

Inoue H, Komatsu N, Tani K. APOA-1 is a Novel Marker of Erythroid Cell Maturation from Hematopoietic Stem Cells in Mice and Humans. Stem Cell Rev. 7:43-52,2011

2. 学会発表

1. 末廣陽子、宮下要、崔日承、鵜池直邦. CEBPA 遺伝子変異を伴う家族性 AML の父子例に対する自己末梢血幹細胞移植療法の長期予後. 第 33 回日本造血細胞移植学会総会. 2011 年 松山
2. 末廣陽子、宮下要、崔日承、鵜池直邦. 低悪性度 B 細胞リンパ腫の患者数とその治療成績の推移-単一施設における 20 年間の後方視的解析-第 51 回日本リンパ網内系学会, 福岡,2011 年 7 月
3. 崔日承、宮下要、末廣陽子、鵜池直邦、Double-hit B-cell lymphoma の 3 例. 第 51 回日本リンパ網内系学会. 2011 年 7 月福岡
4. 笹田亜麻子、長谷川温彦、清水由紀子、末廣陽子、鵜池直邦、豊嶋崇徳、谷憲三朗、森尾友宏、三浦修、宇都宮與、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATLL) に対する樹状細胞免疫療法に向けた、基礎解析と第 I 相臨床試験コールドラン,第 3 回造血器腫瘍免疫療法研究会,大分,2011 年 8 月 20-21 日,
5. 笹田亜麻子、長谷川温彦、清水由紀子、末廣陽子、鵜池直邦、豊嶋崇徳、谷憲三朗、森尾友宏、福田哲也、三浦修、宇都宮與、松岡雅雄、岡村純、神奈木真理. ATLL に対する新規ペプチドパルス樹状細胞療法に向けた基礎解析と第 I 相臨床試験コールドラン. 第 4 回 HTLV-1 研究会,東京,2011 年 9 月
6. Suehiro Y, Choi I, Ikeda M, Miyashita K, Abe Y, Uike N. Mixed-phenotype acute leukemia following intensive chemotherapy for Endometrial cancer.第 73 日本血液学会学術総会,名古屋,2011
7. Choi I, Ikeda M, Suehiro Y, Abe Y, Uike N. IgM myeloma presented as plasmacytoma of L-spine with BCL1/IgH fusion gene.第 73 日本血液学会学術総会,名古屋,2011
8. Abe Y, Shiratsuchi M, Nagasawa E, Ohno H, Sada E, Honda E, Ikeda M, Choi I, Suehiro Y, Uike N. Analysis of plasma levels of thrombopoietin in patients with thrombocytopenia. 第 73 日本血液学会学術

総会,名古屋,2011

9. Choi I, Eto T, Tanosaki R, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Takemoto S, Taguchi J, Fukushima T, Kato K, Teshima T, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, Uike N. A prospective Feasibility trial of unrelated bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning regimen for elderly patients with adult T-cell leukemia/ lymphoma (ATL).Blood (ASH Annual Meeting Abstracts),116:285,Nov 2011

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業） 分担研究報告書

同種造血幹細胞移植後の抗白血病効果を促進する試み

研究分担者：豊嶋 崇徳 九州大学・遺伝子細胞療法部 准教授

研究要旨

同種造血幹細胞移植後の移植片対白血病（GVL）効果を損なわずに選択的な移植片対宿主病（GVHD）を抑制するために Wnt アゴニストである R-spondin1 の効果を検討した。R-spondin1 を実験的骨髄移植において移植前後に計 6 回投与することで、移植前処置毒性による腸管傷害を軽減することにより、腸管ダメージに引き続く全身炎症反応が抑制され、腸管のみならず全身 GVHD が軽減した。一方、ドナー T 細胞のアロ応答性は保持されておりその結果、GVL 効果は保持された。本研究成果は GVHD の選択的抑制が可能であることを示唆するものである。

A. 研究目的

本研究班の今までの臨床成績から明らかになった、成人 T 細胞性白血病（ATL）に対する同種造血幹細胞移植の主たる課題は、移植後の再発率が高いこと、移植関連合併症の頻度が高いことである。このため、移植片対白血病（GVL）効果を損なうことなく選択的に移植片対宿主病（GVHD）を抑制する必要がある。われわれは GVHD の発症に深く関与する移植前処置毒性の軽減によって選択的な GVHD 抑制が達成するという以前よりの仮説を、腸幹細胞刺激因子である R-spondin1 投与で達成可能かどうかマウスモデルで検討した。

B. 研究方法

マウスモデルとして、全身放射線照射を用いた MHC 半合致移植モデル（B6 → B6D2F1）を用いた。R-spondin1 を骨髄移植前後それぞれ 3 日間投与した。移植後に、腸管などの GVHD 標的臓器を採取し、GVHD の評価を行った。またドナー T 細胞の活性化の動態も解析した。

（倫理面への配慮）

本研究に関して九州大学動物実験施設の承認を得た。

C. 研究結果

R-spondin1 の投与により、腸管組織での Wnt 標的遺伝子である Axin2 の発現が亢進し、Olfm4+腸幹細胞の増殖が観察され、R-spondin1 が腸幹細胞増殖因子であることが示された。本分子の投与により全身放射線照射による腸管ダメージの軽減がみられ、その結果、腸内細菌

由来の免疫刺激物質の血中流入が抑制され、炎症性サイトカインの産生が抑制された。腸管 GVHD のみならず、全身 GVHD の改善がみられ、生存率の向上がみられた。一方、ドナー T 細胞の活性化、エフェクター、メモリー T 細胞への分化、CTL 活性には変化がみられず、GVL 効果は温存された。

D. 考察

骨髄非破壊的移植前処置法の開発によって、移植前処置毒性の軽減はある程度達成され、移植の適応拡大へと繋がっていった。しかし、一方で、大量化学放射線療法による、白血病再発の増加が問題となっている。本課題で示されたような、正常組織の保護によって移植前処置の軽減を図ることができれば、白血病抑制効果を保持しながら、移植前処置毒性、GVHD を軽減することが可能になるものと考えられた。

E. 結論

正常組織幹細胞の保護によって、GVL 効果を損なわずに、移植成績向上が達成可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K: TIM-3 is a promising target to

- Selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 7(6): 708-717, 2010.
2. Kamimura T, Miyamoto T, Nagafuji K, Numata A, Henzan H, Takase K, Ito Y, Ohno Y, Fujisaki T, Ito T, Takamatsu Y, Teshima T, Gondo H, Akashi K, Taniguchi S, Harada M: Role of autotransplantation in the treatment of acute promyelocytic leukemia patients in remission: fukuoka BMT group observations and a literature review. *Bone Marrow Transplant* 46:820-826, 2011.
 3. Takashima S, Kadowaki M, Aoyama K, Koyama M, Oshima T, Tomizuka K, Akashi K, Teshima T: The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med* 208(2):285-294, 2011.
 4. Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Mitoma H, Niino H, Arinobu Y, Inoue Y, To K, Miyamoto T, Iwasaki H, Teshima T, Harada M, Akashi K: Analysis of immune reconstitution after autologous CD34+ stem/progenitor cell transplantation for systemic sclerosis: predominant reconstitution of Th1 CD4+ T cells. *Rheumatology* 50(5): 944-952, 2011.
 5. Hashimoto D, Chow A, Greter M, Saenger Y, Kwan WH, Leboeuf M, Ginhoux F, Ochando JC, Kunisaki Y, van Rooijen N, Liu C, Teshima T, Heeger PS, Stanley ER, Frenette PS, Merad M : Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med* 208(5):1069-82, 2011.
 6. Mori Y, Miyawaki K, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T: Diagnostic value of serum procalcitonin and C-reactive protein for infections after allogeneic stem cell transplantation versus nontransplant setting. *Intern Med* 50(19): 2149-2155, 2011.
 7. Mori Y, Miyamoto T, Kato K, Kamezaki K, Kuriyama T, Oku S, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, Shiratsuchi M, Abe Y, Nagafuji K, Teshima T, Akashi K: Different risk factors related to adenovirus- or BK virus-associated hemorrhagic cystitis following allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant on line*, 2011.
 8. Ferrara JL, Harris AC, Greenson JK, Braun TM, Holler E, Teshima T, Levine JE, Choi SW, Huber E, Landfried K, Akashi K, Vander Lugt M, Reddy P, Chin A, Zhang Q, Hanash S, Paczesny S: Regenerating islet-derived 3 alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood* 118(25):6702-6708, 2011.
 9. Nishimori H, Maeda Y, Teshima T, Sugiyama H, Kobayashi K, Yamasuji Y, Kadohisa S, Uryu H, Takeuchi K, Tanaka T, Yoshino T, Iwakura Y, Tanimoto M : Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by downregulating Th1 and Th17. *Blood* 119(1): 285-295, 2012.
 10. Teshima T, Maeda Y, Ozaki K: Regulatory T cells and IL-17-producing cells in graft-versus-host disease. *Immunotherapy* 3(7): 833-852, 2011.
 11. Teshima T: Th1 and Th17 join forces for acute GVHD. *Blood* 118: 4765-4767, 2011.
2. 学会発表
 1. Teshima T : A novel strategy to improve outcome of allogeneic stem cell transplantation. The 16th Annual Meeting of the Korean Society of Blood and Marrow Transplantation. Busan, Korea, 2011.
 2. Teshima T : Intestinal homeostasis and graft-versus-host disease. The 16th Annual Meeting of the Asian-Pacific Blood and Marrow Transplantation. Sydney, Australia, 2011.
 3. Teshima T : Current status of the graft processing in Japan. The 1th International Workshop on Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Emerging countries. Worldwide network for Blood and Marrow Stem Cell Transplantation, WHO. Hanoi, Vietnam, 2011.
- 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

