

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法におけるプロウイルス解析

研究分担者：安永純一郎 京都大学ウイルス研究所 講師

研究要旨

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) は感染後、約 5% のキャリアに成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) を引き起こす。ATL は予後不良な血液悪性腫瘍であり、治療法の開発が望まれている。白血病細胞ゲノムに組み込まれた HTLV-1 プロウイルスは ATL 細胞に残る唯一の感染の証拠であり、HTLV-1 プロウイルスの解析から、残存 ATL 細胞の検出やウイルス発がん機構の理解に重要な情報を得る事が可能である。

造血幹細胞移植療法は ATL の治癒を期待できる治療法である。本研究では移植を受けた ATL 症例を対象として、腫瘍細胞における HTLV-1 プロウイルスの特性と移植の有効性に関して検討し、以下の結果を得た。1) 本研究班に登録された移植症例 (NST1 から 4) では、ATL 全症例と比較し、完全型プロウイルスの頻度が有意に高く、*tax* 変異は有意に少なかった。2) 現時点では NST-3 および NST-4 プロトコールでは完全型プロウイルスを有する症例では ATL の再発が少ない傾向にある。これらの所見から、プロウイルスの構造上 *Tax* を発現可能な症例は、悪性度が低く移植の適応となり易いのと同時に、移植の有効性も高いことが示唆される。一方 *Tax* を発現できない欠損プロウイルスや *tax* にナンセンス変異がある症例でも移植が有効であった症例が存在し、これらの症例では HBZ 等 *Tax* 以外の抗原が抗腫瘍免疫を誘導する可能性も考えられた。

A. 研究目的

ATL に対する造血幹細胞移植療法は、強力な化学療法をもってしても予後が悪い本疾患に対して、治癒を期待できる現時点で唯一の治療法である。HTLV-1 プロウイルスの解析は ATL 細胞の特定や治療効果判定に有用であるだけでなく、HTLV-1 感染者におけるウイルス動態の評価や発症リスクの検討にも有用であると考えられる。本研究では ATL 患者のプロウイルスタイピングを通して治療効果との関連を検証すると同時に、HTLV-1 感染ドナーの解析も行い、その安全性について検討する。

B. 研究方法

【対象】 研究班プロトコール、NST-3 および NST-4 に従い同種末梢血幹細胞移植が施行された症例の中で、HTLV-1 プロウイルス解析に必要な DNA を利用可能な症例 (NST-3 登録症例 9 例、NST-4 登録症例 12 例) を解析に用いた。また、統計学的解析には、NST-1 および NST-2 登録症例の結果も利用した。

【方法】 末梢血単核球あるいはリンパ節からゲノム DNA を抽出し、PCR 法にてプロウイルスの欠損の有無を解析した。さらに *tax* 遺伝子および *HBZ* 遺伝子の塩基配列を決定した。これら

の結果と現時点での治療成績 (転帰、生存期間) の関連性について検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

ATL 症例の過去の報告から、全症例の中で完全型プロウイルスを有するのは 54% に留まり、17% の症例では *Tax* の蛋白を発現できなくなる変異を有していることが知られている。この結果と比較して、本研究班に登録され、プロウイルス解析が可能であった移植症例 (NST1 から 4) では完全型プロウイルスの頻度が有意に高く (72.3%、 $p=0.046$)、*tax* の変異は有意に少なかった (2.1%、 $p=0.014$)。また、NST-3 および NST-4 プロトコールでは完全型プロウイルスを有する症例では ATL の再発が少ない傾向にあることが判明した。一方、*Tax* を発現しないと予想される Type2 欠損プロウイルスや *tax* にナンセンス変異がある症例でも移植が有効であった症例がそれぞれ 1 例ずつ存在することも明らかとなった。HBZ の遺伝子配列は全症例に変異を認めなかった。

D. 考察

ATL細胞ではTaxの発現が著明に抑制されていることが知られており、その機序として、ウイルス転写のプロモーターである5'LTRの欠損(欠損型プロウイルス)、*tax* 遺伝子の変異(ナンセンス変異、欠失等)、5'LTRのエピジェネティック機序によるサイレンシングが知られている(Taniguchi Y et al. *Retrovirology*, 2; 64, 2005)。Taxは宿主免疫、特に cytotoxic T lymphocyte (CTL) の主な標的であるため、ATL細胞にとってTaxの発現抑制は免疫からの回避に有利に作用すると考えられる。今回の解析結果から、完全型プロウイルスで*tax* 遺伝子にも変異がない症例が、本研究班での移植療法に多く登録されており、さらに、再発も少ない傾向にあることが判明した。これらの所見は、プロウイルスの構造上、Taxを発現可能な症例は、悪性度が低く移植の適応となり易いのと同時に、移植の有効性も高いことを示唆しており、Taxを標的とした抗腫瘍効果が疾患の悪性度と治療効果に重要な役割を果たすと考えられる。一方、Taxを発現できないType2欠損プロウイルスや*tax*にナンセンス変異がある症例でも移植が有効であった症例が存在する。こういった症例ではTax以外の抗原が抗腫瘍免疫を誘導していることが考えられ、HBZなどのウイルス抗原とマイナー抗原が標的となっていると考えられる。HBZは全てのATL細胞で発現する唯一のウイルス遺伝子であるため(Fan J et al. *J Virol*, 84; 7278, 2010)、HBZは免疫療法の理想的な標的となりうることを示唆された。

E. 結論

本研究班に登録された移植症例では、完全型プロウイルスの頻度が有意に高く、*tax* 変異も有意に少なかった。また、現時点ではNST-3およびNST-4プロトコールでは完全型プロウイルスを有する症例ではATLの再発が少ない傾向にある。これらの所見から、Taxを発現可能なプロウイルスが組込まれている症例は、悪性度が低く移植の適応となり易いのと同時に、移植の有効性も高いことが示唆された。Taxを標的とした抗腫瘍効果がATLの悪性度および治療効果に影響を与えると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ma G, Yasunaga J, Fan J, Yanagawa S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor

dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. *Oncogene*, 2012 Oct 8. doi: 10.1038/onc.2012.450. [Epub ahead of print].

2. Zane L, Yasunaga J, Mitagami Y, Yedavalli V, Tang SW, Chen CY, Ratner L, Lu X, Jeang KT. Wip1 and p53 contribute to HTLV-1 Tax-induced tumorigenesis. *Retrovirology*, 9; 114, 2012.

2. 学会発表

1. 安永純一郎、柳川伸一、松岡雅雄 : Dysregulation of the Wnt pathways by HTLV-1 bZIP factor is involved in leukemogenesis of adult T-cell leukemia : 第71回日本癌学会学術総会、ロイトン札幌(札幌)、2012年9月19-21日
2. Yasunaga J, Tanaka A –Nakanishi, Takai K, Matsuoka M : HTLV -1 bZIP factor downregulates proapoptotic genes through perturbation of FoxO3a function: 第74回日本血液学会学術集会、国立京都国際会館(京都)、2012年10月19-21日
3. Yasunaga J, Ma G, Fan J, Yanagawa S and Matsuoka M. Noncanonical Wnt5a is induced by HTLV-1 bZIP factor, and supports proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells :54th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition, Georgia World Congress Center, Atlanta, U.S.A, December 7-11, 2012.

G. 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） 総括研究報告書

臨床試験の計画と解析

研究分担者：山中 竹春 国立がん研究センター 東病院臨床開発センター
先端医療開発支援室長

研究要旨

ATL の臨床病態は多彩であり、同一病型内であってもさまざまな経過が観察される。本研究では、世界初の急性・リンパ腫型 ATL における予後因子モデル(ATL-PI)を開発することを目的とした。その結果、臨床病期、ECOG PS、年齢、血清アルブミン、sIL-2R の 5 つの因子から構成され、予後予測能を有する ATL-PI が開発された。

A. 研究目的

急性・リンパ腫型 ATL における予後因子モデル(ATL-PI)を開発する。

B. 研究方法

対象は 2000 年 1 月から 2009 年 12 月までの新たに診断された急性・リンパ腫型 ATL 患者。同種造血幹細胞移植は解析からは除外した。データセットを training sample と validation sample の 2 つにランダムに分け、training sample におけるモデル化には Fractional polynomial model を用いた。

C. 研究結果

1270 例の急性・リンパ腫型 ATL が集積され、データ不足などの 236 例を除外し、また同種造血幹細胞移植を行われた 227 例を対象外とした。残った 807 例をランダムに training sample 404 例と validation sample 403 例の 2 つにわけた。観察期間中央値は 41.3 か月、死亡は 641 例、生存期間中央値(MST)は 7.7 か月であった。年齢中央値は 67 歳(35-91 歳)、急性型 564 人(70%)、血清アルブミン中央値 3.6g/dL、血清 LDH 中央値 621 IU/L、可溶性 IL-2 レセプター(sIL-2R)中央値 22,800 U/mL、高カルシウム血症を呈した症例 279 人(35%)、Ann Arbor stage I/II の症例 77 人(10%)、ECOG PS 0/1 は 396 人(49%)であった。最も多くされていた化学療法は CHOP 療法または CHOP 類似のレジメンで 386 人(51.1%)、次は LSG15 で 249 人(33.0%)であった。training sample における解析では、stage III/IV、ECOG PS 2-4、年齢、血清アルブミン、 \log_{10} (sIL-2R)が抽出された。下記の式を作成した。

$$\text{ATL} = 0.65 \text{ (if stage = III/IV)} \\ + 0.35 \text{ (if PS > 1)}$$

$$+ 0.016 \times \text{Age}(\text{years}) \\ - 0.36 \times \text{Albumin}(\text{g/dL}) \\ + 0.37 \times \log_{10}(\text{sIL-2R})$$

