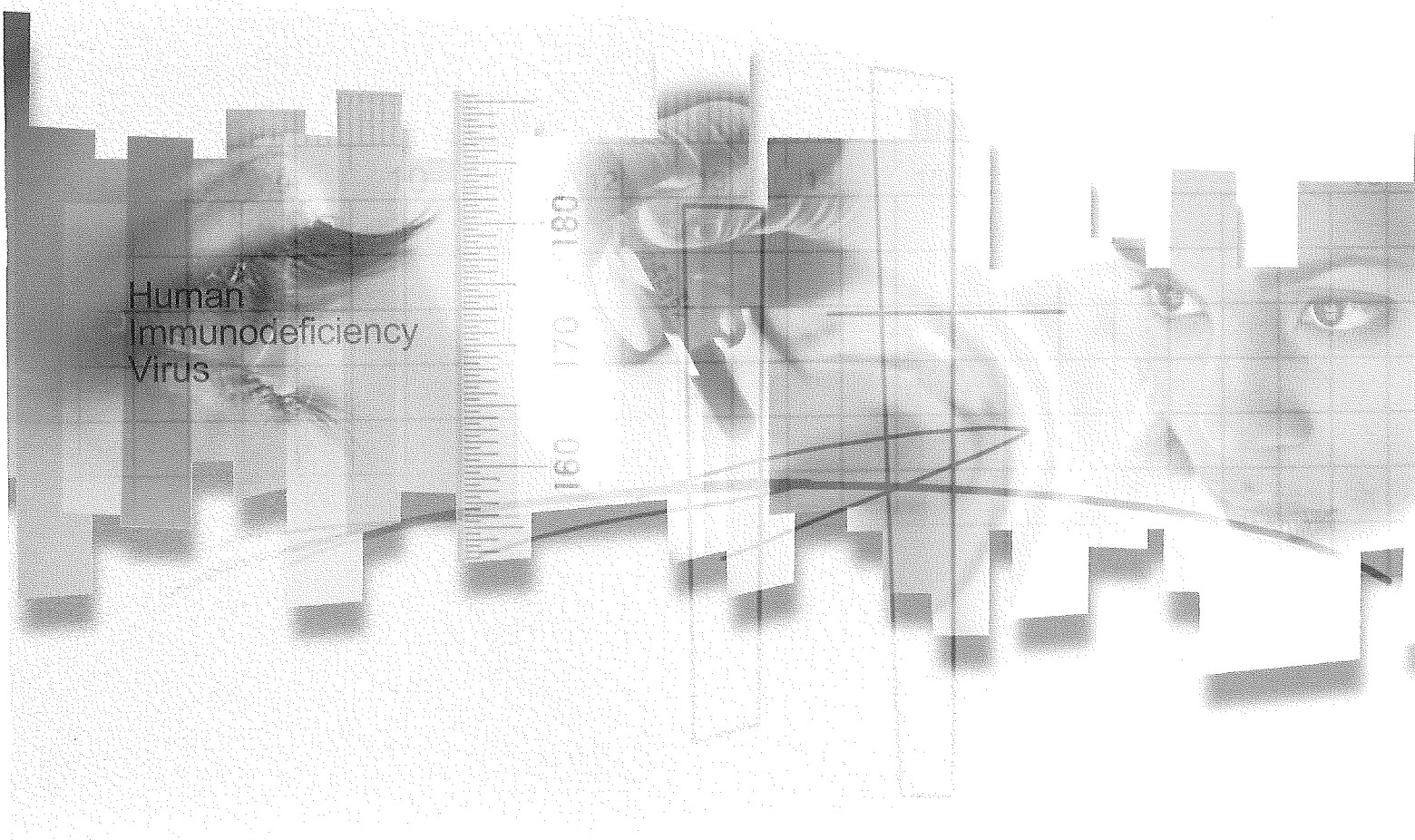


厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業  
平成17年度総括・分担研究報告書

# 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18(2006)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)

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）

我々の班は、HAART時代の HIV 感染症における種々の課題につき「免疫賦活」というキーワードで、研究を行ってきました。今年は、3年目最後の年になります。分担研究者のご努力によりいくつかの興味深い進展が見られました。

## 1. エイズに伴う悪性リンパ腫に対する免疫細胞療法（江川、立川）

エイズ患者に対しても EBV に対する CTL を強力に誘導する細胞の活性化法(DC ワクチン)を見いだすことができました。その効果は、DC 投与終了後少なくとも 8 ヶ月間 CTL が維持されていました。そのレベルは、他の HIV 感染者のレベルより優位に高値でしたが、この CTL は EBV を完全には抑え切れていませんでした。

