

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: 2年度目の平成 27 年 10 月時点で、17 施設の参加表明があり、15 施設でリクルートが開始された。結果、1407 例のリクルートが行われ、うち同意 720 例、除外 396 例、拒否 234 例、保留 23 例であった。同意取得 720 例のうち 518 例の神経心理検査が終了、うち 492 例を対象に中間解析を行い、班会議で報告した。中間解析では HAND 有病率は 23%と推定され、全米の大規模先行研究の約半分であることが示唆された。HAND 有病率は年齢と HIV 罹病期間、抗 HIV 薬との間で有意な関連が認められた。

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)

野生型ラットを用いて予備実験、追加予備実験、再追加予備実験を行い、その後ノックアウトラットを用いた本実験を行った。

最適な投与後回収時間を決定するために予備実験を行った。8 週齢野生型ラット (n=6) に RAL 3 mg/kg を尾静脈投与し、10 分後 (n=2)、30 分後 (n=2)、60 分後 (n=2) に血液、髄液および脳をそれぞれ回収した。投与 10 分後の RAL 血漿中濃度は平均 1260ng/ml、RAL 髄液中濃度は平均 8.6ng/ml で、投与 30 分後はそれぞれ 489ng/ml、6.68ng/ml、投与 60 分後はそれぞれ 155ng/ml、0.85ng/ml であった。この結果から投与後回収時間は 10 分とした。

予備実験では薬剤濃度が低値であったため、投与濃度を上げて追加予備実験を行った。10 mg/kg (n=2)、20 mg/kg (n=2)、50 mg/kg (n=2) を 5 ml/kg で尾静脈投与し、10 分後に血液、髄液および脳をそれぞれ回収した。結果、10 mg/kg の RAL 血漿中濃度は平均 10410ng/ml、RAL 髄液中濃度は平均 106ng/ml で、20 mg/kg はそれぞれ 20150ng/ml、213ng/ml、50 mg/kg はそれぞれ 30550ng/ml、497ng/ml であった。

追加予備実験では RAL 血漿中・髄液中濃度のばらつきが大きく、RAL 脳内濃度が低値であったため、例数を増やし、かつ 100 mg/kg (n=3) も含めた再追加予備実験を行った。20 mg/kg (n=3)、50 mg/kg (n=3)、100 mg/kg (n=3) を投与した結果、20 mg/kg の RAL 血漿中濃度は平均 14300ng/ml、RAL 髄液中濃度は平均 66ng/ml、RAL 血漿髄液比は平均 0.46%で、50 mg/kg はそれぞれ 43000ng/ml、250ng/ml、0.59%、100 mg/kg はそれぞれ 106000ng/ml、1173ng/ml、1.11%であった。

予備実験結果から、投与量を 50 mg/kg と 100 mg/kg、回収時間を 10 分後と 30 分後とし、ノックアウトマウスを用いて本実験を行った。RAL 50 mg/kg (n=10) と 100 mg/kg (n=10) を投与し、10 分後 (n=5) と 30 分後 (n=5) に血液、髄液および脳を回収した。現在、これら回収した検体で RAL 濃度を測定中である。

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: HIV 感染陽性リンパ腫患者のリクルートおよび末梢血血液細胞から DNA を回収し、メチル化アレイ解析及びゲノム不安定性の解析を行った。結果、HIV 関連リンパ腫患者とリンパ腫未発症 HIV 感染患者の一部で共通したメチル化パターンが見出され、ゲノムの不安定性も確認出来、将来のリンパ腫発症予備軍である可能性が示唆された。本年はこれまでの結果を元に HIV リンパ腫予備軍ターゲットの絞り込みを行う。特に、既存の試料で、リンパ腫未発症の単核球から分離されたナイーブ B 細胞と、リンパ腫発症後の末梢血ナイーブ B 細胞の比較を行うことで、リンパ腫発症による特異的なメチル化変動を見出す。絞り込みからリンパ腫発症関連遺伝子の特定を行い DNA メチル化 PCR 解析を確立する。

HIV 関連リンパ腫の早期診断・発症リスク評価マーカーとしての妥当性を検討する。

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: 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ってきた。その中で特に虚血性心疾患に着目すると、HIV 感染でもやはり高血圧、脂質、糖尿病、喫煙の有無などの一般的な冠疾患リスクが、虚血性心疾患と関連することがわかった。3 年度目は、2 年の研究で明らかになった危険因子、症状に加えて、早期発見マーカーとして、HIV 感染や ART による治療で上昇することが報告されている血管炎症マーカー (IL-6 や高感度 CRP など) の測定や、冠動脈 CT や心臓超音波検査、運動負荷試験などで冠動脈評価、虚血評価を前向きに行う。

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 to estimate the prevalence of HIV-associated neurocognitive disorder (HAND) in Japan by a cohort cross-sectional study. This study started July 2014, and at present, 17 facilities/hospital have obtained IRB approvals and 1407 HIV-infected patients have been recruited. Of those, informed consent was obtained from 720 patients, 396 patients were excluded, and 234 patients refused to enrollment. According to the interim analysis using 492 data of patients, HAND was observed in 25% of patients, which is about a half of large cohort study in US and is comparable level to some recent study. HAND was significantly associated with the older age and the longer duration of HIV infection, and in contrast, it was negatively associated with antiretroviral therapy.

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

CNS penetartion 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. In imaging mass spectrometry of brain, raltegravir can be spread from choroid plexus to ventricle as the dosage increased. Moreover, the relationship between the CSF penetration and drug transporters in blood-brain-barrier was evaluated. First, three preliminary studies using wild rats were conducted to optimize the sampling time and the dosage of raltegravir, respectively. According to the results of preliminary studies, the optimized sampling time was determined at 10 and 30 min. since drug administration, and dosage was determined at 50mg/kg and 100mg/kg. Second, we conducted the large population study using drug-transporter gene knock-out mouse and the data is on analyses.

