

HTLV-1 感染疾患機序における自然免疫の役割解明と疾患リスク予知への応用

**HAM/TSP 患者病態の臨床研究
(HTLV-1 感染者に対するガンマデルタ T 細胞療法の確立)**

担当責任者 佐藤 知雄 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 講師

研究要旨：

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) のキャリアは全国に 100 万人以上と推定されている。このキャリアの一部が成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) や HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を発症するが、どちらも難治性の疾患で治療の選択肢が限られている。また、未発症キャリアに対する発症予防法もいまだ確立していない。こうした状況の根本原因となっている HTLV-1 感染細胞に対する制御法を確立することが問題解決に重要と考えられる。これまで感染細胞を制御するエフェクター細胞として、獲得免疫を担う細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が主に研究されてきたが、HAM では CTL が多いにもかかわらずウイルス量が高く、CTL だけでは説明できない。そこで本研究課題では、近年効率のよい増殖方法が開発された自然免疫系のエフェクター細胞の 1 つである $\gamma\delta$ T 細胞に着目し、HAM、ATL 患者を含む HTLV-1 感染者に対する $\gamma\delta$ T 細胞を用いた免疫細胞療法の可能性について検討することとした。まず HTLV-1 感染者の $\gamma\delta$ T 細胞に関する基本的な特徴 (頻度、感染率など) を調べ、次に HTLV-1 感染者由来末梢血単核球から、感染細胞まで増殖されてしまわない δ T 細胞の培養調整法を検討した。その結果、今年度は、

- ✓ 自然免疫を担う $\gamma\delta$ T 細胞が通常の $\alpha\beta$ T 細胞と異なり、ほとんど HTLV-1 に感染していないことを発見した。
- ✓ CD4/CD8 陽性細胞を培養前に除去することで、感染細胞を増殖させることなく、 $\gamma\delta$ T 細胞を培養調整できる方法を確立した。

さらに、研究班全体で取り組んでいる HTLV-1 感染疾患間の相違の解明に向け、

- ✓ HAM 患者検体の提供を行った。

今後は、 $\gamma\delta$ T 細胞の直接作用あるいは抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性による抗 HTLV-1 感染細胞活性について検討し、ハイリスクキャリアに対する発症予防や CCR4 抗体療法との併用による ATL 再発予防など HTLV-1 感染者に対する $\gamma\delta$ T 細胞療法の臨床応用を目指す。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) のキャリアは全国に 108 万人と推定されている。その一部は成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) という予後不良の疾患を発症し、また別

の一部は、HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) という進行性の歩行障害や排尿障害を来す慢性炎症性疾患を発症する。現在のところ、どちらの疾患を発症したとしても、治療の選択肢は限られている。また、妊婦健診に HTLV-1 抗体検査が組み込まれ、全国的にキャリアと告知される機会

が増加しているにも関わらず、未発症キャリアに対する発症予防法もいまだ確立していない。そのため、キャリアの発症予防法開発および HTLV-1 関連疾患に対する新規治療法開発は急務である。こうした中、HTLV-1 感染者のウイルス量（感染細胞数）が、これら疾患の発病リスクや疾患の重症度と相関していることが判明してきた。したがって、HTLV-1 感染細胞の制御法を確立することが上記課題の解決にむけた一手段として極めて有用であると考えられる。

HTLV-1 感染細胞を制御するエフェクター細胞には、これまで獲得免疫を担う細胞傷害性 T 細胞（CTL）が主に研究されてきた。しかし、HAM では、この CTL が増えているにもかかわらず、ウイルス量が高いことが知られている。また、CTL は MHC class I を発現する細胞を標的として認識するが、HTLV-1 感染細胞は MHC class I の発現を低下させることで CTL 抵抗性を獲得している可能性も指摘されている。したがって、CTL による細胞傷害から免れた感染細胞や ATL 細胞に対して自然免疫を担う MHC 非拘束性のエフェクター細胞が抗 HTLV-1 感染細胞効果を発揮する可能性が考えられる。そこで本研究課題では、近年効率のよい増殖方法が開発された自然免疫系のエフェクター細胞の 1 つである $\gamma\delta$ T 細胞に着目し、HTLV-1 感染疾患患者を含む HTLV-1 感染者に対する $\gamma\delta$ T 細胞を用いた免疫細胞療法の可能性について検討することとした。

HTLV-1 感染者に対する $\gamma\delta$ T 細胞療法を確立するにあたって、

- 1) HTLV-1 感染者の $\gamma\delta$ T 細胞に関する基本的な情報（頻度、感染率など）が存在しないため、この細胞が免疫細胞療法に適していない可能性がある
- 2) HTLV-1 感染者由来末梢血単核球

(PBMC) から $\gamma\delta$ T 細胞を選択的に培養増殖させる際に、感染細胞と一緒に増殖されてしまうリスクがあるといった問題が考えられた。

そのため、今年度前半には、まず HAM、ATL 患者を含む HTLV-1 感染者における $\gamma\delta$ T 細胞の基本的特徴を調べ、後半に HTLV-1 感染者 PBMC から、感染細胞を増殖させずに $\gamma\delta$ T 細胞を調整する培養方法の確立を目指した。

さらに、研究班全体で取り組んでいる HTLV-1 感染疾患間における相違の解明に向け、HAM 患者検体の提供も行った。

B. 研究方法

1) 本研究課題に必要な臨床検体の収集、保存および提供について

聖マリアンナ医科大学病院HAM専門外来に受診された無症候性キャリア（AC）、HAM患者より、倫理審査承認済みの同意書を得て検体を収集した。ATL患者検体については、共同研究機関として登録済みの今村病院分院より提供して頂いた。検体より、PBMC、血清、血漿、DNAを分離して保存・バンク化した。同時に、患者の家族歴、重症度、治療内容や経過に関する詳細な臨床情報を蓄積した。

2) PBMC 中における $\gamma\delta$ T 細胞およびその他の細胞群の頻度の測定

AC14例、HAM患者29例およびATL患者8例のPBMCを用いて、フローサイトメトリーにより、以下の細胞群のPBMC中における割合を測定した。

$\gamma\delta$ T(CD3⁺V γ 9⁺)細胞
NK(CD3⁺CD56⁺)細胞
CD4⁺ T(CD3⁺CD4⁺)細胞
CD8⁺ T(CD3⁺CD8⁺)細胞

