

課題番号 : 26指102

研究課題名 : HIV感染者の長期合併症の早期診断・治療法の開発に関する研究

主任研究者名 : 木内 英

分担研究者名 : 濱田 哲暢、土屋 亮人、萩原将太郎、廣井 透雄

キーワード : HIV 関連神経認知障害、中枢神経系薬剤移行性、HIV 関連悪性リンパ腫、HIV 関連心血管障害

研究成果

1. 日本における HIV 関連神経認知障害に関する疫学研究 (分担研究者: 木内)

研究の概要: 全国の HIV 拠点病院を対象に、日本人における HIV 関連神経認知障害の有病率や関連因子を調査する横断的観察研究である。

進捗状況: 2014 年 7 月に当院倫理委員会承認、研究開始。現在、参加表明 18 施設のうち 16 施設で倫理委員会承認された。目標症例数 500 例に対して、210 例で神経心理検査が終了、中間解析を行った。

HAND 有病率は Frascati criteria で 23%と最近の海外報告とほぼ同等の有病率であった。関連因子は加齢・HIV 罹病期間、学歴、高血圧が有意な関連を示した。

2. 抗 HIV 薬の脳内分布と移行性に関する動物モデルを用いた研究 (分担研究者: 濱田、土屋)

研究の概要: 中枢神経系への移行が良いとされているラルテグラビル (RAL) について、ラットの脳内移行性をイメージング質量顕微鏡にて解析を行い、LC-MS/MS を用いた髄液移行性率と併せて評価した。

方法: ラットの尾静脈内にラルテグラビル 10, 20, 50 および 100 mg/kg 用量を投与(n=2)。投与から 10 分後に、ペントバルビタール麻酔下で大槽内より脳脊髄液を採取した。その後、速やかに腹大動脈より全採血を行い、放血安楽死させた。安楽死後のラットから脳を採取し、液体窒素で凍結後保管した。また、脳脊髄液および採取した血液より分離した血漿についても凍結保管した。その後、脳、脳脊髄液および血漿は、LC-MS/MS (QTRAP 5500, ABSciex) にて濃度を測定し、脳は、イメージング質量顕微鏡 (iMScope, 島津製作所) にて、薬剤分布の画像化を行った。

投与量に依存して、Plasma および CSF 中の RAL 濃度が上昇する傾向が認められた。しかしながら、血漿中濃度と髄液移行濃度比である CSF/Plasma が約 1%以下と低い傾向にあることが認められた。

イメージング質量分析により、投与量に依存して、RAL 分布は脈絡叢から脳室全体へ広がる傾向が認められた。今後は血液脳脊髄液関門に発現する薬物トランスポーターとの関連性を解析する。

3. 末梢血液における DNA メチル化修飾変動による HIV リンパ腫の発症予測 (分担研究者: 萩原)

研究の概要: HIV 感染者に潜在するリンパ腫予備軍を DNA メチル化アレイ変動において見だし、予後予測、早期診断治療に貢献せんとするもの。

方法: 健常人ボランティア 3 名と HIV 感染者でリンパ腫未発症の患者さん 3 名の DNA メチル化解析を行った。結果、HIV 感染者における T リンパ球および B リンパ球の両者で健常人に比較して明瞭な DNA メチル化変動が認められた。また HIV リンパ腫発症のカギとなる HIV 感染者の B 細胞におけるゲノム不安定性についてゲノム領域のコピー数について検討した結果、患者 2 名から得た末梢血 B 細胞においてコピー数の異常を確認できた。

今後は、HIV 非感染の悪性リンパ腫患者の末梢血を対象に mFISH, DNA メチル化解析を行い、HIV 感染リンパ腫との対比を行う目的で、研究計画の一部修正を行い、倫理委員会へ再申請を行う。

4. HIV 感染患者の生命予後を規定する、循環器疾患の実態調査と早期介入の研究 (分担研究者: 廣井)
研究の概要: 当センター病院に通院中の HIV 感染患者約 2500 名の電子カルテを参照し、循環器疾患の有病率、危険因子などをレトロスペクティブに検討する。更に前向き調査として、発病率を明らかにし、心電図、負荷心電図、心エコーなどの早期診断における有用性、HIV 感染患者における循環器疾患の予防法を明らかにする。

進捗状況: 現時点で 600 例程度のデータベース化ができていますが、HIV 罹患者の平均年齢が比較的若いことからイベントの発生が少なく、更なるデータベース化が必要である。今後は 1000 例程度までデータベース化を行い、レトロスペクティブな研究データとして統計学的解析を試みる。その解析結果で学会発表などを予定する他、今後の早期介入による前向き研究をどのような形で、どの項目について行っていくかを、具体的に検討する足がかりとする。

Subject No. : 26 指 102

Title : The research for early diagnosis and therapy for age-related complication of HIV-infected patients.

Researchers : Ei Kinai, Akinobu Hamada, Kiyoto Tsuchiya, Shotaro Hagiwara, Yukio Hiroi

Key word : HIV-associated neurocognitive disorder (HAND), CNS-penetration of antiretrovirals, HIV-associated malignant lymphoma(ML) , HIV-associated cardiovascular disease (CVD)

Abstract :

1. The study for the prevalence of HAND in Japan (J-HAND study) (researcher; E Kinai)
The aim of study is estimation of prevalence of HIV-associated neurocognitive disorder (HAND) in Japan by cohort cross-sectional study. This study started July 2014, and at present, 16 facilities/hospital have obtained IRB approvals and 210 HIV-infected patients completed a whole set of neuropsychiatric test. According to the interim analysis, HAND was observed in 23% of patients, which is comparable level to several recent study.

