

## 第IV章. 第 III 相 IL-2 無作為割付国際臨床試験 (ESPRIT) 参加者を対象とした T 細胞免疫反応の経時的な変動

### IV-1; はじめに

第 III 相 IL-2 無作為割付国際臨床試験 (ESPRIT) とは、2000 年夏よりアメリカ合衆国の National Institute of Health (NIH) を中心に、世界 20 か国 221 施設 4,000 名の HIV-1 感染者を、現状の治療 (HAART) にリコンビナント IL-2 (recombinant IL-2: rIL-2) 投与を追加する群と追加しない群に無作為分割し、IL-2 投与の効果を検討する国際共同研究である。ESPRIT は進行中の研究であるため、同研究にエントリーした者の一部を対象として、そこから得られた結果について、基礎知見として本章において報告する。

### IV-2; 目的

IL-2 の体外からの投与により、減少していた CD4+T 細胞数が回復するという報告は数多く存在する[20-25]。IL-2 投与の理論上の効果は、末梢血中の CD4+T 細胞を活性化して、その増殖を促し、更に増殖した CD4+T 細胞から生成される IL-2 により、CD4+T 細胞数は相乗的に増加すると考えられている。しかし、IL-2 投与による CD4+T 細胞増殖の持続性と自己 IL-2 の生成状況について継続的に検討した報告は、既出していない。本章の研究は、IL-2 投与に対する T 細胞表面抗原や IL-2 産生細胞の割合の変化を、経時的にモニターすることで、外部からの IL-2 が及ぼすリンパ球

サブセットレベルへの影響を解析し、個人レベルでの IL-2 投与効果を認知することを目的としている。

#### IV-3: 対象と方法

##### IV-3-1: ESPRIT 施行法

HAART を施行中で CD4+T 細胞数 $>300$  / $\mu$ l、VL  $<50$  copies/ml を始め、NIH より指定された条件を満たす ESPRIT 参加希望者を、無作為抽出により、IL-2 投与群 (IL-2 group) と現在の治療を継続する群 (control group) の2群に分類した。IL-2 group には、1 日に 15 MIU の rIL-2 を皮下注射にて 5 日間連続投与 (15 MIU/day  $\times$  5days) し、これを 1 サイクルとした。次の連続投与までは、平均 8 週間 (6 週~11 週間) のインターバルを開けた。最初の 6 ヶ月以内に 3 サイクル施行し、これを基本投与とした。基本投与終了以降は、IL-2 治療開始時の CD4+T 細胞数を参照し、必要に応じて追加投与を行った。即ち、IL-2 投与前の CD4+T 細胞数が $<500$  / $\mu$ l の対象者では、前値の 2 倍未満になった場合に、IL-2 投与前の CD4+T 細胞数が $\geq 500$  / $\mu$ l の対象者においては、 $<1,000$  / $\mu$ l になった場合に投与サイクルを追加し、CD4+T 細胞数が目標数値に達するまで、rIL-2 追加投与を繰り返した (Fig IV-1)。

##### IV-3-2: 対象

ESPRIT への参加する HIV-1 感染者には、IL-2 投与による副作用、control group に割り当てられる可能性、参加者本人の意志で中断できる事を含め、十分な説明を実施し、インフォームドコンセントを得た。ESPRIT は、現在も進行中の研究であるため、本章では、2000 年 11 月から 2001 年 3 月末までに ESPRIT にエントリーした 9 名 [IL-2 group 5 名 (B1013, Z1039, B1047, G1054, Z1104), control group

4名 (C101, C110, C112, C122) ] についての IL-2 産生細胞割合の推移および細胞表面抗原の解析を報告する。エントリー時点での個人別の臨床所見を Table IV-1 に示す。

#### IV-3-3: 方法

##### IV-3-3a: 採血方法と採血間隔

対象者は、ESPRIT へのエントリーが決定した時点より採血を開始する。この時点での測定結果を基準値 (ベースライン:base line) として、他の時点との比較対照として用いた。本研究用採血には、VL用は EDTA 血を、それ以外はヘパリン血を使用した。検体採取は、IL-2 group においては、基本投与の 1,2,そして 3 サイクル目の開始時点と一部 IL-2 投与サイクル終了直後、更に基本投与終了後は、2, 4, 6 そして 9 ヶ月後に実施した。Control group は、IL-2 group とインターバルがほぼ等しくなるような間隔で検体採取を行った。

##### IV-3-3b: 使用抗体

以下に表記した蛍光標識抗ヒトモノクローナル抗体および精製抗体を用いた。即ち、CD4-APC, CD3-APC, IgG1-APC (negative control), CD25-FITC, CD45RA-FITC, IgG1-FITC (negative control), CD4-PE, CD122-PE, CD56-PE, IgG1-PE (negative control) (以上 coultter, FL, USA)および、CD8-cy chrome, CD25-cy chrome, CD19-FITC, IgG1-cy chrome (negative control), CD132-biotine, streptavidine-FITC (以上 Pharmingen, CA,USA)、そして CD45RO-APC, IFN- $\gamma$ -FITC, IgG2a-FITC, IL-2-PE, IL-4-PE, IgG1-PE (negative control) (以上 Becton Dickinson, CA, USA) である。

#### IV-3-3c: リンパ球表面抗原の解析

リンパ球サブセットは、新鮮ヘパリン血を検体として、IV-3-3b に表記した抗ヒトモノクローナル抗体による抗体染色により、その割合を解析した。これらの抗体は、製造元が推奨する使用濃度および抗体染色法を参照し操作した。細胞上の表面抗原の解析は、フローサイトメトリ（FACS Caliber: Becton Dickinson, CA, USA) にて行った。

#### IV-3-3d: IL-2 産生 T 細胞の変動

PMA と Ionomycin による刺激方法は、第 III 章 III-2-3 に記載した手法を一部変更して用いた[49]。即ち、検体を PBMCs に分離後、 $2 \times 10^6$  /ml に調整し、そこへ 10 ng/ml PMA+ 1  $\mu$ g/ml Ionomycin および 10  $\mu$ g/ml BFA を添加した。前述した条件でインキュベーションした後、EDTA/PBS を EDTA 最終濃度 2 mM となるように添加し、室温 15 分反応させた後、1 回洗浄後、上清を除き PBS-BSA にてリサスペンションした。以降の表面抗原染色から解析まで以降の操作は III-2-4 の手法に準じる。解析には 4 カラー フローサイトメトリ（FACS Calibur: Becton Dickinson CA USA) を用いた (Fig IV-2)。

#### IV-3-3e: T 細胞増殖試験

新鮮ヘパリン血より回収した PBMCs  $1 \times 10^6$  /ml に、終濃度: 25 U/ml の rIL-2 (Roche Diagnostic Systems, NJ, USA) を添加し、negative control となる無刺激 PBMCs とともに 96 穴丸底プレートに分注し、37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 96 時間培養した。細胞回収の後、Bromodeoxy Uridine (BrdU) proliferation ELISA Kit (Roche Diagnostic Systems, NJ, USA) にて細胞増殖能を測定した。同キットの操作法は添付資料および既出の論文を参考にした[50,51]。BrdU を結合した細胞

は、抗 BrdU 抗体との抗原抗体反応を化学発光に置換して検出した。また、結果は、stimulation index (SI) にて表示した。リコンビナント IL-2 に対する増殖反応陽性の目安は SI>3 とした。

#### IV-3-3f: 血漿 HIV-RNA 量 (VL)

HIV viral load は、EDTA 添加血漿をサンプルとして Amplicor HIV-1 monitor 1.5 (Roche Diagnostic Systems, NJ, USA) にて定量した (測定感度: >50 copies/ml)。

#### IV-3-3g: 統計学的処理

本検討は対象者数が少数のため、全てノンパラメトリック検定による解析を行った。解析は  $p < 0.05$  の場合に有意差があると判定した。

### IV-4: 結果

#### IV-4-1: CD4+T 細胞数の変化

IL-2 group の CD4+T 細胞数には顕著な上昇が認められた。これは IL-2 group に所属する全員に一致した傾向であった。基本投与中は、base line より +105 ~ +474 / $\mu$ l (mean: +303 / $\mu$ l) の上昇を、基本投与終了以後は、base line より +160 ~ +802 / $\mu$ l (mean: +486 / $\mu$ l) の上昇をそれぞれ認めた。また基本投与終了 2 ヶ月後を基点として以降の CD4+T 細胞数の増減を追跡すると、基本投与終了 4 ヶ月後では -160 ~ +47 / $\mu$ l (mean: -94 / $\mu$ l)、基本投与終了 6 ヶ月後では -442 ~ +201 / $\mu$ l (mean: -36 / $\mu$ l)、基本投与終了 9 ヶ月後では -552 ~ +372 / $\mu$ l (mean: -103 / $\mu$ l) と低下傾向であるが、base line や同じ時点における control group の値と比較して、有意な高値であった (Fig.

IV-3a)。しかし、B1047 と G1054 は、基本投与終了後に IL-2 追加投与基準を下回る CD4+T 細胞数となったため、B1047 は基本投与終了 7 ヶ月後に、G1054 は基本投与終了 5 ヶ月後に、IL-2 追加投与 1 サイクルを実施した。これにより CD4+T 細胞数は両者とも再上昇し、連続した追加投与は不要であった。IL-2 group の base line と以降の経過期間の CD4+T 細胞数を比較した結果、そして各時点で IL-2 group と control group の 2 群間を比較した結果においては、いずれも有意差が認められた (IL-2 group; base line vs. 基本投与 2 サイクル目 or 基本投与 3 サイクル目 : 両者ともに  $p < 0.01$ , base line vs. 基本投与終了 2 or 4 or 6 ヶ月後:  $p < 0.05$ , base line vs. 基本投与終了 9 ヶ月後:  $p < 0.01$ ) (IL-2 group vs. control group; 基本投与 2 サイクル目:  $p < 0.05$ , 基本投与終了 6 ヶ月後, 9 ヶ月後: 両者ともに  $p < 0.05$ ) (Fig. IV-3a)。また、興味深いことに、IL-2 投与開始前と 5 日日間の連続投与を終了した直後の CD4+T 細胞数を比較すると、直後の CD4+T 細胞数は急激に低下する事が判った (Fig. IV-3b)。しかもこの数的な減少は、次のサイクルが開始するまでには回復しているため、IL-2 投与を成因とするアポトーシスが一過性に多発した為と考えられる[52,53]。

CD8+T 細胞数は、基本投与中に一過性的上昇を認めるものの、それは有意な変化ではなかった (IL-2 group の mean  $\pm$  S.D; base line:  $763 \pm 102$  / $\mu$ l, 基本投与 3 サイクル目:  $912 \pm 217$  / $\mu$ l, 基本投与終了 2 ヶ月後:  $829 \pm 289$  / $\mu$ l, 基本投与終了 9 ヶ月後:  $784 \pm 107$  / $\mu$ l, control group の mean  $\pm$  S.D; base line:  $747 \pm 256$  / $\mu$ l, 基本投与 3 サイクル目:  $670 \pm 114$  / $\mu$ l, 基本投与終了 2 ヶ月後:  $661 \pm 137$  / $\mu$ l, 基本投与終了 9 ヶ月後:  $630 \pm 92$  / $\mu$ l)。また、IL-2 group 全員が、base line では VL が検出限界以下 (undetectable: U.D,  $< 50$  copies/ml) であったが、IL-2 投与期間内に一過性に小幅な上昇を認める者も出現した (B1013; 基本投与 2 サイクル目: 110 copies/ml)。しかし、IL-2 投与を終了することで、VL は再度 U.D に戻り重篤な状態には至らなかった。

#### IV-4-2. IL-2 産生 T 細胞の割合

対象者の PBMCs を PMA+Ionomycin で刺激をして、潜在するサイトカイン産生能を強力に引き出し、表面抗原 (CD4, CD8) とサイトカインの二重染色によりサイトカイン産生 T 細胞の割合を解析した。その結果、IL-2 group と control group 間に IL-2 産生 CD4+T 細胞の有意な変動は認められなかった。しかし、IL-2 group は control group よりも分散が広範囲に及ぶ傾向を持ち、これは IL-2 投与による反応性の個人差を示すものと推測された (Fig. IV-4a)。IL-2 group 中の 2 名 (B1013, Z1104) は、基本投与終了 9 ヶ月後までの IL-2 産生細胞の割合の変動が base line  $\pm$  10% の範囲に収束し、control group のそれと同様の傾向を認めた。一方、Z1039 は IL-2 投与終了後に IL-2 産生 CD4+T 細胞の割合が、15%以上 上昇し、経過期間中は、高値のまま維持された。しかし、B1047, G1054 の両名の IL-2 産生細胞は、逆に base line より 10%程度低下し、追加 IL-2 投与が実施された (B1047: 基本投与終了 7 ヶ月後, G1054: 基本投与終了 5 ヶ月後)。その後、やや上昇傾向を示したものの、基本投与終了 9 ヶ月後まで base line を下回る状態が続いた (Fig. IV-4b)。また、CD4+T 細胞数と同様に、IL-2 産生細胞の割合も、IL-2 投与サイクル終了直後には、投与前値に比べ有意に減少した (Fig. IV-4c)。