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 patents and HIV-associated malignant lymphoma. In comparison of DNA methylation analysis between HIV-infected patients with and without malignant lymphoma, we found a common methylation patterns and stability loss of genomes between them, which can be possible markers of the prediction of HIV-related malignant lymphoma. In 2016, we will determine a lymphoma-specific methylation pattern by comparing the

naïve B cells from the patients with lymphoma and from the patients who are expected to have malignant lymphoma in near future.

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

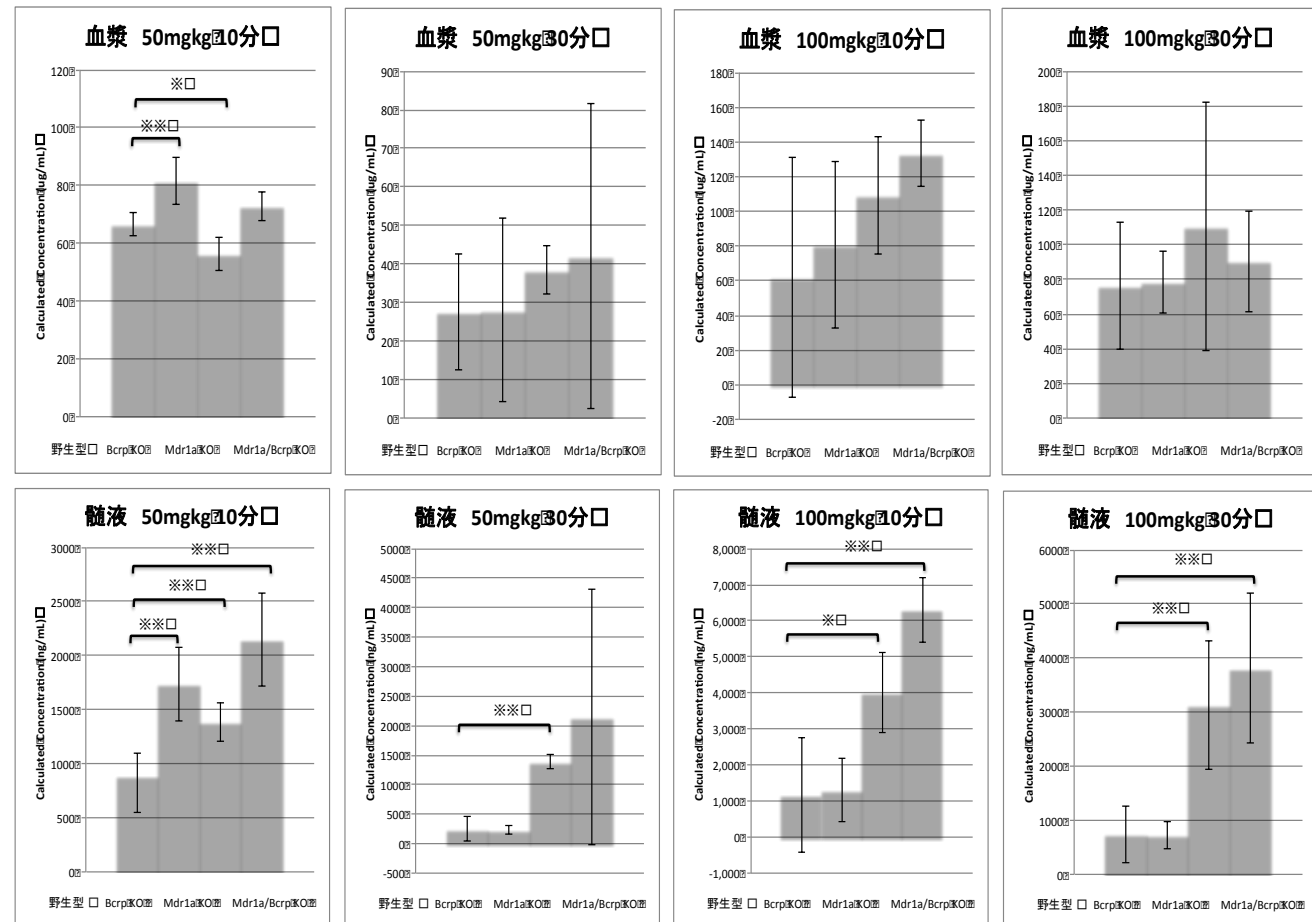
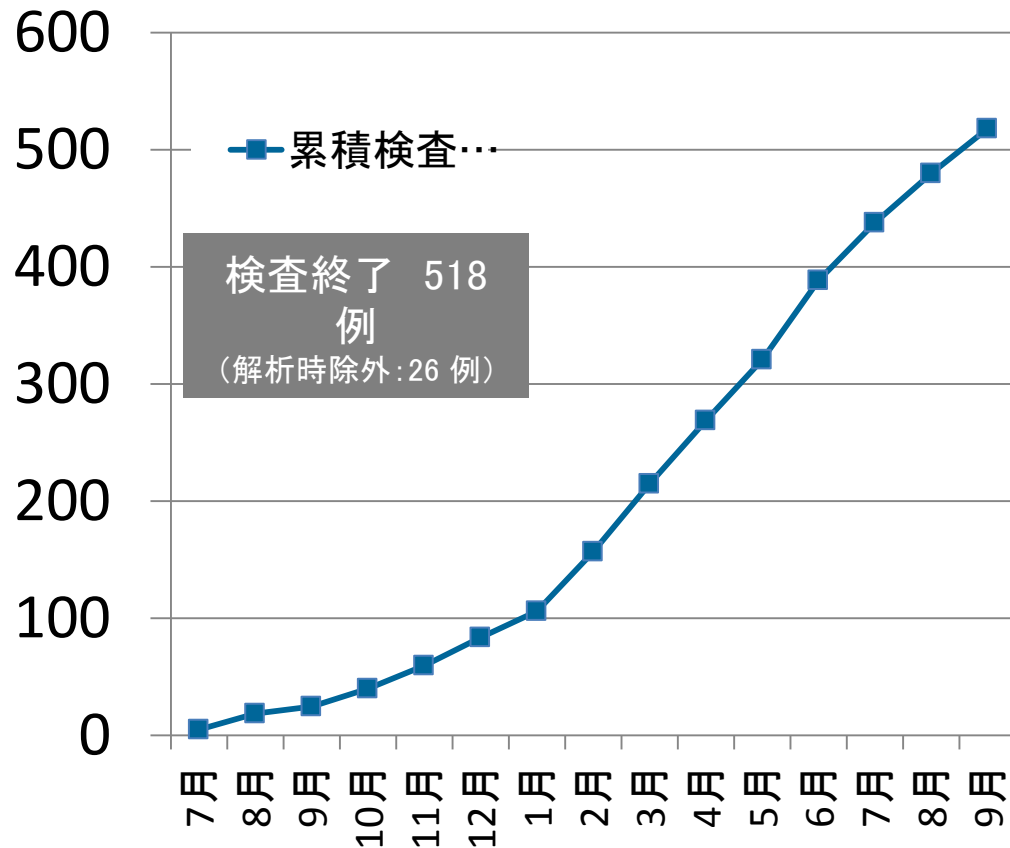
This study is a retrospective study for the prevalence of cardiovascular disease and risk factors of HIV-infected patients. During first 2 years, we accumulated the related data of HIV-infected patients, including coronary risk factor, duration of HIV-infection, antiretroviral therapy, and other comorbidities. In HIV-infected patients, it became clear that ischemic heart disease can be associated with common coronary risk factor such as hypertension, hyperlipidemia, diabetes, or smoking. In 2016, we are planning to start a cohort study to evaluate the association between ischemic heart disease and inflammation biomarkers such as IL-6 and high sensitive CRP, which are reported to increase in HIV-infected patients.

