

- 4) 浦野 恵美子,奥長浩之、森川裕子、駒野 淳. DNA J/HSP40 Co-chaperone familyによるHIV-1複製抑制. 第56回日本ウイルス学会学術集会2008年、岡山
- 5) 駒野 淳、浦野 恵美子、刈屋 祐美、二橋 悠子、市川 玲子、濱武 牧子、深觸 秀輔、森川 裕子、芳田 剛、小柳 義夫、山本直樹. T細胞におけるHIV-1抵抗性遺伝子のスクリーニング - Brd4 C末端ドメインの同定とその機能解析. 第56回日本ウイルス学会学術集会2008年、岡山
- 6) 駒野 淳、濱武 牧子、青木 徹、浦野 恵美子、二橋 悠子、山本 直樹. BiFC/BRETによる癌転移増強分子CXCR4のLigand非依存的な多量体形成の解析. 第67回日本癌学会学術総会、2008,名古屋
- 7) 村上 努、大隈 和、田中礼子、仲宗根正、濱武牧子、駒野 淳、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹. KRH-3955は経口投与可能な高活性抗X4 HIV-1阻害剤である. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪
- 8) 青木 徹、清水佐紀、浦野恵美子、濱武牧子、寺嶋一夫、玉村啓和、村上 努、森川裕子、山本直樹、駒野 淳. HIV-1 Pre55Gagのミリストイル基非依存性ウイルス粒子産生と感染性. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪
- 9) 高橋良明、村上 努、駒野 淳、古田 篤司、田中礼子、山本直樹、田中勇悦. 宿主由来タンパクOX40L,OX40のHIV-1感染に与える影響. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪
- 10) 浦野 恵美子,奥長浩之、森川裕子、山本直樹、駒野 淳. Inhibition of HIV-1 replication by co-chaperone DNA J/HSP40 protein family. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、大阪
- 11) 小林明子、芳田 剛、駒野 淳、小柳義夫. レンチウイルスバクターを用いた抗HIV因子のスクリーニングとその解析. 第22回日本エイズ学会学術集会・総会、2008,大阪
- 12) Makiko Hamatake, Yuko Futahashi, Toru Aoki, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Detection of ligand-independent higher-order oligomerization state of a G-protein-coupled receptor CXCR4 by BiFC/BRET. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸
- 13) Emiko Urano, Yumi Kariya, Makiko Hamatake, Hidesuke Fukazawa, Yuko Morikawa, Yoshio Koyanagi, Naoki Yamamoto, Jun Komano. P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 inhibits HIV-1 replication through restricting Tat-mediated enhancement of LTR promoter activity. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸
- 14) Toru Aoki, Saki Shimizu, Emiko Urano, Makiko Hamatake, Kazuo Terashima, Hirokazu Tamamura, Tsutomu Murakami, Yuko Morikawa, Naoki Yamamoto, Jun Komano. Substitution of the myristoylation signal of HIV-1 Pr55Gag with PLC delta 1 pleckstrin homology domain results in fully infectious pseudovirion production. BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008,神戸
- 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
なし

EB ウイルスによるリンパ腫発症モデルの開発

分担研究者 藤原成悦 国立成育医療センター研究所・母児感染研究部・部長

研究要旨 エイズリンパ腫の主原因となる EB ウイルス (EBV) の感染モデルマウスを作製し、リンパ腫発症メカニズムの解析と治療法の開発を進めている。本年度は、モデルマウスの不顕性 EBV 持続感染について解析した。その結果、持続感染状態のマウスでは、EBV がやや大型の芽球様 B 細胞に感染すること、少なくとも一部の細胞は EBNA1, EBNA2, LMP1 を発現する latency III 型 EBV 遺伝子発現を示すことから、ヒトにおける EBV 潜伏感染とは異なる側面があることが示唆された。一方、EBV 感染後に OKT3 抗体投与により T 細胞を除去すると、マウスの生存期間が短縮されることから、マウスモデルに誘導される T 細胞免疫応答が防御的な役割を果たすことが示された。

A. 研究目的

エイズ患者に発生するリンパ腫（エイズリンパ腫）の約半数は、EB ウイルス (EBV) が原因となる。EBV は *in vitro* でヒト B リンパ球を不死化しリンパ芽球様細胞株を樹立する能力を持つ。このリンパ芽球様細胞に相当する細胞は健常者においては、EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞により速やかに除去されるが、エイズ患者では免疫監視機構破綻のため無制限に増殖し、時にリンパ腫発症に至る。従って、EBV によるヒト B リンパ球増殖の誘発機構解明はエイズリンパ腫発症機構の解明および治療法開発に必須のステップとなる。また、個体レベルでのリンパ腫発症機構の解析や新規治療法の評価には動物モデルが必要である。EBV 関連リンパ腫の小動物モデルとしては従来 *scid* マウスが用いられてきたが、このマウスではウイルス特異的免疫応答が誘導されないことが欠点であった。

NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ ^{null} マウス (NOG マウス) は我が国で最近開発された免疫不全マウスであり、造血幹細胞の移植により、EBV の主な標的となる B 細胞の他、T 細胞、NK 細胞、マクロファージ、樹状細胞など主要な免疫系細胞の発生が認められる (ヒト化マウス)。これまでの我々の研究により、ヒト化 NOG マウスには EBV が感染し、EBV 特異的 T 細胞応答が誘導されることが示されている。主に高レベルの EBV 感染によりリンパ腫が発生すること、低レベルの感染では、約半数のマウスがリンパ腫を発症せず不顕性持続感染となり長期生存することが分かっている。ヒトの EBV 関連エイズリンパ腫では、まず EBV が潜伏感染を確立したのちに HIV-1 が感染し、免疫不全の進行とともにリンパ腫を発症するという経過をとる。従って、マウスの持続感染状態をヒト健常者の EBV 潜伏感染と同等のものと仮定すれば、持続感染マウスに HIV-1

を感染させ免疫不全を誘導すればEBV陽性リンパ腫が発生すると推測され、それがエイズリンパ腫モデルとして最適であると考えられる。

本年は、EBV持続感染状態のマウスについて、感染細胞の同定とEBV遺伝子発現の解析を行った。また、感染ヒト化マウスからT細胞を除去する実験を行い、T細胞の防衛的役割について検討した。

B. 研究方法

1. 臍帯血

東京臍帯血バンクに提供された臍帯血のうち、血液量不足のため移植に使用できないものを利用した。

2. NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ c^{null}マウス

NOD/Shi-*scid*/IL-2R γ c^{null}マウス（以下、NOGマウス）はNOD/Shi-*scid*マウスと、IL-2受容体コモン γ 鎖ノックアウトマウスを掛け合わせたもので、ヒト造血幹細胞の移植に最も適した免疫不全マウスの一つである。雌6~8週齢のNOGマウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所無菌飼育室で飼育・実験を行った。

3. 臍帯血造血幹細胞の分離と移植

臍帯血からFicoll比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34⁺アイソレーションキット（Miltenyi Biotec）あるいはStemsepキット（ステムセルテクノロジー社）を用いてCD34陽性HSCを分離した。1×10⁴~1.2×10⁵個のCD34陽性細胞を、尾静脈内投与により移植した。その後、フローサイトメトリーにより末梢血、骨髄、脾臓、胸腺などからヒトCD45、CD19、CD3陽性細胞を検出し、それぞれヒトリンパ球、ヒトB細胞、ヒトT細胞分化の指標とした。

