

200800025A

平成 20 年度 厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業
(H19-エイズ一般-003)

HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリ
ンパ腫に対する多面的治療戦略開発に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 誠 治

(熊本大学エイズ学研究センター 教授)

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I.	総括研究報告書	
	HAART時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する 多面的治療戦略開発に関する研究	—————1
	岡田 誠治	
II.	分担研究報告書	
	1) エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引き作成	—————5
	味澤 篤	
	2) HAART時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫 に対する多面的治療戦略開発に関する研究 —日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化—	—————7
	永井 宏和	
	3) 日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と 日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化	—————11
	照井 康仁	
	4) エイズ合併リンパ腫の分子標的治療法開発に関する研究	—————17
	渡邊 俊樹	
	5) エイズ関連リンパ腫に対するスタチンとDHMEQの併用 療法の検討	—————25
	片野 晴隆	
	6) B細胞腫瘍化の主因であるEBVを標的にした治療法開発	—————31
	駒野 淳	
	7) EBウイルスによるリンパ腫発症モデルの開発	—————41
	藤原 成悦	
	8) エイズリンパ腫発症モデルと薬剤治療モデルの確立	—————47
	清水 則夫	
	9) エイズ関連悪性リンパ腫発症マウスモデルの確立	—————53
	岡田 誠治	
	(資料) エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引き	—————57
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	—————75

HAART時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する 多面的治療戦略開発に関する研究

主任研究者 岡田 誠治 熊本大学エイズ学研究センター予防開発分野 教授

研究要旨 エイズ関連悪性リンパ腫は世界的にも日本国内でも増加している。エイズリンパ腫は、治療困難例が多いこともあり、エイズ患者の長期予後を大きく規定するが、未だに標準的な治療法は確立していない。そこで、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の標準的治療法の確立と新規治療法の開発を目指して研究を行っている。本年度は、「エイズリンパ腫治療の手引き」の策定とエイズリンパ腫治療の日本全国レベルの多施設共同研究のプロトコール作成を行った。また、病態解析に基づいた治療薬のスクリーニングとエイズリンパ腫発症・治療モデルの開発を行った。今後、長期的視野に立ったエイズリンパ腫の多面的治療戦略を展開する。

研究分担者：

渡邊 俊樹

（東京大学大学院新領域創成科学研究科教授）

味澤 篤

（東京都立駒込病院 感染症科）

永井 宏和

（国立病院機構名古屋医療センター 部長）

藤原 成悦

（国立成育医療センター研究所 部長）

照井 康仁

（癌研究会癌研有明病院血液腫瘍科 癌化学療法センター臨床部 血液腫瘍科担当部長）

清水 則夫

（東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授）

片野 晴隆

（国立感染症研究所感染病理部 室長）

駒野 淳

（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）

研究協力者：

小田原 隆

（東京大学医科学研究所附属病院 講師）

上平 朝子

（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 医長）

四本 美保子

（東京医大附属病院臨床検査科 助教）

萩原 将太郎

（国立国際医療センター 血液内科 医長）

A. 研究目的

HAART導入後エイズが慢性疾患化した現在、エイズ関連悪性リンパ腫（以下エイズリンパ腫）はエイズ患者の長期予後を規定する最重要因子のひとつとなった。エイズリンパ腫は難治性・再発性であり、有効な標準的治療法は確立していない。従って、エイズリンパ腫の標準的な治療法の確立と治療抵抗性エイズリンパ腫に対する有効な新規治療法の開発は、エイズ対策として厚生労働行政上急務である。本研究では、エイズと悪性リンパ腫治療の最前線に立つ

エイズ治療専門医・血液化学療法専門医と基礎研究者が有機的に提携し、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の治療プログラムの確立と新規治療薬の開発を軸に多面的治療戦略を展開する。

B. 研究方法

研究は、相互に関連のある3つの大きな柱を軸に展開する。

柱1 日本人悪性リンパ腫治療最適化プログラムと新規サルベージ療法開発に関する研究

エイズリンパ腫は予後不良であり、海外で開発されたエイズリンパ腫治療プロトコールは、必ずしも日本人に適したものではない。そこで、日本におけるエイズリンパ腫の発生状況と治療状況を把握し、専門家により日本人に最適化された標準的治療法の「治療の手引き」を策定し、その普及を図る。合わせて標準的プロトコールを作成して、多施設共同治験を行う。また、病態解析に基づいた新規分子標的療法とサルベージ療法の考案と研究段階にある治療法の有効性を検討し、日本人エイズリンパ腫に有効な治療最適化プログラムを構築する。

柱2 エイズリンパ腫の分子病態解析

日本人エイズリンパ腫の臨床病理学および分子生物学的解析を通して、リンパ腫発生の分子メカニズムおよび化学療法耐性細胞出現の分子機構解明を試みる。また、予後因子として様々な遺伝子の関与を解析し、臨床にフィードバックする。マイクロアレイ等による分子病態解析・発症機序解析に基づいたエイズリンパ腫の新たな分子標的療法と発症予防法の開発を目指す。また、研究段階にある治療法(NF- κ B阻害薬、JAK・MEK阻害剤、Statin系薬剤、免疫療法等)の有効性を検討し、病態解析に基づいた新規分子標的療法と発症予防法の開発を目指す。

柱3 エイズリンパ腫再現マウスモデルの開発と治療法開発への応用

高度免疫不全マウス体内でヒト造血・免疫系を構築する系とリンパ腫細胞が生着する系(ヒト化マウス)を用いて日和見エイズリンパ腫発生を再現する「エイズリンパ腫再現マウスモデル」を樹立し、その分子病態の解析から新たな

治療法の開発及び治療法の標準化に資する。また、リンパ腫モデルマウスを用いた治療薬の評価法を確立する。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料及び動物を用いた研究では、各施設の必要な委員会の承認を得た上で、規則に従い実施する。ヒト臍帯血・末梢血・手術標本を使用した研究では、医師により本研究の趣旨を説明し、同意を得られた方のみ同意書に署名をいただいた上で試料を採取する。試料は匿名処理を行うため個人情報が流出することはなく、同意の撤回を可能にするなど人権擁護上の配慮を行っている。エイズ関連悪性リンパ腫の治療に関する多施設共同治験においては、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守してプロトコールを作成し、各共同臨床研究機関の倫理委員会の承認を得た上で、規則に従い実施する。

C. 研究結果

柱1 日本人悪性リンパ腫治療最適化プログラムと新規サルベージ療法開発に関する研究

平成19年度のエイズ拠点病院369施設、血液研修指定病院502施設(重複209施設)へのアンケート調査での結果、エイズリンパ腫の症例は53施設が経験していたが、ほとんど施設が1-2例の少数例で、そのような施設では治療法の選択に苦慮しており、標準的な治療法の確立と治療指針の策定を強く希望していた。そこで、味澤を中心としたワーキンググループにより「エイズリンパ腫治療の手引き」を作成した。岡田が日本血液学会で「エイズリンパ腫」についての教育講演を行い、日本エイズ学会では「エイズリンパ腫」のシンポジウムにおいて班員が発表を行うなど、研究成果の公開と普及に努めた。両学会で、「治療の手引き」を合計500部配布し、併せて専門家から意見聴取を行った。これらの意見をもとに「エイズリンパ腫の治療の手引き」改訂版を作成し、公開する予定である。

