分ける。全血・血漿それぞれ 200  $\mu$ l より QIA Blood Mini Kit (Qiagen) を用い DNA を抽出する。EBV の BALF5 領域に設定したプライマー・蛍光プローブを用い、リアルタイム PCR 法にて EBV-DNA を定量する。EBV-DNA 量は、全血・血漿の 1mL あたりの分子数（コピー/mL）で表記する。

#### [評価方法]

主要評価項目は全血法での SMILE 2コース後の EBV-DNA の消失率とし、副次的評価項目は、一連の治療終了後（移植ありまたはなし）の EBV-DNA 消失率、EBV-DNA 量と1年生存率の相関、治療反応性との比較、検体の種類（全血 vs. 血漿）による各評価項目の比較とする。そのほか、病期、国際予後指標 (IPI)、LDH 値、B 症状などと治療前 EBV-DNA 量、1年生存率との比較などを、探索的に評価する。

#### [試験中止の規準]

以下のいずれかの場合、試験を中止する。

- 1) 原病の悪化により、EBV 量測定 of 採血が困難と判断される場合
- 2) 患者が測定 of 中止を申し出た場合
- 3) 患者の転居等で、継続して of 測定ないし追跡が不可能となった場合
- 4) 試験期間中の死亡

#### (倫理面への配慮)

本試験に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言を遵守し、わが国での臨床研究に関する倫理指針あるいは海外各国ではそれに相当する指針に則って実施する。登録に際しては、予め参加施設の IRB 承認が得られた説明文書を渡し、臨床試験の内容を口頭で詳しく説明する。試験登録後は、プロトコルを遵守し有害事象発生 of 防止に努めるとともに、対象患者 of プライバシー of 保護に十分な配慮を行う。

#### C. 研究結果

本試験である SMILE SMILE 療法 of 第 II 相試験は 2007 年 7 月 2 日から症例登録が開始された。最終的に 65 施設 (国内 61 施設、海外 4 施設) で IRB 承認が得られ、2009 年 10 月に 39 症例を登録し症例登録を完遂した。このうち、海外施設登録症例は 12 例であり、残りの 27 例が国内登録症例であった。これらの国内登録症例 27 例に対して末梢血 of EBV-DNA 定量を行った。27 例中、21 例は既に EBV-DNA 定量が終了しており、6 例については 2 回の解析 (SMILE 2 クール後 of 解析) を行っている。全検体が、採取後一両日以内に測定施設に搬送され、解析・評価可能検体と考えられた。

患者末梢血を全血・血漿分画に分けリアルタイム PCR 法により EBV-DNA 定量を行い、それぞれ 1mL あたりの分子数で表記した。この方法による EBV-DNA 検出限界は、概ね 50 コピー/mL であり、それ以下の EBV-DNA 量は測定感度以下と表される。

SMILE 治療開始前 of 全血中 of EBV-DNA 量は、測定感度以下から  $1.1 \times 10^7$  までに分布した。一方、血漿中 of EBV-DNA 量は測定感度以下から  $1.2 \times 10^7$  までに分布した。27 例中 4 例は、登録時 of 全血・血漿いずれからも EBV-DNA が検出されず、

EBV 非関連と考えられた。これらの症例については、2 回目以降の EBV-DNA 定量は行っていない。また 2 例については、登録時に EBV-DNA が検出されたが、研究方法の項に掲げた試験中止基準に合致したため、2 回目以降の測定を行っていない。

#### D. 考察

ENKL は、鼻腔を中心に周辺破壊性に進行し死亡する難治性リンパ腫である。ENKL では、ほぼ全例の腫瘍細胞で EBV が検出される特徴を有する。末梢血中 EBV-DNA 量は、EBV 陽性腫瘍において体内の腫瘍量を反映する指標とされており、その変動を検索することは化学療法反応性を見るためには有益とされてきた。しかし、本邦では適応承認は未だ得られておらず自由に測定できない。また測定方法も、全血法と血漿法の 2 通りがありその優劣は決定していない。本分担研究により、以下の如くの研究成果が期待される。

1) 成熟 NK 細胞性腫瘍に対する末梢血中 EBV-DNA 定量の臨床的意義はいまだ確立されていない。今回の試験により微小残存病変評価としての有用性が示されれば、確実な腫瘍量判定に役立ち、一般臨床のみならず今後行われる臨床研究への貢献が期待できる。