4. EBV感染実験

EBVは、Akata細胞の培養上清を0.45 μ mフィルターを通過させたのちに尾静脈内に接種した。

5. 病理学的解析

EBV感染マウスの組織はホルマリン固定、パラフィン包埋、ヘマトキシリン-エオジン染色により観察した。EBV感染細胞の同定は、EBER in situ hybridizationとCD20の二重染色により行った。

6. EBV遺伝子発現の解析

EBV遺伝子発現はRT-PCR法、免疫化学染色、in situ hybridization法により解析した。

7. T細胞除去実験

ヒト化マウスに10²TD₅₀のEBVを感染させ、3週間後にT細胞表面マーカーCD3に結合するOKT-3抗体（2.0~2.5 μ g/mouse）を週4~5回の間隔で静脈内投与した。このマウスの生存曲線をOKT3を投与しない対照と比較し、その差をLogrank法により検定した。

（倫理面への配慮）

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、ヒト臍帯血細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量の不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者およびバンク利用者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿

名化を行い、個人情報の保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療センターおよび東京脐帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. EBV 持続感染マウスの経過観察

昨年度の研究では、EBV 感染量が 10 TD₅₀ (50% transforming dose) 以下の場合、約半数のマウスはリンパ腫を発症せず不顕性持続感染状態となることが分かった。末梢血 EBV DNA 量は感染後 5~10 週にいったん上昇した後検出感度以下に低下した。一部のマウスでは、末梢血 EBV DNA の上昇と低下が繰り返された。このような EBV DNA 量の変化にやや遅れて末梢血 CD8 細胞が増減を繰り返すマウス個体も認められた(図 1)。T 細胞が EBV に応答して増殖し、防御作用を有することを示唆する結果と考えられる。持続感染マウスを安楽死させ主要臓器を観察したところ、一部で脾臓が若干肥大していた以外は、肉眼的な異常は認められなかった。

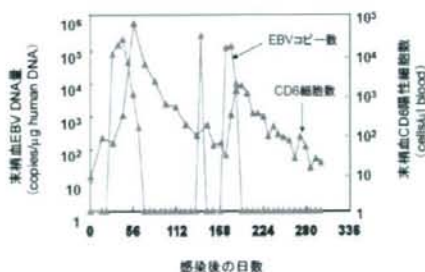


図 1 不顕性持続感染状態のマウスにおける末梢血中 EBV DNA 量および CD8 細胞数の変化。

2. 不顕性持続感染における標的細胞の解析

ヒトの EBV 潜伏感染においては、EBV は記憶 B 細胞に感染し、ほぼ全てのウイルス遺伝子発現を停止させることにより、免疫監視機構から免れている。EBV 持続感染マウスにおける感染細胞を EBER in situ hybridization と免疫化学染色により検討したところ、EBV は CD20 抗体陽性で細胞質が比較的大きい、やや大型の B 細胞に感染していることが分かった(図 2)。記憶 B 細胞は通常小型細胞とされているので、形態的には異なっている。



図 2. 不顕性持続感染マウス肝臓における EBV 感染細胞。CD20 の免疫化学染色と EBER in situ hybridization を同時に行った。

3. 不顕性持続感染における EBV 遺伝子発現

不顕性持続感染マウスの脾臓から RNA を精製し RT-PCR 法により EBV 遺伝子発現を解析したところ、EBNA1, EBNA2, LMP1 の発現が認められた(図 3)。これは、latency III 型の EBV 遺伝子発現を示す細胞が含まれることを示すが、健康成人における EBV 潜伏感染では、EBV 感染記憶 B 細胞がほとんど全ての遺伝子発現を停止させている(latency 0)のとは異なっている。しかし、マウスでも latency 0

の細胞が含まれる可能性も残されており、今後も検討を続ける予定である。

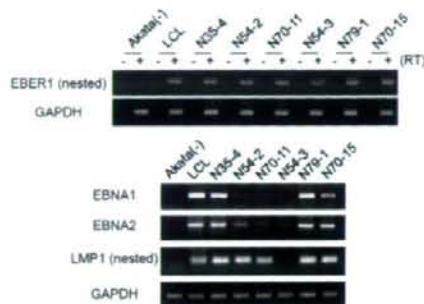


図 3. 不顕性持続感染マウス脾臓における EBV 遺伝子発現. RT-PCR 法による解析。

4. EBV 感染マウスの生存に対する T 細胞除去の影響

これまでに ELISPOT 法などにより EBV 感染細胞で刺激すると IFN- γ を産生する CD8 細胞が検出されている。この EBV 特異的 T 細胞が EBV 感染に対して実際に防御的な役割を果たしているかどうかを検討するために、感染マウスに対して OKT3 抗体投与実験を行った。 10^2 TD₅₀ の EBV を感染させた 3 週間後に T 細胞表面マーカー CD3 に結合する OKT-3 抗体を静脈内投与した。これにより末梢血 CD3 陽性 T 細胞数は著明に減少した。マウスの生存曲線を解析したところ、OKT-3 投与群は、対象と比較して有意に生存期間が短かった (Logrank test で $P=0.008$) (図 4)。

D. 考察

ヒト化マウスに誘導される不顕性持続感染が、ヒトの EBV 潜伏感染と同等の状態であれば、このマウスにさらに HIV を感染させ免疫不全を誘導することにより EBV 陽性リンパ腫を発症させようと考え

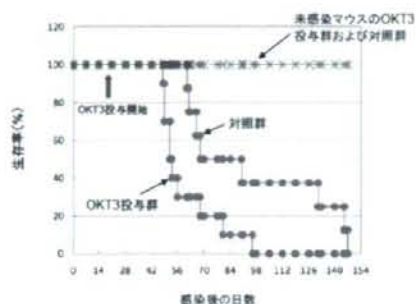


図 4. EBV 感染マウスの生存に対する OKT-3 抗体の作用. EBV 感染後 3 週間で OKT-3 投与を開始し、投与群と対照群のあいだで生存曲線を比較した。

られる。発症過程を再現するという観点からは、これがもっとも厳密な意味でのエイズリンパ腫モデルといえる。本年度は、マウスの不顕性 EBV 持続感染状態を調べ、ヒトの EBV 潜伏感染状態との異同を比較した。ヒト EBV 潜伏感染では、EBV は形態的には小型リンパ球に相当する記憶 B 細胞に感染し、ほとんど全ての EBV 遺伝子発現を停止させることにより、免疫監視機構から逃れている。一方マウスにおける持続感染状態では、EBV は比較的細胞質が大きいやや大型の B 細胞中に検出された。また遺伝子発現を解析したところ、EBNA1, EBNA2, LMP1 の発現が認められ、少なくとも一部の細胞は latency III 型の遺伝子発現パターンをとっていることが推測された。これらの結果は、持続感染マウスにおける EBV 感染細胞は、実際のヒト潜伏感染とは異なる状態にあることを示唆している。一方、OKT-3 抗体投与実験では、感染マウスで誘導される EBV 特異的 T 細胞免疫応答が、実際に EBV に対する防御機構として働くことを示唆しており、持続感染状態のマウスに HIV-1 をさらに感染させ免疫不全

を誘導すれば、EBV 陽性リンパ腫が発症する可能性が高いことが実証された。

一方、EBV 単独で生じるリンパ腫も、組織像 (diffuse large B-cell lymphoma)、細胞表面マーカー発現 (活性化 B 細胞パターン)、EBV 遺伝子発現 (latency III 型) の全てにおいてエイズリンパ腫と一致しているため、こちらも疾患モデルとして有用であると考えており、これを用いての治療薬開発を開始している。

E. 結論

EBV 持続感染状態のマウスでは、EBV がやや大型の芽球様 B 細胞に感染すること、EBNA1, EBNA2, LMP1 を発現する latency III 型 EBV 遺伝子発現を示す細胞を含むことから、ヒトにおける EBV 潜伏感染とは異なる側面があることが示唆された。一方、EBV 感染後に OKT-3 抗体投与により T 細胞を除去すると、マウスの生存期間が短縮されることから、マウスにおいても T 細胞免疫応答が防御的な役割を果たすことが示唆された。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N., and Fujiwara, S. A new humanized mouse model of EBV infection reproducing persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J. Infect. Dis.* 198: 673-682, 2008.