カットポイント 1.6 と 2.6 にて 3 つに群別し、validation sample に当てはめると、low risk(ATL-PI < 1.6) : 72 人、intermediate risk (1.6 ≤ ATL-PI < 2.6) : 232 人、high risk (ATL-PI ≥ 2.6) : 99 人で、MST はそれぞれ 16.2、7.3、3.6 か月であった($p < 0.0001$; $\chi^2 = 89.7$, log-rank test)。

次に、連続変数である 3 つの因子を年齢 70 歳、血清アルブミン 3.5g/dL、sIL-2R 20,000 U/mL で 2 値化し、簡素化した ATL-PI を開発した。

$$\text{Simplified ATL} = 2 \text{ (if stage = III/IV)} \\ + 1 \text{ (if PS > 1)} \\ + 1 \text{ (if Age > 70 years)} \\ + 1 \text{ (Alb < 3.5)} \\ + 1 \text{ (sIL-2R > 20,000)}$$

を作成し、0-2 を low risk、3・4 を intermediate risk、5・6 を high risk とし 3 つに群別した。これを validation sample に当てはめると、MST は low risk 16.2 か月、intermediate 7.0 か月、high 4.6 か月であり($p < 0.0001$; $\chi^2 = 74.2$, log-rank test)、オリジナルの ATL-PI よりは若干劣るものの、十分実用的な予後因子が構築できた。

D. 考察

臨床病期、ECOG PS、年齢、血清アルブミン、sIL-2R の 5 つの因子のいずれもが臨床的に説明のつく因子と考えられ、妥当な予後因子と考えられる。同種造血幹細胞移植例に ATL-PI を当てはめたところ、3 群は十分に分離されなかった。

E. 結論

世界初の実用的な ATL 予後指数が構築された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Sasaki H, Hanada S, Eto T, Moriuchi Y, Saburi Y, Miyahara M, Sueoka E, Uike N, Yoshida S, Yamashita K, Tsukasaki K, Suzushima H, Ohno Y, Matsuoka H, Jo T, Suzumiya J, Tamura K. A Prognostic Index for Acute- and Lymphoma- Type Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. J Clin Oncol, 2012 vol. 30, 1635-1640

2. 学会発表

1. 山中竹春ほか. 急性型・リンパ腫型成人T細胞白血病/リンパ腫における予後指標. 第10回日本臨床腫瘍学会学術集会 (口演) 大阪 2012
2. Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Sasaki H, Hanada S, Eto T, Moriuchi Y, Saburi Y, Miyahara M, Sueoka E, Uike N, Yoshida S, Yamashita K, Tsukasaki K, Suzushima H, Ohno Y, Matsuoka H, Jo T, Suzumiya J, Tamura K. A Prognostic Index for Acute and Lymphoma Type Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. American Society of Hematology annual meeting, San Diego, CA, 2011
3. 勝屋弘雄、山中竹春、石塚賢治、宇都宮與、佐々木秀法、花田修一、衛藤徹也、森内幸美、佐分利能生、宮原正晴、末岡榮三朗、鵜池直邦、吉田真一郎、山下清、塚崎邦弘、鈴島仁、大野裕樹、松岡均、城達郎、鈴宮淳司、田村和夫. 急性・リンパ腫型 ATL の予後因子モデル. 日本内科学会総会 プレナリーセッション 京都 2012

G. 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

フローサイトメーターによる ATL 細胞と免疫細胞の同時解析

研究分担者：渡辺信和 東京大学医科学研究所 特任准教授

研究要旨

近年、成人 T 細胞白血病（ATL）の治療において、鵜池班を中心に細胞療法や抗体療法など新たな戦略が試みられている。治療に伴う効果の判定には、ATL 細胞の正確な同定が必須である。また、ATL に対するこれらの治療法においては、生着不全、急性 GVHD およびその類似病態、ATL の再発など、免疫反応と深く結びついた様々な病態が起こりうるので、免疫細胞の解析は重要である。平成 24 年度の前半、鵜池班の 3 移植施設から患者検体を受け入れ、ATL に対する臍帯血移植、樹状細胞（DC）療法、および抗 CCR4 抗体療法におけるキメリズム動態、ATL 細胞と制御性 T 細胞（Treg）、およびそれらの細胞における CCR4 発現レベルの解析を 12 カラーのフローサイトメーター（FCM）を使用して行った。その結果、移植後早期の ATL 細胞の検出に加え、Treg や CCR4 発現レベルの詳細な解析が可能であった。FCM による本解析システムは、新たな細胞療法や抗体療法における臨床検査と病態解明の手段として、極めて有用なツールとなる可能性がある。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、ATL 細胞、Treg、および CCR4 発現をモニタリングする方法論を確立し、本研究班における新しい治療戦略の開発を支援することである。

B. 研究方法

1. 患者検体の採取および搬送

鵜池班に所属する各医療機関において採取された患者検体は、宅急便で翌日正午までに医科研・病態解析領域研究室に送付した。医療機関の内訳は、九州がんセンター3例、今村病院2例、国立がんセンター1例であった。造血細胞移植後の患者では、移植後1、2、3、4、5週目、2ヶ月後に末梢血を採取した。また、抗CCR4抗体（Poteligeo）療法の患者では、治療開始前、および抗体療法開始後1、2、3、4、5週目、2ヶ月後に末梢血を採取した。DC療法の患者では、DC接種後2、4、6週目に採血した。

2. 末梢血細胞の調整、蛍光標識抗体による染色、およびフローサイトメーターによる解析

末梢血からファイコール比重遠心法により単核細胞を分離し、PBS(-)で洗浄した後染色した。

ATL に対する臍帯血移植療法の症例では、ドナーとレシピエントのミスマッチ HLA をアリル

特異的抗 HLA 抗体で染色可能な場合、キメリズム解析/HLA-Flow 法に ATL 細胞のフェノタイプ解析を組み合わせ、生着動態と残存 ATL 細胞の同時解析を試みた。染色に使用した蛍光標識抗体の組合せは以下のものである（抗 HLA 抗体の組合せは、症例により適当なものを選択した）：FITC-HLA-A24(Donor/Recipient)、Biotin-HLA-B5/SA-PE(Recipient)、PE-Cy5-CD235a、PerCP-Cy5.5-CD8、PE-Cy7-CD3、PE-TR-CD16、Alexa Fluor 647-TSLC-1、Alexa Fluor 700-CD56、APC-Cy7-CD19、V450-CD7、V500-CD4、Brilliant Violet 605-CD14（Stain 1：キメリズム解析）。

また、全症例において ATL 細胞、正常な Treg、およびそれらの細胞における CCR4 発現レベルを解析する目的で、以下のような蛍光標識抗体の組合せで細胞を染色した：FITC-CCR4、Biotin-TSLC-1/SA-PE、PE-Cy5-CD235a、PerCP-Cy5.5-CD14、PE-Cy7-CD25、PE-TR-CD16、Alexa Fluor 647-CD127、Alexa Fluor 700-CD56、APC-Cy7-CD3、V450-CD7、V500-CD4、Brilliant Violet 605-CD45RA（Stain 2：ATL/Treg/CCR4 解析）。

ATL に対する DC 療法では、患者のもつ特定の HLA（HLA-A*02:01、A*11:01、あるいは A*24:02）によって提示される Tax タンパク由来のペプチドをパルスした DC で患者を免疫す

る。それにより、患者体内の Tax 特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が活性化し、標的となる ATL 細胞を傷害することが期待されている。しかしながら、ATL 細胞における当該ペプチドが結合する HLA がダウンレギュレーションした場合、ATL が細胞が免疫反応からエスケープする可能性がある。我々は、DC 療法の前後で ATL 細胞が残存している場合、それらの ATL 細胞についてペプチドが結合する HLA と、汎 HLA クラス I 分子 (HLA-ABC) の発現レベルを FCM で解析した。蛍光標識抗体の組合せは、以下のものである: FITC-HLA-A24 (あるいは HLA-A2、あるいは HLA-A11)、Biotin-TSLC-1/SA-PE、PE-Cy5-CD235a、PerCP-Cy5.5-CD14、Alexa Fluor 647-HLA-ABC、APC-Cy7-CD3、V450-CD7、V500-CD4 (Stain 3: ATL/HLA 解析)。

