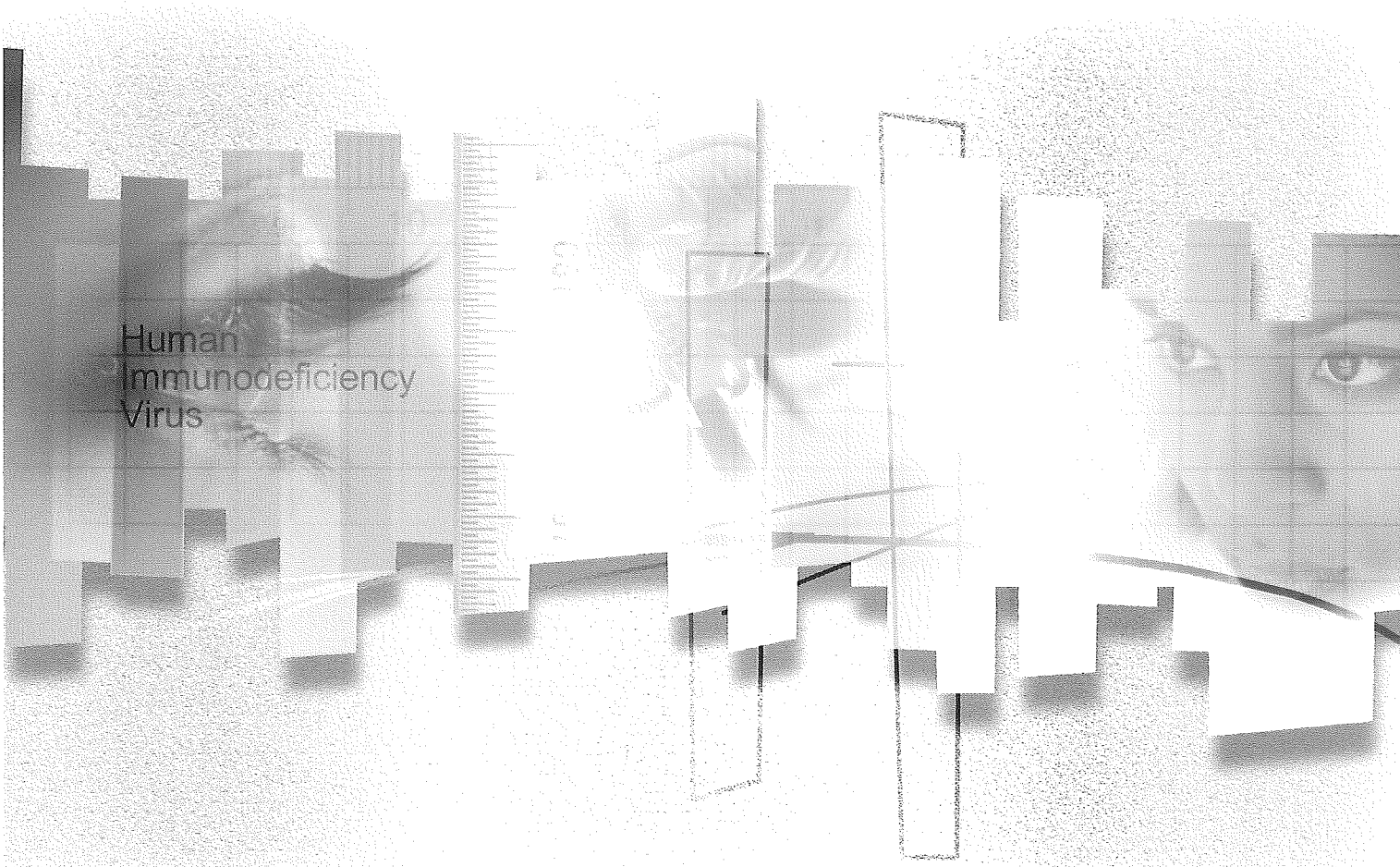


7-5005 6
厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業
平成15-17年度総合研究報告書