また、日本人エイズリンパ腫の最適化された治療プログラム作成のために全国規模の臨床治験を行うためのワーキンググループを立ち上げ、現在、エイズリンパ腫で最も多いび慢性大細胞性リンパ腫と治療抵抗性リンパ腫のプ

ロトコールを作成中である。平成 21 年度から臨床治験を開始する予定である。

柱2 エイズリンパ腫の分子病態解析

エイズリンパ腫と EBV 陽性 LCL 細胞株では、NF- κ B が強発現し NF- κ B 阻害剤が有効であることが確認された。また、エイズリンパ腫治療において Rituximab は有効であるが、非エイズリンパ腫において CD20 変異により耐性が生じること、CD5 発現例では治療成績が悪いことなどが報告された。保存検体を用いたマイクロアレイ解析を試みたが、検体の保存状態が悪く総合的な解析には適さないことが判明した。そのため、これらの検体を用いた解析方法の工夫と新たな検体収集システムの構築を計画している。

柱3 エイズリンパ腫再現マウスモデルの開発と治療法開発への応用

新たな高度免疫不全マウスを用いてヒトの造血・免疫系を構築したマウス（ヒト化マウス）を樹立した。「ヒト化マウス」に EBV を感染させることにより、潜伏感染とリンパ増殖性疾患のモデルが確立した。また、リンパ腫細胞株を移植したマウスに NF- κ B 阻害剤などを投与するエイズリンパ腫治療モデルを樹立した。

D. 考察

エイズ拠点病院・血液研修指定病院へのアンケート調査により、日本においてもエイズリンパ腫症例は増加していること、各施設が治療に苦慮していることが判明した。治療指針を提示して欲しいとの要望が多かったため、エイズリンパ腫に対する「治療の手引き」を作成した。日本人エイズリンパ腫の症例が少ないため、世界の状況を参考に現時点で最良と思われる治療法を示したが、今後症例を蓄積して、日本人に最適化された治療法を継続的に提示していくことが必要である。また、エイズリンパ腫の日本全国規模の多施設共同研究を開始するための体制を整え、エイズリンパ腫で最も多いび慢性大細胞性リンパ腫と治療抵抗性リンパ腫のプロトコールを作成中である。多施設共同研究により治療上の問題点が抽出され、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の標準的治療法

の確立に大きく寄与することが期待できる。また、エイズリンパ腫の病態解析とそれに基づいた新規治療法の開発にはエイズリンパ腫の検体収集が必要であり、多施設共同研究はその母体として機能することも期待される。

エイズリンパ腫発症には EBV の関与が指摘されていることから、EBV によるエイズリンパ腫発症マウスモデルと EBV 陽性 LCL 細胞株を作成し、病態解析とこれらを標的とした治療薬開発を行っている。近年 EBV が関与しないエイズリンパ腫が増加していることから、EBV 陽性例と陰性例の遺伝子プロファイルの比較を行い、エイズリンパ腫の再分類と病態解明に資することが必要である。また、マウスモデルは、エイズリンパ腫研究と治療法開発において非常に有用なツールとなりうる。今後 3 つの柱を中心に、長期的視野に基づいたエイズリンパ腫の多面的治療戦略を展開する

E. 結論

日本人に最適化されたエイズリンパ腫の治療プログラムの確立と新規治療薬の開発を軸に多面的治療戦略を展開している。本年度は、エイズリンパ腫の「治療の手引き」を策定し、全国レベルの多施設共同研究の実施体制を整えた。また、エイズリンパ腫発症・治療マウスモデルの作成、分子標的療法としての rituximab の有用性と危険性、NF- κ B 阻害剤の有用性についての知見を得るなどの研究の進展が認められた。

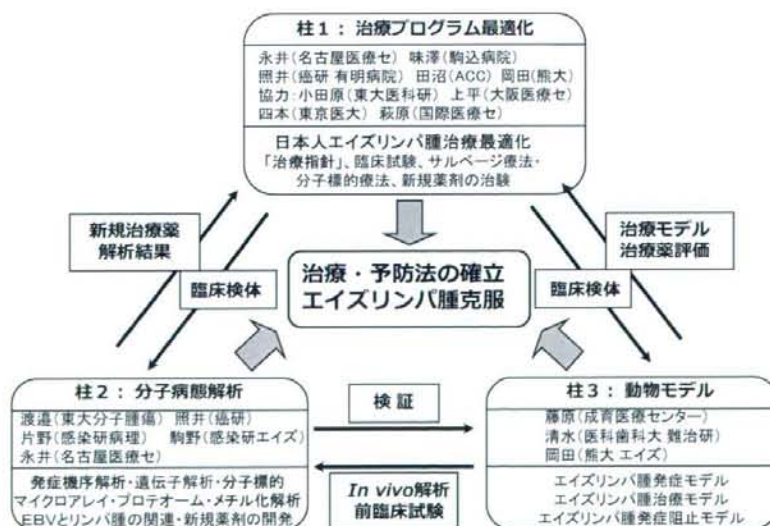
F. 健康危機情報

該当なし

図1. 日本人エイズ関連悪性リンパ腫の克服

	柱1：最適化治療プログラム [永井、味澤、田沼、照井、岡田] 研究協力：小田原(医科研病院)、上平(大阪医療セ)、四本(東京医大)、萩原(国際医療セ)	柱2：分子病態解析 [渡邊、照井、片野、駒野、永井] 研究協力：竹内(癌研有明病院)	柱3：動物モデル [藤原、清水、岡田]
19年度	・日本人エイズリンパ腫の現状と治療成績検討 ・分子標的療法(抗CD20/22)	・がん関連遺伝子のメチル化解析 ・遺伝子多型(CD20, FcγIIIa)解析 ・リンパ腫発症時の遺伝子解析 ・臨床検体の収集計画	・EBV持続感染系の確立 ・エイズリンパ腫モデルマウス ・薬物治療モデルの開発
20年度	・日本人エイズリンパ腫の治療指針の作成 ・日本人エイズリンパ腫の最適化治療プログラムの臨床試験開始 ・サルベージ療法の提案	・EBVとエイズリンパ腫の関連 ・分子標的療法の機序と副作用解析 ・リンパ腫発症時の遺伝子解析	・EBVによるリンパ腫発症モデル ・エイズリンパ腫モデルを用いた新規治療法の開発
セミナー開催による研究成果の公開と社会還元			
21年度	・び慢性大細胞性リンパ腫の全国規模の臨床試験開始 ・サルベージ療法の臨床試験開始 ・「治療の手引き」の公開	・エイズリンパ腫発症機序の分子生物学的解析 ・エイズリンパ腫中央診断と検体収集システムの構築 ・病態解析に基づく新規治療薬のデザイン	・エイズリンパ腫発症モデルマウスの確立と新規分子標的薬を用いた治療モデルの開発 ・エイズリンパ腫発症阻止マウスモデルの作成
シンポジウム開催による研究成果の公開と社会還元			
成果： エイズリンパ腫治療法の確立、新規治療薬の開発			
長期的成果： 患者救済と医療費削減			

