

E. 結論

核マトリックスは KSHV ゲノムの潜伏感染複製の場として重要であり、核マトリックスへ集積するという LANA の本質により達成されている。

KSHV 潜伏感染が形成する PEL 細胞環境により Angpt-1 の発現が亢進する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi' s sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis." In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). Leukemia Research and Treatment. doi:10.4061 /2011/726964.
- 2) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. "Kaposi' s sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation." In " Herpesviruses", Magel, D. G. and Tying, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186-4. pp93-104, 2012.
- 3) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi' s sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis." In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). in press.
- 4) Ohsaki, E. and Ueda, K. "Kaposi' s Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency." *Frontiers in Virology*. 3:7-19, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007.
- 5) Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. "Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II." *Virology* 425:95-102, 2012. doi. org/10.1016/j.virol.2012.01.008.
- 6) Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H. "Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7." *Neuroscience Res*. 73(2):115-21. 10.1016/j.neures.2012.03.001.
- 7) Ueda, K. "For the future studies of Kaposi' s sarcoma-associated herpesvirus" . An Editorial. *Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00237.

- 8) Ueda, K. "Kaposi' s Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded." *J.Blood and Lymph*2:3, 2012. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109
- 9) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H. "Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity." submitted to *Biochem. Biophys. Res. Comm.*
- 10) Ueda, K. "Start or End? ; one of the biggest mysteries is finally solved?" *Medical Microbiology and Diagnosis dx*.doi.org/10.4172/2165-7866.1000e101.

和文原著

- 1) 上田啓次：B 型肝炎のウイルス学 化学療法の領域 48:125-133 2012.
- 2) 上田啓次：遺伝子挿入 HBV を用いた感染リセプターの探索 肝胆臓 65:601-609 2012.
- 3) 上田啓次：HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会（編集中心）
- 4) 上田啓次：「HBV 遺伝子と関連抗原」*Hepatology Practice*. pp2-9 文光堂 2013.
- 5) 上田啓次：「グルココルチコイド感受性領域」*Hepatology Practice*. pp149-151 文光堂 2013.

学会発表

- 1) 大崎恵理子、中野和司、Zheng Xin、Yang Zunlin、Jin Cangao、上田啓次：核マトリックス因子 NuMA と LANA のキメラ蛋白による ori-P 複製活性と LANA の核マトリックス分画局在に重要なドメインの検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 大阪
- 2) 大崎恵理子、中野和司、Zheng Xin、Yang Zunlin、Jin Cangao、上田啓次：核マトリックス因子 NuMA と LANA のキメラ蛋白による ori-P 複製活性と LANA の核マトリックス分画局在に重要なドメインの検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 大阪
- 3) Zheng Xin、大崎恵理子、上田啓次：KSHV 感染 PEL 細胞で Angpt-1 遺伝子発現制御機構の解析 第 28 回ヘルペスウイルス研究会 淡路夢舞台国際会議場 2012 年 5 月
- 4) 大崎恵理子、上田啓次：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのゲノム分配メカニズムについて 第 28 回ヘルペスウイルス研究会 淡路夢舞台国際会議場 2012 年 5 月
- 5) Zheng Xin、大崎恵理子、上田啓次：KSHV 感染 PEL 細胞で Angpt-1 遺伝子発現制御機構の解析 第 10 回 EB ウイルス研究会 キャンパスプラザ京都 2012 年 7 月

- 6) 上田啓次：HBV 感染症克服へ向けた HBV 研究
展開 – 受容体の分離・同定と感染系の構築を中
心に – 第 61 回日本ウイルス学会学術集会
神戸国際会議場 2013 年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新規治療薬の開発 (抗 PEL 化合物および抗 KSHV 化合物の開発)

研究分担者 藤室雅弘 京都薬科大学 細胞生物学 教授

研究要旨

γ -ヘルペスウイルス亜科に属すカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) は健常者に感染すると深刻な疾患を起こさずにそのまま宿主に潜伏感染し、エピゾームとして核内で維持される。しかし、感染者の免疫不全時に KSHV はカポジ肉腫 (Kaposi's sarcoma: KS) や原発性体腔液性リンパ腫 (Primary effusion lymphoma: PEL) を引き起こす。KSHV 関連疾患に関して、KS に対してはドキシルが有効な治療薬として用いられている。一方、PEL に関しては CHOP 療法やリツキシマブが用いられているが、これらは有効な治療法とは言い難い。そこで本研究では、PEL を標的とした抗腫瘍化合物、および、KSHV 複製阻害活性を持つ化合物の探索と開発を実施した。その結果、プロテアソーム阻害化合物 (MG132、Lactacystin、PSI)、HSP90 阻害化合物 (GA、17AAG、Radicicol)、Erk 阻害化合物 (Sangivamycin)、caspase9 活性化剤 (ピロリジニウム型フラレン)、NF- κ B 阻害化合物 (Diallyl trisulfide) は PEL 細胞特異的な殺細胞活性を有することを明らかにし、プロテアソーム阻害剤、HSP90 阻害剤、Sangivamycin、フラレン誘導体が PEL 治療薬のリード化合物となりえる可能性を見出した。

A. 研究目的

1994 年に Chang らにより同定された Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) は γ -2 ヘルペスウイルス亜科 (rhadinovirus 属) に分類され、8 番目に発見されたヒト・ヘルペスウイルスであることからヒト・ヘルペスウイルス 8 型 (HHV-8) とも呼ばれる。KSHV の DNA 配列は γ -1 ヘルペスウイルス亜科 (lymphocryptovirus 属) の EBV や、KSHV と同属の herpesvirus saimiri (HVS) と相同性を持ち、約 170kbp の KSHV 遺伝子内に約 90 個の ORF を有している。

ヒト体内において、KSHV は B 細胞と血管内皮細胞に潜伏感染することが明らかにされている。KSHV のトロピズム (細胞指向性) を決定する細胞のウイルスレセプターは明確ではないが、KSHV は他のヘルペスウイルス同様、細胞膜のヘパラン硫酸に親和性を有し、細胞のインテグリン α 3 β 1 や xCT と結合する。KSHV の潜伏感染者の割合は、アフリカでは 50% 以上、EU や北米では 10% 程度、日本では 2% 以下と報告されている。

KSHV は健常者に感染すると重篤な疾患を伴わ

ないで潜伏感染する。KSHV は標的細胞に吸着・侵入後、脱核して 2 本鎖 DNA として感染細胞核内で維持される。KSHV 潜伏感染時、KSHV 遺伝子は両側のターミナルリピートが繋がった環状 2 本鎖 DNA (エピゾーム) として存在し、ウイルスの再活性化により溶解感染 (lytic infection) に移行し、ウイルスの複製を開始する。なお、KSHV のエピゾーム維持にはウイルス蛋白質 LANA (ORF73) が、KSHV の再活性化には転写因子である RTA (ORF50) が必須である。

KSHV の潜伏感染は、エイズ関連型の PEL や多発性キャッスルマン病 (Multicentric Castleman's disease: MCD) において、極めて高い確率で検出され、それらの発症に深く関与していると考えられている。また、KSHV はエイズ関連、非関連のどちらの KS でも、ほぼ 100% の確率で潜伏感染している。エイズ関連非ホジキンリンパ腫の一つである PEL と、EBV 関連のバーキットリンパ腫や他のエイズ関連非ホジキンリンパ腫とでは、発現する遺伝子パターンが異なる。一方、カポジ肉腫や PEL と比べ、MCD での KSHV 陽性率は低いが、

エイズ関連型 MCD 発症者では、KSHV が高頻度に検出される。

KSHV 関連疾患における化学療法に関しては、KS に対してはドキシソルピシンのリポソーム封入剤（ドキシル）が用いられ、PEL に対しては CHOP 療法（アドリマイシン+シクロホスファミド+ビンクリスチン+プレドニゾロン）、または、CHOP + 抗ヒト CD20 抗体のリツキシマブによる化学療法が用いられる。現在における KSHV 関連腫瘍に対する化学療法の問題点として、その副作用や抗がん剤排出ポンプを発現した多剤耐性がん細胞が指摘されている。

これらの現状をふまえ、本研究では KSHV 感染 PEL 細胞に対する抗腫瘍化合物と KSHV の複製阻害活性を有する抗 KSHV 化合物の探索と作用機序の解析を行い、プロテアソーム阻害化合物（MG132、Lactacystin、PSI）、HSP90 阻害化合物（GA、17AAG、Radicicol）、Sangivamycin、水溶性フラレン、ニンニクの新芽由来のフィトケミカルであるジアリルトリスルフィドを抗 PEL 化合物として同定した（図 1）。

B. 研究方法

B-1. 細胞培養と生細胞の測定

実験に用いた PEL 細胞株と KSHV 非感染 B 細胞株

BC3 : KSHV(+)/EBV(-)

BCBL1 : KSHV(+)/EBV(-)

HBL6 : KSHV(+)/EBV(+)

BC2 : KSHV(+)/EBV(+)

Raji : KSHV(-)/EBV(+)

DG75 : KSHV(-)/EBV(-)

Ramos : KSHV(-)/EBV(-)