## 2. CCR5 をいじるとどうなるか？（満屋、森内）

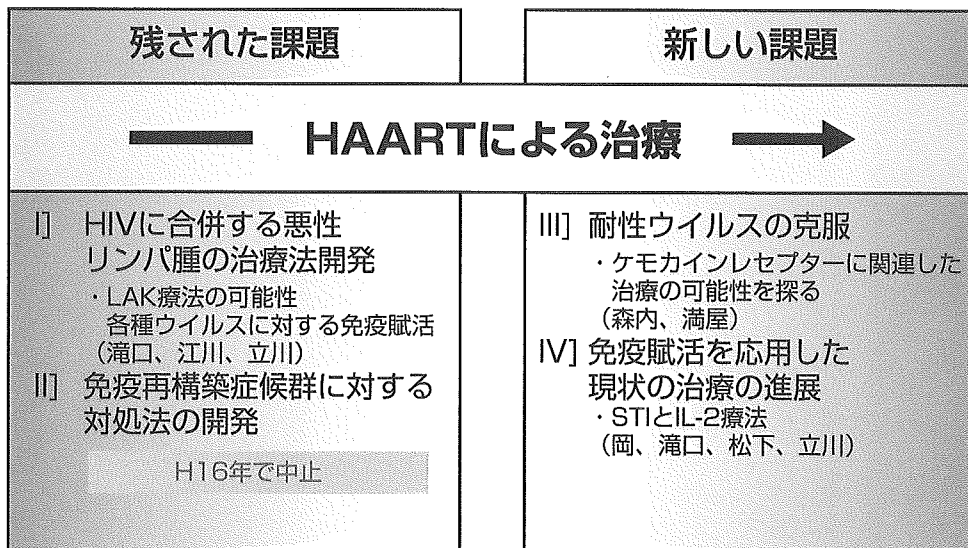
CCR5 の発現は、日内変動や種々の刺激により変化することがわかりました。感染症の併発を繰り返すことや、CCR5 agonists による抗 HIV 療法は、X4virus を誘導する可能性のあることが示されました。今回の研究で CCR5 阻害薬の候補品が発見され、第 2 相試験まで進みました。今回の物質は、副作用で中止となりましたが、CCR5 阻害剤開発が可能であることを示しました。今回の研究より CCR5 とケモカインの相互作用と HIV の細胞内侵入に関わる CCR5 の役割についての理解の基礎が得られました。

## 3. 急性 HIV 感染者に対する STI 療法（岡、田沼、滝口）

急性期の感染者に対し 5 回の中断を計画的に行った臨床研究は、世界でも行われておりません。STI 終了後は、確かにウイルス量は抑えられるようですが、1 年から 18 ヶ月あたりでベースラインに近づいていきます。この機序を繊細に解析すると、escape mutant が出現し CTL から逃避していました。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となります。

## 4. 慢性感染期における免疫再構築（松下）

治療用の中和抗体でも escape mutant が問題となりました。しかし、escape mutant は、CCR5 inhibitor に対する感受性が高まり、併用により synergistic effect が得られました。また、免疫を妨害する制御性 T 細胞の存在も確認されました。



---

## 5. 細胞性免疫応答の解析（滝口）

長期未発症者の CTL の解析から、今後の治療ワクチンを考える上で非常に有望と思われる HLAB51 拘束性のエピトープが見いだされました。今後の治療への応用についての研究が期待されます。

## 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
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
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
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
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
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

---

## 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 取締役）

免疫療法に関する臨床応用 .....	13
--------------------	----

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）

免疫療法による各種ウイルスに対する細胞性免疫応答の解析 .....	19
-----------------------------------	----

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）

ケモカインレセプターに影響しない侵入阻害薬の開発 .....	25
--------------------------------	----

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.....31

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）

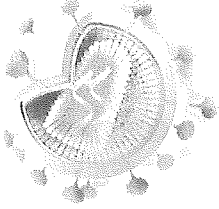
HAART 下における抗 HIV 免疫再構築に関する臨床研究.....37

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）

STI による免疫療法.....43

分担研究者：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）

# 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<sup>1</sup>、松下 修三<sup>2</sup>、森内 浩幸<sup>3</sup>、満屋 裕明<sup>4</sup>、  
江川 滉二<sup>5</sup>、立川 夏夫<sup>6</sup>

<sup>1</sup>熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野 教授、

<sup>2</sup>熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野 教授、

<sup>3</sup>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、

<sup>4</sup>熊本大学医学部 免疫病態学内科学第二 教授

<sup>5</sup>(株)メディネット 分子免疫学研究所 取締役、

<sup>6</sup>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：矢崎 博久、源河いくみ、上田 晃弘、阿部 泰尚、恩田 順子、  
横田 恭子、中野 彰子、高野 操、石坂美千代  
(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

HAART時代のHIV感染症における種々の課題につき「免疫賦活」というキーワードで、研究を行ってきた3年目である。エイズに伴う悪性リンパ腫に対する免疫細胞療法では、エイズ患者に対してもEBVに対するCTLを強力に誘導する細胞の活性化法(DCワクチン)を見いだすことができた。CCR5に関する研究では、感染症の併発を繰り返すことや、CCR5 agonistsによる抗HIV療法は、X4virusを誘導する可能性のあることが示された。今回の研究よりCCR5とケモカインの相互作用とHIVの細胞内侵入に関わるCCR5の役割についての理解の基礎が得られた。急性HIV感染者に対するSTI療法では、STI終了後は、確かにウイルス量は抑えられていたが、1年から18ヶ月あたりでベースラインに近づいていた。この機序を繊細に解析すると、escape mutantが出現しCTLから逃避していた。慢性感染期における免疫再構築では、治療用の中和抗体でもescape mutantが問題となった。しかし、escape mutantは、CCR5 inhibitorに対する感受性が高まり、併用によりsynergistic effectが得られた。細胞性免疫応答の解析の研究では、長期未発症者のCTLの解析から、今後の治療ワクチンを考える上で非常に有望と思われるHLA B51 拘束性のエピトープが見いだされた。今後の治療への応用が期待される。



## 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。本研究班は、これら課題克服を目的に以下の3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 (江川、立川、滝口)

EBウイルス(EBV)によるリンパ腫が、HIV患者の予後に重大な影響を及ぼす。そこで、EBV特異的CD8T細胞を誘導する免疫療法をおこない、患者体内でのEBV特異的CD8T細胞の誘導を解析し、その効果を検討した。