IL-2 産生 CD8+T 細胞の割合は、IL-2 group 内の base line と以降の時点の値を比較した場合においても、同じ時点の IL-2 group と control group 間の比較した場合においても、有意な変化を認めなかった (IL-2 group の mean  $\pm$  S.D; base line:  $8.5 \pm 3.4\%$ , 基本投与 3 サイクル目:  $12.7 \pm 5.5\%$ , 基本投与終了 2 ヶ月後:  $14.9 \pm 8.5\%$ , 基本投与終了 9 ヶ月後:  $12.7 \pm 7.2\%$ , control group の mean  $\pm$  S.D; base line:  $12.4 \pm 2.2\%$ , 基本投与 3 サイクル目:  $14.4 \pm 3.9\%$ , 基本投与終了 2 ヶ月後:  $11.3 \pm 7.8\%$ , 基本投与終了 9 ヶ月後:  $12.4 \pm 2.2\%$ )。

#### IV-4-3: TH1・TH2 タイプサイトカイン産生細胞

IL-2 group の IFN- $\gamma$  産生 CD4+T 細胞の変動に関しては、base line  $\pm$  10% 範囲を推移する 2 名 (B1013, Z1104) および基本投与終了後に base line +10% でシフトする Z1039 の計 3 名は、IL-2 産生 CD4+T 細胞同様の傾向を認めるものの、残りの B1047, G1054 の両名の IFN- $\gamma$  産生 CD4+T 細胞の割合は、振幅が非常に激しく、IL-2 産生細胞の傾向とは異なる結果となった (Fig. IV-5a)。但し、control group の変動幅と比べると明らかに過度なことより、この現象が IL-2 投与に付随して発生している可能性は、否定できない。一方、IL-2 group における IL-4 産生細胞の割合は、基本投与間および基本投与終了以降において、有意な変動を認めず、同じ時点での IL-2 group と control group 間の比較においても、有意な差は認められなかった (Fig. IV-5b)。

IFN- $\gamma$  産生 CD8+T 細胞は、IL-2 group の base line と以降の各時点の値を比較した場合においても、同じ時点の IL-2 group と control group 間の値を比較した場合においても、有意な変化を認めなかった (IL-2 group の mean  $\pm$  S.D; base line: 54.2  $\pm$  21.9%, 基本投与 3 サイクル目: 48.4  $\pm$  20.9%, 基本投与終了 2 ヶ月後: 50.4  $\pm$  32.7%, 基本投与終了 9 ヶ月後: 51.1  $\pm$  25.1%, control group の mean  $\pm$  S.D; base line: 52.3  $\pm$  20.6%, 基本投与 3 サイクル目: 52.3  $\pm$  25.5%, 基本投与終了 2 ヶ月後: 52.9  $\pm$  18.4%, 基本投与終了 9 ヶ月後: 55.4  $\pm$  10.5%)。

#### IV-4-4: 上記 2 項目 (IV-4-2,3) のまとめ

外部からの rIL-2 投与による影響を受けて、生体内の IL-2 の生成状況が亢進し、それ故、IL-2 投与中断以降も CD4+T 細胞数が維持できるのではないかと、というのが、当初予測した仮説であった。CD4+T 細胞中の IL-2 産生細胞の割合をモニターすることで、この仮説を証明しようと試みたが、実際は IL-2 group の 4/5 名において、IL-2 産生細胞の割合の増加は認められなかった (Fig. IV-4a, -4b)。更に、TH1/TH2 サイトカイン産生細胞の割合の比較したところ、IFN- $\gamma$  産生 CD4+T 細胞が、



優位に出現する可能性にも、TH1 タイプのサイトカインを阻害作用のある IL-4 の産生能が抑制される可能性にも、否定的な結果であった (Fig. IV-5a, -5b)。即ち、IL-2 投与により CD4+T 細胞数は増加するものの、IL-2 産生細胞はじめ TH1/TH2 サブユニットの相互作用が、CD4+T 細胞数の維持を直接的に支配している可能性は少ないことが明らかになった。そこで、rIL-2 投与により CD4+T 細胞数の増と維持をもたらす可能性のあるサイトカイン産生 T 細胞以外の要因を調べる為、以下に細胞増殖反応および細胞表面抗原を解析した結果を示す。

#### IV-4-5: T 細胞増殖試験

IL-2 group において、基本投与および基本投与終了後に、T 細胞の増殖能の亢進が認められるかを BrdU 取り込み試験により解析した。活性化された S 期 (DNA 複製期) の細胞に取り込まれる BrdU は、non RI ながら高感度で簡便な細胞増殖の検出法である[50,51]。IL-2 group の基本投与の Stimulation Index (SI) は、base line より上昇傾向にあり、T 細胞増殖能の亢進の可能性が認められた。しかし、基本投与終了後においては、増殖の上昇は持続せず、逆に base line 値近似程度にダウンした (Fig. IV-6)。しかし、base line と基本投与または、基本投与終了後の SI の間に統計学的な有意差はなかった。

#### IV-4-6. IL-2 レセプター (IL-2 receptor: IL2 R) の発現

IL-2 group における CD4+T 細胞中の IL2R $\alpha$  (CD25) の経過期間中の変動は、base line 値と比較して、基本投与 3<sup>週間</sup>目で有意な高値を示した (base line vs. 基本投与 3<sup>週間</sup>:  $p < 0.05$ )。更に、base line と基本投与終了 2, 4, 6, 9<sup>ヶ月</sup>後の有意な上昇を認めた (IL-2 group: base line vs. 基本投与終了 2 or 4 or 6 or 9<sup>ヶ月</sup>: 全て  $p < 0.01$ )。また、同じ時点の control group との比較においても、基本

投与終了以降に有意な上昇を認めた (IL-2 group vs. control group; 基本投与終了 2, 4, 6, 9 ヶ月後; 全て  $p < 0.01$ ) (Fig. IV-7a)。Base line から基本投与終了 2 ヶ月後 までの CD4+CD25+ の上昇は、+20.0 ~ +37.4% (mean: +28.8%) であるのに対し、基本投与終了 2 ヶ月後 を基点として、基本投与終了 9 ヶ月後の CD4+CD25+ の増減を算出すると、-3.5 ~ +12.5% (mean: +6.4%) となった。即ち、基本投与終了以降は CD4+T 細胞数同様、CD4+CD25+ の割合も増加は継続せず、しかしながら base line にまで減少することはなく、基本投与期に上昇した割合を維持していた。IL-2 group の CD4+CD25+ の割合と CD4+T 細胞の数は正の相関を示した ( $r=0.40$ ,  $p < 0.05$ )。さらに、個人別においても 4/5 名で高い正の相関を示した (Fig. IV-7b, 7c)。

一方、CD4+T 細胞中の IL2RB (CD122) の発現は、一連の経過期間中、有意な変化を示さなかった (Fig. IV-8a) が、CD25+ と CD122+ の両レセプターを発現する CD4+T 細胞は、base line と比較すると、基本投与 3 ヶ月目で +3.1 ~ +10.6% (mean: +6.0%) と、基本投与終了 2 ヶ月後 で +5.2 ~ +15.2% (mean: +7.8%) と、それぞれ上昇しており、逆に CD4+CD25-CD122+ T 細胞は一過性に低下した。即ち、CD4+CD25-CD122+ T 細胞の一部に IL-2 投与により CD25+ の発現が誘導された事を示唆している (Fig. IV-8b)。Common  $\gamma$  (CD132) は、複数のサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15) に共有のレセプターであり、IL-2 の影響のみを反映しているとは言い難い。本研究において、IL-2 group, control group とともに殆どの T 細胞にその発現が認められた (IL-2 group; base line: 91.2 ~ 99.8%, control group; base line: 95.5 ~ 99.9%)。また、この発現が IL-2 投与により影響を受けることはなかった (IL-2 group; 基本投与 3 ヶ月目 : 91.6 ~ 99.8%)。

#### IV-4-7. ナイブ・メモリー T 細胞

IL-2 group において、CD4 のナイーブサブセットである CD4+CD45RA の割合は、base line と比較して基本投与 2 サイクル目に +5.8~+15.5% (mean: +10.9%) と、有意な上昇を認め (IL-2 group; base line vs. 基本投与 2 サイクル目;  $p < 0.05$ ) (Fig IV-9a)、その一方、この時点の CD4+CD45RO は base line と比較して、-6.8~+21.3% (mean: +14.5%) と低下傾向を示した (Fig IV-9b)。しかしながら、両サブセットとも IL-2 group と control group の間に有意な差は認められなかった。

#### IV-4-7. NK 細胞の変動

NK サブセット (CD56+CD3-CD19- lymphocyte) の割合は、有意ではないが base line から基本投与終了 2 ヶ月後 にかけて上昇傾向にあった (IL-2 group の mean±S.D; base line: 10.2±6.8%, 基本投与 3 サイクル目: 12.8±3.4%, 基本投与終了 2 ヶ月後: 14.3±4.5%, 基本投与終了 9 ヶ月後: 11.4±4.6%, control group の mean±S.D; base line: 10.2±3.8%, 基本投与 3 サイクル目: 9.9±1.3%, 基本投与終了 2 ヶ月後: 9.1±3.5%, 基本投与終了 9 ヶ月後: 10.5±1.9%)。

#### IV-5. 考察

HIV-1 感染者の病期の進行と TH-1/TH-2 タイプのサイトカイン産生 CD4+T 細胞の割合の変動について解析した先行研究により、IL-2 産生 CD4+T 細胞の低下と、CD4+T 細胞数の減少あるいは VL の増殖との関連が明らかになった[49]。HIV-1 病期の進行に IL-2 産生細胞の減少が重要な役割を果たしていると推定された為、外部からの rIL-2 投与により免疫機能が改善し、IL-2 産生細胞の割合が回復することを期待して、本章の研究を実施した。

実際に対象者に IL-2 を投与すると、初回サイクル終了から CD4+T 細胞数の上昇が認められ、基本投与終了までには、base line の CD4+T 細胞数が  $<500/\mu\text{l}$  の者は前値の2倍以上となり、base line が  $>500/\mu\text{l}$  の 2 名は両名とも  $1,000/\mu\text{l}$  を越えた。しかし、基本投与終了以降の経過観察期間内に B1047 と G1054 は、追加 IL-2 投与が必要になった。他の 3 名においても CD4+T 細胞数は、base line より高値を維持しているものの、時間の経過と共に徐々に下降しており、特に base line の CD4+T 細胞が  $<500/\mu\text{l}$  の HIV-1 感染者においては、3 サイクルの基本投与のみでは、半永久的な数の安定維持は難しいことが予測された。

体外からの IL-2 投与により、CD4+T 細胞数と IL-2 産生 CD4+T 細胞の割合が相乗的に増加し、安定的に維持されるところで、HIV-1 病期の改善をもたらされる、という仮説を持ち、本検討に臨んだ。しかし、IL-2 group の 4/5 名において、IL-2 産生 CD4+T 細胞の割合の増加は認められず、TH1 タイプサイトカイン (IFN- $\gamma$ ) 産生細胞の増加も TH2 タイプサイトカイン (IL-4) 産生細胞の減少も認められなかった。しかしながら、今回の縦断検討により、IL-2 投与による CD4+T 細胞の反応性には、明らかな個人差が認められた。即ち、IL-2 産生細胞が上昇したまま維持される者 (Z1039)、control group 同様、base line 近接値で推移する者 (B1013,Z1104)、そして base line より低い割合で推移する者 (B1047, G1054) である。B1047, G1054 は、いずれも基本投与終了後の早い時期に、追加 IL-2 投与が必要になったが、base line の CD4+T 細胞数が最低だった B1013 は、追跡期間中は追加投与を必要としていない。この IL-2 産生細胞の動向と IL-2 治療効果の維持に関しては、更に症例数を増やし検討を重ねる必要がある。いずれにしても、この縦断検討の結果は、臨床研究における個人レベルでの反応性を追跡することの意義を示唆するものである。

IL-2 投与による CD4+T 細胞数を維持と、T 細胞の増殖能の関連を確認するため、対象者の PBMCs に IL-2 を添加し in vitro において培養した。この結果、IL-2 group においては、基本投与

中は base line より細胞増殖能が若干上昇傾向にあったが、base line との間に有意な差はなかった。

更に、基本投与終了以降において SI は base line と近似にまでにダウンした (Fig. IV-6)。

IL-2 投与開始前と 5 日間の連続投与を終了した直後を比較すると、CD4+T 細胞数や IL-2 産生 CD4+T 細胞の割合が急激に低下する事が判った (Fig. IV-3b, -4c)。これは、健康人に rIL-2 を投与した場合においても確認される現象であり[84]、IL-2 投与を成因として、生体内が一過性に免疫機能不全状態に陥り、アポトーシスが多発した為と考えられる[52,53]。IL-2 group 全員において、この数的な減少は、次のサイクルが開始するまでには回復していた。

