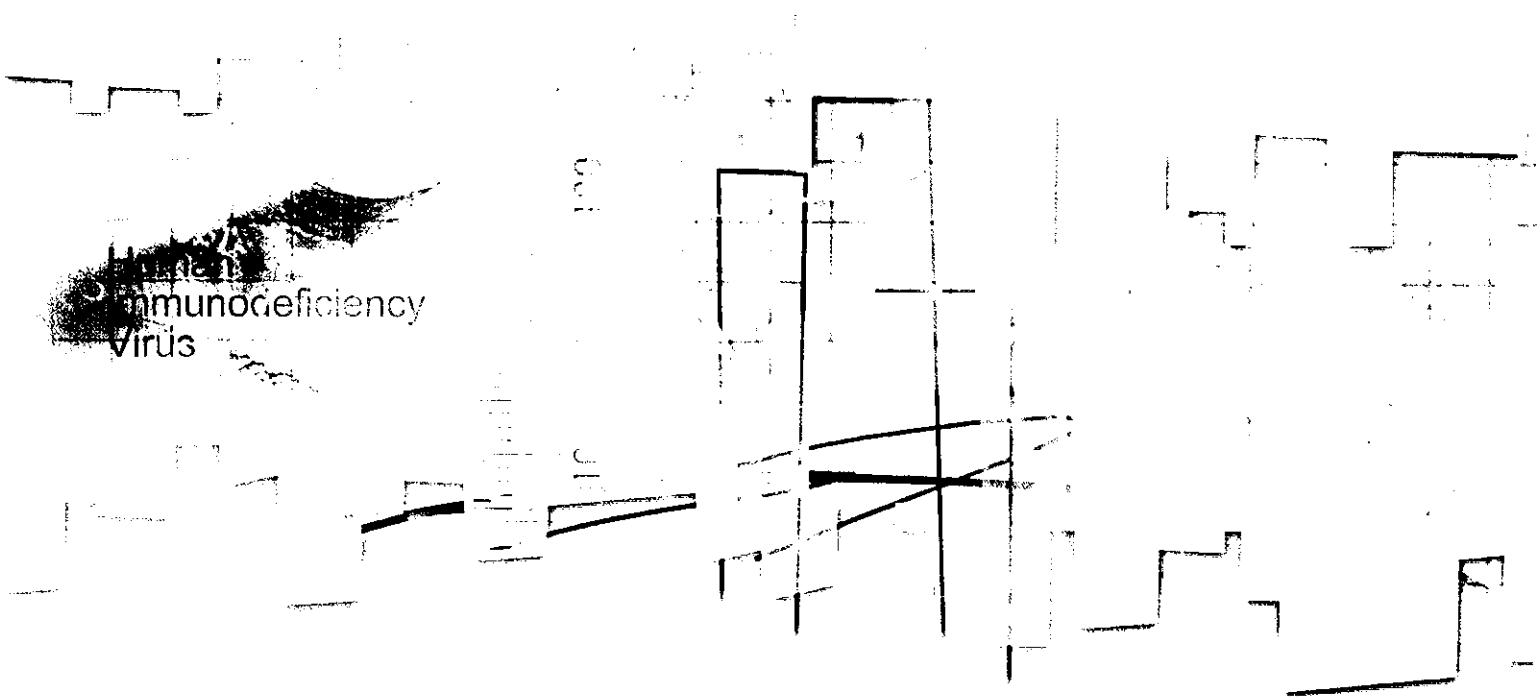


厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業
平成16年度総括・分担研究報告書

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17(2005)年3月

平成 16 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 16 年度 総括・分担研究報告書－

主任研究者 岡 慎一

平成 17(2005)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が、治療が長期にわたるという点からいくつかの課題は残されている。当班では、これら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、研究を行っている。

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

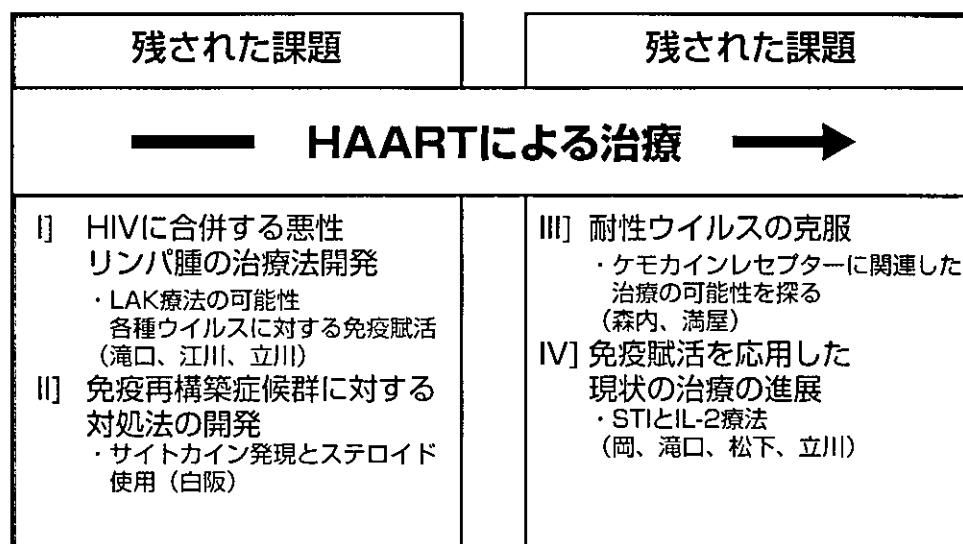
柱3：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服

柱4：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

当班の研究は2年目を迎え、いくつかの興味深い進展が見られた。

柱1では、抗原提示能の強い成熟樹状細胞を皮内投与することで、EBV抗原に特異的に反応する γ -IFN産生細胞が体内で確認された。柱2では、防御免疫において γ -IFN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が、はっきりとした結果を得られなかった。柱3では、本研究の意義として臨床試験段階にあるAK602のより詳細な基礎的データの蓄積がなされたことに加えて、生体への影響の少ない新たな薬剤開発のための新たな知見が得られた。柱4では、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。有効なHAARTの継続により、自己由来HIVに対する液性免疫応答が回復する症例では、ヘルパーT細胞反応の再構築も認められる場合が多い。一方、HIVに対するヘルパーT細胞は制御性T細胞の反応で抑制されている例が認められた。