図2. 研究ネットワーク



エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引き作成

分担研究者 味澤 篤 都立駒込病院感染症科 部長

研究要旨 Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) に関連した非ホジキン悪性リンパ腫 (AIDS-related non-Hodgkin lymphoma, ARNHL) の経験のない血液科医師および human immunodeficiency virus (HIV) 担当医師を対象にエイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引きを作成した。ARNHL が非 HIV 感染者における非ホジキン悪性リンパ腫とどのような点で異なり、その治療方針はどうあるべきかを総論的に記載した。

A. 作成目的

UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) の推定では、現在世界で 3,300 万人の HIV-1 感染者がおり、年間 250 万人が新たに感染し、210 万人が死亡している (2007 年末)。一方、本邦における HIV-1 感染者は増加の一途をたどり 2007 年度の HIV-1 感染者とエイズ患者の新規発生件数は 1500 件となっている。近年、多剤併用療法 (HAART: Highly active antiretroviral therapy) の普及により HIV-1 感染者の日和見感染の発現頻度は減少し、HIV-1 感染者の予後は劇的に改善しているが、代わって悪性腫瘍の合併増加が問題となっている。

AIDS 非ホジキン悪性リンパ腫 (AIDS-related non-Hodgkin lymphoma, ARNHL) は AIDS 指標疾患として位置づけられており、HIV-1 感染者の 5-20% は生涯にエイズリンパ腫を合併するため、その長期予後を規定する最重要因子とされている。永井らは、全国の血液研修施設とエイズ拠点病院へのアンケート調査を行い、回答のあった 349 施設中 143 施設 (41%) で ARNHL を経験していると報告した (Int J Hematol 87:442, 2008)。また、HIV-1 感染の診断がされおらず ARNHL で発症して血液科を訪れる「いきなりエイズ」の症例もあることから、ARNHL は血液専門医が遭遇する可能性の高い疾患となっている。しかし、ARNHL の施設当たりの症例経験数が少なく、難治性再発性でエイズ特

有の合併症も多く、標準的な治療法が確立していないことから、本邦における ARNHL の標準的治療法の確立は急務である。

B. 作成方法

手引きは、厚生労働省エイズ対策研究事業「HAART 時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する多面的治療戦略開発に関する研究」班のワーキンググループで、ARNHL の経験の少ない血液専門医と HIV-1 感染者担当医を対象に作成した。特に ARNHL 治療時に注意が必要な抗 HIV-1 薬と抗悪性腫瘍薬の併用上の注意や ARNHL の特徴、エイズ特有の合併症に重点をおいて解説した。

第 1 回ワーキンググループ会合 (2008 年 4 月 12 日) で、たたき台を作成しワーキンググループで検討することに決定した。2008 年 6 月 18 日に Ver 0.1 を作成しワーキンググループに配布し、意見を求めた。それをもとに 2008 年 9 月 29 日 Ver 0.5 を作成しワーキンググループに配布した。2008 年 10 月 11 日、血液学会での AIDS 関連悪性リンパ腫の教育講演で Ver 0.5 を 200 部配布し意見を求めた。第 2 回ワーキンググループ会合も行った。集まった意見をもとに、Ver 0.9 を作成し、2008 年 11 月 27 日、日本エイズ学会のエイズ関連悪性リンパ腫シンポジウムで Ver 0.9 を 300 部配布し、再度意見を求めた。第 3 回ワーキンググループ会合も

行った。集まった意見をもとに最終版を作成した。

C. 研究結果

別紙に示すとおり、エイズ関連非ホジキンリンパ腫治療の手引き Ver 1.0 を作成した。

D. 考察

ARNHL は標準治療が確立しておらず、明確なガイドラインはない。British HIV Association の「HIV Associated Malignancies」、National Cancer Institute のホームページ「AIDS-Related Lymphoma Treatment」 および National Comprehensive Cancer Network の「Non Hodgkin's Lymphoma」を参考に治療手引きを作成した。今後の国内外でのエビデンスを基に、修正していく必要がある。したがって今回の手引きは、ARNHL が非 HIV 感染者における非ホジキン悪性リンパ腫とどのような点で異なり、その治療方針はどうあるべきかを総論的に記載した。

E. 結論

日本国内での ARNHL の診療・治療に有用と考えられる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 学会発表

(国内学会)

- 1) 味澤篤, AIDS関連非ホジキンリンパ腫におけるHAART併用EPOCH療法、第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008年11月26日-28日、大阪

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし。

HAART時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する 多面的治療戦略開発に関する研究

分担研究者 永井 宏和 国立病院機構名古屋医療センター 部長

研究要旨 HAART が導入され AIDS defining illness としての日和見感染の頻度は減少してきたが、悪性リンパ腫（以後エイズリンパ腫）は減少傾向がない。エイズリンパ腫の治療法の確立はエイズ全体の診療向上に大きく寄与すると考えられる。本邦におけるエイズリンパ腫の治療は施設間格差が大きく、今後の治療戦略上、多施設共同臨床試験の実施が急務である。エイズリンパ腫は血液内科、感染症科など診療体制が施設により異なることもあり、多施設共同臨床試験を行うには、施設間でのコンセンサスの形成・試験体制の整備・データセンターの設置などが重要な課題となる。平成 20 年度は臨床試験を開始する基盤の構築を行った。これにより、複数の臨床試験プロトコールの開始が可能になった。

A. 研究目的

HAART が広く導入され、AIDS-defining illness (ADI)としての日和見感染の頻度は劇的に減少してきている状況において、エイズリンパ腫は ADI として最も頻度の高い疾患となってきた。しかし、標準的な初発例に対する治療法、再発例に対する救済療法は確立していない。エイズ特異的な免疫力の低下もあり、通常の化学療法の適応は注意を要すると考えられている。エイズリンパ腫に対する治療法は欧米から多くの報告があるが、標準治療の確立に至っておらず、本邦では症例報告レベルの研究がなされているのみである。平成 19 年度に当研究班で全国のエイズリンパ腫の実態調査を施行した。エイズ拠点病院 369 施設、血液研修指定病院 502 施設（重複 209 施設）を対象としアンケート調査をおこなった（回答率約 60%）。この結果により、エイズリンパ腫に対する治療法の施設間での差が大きいこと、HAART を含む支持療法も統一したものがないことが明らかになった。今後エイズリンパ腫に対する治療法の確立に向けた研究が必要である。本邦初となるエイズリンパ腫の多施設共同臨床試験を開始すべく