2) Nakamura, H., Ishii, C., Suehiro, M., Iguchi, A., Kuroda, K., Shimizu, K., Shimizu, N., Imadome, K., Yajima, M., and Fujiwara, S. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Encoded by Epstein-Barr Virus Induces Expression of the Putative Oncogene Bcl-3 Through Activation of the Nuclear Factor- κ B. *Virus Res.* 131: 170-179, 2008.

3) Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, and Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* in press.

2. 著書

1) 藤原成悦. 動物モデル. 「EB ウイルス」(高田賢蔵 監修). 診断と治療社、東京、pp88-92、2008.

3. 学会発表

1) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、服部高明、渡辺睦房、富満弘之、横田隆徳、水澤英洋、今留謙一、藤原成悦. 化学療法後に運動神経優位の末梢神経障害を認めた慢性活動性 EB ウイルス感染症. 第 18 回 EB ウイルス感染症研究会. 2008 年 3 月 8 日、東京.

2) 新井文子、廣田理子、長尾俊景、三浦修、今留謙一、藤原成悦. Capizzi 療法 AraC 投与時に高度の発熱、心不全を合併した慢性活動性 EB ウイルス感染症成人例 3 例の臨床経過の検討. 第 18 回 EB ウイルス感染症研究会. 2008 年 3 月 8 日、東京.

3) 矢島美彩子、今留謙一、中川温子、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、伊藤守、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続

感染. EB ウイルス研究会. 2008 年 7 月 18 日、米子.

4) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、逸見千寿香、清水則夫、山本直樹、藤原成悦. ヒト化 NOG マウスモデルにおける EB ウイルス持続感染. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. 2008 年 10 月 26 日、岡山.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

エイズリンパ腫発症モデルと薬剤治療モデルの確立

分担研究者 清水 則夫 東京医科歯科大学難治疾患研究所
フロンティア研究室ウイルス治療学 准教授

研究要旨

エイズ関連悪性リンパ腫には化学療法が有効であるが、再発率が高く多くの場合治療抵抗性となるため、化学療法剤と違った作用機作を持つ薬剤の開発が求められている。我々はエイズリンパ腫の約半数が EBV ウイルス (EBV) 陽性であることに着目し、EBV が存在することにより選択毒性を発揮する薬剤の探索を行った。その結果、EBV が持つチミジンキナーゼ (EBV-TK) により特異的にリン酸化される薬剤 (2'-fluoro-4'-thio-arabinofuranosyl-methyl-uracil) を見出し、EBV 感染細胞株に対する特異的かつ強力な増殖抑制効果があることを確認した。今後 EBV 陽性エイズ関連悪性リンパ腫の新しい治療薬としての有効性を動物実験により確認していく予定である。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) の感染者は年々増加しており、2008 年に新たに判明した HIV 感染者・エイズ患者は 1545 人と報告され、6 年連続最多を更新している (厚生労働省エイズ動向委員会発表)。一方、近年導入された薬剤治療法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy: HAART 療法) の導入により HIV-1 感染者の予後は大幅に改善され、現在では HIV-1 感染症は治療可能な慢性疾患となった。しかし、HAART 療法によっても感染者から HIV-1 を完全に排除することは不可能であり、抗ウイルス剤の長期服用による副作用や薬剤耐性 HIV-1 の出現など多くの問題が生じている。さらに、エイズ関連悪性リンパ腫 (エイズリンパ腫) の発症率は HAART 療法導入後もあまり下がっておらず、また再発率が高く再発後は治療抵抗性となるため、現在でもエイズ患者の長期的予後を脅かす最大の要因となっている。エイズリンパ腫患者全体に占める EBV 陽性例は減少傾向にあるものの、依然半数近くのエイズリンパ腫は EBV 陽性である。我々は EBV 陽性エイズリンパ腫の治療法を確立するため、EBV が存在することによ

り選択毒性を発揮する薬剤の検索を行った。その結果、EBV がコードするチミジンキナーゼ (EBV-TK) により特異的にリン酸化され細胞毒性を発揮する薬剤 (2'-fluoro-4'-thio-arabinofuranosyl-methyl-uracil: YMS-95145) を見出した (京都大学ウイルス研究所児玉栄一博士との共同研究)。従来、EBV-TK 遺伝子は早期遺伝子に分類され、EBV 陽性エイズリンパ腫のような EBV 潜伏感染細胞に発現するか否か詳細な検討はなされていない。本研究では、様々な EBV 感染細胞株の EBV-TK 遺伝子発現の解析とそれら細胞株に対する YMS-95145 の効果を確認することを通じて、YMS-95145 のエイズリンパ腫に対する治療薬としての可能性を検討することを目的に研究を行った。

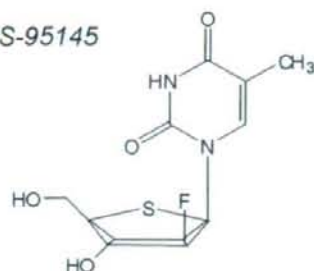
B. 研究方法

1. 抗ウイルス剤

今回使用した YMS-95145 は、ヤマサ醤油株式会社により合成、供給されたものを使用した。また、コントロールとして AZT, BVaraU, BVDU, GCV, ACV を使用した。YMS-95145 の構造式を以下に

示す。

YMS-95145



2. EBV-TK 導入細胞の増殖を抑制する薬剤の探索

EBV 感染細胞の増殖抑制を指標に薬剤の検索を行った。ヒトゲノム由来および EBV ゲノム由来のチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子 (hu-TK or EBV-TK) を pCIneo ベクター (薬剤耐性マーカーとサイトメガロウイルスのプロモーターおよび polyA シグナルを持つ: プロメガ) にそれぞれクローニングした。

それぞれのプラスミドを TK 遺伝子を欠損しているヒト骨肉種細胞由来の 143BTK(-)細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞を各種薬剤存在下で培養を行うことにより hu-TK 導入細胞には毒性を示さず、EBV-TK 導入細胞に毒性を示す薬剤の探索を MTT アッセイにより行った。

3. EBV 陽性細胞株

EBV 陽性細胞株に対する増殖抑制効果を測定するため、EBV 陽性 B 細胞株 (B95a, NC37)、EBV 陽性 NK 細胞株 (KAI3, SNK-6, SNK-10, YT-A1)、EBV 陽性 T 細胞株 (SNT-8, SNT-15, SNT-16)、コントロールとして EBV 陰性 T 細胞株 (H9, Jurkat, PM-1, SupT1) を使用した。

