

2. 善本英一郎, 古西 満, 宇野健司, 中川智代, 米川真輔, 笠原 敬, 前田光一, 三笠桂一: Tenofovir 過量内服を含む HAART 開始後短期間に急性腎不全をきたした HIV 感染者の 1 例. 感染症誌, 2008. 82: 650-653.

山崎善隆

1. Tadashi Okabe, Yoshitaka Yamazaki, Miho Shiotani, Takefumi Suzuki, Mayumi Shiohara, Eriko Kasuga, Shigeyuki Notake, Hideji Yanagisawa. An amino acid substitution in PBP-3 in *Haemophilus influenzae* associate with the invasion to bronchial epithelial cells. *Microbiol Res* 2008, in press
2. 山崎善隆. 上皮細胞内に侵入する *Haemophilus influenzae* とクラリスロマイシンの細胞内殺菌効果. 感染と抗菌薬 11, 327-333, 2008

永井英明

1. 金子有吾, 長山直弘, 川辺芳子, 島田昌裕, 鈴木純一, 久能木真喜子, 松井芳憲, 川島正裕, 鈴木純子, 有賀晴之, 大島信治, 益田公彦, 松井弘稔, 永井英明, 田村厚久, 赤川志のぶ, 豊田恵美子, 町田和子, 倉島篤行, 四元秀毅 慢性肝炎合併結核患者の結核化学療法による肝障害の検討 結核 2008. 83(1):13-19.
2. 永井英明 呼吸器疾患の治療 肺結核と結核性胸膜炎(解説/特集) 日本医師会雑誌 2008. 137:S198-S201.
3. 永井英明 【結核】結核の病態 HIV感染と結核 臨床検査 2008. 52(10): 1115-1118.
4. 永井英明, 池田和子, 織田幸子, 城崎真弓, 菅原美花, 山田由美子, 今井敦子, 遠藤卓, 大野稔子, 河部康子, 小西加保留, 山田三枝子. 緩和ケア病棟における後天性免疫不全症候群患者の受け入れについての検討 医療 2008. 62(8):436-439.
5. 永井英明 結核の治療法と院内感染対策 化学療法の領域 2008. 24(増):58-65.

堀場昌英

1. Gatanaga H, Hayashida T, Tsuchiya K, Yoshino M, Kuwahara T, Tsukada H, Fujimoto K, Sato I, Ueda M, Horiba M, Hamaguchi M, Yamamoto M, Takata N, Kimura A, Koike T, Gejyo F, Matsushita S, Shirasaka T, Kimura S, Oka S. Successful efavirenz dose reduction in HIV type 1-infected individuals with cytochrome P450 2B6 *6 and *26. *Clin Infect Dis* 2007, 45:1230-1237

研究課題：NeuroAIDSの発症病態と治療法の開発を目指した長期フォローアップ体制の構築

課題番号：H18-エイズ一般-009

主任研究者：中川 正法（京都府立医科大学大学院 教授）

分担研究者：出雲周二（鹿児島大学大学院医学総合研究科 教授）、岸田修二（都立駒込病院 内科部長）、白坂琢磨（独立行政法人大阪医療センター診療部長）、古川良尚（鹿児島大学病院 講師）、向井榮一郎（独立行政法人名古屋医療センター 第一神経内科部長）

1. 研究目的

HAART 導入により HIV 感染症は慢性感染症となったが、このことはエイズ脳症を含む HIV 感染による神経合併症（以下、NeuroAIDS）の相対的頻度の増加と臨床病態の変化を予測させるものである。本研究は HIV 感染者が集中している施設に限定して、神経内科医、感染症科医、臨床心理士、コーディネーター、神経病理医などとの学際的な協力のもと NeuroAIDS 早期発見の観点から HIV 感染者を長期フォローアップする体制の構築と NeuroAIDS の病態を臨床的、病理学的に解明することである。

2. 研究方法

都立駒込病院、大阪医療センター、名古屋医療センター、鹿児島大学病院、京都府立医大附属病院の感染症・免疫内科医、神経内科医、臨床心理士などと協力して、HIV 感染者の同意の下、初診から出来るだけ早い時期より神経内科的フォローアップを行うための体制づくりをすすめる。HIV 感染者を神経内科的に長期間フォローアップするために作成した高次脳機能検査や MRI 検査等を含むプロトコルの有用性を検討する。各地域の大学病院とも協力して、神経内科医や臨床心理士が不足している施設への協力体制を構築する。また、AIDS 関連死亡例およびサルエイズモデルの分子病理学的検討を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は患者および無症候性 HIV キャリアーを対象とし、疾患個人情報や血液・組織試料を用いて行うものである。従って、各研究機関の研究倫理委員会等での承認を得て、対象者に本研究について十分な説明を行い研究への理解を求め、文書による承諾を得ておこなう。

3. 研究結果

最終年度である今年度は、本研究班で作成したプロトコル（神経内科学的診察所見、末梢神経伝導検査、高次脳機能検査、MRI 検査、脳血流検査、血液検査、髄液検査、脳波検査など）に基づいて HIV 感染者の神経内科的フォローアップを継続した。現在、計 20 名弱のフォローアップ症例を登録し経年変化を観察中である。

研究協力者の近藤らは、HIV 感染者 6 例の高次脳機能バッテリー、画像検査の結果を解析した。正常対照群の平均より 2SD の変動がみられたのは、RCMT で 4 例、ROCFT の 3 分後再生で 4 例、数唱順唱で 3 例、逆唱で 4 例、符号問題で 3 例、WFT のカテゴリーで 2 例、語頭音で 1 例であった。IHDS で異常を認めなかった 3 例はそれぞれ異なる項目（RCMT、ROCFT、数唱、符号問題、MMSE）で変化が認められた。MRI 検査では明らかな脳萎縮はみられず、1 例のみ軽度の白質病変を認めた。脳血流 SPECT は 5 例で後頭葉、頭頂葉の軽度低下、1 例でびまん性の低下を認めた。以上より、研究班で作成した高次脳機能検査バッテリーの有用性が示唆されたが、脳血流異常との関連は今回の結果では明らかでなかった。古川班員は、HIV 感染者 5 例の神経学的所見及び画像所見の経時的変化を検討した。脳波検査では 1 例に過呼吸負荷終了後に徐波の出現を認めた。頭部 MRI/CT では異常所見を認めなかった。神経心理学的所見では、IHDS は平成 19、20 年度とも満点で、認知機能低下を検出するには感度が優れていないと思われた。脳血流 SPECT を 5 例に施行し、全例に側頭葉・前頭葉の相対的な血流低下を認めた。平成 19 年度に左前頭葉、頭頂部の局所的な血流低下の著しかった症例は、平成 20 年度には前頭葉、側頭葉、基底核血流の広範な低下がみられた。この症例は CD4 が 106 個/ μ l から 375 個/ μ l へ回復し、平成 19 年度に得点の低かった課題が 1 年後にやや改善傾向をみた。以上より、HIV 感染者では脳血流シンチ上相対的な側頭葉、前頭葉の血流低下がみられること、HAART 開始後に不十分なが、認知機能の改善がみられた症例があることが示された。白坂班員は PML10 症例の検討を行い、HIV 感染者の頭部 MRI、脳血流シンチ、髄液中ウイルス検査（HIV、JCV、HSV、CMV など）を積極的に行うことの重要性を指摘した。仙台医療センターからは、クリプトコッカス髄膜炎で発症し免疫改善後に再燃した症例でイトリコナゾール経口投与併用により外来治療が可能となった例が報告された。向井班員は、HIV 感染症に合併した脳原発リンパ腫（PCNSL）と進行性多巣性白質脳症（PML）の臨床的、神経病理学的特徴を検討し、PCNSL は HAART と放射線照射の併用が有効であること、PML は HAART により免疫不全が

らの回復を果たした症例では長期生存可能であることなどを報告した。岸田班員は、HAART 治療中に発症した HIV 関連認知運動障害について検討し、HAART 中でも脳症が発症すること、そのメカニズムに HAART 開始が主要な役割を演じている可能性があること、HAART で延命したとしても不完全な中枢神経系でのウイルス抑制は脳症を発症する危険性があり、末梢でのウイルスモニター、HAART 治療中患者の認知機能の観察、薬剤選択などを充分考慮する必要があることを指摘した。HIV 脳症は軽症であっても社会生活や服薬コンプライアンスに支障を来すものであり、早期発見治療は重要であることが強調された。

AIDS 関連死亡例の検討では、白阪班員、向井班員、新宅研究協力者より、骨髄移植後に発病した HIV6 脳脊髄炎剖検例、AIDS 関連びまん性 B 大細胞型リンパ腫例、HIV 感染症に合併した進行性多巣性白質脳症例の報告があり神経病理学的検討を行った。出雲班員らは、サルエイズモデルの神経病理学的検討を行い、炎症性サイトカイン TNF- α と IL-1 β のエイズ脳症への関与、アクアポリン 4 (AQP4) の発現低下のパターンが EAAT-2 の染色低下ときわめてよく一致しており、AQP4 もエイズ脳症の発症病態に関与している可能性を指摘した。

2008 年 11 月に行われた第 22 回日本エイズ学会で NeuroAIDS に関するシンポジウムを行った。

4. 考察

研究班で作成した長期フォローアッププロトコルに基づいて、経年的な HIV 感染者のフォローアップを行った。本研究の中で、神経所見のない HIV 感染者でも比較的初期より脳血流低下が見られることが明らかとなった。その高次脳機能を評価する上では、国際的に使用されている IHDS では検出感度が不十分であり、われわれが作成した高次脳機能評価バッテリーの有用性が示唆された。

HAART で延命したとしても脳症を発症する危険性があり、HAART 治療中患者の末梢でのウイルスモニター、認知機能評価、薬剤選択などを充分考慮する必要がある、今後の主要な課題であると考ええる。

長期フォローアップを行う上で検査費用負担の問題がエントリーの障害となった。3割負担の場合、頭部 MRI、RI 脳血流検査などの自己負担額は約 4 万円となる。HAART を開始していない初期の HIV 感染者の神経内科的フォローアップを行う上での大きな障害となった。

AIDS 関連死亡例の全国調査については関連施設の協力体制がつくれ、今後も具体的な共同研究を行っていく必要性が示された。また、サルエイズモデルとの神経病理学的比較研究を進めることは、ヒト NeuroAIDS の病態解明に

重要な知見を与えたと考える。

5. 自己評価

1) 達成度について

本年度は最終年度であったが、HIV 患者長期フォローアップ数は残念ながら目標に達しなかった。しかし、研究班で作成した高次脳機能検査プロトコルの有用性が示された。研究者間の協力体制は研究班員以外の施設にも広がり、サルエイズモデルとの比較検討も含めて AIDS 関連死の神経病理学的検討に一定の成果を得た。この 3 年間の達成度は当初の計画の 60% 程度と考える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究組織は、神経内科医、感染症科医、神経病理医、臨床心理士などとの学際的な協力のもと、HIV 感染者を初期より長期間フォローアップする体制の構築を目指すものであり、NeuroAIDS に関する全国的な長期フォローアップ体制を構築する上で社会的意義は大きいと考える。