2. The study for CNS-penetration and distribution in brain of antiretrovirals using animal models (researchers: A Hamada and K Tsuchiya)

CNS penetration of Raltegravir, which is one of the major current antiretroviral agents, was evaluated by measurement of CSF/plasma concentration ratio in rats using LC-MS/MS and by the image of drug distribution in rats' brain using imaging mass spectrometry. Different dosages of raltegravir were intravenously administered into rats, and 10 minutes later, plasma, CSF, and brain samples were obtained. According to interim analysis, CSF/plasma concentration ratio of raltegravir were quite low (<1%), although it tend to increase according to the dosage. In imaging mass spectrometry of brain, raltegravir can be spread from choroid plexus to ventricle as the dosage increased. In 2015, the relationship between the CSF penetration and drug transporters in blood-brain-barrier should be investigated.

3. The study for establishment of early diagnostic techniques of HIV-associated malignant lymphoma (researcher: S Hagiwara)

The aim of this study is an evaluation of the association between the variabilities of DNA methylation or genome instabilities in peripheral blood lymphocytes of HIV-infected patients and HIV-associated malignant lymphoma. According to the DNA methylation analysis of HIV-infected patients and healthy volunteer, a variety of hypomethylation/hypermethylation of DNA were observed in lymphocytes of HIV-infected patients, whereas no variation was found in healthy volunteers. Genome instability, which is a proceeding phenomenon of malignant lymphoma, were also found in B cells of HIV-infected patients.

4. The study for the prevalence of cardiovascular disease and the development of early diagnostic procedures for CVD (researcher: Y Hiroi)

This study is a retrospective study for the prevalence of cardiovascular disease and risk factors of HIV-infected patients. Furthermore, those patients will be followed up prospectively, and the association between the results of electrocardiogram or echocardiography, and future CVD will be evaluated. At present, a total of 600 patients have already been registered, and data are under analysis.

課題番号:26指102

研究課題名:HIV感染者の長期合併症の早期診断・治療法の開発に関する研究

H26年度研究進捗報告(1)

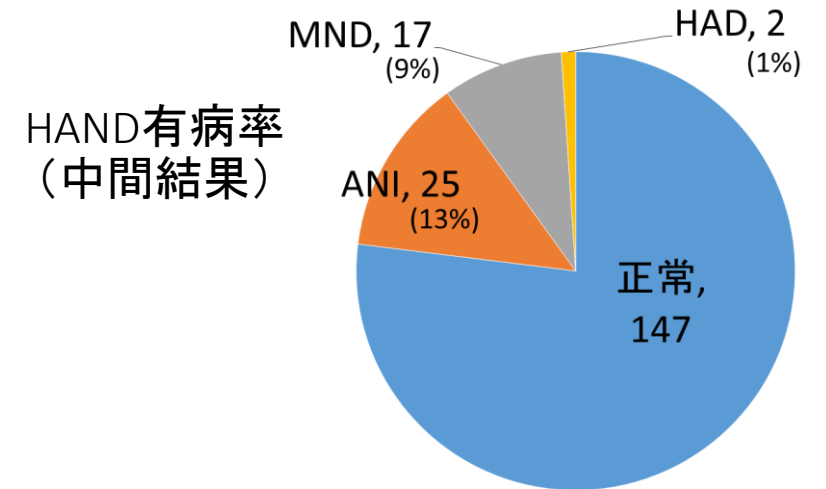
<日本におけるHIV関連認知障害に関する疫学研究(木内)>

- 2014年7月に当院倫理委員会承認、研究開始。
- 参加予定18施設のうち16施設で倫理委員会承認、目標500例に対して、210例で神経心理検査終了。
- HAND有病率はFrascati criteriaで23%。最近の海外報告と合致。

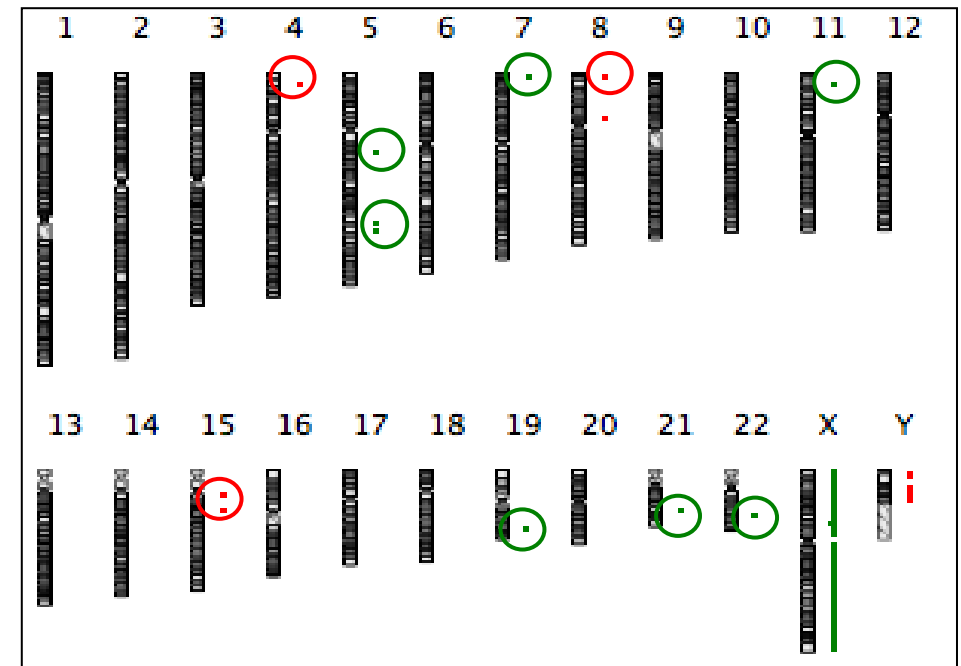
<末梢血液におけるDNAメチル化修飾変動によるHIVリンパ腫の発症予測(萩原)>