アレル特異的抗 HLA 抗体は One Lambda 社 (Canoga Park, CA) から、その他の抗体は BioLegend 社 (San Diego, CA) から購入した。

染色した細胞は、FACS SORP Aria (Becton-Dickinson 社, San Jose, CA) で測定し、必要に応じて細胞分取 (ソーティング) を行った。測定直前の検体に PI (Sigma 社, St. Louis, MO) を添加し、PI 陽性の死細胞を PE-Cy5 の検出器で除外した。得られた FCS データは、FlowJo ソフトウェア (TreeStar 社, Ashland, OR) で解析した。

(倫理面への配慮)

共同研究先の医療機関において、医療行為として採取された ATL 患者の末梢血検体を解析した。患者の病態を把握するための臨床検査として、結果は速やかに担当医に報告した (医療行為としての少数例の解析では倫理審査が不要であることを、医科研・倫理支援室に確認済み)。

平成 24 年 10 月までに累積解析症例数が 6 例となったため、臨床研究に関する倫理指針 (平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)、および東京大学医科学研究所で定めた倫理規定を遵守して研究計画書を作成し、平成 24 年 11 月 15 日の本研究所・倫理審査委員会に提出する予定である。

C. 研究結果

ATL に対する化学療法後や移植後早期には、採取できる末梢単核細胞数が極めて少ないことが多い。その中で、フローサイトメーターを使って ATL 細胞や各種の免疫細胞を正確に区

別し、複数の機能分子の発現を解析するには、同時に多くのパラメーターを解析する必要がある。当研究室では、2004 年からマルチカラーのフローサイトメーターによる免疫担当細胞の解析システムの開発を行い、現在 12 カラーでの解析とソーティングが可能である。

本解析システムを使用して、鶴池班の下記プロジェクトにおける免疫モニタリングシステムの検討を行った。解析した症例は計 5 例である。その他、国立がん研究センターからの 1 症例は現在解析中のため、今回の報告から除いた。

1) ATL に対する臍帯血移植療法

(ATL-NST-5): 症例 1、2、3

2) ATL に対する DC 療法 (ATL-DC1-L1): 症例 4

3) ATL に対する Poteligeo 療法: 症例 5

1. ATL に対する臍帯血移植療法 (ATL-NST-5)

ほとんどの臍帯血移植は HLA ミスマッチで行われる。ドナーおよび/あるいはレシピエントに特異的な HLA を染色可能な抗 HLA 抗体があるとき、HLA-Flow 法によるキメリズム解析が可能である。その場合、生着動態と残存 ATL 細胞を同時に解析する蛍光標識抗体の組み合わせ (B. 研究方法 2 の Stain 1) で細胞を染色した。

また、臍帯血移植を含むすべての造血細胞移植療法においては、移植後の ATL 細胞、正常な Treg およびそれらにおける CCR4 発現レベルを同時に解析する蛍光標識抗体の組み合わせ (B. 研究方法 2 の Stain 2) で細胞を染色した。

この半年の間に、九州がんセンターから 1 例 (ATL-NST-5-1、症例 1)、今村病院分院から 2 例 (症例 2、症例 3)、急性型 ATL 患者に対する臍帯血移植後の検体の解析依頼があった。

症例 1 は HLA 完全一致の臍帯血移植であったため、HLA-Flow 法が適応出来ず、ATL 細胞、Treg およびそれらにおける CCR4 発現レベルの解析 (Stain 2) のみ行なった。移植後 1 週目から 5 週目まで毎週解析した結果、TSLC-1 陽性 CD7 陰性の ATL 細胞は検出されなかった。また、移植後には TSLC-1 と CD7 のダウンレギュレーションに加え、CD45RA (ナイーブ・マーカー) が時間とともに増減した。

症例 2 は、ポテリジオ投与後に末梢血の ATL 細胞が消失したが、髄液中に異常細胞の増加が認められたため、髄液中の ATL 細胞、Treg およびそれらにおける CCR4 発現レベルの解析 (Stain 2) を行なった。しかし、前回の髄液採

取時に抗がん剤の髄注が行なわれたため、検体採取時に髄液中の異常細胞は激減し、信頼性のある解析はできなかった。

症例 3 は解析可能なミスマッチ HLA があつたため、HLA-Flow 法と ATL 細胞/Treg/CCR4 発現解析を行なった。臍帯血移植後 19 日目の末梢血では、ATL 細胞に一致するフェノタイプの細胞は検出出来なかったが、移植後 39 日目の末梢血で有意な頻度 (CD4 陽性細胞中 7.23%) の ATL 細胞と疑われるフェノタイプ (CD7⁺TSLC1⁺) が検出され (図 1A 右)、それらをソーティングして形態を調べたところ、すべて ATL 細胞であった。また、この分画のほとんどの細胞は Treg フェノタイプ (CD25⁺CD127⁻) を示し、CCR4 を発現していた (図 1B 下段)。さらに、HLA-Flow 法によるキメリズム解析の結果、この分画の細胞はすべてレシピエント由来であった。本症例では急性 GVHD もみられなかったため、免疫抑制剤を減量し、ポテリジオ投与で対応している。

2. ATL に対する DC 療法 (ATL-DC1-L1)

最初にプロトコールに登録された症例 5 は、登録後に ATL 細胞の増加を認めたため、プロトコールから脱落し、Poteligeo 投与が行なわれた (次項に記載)。

登録 2 例目の症例 4 は、10 月日に DC 療法が行なわれた。その後高熱を発生し、それに対してステロイドの投与も考慮されたため、急遽 5 日目で免疫解析を行なった。その後解熱傾向を示してステロイド投与は回避されたが、急性 GVHD 様の病態を呈し、治療 2 週間目の解析で Treg の著明な増加が観察された (図 2)。今後は Treg 染色に加えて細胞内サイトカイン染色を行ない、炎症反応の解明を進めたい。なお、現在までの解析では HLA クラス I の発現レベルに変動は無かった。

3. ATL に対する Poteligeo 療法

DC 療法のプロトコールに最初に登録された症例 5 は、登録後に ATL 細胞の増加を認めたため、プロトコールから脱落した。その後、ポテリジオ療法の適応となり、毎週 1 回、8 週間連続してポテリジオが投与された。

投与後速やかにリンパ節腫脹が軽減し、本剤の迅速な効果を伺わせた。投与後 1 週目の末梢血の解析では、投与前に見られた CCR4 陽性細胞はほとんど消失していた。

Treg の頻度もやや減少が見られたが、CCR4 陰性の Treg も存在するためか、消失することはなかった。

D. 考察

フローサイトメーターを使用した ATL 患者の病態解析では、ATL 細胞の正確な同定が必須である。東京大学医科学研究所附属病院・血液腫瘍内科の内丸薫准教授と小林誠一郎助教は、多くの場合 ATL 細胞で CD7 の欠失と CD3 のダウンレギュレーションが認められることに着目し、マルチカラー解析による ATL 細胞の検出法を開発した (1st HAS-Flow 法、Tian Y et al. Cancer Sci. 102(3): 569-577, 2011.)。その後、CD4 陽性細胞を CD7 と TSLC-1 で解析すると、ATL 細胞は CD7⁺TSLC-1⁺ 細胞としてその他の細胞からより明確に判別できることがわかった (2nd HAS-Flow 法)。

しかしながら、ATL に対する造血細胞移植患者の症例解析の結果、移植後には HTLV-1 感染や ATL 細胞と関係なく、CD4 陽性細胞における TSLC-1 弱陽性分画が増加することが判明した (小林ら)。したがって、TSLC-1 の発現レベルによって ATL 細胞を判別する 2nd HAS-Flow 法が、ATL に対する造血細胞移植後にも有効であるのか危惧されていた。

今年度前半の臨床研究の中で、症例 3 の移植後早期の解析において、HAS-Flow 法により ATL 細胞の増加を低頻度でも極めて明確に検出できることが示された。今回使用したモニタリングシステムのうち、Stain 1 (キメリズム解析) および Stain 2 (ATL/Treg/CCR4 解析) は、造血細胞移植後の ATL の再発の早期診断に有用であると思われる。

また、今回の解析の Stain 2 を用いることによって、Treg のフェノタイプを示すと言われている ATL 細胞と正常な Treg を判別し、それぞれにおける CCR4 発現レベルの解析が可能である。Poteligeo 療法で標的となるのは、CCR4 を発現している細胞である。したがって、Poteligeo を投与する前に、細胞傷害を受ける可能性のある CCR4 陽性の ATL 細胞と正常 Treg を評価し、治療開始後にそれらの細胞の消長をフォローアップすることが可能である。Poteligeo 投与によって GVHD 様の激しい皮膚の炎症を起こすことが報告されており、そのメカニズムとして Poteligeo による CCR4 陽性の Treg が傷害されることが考えられている。

今回の報告は少数例でのプレリミナリーな解析にとどまったが、今後鶴池班の臨床試験が進み、症例数が十分増えたところで、フローサイトメーターでの解析結果と患者の病態を比較検討する予定である。その結果、本解析システムは、新たな細胞療法や抗体療法における治療適応の判断、治療効果の判定、およびGVHD病態のモニタリングとその発症予知において、有用な情報をもたらす可能性がある。

E. 結論

フローサイトメーターを使用した ATL 患者の解析システムは、新たな細胞療法や抗体療法における臨床検査と病態解明の手段として、極めて有用なツールとなる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuno N, Yamamoto H, Watanabe N, Uchida N, Ota H, Nishida A, Ikebe T, Ishiwata K, Nakano N, Tsuji M, Asano-Mori Y, Izutsu K, Masuoka K, Wake A, Yoneyama A, Nakauchi H, Taniguchi S. Rapid T-cell chimerism switch and memory T-cell expansion are associated with pre-engraftment immune reaction early after cord blood transplantation. Br. J. Haematol. 160(2): 255-258, 2013.
2. Kobayashi S, Tian Y, Ohno N, Yuji K, Ishigaki T, Isobe M, Tsuda M, Oyaizu N, Watanabe E, Watanabe N, Tani K, Tojo A, Uchimaruru K. The CD3 versus CD7 Plot in Multicolor Flow Cytometry Reflects Progression of Disease Stage in Patients Infected with HTLV-1. PLoS One. 2013;8(1):e53728.doi:10.1371/journal.pone.0053728. Epub 2013 Jan 22.