各細胞群の頻度が AC、HAM 及び

ATL 間で異なるかどうか調べるために、Tukey の方法による多重比較を実施した。

3) HTLV-1 プロウイルス量と各細胞群の頻度の相関解析

上記 2) で対象とした AC14 例および HAM 患者 29 例 (計 43 例) の PBMC より抽出されたゲノム DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を実施し、HTLV-1 プロウイルス量を測定した。測定されたウイルス量と各細胞群の頻度についてピアソンの相関解析を実施し、相関の有無を調べた。

4) HTLV-1 感染者由来 $\gamma\delta$ T 細胞の感染率

HAM 患者 5 例、AC1 例の計 6 例の PBMC を使用して、CD3 陽性 $V\gamma 9$ 陽性の $\gamma\delta$ T 細胞とそれ以外の CD3 陽性細胞を FACS によりソートし、この 2 群よりゲノム DNA を抽出した。抽出された DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を実施し、HTLV-1 プロウイルス量を決定した。これら 2 群のウイルス量は paired 2-tailed Student's *t* test によって検定した。

5) HTLV-1 感染者 PBMC の $\gamma\delta$ T 細胞の選択的増殖法の検討

培地は ALyS203 (株式会社細胞科学研究所) に 10% 自己血漿、IL-2 (final 1000IU/mL) およびゾメタ (ノバルティス、final 5 μ M) を添加して使用した。健常者 3 例および HTLV-1 感染者 9 例 (AC5 例、HAM4 例) の全血より分離した PBMC を上記の培地を用いて 14 日間培養した。培養前後の $\gamma\delta$ T (CD3⁺ $V\gamma 9$ ⁺) 細胞の増殖率を比較した。

上記にて培養後の感染細胞の増加が確認されたため、その防止策とし

て、PBMC から培養をスタートする群以外に、あらかじめ CD4 陽性細胞を除いた群と、CD4/CD8 陽性細胞の両者を除いた群を追加し、以下の 3 群を starting material として培養を実施した。

① PBMCs

② CD4⁺ cell-depleted PBMCs

③ CD4⁺/CD8⁺ cell-depleted PBMCs
細胞の depletion は CD4 ビーズ、CD8 ビーズおよび LS カラム (いずれもミルテニー) を用いた positive depletion とした。上記 3 条件で 14 日間培養した前後の HTLV-1 プロウイルス量を測定し、培地中に含まれていた全感染細胞の増加率を比較した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された (承認番号: 第 1646 号) 同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、個人情報管理者が連結可能匿名化により番号化する為、提供者を特定できないようにして、患者の人権擁護に努めた。

C. 研究結果

1) 本研究課題に必要な臨床検体の収集、保存および提供について

今年度、ステロイド未治療 HAM 患者 3 例およびステロイド治療 HAM 患者 3 例の計 6 例より採取した凍結 PBMC ($6 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞) を HAM 患者細胞株樹立のために神奈木真理先生 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 免疫治療学分野) の元へ提供することができた。

2) PBMC 中における $\gamma\delta$ T 細胞およびそ

の他の細胞群の頻度の測定

HAM 患者では、PBMC 中に含まれる $\gamma\delta$ T 細胞の割合が AC と比較して有意に低いことが判明した (図1)。しかし、NK 細胞、 $CD4^+$ T 細胞、 $CD8^+$ T 細胞の割合は AC と比較して有意差を認めなかった。一方、ATL 患者では、 $CD4^+$ T 細胞率が AC と比較して有意に高く、逆に $\gamma\delta$ T 細胞率および NK 細胞率は AC と比較して有意に低いことがわかった (図1)。

3) HTLV-1 プロウイルス量と各細胞群の頻度の相関解析

AC および HAM 患者においては、PBMC 中の $\gamma\delta$ T 細胞率と HTLV-1 プロウイルス量が弱いながら有意な逆相関を示すことが判明した (図2)。一方、NK 細胞および $CD8^+$ T 細胞の割合は HTLV-1 プロウイルス量との相関を認めなかった。 $CD4^+$ T 細胞率は HTLV-1 プロウイルス量と正の相関を示す傾向が認められたが、有意差は得られなかった (図2)。

4) HTLV-1 感染者由来 $\gamma\delta$ T 細胞の感染率

HAM 患者 5 例、AC1 例の計 6 例の PBMC よりソートした $\gamma\delta$ T 細胞と、それ以外の $CD3$ 陽性細胞では、平均 HTLV-1 プロウイルス量がそれぞれ 1.2、10.6 (copies/100 cells) であり、 $\gamma\delta$ T 細胞の感染率は通常の T 細胞と比較して有意に低いことが判明した。(図3)。

5) HTLV-1 感染者 PBMC の $\gamma\delta$ T 細胞の選択的増殖法の検討

健常者 3 例および HTLV-1 感染者 9 例の PBMC を用いて $\gamma\delta$ T 細胞を選択的に刺激すると、どちらも培養前後の $\gamma\delta$ T 細胞の増殖率は平均約 2000 倍

となり、HTLV-1 感染者であっても健常者と同等の増殖を確認できた (data not shown)。

次に、培養中の感染細胞の増殖を防止できるか前述した 3 つの条件で比較したところ、PBMC から培養を開始した場合、培養による $\gamma\delta$ T 細胞の増殖とともに感染細胞数が平均 24 倍増加した。あらかじめ主な感染細胞を含む $CD4^+$ 細胞を除くことによって、感染細胞の平均増加率は 3.5 倍となり、さらに、 $CD8^+$ 細胞も除くことによって、0.03 倍まで増加率を抑制できた (図 5)。

