

36. Yamochi T, Morita Y, Yamochi T, Sasaki Y, Watanabe N, Ogawa S, Utsunomiya A, Hamaguchi I, Uchimaru K, Nakauchi H, Watanabe T: Search for cancer stem cells in ATL. 第72回日本血液学会学術集会, 2010年9月24-26日, 横浜.
37. 眞鍋香澄, 高松尚文, 丸塚浩助, 日高智徳, 中畑新吾, 前田宏一, 齊藤祐介, 濱崎誠, 一ノ瀬孝子, 岩田喬子, 畠山金太, 鶴飼由範, 岡山昭彦, 黒沢仁, 浅田祐士郎, 宇都宮與, 森下和広: CADM1特異抗体を用いた ATLL (成人 T 細胞白血病・リンパ腫) 診断・治療法の開発. 第72回日本血液学会学術集会, 2010年9月24-26日, 横浜.
38. Choi I, Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Okamura J: Antiviral effect of allo-SCT with RIC for ATLL: Short and long-term kinetics of HTLV-1 proviral load. The 1st ISCT Asia-Pacific Regional Meeting, Miyazaki, Japan, October 17-20, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）

分担研究報告書

ATL 及び悪性リンパ腫に対する移植ソース別の同種移植解析

研究分担者：谷口 修一 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 血液内科 部長

研究分担者：和気 敦 国家公務員共済組合連合会虎の門病院分院 血液内科 部長

研究要旨 成人 T 細胞白血病 (ATL) は HTLV-I 感染高齢者に発症する難治性の悪性リンパ腫 (ML) で、化学療法での長期生存例は少なく、同種造血幹細胞移植の有効性が示唆されている。近年、前処置を骨髄破壊的前処置から軽減する (ミニ移植) ことで、より高齢者でも同種造血幹細胞移植が可能となり、登録から移植までに時間がかからない臍帯血移植が急増しているが、ATL に対する同種移植のレジストリーデータ解析では臍帯血移植は有意に生存率が低い。

今回、当科で施行した ATL を含めた悪性リンパ腫 (ML) 全体に対する同種移植症例を移植ソース別に解析した。ML 計 209 例 (ATL 51 例) で、移植ソースの内訳は血縁間同種移植 (rSCT) 50 (11) 例、非血縁骨髄移植 (uBMT) 53 (9) 例、臍帯血移植 (CBT) 106 (31) 例であった。移植成績は、ML (非 ATL) 群の 3 年無再発生存率 (PFS) で 32.5% (27.6-42.7)、ATL 群は 22.8% (9.8-31.7)、移植ソース別 3 年 OS は rSCT 31.0%, u-BMT 50.3%, CBT 20.3% ($p < 0.0001$) と有意に CBT で不良だったが、OS に関する多変量解析では PS 不良 (PS0-2vs3) と移植時病期 (CR/PRvsPD/REF) だけが有意な予後因子で CBT は有意な予後不良因子ではなかった。ATL 群内解析でも全体では CBT が不良だったが CR/PR/SD の良好病期での生存率は移植ソース間で差を認めなかった ($p = 0.677$)。よりよい移植時病期で移植に望めば ATL に対する臍帯血移植は良好な移植成績を得られる可能性がある。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する同種造血幹細胞移植 (alloSCT) の有効性が示唆されている。中でも骨髄非破壊的移植 (ミニ移植) は、臓器障害を有する高齢者にも安全に施行可能なことが示されつつあるが、臍帯血を用いたミニ移植 (reduced intensity cord blood transplantation: RICBT) は高率かつ短期で移植ドナーを確保し得る同種移植法として期待される。

虎の門病院血液科では、フルダラビン、メルファランと低線量全身放射線照射 (TBI) を軸に移植片対宿主病 (GVHD) 予防を変更しつつ、各種血液疾患に RICBT を施行してきたが ATL に対する成績は不良であった。今回、当院で施行した ATL を含めた悪性リンパ腫 (ML) に対する同種移植成績を移植ソース別に解析し、ATL に対する臍帯血移植成績不良の要因を明らかにし、ATL に対する RICBT の可能性を再検討する。

B. 研究方法

2000 年 1 月から 2009 年 12 月までに当科で ATL を含めた ML に対して施行した同種移植症例 220 のうち、移植時 PS4 と活動性感染症例を除外した 209 例を対象とした。疾患内訳は、ATL 51 例、HL 11 例、中悪性度 B-NHL 72 例、低悪性度 B-NHL 45 例、T-NHL (非 ATL) 31 例。年齢中央値は 54 才 (18-79)。疾患病期は寛解期 (CR) が 27 例、部分寛解期 (PR) が 38 例、進行期 (PD) が 144 例 (68.9%) であった。移植ソースの内訳は血縁者間 (rSCT) 50 例、非血縁骨髄 (uBMT) 53 例、臍帯血 (CBT) 106 例であった。移植後観察期間が生存例中央値で 1720 日 (109-2430)。3 年全生存率 (OS)、無増悪生存率 (PFS) を算出し、各々に患者背景や移植背景が及ぼす影響を検討した。

(倫理上の問題点に対する配慮)

本研究における臍帯血ミニ移植は臨床第 I/II 相試験であり、本療法の有効性と危険性について十分な説明を行い、文書で同意が得られた者につ

いてのみ施行した。

C. 研究結果

ML (非 ATL) 症例158例での1年/3年 OS は、41.7% (95%CI:33.8-49.6)/39.4% (31.5-47.2)、1年/3年 PFS は39.4% (31.9-47.2)/32.5% (27.6-42.7)、ATL 症例51例の1年/3年 OS は、41.0% (26.1-55.9)/24.5% (10.1-38.9)、1年/3年 PFS は、34.4% (22.4-41.8)/22.8% (9.8-31.7) で、両群間に有意な差は検出されなかった。移植ソース別1年/3年 OS は、血縁39.9%/31.0%、非血縁骨髓53.9%/50.3%、臍帯血26.0%/20.3%で有意に臍帯血が不良だった ($p < 0.0001$)。病期別にみると、CR/PR 群では移植ソース別成績に差はなく ($p = 0.36$)、PD 群ではCBが不良 ($p = 0.04$) だった。OS に影響する因子の多変量解析では、移植前病期 (CR-PR vs PD) と移植前 Performance status (PS) (0-2 vs 3) が各々、 $p = 0.003$ 、 $p < 0.0001$ と有意な因子だったが、年齢、疾患 (ATL vs 非 ATL)、移植ソースはいずれも有意な予後因子として検出されなかった。

