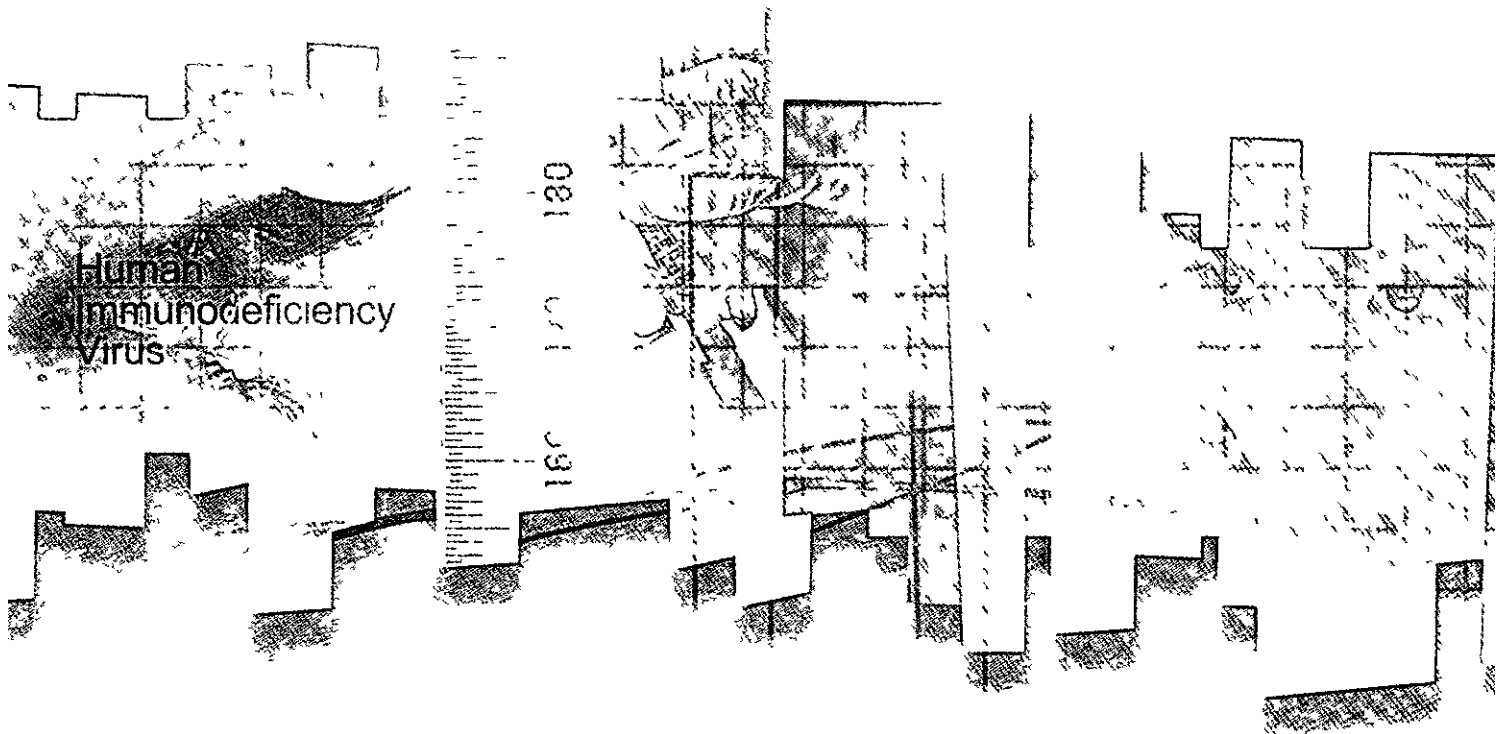


厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業
平成15年度総括・分担研究報告書

免疫賦活を応用した HIV感染症の治療開発に関する研究



主任研究者 岡 慎 一

国立国際医療センター
エイズ治療・研究開発センター

平成16(2004)年3月

平成 15 年度
厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業

免疫賦活を応用した HIV 感染症の治療開発に関する研究

－平成 15 年度 総括・分担研究報告書－

主任研究者 岡 慎一

平成 16(2004)年 3 月

免疫賦活を応用した HIV 感染症の治療開発に関する研究班

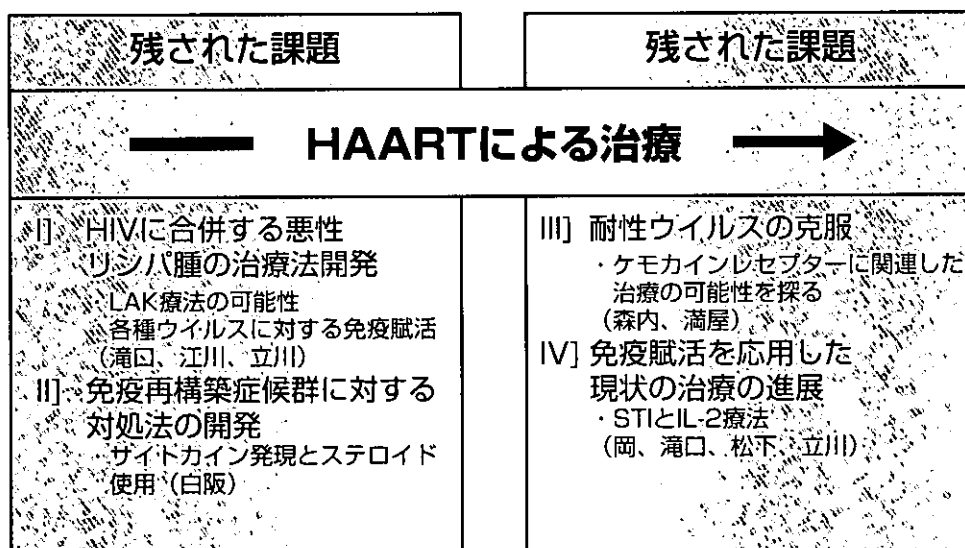
(AIDS-H15-001)

