

201332023A

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野)

成人T細胞白血病の治癒を目指した病因ウイルス特異抗原を
標的とする新規複合的ワクチン療法：
抗CCR4抗体を併用した樹状細胞療法 第I/II相試験

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 末廣 陽子
(独立行政法人国立病院機構 九州がんセンター血液内科)

平成 26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告		
成人T細胞白血病の治癒を目指した病因ウイルス特異抗原を標的とする新規複合的ワクチン療法： 抗CCR4抗体を併用した樹状細胞療法 第I/II相試験	末廣 陽子	1
II. 分担研究報告		
1. プロトコール作成細胞製剤の調製、免疫解析	神奈木真理	6
2. プロトコール作成ATLに対する樹状細胞ワクチン療法の開発	赤司 浩一	10
3. CCR4抗体による免疫賦活作用の解析	石田 高司	13
4. ATL症例のHTLV-1プロウイルス解析	松岡 雅雄	16
5. ATLに対する樹状細胞ワクチン療法臨床試験の実施	福田 哲也	19
6. 成人T細胞白血病(ATL)に対する樹状細胞療法におけるデータセンターの体制整備	下川 元継	20
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		21
IV. 研究成果の刊行物・別刷		23

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）

総括研究報告書

成人T細胞白血病の治癒を目指した病因ウイルス特異抗原を
標的とする新規複合的ワクチン療法：
抗CCR4抗体を併用した樹状細胞療法 第I/II相試験
(H25-実用化(がん) - 一般 - 003)

研究代表者：末廣 陽子 国立病院機構九州がんセンター血液内科 医長

研究要旨

既治療 ATL 患者に対して「HTLV-I Tax 標的樹状細胞を用いた新規免疫療法第 I 相臨床研究」を実施し、登録患者 3 症例で安全性を確認した。さらに、3 症例中 2 症例で部分寛解が得られ、全例で PS の改善を認め一年以上無治療で外来経過観察が可能であった。これらの症例では、ワクチン接種数ヶ月経過しても Tax-CTL 活性化が同定できており、長期的な ATL 抑制機構の存在が示唆された。本研究ではこの樹状細胞ワクチンの効果を増強するため、抗 CCR4 抗体を併用する複合的免疫療法の第 Ia/Ib 相医師主導治験を推進する。平成 25 年度は、治験開始に向けて治験薬概要書、治験実施計画書の作成、GMP 関連書類作成とともに GCP 組織整備に着手し PMDA 薬事戦略相談を実施した。

研究分担者

- | | | |
|----------|-------------|-----|
| 1. 神奈木真理 | 東京医科歯科大学 | 教授 |
| 2. 赤司 浩一 | 九州大学大学院 | 教授 |
| 3. 石田 高司 | 名古屋市立大学 | 准教授 |
| 4. 松岡 雅雄 | 京都大学ウイルス研究所 | 教授 |
| 5. 福田 哲也 | 東京医科歯科大学 | 助教 |
| 6. 下川 元継 | 九州がんセンター | 研究員 |

A. 研究目的

本研究では ATL の新規治療法開発を目的に既治療 ATL 患者を対象としてウイルス特異抗原である Tax を標的とした樹状細胞(DC)ワクチン療法の安全性、忍容性の検証を行う。本臨床試験では、制御性免疫の抑制、残存病変の縮小効果による効率的な抗腫瘍免疫の誘導を目的として、抗 CCR4 抗体を併用する複合的免疫療法の第 Ia/Ib 相治験を計画した。本年度は、DC ワクチンの実用化を目指し、PMDA 薬事戦略相談を実施するとともに、既に臨床研究として樹状細胞ワクチン療法を実施した 3 症例の追跡調査を行った。

B. 研究方法

1. ATL に対する Tax 特異的樹状細胞ワクチン療法の第 I 相臨床研究追跡調査

平成 24 年度に実施した Tax 特異的 DC ワク

チン療法の第 I 相臨床研究では、既治療の ATL 患者を対象に DC ワクチン単独投与を実施し安全性の評価を行った。ワクチン製剤は、患者から成分採血で得られた白血球細胞分画を 2 種類の密度勾配遠心法により単球分離し、付着細胞処理後、AZT 存在下で、DC 誘導刺激(GM-CSF, IL-4)、DC 成熟刺激(TNF- α , KLH, OK432)を加え、Tax ペプチドを添加した。DC ワクチンは、2 週毎に計 3 回皮下接種し、ワクチン接種 4 週間後に安全性、抗腫瘍効果を評価した。登録された 3 症例は、九州がんセンターで登録され臨床研究を完遂した。ワクチン製剤の調製は、九州大学の細胞調製施設で実施された。平成 25 年度は、臨床研究完遂例の追跡調査として臨床経過観察、腫瘍マーカー (sIL-2R)、HTLV-1 プロウイルス量、Tax テトラマー解析による CTL 検出、制御性 T 細胞の解析を実施した。

2. 抗 CCR4 抗体を併用した複合的免疫療法第 Ia/Ib 相医師主導治験

平成 25 年度後期にコアメンバーによるワーキンググループで実施計画書、治験薬概要書を作成、治験薬製造における品質・安全性の PMDA 薬事戦略相談対面助言を実施した。また治験調製事務局を九州がんセンターに設置し組織整備を開始した。

3. HTLV-1 プロウイルス解析(松岡班員)

Tax を標的とした DC ワクチン適応症例における feasibility を検討するとともに ATL 患者検体における Tax 発現能を解析した(tax 遺伝子変異、5'側 LTR 欠損、5'側 LTR メチル化)。

4. 抗 CCR4 抗体による免疫賦活作用の解析

(石田班員)

ATL 患者で抗 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) 治療による制御性 T 細胞および Tax 特異的 T 細胞の動態を解析した。

(倫理面への配慮)

「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」は、九州がんセンター、九州大学、東京医科歯科大学の倫理審査委員会により承認済みである。「ATL 症例の HTLV-1 プロウイルス解析」は京都大学の倫理審査委員会の承認を得た。「抗 CCR4 抗体による免疫賦活作用」に関する研究は、名古屋市立大学の倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. ATL に対する Tax 特異的樹状細胞ワクチン療法の第 I 相臨床研究追跡調査

1-1. 臨床経過

樹状細胞ワクチンを単独投与した3症例の被験者において grade3 以上の非血液学的毒性を認めず、接種開始後13-18ヶ月の経過で安全性は確認された。3症例中2症例で部分寛解が得られ、1例は不変(SD)であった。全例でPSの改善を認め一年以上無治療で外来経過観察が可能であった。部分寛解が得られた2症例中1例は6ヶ月後の評価で完全寛解の評価が得られ、現在も寛解維持ができています。SDの1例は、6ヶ月後に進行(PD)と判定されたが、病勢進行が緩徐であった。

1-2. Tax テトラマー解析による CTL 検出

(神奈木班員)

症例 1: HLA-A*2402

HLA-A*2402/Tax301-309 ペプチド添加
DC ワクチン

症例 2: HLA-A*2402

HLA-A*2402/Tax301-309 ペプチド添加
DC ワクチン

症例 3: HLA-A*0201,*1101

HLA-A*0201/Tax11-19 ペプチド添加
DC ワクチン

末梢血 CD8+細胞中の Tax 特異的テトラマー陽性 CTL の頻度は、DC 接種以前から検出できていた例では大きな変化はなかった(症例 1, 症例 2)。症例 3 では、Tax 特異的 CTL は DC ワクチン前には検出されなかったが、ワクチン後 2 週目以降に HLA-A*0201/Tax11-19 テトラマー陽性 CTL が検出された。同症例では HLA-A*1101/Tax 88-96 テトラマー陽性 CTL は検出されなかったことから、ワクチンに用いた Tax11-19 ペプチドに対する特異的応答であることが示唆された。3 症例とも DC 接種開始から 16-20 週目の末梢血検体で、培養中に Tax 特異的 CTL の増殖が観察された。