### 柱2：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服 (満屋、森内)

*in vitro/in vivo*で強力な活性を有するAK602/Aplaviroc (AVC)と一連の誘導体を用いてHIV感染を阻害する具体的なメカニズム、CCR5阻害剤・ケモカインとCCR5の相互作用などの基礎的研究を進め、ケモカインを介した各種の生理作用に影響を与えないCCR5阻害剤の開発を進めた。ケモカイン・レセプターをターゲットとした新たな治療法が有効かつ安全に行えるために、ケモカイン・レセプターの発現と制御、そしてそれを介するシグナルが及ぼす影響を理解する。

### 柱3：免疫賦活を応用した現状の治療の進展 (岡、滝口、松下)

免疫療法として行っている2つの臨床試験(急性期感染者に対するSTI療法、IL-2を用いた免疫賦活療法)の経過を観察した。さらに新たなHIV-1に対する免疫療法の基盤を確立するために、長期未発症者(LTNP)に高頻度に見られるHLA-B\*5101が提示する4つのHIV-1特異的細胞傷害性T細胞(CTL)の誘導を、20年間以上無治療で経過した血友病患者で検討した。新規に開発した*in vitro*における中和抗体の耐性誘導システムを用いて、これまでCell Lineでは困難であったR5ウイルスの*in vitro*での中和抗体逃避ウイルスを比較的簡便に誘導し、*in vivo*での耐性ウイルスの予測を行った。

## 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

過去2年間で、実際の免疫細胞療法を1卵生双生児であった2例に行った。DCワクチンを行った2例目では、EBVに対するCTLが誘導でき1年以上維持できているが、このレベルと他のHIV患者のEBVに対するCTLのレベルを比較した。さらに、今回は、この技術のHIV免疫療法への進展をにらみ、DCワクチン療法の基礎検討をおこなった。HIV患者および非感染者のPBMCをIL-2(20 IU/ml)存在下、抗HIV薬(AZT、3TC、NFV)1μMの存在/非存在下で培養し、形態、HIVの増殖の有無、細胞数を調べた。また新たにHIV患者2名と今まで対象とした一卵性双生児兄弟計4名の末梢血から抗HIV薬の存在下で誘導したmature DCをFACS解析により比較した。次にPBLとEBVのpeptide(A\*2402 EBNA3B TYSAGIVQI)をパルスしたこのDCを用いて(5対1)、抗HIV薬とIL-2存在下でCTLを誘導し、MHC tetramer法とElispot法でpeptide特異的T細胞を解析した。一卵性双生児兄弟ではそれぞれ由来のDCとPBLを4通りに組み合わせCTLを誘導した。

### 柱2：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服

- 1) 抗HIV化合物の活性評価には試験管内での評価に加え、SCID-huマウスAIDSモデルを用いた評価系を用いた。
- 2) CCR5阻害剤の<sup>3</sup>Hラベル体作成および複数の変異CCR5発現細胞株を作成、更に<sup>125</sup>Iラベル化されたケモカイン(RANTES、MIP-1α、MIP-1β)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。
- 3) ウシロドプシン結晶構造を基にCCR5の構造的解析を行なった。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取得しCCR5との結合様式の解析を進めた。
- 4) 宿主因子がCCR5の発現とHIVの感染性に及ぼす影響：健康成人またはHIV感染者のPBMCを①臍帯血由来のalpha-fetoprotein (AFP)、②乳清由来の諸成分、または③ストレス関連因子の添加・無添加で培養し、CCR5の発現を調べ(flow cytometry)、HIVの*in vitro*感染実験を行った。
- 5) CCR5 ligandsが潜伏したHIVの再活性化に及ぼす影響：HIV感染者のPBMC (CD8 & CD14-deplet-

ed) 培養において RANTES (CCR5 agonist)+少量の抗 CD3 抗体の刺激によるウイルス発現の有無を評価した。

### 柱 3：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

STI 療法では、誘導された CTL のエピトープの sequence を行い、escape 機序の解析を行った。

LTNP における 4 つの HLA-B\*5101 拘束性 CTL を検出するために、これらのエピトープを結合させた HLA-B\*5101 テトラマーを作製し、7 名の血友病患者での特異的 CD8T 細胞の数をフローサイトメトリーで解析した。

KD-247 単クローン抗体存在下に、CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞を用い *in vitro* R5 ウイルス (JR-FL) の逃避ウイルス誘導を行い、得られた逃避ウイルスの責任部位を導入した pseudotype ウイルスを作製した。

(倫理面への配慮)

本研究班の臨床試験は、「ヘルシンキ宣言」に基づいた厚生労働省の「臨床研究に係る倫理指針」に基づきプロトコールを作成し、国立国際医療センターの倫理委員会での承認「IL-2 国際臨床試験 (H11-J-95)、急性期患者に対する STI 臨床試験 (H13-10)、エイズに伴う悪性リンパ腫に対する LAK 療法(H15-162)」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 (1 卵生双生児) は、DC 治療開始後、EBV 特異的な CTL の誘導が確認され DC 投与終了後現在まで 10 ヶ月この CTL が維持されている。この CTL のレベルは、HIV 患者 43 例 (非悪性リンパ腫) において末梢血 PBMC $10^6$  個あたりの CTL 130 個であったのに対し、この例においては 2160 個であった。今後の免疫療法に向けて、HIV 患者の PBMC を用いて mature DC を誘導した結果、4 名とも抗 HIV 薬の存在下でも DC 誘導が可能であった。また 4 名ともこの DC 刺激で CTL 誘導も可能で、リンパ球分画の 30%から 70%が EBV 特異的 tetramer 陽性細胞となった。一卵性双生児の兄弟の DC 誘導でも、HIV 感染の有無にかかわらず HLA-DR、CD80、CD83、CD86、CCR7 の発現の程度が類似していた。