HAARTの遂行により多くの患者において予後が改善された。しかし、治療が長期にわたるといふ点からいくつかの課題は残されている。その1つが、未だ治療抵抗性で死亡率の高いエイズに合併する悪性リンパ腫である。日本人の場合、EBウイルスによるものがほとんどであり、いわゆる通常の化学療法に抵抗性である。2番目の課題は、HAART後に高頻度に出現する免疫再構築症候群である。この現象が起こると治療失敗になる頻度はきわめて高いが、エイズで発病し HIV 感染を知る患者が多い日本にとって大きな問題である。3番目の課題は、現状の逆転写酵素阻害薬(RTI)やプロテアーゼ阻害薬(PI)に対し耐性を示すウイルスが徐々に増加しつつあることである。しかし、RTIやPIの新薬開発が飽和に達しつつあり、交差耐性を持たない物質は、動物実験の段階で強い毒性が出たりしている。4番目は、HIVの本体である免疫不全がHAARTのみではなかなか改善されないという問題点である。したがって、治療をやめるとすぐにリバウンドをきたしてしまう。

これら4つの課題を克服するために以下の4つの柱で研究チームを構成した。

- 柱1： HIVに合併する悪性リンパ腫の治療法の開発
- 柱2： 免疫再構築症候群に対する対処法の開発
- 柱3： 現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服
- 柱4： 免疫賦活を応用した現状の治療の進展

研究班の概念図(平成15年-17年)



柱1では、具体的にはLAK療法（江川）を試みる。この時に、臨床効果（立川）と同時にHIVやEBVに対する免疫能（滝口）が誘導されているかどうか免疫学的に解析する。柱2では、免疫再構築症候群発症時のサイトカイン発現を調べ、過剰なサイトカインをコントロールするステロイドの投与量や投与期間を科学的に解析する（白阪）。柱3は、RTIやPI以外の機序による新薬開発、特にCCR5阻害薬の開発（満屋）が中心になる。この種の薬剤は、ケモカインとの拮抗作用が問題になる可能性があり、実際にケモカインレセプターの刺激によりどのようなことが起こりうるのかを人で調べておく必要がある（森内）。柱4は、免疫賦活を加えることによりHAARTの効果を高める（岡、立川）、あるいはHIV自身に対する免疫を誘導（松下、滝口）させる治療法の開発にある。柱4は、すでに開始されている臨床研究の継続部分を含むが、次の3年で結論を得ることが可能と思われる。

主任研究者：岡 慎一（国立国際医療センター）

免疫賦活を応用した HIV 感染症の治療開発に関する研究

研究者名	分担	所属	役職
岡 慎一	主任研究者	国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター	部長
江川 滉二	分担研究者	(株)メディネット 分子免疫学研究所	所長
立川 夏夫	分担研究者	国立国際医療センター エイズ治療・研究開発センター	室長
滝口 雅文	分担研究者	熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野	教授
白阪 琢磨	分担研究者	国立病院大阪医療センター 臨床研究部免疫感染研究室	室長
満屋 裕明	分担研究者	熊本大学医学部 第二内科	教授
森内 浩幸	分担研究者	長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科	教授
松下 修三	分担研究者	熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野	教授