免疫賦活を応用した HIV感染症の治療開発に関する研究



Human
Immunodeficiency
Virus

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）

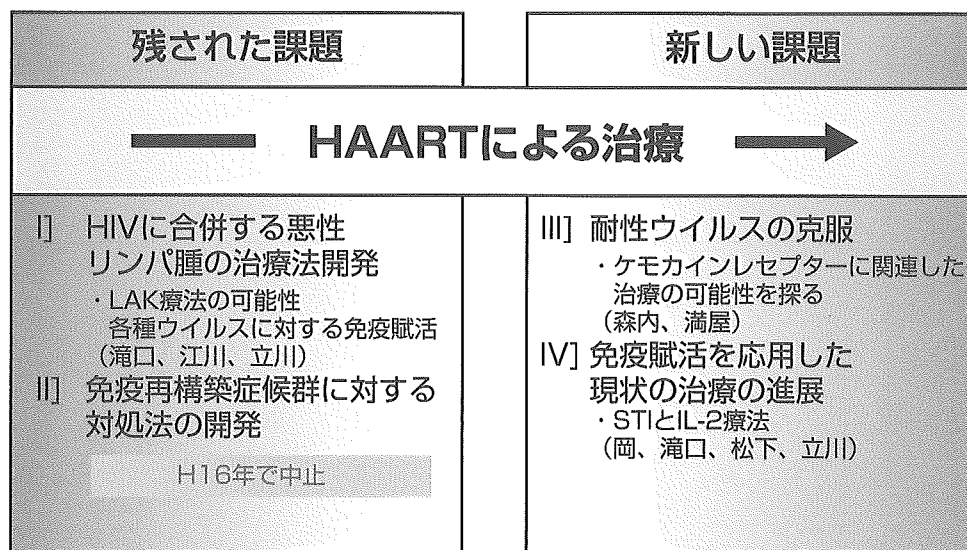
CCR5 の発現は、日内変動や種々の刺激により変化することがわかりました。感染症の併発を繰り返すことや、CCR5 agonists による抗 HIV 療法は、X4virus を誘導する可能性のあることが示されました。今回の研究で CCR5 阻害薬の候補品が発見され、第 2 相試験まで進みました。今回の物質は、副作用で中止となりましたが、CCR5 阻害剤開発が可能であることを示しました。今回の研究より CCR5 とケモカインの相互作用と HIV の細胞内侵入に関わる CCR5 の役割についての理解の基礎が得られました。

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	研究期間
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	H15-17
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	H15-17
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	H15-17
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	H15-17
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	H15-17
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	H15-17
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	H15-17
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	H15-16

目 次

総合研究報告書

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	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）

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	21
-----------------------------------	----

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	31
--------------------------------	----

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	39
-------------------------------	----

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）

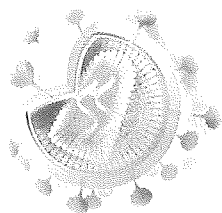
HAART 下における抗 HIV 免疫再構築に関する臨床研究	49
--------------------------------------	----

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	63
-------------------	----

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）

I. 総合研究報告書



総合研究報告書

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、森内 浩幸³、満屋 裕明⁴、
江川 滉二⁵、立川 夏夫⁶、白阪 琢磨⁷

¹ 熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野 教授、

² 熊本大学エイズ学研究センター 病態制御分野 教授、

³ 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、

⁴ 熊本大学医学部 免疫病態学内科学第二 教授、

⁵ (株)メディネット 分子免疫学研究所 取締役、

⁶ 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、

⁷ 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

研究要旨

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、研究を行ってきた。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。その効果は、DC 投与終了後少なくとも 8 ヶ月間 CTL が維持されていた。CCR5 に関する研究では、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った。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 相試験まで進んだが副作用で中止となった。しかし、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。また、免疫を妨害する制御性 T 細胞の存在も確認された。細胞性免疫応答の解析の研究では、長期末発症者の 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。(当初は、免疫再構築に対する対処も含めた4つの柱であったが、この柱(白阪)は、2年目で到達度が低かったために中断とした。)

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通りに組み合わせて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³H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¹²⁵I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の構造学的解析を行なった。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j得て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。IL-2 を用いた免疫賦活療法は、臨床経過の観察を行った。

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

1 例目は、悪性リンパ腫の悪化で免疫細胞療法の効果判定はできなかった。2 例目は、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 μ 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 IC₅₀ が 6.3 μ g/ml であったのが、8-passage ウイルスは、>100 μ 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。この3年間で、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はなく、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. 研究発表

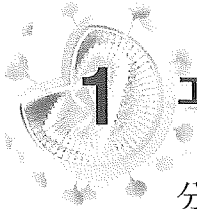
別添

G. 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. 総合研究報告書

平成 15 - 17 年度



1 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：後藤 重則¹、井田 節子¹、野口 敦崇¹、賛田 美枝¹