4. EBV-TK 遺伝子発現の定量

EBV-TK は EBV ゲノム BamHIX 断片上の左向きのオープンリーディングフレーム BXLFI にコードされていることが明らかとなっているため、BXLFI 遺伝子の中に下記のような RT-PCR 用のプライマー・プローブを設計した。

Primer F: CGCATCGGTTCAGGGACTAC

Primer R: GTGTGGGAAAGACTACTATGCTGAATC

Probe : 6FAM-TCAGGTCCCAAAAGACGCCTTC-
AAA-iowaBlack

RNA 抽出: QIAGEN RNeasy mini kit により抽出した。

DNaseI 処理: RNA 抽出後、TAKARA DNaseI で 37°C15 分間処理し、再度 QIAGEN RNeasy mini kit にてクリーンアップした。

RT-PCR: 下記の条件で RT-PCR を行った。

RNA solution	1 μ l
X2 Buffer	10 μ l
10 μ M Primer Mix	1 μ l
4 μ M Probe	1 μ l
RT-taq polymerase	0.5 μ l
H ₂ O	6.5 μ l

Total	20 μ l
-------	------------

RT-PCR Reaction

RT reaction	50°C	20 分
Denature	95°C	15 分
PCR (50Cycle)	95°C	0 秒
	60°C	30 秒

PCR (DNaseI 処理後の残存 DNA 確認)

RNA solution	1 μ l
AB gene X10 Buffer	2 μ l
10 μ M Primer Mix	2 μ l
4 μ M Probe	1 μ l
AB gene taq polymerase and anti-taq high	0.2 μ l
20mg/ml BSA	0.5 μ l
H ₂ O	12.3 μ l

Total	20 μ l
-------	------------

PCR Reaction

Denature	95°C	0 秒
PCR (45Cycle)	95°C	0 秒
	60°C	20 秒

(倫理面への配慮)

研究にはヒト臍帯血を移植したマウス (ヒト化マウス) 由来の試料を一部使用した。ヒト化マウスの作成に当たっては、以下の点に留意した。

1. 臍帯血の使用に関しては、国立感染症研究所、日本大学医学部および東京臍帯血バンクの倫理委員会の承認を受け、規則に従い実施した。
2. 臍帯血の採取は、あらかじめ医師を通じて妊

産婦に研究内容を説明し、文書による承諾を得た上で行った。実際の採取は産婦人科の医師が行い、匿名処理を行うなど研究者には必要以上に提供者の情報が伝わらないよう留意した。また、臍帯血は他の研究目的には使用しないため、直接提供者が医学上の利益・不利益を得ることはない。

3. 動物実験は、「動物愛護の精神」を遵守し、極力動物の苦痛軽減を配慮して行った。放射線照射、細胞移植、採血、剖検の際は、必ず腹腔より十分量のネプタールを注入し、動物が眠っていることを確認してから行っている。これは動物実験における実験処置に対する倫理基準のカテゴリーB（動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験）レベルの実験に相当する。

C. 研究結果

1. EBV-TK発現細胞に対する薬剤の効果

実験に使用した薬剤（YMS-95145, AZT, BVaraU, BVDU, GCV, ACV）のヒト骨肉種細胞由来143BTK(-)細胞に対する細胞毒性 CC50 値（50%細胞毒性濃度）は何れも 100 μ M 以上であり、また hu-TK 導入細胞に対する効果も 100 μ M 以上だった。EBV-TK 導入細胞に対する効果は、YMS-95145 以外は 100 μ M 以上だったのに対して YMS-95145 は 0.11 μ M と際立った低値を示し、CC50 値を 50%有効濃度 EC50 値で割った有効係数 SI 値（Selectivity Index）は 2700 以上と非常に高値を示し、YMS-95145 は EBV-TK 陽性細胞に選択的に細胞毒性を示す非常に有望な薬剤であることが示された。

2. EBV陽性細胞株に対するYMS-95145の効果

YMS-95145 の EBV 陽性細胞株に対する効果を検討したところ、B 細胞系の B95a, NC37, NK 細胞系の EBV 陽性 NK 細胞株 KAT3, SNK-6, SNK-10, YT-A1, EBV 陽性 T 細胞株 SNT-8, SNT-15, SNT-16 に対する CC50 は何れも 10 μ M 以下だったが、EBV 陰性のコントロール細胞株 H9, Jurkat, PM-1, SupT1 に対する CC50 は何れも一桁多い 100 μ M 以上であり、YMS-95145 が EBV 陽性細胞株に対して選択的増殖抑制効果を持つことが示され、治療薬候補になりうることが示唆された。

3. EBV-TK 遺伝子発現の解析

EBV 陽性あるいは陰性細胞株と EBV 感染あるいは非感染ヒト化 NOG マウスの組織における EBV-TK 遺伝子発現を検討した。その結果は下記の通りで、EBV 陽性サンプルは全てすべて EBV-TK 遺伝子発現が陽性だった。

Sample	EBV genome	EBV-TK (copies/ μ g RNA)
SNK-6	+	2.0 x 10 ³
SNT-8	+	2.5 x 10 ²
SNK-10	+	1.5 x 10 ²
マウス spleen	+	2.0 x 10 ³
マウス liver	+	4.2 x 10 ³
マウス PBMC	+	2.2 x 10 ³
KYG1	-	Negative
Huh-7	-	Negative
PHK160b	-	Negative
マウス spleen	-	Negative
マウス liver	-	Negative
マウス PBMC	-	Negative

D. 考察

1. ヘルペスウイルスは自身の TK 遺伝子を持つため、ヒト TK によってはリン酸化されずヘルペスウイルス TK によりリン酸化されて初めて効果を発揮する薬剤がヘルペスウイルス感染細胞に選択毒性を示す。そのような効果を持つ薬剤が多数開発され、単純ヘルペスウイルスに有効なアシクロビルやサイトメガロウイルスに有効なガンシクロビルが実用化されている。しかし、何れの薬剤も EBV に対する効果は限定的で、EBV 関連疾患の治療薬として確立された薬剤は開発されていない。また、他のヘルペスウイルスはウイルスの増殖に伴って病変が現れるので、ウイルス複製サイクルで発現する TK を標的とした薬剤が有効であるが、EBV 潜伏感染細胞の増殖が病因となる EBV 感染症では、早期抗原に分類される EBV-TK 遺伝子を標的とした薬剤の効果は疑問視されていた。しかし、EBV-TK 存在下でのみ細胞増殖抑制効果を発揮する YMS-95145 を見出し、しかも EBV 潜伏感染細胞中に EBV-TK が発現されているとの実験結

果は、EBV 関連疾患の治療薬を開発する際に非常に重要な知見である。

2. YMS-95145 は 10 μ M 濃度で EBV 陽性細胞株の増殖を抑制するが、EBV 陰性細胞株の増殖を抑制する濃度は 100 μ M 以上であることから、従来の薬剤に比べて EBV 陽性細胞に非常に強い選択毒性を有する薬剤候補と考えられる。