目次

総括研究報告書

免疫賦活を応用した HIV 感染症の治療開発に関する研究	3
------------------------------------	---

主任研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 部長）

分担研究報告書

エイズに伴う悪性リンパ腫に対する LAK 療法の開発	9
----------------------------------	---

分担研究者：江川 滉二（株式会社メディネット 分子免疫学研究所 所長）

研究協力者：後藤 重則（瀬田クリニック 院長）

金子 亨（新横浜メディカルクリニック 院長）

免疫療法に関する臨床応用	15
--------------------	----

分担研究者：立川 夏夫（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 室長）

研究協力者：菊池 嘉（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 病棟医長）

照屋 勝治（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 外来医長）

免疫療法における各種ウイルスに対する細胞性免疫応答の解析	23
------------------------------------	----

分担研究者 滝口 雅文（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野 教授）

研究協力者 上野 貴将（熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野 講師）

岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 部長）

免疫再構築症候群への対処法開発に関する研究	29
-----------------------------	----

分担研究者 白阪 琢磨（国立病院大阪医療センター臨床研究部免疫感染研究室 室長）

研究協力者 上田 千里（国立病院大阪医療センター臨床研究部免疫感染研究室 室員）

上平 朝子（国立病院大阪医療センター免疫感染症科 医師）

ケモカインレセプターに影響しない侵入阻害薬の開発	37
--------------------------------	----

分担研究者：満屋 裕明（熊本大学医学部免疫病態学内科学第二 教授）

ケモカインレセプターによる免疫応答に関する解析	43
-------------------------------	----

分担研究者：森内 浩幸（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）

研究協力者：森内 昌子（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助手）

HAART 下における抗 HIV 免疫再構築に関する臨床研究	51
--------------------------------------	----

分担研究者：松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 教授）

研究協力者：木村 哲也（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 非常勤研究員）

Structured Treatment Interruptions(STI) による免疫療法	55
---	----

分担研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・開発センター 部長）

研究協力者：田沼 順子（国立国際医療センターエイズ治療・開発センター）

木村 哲（国立国際医療センターエイズ治療・開発センター センター長）

菊池 嘉（国立国際医療センターエイズ治療・開発センター 病棟医長）

立川 夏夫（国立国際医療センターエイズ治療・開発センター 室長）

照屋 勝治（国立国際医療センターエイズ治療・開発センター 外来医長）

源河いくみ（国立国際医療センターエイズ治療・開発センター）

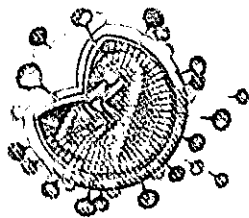
湯永 博之（国立国際医療センターエイズ治療・開発センター）

山中ひかる（(財) エイズ予防財団リサーチレジデント）

土屋 亮人（(財) エイズ予防財団リサーチレジデント）

研究成果の刊行物に関する一覧表	61
-----------------------	----

1. 総括研究報告書



総括研究報告書

免疫賦活を応用した HIV 感染症の治療開発に関する研究

主任研究者：岡 慎一（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター 部長）

分担研究者：滝口 雅文¹、松下 修三²、満屋 裕明³、森内 浩幸⁴、
江川 滉二⁵、白阪 琢磨⁶、立川 夏夫⁷

（¹熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野、²熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野、³熊本大学第二内科、⁴長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染疾病病態制御学系、⁵(株)メディネット分子免疫学研究所、⁶国立病院大阪医療センター臨床研究部、⁷国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター）

研究要旨

本研究は、HAART 時代に残された課題の克服を目的とし 4 つの柱で、免疫賦活もしくは制御を応用した新しい治療法を探索した。一つ目の柱である EBV を狙った免疫賦活療法は、順調に臨床試験が開始できた。二つ目の柱である免疫再構築に対する対処法の検討は、サイトカインの解析を行うことにより科学的に判定できた。三つ目の柱である進入阻害剤の開発は、新しい治療の柱として期待される。四つ目の免疫賦活療法が成果を上げ HIV 自身に対する免疫が誘導されれば、治療中断が可能になるという大きな期待もある。以上のように、3 年計画の 1 年目としての計画をほぼ達成できた。

A. 研究目的

HAART により多くの患者の予後が改善された。しかし、治療が長期にわたるといった点からいくつかの課題は残されている。本研究は、これら課題克服を目的に以下の 4 つの柱で遂行した。

- 柱 1：HIV に合併する悪性リンパ腫の治療法の開発、
- 柱 2：免疫再構築症候群に対する対処法の開発、
- 柱 3：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服、
- 柱 4：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

B. 研究方法

柱 1：HIV に合併する悪性リンパ腫の治療法の開発

始めの例は identical twin による患者を選択した（立川）。基本治療は LAK 療法とするが、免疫賦活に用いる抗原およびその方法は、適宜改良した（江川）。臨床効果は腫瘍の縮小でみるが、補助診断として EBV に対する細胞傷害性 T 細胞（CTL）の解析をおこなった（滝口）。

柱 2：免疫再構築症候群に対する対処法の開発

カリニ肺炎(PCP)に対する免疫再構築症候群(IRS)が発症した患者血清中のサイトカインパターンの解析を行い治療経過と比較検討した(白阪)。

柱 3：耐性ウイルスの克服

CCR5 アンタゴニスト (spirodiketopiperazine 誘導体)の中から、AK602を絞り込み、臨床試験の段階まで来た(満屋)。一方宿主側因子である CCR5 を阻害することによる長期的な生体への影響については現在のところ全く未知である。そこで CCR5 阻害剤の抗 HIV 活性と本来の働きであるケモカインを介した作用に対する阻害作用との関連を詳しく検討し、HIVのみを特異的に阻害することのできる CCR5 阻害剤の開発に向けた研究を行った。(満屋、森内)。

柱 4：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

急性感染者に対する STI 療法は、26 例全例が観察期間に入っている。最終投薬から無治療で 1 年以上経過した時点でのウイルス量が 10,000 c/ml 以下に抑えられている症例を臨床的な有効例と判定した(岡)。また、実際に CTL が誘導されているかどうかを経時的にテトラマーを用いて解析した(滝口)。IL-2 を用いた免疫賦活療法に関しても最終的には予後に差が出るかどうかについて今後 3 年間観察していく(岡)。長期 HAART 療法にてウイルス抑制が持続でき中和活性が回復した症例において、免疫学的解析を行った(松下)。

(倫理面への配慮)

本研究に関する臨床研究はすべて倫理委員会/受託審査委員会の承認を得た。また、対象となる患者より文書同意を得ている。

C. 研究結果**柱 1：HIV に合併する悪性リンパ腫の治療法の開発**

実際の症例における LAK/免疫療法の評価に関しては、以下の 2 側面が認められた。腫瘍サイズでは Salvage 療法開始後も新たな病変が出現し化学療法は断念された。しかしリンパ腫の特徴的マーカーである血漿中 EBVDNA 量は抑制された。通常 EBVDNA 量は化学療法中断にて再上昇する。しかし、こ

の症例においては化学療法断念後も検出感度未満となっている。さらに自宅での生活が可能なまでに症例の全身状態は良好なまま保たれている(立川、江川)。補助診断法としては、CD8T 細胞の機能を反映したフェノタイプ分類を可能にした(滝口)。

柱 2：免疫再構築症候群に対する対処法の開発

IRS 発症例では未発症例に比べ、PCP 初発時の血中 IFN- γ 濃度は低値であった。PCP 発症早期の血中 IFN- γ 測定は IRS 発症を予測する一助となる可能性が示唆された(白阪)。