- HIV感染者におけるTリンパ球およびBリンパ球の両者で健常人に比較して明瞭なDNAメチル化変動が認められた。
- HIVリンパ腫発生のカギとなるHIV感染者のB細胞におけるゲノム不安定性についてゲノム領域のコピー数について検討した結果、患者2名から得た末梢血B細胞においてコピー数の異常を確認できた。

■:amplification ■:deletion



HIV感染者末梢血B細胞でのゲノム領域のコピー数異常



課題番号:26指102

研究課題名:HIV感染者の長期合併症の早期診断・治療法の開発に関する研究

H26年度研究進捗報告(2)

<動物モデルを用いた抗HIV薬の髄液移行性と脳内分布に関する研究(土屋・濱田)>

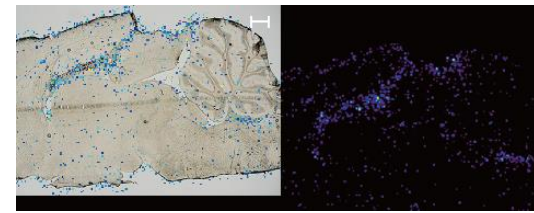
- ラットにラルテグラビルを10, 20, 50および100 mg/kg投与。投与から10分後に脳脊髄液を採取した。その後、安楽死後のラット脳を採取し、脳、脳脊髄液および血漿中のRAL濃度をLC-MS/MSにて測定し、脳はイメージング質量顕微鏡にて、薬剤分布の画像化を行った。
- 投与量に依存して、PlasmaおよびCSF中のRAL濃度が上昇する傾向が認められたが、髄液濃度/血漿濃度比が約1%以下と低い傾向であった。イメージング質量分析では、RAL分布は脈絡叢から脳室全体へ濃度依存性に広がる傾向が認められた。ラットモデルではRALの脳内移行性は低いと推測された。
- 今後は血液脳脊髄関門に発現する薬物トランスポータとの関連性を検討する。

<HIV感染患者の生命予後を規定する、循環器疾患の実態調査と早期介入の研究(廣井)>

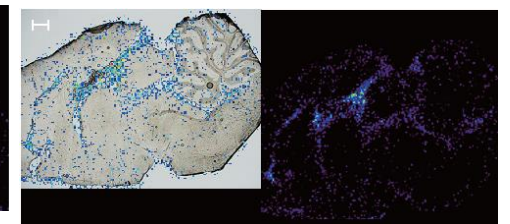
- 研究の概要:HIV感染患者約2500名より循環器疾患の有病率、危険因子などをレトロスペクティブに検討する。更に前向き調査として、発病率を明らかにし、心電図、負荷心電図、心エコーなどの早期診断における有用性、HIV感染患者における循環器疾患の予防法を明らかにする。
- 進捗状況:現時点で600例程度のデータベース化ができていますが、HIV罹患者の平均年齢が比較的若いことからイベントの発生が少なく、更なるデータベース化が必要である。今後は1000例程度までデータベース化を行い、レトロスペクティブな研究データとして統計学的解析を試みる。

Dose (mg/kg)	Plasma (mcg/ml)	CSF (ng/mL)	CSF/Plasma ratio (%)
20	14.3±0.1	65.7±28.3	0.46±0.20
50	43.0±6.7	250.33±10.8	0.59±0.10
100	106.1±7.7	1172.7±441.7	1.11±0.43

50 mg/kg



100 mg/kg



日本におけるHIV関連神経認知障害に関する疫学研究(J-HAND研究) H26年度研究進捗報告

• <進捗状況>

- 2014年7月に当院倫理委員会承認、研究開始
- 現在、参加表明18施設のうち16施設で倫理委員会承認。
- 目標症例数500例に対して、777例リクルート、346例で同意取得、210例で神経心理検査終了。