3) 今後の展望について

HIV 感染者のフォローアップ体制の構築：

研究班が作成した高次脳機能評価法の有用性が示された。さらに長期的な HIV 感染者の神経内科的フォローアップが必要である。HIV 感染者の長期フォローアップを通じて、NeuroAIDS の臨床的特徴を明らかにし、各神経合併症の早期診断、治療評価に役立つ臨床的、血液学的、分子学的、神経画像的指標の確立を目指す必要がある。

病理解剖例での神経病理学的解析：

3年間の研究で NeuroAIDS 関連死亡例についての蓄積を行った。今後、各症例についての分子病理学的検討を行い、その病態解明を進める必要がある。更に、サルエイズモデルとの比較研究も含めた総合的検討を行い、HAART 下の HIV 感染症における NeuroAIDS の神経病理学的動向を明らかにする継続的な研究が必要である。

6. 結論

最終年度である今年度は、HIV 感染者の長期フォローアップの経年変化に関する若干の知見とサルエイズモデルに関する知見を得た。その結果、HAART 開始前後の高次脳機能の評価が重要であり、NeuroAIDS 早期発見により社会的損失をある程度防ぐことが可能であること、AQP4 がアストロサイト機能の指標となる可能性が示唆された。NeuroAIDS に関する継続的な研究が必要である。

7. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし。

研究発表

主任研究者

中川正法

原著論文による発表

欧文

- 1) Ohshima, Y., Kubo, T., Koyama R., Nakagawa, M., and Yamashita, T. Regulation of axonal elongation and pathfinding from the entorhinal cortex to the dentate gyrus in the hippocampus by the chemokine stromal cell-derived factor 1alpha. *J. Neurosci.* 28:8344-8353, 2008.
- 2) Matsuo K, Mizuno T, Nakagawa M, et al. Cerebral white matter damage in frontotemporal dementia assessed by diffusion tensor tractography. *Neuroradiology* 50:605-611, 2008.
- 3) Kuriyama N, Tokuda T, Miyamoto J, Takayasu N, Kondo M, Nakagawa M. Retrograde jugular flow associated with idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Ann. Neurol.* 64:217-221, 2008.

和文

- 1) 中川正法. HIV感染と神経合併症. *日本内科学会雑誌*. 97:1690-1696, 2008.

口頭発表

国内

- 1) 中川正法. NeuroAIDS: オーバービュー. *日本エイズ学会*, 2008年, 大阪.
- 2) 中川正法. AIDSに伴う脳炎・脳症 - HAART導入に伴う変化 -. *日本神経学会東海北陸地区生涯教育講演会*, 2008年, 名古屋.

分担研究者

岸田修二

原著論文による発表

欧文

- 1) Kishida, S. and Ajisawa, A. Probable cerebral mycobacterium avium complex-related immune reconstitution inflammatory syndrome in an HIV- infected patient. *Inter. Med.* 47: 1349-1354, 2008.

和文

- 1) 岸田修二. HAART療法導入後のHIV関連PML 6 自験例の臨床的検討. *神経内科*. 36:568-576, 2008.

口頭発表

国内

- 1) 岸田修二. HAART導入後の神経系AIDSとその関連疾患 - 真菌性髄膜炎を含めて -. *日本神経感染症学会*, 2008年, 東京.
- 2) 岸田修二. 神経免疫再構築症候群とエイズ脳症. *日本エイズ学会*, 2008年, 大阪.

出雲周二

原著論文による発表

欧文

- 1) Xing HQ, Hayakawa H, Gelpi E, Kubota R, Budka H, Izumo S. Reduced expression of excitatory amino acid transporter 2 and diffuse microglial activation in the cerebral cortex in acquired immunodeficiency syndrome cases with or without human immunodeficiency virus encephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* in press.
- 2) Xing HQ, Hayakawa H, Izumo K, Gelpi E, Kubota R, Budka H, Izumo S. In vivo expression of proinflammatory cytokines in HIV encephalitis: an analysis of 11 autopsy cases. *Neuropathology*. in press.
- 3) Xing HQ, Mori K, Sugimoto C, Ono F, Izumo K, Kuboda R, Izumo S. Impaired astrocytes and diffuse activation of microglia in the cerebral cortex in simian immunodeficiency virus-infected Macaques without simian immunodeficiency virus encephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67:600-611, 2008.
- 4) Xing HQ, Moritoyo T, Mori K, Sugimoto C, Ono F, Izumo S. Expression of proinflammatory cytokines and its relationship with virus infection in the brain of macaques inoculated with macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *Neuropathology*. 2008 May 27. [Epub ahead of print]

口頭発表

- 1) 那 惠琴, 森 一泰, 杉本智恵, 森豊隆志, 久保田龍二, 出雲周二. 炎症性サイトカインTNF- α とIL-1 β のエイズ脳症への関与; サルエイズモデルでの検討. 第49回日本神経病理学会, 2008年5月, 東京.
- 2) 那 惠琴, 早川 仁, 森 一泰, Herbert Budka, 出雲周二. NeuroAIDSとサイトカイン, ヒト剖検例とサルエイズモデルをもちいた免疫組織学的検討. *日本エイズ学会*, 2008年, 大阪.

白阪琢磨

原著論文による発表

欧文

- 1) HIDAKA Y, OPERARIO D, TAKENAKA M, OMORI S, ICHIKAWA S, SHIRASAKA T. Attempted suicide and

associated risk factors among youth in urban Japan, Soc Psychiatr Psychiatr Epidemiol 2008

- 2) KAWASHIMA Y, SATOH M, OKA S, SHIRASAKA T, TAKIGUCHI M. Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among three subtypes of HLA-A 26 associated with slow progression to AIDS, BBRC 366:612-616, 2008
- 3) KUWAHARA T, MAKIE T, YAMAMOTO Y, YOSHINO M, YAGURA H, SANO T, KOJIMA K, HIGASA S, SHIRASAKA T. Burden on AIDS-specialist Hospitals in Japan, Based on the Number of Patients Taking Anti-HIV Drugs, Pharmaceutical Regulatory Science 39(7):421-426, 2008
- 4) SASAKAWA A, YAMAMOTO Y, YAZIMA K, SAKAI M, UEHIRA T, SIRASAKA T, MAKIE T, Liposomal amphotericin B for a case of intractable cryptococcal meningoencephalitis and immune reconstitution syndrome, The Journal of Medical Investigation 55(3,4):292-296, 2008
- 5) KAWASHIMA Y, SATOH M, OKA S, SHIRASAKA T, TAKIGUCHI M. : Different immunodominance of HIV-1-specific CTL epitopes among three subtypes of HLA-A 26 associated with slow progression to AIDS, BBRC366:612-616, 2008

和文

- 1) 白阪琢磨：HIV 感染症治療の最前線と課題、日本医事新報、4401：56-62、2008
- 2) 白阪琢磨：HIV 感染症治療におけるチーム医療、治療学 42(5)：51-55、2008

口頭発表

国内

- 1) 白阪琢磨：HIV 感染症診断のガイドライン 第一部 臨床家のための HIV-1,2 感染症の診断について。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 2) 渡邊大、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、谷口智宏、富成伸次郎、大谷成人、上平朝子、白阪琢磨：ParvovirusB19 による輸血依存性貧血をきたし、抗 HIV 療法にて軽快した AIDS の一例。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 3) 下司有加、安尾利彦、仲倉高広、上平朝子、白阪琢磨：初診患者における HIV 専門看護師と臨床心理士の連携状況の報告。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 4) 上平朝子、大谷成人、富成伸次郎、坂東裕基、谷口智宏、矢嶋敬史郎、小川吉彦、矢倉裕輝、吉野宗宏、渡邊大、白阪琢磨：新規抗 HIV 薬 (Darunavir,Raltegravir,Etravirine) の使用経験。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 5) 赤羽学、井出博生、今村知明、白阪琢磨：HIV 診療に係る原価の計算方法に関する研究。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 6) 安尾利彦、早林綾子、大谷ありさ、森田眞子、藤本恵里、仲倉高広、下司有加、廣常秀人白阪琢磨：大阪医療センターにおける HIV 感染症患者の精神状態および保健行動に関する分析：第一報。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 7) 早林綾子、安尾利彦、仲倉高広、大谷ありさ、森田眞子、藤本恵里、下司有加、白阪琢磨、廣常秀人：大阪医療センターにおける HIV 感染症患者の精神状態および保健行動に関する分析：第二報。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 8) 富成伸次郎、矢嶋敬史郎、谷口智宏、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨：HIV 感染症患者の入院治療の臨床的検討。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 9) 白阪琢磨、下司有加、織田幸子、古金秀樹、上平朝子：献血を機に当院を受診し HIV 感染症と診断された症例の検討。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 10) 谷口智宏、小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨：肺の空洞性病変と複数の日和見感染症を合併した AIDS の一症例。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 11) 小川吉彦、坂東裕基、矢嶋敬史郎、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨：HIV 患者で播種性ペニシリン症を発症した一例。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 12) 矢嶋敬史郎、渡邊大、小川吉彦、坂東裕基、谷口智宏、大谷成人、富成伸次郎、上平朝子、白阪琢磨：HHV-8 による多彩な病変を呈した AIDS の 1 例。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 13) 吉野宗宏、矢倉裕輝、柴原健、坂東裕基、小川吉彦、矢嶋敬史郎、谷口智宏、笹川淳、大谷成人、富成伸次郎、渡邊大、上平朝子、白阪琢磨：Tenofovir 長期投与における腎機能の評価 (第 2 報)。第 22 回日本エイズ学会学術集会、2008 年、大阪。
- 14) 上平朝子、矢嶋敬史郎、谷口智宏、富成伸次郎、渡邊大、山本善彦、白阪琢磨：当院における HIV 患者の CMV 感染症の現状。第 82 回日本感染症学会総会、2008 年、島根。

向井栄一郎

原著論文による発表

和文

- 1) 橋本里奈、向井栄一郎、横幕能行、間宮均人、濱口元洋、HIV 脳症 5 例の臨床的特長と経過。臨床神経。48: 173-178, 2008.