ATL では、血縁 ($n = 11$)、非血縁骨髓 ($n = 9$)、臍帯血 ($n = 31$) のソース間で、年齢 (49 vs 49 vs 56)、移植時病期、PS が臍帯血で不良で、前処置強度や診断から移植までの日数には差を認めなかった。OS, PFS とも臍帯血で有意に不良だったが、移植時病期がCR、PR、または stable disease (SD) の群では、移植ソース間でOS ($p = 0.677$)、PFS ($p = 0.716$) とも差を認めなかった。

臍帯血移植は1例を除き全例がミニ移植であったが、GVHD 予防法別にみると、観察期間中央値は220日とまだ短い、FK506+Mycophenolate mofetil (MMF) 群では OS, PFS とも50.0%と他の群 (CsA 単独 or FK506単独) に比べ良好だった。

D. 考察

ATL は高齢者に多く、かつ極めて難治性の HTLV-I がもたらす血液疾患である。なかでも急性型やリンパ腫型では化学療法での50%生存期間は最長の報告でも13ヶ月程度である。同種造血幹

細胞移植は有望な根治的移植法であるが、岡村班で研究している PBSCT でのミニ移植に比べ、CBT でのミニ移植は未だ満足すべき成績が得られず、本年報告されたレジストリーデータ解析でも CBT は生存に関して有意に予後不良な因子とされている。我々の単施設での検討でも、CBT は悪性リンパ腫全体においても ATL においても一見成績不良にみえるが、今回の検討で、ATL における CBT 成績不良は、移植時病期や PS の影響が強い可能性が示唆された。過去に我々は、フルダラビン、メルファラン、全身放射線照射 4~8Gy の前処置で CsA もしくは FK506 単剤による GVHD 予防で進行期 ATL を対象とした CBT を行ったが早期の治療関連死と晩期再発が多く、長期生存は10%以下であった。そこで最近我々は移植時期を移植時病期が良好な時期に GVHD 予防も MMF で強化する試みを行っているが、短期的には生存率が向上している。移植時病期がよい状態で RICBT を行えば、早期の治療関連死亡は減少しており、晩期再発の増加がなければ有望な移植法と考える。

RICBT は、ドナーの安全性や移植コーディネーターに要する期間が短いなど、明らかに有利な点があり、移植成績の向上が期待される。

E. 結論

悪性リンパ腫 (ATL を含む) に対する同種移植の成績比較から、より早期で全身状態の良い患者を選択できるように工夫すれば、臍帯血ミニ移植を ATL の治療戦略のひとつとして位置づけられる可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Waki F, Masuoka K, Wake A, Takahashi S, Takaue Y, Taniguchi S. et al. Feasibility of Reduced-intensity Cord Blood Transplantation as Salvage Therapy for Graft Failure: Results of a Nationwide Survey of 80 Adult Patients. Biol Blood Marrow Transplant. 2010.
2. Masuoka K, Uchida N, Ishiwata K, Takagi

- S, Tsuji M, Yamamoto H, Seo S, Matsuno N, Wake A, Makino S, Yoneyama A, Taniguchi S. What is the upper age limit for performing allo-SCT? Cord blood transplantation for an 82-year-old patient with AML. *Bone Marrow Transplant*. 2010.
3. Takagi S, Ota Y, Uchida N, Takahashi K, Ishiwata K, Tsuji M, Yamamoto H, Asano-Mori Y, Matsuno N, Masuoka K, Wake A, Miyakoshi S, Ohashi K, Taniguchi S. Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for myelofibrosis. *Blood*;Jul 29;116(4):649-52, 2010.
4. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, Uchida N, Suzuki N, Sone A, Najima Y, Ozawa H, Wake A, Taniguchi S, Shultz LD, Ohara O, Ishikawa F. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med*;2(17):17-9,2010.
5. Morita-Hoshi Y, Mori SI, Soeda A, Wakeda T, Ohsaki Y, Shiwa M, Masuoka K, Wake A, Taniguchi S, Takaue Y, Heike Y. Identification of molecular markers for pre-engraftment immune reactions after cord blood transplantation by SELDI-TOF MS. *Bone Marrow Transplant*. Nov;45(11):1594-601, 2010.
6. Saito Y, Uchida N, Tanaka S, Suzuki N, Tomizawa-Murasawa M, Sone A, Najima Y, Takagi S, Aoki Y, Wake A, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F. Induction of cell cycle entry eliminates human leukemia stem cells in a mouse model of AML. *Nat Biotechnol*. 2010 Mar;28(3):275-80.
7. Nishida A, Yamamoto H, Ohta Y, Karasawa M, Kato D, Uchida N, Wake A, Taniguchi S. T-cell post-transplant lymphoproliferative disorder in a patient with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic

PBSC transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Aug;45(8):1372-4.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

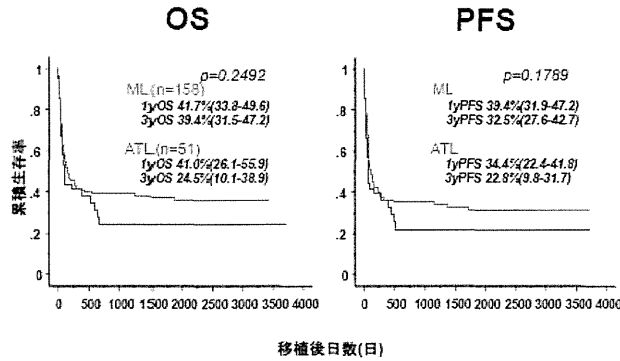
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