2) 末梢血中 EBV-DNA 定量が予後予測因子となるのであれば、治療における層別化因子となる可能性がある。一般臨床のみならず、今後行われる臨床研究への貢献が期待できる。

末梢血中 EBV-DNA 量は、EBV 陽性腫瘍において体内の腫瘍量を反映する指標とされているが、本邦では適応承認は未だ得られておらず自由に測定できない。また測定方法も、全血法と血漿法の 2 通りがありその優劣は決定していない。よって、本試験においては EBV-DNA 定量の臨床的有用性と、全血法と血漿法の優劣を検討することとした。

#### E. 結論

ENKL に対する有効な寛解導入療法を開発するため、東アジアのセンター施設の参加による「未治療 IV 期、再発・難治 NK/T 細胞リンパ腫/白血病に対する SMILE 療法の第 II 相試験 (SMILE-II)」を計画し、2007 年 7 月から症例登録を開始した。本分担研究者は、微小残存病変評価および予後予測

因子としての末梢血 EB ウイルス量測定を担当している。2009 年 2 月 27 日現在で計 24 例が登録されており、国内登録症例 17 例に対してウイルス量測定を行った。

検討症例 27 例のうち、4 例については EBV-DNA 陰性であったため、その後の解析は行っていない。残りの 23 例中 6 例は、まだ予定の 3 回の解析を終えていないため、現時点では解析結果を評価することはできない。今後、全登録症例に対してのウイルス定量結果が判明した時点で、末梢血中 EBV-DNA 定量の臨床的有用性と、全血法と血漿法の優劣を検討していく。

本研究分担では国内登録症例についてのみ、EBV-DNA 定量を行っている。国外の参加施設については、それぞれ独自に採用しているリアルタイム PCR 法を用いて、EBV-DNA 定量を行なう。用いるシステムの違いにより、感度・標準値が異なるため、すべての症例の解析終了後、国内症例と国外症例についての比較行う予定である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y. Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 200 ; 1078-87, 2009
- (2) Nomura Y, Kimura H, Karube K, Yoshida S, Sugita Y, Niino D, Shimizu K, Kimura Y, Aoki R, Kiyasu J, Takeuchi M, Hashikawa K, Hirose S, Ohshima K. Hepatocellular apoptosis associated with cytotoxic T/natural killer-cell infiltration in chronic active EBV infection. *Pathol Int* 59: 438-442, 2009
- (3) Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Maruyama K, Yagasaki H, Kojima S, Kimura H. Cytomegalovirus and

- Epstein-Barr virus coinfection in three toddlers with prolonged illness. *J Med Virol* 81:1399-1402, 2009
- (4) Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko Y-H, Jaffe ES. Epstein-Barr virus Associated Lymphoproliferative Disease in Non-Immunocompromised Hosts. *Ann Oncol* 20: 1472-82, 2009
- (5) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol* 90: 42-50, 2010
- (6) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Immunologic and Virologic Analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients with Chronic High Epstein-Barr Viral Loads. *J Infect Dis* *in press*
- Epstein-Barr viral loads. The 34th International Herpesvirus Wlorkshop, July 26, 2009, Ithaca, USA
- (5) Kimura H. Pediatric EBV+ T-cell lymphoproliferative disease. T-cell lymphoma Forum, Jan 29, 2010, Lahaina, USA
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
国際特許出願 PCT/JP2009/001173(WO)  
ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット  
発明者；木村 宏、西山幸廣  
出願日；2009年3月17日

## 2. 学会発表

- (1) 木村 宏、河邊慎司、後藤研誠、伊藤嘉規、岩田誠子、西山幸廣：FISH法を用いたEBV関連リンパ増殖性疾患の非侵襲診断および病態解析：第57回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、2009年10月25日、東京
- (2) 木村 宏：免疫不全宿主におけるEBウイルス関連リンパ腫：第23回日本エイズ学会学術集会、シンポジウム、2009年11月26日、名古屋
- (3) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Iwata S, Kawabe S, Gotoh K, Ito Y, Nishiyama Y: Identification of EBV-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. The 34th International Herpesvirus Wlorkshop, July 26, 2009, Ithaca, USA
- (4) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H: Immunologic and virologic analyses in pediatric liver transplant recipients with chronically high