課題番号(26指102)

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(1)

ラット血漿及び髄液中Raltegravir濃度

J-HAND研究: 検査終了者数推移



課題番号(26指102)

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(2)

HIV感染者の循環器疾患

悪性リンパ腫研究：
HIV感染者はDNAメチル化が多い。

平成
26,
27
年度

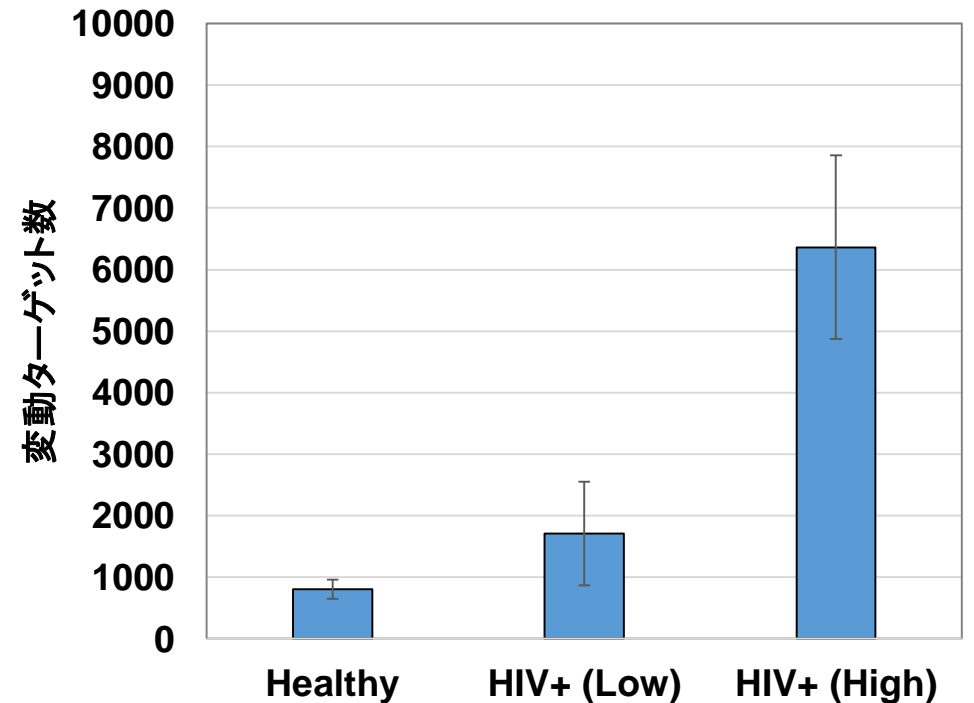
ACC患者600名のデータ解析
(後ろ向き研究)

