

## 日本人エイズリンパ腫治療プログラムの最適化（2007 年度担当）

分担研究者 小田原 隆 東京大学医科学研究所附属病院 感染免疫内科 講師

研究要旨 初年度の課題として、まず国内臨床現場での治療の現状を把握する目的で、エイズリンパ腫の治療経験のある国内 20 施設へのアンケート調査を行った。各施設の 2001 年以降の症例数を調べた 1 次調査では、10 例以上の症例を経験している施設が 4 施設あった一方で、約半数の施設（11 施設）は 6 年間に 2 例以下の症例数しか経験していなかった。症例ごとの治療法や予後を調べた 2 次調査では、DLBCL 治療に用いるメニューとして CHOP と EPOCH で同等の有効性が示唆され、抗ウイルス治療（ART）の併用は望ましく、Rituximab 併用も考慮される結果となったが、施設間格差や全症例数の少なさから、日本人での最適な治療法を統計学的に示すことはできなかった。全身性のリンパ腫では CD4 数が予後を規定する因子となっており（原発性脳リンパ腫ではそうではなかった）、HIV 感染早期発見の重要性を示唆した。また、全体に HAART 時代になってエイズリンパ腫の予後は改善しているが、少数例しか経験のない施設では手探り状態の治療となっていることも示唆され、治療の標準を示すガイドラインを作成することが急務と考えられた。さらに、本研究班が中心となって、all Japan team の共同治験体制を整えることの重要性も認識され、いずれも次年度以降で実現されることになった。

### A. 研究目的

抗ウイルス治療（ART）により HIV 感染症の予後は大きく改善しているが、エイズリンパ腫は今もって患者の予後を脅かす重大な疾患である。これに対処すべく、国内のエイズリンパ腫治療をサポートできる研究の推進を目指した本研究班の初年度の課題として、まずは国内のエイズリンパ腫治療の現況を把握することを目的とした。具体的には、国内でエイズリンパ腫の治療を行っていると考えられる施設の医師に郵送でアンケートを依頼し、現在の治療状況について調査を行った。集計結果を解析して、国内のエイズリンパ腫治療が抱えている問題点を拾い上げ、さらにはオール

ジャパンの協力体制を構築することも企図した。

### B. 研究方法

（1）国内でエイズリンパ腫を診療していると考えられる 23 施設の医師達にアンケート調査への協力を打診した。この際、各施設でのエイズリンパ腫症例の経験数を教えていただいた（1 次調査）。  
（2）アンケート調査（2 次調査）へ協力すると回答が得られた医師に対し、個々の症例の調査票をお送りして、記入・郵送していただいた。調査票には、治療メニューや治療経過を記載していただくが、患者の個人情報が入らないように配慮した。調査の対象としたのは、2001 年から 2007

年の間に各施設で治療をされたエイズリンパ腫症例の診療記録である。なお、1次調査で協力をご快諾いただいていたのは以下の20施設だった：国立病院機構仙台医療センター・群馬大学医学部附属病院・国保旭中央病院・千葉大学医学部附属病院・国立国際医療センター・都立駒込病院・東京女子医科大学病院・東京慈恵医科大学附属病院・武蔵野赤十字病院・順天堂大学医学部附属病院・長野赤十字病院・国立松本病院・国立病院機構名古屋医療センター・奈良県立医科大学附属病院・国立病院機構大阪医療センター・兵庫医科大学病院・広島大学医学部附属病院・国立病院機構九州医療センター・熊本大学医学部附属病院・琉球大学医学部附属病院

(3) 回収した調査票を集計解析し、国内のエイズリンパ腫治療の問題点を拾い上げた。データの取り扱いに際しては個人情報保護法を遵守した。

#### (倫理面への配慮)

各施設へのアンケート調査依頼にあたっては、研究全体の内容を、分担研究者の所属機関である東京大学医科学研究所の倫理審査委員会で審査を受け、承認を得たうえで行った。さらに下記の点を確認して調査を行った。

#### I 研究の対象とする個人の人権の擁護

各病院が遵守している疫学研究の倫理指針の範囲内で行う調査であり、また、調査票の項目に患者の個人情報が入らないようにしている。研究成果の公表にあたって、個人が特定されるような情報が公表されることはないので、個人の人権は守られる。本研究を施行するにあたっては、個人情報保護法ならびに疫学研究に関する倫理指針の原則を遵守する。

#### II 被験者に理解を求め同意を得る方法

依頼する各施設における疫学研究の包括的な同意にゆだねる。

#### III 研究によって生ずる個人への危険性

各施設の医師が記入して郵送してくれる調査票から個人を特定することはできないので、特別な危険はない。

### C. 研究結果

まず国内の臨床現場での治療の現状を把握す

ることを目的として、エイズリンパ腫の治療経験のありそうな国内主要施設への1次アンケート調査を行った。各施設での2001年以降のエイズリンパ腫症例数を聞いた1次調査では、調査を依頼した23施設のうち20施設より回答が得られ、2001年以降に10例以上を経験している施設が4施設(東京2、名古屋1、大阪1)あった一方で、約半数の施設(11施設)では6年間で2例以下の症例数しか経験していなかった。

1次調査に回答を頂いた20施設のいずれもが、症例ごとの治療メニューや予後を記載する2次調査票への回答を快諾されたので、分担研究者の所属機関での倫理審査委員会の審査・承認を経て、各症例の調査票への回答を依頼した。2次調査の回答率は1次調査よりは低下してしまっただが、全身性リンパ腫で43症例(DLBCL34例、Burkitt2例、その他7例)、原発性脳リンパ腫(PCNSL)で15症例の回答が2008年1月末までに寄せられた。

①エイズリンパ腫の半数以上を占めるDLBCLは、10施設から34症例の治療報告があり、完全寛解にいたったかどうかを規定するbaselineの因子として、年齢・LDH・PS・節外病変数・病期によってスコア化されるInternational Prognostic Index(IPI)に加えて、CD4数が重要な予後規定因子となっていることが分かった。

DLBCLの化学療法のメニューは、CHOPが15例、EPOCHが17例となっていたが、EPOCHは2施設のみでの採用だった(CHOPとEPOCH以外では、VADが1例、放射線治療のみが1例)。CHOPとEPOCHとでは治療効果に差を認めなかった(図1)。Rituximabの併用も8例で行われており、CHOP、R-CHOP、EPOCH、R-EPOCHでの完全寛解(CR)率の差がないかどうかを検討してみたが、有意な差は認められなかった(図2)。抗ウイルス治療(ART)はDLBCL37例中の31例で化学療法時に併用されており、ART併用群でCR率が高い傾向が見られたが、全症例数が少ないこともあり、統計学的に有意な差を見出すことは出来なかった(図3)。施設間での差や治療年代(2001~2007年)による差もあることを考慮すると、この症例数で多岐にわたる治療法間の優劣に統計学的な意味づけをすることは困難と考えられた。

②原発性脳リンパ腫 (PCNSL) は 11 施設から計 15 例の治療成績報告があり、13 例が放射線治療を受け、1 例が high dose MTX の治療を受けていた (1 例は剖検時に脳リンパ腫が判明)。7 例が外来通院可能な状態にまで回復していたが、8 例は死亡しており、そのうちの 6 例は診断後 3 ヶ月以内に死亡していた。診断時の全身状態 (PS) が予後に大きく関連していることが示唆され、初期の放射線治療を乗り切った症例では HAART 時代になって予想以上によい経過をたどっている症例が多いことが分かった。ただし、CD4 数が重要な予後規定因子となっていた全身性の DLBCL とは異なり、(後に分担研究者の永井医師が進めて下さった更に精細な統計解析でも)、PCNSL では CD4 数が予後を規定する因子とはなっていなかった。

#### D. 考察

多忙な臨床の先生達に治療成績票を記入していただくかねばならず、とりわけ多数の症例を診ている施設では回答の負担が大きくなってしまい、本調査 (2 次調査) で症例を網羅することができなかったのは残念であったが、国内の治療と予後のおおよその動向は把握することができたと考えられた。

全身性の DLBCL では、非エイズリンパ腫でも予後規定因子として提唱されている International Prognostic Index (IPI) に加えて、CD4 数が重要な予後規定因子であることが分かった。CD4 数の高い症例では、HAART 時代になってエイズリンパ腫の治療予後がかなり改善していることが分かったが、CD4 数の低い症例では依然として予後が悪いことから、HIV 感染を早期に発見することの重要性も痛感された。

また、原発性脳リンパ腫 (PCNSL) は、現在でも放射線治療以外の積極的治療が難しい疾患である (PCNSL では CD4 数が必ずしも予後を規定する因子となっていなかったのは、化学療法が行われないことと関係があるのかもしれない) が、診断後 6 ヶ月以内に死亡してしまっているケースが多く報告された一方で、そこを乗り越えて放射線治療の行われた症例では、HAART 時代になって予想以上によい経過をたどっている症例も多いこ

とが分かった。

HAART 時代になってエイズリンパ腫の予後が全体にかなり改善していると分かったことから、治療の標準化によって、少なくとも CD4 数の高い症例では、どこの施設であっても治癒を目指すべきであると考えられた。しかし、少数例しか経験のない施設では手探り状態の治療となっていることもうかがわれ、とりわけ、①治療メニューとして CHOP を選ぶのか EPOCH を選ぶのか、②dose の調整をどのように考えて行うのか、③ART は併用が望ましいが、化学療法との相互作用を最小にするメニューとしてどの抗ウイルス薬を選択すべきか、④Rituximab の併用をどうするか、などの点で各施設ごとに差が認められた。これらの点に関して標準となる考え方を提示するガイドラインを作成することが、国内の各施設がエイズリンパ腫に立ち向かえるために急務と考えられた。このため、今回の調査で最も多くの症例数を報告して下さった味澤医師に分担研究者となっただき、2 年目以降の研究班の重要課題として実現していただいた。

日本人にとって最適な治療法は何かという問いに対しては、施設間での差や治療年代 (2001～2007 年) による差もあることから、今回の調査の症例数で治療法間の優劣に統計学的な意味づけをすることは困難であった。現状では、米国や英国のガイドラインに基づいて、各施設の現場が dose 変更などの工夫を加えながら治療を行っているが、日本人に最適な治療法を明確にするための多施設共同臨床試験も立ち上げていくことが望まれた。そのためには、all Japan の共同治験体制を組むことが不可欠と考えられたが、幸いにして本研究班は、専門を異にする多様な研究者らが集まっていたおかげで、all Japan team の協力体制をスムーズに構築することができたと考えられる。その協力体制による多施設共同臨床試験は、次期の研究班によって推進されていくことが期待される。

#### E. 結論

国内の臨床現場での治療の現状を把握することを目的として、エイズリンパ腫の治療経験があ

る国内 20 施設へのアンケート調査を行った。各施設での 2001 年以降の症例数を調査した 1 次調査では、10 例以上を経験している施設が 4 施設（東京 2、名古屋 1、大阪 1）あった一方で、約半数の施設（11 施設）は 6 年間で 2 例以下の症例数しか経験していなかった。症例ごとの治療法や予後を調べた 2 次調査では、DLBCL 治療に用いるメニューとして CHOP と EPOCH で同等の有効性が示唆され、抗ウイルス治療（ART）の併用は望ましく、Rituximab 併用も考慮したい結果だったが、施設間格差や全症例数の少なさから、最適の治療法を統計学的に示すことはできなかった。また、全身性の DLBCL では CD4 数が予後を規定する因子となっているが、PCNSL ではそうではないこと。全体として HAART 時代になってエイズリンパ腫の予後は改善しているが、少数例しか経験のない施設では手探り状態の治療となっていることも示唆され、標準的な治療方法を提示するガイドラインの作成が急務と考えられた。本研究班が中心となって、オールジャパンの共同治験体制を整えることの重要性も認識され、いずれも次年度以降に実現されてきている。次期研究班による共同治験の推進が期待される。

## F. 健康危機情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, and Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *J Med Virol.* 80:373-382, 2008

### 2. 学会発表

(国際学会)

1) Kawana-Tachikawa A, Miyazaki E, Tomizawa M, Odawara T, and Iwamoto A. Highly restricted T cell receptor repertoire against an immunodominant HIV-1 CTL epitope with a

stereotypic amino acid substitution. 4th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. (Sydney, Australia) July 22-25, 2007

2) Kawana-Tachikawa A, Motose M, Odawara T, Fujii T, and Iwamoto A. Maintenance of proliferative PD-1 low memory CD8+ T cells specific for eradicated virus in HIV-1 patients with high CD4 count. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (Boston, USA) February 3-6, 2008

(国内学会)

1) 鯉淵智彦、古賀道子、松村武史、古賀一郎、前田卓哉、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、中村哲也、岩本愛吉. HAART を施行した HIV/HBV 重複感染者の解析. 第 81 回日本感染症学会総会、2007 年 4 月 10-11 日、京都

2) 中山香、立川(川名)愛、小田原隆、藤井毅、小島直也、岩本愛吉. HIV セットポイントを規定する免疫関連因子の探索. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月 21-23 日、札幌

3) 立川(川名)愛、宮崎恵利子、富澤麻利子、本瀬真樹子、小田原隆、岩本愛吉. エスケープ変異を伴うエピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) レパートリーの解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会、2007 年 10 月 21-23 日、札幌

4) 宮崎菜穂子、中村哲也、小田原隆、伊賀睦了、鯉淵智彦、遠藤宗臣、藤井毅、細野治、森本畿夫、吉田久博、岩本愛吉. 当院外来患者へのアンケート調査で見られた服薬の問題点と服薬指導の意義. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28-30 日、広島

5) 立川(川名)愛、朱大勇、本瀬真樹子、富澤麻利子、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子発現量の解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28-30 日、広島

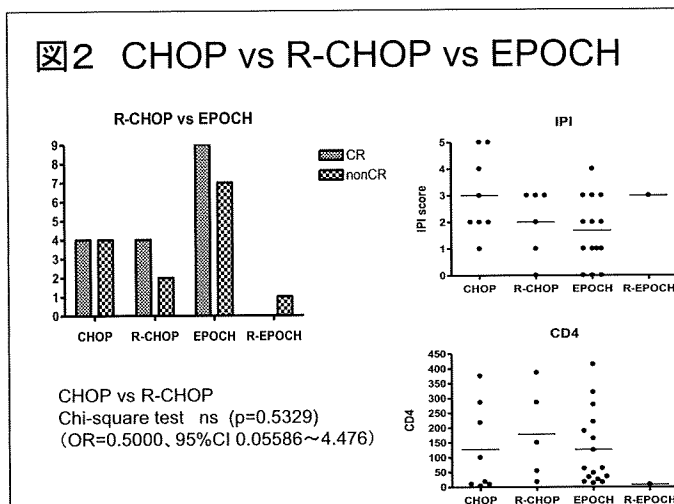
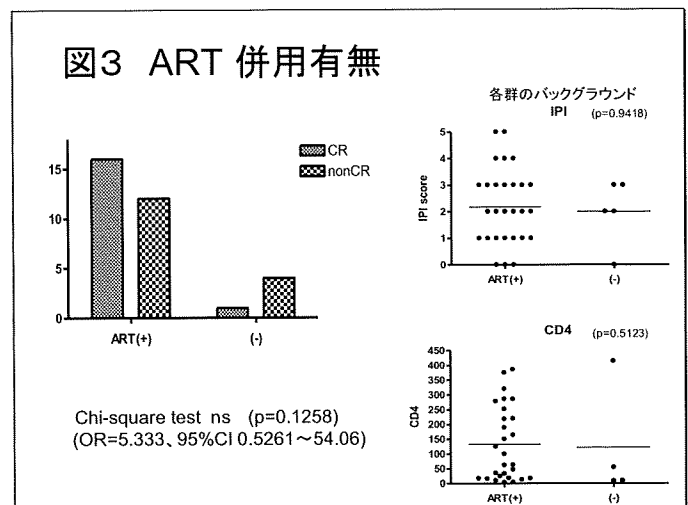
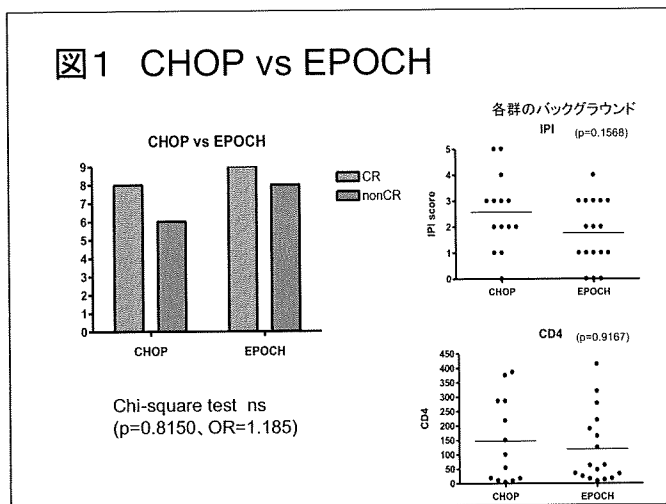
6) 遠藤宗臣、坂本勇一、前田卓哉、鯉淵智彦、宮崎菜穂子、藤井毅、小田原隆、岩本愛吉. HIV プロテアーゼ阻害剤アタザナビル長期投与

における臨床効果に関する検討. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28-30 日、広島

- 7) 前田卓哉、藤井毅、宮崎菜穂子、小田原隆、岩本愛吉. HIV/AIDS 患者に対する ST 合剤の副作用発現に関する臨床のおよび基礎的解析. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28-30 日、広島

- 8) 菊地正、前田卓哉、坂本勇一、鯉渕智彦、遠藤宗臣、藤井毅、小田原隆、小柳津直樹、岩本愛吉. 腕神経叢浸潤を来した AIDS 関連悪性リンパ腫の一症例. 第 21 回日本エイズ学会学術集会、2007 年 11 月 28-30 日、広島

- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)  
該当なし



## 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 変異の解析とリツキシマブ耐性機序、2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブ併用 CHOP 療法と可溶性 IL-2 受容体の予後予測的価値、3) リツキシマブ併用化学療法の臨床効果を予測する補体依存性細胞障害を利用したイメージングに基づいた迅速評価法の開発、4) リツキシマブ併用 CHOP 療法を受けた B細胞性リンパ腫患者におけるスタチン非依存的予後の解析、5) 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など 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予後因子の解析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、ドキシソルビシン、オンコビン、プレドニゾロン)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 変異の解析とリツキシマブ耐性機序、2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブ併用 CHOP 療法と可溶性 IL-2 受容体の予後予測的価値、3) リツキシマブ併用化学療法の臨床効果を予測する補体依存性細胞障害を利用したイメージングに基づいた迅速評価法の開発、4) リツ

キシマブ併用 CHOP 療法を受けた B 細胞性リンパ腫患者におけるスタチン非依存的予後の解析、5) 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の解析を行なった。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予後因子の解析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 変異の解析とリツキシマブ耐性機序

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。CD19 陽性細胞由来の RNA を抽出し、RT-PCR により CD20 遺伝子の cDNA を合成した。さらに、CD20 遺伝子の 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培養細胞への遺伝子導入を行ない、変異遺伝子の意義についてフローサイトメトリー法と補体依存性細胞障害アッセイにて検討を行った。

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併用 CHOP 療法と可溶性 IL-2 受容体の予後予測的価値

リツキシマブ併用 CHOP (R-CHOP) 療法あるいは CHOP 療法を受けた B 細胞性リンパ腫患者における血清可溶性 IL-2 受容体 (s IL-2R) 値を測定し、R-CHOP 療法群と CHOP 療法群で s IL-2R 値の予後的価値の評価の統計的解析を施行した。

### 3) リツキシマブ併用化学療法の臨床効果を予測する補体依存性細胞障害を利用したイメージングに基づいた迅速評価法の開発

患者新鮮リンパ腫生細胞の *in vitro* イメージング技術を利用した補体依存性細胞障害アッセイをリツキシマブ存在下に施行した。リツキシマブの臨床効果と組織型、*in vitro* 補体依存性細胞障害活性の関係の統計的解析を行った。

### 4) リツキシマブ併用 CHOP 療法を受けた B 細胞性リンパ腫患者におけるスタチン非依存的予後 R-CHOP 療法を受けたびまん性大細胞型リンパ

腫患者 256 例をスタチン服用群 (35 例) と非服用例 (221 例) に分けて後方視的に予後を解析した。

### 5) 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

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。

## (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、個人情報が出ることはない。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・不利益を得ることではない。

### 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 10-100 ml 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CD20変異の解析とリツキシマブ耐性機序

リツキシマブ抵抗性におけるCD20変異の関与についての報告はいままでなかったが、B細胞性リンパ腫50症例のCD20遺伝子の塩基配列解析により、C末端欠損変異型(8%)、細胞外ドメイン変異型(2%)、膜貫通ドメイン変異型(2%)、早期終止変異型(10%)の4つの変異型を見出した。C末端欠損型ではCD20分子の細胞表面発現が正常型に比べて有意に低下していた。リツキシマブの作用機序のひとつである補体依存性細胞障害(CDC)活性では、細胞表面CD20低発現変異体であるC末端欠損変異型でCDC活性の低下が有意にみられた。また、抗CD20抗体に対する奏効率では、正常型とC末端欠損型で非CR率に有意差はないが、C末端欠損変異型で非CR率が高い傾向がみられた。リツキシマブ療法後の無増悪期間中央値は正常型とC末端欠損変異型でそれぞれ31ヶ月と7ヶ月であり、log-rank試験で有意差をみとめた。この結果はClinical Cancer Researchで2009年に掲載された。

#### 2) リンパ腫症例の抗体医薬リツキシマブ併用CHOP療法と可溶性IL-2受容体(sIL-2R)の予後予測的価値

R-CHOP療法群141例とCHOP療法群87例の計228例でsIL-2R値の予後に関する解析を行った。R-CHOP療法およびCHOP療法群ともに、sIL-2R高値群は低値群に比較して無増悪生存率と全生存率において有意に不良であった

(R-CHOP療法群:2年無増悪生存率66%対92% $p<0.001$ 、2年全生存率82%対95% $p=0.005$ 。CHOP療法群:2年無増悪生存率40%対82% $p<0.001$ 、2年全生存率61%対90% $p<0.001$ )。

International prognostic index (IPI)の予後因子との多変量解析では、sIL-2R値は、R-CHOP療法およびCHOP療法群において、無増悪生存率および全生存率の独立した予後因子であることが示された。

#### 3) リツキシマブ併用化学療法の臨床効果を予測する補体依存性細胞障害(CDC)活性を利用したイメージングに基づく迅速評価法の開発

234症例から得られたリンパ節生検検体から得られたCD19陽性B細胞性リンパ腫細胞を用いて、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)と濾胞性リンパ腫(FL)におけるCDC感受性とリツキシマブ併用化学療法に対する臨床効果との関係を統計的に解析した。患者から得られた新鮮リンパ腫細胞のCDC感受性がDLCLおよびFLでリツキシマブ併用化学療法に対する臨床効果と強く関連していることが分かった。しかしながら、リツキシマブを併用しない化学療法での相関は明らかではなかった。

#### 4) リツキシマブ併用CHOP療法を受けたB細胞性リンパ腫患者におけるスタチン非依存的予後

新規診断DLBCL256例中、35例でスタチンを服用していた。スタチン服用群および非服用群の予後の比較では、3年無増悪生存率および3年全生存率に有意差は認められなかった(3年無増悪生存率:84%対73% $p=0.38$ 、3年全生存率:89%対78% $p=0.28$ )。

#### 5) 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、HCVRNA 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。

#### D. 考察

C 末端欠損変異型は4例でみられたが、そのうち3例はリツキシマブ治療の後の再発時にみられた。また2例はリツキシマブ投与前に放射線照射を受けていた。放射線照射やシクロホスファミドなどのアルキル化剤は変異原性が知られており、CD20 遺伝子の変異に関係すると考えられる。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。

また、sIL-2R 値は CHOP 療法のみならず、R-CHOP 療法でも独立した予後因子となり得た。HIV 関連リンパ腫の治療では、CD4 細胞数が予後因子となっており HIV 関連リンパ腫においても、R-CHOP 療法を行うのであれば、sIL-2R 値の測定と予後解析が必要になる。

HIV リンパ腫に対して免疫低下をおこすリツキシマブ治療においては、リツキシマブ投与前の *in vitro* での感受性試験があれば、リツキシマブの必要な症例と必要のない症例を分別することができるため、リンパ腫に対する治療とはいえ、むやみに免疫能を低下させず、感染症リスクを下げる事が出来る。

今回、スタチンは R-CHOP 療法における予後を改善させることはなかったが、HIV リンパ腫で見られるような EBV 関連したリンパ腫における解析も行う必要がある。

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。

#### E. 結論

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、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予後因子の解析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。今後、エイズ関連リンパ腫の治療プロトコルが開始されるが、様々な耐性化や予後に関する因子の解析が重要になってくると考える。

#### F. 健康危機情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

英文

1) Yokota A, Kimura S, Masuda S, Ashihara E, Kuroda J, Sato K, Kamitsuji Y, Kawata E, Deguchi Y, Urasaki Y, Terui Y, Ruthardt M, Ueda T, Hatake K, Inui K, Maekawa T: INNO-406, a novel BCR-ABL/Lyn dual tyrosine kinase inhibitor, suppresses the growth of Ph<sup>+</sup> leukemia cells in the central nervous system and cyclosporine A augments its *in vivo* activity. Blood 109(1): 306-314, 2007.

2) Mishima Y, Terui Y, Sugimura N, Matsumoto-Mishima Y, Rokudai A, Kuniyoshi R, Hatake K. Continuous treatment of bestatin induces anti-angiogenic property in endothelial cells. Cancer Sci. 98(3):364-372, 2007.

3) Utsubo-Kuniyoshi R, Terui Y, Mishima Y, Rokudai A, Mishima Y, Sugimura N, Kojima K, Sonoda Y, Kasahara T, Hatake K. MEK-ERK is involved in SUMO-1 foci formation on apoptosis. Cancer Sci. 98(4):569-76, 2007.

4) Ennishi D, Terui Y, Yokoyama M, Mishima Y, Takahashi S, Takeuchi K, Okamoto H,

- Tanimoto M, Hatake K. Monitoring serum hepatitis C virus (HCV) RNA in patients with HCV-infected CD20-positive B-cell lymphoma undergoing rituximab combination chemotherapy. *Am J Hematol.* 2007.
- 5) Ennishi D, Yokoyama M, Mishima Y, Watanabe C, Terui Y, Takahashi S, Takeuchi K, Ikeda K, Tanimoto M, Hatake K. Rituximab plus CHOP as an initial chemotherapy for patients with disseminated MALT lymphoma. *Leukemia and Lymphoma* 48(11): 2241-2243, 2007.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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, 2009.
- 12) 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* 15(7), 2523-2530, 2009.
- 13) 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* 15(10):3624-32, 2009.
- 14) Terui Y. Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders, histiocytic and dendritic cell neoplasms. *Rinsho Ketsueki* 50(4):271-275, 2009
- 15) Kodaira M, Takahashi S, Yamada S, Ueda K, Mishima Y, Takeuchi K, Yamamoto N, Ishikawa Y, Yokoyama M, Saotome T, Terui Y, and Hatake K. Bone metastasis and poor performance status are prognostic factors for survival of carcinoma of unknown primary site in patients treated with systematic chemotherapy. *Ann Oncol.*, in press, 2009.
- 16) Ennishi D, Asai H, Maeda Y, Shinagawa K, Ikeda K, Yokoyama M, Terui Y, Takeuchi K, Yoshino T, Matsuo K, Hatake K, Tanimoto M. Statin-independent prognosis of patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol.*, in press, 2009.

和文

- 1) 照井康仁：抗 CD 2 2 抗体 Pharma Medica 25(3) 21-25, 2007
- 2) 照井康仁：リンパ節腫脹 Modern Physician 27 (4) 503-506, 2007
- 3) 照井康仁：CTCAE 腫瘍内科 1 (2) 203-206, 2007
- 4) 照井康仁：リツキシマブ耐性化機序における CD20 と CD55 の役割 血液腫瘍科 54(5): 525-532, 2007
- 5) 照井康仁：リンパ腫における遺伝子解析と予後予測 -CD20 の点変異- がん診療の最前線 (後編) 最新医学 6 2 巻 6 月増刊号: 123 - 131, 2007
- 6) 照井康仁：1 4 リツキシマブ以外の抗体療法の進歩は? EBM 血液疾患の治療 2008-2009 中外医学社 404- 408, 2007
- 7) 照井康仁：骨髄腫 がん外来化学療法コンセプトシート 医学のあゆみ 222(13) 1063-1067, 2007
- 8) 照井康仁：リツキシマブ耐性化の機序 Medical Practice 24 (11)1975-1976, 2007
- 9) 照井康仁：TOPICS ASCO サマリー：血液腫瘍分野 がん分子標的治療 5(4) 295-299, 2007
- 10) 照井康仁：悪性リンパ腫薬物療法 レジデントハンドブック 真興交易 (株) 医書出版部 畠 清彦監修, 2007
- 11) 照井康仁、畠清彦：抗体療法の耐性機序- 抗 CD20 抗体リツキシマブ耐性克服の試み 癌抗体療法 別冊医学のあゆみ 編集畠清彦 71-76, 2007
- 12) 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
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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
- 16) 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.
- 17) 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
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 畠清彦、照井康仁、高橋ナヲ子、東江朝子、横井麻珠美 編集 血液がん患者の治療と看護 看護師が がんチーム医療のレベルアップに貢献するために がん看護 1 4 (2) 増刊 南江堂, 2009
- 23) 照井康仁：IGF-IGF-IR システムと抗 IGF-IR 抗体 腫瘍内科 3(3) 255-259, 2009
- 24) 照井康仁：末梢 T 細胞リンパ腫 (非特定) 血液・腫瘍科 58(6) 676-679, 2009
- 25) 照井康仁：V I. マクログロブリン血症 現場で役に立つ血液腫瘍治療プロトコール集 直江知樹編 144-152, 2009
- 26) 照井康仁：ニューモシスチス肺炎予防 化学療法の領域 25(11) 85-91, 2009
- 27) 照井康仁：カリケアマイシン抱合抗 CD22 抗体による B 細胞性リンパ腫の治療研究 血液・腫瘍科 59(4), 2009
- 28) 照井康仁：CD22 3 章 おさえておくべき検査の知識 がん診療レジデントハンドブック 畠清彦編著 中外医学社 134-135,

2009

29) 照井康仁：悪性リンパ腫に用いられる分子標的治療薬 臨床腫瘍プラクティス 5(4) 362-367, 2009

30) 照井康仁：HyperCVAD ±MA 療法 2. 治療レジメンと治療遂行上の注意点 悪性リンパ腫治療マニュアル 改訂第3版 飛内賢正、堀田知光、木下朝博編集、南江堂 256-258, 2009

31) 照井康仁：カリケアマイシン抱合CD22抗体によるB細胞性リンパ腫の治療研究 血液・腫瘍科 59(4) 402-406, 2009

32) 島清彦、照井康仁：B細胞性リンパ腫におけるリツキシマブ耐性 癌と化学療法 36(4) 548-551, 2009

33) 照井康仁、島清彦：腫瘍量とリツキシマブ効果 血液・腫瘍科 59(6) 685-690, 2009

#### 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

## 未治療の HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する 抗レトロウイルス療法併用 R-CHOP 療法の有用性に関する 多施設共同臨床第Ⅱ相試験

分担研究者 田沼順子 国立国際医療センター戸山病院 エイズ治療研究開発センター

**研究要旨** 抗レトロウイルス療法（HAART）により、HIV 感染者の長期予後は飛躍的に改善し、日和見疾患による死亡数も激減したが、HIV 関連悪性リンパ腫は、相対的に増加しており、今なお予後不良の悪性疾患である。しかし、HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する標準治療は、確立されておらず、治療成績に関するデータの蓄積が急務である。そこで、HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する R-CHOP 療法の、腫瘍縮小効果と安全性を評価する、多施設共同研究を開始した。本研究は、HIV 関連悪性リンパ腫を対象とした、日本初の多施設共同臨床試験であるが、学術的意義のみならず、本試験のネットワークを通じて、専門性の高い HIV 関連悪性リンパ腫の診療体制を整備するといった社会的貢献が期待されている。

### A. 研究目的

HIV 感染者においては、HIV 非感染者に比べて、悪性リンパ腫の発生頻度が 100 倍も高いことが知られている。抗レトロウイルス療法（HAART）により、HIV 感染者の長期予後は改善され、日和見疾患による死亡数も激減したが、HIV 関連悪性リンパ腫は、相対的に増加しており、今なお予後不良の悪性疾患である。しかし、HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する標準的治療は、未だ確立されていない。通常、HIV 非感染者の CD20 陽性非ホジキンリンパ腫と同様に、R-CHOP 療法が選択されることが最も多いが、効果と安全性に関する一定の見解は得られておらず、治療成績に関するデータの蓄積が急務である。

そこで、本邦における HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する R-CHOP 療法の腫瘍縮小効果を検証すると共に、HAART 療法や日和見予防対策などの支持療法を強化した場合の治療関

連感染症死や日和見疾患発生頻度を検証することを目的に、多施設共同研究を開始した。

なお、本試験は、2007 年 9 月 6 月の当院倫理委員会で承認された「未治療の CD20 陽性 HIV 関連非ホジキンリンパ腫に対する抗レトロウイルス療法を併用した R-CHOP 療法の有用性に関する臨床試験」（当院倫理委員会承認番号 467）のプロトコルを踏襲し、多施設に拡大したものである。

### B. 研究方法

#### 1. 試験デザインと治療プロトコル

多施設共同臨床第Ⅱ相試験である。

治療プロトコルは、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、HIV 陽性例における安全性は確立していない。本試験では、必ず HAART を併用することとし、積

極的な日和見疾患対策を推奨しつつ、Rituximabを併用することとした。

## 2. エンドポイント

本試験の第一の目的は、HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する初回標準治療としての、R-CHOP 療法の寛解率の確認である。そのため、主要評価項目 (primary endpoint) を治療終了時の完全寛解率 (complete response) とした。

副次的評価項目 (secondary endpoint) としては、2 年時点での無増悪生存率 (progression-free survival) および生存率 (overall survival)、無イベント生存率 (期間) Event-free survival (EFS)、4 コース、6 コース、8 コース終了時の寛解率、重要な有害事象・治療感染死亡、日和見疾患発生頻度、など、治療有効性と治療関連毒性を評価する予定である。

## 3. 対象・登録期間

対象は、病理学的に診断された、未治療の HIV 陽性 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫で、測定可能な標的病変を有し、performance status score 0 から 3、登録時年齢が 20 歳以上 70 歳未満とした。バーキットリンパ腫と中枢神経浸潤例、またコントロール不良な感染症合併例は除外した。

永井らの行った全国調査では、回答のあった 349 施設中 143 施設 (41%) で HIV 関連悪性リンパ腫を経験しており<sup>1)</sup>、年間発症数は 20-30 例と思われる。よって、全国の拠点病院等に呼びかけを行うことにより、年間 15 例/年の登録は可能と考えられる。過去の報告によると、HIV 関連非ホジキンリンパ腫の CDE または CHOP による完全寛解率は、およそ約 50% である<sup>2)</sup>。一方、海外における HIV 関連 CD20 陽性非ホジキンリンパ腫に対する R-CHOP 療法の完全寛解率は 47-77%<sup>3-5)</sup> である。本研究において、完全寛解が 65% に期待されると仮定し、閾値を 45% とした場合、有意水準 0.05 (片側)、検出力 0.80 として統計学的に必要なサンプル数を推計すると、最低 38 例となる。事後不適格や逸脱等の確率を 10% と仮定し、目標症例数は 42 例とした。

登録期間は 3 年 (但し予定症例数に達した時点で終了)、主たる解析終了後も副次的評価項目の評価目的にて登録終了後 2 年間を追跡期間とした。

## (倫理面への配慮)

本試験は、ヘルシンキ宣言 (2008 年ソウル改訂) の精神に従い、「臨床試験に関する倫理指針」(平成 15 年 7 月 30 日制定、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 7 月 31 日全部改正、厚生労働省) に準拠して実施する。また、本試験が実施される各施設において、倫理委員会で承認を得てから行われる。

## C. 研究結果

本年度は、本試験の研究代表者として、多施設共同プロトコルの作成と、研究体制の整備を行った。

参加施設は、エイズ診療拠点病院・ブロック拠点病院を中心に 11 施設が登録され、事務局とデータセンターが国立病院機構名古屋医療センター (臨床研究センター) 内に設置された。

以下のごとく、参加施設は全国に広がる。

施設名 (施設代表者): 北海道大学第二内科 (遠藤知之)、国立病院機構仙台医療センター血液内科 (伊藤俊広)、都立駒込病院感染症科 (味澤篤)、東京医科大学臨床検査医学科 (四本美保子)、国立国際医療センター戸山病院エイズ治療・研究開発センター (田沼順子)、横浜市立市民病院血液腫瘍内科 (仲里朝周)、国立病院機構名古屋医療センター血液内科 (永井宏和)、国立病院機構大阪医療センター免疫感染症科 (上平朝子)、広島大学輸血部 (藤井輝久)、国立病院機構九州医療センター免疫感染症科 (南留美)、熊本大学血液内科 (宮川寿一)

新たに作成された多施設共同プロトコルは、研究代表施設である当院の倫理委員会において、承認を得て (申請番号 678、承認通知 平成 21 年 12 月 14 日受理)、平成 21 年 12 月 15 日に患者登録が開始された。

## D. 結論

本研究は、エイズリンパ腫治療を対象とした、日本初の多施設共同臨床試験であり、エイズリンパ腫治療指針を作成する上で、質の高い evidence を提供することを目的としている。

また、社会的な側面として、本試験を通じて、全国的な研究体制が整備されたことは、大変意義深い。エイズリンパ腫の治療は、HAART と抗が

ん剤の薬物相互作用や、多岐にわたる合併症のため、しばしば困難を極め、非エイズリンパ腫の治療時とは異なる配慮が必要な、専門性の高い分野に属する。本試験を通じて組織されたネットワークは、エイズリンパ腫の診療上重要な情報交換の場となり、高度医療の均点化に寄与するものと考えられる。

今後は、本臨床試験を継続するとともに、本試験で整備されたエイズリンパ腫診療ネットワークを通じて、活発な情報交換とエイズ関連リンパ腫の疫学的研究、病態解明の基礎研究に貢献するシステムの構築等、実施してゆきたい。

## E. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1)古西満、菊池嘉、小田原隆、富成伸次郎、永井英明、今村顕史、田沼順子、善本英一郎. 第22回日本エイズ学会シンポジウム記録 シンポジウム「抗 HIV 療法をいつ、どの薬剤で始めるか-症例経験から考える-」エイズ関連悪性リンパ腫における HAART. 日本エイズ学会誌、11:75-80, 2009

### 2. 学会発表

(国際学会)

なし

(国内学会)

1) 萩原将太郎、田沼順子、岡慎一. AIDS 関連リンパ腫: 当院における後方視的検討. 第56回日本化学療法学会東日本支部総会、2009年10月30日、東京

2) 萩原将太郎、田沼順子、岡慎一. 難治性・再発性 AIDS 関連リンパ腫の後方視的解析. 第23回日本エイズ学会学術集会、2009年11月26-28日

## 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

## 参考文献)

1) Nagai H et al: Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. Int J Hematol 87:442-443, 2008

2) Sparano JA, Phase II trial of infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Trial (E1494). J Clin Oncol. 22:1491-500. 2004

3) Kaplan LD, et al. Rituximab does not improve clinical outcome in a randomized phase 3 trial of CHOP with or without rituximab in patients with HIV-associated non-Hodgkin lymphoma:

AIDS-Malignancies Consortium Trial 010. Blood, 106:1538-1543. 2005

4) Boué F, et al. Phase II trial of CHOP plus rituximab in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 24:4123-8. 2006

5) Ribera JM, et al; PETHEMA, GELTAMO, GELCAB and GESIDA Groups. Safety and efficacy of cyclophosphamide, adriamycin, vincristine, prednisone and rituximab in patients with human immunodeficiency virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: results of a phase II trial. Br J Haematol. 4:411-9. 2

## 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（国立感染症研究所感染病理部）  
石田尚臣、三宅在子、Nazanin Dabagmanesh、山岸誠、中野和民（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** [1] (H19～20年度)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- $\kappa$ 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, NF $\kappa$ B1 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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しめした。これらの細胞は NF- $\kappa$ 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 $\beta$ 阻害剤による NF- $\kappa$ B 活性の阻害が認められなかった事から、NF- $\kappa$ 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。[2] (H21年度)エイズリンパ腫検体 10 例および対照群として健常人組織およびリンパ節検体 22 例から RNA を抽出し、近年その発現低下と細胞のがん化との関係が注目されている microRNA-31 (miR-31) の発現プロファイルを検討した。その結果、エイズリンパ腫では miR-31 の発現が低下する傾向が見られ、miR-31 の機能不全がリンパ腫の発症と何らかの関係がある可能性が見出された。

### A. 研究目的

HIV 感染者はエイズ発症期に、ニューモシスチ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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。

本研究での 3 年間の経過は次の通りである。まず H19 年度には EBV 陽性 ARL のモデルとしては、健常人末梢血単核球 (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- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ に

よる NF- $\kappa$ 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。

次に H20 年度には、PEL 細胞に対する NF- $\kappa$ 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技術を用いて検討した。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 $\beta$  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 H21 年度にはエイズリンパ腫検体および健常人各種組織およびリンパ節検体から抽出した Total RNA サンプルを用いて、microRNA (miRNA) の発現異常を検討した。miRNA は 20 塩基ほどの小さな non-coding RNA で、複数のターゲット RNA の 3'-UTR に結合し、その発現を抑制している。近年様々な癌の発症において、これらの miRNA の発現異常が関わっているとの報告が多く出されている。我々は、miRNA-31 (miR-31) が NIK をターゲットにしており、Non-canonical NF- $\kappa$ B 経路の抑制に重要な役割を果たしていることを明らかにした。この度上記のエイズリンパ腫検体で miR-31 の発現量を測定した結果、健常人よりも発現が低下している傾向にあることを発見し、miR-31 の機能不全による NF- $\kappa$ B の過剰な活性化がエイズリンパ腫の発症に何らかの影響を及ぼしている可能性を見出した。

## B. 研究方法 (年度別)

### (1) PEL 細胞に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の作用 (H19 年度)

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 (H20 年度)

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- $\kappa$ B 活性などを検討した。また、これらの細胞の NF- $\kappa$ B 阻害剤に対する感受性を DHMEQ を用いて検討した。

### (3) エイズリンパ腫での miR-31 発現解析 (H21 年度)

エイズリンパ腫検体 10 例および対照群として、健常人の様々な組織およびリンパ節検体 (22 例) より、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。特にエイズリンパ腫検体に関しては、RNA の分解が顕著であったが、それらの検体について miRNA 解析においてノーマライザーとして汎用されている snoRNA の一つである RNU48 の濃度を realtime-PCR 法 (ABI) によって測定したところ、small RNA の測定には十分耐える検体品質であることが確認された。miR-31 はターゲット遺伝子に細胞の運動性に関わる RhoA を含むことが報告されており、我々の研究室でも新たに non-canonical NF- $\kappa$ B 経路の調節因子である NIK がターゲットであることを確認し、miR-31 の発現量の低下が、この miRNA の癌抑制効果を不全にしていると考えている。そこで我々は、この度 ABI 社製の miR-31 特異的 realtime-PCR プライマーを用いて、前述のエイズリンパ腫および健常人検体から抽出した RNA サンプルにおいて、miR-31 濃度の測定を行った。

#### (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 (年度別)

#### (1) PEL 細胞に対する NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ の作用 (H19 年度)

PEL 細胞株に体する DHMEQ の効果は一過性であり、処理した HHV-8 感染 PEL 細胞株 (BCBL1, TY1, BC1) の核抽出液を用いた EMSA

で、NF- $\kappa$ B 活性が 1 ~ 3 時間後に抑制されたが、効果は一過性で 2 4 時間後には回復する事が示されている (図 1)。

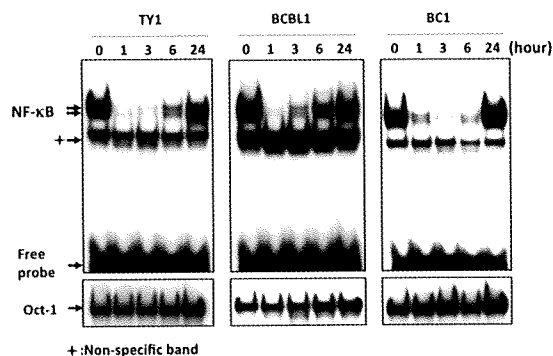


図 1. DHMEQ による一過性の NF- $\kappa$ B 活性化抑制 10 $\mu$ g/ml の DHMEQ 処理後時間経過を追って各抽出液を調製し EMSA 法によって NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性を検討した。

次に、DHMEQ による NF- $\kappa$ B 活性抑制が遺伝子発現に与える影響を Agilent 社のシステムで再検討した (図 2)。

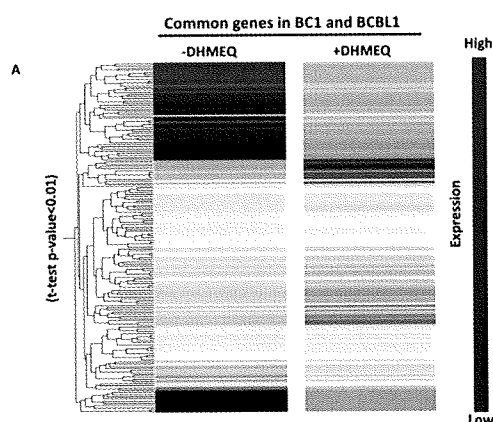


図 2. DHMEQ 処理による PEL 細胞の遺伝子発現変化 BC1 細胞と BCBL1 細胞で共通の変化を示す遺伝子群を抽出してクラスター解析を行った。

発現が有意に増加あるいは減少した遺伝子 (t test p value<0.01) 群を抽出した。その結果、発現抑制が認められた遺伝子は 72、発現が誘導された遺伝子は 71 個となった。

NF- $\kappa$ B 標的遺伝子の中で発現抑制が認められたものには以下のようなものがある。

IL6, myc, CCR5, BCL-xL, cIAP2, NF- $\kappa$ B1  
また、抗アポトーシス遺伝子で発現抑制が認め

られた遺伝子には以下のものがある。

Bcl-xL, c-IAP2, NF- $\kappa$ B1, Birc5, IGF1R

一方、発現亢進が認められた遺伝子には以下のようなものがあった。

SSP1, VEGF, MIF, BAG3

プロアポトーシス遺伝子で発現亢進が認められた遺伝子には以下のものがあった。

DEDD2, CDKN1A, APOE, TNFSF10

細胞周期停止遺伝子で発現亢進の認められた遺伝子には以下のものがある。

CDKN1A, CDKN1B, PPP1R15A, DDIT3

これら発現が有意に変化した遺伝子群に関して GeneSprinr GX を用いて Gene Ontology で解析した (図3)。

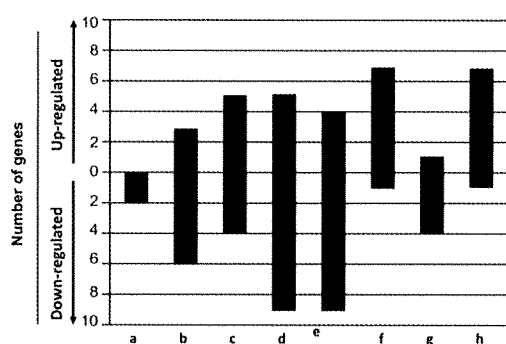


図3. Gene Ontology 解析の結果

グラフは以下のカテゴリーの遺伝子の数を示している。a, negative regulators of NF- $\kappa$ B import into nucleus; b, I $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B cascade; c, positive regulators of apoptosis; d, negative regulators of apoptosis; e, DNA repair; f, cell cycle arrest; g, cell cycle checkpoint; h, regulators of cyclin dependent protein kinase activity. 各領域は発現亢進あるいは抑制を示す遺伝子の数を反映している。

解析の結果、以下の機能群に属する遺伝子の発現抑制が認められた。

- (1) negative regulators of NF- $\kappa$ B import to the nucleus,
- (2) I- $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B cascade
- (3) negative regulators of apoptosis
- (4) DNA repair
- (5) cell cycle checkpoint.

一方、以下のカテゴリーに属する遺伝子については発現亢進の傾向が認められた。

- (1) positive regulators of apoptosis
- (2) cell cycle arrest

(3) regulators of cyclin dependent protein kinase activity

全体をまとめると、アポトーシス促進と細胞周期停止遺伝子の発現亢進の傾向と、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子、抗アポトーシスと DNA 修復にかかわる遺伝子の発現抑制が認められた。

従って、PEL 細胞における NF- $\kappa$ B の恒常的活性化は細胞の増殖と生存に必須な事象である事が示唆された。

## (2) H20 年度 B 細胞リンパ腫細胞に対する PKC 阻害剤の作用の検討 (H20 年度)

まず、実験に用いる培養細胞における各種 PKC 分子の発現と PKC $\beta$ の活性を評価した。Immunoblot による解析の結果、これらの細胞株では、PKC の $\alpha, \beta, \gamma$ および $\delta$ の発現が確認されたが、 $\theta$ の発現はいずれの細胞においても認められなかった (図4)。

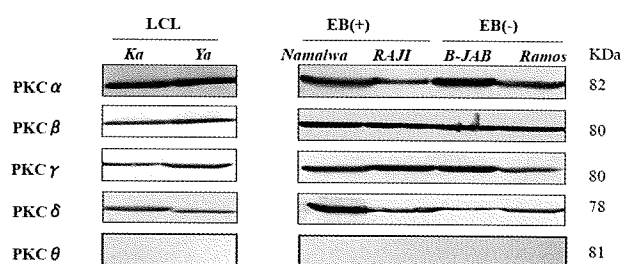


図4. B 細胞株における PKC アイソフォームの発現

細胞株の whole cell extract を SDS-PAGE で分画後、PVDF メンブレンに転写し、各 PKC 特異抗体を用いてプロットした。

次に、B 細胞受容体からのシグナル伝達に必須の役割を持つ PKC $\beta$ についてその活性化状態を2つの方法で検討した。まず、SigmaTect Protein kinase C assay system (Sigma)を用いて測定したところ、これらの B 細胞株では、未刺激の状態でも対照の TPA 刺激後の Jurkat 細胞と同等あるいはそれ以上の活性を示した (図5a)。従って、これらの細胞においては PKC $\beta$ の恒常的かつ強力な活性化が存在する事が示唆された。さらに、活性化 PKC は膜分画に存在する事から、生化学的に細胞質分画と膜分画に分けて immunoblot 法によってその局在を解析した (図5b)。その結果、やはりこれらの B 細胞株全てにおいて、PKC $\beta$ の膜局在が確認できた。

これらのデータを総合すると、B細胞培養株では、EBVの感染の有無にかかわらず、PKCβの高いレベルでの恒常的活性化が存在する事が示された。

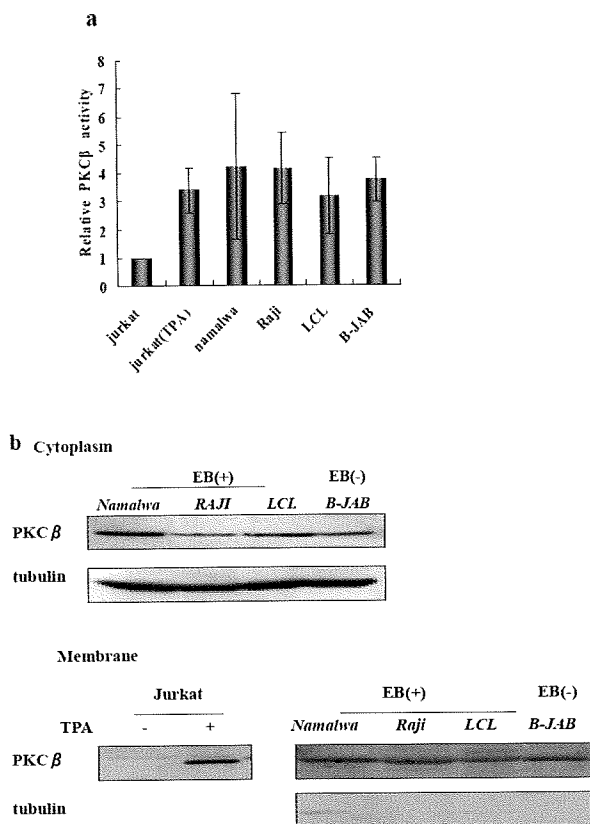


図5. B細胞株におけるPKCβの恒常的活性化

a) SigmaTect Protein kinase C assay system (Sigma)による測定結果。Jurkat細胞のTPA刺激有り無しの検体を対照としている。b) PKCβの細胞内局在の解析。生化学的に細胞質と膜成分を分画し、それぞれをimmunoblot法で解析した。対照にはTPA刺激有り無しのJurkat細胞の検体を用いた。

次に、これらの細胞株に対するPKCβ阻害剤 (Staurosporine) の影響を検討した。まず、細胞死の誘導について検討したところ、いずれの細胞も感受性を示したが、その程度は2群に分かれた。つまり、Raji細胞とLCLは0.065μMにおいてもrelative viabilityが60%以上であり、NamalwaおよびB-JAB細胞株が、10-20%であるのと比較して、相対的な耐性を示した(図6)。

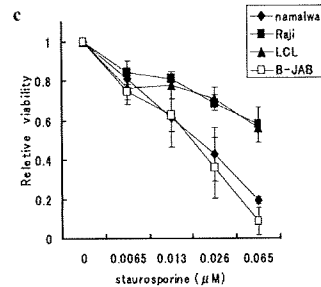


図6. PKCβ阻害剤による細胞死誘導

Staurosporine添加48時間後に、WT-8アッセイ生細胞数を評価し、相対的生存率で表現した。

次に、細胞死がアポトーシスによるものかどうかを検討するために、Staurosporine添加後の細胞について、Caspase-3, -8, -9の活性化の有無をgreen-fluorochrome-labeled inhibitors of caspase (FLCA)によって検討した。その結果、相対的な高感受性を示したNamalwa細胞とB-JAB細胞で明らかな活性化が認められたが、Raji細胞とLCLでは、活性化が低レベルであった(図7)。

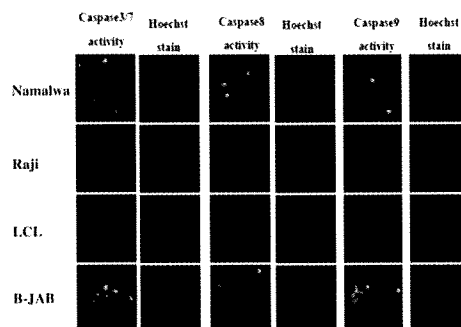


図7. Staurosporine添加によるcaspaseの活性化

添加後8時間で細胞を固定し、それぞれのcaspaseの活性化をFLCAで検討した。また、Hoechst33342染色の結果を右に示す。

更に、Staurosporine処理によるNF-κB活性化に対する効果をEMSA法で検討した。その結果、相対的に高い感受性を示したNamalwa細胞とB-JAB細胞においては、NF-κBの活性化が強く阻害されていた。一方相対的な耐性を示したRaji細胞とLCLでは、ほとんど活性が阻害されていなかった(図8)。