BrdU の細胞への取込みは、休止状態から活性化へ移行し、細胞周期上で DNA 合成期に入った細胞の割合を示す指標であり、同時に T 細胞のターンオーバーの指標でもある。外部から IL-2 を投与している期間中は、T 細胞の増殖能は上昇し、同時にアポトーシスによる細胞死も促進するが [52,53]、IL-2 投与終了後は、一転してアポトーシスは減少し、正常化域に近付くという見解がある [53]。Paiardin らは、HIV-1 感染者におけるターンオーバーの異常亢進の原因は、Go 期の T 細胞内に、細胞周期の Go 期以降のフェーズで強発現されるタンパク (サイクリン) の一種が異常増殖しており、その不均衡を是正できないことで細胞は、アポトーシスを選択すると説明している [54]。更に、Paiardin らは、in vitro の実験により、HIV-1 感染者の PBMCs に rIL-2 を添加すると、この不均衡が改善されると報告している[54]。これらの知見を本研究の結果に反映させると、IL-2 投与期間中は、その作用により休止期の CD4+T 細胞の一部が活性化され、分裂・増殖する細胞が増える (=即ち、ターンオーバーが亢進した状態になる)。一方、IL-2 産生細胞の割合は base line と比べて 4/5 名で増加していないにもかかわらず、IL-2 投与終了以降も CD4+T 細胞数が base line よりも上昇したままの数値を維持できる理由は、アポトーシスを起こす細胞が減少し、細胞のターンオーバーが正常化に近付いた、もしくは正常域以上に細胞の寿命が延長しているためと考えられる。即ち、外部からの IL-2 投与により、CD4+T 細

胞が、直接的に増加するばかりでなく、CD4+T 細胞のアポトーシスの改善やターンオーバーの遅延などが相乗的作用し、CD4+T細胞の数的な上昇に貢献していると予測できる。今後、Paiardin の理論を *in vivo* の系において追試し、証明が可能であれば、HIV-1 感染者の CD4+T 細胞に対する IL-2 の治療効果に重要な意義を加えるものと考えられる。

IL-2 投与により IL2R $\alpha$  (CD25) の発現が上昇し、それが基本投与終了後も CD4+T 細胞数同様、高値維持される現象は、本研究中の最も興味深い結果の一つである (Fig. IV-7a)。CD25 の T 細胞上への発現は、IL-2 から IL2R ( $\beta\gamma$ ) を介したシグナル伝達による場合、または T 細胞レセプター (TCR) から伝わるシグナル伝達により IL-2 の生成とともに起こる場合とがあり、ともに T 細胞の増殖に深く関与しているため、CD25 は、T 細胞の活性化マーカーといわれている。Common  $\gamma$  (CD132+) は、既存の研究同様に殆どの T 細胞が発現していたので [55,56]、IL-2 投与により CD25-CD122+(CD132+) から CD25+CD122+(CD132+) になった CD4+T 細胞は、IL-2 に対して中等度親和性から高度親和性にシフトしたと考えられる。CD25-CD122+(CD132+) が、IL-2 投与により低下傾向にあるのも、CD25 の発現によるこのシフトを裏付けていると思われる。しかし、CD25+CD122+ の割合以上に CD25+CD122- の割合が上昇しており、この 2 つのサブセットが、伴に CD4+T 細胞数の増加に関与していると考えられる (Fig. IV-8b)。

CD4+CD25+T 細胞に関する最近の研究に、この細胞群が自己免疫抑制効果を持つという報告がある。いくつかの報告の内容を総括して、下記にまとめた。即ち、1). CD4+CD25+ は、CD4+CD25- による細胞増殖を抑制する [57-59]。2). CD4+CD25+ による抑制作用は IL-2 の添加で阻害される [57-59]。3). CD4+CD25+ による抑制反応は細胞間直接作用 (cell to cell contact) にて行われる [57-59]。4). CD4+CD25+ 自身の増殖能は CD4+CD25- と比較すると極めて低く、IL-2, IFN- $\gamma$  のような TH1 サイトカインの産生も少量である [58,59]。5). CD4+CD25+ は cytolytic

T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) や transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) を産生しており、Annuziati らは、これらのサイトカインが細胞増殖抑制作用をもたらすとしている[59]。IL-2 投与期間中においては、間歇的に供給される外部からの IL-2 により、IL2R $\beta\gamma$ , IL2R $\gamma$ を発現していた CD4+T 細胞に、IL2R $\alpha$  (=CD25) の発現が促される。IL-2 投与終了以降も、この増加した CD4+CD25+T 細胞は、その発現が初期値に低下することなく、外部から IL-2 の供給がない状態で9ヶ月経過しても(基本投与終了9ヶ月後)、高い発現が維持された。この CD4+CD25+T 細胞サブセットの維持には、先に述べた IL-2 投与によるアポトーシスの減少や IL-2 投与により正常化ないしそれ以上に延長する細胞のターンオーバーも関連していると考えられる。また、CD4+CD25+が、IL-2 や IFN- $\gamma$  の産生量が少ないという報告[58,59]は、本研究において IL-2 産生 CD4+T 細胞の割合に増加が認められなかった理由が、CD4+CD25+サブセットの優位な上昇に起因することを暗示している。しかし、これはあくまで、in vitro での実験結果を参照した仮説であり、in vivo での IL-2 投与における CD25+の役割を証明するためには、IL-2 レセプターに焦点を絞った具体的な検討を行う必要がある。

CD4+T 細胞のナイーブ・メモリサブセットに関しては、IL-2 投与によりナイーブサブセット (CD45RA) が一過性ながら上昇し、メモリサブセット (CD45RO) は逆に低下した。しかし、rIL-2 は主に末梢 T 細胞に作用するので[60]、胸腺由来ナイーブ T 細胞が有意に増殖したとは考え難い。IL-2 により CD4+T 細胞上に CD25+が発現するのは前項の通りであるが、CD4+CD45RA にも CD4+CD45RO にも CD25+の新たな発現が認められる。IL-2 group の基本投与3回目<sup>リカド</sup>の CD25+CD4+T 細胞の上昇は、base line と比較した場合、CD4+CD45RA で+10.3~+27.9% (mean: +19.7%) に対して、CD4+CD45RO は、+9.3~+11.4% (mean: +9.7%) であった。即ち、IL-2 投与によるナイーブサブセットの増殖の成因は、CD4+CD45RA に CD25+がよく発現したことに起因する可能性が示唆された。

生体が本来維持している防御機構の最前線にはマクロファージや NK 細胞が存在する。マク

マクロファージやその他のファゴサイトおよびNK細胞が分泌するサイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 など)は、感染の拡大を防御すると同時に、抗原特異的なIL-2産生細胞や細胞傷害細胞の増殖を促す役割も果たすといわれている。特にNK細胞はIL-2に長期的に暴露すると、活性化されプロ炎症性サイトカイン (pro-inflammatory cytokine) を高率に生成するようになる[61]。本研究のIL-2 groupにおいて、IL-2投与期に、NK (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) サブセットの割合は、一過性に増加を認めたが、これは、健康人にrIL-2投与した場合においても認められる現象である[84]。即ち、このNK活性による炎症作用は、健康人においても、HIV-1感染者においても、高熱や全身倦怠および疲労感など系統化された症状を引き起こすものであった。投与するIL-2が高濃度であれば、それに付随してこれらの炎症作用も重篤なものになる。



Table IV-1: Patients characteristics at BL

	IL-2 group					control group			
	B1013	Z1039	B1047	G1054	Z1104	C101	C110	C112	C122
gender	male	male	male	male	male	male	male	male	male
age	25	39	35	25	28	39	43	23	29
CD4 (/μl) at BL	289	851	474	295	683	418	793	453	392
viral load (copies/ml) at BL	U.D	U.D	U.D	56	UD	U.D	U.D	U.D	U.D
Nadia CD4 (/μl)	191	361	238	138	228	133	410	236	12
viral load at Nadia CD4 (copies/ml)	7.7X10 <sup>3</sup>	8.2X10 <sup>4</sup>	6.6X10 <sup>4</sup>	< 400	9.7X10 <sup>3</sup>	1X10 <sup>3</sup>	3.3X10 <sup>4</sup>	650	4.7X10 <sup>5</sup>
Duration-1 (months) <sup>-1</sup>	15	30	14	4	46	13	41	41	56
HAART	3TC+d4T+EFV	3TC+d4T+IDV	3TC+d4T+NVP	3TC+d4T+NVP	AZT+3TC+IDV+RTV	3TC+d4T+EFV	AZT+ddC+NFV	3TC+AZT+IDV	3TC+ABC+EFV+LPV
Duration-2 (months) <sup>-2</sup>	5	31	15	15	12	1	34	42	0

BL: baseline, VL: plasma viral load (HIV RNA), U.D: undetectable (<50 copies/ml)

\*1: Duration from nadia CD4 till BL

\*2: Duration from starting treatment till BL

3TC: Lamivudine, d4T: Stavudine, ZDV: Zidovudine, IDV: Indinavir, RTV: Ritonavir, NFV: Nelfinavir, EFV: Efavirenz, ABC: Abacavir, LPV: Lopinavir, NVP: Nevirapine

## Figure Legends (第IV章)

Fig. IV-1: The Flowchart of ESPRIT

第III相IL-2無作為割付国際臨床試験(ESPRIT)の一連の流れを示した。くじ引きによりIL-2 groupに割付られた対象者には、リコンビナントIL-2(rIL-2) 15MIUを5日間連続して皮下投与し、これを1サイクルとした。次の投与までは、平均8週(range: 6~11週)のインターバルを開けた。合計3サイクルの基本投与を実施した後は、IL-2投与を中断して経過を観察した。基本投与終了以降にCD4+T細胞数が規定値以下になった場合には、追加投与を実施した。

Fig. IV-2: Flow cytometric analysis of intracellular cytokine-producing T cells

本研究におけるCD4+CD8-T細胞ゲーティング方法を示した。(A) 主要リンパ球集団を2次元ドットプロットにより設定し、これをリンパ球領域(R1)とした。(B) CD4+リンパ球領域(R2)は、R1(リンパ球)領域中の細胞を対象として、アイトタイプコントロール(IgG-APC)によりカットオフポイントを設定した後にFL4ヒストグラムドット上に設定した。(C) R2内に漏れ込んだCD8-T細胞群(R3)を除くため、CD8-細胞領域を設定した(R2 without R3)。(D) フローサイトメトリによりR2 without R3中のCD4+CD8-T細胞を最低10,000イベント取込み、細胞内サイトカインをFL1(IFN- $\gamma$ )、FL2(IL-2,IL-4)により検出した。(E) CD4+CD8-T細胞中のIFN- $\gamma$ -FITCとIL-2-PEの発現状況。(F) (E)と同じサンプルの抗体コントロール(IgG2a-FITC, IgG1-PE)。

Fig. IV-3: The fluctuation of CD4 T cell counts in ESPRIT

Fig. IV-3a: IL-2投与によるCD4+T細胞数の変動を示す。黄色のマーカーはIL-2 group 5名の値を、オレンジ色のマーカーは、IL-2 groupの平均値をそれぞれ示した。各時点のmean $\pm$ S.Dをマーカー上部に表記した。IL-2投与は、規定の処方に従い第1サイクル、第2サイクル、第3サイクルの計3サイクルを実施し、これを基本投与とした。表中には、この基本投与を赤のドットラインで示した(Basic III 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>)。更に基本投与終了2, 4, 6, 9ヶ月後(Post basic III 2Ms, 4Ms, 6Ms, 9Ms)の経過をあわせてプロットした。B1047とG1054は、基本投与終了7ヶ月後(Post basic III 7Ms)と5ヶ月後(Post basic III 5Ms)にIL-2追加投与を行い、これを黄色と水色のドットラインでそれぞれ表示した。Control groupにおいては、IL-2 groupと等間隔にサンプリングした4名のmean $\pm$ S.Dをマーカー横に示した。青色の♣は、同時点でIL-2 groupとcontrol groupを比較し有意差を示したものを、黒色の♣は、IL-2 groupのIL-2投与開始前値(base line: BL)と各時点の値を比較し有意差を示したものをそれぞれ表示した(♣:  $p < 0.05$ , ♣♣:  $p < 0.01$ )。横軸に沿ったオレンジ色と茶色のラインは、BLの平均値から延長したものである。このFigureで使用したマーカー、ラインを、以降のFig IV-3b~9bにおいても同様の形式で使用した。

Fig. IV-3b: IL-2 groupにおけるBasic IIIの1サイクル目(1<sup>st</sup>)および3サイクル目(3<sup>rd</sup>)の投与前と投与直後(連

続投与 5 日終了後)の CD4+T 細胞数の変化を示した。

Fig. IV-4: The variation of IL-2-producing CD4+ T cells

Fig. IV-4a: PMA+Ionomycin により IL-2 を産生する CD4+T 細胞の経時的な変化の割合を示す。表中の数値は、各時点の mean±S.D を表示した。

Fig. IV-4b: 各時点の IL-2 産生細胞の割合を BL からの変化値により表示した。表中の数値は、各時点における変化値の mean および BL との差が ±10% を越えた数値のみを表示した。横軸に沿った黒点線は BL±10% を示した。

Fig. IV-4c: IL-2 group における Basic III の 1 サイクル目(1<sup>st</sup>)と 3 サイクル目(3<sup>rd</sup>)の投与前と投与直後(連続投与 5 日終了後)の IL-2 産生 CD4+T 細胞割合の変動を示す。黒色の♣は、各サイクル毎の前後の値を比較した有意差をそれぞれ表示した(♣:  $p < 0.05$ , ♣♣:  $p < 0.01$ )。

Fig. IV-5: TH1 or TH2 type cytokine producing CD4+ T cells

各時点の IFN $\gamma$  産生細胞の割合(Fig. V-5a)および、IL-4 産生細胞の割合(Fig. IV-5b)を BL からの差により表示した。表中の数値は、各時点における変化値の mean 並びに、BL との差が ±9%(IFN $\gamma$ )または ±4%(IL-4)を越えた数値のみを示した。横軸に沿った黒点線は BL±10%(IFN $\gamma$ ), BL±4%(IL-4)を示した。