虚血性心疾患の罹患率低い
若年者
HIV罹患年数短い
非感染者と同じリスク因子

前向き研究開始
hCRP, IL-6
心エコー、冠動脈CT

平成
28
年度

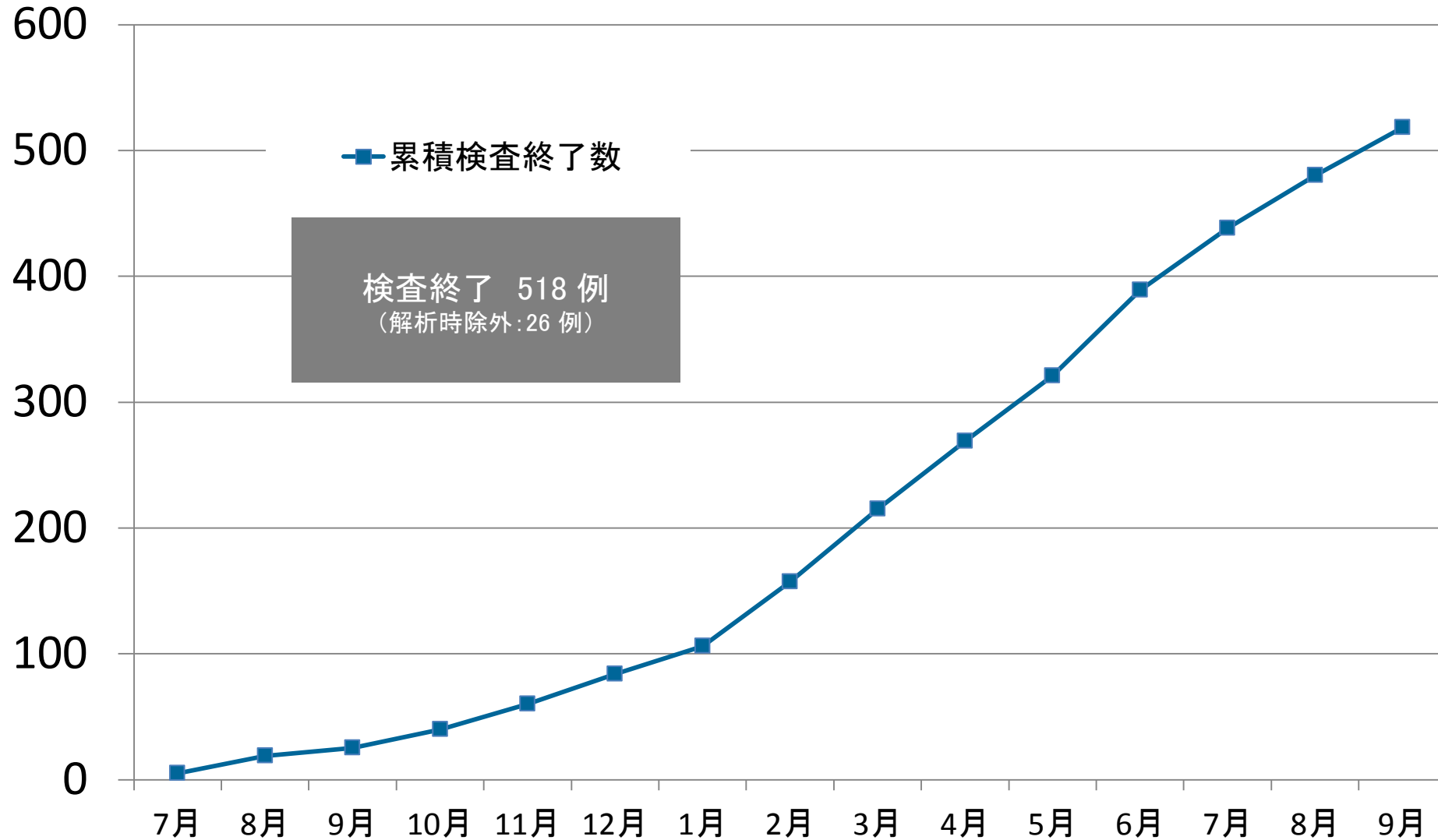
DNAメチル化変化変動



HIV感染者にDNAメチル化変動の小さい集団と大きい集団が存在する

検査患者数の推移

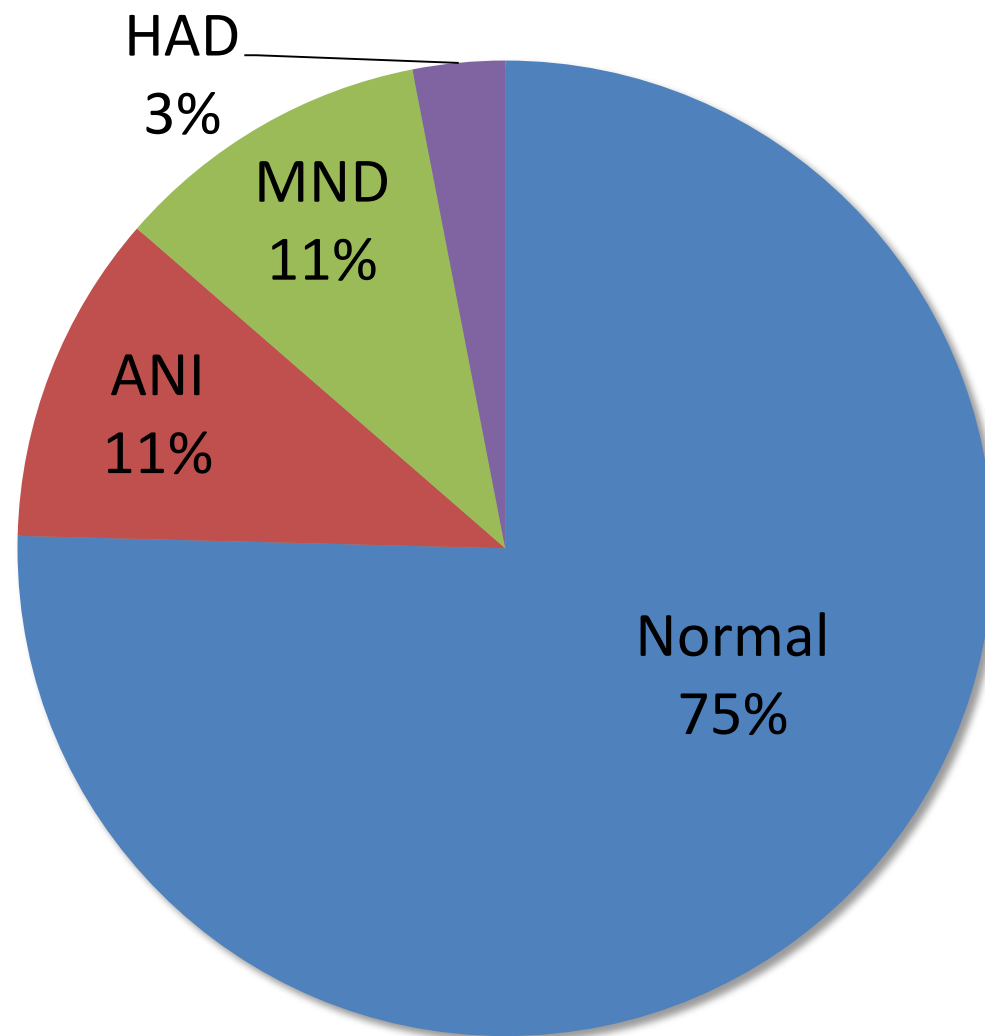
2015/10/1付



神経心理テスト結果 (Frascati criteria)