平成 20 年度は研究体制の整備、プロトコール作成を行った。

B. 研究方法

1. 多施設共同臨床試験を高品質に行うためにデータセンターの整備・生物統計家の協力体制を確立する。
2. びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL)はエイズリンパ腫の中で最も頻度が高い疾患群である。今回の多施設共同研究はエイズ関連の DLBCL を対象としプロトコール作成を行う。

（倫理面への配慮）

現在、プロトコール作成が進行中である。今後、当臨床試験が実施される場合には各施設での IRB での審査が必要となる。

C. 研究結果

1. データセンターの整備
多施設共同臨床試験はプロトコール作成・症例報告書作成・症例登録の一元化・データクレンジング・臨床試験実施時の安全性の検証・データ解析などを高品質で行わなくてはならないため、データセンターを完備しなければ実施不能である。当研究にお

いては、国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センターにデータセンターを設置し、専属のデータマネージャーを選定した。また、生物統計学による論理的検証が必須であるため、生物統計家の協力が得られる体制を整えた。

2. 研究体制の整備

エイズリンパ腫は施設により担当診療科が異なることが多い。多くは血液内科または感染症科が担当している。平成 19 年度の調査研究から、単施設でエイズリンパ腫を多く診療している施設が明らかとなった。それらの施設に共同研究を提案し、参加して頂ける事となった。これにより、本邦で発症するエイズリンパ腫の約半数以上、東京・大阪・名古屋の大都市圏の殆どを網羅出来る体制となった。

3. 治療プロトコルの作成

治療法：

現在エイズ関連 DLBCL に対する標準的な治療法は確立していない。欧米からは m-BACOD、CHOP 療法、Rituximab 併用 CHOP 療法、EPOCH 療法、Rituximab 併用 EPOCH 療法などの報告がある。本研究では非エイズ aggressive lymphoma の標準療法であり、安全性も確立している CHOP 療法を採用した。Rituximab の併用は奏効率を向上することが明らかになっているが、エイズ症例における安全性は確立していない。本試験では支持療法を高レベルで均一に行うことを条件として Rituximab 併用を行うこととした。

HAART は必ず併用とする。

また試験デザインとしては single arm phase II study とする。

Primary endpoint:

奏効率

Secondary endpoint

完全奏効率、2 年生存率、2 年無増悪生存率、有害事象発生割合

以下の条件を満たす症例を対象とする。

1. DLBCL であることが病理組織学的に証明されている。
2. HIV 陽性である。

3. 腫瘍細胞に CD20 抗原が陽性である。
4. 測定可能病変を有する。
5. 年齢が 20 才以上 69 才以下である。
6. 腫瘍臓器の機能が保たれている。
7. PS(ECOG)が治療開始時 0-2 である。
8. 化学療法の既往がない。
9. 本試験参加について文書による同意が本人から得られている。

研究期間と予定症例数

症例登録期間：3 年間

追跡調査期間：2 年間

総研究期間：5 年

予定症例数：42 症例

症例数算定の統計学的根拠

検出力 90%、 α エラー 0.1 として null proportion を 0.5、alternative proportion を 0.7 とすると 39 症例が必要。事後不適格例を 1 割見込み 42 例と設定した。

D. 結論

平成 19 年度の調査研究により、エイズリンパ腫の治療が施設間で差が大きいことが判った。このことは、本邦において当疾患の認識が低く、また本邦からのエビデンスが欠如しているためと考えられる。本邦での治療研究によるエビデンスの蓄積が急務である。当研究は本邦初の多施設共同臨床試験としてエイズリンパ腫の治療法開発を目指している。本年度は臨床研究を高い品質で施行するための infrastructure の整備としてデータセンターの設置、研究グループの拡大、治療プロトコルのコンセンサス形成、プロトコル作成を行った。次年度は本臨床試験の登録を開始する予定である。

E. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Nagai H.](#), Iwasaki N, Odawara T, Okada S. Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. Int J Hematol. 87: 442-443, 2008
- 2) [Nagai H.](#), Yano T, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Hanada S, Kawano F, Sunami K, Inoue N, Sawamura M, Nishiura T, Hotta T, Horibe H.

- Remission induction therapy containing rituximab markedly improved the outcome of untreated mature B cell lymphoma. *British J Haematol.* 143: 672-680, 2008
- 3) Kubota T, Moritani S, Yoshino T, Nagai H, Terasaki H
Ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with polyclonal hypergammaglobulinemia. *Am J Ophthalmol.* 145:1002-1006, 2008
- 4) Terasawa T, Lau J, Bardet S, Couturier O, Hotta T, Hutchings M, Nihashi T, Nagai H.
Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for Interim Response Assessment of Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Systematic Review. *J Clin Oncol.* in press, 2009
- 5) 永井宏和
ホジキンリンパ腫 がん薬物療法学—基礎・臨床研究のアップデート—
日本臨床, 67: 764-770, 2009
- 6) 永井宏和
再発または難治性多発性骨髄腫におけるレナリドマイドの役割
医薬ジャーナル, 44: 113-118, 2008
- 7) 永井宏和
濾胞性リンパ腫—悪性リンパ腫 update in 2008
内科, 102: 293-299, 2008
- 8) 岡田誠治, 永井宏和, 味沢篤
エイズ関連リンパ腫の現状と治療戦略
臨床血液, 49: 206-214
- 9) 永井宏和
ホジキンリンパ腫
Cancer Treatment Navigator (中川和彦編)、メディカルビュー社、pp206-207, 2008
2. 学会発表 (国際学会)
- 1) Nagai H, Hagiwara K, Hamaguchi M, Hotta T.
p57KIP2 gene methylation is useful to detect minimal residual disease in diffuse large B cell lymphoma. 10th International Congress on Malignant lymphoma. (Lugano Switzerland) June 4-7, 2008.
- 2) Nagai H, Yano T, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Kawano F, Hanada S, Sunami K, Ikeda H, Sawamura M, Nishiura T, Hotta T, Horibe K.
Remission induction therapy containing rituximab improved the outcome of untreated DLBCL especially at poor risk of R-IPI- a retrospective analysis. The 32th World Congress of the International Society of Hematology, (Bangkok, Thailand) October 19-23, 2008 (国内学会)
- 1) 永井宏和, 岩崎奈美, 小田原隆, 岡田誠治.
本邦でのAIDS-related lymphomaの診療実態調査. 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
- 2) 塚崎邦宏, 渡辺隆, 吉村健一, 木下朝博, 鏡味良豊, 伊藤国明, 小椋美知則, 加藤晴美, 山口素子, 黒澤光俊, 笠井正晴, 飛内賢正, 鈴木孝世, 薄井紀子, 正木康史, 末岡栄三郎, 張高明, 永井宏和, 安藤潔, 大西一功, 畑裕之, 吉田功, 松田信, 前田嘉治, 向井清, 中村栄男, 大島孝一, 堀田知光, 下山正徳. 多施設共同臨床試験併合解析による末梢T/NK細胞性リンパ腫の新たな予後予測モデル (JCOG0108A) 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
- 3) 萩原和美, 小栗佳代子, 堀田知光, 永井宏和.
癌抑制遺伝子としてのPROX1の機能解析. 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
- 4) 鈴木康裕, 横澤敏也, 萩原彰人, 青木恵津子, 加藤千明, 大橋春彦, 堀田知光, 濱口元洋, 永井宏和.
高齢者急性骨髄性白血病における救済化学療法としてのGemtuzumab Ozogamicin (GO). 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都