### 柱 2：現状の治療薬に対する耐性ウイルスの克服

AVC は多剤耐性株を含む R5-HIV-1 を試験管内および動物モデルでも強力な抗ウイルス活性を発揮した。AVC は多くの薬剤との強い相乗効果を認め CCR5 阻害剤が多剤併用療法で有効な効果を示す事が示された。AVC の構造学的解析から、AVC は CCR5 の細胞外ドメインと上部膜貫通ドメインで形成される疎水性ポケットに結合していた。このポケットがケモカイン作用および HIV 感染に与える影響に関する検討の結果、ポケットの一部 (第 4-5 膜貫通ドメイン近傍) に HIV 感染に重要でありながらケモカイン作用へはほとんど影響しない領域があることを明らかにした。これにより低分子化合物をデザインすることでケモカインレセプターの生理的作用を阻害しない抗 HIV 薬のモデリングが可能である事示した。

CCR5 の発現とその制御機序の解析では、① AFP は CCR5 の発現を減少させ HIV 感染を抑制した。② 乳清成分のうち sialyl lactose と lactoperoxidase は感染初期過程で HIV 感染を抑制したが、CCR5 の発現への直接的影響はなかった。③急性ストレスに関わる catecholamines は HIV 感染を抑制したが、CCR5 の発現への影響はなかった。CCR5 ligands が HIV 感染に与える影響の解析では、RANTES +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り、系統樹解析では抗 CD3 抗体単独の刺激で出現するウイルスと少し異なる quasi-species に属することが示唆された。

### 柱 3：免疫賦活を応用した現状の治療の進展

STI による免疫賦活療法では、一定期間 CTL を誘導の後 CTL は低下した。これは、CTL からの escape mutant であることが証明された。CTL も epitope の数が少ないと薬剤同様耐性化することがわかった。IL-2 療法による集中的な免疫賦活により CD4 の持続的な上昇を認めた。

*In vitro* で強い HIV-1 増殖抑制を示した 2 つの Pol 特異的 CTL が無治療血友病患者でどの程度誘導されているか調べるために、このテトラマーを用いて、患者末梢血でのそれぞれに特異的な CD8T 細胞の検出をおこなった。その結果、3 人の LTNP では、2 つの Pol に対する特異的 CD8T 細胞が検出できた。しかし、4 人の発症遅延者では、ウイルス量が最も低い一人は、Pol283 と Pol743 に対して特異的 CD8T 細胞が検出できたが、他の 3 人は Pol743 に対して

は検出がまったくできなかった。以上のことから、この2つの Pol 特異的 CD8T 細胞が、患者体内で HIV-1 の増殖抑制に強く関与していると考えられた。

KD-247 による逃避ウイルス誘導の結果、抗体濃度を 600 $\mu$ g/ml(6-passage)まで上げたところで、JR-FL 株の gp120-V3 の tip 部位の-GPGR-が-GPER-に変異したウイルスが認められ、1mg/ml(8-passage)まで抗体濃度を上げると、8割以上のウイルスが-GPGR-から-GPER-に置き換わっていた。8-passage の上清中のウイルスを用いて、KD-247 に対する感受性を MTT assay で測定すると、野生株の JR-FL の IC<sub>50</sub> が 6.3 $\mu$ g/ml であったのが、8-passage ウイルスは、>100 $\mu$ g/ml であり、耐性となっていた。

#### D. 考察

本研究班は、3つの柱ではあるが、実質的には免疫賦活療法と新薬開発にまとめられる。免疫賦活療法では、1) HIV 患者であっても DC ワクチンにより CTL を誘導できること、2) DC の活性は、一定期間維持できること、3) LTNP の解析より有効なエピトープが発見できたこと、4) エピトープが少ないと、CTL でも中和抗体でも escape mutant が出現し耐性となること、などがわかった。これらのことを組み合わせると、今回の結果は、今後 HIV そのものに対する免疫賦活療法への布石となったといってもよい。今後より強力な CTL エピトープを複数発見することにより、より有効な免疫賦活療法を実施したい。

一方、新薬開発では、CCR5 阻害薬の開発の過程で、繊細な構造解析を行うことができた。今回開発した AVC 自体は、臨床試験の過程で副作用により開発中止となったが、この班で行った構造解析により、今後のこのクラスの薬剤モデリングを行う上で、生体への影響の少ない新規薬剤の計画的デザインの可能性を示唆するものである。

#### E. 結論

免疫賦活に関する研究では、HIV そのものに対する免疫賦活療法の基礎となるデータが得られた。次のステップとして是非実現したい。新薬開発では、構造学的データから、より特異的・選択的な薬剤のデザインを図るという最近の分子標的のアプローチ

に即した研究といえる。今後は既に構築された構造モデルを用いて抗 HIV 活性に特化した新規のケモカインレセプター (CCR5) 阻害剤の開発を進める。CCR5 の発現や機能を解析する事は、HIV 感染の病態生理の理解を深めるだけでなく、これをターゲットとする治療の効果を高め、副反応を軽減するためにも不可欠である。

#### F. 健康危険情報

なし

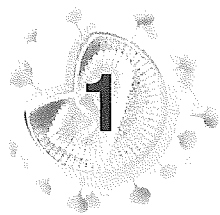
#### G. 研究発表

別添

#### H. 知的財産権の出願・取得状況

1. 「乳清由来 lactoperoxidase および sialyl lactose の HIV 感染抑制効果」特許申請中。
2. 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
3. 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