2. 学会発表

2. 渡辺信和、「キメリズム解析／HLA-Flow法による臍帯血移植後の病態解析」CBT MEETING、平成 24 年 5 月 10 日（東京）
3. 石垣知寛、小林誠一郎、渡辺恵理、大野伸広、田野崎隆二、渡辺信和、内丸薫、東條有伸、中内啓光、『CADM1/CD7 を用いた同種造血幹細胞移植後の ATL 細胞のモニタリング』、第 74 回日本血液学会、口頭発表、平成 24 年 10 月 19 日（国立京都国際

会館、京都）石垣知寛ほか、CADM1/CD7 を用いた同種造血幹細胞移植後の ATL 細胞のモニタリング（ポスター）、第 74 回日本血液学会、平成 24 年 10 月 19 日（京都）

4. 中野伸亮、渡辺理恵、徳永雅仁、窪田歩、竹内昇吾、高塚祥芝、渡辺信和、宇都宮與、『フローサイトメトリーによる ATL に対する臍帯血移植後のキメリズムと MRD の同時解析』、第 74 回日本血液学会、口頭発表、平成 24 年 10 月 19 日（国立京都国際会館、京都）

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明の名称：患者検体を用いた HTLV-1 キャリア、成人 T 細胞白血病の発癌過程進行度又は悪性度の評価法

知財部管理番号：25B132002-1

発明者：渡辺信和、内丸薫、小林誠一郎

出願人：国立大学法人 東京大学

出願日：2013/2/25

出願番号：特願 2013-034326

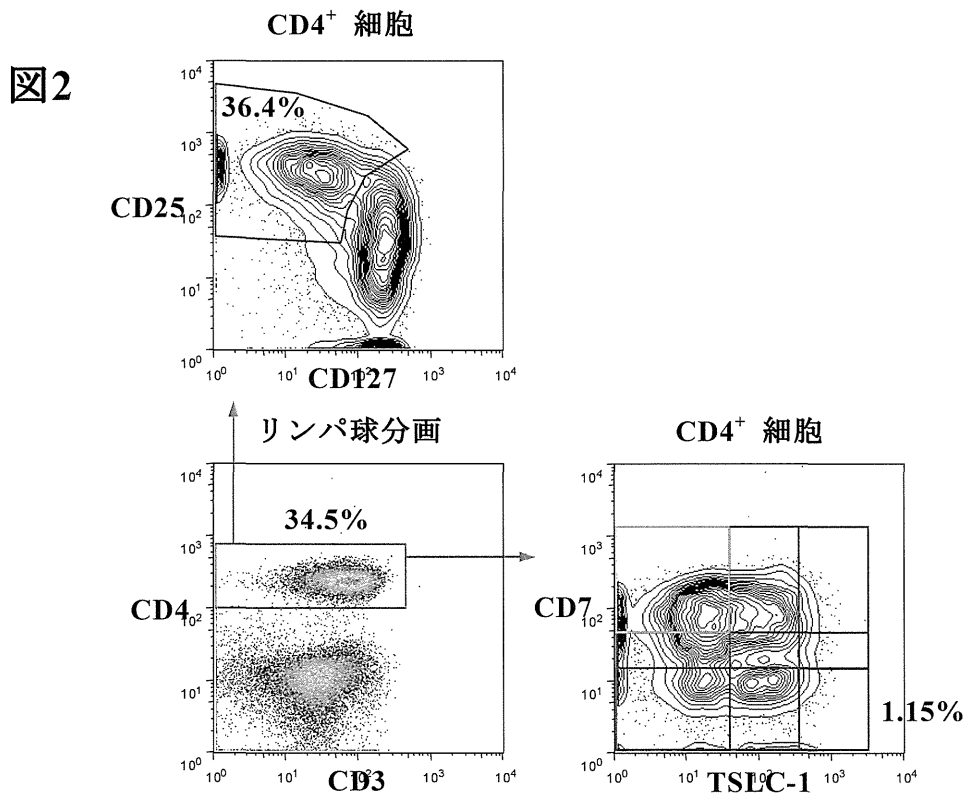
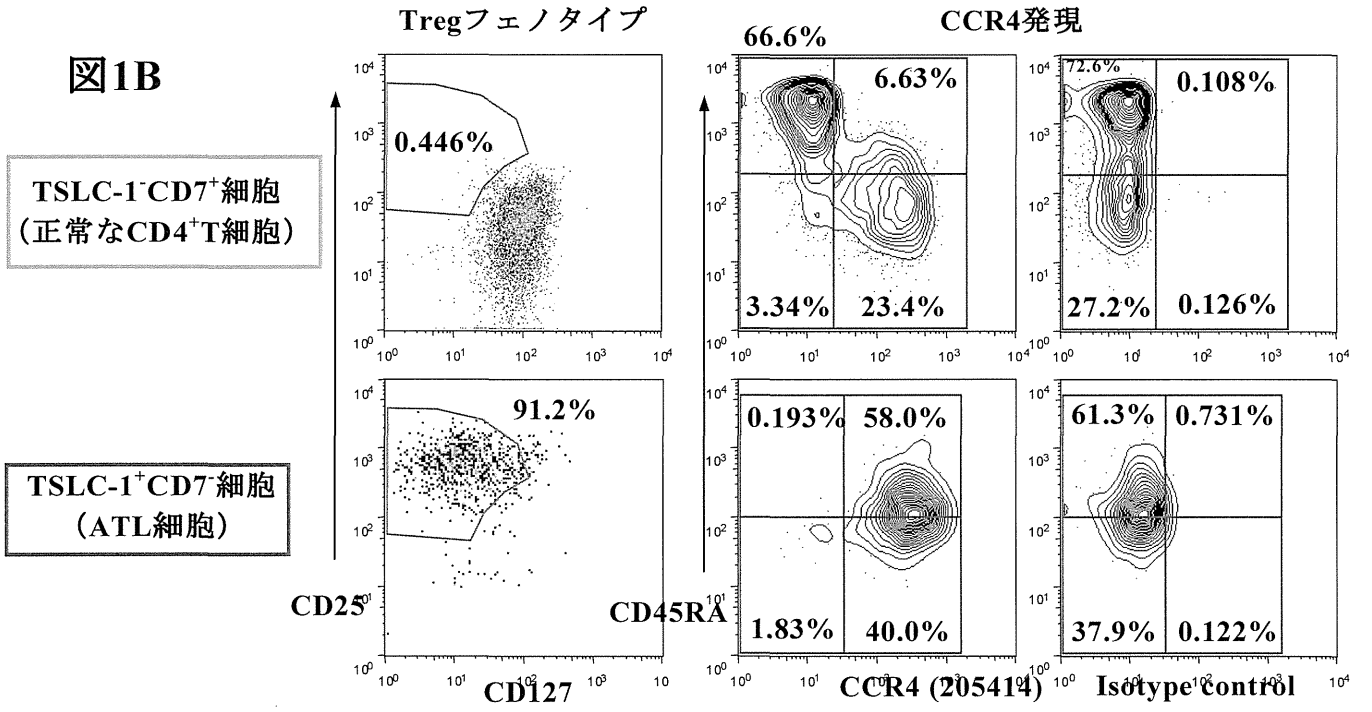
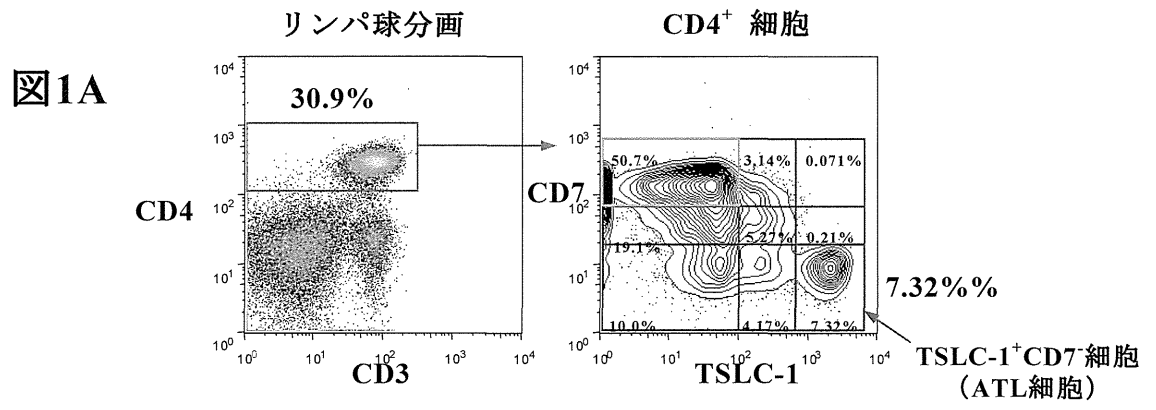
出願国：日本