Multi-color FACS による末梢血 ATL 細胞の評価

研究分担者：内丸 薫 東京大学医科学研究所附属病院 血液腫瘍内科 准教授

研究要旨

Multi-color FACS(HAS)による急性型 ATL 症例末梢血の解析を継続し、移植前病勢評価に有用と考えられる結果を得た。また、移植後症例の評価に応用するため HLA mismatch 移植に応用可能な抗 HLA 抗体を組み込んだ HAS を開発し、予備検討では患者 ATL 細胞残存の評価が可能であった。TRU カウント法を応用した FACSCalibur による末梢血 ATL 細胞の直接カウント法を開発し、HAS の汎用化をはかった。HAS は無症候性キャリアの評価にも有用で、ハイリスクキャリアの同定が可能と考えられた。

A. 研究目的

昨年度我々は急性型 ATL 症例の末梢血中の腫瘍細胞を同定するための multi-color FACS(HTLV-1 Analysis System:以下HAS)の開発を行った。その有用性の検討のためHASによる急性型ATL症例の治療経過の評価を継続する。さらにより簡便にATL細胞数を評価するためFACSにより直接定量する系の開発を行う。昨年度の検討では移植後の症例においてはHASによる評価は困難であり、今後当班で予定されている臍帯血移植後の評価に有用な新しいFACSの系の開発を試みる。昨年 の 検 討 で CD7 発 現 量 の 低 下 が HTLV-1 感 染 細 胞 の 腫 瘍 化 過 程 を 反 映 し て いる 可 能 性 が 示 唆 さ れ、indolent ATL、無症候性キャリアの末梢血をHASで評価することにより発症ハイリスクキャリアの同定を試みる。

B. 研究方法

当科に入院中の急性型 ATL 症例を対象に末梢血単核球を分離後、PE-CD7、PE-Cy7-CCR4、APC-CD25、APC-Cy7-CD3、Pacific Blue-CD4、Pacific Orange-CD14 で染色し FACSAria で解析した。CD14 で単球をゲートアウトした後、CD3/4 で CD4 陽性 T 細胞にゲートをかけ、CD3/7 で展開し、治療に伴う HAS の変化を経時的に解析した。定量 HAS の開発のため、HAS を CD3、4、7、14 のみとし TRU カウントチューブを組み込むことで、CD7(-)の ATL 細胞集団数を FACSCalibur で測定、FACSAria のデータと比較した。HLA mismatch 臍帯血移植後症例の検討のため、HAS に患者/ドナー特異的 HLA に対する抗体を組み込み、患者、ドナーに分けて HAS を行った。HAS によるハイリスクキャリアの同定

のため、indolent ATL および無症候性キャリア (AC)の末梢血サンプルを HAS で解析し、inverse PCR によりそれぞれクローナリティを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究に関する倫理指針に則り東京大学医科学研究所倫理委員会の審査承認（承認番号22-3,4-0518）のもとに被験者から文書による説明と同意を得て遂行された。

C. 研究結果

治療経過に伴う HAS の変化を検討した症例を 14 例まで増やした。うち造血細胞移植を施行した症例は 8 例で移植前の status は CR1、PR4、SD1、PD2 であった。CR、PR の症例は移植前の CD4+/CD7- の集団は全例 50% 台以下であり、全例生存している。SD、PD の症例は移植前同集団は 80% 以上であり全例死亡した。定量 HAS については FACSAria との同時解析により validation を行ったが、Aria のデータとほぼ同じデータが再現され、FACSCalibur により CD4+CD7- 細胞の FACS による直接定量が可能であった。臍帯血移植後の ATL 症例の末梢血を予備的に解析した結果、ドナー臍帯血は移植後 CD7 発現がダイナミックに変化し、一方レシピエント細胞は HAS による CD4+CD7- の ATL 細胞の解析が可能であることが示唆された。AC 39 例、くすぶり型 8 例、慢性型 7 例の末梢血を HAS で解析したところ、くすぶり型、慢性型 ATL 症例は CD7dim+CD7->45% の領域 (G2) に分布し、AC 例は CD7dim+CD7-<45% の領域 (G1) に多くが分布したが、一部 G2 に分布する症例を認めた。これらの症例は inverse PCR により major clone の出現が示唆された。

D. 考察

HASによるATL患者末梢血解析は病勢をよく反映していると考えられ、治療効果の判定に有用である。移植前の病勢コントロールは移植後長期生存のため重要であるが、移植前評価に本法を加えることにより移植後の予後が推定できる可能性があり、さらに症例を重ねて検討したい。定量HASは多くの病院で使用可能なFACSCaliburで施行可能で、本法の汎用化に有用な系と考えられる。HASは移植後の評価に使えないのが一つの欠点であったが、今回の検討によりHLA mismatch移植ではレシピエントのATL細胞の経過を追える可能性が示唆された。HASはACにおける発症ハイリスク群の同定にも有用である可能性が示唆された。

E. 結論

本法（HAS）により移植前ATL症例の病勢評価が可能で、移植後の予後推定に有用である事が示唆された。また移植後の評価にもHLA mismatch移植では有用と考えられる。本法を改良した定量HASは多くの病院で施行可能である。HASによりハイリスクキャリアの同定も可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Tani K, Zaike Y, Watanabe N, Tojo A and Uchimaru K. Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3^{dim}CD7^{low} subpopulation of CD4⁺ T cells in acute-type adult T cell leukemia. *Cancer Sci*. 102(3):569-577 2011.
2. Tsuda M, Ebihara Y, Mochizuki S, Uchimaru K, Tojo A and Tsuji K. Reduced dose chemotherapy for acute promyelocytic leukaemia with adult Down syndrome. *Br J Haematol*. 155(1):130-132 2011.
3. Uchimaru K. Current problems on the management of HTLV-1 asymptomatic carriers and ATL patients. *Rinsho Ketsueki* 53(10):1432-1438 2011.
4. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A,

Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T.: Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*, 21: 121-135, 2012

2. 学会発表

1. 大野伸広、田亜敏、小林誠一郎、磯部優理、津田真由子、在家裕司、渡辺信和、谷憲三朗、東條有伸、内丸薫. CD3 と CD7 の展開による ATL 細胞の同定：急性型 ATL の治療反応性のモニタリングとして 第 73 回日本血液学会総会 名古屋 2011
2. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Zaike Y, Watanabe N, Tani K, Tojo A Uchimaru K. CD3 vs CD7 plot in multi-colour FACS reflects progression of disease stage of HTLV-1 infected patients. 第 73 回日本血液学会総会 名古屋 2011
3. Uchimaru K, Yamano Y, Tsukasaki K, Uike N, Utsunomiya A, Iwanaga M, Hmada T, Iwatsuki K, Watanabe T. Nation-wide survey of the management of adult T-cell leukemia and HTLV-1 carrier. 第 73 回日本血液学会総会 名古屋 2011
4. 石垣知寛、在家裕司、小林誠一郎、大野伸広、内丸薫、渡辺信和、小柳津直樹、東條有伸、中内啓光. フローサイトメトリーによるフェノタイプ解析を用いた、急性型 ATL の末梢血腫瘍細胞数の評価 第 4 回 HTLV-1 研究会 東京 2011
5. 大野伸広、湯地晃一郎、小林誠一郎、渡辺信和、石垣知寛、東條有伸、内丸薫. Multi-color FACS 用いた CD3/7 展開による急性型 ATL の治療反応性のモニタリング 第 4 回 HTLV-1 研究会 東京 2011
6. 小林誠一郎、田亜敏、大野伸広、湯地晃一郎、石垣知寛、磯部優理、津田真由子、在家裕司、渡辺恵理、渡辺信和、谷憲三朗、東條有伸、内丸薫. マルチカラーFACS における CD3 と CD7 の展開は HTLV-1 感染患者の病期の進行を反映する 第 4 回 HTLV-1 研究会 東京 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 細胞白血病リンパ腫（ATL）の根治を目指した
同種細胞療法の開発・確立とその機序の解明に関する研究

研究分担者：田野崎隆二 国立がん研究センター中央病院 病理科・臨床検査科 副科長

研究要旨

当院ではこれまで本研究班のミニ移植前方視臨床試験に計 15 例（第 1 期 3 例、第 2 期 3 例、第 3 期 6 例、第 4 期 3 例）の本登録・ミニ移植を行った。他院で移植した第 2 期 1 例も含めて現在生存者は 11 例で全例当院外来でフォロー中である（観察期間中央値 56 か月）。50 歳から 69 歳までの急性型およびリンパ腫型 ATL の CR および PR 例に対し、同種造血幹細胞ミニ移植は、半数以上の患者において安全に治癒に近いキャリア状態に至らしめる可能性のある治療法と考えられる。

A. 研究目的

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療法（以下、ミニ移植）を開発的に検討し、多施設共同研究によりその安全性と有効性を確認することを目的とする。