口頭発表

- 1) 橋本里奈、HAART と神経日和見感染症。日本エイズ学会、2008 年、大阪。

研究課題:免疫不全に伴う脳内潜伏トキソプラズマ原虫再活性化の事前予想と再活性化原発局所における宿主遺伝子発現レベルの網羅的解析

課題番号: H18-エイズ-若手-0001

主任研究者: 高島 康弘 (岐阜大学応用生物科学部准教授)

分担研究者: 鈴木 和彦 (日本大学生物資源科学部助手)

1. 研究目的

現在 AIDS 患者においては、末梢血 CD4 陽性細胞数が一定以下になった場合に日和見感染症のリスクが高いと判断されて予防的投薬が開始されている。しかし CD4 陽性 T 細胞数は個々の日和見感染症病原体の活動レベルとは直接関係のない値である。したがって CD4 陽性 T 細胞数を指標とすると日和見感染症発症リスクを見逃したり、それほど危険がない時期にも投薬を行ってしまったりする可能性が高い。日和見感染発症にいたる直接的な宿主側要因を同定しこれをモニターできるようにになれば、ピンポイントに再活性化時期を予測することが可能となり、真にハイリスクな時期のみの短期間投薬が可能となる。AIDS にともなう日和見感染症には、潜伏感染からの再活性化によって発症にいたるものが少なくない。そこで本研究ではこのような発症メカニズムをとる病原体のひとつであるトキソプラズマ脳炎をモデルとして「再活性化原発部位での遺伝子発現変化の網羅的解析」をおこない、本原虫の脳内再活性化の直接的な宿主側要因候補を見出すことで「潜伏した日和見感染症の再活性化時期の予想」「再活性化の阻止」という新しい対処法へ向けて有用な知見を提供することを当初の目的とした。本研究では H18 年度において新技術を確立し、本原虫の再活性化原発部位の同定をはじめ可能とした。この系を用いた実験により H19 年度には本原虫の潜伏様式について新たな考え方を提唱した。すなわち、spontaneous な活性化によってシストから脱出した虫体を宿主免疫系が速やかに排除することによる潜伏の維持という従来の考え方によって、潜伏中の虫体に対する免疫反応が潜伏型虫体のステージ変換そのものを阻んでいるという解釈である。言い換えれば、潜伏中の原虫に対する免疫反応が宿主細胞の内部環境を「原虫の潜伏を維持できる状態」にしているということである。

これを踏まえ、H20 年には本原虫の潜伏を許す宿主細胞内中の環境を同定することを目的とする。

2. 研究方法

モデル抗原(アルブミン)をステージ特異的に発現する原虫の作成: トキソプラズマ原虫タキゾイト期(活性化期)に特異的に活性を有する SAG1 プロモーター支配下、プラ

ディゾイト期(潜伏期)に特異的に活性を有する BAG1 プロモーター支配下に卵白アルブミン遺伝子をつないだ発現ユニットを構築しそれぞれを PLK 株に組み込んだ。この際、卵白アルブミン遺伝子のシグナル領域に改変を加えて発現された分子が虫体表面にとどまるようにする。えられた組み換え原虫をそれぞれ PLK/S-OVA、PLK/B-OVA とする。これらをマウスに感染させ、OVA に対する免疫を誘導するか否か確認する。この作業により「潜伏中の虫体表面の抗原は免疫系に認識されない」という従来の概念の正否を問う。

PLK/DUAL 株の解析: H19 年度に作成した PLK/DUAL 株(潜伏期に緑色、活性期に赤色蛍光を発する)を免疫染色し、蛍光色とステージ特異的分子(SAG1 および BAG1)の発現様式が一致していることを確認する。

宿主細胞 P38 α MAPK の関与: P38 α MAPK 欠損マウス胎児から樹立した繊維芽細胞(KOP)とそのリバートント(RKOP)に PLK/DUAL 株を感染させ、細胞外からの潜伏誘導刺激がない状態で培養する。原虫の発する蛍光色を経時的に観察することで宿主細胞 P38 α MAPK 情報伝達系の欠如が原虫のステージ転換に影響を及ぼすか否か調べる。

原虫の潜伏を許す宿主細胞内微小環境をつくりだす遺伝子の網羅的解析: Gene Trap Mutagenesis 法によって CHO 細胞の遺伝子をランダムに破壊したライブラリを作成し、そこに PLK/DUAL 株を感染。外部からの潜伏誘導刺激がないままでも原虫が潜伏してしまう細胞クローンが存在するか否か確認。存在した場合は当該クローンにおいて破壊されている遺伝子を同定する。

(倫理面への配慮)

岐阜大学または日本大学の動物実験委員会の指針に従い承認のもとですべての動物実験を実施。

3. 研究結果

モデル抗原(アルブミン)をステージ特異的に発現する原虫の作成: 5 クロンの PLK/S-OVA および 7 クロンの PLK/B-OVA を得た。H20 年 12 月現在、感染実験を実施中である。

PLK/DUAL 株の解析

抗 BAG-1 抗体を作成した。PLK/DUAL 株を市販の抗 SAG1 抗

体および抗 BAG1 抗体で染色した。緑色蛍光を強く発する虫体ほど抗 BAG1 抗体に強く反応しており、蛍光色の変化とステージ特異的分子の発現が厳密に一致していることを確認した。

宿主細胞 P38 α MAPK の関与: PLK/DUAL 株を P38 α MAPK 欠損株である KOP 細胞に感染させたところ、外部からの潜伏誘導刺激をくわえなくても、感染後 2-3 日で緑色蛍光を発し始めた。このような現象は P38 α MAPK 遺伝子を導入したリパータント (RKOP) では見られなかった。

原虫の潜伏を許す宿主細胞内微小環境をつくりだす遺伝子の網羅的解析: ライブラリに PLK/DUAL を感染させたところ、外部からの潜伏誘導刺激なしで緑色蛍光を発する虫体がみられた。H20 年 12 月現在、このような虫体を内包する宿主細胞においてどのような遺伝子が破壊されているのか調査中である。

4. 考察

当初計画では潜伏維持中にみられる spontaneous な再活性化像 (発症に至らない) の周辺と免疫抑制群に見られる再活性化原虫部位 (発症にいたると思われる) 周辺の比較を予定していたが、潜伏維持中のマウスからは再活性化像が得られなかった。一方で、免疫抑制群からは再活性化像が得られた。この結果から「spontaneous な活性化」という概念に疑義が生じ、「spontaneous な活性化によってシストから脱出した虫体を宿主免疫系が速やかに排除することによる潜伏の維持」という従来の考え方で潜伏現象を説明するのは無理があると考えられた。すなわち、潜伏中の虫体に対する免疫反応が潜伏型虫体のステージ変換そのものを阻んでいるため、免疫正常群では再活性化した赤色原虫が見られないと考えるほうが実験結果を解釈しやすいということである。本研究計画にある発現解析においては (従来計画にあった spontaneous な再活性化後の虫体に対する免疫反応だけでなく) 潜伏型原虫に対する微弱な免疫反応をも考慮に入れて実施すべきであると考えられた。

5. 自己評価

1) 達成度について

宿主細胞の P38 α MAPK が不活化した宿主細胞内で本原虫が潜伏するという事を明らかにしたことは意義深い。また P38 α MAPK 情報伝達経路のさらに下流に位置する分子群のなかで、どの分子が原虫の運命を直接的につかさどっているのかを知る手がかりとして変異細胞ライブラリを得たことは今後の研究展開に大きく益する。このように

In Vitro の系で大きな進展があった。これに対し In Vivo での成果は残念ながら少なかつた。H18 年には In Vivo で研究を展開するための系を世界に先駆けて開発し学術誌の表紙に掲載されるなど一定の評価を得たが、2・3 年目の研究費の大幅な減額によりこの系を十分生かすことが出来なかった。減額の理由は主として「あまりに基礎研究に偏りすぎ」というものであったので今後本事業に応募する場合は厚生行政への貢献をさらに深く考えたい。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

トキソプラズマ原虫の潜伏様式について、「潜伏を許す宿主細胞内の微小環境が存在する」という既存を提唱し、かつその微小環境をつかさどる分子 (のひとつ?) として P38 α MAPK の関与を証明した。この発見は基礎生物学的なものであるが長期的にはトキソプラズマ脳炎の制御にむけて重要な知見になるものであり、国際的・社会的に有意義な情報といえる。2008 年 12 月現在、論文投稿準備中であり本研究事業終了 (H21 年 3 月末日) までに公表が間に合わない公算が大きいが、できるだけ早く学術論文として公開したい。

3) 今後の展望について

3 年計画の本研究課題は本年度で終了する。この間トキソプラズマ原虫の潜伏を理解する新たな知見や、革新的な実験系を構築できた。今後はこの成果を生かしつつ、さらに基礎的・応用的研究を進めていきたい。本研究課題の中間評価では「あまりに基礎研究に偏りすぎ」との評価を複数回頂戴した。今後得られた成果を展開するに当たり、臨床に益するための研究展開のあり方を良く考えた上で進めたい。

6. 結論

本年度の成果として、P38 α MAPK が不活化した状態の細胞内では、細胞外からの特定の刺激がなくともトキソプラズマ原虫は潜伏するということが明らかになった。今後は、P38 α MAPK 情報伝達系の下流に位置する分子群をちゅうしんにかいせきをすすめ、「原虫の潜伏を許す細胞内微小環境」の詳細を解き明かす必要がある。また同様のことが生体内でも起こっているかどうか確認することでトキソプラズマ脳炎の制御に益する知見が得られるものと思われる。

7. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

予定なし。

研究発表

主任研究者

高島康弘

原著論文による発表

欧文

1) Unno A, Suzuki K., Xuan X., Nishikawa Y., Kitoh K., Takashima Y. 2008. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. Parasitol. Int. 57(4): 515-8.

2) Ota H., Takashima Y., Matsumoto Y., Hayashi Y., Matsumoto Y. 2008. Pretreatment of macrophages with the combination of IFN-gamma and IL-12 induces resistance to *Leishmania major* at the early phase of infection. J Vet Med Sci. 70(6): 589-93.

分担研究者

鈴木和彦

欧文

1) Unno A, Suzuki K., Xuan X., Nishikawa Y., Kitoh K., Takashima Y. 2008. Dissemination of extracellular and intracellular *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the blood flow. Parasitol. Int. 57(4): 515-8.

研究課題：HAART時代の長期予後を脅かす治療抵抗性エイズリンパ腫に対する多面的治療戦略開発に関する研究

課題番号：H19-エイズ-003

主任研究者：岡田 誠治（熊本大学エイズ学研究センター 教授）

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 教授）、藤原 成悦（国立成育医療センター研究所母
児感染研究部 部長）、味澤 篤（東京都立駒込病院 部長）、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 副部長）、永井 宏和（国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター・血液腫瘍研究部
部長）、清水 則夫（東京医科歯科大学難治疾患研究所 准教授）、片野 晴隆（国立感染症研究所感染病理部診断病理室
室長）、駒野 淳（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）

1. 研究目的

HAART導入後エイズが慢性疾患化した現在、エイズ関連悪性リンパ腫（以下エイズリンパ腫）はエイズ患者の長期予後を規定する最重要因子のひとつとなった。エイズリンパ腫は難治性・再発性であり、未だ標準的な治療法は確立していない。従って、本邦におけるエイズリンパ腫の標準的な治療法の確立と治療抵抗性エイズリンパ腫に対する有効な新規治療法の開発は、エイズ対策として厚生労働行政上急務である。本研究では、エイズと悪性リンパ腫治療の最前線に立つエイズ治療専門医・血液腫瘍専門医と基礎研究者が有機的に提携し、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の治療プログラムの確立と新規治療薬の開発を軸に多面的治療戦略を展開する。