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

成人 T 細胞白血病-リンパ腫の同種造血幹細胞移植後の
サイトメガロウイルス pp65 抗原陽性に関する検討

研究分担者：宇都宮 興 公益財団法人慈愛会 今村病院分院 院長

研究要旨

同種造血幹細胞移植（allo-HSCT）後のサイトメガロウイルス(CMV)抗原血症発症について ATL が、疾患特異的に有意な発症危険因子に成り得るかどうかについて後方視的に解析した。2006 年 11 月から 2012 年 5 月までに当院で施行した allo-HSCT 患者のうち除外症例を除く 85 名を対象とした。全症例における CMV-pp65 抗原血症発症例数は、63 名（ATL 群 34 名、非 ATL 群 29 名）であり、その累積発症率に関して、疾患別では ATL 患者（91.9% vs 60.4%, $P < 0.001$ ）、年齢では 50 歳以上の患者（89.6% vs 54.1%, $P = 0.002$ ）で有意に高い発症を認めた。ATL 患者では、CMV-IgG 抗体の保有率が高く、allo-HSCT 後の高率な CMV-pp65 抗原血症発症と関連しているものと思われる。ATL は、CMV-pp65 抗原血症発症の独立した危険因子と成り得る。

A. 研究目的

サイトメガロウイルス（CMV）感染症は、同種造血幹細胞移植（allo-HSCT）において生存に影響を及ぼすことが報告されている。また、成人 T 細胞白血病-リンパ腫（ATL）は、免疫不全と関連して CMV 感染症は高頻度にみられる。しかしながら、ATL に対する allo-HSCT 後の CMV 抗原血症に関する多数例の報告はない。今回、allo-HSCT 後の CMV 抗原血症発症について ATL が、疾患特異的に有意な発症危険因子になり得るかどうかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2006 年 11 月から 2012 年 5 月までに当院で施行した allo-HSCT 患者 97 名（106 回）のうち早期死亡、2 回目以降の移植患者 12 名（21 回）を除外した 85 名（85 回）を対象とした。診療録を基に、後方視的に allo-HSCT 施行症例における CMV-pp65 抗原血症に関して、ATL が、疾患特異的に有意な発症危険因子になり得るかどうかについて、他疾患と比較して検討した。

（倫理面への配慮）

ATL はもとより造血幹細胞移植を受ける患者は、予後の厳しく、移植後の治療成績も完全とは言えないので、十分な説明と同意を得て治療を実施した。

C. 研究結果

解析した患者 85 名の性別は男性 52 名、女性 33 名、年齢の中央値 52 歳（19-69 歳）で、ATL

患者 37 名、非 ATL 患者 48 名であった。移植ドナーと幹細胞源は血縁ドナー 19 名（BM 7、PB 12）、非血縁ドナー 66 名（BM 56、CB 10）、移植前処置は骨髄破壊的前処置（MAC）64 名、骨髄非破壊的前処置（RIC）21 名であった。移植前レシピエントの CMV-IgG 抗体の有無が確認できたものが 68 名（ATL 群 27 名、非 ATL 群 41 名）であり、ATL 群においては 50 歳以上と未満では抗体保有率に差は認めなかったが、非 ATL 群においては若年層で有意に CMV 抗体保有率が低かった（ $P = 0.002$ ）。全症例における CMV-pp65 抗原血症発症例数は、63 名（ATL 群 34 名、非 ATL 群 29 名）であり、その累積発症率に関して、疾患別では ATL（91.9% vs 60.4%, $P < 0.001$ ）、年齢では 50 歳以上の患者（89.6% vs 54.1%, $P = 0.002$ ）で有意に高い発症を認めた。CMV-pp65 抗原血症発症者の約 2/3 において、発症前 10 日間の内にステロイドの投与が行われていた。移植前レシピエントの CMV-IgG 抗体有無の確認が取れている 68 名による CMV-pp65 抗原血症発症に関する Cox 回帰分析では、ATL（HR 2.625, $P = 0.008$ ）、RIC（HR 2.532, $P = 0.014$ ）が多変量解析で有意な発症危険因子であった。CMV 関連疾患を認めた症例は全体で 7 名（腸炎 6 名、肺炎 1 名）であったが、疾患群間に差はなかった。

D. 考察

CMV-IgG 抗体保有率は、非 ATL 患者では高齢者に高かったが、ATL 患者では若年者でも抗体保有率が高かった。Allo-HSCT 後の CMV-pp65

抗原血症発症率は、ATL 患者において有意に高く、多変量解析でも有意差がみられた。前処置の強度による解析では、一般に CMV 感染は、MAC に高いと報告されているが、今回の検討では RIC の方が MAC に比し、有意に CMV-pp65 抗原血症発症率が高かった。今回の対象では、ATL 患者が多く、RIC 症例で高齢の患者が多かったことに関連していると考えられる。また、非 ATL 患者では、高齢群に高い CMV-pp65 抗原血症発症がみられたが、CMV-IgG 抗体の保有率が高かったことと関連している可能性が考えられる。いずれにしても ATL 患者では、若年者も高齢者も CMV-IgG 抗体の保有率が高く、allo-HSCT 後の非常に高率な CMV-pp65 抗原血症発症と関連しているものと思われる。

E. 結論

ATL は、CMV-pp65 抗原血症発症の独立した危険因子と成り得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 宇都宮 興: Column これだけは押さえない、がんと感染症のひとくちメモ 第 2 回 HTLV-1 と成人 T 細胞白血病 (ATL) . がん治療と感染症(4): 巻末, 2012
2. Katsuya H, Yamanaka T, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Sasaki H, Hanada S, Eto T, Moriuchi Y, Saburi Y, Miyahara M, Sueoka E, Uike N, Yoshida S, Yamashita K, Tsukasaki K, Suzushima H, Ohno Y, Matsuoka H, Jo T, Suzumiya J, Tamura K: Prognostic index for acute- and lymphoma-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Clin Oncol* 30(14): 1635-1640, 2012
3. Fukuda RI, Tsuchiya K, Suzuki K, Itoh K, Fujita J, Utsunomiya A, Tsuji T: HTLV-1 Tax regulates the cellular proliferation through the down-regulation of PIP3-phosphatase expressions via the NF- κ B pathway. *Int J Biochem Mol Biol* 3(1): 95-104, 2012
4. Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3⁺CD4⁺ T cells in the HTLV-1 infected individuals. *Retrovirology* 9(1): 46, 2012
5. Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Taniguchi S, Eto T, Takatsuka Y, Miyazaki Y, Moriuchi Y, Hidaka M, Akashi K, Uike N, Sakamaki H, Morishima Y, Kato K, Suzuki R, Nishiyama T, Utsunomiya A: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma with special emphasis on preconditioning regimen: a nationwide retrospective study. *Blood* 120(8):1734-1741, 2012
6. Higashi Y, Kawai K, Yonekura K, Takeda K, Kanzaki T, Utsunomiya A, Kanekura K: Indication for random skin biopsy for the diagnosis of intravascular large B cell lymphoma. *Dermatology* 224: 46-50, 2012
7. Kannagi M, Hasegawa A, Takamori A, Kinpara S, Utsunomiya A: The roles of acquired and innate immunity in human T-cell Luekemia virus type 1-mediated diseases. *Frontiers in Microbiology* 3(323): 1-10, 2012