## 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 取締役）

研究協力者：井田 節子<sup>1</sup>、野口 敦崇<sup>1</sup>、立川 夏夫<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>株式会社 メディネット、<sup>2</sup>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

HIV 感染者の免疫細胞治療のために、HIV 感染者自身の末梢血から mature DC、EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導は可能か、また HIV 感染者と HIV 非感染者では誘導に差があるかどうかを HAART 治療を受け血中の HIV 量が 50copies/ml 以下に保たれている 3 名の HIV 感染者について検討した。うち 1 名は AIDS 悪性リンパ腫を発症し一卵性の兄から得た免疫細胞を組み合わせた治療の結果寛解している本研究の対象者である。抗 HIV 薬の存在下で 3 名の HIV 感染者の末梢血から mature DC の誘導と EBV 抗原特異的 CD8T 細胞の誘導が可能であった。培養期間中 HIV の増殖は認められなかった。この一卵性双生児兄弟を対象として HIV 感染者と非感染者の比較をおこなった。兄弟から得た mature DC の細胞表面抗原マーカーの発現に差はなかった。兄弟の末梢血から誘導し EBV 抗原ペプチドをパルスした mature DC とそれぞれの PBL を 4 通りに組み合わせて刺激し EBV 抗原特異的 CD8T 細胞を誘導した。EBV 抗原特異的 CD8T 細胞は 4 通りの組み合わせでほぼ同程度の頻度に誘導が可能であり両者に差は認められなかった。今回対象とした HIV 感染者では抗 HIV 薬を加えた標準的な培養方法により HIV 非感染者と同様に mature DC と EBV 特異的 CD8T 細胞を誘導できることが示された。AIDS 期の患者を含め更に症例数を増やし検討する必要がある。

### A. 研究目的

我々は免疫細胞治療に用いる細胞培養の基礎検討と技術開発を行い、AIDS 悪性リンパ腫患者を治療するための免疫細胞を国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センターに供与してきた。昨年度までに AIDS 悪性リンパ腫患者にその一卵性の双生児で HIV に感染していない健康人から作成した免疫細胞を抗がん剤（EPOCH 等）、抗 CD20 抗体、抗 HIV 薬（HAART）と交互に投与する免疫細胞治療がおこなわれた。この結果 EBV 特異的 CD8T 細胞の顕著な上昇が認められ患者は完全寛解している。今年度は HIV 感染者自身の細胞を用いた免疫細胞

治療を行うことを目的にして

- 1) HIV 感染者の末梢血から mature DC、EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導は可能か
- 2) HIV 陽性者と HIV 陰性者では mature DC、EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導に差があるかの 2 点を *ex vivo* で検討した。

### B. 研究方法

#### 1. 解析対象者

1 組の一卵性双生児（2004 年 1 月から 2005 年 3

月まで免疫細胞治療を行った AIDS 悪性リンパ腫患者と HIV に感染していない健康人の兄弟) と HIV 感染者 3 名、計 4 名を対象とした。関連のある検査所見を表 1 に示す。

## 2. mature DC の誘導と解析

対象者 4 名の末梢血単球から 10% の非働化自己血漿と抗 HIV 薬 (AZT、3TC、NFV 各 1 $\mu$ M) の存在下で、GM-CSF、IL-4、TNF- $\alpha$ 、prostaglandin E2、IL-6、IL-1 $\beta$  で mature DC を誘導し、細胞表面抗原 (HLA-DR、CD80、CD83、CD86、CCR7) をフローサイトメトリーで解析し比較した。

## 3. EBV-peptide 特異的 CD8T 細胞の誘導と解析

10% の非働化自己血漿、抗 HIV 薬 (AZT、3TC、NFV 各 1 $\mu$ M)、IL-2 存在下で PBL を EBV 由来の peptide をパルスした mature DC (5 対 1 ~ 10 対 1) で 7 日間隔で 2 ~ 3 回刺激して EBV-peptide 特異的 CD8T 細胞を誘導した。用いた peptide の配列は患者 1 : \*A0201 拘束性 BMLF1(GLCTLVAML) 患者 2 : \*A1101 拘束性 EBNA3B(IVTDFSVIK) 患者 3、4 : A2402 拘束性 EBNA3B (TYSAGIVQI) である。一卵性双生児兄弟では兄弟由来の mature DC と PBL を互いに 4 通りに組み合わせ【HIV(+)/mDC/HIV(+)/PBL、HIV(+)/mDC/HIV(-)/PBL、HIV(-)/mDC/HIV(+)/PBL、HIV(-)/mDC/HIV(-)/PBL】EBV-peptide 特異的 CD8T 細胞を誘導した。フローサイトメトリーにより peptide 特異的な Tetramer 陽性細胞の解析と

Elispot 法により peptide 特異的な IFN  $\gamma$  産生細胞を解析した。培養期間中の HIV 増殖の有無を培養液上清中の P24 を測定し判定した。

(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取得後に実施した。また、国際医療センター及び研究協力機関である瀬田クリニックグループ倫理委員会の承認を得て実施した。個人情報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するとともに、検体・試料等廃棄時には最大限の配慮のもと適切に処分した。

## C. 研究結果・症例検討

### 1. 症例の臨床経過

1 $\mu$ M の抗 HIV 薬の存在下で培養した全ての培養上清の P24 抗原は陰性で HIV の増殖は認められなかった。HIV 感染者、非感染者ともに抗 HIV 薬の存在下で mature DC 誘導が可能であった。図 1 に示すように一卵性双生児兄弟は mature DC の HLA-DR、CD80、CD83、CD86、CCR7 はほぼ同程度に発現していた。