研究班の概念図(平成15年-17年)



このように、柱1、柱3、柱4の研究は、すべて新しい治療法を模索する研究であるにもかかわらず、ほぼ予定通り進行しており、今後の治療法の発展に寄与することが期待できる。柱2については、もう一度綿密な計画の立て直しが必要であると考えられる。今回の研究が進行することにより、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開発が期待できる。

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 | 取締役 |
| 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 | 国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター | センター長 |
| 満屋 裕明 | 分担研究者 | 熊本大学医学部 免疫病態学内科学第二 | 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 新興感染疾病病態制御学系 | 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

| | |
|-------------------------------------|---|
| エイズに併発した悪性リンパ腫に対する免疫細胞療法の臨床応用 | 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 取締役）
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 医療情報室長）
研究協力者：後藤 重則（瀬田クリニック 院長）
井田 節子（株式会社メディネット 分子免疫学研究所 研究員）

| | |
|------------------------------------|----|
| 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 | 17 |
|------------------------------------|----|

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 | 23 |
|-----------------------------|----|

分担研究者：白阪 琢磨（国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター センター長）
研究協力者：上田 千里（国立病院機構大阪医療センター 免疫感染症科医長）
上平 朝子（国立病院機構大阪医療センター 免疫感染症科医長）
山本 善彦（国立病院機構大阪医療センター 臨床研究部免疫感染研究室員）

| | |
|--------------------------------|----|
| ケモカインレセプターに影響しない侵入阻害剤の開発 | 27 |
|--------------------------------|----|

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）
研究協力者：松岡 雅雄（京都大学ウイルス研究所所属エイズ研究施設 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33

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 新興感染疾病病態制御学系 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 新興感染疾病病態制御学系 助手）

HAART における抗 HIV 免疫再構築に関する臨床研究43

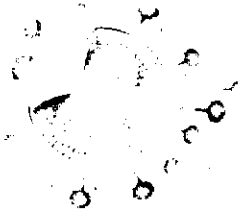
分担研究者：松下 修三（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 教授）
研究協力者：木村 哲也（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野）
濱本理恵子（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野）
吉村 和久（熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野）

Structured Treatment Interruptions(STI) による免疫療法.....51

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：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 情報室長）
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）
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 技官）
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 専門修練医）
山中ひかる（(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59

餘 歸 功 於 諸 君



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、

⁵(株)メディネット分子免疫学研究所、

⁶国立病院機構大阪医療センター HIV/AIDS 先端医療開発センター、

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、免疫賦活をキーワードとした 4 つの柱で新しい治療法を探索している。一つ目の柱である EBV を狙った免疫賦活療法は、EBV に対する免疫を強力に誘導する細胞の活性化法と投与方法を見いだすことができた。二つ目の柱である免疫再構築に対する対処法の検討は、種々のサイトカインを IRS 前後で測定したが、一定の傾向は得られなかった。三つ目の柱である進入阻害剤の開発は、CCR5 の変動をもものともしない抗 HIV 効果を示すことが示された。特記すべきは、ヒトでの前期第 2 相試験で、強力に HIV を抑制したことである。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としての STI 終了後は、確かにウイルス量は抑えられるが、1 年から 18 ヶ月あたりでベースラインに近づいていた。この事実は、今後の治療ワクチンを考える上では非常に大きな発見である。さらに、長期未発症者の CTL の解析から、今後の治療ワクチンの候補となりうる HLAB51 拘束性のエピトープを見いだした。

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ふ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

昨年の 1 例目に続き、2 例目の一卵性双生児の悪性リンパ腫 HIV 患者に対して、化学療法に免疫療法を併用した（立川）。免疫療法は、以下の 3 つの方法を順次試みた。① LAK、②ペプチド刺激 CTL + DC、③ペプチド刺激 CTL + DC（成熟型：IL-6、IL- β 、TNF- α 、PEG2 を使用）であり、特に

③は DC の分化・成熟に関して②より優れた方法を採用した。効果判定の補助として、テトラマーを用いた EBV 特異的 CD8T 細胞の検出と（滝口）、ELISPOT 解析を行った（江川）。

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)と確定した 5 例の患者血清中のサイトカインパターンを解析を PCP 初発症時早期、HAART 開始時、及び IRS 発症症例では IRS 治療前後の血漿中 γ -IFN 濃度を当院保存血漿を用い ELISA 法により測定した（白阪）。

柱 3：耐性ウイルスの克服

AK602(CCR5 アンタゴニスト:spirodiketopiperazine 誘導体)の作用機序の解析を目的として CCR5 阻害剤の ³H ラベル体作製および CCR5 の各ドメインに変異を加えた変異 CCR5 発現細胞株を作製、更に ¹²⁵I ラベル化されたケモカイン (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) を用いて野生株・変異 CCR5 との結合能や CCR5 阻害剤とケモカインとの相互作用の検討を行なった。また、分子構造解析機器 (SYBYL) を用いた構造モデリングの手法により CCR5 の構造的解析を行った。更に変異 CCR5 とケモカイン・CCR5 阻害剤との結合能の変化のデータを元に、これらと CCR5 との結合様式の解析を進めた（満屋）。一方 CCR5 ligands が潜伏した HIV の再活性化に及ぼす影響を検討するため、HARRT によりウイルスが検出限界以下となった患者の PBMC (CD8-depleted, CD8+CD14-depleted) 培養において RANTES (CCR5 agonist)+少量の抗 CD3 抗体の刺激がウイルス発現を促すかどうかを評価した（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（岡）。これらの例において、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）。長期 HAART 療法にてウイルス抑制が持続できている症例において、自己の分離株に対する中和抗体活性を経時的に検討した。HIV 特異的 T 細胞反応は、末梢血単核球を HIV 抗原で刺激後の細胞内サイトカイン産生を FACS 解析した。制御性 T 細胞のマーカーである Foxp3 はリアルタイム PCR で測定した（松下）。将来的な免疫療法への基礎検討として、長期未発症者である HLAB51 保有者について、CTL を解析した

