

**厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業(革新的医療実用化研究事業)**

**成人T細胞白血病の治療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 26 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 27 (2015) 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 -----	5
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 -----	8
3. ATL症例のHTLV-1プロウイルス解析	松岡 雅雄 -----	12
4. CCR4抗体による免疫賦活作用の解析	石田 高司 -----	16
5. フローサイトメーターによるATL細胞、免疫細胞、およびHLA-A発現の同時解析に関する研究	渡辺 信和 -----	19
6. 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 -----	23
7. 樹状細胞における膜孔形成性細胞傷害蛋白Perforin-2に関する研究	白土 基明 -----	25

III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	26
----------------------	-------	----

IV . 研究成果の刊行物別刷	-----	29
-----------------	-------	----

厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）

総括研究報告書

成人T細胞白血病の治療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

我々は ATL に対する非侵襲的治療の開発を目的とし、病因ウイルス抗原である Tax を標的とした樹状細胞ワクチンの実用化を目指した治験を計画した。平成 24 年にプロトタイプである既治療 ATL 患者に対する HTLV-I Tax 標的樹状細胞ワクチン単独の第 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。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(2 例で 2 年以上経過観察中)。これらの症例では、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増強を目的とし、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 26 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、GCP 組織整備とともに関連 SOP を作成し PMDA 薬事戦略相談、施設 IRB 承認を経て治験を開始した。

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. 松岡 雅雄 | 京都大学ウイルス研究所 | 教授 |
| 4. 石田 高司 | 名古屋市立大学 | 准教授 |
| 5. 渡辺 信和 | 東京大学医科学研究所(～2月) 特任准教授
九州がんセンター (3月～) | 医長 |
| 6. 福田 哲也 | 東京医科歯科大学 | 助教 |
| 7. 白土 基明 | 九州大学大学院 | 助教 |
| 8. 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、施設 IRB 承認を経て治験計画届を提出。医師主導治験を開始した。

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第 I 相臨床研究追跡調査

本研究に先行して平成 24 年度に実施した既治療 ATL 患者を対象とした Tax 特異的 DC ワクチン単独療法の第 I 相臨床研究追跡調査を実施し、長期安全性評価、免疫解析を行い、有効性を検討した。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 26 年度は PMDA 薬事戦略相談対面助言に基づき治験薬製造における生物由来原料を見直し(培地、試薬変更)、製造手順書、指図書・記録書を修正した。健常人 3 例のアフェレーシス検体を用いた治験薬製造工程のバリデーション、および治験薬の品質・安全性・安定性の検証、非臨床試験(マウス毒性試験、造腫瘍性試験)を実施した。また多施設での治療応用に向けた製剤の搬送試験を開始した。ワクチン製剤の調製は、九州大学 CAMI の細胞調製施設で実施された。また治験調整事務局、安全性

部門を九州がんセンターに設置、モニタリング、データマネジメント、監査をCROに委託した。

3. Tax 特異的 CTL の解析 (神奈木班員)

臨床研究完遂例の末梢血単核球を用い、Tax テトラマー解析を実施。Tax テトラマー陽性 CD8+T 細胞の頻度と機能を評価した。

4. HTLV-1 プロウイルス解析(松岡班員)

HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は全ての ATL 症例で発現しており、免疫療法の標的となることが期待できる。HBZ を発現するワクチニアウイルスを作製し、マウスに接種後、抗原特異的免疫反応を解析した。

5. 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。

6. マルチカラーFACS 解析システムによる ATL 細胞、制御性 T 細胞および HLA-A 発現の同時解析

ATL 細胞、Treg における表面マーカー、および Foxp3 や CTLA-4 など細胞内機能分子の同時解析を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、治験に関する倫理指針を遵守して行う。「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」は、治験実施施設である九州がんセンター、九州大学の IRB 承認が得られ治験計画届が受理された。特殊検査・付随研究においては、「Tax に対する CTL の免疫動態」は東京医科歯科大学の IRB により承認。「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承認。「抗 CCR4 抗体による免疫賦活作用」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23-30ヶ月の経過で安全性は確認された。部分寛解が得られた2症例は、いずれも2年以上無治療経過観察で生存中であり、内1例は6ヶ月後の評価で完全寛解が得られ、現在維持ができています。

1-2. Tax テトラマー解析による CTL 検出

末梢血 CD8+細胞中の Tax 特異的テトラマー陽性 CTL 解析において、3 症例とも DC ワクチン接種開始から 16-20 週目の末梢血検体で、培養中に Tax 特異的 CTL の増殖応答が観察された。しかし CTL の機能 (増殖能、IFN γ 産生能) は、ワクチン接種 6 ヶ月以降で次第に低下傾向を示した。ATL に対する腫瘍ワクチン療法は安全で有望な治療方法と考えられるが、時間経過とともに CTL 機能の低下が認められ、免疫抑制に抗する工夫が必要と考えられた。

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

PMDA薬事戦略相談 (事前面談8回、対面助言4回)、施設IRB承認を経て平成26年12月17日に治験計画届が承認された。

2-1. 治験実施体制

- ・ 治験実施施設 九州がんセンター、九州大学 (追加予定：東京医科歯科大学、名古屋市立大学)
- ・ 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

2-2. 治験骨子

- ・ ワクチン療法のデザイン：第 I a/I b 相
- ・ 登録期間：登録開始から 2 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：9-18 症例
- ・ 主要評価項目：安全性・忍容性の確認
- ・ 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 (sIL-2R)、血中 Mogamulizumab 濃度、

2-3. 治験製剤

PMDA薬事戦略相談を通して治験製剤の品

質・安全性の観点から生物由来原料、最終製品規格、出荷試験の見直しを行い、培地・試薬の変更、微生物試験の妥当性を検討した。新たに健常人ドナーのアフェレーシス検体で細胞調製工程、規格試験のバリデーション、安定性試験を実施。非臨床試験としてin vitroでの造腫瘍性試験(核型試験、軟寒天コロニー形成試験、延長培養試験)によりサイトカイン非依存性、足場非依存性の増殖能がないことを確認した。また免疫不全マウスを用いた反復投与試験(GLP準拠)では明らかな毒性を認めず安全性を確認した。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。製剤の搬送試験では、製剤品質を解析・評価するための施設間標準化が進行中である。

2-4. GCP組織整備

平成26年度はGCP組織整備を推進し治験調整委員会、効果安全評価委員会、治験調整事務局、安全性情報部門を設置し各担当者を選定した。GCP運用管理に関するSOP書類の作成、データマネジメントの一環としてEDCシステムを導入した。モニタリング、監査部門、統計解析はCROに委託。治験前GCP監査を終了、治験実施体制が整った。

4. HTLV-1プロウイルス解析

HBZ を発現するワクチニアウイルスを作製し、その免疫原性を解析した。免疫により細胞傷害性Tリンパ球の誘導が可能であり、その細胞傷害性Tリンパ球はHBZ発現細胞の抑制、担がんマウスの生存延長をもたらした。Taxに加えてHBZも免疫治療の標的となることが示され、複数の標的分子の併用は、ATLに対する免疫療法の相乗効果が期待できるのみでなく対象拡大につながることを期待できる。

5. 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。

6. マルチカラーFACS解析システムによるATL細胞、制御性T細胞およびHLA-A発現の同時解析

健常人末梢血を用いた予備実験を実施し、Tregにおける表面マーカー、およびFoxp3やCTLA-4など細胞内機能分子の同時解析が可能であることが示された。免疫療法における免疫応答と残存病変のモニタリングの手段として、有用なツールとなることが期待された。

D. 考察

ATLに対するTax特異的DCワクチン単独の第I相臨床研究(プロトタイプ)を完遂した3症例で安全性が確認された。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。本研究では、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。本研究は、国内独自のシーズを臨床展開する独創的なトランスレーショナルリサーチであり、非侵襲的治療の実用化は社会的意義が大きいと考える。

E. 結論

ATLに対するHTLV-1 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「抗CCR4抗体を併用した複合的ワクチン療法：第Ia/Ib相試験」を実施し安全性、有効性を検証する。本年度は、PMDA薬事戦略相談、施設IRB承認を経て治験計画届を提出。医師主導治験を開始した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. [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. *British journal of haematology*, (2015). doi: 10.1111/bjh.13302

2. 末廣陽子. ATL に対する免疫療法の現況 . 細胞 46 (6) : 266-269 , 2014 . (2014 年 6 月 30 日 公 刊)
3. 神奈木真理、長谷川温彦、金原秀一、末廣陽子. 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). 血液フロンティア, 医薬ジャーナル社 24: 1631-8, 2014

2. 学会発表

〈国際学会〉

1. 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. 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. The 19th Congress of the European Hematology Association, June 12-15, 2014, Milan, Italy.
2. Suehiro Y, Iino T, Hasegawa A, Watanabe N, Matsuoka M, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, Shiratsuchi M, Teshima T, Akashi K, Kannagi M, Uike N, Okamura J. Excellent quality of lives for preciously treated adult T-cell leukemia/lymphoma patients after autologous dendritic cell vaccine therapy targeting HTLV-1 Tax antigens, European Society for Medical Oncology 2014, 26-30 September 2014, Madrid, Spain.
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, Uike N. 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) 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Dec. 6-9, 2014, San Francisco, CA.

