

G-CSF レセプターを発現し、G-CSF に反応し増殖する症例が存在することが知られていた (Matsushita K et al. Leuk Lymphoma. 31:295-304, 1998)。本事例では、ドナーとなる予定であった HTLV-1 陽性同胞の末梢血にて G-CSF 投与後に異常細胞が増加したことを契機とし、感染細胞のクローナルな増殖が明らかとなった。G-CSF 投与前の DNA サンプルが残されていないため、詳細な評価が不可能であったが、少なくとも G-CSF 後にはクローナリティがあり、ドナーとしてはリスクが高かったと考えられる。本事例では G-CSF が直接ドナー由来の感染細胞を増殖させたという所見は得られなかった。プロウイルス量に関しては、G-CSF 投与中止し半年を経ても、測定値に大きな変動は認められなかったことから、以前よりクローナリティが存在していた可能性も示唆される。HTLV-1 陽性同胞をドナーとする場合、慎重な適応の検討、十分な経過観察が必要である。

一方、今回の解析の過程で、プロウイルス定量の方法により、施設間で誤差が生じていることが明らかとなった。プロウイルス量を評価する上で今後重要なことは、1) 適切な標準法の使用、2) 全国で統一した方法の開発等が挙げられる。

## E. 結論

HTLV-1 陽性ドナーにおいてクローナルな感染細胞の増加を認める事例を経験した。本事例はドナーとしてはリスクが高かったと考えられ、ドナーにおいてもクローナリティを含めた適応の評価が望まれる。

プロウイルス定量の評価には注意が必要であり、正確かつ標準化された測定系の構築が必要である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hagiya K, Yasunaga J, Satou Y, Oshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes prolifera-

tion of adult T-cell leukemia cells.

Retrovirology, 8; 19, 2011

2. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20 (USP20) targets TRAF6 and HTLV-1 Tax to negatively regulate NF- $\kappa$ B signaling.

J Virol, 85; 6212-6219, 2011

3. Yasunaga J and Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. Int. J. Hematol, 94; 435-442, 2011.

4. Sugata K, Satou Y, Yasunaga JI, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, Mitsuyama M, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. Blood, 119; 434-444, 2012.

### 2. 学会発表

1. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor perturbs immune response to the pathogens in vivo by inhibiting IFN-gamma production: 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011

2. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. HTLV-1 Tax-induced NF- $\kappa$ B activation is negatively regulated by Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20): 15<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses. Leuven, Belgium. 4-8 June, 2011

3. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF- $\kappa$ B pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 2011 ASBMB SpecialSymposiaSeries.Guangzhou Baiyun International Convention Center, China. July 24-26, 2011

4. Yasunaga J, Lin FC, Lu X, Jeang KT. UBIQUITIN-SPECIFIC PEPTIDASE 20

TARGETS HTLV-1 TAX AND NEGATIVELY REGULATES NF-kB PATHWAY:

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sappaoro Convention Center, Japan. September 11-16, 2011

5. 安永純一朗 : Ubiquitin-specific peptidase 20(USP20) suppresses NF-kB pathway by targeting TRAF6 and HTLV-1 Tax: 第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月3-5日
6. Yasunaga J, Tiejun Zhao, Miyazato Paola, Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) induces functionally impaired regulatory T-cells in vivo: 第73回日本血液学会学術集会、名古屋、2011年10月14-16日

#### 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

CCR4 抗体治療がもたらす、ATL 患者における免疫病態変化の解明

研究分担者：石田 高司 名古屋市立大学 腫瘍・免疫内科学 講師

**研究要旨** ヒト化抗 CCR4 抗体（KW-0761）は CCR4 を発現した腫瘍細胞のみならず、健常な制御性 T 細胞（Treg）を除去する作用を有する。故に、KW-0761 の投与はヒトの免疫状態を大きく変化させる可能性を有する。分担研究者は KW-0761 投与によるヒト免疫反応の変化を明らかにする目的で、9,000以上のヒトタンパク質がスポットティングされた ProtoArray® Human Protein Microarray v5.0 を用いて KW-0761 投与前後の成人 T 細胞白血病/リンパ腫（ATL）患者血清中の抗体反応を網羅的に解析・比較した。結果、KW-0761 投与後に共通して上昇あるいは新たに出現する抗体反応を検出した。現在これらの抗体反応変動の機序及び臨床的な意義について詳細な解析を実施している。また、本網羅的 protein array の過程で、従来 ATL での発現は報告されていない複数の腫瘍抗原（がん精巢抗原）に対する抗体反応を検出した。さらに患者由来 ATL 細胞における該当腫瘍抗原の発現を mRNA およびタンパクレベルで確認することができ、さらに該当腫瘍抗原特異的 CTL を誘導しえた。これら腫瘍抗原は ATL に対する免疫療法の新規標的抗原になりうると考えられた。