（滝口）。

（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

2 例目 (Diffuse Large B-cell Lymphoma) の治療は、03 年 12 月 26 日より EPOCH 療法で開始し、05 年 1 月現在 CR (完全寛解) と判断されている。免疫療法は、ほぼ 2 週間隔にて 04 年 1 月末より① LAK (4 回)、②ペプチド刺激 CTL + DC (8 回)、③ペプチド刺激 CTL + DC (成熟型) (10 回) が投与された。初期には γ -IFN 産生細胞は 100 未満/100 万 PBMC であったが、③の投与 2 週間後には 2479 個/100 万 PBMC まで増加し、高値が持続している（立川、江川）。

柱 2：免疫再構築症候群に対する対処法の開発

IRS 発症した 1 例では未発症例に比べ、PCP 初発時の血中 γ -IFN 濃度は低値であった。しかし、他の症例については全例に一致した傾向を見いだせなかった（白阪）。

柱 3：耐性ウイルスの克服

AK602 は試験管内 (IC50:0.2nM) および動物モデル (huPBL-NOD-SCID マウス) の系でも強力な抗 HIV 活性を示した。また、AK602 は強力な CCR5 に対する結合親和性 (K_D 値: ~ 3 nM) を持ちながら、ケモカイン (RANTES) が CCR5 を介してもたらす生理的作用は完全には阻害しなかった。AK602 の CCR5 との結合は、既存の CCR5 阻害剤の結合部位とは異なり extracellular loop 2 とその直下の上部膜貫通ドメインに重要なアミノ酸のクラスターが形成されることがわかった（満屋）。この薬剤は、米国で臨床第 2 相試験の段階まできた。CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響の研究では、HARRT により潜伏状態にある HIV の CD8-depleted PBMC からの発現は刺激なしでは起こらず、少量の抗 CD3 抗体の刺激だけでは多くの場合不十分であった。しかし RANTES (CCR5 agonist)+少量の抗 CD3 抗体の刺激は、抑制されていたウイルスの再増殖を促すことが

ある。しかしこれらの効果は CD8+CD14-depleted P B M C ではみられなかったことから、monocytes/macrophages への作用がこれらの効果に不可欠であると考えられた（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、2005 年 1 月現在、15 例が治療を完遂、中断・脱落例 11 例である。完遂例では、3 ヶ月ごとの平均 HIV-RNA は、STI 終了後 2 年以上にわたり 10,000copies/ml 未満に抑えられていた（岡）。成功例では、CTL も誘導できていることが確認された（滝口）。慢性期患者で HAART により自己の HIV に対する中和活性の増加を認めた症例では、HIV 抗原に反応して IL2 や γ -IFN を産生する CD4 陽性 T 細胞の頻度が増加していた。HIV 感染症例では Foxp3 が非感染者に比較して高く、HIV 抗原に対する制御性 T 細胞活性に相関した（松下）。HLA-B*5101 拘束性 CTL のうち 2 つの Pol エピトープ特異的 CTL は、強い HIV-1 増殖抑制能と強い HIV-1 感染 CD4T 細胞に対する細胞傷害活性を示した。このエピトープは、3 人の LTNP で検出できたが、4 人の slow progressor では 1 つしか検出できなかった（滝口）。

D. 考察

柱1：抗原提示能の強い成熟樹状細胞を皮内投与することで、EBV 抗原に特異的に反応する γ -IFN 産生細胞が体内で確認された。この治療により EBV の体内での増殖を阻止し、B 細胞リンパ腫の進行を抑制する事が期待される。柱2：防御免疫において γ -IFN 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が、はっきりとした結果を得られなかった。柱3：本研究の意義として臨床試験段階にある AK602 のより詳細な基礎的データの蓄積がなされたことに加えて、生体への影響の少ない新たな薬剤開発のための新たな知見が得られたことが挙げられる。柱4：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。有効な HAART の継続により、自己由来 HIV に対する液性免疫応答が回復する症例では、ヘルパー T 細胞反応の再構築も認められる場合が多い。一方、HIV に対するヘルパー T 細胞は制御性 T

細胞の反応で抑制されている例が認められた。

E. 結論

当班の研究は、2 年目を迎え、各柱において大きな進展が見られた。

柱1では、有効な CTL を誘導できる細胞療法の投与法を見いだせたと思われる。柱3では、免疫系に影響しない侵入阻害薬が開発でき、米国で第2相試験まで進行したことの意義は非常に大きく、柱4においては、ほぼ最終段階にまできている。このように、先の3つの柱の研究においては、ほぼ予定通りの進行をしており、今後の発展に寄与することが期待できる。しかしながら、柱2では、2年目で予定していたレベルに検討症例数、検討内容とも到達できておらず、もう一度綿密な計画の立て直しが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

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

目 次

1

エイズに併発した悪性リンパ腫に対する免疫細胞療法の臨床応用

分担研究者：江川 滉二 ((株)メディネット 分子免疫学研究所 取締役)

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
医療情報室 室長)

研究協力者：後藤 重則 (瀬田クリニック)

井田 節子 ((株)メディネット 分子免疫学研究所)

研究要旨

AIDS 悪性リンパ腫に対する免疫細胞療法の基礎的検討が可能であった。特に、樹状細胞を成熟化させて投与する方法には効果が認められた。今後は一卵性双生児以外の通常例での方法の構築が必要と考えられた。

A. 研究目的

江川のグループが供給する免疫細胞を実際の AIDS リンパ腫の患者において使用し、その抗腫瘍効果を検討する。このことにより、現在非常に予後が不良である AIDS リンパ腫の治療法を開発する。

B. 研究方法

In vitro で誘導された免疫細胞の効果を判定するが、実際には、AIDS リンパ腫患者に対して集学的治療 (抗癌療法+抗 HIV 療法+免疫細胞療法) の一部として施行される。抗 HIV 療法は世界的なガイドラインに則って施行された。抗癌療法は院内の血液内科と緊密に連携をとりながら施行された。免疫細胞療法は江川グループと検討した細胞を使用した。