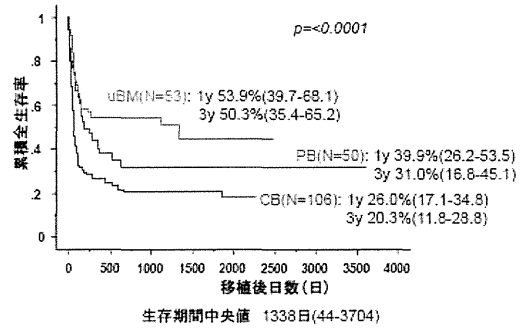
全症例(n=209)の生存率



100723

平成22年度第1回腫瘍薬学大会

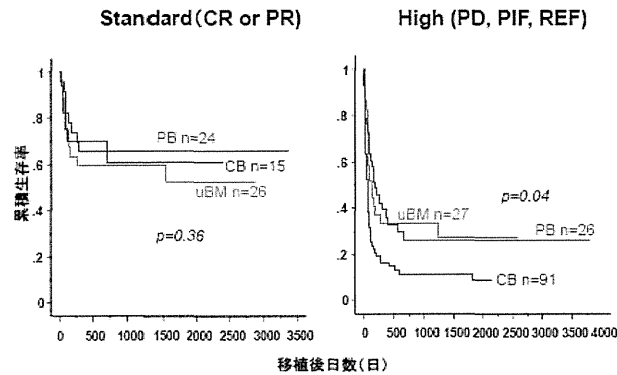
移植ソース別の全生存率



100723

平成22年度第1回腫瘍薬学大会

病期(リスク)別にみた移植ソース別の全生存率



100723

平成22年度第1回腫瘍薬学大会

OSに影響する因子の多変量解析

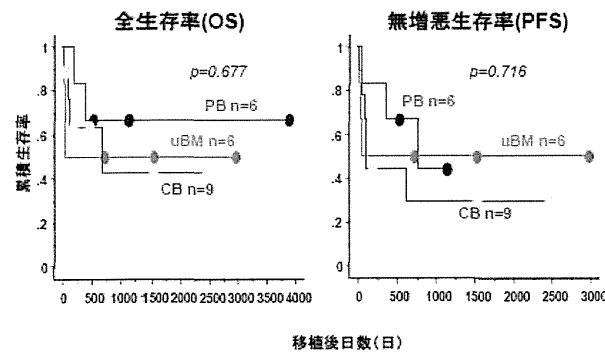
Factors	p	relative risk	95%CI
年齢: 55歳未満 vs 55歳以上	0.1111	1.241	0.840-1.833
疾患: 非ATL vs ATL	0.8070	1.130	0.710-1.797
病期: CR/PR vs PD/REF	0.003	2.817	1.422-5.579
PS: 0-2 vs 3	<0.0001	3.300	2.146-5.076
移植ソース: CB vs PB	0.7816	0.789	0.147-4.223
CB vs u-BM	0.1860	0.701	0.414-1.187

Other variables: 性別, フルミニ, TBI線量(8Gy以上), HLA一致度

100723

平成22年度第1回腫瘍薬学大会

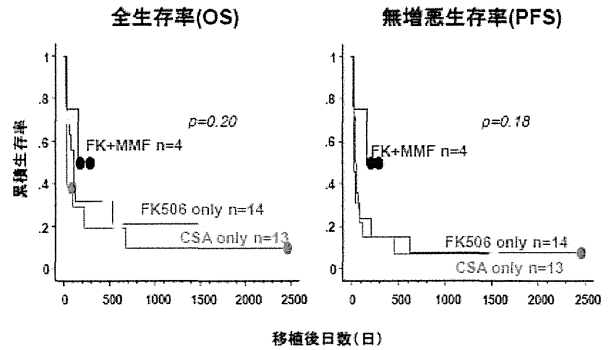
低リスク(CR,PR,SD)での移植ソース別ATL生存率



100723

平成22年度第1回腫瘍薬学大会

臍帯血移植でのGVHD予防法別ATL生存率



100723

平成22年度第1回腫瘍薬学大会

研究要旨 ATL に対する同種造血幹細胞移植の有用性が報告されているが、未だ不明な点も多い。また、我々は北海道における良好な移植成績を報告してきたが、九州などの ATL 好発地帯と比較して病態が異なる可能性が考えられている。北海道大学病院および札幌北楡病院において同種移植を施行した28例の ATL 症例に対する後方視的解析を施行した。フォローアップ期間中央値16ヶ月で、3年全生存率58%、3年無進行生存率49%であった。死亡した13例中、9例が非再発死亡であり、大きな問題であると考えられた。単変量解析において男性および移植前病態が PD であることが全生存率に關与する予後不良因子として抽出されたが、症例数が少ないため、確固とした結論を得るためには、さらなる症例の蓄積が必要である。

A. 研究目的

ATL に対する同種造血幹細胞移植の有用性を検討する。

B. 研究方法

北海道大学病院ならびに札幌北楡病院において2000年10月から2010年4月までの期間に同種造血幹細胞移植を施行された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。個人情報特定できないよう配慮した。

C. 研究結果

症例数は28症例で、年齢中央値は57歳。急性型は14例、リンパ腫型は13例であり、移植前の病態は CR が16例、PR が8例、PD が4例であった。ドナーは HLA 一致同胞が13例、非血縁ドナーが15例であった。骨髄破壊的移植が9例、骨髄非破壊的移植が19例であった。好中球生着は96%の患者で認められた。急性 GVHD は67%で認め、慢性 GVHD は87%の患者で認められた。フォローアップ期間中央値16ヶ月で、3年全生存率58%、3年無進行生存率49%であった。死亡した13例中、4例が ATL、9例が非再発死亡であった。