B. 研究方法

当院ではこれまで第 1 期第 I 相試験（血縁末梢血幹細胞、ATG 有）に 3 例、第 2 期第 I 相試験（血縁末梢血幹細胞、ATG 無）に 3 例、第 3 期第 II 相試験（血縁末梢血幹細胞、ATG 無）に 6 例、第 4 期第 I 相試験（非血縁骨髄）に 3 例の計 15 例の本登録・ミニ移植を行った。上記の前方視臨床試験はいずれも本年度中までに登録が終了となったが、九州がんセンターで移植を施行した第 2 期 1 例も含めて生存例は全例当院外来でフォロー中である。このうち、第 I・II 期登録例は 10 年まで年 1 回の HTLV-1 プロウイルス量および HLA 拘束性 Tax 特異的 CTL の解析などを経時的にフォロー継続中である。

一方、研究班の免疫療法プロトコルの検討や臍帯血移植の新規研究プロトコル作成などにも携わった。

（倫理面への配慮）

以上の研究は基本的に登録時に得た同意書の下に施行しているが、定期的採血においては研究が長期にわたっていることから、患者診察日の採血前に研究分担者が直接その都度意思確認を口頭で行って倫理面に配慮した。

C. 研究結果

当院で本登録・移植した 15 例と移植後からフォローをしている 1 例を合わせた計 16 例について検討した。男 9 女 7 例で、移植時年齢の中央値 57 歳（範囲 50-68 歳）。平成 23 年 11 月時点において生存者の観察期間は中央値 56 か月（範囲 6-120 か月）。

第 1 期から第 3 期までの血縁末梢血幹細胞移植だけでは中央値 76 か月。再発は 4 例（15、171、199、340 日目）。死亡は 5 例で、死因は腫瘍関連死が 3 例（298、361、900 日目）で、他の 2 例は閉塞性細気管支炎（617 日目）と重症消化管 GHVD（105 日）であった。移植前は全例において中枢神経浸潤既往がなく、再発後には抗がん剤の髄注は施行しなかったが中枢神経再発は認めなかった。また、再発は 1 年以降には認めず、再発時に血液中の HTLV-1 プロウイルス感染細胞が消失し病変が局在していた 1 例では局所放射線照射とドナーリンパ球輸注療法で以後 107 か月無病生存している。 Kaplan-Meier 法による全生存曲線では 30 か月以降プラトーになり生存率は 63% と良好である。なお、全例で抗 HTLV 抗体は陰性化していない。

第 4 期臨床試験は非血縁者ドナーを対象とした第 1～3 期と異なる条件のミニ移植法であるが、当院では本登録 3 例中 3 例が 1 年から 2 年間の観察期間において全例無再発生存中である。このことから、当該治療の安全性と有効性が期待される。

D. 考察

第3期第II相試験は登録集積が予想以上に遅く、当初の予定症例数に至らずに研究期間等の理由から登録が終了となった。けれども、血縁末梢血幹細胞移植に関しては第1期から第3期まで通してほぼ一貫したミニ移植プロトコールにより治療が行われ、当院だけでも13例がフォローされていて、うち8例(61.5%)が観察期間中央値6年以上において寛解状態かつ良好な全身状態で生存している。生存曲線は30か月以降プラトーであり、抗HTLV抗体は残存していることから、ATLはほぼ治癒と考えられ、キャリア状態になったと考えられる。将来的にATLが再発するか否か、再発する場合には通常発症の自然歴と比較してどのくらいの時期に発症するかなど本疾患の治療の確立や病態解明のために重要な課題が残っており、これらに関してはさらに長期的な観察が必要である。当院では年間約100例の造血細胞移植を行ってきており、本来、本ミニ移植前処置法は急性白血病や骨髄異形成症候群など他の疾患に対してより多くの経験を重ねてきたものであり、合併症などに十分に慣れた上で今回の一連の研究に臨んだことから移植関連死亡が比較的少なかったと考えられる。またプロトコール範囲内で免疫抑制剤を最小限にすることにより、移植片対ATL(GV-ATL)効果を効果的に出して再発率が低く良好な成績につながった可能性が考えられる。第3期の臨床試験では研究班全体としても十分な症例数が集積できなかったものの、移植関連死亡を低く抑えることにより、約30%という第1期および第2期の長期無病生存割合を上回る成績が期待できる可能性がある。

E. 結論

50歳から69歳までの急性型およびリンパ腫型ATLのCRおよびPR例に対し、同種造血幹細胞ミニ移植は、半数以上の患者において安全に治癒に近いキャリア状態に至らしめる可能性のある治療法と考えられる。

F. 健康危険情報

時に重篤な合併症を伴う治療であるために十分な経験と技術が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A,

Tomonaga M, Harada M, Yamanaka T, Kannagi M, Okamura J. Long-term outcomes after hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective trials. *Bone Marrow Transplant* 46; 116-118:2011

2. Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*. 119(9):2141-8 :2012 Mar 1.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

ATL に対する骨髄非破壊的移植療法のキメラ解析およびウイルス動態の検討

研究分担者：岡村 純 九州がんセンター 小児科 医師
共同研究者：高田 豊 九州がんセンター 臨床研究センター(キメラ解析)

研究要旨

個人間で遺伝子配列長の多様な STR 領域の長さの違いに着目してキメリズムを評価した。方法は、10 個の STR 領域を同時に増幅する PCR を使用し、蛍光検出型電気泳動装置にて生成物を解析した。ATL に対する骨髄非破壊的移植療法（RIC）の臨床試験（NST-1～NST-4）に登録された全 65 例で解析可能な STR 領域が存在し、移植後キメリズムの経過観察評価は STR により十分に遂行可能であった。また、患者の末梢血単核細胞から DNA を抽出して Real-time PCR 法により RIC 後の HTLV-1 プロウイルス量を経時的に測定した。RIC 後 180 日以内にプロウイルス量が測定感度以下（ <0.5 ）となって「陰性化する割合」は、血縁者間末梢血移植である NST-3 では、19 例中 12 例（63%）、非血縁者骨髄移植の NST-4 では 15 例中 13 例（83%）であり、HTLV-1 陰性ドナーからの移植である NST-4 におけるプロウイルス量の陰性化は NST-3 と比較して速やかでかつ高率であった。

A. 研究目的

本研究班では、ATL に対する骨髄非破壊的移植療法（RIC）の検証的臨床試験を行っている。RIC を実施する上で、拒絶や再発の指標となるドナー/レシピエントの混合キメラ比率を正確に評価することおよび RIC 後の HTLV-1 プロウイルス動態の解析は極めて重要である。我々は、臨床試験と並行してキメラ比率と HTLV-1 プロウイルス量を定期的に測定して臨床経過との関連の有無を検討している。

B. 研究方法

対象：

4 種類の RIC プロトコール（NST-1、NST-2、NST-3、NST-4）に登録された 65 例で、NST-1,2,3 は血縁者間（ドナーは、すべて HLA 一致同胞 50 例、幹細胞ソースは末梢血）、NST-4 は非血縁者間（ドナーは、すべて HLA 一致非血縁ボランティア 15 例、幹細胞ソースは骨髄）の移植である。

方法：

(1) RIC 後のキメラ解析：
個人間で遺伝子配列長の多様な 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。末梢血からゲノム DNA を抽出し、各 STR

polymorphism 領域（10 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。遺伝子は通常ヘテロ接合体であり、各 STR の領域のピークは標準では各々で 2 つのピークを示す。また、ホモ接合体の場合は各領域に 1 つのピークが、ほぼ 2 倍量のピークとして観察される。解析方法としてドナーとレシピエントでピークのパターンに差がある領域を解析するが、この時、片側ピークは同一長ピークが存在する領域を解析領域として選ぶ。これにより、同一長ピーク中のドナーアレル由来とレシピエントアレル由来のピーク量を、ドナーとレシピエントの各対立アレル由来ピークの量から割振り、ドナー型血球細胞の割合(キメラ値)を算出した。RIC 後は、30、60、90、180、1 年、その後は 1 年毎にキメラ解析を実施した。

(2) HTLV-1 プロウイルス量動態に関する研究：
末梢血単核細胞(PBMC)から DNA を抽出し、HTLV-1 pX および β -globin に特異的な 2 種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた Real-time PCR 法 (Light Cycler) により HTLV-1 プロウイルス量を測定した。RIC 後、30、60、90、180、1 年、その後は 1 年毎にプロ

ウイルス量を測定した。

(倫理面での配慮)

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。研究実施に伴う血液および骨髄検体の採取については、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、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

初期研究の移植例である血縁者間移植 NST-1, NST-2 を含めても移植症例全 65 例で解析可能な STR 領域が存在しており、移植後キメリズムの経過観察評価は、我々の行った STR による評価法により十分に遂行可能であった(Table 1)。

Table1 : 解析に使用した STR 領域の種類と頻度

NST	D3S1358	AHA	FGA	Amelogenin	TH01	TPOX	CSF1PO	D2S1328	D18S11	D7S820	STR領域数
NST1	0	1	4	0	0	0	1	0	4	6	16
NST2	0	0	4	0	1	2	0	3	2	2	14
NST3	0	2	3	0	3	2	4	1	5	0	20
NST4	1	0	4	0	0	6	2	0	1	1	15
合計	1	3	15	0	4	10	7	4	12	9	65