(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。

C. 研究結果・症例検討

1. 症例の臨床経過

症例は 33 歳男性。2000 年帯状疱疹を契機に HIV 陽性が判明 (感染リスクは MSM)。2001 年末腸結核を発症し 6 ヶ月間治療。2003 年 5 月より抗 HIV 療法 (AZT/3TC/NFV) を開始したが、嘔気・嘔吐などで、殆ど内服できなかった。2003 年 11 月下旬当センター転院。12 月はじめより、上腹部痛出現。上部消化管内視鏡で十二指腸下行脚に潰瘍を伴う隆起性病変が認められ、生検で悪性リンパ腫と診断された。

【検査所見】(2003/12/15)

<血算> WBC 3430/ μ l RBC444 $\times 10^4$ / μ l, Hb 12.5g/dl, Ht38.1 %, MCV 85.8fl, MCH 28.2pg, MCHC 32.8%, Plt21.1 $\times 10^4$ / μ l.

<生化> Alb 3.8 g/dl, T-Bil 0.2mg/dl, AST 18IU/l, ALT25 IU/l, LDH 154 IU/l, BUN 12.4mg/dl, Cr 0.64mg/dl, CRP 0.13mg/dl, sIL2 Rc884U/ml, β 2MG 2.7mg/L, TK 12.3U/L.

< HIV 関連検査 > (2003/11/28)

CD4 127/ μ l (12.3%), CD8 737/ μ l (71.4%), CD4/8 0.17, HIV-RNA 9.9 $\times 10^4$ copies/ml.

<その他感染症検査> geniQ-CMV <2 $\times 10^2$ copies/ml, geniQ-EBV 3 $\times 10^2$ copies/ml, geniQ-

HSV2×10^2copies/ml, geniQ-HHV8<math>< 2 \times 10^2</math>copies/ml. EBV VCA-IgG 640 ×, EBV EA-IgG 10 ×, EBV EBNA 20 ×.

< HLA > A 0207/2402, B 4601/3701, Cw 0102/0602, DRB1 0803/1001, DQB1 0601/0501

< 上部消化管内視鏡 2003/12/8 > 十二指腸下行脚に全周性の潰瘍を伴う隆起性病変。

#1 HIV 感染症 (AIDS)

ほぼ抗 HIV 療法は内服されておらず、抗 HIV 療法の再導入が必要な段階。CD4 数からは免疫低下が進行した状態。

#2 悪性リンパ腫 (NHL PS 0, stage IV BE, Diffuse Large B cell CD20+, EBV + ?)

病理：病理組織検査 (十二指腸潰瘍病変の生検)：厚い潰瘍底壊死組織のなかに核型不整な中型～大型異型細胞が孤立性に密に浸潤しており、悪性リンパ腫 (Diffuse Large B-cell Lymphoma) と診断された。CD20(+), CD3(-), CD30(-), bcl-2(+), EBER(-), LMP-1(-)。

病変部位：十二指腸。肝 (S4)、胃壁、骨髄 (判定不能)。

PS：0 (または 1)。LDH：正常値。60 歳以下。

以上より、Stage IV B で、International Prognostic Index 2 点 (low intermediate risk)。

EBV 関連事項：病理では EBER(-), LMP-1(-)、血液 EBVDNA 300 copies/ml。

【図 1】04 年 12 月腹部 CT 検査 参照

十二指腸下行脚部分は全周性に肥厚が認められ、最も腫瘍量の多い部分と考えられた。

注：本来外科的切除後に化学療法が望ましかったが、外科的侵襲性が高いことより、化学療法のみで

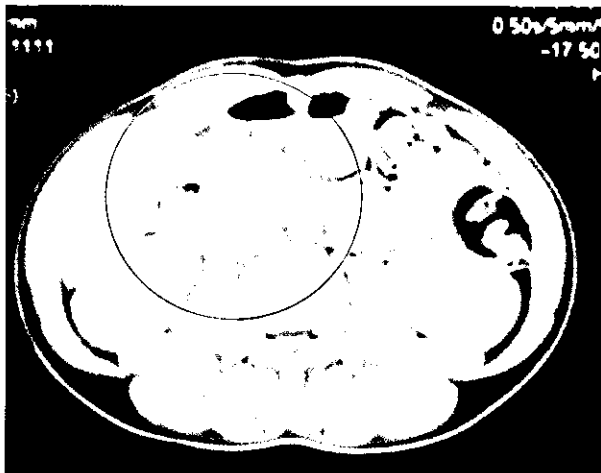


図 1. 04 年 12 月腹部 CT 検査

の治療となった。このため、一気に腫瘍量が低下することによる腹膜穿孔・穿通の可能性があり、初回の化学療法は rituximab を併用せず。

【図 2】04 年 12 月十二指腸 病理組織検査 参照

2. 治療経過

(1)化学療法 (R-EPOCH)

EPOCH 療法で開始し、抗 CD20 抗体 (Rituximab) を 2 クール目から併用。現在 CR と考えられる。

- ・ 1 回目：03 年 12 月 26 日より：EPOCH
- ・ 2 回目：04 年 1 月 19 日より：EPOCH + CD20 抗体 (先行投与)
- ・ 3 回目：04 年 2 月 13 日より：EPOCH + CD20 抗体 (先行投与)
- ・ 4 回目：04 年 3 月 5 日より：EPOCH + CD20 抗体 (先行投与)
- ・ 5 回目：04 年 4 月 2 日より：EPOCH + CD20 抗体 (先行投与)
- ・ 6 回目：04 年 4 月 23 日より：EPOCH + CD20 抗体 (先行投与)