Fig. IV-6: Proliferation assay by BrdU detection

IL-2 group の PBMCs ( $2 \times 10^5$  / well)を IL-2 (25U/ml)と共に 96 時間培養し、BrdU の取込み状況により T 細胞増殖能を測定した。結果は、IL-2 添加系の毎秒の化学発光強度(response intensity per second : ris)を無刺激系の ris で割った stimulation index(SI)により表記した。Control group は、BL(ESPRIT エントリー時点)のみを表示した。表中の数値は、各時点における SI を mean±S.D により示した。

Fig. IV-7: IL-2 reseptor  $\alpha$  (IL2 R $\alpha$ =:CD25)

Fig. IV-7a: CD4+CD25+T 細胞の経時的な変化を示した。表中には、時点毎の mean±S.D の数値を示した。青色の♣は、同じ時点で IL-2 group と control group の値を比較し有意差を検定したものを、黒色の♣は、IL-2 group の IL-2 投与開始値 (base line: BL)とそれぞれの時点の値を比較し有意差を検定したものを表示した(♣:  $p < 0.05$ , ♣♣:  $p < 0.01$ )。

Fig. IV-7b, c: IL-2 group を BL の CD4+T 細胞数が  $< 500/\mu\text{l}$  の 3 名(B1013, B1047, B1054)と BL の CD4+T 細胞数が  $> 500/\mu\text{l}$  の 2 名(Z1039, Z1104)の 2 群に分けて、期間中の全時点の CD4+T 細胞数( $/\mu\text{l}$ )と CD4+CD25+の割合(%)を、同じ次元上にプロットし相関の有無を検討した (Fig. IV-7b,c)。マーカーの右にそ

それぞれの相関係数を表示した。BL: base line, 3<sup>rd</sup>: Basic III 3<sup>rd</sup>, Post 9Ms: Post basic III 9 Ms

Fig. IV-8: IL-2 reseptor  $\beta$  (IL-2 R $\beta$ :CD122)

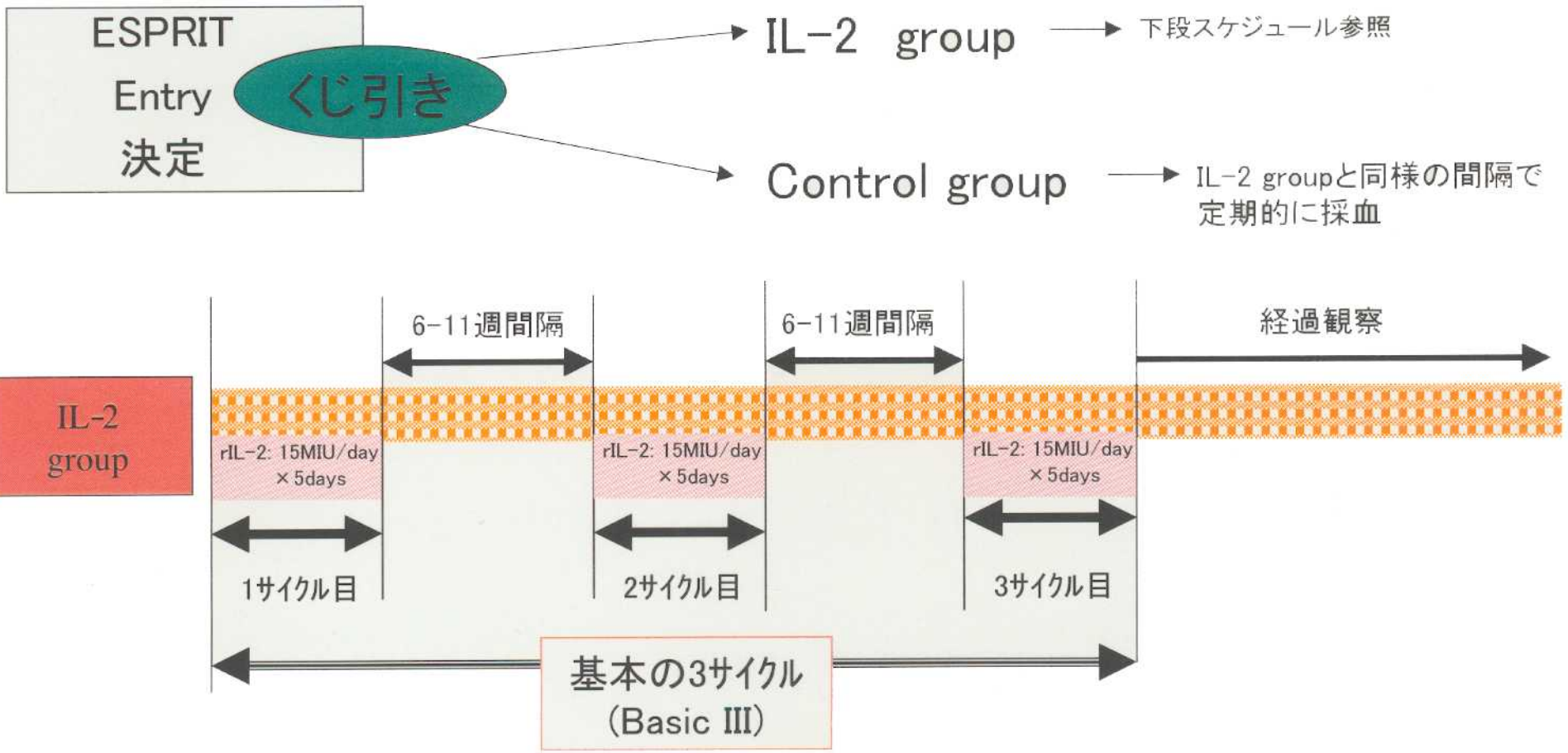
Fig. IV-8a: IL-2 group における CD4+T 細胞中の CD122+ の割合(%)の経時的な変化を示した。表中には、時点毎の mean $\pm$ S.D の数値を示した。Control group は、BL のみを表示した。

Fig. IV-8b: IL-2 group における CD4+T 細胞中の CD25+CD122+, CD25-CD122+, CD25+CD122- の割合(%)の変化を BL からの変化量により示した。

Fig. IV-9: CD4 memory /naïve subsets

CD4+CD45RA T 細胞の経時的な変化を示す。表中には、時点毎の mean $\pm$ S.D の数値を示した。IL-2 group の BLと比較して Basic III 2<sup>nd</sup> 値において、有意な上昇が認められた(\*:  $p<0.05$ ) (Fig. IV-9a)。一方 CD4+CD45RO T 細胞の割合においては、有意な変化を認めなかった (Fig IV-9b)。

# Evaluation of subcutaneous Proleukin in a Randomized International Trial (ESPRIT)



基本は3サイクルで終了→サイクル追加の基準値 開始時のCD4+T細胞数<500 / $\mu$ l: 開始時の2倍未満 になった場合  
 開始時のCD4+T細胞数>500/ $\mu$ l: >1,000/ $\mu$ l になった場合  
 但し、6サイクル終了してもCD4+T細胞数が+50/ $\mu$ l 上昇しない場合は、無効として、IL-2投与を中止する。

Fig. IV-1

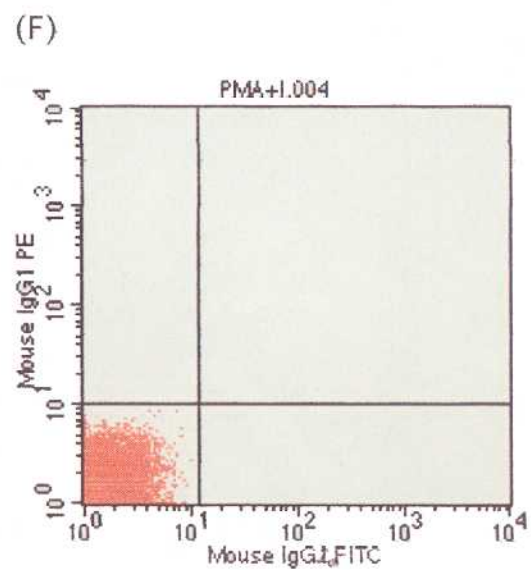
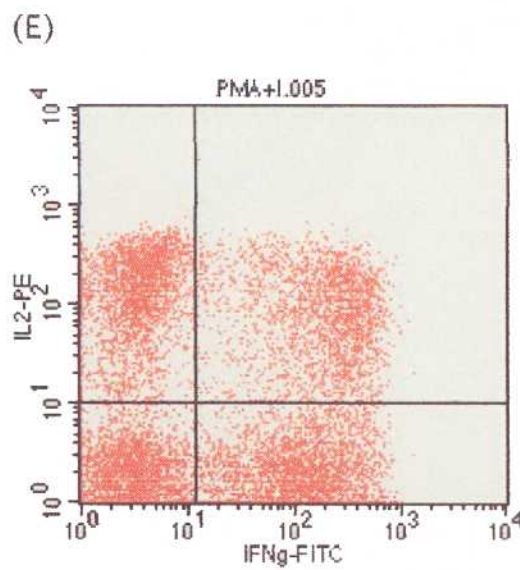
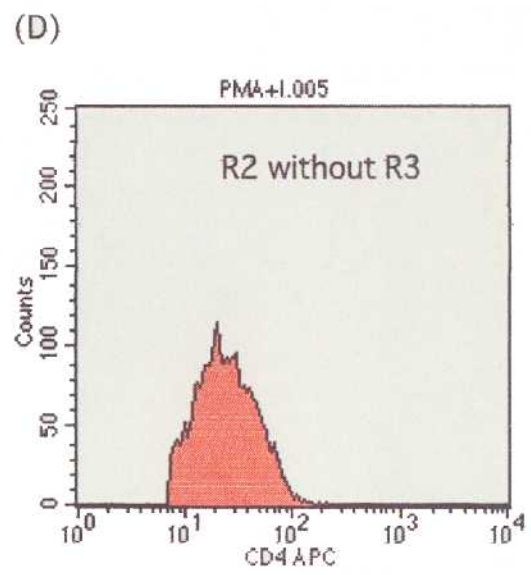
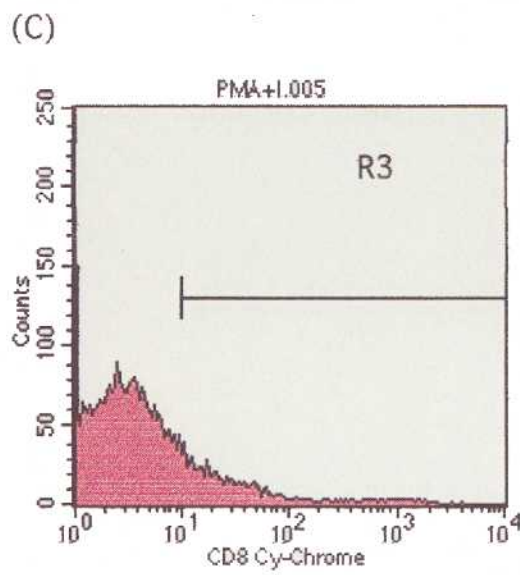
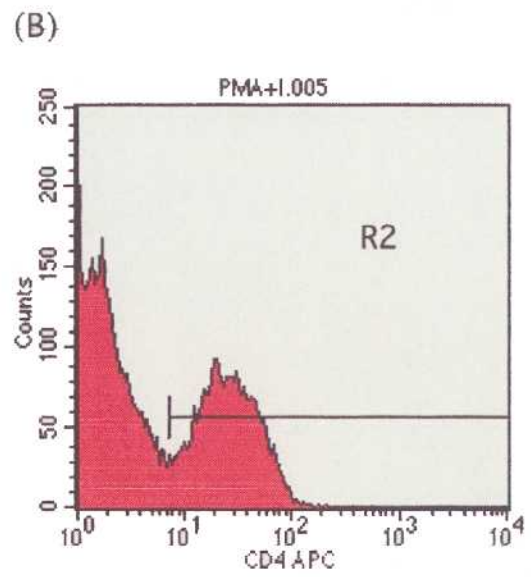
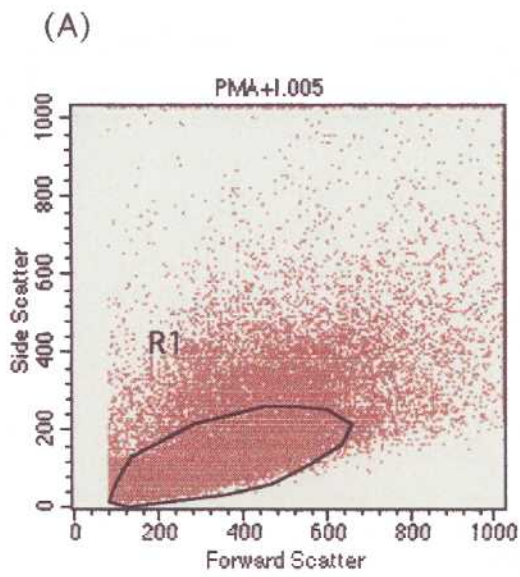