上記の細胞は、10% FBS を含む RPMI-1640 で培養した。細胞増殖アッセイには、96-well plate に細胞数 5×10^4 cells/well となるよう細胞を加え、さらに各種化合物をフェノールレッド非含有の RPMI 1640 で希釈し、細胞培養液 100 μ L/well で 24 時間培養を行った。培養後、生存細胞数を測定するため、CCK-8 を添加し呈色反応後に 450 nm における吸光度を測定した。なお、薬物無添加の細胞数を 100% として各濃度の薬物添加 24 時間後の生存腫瘍細胞数の割合を算出した。

B-2. ウイルス産生阻害アッセイ

BC3 細胞に、TPA を終濃度 20 ng/mL で添加した。培養上清を DNase I 処理し、培養液に含まれるウイルス粒子からウイルス DNA を QIAamp DNA blood mini kit (QIAGEN) で精製した。KSHV の ORF50 プライマー (5'-GATGACAAGGTAAAGATCGACCT-3' と 5'-GGTCAAGTACACCGAACACTTAA-3') を用いてリアルタイム PCR を行い、培養液に含まれる KSHV ゲノムのコピー数を算出した。ゲノムのコピ

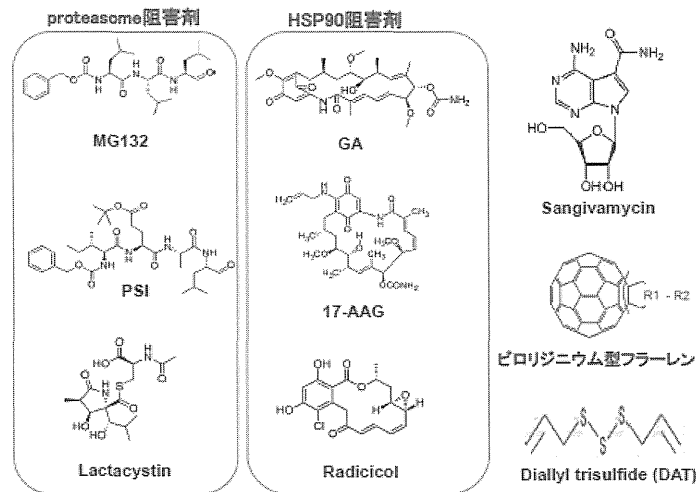


図 1

本研究で明らかにした抗 PEL 化合物（および、抗 KSHV 化合物）

一数算出のため、KSHV の ORF21 遺伝子を pCIneo に組み込んだプラスミドを 1、10¹、・・・10⁶、10⁷ copies/ μ L に希釈したものをスタンダードサンプルとして同時に PCR を行い、得られた検量線から KSHV ゲノムのコピー数を算出した。

B-3. 化合物

MG132 (Benzyloxycarbonyl-L-Leucyl -L-Leucyl-L-Leucinal)、PSI (Benzyloxycarbonyl-L-Isoleucyl- γ - τ -Butyl-L-Glutamyl-L-Alanyl-L-Leucinal)、Lactacystin(N-Acetyl-L-Cysteine,R, 3S,4R)-3-Hydroxy-2-[(1S)-1-Hydroxy-2-Methylpropyl]-4-Methyl-5-Oxo-2-Pyrrolidinecarbonyl) はペプチド研究所より購入した。 Geldanamycin(GA)、Tanespimycin (17AAG)、Radicicol、Sangivamycin、Diallyl trisulfide は Calbiochem より購入した。フラレーン誘導体は慶應大学 薬学部 増野匡彦先生よりご恵与いただいた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え等の実験に関しては当該研究施設の遺伝子組換え実験倫理委員会の承認を得た上で実験を行った。

C. 研究結果

1. プロテアソーム阻害化合物 (MG132、Lactacystin、PSI)

PEL を含む各 B リンパ腫細胞に対してプロテアソーム阻害剤 (MG132、Lactacystin、PSI) の増殖抑制活性を測定した (用いた化合物を図 1 に示した)。その結果、MG132、Lactacystin、PSI はウイルス非感染 B 細胞に比べ PEL 細胞に対して低濃度での強い殺細胞活性を示した。次にその作用機序の解析を行った結果、プロテアソーム阻害剤は PEL 細胞内の I κ B の安定化を誘導することで、PEL 細胞内の NF- κ B シグナルを抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、プロテアソーム阻害剤による KSHV のウイルス複製阻害を解析した結果、3 種類のプロテアソーム阻害剤は、PEL 細胞の生存に影響を与えない低濃度において、KSHV 複製と産生を抑制した。

3 種類のプロテアソーム阻害剤のなかで、抗 PEL 活性 (PEL 細胞に対する殺細胞活性) は PSI が最も強く (IC₅₀=22-53 nM)、抗 KSHV 活性 (KSHV 複製阻害活性) は MG132 が最も強かった。

2. HSP90 阻害化合物

(GA、17AAG、Radicicol)

PEL 細胞株、および、KSHV 非感染 B リンパ腫細胞株に対して HSP90 阻害化合物 (GA、17AAG、Radicicol) の殺細胞活性を測定した。その結果、GA、17AAG、Radicicol は KSHV 非感染 B 細胞に比べ PEL 細胞に対して低濃度での強い増殖抑制効果を示した。次に作用機序解析を行った結果、HSP90 阻害化合物は PEL 細胞内の I κ B の分解を誘導する IKK 依存的な I κ B リン酸化を阻害することが明らかになった。つまり、HSP90 阻害化合物は PEL 細胞内の I κ B の安定化を誘導することで NF- κ B シグナルを抑制し、アポトーシスを誘導していた。また、HSP90 阻害化合物による KSHV のウイルス複製阻害を解析した結果、GA と 17AAG は、PEL 細胞の生存に影響を与えない低濃度において、KSHV 複製を抑制した。

3. Sangivamycin

PEL 細胞株、および、KSHV 非感染 B リンパ腫細胞株に対して Sangivamycin の殺細胞活性を測定した結果、Sangivamycin が PEL 細胞内の Erk 1/2 のリン酸化阻害により、Erk シグナルを阻害し、PEL に caspase9 の活性化を介したアポトーシスを誘導することを見出した。さらに、Sangivamycin は HSP90 阻害剤 (ゲルダナマイシン) やバルプロ酸との同時投与により、より低濃度で PEL 細胞に対して殺細胞活性を発揮することを見出した。なお、Sangivamycin は複製・産生抑制効果 (抗 KSHV 活性) を有していなかった。

4. 水溶性フラレーン

マロン酸型、ピロリジニウム型、プロリン型、アミノ酸型などの 7 種類の水溶性フラレーン誘導体を用いて、PEL および KSHV 非感染細胞に対する細胞増殖阻害効果を解析した。その結果、ピロリジニウム型フラレーン誘導体は、PEL 細胞株に caspase9 依存的なアポトーシスを誘導した。ピロリジニウム型フラレーンは PEL 細胞内の Akt の Ser473 のリン酸化 (Akt の活性化を誘導) を阻害し、Akt シグナルを抑制することが明らかとなった。また、ピロリジニウム型フラレーンは、caspase9 の Ser196 のリン酸化も阻害した。この caspase9 の Ser196 のリン酸化は、caspase9 の切断 (活性化) を抑制する。また、Ser473 がリン酸化された活性化型 Akt は、caspase9 の Ser196 をリン酸化し、caspase9 の抑制 (切断阻害) を介して、抗アポトーシス作用を発揮することが知られている。この

ことから、ピロリジニウム型フラレンは、PEL細胞内のAktのリン酸化（活性化）を阻害することでcaspase9のSer196のリン酸化（caspase9の不活性化）を抑制してPEL細胞にアポトーシスを惹起すると考えられる。なお、ピロリジニウム型フラレンはウイルス産生抑制効果（抗KSHV活性）を有していなかった。

5. ジアリルトリスルフィド (Diallyl trisulfide: DAT)

抗PEL化合物スクリーニングにより、ニンニクの新芽由来のフィトケミカルであるジアリルトリスルフィド（Diallyl trisulfide; DAT）がPEL細胞特異的な細胞増殖抑制効果を有していることも見出した。DATはPEL細胞内のNF- κ Bシグナルの抑制因子であるI κ B α を顕著に安定化し、NF- κ Bの転写因子p65の核移行とNF- κ Bシグナルを阻害した。さらに、DATによるI κ B α の安定化は、DAT処理がI κ B α の分解を誘導するリン酸化を阻害することに起因することを明らかにした。なお、DATはKSHVの複製・産生抑制効果（抗KSHV活性）を有していなかった。