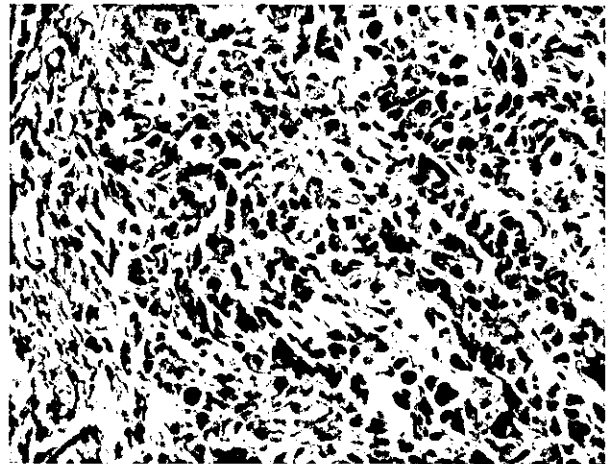


図 2-1. 04 年 12 月十二指腸 病理組織検査
×1000 HE 染色

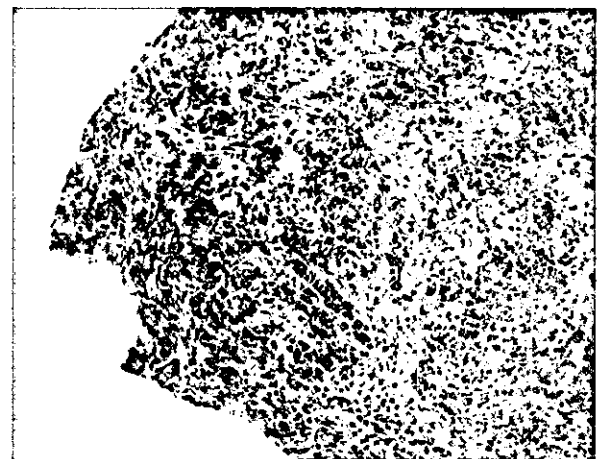


図 2-1. 04 年 12 月十二指腸 病理組織検査
×200 HE 染色

- ・ 7回目：04年5月21日より：EPOCH + CD20抗体（先行投与）
- ・ 8回目：04年7月23日より：EPOCH + CD20抗体（先行投与）
- 注1：化学療法による十二指腸穿孔の可能性もあり、初回は抗CD20抗体なしで治療。
- 注2：1、2回目は注1と同様の理由でCPAを50%減量。そのため7回目を追加投与。
- 注3：8回目は総抗がん剤量の補充と網膜病変にリンパ腫の可能性があったため投与。

【図3】臨床経過表-1 参照

(2)抗 HIV 療法

抗 HIV 療法は抗癌剤との相互作用が少ないことが想定される NFV/d4T/3TC を用いた。CD4 数は抗癌剤投与中には上昇は乏しかったが、抗癌剤投与終了後は順調な上昇を示した。血漿 HIVRNA 量は治療に反応し、検出感度（50 copis/ml）未満まで低下した。

【図4】臨床経過表-2 参照

(3)免疫療法

免疫療法の背景は、一卵性双生児の兄の存在であった。このため、免疫療法は一卵性双生児の兄の血液を加工して、免疫療法に使用した。免疫療法は以下の3つの方法を施行した。3つの方法は、患者の

状態・HLA 情報などに基づき、準備ができた順番で治療を開始した。

化学療法、抗 HIV 療法、免疫細胞療法の全体の経過は【図5】化学療法、抗 HIV 療法、免疫細胞療法の全経過に示した。

各免疫細胞療法が準備できた順番で以下の3種類の治療を投与した。

- ① CD3-LAK 細胞
- ② DC(1)+ peptideCTL(1) /peptideCTLOKT3(1)
- ③ DC(2)+ eptideCTL(2) /peptideCTLOKT3(2)

上記方法の培養法、投与回数、投与細胞数に関しては、下記【参考資料】免疫細胞療法の培養法を参照。DC(1)とDC(2)を比較すると、DC(2)の方がより成熟が期待された。

これら細胞免疫療法の効果判定としては、腫瘍病変の変化が最も有効であるが、腫瘍に関しては化学療法が有用であったと考えられる。このため、今回は surrogate マーカーとして「ELISPOT 解析」を施行した。これは、免疫細胞投与後のリンパ腫患者より採血し、そのPBMC中の各種ペプチドに対するIFN- γ 産生で判定したものである。今回は、前述EBVのペプチドを使用した。