2011.09.30時点

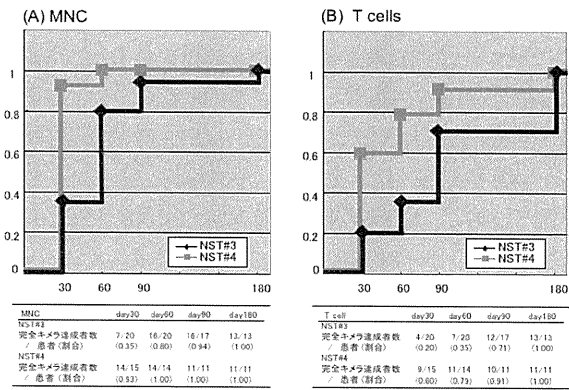
(1-1) キメラ値を計算した遺伝子領域：血縁者移植と非血縁者間移植の相違：

血縁者末梢血移植 NST-3 の 20 症例では、移植あたり解析可能な領域数は平均 5.4(領域数は 2-9)であり、非血縁者間骨髄移植 NST-4 の 15 症例では、平均 5.3(領域数は 2-9)であり、NST-3 との間に差は見られなかった。NST-4 では各 STR 領域中の両 allele のピークがどちらも不一致である領域数は 10 領域中平均 2.9(領域数は 0-5)であった。血縁者間移植の NST-3 は 10 領域中平均 0.8(領域数は 0-4)であることと比べると、ドナーとレシピエントの遺伝的類似性がより小さいことが確認された。

(1-2) 移植片の生着と完全キメラの達成について：

本研究では、患者の血球数に対してのドナー血球数の占める割合が 95%を超えるキメラ値が得られた時に、完全キメラ状態であると定義している。この完全キメラの達成者数の割合を、末梢血の観測ポイントの 30 日、60 日、90 日、120 日、180 日検体でプロットした (Figure 1)。

Figure.1 完全キメラ達成率の推移



移植後の患者血球全体を示す MNC (Mononuclear cell) 分画で比較すると、NST-4 では、完全キメラ達成者は 15 例中 14 例であり、血縁者間移植である NST-3 と比較するとその割合の推移は速やかであった。これは移植前処置の相違 (NST-3 ではフルダラビン/ブズルファン、NST-4 では、フルダラビン/ブズルファン+全身放射線照射) や移植ソースの影響によるものと思われた。また、T 細胞分画のみを比較すると、完全キメラ達成のスピードはさらに顕著であった。

(2) HTLV-I プロウイルス動態に関する研究：(Table 2)

NST-3 および NST-4 における RIC 後の HTLV-I プロウイルス量の推移を Table 2 に示した。先行試験の NST-1/NST-2 では、評価可能であった 28 例中 16 例 (57%) で、RIC 後 180 日以内にプロウイルス量が測定感度以下 (<0.5) となり陰性化した。

NST-3/ NST-4 におけるプロウイルス量陰性化の割合 : NST-3 の HTLV-I 陰性ドナーからの移植の場合、Day 30 で 12 例中 5 例 (42%)、Day 180 では 12 例中 10 例 (83%) であり、HTLV-I 陽性ドナーからの移植では、各々 7 例中 1 例 (14%)、7 例中 2 例 (29%) であり、非血縁骨髄を使用した NST-4 (ドナーは全例が HTLV-I 陰性) では、Day 30 で 15 例中 8 例 (53%)、Day 180 では 15 例中 13 例 (87%) であった。なお、NST-4 で陰性化しなかった 2 例はいずれも RIC 後早期の再発例であった。

Table 2 : NST-3, NST-4 における RIC 後の HTLV-1 プロウイルス量の陰性化頻度

臨床試験	HTLV	n	Day30	Day90	Day180
NST-3	(-)	13	5/12(42%)	8/12(67%)	10/12(83%)
	(+)	7	1/7(14%)	2/7(29%)	2/7(29%)
NST-4	(-)	15	8/15(53%)	11/15(73%)	13/15(87%)
	(+)	5			

D. 考察

本解析に用いた STR 法によるキメラ解析は、ドナーが血縁か非血縁を問わず RIC において応用が可能であり、ドナー/レシピエントの識別が困難な症例はなかった。非血縁者間移植である NST-4 では、完全キメラ達成者は 15 例中 14 例であり、血縁者間移植である NST-3 と比較するとその割合の推移は速やかであった。RIC 後の HTLV-I プロウイルス量動態の解析では、非血縁者骨髄を使用した NST-4 において血縁者間移植と比較して、プロウイルス量の陰性化は速やかでかつ高率であった。一旦陰性化した HTLV-I プロウイルスが、正常リンパ球に感染していく経緯や割合については今後長期の観察が必要と考えられる。

E. 結論

STR 法によるキメラ比率の測定や Real-time PCR 法による HTLV-I プロウイルス動態の解析は ATL に対する RIC 後の経過観察には有効な手段であると考えられる。キメラ比率やプロウイルス量は、移植ソースや前処置法の相違により影響を受けると考えられるが、さらに詳細な解析を必要とする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Tomonaga M, Harada M, Yamanaka T, Kannagi M, Okamura J on behalf of the ATLL allo-HSCT study group. Long-term outcomes after hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL): results of prospective trials. *Bone Marrow Transplantation*, 46(1):116-118, 2011
2. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Masuda M, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retrovirology* :100 doi:10.1186/1742-4690-8-100, 2011

3. Kanda J, Hishizawa M, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study. *Blood*. 119(9):2141-8 : Mar 1, 2012

2. 学会発表

1. Hasegawa A, Takamori A, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, Choi I, Uike N, Okamura J, Watanabe T, Masuda T, Kannagi K. Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CTLs in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers. 15th International Conference on Human Retrovirology, Leuven, Belgium June 5-8, 2011
2. Uike N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, Okamura J. Can allo-SCT with RIC cure ATLL? : Long-term survivors with excellent PS and with heterogenous HTLV-1 proviral load level. 15th International Conference on Human Retrovirology, Leuven, Belgium, June 5, 2011
3. Utsunomiya A, Uike N, Choi I, Tanosaki R, Kannagi M, Okamura J. Recent Advances in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma. The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases September 15 (Thu)-17 (Sat), 2011, Tokyo, Japan.
4. 笹田亜麻子、長谷川温彦、清水由紀子、末廣陽子、鵜池直邦、豊嶋崇徳、谷憲三朗、森尾友宏、福田哲也、三浦修、宇都宮與、松岡雅雄、岡村純、神奈木真理. ATLL に対する新規ペプチドパルス樹状細胞療法に向けた基礎解析と第 I 相臨床試験コールドラン. 第 70 回日本癌学会総会、名古屋市、2011 年 10 月 3-5 日
5. Eto T, Choi I, Tanosaki R, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Takemoto S, Taguchi J, Fukushima T, Kato K, Teshima T, Suehiro Y,

Yamanaka T, Okamura J, Uike N.A prospective feasibility trial of unrelated bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning regimen for elderly patients with adultT-cell leukemia/lymphoma (ATL), #40574, 53th ASH Annual Meetings, San Diego, December 10-13, 2011

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

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
Oka T, Sato H, Ouchida M, <u>Utsunomiya A</u> , Ennishi D, Tanimoto M, Yoshino T.	Accumulation of specific epigenetic abnormalities during development and progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. T-Cell Leukemia	Babusikova O, Dovat S and Payne KJ.	INTECH			2011	131-168
<u>宇都宮 與</u> 、 <u>窪田 歩</u>	§6. 悪性リンパ腫およびリンパ系腫瘍 9. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫	木崎昌弘	白血病・リンパ腫・骨髄腫 今日の診断と治療 第4版	中外医学社	東京	2011	436-444
<u>宇都宮 與</u>	第IX章 白血球系疾患：腫瘍性疾患 23.	日本血液学会	成人 T 細胞白血病/リンパ腫 血液専門医テキスト	南江堂	東京	2011	302-312

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
Nakahata S, Saito Y, Marutsuka K, Hidaka T, Maeda K, Hatakeyama K, Shiraga T, Goto A, Takamatsu N, Asada Y, <u>Utsunomiya A</u> , Okayama A, Kubuki Y, Shimoda K, Ukai Y, Kurosawa G, Morishita K.	Clinical significance of CADM1/TSLC1/IgSF4 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma.	Leukemia		Epub ahead of print	2012
Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, <u>Utsunomiya A</u> , Yamaguchi K, <u>Uchimaru K</u> , Ogawa S, Watanabe T.	Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-κB pathway in adult T-cell leukemia and other cancers.	Cancer Cell	21	121-135	2012
<u>Ishida T</u> , Joh T, <u>Uike N</u> , Yamamoto K, <u>Utsunomiya A</u> , Yoshida S, Saburi Y, Miyamoto T, Takemoto S, Suzushima H, Tsukasaki K, Nosaka K, Fuzjiwara H, Ishitsuka K, Inagaki H, Ogura M, Akinaga S, Tomonaga M, Tobinai K, Ueda R	Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody (KW-0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter Phase II study.	J Clin Oncol	30(8)	837-42	2012