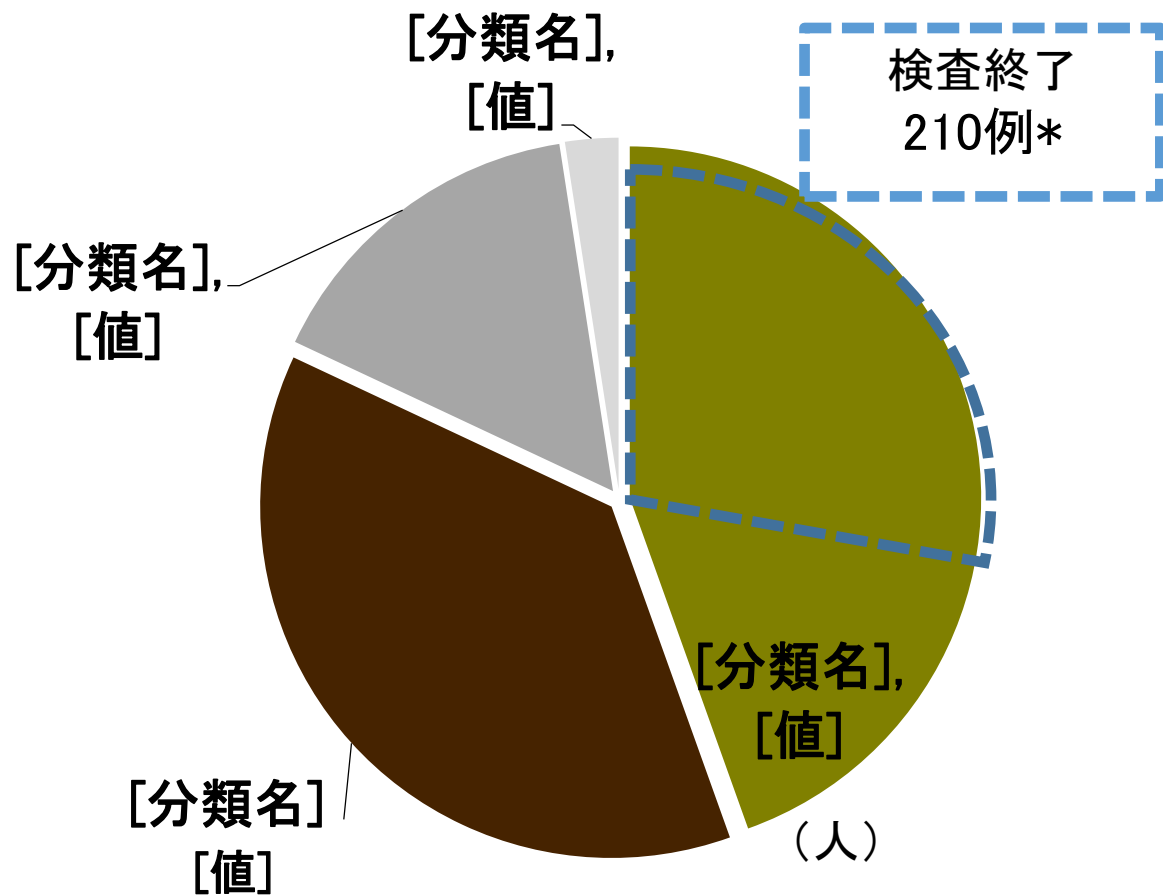
• <結果>

- HAND有病率はFrascati criteriaで23%。最近の海外報告と合致。
- 加齢・HIV罹病期間、学歴、高血圧が関与。

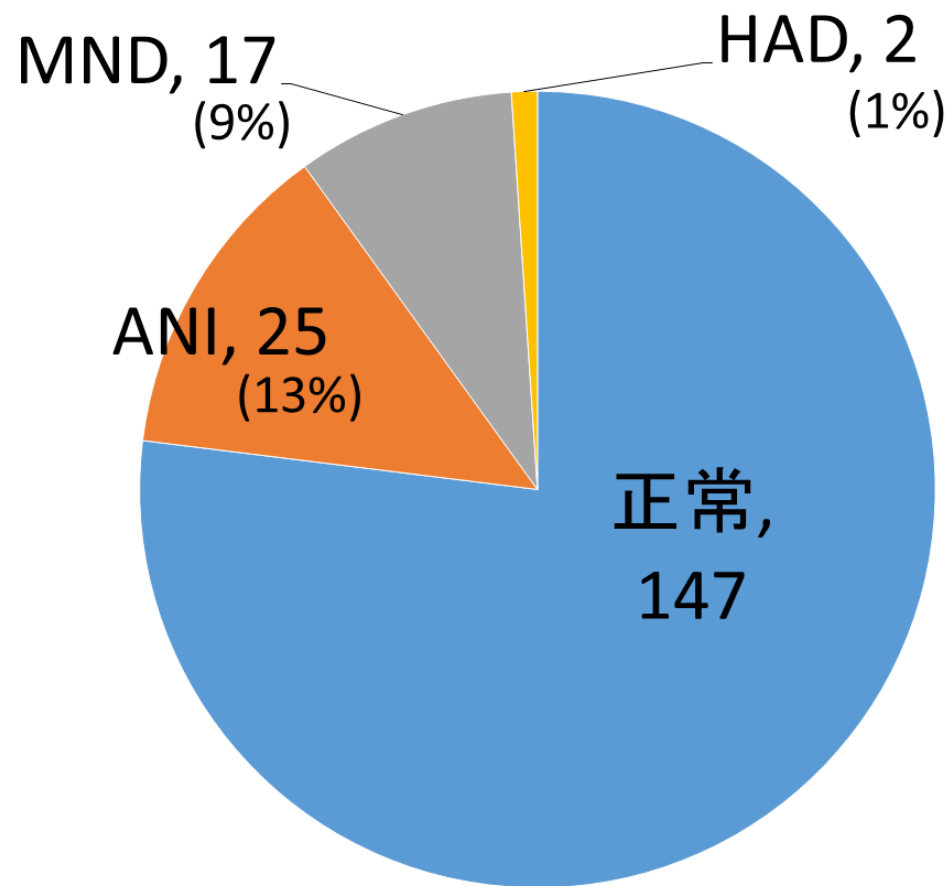
• <施設モニタリング・課題>

- 8施設に対して研究関連書類・CRF・神経心理検査状況などにつきモニタリングを実施した。
- モニタリングの結果、おおむね適切に研究が行われていた。一部施設で除外疾患が複数含まれている可能性があり、再モニタリングを検討している。
- Rey複雑図形模写の採点誤差が大きい。相互に再採点を行い、著しく乖離する事例では第三者による再採点も検討。

除外・拒否・保留の内訳



中間結果：HAND有病率



平成26年度 国際医療研究開発費 26指102 木内班 研究報告書 (分担 濱田哲暢)

動物モデルを用いた抗HIV薬脳内移行イメージング解析

研究の概要

HIV関連神経認知障害の治療において、抗HIV薬の脳内への移行は極めて重要である本検討では、中枢神経系への移行が良いとされているラルテグラビル(RAL)について、ラットの脳内移行性をイメージング質量顕微鏡にて解析を行い、LC-MS/MSを用いた髄液移行性率と併せて評価した。

方法

馴化飼育後のラットを3群に群分けした。群分け後、ラットの尾静脈内に被験物質投与液10, 20, 50および100 mg/kg用量を5 mL/kgの容量で尾静脈内投与した(n=2)。投与から10分後に、ペントバルビタール麻酔下で大槽内より脳脊髄液を採取した。その後、速やかに腹大動脈より全採血を行い、放血安楽死させた。安楽死後のラットから脳を採取し、液体窒素で凍結後保管した。また、脳脊髄液および採取した血液より分離した血漿についても凍結保管した。その後、脳、脳脊髄液および血漿は、LC-MS/MS(QTRAP 5500, ABSciex)にて濃度を測定し、脳は、イメージング質量顕微鏡(iMScope, 島津製作所)にて、薬剤分布の画像化を行った。