分担研究者は ATL 患者 PBMC から HTLV-1 ウイルス抗原 Tax 特異的 CTL の誘導・増殖方法の最適条件を確立した。本手法を用いて誘導した Tax-CTL が自己の ATL 細胞を特異的に傷害することを確認した。これまで、病期が進行した ATL 患者では Tax の発現は限定的と考えられていたが、分担研究者は多くの症例において ATL 細胞の増殖の場（リンパ節）では比較的高頻度に Tax の発現を認め、その発現は細胞周期に依存している事を見出した（論文投稿中）。

#### A. 研究目的

ヒト化抗 CCR4 抗体（KW-0761）は2012年春に再発 ATL 患者に承認される見込みの新規薬剤である。KW-0761 は CCR4 を発現した腫瘍細胞のみならず、健常な制御性 T 細胞（Treg）を除去する作用を有する。Treg の存在は腫瘍細胞の宿主免疫応答回避に重要な役割を果たしており、KW-0761 がもたらす Treg 除去は抗腫瘍免疫の増強につながる事が期待されている。これら KW-0761 抗体治療がもたらす、ATL 患者における免疫病態変化を解明し、ATL に対する新規細胞免疫療法を確立することが本研究の目的である。

#### B. 研究方法

KW-0761 治療を受けた ATL 患者サンプルを用いて、治療前後の液性免疫反応、細胞性免疫反応を詳細に解析する。

#### （倫理面への配慮）

患者試料を用いた研究はヘルシンキ宣言を遵守し名古屋市立大学医学部倫理委員会における研究計画書の承認審査を得て、また遺伝子異常の検討は3省庁による『ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針』を遵守し名古屋市立大学医学部遺伝子倫理委員会における研究計画書の審査承認を得た上で試料提供者への十分な説明と文書による同意を得て行った。

動物を用いた研究は動物愛護の精神則り施設実験動物研究センターでの研究計画書の承認を得て行った。

#### C. 研究結果

9,000以上のヒトタンパク質がスポットティングされた ProtoArray® Human Protein Microarray v5.0を用いて KW-0761 投与前後の ATL 患者血清中の抗体反応を網羅的に解析・比較した。結果、KW-0761 投与後に共通して上昇あるいは新たに

出現する抗体反応を検出した。現在これらの抗体反応変動の機序及び臨床的な意義について詳細な解析を実施している。また、本網羅的 protein array の過程で、従来 ATL での発現は報告されていない複数の腫瘍抗原（がん精巢抗原、NY-ESO-1、MAGE-A 3, 4）に対する抗体反応を検出した。さらに患者由来 ATL 細胞における該当腫瘍抗原の発現を mRNA およびタンパクレベルで確認することができ、さらに該当腫瘍抗原特異的 CTL を誘導しえた。これら腫瘍抗原は ATL に対する免疫療法の新規標的抗原になりうると考えられた。

分担研究者は ATL 患者 PBMC から HTLV-1 ウイルス抗原 Tax 特異的 CTL の誘導・増殖方法の最適条件を確立した。本手法を用いて誘導した Tax-CTL が自己の ATL 細胞を特異的に傷害することを確認した。これまで、病期が進行した ATL 患者では Tax の発現は限定的と考えられていたが、分担研究者は多くの症例において ATL 細胞の増殖の場（リンパ節）では比較的高頻度に Tax の発現を認め、その発現は細胞周期に依存している事を見出した（論文投稿中）。

#### D. 考察

C で述べた腫瘍抗原特異的、あるいは Tax 特異的 CTL は KW-0761 治療後に寛解に至ったケースで高頻度に認め、さらに効率よく増幅可能であった。

#### E. 結論

KW-0761 は CCR4 陽性 ATL 細胞に対する直接的な抗腫瘍効果を有するのみならず、Treg 除去による二次的な抗腫瘍免疫賦活による抗 ATL 効果を有することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A, 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): 837-842, 2012

2. Nishikawa H, Maeda Y, Ishida T, Gnjatic S, Sato E, Mori F, Sugiyama D, Ito A, Fukumori Y, Utsunomiya A, 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 Feb 8
3. Ishida T, Ueda R.; Immunopathogenesis of lymphoma: focus on CCR4. *Cancer Sci*. 2011 Jan;102(1):44-50.
4. Ishida T, Ueda R.; Antibody therapy for Adult T-cell leukemia-lymphoma. *Int J Hematol*. 2011 Nov;94(5):443-52.
5. Yamada S, Sato F, Xia H, Takino H, Kominato S, Ri M, Ishida T, Iida S, Inagaki H, Yamada K. Forkhead box P1 overexpression and its clinicopathological significance in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified. *Hum Pathol*. in press.
6. Shimizu K, Murakami H, Sawamura M, Hattori Y, Iida S, Ishida T, Sunami K, Asaoku H, Sakai A, Abe M, Takagi T. Efficacy of Long-Term Treatment with Low-Dose Thalidomide for Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *International Journal of Clinical Medicine* 2011, 2, 570-575.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ATLのゲノム異常解析

研究分担者：瀬戸 加大 愛知県がんセンター研究所・遺伝子医療研究部 副所長兼部長

**研究要旨** 我々はこれまでに、アレイ CGH 解析法により、急性型 ATL とリンパ腫型 ATL の間でゲノム異常様式が異なることを報告していた。今回、末梢血検体とリンパ節検体が同時期に得られた急性型 ATL13 症例を用いてアレイ解析したところ、同一個体で末梢血腫瘍細胞とリンパ節腫瘍細胞間でゲノム異常様式が異なる症例があることを見出した。その割合は13症例中9症例（70%）と高率であることが判明した。解析の結果、急性型 ATL 患者リンパ節には複数の腫瘍細胞が存在し、その一部が末梢血へと流れ出ていることが明らかとなった。このようなクローンの進化は ATL の治療抵抗性の一因であることが示唆された。

**A. 研究目的**

ATLは予後不良な疾患であるが、HTLV-1 ウイルス以外のゲノム異常については明らかではない。本研究は、ATL 治療戦略を考察することを目的とし、急性型 ATL 患者のゲノム異常様式を詳細に検討した。具体的には、同一患者で末梢血とリンパ節検体が得られる症例を対象にゲノム異常様式を調べ、急性型 ATL の分子病態を解明することを目的とした。

**B. 研究方法**

同意の得られた急性型 ATL 患者13症例のリンパ節組織と末梢血を対象に検討した。末梢血検体から CD4 陽性細胞選択用マイクロビーズを用いて、CD4 陽性分画を選択し、DNA を精製した。リンパ節検体はそのまま DNA を精製した。Agilent 社44 K ヒト全ゲノムアレイ CGH グラスを用いてプロトコールに基づいてアレイ CGH を施行した。

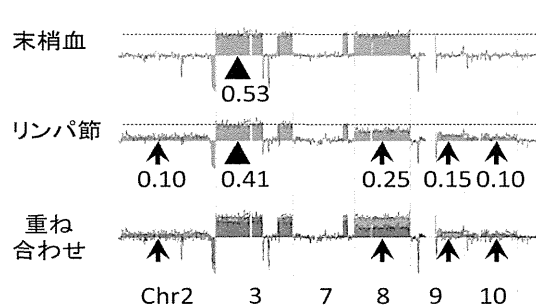
**(倫理面への配慮)**

本研究は愛知県がんセンターのヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会の承認を得ている。患者検体は対応する共同研究機関で IC を得た上で採取している。

**C. 研究結果**

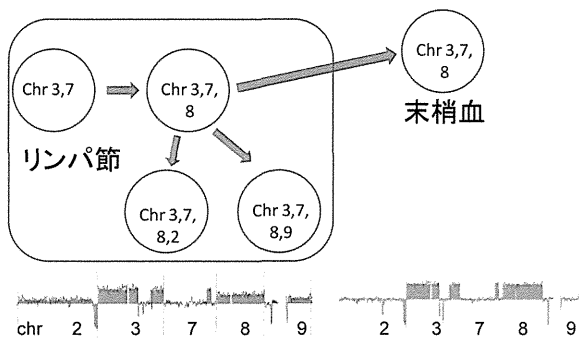
1. 末梢血腫瘍細胞とリンパ節腫瘍細胞のゲノム異常様式は、一部共通するものの、リンパ節内の腫瘍細胞のゲノム異常様式はより多様性が認められた（図1）。また、その頻度は、13症例中9例に認められた。

図1 Log2 ratio imbalance (検体1)



2. リンパ節内では複数のクローンが存在することが示唆されたが、HTLV-1 ウイルス挿入サイト並びに T 細胞受容体を用いたサザンブロット解析により単クローン性であることが明らかとなった。すなわち、リンパ節内でのゲノム異常の多様性は、共通のクローンから由来し、ゲノム異常を蓄積しながらクローンが進化していることが示唆された。また、リンパ節内の複数のクローンの一部が末梢血中に流出していることが明らかとなった（図2）。

図2 アレイCGH解析による急性型ATLLの発展モデル



#### D. 考察

今回の解析で、急性型 ATL 患者の70%に複数のクローンが存在することが明らかとなった。サザン解析の結果、それらは、共通のクローンに由来することが判明したので、急性型 ATL 患者には複数のサブクローンが存在することが明らかとなった。また、末梢血中の腫瘍細胞は、それらの複数のクローンの進化の途中の段階にあるものが出ていたことが推測された。以上のことから、ATL 腫瘍細胞はリンパ節内で増殖することが示唆された。また、末梢血中に流出する腫瘍細胞は、リンパ節内に存在するクローンと完全に同一なのか、あるいは何らかの特殊なゲノム異常を獲得した結果流出するようになったのか、今後、解明していく必要がある。

今回の解析で明らかになったリンパ節内の複数のクローンの増殖は ATL 治療戦略を考える上で大変重要なことを意味する。すなわち、次々とゲノム異常を獲得してクローンが進化していく病態は、いろいろな治療法を潜り抜けることの分子基盤となっているのかもしれない。その意味では、DNA 複製や細胞分裂を標的とした治療よりも、移植や抗体療法などの治療法がより優れていることを示唆している可能性がある。

#### E. 結論

1. 70%の急性型 ATL 症例で、患者の末梢血腫瘍細胞とリンパ節では、ゲノム異常様式が異なる。
2. リンパ節内には複数のクローンが存在するが、それらは共通のクローンから進化したものである。

3. 末梢血 ATL 腫瘍細胞はクローン進化の途中のクローンが末梢血中に流出したものである。
4. 上記の結果は、ATL 腫瘍細胞の増殖の場はリンパ節であることを示唆し、治療戦略を考える上で、重要な知見を与える。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sung CO, Kim SC, Karnan S, Karube K, Shin HJ, Nam DH, Suh YL, Kim SH, Kim JY, Kim SJ, Kim WS, Seto M, Ko YH. Genomic profiling combined with gene expression profiling in primary central nervous system lymphoma. *Blood*, 117: 1291-1300, 2011.
2. Kato H, Kagami Y, Kodaira T, Oka S, Oki Y, Chihara D, Taji H, Yatabe Y, Nakamura T, Nakamura S, Seto M, Yamamoto K, Morishima Y. Nodal Relapse After Helicobacter pylori Eradication in a Patient With Primary Localized Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *Am J Gastroenterol.*, 106: 549-551, 2011.
3. Umino A, Nakagawa M, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Taira N, Katayama N, Seto M. Clonal evolution of adult T-cell leukemia/lymphoma takes place in lymph node. *Blood*, 117: 5473-5478, 2011.
4. Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, Sato F, Mimata H, Seto M, Moriyama M. Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 $\alpha$ , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *J Pathol.*, 224:280-288, 2011.
5. Tsuzuki S, Taguchi O, Seto M. Promotion and maintenance of leukemia by ERG. *Blood*, 117:3858-3868, 2011.
6. Iqbal J, Weisenburger DD, Chowdhury A,

- Tsai MY, Srivastava G, Greiner TC, Kucuk C, Deffenbacher K, Vose J, Smith L, Au WY, Nakamura S, Seto M, Delabie J, Berger F, Loong F, Ko YH, Sng I, Liu X, Loughran TP, Armitage J, Chan WC. International Peripheral T-cell Lymphoma Project. Natural killer cell lymphoma shares strikingly similar molecular features with a group of non-hepatosplenic  $\gamma\delta$  T-cell lymphoma and is highly sensitive to a novel aurora kinase A inhibitor in vitro. *Leukemia*, 25:348-358, 2011.
7. Kuroda A, Tsukamoto Y, Nguyen LT, Noguchi T, Takeuchi I, Uchida M, Uchida T, Hijiya N, Nakada C, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Matsuura K, Seto M, Ito H, Fujioka T, Moriyama M. Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One*, 6(7):e22313, 2011.
  8. Nakagawa M, Tsuzuki S, Honma K, Taguchi O, Seto M. Synergistic effect of Bcl2, Myc and Ccnd1 transforms mouse primary B-cells into malignant cells. *Haematologica*, 96 : 1318-1326, 2011.
  9. Kumar V, Matsuo K, Takahashi A, Hosono N, Tsunoda T, Kamatani N, Kong SY, Nakagawa H, Cui R, Tanikawa C, Seto M, Morishima Y, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility. *J Hum Genet.*, 56:436-439, 2011.
  10. Karube K, Nakagawa M, Tsuzuki S, Takeuchi I, Honma K, Nakashima Y, Shimizu N, Ko YH, Morishima Y, Ohshima K, Nakamura S, Seto M. Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by genomic and functional analyses. *Blood*, 118:3195-3204, 2011.
  11. Kato H, Yamamoto K, Oki Y, Ine S, Taji H, Chihara D, Kagami Y, Seto M, Morishima Y. Clinical value of flow cytometric immunophenotypic analysis for minimal residual disease detection in autologous stem-cell products of follicular and mantle cell lymphomas. *Leukemia*, 11: 483-489, 2011.
  12. Tsuzuki S, Seto M. Expansion of functionally defined mouse hematopoietic stem/progenitor cells by a short isoform of RUNX1/AML1. *Blood*, 119: 727-735, 2012.
  13. Chihara D, Matsuo K, Kanda J, Hosono S, Ito H, Nakamura S, Seto M, Morishima Y, Tajima K, Tanaka H. Inverse association between soy intake and non-Hodgkin lymphoma risk among women: a case-control study in Japan. *Ann Oncol.*, in press.
  14. Kato H, Yamamoto K, Oki Y, Ine S, Taji H, Chihara D, Kagami Y, Seto M, Morishima Y. Clinical value of flow cytometric immunophenotypic analysis for minimal residual disease detection in autologous stem-cell products of follicular and mantle cell lymphomas. *Leukemia*, in press.
- ## 2. 学会発表
1. Karube K, Nakagawa M, Tsuzuki S, Ko YH, Nakamura S, Seto M. Identification of FOXO3 and PRDM1 as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms by the combination of genomic and functional analyses. 第11回国際リンパ腫会議, 2011, ルガノ (スイス) [口演] 2011.6.16
  2. 瀬戸加大: 悪性リンパ腫研究の楽しみ方. 第51回日本リンパ網内系学会総会, 2011, 福岡国際会議場 (福岡), [口演] 2011.7.1
  3. 加留部謙之輔, 瀬戸加大: NK 腫瘍の統合的な分子病態解析. 第51回日本リンパ網内系学会総会, 2011, 福岡国際会議場 (福岡), [シンポジウム] 2011.7.1