発 表 者 氏 名	論 文 タ イ ト ル 名	発 表 誌 名	巻 号	ペ ー ジ	出 版 年
Nishikawa H, Maeda Y, <u>Ishida T</u> , <u>Gnjatic S</u> , Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, <u>Utsunomiya A</u> , Inagaki H, Old LJ, Ueda R, Sakaguchi S	Cancer/testis antigens are novel targets of immunotherapy for adult T-cell leukemia/lymphoma.	Blood	119(13)	3097-3104	2012
Sugata K, Satou Y, <u>Yasunaga JI</u> , Hara H, Ohshima K, <u>Utsunomiya A</u> , Mitsuyama M, Matsuoka M.	HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines.	Blood	119	434-444	2012
Kanda J, Hishizawa M, <u>Utsunomiya A</u> , <u>Taniguchi S</u> , Eto T, Moriuchi Y, <u>Tanosaki R</u> , Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, <u>Okamura J</u> , Ichinohe T, Uchiyama T.	Impact of graft-versus-host disease on outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia: a retrospective cohort study.	Blood	119(9)	2141-8	2012
<u>Choi I</u> , <u>Tanosaki R</u> , <u>Uike N</u> , <u>Utsunomiya A</u> , Tomonaga M, Harada M, <u>Yamanaka T</u> , <u>Kannagi M</u> and <u>Okamura J</u> .	Long-term outcomes after hematopoietic SCT for adult T-cell leukemia/lymphoma: results of prospective trials.	Bone Marrow Transplant	46	116-8	2011
<u>Kannagi M</u> , Hasegawa A, Kinpara S, Shimizu Y, Takamori A and <u>Utsunomiya A</u> .	Double control of viral expression by innate and acquired immunity in Human T-cell leukemia virus type-I infection.	Cancer Sci	102	670-6	2011
Takamori A, Hasegawa A, <u>Utsunomiya A</u> , Maeda Y, Yamano Y, Shimizu Y, Tamai Y, Sasada A, Zeng N, <u>Choi I</u> , <u>Uike N</u> , <u>Okamura J</u> , Watanabe T, Masuda T, and <u>Kannagi M</u> .	Functional impairment of Tax-specific but not CMV-specific CD8+ T-cells in a minor population of asymptomatic HTLV-I-carriers.	Retrovirology	8	100	2011
Umino A, Nakagawa M, <u>Utsunomiya A</u> , Tsukasaki K, Taira N, Katayama N, <u>Seto M</u> .	Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node	Blood	117(20)	5473-8	2011
Araya N, Sato T, Yagishita N, Ando H, <u>Utsunomiya A</u> , Jacobson S, Yamano Y.	Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease.	Viruses	3	1532-48	2011

発 表 者 氏 名	論 文 タ イ ト ル 名	発 表 誌 名	巻 号	ペ ー ジ	出 版 年
Uota S, Dewan MZ, Saitoh Y, Muto S, Itai A, <u>Utsunomiya A</u> , Watanabe T, Yamamoto N, Yamaoka S.	An IκB kinase 2 inhibitor IMD-0354 suppresses the survival of adult T-cell leukemia cells.	Cancer Sci	103(1)	100-6	2011
Uchida N, Wake A, Nakano N, Ishiwata K, Takagi S, Tsuji M, Yamamoto H, Kato D, Matsuno N, Masuoka K, Araoka H, Asano-Mori Y, Izutsu K, Makino S, Yoneyama A, <u>Taniguchi S</u> .	Mycophenolate and tacrolimus for graft-versus-host disease prophylaxis for elderly after cord blood transplantation: a matched pair comparison with tacrolimus alone.	Transplantation	92	366-371	2011
<u>Fukushima T</u> , Taguchi J, Moriuchi Y, Yoshida S, Itonaga H, Ando K, Sawayama Y, Imaizumi Y, Imanishi D, Hata T, Miyazaki Y.	Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for ATL with central nervous system involvement: The Nagasaki Transplant Group experience.	Int J Hematol	94	390-4	2011
Hagiya K, <u>Yasunaga J</u> , Satou Y, Oshima K, Matsuoka M.	ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells.	Retrovirology	8	19	2011
<u>Yasunaga J</u> , Lin FC, Lu X, Jeang KT.	Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF-κB signaling.	J Virol	85	6212-9	2011
<u>Yasunaga J</u> and Matsuoka M.	Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis.	Int. J. Hematol	94	435-442	2011
<u>Ishida T</u> , Ueda R.	Immunopathogenesis of lymphoma: focus on CCR4.	Cancer Sci	102(1)	44-50	2011
<u>Ishida T</u> , Ueda R.	Antibody therapy for Adult T-cell leukemia-lymphoma.	Int J Hematol	94(5)	443-52	2011
Tian Y, Kobayashi S, Ohno N, Isobe M, Tsuda M, Tani K, Zaike Y, Watanabe N, Tojo A and <u>Uchimaru K</u> .	Leukemic T cells are specifically enriched in a unique CD3 ^{dim} CD7 ^{low} subpopulation of CD4 ⁺ T cells in acute-type adult T cell leukemia.	Cancer Sci	102(3)	569-77	2011
<u>Uchimaru K</u>	Current problems on the management of HTLV-1 asymptomatic carriers and ATL patients.	Rinsho Ketsueki	53(10)	1432-8	2011

発 表 者 氏 名	論 文 タ イ ト ル 名	発 表 誌 名	巻 号	ペ ー ジ	出 版 年
神奈木真理.	ATL に対する免疫療法の展望	血液フロンティア	22	251-257	2012
岩下生久子、井野彰浩、 鵜池直邦、内田耕栄、 西牟田雄祐、上原智	HTLV-1 感染者の上部消化管病変	胃と腸 (医学書院)	46	264-74	2011
崔日承、鵜池直邦	成人T細胞白血病リンパ腫に対する ミニ移植の有効性は持続するか？	血液内科	63	46-50	2011
宇都宮與、石田高司、 鵜池直邦、瀬戸加大	Round Table Discussion 成人 T 細胞 白血病研究の進歩と今後の展望	Trends in Hematological Malignancies (メディカルビュー ー社)	3(2)	64-71	2011

Review Article

Double control systems for human T-cell leukemia virus type 1 by innate and acquired immunity

Mari Kannagi,^{1,3} Atsuhiko Hasegawa,¹ Shuichi Kinpara,¹ Yukiko Shimizu,¹ Ayako Takamori¹ and Atae Utsunomiya²¹Department of Immunotherapeutics, Tokyo Medical and Dental University, Graduate School, Tokyo; ²Department of Hematology, Imamura Bun-in Hospital, Kagoshima, Japan

(Received November 30, 2010/Revised December 22, 2010/Accepted December 27, 2010/Accepted manuscript online January 10, 2011/Article first published online February 28, 2011)

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is the causative retrovirus of adult T-cell leukemia (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HTLV-1-specific T-cell responses elicit antitumor and antiviral effects in experimental models, and are considered to be one of the most important determinants of the disease manifestation, since they are activated in HAM/TSP but not in ATL patients. The combination of low T-cell responses and elevated HTLV-1 proviral loads are features of ATL, and are also observed in a subpopulation of HTLV-1 carriers at the asymptomatic stage, suggesting that these features may be underlying risk factors. These risks may potentially be reduced by vaccination to activate HTLV-1-specific T-cell responses. HAM/TSP and ATL patients also differ in their levels of HTLV-1 mRNA expression, which are generally low *in vivo* but slightly higher in HAM/TSP patients. Our recent study indicated that viral expression in HTLV-1-infected T-cells is suppressed by stromal cells in culture through type-I IFNs. The suppression was reversible after isolation from the stromal cells, mimicking a long-standing puzzling phenomenon in HTLV-1 infection where the viral expression is very low *in vivo* and rapidly induced *in vitro*. Collectively, HTLV-1 is controlled by both acquired and innate immunity *in vivo*: HTLV-1-specific T-cells survey infected cells, and IFNs suppress viral expression. Both effects would contribute to a reduction in viral pathogenesis, although they may potentially influence or conflict with one another. The presence of double control systems for HTLV-1 infection provides a new concept for understanding the pathogenesis of HTLV-1-mediated malignant and inflammatory diseases. (*Cancer Sci* 2011; 102: 670–676)

It has been three decades since the discovery of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) as the causative retrovirus of adult T-cell leukemia (ATL).^(1,2) ATL develops during middle age or later mainly in a small portion of vertically HTLV-1-infected populations.^(3,4) HTLV-1 also causes HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in another small population of infected individuals.^(5,6) Some other inflammatory diseases such as uveitis and arthritis are also associated with HTLV-1 infection.^(7,8) New therapeutic approaches such as hematopoietic stem cell transplantation (HSCT),^(9,10) an antibody therapy targeting CCR4,⁽¹¹⁾ and antiviral therapy with interferon-alpha and zidovudine⁽¹²⁾ partly improved the prognosis of ATL. However, ATL still shows high mortality, and HAM/TSP remains to be an intractable disease.

Enormous amounts of research findings have been accumulated regarding the virus-mediated pathogenesis. HTLV-1 Tax, a virus-encoded regulatory gene product, mediates cell activation, proliferation and resistance to apoptosis by transactivation through NF- κ B, cAMP response element binding protein (CREB) and serum response factor (SRF), and by inactivation

of tumor suppressors,^(13–15) which would be involved in leukemogenesis and inflammation in HTLV-1 infection. Another minus-strand HTLV-1-encoded gene product, HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ), is continuously expressed in infected cells *in vivo* regardless of the disease and may also be involved in the growth ability of infected cells.⁽¹⁶⁾

However, many unsolved questions still remain regarding the pathogenesis of HTLV-1 infection, for example, how the same virus causes totally different diseases such as ATL and HAM/TSP, why only small portions of HTLV-1-infected populations develop diseases, and why it takes more than 40 years to develop ATL. The answers to these questions would provide hints for predicting disease risks as well as aiding the development of prophylactic and therapeutic strategies.