D. 考察

MG132、Lactacystin、PSIはI κ B α のプロテアソームによる分解を、HSP90阻害剤（GA、17AAG、Radicicol）はIKKによるI κ B α のリン酸化を阻害することで共にNF- κ Bシグナルを阻害してPEL細胞にアポトーシスを誘導した。NF- κ Bシグナルにおいて、IKK複合体はNF- κ Bの阻害因子I κ B α のリン酸化を行う。IKK複合体により、リン酸化されたI κ B α はポリユビキチン化され、プロテアソームによる分解を受ける。HSP90はIKK複合体の安定化と活性化に寄与することが知られている。一方、PEL細胞内ではNF- κ B経路の恒常的活性化が、細胞の生存に必須であることが知られている。事実、KSHVのコードする複数のウイルス蛋白質はNF- κ B経路の活性化に寄与する。KSHVがコードするORF72/v-FLIPは、IKK複合体の安定化と活性維持に関与し、NF- κ Bの阻害因子I κ B α のリン酸化と、それに引き続くI κ B α の分解に寄与するという報告もある。また、KSHVがコードする12回膜貫通蛋白質のK15もNF- κ B経路の恒常的活性化に関与する。HSP90阻害剤は、HSP90阻害によるI κ B α のリン酸化の抑制とI κ B α の安定化を惹起し、NF- κ B経路を負に制御する。一方、プロテアソーム阻害剤はI κ B α の分解を阻害することでNF- κ B

経路を抑制する。PEL細胞ではNF- κ B経路の恒常的活性化が細胞の生存に必須であることから、これら化合物によるNF- κ B経路の抑制がPEL細胞にアポトーシスを誘導していると考えられる。

SangivamycinはErkのリン酸化阻害によりErkシグナルを阻害し、PEL特異的な殺細胞活性を發揮した。SangivamycinはATPの誘導体であり、プロテインキナーゼC（PKC）を阻害することが知られている。また、PKCは、MAPK経路の最上流分子のRafとErkのリン酸化を行い、MAPK-Erk経路を正に制御していると考えられている。つまり、SangivamycinはPEL細胞のプロテインキナーゼCを阻害することで、RafとErkのリン酸化（活性化）を抑制することが考えられる。

ピロリジニウム型フラレンは、Aktの活性化につながるSer473-Aktのリン酸化とcaspase9の不活性化を誘導するSer196-caspase9のリン酸化を減弱させた。Ser473がリン酸化された活性型Aktは、caspase9のSer196をリン酸化することでcaspase9を不活性化（切断阻害）し、抗アポトーシス作用を發揮することが知られている。つまり、ピロリジニウム型フラレン誘導体はAktを介したCaspase9抑制を解除することにより、PEL細胞にアポトーシスをもたらすことが推論できる。

DATはPEL細胞のI κ B α を安定化し、NF- κ Bシグナルを抑制した。DAT処理により、PEL細胞内のプロテアソーム活性とI κ B α のポリユビキチン化は影響を受けなかったが、I κ B α のリン酸化は阻害された。このことから、DATはIKK複合体によるI κ B α のリン酸化阻害によるI κ B α の安定化とNF- κ Bシグナルの抑制を介してPEL細胞にアポトーシスを誘導したと推察できる。

E. 結論

プロテアソーム阻害剤（MG132、Lactacystin、PSI）、HSP90阻害剤（GA、17AAG、Radicicol）、Sangivamycin、ピロリジニウム型フラレン、DATはPEL特異的な殺細胞活性を有していた。また、プロテアソーム阻害剤（MG132、Lactacystin、PSI）とHSP90阻害剤（GA、17AAG）は、KSHVの複製抑制効果（抗KSHV活性）を有していた。本研究により、PELを標的とした抗腫瘍薬と抗KSHV薬開発に必要なリード化合物の候補薬物が示された。今後はさらに詳細な作用機序解析と動物実験を実施する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saji C, Higashi C, Niinaka Y, Yamada K, Noguchi K, Fujimuro M: Proteasome inhibitors induce apoptosis and reduce viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, 415: 573-578
- 2) Nishiya T, Matsumoto K, Maekawa S, Kajita E, Horinouchi T, Fujimuro M, Ogasawara K, Uehara T, Miwa S: Regulation of Inducible Nitric-oxide Synthase by the SPRY Domain- and SOCS Box-containing Proteins. *J Biol. Chem.* 2011, 286: 9009-9019
- 3) Higashi C, Saji C, Yamada K, Kagawa H, Ohga R, Taira T, Fujimuro M: The effects of heat shock protein 90 inhibitors on apoptosis and viral replication in primary effusion lymphoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2012, 35: 725-730,
- 4) Ashizawa A, Higashi C, Masuda K, Ohga R, Taira T and Fujimuro M: The ubiquitin system and Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Front. Microbiol.* 2012, 3: 66
- 5) Nakazawa T, Ohmae T, Fujimuro M, Ito M, Nishinaga T, Iyoda M: Syntheses, molecular structures, and antiviral activities of 1- and 2-(20-deoxy -D- ribofuranosyl) cyclohepta [d][1,2,3] triazol-6 (1H) -ones and 1-(20-deoxy-D-ribofuranosyl) cyclohepta [b]pyrrol- 8(1H)-one. *Tetrahedron* 2012, 68: 5368-5374
- 6) Yamanokuchi R, Imada K, Miyazaki M, Kato H, Watanabe T, Fujimuro M, Saeki Y, Yoshinaga S, Terasawa H, Iwasaki N, Rotinsulu H, Losung F, Mangindaan E. P. R, Namikoshi M, Voogd J de Nicole, Yokosawa H, Tsukamoto S: Hyrtioreticulins A-E, indole alkaloids inhibiting the ubiquitin-activating enzyme from the marine sponge *Hyrtios reticulatus*. *Bioorg. Med. Chem.* 2012, 20: 4437-4442
- 7) Wakao K, Watanabe T, Takadama T, Uia S, Shigemi Z, Kagawa H, Higashi C, Ohga R, Taira T, Fujimuro M: Sangivamycin induces apoptosis by suppressing Erk signaling in primary effusion lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 444:135-140
- 8) Wakabayashi N, Skoko JJ, Chartoumpakis DV, Kimura S, Slocum SL, Noda K, Palliyaguru DL, Fujimuro M, Boley PA, Tanaka Y, Shigemura N, Biswal S, Yamamoto M, Kensler TW: Notch-Nrf2 axis: Regulation of Nrf2 gene expression and cytoprotection by Notch signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2014, 34:653-663
- 9) 藤室雅弘: ウイルス発がん . がん増殖と悪性

化の分子機構 (化学同人) . 13:161-174, 2012.

- 10) 藤室 雅弘: 細胞分裂と増殖 新細胞生物学 (廣川書店) , 2013, 6:151-174

2. 学会発表

- 1) 渡部匡史、中村成夫、増野匡彦、小野智哉、宇井定春、賀川裕貴、藤室雅弘: カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス誘導性リンパ腫を標的とした化学療法の探索 日本薬学会年会 . 横浜 (2013.3)
- 2) 重見善平、賀川裕貴、渡部匡史、藤室雅弘: 小胞体ストレス誘導剤 Diallyl trisulfide のウイルス感染性リンパ腫に対する抗腫瘍活性 日本生物高分子学会 2013 年度大会 . 大阪 (2013.10)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HIV 関連カポジ肉腫の臨床像と治療方針に関する検討

研究分担者 今村顕史 がん・感染症センター都立駒込病院感染症科 医長

研究協力者 加藤博史 がん・感染症センター都立駒込病院感染症科

研究要旨

エイズに合併したカポジ肉腫においては、他の悪性腫瘍とは異なり、抗 HIV 療法 (ART) による病変の改善も期待できる。また、長期の化学療法は ART による免疫回復に悪影響をもたらすことから、化学療法の適応が問題となることが多い。しかし、カポジ肉腫の臨床像は多彩であり、これまで使われていた病期分類では、治療方針を決定するのも困難であることがわかった。本研究班では、これまでに経験された多くの症例を調査することで、カポジ肉腫に対する化学療法の適応をまとめた。さらに、免疫再構築症候群として増悪する例、喉頭蓋病変を伴う重症例、あるいは PLD 無効例など、難治例の治療における注意点や対策についても検討を行った。これらの結果については手引き書としてまとめ、カポジ肉腫を診療した経験の少ない医師のために、数多くの画像所見も掲載した。

A. 研究目的

エイズ合併カポジ肉腫では、pegylated liposomal doxorubicin (PLD) などによる化学療法だけでなく、抗 HIV 療法 (ART) によっても腫瘍を改善させる効果のあることがわかっている。化学療法による骨髄抑制は、ART 後の免疫回復にも悪影響をもたらす可能性がある。したがって、その適応を決めることはカポジ肉腫の治療における重要なポイントとなってくる。しかし、これまでに利用されてきたカポジ肉腫の病期分類は、ART 導入以前につくられたものであり、現在の治療方針に適さなくなっている。本研究班では、これまでの病期分類を再評価し、現状にあわせたカポジ肉腫の治療指針を作成することとした。また、実際の臨床現場では、喉頭蓋病変を伴う重症例、ART 後に免疫再構築症候群として病変が増悪する例、あるいは PLD 無効例など、基本的な治療方針で対応しきれない症例も存在する。このような難治例への対策についても詳細な検討を行った。

B. 研究方法

1990～2010 年末までに当院でカポジ肉腫と診断された 102 例について、その病変部位、検査所見、治療方針や経過などを、診療録を用いて後方視的に調査した。さらに ACTG による病期分類の問題点を考慮し、各症例の臨床所見を詳細に検討する

ことで、治療方針を決定するためのガイドラインを作成した。

(倫理面に対する配慮)

承認前の PLD については、エイズ治療薬研究班からの供給薬によって治療を行っている。この際には、同研究班の規定によるインフォームドコンセントを行い、同意書を取得後に治療を開始した。