2. 学会発表

1. 中野伸亮, 高塚祥芝, 竹内昇吾, 徳永雅仁, 窪田歩, 徳永真弓, 糸山貴浩, 牧野虎彦, 宇都宮 興: 成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対して同種移植を施行した 59 例の検討—単施設における 13 年の経験—. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会, 2012 年 2 月 24-25 日, 大阪
2. 亀甲亜矢子, 村山芳博, 堂園浩一朗, 三石敬之, 武清孝弘, 高塚祥芝, 竹内昇吾, 徳永雅仁, 窪田歩, 中野伸亮, 宇都宮 興: 造血幹細胞移植患者の体力・QOL に環境が及ぼす影響. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会, 2012 年 2 月 24-25 日, 大阪
3. 武清孝弘, 村山芳博, 堂園浩一朗, 三石敬之, 亀甲亜矢子, 高塚祥芝, 竹内昇吾, 徳永雅仁, 窪田歩, 中野伸亮, 宇都宮 興: 造血幹細胞移植患者の体組成・体力変化—移植 1 年後の経時的変化—. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会, 2012 年 2 月 24-25 日, 大阪
4. 谷村あゆみ, 池田清夏, 岩切郁美, 福盛貴子, 高塚祥芝, 中野伸亮, 宇都宮 興, 柏木美恵子: 造血幹細胞移植患者に対する退院指導内容の検討—指導用パンフレットの内容理解度調査から—. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会, 2012 年 2 月 24-25 日, 大阪
5. 勝屋弘雄, 山中竹春, 石塚賢治, 宇都宮 興, 花田修一, 衛藤徹也, 森内幸美, 鈴宮淳司, 田村和夫: 急性リンパ腫型の ATL の予後因子モデル. 第 109 回日本内科学会総会, 2012

- 年 4 月 13-15 日, 京都
6. 米倉健太郎, 神埼保, 宇都宮與, 高塚祥芝, 竹内昇吾, 徳永雅仁, 窪田歩, 河井一浩, 内田洋平, 金蔵拓郎, 石塚賢治: くすぶり型 ATL の予後因子としての皮膚病変について. 第 162 回日本皮膚科学会鹿児島地方会・総会, 2012 年 4 月 15 日, 鹿児島
 7. 米倉健太郎, 神埼保, 中野伸亮, 窪田歩, 徳永雅仁, 竹内昇吾, 高塚祥芝, 宇都宮與: ATL 患者における抗 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) 投与後に生じた皮膚症状の検討. 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012 年 6 月 14-16 日, 福島
 8. Oka T, Kitamaru Y, Tamura M, Sato H, Washio K, Al-Kader A L, Ouchida M, Utsunomiya A, Yoshino T: Aberrant expression of has-miR34a in leukemia/lymphoma(ATL). 第 52 回日本リンパ網内系学会総会, 2012 年 6 月 14-16 日, 福島
 9. 宇都宮與: ATL 治療における抗 CCR4 抗体「ポテリジオ」のインパクト. 日本がん分子標的治療学会第 16 回学術集会ランチョンセミナー, 2012 年 6 月 27-29 日, 北九州
 10. 宇都宮與, 石塚賢治, 勝屋弘雄, 山中竹春, 鈴宮淳司, 田村和夫: 全国調査から見た成人 T 細胞白血病・リンパ腫の診療実態. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 11. 米倉健太郎, 神埼保, 中野伸亮, 窪田歩, 徳永雅仁, 竹内昇吾, 高塚祥芝, 宇都宮與: ATL 患者における抗 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) 投与後に生じた皮膚症状の検討. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 12. 長谷川温彦, 高森絢子, 宇都宮與, 前田裕弘, 山野嘉久, 増田昌人, 清水由紀子, 玉井洋太郎, 笹田亜麻子, 崔日承, 鶴池直邦, 岡村純, 渡邊俊樹, 神奈木真理: HTLV-1 感染者における Tax 特異的 T 細胞応答および ATL 発症予防. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 13. 斉藤愛記, 掛谷綾香, 深澤麻純, 大迫美穂, 宇野雅哉, 宇都宮與, 渡邊俊樹, 山岡昇司: ユビキチン化修飾酵素 A20 は HTLV-1 感染細胞の生存に寄与する. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 14. 吉田稚明, 加留部謙之輔, 片山幸, 在田幸太郎, 海野啓, 宇都宮與, 塚崎邦弘, 今泉芳孝, 平良直也, 大島孝一, 都築忍, 瀬戸加大: 慢性型 ATL のゲノム異常解析. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 15. 永田安伸, 佐藤亜以子, 奥野友介, 千葉健一, 田中洋子, 白石友一, 吉田健一, 真田昌, 宇都宮與, 山口一成, 大島孝一, 宮野悟, 宮脇修一, 渡邊俊樹, 小川誠司: 全エクソン解析により明らかとなった成人 T 細胞性白血病における TET2 異変. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 16. 岡剛史, ABD AL-Kader Lamia, 佐藤妃映, 神農陽子, 鷲尾佳奈, 村上一郎, 大内田守, 宇都宮與, 吉野正: 成人 T 細胞白血病・リンパ腫(ATL)の発症・進展におけるエピジェネティクス異常のダイナミクス. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 17. 矢持忠徳, 守田洋平, 矢持淑子, 佐々木陽介, 渡辺信和, Sanaz Firouzi, 内丸薫, 宇都宮與, 渡邊俊樹: 成人 T 細胞性白血病における Tumor Initiating Cell の探索の試み. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 18. 吉森みゆき, 西垂水和隆, 中島美奈子, 東美奈, 柏木美恵子, 高塚祥芝, 宇都宮與: HTLV-1 感染者の針刺し皮膚粘膜曝露後のフォローアップ. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 19. 東美奈, 中島美奈子, 南美穂, 益山景子, 松山郁子, 高塚祥芝, 宇都宮與: HTLV-1 キャリア外来受診のための電話相談の分析～情報シートを活用して～. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 20. 中野伸亮, 高塚祥芝, 竹内昇吾, 徳永雅仁, 窪田歩, 徳永真弓, 牧野虎彦, 宇都宮與: 同種移植患者のサイトメガロウイルス pp65 抗原血症に関する成人 T 細胞白血病と他疾患との比較. 第 5 回 HTLV-1 研究会/シンポジウム, 2012 年 8 月 25-26 日, 東京
 21. 玉井洋太郎, 長谷川温彦, 高森絢子, 笹田亜麻子, 田野崎隆二, 崔日承, 宇都宮與, 衛藤徹也, 高起良, 末廣陽子, 岡村純, 鶴池直邦, 神奈木真理: 同種造血幹細胞移植後 ATL 患者より同定した HLA-DR1 拘束性 HTLV-1Tax 特異的 CD4 陽性 T 細胞エピートプ. 第 71 回日本癌学会学術総会,

- 2012年9月19-21日, 札幌
22. 掛谷綾香, 深澤麻純, 宇野雅哉, 宇都宮與, 渡邊俊樹, 齊藤愛記, 山岡昇司: ユビキチン修飾酵素 A20 は成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞の生存に必要である. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
23. 金原秀一, 増田貴夫, 長谷川温彦, 宇都宮與, 中村正孝, 神奈木真理: ATL 細胞における 3'側宿主領域と Gag 領域を含む HTLV-1 LTR によりコードされる新規アンチセンス RNA の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
24. 崔日承, 衛藤徹也, 田野崎隆二, 宇都宮與, 福島卓也, 豊嶋崇徳, 末廣陽子, 山中竹春, 岡村純, 鶴池直邦: 成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁骨髄移植の多施設共同臨床試験. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
25. 石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 宇都宮與, 山野嘉久, 中村祐輔, 中川英刀, 植田幸嗣: 成人 T 細胞白血病ウイルス関連疾患における新規マーカー同定を目的とした定量プロテオームプロファイリング. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
26. 岡 剛史, 藤田洋史, Lamia Abd Al-Kader, 佐藤妃映, 村上一郎, 宇都宮與, 吉野正: 成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞における 5-aminolevulinic acid を用いた photodynamic action によるアポトーシスの誘導. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
27. 矢持忠徳, 守田陽平, 矢持淑子, Firouzi Sanaz, 佐々木陽介, 渡辺信和, 内丸薫, 宇都宮與, 渡邊俊樹: 成人 T 細胞性白血病におけるがん幹細胞の同定への試み. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
28. 武藤真人, 佐藤知雄, 有吉直子, 新谷奈津美, 宇都宮與, 清野研一郎, 前川隆司, 山野嘉久: HTLV-1 感染者に適応可能な γ δT 細胞療法の開発. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
29. 永田安伸, 真田昌, 吉田健一, 白石友一, 佐藤亜以子, 宇都宮與, 山口一成, 大島孝一, 宮脇修一, 宮野悟, 渡邊俊樹, 小川誠司: 全エクソン解析により明らかとなった成人 T 細胞性白血病における TET2 異変. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 19-21 日, 札幌
30. Nagata Y, Sanada M, Yoshizato T, Kon A, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Shiraishi Y, Yoshida K, Sato Y, Matsunawa M, Sato A, Ishiyama K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Yamada Y, Oshima K, Miyano S, Miyawaki S, Watanabe T, Ogawa S: TET2 mutations revealed by whole exome sequencing in adult T-cell leukemia. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都
31. Yamagishi M, Takahashi R, Nakano K, Asanuma S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaruru K, Ogawa S, Watanabe T: Molecular hallmarks of adult T cell leukemia: miRNA, epigenetics, and emerging signaling abnormalities. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都
32. Nakano N, Watanabe E, Tokunaga M, Takatsuka Y, Takeuchi S, Kubota A, Watanabe N, Utsunomiya A: Concurrent analysis of engraftment and MRD in a recipient with ATLL using multicolor FACS after CBT. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都
33. 竹内昇吾, 徳永真弓, 糸山貴浩, 中野伸亮, 窪田歩, 徳永雅仁, 高塚祥芝, 米倉健太郎, 宇都宮與: 成人 T 細胞性白血病に対する同種造血幹細胞移植後早期死亡例の検討. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都
34. Kato K, Cho I, Wake A, Uike N, Taniguchi S, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Hino M, Akashi K, Sakamaki H, Kato K, Suzuki R, Yamanaka T, Utsunomiya A: Cord blood transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma: The JSHCT WG study. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都
35. Moriuchi Y, Fukushima T, Nomura S, Shimoyama M, Utsunomiya A, Shibata T, Tamura K, Ishizuka K, Yoshida S, Uike N, Hata H, Kawano F, Fukushima N, Uozumi K, Masuda M, Yamada Y, Kaba H, Watanabe Y, Fukuda H, Hotta T, Tobinai K, Tsukasaki K: An ancillary study for aggressive ATL by the Japan Clinical Oncology Group, JCOG0902A. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都
36. 徳永真弓, 中野伸亮, 窪田歩, 徳永雅仁, 竹内昇吾, 高塚祥芝, 糸山貴浩, 牧野虎彦,