2. 研究方法

研究は、相互に関連のある3つの大きな柱を軸に展開する。
柱1 日本人悪性リンパ腫治療最適化プログラムと新規サルベージ療法開発に関する研究

エイズリンパ腫は予後不良であり、海外で開発されたエイズリンパ腫治療プロトコルは必ずしも日本人に適したものではない。そこで、日本におけるエイズリンパ腫の発生状況と治療状況を把握し、専門家により日本人に最適化された標準的治療法の「治療の手引き」を策定し、普及を図る。合わせて標準的プロトコルを作成して、多施設共同治験を行う。また、病態解析に基づいた新規分子標的療法とサルベージ療法の考案と研究段階にある治療法の有効性を検討し、日本人エイズリンパ腫に有効な治療最適化プログラムを構築する。

柱2 エイズリンパ腫の分子病態解析

日本人エイズリンパ腫の臨床病理学および分子生物学的解析を通じて、リンパ腫発生の分子メカニズムおよび化学療法耐性細胞出現の分子機構解明を試みる。また、予後因子として様々な遺伝子の関与を解析し、臨床にフィードバックする。マイクロアレイ等による分子病態解析・発

症機序解析に基づいたエイズリンパ腫の新たな分子標的療法と発症予防法の開発を目指す。

柱3 エイズリンパ腫再現マウスモデルの開発と治療法開発への応用

高度免疫不全マウス体内でヒト造血・免疫系を構築する系とリンパ腫細胞が生着する系（ヒト化マウス）を用いて日和見エイズリンパ腫発生を再現する「エイズリンパ腫再現マウスモデル」を樹立し、その分子病態の解析から新たな治療法の開発及び治療法の標準化に資する。また、リンパ腫モデルマウス用いた治療薬の評価法を確立する。

（倫理面への配慮）

ヒト由来試料及び動物を用いた研究では、各施設の委員会の承認を得た上で、規則に従い実施している。ヒト試料を使用した研究では、医師により本研究の趣旨を説明し、同意を得られた方のみ同意書に署名をいただいた上で試料を採取する。試料は匿名処理を行うため個人情報流出することはなく、同意の撤回を可能にするなど人権擁護上の配慮を行っている。エイズ関連悪性リンパ腫の治療に関する多施設共同治験においては、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守してプロトコルを作成し、各共同臨床研究機関の倫理委員会の承認を得た上で、規則に従い実施する。

3. 研究結果

柱1 日本人悪性リンパ腫治療最適化プログラムと新規サルベージ療法開発に関する研究

味澤を中心としたワーキンググループにより「エイズリンパ腫治療の手引き」を作成した。岡田が日本血液学会で「エイズリンパ腫」についての教育講演を行い、日本エイズ学会では「エイズリンパ腫」のシンポジウムにおいて班員が発表を行うなど、研究成果の公開と普及に努めた。両学会で、「治療の手引き」を合計500部配布し、併せて専門家から意見聴取を行った。これらの結果をもとに現在「エイズリンパ腫の治療の手引き」改訂版を作成中である。また、日本人エイズリンパ腫の最適化された治療プログ

ラム作成のために全国規模の臨床試験を行うためのワーキンググループを立ち上げ、現在、エイズリンパ腫で最も多いび慢性大細胞性リンパ腫と治療抵抗性リンパ腫のプロトコルを作成中である。

柱2 エイズリンパ腫の分子病態解析

エイズリンパ腫と EBV 陽性 LCL 細胞株では、NF- κ B が過発現し NF- κ B 阻害剤が有効であることが確認された。また、エイズリンパ腫治療において Rituximab は有効であるが、非エイズリンパ腫において CD20 変異により耐性が生じること、CD5 発現例では治療成績が悪いことなどが報告された。保存検体を用いたマイクロアレイ解析を試みたが、検体の保存状態が悪く解析に適さないことが判明した。そのため、これらの検体を用いた解析方法の工夫と新たな検体収集システムの構築を計画している。

柱3 エイズリンパ腫再現マウスモデルの開発と治療法開発への応用

新たな高度免疫不全マウスを用いてヒトの造血・免疫系を構築したマウス（ヒト化マウス）を樹立した。「ヒト化マウス」に EBV を感染させることにより、潜伏感染とリンパ増殖性疾患のモデルが確立した。また、リンパ腫細胞株を移植したマウスに NF- κ B 阻害剤などを投与するエイズリンパ腫治療モデルを樹立した。

4. 考察

エイズ拠点病院・血液研修指定病院へのアンケート調査により、日本においてもエイズリンパ腫症例は増加していること、各施設が治療に苦慮していることが判明した。治療指針を提示して欲しいとの要望が多かったため、エイズリンパ腫に対する「治療の手引き」を作成した。日本人エイズリンパ腫の症例が少ないため、世界の状況を参考に現時点で最良と思われる治療法を示したが、今後症例を蓄積して、日本人に最適化された治療法を継続的に提示していくことが必要である。また、エイズリンパ腫の日本全国規模の多施設共同研究を開始するための体制を整え、エイズリンパ腫で最も多いび慢性大細胞性リンパ腫と治療抵抗性リンパ腫のプロトコルを作成中である。多施設共同研究により治療上の問題点が抽出され、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の標準的治療法の確立に大きく寄与することが期待できる。また、エイズリンパ腫の病態解析とそれに基づいた新規治療法の開発にはエイズリンパ腫の検体収集が必要であり、多施設共同研究はその母体として機能することも期待される。

エイズリンパ腫発症には EBV の関与が指摘されていることから、EBV によるエイズリンパ腫発症マウスモデルと EBV 陽性 LCL 細胞株を作成し、病態解析とこれらを

標的とした治療薬開発を行っている。近年 EBV が関与しないエイズリンパ腫が増加していることから、EBV 陽性例と陰性例の遺伝子プロファイルの比較を行い、エイズリンパ腫の再分類と病態解明に資することが必要である。また、マウスモデルは、エイズリンパ腫研究と治療法開発において非常に有用なツールとなりうる。今後 3 つの柱を中心に、エイズリンパ腫の多面的治療戦略を展開する。

5. 自己評価

1) 達成度について

日本におけるエイズ関連悪性リンパ腫の発症・治療状況を把握し、「治療のてびき」の策定及び全国レベルの多施設共同研究の体制が整った意義は大きい。新規治療法確立に向けた基礎的研究・共同研究も順調に進んでいる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

エイズリンパ腫の分子病態解析に基づくユニークな治療薬開発とモデルマウスの樹立は、学術的な意義が大きいばかりでなく、長期的展望に立った日本発の治療法の開発として国際的・社会的意義も大きい。

「治療の手引き」の策定及び多施設共同研究の展開は、各地域におけるエイズおよびエイズリンパ腫治療水準の向上に寄与する。また、エイズ臨床医と血液科専門医の相互理解が深まり、新たな病院間連携が生まれることは、広く患者の利益となる。更に、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の標準的治療法は、広くアジア民族の治療にスムーズに応用可能であり、国際的貢献が期待できる。

3) 今後の展望について

「治療の手引き」の策定及び多施設共同研究の展開により、日本人に最適化されたエイズリンパ腫の標準的治療法の確立を目指す。更に、病態解析に基づいた新規治療法の開発とマウスを用いたエイズリンパ腫発症・治療モデルの樹立により、長期的視野に立ったエイズリンパ腫の治療戦略を展開する。

6. 結論

エイズリンパ腫「治療のてびき」を策定し、全国レベルの多施設共同研究の実施体制を整えた。また、エイズリンパ腫発症・治療マウスモデルの作成、分子標的療法としての rituximab の有用性と危険性、NF- κ B 阻害剤の有用性についての知見を得るなどの研究の進展が認められた。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

なし

研究発表 (抜粋)

主任研究者

岡田誠治

- 1) Okada S., Harada H, Ito T, Saito T, and Suzu S.; Development of human hematopoietic and acquired immune system in NOD/Scid/Jak3^{ml} mice engrafted with cord blood-derived human hematopoietic stem cells. *Int J Hematol* 88:476-482, 2008
- 2) Nagai H, Iwasaki N, Odawara T, and Okada S.; Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. *Int J Hematol* 87(5):442-443, 2008
- 3) 岡田誠治, 味澤篤, 永井宏和. エイズ関連悪性リンパ腫の現状と治療戦略. 臨床血液 49:1490-1498, 2008.

分担研究者

渡邊俊樹

- 1) Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake A, Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. Transient inhibition of NF- κ B by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. *Cancer Sci* in press
- 2) Watanabe M, Nakashima M, Togano T, Higashihara M, Watanabe T. Identification of the Rela domain responsible for action of a new NF κ B inhibitor DHMEQ. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 310-314, 2008
- 3) Miyake A, Dewan MZ, Ishida T, Watanabe M, Honda M, Sata T, Yamamoto N, Umezawa K, Watanabe T., Horie R. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- κ B inhibitor DHMEQ. *Microbes Infect* 10:748-756, 2008
- 4) Franchina, M., Woo, AJ., Dods, J., Karimi, M., Ho, D., Watanabe, T., Spagnolo, DV., Abraham, LJ.
The CD30 Gene Promoter Microsatellite binds Transcription Factor Yin Yang 1 (YY1) and shows Genetic Instability in Anaplastic Large Cell Lymphoma. *J Pathol* 214: 65-74, 2008

藤原成悦

- 1) Imadome K, Shimizu N, Yajima M, Watanabe K, Nakamura H, Takeuchi H, and Fujiwara S. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* in press.
- 2) Nakamura, H., Ishii, C., Suehiro, M., Iguchi, A., Kuroda, K., Shimizu, K., Shimizu, N., Imadome, K., Yajima, M., and Fujiwara, S. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Encoded by Epstein-Barr Virus Induces Expression of the Putative Oncogene Bcl-3 Through Activation of the Nuclear Factor- κ B. *Virus Res.* 131: 170-179, 2008.
- 3) Yajima, M., Imadome, K., Nakagawa, A., Watanabe, S., Terashima, K., Nakamura, H., Ito, M., Shimizu, N., Honda, M., Yamamoto, N., and Fujiwara, S. A new humanized mouse model of EBV infection reproducing persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses. *J. Infect. Dis.* 198: 673-682, 2008.

味澤 篤

- 1) 岡田誠治, 味澤篤, 永井宏和. エイズ関連悪性リンパ腫の現状と治療戦略. 臨床血液 49:1490-1498, 2008.

照井康仁

- 1) 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.*, in press.
- 2) 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.* 2008, in press.
- 3) 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 in press.
- 4) 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.
- 5) 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. *Int J Hematol.* 87(4):393-7, 2008.

永井宏和

- 1) Terasawa T, Lau J, Bardet S, Couturier O, Hotta T, Hutchings M, Nihashi T, Nagai H. Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography for Interim Response Assessment of Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Systematic Review. *J Clin Oncol*. In press
- 2) Nagai H, Yano T, Watanabe T, Uike N, Okamura S, Hanada S, Kawano F, Sunami K, Inoue N, Sawamura M, Nishiura T, Hotta T, Horibe H. Remission induction therapy containing rituximab markedly improved the outcome of untreated mature B cell lymphoma. *British J Haematol*. 143: 672-680, 2008
- 3) Nagai H, Iwasaki N, Odawara T, Okada S. Actual status of AIDS-related lymphoma management in Japan. *Int J Hematol*. 87: 442-443, 2008

清水則夫

- 1) Kanno H, Watabe D, Shimizu N, Sawai T. Adhesion of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lines to cultured endothelial cells stimulated with inflammatory cytokines. *Clinical Experimental Immunology* 151(3):519-527, 2008.