C. 研究結果

1990～2010 年末までに、臨床的にカポジ肉腫と診断された症例は 102 例 (男性 102 例、女性 0 例) であった。診断時における CD4 陽性リンパ球数は平均 101.8 (0～624) / μ L で、CD4 数 100 未満の発症が 70 例 (68.6%) と多くをしめていたが、CD4 数 200/ μ L 以上の比較的高い免疫状態での発症も 19 例 (18.6%) に認められていた。

カポジ肉腫の主な病変部位は、皮膚 83 例 (81.4%)、口腔内 42 例 (41.2%)、消化管 44 例 (43.1%)、肺 13 例 (12.7%)、肝臓 6 例 (5.9%) などであった。

経過中に ART を導入できたのは 61 例であった。このうち、ART のみで治療を行ったのは 44 例 (72.1%) で、ART に加えて pegylated liposomal doxorubicin (PLD) による化学療法を開始したのは 17 例 (27.9%) であった。

現在、エイズ合併のカポジ肉腫には、エイズ臨床試験研究グループ（AIDS Clinical Trials Group：ACTG）腫瘍学委員会による病期分類がある。（表1）我々の調査では、カポジ肉腫に対する化学療法の適応は「免疫機能（Immune system: I）」や「全身性疾患（Systemic illness: S）」とは関係なく、「腫瘍（Tumor:T）」のみによって決定されていた。カポジ肉腫はARTによる改善も期待できることから、T1病変の中にも化学療法を必要としない例が多く含まれていた。

化学療法が必要とされた例は、顔面や四肢に集簇して浮腫を伴う場合、咽頭・喉頭部の病変、肺病変、消化器病変でも広範囲にわたる場合、鼠径部に集簇したリンパ節病変などであった。

PLDを投与した1例においては、PLDの継続にても寛解増悪を繰り返したため paclitaxel (PTX)へと変更し治療されていた。[2011年度研究報告、第25回日本エイズ学会、2011、東京]

喉頭蓋病変があった3例のうち、2例においては緊急の気道切開が必要となっていた。また、喉頭蓋病変が、免疫再構築症候群と喉頭蓋浮腫に対するステロイド投与によって増悪したと考えられた例も経験されていた。[第27回日本エイズ学会、2013、熊本]

D. 考察

カポジ肉腫における皮膚病変は、その広がりや進行の早さが様々であった。皮膚病変が集簇すると四肢や顔面を中心に浮腫が出現し、疼痛をともなうこともある。

口腔内病変も比較的多く認められ、口蓋や歯肉が好発部位となっていた。内臓病変では、消化管病変が最も多く、肺や肝臓の病変も認められた。カポジ肉腫が直接の死因となることは稀であるが、肺病変は呼吸不全、喉頭部病変は浮腫をとめない気道狭窄の危険性が高かった。

エイズに合併したカポジ肉腫においては、ARTによる改善も期待できることがわかっている。重症例においては化学療法が必要となり、現在は第一選択として pegylated liposomal doxorubicin (PLD)の投与が行われている。

化学療法は、HIV感染症の治療における免疫回復に対しては不利となり、他の日和見疾患発症の危険性も高まる。したがって、その治療適応を適切に判断していくことは、カポジ肉腫治療の重要なポイントとなる。

しかし我々の調査結果では、カポジ肉腫の病変の広がり方や経過は多彩であり、これまで利用されてきたACTG分類における「腫瘍（Tumor:T）」の項目も、病気の重症度を的確に表現しきれてはいなかった。そして、化学療法の適応は「腫瘍（Tumor:T）」の状況のみによって決定され、T1病変の中にも化学療法を必要としない例が多く含まれていることがわかった。このように、ART時代以前につくられたACTG分類は、ARTによる免疫回復や、ART自体による抗腫瘍効果が考慮されおらず、現在の治療に結びつく分類とはいえなかった。

そこで当研究班では、化学療法の適応を決定するためにはT1分類に属する病態をさらに検討する必要があると考え、カポジ肉腫による多彩な病変についての詳細な調査を行った。その結果、顔面

表1
カポジ肉腫の病期分類（ACTG）

	リスク良好 (以下のすべて)	リスク不良 (以下のいずれか)
腫瘍 (T)	【T0】 皮膚やリンパ節に限局 軽度の口腔内病変	【T1】 腫瘍が原因の浮腫 広範な口腔内病変 リンパ節以外の内臓病変 (肺、消化管、肝臓など)
免疫機能 (I)	【I0】 CD4数 > 200/μl	【I1】 CD4数 < 200/μl
全身性疾 (S)	【S0】 日和見疾患既往(-) カンジダ既往(-) B症状(-) PS < 70%	【S1】 日和見疾患既往(+) カンジダ既往(+) B症状(+) PS < 70% 他のHIV関連疾患

や四肢に浮腫を伴う場合、肺病変、喉頭部病変などにおいては、特に化学療法の開始がすすめられることがわかった。そして、これらの検討をもとに、現在の治療状況から考えられる現在の治療方針をまとめた。(図 1)

難治例の調査では、PLD の無効例や再燃を繰り返す例があり、そのような例でもパクリタキセル (PTX) が有効である可能性が示唆された。喉頭部に発症した例では、進行にともない浮腫をとまなうことで気道狭窄を起こし致命的となる危険性が高かった。また ART 開始後に、免疫再構築症候群として病変が増悪する例もあり、このような場合には化学療法の開始を考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

AIDS に合併するカポジ肉腫の臨床像は多彩であり、従来の病期分類で化学療法の適応を判断することは困難であった。しかし、本研究で多くの症例を調査したことによって、化学療法を開始する基準を示した手引きが作成された。

カポジ肉腫における化学療法の適応を決めるためには、腫瘍の状態を適切に判断することも重要なポイントとなる。しかし、カポジ肉腫は他の疾患ではほとんど見ることがない合併疾患であり、我が国においては HIV 診療を行っている医師でも、多くの症例を経験することは難しいというのが現状である。そこで、作成された冊子には、診療経験の少ない医師にも参考となるような画像所見を

多く掲載した。さらに、難治例や重症例を詳細に検討することで得られた、臨床上の注意点についても解説も行った。

F. 研究発表

学会発表

- 1) 「HIV 関連カポジ肉腫の臨床像と治療方針に関する検討」
- 2) 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会
「カポジ肉腫による気道狭窄を生じたエイズ患者 3 例の検討」
第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

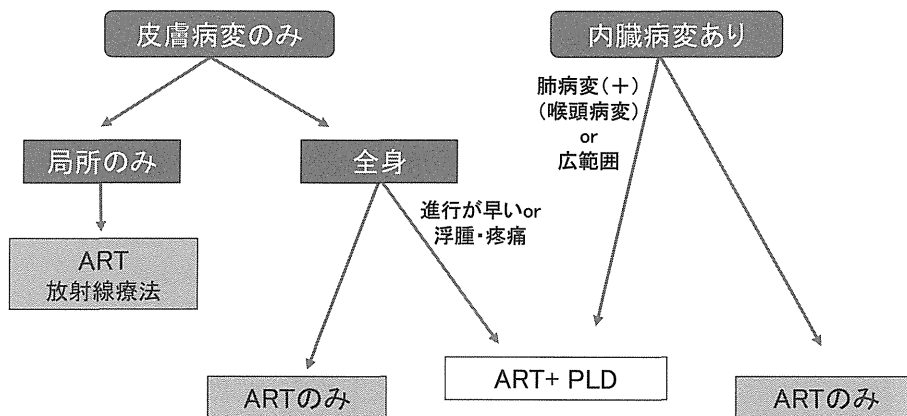
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



治療方針についての考え方をフローチャートにまとめた (PLD: pegylated liposomal doxorubicin)

図 1
カポジ肉腫の治療方針

HHV-8 感染症の病態と治療

研究分担者 照屋勝治 国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター 病棟医長

研究協力者 柳川泰昭 国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センター
永田尚義 国立国際医療研究センター消化器内科

研究要旨

HIV 感染者における HHV-8 関連疾患の全国実態調査を実施した。リポゾーマルドキソルピシン (PLD) などの化学療法を必要とする予後不良例が少なからず存在し、死亡率も高い現状が判明した。一方で、日本では保険診療として使用可能な薬剤が限られており、適切なマネジメントを行い予後をさらに改善するためには、治療に必要ないくつかの薬剤について保険適用薬として認可する必要があると考えられた。

カポジ肉腫 (KS) の深部臓器病変として最も頻度の高い消化管 KS に関して臨床的解析を行い、消化管 KS の 8 割で消化器症状がなく、3 分の 1 で皮膚 KS を認めないことを明らかにした。この結果に基づき、消化管内視鏡検査の適応の判断は、CD4 数や感染経路に基づいて行うべきであることを提言した。予後不良のキャッスルマン病 (MCD) の治療については、現在までの知見を踏まえた上で、リツキシマブを主体とした治療を提言した。