D. 考察

これまで HTLV-1 関連分野において $\gamma\delta$ T 細胞はほとんど研究されてこなかったため、HTLV-1 感染者における $\gamma\delta$ T 細胞に関する基本的な情報が不足していた。それが本研究によって、いくつかの重要な知見が明らかとなった。1 つは、HAM 患者や ATL 患者では $\gamma\delta$ T 細胞の頻度が低下しており、キャリアと HAM では、その頻度が低下しているほど、プロウイルス量が増加しているという逆相関を認めた点である。これは相関関係であって必ずしも因果関係を意味しないが、 $\gamma\delta$ T 細胞が感染細胞の制御に関与している可能性を示唆するものである。もう 1 つは $\gamma\delta$ T 細胞が通常の T 細胞と比較して、HTLV-1 感染率が顕著に低い点である。免疫細胞療法は患者 (HTLV-1 感染者) から血液を取り出して目的の細胞群を増殖させた後、患者本人へ戻すという手順を踏むため、NKT 細胞のように抗 HTLV-1 細胞活性があったとしても、それ自身が HTLV-1 に多く感染していた場合、増殖させて体内へ戻すという方法をとることは安全性の観点から難しい。しかし、その点、 $\gamma\delta$ T 細胞の感染率は非常に低く、すでにこの

細胞を効率的かつ選択的に増殖させる方法が確立されていることから、 $\gamma\delta$ T 細胞は HTLV-1 感染者における免疫細胞療法に非常に適した細胞群であると考えられた。

$\gamma\delta$ T 細胞による免疫細胞療法を実施しようとする場合、HTLV-1 感染者由来の PBMC から $\gamma\delta$ T 細胞を選択的に増殖させたとしても、もともと PBMC 中に含まれていた感染細胞が $\gamma\delta$ T 細胞とともに増殖してしまうリスクが考えられた。実際、感染者の PBMC を IL-2 とゾメタを用いて、 $\gamma\delta$ T 細胞を刺激増殖させた場合に培養前後でウイルス感染細胞数が平均 24 倍、多いと 100 倍以上に増加してしまうことがわかった。そのため、あらかじめ $CD4^+$ 細胞、さらに $CD8^+$ 細胞まで除いてから培養する方法を試みた。その結果、 $CD4^+/CD8^+$ 細胞の両者を除いておけば、培養前に含まれていた感染細胞をほとんど増加させることなく、 $\gamma\delta$ T 細胞を増殖させることが可能であった。この方法は、HTLV-1 感染を有する「がん患者」に対して安全な $\gamma\delta$ T 細胞療法を提供できる可能性を示すものである。現在までに $\gamma\delta$ T 細胞療法は、多発性骨髄腫などの血液がん、非小細胞肺癌、前立腺癌などのがん患者に投与する臨床研究が行われ、すでに安全性は確立し、一部のがん患者における有効性も示されてきている。しかし、これまで HTLV-1 保有者は、培養中に感染細胞が増殖してしまうリスクが考えられたため、安全性を考慮して原則禁忌とされていた。しかし、本研究で開発された培養調整法を用いれば、この問題を回避できるものと考えられる。

E. 結論

今年度、本研究によって、

- ✓ 自然免疫を担う $\gamma\delta$ T 細胞が通常の $\alpha\beta$ T 細胞と異なり、ほとんど HTLV-1 に感染していないことを発見した

- ✓ $CD4/CD8$ 陽性細胞を培養前に除去することで、感染細胞を増殖させることなく、 $\gamma\delta$ T 細胞を培養調整できる方法を確立した

さらに、研究班全体で取り組んでいる HTLV-1 感染疾患間の相違の解明に向け、

- ✓ HAM 患者検体の提供を行った。

今後は、 $\gamma\delta$ T 細胞の直接作用あるいは抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性による抗 HTLV-1 感染細胞活性について検討し、ハイリスクキャリアに対する発症予防や CCR4 抗体療法との併用による ATL 再発予防など HTLV-1 感染疾患患者および無症候性キャリアに対する $\gamma\delta$ T 細胞療法の臨床応用を目指す。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Yamano Y, Sugano S, Ueda K.

A plasma diagnostic model of human T-cell leukemia virus-1 associated myelopathy.

Ann Clin Transl Neurol, 2015 *in press*.

Yamauchi J, Coler-Reilly A, Sato T, Araya N, Yagishita N, Ando H, Kunitomo Y, Takahashi K, Tanaka Y, Shibagaki Y, Nishioka K, Nakajima T, Hasegawa Y, Utsunomiya A, Kimura K, Yamano Y.

Anti-CCR4 antibody mogamulizumab targets human T-lymphotropic virus type I-infected $CD8^+$ as well as $CD4^+$ T cells to treat associated myelopathy.

J Infect Dis, 211(2): 238-248, 2015.

Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y.

HLVL-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells.

J Clin Invest, 124(8):3431-3442, 2014.

2. 学会発表

Ishihara M, Araya N, Sato T, Fujii R, Tatsuguchi A, Saichi N, Nakagawa H, Yamano Y, Ueda K. Quantitative membrane proteome profiling to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL). AACR Annual Meeting 2014, 5-9 April, 2014, San Diego, USA..

佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、山内淳司、國友康夫、高橋克典、齋藤祐美、石川美穂、八木下尚子、山野嘉久. HAMにおけるTh1様異常T細胞の発生機構および病態への関与, 第19回日本神経感染症学会総会学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 2014年9月4日~6日, 石川県(金沢市).

山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, Ariella Coler-Reilly, 國友康夫, 高橋克典, 八木下尚子, 佐藤知雄, 宇都宮與, 山野嘉久. HAMにおける抗CCR4抗体療法の有用性およびCCR4+CD8+T細胞の異常に関する検討. 第19回日本神経感染症学会総会

学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会, 2014年9月4日~6日, 石川県(金沢市).

山野嘉久, 木村美也子, 八木下尚子, 鈴木弘子, 石川美穂, 小池美佳子, 齋藤祐美, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 高田礼子. HAM患者登録システム「HAMねっと」を用いた疫学的解析. 第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014年8月22日~24日, 東京都(港区).

佐藤知雄, 井上永介, 新谷奈津美, 高橋克典, 國友康夫, Ariella Coler-Reilly, 山内淳司, 八木下尚子, 山野嘉久. HTLV-1関連脊髄症(HAM)の臨床的評価指標の有用性に関する検討. 第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014年8月22日~24日, 東京都(港区).