2015/10/1付

HAND : 25%



内訳	人数
Normal	371
ANI	54
MND	52
HAD	15
合計	492

平成27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

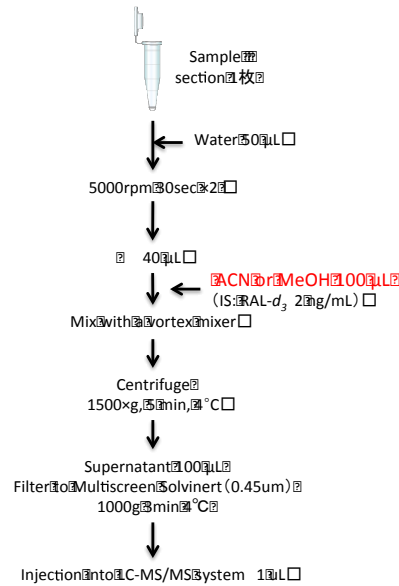
研究の概要

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、脳内輸送を制御するABCB1, ABCG2, double knockout ラットの脳内移行性を質量顕像装置 (iMsope, Shimadzu)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

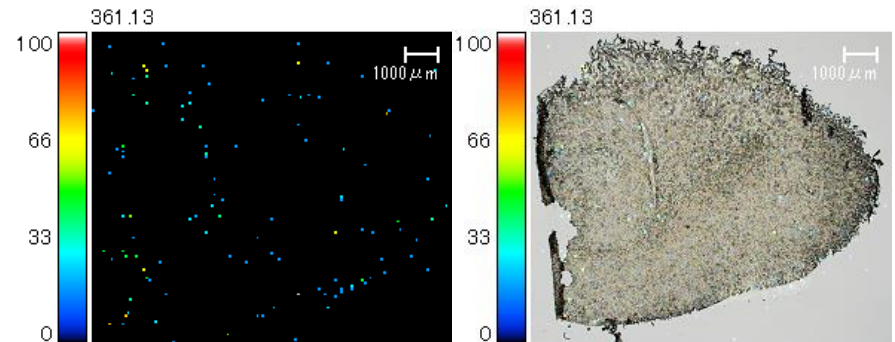
ラット尾静脈内に被験物質投与液50, 100 mg/kg用量を5 mL/kgの容量で尾静脈内投与した。投与から10, 30分後に、大槽内より脳脊髄液を採取した。その後、速やかに腹大動脈より全採血を行い、放血安楽死させた。安楽死後のラットから脳を採取し、液体窒素で凍結後保管した。また、脳脊髄液および採取した血液より分離した血漿についても凍結保管した。その後、脳、脳脊髄液および血漿は、LC-MS/MS(QTRAP 5500, ABSciex)にて濃度を測定し、脳は、質量分析イメージングにて、薬剤分布の画像化した。測定方法は、再現性に関して再検討を行った。

測定条件の検討



	Old	New
測定範囲	99.9997~455	49.9944~455.1816
積算回数	3回/pixel	1回/pixel
サンプル電圧	3kV	3.50kV
検出器電圧	2.1kV	1.80kV
MS段数	2	2
プリカーサ	445	445.163
幅	1.5	1.5
エネルギー	48	38
カットオフ	123	123
ガス量	50	50
アイソレーション	20	20
CID時間	30	30
2nd CID	なし	なし
Δ m/z	0	0
照射回数	150shots	150shots
繰り返し周波数	1000Hz	1000Hz
照射径	2	2
強度	45	46