柱 3：耐性ウイルスの克服

AK602 は試験管内で強力な活性を示し(IC50:0.2nM)、既存の抗 HIV 剤 (RTIs, PIs) との交差耐性を認めず、動物モデル(huPBL-NOD-SCID マウス)の系でも強力な抗 HIV 活性を示した。AK602 は非常に強力な CCR5 に対する結合親和性 (KD 値: ~ 3 nM) を持ちながら、CCR5 への結合にはわずかししか影響を与えず、RANTES が CCR5 を介してもたらず生理的作用 (chemotaxis や CCR5 の internalization) についても完全には阻害しないことが分かった。構造学的解析から AK602 が既存の CCR5 阻害剤の結合部位と異なる部位に結合、その中でも extracellular loop 2 の両端に位置するアミノ酸 (G163 と K191) が結合に重要であることを示した(満屋)。CCR5 プロモーターを DBP (日内変動の影響を受ける転写因子) が活性化さ、CCR5 の発現も概日リズムを取る。また、RANTES (CCR5 agonist) + 少量の抗 CD3 抗体の刺激は、HAART でウイルスが検出限界以下となった患者の末梢血単核細胞からのウイルス発現を促した。しかし、これらの影響は AK602 では軽微であることも示唆された(森内)。

柱 4：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

STI に関しては、2004 年 1 月現在、14 例が治療を完遂、中断・脱落例 10 例、2 例が治療進行中である。17 例中 4 例は、治療終了後 6～12 ヶ月後の平均 HIV-RNA が 10,000copies/ml 未満と比較的低く抑えられていた(岡)。ウイルス抑制の見られた成功例では、CTL も誘導できていることが確認された(滝口)。IL-2 免疫賦活療法も順調に経過している(岡)。HAART による免疫再構築は、観察期間を延長することにより、自己由来 HIV に対する液性免

疫応答が回復する症例が増加した。またこのような症例では、ヘルパー T 細胞反応の再構築も起こることを示した (松下)。

D. 考察

柱 1 に関しては、本研究で初めて行ったエイズ悪性リンパ腫に対する免疫賦活療法の結果として、症例血液中の EBV に対する CTL 数が健常者レベルまで回復していること、症例血漿中 EBVDNA 量が低値に抑えられていること、など LAK/免疫療法の寄与を示唆する所見も得られている。さらに臨床評価を綿密に行い、2 例目以降にも期待したい。

柱 2 に関しては、防御免疫において IFN- γ を含む Th1 サイトカインの重要性が報告されている。我々は血中サイトカイン量測定が IRS 発症の簡便で迅速な予知検査となる可能性を検討した。さらに症例を増やし検討を続けたい。

柱 3 に関しては、CCR5 の構造学的解析を更に発展させることで CCR5 のどの部位が HIV 感染に特に重要であるか、さらにはどのような特徴 (構造) を有する化合物が HIV 特異的な CCR5 阻害を来す可能性があるかといった具体的な知見を得ることが可能と考えられる。

柱 4 に関しては、STI の成功例では、免疫学的にも裏付けられる結果が出ており、確かに一部には有効例のあることがわかった。今後その差につながる因子の解析が重要となろう。HAART の問題点が明らかになり、何らかの免疫療法の開発が期待されている。有効な HAART の継続により、細胞性・液性の免疫応答が回復する症例があることを示した。

E. 結論

当班の研究は、一部、前回の HIV 治療班からの継続研究と、今回からの新規のものが含まれる。継続研究については、ほぼ予定通りの速度での研究の進展が行っている。新規分については、今後の進展が期待される。特に、LAK/免疫療法は AIDS リンパ腫のもつ感染症的側面に注目した非常にユニークな研究であり、その評価方法も含め世界的にも初の試みと考えられる。CCR5 標的療法が HAART に組み込まれる時代が到来しつつあり、この発現や機能に関わる知見の拡大は大きな意義を有する。長期間 HAART が有効な症例に関する HIV 特異的ヘルパー

T 細胞の再構築に関する報告はきわめてユニークなものである。

これらの 4 つの課題が克服されることにより、現状のガイドラインベースでの治療の一步先を行く新しい治療法の開発と発展に寄与することが期待できる。

F. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし

G. 研究発表

別添

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特願 2000-137975 整理番号 YP2000-007 (平成 12 年) 4'-C-エチニルピリミジンヌクレオシド化合物
2. 特願 2001-079611 整理番号 ONP3741 (平成 13 年) トリアザスピロ [5, 5] ウンデカン誘導体を有効成分とする HIV 感染の予防および/または治療剤

II. 分担研究報告書



エイズに伴う悪性リンパ腫に対する LAK 療法の開発

分担研究者：江川 滉二（株式会社メディネット 分子免疫学研究所 所長）

研究協力者：後藤 重則¹、金子 亨²

（¹瀬田クリニック、²新横浜メディカルクリニック）

研究要旨

AIDS 患者の延命に伴って EBV 由来 B 細胞リンパ腫の発生頻度が高まることが知られている。この疾患は AIDS 自体に対する既知の治療では対処できないが、*in vitro* の研究から EBV 由来 B 細胞リンパ腫は免疫反応の標的となり得る腫瘍であることが確認されており、これを標的とした免疫細胞療法を行えばこの腫瘍に対する治療効果を期待すること出来ると考える。

本研究では EBV 由来 B 細胞リンパ腫を発症した 2 名の AIDS 患者に対して免疫細胞療法を行いその治療効果を検討した。この 2 名の患者は非常に特殊なケースで、一卵双生児の兄弟（健常人）の血液を用いる事が出来た。治療に用いた細胞は、固相化抗 CD3 抗体と IL-2 で活性化した T 細胞 (CD3-Lymphokine-Activated Killer : CD3-LAK) (図 1)と、抗原特異的な細胞障害性 T 細胞(Cytotoxic T Lymphocyte : CTL) を誘導することを目的として、自己腫瘍由来の抽出物（ライセート）または EBV 由来の抗原ペプチドを取り込ませた（パルスした）樹状細胞 (Dendritic Cell : DC) で自己の T 細胞を活性化し、更に固相化抗 CD3 抗体と IL-2 で活性化、増殖させた細胞集団(DC - CTL) (図 2)の 2 種である。両名の患者において細胞療法の治療効果を示唆する結果が得られたが、より高い治療効果が得られる細胞療法の開発が望まれる。