- 5) 小島勇貴、萩原彰人、森谷鈴子、鈴木康裕、横澤敏也、青木恵津子、大橋春彦、市原周、濱口元洋、堀田知光、永井宏和. HIV陰性HHV-8陰性のprimary effusion lymphomaの一例. 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
- 6) 萩原彰人、鈴木康裕、青木恵津子、森谷鈴子、間宮均人、加藤千明、横澤敏也、大橋春彦、堀田知光、市原周、濱口元洋、永井宏和. HAARTと強力化学療法を併用したAIDS関連Burkitt lymphoma/leukemiaの3例. 第70回日本血液学会総会、2008年10月10-12日、京都
- 7) 萩原彰人、森谷鈴子、鈴木康裕、青木恵津子、加藤千明、横澤敏也、大橋春彦、堀田知光、市原周、濱口元洋、永井宏和. AILTと診断されたMTX関連リンパ増殖症(MTX-LPD)の1例. 第48回日本リンパ網内系学会総会、2008年6月13, 14日、札幌
- 8) 永井宏和. 悪性リンパ腫の臨床—エイズリンパ腫と非エイズリンパ腫(シンポジウム). 第22回日本エイズ学会学術集会、2008年11月26-28日、大阪
- 9) 永井宏和. 末梢血幹細胞移植の今日的課題、臨床応用の現況と将来 悪性リンパ腫(シンポジウム)、第52回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会、2008年10月25日、名古屋.

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化

分担研究者 照井 康仁 癌研究会 癌研有明病院・血液腫瘍科
癌化学療法センター・臨床部 血液腫瘍科担当部長

研究要旨 日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化のため、1) B細胞性リンパ腫における CD20 変異の解析、2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブの効果とウイルス活性化に関する影響、3) EB ウイルス感染および CD4/CD8 比におけるリンパ腫症例の解析、4) エイズ患者および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。B細胞性リンパ腫の標準治療におけるリツキシマブの耐性化やウイルス活性化の機序に迫る臨床的基礎データの集積を行なうことで、エイズ関連リンパ腫治療プログラムの最適化に寄与した。

A. 研究目的

エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) は、年々その感染者が増加しているが、HAART 療法のような有効な薬剤治療法が開発され、HIV-1 感染者の治療状況は大幅に改善された。生存が改善される一方で、HIV に関連した疾患、特に悪性リンパ腫の発症は懸念されるところである。そのため、日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化は急務である。

HIV 関連リンパ腫のうち、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse Large B cell Lymphoma, DLBCL) は EB ウイルス感染との関連で注目されている。また、HIV 非感染の非ホジキンリンパ腫の中で最も多い組織型は DLBCL であり、治療の標準化もされていることから HIV 関連リンパ腫治療モデルの一つと成り得ることが想定される。

DLBCL の標準治療には、B 細胞の細胞表面にある CD20 分子を標的とした抗体医薬であるリツキシマブと CHOP 療法 (エンドキサン、ドキシゾリン、オンコピン、ブレドニゾロン) の

併用療法があり、CHOP 療法との比較でその奏効が有意に改善することが報告されている。

リツキシマブ治療の有害事象として最も多く見られるものは、アレルギーを主体としたインヒュージョン・リアクションであり、その他はほとんど見られない。しかしながら、最近になって遅発性の好中球減少や免疫グロブリンの低下など免疫系への影響が少なからず報告されるようになってきている。また、リツキシマブ治療への耐性化も問題となっており、その機序と対応策は解決すべき事柄である。

我々は、日本人リンパ腫治療成績検討、分子標的療法の確立と日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化のため、1) B細胞性リンパ腫における CD20 変異の解析、2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブの効果とウイルス活性化に関する影響、3) EB ウイルス感染および CD4/CD8 比におけるリンパ腫症例の解析、4) エイズ患者および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。B細胞性リンパ腫の標準治療におけるリツキシマブの耐性化やウイルス活性化の機序に迫る臨床的基礎データの集積を行なうことで、エイズ関連リンパ腫治療プログラムの最適

化に寄与することを試みた。

B. 研究方法

1) B細胞性リンパ腫における CD20 変異の解析

B細胞性リンパ腫の50症例のリンパ節検体を浮遊細胞にしてMACSによりCD19陽性細胞を採取する。それらの細胞からRNAを抽出し、RT-PCRによりCD20cDNAを合成した。そのcDNAの塩基配列をシーケンサーにより決定した。

変異遺伝子のクローニングと発現型の再構成実験を行ない、変異遺伝子の意義について検討を行った。

また、遺伝子解析による変異群間のリツキシマブ治療に関する奏効性と無増悪期間の比較を統計学的に行なった。

2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブの効果とウイルス活性化にする影響

C型肝炎ウイルスに感染したB細胞性リンパ腫患者において免疫グロブリン、HCV mRNA、肝機能検査(GOT, GPTなど)を施行し、その推移を比較検討した。

3) EBウイルス感染およびCD4/CD8比におけるリンパ腫症例の解析

HIV非感染リンパ腫におけるEBV感染をLMP免疫染色や血清学的検査で評価し、HIV非感染リンパ腫におけるCD4/CD8比、CD4細胞数との関連を解析した。

4) エイズ患者および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析

材料と方法:EBV陽性エイズ関連DLBCL 10例、EBV陰性エイズ関連DLBCL 10-20例、および非エイズ患者に発症したEBV陰性DLBCL 10例の凍結生検体(5mm角程度)を下記要領にて採取し、凍結保存する。すべての検体はインフォームドコンセントのもと採取される。

検体採取、保存法:生検、または剖検時に採取したリンパ腫組織と思われる組織を滅菌シャーレの上に載せ、滅菌ハサミまたはナイフで5mm角以下になるよう細切する。組織片を1.5mlの血清チューブに移し、個人情報がわからないように番号付けをしてそのまま-80℃で保存する。

DNA マイクロアレイ:凍結保存された検体か

らRNAを抽出し、RT反応後、蛍光ラベルし、DNAマイクロアレイ(アフィメトリクス社、またはマイクロダイアグノースティクス社)を用いて遺伝子プロファイルを決定する。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料(末梢血・リンパ節検体等)を用いた研究は、癌研究会倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施している。また、遺伝子解析においてはゲノム等解析倫理委員会の承認を得た上で「癌研究会倫理指針」に従い実施している。