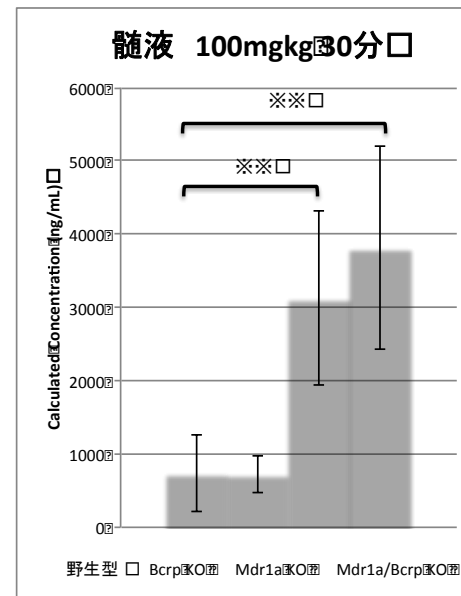
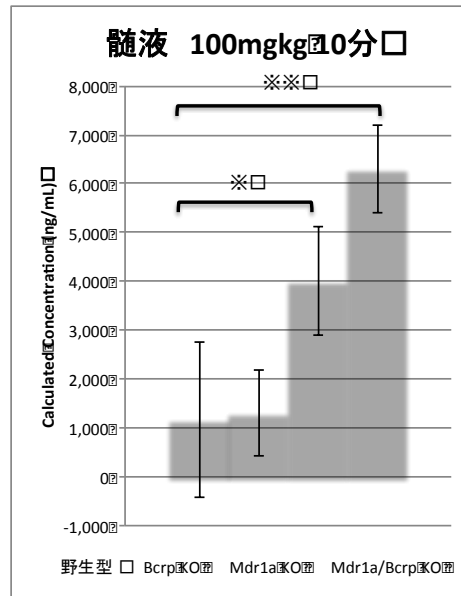
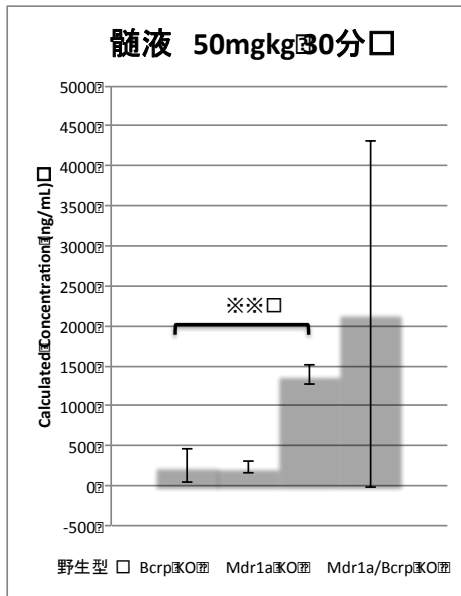
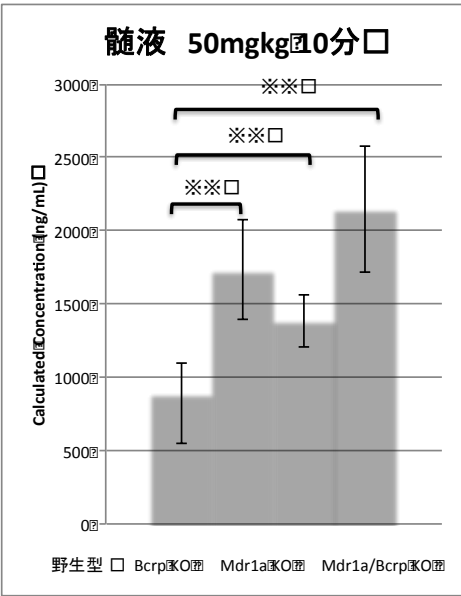
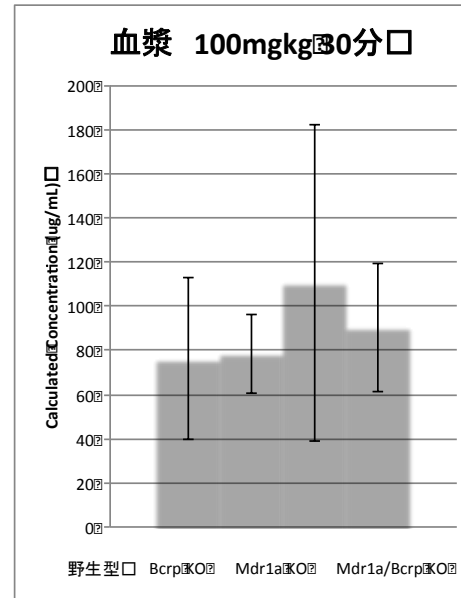
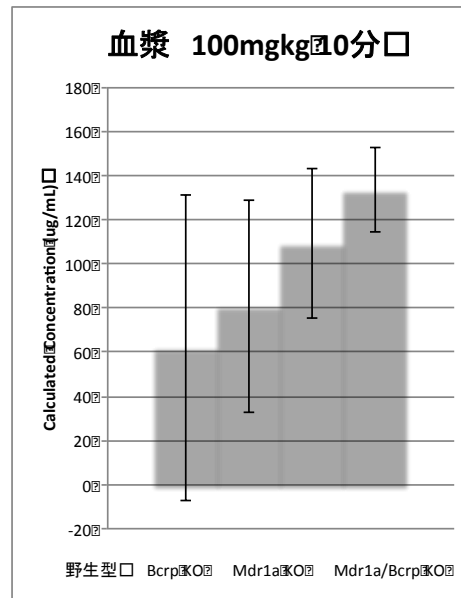
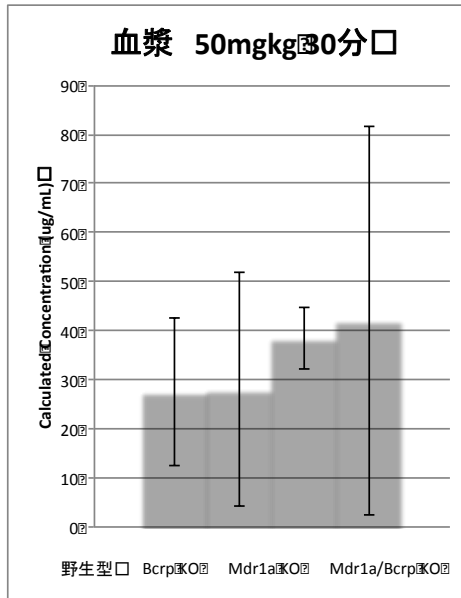
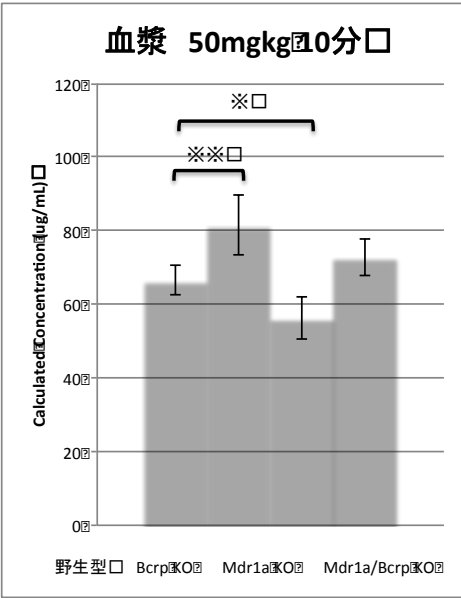
✓ New methodでの Rat Brainにおけるraltegravir測定結果 (100mg/kg 10min Mdr1a /Bcrp KO)



組織含有薬剤定量として、抽出溶媒 (MeoH or ACN) およびホモジナイズ用ビーズの有無を検討中

ラット血漿及び髄液中Raltegravir濃度

※ P<0.05以下
 ※※ P<0.01以下



ラルテグラビルの脳内移行にBcrp(ABCG2)と比較し、Mdr1a(ABCB1)の影響が大きい傾向が認められる

平成27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、髄液中濃度に影響を与える薬物トランスポータのノックアウトラットを使用して髄液中濃度と薬物トランスポータの関連を解析した。

方法

動物は8週齢雄 Sprague-Dawley 野生型ラットおよび8週齢雄 Sprague-Dawley ABCG2 (BCRP) ノックアウトラットを用いた。

RAL (dimethyl sulfoxide 溶液 / polyethylene glycol 400 / water で 20:60:20 に調製) 50mg/kg (n=10) と 100mg/kg (n=10) を 5ml/kg で尾静脈へ投与した。