岡 慎一²、立川 夏夫²

(¹株式会社 メディネット、²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

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事が知られている。*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うる事が確認されており、免疫細胞治療による効果が期待できる。本研究では国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センターと連携して AIDS 悪性リンパ腫患者に対する免疫細胞治療法開発のための検討をおこなってきた。初年度及び 2 年度に一卵性の兄を持つという点で特殊な患者が 2 名登録された。我々は HIV 非感染の一卵性の兄の血液を用いて改良を加えつつ 5 種類の免疫細胞を調製し供給した。供給した免疫細胞は抗がん剤と交互に抗 HIV 薬とともに患者に投与された。このうち HIV 非感染の一卵性の兄の血液から誘導し EBV 特異的 peptide をパルスした mature DC を peptideCTL+ peptideCTLOKT3 細胞とともに症例 2 に投与したところ、EBV 特異的 CD8T 細胞の顕著な上昇が認められ患者は現在完全寛解に至っている。このため 3 年度は HIV 感染者自身の免疫細胞による治療をめざして、HIV 感染者から *ex vivo* で免疫細胞の誘導を試みた。AIDS 悪性リンパ腫が寛解状態にある 2 例目の患者と他の HIV 感染者 2 名の末梢血からは mature DC、EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導が可能であった。また HIV 感染者と HIV 非感染者では免疫細胞の誘導能に差があるかどうかを一卵性の兄弟を対象として両者の mature DC と PBL を 4 通りに組み合わせて検討した。誘導された EBV 特異的 CD8T 細胞が CD8T 細胞に占める割合はいずれの組み合わせでもほぼ等しかった。今回の対象とした HIV 感染者 3 名は HAART 治療により血液中の HIV が 50copies/ml 以下に抑えられ比較的免疫能が保たれている HIV 感染者である。今後実用化に向けて、免疫能の低下した HIV 患者を含め更に症例数を増やして検討する必要がある。

A. 研究目的

AIDS 悪性リンパ腫は非常に予後が不良であり、AIDS 患者の死因となることも多い。そこで当分担研究班は AIDS 悪性リンパ腫を免疫細胞療法でコントロールすることを目的に、免疫細胞療法に使用する細胞の加工技術開発を行った。

B. 研究方法

初年度及び 2 年目には偶然健常 (HIV 非感染) の一卵性の兄を持つ患者が 2 名登録された。この 2 名の治療のため以下の方で HIV 非感染の一卵性の兄から Epstein-Barr virus (EBV) 特異的 CD8T 細胞を含む活性化 T 細胞集団、及び EBV 抗原をパルスした樹状細胞 (DC) を誘導し提供した。我々はその治療用

細胞の免疫学的評価や、細胞加工・品質管理技術提供、及び改良を研究分担として実施した。臨床応用は国立国際医療センターにおいて立川グループが実施した。

3 年度は HIV 感染者の末梢血から mature DC、EBV 特異的 CD8T 細胞の誘導が可能か、また HIV 感染者と HIV 非感染者で差があるかという点について *ex vivo* で検討した。

(1) HIV 非感染者からの免疫細胞誘導および投与方法【症例 1】

① CD3-LAK 細胞（図 1）

末梢血単核球（PBMC）を、固相化した抗 CD3 抗体及び IL-2 で約 2 週間活性化・増殖させた。

② DC-CTL 細胞（図 2）

ex vivo で癌細胞特異的または EBV 特異的な T 細胞を増殖させる培養法として選択された。

末梢血単核球から GM-CSF と IL-4 を用いて分化させた immature DC に、摘出した自己腫瘍のライセートまたは EBV 抗原ペプチド（患者 MHC class I に拘束性をもち *in vitro* で CTL 誘導が確認できているペプチド）を抗原としてパルスした。その DC と PBMC を混合培養し、抗 CD3 抗体及び IL-2 で増殖させた。EBV 抗原ペプチドは滝口グループが選定した以下の種を用いた。