片野晴隆

- 1) Dewan MZ, Tomita M, Katano H, Yamamoto N, Ahmed S, Yamamoto M, Sata T, Mori N, Yamamoto N. An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells. *Int J Cancer*. 2009;124:622-9.
- 2) Dabaghmanesh N, Matsubara A, Miyake M, Nakano K, Ishida T, Katano H, Horie R, Umezawa K, Watanabe T. Transient inhibition of NF- κ B by DHMEQ induces cell death of primary effusion lymphoma without HHV-8 reactivation. *Cancer Sci*. 2009; in press.
- 3) Nozawa N, Yamamoto Y, Fukui Y, Katano H, Tsutsui Y, Sato Y, Yamada S, Inami Y, Nakamura K, Yokoi M, Kurane I, Inoue N. Identification of a 1.6 kb genome locus of guinea pig cytomegalovirus required for efficient viral growth in animals but not in cell culture. *Virology*. 2008;379:45-54.
- 4) Liem NT, Nakajima N, Phat LP, Sato Y, Thach HN, Hung PV, San LT, Katano H, Kumasaka T, Oka T, Kawachi S, Matsushita T, Sata T, Kudo K, Suzuki K. H5N1-Infected Cells in Lung with Diffuse Alveolar Damage in Exudative Phase from a Fatal Case in Vietnam. *Jpn J Infect Dis*. 2008;61:157-60.
- 5) Dewan MZ, Takamatsu N, Hidaka T, Hatakeyama K, Nakahata S, Fujisawa J, Katano H, Yamamoto N, Morishita K. Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo. *J Virol*. 2008;82:11958-63.

駒野淳

- 1) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J. Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett*. 2008 Dec 10; 582 (29):4053-8
- 2) Hamatake M, Aoki T, Futahashi Y, Urano E, Yamamoto N, Komano J. Ligand-independent higher-order multimerization of CXCR4, a G-protein-coupled chemokine receptor involved in the targeted metastasis. *Cancer Sci*. 2008 Oct 30 (in press)
- 3) Urano E, Aoki T, Futahashi Y, Murakami T, Morikawa Y, Yamamoto N, Komano J. Substitution of the myristoylation signal of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag with the phospholipase C delta 1 pleckstrin homology domain results in infectious pseudovirus production. *J Gen Virol*. 2008 Dec; 89 (Pt 12):3144-9
- 4) Urano E, Shimizu S, Futahashi Y, Hamatake M, Morikawa Y, Takahashi N, Fukazawa H, Yamamoto N, Komano J. Cyclin K/CPR4 inhibits primate lentiviral replication by inactivating Tat/positive transcription elongation factor b-dependent long terminal repeat transcription. *AIDS*. 2008 May 31;22(9):1081-3.

研究課題：HIV感染症に合併する各種疾病に関する研究

課題番号：H18-エイズ一般-007

研究代表者：小池和彦（東京大学医学部 教授）

研究分担者：高松純樹（名古屋大学医学部附属病院 教授）、菅原寧彦（東京大学医学部 准教授）、四柳 宏（東京大学医学部 准教授）、菊池 嘉（国立国際医療センター・エイズ治療研究開発センター 部長）、茶山一彰（広島大学医学部薬学総合研究科 教授）、髭 修平（北海道大学医学部 講師）、正木尚彦（国立国際医療センター 医長）、加藤道夫（国立病院大阪医療センター 部長）、服部俊夫（東北大学大学院医学系研究科 教授）

1. 研究目的

多剤併用抗レトロウイルス療法 HAARTの導入後、HIV感染者の死因も従来に比べて大きく変化してきている。HIV感染症の死亡原因中AIDS関連死は約半数にとどまり、非AIDS関連死が約半数であり、その90%が肝疾患関連の死である。C型肝炎ウイルス(HCV)による慢性肝疾患が主たる死因であるが、B型肝炎ウイルス(HBV)についても同様の傾向があり、HIV感染症においてはHBV感染症が持続感染しやすいため、HBVキャリア率は6~10%と健康人に比して5~10倍高率となっている。HIV・HBV重複感染例では、B型慢性肝炎の進行が速い、薬剤性肝障害の頻度が高い、抗レトロウイルス剤がHIVとHBVの両方に抗ウイルス活性をもつ、という問題があり、HBV合併HIV感染症の治療に際し重大な問題を引き起こしている。したがって、HIV感染者に行われたHBV感染症とHCV感染症をいかに治療・管理して行くかは最大の懸念事項であり、治療法を確立することが必要である。私達は、これまで厚生労働科学研究費補助金エイズ対策事業「HIV感染症に合併する肝疾患に関する研究」班において、主にHIV感染者に合併する慢性C型肝炎ウイルス(HCV)感染症の治療法の開発を目指してきた。これを更に発展させ、HCVのみならず、HBV重複感染時も含めてHIV感染症、合併する肝疾患ともに治療法の改良を図ることを目的とする。

2. 研究方法

- 1) 我が国における HIV・HBV 重複感染の実態を把握するために行った全国エイズ拠点病院アンケート調査のデータを基礎データとして、HBV 感染合併 HIV 感染症の肝障害の重症度、進行度を、班員の施設において共同研究を行なって詳細に検討する。
- 2) HBV 感染合併 HIV 感染症の治療ガイドラインを作成する。
- 3) HIV 感染症に合併する B 型慢性肝炎の genotype 別の病態、治療効果についての検討。
- 4) リバビリン併用ベグ・インターフェロン (Peg-IFN) 療法時代の血友病 HIV/HCV 重複感染のコントロール。
- 5) Peg-IFN リバビリン併用治療無効の HIV/HCV 重複感染例への低容量 PEG-IFN 長期治療。
- 6) HIV 感染症における肝障害機序の検討
- 7) HIV 感染合併肝炎患者の治療法と薬剤耐性に関する研究。
- 8) HIV 感染症をもつ末期肝疾患患者に対する成人間生体肝移植のための更なる技術開発。
- 9) HIV 感染症診療医と B 型肝炎、C 型肝炎を含む肝臓病の診療医の連携の強化。

3. 研究結果

- 1) 全国拠点病院に対する HIV・HBV 重複感染に関するアンケート調査において、HIV 感染例 5988 例中の 377 例 (6.4%) において HBs 抗原が陽性であった。
- 2) 血液製剤による HIV 感染例では 5.9%、同性間性交渉による HIV 感染例では 8.3%と、日本全体での HBV 陽性率 (1.0%程度) に比して高率であったが、これらの間に有意差は無かった。「others」(異性間感染例が大部分と推定される)での HBV 陽性率は 3.4%であり、同性間性交渉による HIV 感染例に比して低率であったが、日本全体での HBV 陽性率の 3 倍強の陽性率であり、年齢層も考慮するとかなりの高率であるといえる。
- 3) 班員施設における HBV 感染合併 HIV 感染症の肝障害共同研究において、6 施設から計 252 例の HIV・HBV 重複感染例がエントリーされた。男性 243 例、女性 9 例、初診時平均年齢 39.5±5.6 (歳)。HIV 推定感染経路は、血液製剤 14 例 (6.1%)、MSM186 例 (80.9%)、Heterosexual 24 例 (10.4%)、IVDU 2 例 (0.9%)、その他 4 例 (1.7%) であった。
- 4) HBV 陽性発見時 HBe 抗原陽性が 142 例 (71%)、HBVDNA ≥ 6 LGE/ml が 112 例 (67%) と発見時に HBV 量の多い例が多数であった。観察期間中に HBe 抗原→HBe 抗体へセロコンバージョンしたものは 32 例 (22.2%)、HBVDNA 量が 6 LGE/ml 以上から 6 LGE/ml 未満へと減少した例が 61 例 (42%) であった。
- 5) 初診時の血清アルブミン値は平均 3.9±0.7 (g/dL)、最終観察時には平均 4.1±0.6 (g/dL) と有意な変化を認めなかった。初診時の血清ビリルビン値は平均 1.0±2.2 (mg/dL)、最終観察時には平均 1.2±1.1 (mg/dL) と有意な変化を認めなかった。
- 6) HBV 感染判明時の血清 ALT 値 (IU/L、以下、単位省略) (252 例) は、平均 203±583、中央値 36 であった。平均観察期間 3.9±4.1 (年) を経た後の血清 ALT 値 (252 例) は、平均 48±84、中央値 30 であった。30 未満の症例は 107 例 (50%)、30 以上 40 未満の症例は 33 例 (16%)、40 以上 80 未満の症例は 52 例 (24%)、80 以上 200 未満の症例は 16 例 (8%)、200 の症例は 5 (2%) であった。なお、145 例中 (57%) に HAART が導入されていた。
- 7) CD4 陽性 T 細胞数が 200/ μ l 未満の例は初診時には 221 例中 82 例 (37%)、最終観察時には 211 例中 37 例 (17%) であった。
- 8) HBV の遺伝子型では、測定された 73 例のうち、A が 58 例 (79%)、B が 6 例 (4.1%)、C が 7 例 (9.6%)、D が 1 例、A/G が 1 例、H が 3 例 (4.1%) であり、非 HIV 感染例において B、C が多いことは顕著な違いを見せた。近年の我が国における B 型急性肝炎においては、遺伝子 A の HBV によるものが増加しているが、それに比べても遥かに高率であった。

- 9) HAARTについては、記載のあった252例中172例(68%)で施行されていた。
- 10) 平均3.9年の経過観察中に3例で肝不全(腹水、脳症の出現)を発症した。肝細胞癌の合併は1例で、肝移植を受けた例は存在しなかった。
- 11) HBV感染合併HIV感染症の治療ガイドラインを作成した(印刷中)。
- 12) HIV感染例で最近問題となっているB型急性肝炎の現状に関し検討を行い、非HIV感染例とHIV感染の両者にgenotype AのHBVによるB型肝炎が拡大してきていることを確認した。
- 13) HIV/HBV重複感染・HBsAg陽性のB型慢性肝炎患者のうちHAARTを開始例について検討した。現在のところ、HIV/HBV重複感染例では抗HBV薬2剤(3TC:ラミブジン、TDF:テノホビル)を含むレジメが、HAART導入時の肝障害に対して有効であると考えられた。
- 14) B型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法(特にラミブジン)の効果をHIV感染者と非感染者とで比較した結果、前者における抗HBV効果は有意に劣ることが判明した。尚、両者においてYMDD変異の出現率はほぼ同様であった。
- 15) HIV感染症合併慢性C型肝炎に対して、リバビリン(RBV)併用ペグ・インターフェロン(PegIFN)療法を施行している。HCV排除であるsustained virological response (SVR)が得られた例は、約35%であり、HCV単独感染の場合に比して治療効果は低い傾向がある。
- 16) C型肝炎に対するRBV併用PegIFN療法が無効であった症例に対するPegIFNを含むIFN製剤の少量長期導入を開始し、続行中である。しかしながら、高HCV量、進行肝疾患をもち、抗HCV治療の困難なHIV・HCV重複感染症例に対する治療には、やや手詰まり感があることは否定できない。
- 17) HIV・HCV重複感染症に対する生体肝移植のために、更に安全なドナー肝手術法の改良を図っている。
- 18) 班員施設を中心とするHIV感染症患者の多数存在する全国の施設において、肝臓病専門医とHIV感染症診療医との定期的な話し合いをもち、連携強化を行なった。また、患者団体との話し合いも両者が同席して行なわれている。