D. 考察

我々の施設では ATL に対する良好な移植成績を報告してきたが、移植後非再発死亡が35.5%と大きな問題である。単変量解析において、男性および移植前病態が PD であることが全生存率、無進行生存率の両方に關与し、急性 GVHD（Grade II-IV）および GVHD 予防にタクロリムスを用いることが、無進行生存率のみに關与する予後不良因子として抽出された。我々は非血縁の HLA アリル不一致ドナーに対してタクロリムスを用いており、HLA 一致度の違いや GVHD に關連している可能性が考えられる。男性患者の移植予後に關しては我が国からの報告（Hishizawa M, et al. Blood. 2010 26;116(8):1369-76.）とも一致しており、今後の検討課題と考えられた。

E. 結論

北海道大学病院および札幌北楡病院において同種移植を施行した28例の ATL 症例の移植成績を解析した。非再発死亡が大きな問題であり、男性患者への移植および GVHD に対する予防法などが今後の課題と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

なし

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

臨床試験の計画と解析，ATL レトロスペクティブデータ

研究分担者：山中 竹春 九州がんセンター 臨床研究部

腫瘍統計学研究室 研究員

研究要旨 本研究班でこれまでに実施した ATL の血縁者間骨髄移植に関する 2 つの臨床試験データの統合解析をおこなった。

A. 研究目的

本研究班でこれまでに実施してきた ATL に対する RIST を用いた血縁者間骨髄移植の 2 つの臨床試験データは世界で初めて実施された ATL に対する移植治療の前向き試験データである。これらを統合したレトロスペクティブ解析をおこなった。

B. 研究方法

血縁間骨髄移植の臨床試験データの解析：本研究班でこれまでに実施した血縁者間骨髄移植に関する RIST の臨床試験データ（第 1 期、第 2 期計 29 例）に関するレトロスペクティブ解析をおこない、生存時間、ウイルス量の経時的変化などを探索した。

C. 研究結果

血縁間骨髄移植の臨床試験データの解析：本登録された 29 例に対する検討では、11 人が原病死、8 人が治療関連死であった。対象症例の中でもっとも遅く死亡が観測されたのは登録から 26 ヶ月後であった。29 人の 5 年生存率は 34%（95%CI:18-51%）、追跡期間中央値は 82 ヶ月であった。その他、生存症例の臨床背景について詳細な集計をおこなった。

生存している 10 例における HTLV-1 のウイルス量の経時的変化についても要約した。ATL は HTLV-1 感染が原因で発症する疾患であるため、HTLV-1 ウイルス量の経時的変化については多くの研究者が興味を寄せるところであるが、前向き研究として、その変化を検討したデータはない。今回、移植後の長期生存 10 例に対する検討をおこ

なった結果、移植後、長期生存例でもウイルス量の高値の状態が続く症例、逆にウイルス量が減少して検出限界下のレベルに至る症例が存在することが判明した。さらに、いったん検出限界以下のレベルになるものの、再びウイルス量の増加が見られる症例もいた。今回の検討ではこの 3 通りであるが、多様なパターンを示していることが判明したので今後のさらなる研究が必要である

D. 考察

血縁者間の骨髄移植によって、一部の症例に疾患治癒と思われる状態が観測されたのは有望な結果であるといえる。しかしながら、移植関連死亡率は高いことは今後の重大な検討課題である。また、移植が実施可能な症例は限られており、また ATL という疾患の特徴から前処置を RIST とした非血縁者間での移植の実施可能性を検討することは重要である。ウイルス量の経時的変化データと併せて現在本研究班で実施中の臨床試験の結果を待ちたい。

E. 結論

29 人の 5 年生存率 34%（95%CI:18-51%）は治癒が困難と認識されていた ATL にとっては有望な結果と考えられる。今後、ATL に対する治療戦略へのさらなる展望が得られることが期待される。

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. 学会発表

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法におけるプロウイルス解析

研究分担者：佐藤 賢文 京都大学ウイルス研究所 助教

安永純一朗 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、一部のキャリアに成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia:ATL) を引き起こす。ATL は予後不良な血液悪性腫瘍であり、治療法の開発が望まれている。白血病細胞ゲノムに組み込まれた HTLV-1 プロウイルスは ATL 細胞に残る唯一の感染の証拠であり、HTLV-1 プロウイルスの解析は残存 ATL 細胞の検出のみならずウイルス発がん機構を明らかにすることも期待される。

造血幹細胞移植後に髄液中のリンパ球数の増加を認めた症例が存在したため、微量の髄液中リンパ球からでも HTLV-1 の組み込み部位を標的として微小残存腫瘍を検出する検査方法を確立した。

また一方で、ATL 細胞中のプロウイルス全塩基配列を決定し nonsense 変異が多数存在することを明らかにした。変異は tax, rex, p12, p30, p13 など殆ど全てのウイルス遺伝子に存在したが、HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 遺伝子のみには検出されなかった。この結果から ATL 発がん過程においてウイルス遺伝子 HBZ の重要性が示唆された。

A. 研究目的

ATL が独立した疾患として提唱され、その原因ウイルスである HTLV-1 が発見され 30 年が経過したが ATL の治療成績は不良なままであった。しかし、最近の血液幹細胞移植はその治療成績を大きく改善しつつある。ATL 細胞に残る唯一の感染の証拠であるプロウイルスを解析し、その有効性の機序を明らかにすることが本研究の目的である。

B. 研究方法

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

【方法】 末梢血、リンパ節あるいは髄液中リンパ球からゲノム DNA を抽出し、HTLV-1 プロウイルスを増幅し、その全塩基配列を決定するとともに、一部の ATL 症例においては ATL 細胞におけるプロウイルスの組み込み部位を決定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) 造血幹細胞移植後に髄液中のリンパ球数の増加を認めた症例を経験した。そこで髄液中リンパ球をトリ細胞株と共に遠沈回収し DNA を抽出した。HTLV-1 の組み込み部位を標的として微小残存腫瘍を PCR で検出する検査方法を確立した。