HTLV-1-specific T-cell responses that contribute to antiviral and antitumor surveillance could be one of the most important determinants of the diseases. In fact, HTLV-1-specific T-cells are activated in HAM/TSP but not in ATL.^(17–19) Oral HTLV-1 infection induces T-cell tolerance to HTLV-1 and increased proviral loads,^(20,21) consistent with the epidemiological finding that vertical HTLV-1 infection is one of the risk factors for ATL.⁽³⁾ Therefore, the individual status of HTLV-1-specific T-cell responses is expected to be an indicator of risk for ATL.⁽²²⁾ Although the pathological significance of HTLV-1-specific T-cells in HAM/TSP remains controversial,^(23,24) advantages for HLA-A02-positive individuals in protection against HAM/TSP have been reported, and interpreted through the association of this HLA with strong CTL responses to a major epitope of HTLV-1 Tax.⁽²⁵⁾

Elevation of proviral loads is also a risk factor for ATL. Given the fact that HTLV-1-specific CTLs have antiviral effects, these CTLs are likely to be one of the determinants of proviral loads.⁽²⁶⁾ However, proviral loads are also increased in HAM/TSP patients, and the correlations between proviral loads and HTLV-1-specific T-cell responses vary among studies,^(27,28) suggesting the presence of additional factors for determining individual proviral loads.

Another curious finding in HTLV-1 infection is the scarcity of viral antigen expression in the peripheral blood, although the viral mRNA is barely expressed.⁽²⁹⁾ The transcription of HTLV-1 is mainly regulated by CRE-like repeats in the HTLV-1 LTR.⁽³⁰⁾ Involvement of inducible cAMP early repressor (ICER) and transducers of regulated CREB 2 (TORC2) in the inhibition of HTLV-1 transactivation has been suggested.^(31,32) However, the mechanism involved in suppressing viral expression only *in vivo* has remained obscure. It is a paradox that HTLV-1 Tax contributes to the pathogenesis while Tax protein is undetectable *in vivo*. Expression of HBZ in the absence of Tax may partly

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: kann.impt@tmd.ac.jp

explain the growth advantage of infected cells,⁽³³⁾ but not all of HTLV-1-mediated leukemogenesis. In addition, it does not make sense that Tax-specific T-cell responses are maintained if Tax is not expressed *in vivo*. The paradox will remain until the state of viral expression and the mechanisms for suppressing HTLV-1 expression *in vivo* are clarified.

We recently found that innate immune responses, especially type-I interferons (IFNs), suppress HTLV-1 expression.⁽³⁴⁾ This integrates the issue of viral expression and the host defense system against HTLV-1, which includes innate immunity as well as acquired immunity. The presence of double control systems explains some of the paradox in persistent HTLV-1 infection, and adds new aspects to the pathogenesis of HTLV-1-mediated diseases.

Control of HTLV-1 by HTLV-1-specific T-cell responses

Antitumor surveillance by HTLV-1-specific T-cells. CD8⁺ HTLV-1-specific CTL responses are found in many HAM/TSP patients and asymptomatic carriers (AC), but rarely in ATL patients.^(17–19,35,36) These CTLs kill HTLV-1-infected cells *in vitro*, and mainly recognize HTLV-1 Tax.^(18,37) The HTLV-1 envelope is also a popular target, especially for CD4⁺ CTLs.⁽³⁸⁾ Other viral antigens, including polymerase,⁽³⁹⁾ ROF (p12) and TOF (p30/p13),⁽⁴⁰⁾ and HBZ,⁽⁴¹⁾ have also been shown to be targets of CTLs. Elimination of CD8⁺ cells among PBMCs from HAM/TSP patients induces HTLV-1 expression during subsequent cell culture,⁽⁴²⁾ clearly indicating that CD8⁺ HTLV-1-specific CTLs contribute to the control of HTLV-1-infected cells.

A series of animal model experiments indicated that HTLV-1-specific T-cell responses limit the expansion of HTLV-1-infected cells *in vivo*. Oral HTLV-1 infection induced insufficiency of HTLV-1-specific T-cell responses in rats, and the HTLV-1 proviral loads were inversely correlated with HTLV-1-specific T-cell responses.⁽²¹⁾ Re-immunization of these rats with mitomycin C-treated HTLV-1-infected cells restored HTLV-1-specific T-cell responses and reduced the proviral loads⁽⁴³⁾ (Fig. 1). In another rat model of HTLV-1-induced tumors, the otherwise fatal HTLV-1-infected lymphomas in T-cell-deficient rats were eradicated by transfer of T-cells from syngeneic rats that had been vaccinated with a Tax-encoding DNA or peptides corresponding to a major epitope for Tax-specific CTLs.^(44,45)

Recent clinical reports have indicated that HTLV-1-carrying recipients after liver transplantation developed ATL under the administration of immunosuppressants.^(46,47) In contrast, Tax-specific CTL responses were strongly activated in some ATL patients who obtained complete remission after HSCT, but were not observed in the same patients before transplantation.⁽⁴⁸⁾ These findings suggest that HTLV-1-specific T-cells, including Tax-specific CTLs, play important roles in antitumor surveillance against HTLV-1 leukemogenesis.

Insufficient HTLV-1-specific T-cell responses as a potential risk for ATL. Most HTLV-1-infected individuals are asymptomatic, and only about 5% develop ATL and <1% develop HAM/TSP.^(3,49) The epidemiological risk factors for ATL include vertical transmission and increases in the number of abnormal lymphocytes or HTLV-1 proviral loads.^(3,50,51) HTLV-1 proviral loads are also elevated in HAM/TSP patients.⁽⁵²⁾

Immunological studies have suggested that insufficiency in host T-cell responses against HTLV-1 might be another risk factor for ATL.⁽²²⁾ A small-scale survey measuring Tax protein-specific IFN- γ production revealed a wide variety in the strengths of HTLV-1-specific T-cell responses among HTLV-1 carriers.⁽⁵³⁾ The combinations of HTLV-1-specific T-cell responses and proviral loads categorize HTLV-1 carriers into the following four groups: (i) low proviral loads with HTLV-1-specific T-cell responses; (ii) elevated proviral loads with

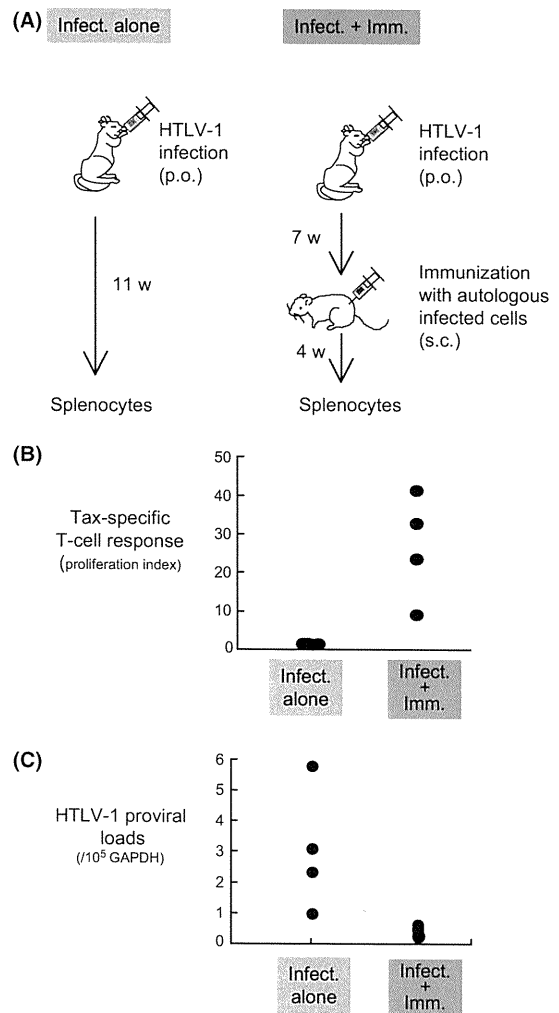


Fig. 1. Recovery of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-specific T-cell responses and reduction of proviral loads by re-immunization. Eight rats orally infected with HTLV-1 were divided into two groups. (A) One group was left untreated (Infect. alone) and the other was subcutaneously immunized with mitomycin C-treated HTLV-1-infected syngeneic rat T-cells (Infect. + Imm.) at 4 weeks. Splenocytes were harvested at 7 weeks after infection. (B,C) T-cells from the re-immunized rats (Infect. + Imm.) show elevated levels of Tax-specific T-cell proliferative responses (B) and lower proviral loads (C), compared with untreated rats (Infect. alone).⁽⁴³⁾

HTLV-1-specific T-cell responses; (iii) low proviral loads with low T-cell responses; and (iv) elevated proviral loads with low T-cell responses (Fig. 2).