3. 今回用いた EBV 陽性細胞株および EBV 感染ヒト化 NOG マウス組織中には EBV ゲノムが増殖サイクルに入っていることを示す BZLF1 遺伝子発現は検出されず、少なくとも EBV 感染細胞の大部分は EBV 潜伏感染細胞と考えられる。EBV 潜伏感染細胞中に TBV-TK 遺伝子が発現していることの実験結果は新しい知見であり、EBV 関連疾患に対する治療薬を開発する上で重要な発見である。EBV 関連疾患の原因細胞はリンパ系の B, T, NK 細胞に加え上皮細胞（上咽頭癌や胃癌）と多岐に渡っているため、今回発見した現象が普遍性を持つものか否か検討していきたい。

3. 倫理委員会への申請などが必要なため、EBV 陽性エイズリンパ腫患者のリンパ腫細胞中における EBV-TK 遺伝子の発現状況を今年度中に検討することができなかった。今後必要な手続きを進め検討していく予定である。

4. 我々はヒト化マウスに EBV を感染し、B 細胞リンパ腫を発生させることに成功している。発生する B リンパ腫は EBV 陽性エイズリンパ腫と同様に全ての EBV 潜伏感染関連遺伝子が発現する 3 型の EBV 潜伏感染細胞であることが明らかとなっている。次年度は、YMS-95145 をエイズリンパ腫モデルマウスに投与し、リンパ腫の発生の抑制・リンパ腫退縮効果の有無を検討するなど、YMS-95145 の実用化を目指した研究を行っていく予定である。

E. 結論

我々はエイズリンパ腫の約半数が EB ウイルス (EBV) 陽性であることに着目し、EBV が存在することにより選択毒性を発揮する薬剤の検索を行った。その結果、EBV が持つチミジンキナーゼ (EBV-TK) により特異的にリン酸化される薬剤 (2'-fluoro-4'-thio- arabinofuranosyl-methyl-uracil) を見出し、EBV 感染細胞株

に対する特異的かつ強力な増殖抑制効果があることを確認した。EBV-TK は EBV 潜伏感染細胞中にも発現していることが確認されたため、EBV 陽性エイズリンパ腫をはじめ様々な EBV 感染疾患に有効な可能性がある。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. Takahashi H, Sugita S, Shimizu N, Mochizuki M. A high viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in ocular fluids in a HLA-B27 negative acute anterior uveitis patient with psoriasis. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 52(2):136-138, 2008
2. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami, Morio T, Sugamoto Y and Mochizuki M. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *British Journal of Ophthalmology*, 92(7):928-932, 2008.
3. Kido S, Sugita S, Horie S, Miyana M, Miyata K, Shimizu N, Morio T and Mochizuki M. Association of varicella zoster virus load in the aqueous humor with clinical manifestations of anterior uveitis in herpes zoster ophthalmicus and zoster sine herpette. *British Journal of Ophthalmology* 92(4):505-8, 2008.
4. Nakamura H, Ishii C, Suehiro M, Iguchi A, Kuroda K, Shimizu K, Shimizu N, Imadome K, Yajima M and Fujiwara S. The latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus induces expression of the putative oncogene Bcl-3 through activation of the nuclear factor- κ B. *Virus research*, 131(2):170-179, 2008.
5. Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, Watanabe S,

Terashima K, Nakamura H, Ito M, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N, Fujiwara S.

A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *Journal of Infectious Diseases*. 198(5):673- 82, 2008.

6. Kanno H, Watabe D, Shimizu N, Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clinical Experimental Immunology* 151:519-527, 2008.

7. Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes and Infection* (in press)

8. 木戸さやか、杉田 直、二神百合、堀江真太郎、佐々木秀次、望月 學、清水則夫、森尾友宏 ステロイド点眼治療中に樹枝状角膜炎を合併したヘルペス性角膜内皮炎の4例 *臨床眼科* 2008, 62:1061-1065.

9. 鴨居功樹、杉田直、木戸さやか、堀江真太郎、菅本良治、望月學、森浩士、宮永将、宮田和典、清水則夫 皮膚症状を伴わない水痘帯状 疱疹ウイルス前部ぶどう膜炎の3例 *臨床眼科* 2008, 62:1067-1071.

国内学会発表

1. 今留謙一、矢島美彩子、清水則夫、中川温子、川野布由子、藤原成悦 NOG マウスを用いた慢性活動性 EB ウイルス感染症モデルの作製 第5回 EB ウイルス研究会 鳥取 7/18/2008

2. 鴨居功樹、杉田直、菅本良治、高瀬博、望月學、清水則夫、渡邊健 硝子体液の定量 PCR で診断でき

た細菌および真菌混合感染による遅発性眼内炎の1例 第42回日本眼炎症学会 福岡市 7/4/2008

3. 山本紗也香、杉田直、二神百合、堀江 真太郎、望月學、清水則夫、森尾友宏 角膜病変を伴わない HSV-1 関連虹彩毛様体炎の3症例 第42回日本眼炎症学会 福岡市 7/4/2008

4. 宮永将、杉田直、清水則夫、森尾友宏、宮田和典、望月學 サイトメガロウイルスによる虹彩炎と角膜内皮炎の臨床像比較 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/26/2008

5. 山本紗也香、杉田直、森尾友宏、清水則夫、望月學 帯状疱疹に伴う角結膜炎の涙液中 VZV-DNA 量および眼所見 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/26/2008

6. 鴨居功樹、高瀬博、杉田直、菅本良治、田中裕一郎、望月 學、渡邊健、清水則夫 Broad-range PCR システムで診断した真菌性眼内炎の1例 第62回日本臨床眼科学会 東京 10/25/2008

7. 清水則夫 再生医療とウイルス安全性確保 第8回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム 東京 12/12/2008

国際学会発表

Fox CP, Long HM, Lowe C, Shimizu N and Rowe M. LMP2A AS A TARGET FOR T CELL RECOGNITION IN EBV-ASSOCIATED T AND NK CELL TUMOURS EBV Association General meeting, November 2008, Guangzhou, China.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

エイズ関連悪性リンパ腫発症マウスモデルの確立

分担研究者 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

研究協力者 鈴 伸也 熊本大学エイズ学研究センター・予防開発分野 准教授

研究要旨 エイズリンパ腫の病態解析と新規治療法の開発に供するため、エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルの開発を進めている。新規高度免疫不全マウス(NOD/Scid/Jak3 欠損マウス)腹腔内にヒト Primary effusion lymphoma (PEL)細胞株を移植することにより、PELマウスモデルを樹立した。更にMTT法によるスクリーニングの結果得られたNF- κ B阻害剤Cepharanthine (CEP)は、PELの増殖をin vivoにおいても阻害した。CEPは、PELの新たな治療薬として期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを作成し、エイズ関連リンパ腫の標準的な治療法、新規治療法の開発に供することである。本年度は、特にHIV-1感染者に多いPrimary effusion lymphoma (PEL)の治療モデル作成に重点をおいて研究を行った。

B. 研究方法

ヒト Primary effusion lymphoma (PEL)細胞株(BCBL-1, TY-1, RM-P1)とBurkittリンパ腫細胞株(Raji等)に様々な薬剤や抗体を添加し、MTT法によりその効果を調べた。

高度免疫不全マウスNOD/Scid/Jak-3欠損マウスは、NOD/ScidマウスにJak-3欠損マウス(理化学研究所RCAI 斉藤隆博士から供与)を10世代バッククロスして作成した。NOD/Scid/Jak-3

欠損マウス腹腔にPEL細胞株BCBL-1を移植してPELモデルマウスを作成し、更に薬剤投与による治療モデルを作成した。

(倫理面への配慮)