〈国内学会〉

1. 渡辺恵理、佐藤奈津子、末廣陽子、鵜池直邦、渡辺信和. 成人T細胞白血病(ATL)に対する樹状細胞療法後のATL細胞と免疫細胞動態の同時解析. 第24回日本サイトメトリー学会, 2014年6月28日-29日, 関西医科大学(大阪府枚方市)
2. 飯野忠史、末廣陽子、長谷川温彦、渡辺信和、田野崎隆二、宇都宮與、松岡雅雄、豊嶋崇徳、赤司浩一、鵜池直邦、岡村 純、神奈木真理. 成人T細胞性白血病に対する樹状細胞ワクチン療法. 第18回日本がん免疫学会総会, 2014年7月30日-8月1日, 松山市.
3. 渡辺恵理、佐藤奈津子、渡辺信和、末廣陽子、鵜池直邦. ATLに対する樹状細胞療法後のATL細胞と免疫細胞動態のマルチカラーFACS解析. 第1回HTLV-1学会学術集会, 2014年8月23-24日, 東京.
4. 末廣陽子. ATL 発がん機構と治療の新開発成人T細胞白血病/リンパ腫に対する免疫療法:免疫機序を介した多面的治療戦略のアプローチ. シンポジウム, 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25-27日, 横浜.
5. 渡辺恵理、佐藤奈津子、末廣陽子、崔 日承、鵜池直邦、渡辺信和. 12カラー・フローサイトメトリーによるATLに対する樹状細胞療法後のATL細胞と免疫細胞の同時解析、w第76回日本血液内科学会学術集会, 2014年10月31日-11月1日, 大阪.
6. Kannagi M, Hasegawa A, Kinpara S, Suehiro Y. The roles of acquired and innate immunity in HTLV-1 infection: Implication for therapy and pathogenesis. 第62回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム(S06 ウイルス感染に対する免疫応答) 2014年11月10-12日、横浜

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
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）

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) に対する治療には、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。現時点では、同種造血幹細胞移植療法が長期寛解を得る治療法として認知されているが同時に重篤な副作用の危険がある。我々は ATL に対する幹細胞移植療法に関して 12 年間の臨床-基礎共同研究を行い、移植後の ATL 症例から Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (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 ペプチドを用いた抗腫瘍ワクチン療法の開発を行った。本年度は 2012 年に開始した臨床研究「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 相試験」に参加した ATL 患者 3 症例の経過および免疫応答の追跡を行うとともに、抗 CCR4 抗体医薬モガリズマブと Tax ペプチドパルス樹状細胞ワクチンを併用した新規複合的ワクチン療法「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法」の実用化を目指し医師主導臨床治験の第 Ia/Ib 相試験実施の手続きを進めた。この際 PMDA の指導を仰ぐため頻回の事前面談を経て対面助言を受け、本臨床治験の実施にあたり明確にしておく必要のあった Tax ペプチドパルス樹状細胞の品質安定性について追加検討を行い、さらに今後多施設での治験実施を可能にするため、製品運搬による品質安定性について健常者アフエーシス検体を用いて検討した。これらの結果を踏まえ試験実施計画書を作成提出し治験準備が整った。

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自家樹状細胞 (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、Tax ペプチドパルス樹状細胞の保存や運搬による品質安定性を検討した。

B. 研究方法

1. Tax ペプチドパルス DC 免疫ワクチン療法施行後の ATL 患者の免疫解析

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。

2. 新規「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法第 Ia/Ib 相試験」に向けての準備

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ール作成、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 への事前面談・対面助言を経て、申請書類の作成を行った。

3. 健常者アフエーシス検体を用いた Tax ペプチドパルス樹状細胞の長期保存・搬送による品質安定性に関する試験

- i) 凍結された Tax ペプチドパルス樹状細胞を解凍してワクチンに供されるため、一定期間 (0, 2, 3 ヶ月) 凍結後の製品の品質について、アロ CD4+T 細胞刺激能 (MLR) を指標に評価した。
- ii) 一定期間 (0, 2, 3 ヶ月) 凍結された Tax ペプチドパルス樹状細胞を九州大学より当大学へドライシッパーを用いて搬送し、解凍後の製品の品質について、生細胞数、DC の細胞表面形質 (CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR) を指標に評価した。

(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。新規の治験計画「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法第 1a/1b 相試験」については、九州がんセンターの倫理審査委員会で承認され、現在東京医科歯科大学に申請中である。

C. 研究結果

1. 既に実施された Tax ペプチド添加 DC ワクチン療法第 I 相試験に参加した ATL 患者の免疫応答追跡

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 相臨床試験参加 ATL 患者 3 名の T 細胞応答解析を行った。3 例のうち 2 例は部分寛解となりワクチン接種後現在まで（それぞれ 2 年と 1 年半）無治療で経過しており、1 例は病状が安定していたが徐々に進行し 14 ヶ月目から別の治療が加えられた。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。しかし、末梢血 CD8+T 細胞中の Tax 特異的テトラマー陽性 CTL の機能（増殖能、IFN γ 産生能）は、部分寛解の症例で、ワクチン接種開始から 6 ヶ月以降しだいに低くなった。病状の進行が見られた症例では Tax 特異的 CTL の機能は保たれていたが、リンパ節生検で腫瘍細胞の Tax 発現能が乏しい事が分かった。

2. 一定期間（0, 2, 3 ヶ月）凍結保存後の Tax ペプチドパルス樹状細胞製品の品質評価

各期間凍結保存後に解凍した樹状細胞をアロ CD4+T 細胞と 4 日間共培養したところ、試験したすべての樹状細胞がアロ CD4+T 細胞刺激能を有していることがわかった。

3. 凍結 Tax ペプチドパルス樹状細胞運搬後の製品の品質評価

運搬された凍結細胞の生細胞数・細胞表面形質について、運搬による大きな影響は認められなかった。

D. 考察

既に実施した Tax ペプチド添加樹状細胞療法の第 I 相臨床試験に参加した ATL 症例では、ワクチン接種後 1 年以上の無治療期間が得られ、免疫解析では Tax 特異的 CTL の活性が検出された。このことから、ATL に対する腫瘍ワクチン療法は安全で今後有望な治療方法と考えられる。しかし、時間経過とともに CTL 機能の低

下が認められ、免疫抑制に抗する工夫が必要と考えられた。

これまでの研究成果を踏まえ、現在準備を進めているモガムリズマブと Tax ペプチドパルス DC ワクチンの併用療法「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法」では、モガムリズマブにより CCR4 陽性の ATL 細胞とともに制御性 T 細胞の減少が期待され、ATL 患者における免疫抑制が軽減される可能性がある。

抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法」を新規医師主導臨床治験として実施するため行った、健常者のアフエレーシス検体を用いた製品（Tax ペプチドパルス樹状細胞）の長期凍結保存・運搬後の品質安定性試験では、長期保存や運搬による品質への影響は大きくないことが確認された。この結果から、Tax ペプチドパルス樹状細胞を用いた臨床治験は品質の面では、実施可能であるとともに、運搬による他施設実施も可能であると考えられた。

E. 結論

新規の医師主導臨床治験「抗 CCR4 抗体を併用した自家樹状細胞療法」の治験実施に向けて、治験製品の保存・運搬による製品の品質安定性が確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. *British journal of haematology*, (2015). doi: 10.1111/bjh.13302
2. 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. & Kannagi M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and antisense viral RNA in the constitutive NF κ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Leukemia*, (2015). doi: 10.1038/leu.2015.1
3. 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. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*, (2014).
4. Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama A, Fujii H, Hasegawa A, Kannagi M, Ansari A. A, Saito M, 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. *AIDS Res Hum Retroviruses* **30**, 542-552 (2014).
 5. 神奈木真理, 長谷川温彦, 金原秀一, 末廣陽子. 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). *血液フロンティア*, 医薬ジャーナル社 24: 1631-8, 2014

2. 学会発表 《国際学会》

1. Kannagi M, Kinpara S, Hasegawa A. Impact of interferon response in HTLV-1 infection: a molecular mechanism of AZT/IFN- α therapy for ATL (Invited speaker). IVth Carcinogenic Spiral International Meeting, February 10-11, 2014, Sapporo.
9. Ando S, Hasegawa A, Murakami Y, Takatsuka N, Maeda Y, Masuda T, Kannagi M. CTL epitope peptide-pulsed dendritic cell vaccine has the potential to restore HTLV-1-specific CTLs to eliminate infected cells. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都
10. Murakami Y, Ando S, Tanaka Y, Tanaka R, Masuda T, Kannagi M, Hasegawa A. Evaluation of anti-gp46 neutralizing monoclonal antibody vaccine against primary HTLV-1 infection to rats. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都
11. Kinpara S, Saitoh Y, Hasegawa A, Nakamura M, Yamaoka S, Matsuoka M, Masuda T, Kannagi M. 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. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 2014 年 12 月 10-12 日、京都市

《国内学会》

1. 神奈木真理. HTLV-I 感染の免疫学, 日本 HTLV-1 学会設立記念シンポジウム. 2014 年 2 月, 東京
2. Kannagi M. Immune control of the retrovirus-induced adult T-cell leukemia: fighting with invisible enemy. 第 73 回日本癌学会総会シンポジウム 2014 年 9 月, 横浜
3. Kinpara S, Saitoh Y, Hasegawa A, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, Kannagi M. Involvement of PKR and anti-sense HTLV-1 transcripts in the constitutive activation of NF κ B in ATL cells. 第 73 回日本癌学会 9/25-27/2014 横浜
4. Kannagi M, Hasegawa A, Kinpara S, Suehiro Y. The roles of acquired and innate immunity in HTLV-1 infection: Implication for therapy and pathogenesis. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、シンポジウム (S06 ウイルス感染に対する免疫応答) 2014 年 11 月 10-12 日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

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. 原嶋奈々江, 神奈木真理, 田野崎隆二. 「HLA-A11 拘束性 Tax 特異的抗腫瘍エピトープ」平成 25 年 1 月 18 日特許取得 (国内特許第 5176099 号、東京医科歯科大学)

**厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）**

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、九州大学イノベーションセンター、同医学研究院 病態修復内科学、同医学研究院 病態制御内科学、九州がんセンター血液内科、東京医科歯科大学 免疫治療学分野などの医療機関、研究機関と共同で、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の基盤整備を独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）との協議を進めながら行なった。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を確立し、CPC 運用に加えて、本治験の樹状細胞製剤製造に特化した標準作業手順書を完成させた。さらに、実際の治療を想定した 3 名の健常人のアフェレーシスを行い、これらのアフェレーシス産物に由来する末梢血単核球を用いて、治験と同様のスケール、グレードで樹状細胞製剤の製造を行ない各工程の適切性の確認、その製剤を用いて品質の評価、安定性、毒性試験など前臨床の各種の試験を行った。その結果、最終製剤製造までの工程上の SOP は問題ないこと、最終製剤の安全性、安定性、品質など治験として問題なく行えることを確認し PMDA に報告した。そしてこれらの成果をもとに学内の治験審査委員会に「成人 T 細胞白血病の治療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」として治験の承認申請をした。

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をもとに、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のための組織、ハード的な基盤を構築し、実際に治験を行なう上で必要な非臨床のデータを集積し、医師主導治験を行い樹状細胞療法の安全性を証明することが目的である。

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、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及び品質、安定性に関連した試験を行い、それらの結果に基づいた資料、ワクチン療法の具体的なプロトコールを作成し、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）への治験届け、治験審査委員会に必要な安定性、品質、毒性などの評価を目的とした前臨床の試験を行う。これらの試験は共同研究機関と協議しながら行う。これらの結果、考察から治験としての九州大学での樹状細胞製剤の製造を徐々に具体化、実現化

する。すなわち、医師主導治験での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CPCの運用の元での治験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製剤を製造することで、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、九州大学学内の倫理委員会の承認を得ている。また、治験に関しても九州大学病院の治験倫理審査委員会に承認申請中である。

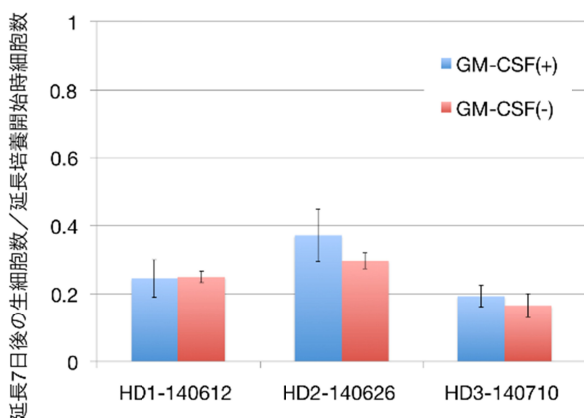
C. 研究結果

PMDA との協議の上、我々（九州大学を含む共同研究機関）が行うべき試験に関して、細胞製剤であるという特性を踏まえた上で、助言を頂いた。特に、九州大学では、造腫瘍性に関し

て延長培養試験（予定の期間を超えて培養した細胞の特性指標の検討）、軟寒天コロニー形成試験による「細胞の形質転換能」、「サイトカイン非依存性増殖能」、「足場非依存性増殖能獲得の有無」などの評価と製剤の凍結保管における安定性の評価について、健康成人由来白血球から製造した製剤を用いて行なうことになった。健康成人3例（HD1-140612、HD2-140626、HD3-140710）からの樹状細胞誘導は特に問題なく行うことができ、得られた製剤の表面マーカーはTable1に示している。

延長培養は、健康人末梢血に由来する製剤を製造後、引き続き培養を続けた場合に、細胞数の増加を評価することで形質転換や異常増殖がおこるかどうかを評価することを目的に行った。図1にあるように、樹状細胞を刺激するサイトカインである GM-CSF の有無に関わらず、細胞数の増加はまったく認めなかった。

図1. 予定の期間を超えて培養した細胞の特性



軟寒天コロニー形成試験も健康人末梢血に由来する樹状細胞製剤を用いて行った。健康人3人ともコロニーの増殖はなく細胞の形質転換、サイトカイン非依存性増殖、足場非依存性増殖能獲得はなかった。陰性コントロールとして細胞株 MRC-5、陽性コントロールとして HeLa を用いた。コロニー数の変化に関するグラフを図2に示す。

製剤の凍結後の安定性に関しては、細胞数、生細胞率として図3に示しているが、健康人3例のうち、1例は6ヶ月間の凍結保存においても生細胞率、細胞数ともに安定していた。

図2. 軟寒天コロニー形成確認試験

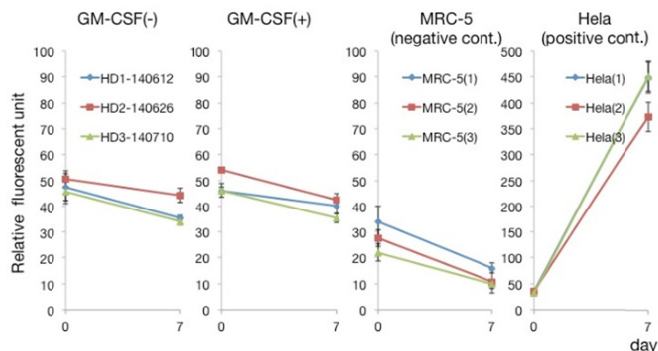
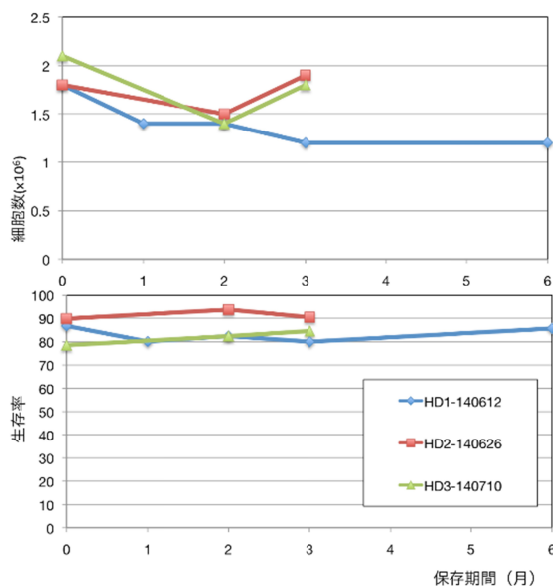


図3. 凍結後安定性試験（細胞数と生存率）



2例は、3ヶ月間までしか評価していないが安定していた。細胞の表面抗原に関してはフローサイトメトリー法で評価しているが、その陽性率は、Table.1に示しているが、いずれの場合も製剤の段階での陽性率、凍結融解後の陽性率に大きな違いはなかった。代表データとして、HD1-140612の製剤、3ヶ月間の凍結融解後サンプル、6ヶ月間の凍結融解後のサンプルについて、フローサイトメトリーの結果のヒストグラムを図4から6に示す。

Table1-1

HD1-140612	表面マーカー	製剤	凍結後1ヶ月	凍結後2ヶ月	凍結後3ヶ月	凍結後6ヶ月
樹状細胞誘導の表面マーカー (全体での割合 %)	CD11c	88.6	90.6	90.8	89.3	88.9
	CD14	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5
	HLA-DR	90.2	91.7	91.9	89.5	90.0
	CD40	31.0	20.6	13.9	45.2	58.5
	CD80	90.0	91.1	91.5	86.6	88.4
	CD83	90.2	91.7	91.9	89.5	90.0
	CD86	88.6	85.4	82.9	82	79.7
	CD11c+HLA-DR	89.8	91.7	91.1	89.4	89.4
リン(球)の表面マーカー (全体での割合 %)	CD3	2.9	3.4	4.2	4.2	4.1
	CD19	1.7	0.9	1.3	1.3	3.5
	CD56+CD3+	0.1	0.0	0.09	0.08	0.1
	CD4+CD25+	0.7	0.8	1.0	0.9	0.7

Table.1-2

HD1-140626	表面マーカー	製剤	凍結後 2ヶ月	凍結後 3ヶ月
樹状細胞由来の 表面マーカー (%)	CD11c	93.9	95.5	95.9
	CD14	0.0	0.0	0.0
	HLA-DR	95.3	96.9	97.1
	CD40	57.3	71.1	72.4
	CD80	95.2	96.6	97.1
	CD83	95.3	96.9	97.1
	CD86	84.1	98.6	96.4
リンパ球由来の 表面マーカー (%)	CD11c+HLA-DR	95.4	96.1	96.4
	CD3	1.0	1.7	1.3
	CD19	0.4	0.3	0.6
	CD39+CD3	0.1	0.1	0.5
	CD4+CD25*	0.2	0.3	0.2

Table.1-3

HD1-140710	表面マーカー	製剤	凍結後 2ヶ月	凍結後 3ヶ月
樹状細胞由来の 表面マーカー (全等 体の割合 %)	CD11c	70.4	70.4	70.8
	CD14	0.1	0.2	0.2
	HLA-DR	76.9	77.1	76.3
	CD40	26.9	30.9	18.9
	CD80	75.0	75.5	76.2
	CD83	76.9	77.1	76.3
	CD86	74.8	71.2	71.8
リンパ球由来の 表面マーカー (全等 体の割合 %)	CD11c+HLA-DR	72.7	72.5	72.6
	CD3	8.5	11.5	11.0
	CD19	6.2	5.6	5.9
	CD39+CD3	1.2	0.7	0.8
	CD4+CD25*	1.3	1.5	1.4