□ CD3-LAK (CD3-Lymphokine-Activated Killer : CD3-リンフォカイン活性化キラー) 療法

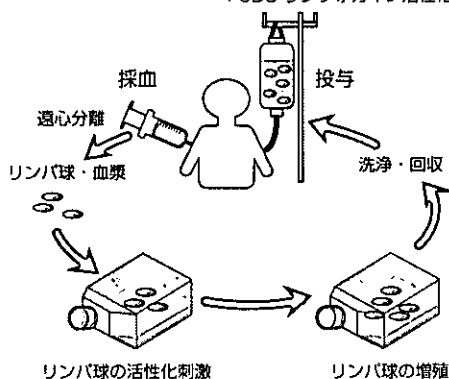


図 1. CD3-LAK 法

DC-CTL法

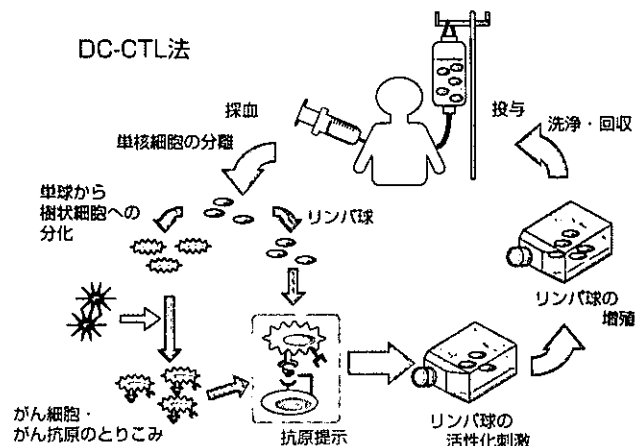


図 2. DC-CTL 法

A. 研究目的

現在の AIDS 治療での予後における課題の一つに、AIDS に合併する悪性リンパ腫の死亡率が高いことが挙げられる。日本人の場合、EBV 由来の B 細胞リンパ腫であることがほとんどであり、通常の化学療法では抵抗性を示すことが多い。

そこで、本研究班は合併症克服を目的として、免疫賦活もしくは制御を応用した合併症の新しい治療法を探索している。これを実現する柱の一つとして、当分担研究班は免疫細胞療法による HIV に合併する悪性リンパ腫の治療技術の開発を進めている。

また、EBV を標的とした免疫細胞療法の開発は、今後他の難治性ウイルス (CMV など) や非定型好酸菌などに起因する疾病の治療にも応用されることが期待される。

B. 研究方法

国立国際医療センター病院における HIV に併発する悪性リンパ腫の治療で、当分担研究班は免疫細胞療法を試みている。我々は医療機関に対し、免疫細胞療法に用いる治療用細胞の培養技術の提供および改良、品質管理ノウハウの提供、フローサイトメトリーによる表面抗原の解析等を含む培養細胞の評価を研究分担として実施した。治療用細胞として

は、CD3-LAK 細胞または DC-CTL 細胞が用いられた。

CD3-LAK 細胞は、末梢血単核球を固相化した抗 CD3 抗体及び IL-2 で活性化・増殖させる方法で約 2 週間培養された(図 3-a)。DC-CTL 細胞は、がん抗原をパルスした樹状細胞と末梢血リンパ球を約 1 週間共培養し、その後固相化した抗 CD3 抗体及び IL-2 で増殖させる方法で培養した(図 3-b)。DC-CTL 細胞を選択した症例では、樹状細胞としては末梢血単球から GM-CSF と IL-4 を用いて分化させた未熟樹状細胞に、自己腫瘍由来のライセートまたは EBV 由来で患者の MHC の Class I に拘束性をもって CTL が誘導できることが *in vitro* で確認できているペプチドをパルスしてもちいた。

細胞表面抗原については、CD3, CD4, CD8, CD56, TCR gamma delta をフローサイトメトリーで解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は患者に対する十分な説明と同意の取得が行なわれて、実施されている。本研究は国際医療センター及び研究協力者である瀬田クリニックグループ倫理委員会によって各々承認されている。個人情報 は記号化することで個人の特長ができないよう配慮されるとともに、廃棄時には最大限の配慮のもと適切に処分されている。