免疫不全マウスの作成及び移植実験等の動物実験は、熊本大学本荘地区動物実験委員会の承認を得た上で「熊本大学動物実験指針」に従い実施した。動物実験は、「熊本大学動物実験指針」を遵守し、極力動物の苦痛軽減に配慮して行っている。動物実験における実験処置に対する倫理基準では、カテゴリーB(動物に対してほとんど不快感を与えないと思われる実験)レベルの実験であり、解析時には「動物の処分方法に関する指針」を遵守して、頸椎脱臼により安楽死させた。

C. 研究結果

1) MTT 法による抗 PEL 薬剤のスクリーニング

PEL では NF- κ B が活性化していることが知られていることから、NF- κ B 阻害作用のある物質を中心に抗 PEL 薬剤のスクリーニングを行い、数種類の候補物質を得た。それらの薬剤のうち、ツズラフジ科植物から得られたアルカロイドである Cepharanthine (CEP) は、*in vitro* において強力な抗腫瘍効果を示し (図 1)、既に臨床の場で使われていて、副作用が極めて少ないことから、本年度は CEP を中心に解析を行った。

2) Cepharanthine (CEP) の作用機序

PEL 細胞株に CEP を投与後、ウエスタンブロット法にて NF- κ B p65 の発現を検討した。細胞内の p65 は増加していたがリン酸化 (活性化) p65 は減少しており、核内の p65 量も減少していたことから、CEP は、細胞質内で NF- κ B p65 の活性化を抑制することにより、NF- κ B 阻害作用を呈することが判明した (図 2)。

3) PEL 発症マウスモデルの樹立

NOD/Scid/Jak-3 欠損マウス腹腔に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植して PEL 発症マウスモデルを作成した。BCBL-1 1×10^7 個を腹腔内に移植したところ 3 週間後には腹水の増加と肺・肝・脾臓に転移が認められた。

4) CEP による PEL マウスモデルの治療

NOD/Scid/Jak-3 欠損マウス腹腔に PEL 細胞株 BCBL-1 を移植し、5 日目より CEP 10mg/kg を連日腹腔内投与した。その結果、CEP 投与群では、明らかな腹水量の低下と転移の抑制が認められ、CEP の有効性が確認された (図 3)。

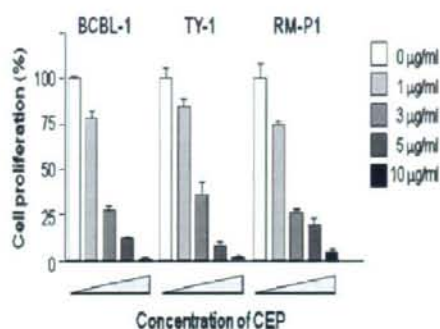


図 1. Cepharanthine (CEP) の抗 PEL 作用. MTT 法により PEL 細胞株に対する CEP の効果を検討した。

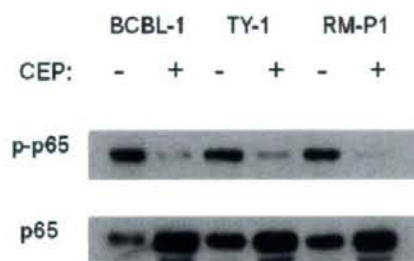


図 2-1. CEP による NF- κ B p65 活性化抑制. CEP 投与により PEL 細胞株細胞質内の p65 量は増加するがリン酸化は抑制された。

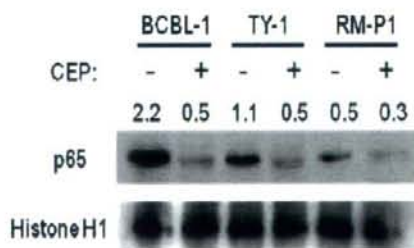


図 2-2. CEP による NF- κ B p65 活性化抑制. CEP 投与により核内 NF- κ B p65 は減少した。

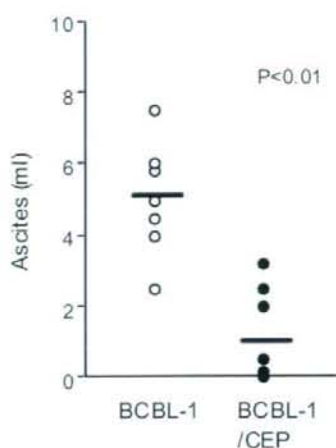


図3. CEP投与による腹水貯留の抑制

D. 考察

エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを作成した。PELの治療薬として、NF- κ B阻害物質が期待されているが、本研究でもNF- κ B阻害作用のある種々の薬物が有用であるという知見を得た。特にNF- κ B阻害剤Cepharanthineは、既に臨床で使われており、重篤な副作用がないことから、PELの新たな治療薬として期待される。

現在、マウスモデルを用いて、PELに対する放射線療法、免疫放射線療法などの有効性を確認している。

E. 結論

高度免疫不全マウスを用いて、エイズ関連悪性リンパ腫のマウスモデルを樹立した。更に、このマウスモデルを用いて薬剤による治療薬の評価系を確立し、CepharanthineがPrimary Effusion Lymphomaの治療に有効であることを示した。本マウスモデルは、今後エイズ関連悪性リンパ腫の新たな治療法の開発に役立つことが期待される。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okada S, Harada H, Ito T, Saito T, and Suzu S.; Development of human hematopoietic and acquired immune system in NOD/Scid/Jak3^{null} mice engrafted with cord blood-derived human hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 88:476-482, 2008

2. Murakami T, Harada H, Suico MA, Shuto T, Suzu S, Kai H, and Okada S; Ephedrae herba, a component of Japanese herbal medicine *Mao-to*, efficiently activates the replication of latent HIV-1 in a monocytic cell line. *Biol Pharm Bull* 31(12):2334-2337, 2008

3. Wang X, Xiao G, Zhang Y, Gao X, Okada S, and Liu X; Regulation of *Terb* recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition. *Nature Immunol* 9(7):794-801, 2008

4. Nagai H, Iwasaki N, Odawara T, and Okada S; Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. *Int J Hematol* 87(5):442-443, 2008

(総説等)

- 岡田誠治. フローサイトメトリーのための抗体の標識と細胞の染色. 「抗体実験マニュアル 改訂版」 羊土社. 2008年4月
- 岡田誠治. エイズ関連悪性リンパ腫の現状と治療戦略. *臨床血液* 49(10):1490-1498, 2008.
- 鈴伸也, 岡田誠治. Srcキナーゼの新たな役割—ゴルジ体を通して. *血液・腫瘍科* 57(3):326-329, 2008.