Fig. IV-21

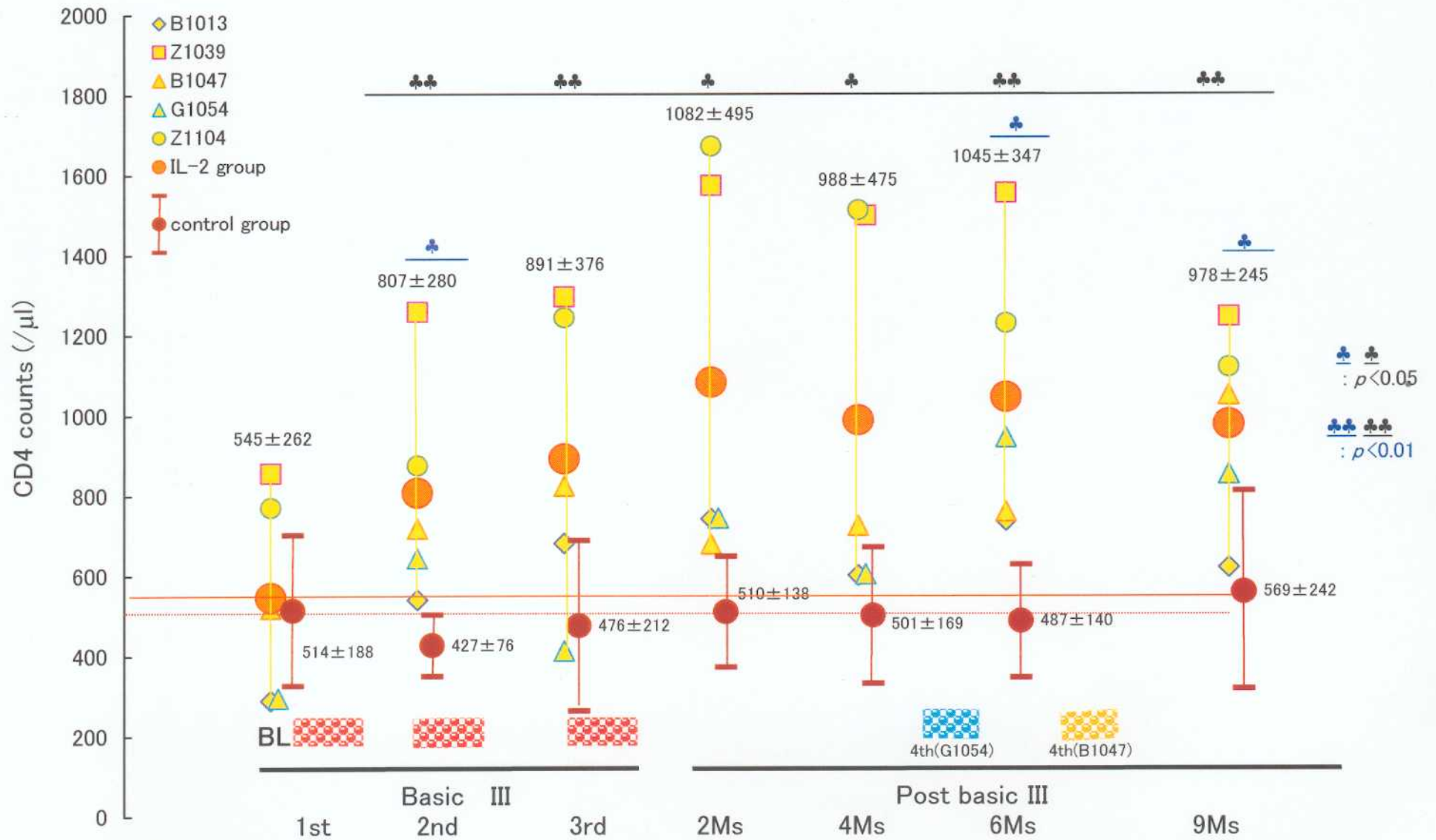


Fig. IV-3a



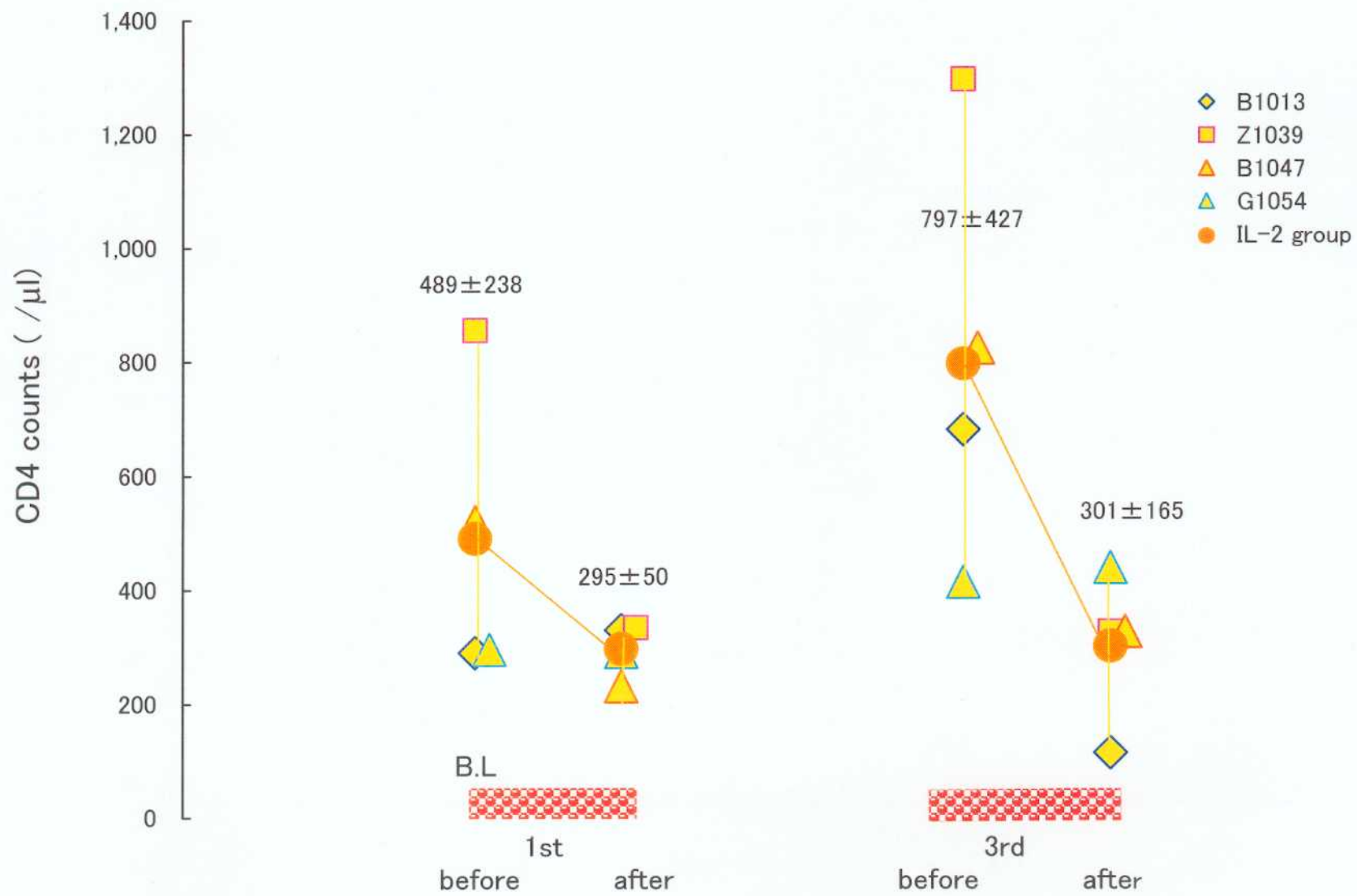


Fig. IV-3b



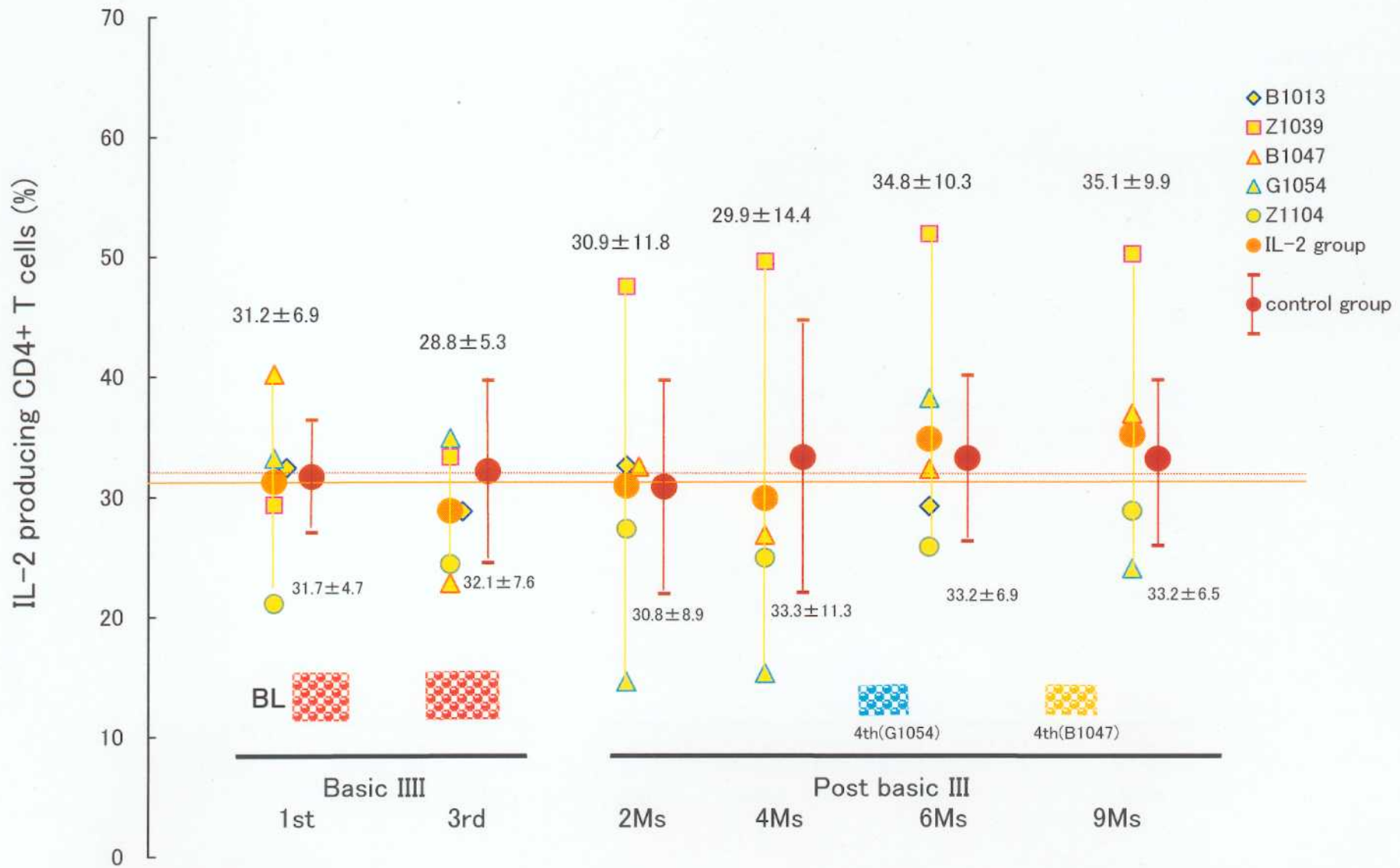


Fig. IV-4a