この結果より、04年6月のDC(2)+ eptideCTL(2) /peptideCTLOKT3(2)より顕著な上昇が認められている。

【図6】ELISPOT 解析 参照

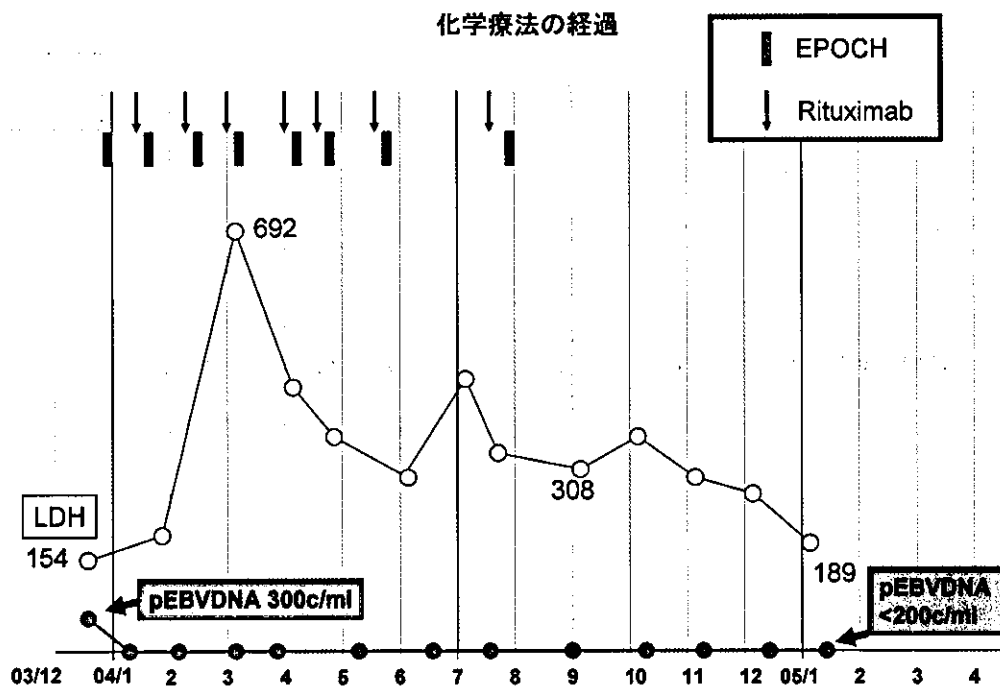


図3. 臨床経過表-1

化学療法 + 抗HIV療法の経過

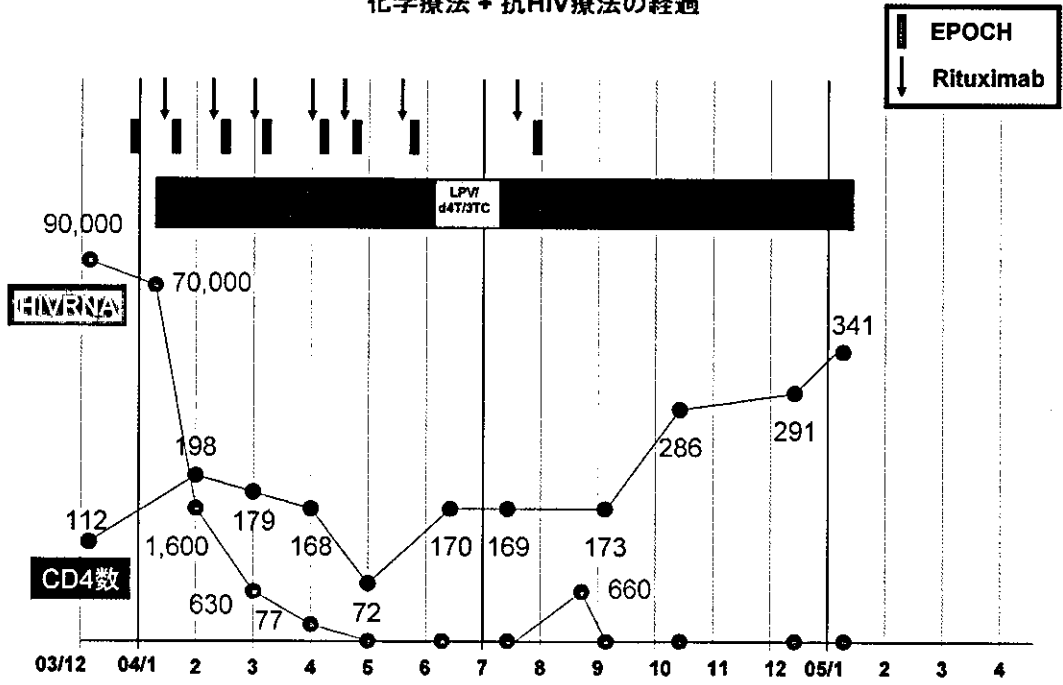


図 4. 臨床経過表-2

化学療法 + 抗HIV療法 + 免疫療法の経過

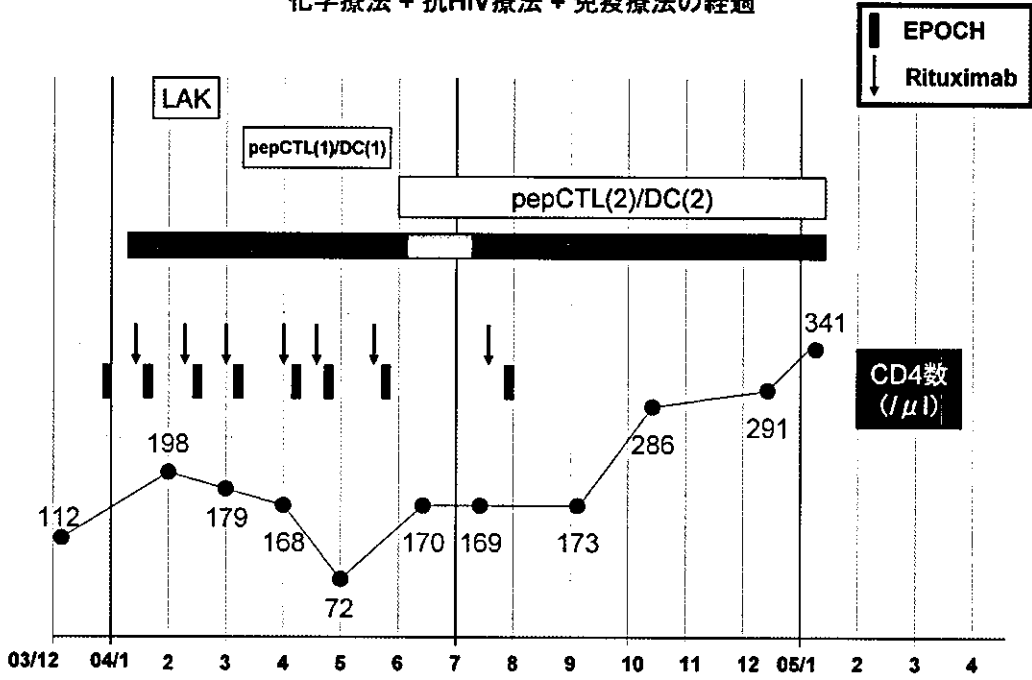
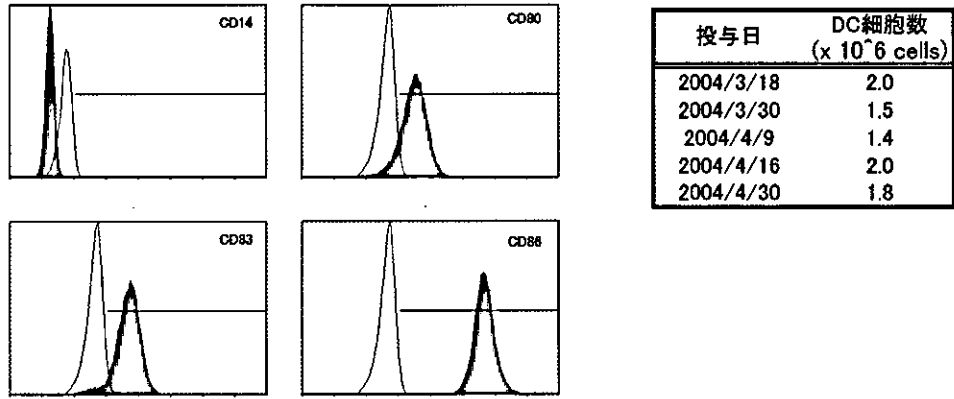