- ・ A*1101 EBNA3B(AVF) AVFDRKSDAK
- ・ A*1101 EBNA3B(IVT)IVTDFSVIK
- ・ A*1101 LMP2SSC SSCPLSKI

③ peptideCTL 細胞（図 3）

EBV 抗原ペプチドと IL-2、固相化抗 CD3 抗体を用いて活性化した EBV 抗原特異的 CD8⁺T 細胞を含有するリンパ球集団であり、EBV 抗原ペプチド特異的 CD8⁺T 細胞と多様な T 細胞集団の両方を得る方法として選択された。EBV 抗原ペプチドは DC-CTL 時と同じ 3 種を用いた。

④ mature DC

末梢血単核球から GM-CSF、IL-4、TNF α 、PGE2 を用いて分化させた mature DC に、3 種の EBV 抗原ペプチドをロードし、DC ワクチンとした。

症例 1 には表 1 の細胞を投与した。

CD3-LAK 法

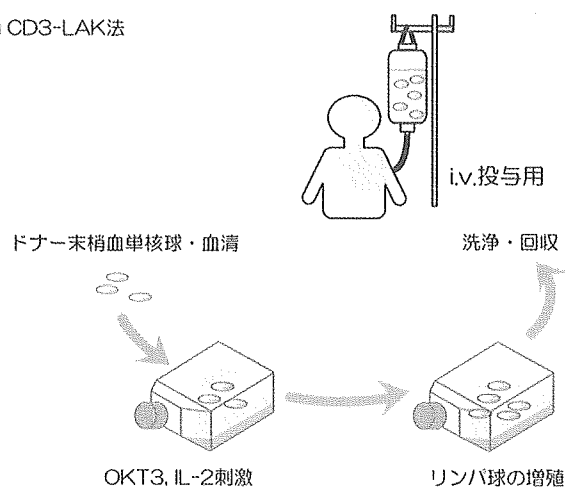


図 1

DC-CTL 法

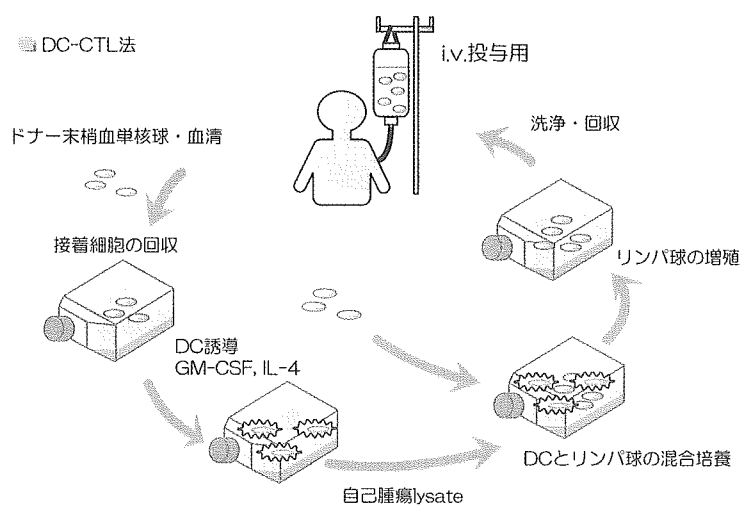


図 2

pepCTL+pepOKT3 法

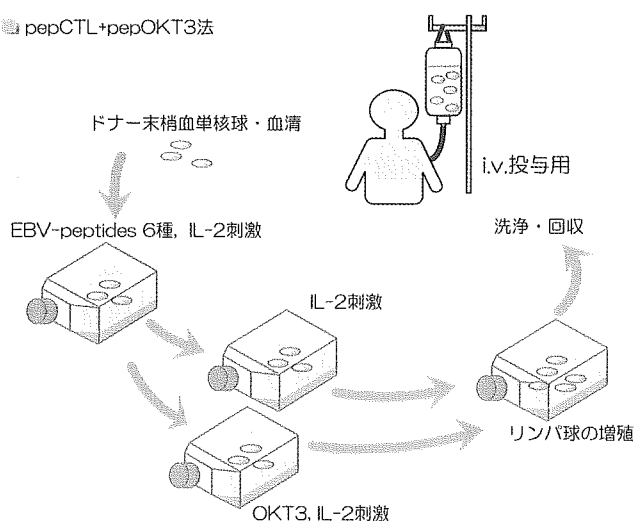


図 3

表 1. 症例 1

投与期間	投与経路	細胞	回数
	I.V.	CD3-LAK	8
2003/10/14～2003/11/12	I.V.	腫瘍 lysate DC-CTL 細胞	4
2003/12/10～2004/2/19	I.V.	peptide DC-CTL 細胞	6
2004/2/24～2004/4/6	I.V.	peptide CTL+peptide CTL OKT3 細胞 と mature DC	4