図4. HD1-140612 の製剤の表面抗原

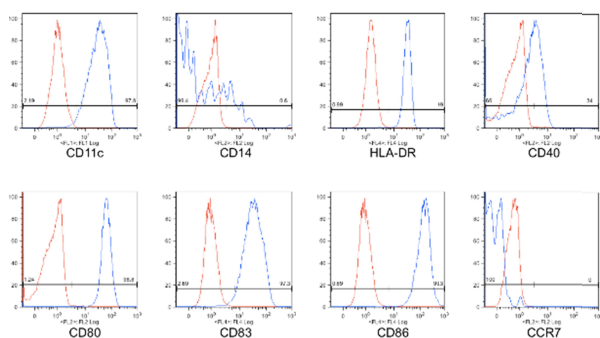


図5. HD1-140612 の凍結3ヶ月後融解した細胞の表面抗原

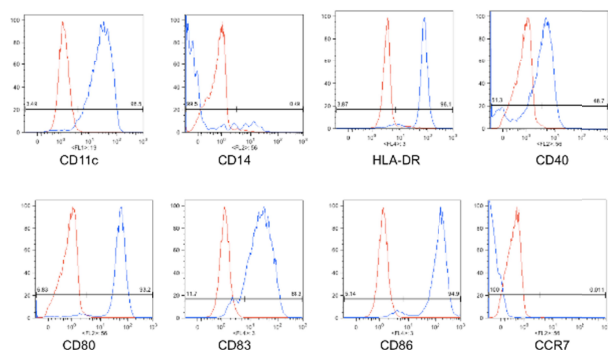
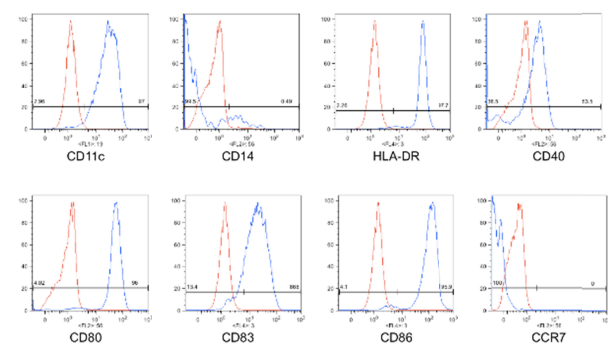


図6. HD1-140612 の凍結6ヶ月後融解した細胞の表面抗原



D. 考察

製剤の承認申請に必要な試験としては、品質及び安全性に関する試験と非臨床安全性に関する

る試験を、品質及び安全性に関しては、原薬及び製剤についてそれぞれ製造方法、規格及び試験方法、並びに安定性試験に関する資料の提出を、非臨床安全性に関しては、薬理試験（効力を裏付ける試験、吸収、分布、代謝、排泄などの薬物動態試験）、動物実験による毒性試験を行う必要がある。本治験製剤が細胞製剤という特殊性を加味すると、従来の化学物質の製剤に求められる安全性試験、非臨床試験は困難なものである。そこで PMDA との治験についての協議を経た上で、造腫瘍性に関して延長培養試験（予定の期間を超えて培養した細胞の特性指標の検討）、軟寒天コロニー形成試験による「細胞の形質転換能」、「サイトカイン非依存性増殖能」、「足場非依存性増殖能獲得の有無」などの評価と製剤の凍結保管における安定性の評価について、健康成人由来白血球から製造した製剤を用いて行なうことになった。また、延長培養試験を行うことで、製剤製造後、引き続き培養を続けた場合に、細胞数の増加を評価することで形質転換や異常増殖がおこるかどうかを評価した。動物実験による毒性試験、安定性試験については行なっているが、現在解析中である。

以上の結果、健康人由来製剤では、安全性、凍結後の安定性に関して問題ないことがほぼ証明された。今後は、実際の患者からのサンプルを用いて評価することが必要になる可能性があり、これは治験を行ないながら慎重に確認していく。

E. 結論

本治験で用いる予定の製剤である健康人末梢血由来の樹状細胞製剤に、造腫瘍性は認められず、安定性も確認でき、実際の患者から製造した樹状細胞製剤を患者に投与する治験を行うことに関しては妥当であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yuda J, Kato K, Kikushige Y, Ohkusu K, Kiyosuke M, Sakamoto K, Oku S, Miyake N, Kadowaki M, Iino T, Tanimoto K, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Shimono N, Teshima T, Akashi K. Successful treatment of invasive zygomycosis based on a prompt diagnosis using molecular methods in a patient with acute myelogenous leukemia. Intern Med 53: 1087-1091, 2014

2. Takashima S, Miyamoto T, Kadowaki M, Ito Y, Aoki T, Takase K, Shima T, Yoshimoto G, Kato K, Muta T, Shiratsuchi M, Takenaka K, Iwasaki H, Teshima T, Kamimura T, Akashi K. Combination of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as a consolidation therapy after autologous stem cell transplantation for symptomatic multiple myeloma in Japanese patients. *Int J Hematol* 100: 159-164, 2014
3. Takashima S, Eto T, Shiratsuchi M, Hidaka M, Mori Y, Kato K, Kamezaki K, Oku S, Henzan H, Takase K, Matsushima T, Takenaka K, Iwasaki H, Miyamoto T, Akashi K, Teshima T. The use of oral beclomethasone dipropionate in the treatment of gastrointestinal graft-versus-host disease: the experience of the Fukuoka blood and marrow transplantation (BMT) group. *Intern Med* 53: 1315-1320, 2014
4. Takenaka K, Akashi K. [New approaches to target leukemia stem cells]. *Nihon Rinsho* 72: 1018-1025, 2014
5. 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* 20:1968-74,2014

賞講演) 2014年11月2日、大阪(大阪国際会議場)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

2. 学会発表

1. 『Cancer Stem Cell』 赤司浩一、第87回日本内分泌学会学術総会(教育講演)2014年4月24日、福岡(福岡国際センター)
2. 『造血器腫瘍幹細胞』 赤司浩一、第3回日本血液学会東海地方会(共催セミナー)2014年4月26日、名古屋(名古屋大学医学部附属病院)
3. 『TIM-3, as a Target for Eradication of Cancer Stem Cells』 The Uehara Memorial Foundation Symposium 2014年6月17日、東京(ハイアットリージェンシー東京)
4. 『造血器腫瘍幹細胞』 赤司浩一、第101回近畿血液学地方会(特別講演)2014年6月28日、大阪(テイジンホール)
5. 『白血病幹細胞研究のすゝめ』 赤司浩一 第76回日本血液学会学術集会(学会賞受

**厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）**

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

成人 T 細胞白血病(adult T-cell leukemia: ATL)は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型(human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) の感染により引き起こされる末梢性 T リンパ球の腫瘍である。Tax 発現は ATL 症例では、しばしば障害されているが、全ての症例で HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は発現しており、免疫療法の標的となることが期待できる。HBZ を発現するワクチニアウイルスを作製し、その免疫原性を解析した。免疫により細胞傷害性 T リンパ球の誘導が可能であり、その細胞傷害性 T リンパ球は HBZ 発現細胞の抑制、担がんマウスの生存延長をもたらした。

A. 研究目的

ATL 症例では、Tax の発現は、しばしば障害されているのに対して HBZ は全ての症例で発現が認められる。Tax は抗原性が高く、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の標的となるのに対して HBZ の免疫原性は低いために発現しても細胞傷害性 T リンパ球の標的となりにくいことが予想される。しかし、HBZ の恒常的な発現から、HBZ に対する免疫応答を誘導できれば治療の有力な手段になることが予想される。この HBZ に対する細胞傷害性 T リンパ球の誘導、抗腫瘍効果に関して検討を加えた。

B. 研究方法

1) Tax、HBZ 発現ワクチニアウイルスの作製：抗原遺伝子として HTLV-1 Tax と HBZ の変異体を使用した。Tax は TL130/131AS 変異 (Tax M22) ・ S258A 変異 (Tax S258A) を挿入した。一方で HBZ は LL27/28AA 変異 (HBZ LL/AA) を挿入した。野生型ワクチニアウイルス株 LC16m8 はニワトリ胚線維芽細胞 (CEF) に感染させた。LC16m8 感染 CEF は neon transfection system (Invitrogen) によって pBMSF-7c プラスミドを導入することによって相同組換えを起こさせた。それによって抗原遺伝子は LC16m8 株のヘマグルチニン領域に組み込まれる。作製した組換えウイルスは RK13 細胞株により増やした。組換えウイルスでの挿入遺伝子発現は抗 Tax 抗体 (MI73) と HBZ 抗体 (HBZ ペプチド免疫ウサギ血清) を使い、ウェスタンブロットで確認した。

2) 実験動物へのワクチン接種

作製したウイルスは二又針を使い、実験動物の皮膚に 10^7 PFU で接種させた。マウス (C56BL/6) での追加免疫は 3-4 週間に 1 回接種し、計 6 サイクル行った。H4、ワクチン接種動物での抗原特異的反応の検出

3) 抗原特異的反応の解析：マウスでは脾細胞を使用した。マウス脾細胞とサル PBMC は CD4 or CD8 magnetic beads (BD) を使用する事で T 細胞を除去し、ELISPOT assay (Mabtech) に使用した。CTL アッセイとサイトカイン産生誘導の為に CD4 除去マウス脾細胞は 1 μ M ペプチドで前刺激を行った。サイトカイン産生はペプチドをパルスした bone marrow-derived DC で刺激する事で誘導した。CTL の細胞障害性を解析する為に Ly5.1 C57BL/6 マウス脾細胞は 1 μ M pooled peptide で 1 週間刺激し、effector 細胞として使用した。Ly5.2 EL4 細胞株は FCS(-) RPMI 中で 1 μ M peptide を 37 1hr パルスし、target 細胞として使用した。Target に対する細胞障害性は flowcytometry を使い、AnnexinV (BD) の発現を測定する事で下記公式によって決定した。
$$\left(\frac{E:T_{x:1} - E:T_{0:1}}{100 - E:T_{0:1}} \right) \times 100 = \text{細胞障害性 (\%)}$$

(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) HBZ, Tax に対する CTL 誘導

作製した組換えウイルスは C57BL/6 に 6 回接種した。脾細胞での IFN-g 産生は 20mer オーバーラップペプチド刺激によって ELSIPOT で測定した。rVV-Tax の両方で Tax 特異的 CD4 と CD8 T 細胞の誘導を確認した。一方で rVV-HBZ LL/AA も同様にワクチン接種マウスに特異的 T 細胞を誘導可能であった。これまで生体内に Tax 特異的 T 細胞を誘導する方法は多数報告されてきた。しかし、HBZ 特異的 T 細胞の誘導する方法の報告は無く、今回示した組換えウイルスを用いた方法は HBZ 特異的 T 細胞誘導の出来る唯一の方法である。