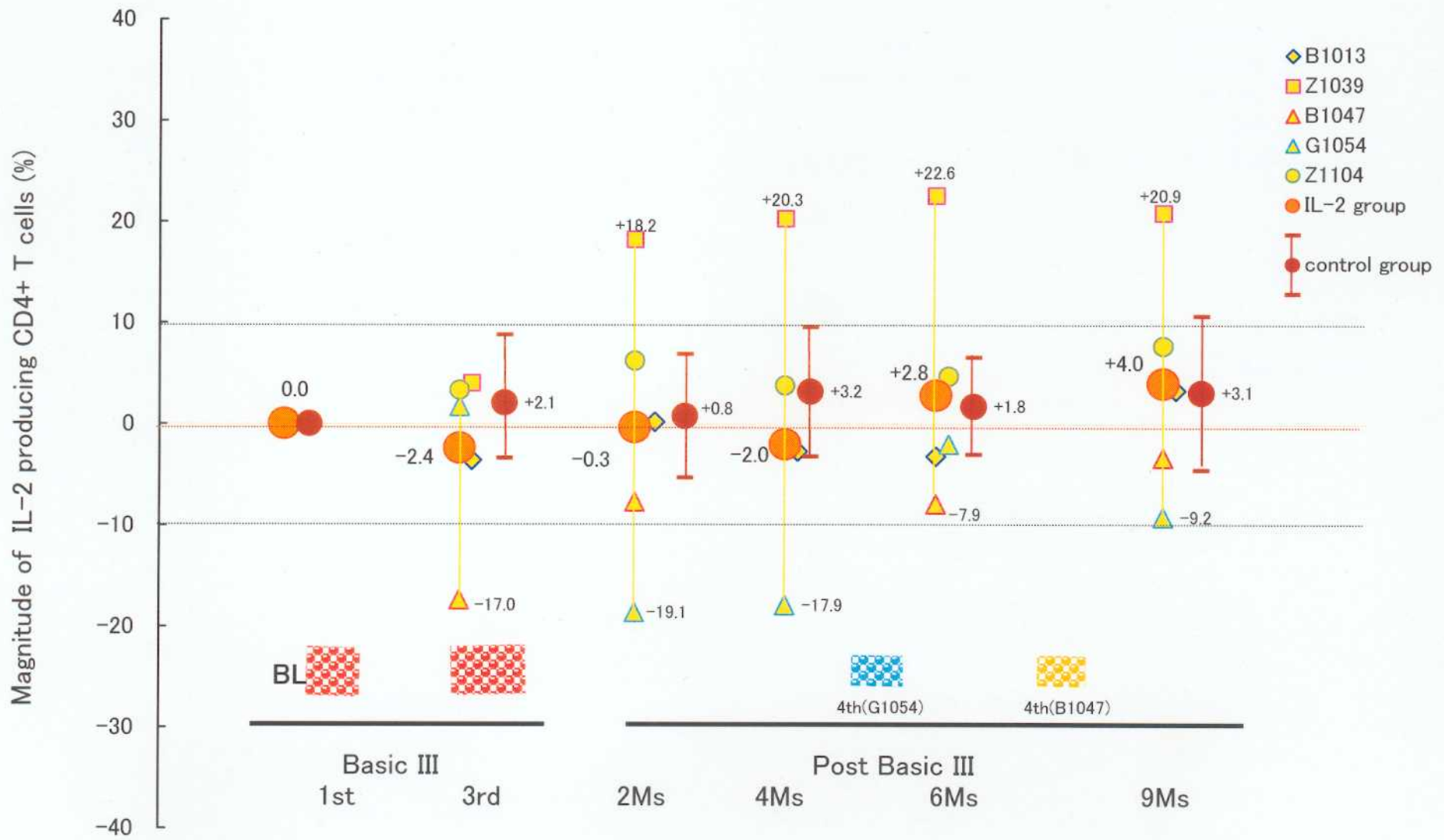


Fig. IV-4b

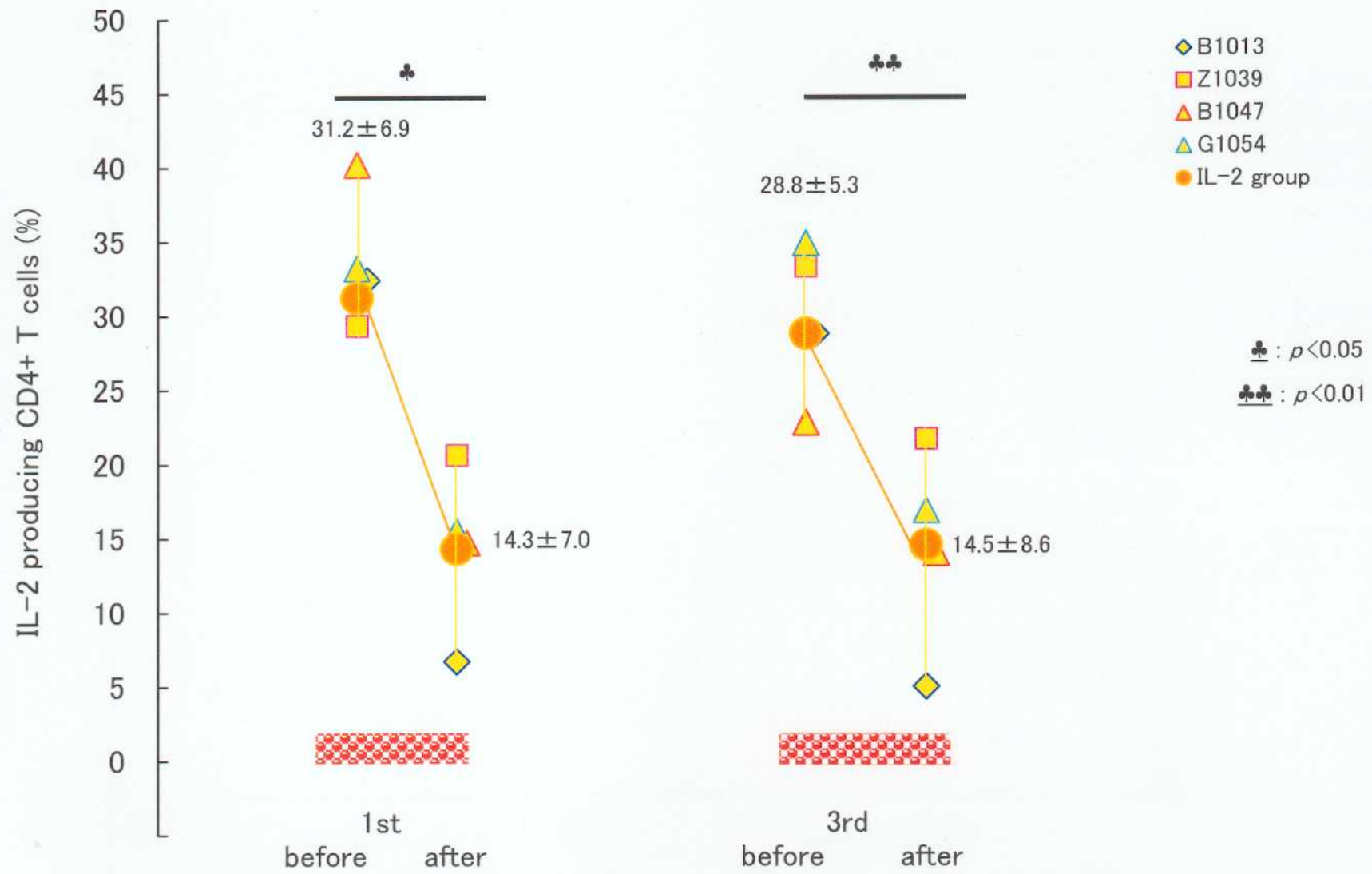


Fig. IV-4c

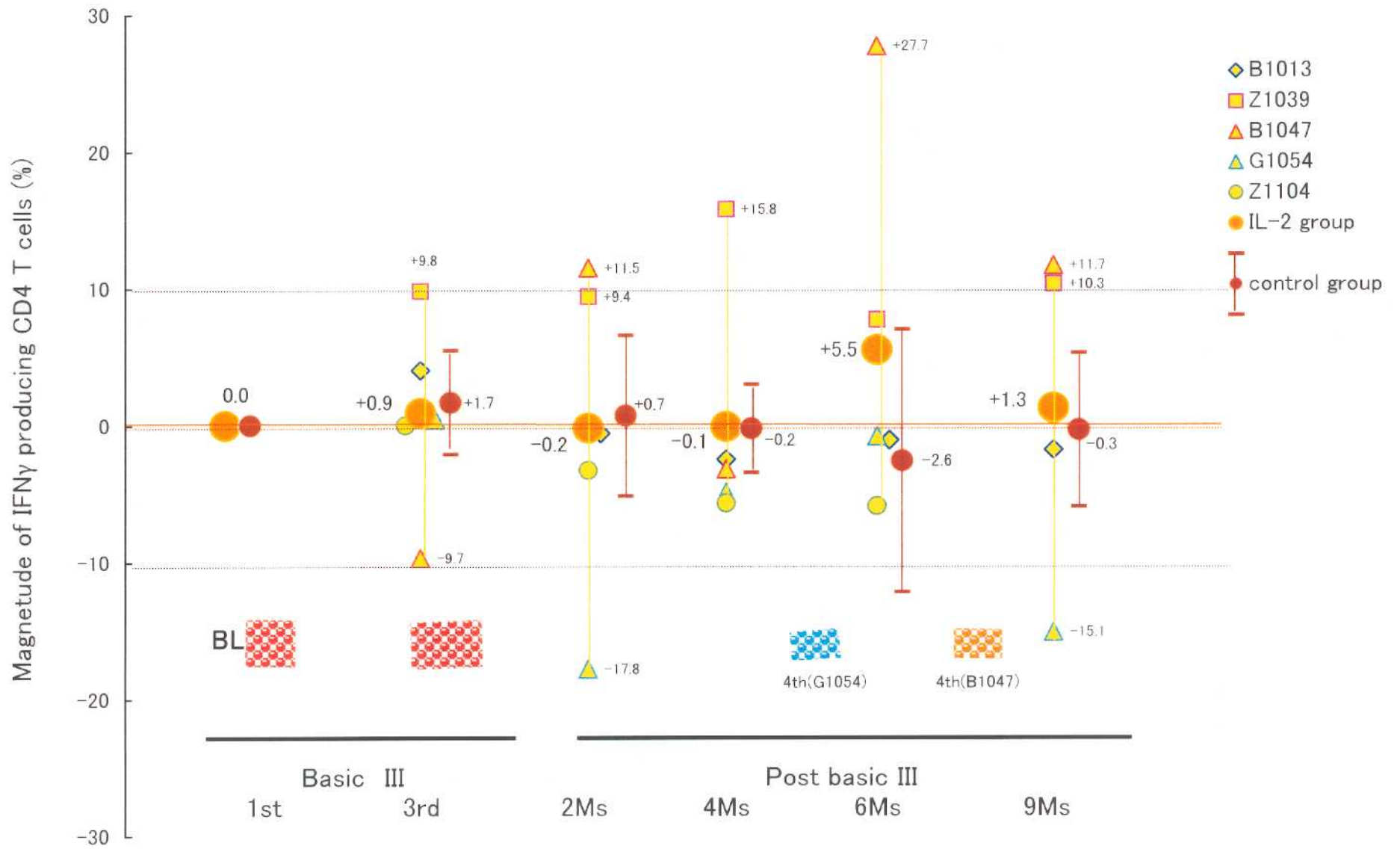


Fig. IV-5a

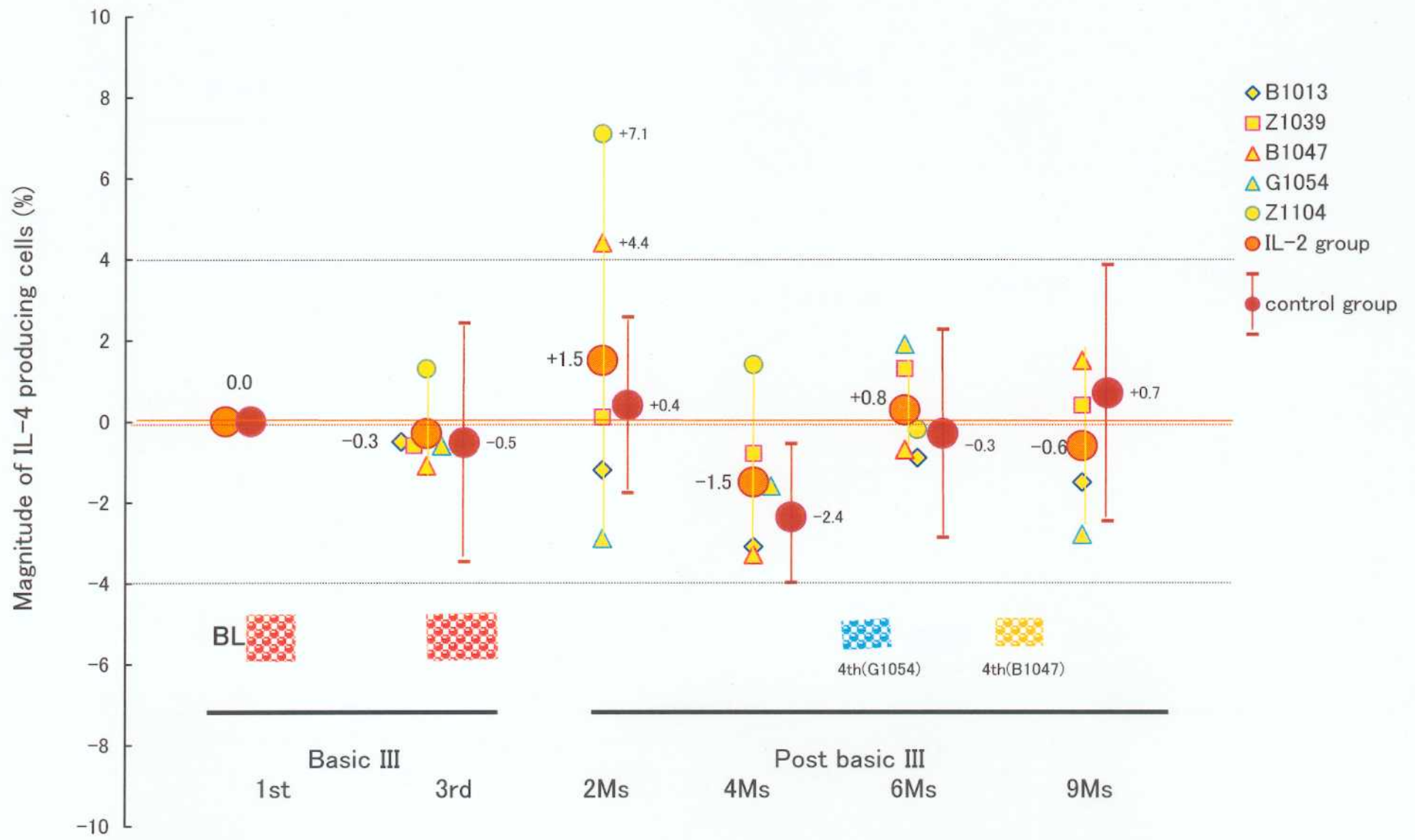


Fig. IV-5b