【症例 2】

① CD3LAK 細胞

② peptide-CTL 細胞、peptide-CTLOKT3 細胞

EBV 抗原ペプチドは滝口グループが選定した以下の 6 種を用いた。

- ・ A*2402 LMP2 TYGPVFMCL
- ・ A*2402 LMP2 TYGPVFMSL
- ・ A*2402 BRLF1 TYPVLEEMF
- ・ A*2402 BMLF1 DYNFVKQLA
- ・ A*2402 EBNA3A RYSIFFDYM
- ・ A*2402 EBNA3B TYSAGIVQI

③ mature DC (図 4、図 5)

peptide-CTL 細胞に用いたものと同種の EBV 抗原ペプチドをパルスした mature DC を DC ワクチンとした。2004 年 3 月 10 日から 2004 年 4 月 30 日にかけて 6 回 i.v. 投与された mature DC(1) は $\text{TNF}\alpha$ と prostaglandin E2 にて成熟化した mature DC である。2004 年 6 月 1 日以降に 22 回 s.c. 投与された mature DC(2) は成熟化、抗原提示、migration を考慮して培養法及び投与ルートを変更し、 $\text{TNF}\alpha$ と prostaglandin E2 に $\text{IL-1}\beta$ と IL-6 を加えた成熟化サイトカインカクテルにて成熟化後に EBV 抗原ペプチドを 1 種ずつパルスした DC である。

症例 2 には表 2 の細胞を作製し投与した。

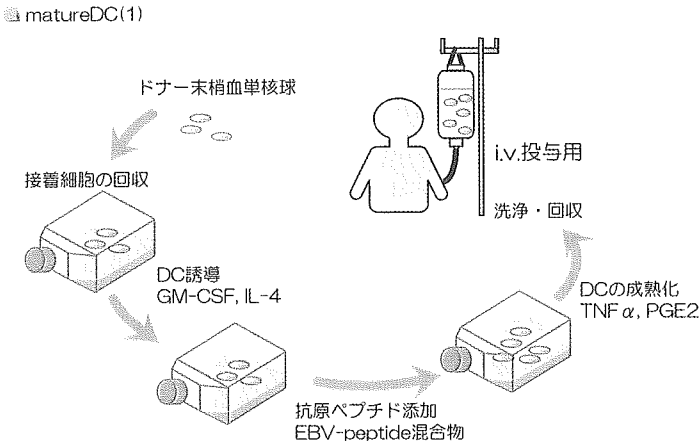


図 4

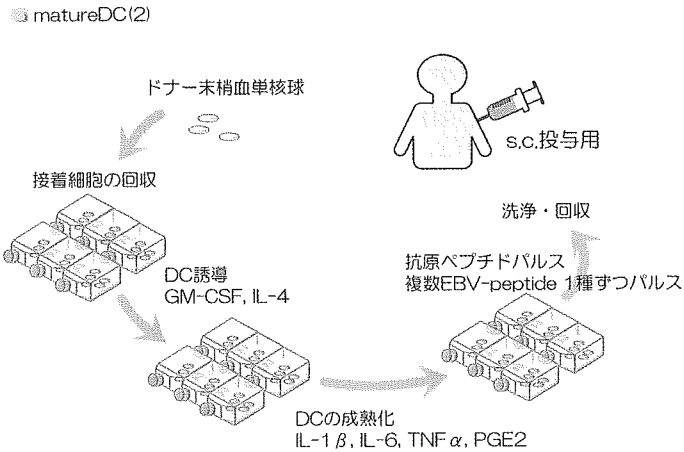


図 5

表 2. 症例 2

投与期間	投与経路	細胞	回数
2004/1/27～2004/2/25	I.V.	CD3-LAK	4
2004/3/10～2004/5/21	I.V.	peptideCTL+peptideCTLOKT3 細胞	8
	I.V.	mature DC①	6
2004/6/1～2005/3/22	I.V.	peptideCTL+peptideCTLOKT3 細胞	22
	S.C.	mature DC②	22