結果

■ Plasma・CSF Raltegravir濃度

Sample	Dose (mg/kg)	Plasma (ng/mL)	CSF (ng/mL)	CSF/Plasma (%)
001	Pre	out of range	out of range	-
101	10	6260	28.3	0.45
102	10	1128	1.50	0.13
103	10	414	out of range	-
201	20	14120	54.8	0.39
202	20	14400	44.5	0.31
203	20	14280	97.8	0.68
301	50	43600	238	0.55
302	50	49400	258	0.52
303	50	36000	255	0.71
401	100	103400	1635	1.58
402	100	114800	1128	0.98
403	100	100200	755	0.75

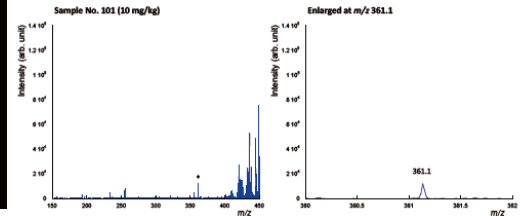
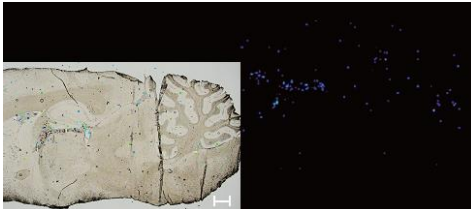
結果・考察

Control



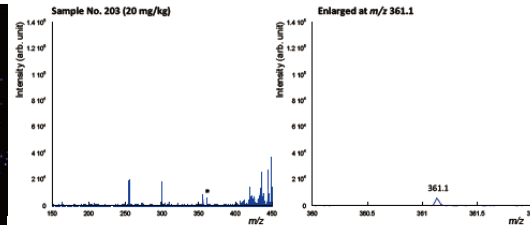
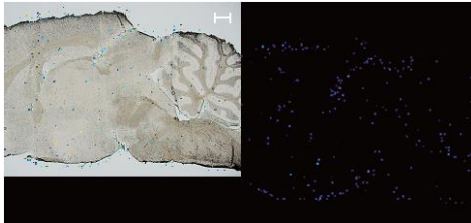
投与量に依存して、PlasmaおよびCSF中のRAL濃度が上昇する傾向が認められた。しかしながら、血漿中濃度と髄液移行濃度比であるCSF/Plasmaが約1%以下と低い傾向にあることが認められた。イメージング質量分析により、投与量に依存して、RAL分布は脈絡叢から脳室全体へ広がる傾向が認められた。

10 mg/kg



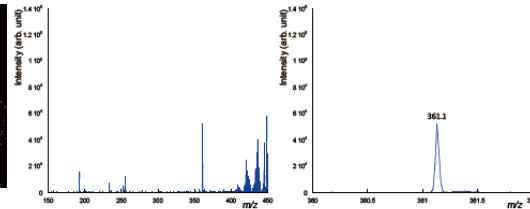
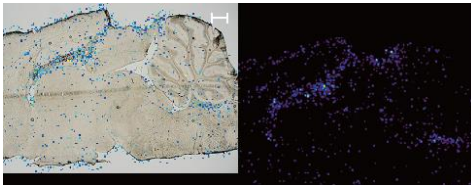
脳内RALのイメージング結果は、全脳を摘出しホモジネートする場合、血管に存在する薬剤濃度を測定する危険性を示唆する。

20 mg/kg

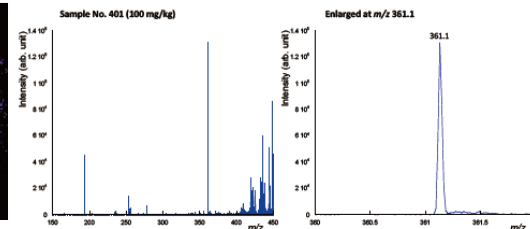
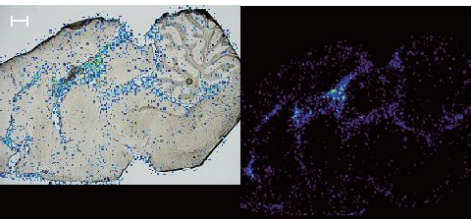


よって、脳内への薬物移行性を評価する場合、解釈に注意が必要である。すなわち、これまで薬剤の脳内移行性の評価において髄液移行率にて評価されているが、組織への分布を反映しない可能性がある。今後、薬理作用と併せて評価する必要があると考えられる。

50 mg/kg



100 mg/kg



結語

ラットモデルの結果では、ラルテグラビルの脳内移行性は、低いと考えられる。

平成26年度 国際医療研究開発費 26指102 木内班 研究報告書(分担 土屋亮人)
動物モデルを用いた抗HIV薬髄液中濃度の薬理遺伝学的解析

研究の概要

HIV関連神経認知障害の治療において、抗HIV薬の脳内への移行は極めて重要である。そこで本検討では、中枢神経系への移行が良いとされているラルテグラビル(RAL)について、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析装置(LC-MS/MS)を用いてラットの髄液への移行性を解析した。

方法1

8週齢雄 Sprague-Dawley ラットに RAL (dimethyl sulfoxide 溶液/polyethylene glycol 400/water で 20:60:20 に調製) 3mg/kg を 5ml/kg で尾静脈へ投与した。投与10分後(n=2)、30分後(n=2)、60分後(n=2)にイソフルランによる深麻酔下にて大槽(小脳延髄槽)から髄液を約200 μ l採取、後大動脈から全血を約8ml採血。