4. 都築忍, 瀬戸加大: Altered differentiation and enhanced self-renewal activity of B cells by the leukemia-associated TEL (ETV6)-AML1 (RUNX1) fusion gene. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [シンポジウム] 2011.10.3
  5. 成松隆弘, 松浦恵子, 泥谷直樹, 中田知里, 井上享, 野村威雄, 佐藤文憲, 瀬戸加大, 三股浩光, 守山正胤: 9p24.1-p13.3 loss may be indicator to predict metastasis of clear cell renal cell carcinoma. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [シンポジウム] 2011.10.3
  6. 松浦恵子, 中田知里, 成松隆弘, 塚本善之, 野村威雄, 佐藤文憲, 三股浩光, 瀬戸加大, 守山正胤: Frequent deregulation of the Hippo signaling pathway in high-grade clear cell renal cell carcinoma. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [シンポジウム] 2011.10.3
  7. 瀬戸加大: Molecular bases of malignant lymphoma. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [シンポジウム] 2011.10.4
  8. 加藤春美, 山本一仁, 加留部謙之輔, 都築忍, 谷田部恭, 瀧澤淳, 大島孝一, 中村栄男, 森島泰雄, 瀬戸加大: Gene expression profiling of EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) of the elderly. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [口演] 2011.10.4
  9. 加留部謙之輔, 中川雅夫, 都築忍, 清水則夫, 中村栄男, 高田尚良, 瀬戸加大: Identification of FOXO3 and PRDMI as tumor suppressor gene candidates in NK cell neoplasms. 第70回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [ポスター (示説)] 2011.10.5
  10. Tashima M, Nishikori M, Kishimoto W, Yamamoto R, Samomi T, Suzuki T, Tsuzuki S, Seto M, Akifumi Takaori-Kondo: Development of a mouse model for blastoid variant of mantle cell lymphoma. 第73回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [ポスター (示説)] 2011.10.14
  11. 都築忍, 瀬戸加大: ERG 発現による白血病化. 第73回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [ポスター (示説)] 2011.10.14
  12. 加藤春美, 山本一仁, 加留部謙之輔, 都築忍, 谷田部恭, 瀧澤淳, 大島孝一, 中村栄男, 森島泰雄, 瀬戸加大: 加齢性 EBV 関連 B 細胞性リンパ増殖性疾患の遺伝子発現プロファイル. 第73回日本血液学会学術集会, 2011, 名古屋国際会議場 (名古屋) [口演] 2011.10.16
  13. Kato H, Yamamoto K, Karube K, Katayama M, Tsuzuki S, Yatabe Y, Takizawa J, Ohshima K, Nakamura S, Morishima Y, Seto M. Gene Expression Profiling of Age-Related Epstein-Barr Virus (EBV)-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorder Uncovers Alterations in Immune and Inflammatory Genes: Possible Implications for Pathogenesis. 第53回米国血液学会総会, 2011, サンディエゴ (米国) [ポスター (示説)] 2011.12.12
  14. Yamamoto K, Tsuzuki S, Naoe T, Seto M. Deregulated activity of AML1/RUNX1 cooperates with BCR-ABL to immortalize hematopoietic progenitor cells and induces blast crisis-like disease of chronic myelogenous leukemia in mice 第53回米国血液学会総会, 2011, サンディエゴ (米国) [ポスター (示説)] 2011.12.12
  15. Karube K, Seto M. Genomic and functional analyses of NK-cell neoplasms. 4th T cell lymphoma forum, 2011, サンフランシスコ (米国), [口演] 2012.1.26
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



ATL に対する骨髄非破壊的移植療法の検討

研究分担者：崔 日承 九州がんセンター血液内科 医師

**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。我々は、適切な血縁ドナーが得られない寛解期の ATL 患者を対象に、非血縁者間同種骨髄移植における骨髄非破壊的処置療法の安全性を検討する第 I 相試験を実施し、目標症例数15例の移植を完了した。主要評価項目である、移植後100日時点での生存かつ100日以内の完全キメラ達成は、15例中13例で認められ、本治療法の安全性が示された。現在、追跡調査中である。また、さらなる移植幹細胞源の拡大のため、臍帯血移植の安全性を検討する臨床試験を計画中である。

**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。HLA 一致血縁ドナーからの末梢血幹細胞移植における骨髄非破壊的処置療法については、1 期、2 期試験にて安全性を確認し、2 年生存率を主要評価項目とする第 II 試験を実施して来た。目標症例数を35例としていたが、2 年間の症例登録期間の延長を経て、20例の移植が行なわれている。2011年9月末日をもって新規症例登録を締め切り、現在追跡調査中である。

適切な血縁ドナーが得られない患者においては、移植細胞源の開発は急務である。我々は適切な血縁ドナーが得られない患者を対象に、非血縁者間同種骨髄移植における骨髄非破壊的処置療法の安全性を検討する第 I 相試験を実施してきた。

**B. 研究方法**

対象患者は移植時年齢50-65歳。急性型またはリンパ腫型の ATL で、化学療法等により完全寛解、または部分寛解となった症例。適切な血縁ドナーが得られない症例。ドナーは HLA-A、B、

DR 座が genotype で 6 座一致（DR の genotype 一座不一致までは許容）した骨髄バンクドナーとした。移植前処置はフルダラビン、ブスルファン、TBI 2Gy とし、GVHD 予防は、タクロリムスとメソトレキセートを用いた。17施設で倫理委員会の承認を得、2009年2月から2011年4月までに、8施設で15例の移植が行なわれた。