対象者 1、2、3、4 の末梢血には用いた EBV peptide 特異的な tetramer 陽性 CD8T 細胞がそれぞれ 0.02 %、0.2 %、0.2 %、0.4 % 存在し、EBV peptide 特異的な IFN  $\gamma$  産生細胞は PBMC 10<sup>5</sup> 個あたり 9、56、132、171 検出された。4 名ともに EBV 関連

表 1. 採血時の検査所見

患者	HLA 型	HIV 初診	治療歴	HIV copies/ml	CD4 cells/ $\mu$ l	CD8 cells/ $\mu$ l	EBV 関連抗体
1	A*0201, A*0206 B*4002, B*1301	2001/5	3TC, TDF, AVC, RTV	50>	238	819	VCAIgG 320 VCAIgM 10> EBNA 40
2	A*0201, A*1101 B*5101, B*5401	2001/1	d4T, ddI, NFV	50>	621	515	VCAIgG 160 VCAIgM 10> EBNA nd
3	A*0207, A*2402 B*4601, B*3701	2003/11 悪性 リンパ腫	d4T, ddI, NFV 免疫細胞、 抗 CD20 抗体 抗癌剤	50>	418	1173	VCAIgG 640 VCAIgM 10> EBNA 40
4*	A*0207, A*2402 B*4601, B*3701	/	なし	0	/	/	VCAIgG 1280 VCAIgM 10> EBNA 40

\*: 患者 3 の一卵性双生児で HIV 陰性

抗体が検出され EBV 陽性であった。

EBV 由来 peptide をパルスした mature DC をもちいて PBL を 7 日間隔で 3 回刺激した結果患者 1、2 ではリンパ球分画の 26.2 %、76.2 % の EBV 特異的 tetramer 陽性細胞が誘導された。図 2 に示すように HIV 感染者と HIV 非感染者からなる 1 卵生双生児兄弟の mature DC と PBL を 4 通り [HIV(+)/mDC/ HIV (+)/PBL、HIV(+)/mDC/HIV(-)/PBL、HIV(-)/mDC/ HIV(+)/PBL、HIV(-)/mDC/HIV(-)/PBL] に組み合わせ同様に 2 回刺激培養した結果それぞれ、37 %、65 %、59 %、71 % の EBV peptide 特異的 CD8T 細胞が誘導され EBV 特異的な IFN- $\gamma$  産生細胞の増加を認めた。

#### D. 考察

我々の標準的な免疫細胞培養方法に抗 HIV 薬を加えることにより HIV 感染者の末梢血からも mature DC と EBV 特異的 CD8T 細胞を誘導できることが確認された。HIV 感染者と HIV 非感染者からなる一卵性双生児兄弟の mature DC と PBL の 4 通りの組み合わせでいずれの組み合わせからもほぼ同頻度に EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導が可能であった。以上の結果より今回対象とした HIV 感染者からは HIV 非感染者とほぼ同等に *ex vivo* において EBV 特異的免疫細胞の作製が可能なる事が明らかになった。ここで対象とした HIV 感染者は抗 HIV 薬投与により血液中の HIV が 50copies/ml 以下に抑えられ

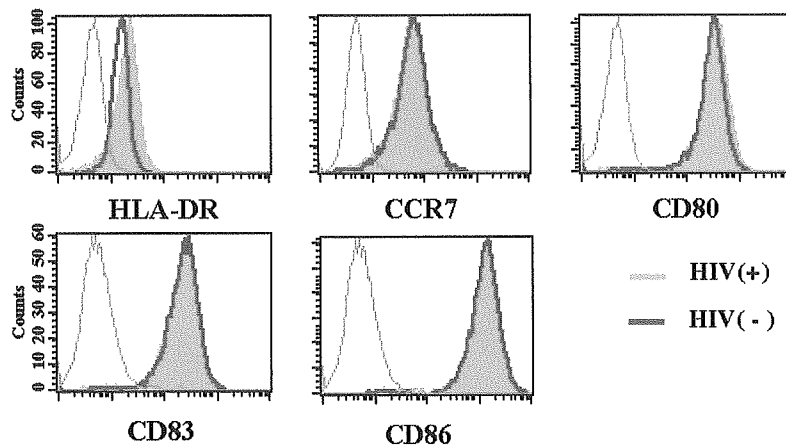


図 1. 一卵性双生児兄弟から誘導した mDC の細胞表面マーカーの比較

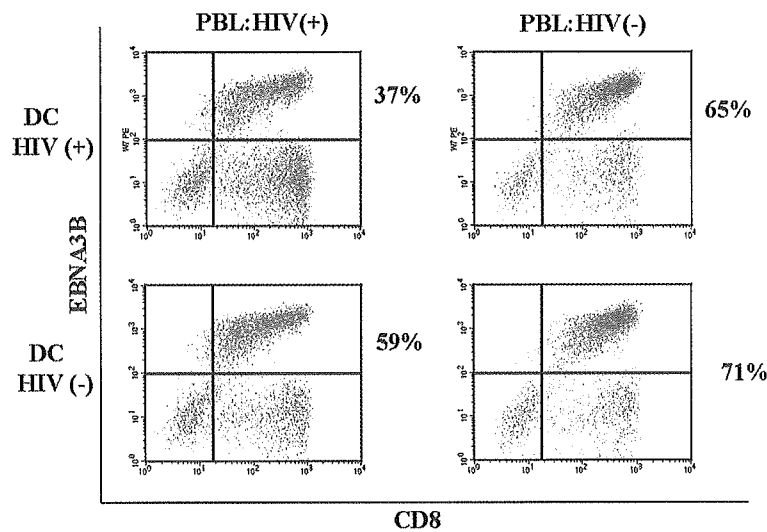


図 2. HIV 陽性と陰性の一卵性双生児兄弟由来の mDC と PBL を用いた EBV 特異的 CD8T 細胞誘導の比較

CD4、CD8 数が多い比較的免疫能が保たれている患者であった。AIDS 悪性リンパ腫は実際には CD4、CD8 数が減少した患者において発症するため、症例数を増やすとともにエイズ末期の免疫能が低下している患者からも効率的に免疫細胞を誘導できるかについても確認することが必要と考えられる。