図 5. 化学療法、抗 HIV 療法、免疫療法の全経過

DC-1



DC-2

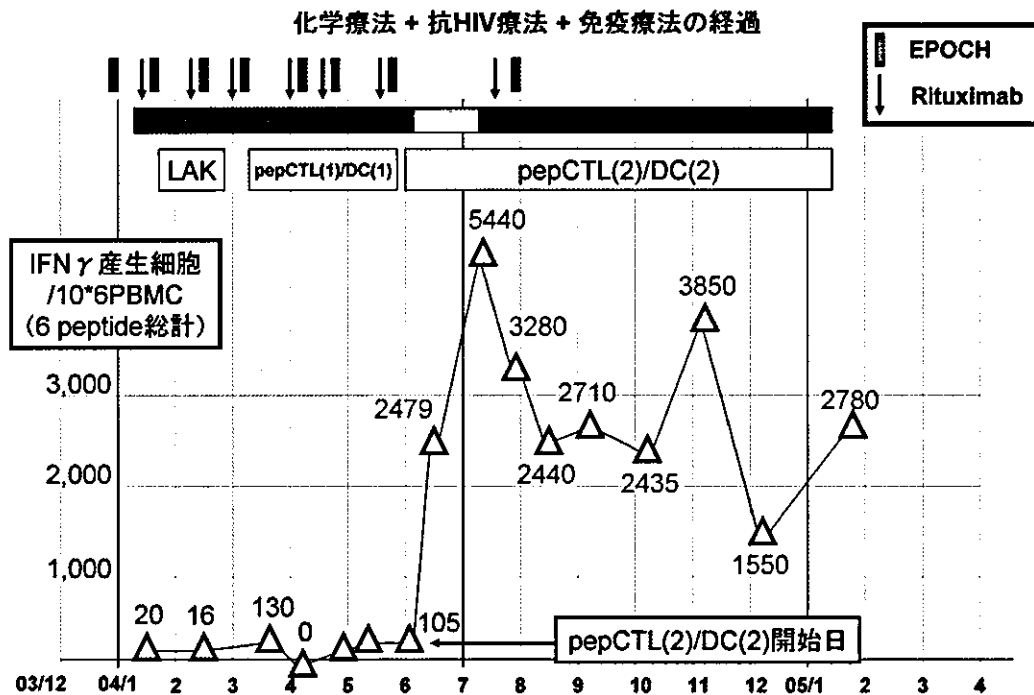
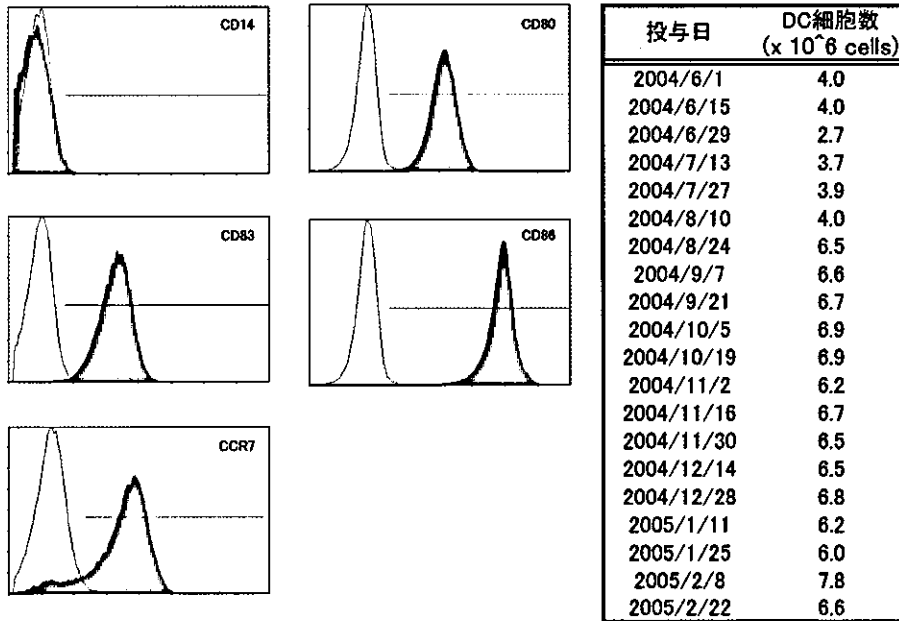


図 6. ELISPOT 解析

D. 考察

本年度の成果は、「現時点での免疫細胞療法の最も有効な方法の確立」が可能であったことである。それは 2004 年 6 月 1 日以降に投与された方法であり、peptideCTL (2) /peptideCTLOKT3 (2) + DC(2)と示した方法である。特に DC(2)では①各 EBV-peptide を別々に培養し、②DC の培養条件を GM-CSF 500U/mL、IL-4 500U/mL、TNF α 1ng/mL、PGE2 100ng/mL に加えて IL-6 100U/mL、IL- β 10ng/ml、(更に TNF α 10ng/mL、PGE2 1 μ g/mL と各投与量を増加させ)、③DC に対する EBV-peptide の刺激のタイミングを IL-6、IL- β 、TNF α 、PGE2 投与後にしたこと、④患者への投与方法として皮下注射を実施したこと、などが改良点であった。

投与細胞には DC 細胞のみでなく、peptideCTL / peptideCTLOKT3 細胞も投与された。実際の患者内で投与後 2 週間目に検出された EBV peptide specific CD8 細胞が、この *in vitro* で増殖させた CD8 細胞なのか、患者体内で *in vivo* に DC \rightarrow CD8 細胞と刺激が機能し、*in vivo* にて増殖された CD8 細胞なのかの判定は判別できてはいない。Donor と recipient が HLA が相同であるためである。