2. 抗 CCR4 抗体を併用した複合的免疫療法第 Ia/Ib 相医師主導治験

プロトコール部門、治験薬製造部門、GCP 部門の各ワーキンググループを設置し、治験支援業者(CRO)との連携により治験実施計画書、治験薬概要書(案)の作成とPMDA薬事戦略相談を実施した。3回のPMDA事前面談(品質相談、非臨床試験相談)を経て平成26年2月に製剤安全性に係わる対面助言、3月に製剤品質に係わる対面助言を実施した。また2月にはプロトコール骨子に関する事前面談を実施した。

2-1. 治験実施体制

- 治験調整事務局 (患者登録・情報管理)
九州がんセンター
- 細胞調製実施機関: 九州大学
- 基礎解析機関: 東京医科歯科大学
京都大学ウイルス研究所
東京大学医科学研究所

2-2. 治験骨子

- ワクチン療法のデザイン: 第 Ia/Ib 相
- 登録期間: 登録開始から 3 年間
- 対象患者: HLA-A2, A24, A11 を有する既治療の ATL 患者
- 目標登録数: 9-15 症例
- 主要評価項目: 安全性の確認
- 副次評価項目: 奏功率、次治療開始までの期間、制御性 T 細胞の抑制効果、抗ウイルス効果、腫瘍マーカー

2-3. 治験製剤

PMDA薬事戦略相談を通して治験製剤の最終製品規格、出荷試験の見直しを行った。品質・安全性を担保するため、新たに健常人ドナーのアフェレーシス検体を使用した細胞調製工程、規格試験のバリデーション、安定性試験を計画。非臨床試験としてin vitroでの造腫瘍性試験、免疫不全マウスを用いた安全性試験計画(GLP準拠)を作成。これと並行して治験製剤調製施設におけるGMP施設整備、運用管理・組織整備のためのGMP関連文書作成を作成した。製剤の品質・安全性に係わる対面助言を通して、既に欧米で承認された培地も含めて複数の培地が本邦の薬事法による生物由来原料基準に合致せず、本研究における製剤開発の障壁となっている。また自家細胞加工製剤の収量は限定的であり、薬局方に準じた出荷試験における検体量の規定を満たすための対応策を検討している。

2-4. GCP組織整備

治験調整事務局、データセンター、安全性情報、統計解析の各部門を九州がんセンターに設置し、運用管理に関する書類作成に着手した。また治験情報一元化におけるネットワーク構築を検討した。モニタリング、監査部門はCROに委託しGCP組織整備を推進した。

3. HTLV-1プロウイルス解析

ATL症例の解析から 1) tax 遺伝子のナンセンス変異(12%)、2) 5'側 LTR の高メチル化(12%)、3) 5'側 LTR の欠失(30%)が認められ、このように5'側 LTR が欠失・メチル化されている場合、tax に変異・欠失がある症例では Tax は発現できないことが示唆された。一方、tax 遺伝子の転写が検出された症例に加えて、tax 遺伝子配列が保持され、5'側 LTR にメチル化、欠失がない症例は Tax を発現することが可能であり、このような症例は Tax に対する免疫治療の対象となるものと推測された。解析結果から、約半数のATL症例は Tax に対する免疫治療の適応になるものと推測された。

4. 抗 CCR4 抗体による免疫賦活作用

ATL患者で抗CCR4抗体(モガムリズマブ)治療による制御性T細胞およびTax特異的T細胞の動態を解析した。抗CCR4抗体の投与により機能的制御性T細胞(effector Treg)の比率が著しく低下しTax特異的CTLの増加を認めた。

D. 考察

ATL に対する Tax 特異的 DC ワクチンの第 I 相臨床研究(プロトタイプ)を完遂した3症例の臨床経過は安定しており安全性が確認された。これらの症例では前治療(レナリドマイド、モガムリズマブ等)の免疫修飾効果が影響した可能性もあり興味深い。少数例ではあるが、抗腫瘍効果、Tax 特異的 CTL の活性も確認されたことから、今後、移植非適応のATL患者に対して有望な治療法として期待できる可能性がある。本研究では、プロトタイプである臨床研究の成果を元に次世代のワクチン療法として抗CCR4抗体を併用した複合的ワクチン療法の実現化を図る。基礎解析の結果より抗CCR4抗体による機能的制御性T細胞の排除が認められ、DC ワクチンの抗腫瘍免疫を効率よく誘導できることが期待される。一方治験開始に向けての規制当局対応において、培地の生物由来原料基準、最終製品規格及び製剤出荷試験に関して、本研究における細胞加工製剤特有の問題点が抽出され、製剤調製法の見直しと品質検証試験での対応策を迫られている。細胞・組織加工製品における治験は、国内でも例が少なく、本治験が軌道に乗れば、今後細胞加工製品の開発において、実用化研究から製品化までのプロセスのプラットフォームになる可能性がある。

E. 結論

ATL に対する HTLV-I Tax 特異的 DC ワクチン療法第 I 相臨床研究(プロトタイプ)の安全性が確認された。本研究課題では Tax 特異的 DC ワクチン療法の安全性、有効性を検証し治療の普遍化を目的として新規の医師主導臨床治験「抗CCR4抗体を併用した複合的ワクチン療法」を計画した。PMDA薬事戦略相談を実施し、本治験製剤開発の克服すべき問題点に関して検討し治験申請準備を推進した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to

graft-versus-Tax effect in adult T cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol.* Apr 15; 190(8): 4382-92, 2013

2. Takamatsu A, Abe Y, Suehiro Y, Choi I, Toyoda K, Shiratsuchi M, Uike N. Successful treatment with allogeneic hematopoietic stem cell transplant in a mature B-cell leukemia with MYC and BCL2 translocation. *Leuk Lymphoma.* Nov 6, 2013 [Epub ahead of print]
3. 末廣陽子. 血液がんの新規抗腫瘍薬における皮膚障害—ベンダムスチンとモガムリズマブ—, *医学のあゆみ* vol 246, No 9; 788-793, 2013, 医歯薬出版株式会社 (東京)
4. 豊田康祐、安部康信、津田麻理子、土師正二郎、崔 日承、末廣陽子、喜安純一、大島孝一、鵜池直邦. リツキシマブを併用した経口ソブゾキサシ、エトポシド少量療法が奏効した高齢者ヒトヘルペスウイルス 8 陰性 Primary effusion lymphoma-like lymphoma. *臨床血液* (in press)

2. 学会発表 《国際学会》

1. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh K, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Identificant of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-1 Tax-specific CD4⁺ T-cells augmenting HTLV-1-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic HSCT. 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research (AACR) and the Japanese Cancer Association (JCA), Feb. 21-25, 2013, Maui, HI, USA.
2. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Choi I, Fukuda T, Takaishi S, Tanosaki R, Utsunomiya A, Miura O, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M, Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with peptides corresponding to Tax-specific CTL epitopes. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, June 26-30, 2013, Montreal, Quebec, Canada.
3. Choi I, Tanosaki R, Utsunomiya A, Suehiro Y,

Okamura J, Uike N. The kinetics of HTLV-1 proviral load after allogeneic hematopoietic cell transplantation with reduced intensity conditioning regimen; a comparison with that from sibling donors and that from unrelated donors. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, June 26-30, 2013, Montreal, Quebec, Canada.

4. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Augmentation of donor-derived Tax-specific CTL responses by a novel Tax epitope-specific CD4⁺ helper T-cells in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, June 26-30, 2013, Montreal, Quebec, Canada.
5. Kannagi M, Hasegawa A, Suehiro Y, Takamori A, Kinpara S, Ando S, Sasada A, Utsunomiya A, Choi I, Okamura J, Uike N. Immunological control of HTLV-1: Prospective therapy towards prophylaxis of disease, 第6回 HTLV-1 研究会：第3回 HTLV-1 国際シンポジウム、2013年8月23-25日、東京

《国内学会》

1. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M, Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with Tax peptides. The 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Symposium October 3-5 2013, Yokohama.
2. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Suehiro Y, Maeda Y, Yamano Y, Uike N, Kannagi M. Kinetics of Tax-specific CTL in ATL patients following hematopoietic stem cell transplantation from uninfected donors. The 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5 2013, Yokohama.
3. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Choi I, Tanosaki R, Eto T, Kato K, Tamai Y, Sasada A,

Suehiro Y, Uike N, Kannagi M. Identification of novel HTLV-1-specific CD4 epitopes in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation. The 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5 2013, Yokohama.

4. Oda H, Arikawa M, Choi I, Suehiro Y, Abe Y, Ohshima K, Uike N. Identification of EZH2 gene mutation and immunohistochemical analyses among Japanese non-Hodgkin lymphoma patients. The 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. October 3-5 2013, Yokohama.
5. Suehiro Y, Takamatsu A, Toyoda K, Choi I, Watanabe E, Watanabe N, Abe Y, Uike N. Mogamulizumab is effective for HLA class I deficit ATL cells. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, October 11-13 2013, Sapporo.
6. Sato N, Watanabe E, Ishigaki T, Kobayashi S, Ohno N, Choi I, Suehiro Y, Uike N, Uchimaruk, Watanabe N. フローサイトメトリーによる ATL 細胞の解析法とその臨床検査への応用. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, October 11-13 2013, Sapporo.
7. Watanabe E, Watanabe N, Kobayashi S, Uchimaruk, Suehiro Y, Choi I, Uike N. Analysis of ATL cells, Treg cells, NK cells and the expression levels of CCR4 using 12-color FACS. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, October 11-13 2013, Sapporo.
8. 崔 日承, 津田麻理子, 土師正二郎, 豊田康祐, 末廣陽子, 安部康信, 鶴池直邦. 成人 T 細胞白血病リンパ腫に対する非寛解期同種造血細胞移植の検討, 第 36 回日本造血細胞移植学会総会, 2014 年 3 月 7-9 日, 沖縄県宜野湾市.
9. 土師正二郎, 安部康信, 高松明子, 津田麻理子, 豊田康祐, 崔 日承, 末廣陽子, 鶴池直邦. Mogamulizumab 投与後に同種造血幹細胞を行った成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATLL), 第 36 回日本造血細胞移植学会総会, 2014 年 3 月 7-9 日, 沖縄県宜野湾市.

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
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）
分担研究報告書

プロトコール作成細胞製剤の調製、免疫解析

研究分担者：神奈木真理 東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授

研究要旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) は急激な発症と高頻度の再発のため予後不良であることが知られている。このため、即効性のある導入療法とともに長期間有効な寛解維持療法が必要である。我々は ATL に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植療法に関する 12 年間の共同研究の間に、移植後の ATL 症例で活性化した Tax 特異的 CTL の主要認識エピトープを同定し、CTL エピトープ部位の Tax ペプチドと自家樹状細胞を用いた抗腫瘍ワクチン療法を開発してきた。既にそのプロトタイプとなる抗腫瘍ワクチン療法の予備的な第 1 相試験を、導入療法後の ATL 患者 3 例に対して開始した。現在、これらの症例の経過を追跡するとともに、新規にモガムリズマブとワクチンの併用療法の実用化を目指した臨床治験に向け準備を行なっている。本年度は、PMDA との頻回の事前相談、安全性試験の計画を行なうとともに、前回の第 1 相試験参加者 3 例の免疫解析を行なった。3 例中 2 例は HLA-A*2402 のエピトープである Tax301-309 ペプチド、1 例は HLA-A*0201 の主要エピトープである Tax11-19 ペプチドを添加した樹状細胞療法を 2 週間隔で 3 回接種され、以後抗がん剤治療の投与無しに安定した状態が続いている。免疫解析の結果、樹状細胞ワクチン接種後、炎症性サイトカインの一時的な増加が 1 例に認められた。Tax 特異的 CTL は、3 例中 2 例ではワクチン接種前にも後にも検出されたが、1 例ではワクチン接種後はじめて検出可能となった。この 1 例は HLA-A*0201 とともに HLA-A*1101 が陽性であるが、検出できた CTL はワクチンに用いた HLA-A*0201 のエピトープを認識していた。興味深いことに、3 症例ともワクチン接種開始から 16-20 週目の時期に、PBMC 培養中に Tax 特異的 CTL の強い増殖が認められた。これまでのところ、Tax ペプチド添加樹状細胞ワクチンは安全で有効性を持つことが示唆される。

A. 研究目的

ATL 患者に対する Tax 特異的 CTL 応答の強化を意図した、CTL エピトープ部位のペプチドを付加した樹状細胞 (DC) 免疫ワクチン療法の確立を目的とする。本年度は、新規にモガムリズマブとワクチンの併用療法の実用化を目指した臨床治験に向けて準備を行なうとともに、昨年より予備的に開始した第 I 相臨床試験 (プロトタイプ) を施行した 3 人の ATL 症例の宿主免疫応答を追跡するため Tax 特異的 CTL をはじめとする T 細胞応答解析を行った。

B. 研究方法

1. ATL 患者に対する Tax ペプチド添加 DC 免疫ワクチン療法 (プロトタイプ)
試験参加の同意を得た既治療の ATL 患者由来のアフェレーシス採取単核球から密度勾配法と接着法により単球を分離し、AZT 存在下で、DC 誘導刺激(GM-CSF, IL-4)、DC 成熟刺激(TNF- α , KLH, OK432)を加え培養する。得られた成熟

DC に患者 HLA に合致する Tax 特異的 CT レピトープ部位のペプチドを添加し一旦凍結し製剤とする。安全性試験を経た後、2 週間隔で 3 回、Tax ペプチド添加 DC を皮下投与する。今回の 3 名の患者は九州癌センターでリクルートされ、DC 調整は九州大学病院の細胞調整施設で実施された。

2. Tax ペプチド添加 DC 免疫ワクチン療法 (プロトタイプ) 施行後の ATL 患者の免疫解析
i) DC 免疫ワクチン療法前後の免疫解析として、末梢血単核球の細胞表面抗原、HLA/Tax ペプチドテトラマー染色による CTL 頻度の解析、Tax 抗原および CMV に対する応答性をフローサイトメトリーで評価した。
ii) ATL 細胞の定性
ATL 患者リンパ節細胞の表面形質、短期培養後の HTLV-1 抗原発現をフローサイトメトリー、ELISA を用いて測定した。

3. ワクチン原候補となる Tax 特異的 T 細胞エピトープの探索

骨髓非破壊的造血幹細胞移植前の ATL 患者から自家 HTLV-1 感染 T 細胞株を樹立し、これを抗原として移植後寛解時の PBMC を刺激培養した。

得られた HTLV-1 特異的 T 細胞株の認識エピトープを同定するため、自家 B 細胞株に HTLV-1 抗原、およびペプチドを添加し反応性を IFN γ 産生能で評価した。また、種々の HLA を有する allo-HTLV-1 感染細胞株を用いて HLA の拘束性を調べた。

4. 新規モガムリズマブ/Tax ペプチド添加 DC ワクチンの併用療法の実用化を目指した臨床治験に向け準備

医師主導臨床治験の承認を受けるため、申請に必要なプロトコル作成、安全性試験、品質試験に関する班員による打ち合わせを九州または東京で頻回に行い、複数回の PMDA への事前相談を経て、申請書類の作成を行った。

(倫理面への配慮)

「成人 T 細胞白血病(ATL)に対する HTLV-1 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」は、九州大学と東京医科歯科大学の倫理審査委員会により承認済みである。