KS 症例について、死亡を primary outcome とした最適な PLD の投与回数についての臨床的検討を行った。108 例の KS 症例の臨床的検討を行った結果、KS 症例の多くが診断時にはすでに重度の免疫不全状態であり、その後に発症した日和見疾患の数が有意に予後と関連し、PLD 治療と予後との関連は見られなかった。これは、現在の標準治療と考えられている PLD の一律投与 (4-6 回) が免疫不全を助長することで逆に予後を悪化させている可能性を示唆していた。HHV-8 関連疾患として最も予後不良かつ稀な疾患である原発性滲出性リンパ腫 (PEL: primary effusion lymphoma) について、自施設の症例についての臨床的解析を行った。4 例の HIV 合併 PEL 中の 3 例で腫瘍形成が見られ、1 例の CR 例が確認された。

A. 研究目的

抗 HIV 療法 (ART) の進歩により 1998 年以降、日本の HIV 感染者の生命予後は劇的に改善した。しかし、HHV-8 関連疾患のカポジ肉腫 (KS) については、生命予後はもちろん、QOL に与える影響が大きいため、ART が広く行われるようになった現在でも臨床上の大きな問題となっている。2007 年のリポゾーマルドキソルピシン (PLD) の登場以降、KS の治療は比較的容易になっているが、PLD 治療抵抗性病変や、副作用等により PLD が投与できない症例が少なからず存在しているのが現状である。また、従来より予後不良とされている肺 KS などの深部臓器病変の診断や PLD の治療効果については、国内外を含め現時点では十分な知

見がない。さらに、近年、世界的に HHV-8 関連疾患としてキャッスルマン病 (MCD) の報告例が急増しており、重篤かつ致死的な疾患であることから、本疾患の日本における実態把握も急務となっている。稀ではあるが標準治療が確立しておらず、予後不良な原発性滲出性リンパ腫 (PEL) も、日本における HIV 患者数の急増に伴い、今後問題になってくだろうと推測される。本研究では、全国の HIV 感染者における HHV-8 関連疾患 (KS、MCD、PEL) の発生状況および治療の実態に関する基礎的データを収集し、それを元に「診断・治療ガイドライン」等を作成することで日本における HHV-8 関連疾患のマネジメント向上を図ることを目的とする。

B. 研究方法

1. HHV-8 関連疾患の発生状況および治療の実態調査

日本におけるこれまでの HHV-8 関連疾患の発生状況および治療の実態を把握する目的で、アンケート調査を実施した。

1) 対象：全国のエイズ拠点病院 380 施設。

2) 方法：アンケート協力依頼を郵送により行った。回答の便宜を図るために、web によるオンラインアンケートと紙媒体のいずれでも回答可能とした。回答項目に「転院先」を記載することで、拠点病院間で同一症例の重複を除外できるよう配慮した。

2. 消化管 KS 病変に関連する因子の検討 (永田尚義)

ACC に通院中の HIV 患者で消化器内視鏡検査を実施した 1027 例を対象に、診療録を元にした後ろ向き検討を行った。感染経路、CD4 数、HIV-RNA 数、消化器症状の有無が、消化管 KS 病変の有無と程度に関連するかどうかについて解析を行った。

3. 消化管 KS の内視鏡生検病理診断による偽陰性率とそれに関連する因子の検討 (永田尚義)

KS は粘膜下病変であるため、内視鏡下での生検診断では理論的に偽陰性となるリスクがある。ACC に通院中の HIV 患者で最終的に消化管 KS であると診断された病変のうち、生検病理を行った 116 病変を対象に、偽陰性率および偽陰性に関連する因子について、診療録を元にした後ろ向き検討を行った。

4. 診療手引きの作成 (照屋勝治、永田尚義)

診断が時に困難である消化管 KS の診断について一項目を割り、診断の鍵である消化管内視鏡検査の適応と、多彩な KS 病変の画像を多用することで診断の一助となることをめざす。

MCD については、診断および治療に関する現在の知見を網羅的に要約した臨床現場で役立つような手引きを作成する。特に治療については、臨床上に有効であった具体的治療例を提示する。

5. KS 症例の臨床的検討 (研究協力者：柳川泰昭)

1999 年から 2013 年までに国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センターで経験した 108 例の KS 症例を対象に臨床的検討を行った。患者背景、治療内容、予後等に関して診療録を元にデータを抽出し、予後 (死亡) に関連する因子の解析を行った。

6. PEL 症例の臨床的検討 (研究協力者：柳川泰昭)

1999 年から 2013 年までに国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センターで経験した 4 例の PEL 症例を対象に臨床的検討を行った。診療録より臨床像、治療内容、治療効果についてデータ抽出を行った。

C. 研究結果

1. HHV-8 関連疾患の発生状況および治療の実態調査

46 施設 (拠点病院の 12.1% を占める) より 311 例の KS と 8 例の MCD の症例情報が収集できた。

1) KS について

症例は 1 例を除いて全例男性であった。年齢は 20-50 歳代がほとんどであるが、全体の 9.6% が 60 歳以上の症例であった。発症時の CD4 数は症例の 8 割が CD4 < 200/μL の重度免疫不全状態であった。一方で、38.1% は ART 導入中の発症であり、8.7% は「ART 開始後の免疫能改善に伴う発症あるいは病変の悪化がみられた」免疫再構築症候群 (IRIS) であると判断されていた。

KS の病変部位 (有効回答 311 例、重複あり) については、原則的に PLD による治療適応と考えられる消化管病変および肺病変が、それぞれ 35.4%、14.8% で認められた。

PLD による治療は全体の 41.9% に実施されていた。2 例で現在、日本で使用が認可されていないパクリタキセルによる治療が行われており、ドキシル不応例などによる治療抵抗例が少なからず存在していることが示唆された。

PLD の治療効果については 90.1% で有効と判定されたが、4.5% が不変、5.4% は治療中に悪化していた。予後について情報が入手できた 296 例については、20.3% が死亡していた。ドキシル使用例 111 例に限った場合の死亡率でも 13.5% と高率であった。

2) MCD について

4 施設より 8 例の症例の情報が収集できた。8 例中 5 例 (62.5%) は ART 実施中の発症であり、アンケート実施時点で 3 例 (37.5%) が死亡していた。さまざまな治療法が行われているが、完全寛解は 2 例 (25%) のみと予後不良であった。

2. 消化管 KS 病変に関連する因子の検討

対象患者 1027 例のうち、46 例で皮膚 KS、33 例で消化管 KS を認めた。消化管 KS を認めた 33 例のうち 26 例 (78.8%) は消化器症状を全く認めず、8 例 (33.3%) は皮膚 KS を伴っていなかった。皮

膚 KS を認めない場合に、消化管 KS の存在と関連していた因子は、CD4 数 $<100/\mu\text{L}$ (OR 9.55, $p<0.05$) であり、男性同性愛者 (OR 5.18, $p<0.1$) でリスクが高い傾向があった。CD4 数 $<100/\mu\text{L}$ と HIV-RNA 量 $>100,000$ copies/mL は、潰瘍形成や腫瘤形成などの重症消化管 KS と関連していた。

3. 消化管 KS の内視鏡生検病理診断による偽陰性率とそれに関連する因子の検討

生検を行った 116 病変の病理診断では、41 例 (35.3%) が偽陰性の結果だった。多変量解析で、食道病変は偽陰性率が高い傾向があり (4 例全例が偽陰性、OR 7.26, $p=0.08$)、pathy な病変では有意に偽陰性率が高かった (40 例中 22 例、OR 3.30, $p<0.01$)。

4. 診療手引きの作成

消化管 KS の診断については、上記 2) , 3) の臨床的検討結果を踏まえて記載を行った。便潜血や消化器症状の有無は消化管 KS の診断に全く有用性がないこと、リスク因子として CD4 $<100/\mu\text{L}$ HIV-RNA $\geq 100,000$ copies/mL をあげた。多彩な内視鏡所見を呈し、経験の浅い臨床医にはしばしば診断が困難であるため、臨床症例の内視鏡画像を 8 点掲載し診断の一助となるよう心がけた。確定診断の根拠となる免疫染色などの病理像も 3 点掲載した。

MCD については、標準治療としてはまだ確立していないが、エビデンスとして集積しつつあるリツキシマブによる治療を推奨する記載とした。診断における HHV-8 DNA の検出と CRP 値の有用性、また高頻度に合併する悪性リンパ腫の評価に Ga シンチが有用である可能性についても言及した。治療法が確立していない状況を踏まえ、ACC での治療奏功例の具体的経過について記載することで、治療方針決定の指針となることを目指した。

5. KS 症例の臨床的検討

1) 患者背景

年齢の中央値は 41 歳 (35-52 歳)、KS 診断時の CD4 数は $63/\mu\text{L}$ (29-146) であった。中央値で 68 ヶ月 (30-108) の観察が行われていた。

2) KS 診断時の CD4 数

診断時の CD4 数は 85% の症例が $CD4<200/\mu\text{L}$ 、43% が $CD4<50/\mu\text{L}$ であり、KS 症例の大多数が発症時点ですでに重度の免疫不全状態であった。

3) KS 診断時の他の AIDS 指標疾患

KS 発症時の重度免疫不全を反映して、症例の

67% がすでに他の AIDS 指標疾患を発症していた。30% の症例は 2 個以上の AIDS 指標疾患の併発が見られていた。

4) PLD の投与回数

PLD による治療は 52 例 (48%) に対して行われた。標準治療である 4 コース以上の PLD が投与されたのは全体の 39% であった。61% は標準治療より回数の少ない 1-3 回の投与にとどまっていた。