2) ATL 症例における HTLV-1 プロウイルス配列

ATL 症例におけるプロウイルスをタイピングし、5', 3' LTR を有するプロウイルスを増幅し direct sequence 法で塩基配列を決定した。その結果、gag, pol, env の構造遺伝子だけでなく、tax, rex の調節遺伝子、p12, p13, p30 のアクセサリ遺伝子に多くの non-sense 変異、欠失が見出されたが、HBZ 遺伝子には全くそのような変異・欠失は認められなかった。この結果は HBZ 遺伝子が ATL 細胞の増殖に極めて重要であるという我々の以前の結論を支持している。tax 遺伝子には 60 例中、10 例でナンセンス変異、欠失等を認めた。

ナンセンス変異は同定された 29 変異のうち、27 変異がトリプトファンに起こっていた。変異部分の塩基配列をみると TGG が TGA, TAG という

ストップコドンに変わっていた。この G to A 変異はレトロウイルスの逆転写反応の際に APOBEC3G によって起こる変異と一致しており、APOBEC3G の関与が疑われた。全プロウイルス中の塩基配列の解析から G to A 変異は TGG, CGG を標的にしており APOBEC3G の標的配列と一致していた。

D. 考察

ATL 細胞は組織浸潤性が高く様々な臓器に浸潤することが知られている。特に中枢神経系への浸潤は、生命予後や患者の QOL の低下に大きな影響を与えることから浸潤の有無に関して正確に診断し、適切なタイミングで必要な治療を行うことが重要である。しかしながら、髄液中の細胞数が少ない段階では、リンパ球を回収するために遠心して細胞をペレットにすることが難しく、回収効率が低いと言う問題が考えられる。今回その問題を克服するために、回収した髄液とトリ細胞株とを混合し遠心することで、効率的に細胞を回収することが出来た。回収細胞から抽出した DNA にはヒト DNA の存在が確認されたが、ATL 細胞、感染細胞は検出限界以下であった。今回確立した髄液中の少ないリンパ球回収法と、腫瘍細胞特異的な高感度 PCR 検出法とを組み合わせることで、ATL 細胞の中枢神経浸潤の有無に関して、より正確な診断が可能であった。

今回の解析から HTLV-1 プロウイルスのナンセンス変異は APOBEC3G によって生じていることが示唆された。APOBEC3G はレトロウイルスの逆転写の段階でナイマス一本鎖 DNA をターゲットとして C-to-T 変異を起こす。このためプラス鎖では G-to-A 変異を起こし、ナンセンス変異をつくりウイルスの複製を阻害する。HTLV-1 プロウイルスの G-to-A 変異部位は APOBEC3G の標的配列と一致しており、これらの G-to-A 変異が逆転写の段階で APOBEC3G によって発生したことを示している。つまり ATL 患者、HTLV-1 キャリアの HTLV-1 プロウイルスに認められたナンセンス変異は逆転写の段階で生じていることが示唆された。

ATL 症例では HBZ 遺伝子にはナンセンス変

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

E. 結論

ATL 細胞の中枢神経浸潤の有無について早期診断が可能な検出系を確立した。

今年度の結果から HBZ は全ての症例で保存されていたことから HBZ 遺伝子の発がん過程における重要性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satou Y and Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: How the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *J Clin Exp Hematopathol*, 50(1):1-8, 2010.
2. Fan J, Ma G, Nosaka K, Tanabe J, Satou Y, Koito A, Wain-Hobson S, Vartanian JP, Matsuoka M. APOBEC3G generates nonsense mutations in human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in vivo. *J Virol*. 4(14):7278-87, 2010.
3. Yasunaga J, Jeang KT. Cellular checkpoint dysregulation and HTLV-1 transformation. In: Lever A, Jeang KT, Berkhout B, eds. RECENT ADVANCES IN HUMAN RETROVIRUSES: PRINCIPLES OF REPLICATION AND PATHOGENESIS. Hackensack, NJ: World Scientific Publishing; 2010.
4. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Induces T-Cell Lymphoma and Systemic Inflammation In Vivo. *PLoS Pathog*, 7:e1001274, 2011.

2. 学会発表

1. 菅田謙治、佐藤賢文、原英樹、光山正雄、松岡雅雄：HBZ expression in CD4+T cells impairs cell-mediated immunity against *Listeria monocytogenes*：第72回日本血液学会学術集会、横浜、2010年9月24-26日
2. 佐藤賢文、Jun Fan、馬広勇、野坂生郷、田邊順子、松岡雅雄：APOBEC3G generates nonsense mutation in HTLV-1 proviral genome in vivo：第72回日本血液学会学術集会、横浜、2010年9月24-26日
3. 松岡雅雄、佐藤賢文、安永純一朗：The HTLV-1 bZIP Factor gene is responsible for leukemogenesis of adult T-cell leukemia：第72回日本血液学会学術集会、横浜、2010年9月24-26日
4. 中西梓、佐藤賢文、松岡雅雄：HBZ はアポトーシス促進性分子である Bim の発現を抑制しアポトーシスを阻害する：第69回日本癌学会学術総会、横浜、2010年10月22-24日
5. 佐藤賢文、安永純一朗、趙鉄軍、大島孝一、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP Factor のトランスジェニックマウスは慢性炎症性疾患と T 細胞リンパ腫を起こす：第69回日本癌学会学術総会、横浜、2010年10月22-24日
6. 趙鉄軍、佐藤賢文、今村健志、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor はコアクチベーター p300/CBP を介して TGF-beta シグナルを亢進する：第69回日本癌学会学術総会、横浜、2010年10月22-24日
7. 中西梓、佐藤賢文、松岡雅雄：HBZ はアポトーシス促進性分子である Bim の発現を抑制しアポトーシスを阻害する：第69回日本癌学会学術総会、横浜、2010年10月22-24日
8. 佐藤賢文、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor による T 細胞発がん機構：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7-9日
9. 菅田謙治、佐藤賢文、松岡雅雄：HBZ 発現は IFN-産生を抑制し、HSV-2感染に対する細胞性免疫を障害する：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7-9日