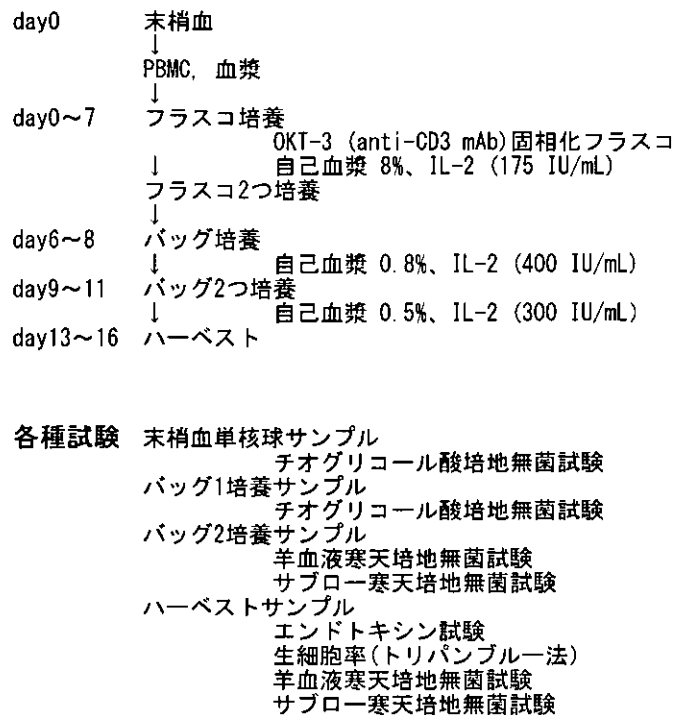


図 3-a. CD3LAK 培養法

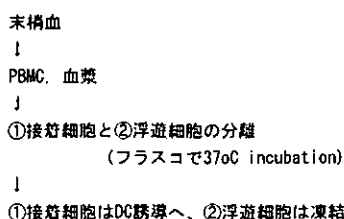
C. 研究結果

2004年2月18日までに、国立国際医療センターACCラボならびに研究協力施設である瀬田クリニック、新横浜メディカルクリニックにおいて、本研究対象となる HIV 感染者4名の治療用細胞培養及び品質検査が実施された。4名中2名は細胞培養期間中にご逝去される等の理由により、治療用細胞の投与は行なわれなかった。残りの2名は2004年2月18日時点で免疫細胞療法を実施中であり、細胞培養も継続中である。この2名はそれぞれ健常人の兄弟をもつ一卵性双生児であったため、健常人兄弟の血液から培養した細胞が治療用細胞として使用された。

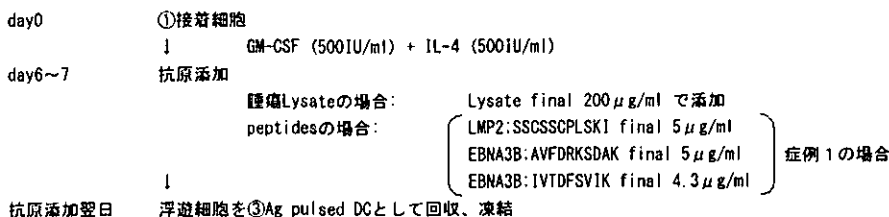
一卵性双生児患者の1名である症例1においては、CD3-LAK細胞を8回（平均 4.4×10^9 個、合計 3.48×10^{10} 個）と、DC-CTL細胞を12回（うち2回は糸状真菌コンタミネーションにより培養中止、平均 3.1×10^9 個、合計 3.07×10^{10} 個）の培養が行なわれ、投与間隔は2週間が基本とされた。（表1）。

細胞のフェノタイプは、CD3-LAK細胞とDC-CTL細胞どちらも99%以上がT細胞(CD3陽性)で、NK細胞(CD3陰性CD56陽性)は1%未満であった。またT細胞サブセットに関しては、T細胞中のCD4陽性CD8陰性T細胞率はCD3-LAK細胞で平均24.1%、DC-CTL細胞で平均26.3%であった。また、CD8陽性CD4陰性T細胞率はCD3-LAK細胞

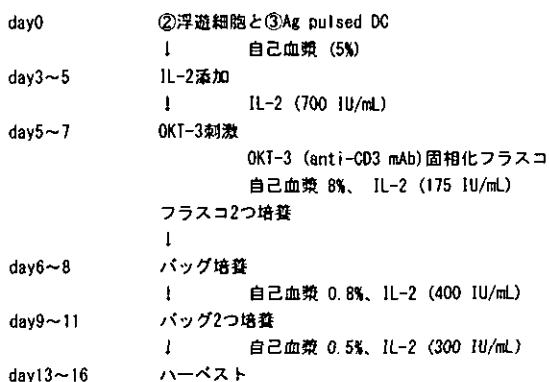
①接着細胞と②浮遊細胞の分離



①接着細胞からDC誘導



CTLの誘導



各種試験

- 末梢血単核球サンプル
- チオグリコール酸培地無菌試験
- DC用抗原サンプル
- 羊血液寒天培地無菌試験
- サブロー寒天培地無菌試験
- Ag pulsed DCサンプル
- 羊血液寒天培地無菌試験
- サブロー寒天培地無菌試験
- バッグ1培養サンプル
- チオグリコール酸培地無菌試験
- バッグ2培養サンプル
- 羊血液寒天培地無菌試験
- サブロー寒天培地無菌試験
- ハーベストサンプル
- エンドトキシン試験
- 生細胞串(トリバンプルー法)
- 羊血液寒天培地無菌試験
- サブロー寒天培地無菌試験

図3-b. DC-CTL培養法

で平均 62.5%、DC-CTL 細胞で平均 61.0%と、同等であった (t test $p > 0.2$)。

$\gamma \delta$ T 細胞に関しては CD3-LAK 細胞では 6.3 ~ 20.4 %であったのに対し、DC-CTL 細胞では 0.0 ~ 11.1 %となり、CD3-LAK 法による培養の際に $\gamma \delta$ T 細胞の割合が高くなる傾向にあった。

もう一名の一卵性双生児患者である症例 4 においては、CD3-LAK 細胞を 3 回 (平均 2.9×10^9 個、合計 0.86×10^{10} 個) の培養が行なわれた(表 2)。細胞のフェノタイプは、90%以上が CD3 陽性の T 細胞であり、10%未満の CD3 陰性 CD56 陽性 NK 細胞であった。T 細胞のフェノタイプは、CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞率が平均 37.8%、CD4 陰性 CD8 陽性 T 細胞率が平均 49.7%であった。