全血は遠心分離後血漿のみを保存、採取された血漿と髄液は測定まで-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。RAL血漿中および髄液中濃度は LC-MS/MS (Nexera X2 (Shimadzu) および QTRAP5500 (AB SCIEX)) で測定した。

結果1

Time (min)	Plasma (ng/ml)	CSF (ng/ml)
10	1200	8.42
	1320	8.78
30	542	9.86
	436	3.5
60	107	0.53
	202	1.17

平均RAL血漿中濃度は、10、30および60分後でそれぞれ1260、489および155 ng/mlであった。平均RAL髄液中濃度は、10、30および60分後でそれぞれ8.6、6.7 および0.9ng/mlであった。

方法2

8週齢雄 Sprague-Dawley ラットに RAL (dimethyl sulfoxide 溶液/polyethylene glycol 400/water で 20:60:20 に調製) 20mg/kg (n=3)、50mg/kg (n=3)、100mg/kg (n=3) を 5ml/kg で尾静脈へ投与した。投与10分後にイソフルランによる深麻酔下にて大槽(小脳延髄槽)から髄液を約200 μ l採取、後大動脈から全血を約8ml採血。以下の方法は方法1と同じ。

結果2

Dose (mg/kg)	Plasma (μ g/ml)	CSF (ng/ml)
20	14.3 \pm 0.1	65.7 \pm 28.3
50	43.0 \pm 6.7	250.3 \pm 10.8
100	106.1 \pm 7.7	1172.7 \pm 441.7

Dose (mg/kg)	CSF/Plasma ratio (%)
20	0.46 \pm 0.20
50	0.59 \pm 0.10
100	1.11 \pm 0.43

Mean \pm SD

平均RAL血漿中濃度 \pm 標準偏差(SD)は、20、50および100mg/kg投与群でそれぞれ14.3 \pm 0.1、43.0 \pm 6.7 および106.1 \pm 7.7 μ g/mlであった。平均RAL髄液中濃度 \pm SDは、20、50および100mg/kg投与群でそれぞれ65.7 \pm 28.3、250.3 \pm 10.8および1172.7 \pm 441.7ng/mlであった。平均RAL髄液/血漿中濃度比 \pm SDは、20、50および100mg/kg投与群でそれぞれ0.46 \pm 0.20、0.59 \pm 0.10および1.11 \pm 0.43%であった。

まとめ

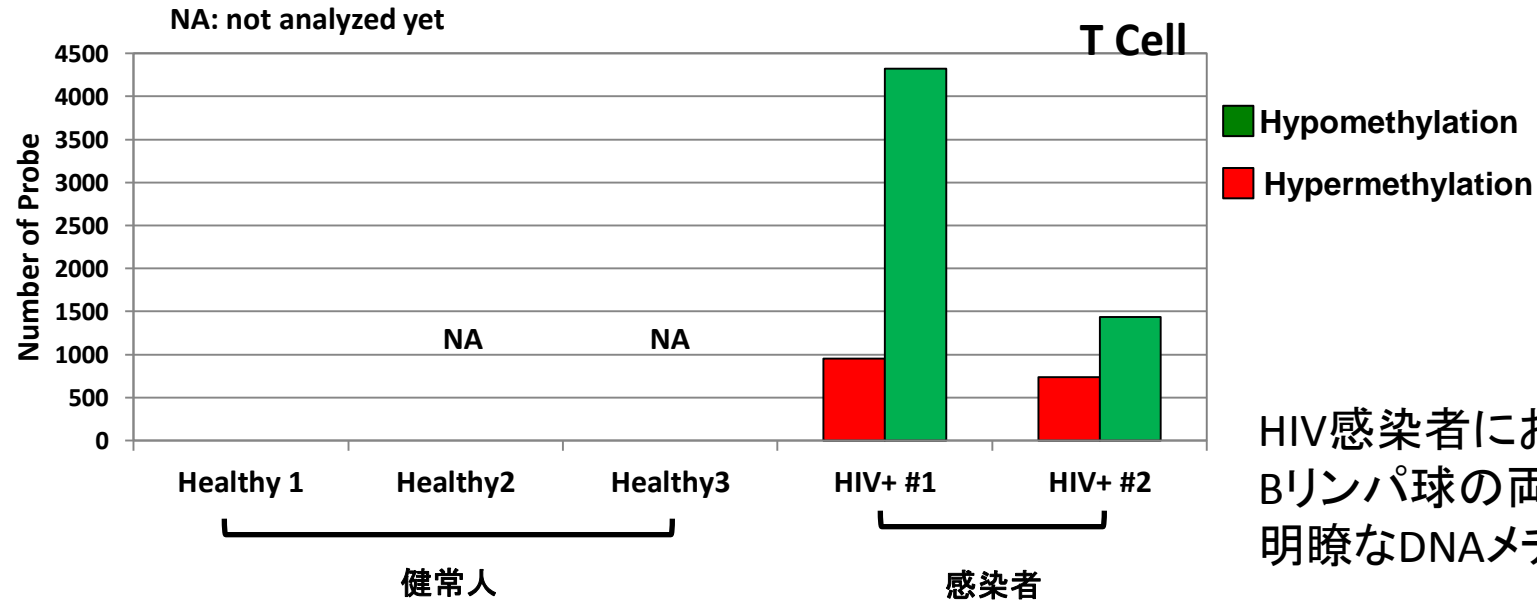
結果1より、投与10分後の平均髄液中濃度が高かったため、血漿および髄液の採取時間は投与後10分とした。