2) CTL の細胞傷害性確認

ワクチンによって誘導された CTL の細胞傷害性を解析する為に CTL killing アッセイを行った。rVV-Tax M22 をワクチン接種マウスの脾細胞は Tax-PA and-PB で前刺激した。その Tax 特異的 bulk CTL は Tax ペプチドをパルスした EL4 細胞に対して障害した。その障害性は Tax-PA と Tax-PB EL4 の両方で確認された。一方で rVV-HBZ LL/AA から生じた HBZ 特異的 bulk CTL は HBZ-PB をパルスした EL4 に対してのみ細胞障害性を示した。一方で HBZ-PA EL4 に対しては killing 活性を示さなかった。rVV-Tax M22 での結果と異なり rVV-HBZ LL/AA が誘導した CTL は主に HBZ アミノ酸配列の後半部 (HBZ₉₁₋₂₀₆) を認識して細胞を障害する可能性が示された。一方で rVV 誘導 Tax 特異的 CTL は Tax-PA と-PB の両方に対して細胞障害性を示した事から、その認識配列には偏りが観察されなかった。これは Tax の非常に免疫原性が高い理由の 1 つと考えられる。

3) HBZ トランスジェニックマウスから樹立した T 細胞株に対する CTL の効果

C57BL/6 を HBZ 発現ワクチニアウイルス接種により免疫した。その後、HBZ トランスジェニックマウスから樹立した T 細胞株 (Ht48) を接種した。Ht48 は HBZ を発現しており、C57BL/6 に生着可能な細胞株である。HBZ 免疫マウスでは、生存期間の延長が認められ、HBZ に対する免疫反応が抗腫瘍効果を発揮したことが示唆された。

D. 考察

これまで感染細胞数 (プロウイルス量) を規定する因子として HBZ に対する細胞傷害性 T リンパ球が報告されてきたが、その細胞数の少

なさから解析が進んでいなかった。今回、我々は HBZ 発現ワクチニアウイルスを使って、HBZ に対する CTL を誘導して、その細胞傷害活性を明らかにした。重要なことに HBZ によって免疫を誘導したマウスは、HBZ 発現 T リンパ腫を接種後、その生存期間延長が認められた。このことは HBZ に対する免疫の抗腫瘍活性が確認できたことを示している。HBZ は免疫原性が低く、CTL 誘導の効率がポイントであるが、ワクチニアウイルスのように効率良く免疫誘導できると抗 ATL 効果が期待できるものと考えられる。

E. 結論

Tax に加えて HBZ も免疫治療の標的となることが示された。Tax と異なり HBZ は全ての症例で発現しており、その免疫誘導は ATL に対する免疫療法の対象を拓げるだけでなく Tax と組み合わせることによる相乗効果も期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ma G, Yasunaga J-I, Akari H, and Matsuoka M. TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (in press).
2. Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green P, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. Cancer Sci, (in press).
3. 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, Kannagi M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NFκB activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. Leukemia (in press).
4. 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 leukemia/lymphoma in a pilot study. Br J Haematol (in press).

5. Niederer HA, Laydon DJ, Melamed A, Elemans M, Asquith B, Matsuoka M, Bangham CR. HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. *Virology J.* 11: 172, 2014.
 6. Lavorgna A, Matsuoka M, Harhaj EW. A critical role for IL-17RB signaling in HTLV-1 Tax-induced NF- κ B activation and T-cell transformation. *PLoS Pathogens* (in press).
 7. Cook LB, Melamed A, Niederer H, Valganon M, Laydon D, Foroni L, Taylor GP, Matsuoka M, Bangham CR. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure and genomic integration site in adult T cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 123: 3925-3931, 2014.
 8. Furuta RA, Ma G, Matsuoka M, Otani S, Matsukura H, Hirayama F. Re-evaluation of screening of plasma positive for human T-cell leukemia virus type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. *Transfusion*, (in press).
 9. Zhao T, Satou Y and Matsuoka M. Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. *Arch Virol*, 159: 1849-1856, 2014.
 10. Azuma Y, Kükenshöner T, Ma G, Yasunaga JI, Imanishi M, Arndt KM, Matsuoka M, and Futaki S. Controlling leucine-zipper partner recognition in cells through modifications of a-g interactions. *Chem. Commun.* 50: 6364-6367, 2014.
 11. 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.
 12. Miyazato P and Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 and Foxp3 expression viral strategy in vivo. *Int Immunol.* 26: 419-425, 2014
- 2. 学会発表**
1. Matsuoka M. How Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Causes Diseases: The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, Keio Plaza Hotel Sapporo, Japan, February 10-11, 2014.
 2. 松岡雅雄: HTLV-1 感染が仕掛ける巧妙な罫: HBZ タンパク質: 成人 T 細胞白血病 (ATL) と原因ウイルス (HTLV-1) 「ATL 細胞の培養から始まった HTLV-1 研究: ATL シンポジウム、高新文化ホール(高知) 2014 年 5 月 24 日
 3. Matsuoka M. Mechanism of leukemogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: The 12th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology. Fukuoka Sunpalace, Japan, July 17-19, 2014.
 4. 安永純一郎、園直希、馬広勇、萩谷啓太、松岡雅雄: 宿主 F-box タンパク質 FBXL11 は Tax と HBZ のユビキチン化を誘導し機能を活性化する: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京) 2014 年 8 月 22 日-24 日
 5. 栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、瀧口功: HTLV-1 モデルマウスである HBZ-Tg マウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京) 2014 年 8 月 22 日-24 日
 6. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症には IFN γ が重要な役割を果たす: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京) 2014 年 8 月 22 日-24 日
 7. Ma G, Yasunaga JI, Matsuoka M. TCF1/LEF1 are T-cell natural HTLV-1 Tax antagonists that restrict viral expansion in thymus. The 1st Annual Meeting of the Japanese Society of HTLV-1 and Associated Diseases. The Institute of Medical Science, Tokyo University, Japan, August 22th-24th, 2014.
 8. 松岡雅雄: HTLV-1 による発がん機構: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川) 2014 年 9 月 25 日-27 日
 9. 川月章弘、安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は Rb タンパクと相互作用し、E2F-1/Rb 経路を改変する: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川) 2014 年 9 月 25 日-27 日
 10. 安永純一郎、松岡雅雄: 転写因子 TCF1、LEF1 は HTLV-1 Tax を阻害し末梢 T リンパ球への感染指向性に関与する: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川) 2014 年 9 月 25 日-27 日

11. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄：
HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症における IFN の役割：第 62 回日本ウイルス学会
学術集会、パシフィコ横浜（神奈川）、2014
年 11 月 10 日-11 月 12 日
12. 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：
Anti-CCR4 抗体は Treg と感染細胞を同時に
標的にする事で、STLV-1 自然感染ニホンザ
ルでのウイルス特異的免疫反応を活性化さ
せる：第 62 回日本ウイルス学会学術集会、
パシフィコ横浜（神奈川）、2014 年 11 月
10 日-11 月 12 日

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
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）

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

ATL 患者において、血液中 HTLV-1 Tax 特異的 CTL の存在比率は血清 sIL2R 値、HTLV-1 load と有意な負の相関を示した。このことは、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の存在が ATL の腫瘍量を規定する因子の一つであることを示唆し、ATL 治療の標的分子としての、Tax の妥当性を示す。免疫を負に制御する制御性 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

CCR4 抗体治療中の 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。CCR4 抗体治療中の 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。

(倫理面への配慮)

患者由来の腫瘍細胞を用いた研究については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の承認を得た上で実施している。

C. 研究結果

CCR4 抗体投与前の ATL 患者において、血液中 HTLV-1 Tax 特異的 CTL の存在比率 (%/全リンパ球)は血清 sIL2R と有意な負の相関を示した[相関係数 -0.360, P= 0.015 (n=51)]。また、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の存在比率は、血液中 HTLV-1 load (copies/1000PBMC) と有意な負の相関を示した [相関係数 -0.410, P= 0.005 (n=51)]。一方、血液中 CMV 特異的 CTL の存在比率 (%/全リンパ球)は血清 sIL2R [相関係数 0.046, P= 0.766 (n=51)] および 血液中 HTLV-1 load (copies/1000PBMC) [相関係数 0.138, P= 0.365 (n=51)] とそれぞれ有意な相関を示さなかった。このことは、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の存在が ATL の腫瘍量を規定する因子の一つであることを示唆し、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。また、ヒトでは FOXP3 分子発現の Treg 特異性が低い、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。また non-Treg 中に CCR4 を発現する sub-population を認める。よって、CCR4 抗体で標的となる Treg は、理論上 effector Treg である。実際に CCR4 抗体の治療を受けた ATL 患者では、effector Treg 分画に存在する細胞比率は著しく低下した。Tax に対する特異的 CTL の存在比率は一定の傾向を示さなかったが、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、CCR4 抗体治療によって effector Treg 分画の細胞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。

CCR4 抗体治療を受けた ATL 細胞は CCR4 陽性であり、さらに ATL 細胞を FOXP3 と CD45RA の発現レベルで分類すると、約 40%が effector Treg (CD45RA^{lo}FOXP3^{hi})、約 15%が non-Treg (CD45RA^{lo}FOXP3^{lo})、残り約 45%が非特異的な形質を示していた。従って CCR4 抗体治療によって除去される effector Treg 分画内の細胞には Treg に加え、ATL 細胞自身も含まれる。

HTLV-1 Tax に対する血清中の抗体価については、ATL 患者における HTLV-1 Tax に対する免疫応答の程度を示すバイオマーカーになり得る所見を得ており、更に解析を進めている。

D. 考察

HTLV-1 Tax 特異的 CTL は ATL の腫瘍量を規定する因子の1つと考えられる。また、CCR4 抗体治療は effector Treg および ATL 細胞を除去することにより、Tax 特異的な免疫応答を増強せしめる。

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, Jo 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, Akinaga S, Tomonaga M, Ueda R. Dose-intensified chemotherapy alone or in combination with mogamulizumab in newly diagnosed aggressive ATL: a randomized phase II study. *Br J Haematol*. In press, (corresponding author).
2. Totani H, Kusumoto S, Ishida T, Masuda A, Yoshida T, Ito A, Ri M, Komatsu H, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Niimi A, Inagaki H, Tanaka Y, Iida S. Reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in adult T-cell leukemia-lymphoma patients with resolved HBV infection following systemic chemotherapy. *Int J Hematol*. 2015 Jan 30. [Epub ahead of print]
3. Suzuki T, Kusumoto S, Masaki A, Ishida T, Inagaki H, Iida S, Mori F. CD30-positive primary bone marrow lymphoma mimicking Hodgkin lymphoma. *Int J Hematol*. 2015 Feb;101(2):109-11.
4. 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*. 2014 Apr 10;32(11):1157-63. (*equally contributed)
5. 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)
6. 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.* 2014 Mar;44(3):354-7.