C. 研究結果

1. 第 I 相臨床試験 (プロトタイプ) 参加 ATL 患者における Tax ペプチド添加 DC ワクチン接種後の免疫応答追跡

現在、九州がんセンター病院でフォローアップされている第 I 相臨床試験 (プロトタイプ) 参加 ATL 患者 3 名の T 細胞応答解析を行った。3 名中 2 名は HLA-A*2402 のエピトープ Tax301-309 ペプチドを添加した DC ワクチンの接種、1 名は HLA-A*0201 のエピトープ Tax11-19 ペプチドを添加した DC ワクチンの投与を 3 回受け、以後抗がん剤の投与無しに経過している。末梢血 CD8+細胞中の Tax 特異的テトラマー陽性 CTL の頻度は、DC 接種以前から検出できていた例では大きな変化はなかった。HLA-A*0201 のエピトープペプチドパルス DC を投与された症例では、Tax 特異的 CTL は DC ワクチン前には検出されなかったが、ワクチン後 2 週目以降に HLA-A*0201/Tax11-19 テトラマー陽性 CTL が検出された。同症例では HLA-

A11*01 も陽性であったが、HLA-A*1101/Tax 88-96 テトラマー陽性 CTL は検出されなかったことから、ワクチン用いた Tax11-19 ペプチドに対する特異的応答であることが示唆された。3 症例とも DC 接種開始から 16-20 週目の末梢血検体で、培養中に Tax 特異的 CTL の増殖が観察された。

2. Tax 特異的 CD4+T 細胞の認識エピトープ探索九州がんセンターを試験本部として実施している ATL に対する骨髓非破壊的造血幹細胞移植の臨床試験 (第 4 期試験、非血縁者間骨髓移植) 参加患者の免疫応答解析の結果、Tax 特異的 CD4 陽性 T 細胞の認識エピトープマッピングを行い、Tax 蛋白の中央部分に 13 アミノ酸から成る最小認識エピトープ配列を同定した。さらにこれが HLA-DR1 に拘束されることが判明した。

D. 考察

ATL に対する Tax ペプチド添加樹状細胞療法の第 I 相試験 (プロトタイプ) 参加症例の経過は安定しており安全性が確認された。今回の免疫解析で Tax 特異的 CTL の活性も確認されたことから、今後、ATL に対する腫瘍ワクチン療法は有望な治療方法として期待できる。これらの症例では前治療にレナリドマイド、モガムリズマブ等が含まれていたことから、前治療の免疫修飾効果が好影響を及ぼした可能性がある。本研究で新規に医師主導臨床治験を計画しているプロトコルでは、これまでの研究成果を踏まえ、モガムリズマブと Tax ペプチドパルス DC ワクチンを併用する。治験の申請のために多大な準備が必要であるが、安全性に注意を払い必要な手続きを進めたい。新たに同定された Tax 特異的 CD4+T 細胞の認識エピトープは、Tax 特異的 CTL 応答を助長する効果がある。現在は 1 種類の HLA に限られるため限定的だが、今後、このようなヘルパーエピトープが複数同定できればワクチンへの貢献が期待される。

E. 結論

成人 T 細胞白血病(ATL)に対する HTLV-1 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免疫療法第 I 相臨床試験 (プロトタイプ) の安全性が確認された。新規の医師主導臨床治験「抗 CCR4 抗体を併用した樹状細胞療法」の治験申請準備が進んだ。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamai Y, Hasegawa A, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, and Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4⁺ T cells to graft-versus-Tax effects in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J. Immunol* 190: 4382-4392, 2013
2. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, and Kannagi M. Interferon- α (IFN- α) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- α combined with zidovudin induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology*, 10:52, 2013

2. 学会発表

(国際学会)

1. Kannagi M, Kinpara S, Takamori A, Sasada A, and Hasegawa A. Impact of innate and acquired immune responses in Adult T-cell Leukemia. AACR/JCA Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research, taking place February 21-25, 2013, Maui. (Invited speaker)
2. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y, Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Identification of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-1 Tax-specific CD4⁺ T-cells augmenting HTLV-1-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic HSCT. The 9th AACR-Japanese cancer association joint conference, Feb. 2013, Maui.
3. Kannagi M. Allogeneic BM transplantation in ATL: Whom to transplant and which modality to use? Can we go beyond BM transplantation? 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Clinical trial workshop. June 26-30, 2013, Montréal. (Solicited speaker)
4. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Maeda Y,

Yamano Y, Eto T, Koh KR, Nakamae H, Suehiro Y, Kato K, Takemoto S, Okamura J, Uike N, Kannagi M. Augmentation of donor-derived Tax-specific CTL responses by a novel Tax epitope-specific CD4⁺ helper T-cells in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses. June 26- 30, 2013, Montréal.

5. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. IFN- α suppresses HTLV-1 expression via PKR in infected cells and renders them susceptible to AZT through p53 activation in AZT/IFN- α treatment. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses June 26-30, 2013, Montréal. (Young Investigator Award)
6. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Choi I, Fukuda T, Takaishi S, Tanosaki R, Utsunomiya A, Miura O, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M, Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with peptides corresponding to Tax-specific CTL epitopes. 16th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses. June 26-30, 2013, Montréal.
7. Kannagi M, Hasegawa A, Suehiro Y, Takamori A, Kinpara S, Ando S, Utsunomiya A, Choi I, Uike N. Immunological control of HTLV-1: Prospective therapy towards prophylaxis of disease. 第6回HTLV-1研究会国際シンポジウム. 2013年8月, 東京 (Invited speaker).

(国内学会)

1. 長谷川温彦、安藤聡美、高森絢子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、神奈木真理. ATL 発症予防、治療を目的としたペプチドパルス樹状細胞療法に関する研究. 第23回日本樹状細胞研究会 2013年5月17日、京都
2. Hasegawa A, Tamai Y, Takamori A, Sasada A, Tanosaki R, Choi I, Utsunomiya A, Suehiro Y, Maeda Y, Yamano Y, Uike N, Kannagi M. Identification of novel HTLV-1-specific CD4 epitopes in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation [同種造血幹細胞移

植後 ATL 患者からの新規 HTLV-1 特異的 CD4 エピトープの同定] 第 72 回日本癌学会 2013 年 10 月, 横浜

3. Kinpara S, Kijiyama M, Takamori A, Hasegawa A, Sasada A, Masuda T, Tanaka Y, Utsunomiya A, Kannagi M. Therapeutic mechanism of AZT/IFN- α treatment for ATL: Involvement of RNA-dependent protein kinase and p53 pathway [インターフェロン α とAZTの併用はATL細胞に対しHTLV-I遺伝子発現低下とp53活性化を誘導する] 第72回日本癌学会2013年10月, 横浜
4. Takamori A, Hasegawa A, Utsunomiya A, Choi I, Tanosaki R, Eto T, Kato K, Tamai Y, Sasada A, Suehiro Y, Uike N, Kannagi M. Kinetics of Tax-specific CTL in ATL patients following hematopoietic stem cell transplantation from uninfected donors [造血幹細胞移植後のATL患者における HTLV-1 Tax特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) 応答の推移] 第72回日本癌学会2013年10月, 横浜
5. Suehiro Y, Hasegawa A, Ino T, Sasada A, Watanabe N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Matsuoka M, Teshima T, Akashi K, Okamura J, Kannagi M. and Uike N. The phase-I study of a therapeutic vaccine to ATL patients with autologous dendritic cells pulsed with Tax peptides [「ATLに対するHTLV-1 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免疫療法」第一相臨床試験] 第72回日本癌学会シンポジウム2013年10月, 横浜
6. Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, Masuda T, Kannagi M. Peptide-pulsed dendritic cell vaccine reinduced functional Tax-specific CD8+ T cells in orally HTLV-1 infected rats with impaired Tax-specific CD8+ T cells responses. 日本免疫学会 2013 年 12 月、幕張

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 玉井洋太郎、長谷川温彦、神奈木真理、田野崎隆二. HLA-DR1 拘束性 HTLV-1 Tax 特異的 CD4+T 細胞エピトープ。平成 25 年 1 月 9 日出願 (特願 2013-002127、東京医科歯科大学)