2. 学会発表

(国際学会)

1. Naoko Takahashi-Makise, Shinya Suzu, Masateru Hiyoshi, and Seiji Okada. Biscoclaurine alkaloid cepharanthine inhibits the growth of primary effusion lymphoma *in vitro* and *in vivo* and induce apoptosis via suppressing the NK-kB pathway. 37th Annual Scientific Meeting International Society of Experimental Hematology July 9-12, 2008. (Boston, USA)

2. Shinichiro Hattori, Kazuhiko Ide, Hiroto Nakata, Hideki Harada, Satoru Kohgo, Noriyuki Ashida, Hiroyuki Hayakawa, Hiroaki Mitsuya and Seiji Okada. Protection of CD4⁺ cells against HIV-1 infection by 4'-Ethylnyl-2'-fluoro-2'-Deoxyadenosine in hu-PBMC-NOD/SCID/Jak-3-KO mice. Aug. 3-8 2008, XVII International AIDS Conference. (Mexico City, Mexico)

(国内学会)

1. 服部真一朗、原田英樹、鈴伸也、岡田誠治。ヒト末梢血単核球を移植した高度免疫不全マウス (NOD/Scid/jak-3 欠損マウス) におけるフローサイトメトリーを用いた HIV-1 感染の解析。第 18 回日本サイトメトリー学会学術集会 2008 年 6 月 28-29 日、東京
2. 岡田誠治。エイズ関連悪性リンパ腫の現状と治療戦略。第 70 回日本血液学会総会、教育講演。2008 年 10 月 10-12 日、京都
3. 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
4. 水上拓郎、浜口功、滝澤和也、倉光球、百瀬暖佳、益見厚子、岡田誠治、山口一成。脾臓における造血幹細胞ニッチの解析。第 70 回

日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都

5. 日吉真照、鈴伸也、岡田誠治。HIV Nef のマクロファージにおける新たなゴルジ体機能の阻害機構。第 56 回日本ウィルス学会学術集会、2008 年 10 月 26-28 日、岡山
 6. 白石善興、後藤久美子、砥綿知美、島崎達也、古嶋昭博、岡田誠治。Primary Effusion Lymphoma における放射線治療の有効性について。日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-11 月 21 日、北九州
 7. Ranya Hassan、鈴伸也、日吉真照、岡田誠治。Hierarchical actions of HIV-1 Nef on Hck determined maturation arrest of cytokine receptor, Fms. 第 22 回日本エイズ学会学術集会総会、2008 年 11 月 26 日-11 月 28 日、大阪
 8. 服部真一朗、井出一彦、中田浩智、原田英樹、鈴伸也、向後悟、芦田則之、早川弘之、満屋裕明、岡田誠治。Hu-PBMC-NOD/SCID/Jak-3-KO マウスを用いた核酸系逆転写酵素阻害剤、4'-Etylnyl-2'-Fluoro-2'-Deoxyadenosine による抗 HIV-1 効果の検討。第 22 回日本エイズ学会学術集会総会、2008 年 11 月 26 日-11 月 28 日、大阪
 9. 岡田誠治。AIDS 関連悪性リンパ腫の治療戦略。第 22 回日本エイズ学会シンポジウム 9。「エイズ診療、これからの重要課題。AIDS 関連悪性リンパ腫」、2008 年 11 月 26-28 日、大阪
- 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：なし

エイズ関連非ホジキンリンパ腫（ARNHL）

治療の手引き Ver 1.0

味澤 篤^{*1}、永井宏和^{*2}、小田原隆^{*3}、照井康仁^{*4}
上平朝子^{*5}、四本美保子^{*6}、萩原将太郎^{*7}、岡田誠治^{*8}

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関する
多面的治療戦略開発に関する研究班

*1 都立駒込病院感染症科*2 名古屋医療センター臨床研修センター
*3 東京大学医科学研究所感染免疫内科*4 癌研究会有明病院癌化学療法センター
*5 大阪医療センター免疫感染症科*6 東京医科大学臨床検査医学科
*7 国立国際医療センター血液内科*8 熊本大学エイズ学研究センター

エイズ関連非ホジキンリンパ腫 (ARNHL) 治療の手引き

味澤 篤^{*1}、永井宏和^{*2}、小田原隆^{*3}、照井康仁^{*4}
上平朝子^{*5}、四本美保子^{*6}、萩原将太郎^{*7}、岡田誠治^{*8}

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関する
多面的治療戦略開発に関する研究班

*1 都立駒込病院感染症科*2 名古屋医療センター臨床研修センター
*3 東京大学医科学研究所感染症免疫内科*4 癌研究会有明病院癌化学療法センター
*5 大阪医療センター免疫感染症科*6 東京医科大学臨床検査医学科
*7 国立国際医療センター血液内科*8 熊本大学エイズ学センター

この手引きの対象は acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) に関連した非ホジキン悪性リンパ腫 (ARNHL) の経験のない血液科医師および human immunodeficiency virus (HIV) 担当医師である。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、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ている。

1. はじめに

ARNHL は HIV 感染症の進行した状態で生じる疾患である。CD4 陽性リンパ球数 (CD4) <200 μ L あるいは AIDS の既往を持つ患者に生じることが多い¹⁾。また筋外性の非ホジキン悪性リンパ腫 (NHL) から HIV 感染が判明する症例も国内で増加してきている。

ARNHL の誘因としては、HIV による免疫不全、慢性の B 細胞への抗原刺激、遺伝的異常、サイトカインの調節不良、EB ウイルスや human herpes virus 8 (HHV8) の影響などが考えられている。HIV 感染者では IL-6、IL-10、sCD23、sCD27、sCD30 および sCD40 が高値であり、これらは B 細胞の増殖因子でありアポトーシスを抑制する因子である。

2. 現 状

CD4 陽性細胞数 <200 μ L あるいは AIDS 指標疾患発症後に、悪性リンパ腫が生じる相対危険度は、immunoblastic lymphoma が 62x で、diffuse large B-cell lymphoma で 145x とされる²⁾。カポシ肉腫が男同性愛者に多く見られるの

に対し、悪性リンパ腫はあらゆる層にみられる⁴⁾。ARNHL では immunoblastic lymphoma と腺原発悪性リンパ腫が、CD4 が 100 低下するとそれぞれ相対危険度が 1.64、2.29 と増加する⁶⁾。ARNHL の危険性は CD4 が低いほどリスクが高くなる (図 1)。

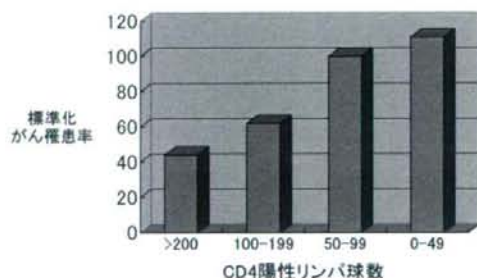


図 1 エイズ関連非ホジキンリンパ腫における標準化がん罹患率と CD4 陽性リンパ球数⁶⁾

3. 分 類

ARNHL の 95% 以上は B 細胞由来で、Burkitt's lymphoma、diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)、immunoblastic lymphoma および primary effusion lymphoma がみられるが、頻度的には DLBCL 次いで Burkitt's lymphoma が多い。表 1 に HIV でみられる悪性リンパ腫を示す。

4. 臨床経過

診断

生検により診断する。組織所見により治療方針が異なってくるので重要な検査である。

表 1 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の分類

- 1.免疫正常者でもみられるリンパ腫 (Lymphomas also occurring in immunocompetent patients)
- Burkitt lymphoma
 - Classical
 - With plasmacytoid differentiation
 - Atypical
 - Diffuse large B-cell lymphoma
 - Centroblastic
 - Immunoblastic
 - Extranodal marginal zone B-cell-lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type: MALT lymphoma (rare)
 - Peripheral T-cell lymphoma (rare)
 - Classical Hodgkin lymphoma
- 2.HIV 感染者により生じやすいリンパ腫 (Lymphomas occurring more specifically in HIV+ patients)
- Primary effusion lymphoma
 - Plasmablastic lymphoma of the oral cavity
- 3.免疫不全状態でもみられるリンパ腫 (Lymphomas also occurring in immunodeficiency states)
- Polymorphic B-cell lymphoma (PTLD-like)