#### E. 結論

HIV 非感染者と同様に HIV 感染者の末梢血からも mature DC と EBV 特異的 CD8T 細胞を誘導できることが確認された。今後実用化に向けて、更に免疫能の低下した HIV 患者を含め症例数を増やして検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

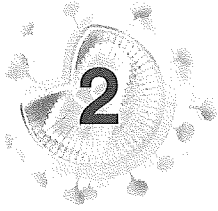
#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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）

江川 滉二（(株)メディネット 分子免疫学研究所 取締役）

研究協力者：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方法には効果が認められた。本年はこの免疫細胞療法終了後の検討を施行。免疫細胞療法終了後も EBV に対する CTL の維持が示唆された。

#### 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（抗腫瘍療法＋抗 HIV 療法＋免疫細胞療法）の一部として施行された。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。個人情報情報は記号化することで個人の特定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 带状疱疹を契機に 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)

<HIV 関連検査> (2003/11/28)

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

< EBV 関連 > geniQ-EBV  $3 \times 10^2$  copies/ml、BV VCA-IgG 640 ×

<HLA>A 0207/2402

<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）

抗 HIV 療法は不完全であった。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, 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)。Stage、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 と強い関連は認められなかった。

## 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。最終化学療法は 04 年 7 月であり、06 年 3 月現在で完全寛解を維持している (【図 1】臨床経過表-1)。

### (2) 抗 HIV 療法

抗 HIV 療法は NFV/d4T/3TC であった。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 copies/ml) 未満まで

低下した (【図 2】臨床経過表-2)。

### (2) 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 3】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 Peptide DC(1) CTL 療法
- ③ Peptide DC(2) CTL 療法

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重要であるが、より詳細に検討するため、症例の末梢血液 1,000,000 個あたりの EBV 特異的 peptide に対する IFN- $\gamma$  産生細胞数の検討を施行した (ELISPOT 解析)。