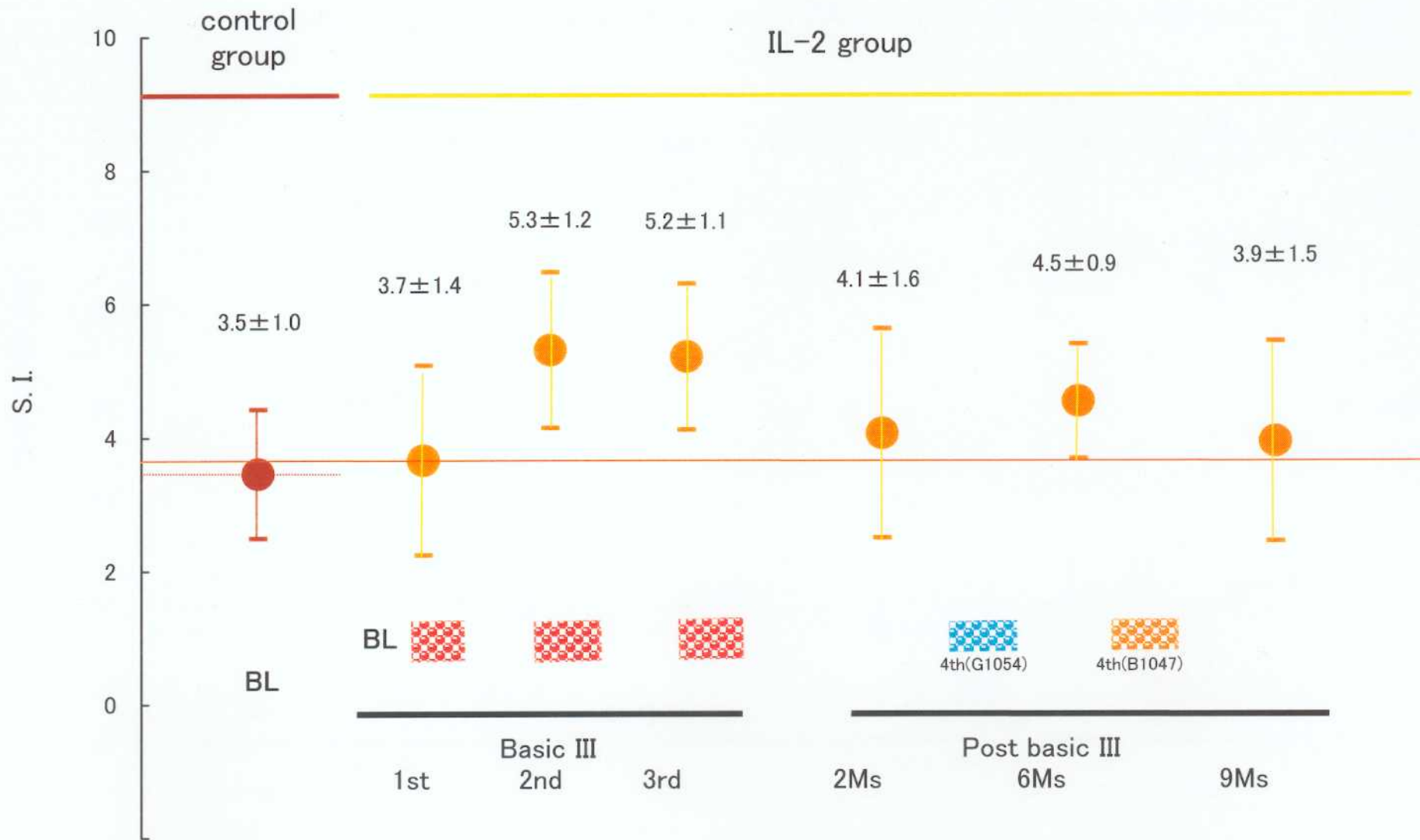


Fig. IV-6

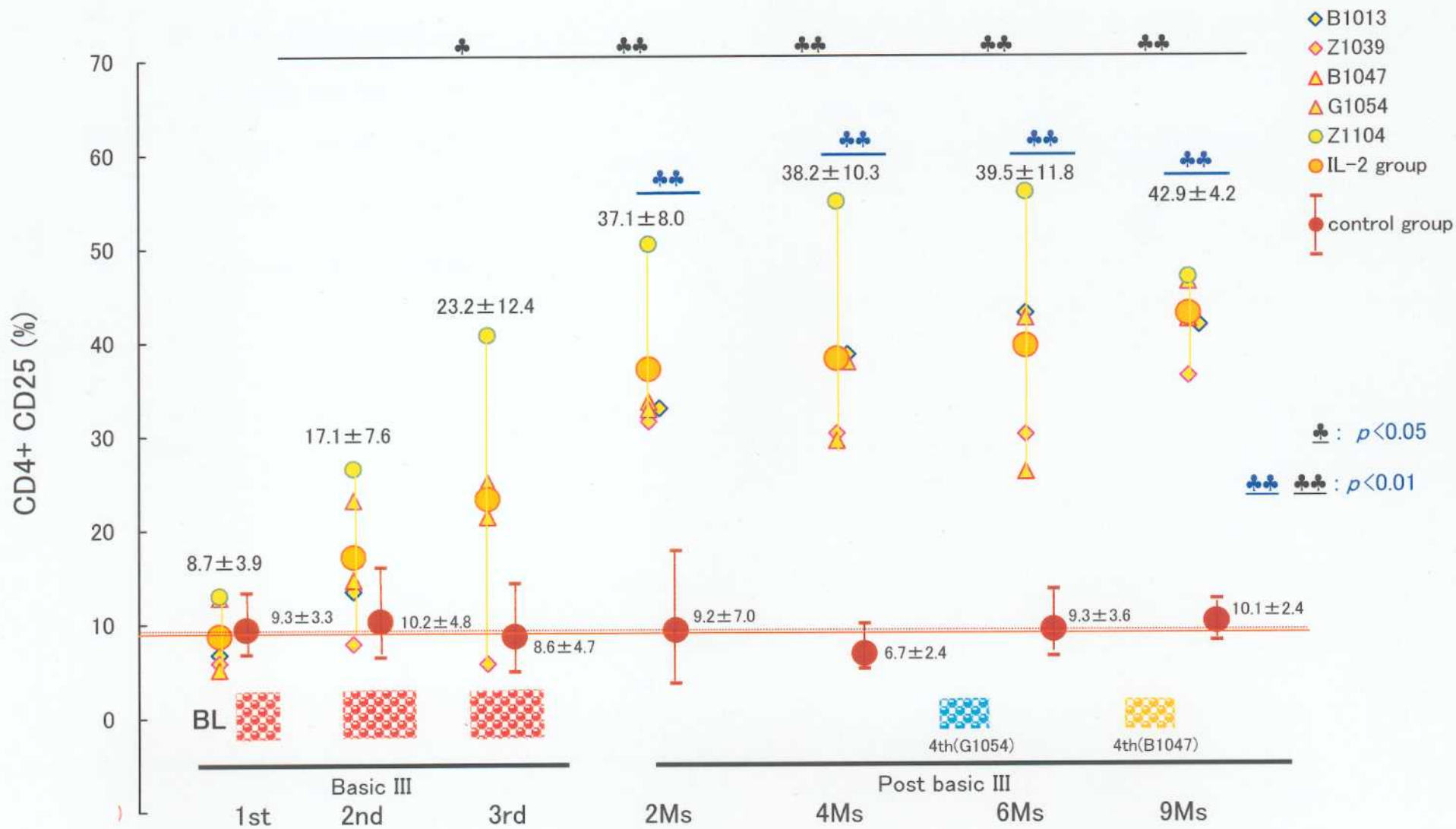


Fig. IV-7a



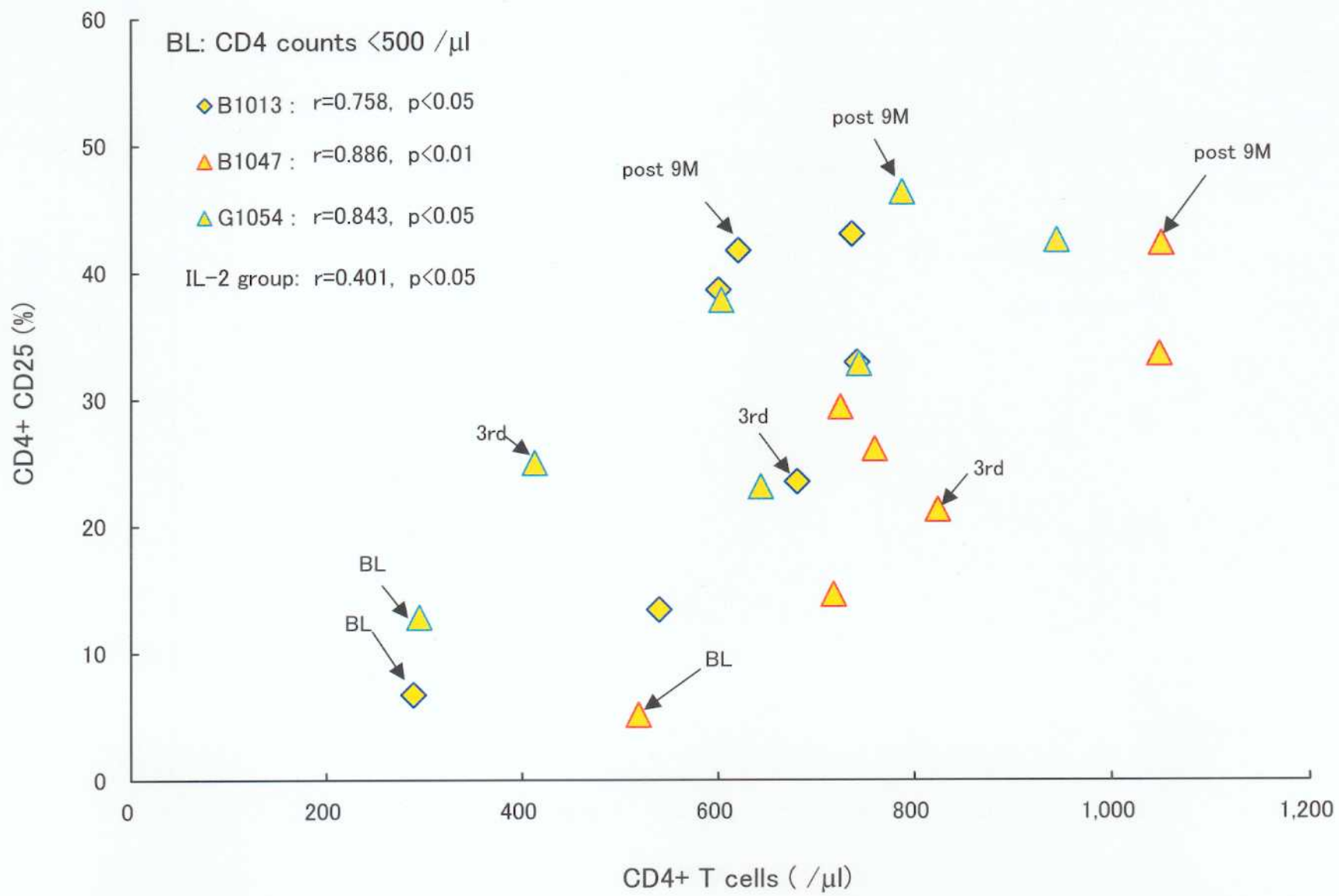


Fig. IV-7b



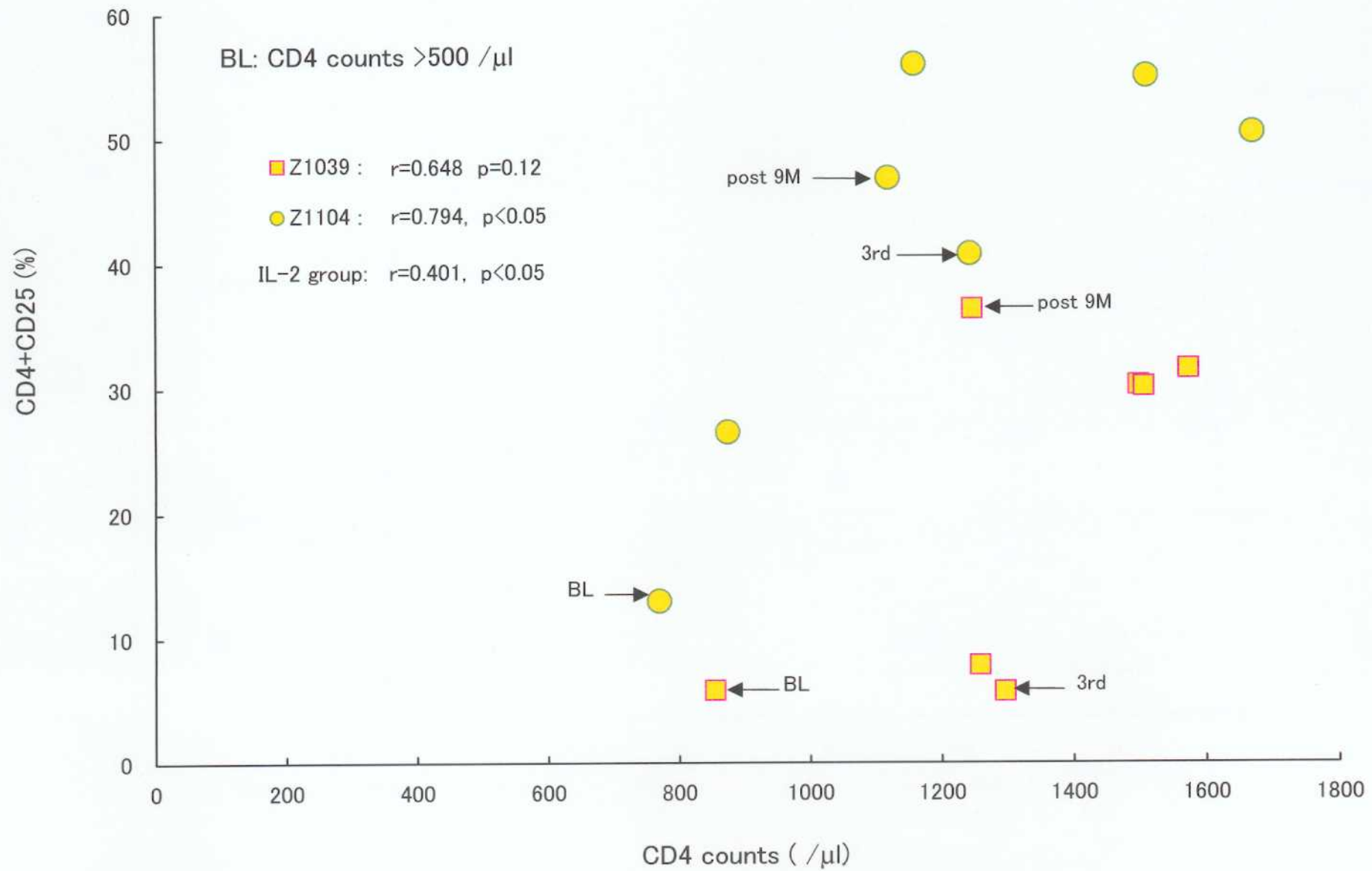