10. 田口奈々絵、佐藤賢文、Paola Miyazato、吉田美香、松岡雅雄：HTLV-1 bZIP factor による炎症惹起機構：第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月7-9日

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

研究要旨 成人 T 細胞白血病リンパ腫（ATL）は化学療法のみでは治癒困難であるが、近年同種造血細胞移植により治癒が得られることが明らかにされつつある。しかし、適切なドナーが得られない場合も多い。我々は ATL の患者に適切なドナーが得られない中、臍帯血をドナーソースとして選択したが、生着が得られ、救済療法として、HLA 不一致血縁からの移植を行い、疾患の寛解を維持し得た症例を経験した。残念ながら寛解期に感染症により死亡したが、今後の治療研究として検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病リンパ腫（ATL）は化学療法のみでは治癒困難であるが、近年同種造血細胞移植により治癒が得られることが明らかにされつつある。しかし、発症年齢が高齢である本疾患においては、骨髄破壊的前処置を用いた造血細胞移植療法の適応は限られる。そこで本研究班ではこれまで一貫して ATL を対象とした骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血細胞移植の安全性、有効性を検証して来た。現在、HLA 一致血縁の末梢血幹細胞または HLA 一致の非血縁骨髄をドナーとした多施設共同臨床試験が進行中で、症例集積中である。しかし、適切なドナーが得られない場合も多く、ドナーソースの拡大は避けられない問題となっている。ATL に対する HLA 一致血縁ドナー、HLA 一致非血縁ドナー以外のドナーを用いた造血細胞移植においては日常診療においてすでに行なわれている部分もあるが、安全性、有効性が十分に評価されているとは言い難い。我々は ATL の患者に適切なドナーが得られない患者に対し、他のドナーソースを用いて移植を行った。

B. 研究方法

52歳女性。ATL 急性型の患者。臍帯血をドナーソースとして選択し、同種造血細胞移植を行った。

（倫理面への配慮）

同種移植の危険性について十分に説明し、同意を得た。

C. 研究結果

TBI+CY の骨髄破壊的前処置を用いて臍帯血移植を行ったが、移植片拒絶（primary graft failure）であった。そこで、HLA 2 座不一致の弟をドナーとして同種末梢血間細胞移植を施行。生着が得られ、ATL は完全寛解となった。安定したドナーキメリズムを得たが、合併症であった C 型肝炎が肝硬変に進展。寛解期に感染症と思われるイベントにて死亡された。

D. 考察

十分な移植前処置にも関わらず臍帯血は拒絶された。しかしその後に行なった HLA 不一致血縁間移植は生着を得た。しかし生着については単にドナーソースの違いだけでなく、前処置や移植時の患者の状態も考慮し、慎重に評価する必要がある。

E. 結論

ドナーソースの拡大は急務である。しかし、安全性の評価が十分とは言えず、今後は臨床研究として前方視的に検証する必要がある。

F. 健康危険情報

HBV に比し、HCV も移植時のリスクとして検討する必要があるかもしれない。

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. 学会発表

1. 崔日承、本多絵美、宮下要、油布祐二、鵜池直邦：臍帯血移植後の拒絶に対して HLA 二座不一致末梢血幹細胞移植を行なった成人 T 細胞白血病・リンパ腫の一例，第32回に本造血細胞移植学会総会，2010年2月19日，浜松.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

成人 T 細胞白血病（ATL）に対する HTLV-I Tax 特異的 T 細胞応答賦活化

ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法第 I 相臨床試験

研究分担者：末廣 陽子 九州がんセンター 血液内科 医長

研究要旨 成人 T 細胞白血病（ATL）移植症例の中には移植片対 ATL 果（GV-ATL）が観察される症例が認められ ATL に対する免疫療法の可能性が注目されている。本研究では、既治療例の ATL に対して Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチドを添加した成熟自己樹状細胞を投与し、抗ウイルス免疫効果を誘導することで抗腫瘍効果を得ることを目的としている。新規治療法開発のための臨床試験計画、樹状細胞調整における標準作業手順書作成、臨床試験開始のための登録システムの立ち上げを推進した。

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。本臨床試験は、樹状細胞用量漸増試験の安全性を検証する第 I 相臨床試験とし、樹状細胞製造の実現可能性、投与された患者における Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞応答および臨床効果についても検討する計画である。

B. 研究方法

HLA-A*0201、HLA-A*2402、HLA-A*1101 のいずれかを有する既治療例の ATL 患者を対象に、アフレーシスによって得られた末梢血単核球より接着細胞を GM-CSF、IL-4、逆転写酵素阻害剤（zidovudine）添加下で分化誘導後、TNF- α 、KLH、OK432 で成熟化させた樹状細胞に Tax ペプチドをパルスする。得られた樹状細胞は、出荷基準を確認後（生細胞数、表面形質）、2 週毎に計 3 回皮下投与する。本臨床試験の主要エンドポイントとして Tax ペプチドパルス樹状細胞ワクチン投与の安全性の検討、副次エンドポイントと

して ATL 患者における樹状細胞製造の実現可能性、Tax 特異的 T 細胞応答の誘導、抗ウイルス（HTLV-1）効果、抗白血病（腫瘍）効果を検討する。

（倫理面への配慮）

本臨床試験は、各共同施設での倫理委員会の承認を取得している。

C. 研究結果

臨床試験実施に向けて臨床試験実施計画書、患者説明および同意書を作成し、九州大学病院倫理委員会の承認を取得。また樹状細胞調整における前臨床試験より得られた知見から、標準作業手順書を作成。臨床スケールに沿った大量細胞調整を行う上での問題点を検証するため、健常人ドナーからのアフレーシス法によって得られた検体で同一工程の安全性、適格性の検証を実施している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Jean-Eric Ghia, Nan Li, Huaqing Wang, Suehiro Y, Jacques Mallet and Waliul I Khan Serotonin activates dendritic cell function in the context of Gut Inflammation AJP 2010 (in press)
2. Inoue T, Sugiyama D, Kurita R, Oikawa T, Kulkeaw K, Kawano H, Miura Y, Okada