(2) HIV 感染者自身の細胞を用いた免疫細胞の誘導

●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 2 名、計 4 名を対象とした。3 名の HIV 感染者はいずれも抗 HIV 薬投与により HIV 量が 50copies/ml 以下に抑制され CD4 および CD8 数はそれぞれ (238 : 819) (621 : 515) (418 : 1178) cells/ml で免疫能が比較的保たれた EBV 抗体陽性者であった。

●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 薬の存在下で、GM-CSF、IL-4、TNF- α 、prostaglandin E2、IL-6、IL-1 β により 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。

●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 μ 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 γ 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。

C. 研究結果

初年度、2 年度は HIV 非感染者から誘導した投与細胞の解析をおこなった。

1. 投与細胞の解析

症例 1 に投与した LAK 細胞（本報告では CD3-LAK、DC-CTL、peptideCTL+peptideCTL0KT3 を含む活性化リンパ球の総称として使用）は、CD8T 細胞を主とし、CD4T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞を含む CD3 陽性細胞（平均 99.3%）から構成されるリンパ球集団であった。peptideCTL+peptideCTL0KT3 細胞中の EBV 抗原ペプチド特異的 CD8+T 細胞を MHC tetramer assay で検査した結果、EBNA3B(AVF) 特異的 CD8+T 細胞 (0.7% ~ 3.9%、平均 1.2%) と、EBNA3B(IVT) 特異的 CD8+T 細胞 (1.4% ~ 27.8%、平均 5.8%) が高頻度で検出された。i.v.投与した DC は CD14-、CD40+、CD80+、CD86+ の mature DC であることを確認した。

症例 2 に投与した DC は CD14-、CD40+、CD80+、CD83+、CD86+、CCR7+ の mature DC であることを確認した。また LAK 細胞は、CD8T 細胞を主とし、 $\gamma\delta$ 細胞を含む CD3 陽性細胞（平均 93.9%）と NK 細胞 (CD56+ CD3-、平均 5.5%) から構成されるリンパ球集団であった。peptideCTL+peptideCTL0KT3 細胞中の EBV 抗原ペプチド特異的 CD8+T 細胞を検査した結果、特に BRLF1 特異的 CD8+T 細胞 (0.00% ~ 1.38%、平均 0.16%)、EBNA3A 特異的 CD8+T 細胞 (0.01% ~ 3.20%、平均 0.28%)、EBNA3B 特異的 CD8+T 細胞 (0.02% ~ 9.57%、平均 1.01%) が比較的高頻度で検出された。

2. 投与結果

初年度、2 年度の研究結果から HIV 非感染者から誘導した mature DC と CTL を含む活性化 T 細胞の投与により AIDS 患者に *in vivo* で特異的 CTL を誘導できる可能性が示唆された。化学療法終了後症例 1 は約 5 ヶ月生存され、医療センターでの過去 8 例の AIDS リンパ腫患者の平均生存期間 32 日 (1 ~ 93 日) よりも長かった。症例 2 では成熟化させた mature DC を投与することにより顕著な EBV 特異的 CD8T 細胞の増加が認められた。症例 2 は完全寛解しかつ末梢血 CD4 陽性細胞数が 300 個/ μ l 以上に回復したため、免疫細胞治療を中止し 2005 年 3 月から 2006 年 3 月現在まで経過観察中である。

(立川グループ報告)。

3 年度は HIV 感染者から免疫細胞を誘導し解析を行った。

1) 対象者の PBMC 中の EBV 特異的免疫細胞の解析

対象とした HIV 感染者 1、2、3 および HIV 感染者 3 の一卵性の兄で HIV 非感染者 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 γ 産生細胞は PBMC 10⁵ 個あたり 9、56、132、171 検出された。

2) 培養細胞中の HIV 検出

HIV 感染者の末梢血を用いて 1 μ 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。

3) mature DC の誘導

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 6 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。

4) EBV peptide 特異的 CD8T 細胞の誘導

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。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。図 7 に示すように結果それぞれ、37 %、65 %、59 %、71 % の EBV peptide 特異的 CD8T 細胞が誘導され EBV 特異的な IFN- γ 産生細胞の増加を認めた。