5) KS 診断後に新たに発症した日和見疾患

全体の 33% で観察期間中に新たな日和見疾患を発症していた。10% で 2 つ以上の疾患の発症がみられた。

6) 予後に関連する因子の解析

観察期間中に 12 例の死亡が確認された。全例が KS 発症後 1 年以内の死亡であり、このうち KS が死因と判断されたのは 3 例 (2.8%) であった。推定 5 年生存率は 88.9% であった。予後に関連する因子の多変量解析では、「KS 診断後の 2 つ以上の新たな日和見疾患の発症 (HR 5.989, $p<0.015$)」が、有意に予後と関連していることが判明した。PLD の投与自体は予後とは全く相関していなかった ($p=0.933$)。

6. PEL 症例の臨床的検討

1) 患者背景

4 例の HIV 感染合併 PEL 症例は全て男性同性愛者であり、PEL 発症時の年齢 (中央値 [範囲]) は 42 歳 [30-75] であった。3 例が ART 未導入下で CD4 数 $50/\mu\text{L}$ 未満であったが、1 例は ART 実施下で CD4 数 $350/\mu\text{L}$ と比較的免疫良好な状態で PEL を発症していた。

2) PEL の病態と予後

1 例は滲出性胸水以外にリンパ腫病変を認めず、典型的な原発性滲出性リンパ腫の像を呈していたが、3 例は表在リンパ節・腹腔内リンパ節・胸壁・大腿・胃粘膜・肝臓・脾臓に腫瘤形成を認めた。2 例で CHOP 療法、2 例で EPOCH 療法が行われたが、初回治療への反応は不良 (PD:progressive disease) であった。3 例は診断後 7-25 週間で死亡が確認された。1 例はサルベージ治療として THP-COP が行われ CR (complete response) となり、診断後 1 年時点で生存が確認されている。

D. 考察

HHV-8 関連疾患は ART のみでの完全なコントロールが困難な症例が少なからず存在し、多くの症例で PLD などによる化学療法が行われているが、国内における診断と治療の実態について、これまで具体的な調査が行われたことはなく、今回の検討で概要が明らかになった点は有意義であったと考える。収集された KS 症例の 4 割程度では、致命的となりうる深部臓器病変を合併していた。41.9% で PLD 投与がなされていたが、その効果については 9 割が良好である一方、1 割では不変～無効であり PLD 単剤のみで全 KS 症例を完全寛解とすることが困難であるのが現状である。本調査の結果を踏まえ、すでに欧米では KS の治療薬として認可されているパクリタキセルを、早期に日本でも使用できるようにする必要性を提言したい。MCD は 8 例が収集されたが、死亡率の高さ (37.5%) と治療反応性の悪さ (完全寛解 25%) が問題であった。症例の 5 例 (62.5%) が ART 中の発症であり、6 例 (75%) では発症時の CD4 数が 200 以上と保たれている症例であることも特徴である。標準治療法がまだ確立していない疾患であるが、最近、リツキシマブによる治療のエビデンスが集積しつつある状況である。今回収集された症例のうち完全寛解となった 2 例でもリツキシマブが使用されていた。一方で、リツキシマブは現時点でキャスルマン病に対する保険診療が認められていない。これについても、早期に日本で使用できるようにする必要性を提言したい。

消化管 KS は上記の全国調査での結果では 35.4% の症例で見られており、深部臓器病変としては頻度が最も高い。消化管 KS は時に腫瘍からの出血、消化管穿孔、腫瘍増大による消化管閉塞を来しようが、重篤化するまで消化器症状はほとんどなく、皮膚 KS 病変を認めない症例も少なからず存在することが知られており、どのような状況で消化管 KS の診断を目的とした内視鏡検査を実施すべきか、そして内視鏡生検の診断率がどの程度なのかというデータも国内外で知見がほとんどない。今回の検討で行った大規模な臨床データの解析により、消化管 KS を認めた症例の 8 割で消化器症状を認めず、3 分の 1 で皮膚 KS を認めなかったことから、これらを指標とした消化管内視鏡の適応に関する適切な判断は不可能であることが示された。一方で、皮膚 KS を認めず、消化器症状が全くない場合でも、男性同性愛者であり、CD4 数 $<100/\mu\text{L}$ の場合には消化管 KS のリスクが高く、また後者は予後と関連しうる重症 KS 病変とも関連

していた。本研究では、この 2 つを消化管内視鏡の適応とすべきであると提言したい。さらに、本検討で消化管 KS では生検病理診断における偽陰性率が驚くほど高く、特に食道病変でその頻度が高いことも見いだした。内視鏡生検病理の結果を解釈する上での重大な注意点であると考えられた。

確立した診断法がなく、予後不良である MCD については、最新の国内外の文献検索を行い、現在までの知見を網羅的に要約し、その上で、実際の治療奏功例の臨床経過を提示した診療の手引きを作成した。これが診療経験の乏しい医療機関の MCD 治療のヒントになるとともに、今後、同じ治療法での臨床例を蓄積していくことで、今後の国内におけるエビデンス構築への足がかりとなりうることを期待している。

KS に対する PLD は腫瘍の縮小効果に優れ、副作用も少ない。しかしながら、PLD の治療適応や、治療を行う場合の最適投与回数について、予後の観点から検討された報告はほとんどなく、多くの施設で独自の判断基準により KS 病変の CR を目指した 4-6 コースの PLD 投与が行われているのが現状である。今回、108 例の KS 症例の臨床的検討を行った結果、KS 症例の多くが診断時にはすでに重度の免疫不全状態であり、その後に発症した日和見疾患の数が有意に予後と関連し、PLD 治療の予後との関連は見られなかった。これは、現在の標準治療と考えられている PLD の一律投与 (4-6 回) が免疫不全を助長することで、逆に予後を悪化させている可能性を示唆していた。この結果は、本研究班が「手引き」内で示した「PLD の投与回数に関する提言」の妥当性を示すものであると考えられる。

今回、検討された 4 例の HIV 感染合併 PEL のうち、3 例で腫瘍形成がみられたことは興味深い。一般的には本疾患での腫瘍形成は稀であると考えられているため、今後の情報集積が必要であると考えられる。予後は不良であるが、1 例で CR 例が確認された。有効な標準治療の確立のため、これについても、今後の全国の症例情報を集積した治療成績の検討が必要であると考えられた。

E. 結論

HIV 感染者における HHV-8 関連疾患に関する日本初の実態調査を実施した。PLD などの化学療法を必要とする予後不良例が少なからず存在し、死亡率も高い現状が判明した。一方で、日本で保険診療として使用可能な薬剤が限られており、適切

なマネジメントを行い予後を改善するためには、治療に必要ないくつかの薬剤について保険適応薬として認可する必要があることを本調査を踏まえて上で提言したい。

頻度の高い消化管 KS の内視鏡検査の適応、および偽陰性の問題点については、大規模な臨床データをもとに解析を行った。MCD については現在までの知見を網羅的にまとめた。以上の結果に基づいて診療手引きを作成し、エビデンスの乏しいこれらの領域の診療に関する提言を行った。

KS 症例の予後に関する検討では、診断後の KS 以外の日和見疾患の発症が有意に関連しており、ART による免疫再構築が最も重要であることが示唆された。これは本研究班で提言した「PLD の使用基準、回数について再考を促す（早期中止を検討）」の妥当性を示すものであると考えられた。

HIV 合併 PEL では腫瘍形成が稀ならず見られた事、1 例の CR 例があったことを示した。標準治療の確立していない予後不良の疾患であり、今後も継続した臨床情報の収集が望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Naoyoshi Nagata, Katsunori Sekine, Toru Igari, Yohei Hamada, Hirohisa Yazaki, Norio Ohmagari, Junichi Akiyama, Takuro Shimbo, Katsuji Teruya, Shinichi Oka, and Naomi Uemura, False-Negative Results of Endoscopic Biopsy in the Diagnosis of Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma in HIV-Infected Patients. Pathology Research International Volume 2012 (2012), Article ID 854146
- 2) Naoyoshi Nagata, Takuro Shimbo, Hirohisa Yazaki, Naoki Asayama, Junichi Akiyama, Katsuji Teruya, Toru Igari, Norio Ohmagari, Shinichi Oka, Naomi Uemura (2012) Predictive Clinical Factors in the Diagnosis of Gastrointestinal Kaposi's Sarcoma and Its Endoscopic Severity. PLoS ONE 7(11): e46967.