Regarding these groups, ATL patients exhibit elevated proviral loads with low T-cell responses, while many, but not all, HAM/TSP patients show elevated proviral loads with high HTLV-1-specific T-cell responses. ACs are found in all four categories. It is noteworthy that small subgroups of ACs and smoldering ATL patients share a common feature with ATL patients. This indicates that the insufficiency of HTLV-1-specific T-cell responses is not merely the result of malignancy but is an underlying problem before the stage without apparent lymphoproliferation. Further follow-up studies are required to clarify whether the extent of the combination of elevated proviral loads with low T-cell responses could be a diagnostic indicator for risk of ATL.

Dissociation between proviral loads and T-cell responses. Although HTLV-1-specific T-cells have the potential to control infected cells, there are no clear correlations between

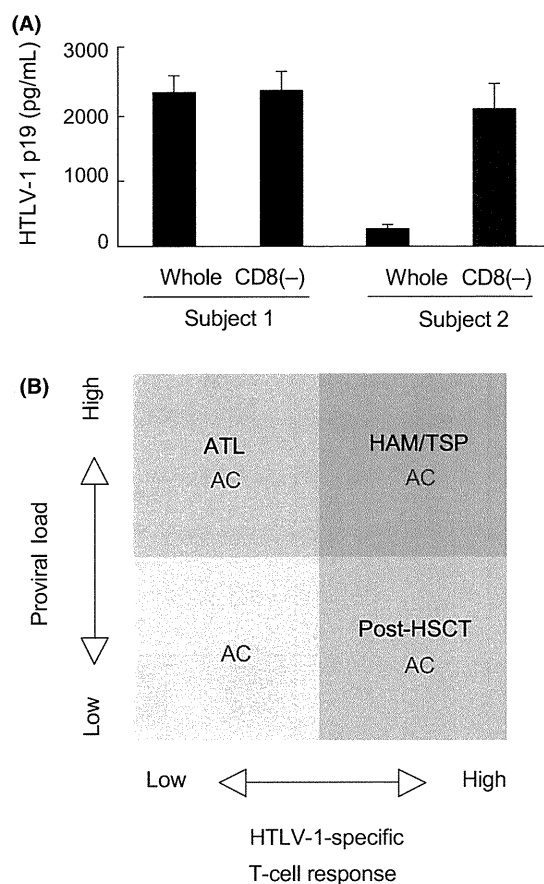


Fig. 2. Diversities in Tax-specific T-cell responses and dissociation with proviral loads in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected individuals. (A) Diversity in CD8⁺ T-cell functions in two representative HTLV-1-infected individuals at the asymptomatic stage. Abundant amounts of HTLV-1 p19 were produced in PBMC cultures with or without CD8⁺ T-cells in subject 1, but only after CD8⁺ T-cell depletion in subject 2.⁽⁵³⁾ (B) A general image for the categories of HTLV-1-infected individuals at various stages according to the combinations of HTLV-1-specific T-cell responses (x-axis) and proviral loads (y-axis) is shown schematically. AC, asymptomatic carriers; ATL, adult T-cell leukemia; HAM/TSP, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

proviral loads and HTLV-1-specific T-cell responses among HTLV-1-infected individuals. This is not surprising because both the proviral loads and T-cell responses are high in HAM/TSP patients. The proviral loads may be negatively correlated with T-cell responses only within an individual but not among individuals. Several other reports have indicated various findings concerning this issue. For example, a study measuring IFN- γ -producing CD8⁺ HTLV-1-specific CTLs indicated a positive correlation with proviral loads in HAM/TSP patients but not in ACs,⁽²⁸⁾ while a study evaluating CD8⁺ CTL function by *ex vivo* clearance of infected cells showed negative correlations with low proviral loads within an AC or a HAM/TSP group,⁽⁴²⁾ and another study indicated an association of higher frequency of tetramer-binding Tax-specific CTLs with low proviral loads in ACs.⁽²⁷⁾ Such inconsistent results suggest the presence of certain other determinants of proviral loads in addition to HTLV-1-specific CTLs.

The HTLV-1 proviral loads reflect the number of infected cells in the peripheral blood. Expansion of HTLV-1-infected cells *in vivo* occurs through both *de novo* infection and proliferation of infected cells.⁽⁵⁴⁾ The number of CD4⁺ FoxP3⁺ cells,⁽⁵⁵⁾ the frequency of iNKT cells,⁽⁵⁶⁾ or MHC-I favorable for

HBZ-specific T-cell responses⁽⁴¹⁾ have been suggested to influence HTLV-1 proviral loads.

In HTLV-1-infected rats, however, the proviral loads are inversely correlated with HTLV-1-specific T-cell responses.⁽²¹⁾ One reason for the discrepancy between humans and rats may be the genetic heterogeneity in humans. It appears that, under the homogeneous genetic background in the experimental rat system, the influence of insufficient HTLV-1-specific T-cell responses may appear more clearly than in humans, allowing *de novo* infection and proliferation of HTLV-1-infected cells *in vivo*. The dissociation of proviral loads and HTLV-1-specific T-cell responses in humans suggests that additional determinants of proviral loads may vary genetically among individuals. As described in the next section, we suppose that innate immunity could be a candidate for this effect.

Control of HTLV-1 by innate immunity

Status of HTLV-1 expression *in vivo*. Since HTLV-1-specific antibodies and T-cells are maintained in HTLV-1-infected individuals, viral expression must occur somewhere *in vivo*. This notion is further supported by the emergence of Tax-specific CTL responses in HTLV-1-uninfected donor-derived hematopoietic systems reconstituted in recipient ATL patients after HSCT.^(48,57) However, HTLV-1 mRNA but not viral proteins are detectable in PBMCs freshly isolated from HTLV-1-infected individuals. The levels of HTLV-1 mRNA are higher in HAM/TSP patients than in ACs,⁽⁵⁸⁾ but viral proteins are still undetectable. Only a few reports have indicated HTLV-1 protein expression *in situ*.⁽⁵⁹⁾

HTLV-1 expression in ATL cells immediately after isolation from the peripheral blood is very low, and becomes significantly induced after culture for some hours *in vitro*.^(60,61) This phenomenon is observed in about one half of ATL patients regardless of the disease severity.⁽⁶²⁾ Viral induction after *in vitro* culture does not occur in the other one half of ATL patients, probably because of genetic and epigenetic changes in the viral genome.^(63–65) Rapid induction of viral expression after *in vitro* culture has also been observed in PBMCs from HAM/TSP patients and ACs,⁽⁶⁶⁾ indicating that there must be a common mechanism for transiently suppressing HTLV-1 expression *in vivo* regardless of the diseases.

Suppression of HTLV-1 expression by type-I IFN responses. Recently, we found that type-I IFN responses are involved in the suppression of HTLV-1 expression.⁽³⁴⁾ When HTLV-1-infected T-cell line cells were co-cultured with stromal cells such as epithelial cells and fibroblasts, HTLV-1 mRNA and proteins were markedly decreased in HTLV-1-infected cells. Similarly, induction of HTLV-1 expression in cultures of primary ATL cells was also suppressed by co-culture with stromal cells. Type-I IFNs were involved in the stromal cell-mediated suppression of HTLV-1 expression, because it was partly neutralized by anti-IFN- α/β receptor antibodies. Since efficient HTLV-1 expression is dependent on transactivation of its own LTR by Tax protein,^(30,67) limitation of this protein below a certain level will lead to the maintenance of HTLV-1 expression at low levels. Stromal cells reduced viral expression via type-I IFNs, but did not reduce cell growth and even supported it by unknown mechanisms.^(34,68)

It has been reported that plasmacytoid dendritic cells (pDCs), a major producer of type-I IFNs, are susceptible to HTLV-1 infection.^(69,70) In ATL patients, pDCs are decreased in number and also lack the ability to produce IFN- α .⁽⁶⁹⁾ A recent report indicated that pDCs generate type-I IFNs mainly through TLR7 recognition of HTLV-1 RNA.⁽⁷¹⁾ The precise mechanisms of the HTLV-1-mediated IFN responses remain to be clarified.

In addition to recombinant IFN- α and IFN- β , recombinant IFN- γ was also capable of reducing HTLV-1 expression to

lesser extents in HTLV-1-infected cell lines.^(34,72) Participation of type-II IFN-producing cells other than stromal cells in HTLV-1 suppression *in vivo* is also conceivable.

Potential involvement of type-I IFNs in HTLV-1 suppression *in vivo*. In *in vitro* experiments, co-cultured stromal cells suppressed viral expression in HTLV-1-infected cells. Interestingly, when infected cells were re-isolated from the co-cultures, viral expression was restored to the original level over the following 48 h (Fig. 3).⁽³⁴⁾ This observation shows a striking similarity to the rapid induction of HTLV-1 expression in freshly isolated ATL cells after culture *in vitro*.

Involvement of type-I IFN responses in the suppression of HTLV-1 expression *in vivo* was confirmed using interferon regulatory factor-7-KO mice, which are deficient in most type-I IFN responses. Viral expression in HTLV-1-infected cells was significantly suppressed when the infected cells were intraperitoneally injected into WT mice but not into interferon regulatory factor-7-KO mice.⁽³⁴⁾

It is speculated that the levels of viral expression in HTLV-1-infected lymphocytes may differ among various tissues depending upon the strength of IFN responses. Thus far, there is little information regarding HTLV-1 expression in various tissues. In transgenic mice with an HTLV-1 LTR-driven construct of the pX gene, expression of the transgene was only observed in lim-

ited organs including the central nervous system, eyes, salivary glands and joints.⁽⁷³⁾ It is intriguing that all of these tissues are involved in human inflammatory diseases related to HTLV-1 infection. Such coincidences suggest the involvement of HTLV-1 gene expression in the pathogenesis of these inflammatory diseases.