7. 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.* 2014 Mar;92(3):219-28. (corresponding author)
8. 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.* 2014 Jun;45(6):1192-8.

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
(がん対策推進総合研究事業(革新的がん医療実用化研究事業))
分担研究報告書**

**フローサイトメーターによるATL細胞、免疫細胞、および
HLA-A発現の同時解析に関する研究**

研究分担者 渡辺信和 東京大学医科学研究所 特任准教授

研究要旨

我々は成人 T 細胞白血病 (ATL) に対する樹状細胞療法の臨床試験 (ATL-DC1-L1) において、フローサイトメーター (FCM) を使用した ATL 細胞と制御性 T 細胞 (Treg) の解析を行ない、治療前後の ATL 細胞と Treg 動態のモニタリングに成功した。これら先行研究の結果を踏まえ、今年度は新しい樹状細胞療法 (ATL-DC1-101) における ATL 細胞、Treg、末梢血リンパ球、および HLA-A 発現をより詳細に解析するマルチカラーの染色組合せを考案した。健常人血を用いて一部の染色方法で予備実験を行ない、Treg における表面マーカー、および Foxp3 や CTLA-4 など細胞内機能分子の同時解析が可能であることが示された。FCM を使用した本解析システムは、ATL-DC1-101 における病態のモニタリングとメカニズムの解明の手段として、有用なツールとなることが期待される。

A. 研究目的

ATL-DC1-101 において ATL 細胞、Treg、末梢血リンパ球および HLA-A 発現レベルをより詳細に解析するマルチカラーFACS 解析システムを確立し、樹状細胞療法における病態のモニタリングとメカニズムの解明を目指す。

B. 研究方法

先行研究の結果を踏まえ、今年度は新しい樹状細胞療法 (ATL-DC1-101) におけるマルチカラーの染色組合せを考案した。

また、一部の染色方法については健常人末梢血を使用し、目的とする解析が実施可能であるのか検証した。

(倫理面への配慮)

平成 26 年 12 月までの時点で、ATL-DC1-101 の患者登録は行なわれなかった。したがって、今回の予備実験では、健常人ボランティアからの末梢血検体を使用した。解析結果は内部コントロールとして、学会や論文での発表は行なわない。

C. 研究結果

副次評価項目として「CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性細胞数」と「末梢血リンパ球表面マーカー」の解析を、付随研究として「HLA-A発現」を解析するための蛍光標識抗体の組合せを考案した。

1. 副次評価項目

1) 目的・意義

CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性細胞数

ATL細胞は、免疫抑制機能を持つTregのフェノタイプや機能を持つことが報告されている。また、一般にがん患者ではTreg活性が亢進し、がんに対する免疫反応を抑制することが知られている。したがって、本臨床試験においては、治療効果判定のためのATL細胞の検出に加え、ATL細胞以外のTregフェノタイプを判別して解析する。また、Tregフェノタイプが真のTregであるのか確認する目的で、細胞内Foxp3とCTLA-4も同時に解析する。これらの解析により、免疫療法の評価判定とTreg動態を明らかにする。

末梢血リンパ球表面マーカー

ポテリジオ投与やDC療法前後の末梢血免疫細胞を測定し、これらの治療に伴う影響をモニタリングする。

2) 染色方法

CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性細胞数

末梢血単核細胞をCD3、CD4、CD7、CD14、CD25、CD45RA、CD127、CCR4、TSLC-1、Foxp3、および CTLA-4に対する蛍光標識抗体の組合せで染色する (表1、Stain 1)。

末梢血リンパ球表面マーカー

T細胞およびNK細胞関連マーカーとして、末梢血単核細胞をCD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD14、CD16、CD25、CD56、CD235a、

およびTSLC-1に対する蛍光標識抗体の組合せで染色する(表1、Stain 2)。

また、B細胞および造血幹・前駆細胞関連マーカーとして、末梢血単核細胞をCD3、CD10、CD11c、CD14、CD19、CD20、CD34、CD45、およびCD235aに対する蛍光標識抗体の組合せで染色する(表1、Stain 3)。

2. 付随研究

1) 目的・意義

樹状細胞(DC)療法では、DC表面上のHLA-A*02:01、HLA-A*11:01、あるいはHLA-A*24:02にTax由来ペプチドを結合させて患者に投与するが、ATL細胞表面のこれらのHLAがダウンレギュレーションして免疫機構からエスケープする可能性もある。よって、ATL細胞表面の当該HLAの発現レベルも解析する。

2) 染色方法

末梢血単核細胞をCD3、CD4、CD7、CD14、CD235a、HLA-2、HLA-A9、HLA-A11、およびTSLC-1に対する蛍光標識抗体の組合せで染色する(表1、Stain 4)。

3. 検体採取ポイント

スクリーニング(Day -28 ~ Day -14)、Day -7、治療期間(ATL-DC-101投与0週目、2週目、4週目)、後観察期間(6週目、8週目)、追跡調査(24週目までは4週間毎に来院、24週目以降は8週間毎に来院)の各ポイントで採血する(図1)。スクリーニング期間からDC療法後2年間までの間でトータル21回、147 mlの採血量となる。Day -7では「末梢血リンパ球表面マーカー」解析のみ行ない、「Treg解析」は行なわない。中止となった場合は、中止時の採血を行なう。

4. 検体採取法

EDTA添加、静脈血採血。

5. 検体量

7 ml。

6. 搬送法(温度、搬送時間制限)

常温の宅急便で送付する。採血後24時間以内に解析を開始する。

7. 検体管理・保存条件

必要と認められた場合はATL細胞フェノタイプをソーティングして、医科研の保存施設において液体窒素に凍結保存する。

8. 報告所用日数

検体受け取り後3日以内に、末廣陽子医師にメールでご報告する。

9. 責任者および検査機関

渡辺信和

東京大学医科学研究所 臨床検体専用FACSコアラボラトリー(臨床FACSコアラボ、1号館2階)

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

Phone: 03-5449-5765、Fax: 03-5449-5750、Mail: nwatanab@ims.u-tokyo.ac.jp

10. 予備実験

健常人の末梢血を使用し、表1のStain 1の染色組合せで細胞を染色した。健常人血であるため、ATL細胞マーカーであるCD7とTSLC-1による染色は行なわなかった。

一般に活性のあるTreg分画と見なされているのは、CD3⁺CD4⁺細胞のFoxp3⁺CD45RRA⁻分画(青のドット)である。これらの活性型Treg分画はCD25、CCR4、およびCTLA-4が陽性に染まり、活性型のTregとして一致する所見が得られた。

D. 考察

平成26年12月の時点で、本治験はまだ患者登録が行なわれていないことから、本年度はフローサイトメトリー解析における蛍光標識抗体の組み合わせを考案するに留まった。

Tregの解析方法に関しては、今だに多くの相反する意見があり、フローサイトメトリー解析のみで真のTregを同定することは困難が伴う。しかしながら、ATL細胞と正常CD4⁺T細胞を判別した上で、Treg活性の本質につながるFoxp3とCTLA-4を解析する我々の方法は、現時点で可能な最善の解析方法と思われる。

E. 結論

FCMを使用した本解析システムは、ATL-DC1-101における病態のモニタリングとメカニズムの解明の手段として、有用なツールとなることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishigaki T, Zaike Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchimar K, Tojo A, Nakauchi H, Watanabe N. Quantification of adult T-cell leukemia/lymphoma cells using simple four-color flow cytometry. Clin Chem Lab Med. 53(1):85-93,2015
2. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T, Uchimar K. CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are

closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult t-cell leukemia/lymphoma. Clin Cancer Res. 20(11): 2851-2861, 2014.