治療用細胞が投与に至らなかった 2 例 (症例 2,3) は、HIV 陽性の患者血液の培養であった。症例 3 は末梢血中に多数の異型細胞が観察されたケースであった。異型細胞は末梢血単核球画分細胞中の 50%程度を占め、T 細胞は 4.3%であった。また、CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞率は 2.0%、CD8 陽性 CD4 陰性 T 細胞率は 1.5%であった。この末梢血単核球画分細胞を 5 日間 CD3-LAK 培養した結果、5 日間の培養で総細胞数が 2 倍程度に増殖した。細胞集団のフェノタイプは、38%が T 細胞 (CD3 陽性)、2%が NK 細胞 (CD3 陰性 CD56 陽性)、60%が CD3 陰性 CD56 陰性の細胞であった。また、T 細胞サブセットに関しては T 細胞中の CD4 陽性 CD8 陰性 T 細胞率は 9.5%、CD8 陽性 CD4 陰性 T 細胞率は 20.9%であった。症例 3 では異型細胞の混入等の観察されない HIV 陽性患者血液を培養した。このケースでは末梢血単核球を 6 日間 CD3-LAK 培養し、20 倍程度まで増殖した。

D. 考察

治療用細胞を投与した 2 症例はいずれも一卵性双生児であり、健常人の兄弟血液を利用することができた。これにより、治療用細胞培養は HIV ウイルスの影響を考慮せずに実施された。

AIDS 患者の血液を使用した場合の治療用細胞培養に関しては、対象例が少なく、わずかな知見しか得られていない。しかし途中まで培養した 2 例の結果を考察すると、少なくとも HIV 陽性の患者血液からも CD3-LAK 細胞を増殖させることができることが示唆されたがその増殖効率は低かった。この原

因は HIV 患者では末梢血中の T 細胞の割合が低いこと、異型細胞が混在するなど健常人の末梢血中では観察されない細胞集団による影響であると推察されるが、HIV 患者由来の末梢血を用いても適用できる適切な培養技術の確立が課題である。この場合、B 細胞リンパ腫を併発した AIDS 患者血液から EBV に特異的な CTL が誘導可能であるかという免疫学的な問題と、培養によって HIV ウイルス量が増大するという可能性が考えられるので、培養技術の開発にはこれらの事を留意する事が大切であると考えられる。また、たとえ細胞培養に使用する血液が健常人由来であっても、がん抗原として患者本人の腫瘍組織を使用する場合には、HIV ウイルスの影響を検討する必要があると考えられるが、症例 1 では、患者本人の腫瘍組織ライセートをガン抗原として使用して DC-CTL 培養 (以下回数は書く必要ないと思います) を行っており、HIV ウイルスを含む腫瘍組織ライセートをパルスした DC を使用しても DC-CTL 細胞の増殖には余り顕著な影響はみられなかった。症例 1 の腫瘍組織ライセートを使用した DC-CTL 培養では、糸状真菌コンタミネーションにより培養中止となった例があるが、これは細胞を培養する環境由来のコンタミネーションである可能性が高かったためと考えられるので、治療用細胞の培養には安全性の確保が必須であり、GMP 準拠のハード・ソフト体制で培養を実施することが望ましい。HIV 陽性原料を使用する場合、ハードとして特に GMP 準拠の P3 クリーンルームが望ましい環境となるため、そのような施設整備も今後の課題である。

E. 結論

非常にまれな症例における免疫細胞療法に使用する細胞培養を実施することができた。HIV 陽性の血液を使用した細胞培養に関しては、対象症例が少なく、CD3-LAK 細胞を増殖させることができる可能性が示唆されるにとどまった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

表 1. 症例 1 の培養・解析結果

治療用細胞のフェノタイプ

	培養開始 PBL 数 (x 10 ⁷)	ハーベスト 細胞数 (x 10 ⁹)	表面抗原発現細胞率 (%)			
			CD3+	[CD3+gated] CD4+CD8-	[CD3+gated] CD8+CD4-	CD3-CD56+
CD3LAK①	0.5	4.7	99.5	28.4	59.6	0.4
CD3LAK②	1.1	4.8	99.7	24.5	61.2	0.1
CD3LAK③	0.7	4.7	99.4	23.5	64.2	0.1
CD3LAK④	1.0	3.8	99.0	27.9	58.0	0.2
CD3LAK⑤	0.9	4.3	99.6	24.6	53.3	0.1
CD3LAK⑥	1	4.4	99.4	22.7	64.3	0.1
CD3LAK⑦	0.8	4.2	99.2	19.4	71.4	0.2
CD3LAK⑧	0.7	3.9	98.8	21.6	67.7	0.1
DC-CTL①	1.1	3.6	98.7	27.8	58.9	0.6
DC-CTL②	糸状真菌のコンタミネーションにより中止					
DC-CTL③	1.3	2.4	98.8	24.2	63.8	0.4
DC-CTL④	1.3	2.7	98.4	25.9	60.9	0.2
DC-CTL⑤	糸状真菌のコンタミネーションにより中止					
DC-CTL⑥	1.5	3.1	99.3	19.7	43.0	0.2
DC-CTL⑦	1.1	3.5	99.7	38.1	50.3	0.2
DC-CTL⑧	0.4	2.2	99.0	38.7	52.4	0.4
DC-CTL⑨	0.6	3.5	99.7	13.9	75.9	0.1
DC-CTL⑩	0.6	3.6	99.7	34.9	54.9	0.2
DC-CTL⑪	0.8	3	99.7	14.6	79.5	0.1
DC-CTL⑫	0.6	3.1	99.7	25.2	70.2	0.1