新谷奈津美, 佐藤知雄, 安藤仁, 外丸詩野, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 山内淳司, 長谷川温彦, 神奈木真理, 田中勇悦, 宇都宮與, 山野嘉久. HTLV-1によるHTLV-1関連脊髄症(HAM)病原性T細胞の発生機構の解析. 第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014年8月22日~24日, 東京都(港区).

八木下尚子, 有福厚孝, 菊池崇之, 木村未祐奈, 佐藤健太郎, 石川美穂, 鈴木弘子, 小池美佳子, 齋藤祐美, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 木村美也子, 高田礼子, 山野嘉久. HTLV-1関連脊髄症(HAM)患者登録システム「HAMねっと」の患者満足度調査. 第1回日本HTLV-1学会学術集会, 2014年8月22日~24日, 東京都(港区).

山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, 國友康夫, 高橋克典, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 佐藤知雄, 宇都宮與, 山野嘉久. HAM における抗 CCR4 抗体療法の有用性および CCR4+CD8+T 細胞の異常に関する検討. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2014 年 8 月 22 日~24 日, 東京都 (港区).

石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 藤井理沙, 最知直美, 宇都宮與, 山野嘉久, 菅野純夫, 植田幸嗣. CD4 陽性 T 細胞を用いた膜プロテオーム解析による HTLV-1 関連脊髄症に対する新規

治療標的分子の探索. 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2014 年 8 月 22 日~24 日, 東京都 (港区).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他