1) 研究対象者に対する人権擁護上の配慮

研究に用いる末梢血、生検検体は、他の研究目的には使用しない。末梢血、生検検体は匿名処理を行うため、個人情報が流出することはない。また、同意書に署名後も試料採取・使用までの期間に同意を撤回することを可能としている。

2) 研究方法による研究対象者に対する利益・不利益

本研究により、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

3) 危険性の排除

生検検体はリンパ節を切り出した後で、通常のリンパ節生検同様に採取するため、患者の身体への影響はない。また、リンパ節の採取は患者の状態が安全な時のみに限るとし、リンパ節採取によって患者の状態の危険性が増す可能性を排除している。

末梢血は、医師が問診した上で、検査技師、看護師、あるいは医師が採血している。採血に伴う身体への危険性はありうるが、これは通常の診療行為を越えるものではない。一回の採取量は10-100mlであり、採血量は、本人の了解のもとに通常の採血と同様に決定している。

4) インフォームドコンセントに係わる状況

リンパ節採取に関しては、協力医療機関の医療スタッフ(医師)が本研究の趣旨を説明し、リンパ節生検手術の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいている。この際、説明を行った医療スタッフ名を明記し、同意書は協力医療機関において厳重に保管している。

末梢血採取に関しては、癌研究会癌研有明病

院のスタッフ(医師)が本研究の趣旨を説明し、末梢血提供の同意を得られた方のみ同意書に署名していただいている。この際、説明を行った医師名を明記し、同意書は癌研有明病院において厳重に保管している。

C. 研究結果

本年度は以下の研究を行なった。

1) B細胞性リンパ腫におけるCD20mutationの解析

抗CD20抗体抵抗性におけるCD20変異の関与についての報告はないが、我々は、B細胞性リンパ腫の50症例のCD20遺伝子解析において、C末端欠損型(8%)、細胞外ドメイン型(2%)、膜貫通ドメイン型(2%)、早期終止型(10%)の4つの変異型を見出した。特にC末端欠損型ではCD20の細胞表面発現が正常型に比べて有意に低下していた。抗CD20抗体に対する奏効率では、正常型とC末端欠損型でCR率、非CR率に有意差はみられなかったが、C末端欠損型で非CR率が高い傾向があった。抗CD20抗体療法後の無増悪期間中央値が正常型とC末端欠損型でそれぞれ3ヶ月と7ヶ月でlog-rank試験で有意差がみとめられた。この結果はClinical Cancer Researchで2009年に掲載予定である。

2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブの効果とウイルス活性化に関する影響

リツキシマブ併用化学療法はB細胞性リンパ腫の標準治療であるが、HBV感染症例でのリツキシマブ投与は抗ウイルス薬の投与などをしながら、HBVの再活性化や肝機能障害の悪化には十分な観察が必要とされる。一方、HCV感染症例の場合はそのような配慮は必要としないとされているため、十分な解析がなされていない。我々は、HCV感染症例でB細胞性リンパ腫を併発し、リツキシマブ投与後のHCV RNA量とIgG量の追跡をおこなった。リツキシマブ投与後、HCV RNA量は5例中5例で増加がみられ、そのうち1例で肝機能障害がみとめられた。また、IgG量の減少も同時にみとめられ、HCVウイルス活性化との関係が示唆された。HCVやHBVに限らず、様々なウイルス感染で同様の現象がみられる可能性があり、注意が必要である。

3) EBウイルス感染およびCD4/CD8比におけるリンパ腫症例の解析

エイズ関連リンパ腫はその多くがEpstein-Barr virus (EBV)陽性のdiffuse large B cell lymphoma (DLBCL)であり、EBVによる日和見腫瘍と考えられてきたが、HIV非感染リンパ腫におけるEBV感染をLMP免疫染色や血清学的検査、血中EBV-DNA量で評価した。現在、平成19年度同様、症例を重ねているところである。また、HIV非感染リンパ腫におけるCD4/CD8比、CD4細胞数との関連に関しても平成19年度同様、症例を集めているところである。

4) エイズ患者および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子発現プロファイルの解析

エイズ(AIDS, acquired immunodeficiency syndrome)はHIV感染により宿主が免疫不全に陥り、さまざまな日和見感染症を合併する疾患である。エイズではカポジ肉腫やリンパ腫など悪性腫瘍が合併する頻度が高いことが知られており、特にエイズ関連リンパ腫は患者の予後を左右する重要な合併症である。エイズ関連リンパ腫はその多くがEpstein-Barr virus (EBV)陽性のdiffuse large B cell lymphoma (DLBCL)であり、EBVによる日和見腫瘍と考えられてきた。しかし、近年のわれわれの調査では、highly active anti-retroviral therapy (HAART)導入以降、EBVの陽性率は著しく下降しており、現在ではエイズ関連リンパ腫の約半数がEBV陰性のリンパ腫(とくにDLBCL)である。エイズ患者におけるEBV陰性リンパ腫の発症機構は不明な点が多く、その解析はされていない。エイズ関連リンパ腫は治療抵抗性のものが多く、現在も重要な死因の一つである。エイズ関連リンパ腫の病態が明らかにされ、病態に応じた治療法が開発されることが望まれる。そこで、遺伝子プロファイルによるエイズリンパ腫の再分類と病態の解明を行う際に、エイズ患者に発症したリンパ腫を非エイズ患者に発症したリンパ腫と比べることは重要であると考えられる。

そこで、エイズリンパ腫および非エイズ患者に発症するリンパ腫の遺伝子プロファイルを

比較し、エイズリンパ腫の再分類と病態の解明を行うために、竹内賢吾（癌研究会 癌研究所 病理部 研究員）、片野晴隆（国立感染症研究所 感染病理部 室長）渡邊俊樹（東京大学大学院 新領域創成科学研究科 病態医療科学分野 教授）との共同研究で以下のような計画を行い、当院遺伝子解析倫理委員会にて承認され、10例中8例が登録された。

D. 考察

B細胞性リンパ腫細胞内のmicrosatellite instabilityによる遺伝子変異原性を検討したが、高い遺伝子変異原性はみられなかった。しかしながら、リツキシマブの標的分子であるCD20分子の変異が見られており、細胞内での遺伝子変異の頻度が高くなっている可能性がある。HIV感染患者のHIVウイルス粒子の変異頻度も高いことが知られているが、HIV感染者へのリツキシマブ治療時の易耐性も考慮する必要があると考えられた。

また、リツキシマブ治療においては、IgG量の減少もHCVウイルス活性化と同時にみとめられており、リツキシマブによるIgG減少がHCVウイルス活性化と関係していることが示唆された。すなわち、HCVやHBVに限らず、HIVなどの様々なウイルス感染でもリツキシマブによるIgG低下現象とウイルス活性化という同様の現象がみられる可能性があり、注意が必要である。