結果2より、血漿から髄液への移行率は平均0.46~1.11%とそれほど高くなかった。次回試験の投与量は平均髄液中濃度の高い50および100mg/kgで検討。

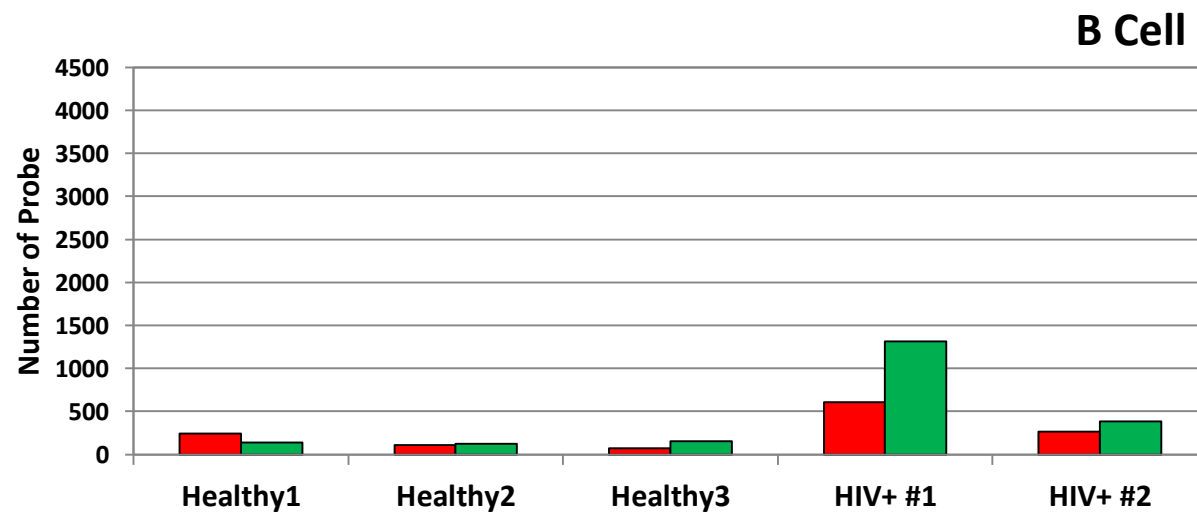
今後は血液脳脊髄液関門に発現する薬物トランスポータとの関連性を解析する。

末梢血液におけるDNAメチル化修飾変動によるHIVリンパ腫の発症予測

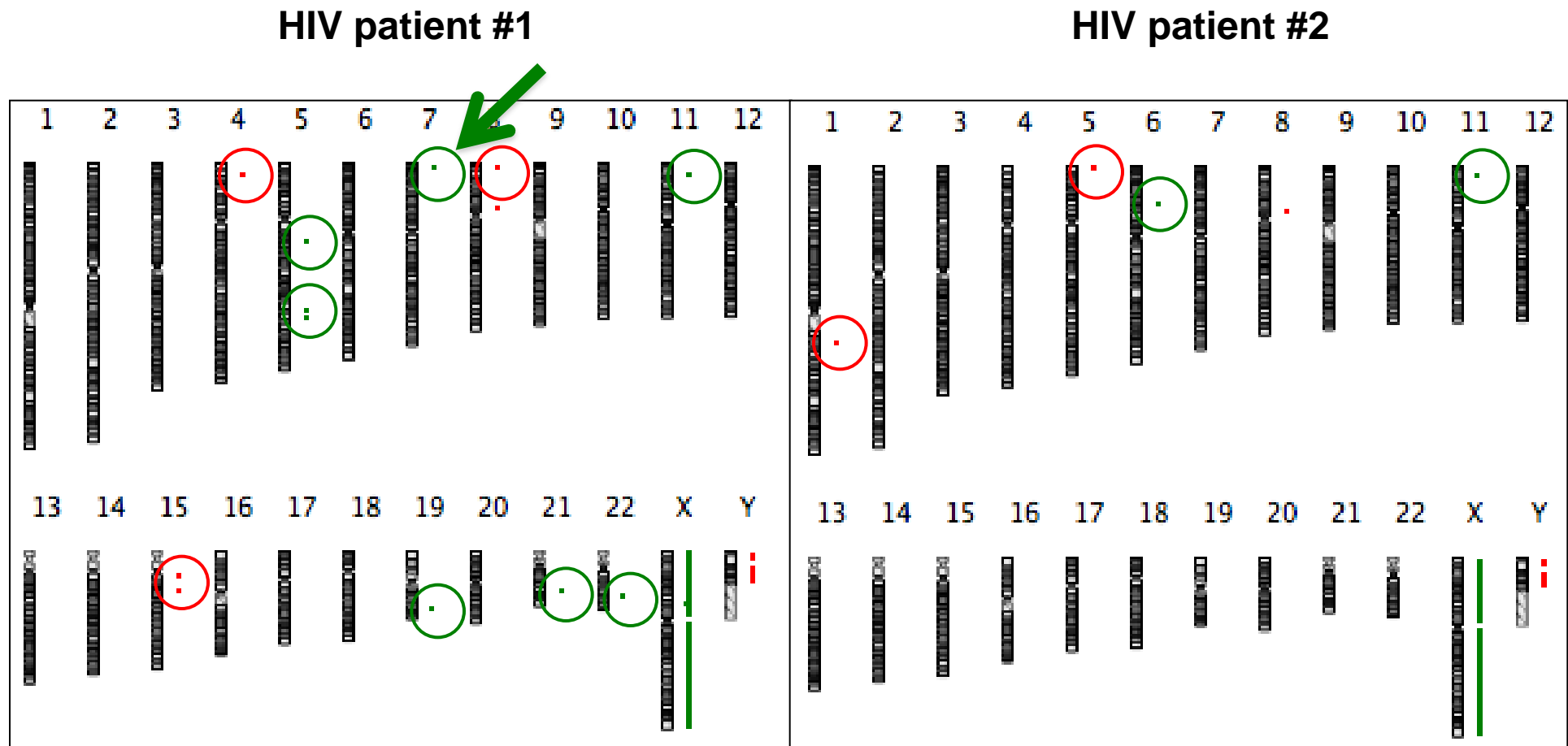
分担研究者： 萩原将太郎



HIV感染者におけるTリンパ球およびBリンパ球の両方で健康人に比較して明瞭なDNAメチル化変動が認められた。



HIV感染者末梢血B細胞でのゲノム領域のコピー数異常



DNAメチル化変動: HIV patient #1 > HIV patient #2

■:amplification ■:deletion

HIVリンパ腫発生のカギとなるHIV感染者のB細胞におけるゲノム不安定性についてゲノム領域のコピー数について検討した。患者2名から得た末梢血B細胞においてコピー数の異常を確認できた。