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
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）
分担研究報告書

プロトコール作成 ATL に対する樹状細胞ワクチン療法の開発

研究分担者：赤司 浩一 九州大学大学院 医学研究院 教授

研究要旨

我々は、九州大学において、イノベーションセンター、病態修復内科学、病態制御内科学、九州がんセンターなどの医療機関と共同で、成人 T 細胞性白血病に対する樹状細胞療法の医師主導治験を立ち上げつつあり、特にイノベーションセンター細胞調整室(CPC)における GMP グレードの細胞調整の基盤整備に尽力した。現在までに、本治験の CPC 運用上での文書面での整備を行い、それらをもとに、スモールスケールで、健常人由来末梢血を CPC で、GMP に準拠した状況で培養を行うシミュレーションを行った。その結果、工程上の問題点の整理を行うとともに、最終産物である樹状細胞が純度よく、無菌的に回収できることの確認ができた。この結果をもとに、実際の臨床スケールでの健常人ドナーからの末梢血単核球を用いて CPC で GMP に準拠した治験と同一のプロセスで最終製品である樹状細胞を作成し、安全性、品質などを評価することを予定している。

A. 研究目的

これまでの成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する樹状細胞療法の臨床試験の経験及び基礎的検討から医師主導治験としての樹状細胞ワクチン療法の開発と細胞療法を行う上での組織、ハード的な基盤を構築することが本研究の目的である。

B. 研究方法

医師主導治験に向けての基盤構築が主な研究内容である。特に、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) への細胞加工製品としての治験薬である樹状細胞の非臨床安全性評価の相談についての資料、実験計画を作成すること、そしてワクチン療法の具体的なプロトコール作成を共同研究期間との間の協議、話し合いを行うことで、治験としての樹状細胞療法を徐々に具体化、実現化していく。

また、医師主導治験における無菌細胞培養調整室(CPC)の運用を目的とした、GMP(Good Manufacturing Practice: 薬事法に基づく厚生労働大臣が定めた、医薬品等の品質管理基準)に準拠した細胞培養及び加工に関する運用の整備、その書類作成、実施体制の構築を行う。

さらに、前臨床段階の検証として、健常人ドナーからの末梢血単核球を用いて実際にCPCでGMPに準拠した治験と同一のプロセスで最終製品である樹状細胞を作成することで、安全性、

品質などを評価する。

(倫理面への配慮) 健常人ドナーからの末梢血単核球採取及び細胞培養、加工に関しては、すでに倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1) ワクチン療法のプロトコールについて

ATL 患者からアフレーシスを行って得た末梢血単核球を培養しワクチン療法として投与する単球由来の樹状細胞を得るが、ATL の場合、ATL 細胞の混入が問題となる。そこで、樹状細胞ワクチン投与直前に抗 CCR4 抗体を ATL 患者に投与すること、培養中に逆転写酵素阻害剤 (AZT) を加えることで、ATL 細胞の増殖、混入を防ぐ方法を開発し、新規の次世代ワクチン療法プロトコールを作成した。抗 CCR4 抗体の意義は、ATL 細胞に対する直接的な効果のみならず、CCR4 陽性の制御性 T 細胞を抑制することで、抗腫瘍免疫も増強 (樹状細胞療法に対する相乗効果) することも期待している。ATL 患者で、CCR4 抗体投与後に末梢血中から ATL 細胞が数日以内に著減すること、制御性 T 細胞が著減することを自験例、文献で確認した。

2) 無菌細胞培養室(CPC)の運用について

適切な医師主導治験を行うために治験薬 GMP に準拠した文書管理を徹底した。CPC の

全体の運用の管理文書はすでに我々は作成していたので、本研究においては、「成人 T 細胞白血病の治癒を目指した病因ウイルス特異抗原を標的とする新規複合的ワクチン療法」の医師主導治験に特化した管理文書を作成した。すなわち、樹状細胞の培養工程（製造工程）の手順書、製造指図・記録書、衛生管理、構造設備のバリデーション、出荷基準に関する管理文書を作成した。これら、GMP に基づく CPC 運用で、実際の治験を行う予定であるが、これら一連の CPC 運用、管理体系について問題がないか健康人の末梢血単核球を用いてバリデーションを行うことにしている。評価項目としては、安全性の確認（無菌検査）、品質の確認（得られた細胞の表面マーカーの解析と機能解析）を行い我々の培養工程、CPC の運用体制の妥当性、安全性を客観的に評価した。スモールスケール（末梢血 100ml）からの出発材料では問題なかったことを確認できた。引き続き、実際の臨床スケール（アフエレーシス由来産物）で行う予定にしており、倫理委員会の承認を得た段階である。近日中に行う予定である。

D. 考察

我々が、ATL に対して考案した抗 CCR4 抗体併用樹状細胞療法の妥当性に関しては、PMDA、厚生労働省で評価の後、さらに各医療機関で倫理委員会にて評価する。その際、臨床治療プロトコルの安全性、治験製剤の安全性が評価されることが予測される。治験製剤の原材料に関して、安全性の確認を文献的、製造業者に対して、書面で確認を行い問題はなかった。特に培地に含まれる生物由来の成分（ヒトアルブミン、トランスフェリン）に関しては、トレーサビリティ（追跡可能性）のあるものを用いることでより安全性を高めることにした。一連の製造工程の安全性の確認のためには、さらに健康人からのアフエレーシスによって採取した末梢血単核球を同一の工程で樹状細胞製剤を製造し、免疫不全マウスに投与し、安全性を確認する予定である。その上で、医師主導臨床治験を行い安全性、有効性を確認し、次世代のワクチン療法の確立を目指す。

E. 結論

ATL に対して根治の期待できる治療は現段階では同種末梢血幹細胞移植療法のみであるが、この治療は移植適応のある患者に限定されるといふ欠点がある。本臨床研究のプロトタイプで

ある厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）（H22-がん臨床-一般-028）「成人 T 細胞白血病(ATL) の根治を目指した細胞療法の確立およびその HTLV-1 抑制メカニズムの解明に関する研究」研究班での「ATL に対する HTLV-1 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免疫療法」は、少数例ながらも造血幹細胞移植不適応症例に対して、安全性と一定の有効性が確認できた。本臨床研究はその成果と経験をもとに、抗 CCR4 抗体を併用するという、一歩進めた次世代の細胞ワクチン療法であり、治験ということも踏まえると、克服すべき課題も少なくない。しかし、徐々に動物実験を含む基礎的データを蓄積すること、細胞療法や医師主導治験をとりまく環境、基盤を「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」を遵守した上で、整備することで、「成人 T 細胞白血病の治癒を目指した病因ウイルス特異抗原を標的とする新規複合的ワクチン療法：抗 CCR4 抗体を併用した樹状細胞療法 第 I/II 相試験」に関する研究は、徐々に具体化しつつあると言える。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ito Y, Miyamoto T, Chong Y, Aoki T, Kato K, Akashi K, Kamimura T. Successful treatment with anti-CC chemokine receptor 4 MoAb of relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma after umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 48: 998-999, 2013
2. Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Ishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood* 121: 1316-1325, 2013
3. Kato K, Miyamoto T, Numata A, Nakaike T, Oka H, Yurino A, Kuriyama T, Mori Y, Yamasaki S, Muta T, Takenaka K, Iwasaki H, Teshima T, Akashi K. Diffuse panbronchiolitis after humanized anti-CCR4 monoclonal antibody therapy for relapsed adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Hematol* 97: 430-432, 2013
4. Iwamoto C, Takenaka K, Urata S, Yamauchi T, Shima T, Kuriyama T, Daitoku S, Saito Y, Miyamoto T, Iwasaki H, Kitabayashi I, Itoh K, Kishimoto J, Kohda D, Matozaki T, Akashi K.