治療用細胞に用いられたドナーの末梢血リンパ球のフェノタイプ

PBMCの使用先	リンパ球 (%)	表面抗原発現細胞率 (%)			
		[lymphocyte gated] CD3+	[CD3+gated] CD4+CD8-	[CD3+gated] CD8+CD4-	[lymphocyte gated] CD3-CD56+
CD3LAK①~④	48	69.5	58.4	34.7	9.2
CD3LAK⑤~⑧	71	69.0	62.2	32.9	6.4
DC-CTL①~⑤	90	85.0	62.4	32.5	7.6
DC-CTL⑦~⑫	89	88.3	65.6	30.2	8.6

DC-CTL法に用いた樹状細胞 (DC) 数

DC	DCの使用先	培養開始PBMC数 (x 10 ⁷)	DC細胞数 (x 10 ⁷)	抗原
DC①	DC-CTL①~⑤	23	3.8	tumor lysate 200 μg/mL
DC②	DC-CTL⑦~⑫	17	3.2	ペプチド (LMP2 SSCSSCPLSK) 5 μg/ml, EBNA3B AVFDRKSDAK 5 μg/ml, EBNA3B IVTDFSVYK 4.3 μg/ml

表 2. 症例 4 の培養・解析結果

治療用細胞のフェノタイプ

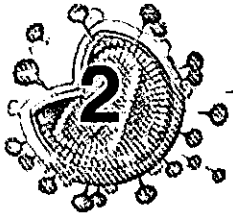
	培養開始 PBL 数 (x 10 ⁷)	ハーベスト 細胞数 (x 10 ⁹)	表面抗原発現細胞率 (%)			
			CD3+	[CD3+gated] CD4+CD8-	[CD3+gated] CD8+CD4-	CD3-CD56+
CD3LAK①	1	3.8	97.0	30.1	59.3	2.6
CD3LAK②	0.6	2.7	93.9	43.9	40.5	5.1
CD3LAK③	0.6	2.1	89.2	39.3	49.4	9.8

治療用細胞に用いられたドナーの末梢血リンパ球のフェノタイプ

PBMCの使用先	リンパ球 (%)	表面抗原発現細胞率 (%)			
		[lymphocyte gated] CD3+	[CD3+gated] CD4+CD8-	[CD3+gated] CD8+CD4-	[lymphocyte gated] CD3-CD56+
CD3LAK①~③	76	59.1	67.5	25.5	18.8

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 |



免疫療法に関する臨床応用

分担研究者：立川 夏夫（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター室長）

研究協力者：菊池 嘉、照屋 勝治（国立国際医療センターエイズ治療・研究開発センター）

研究要旨

強力な抗 HIV 療法が登場して HIV・AIDS 患者の予後が劇的に改善した現在においても、悪性リンパ腫の治療は困難である。通常は CHOP 療法（またはその変法である EPOCH 療法）で治療されるが、実際には長期予後は 10%前後である。

強力な抗 HIV 療法登場後の非常に重要な日和見疾患がこの悪性リンパ腫である。図 1 に示すように当センターでの HIV 感染者の死亡例において悪性リンパ腫は非常に重要である。

免疫細胞療法は通常の癌での有効性はほとんどないが、移植後悪性リンパ腫は免疫細胞療法の代表的な適応疾患である。移植後悪性リンパ腫とは、骨髄移植患者において移植時にドナーの T 細胞を除去した場合などに多い。T 細胞除去のドナー骨髄では GVHD の合併率は減る。しかし、本来免疫的には防御として働く T 細胞を除去するため、ドナー輸注細胞中に含まれた EBV 潜伏感染 B 細胞が免疫学的監視を逃れて活性化される。これが移植後悪性リンパ腫の原因と考えられている。この移植後悪性リンパ腫に対して、ドナー PBMC、またはドナー PBMC からの EBV に対する CTL の輸注が治療方法として確立している。この移植後悪性リンパ腫と AIDS 悪性リンパ腫は EBV の III 型潜伏感染としての共通の性格を持つと考えられている。ここに免疫細胞療法の可能性がある。しかしこの可能性は、AIDS 悪性リンパ腫の多クローンの存在に左右される。多クローン内により悪性度の高い（即ち EBV 感染には依存しない）悪性細胞がどの程度存在するかに影響されることが予測される。

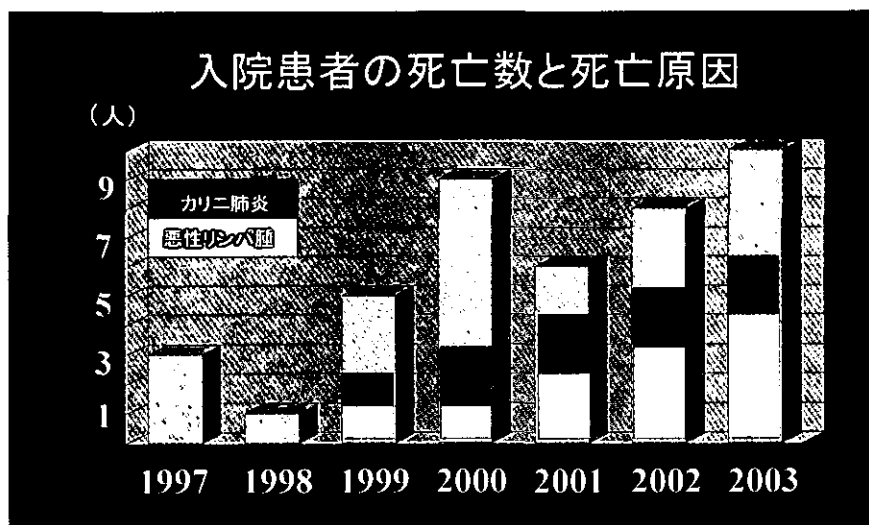


図 1. 当センターでの HIV 感染者の死因に占める悪性リンパ腫の割合