HIV感染患者の生命予後を規定する、循環器疾患の実態調査と早期介入の研究

分担研究者: 廣井 透雄

協力医師: 上村 宗弘

久保田 修司

■研究内容及び、その背景

HIV感染症は免疫能低下を引き起こし、日和見感染症により死に至っていたが、早期からの集学的な化学療法 of 進歩により感染による死亡は減少し、健常者と同様の寿命が期待できるようになった。そのような中で問題となってきたのが、HIV感染もしくは治療薬による循環器疾患であり、その報告のほとんどは海外のものであり、本邦のようにほとんどの患者が最適な医療をうけている状態での報告はない。

当センター病院に通院中のHIV感染患者約2500名の電子カルテを参照し、循環器疾患の有病率、危険因子などをレトロスペクティブに検討する。

更に前向き調査として、発病率を明らかにし、心電図、負荷心電図、心エコーなどの早期診断における有用性、HIV感染患者における循環器疾患の予防法を明らかにする。

■方法

当センターACCにおける患者データベースから、すでに診断のついている虚血性心疾患、肺高血圧症などの循環器疾患の有病率を明らかにするとともに、冠動脈危険因子、罹病期間、内服薬などを抽出する他、3年以内に心電図を検査されている場合には、虚血性心疾患、右室肥大などの所見を循環器医が判読してデータベースに登録を行う。

目標症例数として1500程度を予定している。

■現時点での研究中間報告と問題点

2014年4月までに当院ACCを初診し、HIVの診断を受けた患者を対象としている。

右図がデータベースの一部を示すが、患者の性別、身長・体重、内服薬、心血管リスクの有無、腎機能、心電図、心エコー、胸部レントゲン、冠動脈CT、経皮的冠動脈造影検査、CD4、HIV-RNAのコピー数、BNPなどを電子カルテ上でチェックし、レトロスペクティブに評価を行いデータベース化し、循環器疾患の実態調査を行っている。

Sex	月経期	妊娠	胸部X線	心電図	Cre	算み値	eGFR	BNP	CD4	HIV	DM	DDR
32 M			2014/4/4 なし		0.8	1	86.8		112.0	-		無
47 M			2014/4/1 なし		1.0	1	63.6		434.0	0.740		無
32 M			2014/3/31 なし		0.7	1	104.4		403.0	-		無
30 M			2014/3/27 なし		0.7	1	101.6		324.0	0.016		無
41 M			2014/4/3 なし		0.8	1	83.0		474.0	0.500		無
23 M			2014/3/18 なし		0.7	1	114.7		418.0	5.300		無
40 M			2014/3/14 なし		0.9	1	75.5		214.0	0.790		無
30 M							#DIV/0!					
42 F			2014/3/11 疑い		0.9	0.739	57.8		123.0	-		無
21 M			2014/3/4 なし		0.9	1	95.5		414.0	0.025		無
45 F					0.8	0.739	63.1		522.0	13.000		無
43 M			2014/3/12 なし		0.9	1	74.0		168.0	410.000		無
48 M			2014/3/6 なし		1.1	1	57.5		304.0	0.026		無
41 M			2014/3/6 疑い		0.8	1	88.9		282.0	0.022		無
35 M			2014/2/19 なし		0.8	1	88.1		96.0	0.006		無
46 M			2014/1/30 なし		0.8	1	84.8		561.0	0.490		無
25 M			2014/1/28 なし		0.7	1	110.3		729.0	-		無
45 M			2014/2/12 なし		0.8	1	80.8		509.0	-		無
28 F			2014/1/8 なし		0.6	0.739	94.6		397.0	0.005		無
58 M			2013/12/20 明らか		2.2	1	25.8	5491	299.0	97.000	6.8	有
32 M			2013/12/24 なし		0.8	1	92.9		551.0	-		無
43 M			2014/2/12 なし		0.8	1	90.3		112.0	TND		無
45 M			2014/2/26 なし		0.9	1	71.3		417.0	TND		無
27 M			2013/12/11 なし		1.0	1	78.8		436.0	-		無
25 M			2013/12/9 なし		0.9	1	86.4		413.0	17.000		無
24 M			2014/1/14 疑い		0.8	1	98.1		588.0	0.005	5.2	無
35 M			2013/12/2 疑い		0.9	1	79.4		462.0	0.220		無
37 M			2013/11/26 なし		0.8	1	89.1		358.0	-		無

現時点で600例程度のデータベース化ができているが、HIV罹患者の平均年齢が比較的若いことからイベントの発生が少なく、更なるデータベース化が必要である。しかし初診日が当院の電子カルテシステム導入以前の患者に関しての情報収集に難渋している。

■今後の方針

およそ1000例程度までデータベース化を行い、レトロスペクティブな研究データとして統計学的解析を試みる。その解析結果で学会発表などを予定する他、今後の早期介入による前向き研究をどのような形で、どの項目について行っていくかを、具体的に検討する足がかりとする。

国内で循環器疾患、特に虚血性心疾患とHIVとの関連の報告は少なく、HIVの患者が多く通院する当院のデータは価値があるものと考えられる。