The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. *Exp Hematol* 2014 (Received 27 June 2013; revised 5 November 2013; accepted 7 November 2013)

2. 学会発表

1. 『造血幹細胞と造血器癌幹細胞』 赤司 浩一、第 110 回日本内科学会 2013 年 4 月 13 日 東京（東京国際フォーラム）
2. 『治療標的としてのヒト白血病幹細胞』 赤司 浩一、BIO tech 2013 国際バイオテクノロジー展 2013 年 5 月 8 日 東京（東京ビックサイト）
3. 『Epigenetic Landscape of Hematopoietic Lineage Commitment Can Be Visualized by Analysis of Incorporated H3.3 Variant』 Akashi K. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting 2013 年 5 月 25 日 Vienna, Austria
4. 『Epigenetic landscape of hematopoiesis visualized by histone H3.3 incorporation is deregulated in acute myeloid leukemia』 Akashi K. 第 72 回日本癌学会学術総会（シンポジウム講演） 2013 年 10 月 4 日 横浜（パシフィコ横浜）
5. 『Cancer Stem Cells in Human Hematological Malignancies』 Akashi K. 第 72 回日本癌学会学術総会（モーニングレクチャー） 2013 年 10 月 5 日 横浜（パシフィコ横浜）
6. 『Visualization of the epigenetic landscape of hematopoietic lineage commitment based on the analysis of histone H3.3 incorporation』 Akashi K. 第 75 回日本血液学会学術集会（シンポジウム講演） 2013 年 10 月 13 日 札幌（さっぽろ芸文館）
7. 『造血器癌幹細胞 Malignant hematopoietic stem cell』 赤司 浩一、第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 2013 年 12 月 1 日 福岡（ヒルトン福岡シーホーク）

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）
分担研究報告書

CCR4 抗体による免疫賦活作用の解析

研究分担者：石田 高司 名古屋市立大学 腫瘍・免疫内科学 准教授

研究要旨

免疫を負に制御する各種制御性 T 細胞(Treg)のうち、最も強い Treg 活性を有する、CD45RA^{lo}FOXP3^{hi}の effector Treg は CCR4 を強発現している。すなわち、CCR4 抗体(モガムリズマブ)は CCR4 発現 ATL 細胞を直接傷害することに加えて、effector Treg を減少させ、抗腫瘍免疫応答を増強する可能性がある。このことを検証するために、モガムリズマブ治療を受けた ATL 患者において、各種 Treg の動態に加え、HTLV-1 Tax に対する特異的 T 細胞の動態および機能解析を行った。結果、モガムリズマブ治療は effector Treg を除去することにより、Tax 特異的な免疫応答を増強させることが明らかになった。さらには、患者由来 ATL マウスモデルに対する Tax 特異的 CD8 陽性 T 細胞の養子免疫治療実験で、治療群の生存期間は有意に延長した。この結果は、ATL 治療の標的分子としての、Tax の妥当性を示すものである。

以上より、CCR4 抗体(ATL 細胞および effector Treg の除去)と HTLV-1 Tax に対する樹状細胞療法との併用は ATL に対し、有望な治療法と考えられる。

A. 研究目的

2012 年、ATL に対する治療薬として CCR4 抗体(モガムリズマブ)が日本で承認された。一方、免疫を負に制御する制御性 T 細胞(Treg)の一部も CCR4 を発現していることから、本抗体の標的となる可能性が示唆されている。すなわち、CCR4 抗体は CCR4 発現 ATL 細胞を直接傷害することに加えて、Treg 細胞を減少せしめ、抗腫瘍免疫応答を増強している可能性が考えられる。このことから、CCR4 抗体による Treg 除去の可能性およびそれに伴う HTLV-1 Tax に対する免疫応答の動態解析を行った。これにより、CCR4 抗体(ATL 細胞および Treg の除去) + HTLV-1 Tax に対する樹状細胞療法という ATL に対する新規免疫療法開発の可能性を検討した。

B. 研究方法

モガムリズマブ治療中の ATL 患者において、effector Treg (CD45RA^{lo}FOXP3^{hi})の頻度、HTLV-1 Tax、に対する特異的細胞性免疫応答、液性免疫応答を解析した。モガムリズマブ治療中の ATL 患者の免疫応答を解析するにあたり、多施設共同前方視的観察臨床研究”ATL に対するモガムリズマブ治療中の免疫モニタリング”を実施した。本試験は名古屋市立大学病院医薬品等臨床試験審査委員会の承認を得た。

Tax に対する特異免疫応答は、ATL 患者由来の

腫瘍細胞で ATL マウス(NOG)を作成し、さらに同一の患者から Tax 特異的 CTL を誘導し、治療実験を実施することにより評価した。

(倫理面への配慮)

患者由来の腫瘍細胞を用いたヒト化リンパ腫マウスを用いた併用実験については、実施するにあたり、それぞれ下記の委員会の承認を得ている。名古屋市立大学大学院医学研究科ヒト遺伝子倫理審査委員会、名古屋市立大学医学部遺伝子組み換え実験安全委員会、名古屋市立大学大学院医学研究科動物実験委員会。

C. 研究結果

ヒトでは FOXP3 分子発現の Treg 特異性が低いが、FOXP3 の発現レベルと CD45RA により FOXP3+CD4+細胞を 3 つに分類することで、より厳密に Treg を定義することが可能である。すなわち、naive Treg (CD45RA^{hi}FOXP3^{lo})、effector Treg (CD45RA^{lo}FOXP3^{hi})、non-Treg (CD45RA^{lo}FOXP3^{lo})に分類され、naive Treg および effector Treg は免疫抑制活性を有するが、non-Treg は抑制活性を有しない。また、naive Treg より effector Treg の方が強い抑制活性を持っている。CCR4 の発現は naive Treg では認めず、effector Treg が強い。よって、CCR4 抗体で標的となる Treg は、理論上 effector Treg であるが、実際にモガムリズマブの治療を受けた ATL 患者では、effector Treg の存在比率は著

しく低下し、Tax に対する特異的 CTL は増加していた。また、effector Treg が低下した状態において Tax 特異的 CTL の誘導効率は著しく向上した。このことは、モガムリズマブ治療によって effector Treg が除去されることにより、Tax に対する免疫応答が増強することを意味している。

さらに HTLV-1 Tax は G0 期にある末梢血中の ATL 細胞でその発現を認めないケースでも、リンパ節など、ATL 細胞増殖の場と考えられるリンパ節など ATL 細胞にとっての微小環境を有する場においては発現を認めることを研究分担者は見出し、報告している(Cancer Sci. 2012 ;103:1764-73.)。また、ATL 患者より得た ATL 細胞を用いて ATL モデルマウスを樹立、同一患者から Tax 特異的 CD8 陽性 T 細胞を増幅し、養子免疫治療実験を行った。結果、治療群では各臓器への ATL 細胞の浸潤が抑制され、生存期間は有意に延長した。これらの結果は、ATL 治療の標的分子としての、Tax の妥当性を示すものである。

D. 考察

モガムリズマブ治療は effector Treg を除去することにより、Tax 特異的な免疫応答を増強させる。また、モガムリズマブ治療は、分担者研究者らがその存在を証明した一部の ATL 患者における HTLV-1 HBZ に対する免疫応答をも増強せしめ、抗 ATL 作用を示す可能性を有する。

E. 結論

CCR4 抗体(ATL 細胞および effector Treg の除去)と HTLV-1 Tax に対する樹状細胞療法の併用は ATL に対し、有望な治療法と考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishida T, Ito A, Sato F, Kusumoto S, Iida S, Inagaki H, Morita A, Akinaga S, Ueda R. Stevens-Johnson Syndrome associated with mogamulizumab treatment of Adult T-cell leukemia/lymphoma. Cancer Sci. 2013; 104:647-50. (corresponding author)
2. Ogura M*, Ishida T*, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, Fujimoto K, Yamamoto K, Miyamoto T, Uike N, Tanimoto M, Tsukasaki K, Ishizawa K, Suzumiya J, Inagaki H, Tamura K, Akinaga S, Tomonaga M, Ueda R. Multicenter phase II study of mogamulizumab (KW-0761), a defucosylated anti-CCR4 antibody, in patients with relapsed peripheral T-