2. 学会発表

- 1) 照屋勝治、日和見感染症、診断、治療の実際、日本エイズ学会認定医講習会、第 27 回日本エイズ学会学術集会・総会、熊本、(2013.11)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

カポジ肉腫の現状把握 HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体の保有率について

研究分担者 上平朝子 国立病院機構大阪医療センター 感染症内科 科長
 研究協力者 渡邊 大 国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター
 矢嶋敬史郎 国立病院機構大阪医療センター 感染症内科

研究要旨

1) カポジ肉腫の現状把握

【目的】カポジ肉腫の診療ガイドラインの作成にあたり、悪性リンパ腫や血球貪食症候群など、HHV-8 関連疾患について調査した。【方法】2005 年 9 月～2013 年 12 月までに、大阪医療センターで生検により診断したカポジ肉腫症例 44 例のうち、血中の HHV-8-DNA を測定した 29 例について調査した。【結果】8 例で HHV-8-DNA が検出され、ウィルス量は 74 ～ 1,400,000 copies/mL であった。このうち 3 例で血球貪食症候群 (VAHS) や悪性リンパ腫を合併していた。【考察】HHV-8 関連疾患を発症した 3 例は血中ウィルス量が高値であり、病勢との関連が示唆された。カポジ肉腫症例で高度の血球減少を呈する場合は、血中の HHV-8-DNA の定量を行うことが推奨される。

2) HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体の保有率についての研究

【目的】HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体の保有率については、限られた報告しかない。そこで、大阪医療センターに通院中の HIV 感染者の抗 HHV-8 抗体保有率について、2009 年における横断的調査と、2009 年と 2012 年における縦断的調査を行った。【方法】血漿を採取し、whole virus lysate を用いた ELISA キットで抗 HHV-8 抗体価を測定した。HHV-8 関連疾患の既往のある症例 (KS/MCD 群) と既往のない症例に分類し、既往のない症例は HIV の推定感染経路で、同性間群、異性間・その他群、血液製剤群の 3 つに分類した。各群における抗体保有率を比較した (横断的調査)。2012 年に検体を採取した症例については、2009 年の結果と比較した (縦断的調査)。本研究は倫理審査をうけ、承認を得た (承認番号 11061)。【結果】126 例より検体を採取して抗 HHV-8 抗体価を測定した。KS/MCD 群 (15 例) は全例で抗体陽性、血液製剤群 (11 例) は全例で陰性であった。同性間群 (84 例) は 25 例 (30%) で、異性間・その他群 (16 例) は 1 例 (6%) で抗体陽性であった。縦断的検討では、同性間群 (50 例) のうち 2009 年と 2012 年の両方が陽性であった症例が 10 例 (20%)、陰転化が 1 例 (2%)、陽転化が 6 例 (12%)、両方が陰性であった症例が 33 例 (66%) であった。一方、KS/MCD 群 (9 例)、異性間・その他群 (8 例)、血液製剤群 (7 例) では陰転化・陽転化を示した症例を認めなかった。【考察】感染経路が同性間性的接触である HIV 感染者で、高い抗体保有率と高い陽転化率を認め、これらの症例では HHV-8 は現在流行している病原体の一つと考えられた。

1) カポジ肉腫の現状把握

A. 研究目的

カポジ肉腫は、エイズ関連悪性腫瘍の中でも最も頻度の高い悪性腫瘍であり、診療ガイドラインの作成が必要である。そこで、ガイドラインの作成にあたり、当院におけるカポジ肉腫症例について調査し、HHV-8 が関連する悪性リンパ腫や血球貪食症候群といった難治性病態と HHV-8 ウィルス量との関係を検討した。

B. 研究方法

2005年9月～2013年12月までに、大阪医療センターで生検により診断したカポジ肉腫症例44例について診療録より患者背景、発症時の臨床所見、治療内容、転帰について調査した。

(倫理面に対する配慮)

個人が特定されないように、氏名・生年月日・カルテ番号といった項目は調査項目から除外した。臨床情報の取り扱いについては注意を行った。

C. 研究結果

2005年9月～2013年12月までに、大阪医療センターで生検により診断したカポジ肉腫症例は44例であった(図1)。全例が男性で、年齢の中央値は40歳、発症時のCD4値の平均は92.7/ μ L、転帰は37例が寛解、3例が死亡、その他4例であった。

病変部位では、四肢末梢、口腔内、消化管。体幹、気道、顔面、外陰部・肛門リンパ節であった。治療は、半数の症例で化学療法が実施されており、治療薬は主にリポゾーマルドキソルピシンであった(図2)。施行回数は、6クールが最も多かった(図3)。

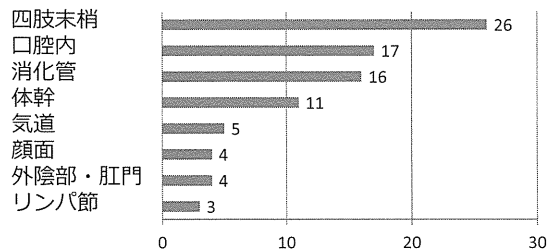
性別	男性 n=44	女性 n=0
年齢(発症時)	26～79歳(中央値)	40歳、平均 42.5歳)
CD4陽性リンパ球数	1～406/ μ l <200/ μ l ≥200/ μ l	平均: 92.7/ μ l n=38 n=6
発症時のHIV-RNA量	40～5,020,000 copies/ml (中央値 193,000 copies/ml)	
合併していたエイズ指標疾患	ニューモシスチス肺炎 CMV感染症(肝・脾・リンパ節以外) カンジダ症(食道) 悪性リンパ腫 クリプトコッカス症(肺以外) 結核	10例 6例 4例 2例 2例 1例
転帰	寛解 37例	死亡 3例 その他(治療中・転院など) 4例

(2005年9月～2013年12月まで)

図1

大阪医療センターにおいて生検により診断したカポジ肉腫症例の患者背景

病変の部位



化学療法の有無

*重複例を含む



図2

病変の部位と化学療法の有無

血中の HHV-8 ウイルス量は 29 例で測定されていた。このうち 8 例で HHV-8-DNA が検出された。HHV-8 ウイルス量は 74 ~ 1,400,000 copies/mL であり、このうち 3 例で血球貪食症候群や悪性リンパ腫を合併しており、HHV-8 のウイルス量は 10^4 copies/mL 以上であった。特にウイルス量が 10^6 copies/mL 以上と高値であった 1 例は、血球貪食症候群と HHV-8 関連悪性リンパ腫の併発を認めた (図 4)。

D. 考察

HIV 感染者など免疫不全宿主では、HHV-8 の再活性化から血球貪食症候群を発症することがあり、重症度と HHV-8 DNA 量との相関が指摘している。

特に高ウイルス量を呈する症例では、致死的な血球貪食症候群を発症することが知られており、ウイルス量が 1.0×10^6 copies/mL 以上の場合では重篤化する可能性がある。本研究において HHV-8 関連血球貪食症候群を呈した 3 例は血中 HHV-8-DNA を検出し、全例で 10^4 copies/mL 以上の高ウイルス量であった。症例数は少ないが、重症度と HHV-8-DNA 量との相関が示唆される。

本研究で解析した血球貪食症候群を発症した 3 例のうち 2 例では、ウイルス量を測定することで適切な診断と治療につながり、病状は改善した。症例数が少ないため評価は難しいが、HHV-8 による血球貪食症候群は、早期に診断できれば、予後の改善につながる可能性がある。急速に進行するカポジ肉腫や高度の血球減少を呈する症例ではこ

化学療法の種類		化学療法の施行回数 (liposomal doxorubicin 23例)	
Liposomal doxorubicin	23例	1~5	2例
VP-16	1例	6	12例
Paclitaxel	1例	7	1例
		8	4例
	*重複例あり	10kur以上	3例
		治療中	1例

免疫再構築症候群の有無 (n=38)

あり	13例*	* 増悪例13例中6例で追加の化学療法が必要であった
なし	25例	* 免疫再構築症候群として発症した症例を含む

図 3
化学療法の種類、施行回数

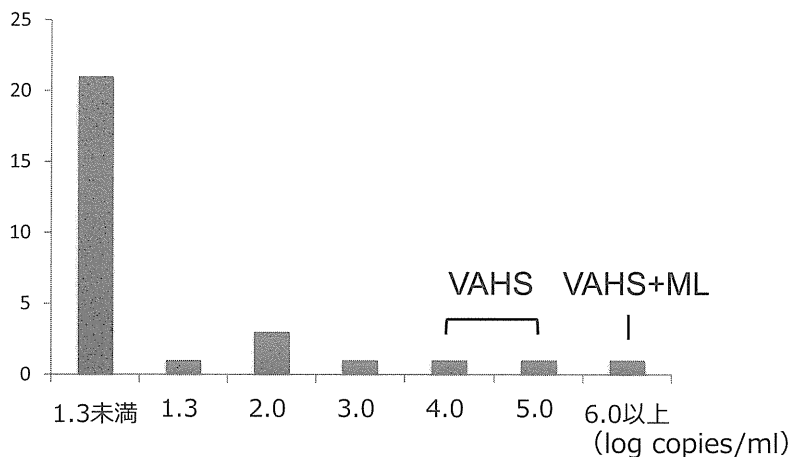


図 4
HHV-8 ウイルス量の測定 (診断時, 血中) n=29

うした HHV-8 関連疾患の関与が疑われるため、血中 HHV-8-DNA の定量を行うことが必要である。

血球貪食症候群による血球減少や発熱などは、非特異的な症状であり、本症の疾患を疑わなければ、HHV-8 のウイルス量を測定することはないと思われる。従って、適切な診断・治療を行うために、まず本病態の存在を知ることが重要であり、診療ガイドラインへの記載を行った。