4. 考察

HIV感染症に重複感染しているHBVによる肝疾患については、感染からの年数がまだ短いめか、進行肝硬変、肝癌へ進行している例は、現在のところまだ少数であった。しかしながら、肝癌発生例も認められてきており、今後は進行肝疾患が増加してよくことが懸念される。

注目すべきは、4年弱の経過で、HAART治療を受けた例も含むが、HBe抗原から抗体へのセロコンバージョン、HBVDNAの減少を呈する例が少なくなかった点である。また、HIV・HBV重複感染例の約80%が遺伝子AのHBVに感染している点も重要である。欧米の非HIV感染例の報告では、成人で感染後に持続感染した例では遺伝子AのHBVが多く、その後の抗HBV治療でHBs抗原もクリアされる例のあることが知られている。予備段階ではあるが、テノホビルとラミブジン(あるいはFTC)を含んだHAARTを受けているHIV・HBV重複感染例でのHBV感染症の経過が比較的良好であることから、HIV・HBV重複感染例には積極的にテノホビルとラミブジン(あるいはFTC)を含んだHAARTを行なって行くのも選択肢の一つであるかもしれない。

今回の共同班研究によって、今後のHIV・HBV重複感染例への治療方針を立てる上で、非常に意義のある事実が明らかにされたと考えられる。今後、更に詳細な検討・解析を進めていく必要がある。

HIV感染症に合併するC型肝炎に対するRBV併用PegIFN療法の治療成績はHCV単独感染に比してやや低めである。通常の慢性C型肝炎患者に比してHCV量が約1オーダー高いことが原因のひとつと考えられる。投与時のウイルス動態はHCV単独例と大差が無いとされ、より長期間の投与が必要と思われる。RBV併用PegIFN治療無効例を中心に、PegIFNの少量長期投与を開始しており、肝硬変への進展、肝癌の発生抑制が期待される。

HIV・HCV重複感染症に合併する末期肝硬変・肝がん症例に対する生体肝移植の適応を、症例ごとに評価を行ない実施してきている。CD4リンパ球数が移植適応の目安であると考えられるが、「手術直前のCD4数の減少速度」を考慮に入れる必要がある。

5. 自己評価

- 1) 達成度について: HIV感染症に合併するB型肝炎について詳細な臨床研究のまとめを行なった。また、「HBV感染合併HIV感染症の治療ガイドライン」の作成も行なった(印刷中)。当初設定した目的について、ほぼ各項目について、目標通りに検討・診療・組織編成が実行されたと考える。抗HCV治療については少量長期投与を継続してエンタリー症例を増加させて行くが、やや手詰まり感があることは否定できない。
- 2) 研究成果の学術・国際・社会的意義について: 肝疾患を合併するHIV感染者の診療において、社会的意義は大きいと考えられる。特に、HIV・HBV重複感染におけるHAARTの使用法については切実な問題となっており、その意義は大きい。また、HIV感染症における急性B型肝炎の高率な慢性化の事実も明らかとなり、当該コホートにおけるHBワクチン投与の推奨を勧める必要があると思われる。
- 3) 今後の展望について: HIV・HBV重複感染時のHAARTに関するガイドラインが作成されたので、これを全国へ配布するとともにWeb上でも公開する。むしろ、ガイドラインは、今後継続して改訂されていくべきものであることは言うまでもない。抗HCV療法に関しては、PegIFN長期投与へのエンタリーを継続して広く呼びかけを行なう必要がある。高HCV量、進行肝疾患をもち、抗HCV治療の困難なHIV・HCV重複感染症例に対する治療には、やや手詰まり感があることは否定できない。

6. 結論

HIV感染症に合併する肝疾患について、B型肝炎とC型肝炎に重点を置いて、疫学、診療体制の組織強化、抗ウイルス療法の実行、等を行なった。実態の把握がなされ、治療法の改良も進行してきており、予後、QOLの改善が期待される。一方で、高HCV量かつ進行肝疾患をもち、抗HCV治療の困難なHIV・HCV重複感染症例に対するC型肝炎治療には、やや手詰まり感があることは否定できない。

7. 知的所有権の出願・取得状況

なし

研究発表

研究代表者

小池和彦

- 1) Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Fujisawa J, Seki T, Koike K, Okazaki K. Hepatitis B virus X protein shifts hepatic Smad3-mediated signaling from tumor-suppression to oncogenesis in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009 in press.
- 2) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization. *J Biol Chem* 2008 Dec 8. [Epub ahead of print]
- 3) Hashimoto M, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Matsui Y, Togashi J, Moriya K, Koike K, Makuuchi M. Colonization and/or infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after living donor liver transplantation: a case control study. *BMC Infectious Diseases* 2008, 8:155. [Epub ahead of print]
- 4) Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection. *J Gastroenterol* 2008 in press.
- 5) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2008 Nov 27. [Epub ahead of print]
- 6) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008;118:683-694.
- 7) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-31.
- 8) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hep Res* 2008;38:310-314.
- 9) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2008;38:252-258.
- 10) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:S87-91.
- 11) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879.
- 12) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatol Res* 2008;38:775-783.
- 13) Matsuzaki G, Ishizaka N, Furuta K, Hongo M, Saito K, Sakurai R, Koike K, Nagai R. Comparison of vasculoprotective effects of benidipine and losartan in a rat model of metabolic syndrome. *Eur J Pharmacol* 2008;587:237-42.
- 14) Okada H, Kitazawa T, Harada S, Itoyama S, Hatakeyama S, Ota Y, Koike K. Combined treatment with oral kanamycin and parenteral antibiotics for a case of persistent bacteremia and intestinal carriage with *Campylobacter coli*. *Intern Med* 2008;47:1363-1366.

研究分担者

高松 純樹

- 1) Honda T, Katano Y, Toyoda H, Hayashi K, Ishigami M, Nakano I, Goto H, Yamamoto K, Takamatsu J. Effect of Ribavirin, Combination with Interferon in Patients with Hepatitis C, on the Bleeding Risk Associated With Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *J Clin Psych* 2008;69:679-80.
- 2) Toyoda H, Honda T, Hayashi K, Katano Y, Goto H, Kumada T, Takahashi K, Abe N, Mishiro S, Takamatsu J. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibody in Japanese patients with hemophilia. *Intervirol*. 2008;51:21-5.

菅原寧彦

- 1) Tamura S, Sugawara Y, Kukudo N, Makuuchi M. Systematic grading of morbidity after living donation for liver transplantation. *Gastroenterology*. 2008 ;135:1804.
- 2) Kyoden Y, Tamura S, Sugawara Y, Matsui Y, Togashi J, Kaneko J, Kokudo N, Makuuchi M. Portal vein complications after adult-to-adult living donor liver transplantation. *Transpl Int*. 2008;21:1136-44.
- 3) Matsui Y, Sugawara Y, Yamashiki N, Kaneko J, Tamura S, Togashi J, Makuuchi M, Kokudo N. Living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Hepatol Res*. 2008;38:987-96.
- 4) Ishizawa T, Hasegawa K, Aoki T, Takahashi M, Inoue Y, Sano K, Imamura H, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Neither multiple tumors nor portal hypertension are surgical contraindications for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;134:1908-16.
- 5) Tamura S, Sugawara Y. Treatment strategy for hepatitis C after liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2008;15:111-23.

四柳 宏

- 1) Takahashi H, Suzuki M, Ikeda H, Kobayashi M, Sase S, Yotsuyanagi H, Maeyama S, Iino S, Itoh F. Evaluation of Quantitative Portal Venous, Hepatic Arterial, and Total Hepatic Tissue Blood Flow Using Xenon CT in Alcoholic

Liver Cirrhosis-Comparison With Liver Cirrhosis Related to Hepatitis C Virus and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Oct 30. [Epub ahead of print]

- 2) Okanoue T, Itoh Y, Minami M, Hashimoto H, Yasui K, Yotsuyanagi H, Takehara T, Kumada T, Tanaka E, Nishiguchi S, Izumi N, Sata M, Onji M, Yamada G, Okita K, Kumada H. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet counts. *Hepatology Res*. 2008;38:27-36.
- 3) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatology Res*. 2008;38:252-8.

菊池 嘉

- 1) Tokuda H, Sakai F, Yamada H, Johkoh T, Imamura A, Dohi M, Hirakata M, Yamada T, Kamatani N, Kikuchi Y, Sugii S, Takeuchi T, Tateda K, Goto H. Clinical and radiological features of Pneumocystis pneumonia in patients with rheumatoid arthritis, in comparison with methotrexate pneumonitis and Pneumocystis pneumonia in acquired immunodeficiency syndrome: a multicenter study. *Intern Med*. 2008;47:915-23.
- 2) Tanuma J, Fujiwara M, Teruya K, Matsuoka S, Yamanaka H, Gatanaga H, Tachikawa N, Kikuchi Y, Takiguchi M, Oka S. HLA-A*2402-restricted HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and escape mutation after ART with structured treatment interruptions. *Microbes Infect*. 2008;10:689-98.
- 3) Uemura N, Makimura K, Onozaki M, Otsuka Y, Shibuya Y, Yazaki H, Kikuchi Y, Abe S, Kudoh S. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosing Pneumocystis pneumonia. *J Med Microbiol*. 2008;57:60-7.

茶山一彰

- 1) Tashiro H, Itamoto T, Fudaba Y, Ohdan H, Fukuda S, Kohashi T, Amano H, Ishiyama K, Ide K, Ogawa T, Shishida M, Irei T, Ushitora Y, Ohira M, Takahashi S, Chayama K, Asahara T. Prophylaxis against recurrence of HBV hepatitis after living-donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology*. 2008;55:1746-9.
- 2) Kawaoka T, Kawakami Y, Tsuji K, Ito H, Kitamoto M, Aimitsu S, Kawakami H, Jeong SC, Imamura M, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. Dose comparison study of pegylated interferon-alpha-2b plus ribavirin in naive Japanese patients with hepatitis C virus genotype 2: A randomized clinical trial. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Nov 19. [Epub ahead of print]
- 3) Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008;89:2108-13.

髙 修平

- 1) Chuma M, Hige S, Nakanishi M, Ogawa K, Natsuzaka M, Yamamoto Y, Asaka M. 8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine is a risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:1431-6.
- 2) Yoshida S, Hige S, Yoshida M, Yamashita N, Fujisawa S, Sato K, Kitamura T, Nishimura M, Chuma M, Asaka M, Chiba H. Quantification of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants by type-specific TaqMan minor groove binder probe assay in patients with chronic hepatitis B. *Ann Clin Biochem*. 2008;45:59-64.