投与10分後 (n=5)、30分後 (n=5) 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し、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。

髄液中および血漿中RAL濃度はLC-MS/MS (Nexera X2 (Shimadzu) および QTRAP5500 (AB SCIEX)) にて測定した。

ラルテグラビル測定結果

WT (50mg/kg)		Mean ± SD
Time (min)	Plasma (µg/ml)	CSF (ng/ml)
10	66.6 ± 4.0	888.6 ± 203.6
30	27.5 ± 15.1	244.8 ± 205.6
Time (min)	CSF/Plasma ratio (%)	
10	1.33 ± 0.26	
30	0.79 ± 0.31	

ABCG2 KO (50mg/kg)

Time (min)	Plasma (µg/ml)	CSF (ng/ml)
10	81.4 ± 8.1	1733.0 ± 339.1
30	45.4 ± 2.6	232.8 ± 71.4
Time (min)	CSF/Plasma ratio (%)	
10	2.11 ± 0.26	
30	0.57 ± 0.14	

WT (100mg/kg)

Time (min)	Plasma (µg/ml)	CSF (ng/ml)
10	62.0 ± 69.2	1168.0 ± 1589
30	76.2 ± 36.9	742.0 ± 523.8
Time (min)	CSF/Plasma ratio (%)	
10	1.22 ± 0.98	
30	0.87 ± 0.32	

ABCG2 KO (100mg/kg)

Time (min)	Plasma (µg/ml)	CSF (ng/ml)
10	80.9 ± 55.3	1301.0 ± 879.8
30	78.6 ± 18.0	720.6 ± 246.6
Time (min)	CSF/Plasma ratio (%)	
10	1.55 ± 0.13	
30	0.91 ± 0.21	

結果

野生型ラットおよびABCG2ノックアウトラットの髄液中RAL濃度は50mg/kg、100mg/kg共にほぼ同程度であった。また、血漿中RAL濃度も同様であった。血漿から髄液への移行率は平均0.57~2.11%とそれほど高くなかった。

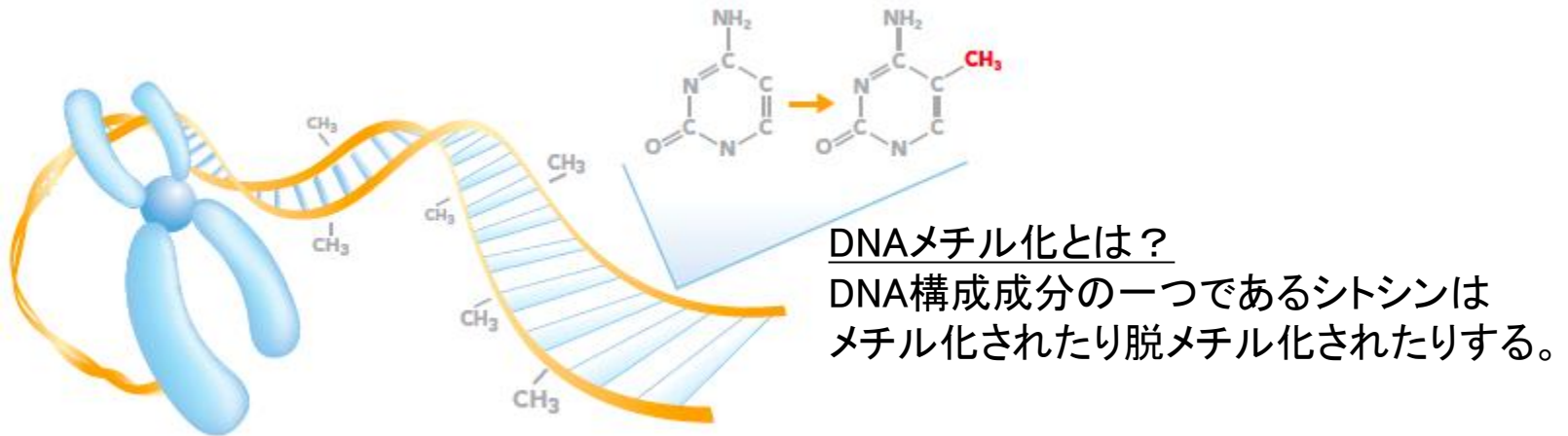
まとめ

ヒトではABCG2の発現量が低下する421C>A(rs2231142)の変異を有する患者において、髄液中RAL濃度の低値が明らかとなっているが(Tsuchiya K et al. J Acquir Immune Defic Syndr. 2014 66:484-6)、今回のラットの検討では再現できなかった。実際の服薬量よりも極めて多い投薬量、また、ヒトとラットの脳構造の違いなども考えられることから、今後も検討を進めて行く。