2. 総説と著書

1. 佐藤奈津子、渡辺恵理、石垣知寛、渡辺信和：BD FACS™を用いたマルチカラー解析による ATL 患者のモニタリング（著書）、BD Science Avanzato、Vol. 9、1-8、2014。
2. 渡辺恵理、佐藤奈津子、渡辺信和：臨床への応用 -患者の病態をリアルタイムで可視化する-（著書）直伝！フローサイトメトリー（実験医学別冊、中内啓光監修・清田純編集、羊土社）110-121、2014。

3. 学会発表

1. 渡辺恵理、佐藤奈津子、末廣陽子、崔日承、末廣陽子、鵜池直邦、渡辺信和：12 カラー・フローサイトメトリーによる ATL に対する樹状細胞療法後の ATL 細胞と免疫細胞の同時解析、第 76 回日本血液学会、ポスター発表、2014 年 11 月 1 日（大阪国際会議場、大阪）
2. Ishigaki T, Kobayashi S, Ohno N, Ota Y, Watanabe N, Tojo A, Nakauchi H, Uchimaru K. Establishment of a stroma-dependent ATL cell-line and analysis of its proliferation in vivo. Oral, The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nov 1, 2014, Osaka.
3. 佐藤奈津子、渡辺信和、渡辺恵理、崔日承、鵜池直邦：キメリズム解析・HLA-Flow 法による臍帯血移植後の生着、ATL 細胞、および ATL 細胞の HLA クラス I 欠失の解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 24 日（東京大学医科学研究所、東京）
4. 石垣智寛、小林誠一郎、大野伸広、中野伸亮、宇都宮與、山崎聡、渡辺信和、東條有伸、中内啓光、内丸薫。急性型 ATL における細胞表面抗原のクラスタリング解析と ATL 幹細胞マーカーの検索、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 24 日（東京大学医科学研究所、東京）
5. 渡辺恵理、佐藤奈津子、渡辺信和、末廣陽子、鵜池直邦。ATL に対する樹状細胞療法後の ATL 細胞と免疫細胞のマルチカラー FACS 解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 23 日（東京大学医科学研究所、

東京）

6. 渡辺信和、佐藤奈津子、渡辺恵理、崔日承、鵜池直邦。ATL に対する臍帯血移植後の ATL 細胞と免疫細胞の 12 カラー FACS 解析、第 1 回日本 HTLV-1 学会、口頭発表、2014 年 8 月 23 日（東京大学医科学研究所、東京）
7. 佐藤奈津子、渡辺恵理、石垣智寛、渡辺信和。キメリズム解析 / HLA-Flow 法の臨床応用、第 24 回日本サイトメトリー学会、口頭発表、2014 年 6 月 28 日（関西医科大学、枚方市）
8. 渡辺恵理、佐藤奈津子、末廣陽子、鵜池直邦、渡辺信和。12 カラー FCM による ATL に対する樹状細胞療法後の ATL 細胞と免疫細胞の同時解析、第 24 回日本サイトメトリー学会、口頭発表、2014 年 6 月 28 日（関西医科大学、枚方市）

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 ATL-DC-101染色組合せ

[Fresh PBMCs]											
Stain 1: Treg/Foxp3/CTLA-4											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	V450	V500	BV605
CCR4①	(Foxp3)③		CD45RA①	Biotin-TSLC-1①	CD4①	(CD152)③	CD14①	CD3①	CD7	CD127①	CD25①
LDG0411031	E11466-1633		B145933		910872A	29768	B131136	09317	2153618	B173326	B158071
10 µl	5 µl		5 µl	1 µl	2 µl	5 µl	7 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
e-Bioscience						BD Pharmingen					

Stain 2: Lymphocyte markers (T cells and NK cells)											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	AF647	AF700	APC-Cy7	V450	V500	BV605
CD2	CD5	CD235a/PI	CD8	CD25	CD16	TSLC-1	CD56	CD3	CD7	CD4	CD14
B166331	27053	B126613/-	B129722	51531	910872A	Lab	B131136	09317	2153618	B173326	B158071
5 µl	12 µl	1 µl / 1 µl	5 µl	5 µl	2 µl	1 µl	7 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Stain 3: Lymphocyte markers (B cells, Stem cells and others)											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	APC	AF700	APC-Cy7	AF405	V500	BV605
CD19	CD34	CD235a/PI	CD20	CD10	CD11c	TSLC-1①	CD3①	CD7①	CD45	CD4①	CD14①
68976	-----	B126613/-	B171352	62232	3079922	Lab	09317	773984A			B158071
12 µl	12 µl	1 µl / 1 µl	5 µl	5 µl	20 µl	1 µl	5 µl	5 µl			5 µl

Stain 4: HLA											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	AF647	AF700	APC-Cy7	V450	V500	BV605
HLA-A9①	HLA-A2①	CD235a①/PI		Biotin-HLA-A11①	PE-TR	TSLC-1①	CD3①	CD7①	CD4①	CD14①	
017	79836	B126613/-		51531	Lab	Lab	09317	2153618	B173326	B158071	
10 µl	12 µl	1 µl / 1 µl		5 µl	1 µl	1 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

Stain 5: Isotype for Stain 4											
FITC	PE	PE-Cy5	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	PE-TR	AF647	AF700	APC-Cy7	V450	V500	BV605
IgG2b①	IgG2b①	CD235a①/PI		Biotin-IgM①	PE-TR	TSLC-1①	CD3①	CD7①	CD4①	CD14①	
B159582	-----	B126613/-		3168672	Lab	Lab	09317	2153618	B173326	B158071	
12 µl	12 µl	1 µl / 1 µl		5 µl	1 µl	1 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl

図1 ATL-DC-101における採血のタイミング

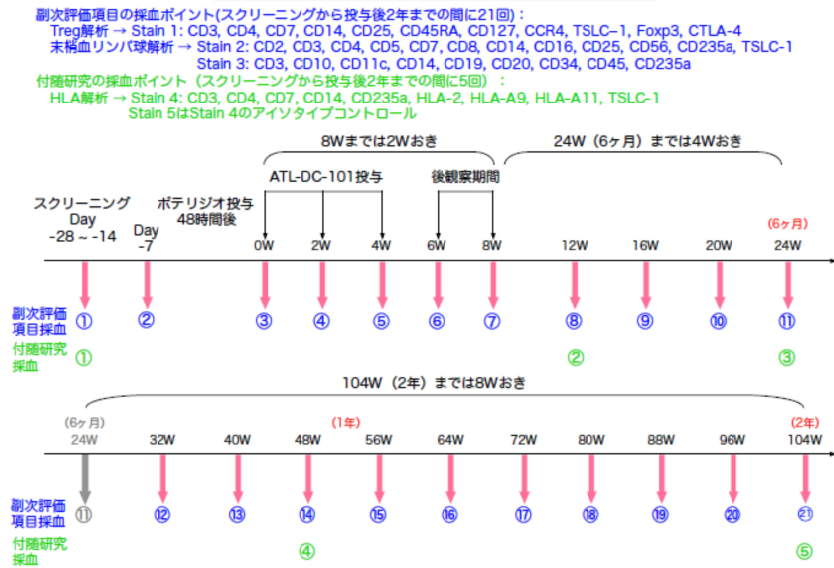
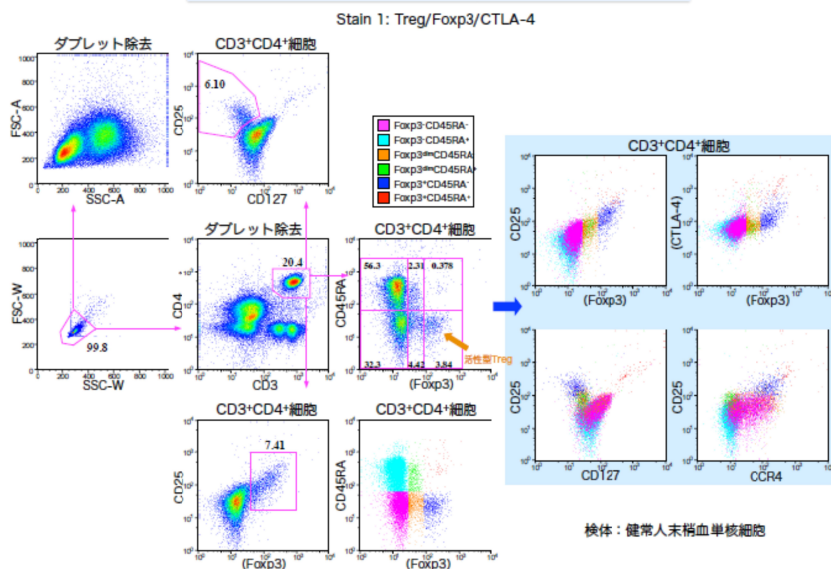


図2 「CD4陽性CD25陽性Foxp3陽性細胞数」の解析



**厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）**

分担研究報告書

ATL に対する樹状細胞ワクチン療法臨床試験の実施

研究分担者：福田 哲也 東京医科歯科大学 血液内科 助教

研究要旨

成人 T 細胞白血病に対する樹状細胞療法について、治験プロトコール作製に従事した。また、免疫療法のより有効性を高めるべく、リンパ系腫瘍における、腫瘍増殖と免疫応答につき、基礎的研究を行った。その結果、免疫調節因子がリンパ系腫瘍の生存に關与することが明らかとなった。

A. 研究目的

極めて難治性である成人T細胞白血病に対して、新たな免疫学的療法の開発を行う。

B. 研究方法

移植適応の無い成人T細胞白血病患者を対象に、抗 CCR4 抗体を併用した樹状細胞療法を行う。細胞株、患者から得られた臨床検体を用いて、より有効な治療開発について検討する。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針を遵守して実施する。

C. 研究結果

臨床試験実施に向け、プロトコール作成を行った。

リンパ系腫瘍における免疫応答について、臨床検体や、細胞株を用いて検討した所、免疫調整因子である IDO 及びトリプトファン代謝産物のトラニラストがリンパ系腫瘍細胞の増殖抑制効果がある事を明らかとした。

D. 考察

成人T細胞白血病は極めて難治性の疾患であり、化学療法のみで長期予後の期待は出来ない。同種造血幹細胞移植での成功例から、免疫学的治療の有効性が期待出来る。本試験の遂行により、この疾患の免疫学的治療の実用化を図るとともに、より有効性を高める為の検討が重要であると考えられる。

E. 結論

成人T細胞白血病に対する新規免疫学的治療の実用化に向けて、早期の臨床試験実施が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. PLoS One 、 査 読 あ り 2014 Nov 19;9(11):e112564.
2. Suwa S, Kasubata A, Kato M, Iida M, Watanabe K, Miura O, Fukuda T. The tryptophan derivative, tranilast, and conditioned medium with indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing cells inhibit the proliferation of lymphoid malignancies. Int J Oncol 2015 Mar;46(3):1369-76

2. 学会発表

1. Suwa S, Usui A, Iida M, Watanabe K, Miura O, Fukuda T. Identification of HLA restricted peptides derived from tumor antigen of hematological malignancy. 第 76 回日本血液学会学術集会、大阪
2. Iida M, Watanabe K, Suwa S, Kato M, Miura O, Fukuda T. Protooncogene MYB

activates the transcription of ROR1 in B cell malignancies.