- cell lymphoma and cutaneous T-cell lymphoma. J Clin Oncol, in press. (*equally contributed)
3. Narita T, Ishida T, Masaki A, Suzuki S, Ito A, Mori F, Yamada T, Masaki Ri, Kusumoto S, Komatsu H, Miyazaki Y, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Niimi A, Iida S, Ueda R. HTLV-1 bZIP factor specific CD4 T cell responses in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. J Immunol. 2014 Feb 1;192:940-7. (corresponding author)
4. Ishida T, Hishizawa M, Kato K, Tanosaki R, Fukuda T, Takatsuka Y, Eto T, Miyazaki Y, Hidaka M, Uike N, Miyamoto T, Tsudo M, Sakamaki H, Morishima Y, Suzuki R, Utsunomiya A. Impact of GVHD on allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T-cell leukemia-lymphoma focusing on preconditioning regimens: nationwide retrospective study Biology of Blood and Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. . 2013;19:1731-9. (corresponding author)
5. Suzuki T, Kusumoto S, Yoshida T, Mori F, Ito A, Ri M, Ishida T, Komatsu H, Niimi A, Iida S. Successful salvage therapy using lenalidomide in a patient with relapsed multiple myeloma after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Int J Hematol. 2013;97:540-3.
6. Masaki A, Ishida T, Suzuki S, Ito A, Mori F, Sato F, Narita T, Yamada T, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Tanaka Y, Niimi A, Inagaki H, Iida S, Ueda R. Autologous Tax-specific CTL therapy in a primary ATL cell-bearing NOD/Shi-scid, IL-2R γ ^{null} mouse model. J Immunol. 2013;191(1):135-44. (corresponding author)
7. Sato F, Ishida T, Ito A, Mori F, Masaki A, Takino H, Narita T, Ri M, Kusumoto S, Suzuki S, Komatsu H, Niimi A, Ueda R, Inagaki H, Iida S. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model. Leuk Res. 2013;37:21-7. (corresponding author)
8. Inagaki A, Tajima E, Uranishi M, Totani H, Asao Y, Ogura H, Masaki A, Yoshida T, Mori F, Ito A, Yano H, Ri M, Kayukawa S, Kataoka T, Kusumoto S, Ishida T, Hayami Y, Hanamura I, Komatsu H, Inagaki H, Matsuda Y, Ueda R, Iida S. Global real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detecting proto-oncogenes associated with

- 14q32 chromosomal translocation as a valuable marker for predicting survival in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2013;37:1648-55.
9. Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, Ishida T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, Mizokami M, Ueda R, Utsunomiya A. Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab. *Hepatol Res.* 2013 Mar 26. doi: 10.1111/hepr.12117. [Epub ahead of print]
 10. Mori F, Ishida T, Ito A, Sato F, Masaki A, Narita T, Suzuki S, Yamada T, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Hishizawa M, Imada K, Takaori-Kondo A, Niimi A, Ueda R, Inagaki H, Iida S. Antitumor effects of bevacizumab in a microenvironment-dependent human adult T-cell leukemia/lymphoma mouse model. *Eur J Haematol.* 2013 Nov 5. doi: 10.1111/ejh.12231. [Epub ahead of print] (corresponding author)
 11. Miyazaki Y, Fujiwara H, Asai H, Ochi F, Ochi T, Azuma T, Ishida T, Okamoto S, Mineno J, Kuzushima K, Shiku H, Yasukawa M. Development of a novel redirected T cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. *Blood.* 2013 Jun 13;121(24):4894-901.
 12. Kato H, Saito C, Ito E, Furuhashi T, Nishida E, Ishida T, Ueda R, Inagaki H, Morita A. Bath-PUVA Therapy Decreases Infiltrating CCR4-Expressing Tumor Cells and Regulatory T Cells in Patients With Mycosis Fungoides. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013 Jun ; 13(3):273-80.
 13. Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, Ishida T, Ueda R, Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H. Prognostic impact of miR-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/ lymphoma. *Hum Pathol.* In press
 14. 石田 高司. 成人 T 細胞性白血病に対する新規治療法, 日本内科学会雑誌, 102(7):1744-50, 2013
 15. 宇都宮 與, 石田 高司. 成人 T 細胞白血病・リンパ腫に対する同種移植の成績, 血液内科, 66(6), 781-88, 2013
 16. 森 芙美子, 石田 高司. 末梢性 $\gamma\delta$ T 細胞リンパ腫, 日本臨床別冊血液症候群, 第 2 版 409-13, 2013
 17. 小畑長英, 秋永士朗, 石田高司, 上田龍三. ヒト化抗 CCR4 抗体モガムリズマブの T 細胞リンパ腫への臨床応用, 腫瘍内科, 11(3), 325- 31, 2013
 18. 稲垣淳, 石田高司. 抗 CCR4 抗体医薬による T 細胞性腫瘍の治療, (編者: 高久史麿), *Annual Review 血液* 2013, 158-164, 2013, 中外医学社(東京),
- ## 2. 学会発表
1. Jo T, Ishida T, Takemoto S, Suzushima H, Uozumi K, Yamamoto K, Uike N, Saburi Y, Nosaka K, Utsunomiya A, Tobinai K, Fujiwara H, Ishitsuka K, Yoshida S, Taira N, Moriuchi Y, Imada K, Miyamoto T, Tomonaga M, Ueda R. Randomized phase II study of mogamulizumab (KW-0761) plus VCAP-AMP-VECP (mLSG15) versus mLSG15 alone for newly diagnosed aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL). 2013 ASCO Annual Meeting , Oral Abstract Session, *J Clin Oncol* 31, 2013 (suppl; abstr 8506)
 2. Ueda R, Ogura M, Ishida T, Hatake K, Taniwaki M, Ando K, Tobinai K, Fujimoto K, Yamamoto K, Miyamoto T, Uike N, Tanimoto M, Tsukasaki K, Ishizawa K, Suzumiya J, Inagaki H, Tamura K, Akinaga S, Tomonaga M. The Efficacy and Safety of Mogamulizumab (KW-0761) in Multicenter Phase II Study for Patients with Relapsed Peripheral or Cutaneous T-Cell Lymphoma (oral) (abs 041) 12th International Conference on Malignant Lymphoma. 19-22 June 2013. Lugano, Switzerland.
 3. Takemoto S, Ishida T, Jo T, Uozumi K, Suzushima H, Yamamoto K, Uike N, Saburi Y, Nosaka K, Utsunomiya A, Tobinai K, Fujiwara H, Ishitsuka K, Yoshida S, Taira N, Moriuchi Y, Imada K, Miyamoto T, Tsukasaki K, Tomonaga M, Ueda R. Combination of Mogamulizumab (KW-0761) with VCAP-AMP-VECP (mLSG15) is Well Tolerated and Effective as an Initial Therapy for Aggressive Adult T-Cell Leukaemia-Lymphoma (ATL) (oral) (abs 154) 12th International Conference on Malignant Lymphoma. 19-22 June 2013. Lugano, Switzerland.
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- 特になし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（がん関係研究分野）
分担研究報告書

ATL 症例の HTLV-1 プロウイルス解析

研究分担者：松岡 雅雄 京都大学ウイルス研究所 教授

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) は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) の原因ウイルスであるが、ATL 細胞では、限られたウイルス遺伝子の発現しか認められない。ATL 症例は Tax, HBZ を発現するものと HBZ のみを発現するものに分けられる。HBZ のみを発現する症例は、Tax を発現しないものと、最早、発現できないタイプに分類できる。我々の解析により全症例の約 30% は Tax を発現できないタイプのプロウイルスを有していた。Tax を標的とする治療法の適応患者選択に重要な情報であると考え。HTLV-1 のモデルとなるサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) の解析を行い、STLV-1 が極めて HTLV-1 と類似した機能を有することを見出した。