HIV感染者では末梢血細胞に変化がある？

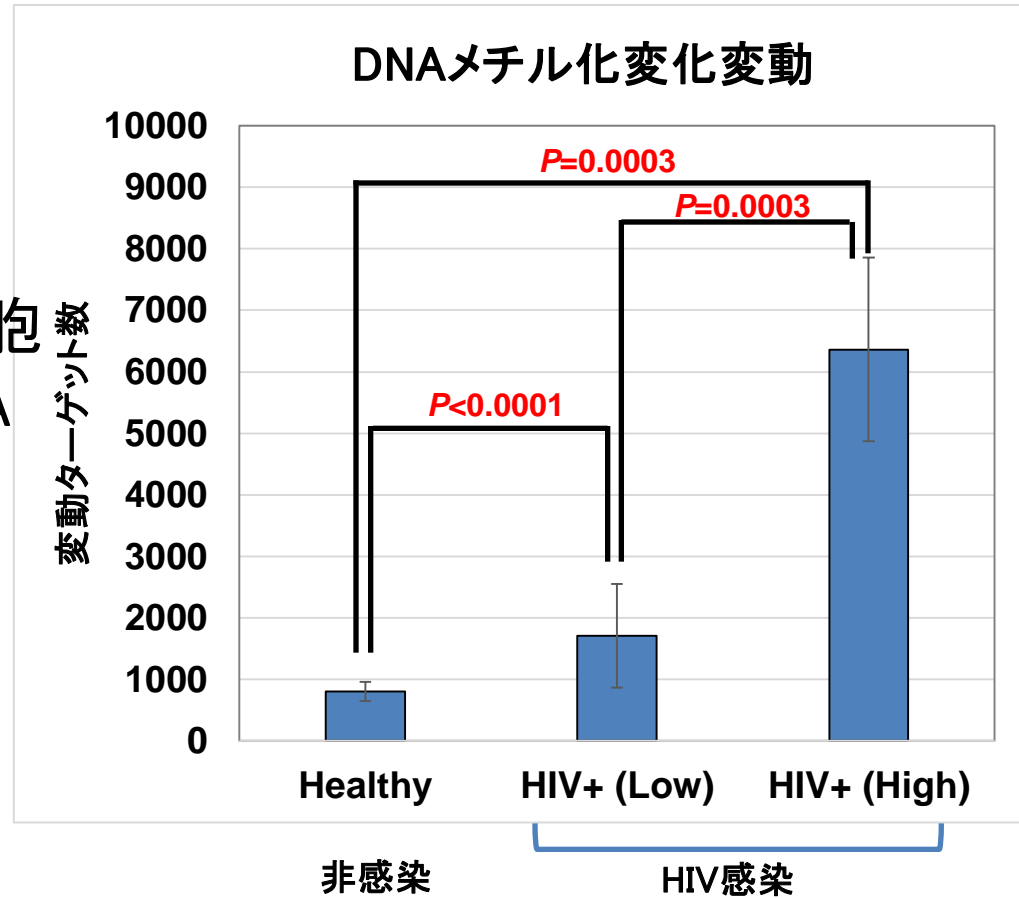
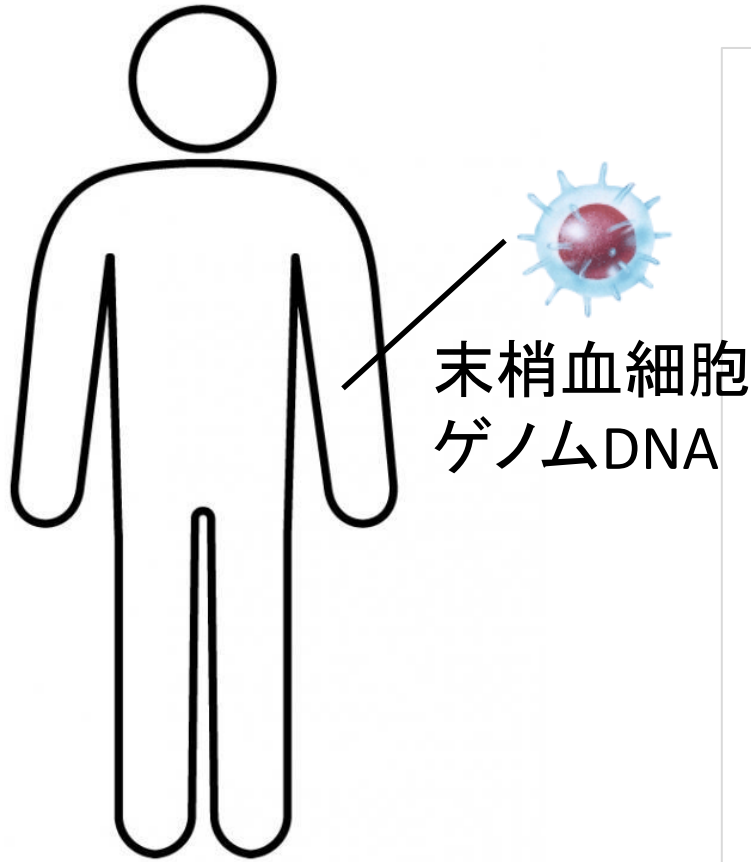
方法

末梢血細胞より抽出したDNAのマイクロアレイ法によるゲノムワイドDNAメチル化解析



解析：HIV感染者24例、非感染者12例

HIV感染者ではDNAメチル化変動が見られる



HIV感染者にDNAメチル化変動の小さい集団と大きい集団が存在する

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

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受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。またそのデータに基づき、HIV感染と特に虚血性心疾患との関連を、画像ツールと炎症マーカーの測定などから前向きに研究する。

■現時点での研究中間報告と問題点、並びに今後の方針

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きた。

現時点で行われた600例程度のデータベースからは、HIV罹患者の平均年齢が比較的若いことや、発症からの期間がまだまだ短いことなどから、冠疾患イベントの発生そのものが少なく、イベントを起こした方は生活習慣病など一般的なリスクを持っている方が多かった。そのため今後行っていく前向き研究においては、一般的な冠疾患リスクのチェックに加え、HIV感染そのものと関連があるとされる炎症マーカー(IL-6や高感度CRPなど)と、冠動脈CTなどによる石灰化の評価や心臓超音波検査などが必要だと思われる。また冠動脈CTについては、同リスクの非HIV感染者の結果との比較を検討している。それらにより、早期診断に有用なマーカーを検討していく。

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。

研究発表及び特許取得報告について

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

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
ラットにおけるラルテグラビル髄液中濃度と脳内局在についての検討	土屋亮人、濱田哲暢、岡慎一、潟永博之	第17回白馬シンポジウム in 米子	米子	2015年6月
Localization of Raltegravir in Rat Brain Using Imaging Mass Spectrometry.	Tsuchiya K, Hamada A, Oka S, Gatanaga H	The 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy	San Diego, California	2015年9月
ラットにおけるラルテグラビル髄液中濃度と脳内局在についての検討	土屋亮人、濱田哲暢、菊池嘉、岡慎一、潟永博之	第29回日本エイズ学会学術集会・総会	東京	2015年11月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。