図 1 PBMC 中における $\gamma\delta$ T 細胞およびその他の細胞群の割合

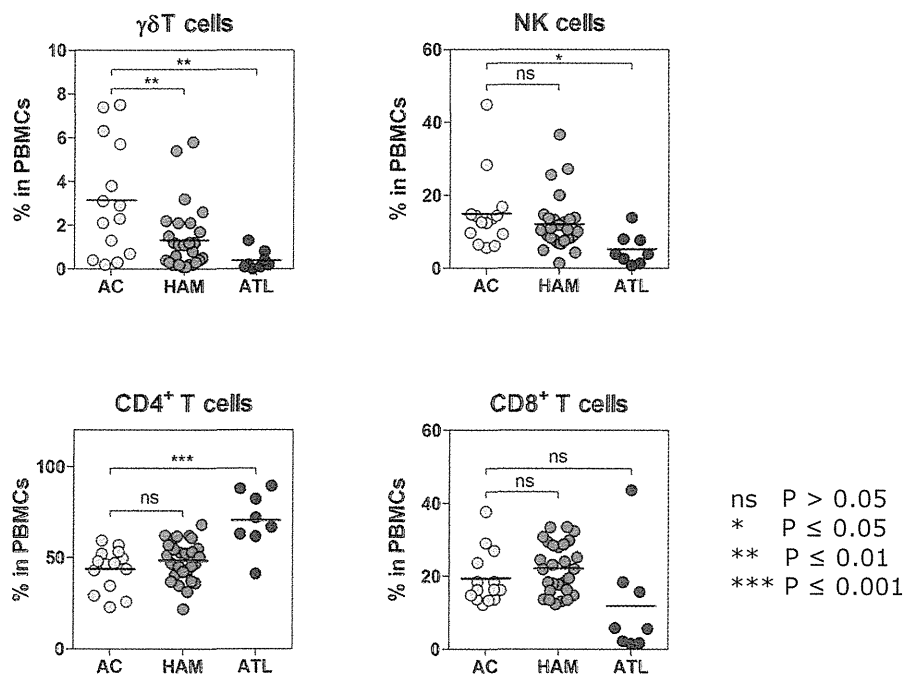


図2 HTLV-1 プロウイルス量と各細胞群の頻度の相関解析

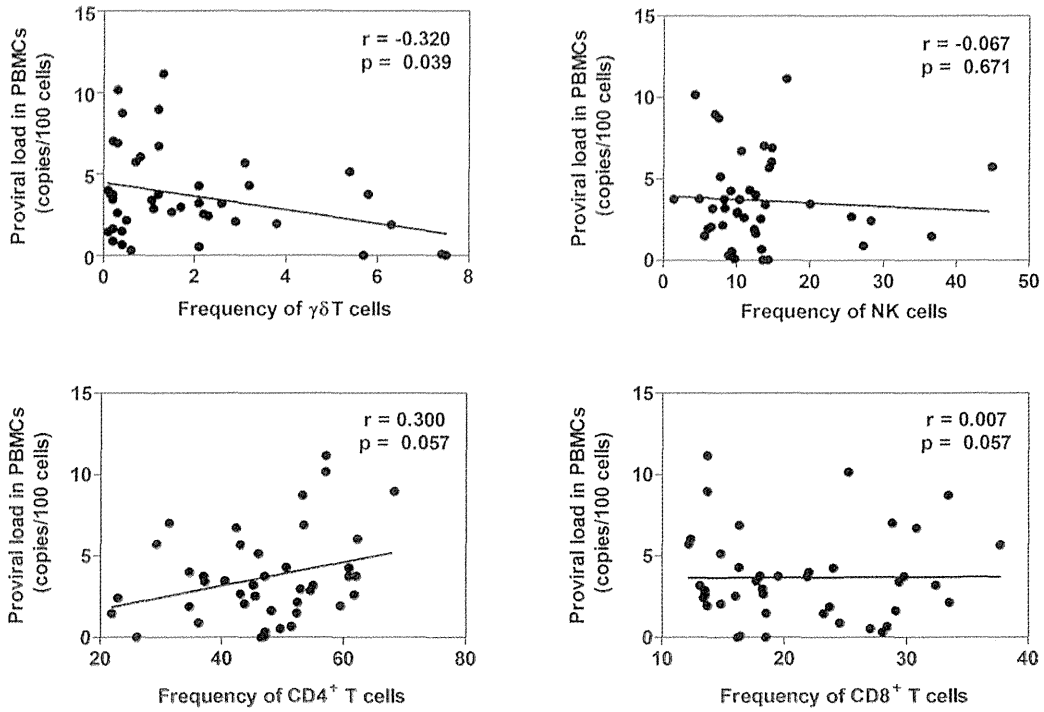


図3 $\gamma\delta$ T 細胞の HTLV-1 感染率

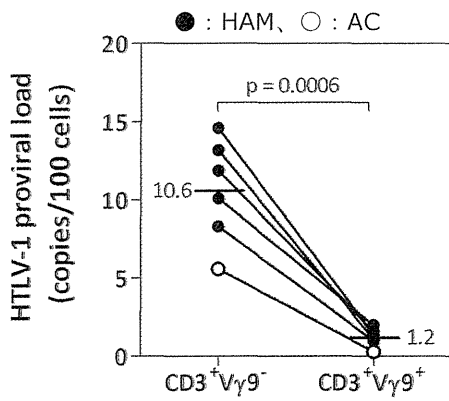
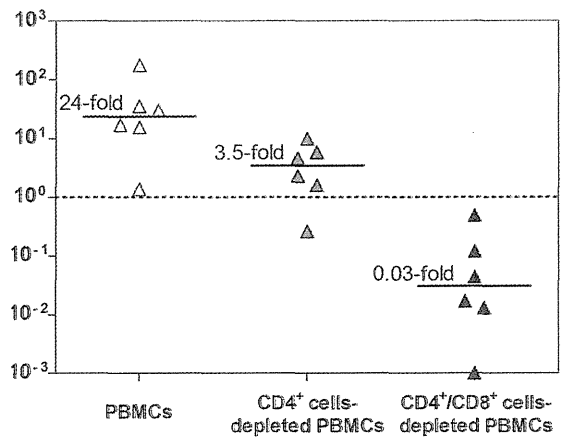


図4 培養後のウイルス絶対量増加率



HTLV-1感染疾患機序における自然免疫の役割解明と疾患リスク予知への応用

ATL患者における病態解析（同種造血幹細胞移植療法後の免疫動態）

担当責任者 崔日承 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター 血液内科 医師

研究要旨： 同種造血細胞移植を行ったATL患者におけるtax特異的CTLの動態を解析した。HLA一致血縁者から末梢血幹細胞移植を行った20例と骨髄バンクドナーから骨髄移植を行った15例を対象とした。それぞれ20例中13例、15例中11例が検出可能なHLAを有した。移植前はそれぞれ13例中12例、11例中全例でtax特異的CTLが認められた。移植後はそれぞれ13例中12例、11例中7例でtax特異的CTLが検出された。Tax特異的CTLの動態は、ドナーがHTLV-1キャリアか否かによって異なる可能性が示唆された。

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な難治性成熟 T 細胞腫瘍である。同種造血細胞移植は ATL に治癒をもたらす治療法であり、移植後の同種免疫反応が腫瘍制御に関与していると考えられている。また、移植後に寛解を維持している患者より、HTLV-1 関連分子である tax 特異的な細胞傷害性 T 細胞（CTL）が認められることが報告されている。我々は ATL に対する骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血細胞移植の前向き臨床研究に登録された症例の移植前後の免疫動態を明らかにするために、tax 特異的 CTL の動態を追跡した。

B. 研究方法

ATL に対する同種末梢血幹細胞による骨髄非破壊的移植療法の検討（多施設共同第Ⅱ相試験）（ATL-NST-3）および、ATL への非血縁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（ATL-NST-4）の2つの前向き臨床研究において、HLA A*02:01、A*24:02を有する患者の HTLV-1 tax 特異的

CTL を追跡した。Tax 特異的 CTL はテトラマー法を用いたフローサイトメトリーにて測定した。

（倫理面への配慮）

それぞれの臨床研究は各施設の倫理委員会で承認され、患者には同意説明文書を用いて説明し、文書にて同意を得た。

C. 研究結果

ATL-NST-3 は化学療法にて病勢が CR（9例）、PR（8例）、NC（3例）までにコントロールされている患者 20 例に骨髄非破壊的前処置による同種造血細胞移植が行われ、ドナーは HLA が一致する血縁者（同胞 17 例、子 3 例）で、移植幹細胞源は G-CSF を用いて動員した末梢血幹細胞を用いた。患者年齢中央値は 54 歳（50-68）、男性 10 例、急性型 13 例、リンパ腫型 7 例であった。20 例中 13 例は、ドナーの抗 HTLV-1 抗体が陽性であった。20 例中 13 例で tax 特異的 CTL の測定が可能であった。13 例中 12 例で、移植前に tax 特異的 CTL が検出された。移植後は、13 例中 11 例で、tax 特異的 CTL が検出された。ドナーが HTLV-1 キャリア陽性の場合（6 例）、移植後 30 日目より

tax 特異的 CTL が認められたが、ドナーが HTLV-1 抗体陰性の場合 (7 例)、tax 特異的 CTL は、移植後 90 日以降に認められた。

ATL-NST-4 では化学療法にて病勢が CR (8 例) または PR (8 例) にコントロールされた 15 例に同種造血細胞移植が行われた。HLA A, B が一致し、DR の遺伝子型 1 座不一致までが許容された日本骨髄バンクドナーより、骨髄移植を行った。ドナーは全例、抗 HTLV-1 抗体陰性であった。患者年齢中央値は 58 歳 (51-62)、男性 7 例、急性型 12 例、リンパ腫型 3 例であった。15 例中 11 例で tax 特異的 CTL の検出が可能であった。11 例全例で移植前に tax 特異的 CTL が認められた。移植後は 7 例で tax 特異的 CTL が認められ、移植後 60 日以降から検出された。

D. 考察

ATL 患者における tax 特異的 CTL は化学療法後の状態でも観察された。検出された CTL の tax を発現する HTLV-1 感染細胞に対する細胞障害活性を直接確認出来てはならず、この CTL の意義は不明である。同種造血細胞移植後に検出される tax 特異的 CTL は移植後キメリズム解析の結果から、ドナー由来の CTL と考えられる。同種造血細胞移植後の HTLV-1 プロウイルスは多くの例で低下するが、tax 特異的 CTL が何らかの役割を果たしている可能性がある。CTL の動態は、ドナーがキャリアの場合とキャリアで無い場合では異なる可能性が示唆された。

E. 結論

ATL に対する同種造血細胞移植前後の tax 特異的 CTL の動態を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文雑誌

1. Kato K, Choi I, Wake A, Uike N, Taniguchi S, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Nakamae H, Oku E, Murata M, Eto T, Akashi K, Sakamaki H, Kato K, Suzuki R, Yamanaka T, Utsunomiya A. Treatment of patients with adult T cell leukemia/lymphoma with cord blood transplantation: a Japanese nationwide retrospective survey. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2014) 20 (1968-1974)
2. Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, Matsuoka M, Takamori A, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, Fukuda T, Miura O, Takaishi S, Teshima T, Akashi K, Kannagi M, Uike N, Okamura J. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T-cell leukaemia/lymphoma in a pilot study. *Br J Haematol* (2015) (in press).