M, Suehiro Y, Takahashi A, Marumoto T, 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. 2010 Apr 8. [E pub]

3. 村橋（伊賀）睦了、土方康基、末廣陽子、他. 抗腫瘍免疫療法における新戦略. 臨床血液2010 (in press)

ATL に対する臍帯血移植の治療成績の解析

研究分担者：福島 卓也 長崎大学病院 血液内科 講師

研究要旨 長崎県における成人 T 細胞白血病/リンパ腫（ATL）に対する臍帯血移植の治療成績を解析した。対象は長崎県の 3 移植施設で CBT を施行した 27 例の ATL 症例。年齢中央値：52(41-63)歳、急性型/リンパ腫型：17/10、移植時寛解/非寛解：16/11、骨髄破壊的前処置/非破壊的前処置：9/183 であった。3 年全生存率は 31.4%、解析の時点で 16 例が死亡しており、うち 11 例が移植後 6 か月以内の死亡であった。そしてその死因は感染症 6 例、多臓器不全 2 例、再発 3 例であった。移植後 2 年以上の長期生存例が 4 例得られており、それらはいずれも骨髄非破壊的前処置による症例であった。ATL に対する CBT は現時点では移植関連死亡の危険性の高い治療法であるが、移植関連毒性を軽減するための工夫により治療成績の向上が得られる可能性があると考えられる。

A. 研究目的

成人 T 細胞白血病/リンパ腫（ATL）に対しての血縁者間および非血縁者間同種造血幹細胞移植（allo-HCT）が一定の治療効果をもたらすことは当班の研究を通して明らかになりつつある。一方 ATL に対する臍帯血移植（CBT）については移植関連死亡、特に感染症による死亡のリスクが高いことが報告されており、有効性に関する評価は未だ定まっていない。ただ移植法の工夫、補助療法の進歩により CBT 後の長期生存例も観察されるようになってきている。

長崎大学病院とその関連病院で施行された ATL に対する CBT に関して後方視的解析を行った。

B. 研究方法

2004年10月～2010年7月に長崎大学病院とその関連移植2施設（佐世保市立総合病院、国立病院長崎医療センター）で CBT が施行された ATL 27 症例を対象に後方視的解析を行った。

（倫理面への配慮）

患者データは、匿名化番号にて収集され、個人が直接同定される情報は含まないよう配慮した。また、研究中に個人情報漏洩することの内容十分に注意した。

C. 研究結果

年齢中央値：52（41-63）歳、男/女：18/9、急性型/リンパ腫型：17/10、移植時寛解/非寛解：16/11、骨髄破壊的移植/治療強度を減弱した移植（RIST）：9/18。全症例の3年生存率：31.4%。解析の時点で16例が死亡しており、10例が非寛解例であった。また移植後12か月以内の死亡が14例で、死因は感染症7例、多臓器不全2例、再発5例であった。そして6か月以内の早期死亡は11例で死因は感染症6例、多臓器不全2例、再発3例であった。移植後2年以上の長期生存例が4例得られ、寛解3例、非寛解1例であった。前処置法はいずれも fludarabine+melphalan+2～4Gy TBI であった。

D. 考察

現時点では、ATL に対する CBT は依然として早期の移植関連死亡の多い治療法とみなされる。ただ 4 例で長期生存が得られ、うち 3 例が寛解例であったこと、いずれも RIST であったことは注目すべき点と思われる。今後移植関連毒性を軽減するための工夫を加えた移植法の開発により治療成績の向上が得られる可能性があると考えられる。

E. 結論

ATL に対する CBT は移植関連死亡が多いが、長期生存例も観察されており、今後至適移植法あ

るいは補助療法の確立を目指して症例を蓄積していく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishitsuka K, Fukushima T, Tsukasaki K, Tobinai K.: Is Zidovudine and Interferon-Alfa the Gold Standard for Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma? J Clin Oncol. 2010 Oct 4. [Epub ahead of print]
2. Ando K, Miyazaki Y, Sawayama Y, Tomimaga S, Matsuo E, Yamasaki R, Inoue Y, Iwanaga M, Imanishi D, Tsushima H, Fukushima T, Imaizumi Y, Taguchi J, Yoshida S, Hata T, Tomonaga M: High expression of 67 kDa laminin receptor relates to the proliferation of leukemia cells and increase the expression of GM-CSF receptor. Exp Hematol, in press.

2. 学会発表

1. 糸永英弘、田口潤、堀尾謙介、今泉芳孝、今西大介、吉田真一郎、福島卓也、波多智子、宮崎泰司：骨髄線維化を伴った造血器悪性腫瘍3例に対する骨髄非破壊的臍帯血移植. 第32回日本造血細胞移植学会総会 プログラム・抄録集 p235.2010.
2. 牧山純也、田口潤、対馬秀樹、糸永英弘、今泉芳孝、今西大介、福島卓也、波多智子、塚崎邦弘、宮崎泰司、石松祐二、林徳眞吉：Progressive metastatic pulmonary calcification associated with adult T-cell leukemia /lymphoma (ATL). 臨床血液, 51(9), p1148, 2010.
3. 田口正剛、田口潤、今西大介、今泉芳孝、波多智子、福島卓也、塚崎邦弘、宮崎泰司：Coexistence of renal AL amyloidosis and gastrointestinal AA amyloidosis in multiple myeloma patient. 臨床血液, 51(9), p1177, 2010.
4. 福島卓也、森内幸美、吉田真一郎、糸永英弘、田口潤、宮崎泰司：第33回日本造血細胞移植学会総会：長崎県における成人 T細胞白血病・リンパ腫 (ATL) に対する臍帯血移植 (CBT) の治療成績、2011.
5. 松尾真稔、福島卓也、谷口広明、牧山純也、糸永英弘、田口潤、波多智子、宮崎泰司：第33回日本造血細胞移植学会総会：肺真菌症に対し liposomal Amphotericin B (L-AMB) 予防投与により同種移植 (allo-HSCT) を施行し得た ALL2症例、2011.