現在、DLBCLに関するEBウイルス感染およびCD4/CD8比におけるリンパ腫症例の解析を行っているが、これもHIV関連リンパ腫の病態とリツキシマブ治療の意義を明らかにするものである。

E. 結論

1) B細胞性リンパ腫におけるCD20mutationの解析

平成20年度に引き続き、B細胞性リンパ腫におけるCD20mutationに関して解析するが、CD20mutationの簡便検出法を開発することで臨床応用を行なう必要がある。実際には、PCR法を応用した高性能で簡便な遺伝子変異検出法を開発し、薬剤奏効性と予後と

の関連を解析する。

1. 変異体データベースにより、変異高頻度領域を決定し、その領域に対する蛍光標識PCRプライマーを設計、作製する。
 2. informed consent 済みの症例検体からのDNAを用いてPCRを行い、PCR産物を得る。
 3. 正常型および変異型PCR産物DNAの変性温度の違いを解析する。
 4. 変性温度の違いによる蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer; FRET) を利用して、遺伝子変異を高感度で検出する。
 5. 分子標的薬剤における薬剤奏効性と予後に関して上記の変異体との関連について統計的手法を用いて解析する。
- 上記のシステムを構築する事でHIV関連および非関連リンパ腫におけるリツキシマブ耐性機序を解明する。

2) EBウイルス感染およびCD4/CD8比におけるリンパ腫症例の解析

平成20年度に引き続き、HIV非感染リンパ腫におけるEBV感染をLMP免疫染色や血清学的検査、血中EBV-DNA量で評価し、200症例の解析を行なう必要がある。また、HIV非感染リンパ腫におけるCD4/CD8比、CD4細胞数との関連に関しても解析する。この解析でHIV関連および非関連リンパ腫の類似点、相違点を探究する事ができると考えられる。

- 3) HIV感染および非感染びまん性大細胞型B細胞リンパ腫における遺伝子プロファイリング
- 4) に関する研究 IRBによる承認後、以下の研究を
- 5) 継続する。
- 6) 継続する。
- 7) 継続する。

1 材料と方法：EBV陽性エイズ関連DLBCL 10例、EBV陰性エイズ関連DLBCL 10-20例、および非エイズ患者に発症したEBV陰性DLBCL 10例の凍結生検体（5mm角程度）を下記要領にて採取し、凍結保存する。すべての検体はインフォームドコンセントのもと採取される。

2 検体採取、保存法

生検、または剖検時に採取したリンパ腫組織と思われる組織を滅菌シャーレの上に載せ、滅菌ハサミまたはナイフで5mm角以下になるよう細切する。組織片を1.5mlの血清チューブに移し、個人情報かわからないように番号付けをしてそのまま-80℃で保存する。

3 DNA マイクロアレイ

凍結保存された検体から RNA を抽出し、RT 反応後、蛍光ラベルし、DNA マイクロアレイ (アフィメトリクス社、またはマイクロダイアグノースティクス社) を用いて遺伝子プロファイルを決定する。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ennishi D, Terui Y, Yokoyama M, Mishima Y, Takahashi S, Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K. Increased incidence of interstitial pneumonia by CHOP combines with rituximab. *I. J. Hematology. Int J Hematol.* 87(4):393-7, 2008.
- 2) Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M, Asai H, Mishima Y, Terui Y, Takahashi S, Komatsu H, Ikeda K, Yamaguchi M, Suzuki R, Tanimoto M, Hatake K. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol* 19(11):1921-6, 2008.
- 3) Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Taniyama A, Kuniyoshi R, Takizawa T, Kimura S, Ozawa K, Hatake K. Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the

resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Sci.* 2008 Sep 22, in press.

4) Ennishi D, Yokoyama M, Terui Y, Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K. Does rituximab really induce hepatitis C virus reactivation? *J Clin Oncol.* 26(28):4695-6, 2008.

5) Ennishi D, Yokoyama M, Terui Y, Asai H, Sakajiri S, Mishima Y, Takahashi S, Komatsu H, Ikeda K, Takeuchi K, Tanimoto M, Hatake K. Soluble interleukin-2 receptor retains prognostic value in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP (RCHOP) therapy. *Ann Oncol.* 20(3), 526-533, 2008.

6) Terui Y, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sakurai T, Mishima Y, Kuniyoshi R, Taniyama A, Yokoyama M, Sakajiri S, Takeuchi K, Watanabe C, Takahashi S, Ito Y, Hatake K. Identification of CD20 C-Terminal Deletion Mutations Associated With Loss of CD20 Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2009, in press.

7) Mishima Y, Sugimura N, Matsumoto-Mishima Y, Terui Y, Takeuchi K, Asai S, Ennishi D, Asai H, Yokoyama M, Kojima K, Hatake K. An imaging-based rapid evaluation method for complement-dependent cytotoxicity discriminated clinical response to rituximab-containing chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2009, in press.

和文

1) 照井康仁: 抗CD22抗体の基礎と臨床 がん分子標的治療の最先端 医学のあゆみ 224(1) 27-31, 2008

2) 照井康仁：心配しないでいいですよ 再発・転移多発性骨髄腫 真興交易（株）医書出版部 畠清彦編集，2008.

3) 照井康仁：抗CD22 抗体の基礎と臨床 医学のあゆみ 224(1) 27-31, 2008.

4) 照井康仁、畠清彦：1. 血液領域の癌の外来治療 I. 各科領域における外来化学療法がんの外来化学療法のマネジメント 改訂版 畠清彦編 マネジメントシリーズ 28-37, 2008

5) 畠清彦、横山雅大、照井康仁：抗体医薬：CD20 抗体、CD52 抗体 抗体エンジニアリングと抗体医薬 Medical Science Digest 34(5) 26-28, 2008.

6) 照井康仁：限局期アグレッシブリンパ腫に対する放射線照射の意義 血液・腫瘍科 57(1) 21-24, 2008

7) 照井康仁：悪性リンパ腫に対する化学療法-臨床医に求められる基礎知識 悪性リンパ腫と闘う：治癒を目指すために必要な治療手段 内科 102(2) 271-274, 2008.

8) 照井康仁：IV-3 血液疾患の研究- トランスレーショナルリサーチ- 腫瘍内科オリエンテーション 畠清彦編 医薬ジャーナル p140-147, 2008.