2. 学会発表

1. 崔日承, ATLL に対する骨髄移植・末梢血幹細胞移植の最適化, 第 36 回 日本造血細胞移植学会総会 シンポジウム「成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATLL)に対する造血幹細胞移植の最適化」 沖縄 2014 年 3 月 5 日-7 日
2. Unrelated bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning regimen for elderly patients with adult T-cell leukemia/lymphoma, feasibility

- study with two year follow up data, Choi I, Eto T, Tanosaki R, Shimokawa M, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Takemoto S, Taguchi J, Fukushima T, Kato K, Teshima T, Nakamae H, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, Uike N, 19th Congress Of The European Hematology Association (Poster, 14-June-2014, Milan, Italy)
3. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma, Choi I, Uike N, 12th Annual Meeting of Japanese Society of Clinical Oncology (Workshop, 17-July-2014, Fukuoka)
 4. Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation Using Reduced-Intensity Conditioning Regimen with Fludarabine and Busulfan from HLA-Matched Related Donor for Elderly Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Results of Multicenter Phase II Study (ATL-NST-3), Tanosaki R, Choi I, Shimokawa M, Utsunomiya A, Tokunaga M, Nakano N, Fukuda T, Nakamae H, Takemoto S, Kusumoto S, Tomoyose T, Sueoka E, Shiratsuchi M, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, and Uike N, 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition (Poster, 7-December-2014, San Francisco, CA)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

HTLV-1感染疾患機序における自然免疫の役割解明と疾患リスク予知への応用

ATLおよび無症候HTLV-1キャリアの病態解析に関する研究

担当責任者 前田 裕弘 独立行政法人国立病院機構 大阪南医療センター 部長

研究要旨：ATLは予後不良の疾患であり、その病態を解明することは治療法の開発に連携することと考えられる。また、HTLV-Iキャリアとの病態の比較を行いながらATLへの進展の因子についても検討する。

A. 研究目的

ATL の病態を解明し、新たな画期的な治療法を開発することを目的とする。

性もあり、レチノイン酸の作用機序に興味もたれる。また、将来性のある薬物かどうかの評価も必要になる。

B. 研究方法

HTLV-I 陽性の細胞株以外に ATL 患者様の新鮮な血液を用いて、病態を解明する。われわれは細胞老化に着目し、ATL で細胞老化が亢進している現象を見いだした。さらに、抗がん剤以外での薬物で、細胞老化をさらに増強させる薬物を見だし、その作用機序も解明することを目的とする。

E. 結論

ATL の細胞老化というひとつの特異的な現象を突破口として治療法の開発の兆しがある。

（倫理面への配慮）

患者様の血液採取および遺伝情報に関してインフォームドコンセントを取得し、個人情報保護を完璧に行う。

F. 健康危険情報

重大な健康被害が発生し、又は発生するおそれがある場合には、厚生労働大臣の承認を得て、対策本部を設置する。

C. 研究結果

われわれは以前に、レチノイン酸が ATL の細胞老化を増強させる現象を見いだしており、細胞株だけでなく、患者様の細胞でも同様の現象が認められた。現時点ではレチノイン酸の作用機序は不明である。レチノイン酸以外の薬物も探索中である。

G. 研究発表

1. 論文発表

Maeda Y, et al. Senescence induction therapy for the treatment of adult T-cell leukemia.

Leukemia & Lymphoma 52:150-152, 2011

Maeda Y, et al. Retrovirus infection and retinoid.

T-cell leukemia. Edited by Olga Babusikova et al. InTECH, 2011

D. 考察

がん遺伝子が原因の細胞老化である可能

Maeda Y, et al. Effects of tamibarotene for treatment of adult T-cell leukemia.

Ann Hematology 91:629-631, 2012

Ohyama Y, Maeda Y, et al. Induction of molecular remission by using anti-CC-chemokine receptor 4 (anti-CCR4) antibodies for adult T-cell leukemia: a risk of opportunistic infection after treatment with anti-CCR4 antibodies.

Ann Hematology 93:169-71, 2014

2. 学会発表

Maeda Y, et al. Cellular senescence induction by retinoid on adult T-cell leukemia cells.

15th International Conference on Retrovirology HTLV-I and Related viruses (Leuven, Belgium) June 5-8, 2011

Eguchi G, Maeda Y, et al. Effects of anti-CCR4 antibodies for adult T-cell leukemia and a risk for Viral infection. 第 75 回 日本血液学会学術集会 2013 年 10 月 11 日～13 日

江口 剛、前田裕弘、他 成人 T 細胞白血病に対する CCR4 抗体投与による臨床効果の評価および皮膚障害と再発例に対する対応について

第 111 回日本内科学会講演会 平成 26 年 4 月 11 日～平成 26 年 4 月 13 日

前田裕弘、他 レチノイドによる細胞老化誘導療法

第 18 回 日本がん分子標的治療学会学術集会 平成 26 年 6 月 25 日～平成 26 年 6 月 27 日

Eguchi G, Maeda Y, et al. Occurrence of dermatopathy by treatment with anti-CCR4 antibodies for adult T-cell leukemia.