E. 結論

カポジ肉腫に、血球貪食症候群や血球減少、悪性リンパ腫を合併する症例がある。このような症例では、血中の HHV-8-DNA を測定すべきである。

2) HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体の保有率についての研究

A. 研究目的

国内における抗 HHV-8 抗体の保有率は限られた報告しかない。一般人口においては 0.2 ~ 1.4 % (Fujii ら、J. Med. Virol. 1999、Katano ら、J. Virol., 2000) とされ、那覇や南大東島ではそれぞれ 1.4 % と 3.2 % との報告 (Satoh ら、Jpn. J. Infect. Dis., 2001) があり、いずれにしても抗体保有率は低い。国内の HIV 感染者の抗 HHV-8 抗体の保有率は 12 % と 64 % という報告 (Fujii ら、J. Med. Virol. 1999、Katano ら、J. Virol., 2000) があり、一般人口より高いと思われる。一方、血液製剤による HIV 感染者では抗体保有者を認めなかったという報告も存在する (Shimizu ら、Arch. Dermatol. Res., 2001)。いずれも 10 年以上前の研究であり、HIV 感染者が増加した近年の国内における抗体保有率の報告は存在しないのが実情である。

このような観点から、大阪医療センターに通院中の HIV 感染者を対象に抗 HHV-8 抗体の保有率を検討することとした。平成 23 年度に倫理審査を行い、平成 24 年度に 2009 年における横断的調査、平成 25 年度に 2009 年と 2012 年における縦断的調査を行った。

B. 研究方法

Advanced Biotechnologies Inc の whole virus lysate を用いた ELISA kit で HIV 感染者の抗 HHV-8 抗体を測定した。測定にあたっては、ELISA の説明文書通りに行い、S/CO が 0.76 以上を陽性とした。HHV-8 関連疾患の既往のある症例 (KS/MCD 群)

と既往のない症例に分類し、既往のない症例は HIV の推定感染経路で、同性間群、異性間・その他群、血液製剤群の 3 つに分類した。各群における 2009 年の抗体保有率を比較した (横断的調査)。また、2009 年と 2012 年に抗 HHV-8 抗体を測定し、その変化について検討した (縦断的調査)。

(倫理面に対する配慮)

抗 HHV-8 抗体の測定について、院内の倫理委員会に相当する受託研究審査委員会で倫理審査を行い、承認を取得した (承認番号 11061)。この審査委員会で審査・受理された方法で研究を遂行し、具体的には文書での同意の取得や、検体処理やデータ管理の際の匿名化などを行った。

C. 研究結果

126 例より検体を採取して 2009 年における抗 HHV-8 抗体価を測定した (横断的調査)。KS/MCD 群 (15 例) は全例で抗体陽性、血液製剤群 (11 例) は全例で陰性であった。同性間群 (84 例) は 25 例 (30%) で、異性間・その他群 (16 例) は 1 例 (6%) で抗体陽性であった。抗 HHV-8 抗体の S/CO は、KS/MCD 群と異性間・その他群、血液製剤群においては、カットオフ値 (S/CO=0.76-1) の前後の数値を示す検体がなく、陽性検体と陰性検体の区別が容易であった。一方、同性間群の S/CO は、陽性検体から陰性検体まで切れ目無く連続しており、2 例がボーダーライン陽性 (S/CO が 0.76 以上 1 未満) であった (本研究では陽性と定義した)。

次に縦断的検討を行った。KS/MCD 群 (9 例) は全例、2009 年と 2012 年の両者で抗 HHV-8 抗体は陽性であった。血液製剤群 (7 例) と異性間・その他群 (8 例) においては全例、2009 年・2012 年とも陰性であった。一方、同性間群 (50 例) は 2009 年陽性・2012 年陽性が 10 例 (20%)、2009 年陽性・2012 年陰性 (陰転化) が 1 例 (2%)、2009 年陰性・2012 年陽性 (陽転化) が 6 例 (12%)、2009 年陰性・2012 年陰性が 33 例 (66%) であり、高い陽転化率を認めた。同性間群における 2009 年に抗 HHV-8 抗体が陰性であった症例 (39 例) にのみ注目すると、約 3 年間の陽転化率は 15% であった。

D. 考察

本研究において、大阪医療センター通院中の HIV 感染者においても高い抗 HHV-8 抗体保有率が

観察された。特に推定感染経路が同性間による HIV 感染者に高い抗 HHV-8 抗体保有率 (30%) と高い抗体陽転化率 (約 3 年で 15%) を認めた。

抗 HHV-8 抗体の測定はいくつかの方法がある。本研究で用いた ELISA 法に加え、IFA 法も用いられることが多い。今回は商業ベースで入手可能な ELISA キットを用いた。このキットは whole virus lysate を抗原としているため、LANA に対する抗体のみを保有する症例については見落としがある。また、陰転化した症例やボーダーライン陽性を示した症例が存在したことは、感染後比較的速やかに抗体価が減弱する可能性も示唆された。このような背景からも、本研究での抗 HHV-8 抗体保有率はあくまでも抗体を保有しているかどうかであり、個々の症例において HHV-8 の既感染かどうかの判定には必ずしも有用ではない。

平成 25 年度の縦断的調査で、MSM-HIV 感染者において高い陽転化も観察された。これは HHV-8 の感染が過去のものではなく、現在も感染拡大が進行していることを意味している。また、陽転化した 6 症例とも抗 HIV 療法が継続されており、CD4 数も 1 例を除いて 350/ μ L 以上であった。このことから HHV-8 の流行は、少なくとも免疫不全に伴うものではないと考えられた。

E. 結論

大阪医療センターに通院中の HIV 感染者における抗 HHV-8 抗体保有率について検討した。感染経路が同性間性的接触である HIV 感染者で、高い抗体保有率と高い陽転化率を認め、これらの症例では HHV-8 は現在流行している病原体の一つと考えられた。

F. 研究発表

- 1) Watanabe D, Taniguchi T, Otani N, Tominari S, Nishida N, Uehira T, Shirasaka T: Immune reconstitution to parvovirus B19 and resolution of anemia in a patient treated with highly active antiretroviral therapy: A case report. *J Infect Chemother.* 17(2):283-7, 2011.
- 2) Watanabe D, Ibe S, Uehira T, Minami R, Sasakawa A, Yajima K, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Yamamoto M, Kaneda T, Shirasaka T: Cellulr HIV-1 DNA levels in patients receiving antiretroviral therapy strongly correlate with therapy initiation timing but not with

therapy duration. *BMC Infect Dis.* 11:146, 2011

- 3) Watanabe D, Koizumi Y, Yajima K, Uehira T, Shirasaka T: Diagnosis and Treatment of AIDS-Related Primary Central Nervous Lymphoma. *J Blood Disord Transfus.* S1-001, 2012
- 4) Watanabe D, Yoshino M, Yagura H, Hirota K, Yonemoto H, Bando H, Yajima K, Koizumi Y, Otera H, Tominari S, Nishida Y, Kuwahara T, Uehira T, and Shirasaka T: Increase in Serum Mitochondrial Creatine Kinase Levels Induced by Tenofovir Administration. *J Infect Chemother.* 18(2):675-82, 2012.
- 5) Watanabe D, Otani N, Suzuki S, Dohi H, Hirota K, Yonemoto H, Koizumi Y, Otera H, Yajima K, Nishida Y, Uehira T, Shima M, Shirasaka T, and Okuno T: Evaluation of VZV-specific cell-mediated immunity in adults infected with HIV-1 by using a simple IFN- γ release assay. *J Med Virol.* 85(8):1313-20, 2013

2. 学会発表

- 1) 渡邊 大、蘆田美紗、岡本瑛里子、鈴木佐知子、廣田和之、米本仁史、坂東裕基、矢嶋敬史郎、小泉祐介、大寺 博、富成伸次郎、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：Population-based genotypic tropism test による HIV 感染血友病患者の HIV の指向性の検討 第 25 回近畿エイズ研究会学術集会 京都 2011 年 6 月
- 2) 渡邊 大、吉野宗宏、矢倉裕輝、廣田和之、米本仁史、坂東裕基、矢嶋敬史郎、小泉祐介、大寺 博、富成伸次郎、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：Tenofovir の投与による血中ミトコンドリア CK 活性の上昇に関する研究 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 東京 2011 年 11 月
- 3) 上平朝子、吉野宗宏、渡邊 大、櫛田宏幸、矢倉裕輝、廣田和之、米本仁史、坂東裕基、矢嶋敬史郎、小泉祐介、大寺 博、富成伸次郎、西田恭治、白阪琢磨：当院の NRTI-sparing レジメンの使用経験 第 25 回日本エイズ学会学術集会・総会 東京 2011 年 11 月
- 4) 渡邊 大、坂東裕基、廣田和之、米本仁史、大寺 博、小泉祐介、矢嶋敬史郎、西田恭治、上平朝子、白阪琢磨：Western blot 法が陰性化した AIDS の 1 例 第 197 回日本内科学会近畿地方会 神戸 2012 年 6 月
- 5) 渡邊 大、矢嶋敬史郎、廣田和之、米本仁史、小泉祐介、大寺 博、西田恭治、上平朝子、白