加藤道夫

- 1) Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Deguchi M, Kagita M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hayashi N. Supportive role played by precore and preS2 genomic changes in the establishment of lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J Infect Dis*. 2008 15:198:1150-8.
- 2) Tanaka H, Imai Y, Hiramatsu N, Ito Y, Imanaka K, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yabuuchi I, Yoshihara H, Inoue A, Kato M, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Hayashi N, Tsukuma H. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003. *Ann Intern Med*. 2008 3:148:820-6.
- 3) Kanada A, Takehara T, Ohkawa K, Kato M, Tatsumi T, Miyagi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Sasakawa A, Hikita H, Kawamura K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatology Res*. 2008;38:622-8.

服部俊夫

- 1) Xiao P, Usami O, Suzuki Y, Ling H, Shimizu N, Hoshino H, Zhuang M, Ashino Y, Gu H, Hattori T. Characterization of a CD4-independent clinical HIV-1 that can efficiently infect human hepatocytes through chemokine (C-X-C motif) receptor 4. *AIDS*. 2008 12:22:1749-57.
- 2) Zhang J, Yamada O, Kawagishi K, Araki H, Yamaoka S, Hattori T, Shimotohno K. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax modulates interferon-alpha signal transduction through competitive usage of the coactivator CBP/p300. *Virology*. 2008 30:379:306-13.
- 3) Ashino Y, Guio H, Iwamoto A, Yano I, Matsumura T, Hattori T. Serological response against Mycobacterium avium complex glycolipid antigens in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Microbiol Immunol*. 2008;52:36-9.

研究課題：血友病の治療とその合併症の克服に関する研究

課題番号：H18-エイズ一般-003

主任研究者：坂田 洋一（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター分子病態研究部 教授）

分担研究者：小澤 敬也（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 教授）、嶋 緑倫（奈良県立医科大学小児科学教室 教授）、長谷川 護（ディナベック株式会社 代表取締役社長）、天野 景裕（東京医科大学臨床検査医学講座 講師）、小林 英司（自治医科大学医学部分子病態治療研究センター臓器置換研究部 教授）、小田原 隆（東京大学医学部研究所 講師）、瀧 正志（聖マリアンナ医科大学 教授）

1. 研究目的

血友病はX染色体上に存在する血液凝固因子(FVIII)の、或いはIX(FIX)遺伝子の異常に起因する先天性出血性疾患である。現在の治療は出血時に因子製剤を投与するcare中心で、致命的な頭蓋内出血等の予防は不可能である。因子製剤は組み換え体を含め、安全性と利便性のいずれも改良されたが、今日でも、未知ウイルス混入やインヒビタ産生の問題はcare治療の重要な課題である。患者のQOLを高めるために、A)血友病にcureをもたらす遺伝子治療と、B)インヒビタ対策、C)患者視点から血友病に関連する諸問題の調査研究を目的に研究を展開する。血友病遺伝子治療に関しては本年度は、遺伝子導入を妨げるアデノ随伴ウイルス(AAV)に対する既存抗体など、明らかにならなかった問題点の解決と安全性向上を目指し、臨床研究へ歩を進める基盤を作る。この他、探索研究として、血友病Aクローンブタ作製なども検討する。インヒビタ対策は、効率的に寛容誘導する技術を確立する研究を展開する。調査研究では医師、医療スタッフ、患者代表により作成された多視点のアンケートの自由記載欄の二次解析を進め、問題点を明らかにする。

2. 研究方法

A.遺伝子治療：1～2年以内の臨床研究開始を視野に入れた研究と、将来の改善に向けた探索的研究を進めた。

I.生体内標的臓器遺伝子治療：個体差は大きい、サル骨格筋、或いは肝臓へ遺伝子導入し治療レベルFVIIIをえることは、これまでに技術的に可能になった。また個体差は、主として、個体のAAV既感染による抗体が、AAVベクター(AAVV)の感染効率を阻害することが明らかとなった。そこで、高感度抗AAV抗体測定法(高感度バイオアッセイと結合抗体測定)の開発、及び、抗体回避ベクター投与方法の検討をすすめた。患者への投与は、バルーン付きマイクロカテーテルのカテ先を門脈左枝迄誘導してバルーンを拡張、門脈血流遮断、生理食塩水で洗浄し、接触する循環血液を最小限にしてベクターを注入する方法を考えた。しかし、サルの細い門脈に使用可能なカテーテルは市販されていない。そこで、開腹し、門脈本幹に直接アプローチして本質的に同様の操作で抗AAV抗体を有するサルに投与し、効果確認の頭数を増やすことと、安全性の検討を行った。高感度抗AAV抗体バイオアッセイとしては、培養液中に糖類を加えることで、測定細胞へのAAVV感染効率上昇を図った。高感度結合抗体測定法としては、プレートコーティングするAAVVの精製レベルを上げることで検討した。サルには血友病は確認されていない。また、FIXとFVIIIはサルとヒトで相同性は極めて高い。サルとヒトのFIXを識別しうるモノクローナル抗体(世界唯一)を作製し、発現FIXを測定し得たが、FVIIIについては、利用できる抗体は世界中に存在しない。AAVVを用いた遺伝子治療では、B領域除去FVIII(海外ではリファクトとして臨床利用)を発現しうる遺伝子を利用していい。そこで、サル個体の発現する完全長とB領域除去FVIIIを識別可能な測定系作製を進めた。

II.遺伝子導入細胞移植：2011年に九州大学で網膜色素変性症の遺伝子治療に使用される改変SIVベクター(SIVV)を用いて、幹細胞を採取し、*ex vivo*で血友病遺伝子を導入し、移植して血小板、或いは肝臓に発現する方法の技術改善と、安全性向上を目指した。具体的には血友病Aイヌを用いて自己幹細胞へFVIII遺伝子を導入し、骨髄へ移植して、血小板へのFVIII発現を観察する。安全性検討として、遺伝子組み込み部位解析と、発現プロモータとして利用する血小板特異的GP1ba遺伝子周囲の配列を検索し、特異的インシュレータを同定し、クローナ-

ル増殖抑制効果を検討する。

III.探索的研究：1)ブタ胎児線維芽細胞のFVIII遺伝子組み換え(KO細胞)作製を進め、農業生物資源研究所との共同研究として血友病Aクローンブタ作製を試みた。2)血友病Aマウス間葉系幹細胞の相同組み換えによる遺伝子修復を*ex vivo*で施行した。

B.インヒビタ対策：これまでに、血友病Aマウスへ、生後1日以内にFVIIIの全身投与にて、或いは、3日以内に胸腺組織へのFVIII暴露により抗原特異的抑制性T細胞が誘導され、免疫寛容が誘導されることを明らかにした。本年度は成熟血友病Aマウスにマイクロレポートシステムを導入してFVIIIを頻回投与し、ヒト臨床応用されている大量頻回FVIII投与による免疫寛容誘導法の現象の血友病Aマウスでの確認を試みた。

C.アンケート調査：配付資料の一次解析に加え、生の声を反映する自由記載欄に対して分析ソフトWordMinerを用いてText型データの統計解析を施行した(倫理面への配慮)

遺伝子治療については、非病原性改変ウイルスベクターを利用した遺伝子導入法の開発と応用を目指したものであり、周辺環境及び実験従事者の安全性に関して倫理的問題が生ずることはないと考えている。研究は遺伝子治療臨床研究に関する文部科学省・厚労省告示の倫理指針を遵守して施行した。動物実験は、各大学の動物実験指針規定に沿って行い、独立行政法人医薬基盤研究所(長野県)医学部研究センターで実施するサルの実験で、独立行政法人医薬基盤研究所「動物実験ガイドライン」及び「サル類での実験遂行方針」を遵守して行った。臨床研究は、厚労省倫理指針に従い被験者の人権に配慮するとともに、インフォームドコンセントをとる。特に遺伝子解析に関しては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。人疫学調査に関しては疫学研究に関する倫理指針を遵守して施行した。

3. 研究結果

A.遺伝子治療

I.生体内標的臓器遺伝子治療：ヒトFIX遺伝子をサル骨格筋に導入し発現を試みたところ、ヒトFIXに対する抗体が高率に出現した。そこで、サルFIXの262Thrをヒト型のAla(ヒト・サル識別可能モノクローナル抗体のエピトープ)に変えて免疫原性を低下させた改変サルFIX遺伝子を搭載したAAV1をモノクローナル抗体に投与した。3頭のサルに4-40%の改変FIXが2年半以上発現維持されている。肝臓に特異性のあるAAV8Vに同じく改変FIX遺伝子を搭載して腸間膜静脈から4頭のサルに投与したところ、1頭のみに20%近い改変FIXの長期発現が確認されたが、他の3頭では初期から0.1%以下であった。組織への遺伝子組み込みも殆ど確認できなかった。既存バイオアッセイによる抗AAV抗体測定限界が示唆されたので、測定感度を上げる種々の工夫を検討した。糖類をアッセイ系に加えることで30倍以上に感度を上げたことが可能になった(投稿中)。別途、AAV8Vコーティングプレートを用いたバインディングアッセイの改良も進めた。AAV8Vを超遠心密度勾配法のみでなく、イオン交換カラムクロマトグラフィを用いて精製し、純度を上げた標品を用いたところ、こちらも数十倍高感度となった。改変FIX発現が見られなかったサルでは、これらの測定法でいずれも、低レベル抗AAV8抗体が存在することが明らかになった。そこで、血液に接しないようにしてベクター導入を試みた。抗AAV8抗体が存在する3頭サルで検討したが、いずれも初期から10%前後の改変FIXの発現がみられ、6ヶ月から1年間、安全性にも問題なく持続している(投稿中)。一方、サルでの発

現 FVIII 測定系として数%レベル感度での ELISA 系をほぼ確立した。

II. 遺伝子導入細胞移植：2010年に日本で臨床応用される改変 SIVV の生産性や安定性に関する研究では、生産に用いる細胞種は 293T/17細胞が、またドライシッパー内でも7日間は活性が保たれること等が確認された。血友病 A マウスの血液幹細胞に SIVV を用いて FVIII 遺伝子を導入し、移植して血小板に発現させて、十分な止血効果が得られたことは報告した。本年度はイヌを用いて確認するための骨髄血採取や骨髄内移植などの基礎的検討を進め、一定の成果が得られた。また安全性と安定性を担保するためのインシュレータとして、内在性クロマチンインシュレータを GPIb 周囲の配列から探索した。マウス、ラット、ヒトで保存領域を推定し、C1-C4 迄の4配列をクローニングした。CTCF という DNA 結合蛋白への結合を旨に検討したところ、C1 領域が可能性の高いことが示唆された(投稿中)。

III. 探索的研究：血友病 A クローンブタ作製は FVIII 遺伝子組み換え体細胞を確立出来、核移植実験を遂行中である。間葉系幹細胞の遺伝子異常正常化の試みは、成功した。効率を高めるための研究が進行中である。

B. インヒビタ対策：血友病 A マウス背部へマイクロボットを植込込み FVIII を投与して、発生する抗 FVIII 抗体価により high responder と low responder に分類して、その後頻りに FVIII を投与して、寛容誘導を観察した。High, low に関係なく、20回暴露以降にインヒビタ価がほぼ一定となり、30回暴露以降、徐々に低下する傾向が見られた。現在、機序を解析中である。