9) 照井康仁、畠清彦：4.6 造血器腫瘍 第V部 がんの分子標的治療薬のトランスレーショナルリサーチ がんの分子標的治療 鶴尾隆編 南山堂 387-391, 2008

10) 照井康仁：ibritumomab tiuxetan (90Y標識マウス型CD20mb) エビデンスに基づいた癌化学療法ハンドブック 2009 有吉寛監修 メディカルレビュー社, 512-514, 2008

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

エイズ合併リンパ腫の分子標的治療法開発に関する研究

分担研究者 渡邊 俊樹 東京大学大学院新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻病態医療科学分野 教授

研究協力者： 片野晴隆（分担研究者：国立感染症研究所感染病理部）

石田尚臣、三宅在子、Nazanin Dabagmanesh（東京大学大学院新領域科学研究科メディカルゲノム専攻病態医療科学分野）

堀江良一（北里大学医学部）

梅澤一夫（慶應義塾大学理工学部）

研究要旨 エイズ合併リンパ腫のモデルとして、PEL 細胞株と B リンパ腫由来細胞株を用いて以下の実験を行った。(1) PEL 細胞株を用いて、恒常的な NF- κ B を標的とした DHMEQ の作用機序の解析を継続した。DHMEQ 処理の有無による遺伝子発現の変化について発現アレイ解析を用いて包括的に解析した。その結果、IL-6, Myc, CCR5, NFKB1 などの標的遺伝子の発現抑制と、アポトーシスや細胞周期停止にかかわる遺伝子の発現更新が確認された。(2) B 細胞リンパ腫細胞株に対する PKC β 阻害剤の作用を検討した。in vitro では細胞増殖、アポトーシス誘導を検討した。その結果、PKC β 阻害剤は B 細胞株に細胞死を誘導したが、その感受性から 2 群に分かれた。Namalwa 細胞は EB 陰性 B-JAB 細胞と同様の高い感受性を示したが、Raji 細胞は LCL と同様に相対的な耐性を示した。これらの細胞は NF- κ B 阻害剤 DHMEQ に対する感受性には差がなかったが、Raji 細胞と LCL では、PKC β 阻害剤による NF- κ B 活性の阻害が認められなかったことから、NF- κ B 活性阻害の有無が感受性を規定している可能性が示された。(3) エイズリンパ腫サンプル 20 例から RNA を抽出して遺伝子発現プロファイル解析を試みたが、解析の結果 RNA の degradation のため解析には適さない事が明らかになった。

A. 研究目的

HIV 感染者はエイズ発症期に、ニューモシス肺炎やサイトメガロウイルスなどの日和見感染症の他にカポジ肉腫、リンパ腫などの悪性腫瘍が合併する。近年の highly active anti-retroviral therapy (HAART) の導入により、多くの日和見感染症は減少する傾向にあるが、カポジ肉腫、リンパ腫は逆に発症率としては増加傾向にある（平成 18 年度 厚生労働科学研究

費 エイズ対策研究事業「重篤な日和見感染症の早期発見と最適治療に関する研究」報告書）。エイズに合併するリンパ腫は (AIDS-related lymphoma, ARL) 一般に進行が早く、コントロールが困難で致死率も高い。このようなリンパ腫のほとんどは diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) であり、その約半数に Epstein-Barr virus (EBV) の感染が認められる。また、2001 年の WHO 分類で、HHV8/KSHV の感染が診断基

準とされた Primary Effusion Lymphoma (PEL)は、その約80%が HIV 感染者に認められる

(Kobayashi et al., Act Haematol 2007;117:132)。ARLの中で PEL が占める割合は5%以下とされており(Chen et al., The oncologist 2007;12:569)、頻度は少ないが、エイズ患者に高発し、50%生存期間 6.2ヶ月と言う予後不良のウイルス性の悪性リンパ腫である(Boulanger et al., J Clin Oncol 2005;23:4372)。

HIV 感染者の5~20%の例でエイズ合併リンパ腫(ARL)を発症するとされ、3-4%においてはその発症が AIDS の診断につながっている(Little et al., JAMA 2001;285,1880)。HAARTの導入後 ARL の発症は減少しているが、最も減少したのは中枢神経原発のリンパ腫である。ARLは依然としてエイズ患者の予後を左右する重大な合併症であり、その治療法の開発は急務である。

我が国において ARL の約半数を占める EBV 陽性リンパ腫は、PEL と共に、NF- κ B が恒常的に活性化している事が知られている。本研究においては、この恒常的活性化 NF- κ B を治療の分子標的として応用する事を検討した。既に報告されている論文において用いられている薬物は NF- κ B 活性化シグナル伝達の key player である IKK の阻害剤や多彩な機能を有する proteasome 阻害剤を用いたものである。本研究に用いる阻害剤 DHMEQ は p65RelA の核内移行阻害と言う、特異な作用を持つ事から、その作用は大変期待される。実際、分担研究者らは既に NF- κ B の恒常的活性化を特徴とする種々のリンパ性悪性腫瘍においてその作用を検証し、有効性を報告してきている。

本研究では、前年度に、EBV 陽性 ARL のモデルとしては、健康人末梢血単核球 (PBMC) に EBV を感染させて樹立した LCL を用い、PEL については細胞株を使用して、NF- κ B 阻害剤 DHMEQ による NF- κ B 活性抑制効果および細胞死誘導能を検討した。さらに、EBV 感染初期の PBMC に DHMEQ を作用させ、LCL 樹立に至る過程での DHMEQ の効果を検討した。

今年度は、PEL 細胞に対する NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の遺伝子発現に与える影響をマイクロアレイを用いて検討した。さらに、既に臨床治

験が始まっている、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ種の PKC β 阻害剤の作用を参考に、種々の PKC 阻害剤の EBV 陽性 B リンパ腫細胞株に対する作用を in vitro で検討した。最後に、エイズリンパ種の発現アレイ解析を試みたが、予備実験において、サンプル RNA の劣化が確認されたことから、適切な検体が得られるまで解析を保留する事とした。

B. 研究方法

(1) PEL細胞に対する NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の作用

PEL 細胞の培養液中に DHMEQ を添加し、細胞性遺伝子の発現変化を Agilent 社の発現アレイ解析システム(Whole Human Genome Oligo Microarray Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA))を用いて検討した。解析には GeneSpring GX (Agilent)を用いて Gene Ontology 解析を行った。

(2) B細胞リンパ腫細胞に対する PKC 阻害剤の作用の検討

EBV 感染 B 細胞株(Namalwa, Raji,)および LCL 細胞を用いた。これらに PKC 阻害剤 Staurosporine を各種の濃度及び時間で作用させ、細胞の生存率、アポトーシス誘導、シグナル伝達、NF- κ B 活性などを検討した。また、これらの細胞の NF- κ B 阻害剤に対する感受性を DHMEQ を用いて検討した。

(3) エイズリンパ腫の遺伝子発現アレイ解析
エイズリンパ腫検体 20 例(都立駒込病院 10 検体、国立感染症研究所 10 検体)を用いて、Trisol (Invitrogen)を用いて Total RNA を抽出し、その quality を Bio Analyzer (Agilent)を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認(平成 19 年 6 月 4 日 承認番号 107022)を得た上で、同研究所の動物実験施設内感染実験区 (P2 施設)で行われた。

C. 研究結果

(1) PEL細胞に対する NF- κ B 阻害剤 DHMEQ の作用