この結果より、04 年 6 月の Peptide DC(2) CTL 療法より顕著な上昇が認められている (【図 4】ELISPOT 解析)。

症例の寛解状態は持続し、CD4 数も 300/mm<sup>3</sup> 以

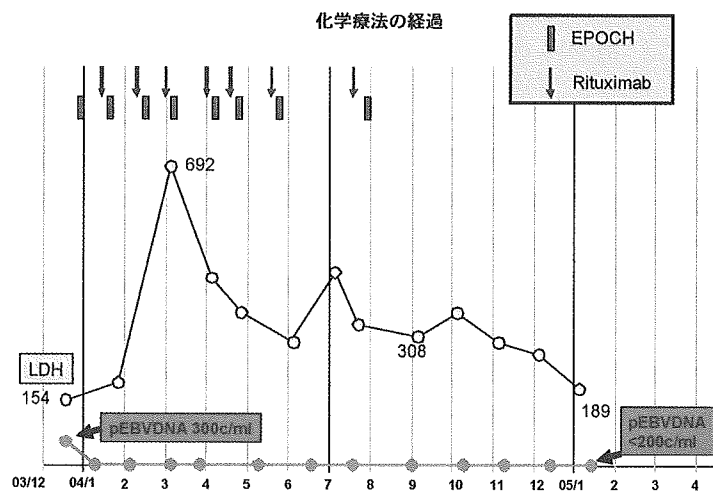


図 1. 臨床経過表 1

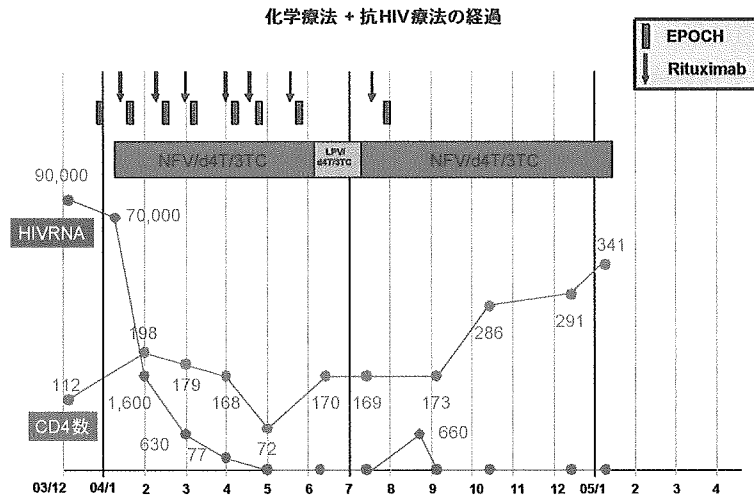


図 1.5 臨床経過表 2

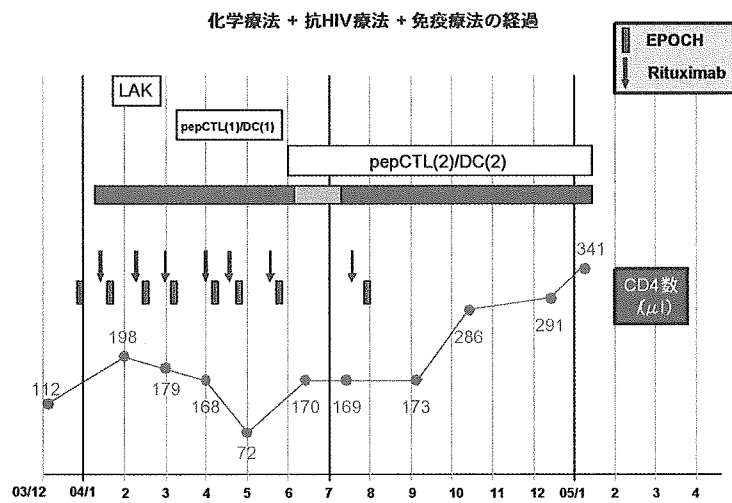


図 3. 化学療法、抗 HIV 療法、免疫細胞療法の全経過

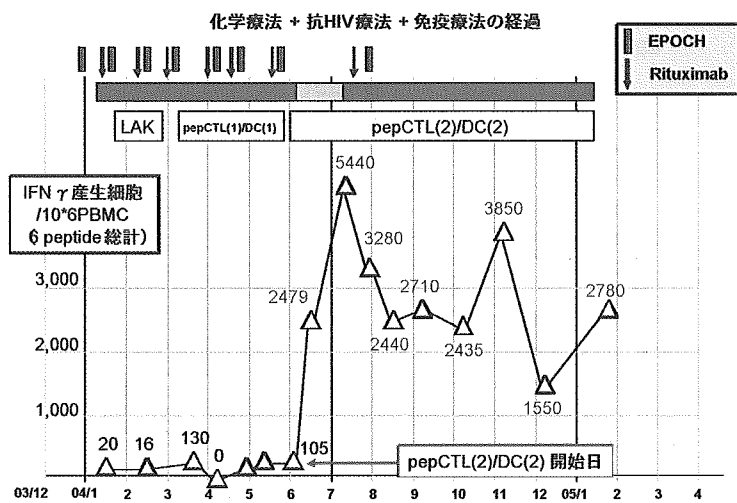


図 4. ELISPOT 解析

上が持続されたことより、05 年 4 月より免疫細胞療法の中断を試みた。この結果一旦低下したようにも思える CTL 細胞数は、それ以後も維持されていた。可能性として、①免疫細胞療法による成立した CTL が維持されている可能性、②免疫細胞療法により成立した CTL は低下したが、症例自身の免疫能が抗 HIV 療法にて回復し、置き換わった可能性、が考えられた（【図 5】免疫療法中断後の経過・ELISPOT 解析）。

それに関する傍証として、症例 2 と非悪性リンパ腫 HIV 患者（対照群）での CTL・ELISPOT 解析を比較した。症例 2 では複数回の測定での IFN- $\gamma$  産生細胞数は 2160 個/ $10^6$  個であったのに対して、対照群では 130 個/ $10^6$  個であった。個人差が大きい結果であり、即断はできないが、①の可能性を示唆する結果であった（【図 6】症例 2 と非悪性リンパ腫症

例での ELISPOT 解析の比較）。

### 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。

また AIDS 期にある症例においても免疫細胞療法の可能性が示唆された。

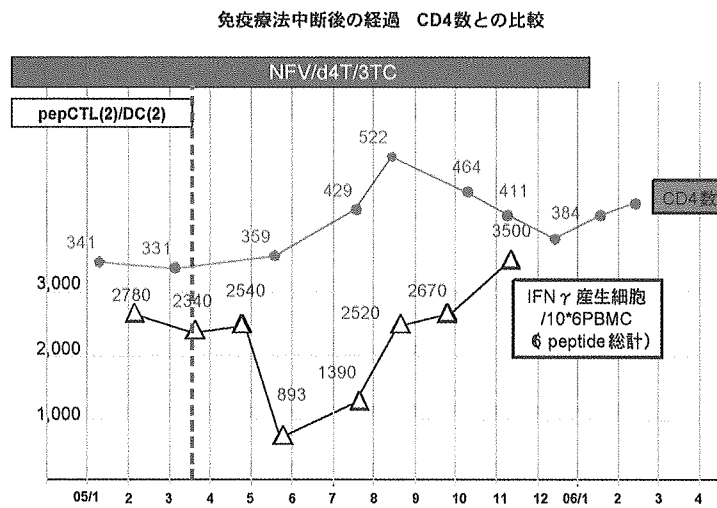


図 5. 免疫療法中断後の経過・ELISPOT 解析

EBV 由来 6 peptide に対する ELISPOT 解析 (末梢血 PBMC  $1 \times 10^6$  個)

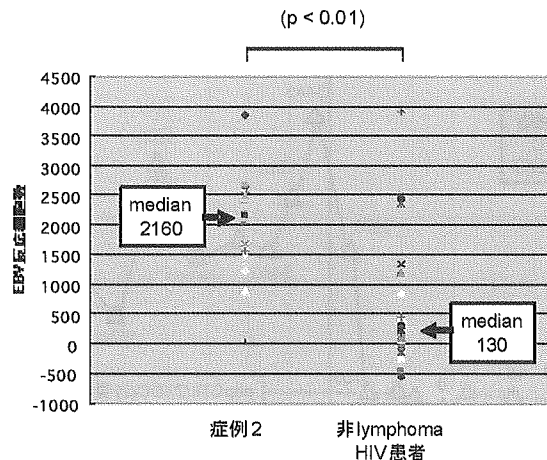


図 6. 症例 2 と非悪性リンパ腫症例での ELISPOT 解析の比較