C. アンケート調査：自由記載欄の解析の結果、治療法、医療制度、医療体制、社会生活、症状に関するものに大別され、公的負担切り捨てに対する不安や、血友病への理解を望む声などが大きなクラスターを構成していた。

4. 考察

A. 遺伝子治療：AAVV を用いて、生体内臓器に FIX 遺伝子を導入し発現させる技術は、サルでも一定の成果が得られた。

AAVIV を用いた骨格筋内投与では、発現ヒト FIX に対する抗体が問題となったが、FIX をサル型に改変することで発現の持続が可能となった。ヒトでのヒト FIX 発現は問題ないと思われる。AAV8V を用いた肝臓内投与では、AAV 既感染による中和抗体の存在が導入高率を低下させたが、血液に接しない方法を工夫することにより、この問題は解決できた。肝臓内投与では10%レベルの改変 FIX 発現が持続し、免疫抑制剤使用は初期4週間のみで十分であり、臨床応用可能であることが示唆された。ヒト投与可能 AAVV が作製出来れば、臨床研究に進める段階に来たと考える。FVIII の遺伝子導入も基本的に FIX と差はないと考えられるが、発現 FVIII 測定系をほぼ確立したので、サルでの発現実験が開始可能と考える。改変 SIVV では、SIV としての問題はほぼ解決されているが、レンチウイルス由来放、染色体への random integration の問題は残る。血液幹細胞に導入した FVIII を血小板に発現させる目的で使用している GPIb プロモータ由来のインシュレータ候補を選別できた。安全性向上が期待できる。血友病 A クローンブタ作製も最終段階に入り、こちらも成功の可能性は極めて高い。相同組み換えを利用した異常 FVIII 遺伝子の修正は、将来の安全性を担保する研究として期待できる。

B. インヒビタ対策：ヒトで臨床応用されている因子製剤繰り返し大量投与による免疫寛容誘導に類似の現象が成熟血友病マウスでも確認出来た。詳細な解析が望まれる。

C. アンケート調査：自由記載欄の解析は方法論的に問題は残るが、前年度のアンケート項目解析と併せて、次の一手を検討し、政策提言へ結びつけていくことが今後の課題であろう。

5. 自己評価

1) 達成度について

AAV8V を用いた肝臓を標的にした FIX 遺伝子導入とその発現は、サルでも、**技術的にはヒト臨床研究開始可能レベル**にほぼ到達した。しかし、安全性と長期治療効果評価については数と

時間の要素が重要である。安全性と技術向上にはさらなる検討が必要と考える。改変 SIVV を用いて、*ex vivo* で血液幹細胞に遺伝子を導入し、血小板に発現させる方法もマウスでは技術的に確立し、イヌへの展開を開始した。random integration の危険性を抑制するための特異的インシュレータ探索にも一定の成果が得られた。血友病 A クローンブタ作製は Southern Blot で組み換え体を確認出来たので、あと一步のところまで到達した。血友病 A マウスでの生後短期間の免疫寛容誘導機序の解析とその技術確立はほぼ達成した。成熟マウスにおける免疫寛容誘導は、ヒトと同様の現象は観察できたが、機序の解析はこれからである。既存ソフトウェアを使用して、アンケートの自由記載欄を解析し、一定の傾向把握はできた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

AAVV は治療量では殆ど染色体に integration されず、安全性が高いことが知られている。しかし、細胞分裂により徐々に効果が希釈されていく欠点を持つ。我々が、遺伝子導入効率の個体差が AAV に対する中和抗体によることを明らかにし、その測定法と、回避技術を確立した意義は大きい。抗 AAV 抗体を持つ患者にも治療可能であり、また、繰り返し治療可能性を提唱し得たからである(論文投稿中)。血小板に発現を誘導するプロモータ周囲の配列から特異的インシュレータを検索し得たことは、そのみでの意味がある。改変 SIVV を用いた遺伝子治療の安全性と安定性に果たす意義は極めて大きい。ヒトに比較的モデル近い大型動物としての血友病 A クローンブタが出来れば遺伝子治療の病態改善研究はもとより、製剤の半減期延長などの基礎実験にも利用可能である。血友病遺伝子治療が確立出来れば、製剤使用量を減少でき、経済的にも資することが大きい。また患者と血友病保因者の精神的 QOL 向上に果たす意味は計り知れない。臨床応用されている大量・長期製剤投与による免疫寛容誘導法の解明は、治療効率を上げるための検討が可能になり、時には一人に数億円かかるインヒビタ対策に資すること大である。患者参加型・多視点のアンケートの解析は自由記載欄を含めて患者の QOL を高めるための政策提言を行う基盤になる。

3) 今後の展望について

ヒト臨床研究開始にはヒト投与可能レベルの AAVV 作製が不可欠である。作製に協力依頼可能な企業の探索は、ベクター特許が海外に存在するために、国際的・国内企業を含め、まさに次の道であった。しかし、ディナベックが改変 SIVV のみならず AAVV に関して、資金的に厚労省予算がつけば、ヒト投与可能ベクター作製への協力を約束してくれた。予算がつけられれば2年-3年目には臨床研究可能と考える。ただ、これまでの血友病治療を鑑み、安全性には漏れないように更に研究を進展させていく必要がある。また、治療改善のための基礎的検討はこれからも不可欠と考える。臨床例に対するインヒビタ対策はまさに緒に就いたばかりである。時間と金のかかる解析故、数智を集積して進める必要があると考える。アンケート解析による政策提言に関しては、解釈の妥当性を高めていきたいと考えている。

6. 結論

体内臓器を標的に、AAV ベクターを用いた血友病遺伝子治療は、**技術的にはほぼ臨床研究開始しうるレベルに到達した**。安全性評価はさらに数と時間の要素が不可欠である。日本で眼科領域の臨床研究に活用される改変 SIV ベクターを用いた血友病遺伝子治療に関しても技術、安全性両面で明るい展望が開けた。インヒビタ対策としての効果的寛容誘導研究は、課題は多いが、血友病マウスを用いた検討では一定の成果が得られた。患者参加型多視点のアンケート解析は、数多くの有益な情報が得られたが、政策提言に結びつけるにはさらなる検討が必要である。

7. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

「血液凝固異常の治療方法」(D4-A0506) 出願済み

研究発表

研究代表者

坂田 洋一

- 1) Ohmori T, Yano Y, Shimada K, Kario K, Sakata Y. Is thrombogenesis related to residual platelet function in ischaemic heart disease? Reply. *Eur Heart J*. 2008 Oct 25. [Epub ahead of print]
- 2) Ohmori T, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Madoiwa S, Mitomo K, Suzuki H, Hasegawa M, Mimuro J, Sakata Y. Phenotypic correction of hemophilia A by ectopic expression of activated factor VII in platelets. *Mol Ther*. 16(8):1359-65, 2008.
- 3) Kimura A, Ohmori T, Kashiwakura Y, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Shimazaki K, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y. Antagonism of Sphingosine 1-Phosphate Receptor-2 Enhances Migration of Neural Progenitor Cells Toward an Area of Brain Infarction. *Stroke*. 39(12):3411-7, 2008.
- 4) Yano Y, Ohmori T, Hoshide S, Madoiwa S, Yamamoto K, Katsuki T, Mitsuhashi T, Mimuro J, Shimada K, Kario K, Sakata Y. Determinants of thrombin generation, fibrinolytic activity, and endothelial dysfunction in patients on dual antiplatelet therapy: involvement of factors other than platelet aggregability in Virchow's triad. *Eur Heart J*. 29(14):1729-38, 2008.
- 5) Yamaguchi M, Ohmori T, Sakata Y, Ueki M. Oligo(tyrosine sulfate)s as heparin pentasaccharide mimic: evaluation by surface noncovalent affinity mass spectrometry. *Bioorg Med Chem*. 15:16(6):3342-51, 2008.
- 6) Mimuro J, Niimura M, Kashiwakura Y, Ishiwata A, Ono T, Ohmori T, Madoiwa S, Okada K, Matsuo O, Sakata Y: Unbalanced Expression of ADAMTS13 and von Willebrand Factor in Mouse Endotoxemia. *Thrombosis Res.*(122):91-97, 2008

口頭発表

- 1) 柏倉裕志、三室 淳、石渡 彰、山中一央、土海桃子、青木慎也、大森 司、窓岩清治、坂田洋一：異常第 VIII 因子遺伝子正常化による血友病 A 遺伝子治療の試み。第 31 回日本血栓止血学会学術集会、2008 年 11 月 20-22 日、大阪。
- 2) 大森 司、石渡 彰、柏倉裕志、窓岩清治、秋葉榮治、長谷川 護、三室 淳、坂田洋一：クロマチンインスレーター挿入による安全性を高めた血小板への遺伝子導入法。第 31 回日本血栓止血学会学術集会、2008 年 11 月 20-22 日、大阪。
- 3) 石渡 彰、三室 淳、水上浩明、小野文子、柏倉裕志、大森 司、諏合輝子、窓岩清治、保富康宏、小澤敬也、坂田洋一：非ヒト霊長類モデルにおける血友病 B 遺伝子治療の基礎的検討。第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日 京都。

研究分担者

小澤 敬也

- 1) Nomoto, T., Okada, T., Shimazaki, K., Yoshioka, T., Nonaka-Sarukawa, M., Ito, T., Takeuchi, K., Katsura, K., Mizukami, H., Kume, A., Ookawara, S., Ikeda, U., Katayama, Y., Ozawa, K.: Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther (in press)*
- 2) Nonaka-Sarukawa, M., Okada, T., Ito, T., Yamamoto, K., Yoshioka, T., Nomoto, T., Hojo, Y., Shimpō, M., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Ikeda, U., Shimada, K., Ozawa, K.: Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med* 10: 368-74, 2008.
- 3) Liu, Y., Okada, T., Shimazaki, K., Sheykholslami, K., Nomoto, T., Muramatsu, S., Mizukami, H., Kume, A., Xiao, S., Ichimura, K., and Ozawa, K.: Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol. Ther.* 16(3): 474-480, 2008.

口頭発表

- 1) 小原陽子、卜部匡司、伊藤孝幸、水上浩明、三室 淳、坂田洋一、久米晃啓、小澤敬也：AAV を利用した第 19 番染色体 AAVS1 領域特異的遺伝子組込み法導入遺伝子の発現期間に関する検討。第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日 京都。
- 2) 水上浩明、八木洋也、三室 淳、石渡 彰、窓岩清治、卜部匡司、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也：AAV ベクターを用いた遺伝子導入法と免疫反応 血友病 B に関する検討を中心に。第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日 京都。

嶋 緑倫

- 1) Tatsumi K, Ohashi K, Shima M, Nakajima Y, Okano T, Yoshioka A. Therapeutic effects of hepatocyte transplantation on hemophilia B. *Transplantation*. 86: 167-70, 2008.
- 2) Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, Shima M. Reference gene selection for real-time