宇都宮與, 坪内博仁: 当院におけるイマチニブによる慢性骨髄性白血病 (CML) の治療成績. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都

37. Asanuma S, Nakano K, Yamagishi M, Ogawa S, Yamaguchi K, Utsunomiya A, Watanabe T: Aberrantly spliced Helios variants in ATL cells induce T cell proliferation. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都
38. 西村由宇慈, 窪田歩, 徳永真弓, 中野伸亮, 徳永雅仁, 竹内昇吾, 高塚祥芝, 宇都宮與: 自家末梢血幹細胞移植後多発髄外腫瘤にて再発した多発性骨髄腫の一例. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012 年 10 月 19-21, 京都 (紙上発表)

G. 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

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 (short tandem repeat) 領域が存在し、移植後キメリズムの経過観察評価は STR により遂行可能であった。RIC 後 24 ヶ月以上生存し、キメラ解析が可能であったのは 65 例中 24 例で、うち 4 例は RIC 後 26～39 ヶ月の期間に死亡した。RIC 後 24 ヶ月以降の ATL 再発は 1 例で、T cell 分画でのみレシピエントの比率が増加し混合キメラとなった。残りの 23 例では、顆粒球、T 細胞および単核球すべての分画において完全キメラが維持されていた。また、RIC 後の HTLV-1 プロウイルス量を経時的に測定したところ、RIC 後 180 日以内にプロウイルス量が測定感度以下（ <0.5 コピー）となり「陰性化」したのは 68%であった。24 ヶ月以上生存した 24 例のうち、HTLV-1 抗体陽性キャリアからの移植は 8 症例で、全例において最終解析時（RIC 後 24～129 ヶ月）にはプロウイルス量が測定感度以上（ ≥ 0.5 コピー）となり「陽性化」した。残る 16 例は抗体陰性ドナーからの移植例であったが、最終解析時（RIC 後 24～120 ヶ月）には、8 例が「陽性化」、8 例は「陰性化」したままであった。

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相関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 (STR) polymorphism を利用した蛍光 PCR プライマーによる混合キメラの定量法を用いて、ATL に対する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前向

きに検討した。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

1. RIC 後のキメラ解析：

(1-1) キメラ値を計算した遺伝子領域：

血縁者末梢血移植である NST-3 の 20 症例では、移植あたり解析可能な遺伝子領域数は平均 5.4(領域数は 2-9)であり、非血縁者間骨髄移植である NST-4 の 15 症例では、平均 5.3(領域数は 2-9)であり、両者間に差は見られなかった。初期研究の移植例である血縁者間移植 NST-1(16 症例)、NST-2(14 症例)を含めると移植症例全 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。

(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、患者の血球に対してのドナー血球の占める割合が 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症例の割合を、末梢血の観測ポイントの 30 日、60 日、90 日、6ヶ月、12ヶ月検体でプロットした (Fig. 1)。

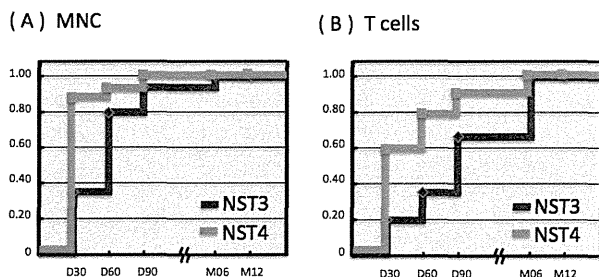


Fig. 1 完全キメラ達成者割合の推移

Fig. 1 に示すように、完全キメラの達成割合は、患者血球全体を示す単核球 (Mononuclear cell, MNC) 分画において、完全キメラの累積達成割合が 80%に達したのは、血縁者間移植 NST-3 では RIC 後 60 日、非血縁者間移植 NST-4

では 30 日であり、後者の方が速やかであった。また、T 細胞分画で比較すると完全キメラ達成のスピードの差はさらに顕著であった (完全キメラの累積達成割合が 80%に達したのは、NST-3 では 180 日、NST-4 では 60 日)。これは移植前処置の相違 (全身放射線照射の有無) による影響が一因と考えられた。

(1-3) 移植後 2 年以上生存者のキメラ解析：

NST-1-NST-4 に登録され 2012 年 9 月までに 2 年以上生存した長期生存症例について検討を行った。観察期間中央値は 62.9 ヶ月(24 ヶ月-132 ヶ月)であった。長期生存例は、NST-1 では 5 例、NST-2 ; 7 例、NST-3 ; 6 例、NST-4 ; 6 例、合計 24 例であった。24 例中 4 例はその後に死亡した。キメラ解析結果では、いずれも末梢血での完全キメラは維持されており、安定した寛解状態であったと考えられた。また、レシピエント T 細胞の再増加がキメラ解析で確認された再発症例は 1 例で、現在も生存中であり、死亡原因とはならなかった。この結果キメラ解析により、長期観察期間中の再発を確定できた。

2. RIC 後の HTLV-1 プロウイルス動態：

(2-1) RIC 後の HTLV-1 プロウイルス動態：

昨年度報告したように、NST-1/ NST-2 では、評価可能であった 28 例中 16 例 (57%) において、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。その後実施した 2 試験では NST-3 では 20 例中 14 例 (70%)、非血縁骨髄を使用した NST-4 (ドナーは全例が HTLV-1 陰性) では 15 例中 13 例 (87%) において、RIC 後 180 日以内にプロウイルス量が「陰性化」した。

(2-2) RIC 後 24 ヶ月以上生存例の HTLV-1 プロウイルス動態 (Table 1)：

NST-1-4 に登録された全 65 例中 24 ヶ月以上生存したのは 24 例であり、移植ソース別に 3 群に分けた HTLV-1 抗体陽性キャリアからの末梢血幹細胞移植は 8 例で、全 8 症例とも最終解析時 (平均 79.8 ヶ月) に、ウイルス量は測定感度以上 (≥ 0.5) となり「陽性化」した。残る 16 例 (細胞源は末梢血 10 例、骨髄 6 例) は抗体陰性ドナーからの移植例であったが、最終解析時には、すでに 8 例が陽性化しており、末梢血 10 例中 3 例、骨髄 6 例中 5 例、合計 6 例が「陰性化」したままであった。

Table1

ドナー	対象症例 (n)	幹細胞源	観察期間 (平均)	プロウイルスが陰性 化した症例 (n)	直近のプロウイルスが陽性 (n)
HTLV-1 陽性	8	末梢血	24-132 月 (79.8)	1	8
HTLV-1 陰性	10	末梢血	24-100 月 (70.4)	10	7
HTLV-1 陰性	6	骨髄	24-36 月 (28)	6	1

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。RIC 後 24 ヶ月を超えて生存しキメラ解析が可能であったのは 65 例中 24 例では再発した 1 例以外はすべて完全キメラが維持されており（観察期間 24～132 ヶ月）本解析法の有用性が確認された。RIC 後の HTLV-1 プロウイルス量動態の解析では、RIC 後 6 ヶ月以内にプロウイルス量が測定感度以下 (<0.5) となり「陰性化する割合」は 68%であった。また HTLV-1 抗体陽性ウイルスキャリアからの移植例では、大多数のレシピエントが HTLV-1 ウイルスキャリアになることが示され、HTLV-1 陰性ドナーからの移植においては、長期的には正常リンパ球への HTLV-1 感染が発生するが、一部の 5 年以上の長期生存例では未感染のまま経過することが判明した。16 例の HTLV-1 陰性ドナーからの移植後には、末梢血細胞は完全キメラ状態であるにもかかわらず、8 例はキャリアの状態となっていた。移植後のプロウイルスについては、ドナー由来かレシピエント由来か、あるいは 2 種類が混在しているのかは判別できない。移植後のドナー細胞由来の ATL 発症は本研究では見られていないが、今後の注意深い観察が必要と思われる。