Double control of HTLV-1 by innate and acquire immunity

Relationship between acquired and innate immune control in HTLV-1 infection. At the primary infection, type-I IFNs generally play a critical role in limiting viral replication, and have positive effects on antigen presentation by activating DCs, inducing type-II IFN, and upregulating MHC-I, which subsequently augments T-cell responses.⁽⁷⁴⁾ However, the role of type-I IFNs in the chronic phase of viral infection may not always be positive. In HIV-1 infection, type-I IFNs may be a progressive factor for the disease by accelerating T-cell exhaustion.⁽⁷⁵⁾

Suppression of HTLV-1 expression by type-I IFNs may reduce the efficacy of T-cell-mediated surveillance against HTLV-1-infected cells, because T-cells require viral proteins for recognition. On the contrary, if the IFN-mediated suppressive system is insufficient, HTLV-1-specific T-cell responses will be activated in response to viral antigens.

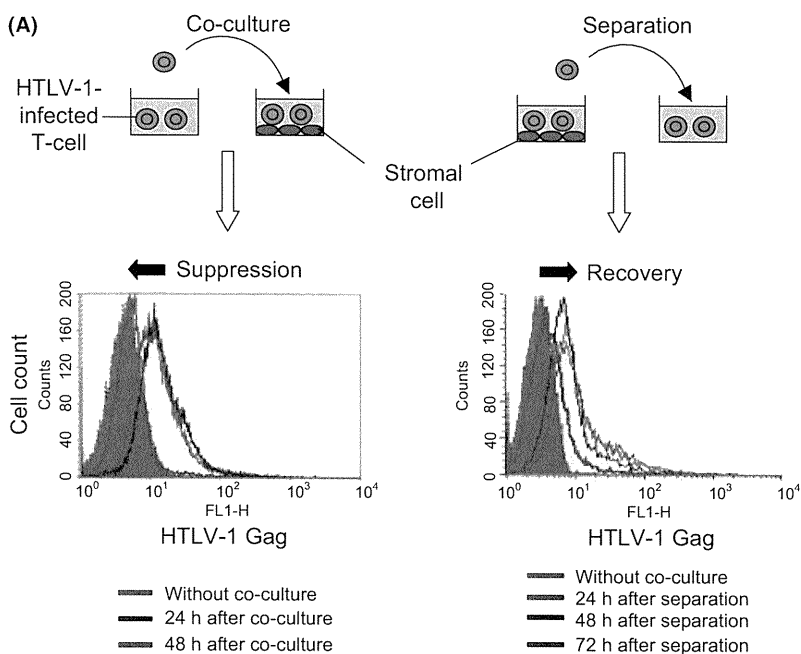


Fig. 3. Reversible suppression of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) expression by innate immunity. (A) When IL-2-dependent HTLV-1-infected cells are co-cultured with 293T cells, intracellular HTLV-1 Gag proteins in the infected cells are decreased within 48 h (left panel). When the infected cells are re-isolated and further cultured on their own, Gag expression is recovered within 48 h (right panel).⁽³⁴⁾ (B) Scheme of the presumed status of HTLV-1-infected cells *in vivo*. Viral expression (indicated as pink) would be suppressed in tissues with strong IFN responses (left) and increased in tissues with weak IFN responses (right). CTL function, if any, is only effective upon viral expression, resulting in an infected cell reservoir without viral expression (left) and a T-cell surveillance system with low efficiency (right).

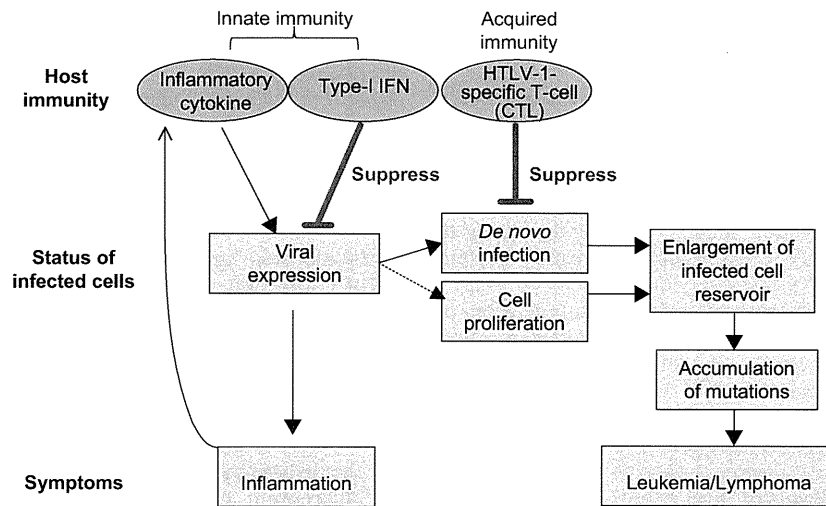


Fig. 4. Hypothetical relationships among the host immunity, status of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected cells and symptoms. HTLV-1-infected cells are controlled by at least two systems: type-I IFNs (innate immunity) and HTLV-1-specific T-cells (acquired immunity). The former suppress viral expression and the latter kill infected cells. An increase in viral expression would accelerate inflammation, increase the number of infected cells through *de novo* infection and activate HTLV-1-specific T-cells that determine an equilibrium level of proviral load within an individual. Viral expression may be a positive, but not absolute, factor for cell proliferation. When the viral expression is well controlled, the viral pathogenesis will proceed slowly, and may not be apparent until infected cell clones with a malignant phenotype finally emerge from the enlarged infected cell reservoir. Without proper T-cell responses, the emergence of such clones may occur earlier, because they would have more chance to survive.

The relationship between innate and acquired immunity may also differ among tissues. In tissues with strong IFN responses, viral expression in the infected cells would be suppressed and CTLs would ignore these cells. However, in tissues with weak IFN responses, infected cells would express viral antigens to be recognized by CTLs (Fig. 3). These presumptions can explain the status of HTLV-1-infected cells *in vivo*, which comprises a large reservoir of infected cells without viral expression and a low-efficiency surveillance system by CTLs that can only work on limited occasions.

Potential relationship between disease manifestation and innate and acquired host immunity in HTLV-1 infection. Although suppression of HTLV-1 expression may partly interfere with the efficacy of T-cell immunity, it may contribute to a slowing down of the Tax-mediated pathogenesis, tumorigenesis and inflammation (Fig. 4). In a rat model, shRNA-mediated suppression of Tax in HTLV-1-transformed cells rendered these cells resistant to Tax-specific CTLs but also reduced their ability for tumorigenesis *in vivo*.⁽⁷⁶⁾ Continuous suppression of HTLV-1 expression in humans may have a similar decelerating effect against Tax-mediated tumorigenesis. This might be a reason why it takes so long for ATL to develop. So long as the viral expression is well controlled, the viral pathogenesis may not be apparent until malignant cell clones finally come through the process of clonal evolution in the infected cell reservoir. Without proper T-cell responses, the emergence of such clones may occur earlier, because they would have more chance to survive.

HAM/TSP patients show elevated levels of viral expression for an unknown reason. Increased levels of inflammatory cytokines could be either a cause or a result of this phenomenon. The involvement of HTLV-1 proviral integration sites in transcription units in elevated viral expression has also been suggested.⁽⁷⁷⁾ An experimental rat model of HAM/TSP using a certain WKAH strain exhibits increased Tax mRNA expression in the spinal cord without T-cell infiltration,⁽⁷⁸⁾ suggesting that viral expression is a primary event while T-cell responses are not. Further studies revealed that this particular rat strain contains mutations

in the promoter region of the IL-12 receptor, which potentially lead to reduced IFN- γ production in the spinal cord.⁽⁷²⁾ The associations of genetic factors related to the IFN system with HAM/TSP patients have remained obscure. Very recently, a gene expression profiling study indicated that expression of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) is upregulated in HAM/TSP patients and ACs, and is positively correlated with high HTLV-1 mRNA loads.⁽⁷⁹⁾

Conclusions

HTLV-1 is controlled by both acquired and innate immunity. HTLV-1-specific T-cells contribute to antitumor surveillance, and type-I IFNs contribute to silencing viral expression. The presence of the double control systems with partial conflicts would explain some of the puzzles in HTLV-1 infection, such as the transient suppression of viral expression *in vivo*, apparently reciprocal occurrence of ATL and HAM/TSP, inconsistent correlations of proviral loads with T-cell responses, and a long incubation period.

Insufficient T-cell responses are regarded as a risk factor for ATL, and vaccines that augment HTLV-1-specific T-cell responses would be beneficial in reducing the risk in a subpopulation of HTLV-1 carriers exhibiting insufficient T-cell responses and elevated proviral loads.

Innate immune responses in HTLV-1 infection should be further investigated, because they could be another important determinant of disease manifestation and represent therapeutic targets in HTLV-1-related diseases.

Acknowledgments

We thank Dr Jun Okamura (National Kyushu Cancer Center) for his invaluable advices and enormous efforts to co-ordinate basic and clinical investigators on HTLV-1 research in Japan. The authors have no conflicting financial interests. This work was supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.