Fig. IV-7c



Fig. IV-8a

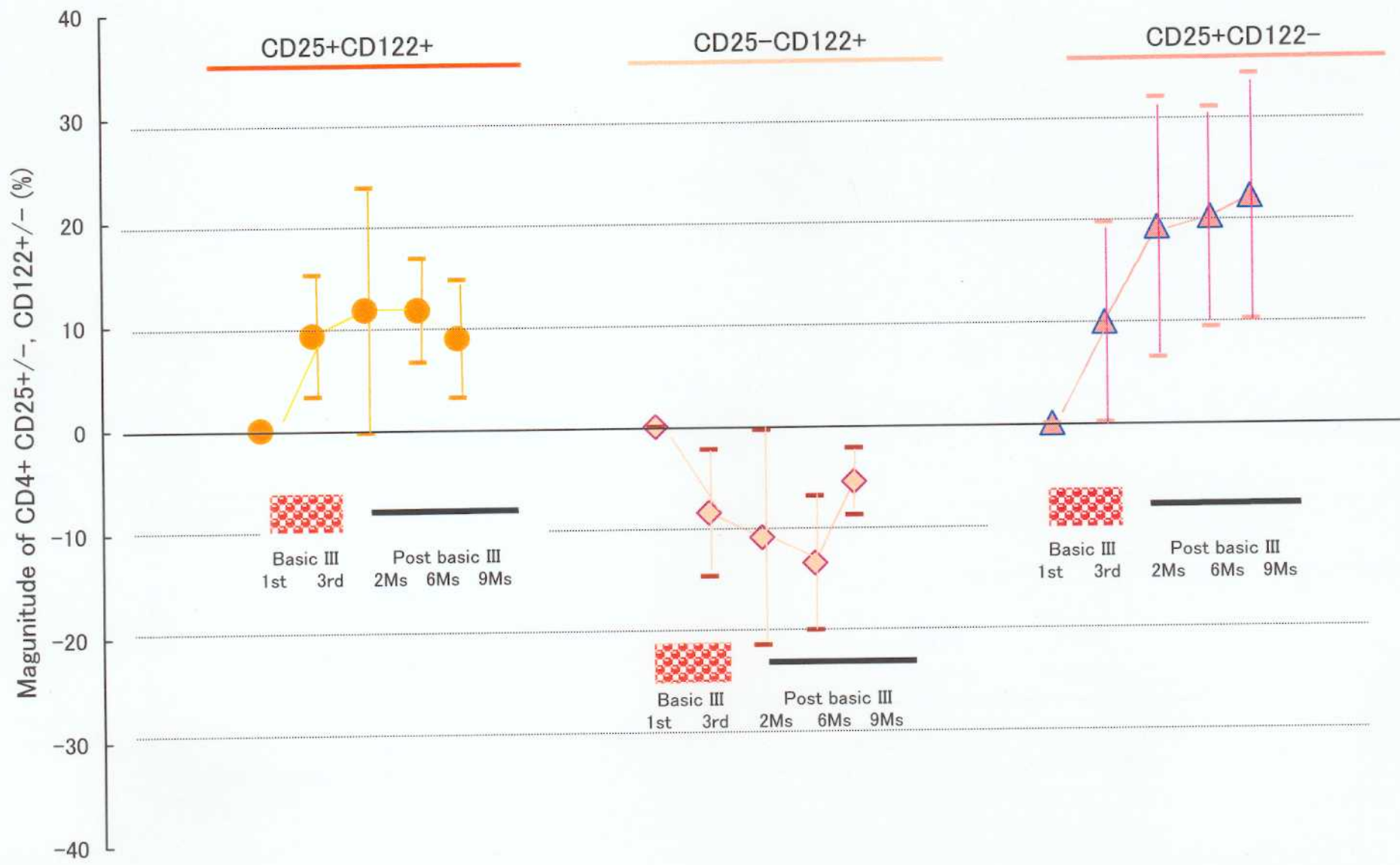


Fig. IV-8b

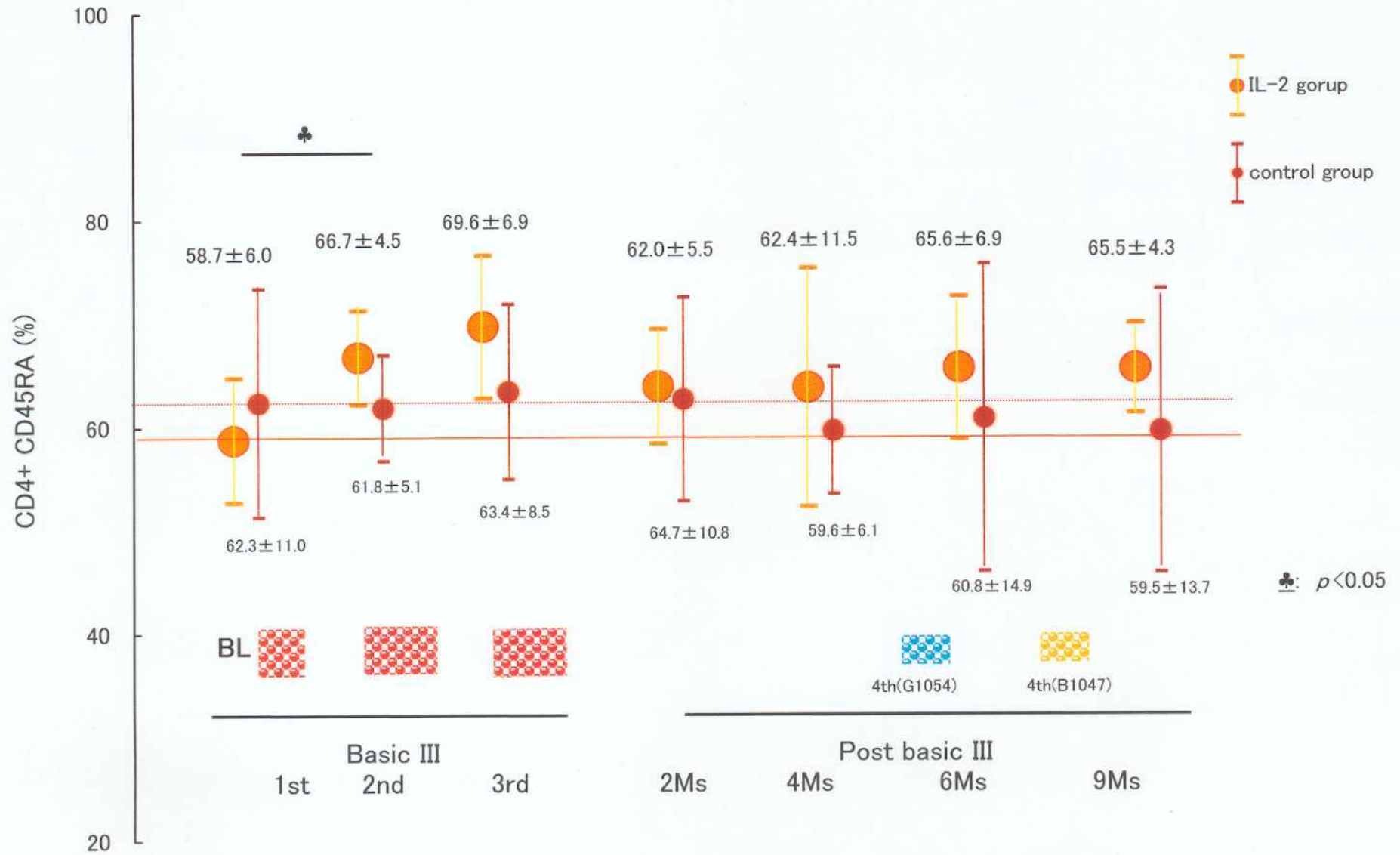


Fig. IV-9a

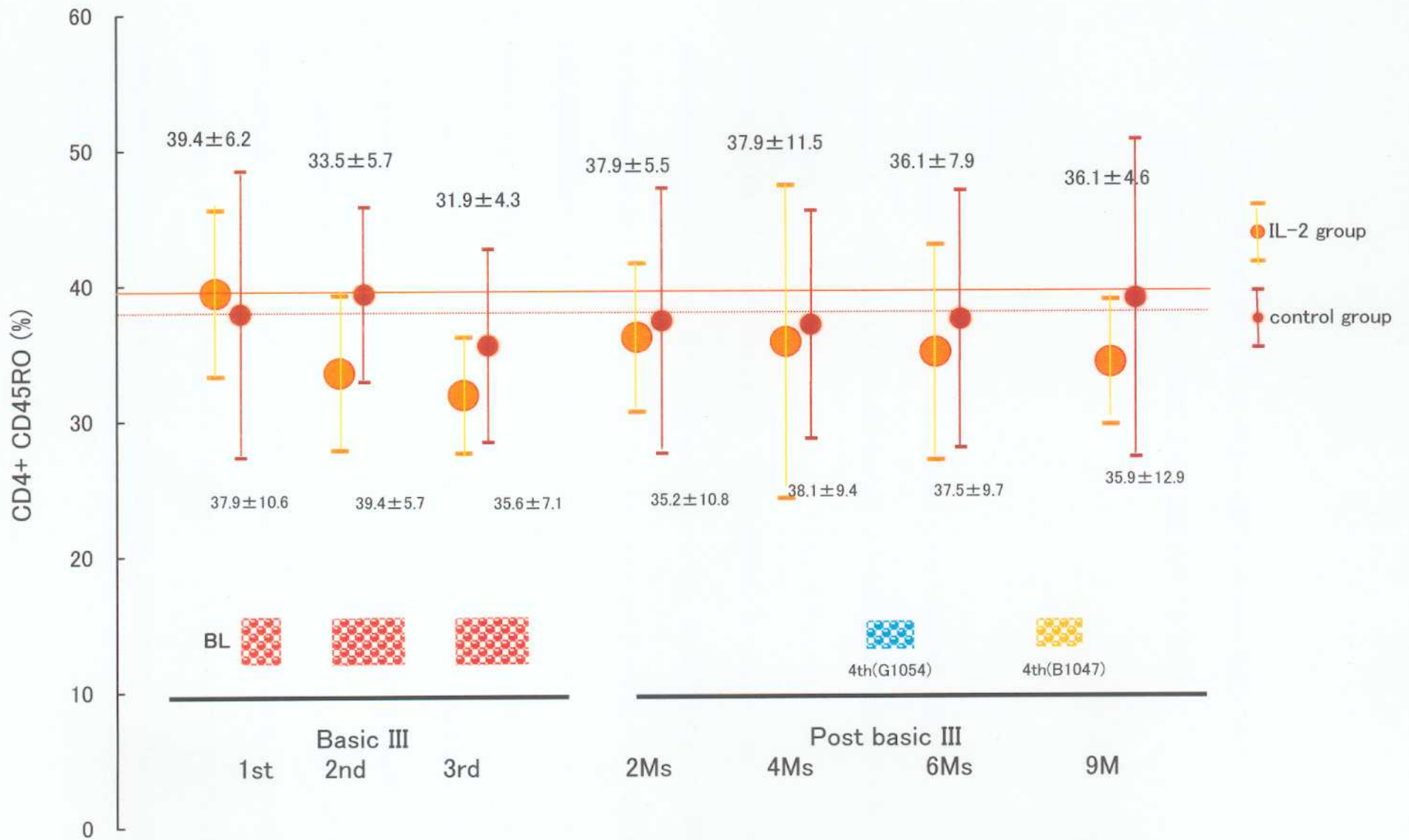


Fig.IV-9b