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白血病再発を抑制する移植片対白血病（GVL）効果を増強する新たなメカニズムについて検討した。ドナー T 細胞はアロ抗原を認識して活性化され、アロ抗原を発現した正常細胞に対し GVHD を誘導し、同じくアロ抗原を発現した白血病に対し GVL 効果を発揮する。このドナー T 細胞が多量のアロ抗原に暴露され続けることにより T 細胞疲弊を起し、GVL 効果を喪失し白血病再発が起こることが判明した。この T 細胞疲弊には T 細胞上の PD1 と標的細胞上の PD-L1 分子の相互作用が関与しており、これを阻害することで喪失した GVL 効果が部分的に回復した。本研究成果は移植後白血病再発の新たな分子メカニズムを世界に先駆けて示すものである。

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。この再発のメカニズムとして、白血病細胞側の耐性獲得が指摘され、graft-versus-leukemia（GVL）効果のエフェクターである T 細胞側の要因はあまり注目されていない。われわれは GVL 効果の喪失が起こる T 細胞側の要因とそのメカニズムについて検討を行った。

B. 研究方法

ドナー T 細胞を活性化するアロ抗原が樹状細胞上に発現するが、graft-versus-host disease（GVHD）の標的細胞である正常上皮細胞には発現しないキメラマウスを作成した。これをレシピエントとして全身放射線照射後に白血病細胞を投与し、骨髄移植を行った。その後の白血病死亡率と、ドナー T 細胞の経時的な機能をモニターした。また肝臓における PD-L1 の発現もモニターした。

（倫理面への配慮）

本研究は九州大学動物実験施設の承認を得ている。

C. 研究結果

移植後にはドナー T 細胞はキメラマウス、コントロールマウスともに樹状細胞が発現するアロ抗

原によって同様に活性化した。T 細胞はその後標的臓器に浸潤し、コントロールでは上皮細胞を攻撃していくが、T 細胞-上皮細胞相互作用によってそれぞれ、PD1, PD-L1 の発現が経時的に亢進し、CD8+T 細胞のサイトカイン産生能、細胞障害活性の減弱がみとめられた。一方、キメラマウスにおいては CD8+T 細胞はアロ抗原の持続的な刺激を受けず、CD8+T 細胞の機能減弱はみられず、細胞障害活性を維持していた。その結果、キメラマウスでは白血病死亡率の有意な増加がみられた。ついで、このキメラマウスにおいて抗 PD-L1 抗体を投与し、PD1/PD-L1 経路を阻害したところ減弱した CD8+T 細胞の機能回復と白血病死亡率の部分的な軽減がみられた。

D. 考察

レシピエント上皮細胞の発現するアロ抗原の持続的な刺激によってエフェクター T 細胞の疲弊が誘導され、GVL が喪失し、白血病再発が起こる新たなメカニズムが証明された。

E. 結論

T 細胞疲弊（T cell exhaustion）が、移植後白血病細胞再発の新たなメカニズムであることを世界に先駆けて証明した。

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 末梢血中 ATL 細胞の正確な評価を行うために Multi-color FACS による解析系の開発を行った。ATL 患者末梢血単核球を CD14により単球をゲートアウトし、CD3/4陽性細胞にゲートをかかけた T 細胞集団を CD3/7展開することにより CD3dim/CD7low 集団として90～99%の純度で ATL 細胞を検出することが可能であった。この系を用いることにより正確に末梢血中 ATL 細胞数を評価することが可能であり、骨髄移植施行時の病勢のコントロール状態の把握に有用であると考えられた。

A. 研究目的

末梢血中の ATL 細胞数は、急性型 ATL の治療効果評価の重要な指標であるが、境界域の異型性の腫瘍細胞の形態診断はしばしば困難であり、治療効果の評価に不確実性を残す。今年度の研究では multi-color FACS（以下 HAS）を用いた客観的な ATL 細胞の評価系の検討を行う。この方法を用いて化学療法による移植前の病勢コントロール状態の正確な評価を行う。

B. 研究方法

当科に入院中の急性型 ATL 症例を対象にインフォームドコンセントを得て、末梢血を採取、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 FACS Aria 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で展開した。この解析で得られた CD7high/CD3High、CD7dim/CD3dim、CD7low/CD3dim の各集団をソーティングし、HTLV-1プロウイルス量を Real time PCR で定量、inverse PCR、FACS による TCR V β レパトア解析によりクローナリティを解析した。一部の症例は治療経過に伴う FACS パターンの変化を検討した。

（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22-3-0518）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

当科に入院した14例の急性型症例を対象に HAS による解析を施行した。正常人コントロールでは CD4陽性 T 細胞は CD7/3 high が major population であるが、急性型 ATL では CD7low/CD3dim が major population であり、一部 CD7dim/CD3dim および CD7high/CD3dim に分布した。この CD7low の集団はプロウイルス量定量によりほぼ100%HTLV-1感染細胞であった。

Inverse PCR による解析の結果 major なクローナルバンドが検出され、FACS による TCR V β レパトア解析の結果、この集団は90～98%が同一の V β を使用しており、純度の高い ATL の腫瘍細胞集団を検出していると考えられた。Inverse PCR により、CD7dim の集団に CD7low と同一サイズのバンドが見られたが、TCR V β レパトア解析では、CD7low の集団と同一の V β を使用する細胞は10%程度であった。

14例中10例においては治療経過に伴う HAS の変化を検討した。治療に反応して病勢が安定していると思われる症例では CD7low の集団が減少し、CD7dim、high の集団が増加していた。

D. 考察

我々の開発した multi-color FACS の解析系 (HAS) は、CD7low/CD3dim 集団として急性型 ATL 症例の末梢血中の ATL 細胞を高純度に検出することが明らかになった。Inverse PCR お