A. 研究目的

HTLV-1 によって引き起こされる ATL では、発現するウイルス遺伝子は限られている。Tax は抗原性が高く、細胞傷害性 T リンパ球の標的となるために、その発現は抑制されており、症例によっては発現できない遺伝子の変異・欠失、DNA メチル化が起こっていることが報告されている。Tax を標的とした治療法を考える場合、腫瘍細胞が Tax を発現できるか否かは最も重要な問題であり、我々は樹状細胞治療適応症例での HTLV-1 プロウイルスを解析して、治療の feasibility を検討すると共に、Tax 発現抑制機構を明らかにすることを目的としている。HTLV-1 に対する免疫応答を解析する場合に適切な動物モデルは、これまでなかった。我々はサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) 感染ニホンザルが HTLV-1 の良い感染モデルとなるかを検討した。

B. 研究方法

- 1) tax の第一、第二エクソンは PCR でゲノム DNA から増幅して塩基配列を決定した。5'側 long terminal repeat (LTR) の DNA メチル化は sodium bisulfite 法で解析した。5'側 LTR の欠損は long-distance PCR で検出した。
- 2) STLV-1 の tax, STLV-1 bZIP factor (SBZ) 遺伝子発現ベクターを構築し、NF- κ B, TGF- β , AP-1, NFAT, Wnt 経路に対する効果を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるプロウイルス解析は京都大

学倫理委員会の承認 (承認番号 G-311, 844) を基に遂行している。動物実験に関しては、動物愛護法に基づいた京都大学動物委員会の承認を得て遂行している。(承認番号: D13-02)

C. 研究結果

1) ATL 症例の解析から 12% の症例では tax 遺伝子にナンセンス変異が検出された。また、約 12% では 5'側 LTR の高メチル化が認められた。約 30% では 5'側 LTR が欠失しており、このように 5'側 LTR が欠失・メチル化されている場合、tax に変異・欠失がある症例では Tax は発現できないことが示唆される。一方、tax 遺伝子の転写が検出された症例 (34%) に加えて、tax 遺伝子配列が保持され、5'側 LTR にメチル化、欠失がない症例は Tax を発現することが可能であり、このような症例は Tax に対する免疫治療の対象となるものと推測された。この結果からみて、約半数の ATL 症例は Tax に対する免疫治療の適応になるものと推測される。

2) STLV-1 がコードする Tax (sTax)、STLV-1 bZIP factor (SBZ) の機能解析
STLV-1 の全塩基配列を決定し、HBZ と相同性がある、SBZ をコードするオープンリーディングフレームを見出した。HBZ と同様のスプライシングを確認できた。SBZ の発現を RT-PCR で確認した。この SBZ を発現ベクターに組み込み、解析を行った。sTax は Tax と同様に NF- κ B, AP-1, NFAT 経路を活性化した。同様に sTax も

これらの経路を活性化した。我々は HBZ が NF- κ B, NFAT, AP-1 経路を阻害して、TGF- β /Smad 経路を活性化することを報告しているが、SBZ も同様の機能を有していた。HBZ を T リンパ球に発現させると Foxp3 遺伝子の発現を誘導するが、SBZ をマウス T リンパ球に発現させると同様に Foxp3 遺伝子の発現が誘導された。以上のことから STLV-1 がコードする Tax, SBZ は HTLV-1 の Tax, HBZ と極めて良く似た機能を有することが明らかになった。

D. 考察

Tax は抗原性が高く細胞傷害性 T リンパ球の標的となりやすい。このため免疫治療の標的としては優れているが、ウイルスは Tax を発現しにくくする戦略を進化させている。一方、HBZ は恒常的に発現しており免疫治療の標的となりうるが、抗原性は低い。Tax を標的とした免疫治療を行う場合、その症例が Tax を発現しうるかを解析することは必須である。本臨床研究では、症例の HTLV-1 プロウイルスを迅速に診断するようになっており、治療の合理性を担保するようになっている。

HTLV-1 の動物モデルとしては、トランスジェニックマウス、ヒト化マウスなどが存在する。トランスジェニックマウスは導入遺伝子産物に免疫応答をみることができないという欠点があり、ヒト化マウスでのヒト免疫能も十分ではない。このため HTLV-1 に対する免疫応答の解析に適切なモデルが求められていた。本研究により、STLV-1 の Tax, SBZ が HTLV-1 Tax, HBZ と極めて類似した活性を有することが明らかとなった。また、1 頭の高齢の STLV-1 感染ニホンザルで T リンパ腫の発症が確認されており、STLV-1 が HTLV-1 と同様の病原性を有することが示された。ニホンザルはヒトに対する抗体が使用可能であることが多く、極めて優れた動物モデルである。実際、STLV-1 感染 T リンパ球は CCR4 陽性であり、抗 CCR4 抗体でプロウイルス量が減少することを確認できている。

E. 結論

HTLV-1 プロウイルス解析から Tax に対する免疫治療法適応基盤を明らかにした。HTLV-1 のモデルとして STLV-1 感染ニホンザルが有用であることを示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J-I, Takai K and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. *Cancer Res*, 74:188-200, 2014.
2. Zhao T, Coutts A, Xu L, Yu J, Ohshima K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor supports proliferation of adult T cell leukemia cells through suppression of C/EBP α signaling. *Retrovirology*, 10:159, 2013.
3. Miura M, Yasunaga J-I, Tanabe J, Sugata K, Zhao T, Ma G, Miyazato P, Ohshima K, Kaneko A, Watanabe A, Saito A, Akari H and Matsuoka M. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology*, 10: 118, 2013.
4. Yamamoto-Taguchi N, Satou Y, Miyazato P, Ohshima K, Nakagawa M, Katagiri K, Kinashi T, and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor induces inflammation through labile Foxp3 expression. *PLoS Pathogens*, 9: e1003630, 2013.

2. 学会発表

1. Matsuoka M: Molecular Pathogenesis by HTLV-1 bZIP Factor: The 15th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, Moscow, Russia, September 8-12, 2013.
2. Matsuoka M: How human T-cell leukemia virus type 1 induces diseases: FRONTIERS OF RETROVIROLOGY, Churchill College, Cambridge University, UK, September 16-18, 2013.
3. 田中梓、安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor suppresses intrinsic and extrinsic apoptotic pathways by targeting FoxO3a: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2013 年 10 月 3-5 日
4. 三浦未知、趙鉄軍、馬広勇、安永純一郎、松岡雅雄: Simian T-cell leukemia virus type 1-infected Japanese Macaques as a model for HTLV-1 research: 第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2013 年 10 月 3-5 日
5. Yasunaga J-I, Guangyong Ma, Jun Fan, Yanagawa S-I, Matsuoka M: Perturbation of the

Wnt pathway by HTLV-1 is important in viral replication and cell proliferation: 第 75 回日本血液学会学術集会、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館（北海道）、2013 年 10 月 11-13 日

6. 松岡雅雄、安永純一郎：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型による発がん：Tax と HBZ の拮抗と協調：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日
7. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄：組換えウイルスを用いた抗 HTLV-1 ワクチンの作製と Macaque 属での応用：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日
8. 園直希、馬広勇、萩屋啓太、安永純一郎、松岡雅雄：FBXL11 は HTLV-1 bZIP factor と Tax の機能を共に増強し ATL 細胞の増殖を促進する：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日
9. 紀ノ定明香、安永純一郎、伊豫田智典、稲葉カヨ、松岡雅雄：HBZ による CD4 陽性 T 細胞増殖促進の免疫学的機序：第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場（兵庫県）、2013 年 11 月 10-12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし