

## 難治性・再発性 HIV 関連血液腫瘍に対する自己末梢血幹細胞移植の開発 および特異的 DNA メチル化パターンによる診断法の開発

研究分担者 萩原将太郎 国立国際医療研究センター血液内科 医長

**研究要旨** 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫の予後は極めて不良であり、有効な治療法の開発が急がれている。我々は、自己末梢血幹細胞移植による治療法の安全性と有効性を確かめるため多施設共同臨床第 Ⅲ 相試験を継続実施している。7 施設で IRB 承認を得ており、12 例の仮登録と 7 例の本登録を得ている。登録症例が予定を下回っているため、研究期間を 3 年間延長した。

HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化解析により、診断への応用の可能性を示した。健常人の末梢血ナイーブ B リンパ球を HIV に感染させた T リンパ球と共培養することにより、DNA メチル化パターンが変化することを示した。これは、一部で HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化パターンと共通することを見出した。

### A. 研究目的

1 . AIDS 関連リンパ腫は、HAART 時代における日和見合併症の中で重要かつ難治性の疾患である。特に初回治療不応あるいは再発性の AIDS 関連リンパ腫は極めて予後不良であり、治療方法の確立が喫緊の課題である。国立国際医療センターにおいて 2005 年より実施した難治性再発性 AIDS 関連リンパ腫に対する自己末梢血幹細胞移植を用いた治療法のパイロット研究では 10 例中 8 例に移植を実施し、7 例で長期寛解を得ている。初回治療抵抗性および再発性 AIDS 関連リンパ腫に対するサルベージ療法の有効性安全性を検討するため、多施設共同臨床第 Ⅲ 相試験を計画した。

2 . 我々は、HIV 関連リンパ腫の DNA メチル化パターンが非 HIV リンパ腫と異なること既に示した。診断への応用を模索するため、正常ナイーブ B リンパ球を HIV 感染 T リンパ球と共培養することにより、B リンパ球における DNA メチル化パターンへの影響を検討する。

### B. 研究方法

1 . 難治性および再発性 HIV 関連悪性リンパ腫に対する MEAM 療法を前処置とする HAART 併用自己末梢血幹細胞移植に関する多施設共同第 Ⅲ 相臨床試験

HIV 感染に関連した日和見合併症としての悪性リンパ腫を発症した患者のうち、初回化学

療法に対して難反応のもの、あるいは再発例を対象とする。本試験では、初回治療で CR または CRu に到達できなかった症例、あるいは再発の患者について仮登録を行い、移植適応を確認できた症例について本登録を行う。本試験への参加者は、仮登録の際にサルベージ療法から始まる一連の幹細胞採取、本登録後の自己末梢血幹細胞移植について十分な説明を受けて文書で同意を得た者とし、さらに本登録前に確認のために自己末梢血幹細胞移植について再度十分な説明をうけることを前提とする。難治性再発性 HIV 関連悪性リンパ腫に対して、ESHAP ± リツキシマブあるいは ICE ± リツキシマブによるサルベージ療法を 1-4 コース施行する。サルベージ療法の骨髄回復期において自己末梢血幹細胞採取術を施行し、CD34 陽性細胞  $2 \times 10^6 / \text{kg}$  以上を採取する。サルベージ療法により部分寛解以上の治療効果が得られた症例で、HAART を併用し MEAM 療法を前処置とした自己末梢血幹細胞移植を行う。Primary endpoint は 2 年生存率。Secondary endpoints は移植後 100 日目の生存率、各治療段階での寛解率、毒性の評価、採取率、生着率、CD4 の数、HIV ウイルス量。

研究期間は 3 年間延長し、2018 年 3 月 31 日までとする。

**(倫理面への配慮)** 本試験に関係する全ての研究者はヘルシンキ宣言（2008 年ソウル改訂）および臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年

7月31日全部改正)に従って本試験を実施する。患者登録に先立って、担当医は患者本人に施設の倫理委員会の承認が得られた説明文書により同意を得る。

## 2. DNA メチル化プロファイリングによる診断への応用

健常人から提供された正常ナীব B 細胞を HIV に感染した T 細胞と共培養し、DNA メチル化パターンの変化を観察することで、HIV 感染における間接的な B 細胞への影響を証明する。

### 1) 検体収集

文書で同意を得た健常人ドナーから末梢血約 60ml をヘパリン加真空管にて採血する。

### 2) 試料調製

国立国際医療研究センターにおいて健常人末梢血リンパ球から T 細胞および B 細胞分画を分離

### 3) HIV 感染細胞作製

国立感染症研究所感染病理部において: T 細胞に HIV ウイルスを感染させ、トランスウェルチャンバーの下層に、B 細胞を上層にて培養する。

### 4) DNA 抽出

一定期間共培養後にリンパ球 DNA を抽出する。

### 5) メチル化 DNA マイクロアレイ解析

抽出された genomic DNA に対してイルミナ社のマイクロアレイチップを用いてメチル化 DNA マイクロアレイ解析を行う。

### 6) 詳細分析

マイクロアレイ解析の結果より、HIV 感染による特異的メチル化パターンの変動、メチル化遺伝子群の判定解析等を行う。

### 7) メチル化遺伝子の同定

メチル化特異的 PCR 等によりメチル化遺伝子の同定を行う。

## (倫理面への配慮)

健常人ボランティアドナーにたいして、説明文書をもちいて説明を行い、文書による同意を得る。試料は、採取された後直ちに個人情報情報を削除(連結可能匿名化)した上で管理する。国立感染症研究所および解析委託業者へは個人情報情報は送付しない。メチル化解析の結果についても完全に匿名化することにより、個人情報情報の漏洩を防ぐ。連結可能匿名化の対応表は個人情報管理者が厳重に管理する。本研究の成果を学会や論文において公表する場合にあって

も、試料提供者個人の特定につながる情報が掲載されないようにする。

## C. 研究結果

### 1. 難治性および再発性 HIV 関連悪性リンパに対する MEAM 療法を前処置とする HAART 併用自己末梢血幹細胞移植に関する多施設共同第 相臨床試験

2014年3月時点での IRB 承認施設は以下の7施設である。

国立病院機構 名古屋医療センター

国立病院機構 大阪医療センター

国立国際医療研究センター戸山病院

北海道大学病院

東京大学医科学研究所附属病院

国立病院機構九州医療センター

がん・感染症センター 都立駒込病院

症例登録の状況は、仮登録症例 12 例、本登録 7 例である。現時点では問題となる有害事象の報告はない。これまでの症例登録数は予定を下回っており、登録期間および総研究期間を3年間延長することとした。

### 2. HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化プロファイリングの診断への応用

HIV 感染 T リンパ球と共培養したナীব B リンパ球の DNA メチル化解析を行った。HIV 非感染 T リンパ球と共培養した B リンパ球との比較では、Hypomethylation ターゲット 11、Hyper-methylation ターゲット 69 であり、HIV リンパ腫との共通ターゲット Hypomethylation 2、Hypermethylation1 箇所が見出された。

## D. 考察

### 1. 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫に対する MEAM 療法を前処置とする HAART 併用自己末梢血幹細胞移植に関する多施設共同第 相臨床試験

HIV 関連リンパ腫は、予後不良であり、再発難治例に対する有効な治療法は確立されていない。しかし、大量化学療法を用いた造血幹細胞移植療法は、大幅な予後改善の可能性のある。EBMT の lymphoma working group は HIV 関連リンパ腫における造血幹細胞移植療法と非 HIV 関連リンパ腫に対する造血幹細胞移植療法との比較で、両者に安全性および有効性に有意な差が無いことを報告している。本研究は、我が国における HIV 関連リンパ腫の難治例、再発例に対する標準療法の確立を目指したも

のであり、まずは、安全性・有効性の確認が必要である。早期の症例蓄積が望まれる。

## 2. HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化プロファイリングの検討

昨年度、我々は、HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化パターンが非 HIV 関連リンパ腫と明確に異なることを報告した。今年度、HIV 関連リンパ腫の診断および発症予測を目標として HIV 感染 T 細胞と共培養したナイーブ B 細胞への影響を DNA メチル化の観点から検討した。その結果、明らかなメチル化変動が観測され、さらに変動ターゲットが HIV 関連リンパ腫と一部共通していることを見出した。この現象は、リンパ腫発症メカニズムに寄与している可能性が示唆された。

## E. 結論

### 1. 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫

本登録症例数は 7 例であり、予定登録数 18 例への到達のために登録期間を延長した。更なる症例の組み込みが必要である。現時点での重篤な有害事象の報告はない。

### 2. HIV 関連リンパ腫における DNA メチル化プロファイリング

HIV 関連リンパ腫において DNA メチル化パターンは新たな診断法の開発に寄与する可能性が示唆された。また、今後、予後不良因子として特異的なメチル化遺伝子の特定により新規治療ターゲットの発見に結びつく可能性がある。

## F. 健康危機情報

### 1. 難治性・再発性 HIV 関連悪性リンパ腫

現時点での予期せぬ有害事象報告はない。

### 2. HIV 関連血液疾患

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yanagisawa K, Tanuma J, Hagiwara S, Gatanaga H, Kikuchi Y, Oka S. Epstein-Barr viral load in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker of central nervous system involvement of AIDS-related lymphoma. Intern Med. 2013;52(9):955-9.
- 2) Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamasaki M, Yoshida L, Mochizuki M, Junko Tanuma,

Oka S, Ishizaka Y, Shimura M, Hagiwara S. DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas. AIDS. 2014 Feb 20;28(4):503-10.

- 3) Ota Y, Hishima T, Mochizuki M, Kodama Y, Moritani S, Oyaizu N, Mine S, Ajisawa A, Tanuma J, Uehira T, Hagiwara S, Yajima K, Koizumi Y, Shirasaka T, Kojima Y, Nagai H, Yokomaku Y, Shiozawa Y, Koibuchi T, Iwamoto A, Oka S, Hasegawa H, Okada S, Katano H. Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition. Cancer Med. 2014 Jan 10. doi: 10.1002/cam4.178. [Epub ahead of print]
  - 4) Kojima Y, Hagiwara S, Uehira T, Ajisawa A, Kitanaka A, Tanuma J, Okada S, Nagai H. Clinical Outcomes of AIDS-related Burkitt Lymphoma: A Multi-institution in Japan. Jpn J Clin Oncol. 2014 Feb 20. [Epub ahead of print]
- ## H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
- なし