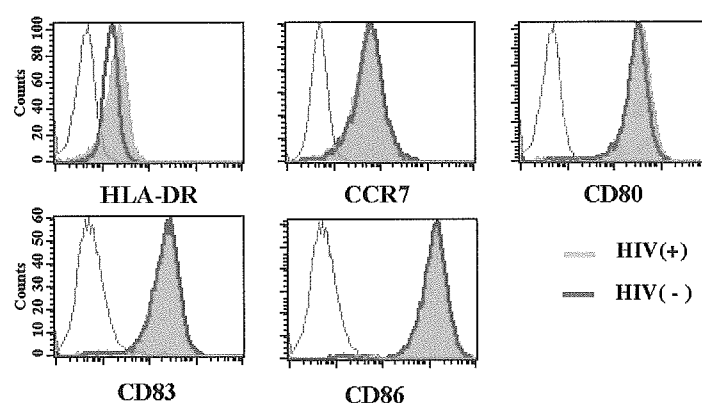


図 6. 一卵性双生児兄弟から誘導した mDC の細胞表面マーカーの比較

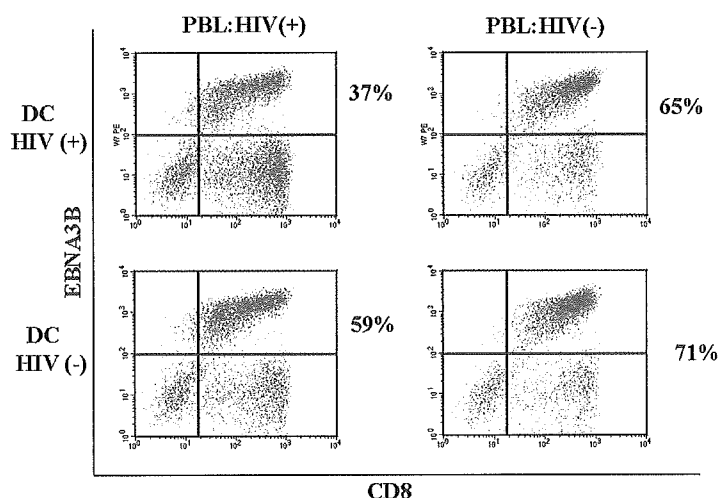


図 7. HIV 陽性と陰性の一卵性双生児兄弟由来の mDC と PBL を用いた EBV 特異的 CD8T 細胞誘導の比較

D. 考察

AIDS 悪性リンパ腫患者に 2 名に、我々が検討した免疫細胞培養法を用いその一卵性の HIV 非感染の兄達から誘導した mature DC と CTL を含む活性化 T 細胞を投与した結果 *in vivo* で特異的 CTL を誘導できる可能性が示唆された。免疫細胞治療には HLA がマッチした細胞を投与する必要がある、またさらに症例数を増やして検討するためには HIV 感染者自身の血液を用いた治療法の開発が必要である。このため HIV 感染者の血液を用いて検討した結果、HIV 感染者からも mature DC と EBV 特異的 CD8T 細胞を誘導できることが *ex vivo* で確認され、培養上清中には p24 抗原は検出されなかった。また HIV 感染者と HIV 非感染者からなる一卵性双生児兄弟由来の mature DC と PBL の 4 通りの組み合わせでは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。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 CD4、CD8 数が多く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確認することが必要と考えられる。

またそのような患者について、治療の安全性を確認することも必要である。

E. 結論

EBV 由来 B 細胞リンパ腫の治療に免疫細胞治療適応の可能性が認められた。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 感染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

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）

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

現在残された課題として AIDS 悪性リンパ腫の治療法の問題がある。今回我々は 2 例の AIDS 悪性リンパ腫症例を経験した。両症例とも一卵性双生児が存在する特異症例であったが、そのため免疫細胞療法を迅速に開始可能であった。

免疫細胞療法としては、LAK 療法、peptide CTL 療法、腫瘍 lysate DC CTL 療法、peptide DC CTL 療法、が検討された。

1 症例目は集学的療法（化学療法＋抗 HIV 療法＋免疫細胞療法）にもかかわらず、救命することが出来なかったが、2 症例目は集学的療法により完全寛解にいたることが可能であった。

免疫細胞療法としては、より成熟化させた peptide DC CTL 療法が最も有望であることが示唆された。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。

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。

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。個人情報化することによって個人の特長がで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。

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

C. 研究結果

1. 研究の背景

AIDS 指定疾患には 23 種類存在し、その中には日和見腫瘍に相当する疾患群が存在する。その代表例は脳原発悪性リンパ腫と非ホジキン悪性リンパ腫である。脳原発悪性リンパ腫はほぼ 100% の症例において EBV（Epstein-Barr Virus）との関連が認められており、非ホジキン悪性リンパ腫では 50 ～ 70% で EBV との関連が認められている。特に脳原発悪性

リンパ腫においては、抗 HIV 療法による免疫回復のみで脳原発悪性リンパ腫が消失した症例が報告されている。EBV 関連腫瘍と免疫との関連の重要性を示唆するものであった。

2003 年時点で、12 例の非ホジキン悪性リンパ腫において長期生存例は 1 例のみであった。この長期生存例は外科手術により腫瘍の殆どを切除可能であった症例であった。非常に予後不良の日和見腫瘍であった。

2. 免疫細胞療法の種類と方法

以下の種類の免疫細胞療法が 2 症例に対して施行された。由来細胞は一卵性双生児の健常者からの細胞とした。症例の HLA とそれに対応する EBV 関連 peptide が作成される順で以下の方法が施行された。

(1) CD3-LAK 療法

末梢血 PBMC (ドナー由来) を OKT-3 固層化フラスコで培養し、IL-2 を添加して増殖させた。非特異的免疫細胞療法と考えられる。

(2) 腫瘍 lysate DC CTL 療法

手術時に得た腫瘍を酵素で分解し、その分解物質を抗原として用いた。抗原提示細胞として樹状細胞 (DC) を利用し、CTL (Cytotoxic T lymphocytes) を誘導した。腫瘍細胞への特異的免疫細胞療法と考えられる。

(3) peptide DC CTL 療法

症例 HLA に適合する EBV 特異的 peptide を作成。これを抗原とした。抗原提示細胞として DC を利用したが、この DC の加工方法の違いにより DC(1) と DC(2) の方法が検討された。DC(2) は時に培養時のサイトカインとして IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE2 が

使用され、症例への投与方法としては皮下注射が施行された。(詳しくは江川の報告参照)

(4) 以下に症例 2 (HLA A24) peptide DC CTL 療法に使用された EBV 特異的 peptide を示す。

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

また免疫療法の効果を判定する方法として、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- γ 産生細胞数の検討を施行した (ELISPOT 解析)。

3. 実際の症例

● 症例 1

33 歳男性。初診時、CD4 71/mm³、血漿 HIV-RNA 量 4.2×10^4 copies/ml、血漿 EBVDNA 量 5×10^4 copies/ml であった。胃の生検より悪性リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma) と診断され stage IVB。小腸病変による腸閉塞を合併し、03 年 5 月 8 日には緊急手術 (小腸切除術) が施行された。臨床経過としては、化学療法・LAK/免疫療法・抗 HIV 療法を並行させて治療開始したが腫瘍の増殖のコントロールは不良であり、03 年 11 月には化学療法は断念となった (【図 1】参照)。

化学療法としては減量した CHOP と salvage 療法としての ESHAP 療法を施行したが腫瘍の反応が不良であり治療断念となった。HIV 療法としては

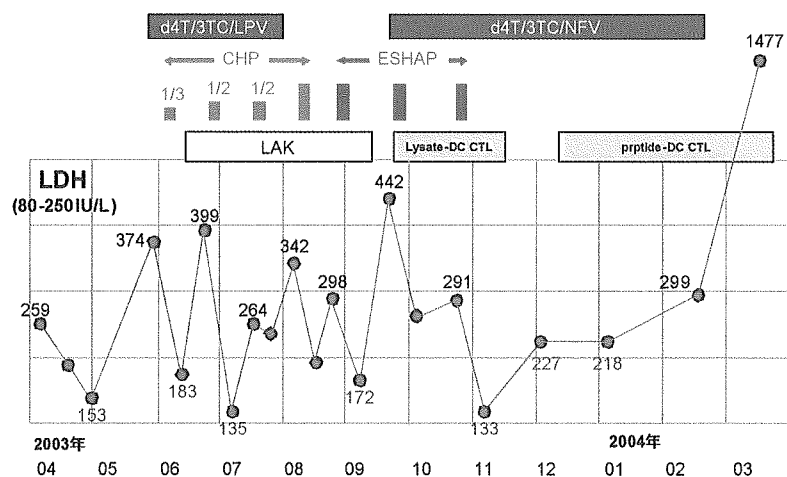


図 1. 症例 1 の臨床経過