症状

非 HIV 感染者に比べ発症時の病期が進行している。発熱、夜間盗汗および 10%以上の体重減少などの B 症状を 75-85%に認める。中枢神経、消化管、骨髄、肝臓、肺、副腎など節外臓器に高頻度で発生する。骨髄および中枢神経系への浸潤も、非 HIV 感染型リンパ腫に比べ高率である²⁴⁾

検査

表 2 に示すような検査を行う。

病期分類

初回治療前に解剖学的な病変の広がりについて定型書式を用い評価を行い、臨床病期を決定する(表 3)。再発した場合は、再発時点での解剖学的な病変の広がりを記録することは勧められるが、再治療時の病期分類 (G 病期) については初発時の病期分類とその臨床的意味を混同してはならない。

予後

ARNHL の予後不良の因子として、①CD4< 100 μ L、②病期 Stage III or IV、③年齢 35 歳以上、④PS 不良、⑤AIDS

表 2 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の際に行うべき検査

	検査項目	意義
NHL 関連	CBC	
	生化学	
	sIL-2	
	HBV、HCV	HBV の合併が多い
	頸部から骨盤 CT	PCP や MAC 症の鑑別にも必要
	頭部造影 MRI	トキシプラズマや中枢神経系のリンパ腫の鑑別にも必要
	FDG-PET	
ARNHL 関連	髄液検査	ARNHL では中枢浸潤が高率
	骨髄検査	ARNHL では骨髄浸潤が高率
HIV 関連	CD4 陽性リンパ球数	必須検査
	HIV-RNA	必須検査
	梅毒	合併が多い
	クリプトコッカス抗原	日和見感染症の検索として
	トキシプラズマ IgG	日和見感染症の検索として
	CMV-Ag	日和見感染症の検索として
	発熱時抗酸菌血液培養	日和見感染症の検索として
	Ga シンチグラフィ	PCP や MAC を疑う際にも有用
	眼科	CMV 網膜炎などの検索

表 3 病期分類

病期 I: 単独リンパ節領域の病変(I)、またはリンパ節病変を欠く単独リンパ外臓器または部位の限局性病変 (IE)(ホジキンリンパ腫では稀)。

病期 II: 横隔膜の同側にある2つ以上のリンパ節領域の病変 (II); または所属リンパ節病変と関連している単独リンパ外臓器または部位の限局性病変で、横隔膜の同側にあるその他のリンパ節領域の病変は有ってもなくてもよい(IIe)。病変のある領域の数は下付きで、例えば II3 のように表してもよい。

病期 III: 横隔膜の両側にあるリンパ節領域の病変(III)、それは更に隣接するリンパ節病変と関連しているリンパ外進展を伴ったり(IIIe)、または脾臓病変を伴ったり(IIIS)、あるいはその両者(IIIE,S)を伴ってもよい。

病期 IV: 1つ以上のリンパ外臓器の瀰漫性または播種性病変で、関連するリンパ節病変の有無を問わない; または隣接する所属リンパ節病変を欠く孤立したリンパ外臓器病変であるが、離れた部位の病変を合わせもつ場合。後出の「解剖学的病期診断規準」に該当する肝臓または骨髄のいかなる病変、あるいは肺の小結節性病変も IV 期とする。病期 IV の病変の場所は、ホジキンリンパ腫の部分で記述されている表に記載された表記法に従ってその部位を更に特定することによって確認される。

発症、⑥静脈麻薬常用者、⑦LDH 高値、⑧Highly active antiretroviral therapy (HAART)への反応不良がある⁷⁶⁾。

最近では、国際予後指標 (IPI) に CD4 を合わせたものも良く使用される。予後は HAART 以降改善し、生存年数の中央値は 24 ヶ月に近づいている。IPI については表 4 を参照。

表 4 国際予後指標 (IPI)

国際非ホジキンリンパ腫予後因子プロジェクトは、アグレッシブ非ホジキンリンパ腫の転帰予測モデルを開発するため、ドキシルピシンを基本とする併用化学療法で治療された数千人のアグレッシブ非ホジキンリンパ腫患者集団の治療前予後因子を用いた。上記のデータセットの多変量解析で認定された因子に基づき、IPI が提唱された。

IPI では5つの治療前特性は独立した統計学的に有意な因子であることが見いだされた: 年齢 (≤ 60 vs. >60); 病期 I または II (限局性) vs. III または IV (進行性); 節外病変数 (0 または 1 vs. ≥ 2); 患者の一般状態 (PS) (0 または 1 vs. ≥ 2); および血清 LDH レベル (正常 vs. 正常上限を超える)。

Low risk	0-1
Low-intermediate risk	2
High-intermediate risk	3
High risk	4-5

これら5つの因子は非ホジキンリンパ腫の場合 Ann-Arbor の病期分類を補うものと考えられる。

4. 治療法

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)

推奨治療法

1. CHOP あるいは CDE、EPOCH が推奨される (推奨 B)。HAART 時代になってから比較試験はなく、非 HIV 感染者における CHOP、R-CHOP といった「gold-standard-therapy」が無い。
2. Rituximab は、CD4 $<$ 50 μ L の場合には治療関連

死亡が生じやすくなるので併用しない (推奨 A)。

3. HAART を併用する (推奨 B)。
4. HAART は抗がん剤との薬物相互作用を考えて選択する (推奨 C)。

治療の変遷

HAART 導入前の 1990 年代初期までは、ARNHL に対して表 5 に示したようなさまざまな化学療法が行われていたが、いずれも不十分な成績であった⁹⁾。完全寛解率 (CR) は 50%前後で生存期間も 6 から 11 ヶ月に過ぎず、2 年生存率も 10%程度であった。生存期間が短い原因としては悪性リンパ腫自体のコントロールが十分できないこと (HIV 感染症に伴う潜在的な骨髄障害により、化学療法後の骨髄回復が遅れることも重要な要因) に加えて、HIV 感染症に伴う日和見感染症の合併が高率

表 6 エイズ関連非ホジキンリンパ腫に対する m-BACOD 療法の投与量に関する比較 (ACTG142)

	Standard Dose	Low Dose	P Value
No. of Patients	81	94	-
CR	52%	41%	NS
Median survival (mo)	7.75	8.75	NS
Grade III 以上の toxicity	70%	51%	0.008
<500 μ L の好中球減少	69%	50%	0.007
日和見感染の合併	23%	22%	NS

文献 14)より

表5 エイズ関連非ホジキンリンパ腫の化学療法⁹⁾

Treatment	No. of Patients	CD4+ counts (cells/ μ L)	Prior AIDS	Karnofsky PS	Extranodal Disease	Bone Marrow Positive	CR	Survival (mo)	Ref.
m-BACOD	13	368	NR	70	11 (85%)	2 (15%)	7 (54%)	11	10
COMET-A	38	164	8 (21%)	75	25 (66%)	NR	19 (50%)	6	11
CHOP	30	200-290	4 (13%)	84	21 (70%)	7 (23%)	16 (53%)	8.0-11.4	12
Low dose m-BACOD	42	150	8 (23%)	>80	23 (66%)	6 (17%)	16 (38%)	6.6	13
Infusional CDE	12	87	1 (8%)	60	10 (83%)	3 (25%)	8 (67%)	17.4	9