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-1 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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): 2141-48, 2012

2. 学会発表

1. 長谷川温彦、高森絢子、宇都宮與、前田裕弘、山野嘉久、増田昌人、清水由紀子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、崔日承、鵜池直邦、岡村純、渡邊俊樹、神奈木真理. HTLV-1 感染者における Tax 特異的 T 細胞応答および ATL 発症予防 第 5 回 HTLV 研究会、2012 年 8 月 25-26 日、東京
2. Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Etoh T, Koh H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Identification of a novel HLA-DR1-restricted epitope that is recognized by Tax-specific CD4⁺ T cells with the potential to enhance Tax-specific CD8⁺ responses in ATL patients after allo-HSCT 第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 19-21 日、札幌市（口演）
3. 崔日承、田野崎隆二、宇都宮與、福島卓也、豊嶋崇徳、末廣陽子、山中竹春、岡村純、鵜池直邦. 成人 T 細胞白血病/リンパ腫に対する骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁骨髄移植の多施設共同臨床試験 第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 19-21 日、札幌市（示説）

G. 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 に対する同種造血幹細胞移植療法の成績向上に関する研究

研究分担者：豊嶋 崇徳 北海道大学大学院医学研究科 教授
田中 淳司 北海道大学大学院医学研究科 准教授
小林 直樹 札幌北榆病院 部長
今村 雅寛 札幌北榆病院 顧問
重松 明男 北海道大学病院検査輸血部 助教

研究要旨

HTLV-1 非浸淫地域における ATL の治療成績の報告は少ない。また、以前より我々は北海道における良好な移植成績を報告してきた。今回の解析では HTLV-1 非浸淫地域である北海道における ATL の全移植症例を後方視的に検討し、リスクファクターの解析を行うとともに、我が国の既報との比較を行った。2012年3月までに北海道内全移植施設（12施設）において、同種造血幹細胞移植が施行された ATL 56 症例を対象とした。年齢中央値は 57 歳、28 例が急性型、22 例がリンパ腫型であり、移植前病期が CR の症例が 23 例、non-CR の症例が 43 例であった。フォローアップ期間中央値 48 ヶ月で 1 年生存率および 5 年生存率はそれぞれ 56.3%、46.5%であり、22 ヶ月で生存曲線はプラトーとなった。生存に対する危険因子としては男性 (HR 3.15) および移植前非寛解 (HR2.70) 症例が多変量解析により同定された。北海道における ATL に対する同種移植成績は既報と比較して良好であった。危険因子は従来との報告と同様の結果であった。

A. 研究目的

北海道における ATL に対して同種造血幹細胞移植された全症例を検討する。

B. 研究方法

2012年3月までに北海道内全移植施設（12施設）において、同種造血幹細胞移植が施行された ATL 症例についての後方視的解析を施行した。

（倫理面への配慮）

本研究はデータベースを基に行った後方視的解析である。個人情報が入り込まないよう配慮した。

C. 研究結果

ATL 56 症例。年齢中央値は 57 歳、28 例が急性型、22 例がリンパ腫型であり、移植前病期が CR の症例が 23 例、non-CR の症例が 43 例であった。移植細胞は骨髄 39 例、末梢血幹細胞 11 例、臍帯血 6 例であり、ドナーは HLA 一致同胞 20 例、HLA 一致非血縁 22 例、HLA 不一致 14 例であった。移植前処置は骨髄破壊的前処置が 17 例、骨髄非破壊的前処置が 39 例であった。53 例に好中球生着が認められた。急性 GVHD は評価可能例の 75%に認められ、グレード II 以上が 58%に認められた。慢性 GVHD は 38%に認められた。

フォローアップ期間中央値 48 ヶ月で 1 年生存率および 5 年生存率はそれぞれ 56.3%、46.5%であり、22 ヶ月で生存曲線はプラトーとなった。生存に対する危険因子としては男性 (HR 3.15) および移植前非寛解 (HR2.70) 症例が多変量解析により同定された。北海道における ATL に対する同種移植成績は既報と比較して良好であった。危険因子は従来との報告と同様の結果であった。

D. 考察

これまで、HTLV-1 非侵淫地域における ATL に対する治療の報告はほとんど認められない。今回の解析では同種造血幹細胞移植を施行された症例について解析を行った。我々の既報と比較すると治療成績の低下が認められるものの、全国的な解析と比較すると良好な経過であった。これには HTLV-1 の genotype の違い関与している可能性が考えられる。予後因子の解析では既報と同様であり、北海道の特殊性は認められなかった。

E. 結論

北海道における ATL に対する同種移植成績は既報と比較して良好であった。危険因子は従来との報告と同様の結果であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

2012年アメリカ血液学会

G. 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（ATL）に対する HTLV-1Tax 特異的 T 細胞応答賦活化
ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法第 I 相臨床試験

研究分担者：末廣 陽子 九州がんセンター 血液内科 医長

研究要旨

本研究は、ATL に対する HTLV-1Tax を標的とした樹状細胞ワクチン療法の第 I 相臨床試験である。抗ウイルス効果、抗腫瘍効果を誘導することによる新規治療法開発を目的としている。今年度は、3 症例が本登録され内 2 症例が試験を完遂しており、grade2 までの非血液学的有害事象を認めただのみで、安全に施行できている。更に臨床的にも症例 1 は、PR、症例 2 は SD と抗腫瘍効果が得られ、その後も無治療経過観察にて長期に病態の安定を認めている（症例 1: 6 ヶ月、症例 2: 4.5 ヶ月）。本症例は、ATL においてヒトにおける初の樹状細胞ワクチン治療例であり、現在免疫学的効果（Tax 特異的 CTL と制御性 T 細胞の推移、Th1/Th2 サイトカイン）を含めた基礎解析を進めている。症例 2、3 は Mogamulizumab 投与後で、長期に制御性 T 細胞が抑制されている可能性があり、ワクチン投与後の炎症反応増強が予想され慎重な経過観察が必要である一方、抗腫瘍効果が効率的に誘導される可能性があり期待される。

A. 研究目的

本研究班の成人 T 細胞白血病（ATL）同種造血幹細胞移植症例での免疫学的解析で移植片対 ATL 効果(GV-ATL)が観察される症例が認められ、HTLV-1 を標的にした Tax 特異的 CTL 応答を賦活する免疫療法は ATL の治療に貢献できるものと期待されている。本臨床試験は、新規治療法開発を目的に既治療例の ATL 患者に対して、Tax ペプチドパルス成熟自己樹状細胞を投与し、抗ウイルス免疫効果を誘導することでの抗腫瘍効果を期待する。

B. 研究方法

HLA-A*0201、HLA-A*2402、HLA-A*1101 のいずれかを有する既治療例の ATL 患者を対象に、アフレーシスによって得られた末梢血単核球より接着細胞を GM-CSF、IL-4、逆転写酵素阻害剤（zidovudine）添加下で分化誘導後、TNF- α 、KLH、OK432 で成熟化させた樹状細胞に Tax ペプチドをパルスする。得られた樹状細胞は、出荷基準を確認後（生細胞数、表面形質）、2 週毎に計 3 回皮下投与する。本臨床試験の主要評価項目として Tax ペプチドパルス樹状細胞ワクチン投与の安全性の検討、副次評価項目として ATL 患者における樹状細胞製造の実現可能性、Tax 特異的 T 細胞応答の誘導、抗ウイルス(HTLV-1)効果、抗白血病（腫瘍）効果を検討する。

（倫理面への配慮）

本臨床試験は、各共同施設（九州大学病院、東京医科歯科大学病院、九州がんセンター）での倫理委員会の承認を取得している。

C. 研究結果

症例 1: 70 歳男性、ATL 急性型。2011 年 12 月より化学療法(mEPOCH 療法) 4 コース後 SD。2012 年 4 月より Lenalidomide 治療を実施したが AE のため中止後 SD。同年 9 月本臨床試験に登録。樹状細胞製剤の生細胞率 90%以上、無菌試験（細菌、真菌培養、マイコプラズマ検査、エンドトキシン検査）はいずれも陰性であった。細胞の表面形質は CD14-CD11c+, HLA-DR+, CD80+, CD83+, CD86+, CD40+であり、成熟した樹状細胞である事が確認された。樹状細胞ワクチン接種（計 3 回）が終了し経過観察中である（図 1）。主要評価項目である安全性の評価に関しては、現時点までに有害事象として接種部発赤、硬結(G1)、発熱(G2)、皮膚炎(G2)、下痢(G1)が認められたが、皮膚炎は外用ステロイド剤、発熱は NSAIDs 内服にてコントロール可能であった。検査値異常としては肝胆道系酵素上昇(G2)、Cr 上昇(G2)、アルブミン低下(G2)、貧血(G3)、血小板減少(G2)と非血液毒性は grade2 に止まり、これらの異常値も経時的に改善を認めている（表 1）。