3. Watanabe K, Iida M, Suwa S, Kato M, Miura O, Fukuda T. Protooncogene MYB Activates the Transcription of ROR1 in B Cell Malignancies. 第 56 回アメリカ血液学会年次集会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

分担研究報告書

樹状細胞における膜孔形成性細胞傷害蛋白 Perforin-2 に関する研究

研究分担者：白土 基明 九州大学大学院病態制御内科学 助教

研究要旨

樹状細胞は強力な抗原提示能を有しており、悪性腫瘍に対する免疫療法への応用が試みられている。しかし、その貪食から抗原提示までのメカニズムは未知の部分が多い。我々はマクロファージに発現が報告されている膜孔形成性細胞傷害蛋白 Perforin-2 が樹状細胞においても、特に貪食の盛んな未熟な段階に高発現していることを見いだした。

A. 研究目的

樹状細胞は感染免疫・腫瘍免疫において T 細胞に抗原を提示する重要な役割を持っている。われわれは膜孔形成性細胞傷害蛋白 Perforin-2 の樹状細胞での発現と機能につき解明する。

B. 研究方法

健常人末梢血より CD14 陽性細胞を磁気ビーズにて単離し、GM-CSF、IL-4 を添加して培養し未熟樹状細胞を誘導した。その後、TNF- α を加えてさらに培養し、成熟樹状細胞を誘導した。それぞれの Perforin-2 蛋白、mRNA をそれぞれ Western blot、RT-PCR にて検討した。

また、Perforin-2 に対する miRNA を組込んだベクターを作成し樹状細胞に導入し Perforin-2 の発現を低下させて抗原提示への影響を検討した。

（倫理面への配慮）

健常人からの採血の際は文書で説明し同意を得た。

C. 研究結果

健常人末梢血より CD14 陽性単球分画を単離し、GM-CSF、IL-4 による刺激下に 7 日間培養し得られた細胞は形態的、表面マーカー上、未熟樹状細胞と考えられた。さらに TNF- α を加えて 2 日間培養を続けると、成熟樹状細胞となった。Perforin-2 蛋白の発現は未熟樹状細胞で高まり、成熟するとやや低下した。しかし mRNA の発現は単球分画が最も高く、次第に低下した。

Perforin-2 に対する siRNA ベクター（GFP 遺伝子を含む）を作成し、Nucleofector にて未熟

樹状細胞に導入を試みた。GFP 陽性率による導入効率に 10%～40%とばらつきが見られた。

D. 考察

健常人末梢血単球分画より誘導した樹状細胞において、Perforin-2 が発現していることを確認できた。蛋白レベルでは未熟樹状細胞において高発現であり、貪食過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。蛋白発現と mRNA レベルが相関しておらず、転写後調節の関与が考えられた。

樹状細胞への遺伝子導入は可能であったが、効率にばらつきが見られ、改良の余地がある。また、今後 mRNA レベルで抑制されていることを確認する予定である。

E. 結論

樹状細胞に膜孔形成性細胞傷害蛋白 Perforin-2 が発現していることを確認した。未熟樹状細胞に高発現することより貪食と抗原プロセッシングに関与している可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
神奈木真理 長谷川温彦 金原秀一 末廣陽子	成人T細胞白血病に対する免疫療法（AZT/IFN-、骨髄移植、樹状細胞ワクチンなど）	沼田稔	血液フロンティア	医薬ジャーナル社	大阪	2014	1631-8
佐藤奈津子 渡辺恵理 石垣知寛 渡辺信和	BD FACS™ を用いたマルチカラー解析による ATL 患者のモニタリング		BDSscience Avanzato Vol. 9			2014	1-8
渡辺恵理 佐藤奈津子 渡辺信和	臨床への応用-患者の病態をリアルタイムで可視化する直伝！フローサイトメトリー	清田純	実験医学別冊	羊土社		2014	110-121

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suehiro Y, Hasegawa A, Iino T, Sasada A, Watanabe N, <u>Matsuoka M</u> , Takamori A, Tanosaki R, Utsunomiya A, Choi I, <u>Fukuda T</u> , Miura O, Takaishi S, Teshima T, <u>Akashi K</u> , <u>Kannagi M</u> , 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.	British journal of haematology,	In press	doi: 10.1111/bjh.13302	2015
Kinpara S, Ito S, Takahata T, Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, <u>Matsuoka M</u> , Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, <u>Kannagi M</u> .	Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and antisense viral RNA in the constitutive NFkappaB activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells.	Leukemia	In press	doi: 10.1038/leu.2015.1	2015
Ma G, Yasunaga J-I, Akari H, and <u>Matsuoka M</u> .	TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax.	Proc.Natl. Acad.Sci.	In press		2015
Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, <u>Matsuoka M</u> , Saitoh A, Green P, Fujii M.	Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells.	Cancer Sci	In press		2015
<u>Ishida T</u> , Jo 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, Akinaga S, Tomonaga M, Ueda R.	Dose-intensified chemotherapy alone or in combination with mogamulizumab in newly diagnosed aggressive ATL: a randomized phase II study.	Br J Haematol	In press		2015

発 表 者 氏 名	論 文 タ イ ト ル 名	発 表 誌 名	巻 号	ペ ー ジ	出 版 年
Totani H, Kusumoto S, <u>Ishida T</u> , Masuda A, Yoshida T, Ito A, Ri M, Komatsu H, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Niimi A, Inagaki H, Tanaka Y, Iida S.	Reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in adult T-cell leukemia-lymphoma patients with resolved HBV infection following systemic chemotherapy.	Int J Hematol	Epub ahead of print		2015
Ishigaki T, Zaïke Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchimarū K, Tojo A, Nakauchi H, <u>Watanabe N</u> .	Quantification of adult T-cell leukemia/lymphoma cells using simple four-color flow cytometry.	Clin Chem Lab Med.	53(1)	85-93	2015
Suwa S, Kasubata A, Kato M, Iida M, Watanabe K, Miura O, <u>Fukuda T</u> .	The tryptophan derivative, tranilast, and conditioned medium with indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing cells inhibit the proliferation of lymphoid malignancies.	International Journal of Oncology	46(3)	1369-76	2015
Araya N, Sato T, 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.	HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells.	J Clin Invest	124	3431-3442	2014
Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama A, Fujii H, Hasegawa A, <u>Kannagi M</u> , Ansari A. A, Saito M.	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.	AIDS Res Hum Retroviruses	30	542-552	2014
Kato K, Choi I, Wake A, Uike N, Taniguchi S, Moriuchi Y, Miyazaki Y, Nakamae H, Oku E, Murata M, Eto T, <u>Akashi K</u> , 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	20	1968-74	2014
Lavorgna A, <u>Matsuoka M</u> , Harhaj EW.	A critical role for IL-17RB signaling in HTLV-1 Tax-induced NF-κB activation and T-cell transformation.	PLoS Pathogens.	10	e1004418	2014
Cook LB, Melamed A, Niederer H, Valganon M, Laydon D, Foroni L, Taylor GP, <u>Matsuoka M</u> , Bangham CR.	The role of HTLV-1 clonality, proviral structure and genomic integration site in adult T cell leukemia/lymphoma.	Blood.	123	3925-3931	2014
Zhao, T, Satou Y and <u>Matsuoka M</u> .	Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice.	Arch Virol.	159	1849-1856	2014
Azuma Y, Kükenshöner T, Ma G, Yasunaga JI, Imanishi M, Arndt KM, <u>Matsuoka M</u> , and Futaki S.	Controlling leucine-zipper partner recognition in cells through modifications of a-g interactions.	Chem. Commun.	50	6364-6367	2014

発 表 者 氏 名	論 文 タ イ ト ル 名	発 表 誌 名	巻 号	ペ ー ジ	出 版 年
Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J-I, Takai K and <u>Matsuoka M.</u>	HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization.	Cancer Res.	74	188-200	2014
Miyazato P and <u>Matsuoka M.</u>	Human T-cell leukemia virus type 1 and Foxp3 expression viral strategy in vivo.	Int Immunol.	26	419-425	2014
Ogura M*, <u>Ishida T*</u> , 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. (*equally contributed)	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.	32(11)	1157-63	2014
Narita T, <u>Ishida T</u> , 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. (corresponding author)	HTLV-1 bZIP factor specific CD4 T cell responses in ATL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	J Immunol	1;192	940-7	2014
Nakano N, Kusumoto S, Tanaka Y, <u>Ishida T</u> , 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.	44(3)	354-7	2014
Mori F, <u>Ishida T</u> , 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	92(3)	219-28	2014
Xia H, Yamada S, Aoyama M, Sato F, Masaki A, Ge Y, Ri M, <u>Ishida T</u> , Ueda R, Utsunomiya A, Asai K, Inagaki H.	Prognostic impact of miR-145 down-regulation in adult T-cell leukemia/ lymphoma.	Hum Pathol	45(6)	1192-8	2014
石田高司, 伊藤旭, 戸倉新樹, 田中淳司, 鶴池直邦, 飛内賢正, 塚崎邦弘	血液内科医・皮膚科医のための統合 ATL 診療ガイドライン解説書 2014	日本皮膚科学会雑誌	124 巻 12 号	2275-2279	2014
Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, <u>Watanabe N</u> , Tojo A, Watanabe T, Uchimaru K.	CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult t-cell leukemia/lymphoma.	Clin Cancer Res.	20(11)	2851-2861	2014