第 76 回 日本血液学会学術集会 平成 26 年 10 月 31 日～平成 26 年 11 月 2 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

4. 特許取得
なし
5. 実用新案登録
なし
6. その他
なし

III. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「HTLV-1 感染疾患機序における自然免疫の役割解明と疾患リスク予知」

機関名：国立大学法人 東京医科歯科大学

学校法人 聖マリアンナ医科大学

独立行政法人国立病院機構 九州がんセンター

独立行政法人国立病院機構 大阪南医療センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Immune control of the retrovirus-induced adult T-cell leukemia: fighting with invisible enemy.	<u>Kannagi M</u>	第 73 回日本癌学会総会シンポジウム	2014 年 9 月	国内
Involvement of PKR and anti-sense HTLV-1 transcripts in the constitutive activation of NF κ B in ATL cells.	Shuichi Kinpara, Yasunori Saitoh, Atsuhiko Hasegawa, Atae Utsunomiya, Masato Masuda, Yasushi Miyazaki, Masao Matsuoka, Masataka Nakamura, Shoji Yamaoka, Takao Masuda, <u>Mari Kannagi.</u>	第 73 回日本癌学会総会	2014 年 9 月	国内
The roles of acquired and innate immunity in HTLV1-infgection: Implacation for therapy and pathogenesis.	<u>Mari Kannagi,</u> Atsuhiko Hasegawa, Shuichi Kinpara, Youko Suehiro.	第 62 回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム	2014 年 11 月	国内
成人 T 細胞白血病の基礎免疫研究から発予防・治療ワクチンへ	<u>神奈木真理</u>	第 18 回日本がん免疫学会モーニングレクチャー（2）臨床	2014 年 8 月	国内
ATL 細胞内 NF- κ B 経路活性化に対する PKR 分子と HTLV-I LTR 領域由来転写産物の寄与.	金原秀一、齊藤愛記、長谷川温彦、宇都宮 與、増田昌人、宮崎泰司、松岡雅雄、中村正孝、山岡昇司、増田貴夫、 <u>神奈木真理.</u>	2014HTLV-1 学会	2014 年 8 月	国内

HTLV-1 感染細胞における自然免疫応答の検討.	伊藤さやか、金原秀一、金井秀美、野上開、Sawada Leila、永野佳子、長谷川温彦、神奈木真理.	2014HTLV-1 学会	2014 年 8 月	国内
CTL エピトープペプチドパルス樹状細胞によるウイルス特異的 T 細胞の誘導および感染細胞の制御.	安藤聡美、長谷川温彦、村上悠二、神奈木真理.	血液疾患免疫療法学会	2014 年 8 月	国内
CTL epitope peptide-pulsed dendritic cell vaccine has the potential to restore HTLV-1-specific CTLs to eliminate infected cells.	Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, Takatsuka N, Maeda Y, Masuda T, <u>Kannagi M.</u>	第 43 回日本免疫学会学術集会	2014 年 12 月	国内
Evaluation of anti-gp46 neutralizing monoclonal antibody vaccine against primary HTLV-1 infection to rats.	Murakami Y, Ando S, Tanaka Y, Tanaka R, Masuda T, <u>Kannagi M.</u> , Hasegawa A.	第 43 回日本免疫学会学術集会	2014 年 12 月	国内
A link between HTLV-1 leukemogenesis and innate immunity; involvement of PKR in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia cells	Kinpara S, Saitoh Y, Hasegawa A, Nakamura M, Yamaoka S, Matsuoka M, Masuda T, <u>Kannagi M.</u>	第 43 回日本免疫学会学術集会	2014 年 12 月	国内
HTLV-I 感染細胞における A20 はユビキチン化修飾酵素活性非依存的に細胞生存を支える ポスター発表	齋藤愛記、持田佳奈子、鶴山恵理、徳永文稔、 <u>山岡昇司</u>	第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会	2014 年 8 月 23 日	国内
A20 はそのユビキチン修飾活性に依存せず TNF- α による caspase-3 活性化を抑制する口頭発表	鶴山恵理、齋藤愛記、 <u>山岡昇司</u>	第 73 回癌学会総会	2014 年 9 月 25 日	国内
ヒト単球系細胞株 THP-1 分化モデルを用いた TNFIP3/A20 の抗アポトーシス機能の解析 ポスター発表	山口 遼、大迫 美穂、齋藤 愛記、持田 佳奈子、 <u>山岡 昇司</u>	第 37 回日本分子生物学会年会	2014 年 11 月 26 日	国内
Quantitative membrane proteome profiling to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL).	Ishihara M, Araya N, <u>Sato T</u> , Fujii R, Tatsuguchi A, Saichi N, Nakagawa H, Yamano Y, Ueda K.	AACR Annual Meeting 2014, San Diego, USA.	2014 年	国外
HAM における Th1 様異常 T 細胞の発生機構および病態への関与	佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、山内淳司、國友康夫、高橋克典、齋藤祐美、石川美穂、八木下尚子、山野嘉久.	第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会・第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会	2014 年	国内

HAMにおける抗CCR4抗体療法の有用性およびCCR4+CD8+T細胞の異常に関する検討	山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, Ariella Coler-Reilly, 國友康夫, 高橋克典, 八木下尚子, 佐藤知雄, 宇都宮與, 山野嘉久	第19回日本神経感染症学会総会学術集会・第26回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会	2014年	国内
HTLV-1関連脊髄症(HAM)の臨床的評価指標の有用性に関する検討	佐藤知雄, 井上永介, 新谷奈津美, 高橋克典, 國友康夫, Ariella Coler-Reilly, 山内淳司, 八木下尚子, 山野嘉久	第1回日本HTLV-1学会学術集会	2014年	国内
HAM患者登録システム「HAMねっと」を用いた疫学的解析	山野嘉久, 木村美也子, 八木下尚子, 鈴木弘子, 石川美穂, 小池美佳子, 齊藤祐美, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 高田礼子	第1回日本HTLV-1学会学術集会	2014年	国内
HTLV-1によるHTLV-1関連脊髄症(HAM)病原性T細胞の発生機構の解析	新谷奈津美, 佐藤知雄, 安藤仁, 外丸詩野, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 山内淳司, 長谷川温彦, 神奈木真理, 田中勇悦, 宇都宮與, 山野嘉久	第1回日本HTLV-1学会学術集会	2014年	国内
HTLV-1関連脊髄症(HAM)患者登録システム「HAMねっと」の患者満足度調査	八木下尚子, 有福厚孝, 菊池崇之, 木村未祐奈, 佐藤健太郎, 石川美穂, 鈴木弘子, 小池美佳子, 齊藤祐美, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 木村美也子, 高田礼子, 山野嘉久	第1回日本HTLV-1学会学術集会	2014年	国内
HAMにおける抗CCR4抗体療法の有用性およびCCR4+CD8+T細胞の異常に関する検討	山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, 國友康夫, 高橋克典, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 佐藤知雄, 宇都宮與, 山野嘉久	第1回日本HTLV-1学会学術集会	2014年	国内
CD4陽性T細胞を用いた膜プロテオーム解析によるHTLV-1関連脊髄症に対する新規治療標的分子の探索	石原誠人, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 藤井理沙, 最知直美, 宇都宮與, 山野嘉久, 菅野純夫, 植田幸嗣	第1回日本HTLV-1学会学術集会	2014年	国内