今回の研究は、方法論の確立という側面と、実際の患者の治療という側面が 2 重に進行しており、ひとつひとつを解析するには情報が不足している。しかし、これまでの 2 例の検討にて、更に解析すべき指標が明らかになった。即ち、①DC を中心とした「細胞免疫療法」の有効性を単独で確認すること、②非一卵性双生児での検討、③ background data としての健常人、HIV 患者、AIDS 患者での上記方法の検討、等である。

E. 結論

第 2 症例にては当センターで始めて内科的治療のみで AIDS 悪性リンパ腫の CR (完全寛解) に至ることが可能となった。腫瘍量は多く臨床病期は進行していたが、有効な化学療法+抗 CD20 抗体療法+抗 HIV 療法+免疫細胞療法により救命可能であったと考えられる。

今回の症例では、EBV が悪性腫瘍成立にどれだけ関与しているかは不明であるが、免疫細胞療法に関しての方向性は示されたと考えられる。

①化学療法中の免疫細胞療法は有効性が低い。

②試みた免疫細胞療法の方法としては、DC(2)+ peptideCTL(2) /peptideCTLOKT3(2)の方法が有用であること。

今後は、免疫細胞療法をより通常の HIV 患者 (一卵性双生児ではない例) に適応するための方法の開発を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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 |

参考資料

【免疫細胞療法の培養法】

(1) EBV-peptide は HLA A2402 に対応した peptide で 6 種類使用した

| | |
|--------|------------|
| LMP2 ① | TYGPVFMCL, |
| LMP2 ② | TYGPVFMSL, |
| BRLF1 | TYPVLEEMF, |
| BMLF1 | DYNFVKQLA, |
| EBNA3A | RYSIFFDYM, |
| EBNA3B | TYSAGIVQI |

(2)CD3-LAK

- Day 0 : PBMC 培養開始。KBM400 液 50ml で開始。OKT3 固相化 T225 フラスコ、IL-2 175 IU/L、自己血漿 8% で培養。
- 細胞増殖に合わせて KBM400 液 400ml (IL-2 175 IU/L、無血清) まで scale up。
- カルチャー・バック培養 (Hymeduum930 1L バック、自己血漿 0.8%)。
- Day 13 ~ 16 (ハーベスト) : CD3LAK として細胞浮遊液 100ml 点滴 (静注) とする。
- 04/1/27 投与分例。
総投与 LAK 細胞数 : 3.8×10^9 細胞。
全体細胞中、CD3(+)細胞は、85.8% (3.26×10^9 細胞)。
全体細胞中、CD3(+)CD4(+)細胞は、25.8% (0.98×10^9 細胞)。
全体細胞中、CD3(+)CD8(+)細胞は、50.9% (1.93×10^9 細胞)。
- EBV 抗原ペプチドを準備する期間中に 4 回 (平均 3.0×10^9 細胞、合計 1.18×10^{10} 細胞) 用いた。

(3)peptideCTL(1) /peptideCTLOKT3(1)

- DC(1)時に凍結した非接着細胞を解凍して使用。
- Day 0 : 解凍浮遊 PBMC 培養開始。2 ~ 4×10^7 細胞を T75 フラスコで培養。AIM-V20ml (IL-2 100 IU/L、自己血漿 10%) を加え培養。EBV-peptide を各 $2 \mu\text{g/ml}$ で投与。
- 細胞増殖に合わせて AIM-V20ml 添加しながら scale up。
- Day 7 : 非接着細胞 (peptideCTLOKT3) と接着細胞 (peptideCTL) に分けて培養。

- 非接着細胞 : OKT3 固相化 T225 フラスコ、IL-2 175 IU/L、自己血漿 8% で培養。
- 非接着細胞 : 細胞増殖に合わせて、KBM400 (IL-2 100 IU/L) 添加しながら scale up。
- 非接着細胞 : カルチャー・バック培養 (自己血漿 0.8%)。
- 非接着細胞 : Day 15 ~ 21 (ハーベスト A)
- 接着細胞 : 接着細胞を KBM400 (IL-2 100 IU/L、自己血漿 8%) 添加しながら培養継続。
- 接着細胞 : 細胞増殖に合わせて、KBM400 (IL-2 100 IU/L) 添加しながら scale up。
- 接着細胞 : カルチャー・バック培養 (自己血漿 0.8%)。
- 接着細胞 : Day 15 ~ 21 (ハーベスト B)
- ハーベストは、ハーベスト A + ハーベスト B で細胞浮遊液 100ml 点滴 (静注) とする。
- 細胞組成は、T 細胞 (CD3⁺、平均 93.5%) と NK 細胞 (CD56⁺ CD3⁻、平均 5.9%) から構成されるリンパ球集団であった。EBV 抗原ペプチド特異的 CD8⁺T 細胞は、MHC テトラマー解析によって特に BRLF1 (0.00% - 1.38%、平均 0.2%)、EBNA3A (0.01% - 3.20%、平均 0.3%)、EBNA3B (0.02% - 9.57%、平均 0.3%) に特異的 CD8⁺T 細胞が比較的高頻度で検出されたが、培養ごとのばらつきが顕著であった。
- 全体 : 28 回、平均 4.3×10^9 細胞、合計 1.2×10^{11} 細胞を用いた。

(4)peptideCTL(2)/peptideCTLOKT3(2)

- peptideCTL(1) + peptideCTLOKT3(1) と基本的に同じ方法。
- 2004 年 6 月 1 日以降に 20 回投与された。

(5)DC(1)

- 末梢血 440ml より PBMC を T75 フラスコ (AIM-V20ml) \times 6 枚で 2 時間培養。
- 接着細胞は DC(1)に使用。非接着細胞は一旦凍結し peptideCTL + peptideCTLOKT3(1)に使用。
- Day 0 : 接着細胞を T75 フラスコ \times 6 枚で培養。GM-CSF 500U/mL、IL-4 500U/mL 加えて培養。5 日間。
- Day 5 : 抗原添加。EBV-peptide を各 $2 \mu\text{g/ml}$ で投与。
- Day 6 : TNF α 1ng/mL、PGE2 100ng/mL で培養。