**C. 研究結果**

患者は男性 7 例女性 8 例。患者年齢の中央値は 58 歳（51-62）。急性型12例、リンパ腫型 3 例。登録時 CR は 7 例、PR 8 例。HLA 完全一致は 9 例で、6 例は DR の 1 座不一致であった。ドナーは全て抗 HTLV-1 抗体陰性。早期再発の 1 例で 100 日以内の完全キメラ達成が得られなかった。1 例は day34 で TMA により死亡。15例中13例で、主要評価項目である移植後100日時点での生存かつ100日以内の完全キメラ達成が認められた。急性 GVHD は15例中10例に認められ、grade 3 が 2 例、grade 2 および 1 はそれぞれ 6 例、2 例であった。15例中10例で、100日までに、末梢血 HTLV-1 プロウイルス量が、測定感度以下になっていた。観察期間中央値627日で、ATL 増悪による死亡 4 例、合併症死亡 1 例であった。

**D. 考察**

非血縁者間同種骨髄移植における骨髄非破壊的処置療法は安全に施行可能である。今後、さらに

経過観察、追跡を行なって行く予定である。

Forum, 2012. 1.26-28, San Francisco

#### E. 結論

ドナーソースの拡大は急務である。今後、さらに臍帯血移植の安全性を検討する予定であり、プロトコール作成中である。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)  
なし

#### F. 健康危険情報

本移植療法において、15例中1例に早期の移植合併症による死亡例が認められた。

#### 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. Eto T, MD, Choi I, Tanosaki R, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Takemoto S, Taguchi J, Fukushima T, Kato K, Teshima T, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, and 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), American Society of Hematology, 2011.12.9-11, San Diego
2. Choi I, Eto T, Tanosaki R, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Takemoto S, Taguchi J, Fukushima T, Kato K, Teshima T, Nakamae H, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J and Uike N. Kinetics of HTLV-1 Provirus Load after Unrelated Bone Marrow Transplantation (uBMT) with Reduced Intensity Conditioning Regimen (RIC) for Elderly Patients with Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL), T cell Lymphoma

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** 成人 T 細胞白血病（ATL）移植症例の中には移植片対 ATL 効果（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、抗腫瘍効果を誘導する新規治療法開発を目的としている。第 I 相臨床試験開始に向け、共同施設において樹状細胞調製のプレランを実施し投与細胞の安全性（無菌検査）と品質（生細胞数、細胞形質、機能）を確認した。11月より臨床試験本登録を開始する。

#### 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。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。

#### 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- $\alpha$ 、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。臨床試験に先立ち、同一工程における大量細胞調製の問題点を検証するため、東京医科歯科大学細胞調製室でプレランを実施。

#### （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）での倫理委員会の承認を取得している。

#### C. 研究結果

プレランを 2 回実施した結果、同一工程で作成した細胞製剤の生細胞率70%以上、無菌試験（細菌、真菌培養、マイコアラート、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。IL12-p70 産生能、MLR 検査では、スモールスケールで実施した前臨床試験と同等の結果が得られ、大量細胞調製の安全性、品質の適格性を検証した。また患者登録システムを立ち上げ、11月より臨床試験の本登録を開始する。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ghia J E, Li N, Wang H, Suehiro Y, Mallet J, Khan W I. Serotonin activates dendritic cell function in the context of Gut Inflammation AJP,178:662-71,2011
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. 7:43-52,2011

### 2. 学会発表

1. 末廣陽子、宮下要、崔日承、鶴池直邦. 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、鶴池直邦. 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、鶴池直邦、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、鶴池直邦、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、鶴池直邦、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の減量による、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 16<sup>th</sup> 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 16<sup>th</sup> 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 1<sup>th</sup> 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应用するため HLA mismatch 移植に应用可能な抗 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 CD 3、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<sup>-</sup> の ATL 細胞の解析が可能であることが示唆された。AC39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 CD7<sup>dim</sup>+CD7<sup>-</sup>>45% の領域 (G2) に分布し、AC 例は CD7<sup>dim</sup>+CD7<sup>-</sup><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<sup>dim</sup>CD7<sup>low</sup> subpopulation of CD4<sup>+</sup> 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- $\kappa$ 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、田垂敏、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の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。