ATLL に対する骨髄移植・末梢血幹細胞移植の最適化(シンポジウム「成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATLL)に対する造血幹細胞移植の最適化」)	崔日承	第 36 回 日本造血細胞移植学会総会	2014. 3. 7	国内
Unrelated bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning regimen for elderly patients with adult T-cell leukemia/lymphoma, feasibility study with two year follow up data (Poster)	Choi I, Eto T, Tanosaki R, Shimokawa M, Takatsuka Y, Utsunomiya A, Takemoto S, Taguchi J, Fukushima T, Kato K, Teshima T, Nakamae H, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, Uike N	19th Congress Of The European Hematology Association (Milan, Italy)	2014. 6. 14	国外
Allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (Workshop)	Choi I, Uike N	12th Annual Meeting of Japanese Society of Clinical Oncology (Fukuoka)	2014. 7. 17	国内
Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation Using Reduced-Intensity Conditioning Regimen with Fludarabine and Busulfan from HLA-Matched Related Donor for Elderly Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma: Results of Multicenter Phase II Study (ATL-NST-3) (Poster)	Tanosaki R, Choi I, Shimokawa M, Utsunomiya A, Tokunaga M, Nakano N, Fukuda T, Nakamae H, Takemoto S, Kusumoto S, Tomoyose T, Sueoka E, Shiratsuchi M, Suehiro Y, Yamanaka T, Okamura J, and Uike N	56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition (San Francisco, CA)	2014. 12. 7	国外
成人 T 細胞白血病に対する CCR4 抗体投与による臨床効果の評価および皮膚障害と再発例に対する対応について	江口 剛、福井彩乃、山口晃史、前田裕弘	第 111 回日本内科学会講演会	2014 年 4 月	国内
レチノイドによる細胞老化誘導療法	前田裕弘、山本健太、福井彩乃、江口 剛、山口晃史	第 18 回 日本がん分子標的治療学会学術集会	2014 年 6 月	国内
Occurrence of dermatopathy by treatment with anti-CCR4 antibodies for adult T-cell leukemia.	Go Eguchi, Kenta Yamamoto, Ayano Fukui, Terufumi Yamaguchi, Yasuhiro Maeda.	第 76 回 日本血液学会学術集会	2014 年 10 月	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等 名)	発表した 時期	国 内・ 外の 別
Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T cell leukaemia/lymphoma in a pilot study.	Suehiro, Y. Hasegawa, A. Iino, T. Sasada, A. Watanabe, N. Matsuoka, M. Takamori, A. Tanosaki, R. Utsunomiya, A. <u>Choi, I.</u> Fukuda, T. Miura, O. Takaishi, S. Teshima, T. Akashi, K. <u>Kannagi, M.</u> (corresponding author), Uike, N. Okamura, J.	British Journal of Haematology	2015 年	国外
Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and antisense viral RNA in the constitutive NFkappaB activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells.	Kinpara, S., Ito, S., Takahata, T., Saitoh, Y., Hasegawa, A., Kijiyama, M., Utsunomiya, A., Masuda, M., Miyazaki, Y., Matsuoka, M., Nakamura, M., Yamaoka, S., Masuda, T. <u>Kannagi, M.</u> (corresponding author)	Leukemia	2015 年	国外
Elimination of human T cell leukemia virus type-1-infected cells by neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity-inducing antibodies against human T cell leukemia virus type-1 envelope gp46.	Y. Tanaka, Y. Takahashi, R. Tanaka, A. Kodama, H. Fujii, A. Hasegawa, <u>M. Kannagi</u> , A. A. Ansari, M. Saito	AIDS Res Hum Retroviruses	2014 年	国外
成人 T 細胞白血病に対する免疫療法 (AZT/IFN- α 、骨髄移植、樹状細胞ワクチンなど)	神奈木真理、長谷川温彦、金原秀一、末廣陽子	血液フロンティア, 医薬ジャーナル社	2014 年	国内

HLVL-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells.	Araya N, <u>Sato I</u> , Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, <u>Kannagi M</u> , Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y.	J Clin Invest, 124(8):3431-3442	2014年	国外
Anti-CCR4 antibody mogamulizumab targets human T-lymphotropic virus type I-infected CD8+ as well as CD4+ T cells to treat associated myelopathy.	Yamauchi J, Coler-Reilly A, <u>Sato I</u> , Araya N, Yagishita N, Ando H, Kunitomo Y, Takahashi K, Tanaka Y, Shibagaki Y, Nishioka K, Nakajima T, Hasegawa Y, Utsunomiya A, Kimura K, Yamano Y.	J Infect Dis, 211(2): 238-248	2014年	国外
Treatment of patients with adult T cell leukemia/lymphoma with cord blood transplantation: a Japanese nationwide retrospective survey.	Kato K, <u>Choi I</u> , Wake A, Uike N, Taniguchi S, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Nakamae H, Oku E, Murata M, Eto T, Akashi K, Sakamaki H, Kato K, Suzuki R, Yamanaka T, Utsunomiya A.	Biol Blood Marrow Transplant.	2014年	国外
Induction of molecular remission by using anti-CC-chemokine receptor 4(anti-CCR4)antibodies for adult T cell leukemia:a risk of opportunistic infection after treatment with anti-CCR4 antibodies	Ohyama O, Kumode T, Eguchi G, Yamaguchi T, <u>Maeda Y.</u>	Ann Hematology	2014年	国外