

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591542

研究課題名(和文)EBV関連血球貪食性リンパ組織球症におけるEBV感染T細胞の解析と病態解明

研究課題名(英文)Analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T cells in EBV associated hemophagocytic lymphohistiocytosis

研究代表者

和田 泰三(Wada, Taizo)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：30313646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症(EBV-HLH)は、EBVのCD8+ T細胞への異所性感染とそのモノクローナルな増殖により引き起こされる。我々は、EBV感染CD8陽性T細胞が特定のTCR V $\beta$ を有しCD5発現の低下した異常活性化細胞として同定可能であることを報告し、さらにサイトカインプロファイルの特徴を明らかにした。ただし活性化CD8陽性T細胞におけるCD5発現の低下自体はEBV-HLHに特異的ではないため、TCR V $\beta$ レパトア解析を併用し評価する必要がある。本研究により、これらの細胞解析とサイトカイン解析の併用はEBV-HLHの診断、病態把握に有用であることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：Epstein-Barr virus (EBV)-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) is characterized by ectopic EBV infection in CD8+ T cells and their clonal proliferation. We demonstrate that EBV-infected cells can be detected as highly activated CD5<sup>-</sup>/dim CD8+ T cells that often react with a specific TCR V $\beta$  monoclonal antibody in patients with EBV-HLH, who exhibit characteristic profiles of serum cytokines. Although down-regulation of CD5 in CD8+ T cells is not specific for EBV-HLH, the combined approach of our flow cytometric analysis including TCR V $\beta$  repertoire and cytokine profile analysis may be useful in diagnosis and follow-up of patients with EBV-HLH.

研究分野：医師薬学

キーワード：小児科学 EBウイルス 血球貪食性リンパ組織球症

### 1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス (EBV) は、ヒトに普遍的に存在するヘルペスウイルスで、主として乳児期に B 細胞を標的細胞として初感染する。多くの場合無症状に経過、一部の例で伝染性単核症を発症するが、EBV 特異的な免疫応答により感染は制御され、EBV は B 細胞に潜伏感染を終生続ける。しかし近年、EBV が T 細胞や NK 細胞に異所性に感染し、血球貪食性リンパ組織球症 (HLH) や慢性活動性 EBV 感染症などのリンパ増殖性疾患を引き起こすことが明らかにされている。

急性型のリンパ増殖性疾患である EBV 関連 HLH (EBV-HLH) は、小児の 2 次性 HLH の原因として最も多く、また重症化する危険性が非常に高い。EBV 感染により T 細胞やマクロファージが増殖・活性化し、過剰のサイトカインが産生される結果、HLH を発症すると考えられている。EBV-HLH では、ほとんどの場合、EBV が CD8<sup>+</sup> T 細胞に選択的に感染することが知られているが、その病態には不明な点が依然として多い。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに、EBV-HLH では EBV が異所性に CD8<sup>+</sup> 細胞に感染すること、それらがクローン性に増殖すること、さらに感染細胞が CD5 発現の低下した、特定の T 細胞レセプター (TCR) V を有する、HLA-DR を強く発現した異常活性化 CD8<sup>+</sup> T 細胞としてフローサイトメトリーにより同定可能であることを報告してきた。本研究では、このような表面マーカーをもつ細胞集団のモニタリングとサイトカイン解析の併用が EBV-HLH の診断と病態把握において有用であるか、他の原因による HLH において、同様の表面マーカーを示す CD8<sup>+</sup> T 細胞が出現するか、などを検討した。

### 3. 研究の方法

#### 【対象】

対象は、EBV-HLH、EBV 感染以外による 2 次性 HLH、パーフォリン欠損による家族性 HLH (FHL2) などの遺伝性 HLH である。HLH の診断は、症状や一般検査の他、sIL-2R、フェリチン等により行い、EBV の関与については EBV 抗体価、EBV コピー数、EBV ターミナルリピート解析等にて評価した。FHL2 の診断はパーフォリンのフローサイトメトリーによる細胞内染色と遺伝子解析にて行った。その他の遺伝性 HLH の診断は必要に応じて遺伝子解析を行った。

#### 【方法】

#### (1) EBV 感染細胞の特定

末梢血から比重遠心法にて単核球を分離し、磁気ビーズを用いて、CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、CD20<sup>+</sup> B、CD56<sup>+</sup> NK 細胞を分離した。それぞれ、サイトスピン標本を作製し、EBER-1 in situ ハイブリダイゼーションにより EBV 感染細胞の同定を行った。

#### (2) リンパ球表面マーカー解析

フローサイトメトリーを用いて CD4<sup>+</sup> T、CD8<sup>+</sup> T、<sup>+</sup> T 細胞における活性化マーカー HLA-DR と CD5 の発現を、それぞれ解析した。CD8<sup>+</sup> T 細胞に CD5 陰性の分画が認められれば、経時的に解析した。また同分画に、その他の抗原の特徴的発現がないか、多数の抗体を用いて解析し、EBV 感染との関連を検討した。一般的なリンパ球サブセットも解析した。

#### (3) TCR V レパトア解析

T 細胞のクローナリティを検討するため、フローサイトメトリー法を用いてレパトア解析を行った。23 種類の V 特異的抗体を用い CD4<sup>+</sup> T と CD8<sup>+</sup> T 細胞における V レパトア分布を定量した。

#### (4) サイトカイン測定

ELISA キットを用い、血中の炎症性サイトカイン (IL-6, IL-18, IFN- $\gamma$ , ネオプテリン, TNF- $\alpha$ , 可溶性 TNF レセプター) を定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) EBV-HLH の細胞解析およびサイトカインプロファイルによる病態把握；

EBV-HLH 患児 11 名、EBV による伝染性単核症 (IM) 11 名および FHL2 患児 4 名から採取した急性期の血清もしくは血漿を用いて、炎症性ならびに抑制性サイトカイン計 10 種を ELISA 法にて解析した。EBV-HLH では IM に比べ、IFN- $\gamma$ 、IL-6、IL-10、IL-18、ヘムオキシナーゼ-1 が有意に高値を示した。しかし、これらは FHL2 患児とほぼ同じプロファイルであった。したがって、EBV-HLH で認められたサイトカインプロファイルは、HLH という病態を反映しているものであり、CD8<sup>+</sup> T 細胞に対する EBV の異所性感染に起因しているのではないことが示唆された。

一方 TNF- $\alpha$  は、EBV-HLH、IM ともに上昇していた。また EBV 感染細胞から viral IL-10 が産生される可能性があるが、EBV-HLH における IL-10 高値については、FHL2 と同程度であったことから viral IL-10 の関与は高くないことが示唆された。これらサイトカインプロファイル解析と、フローサイトメトリーによる解析、すなわち CD8<sup>+</sup> T 細胞におけるクローン性増殖と CD5 発現低下の解析を組み合わせることは、EBV-HLH の診断、病態把握に非常に有用であることが示された。

#### (2) FHL における T 細胞の特徴；

FHL は、細胞傷害性顆粒やその放出に関連した異常によって引き起こされる遺伝性 HLH である。細胞傷害活性の低下によりウイルス感染細胞等の除去が制限され、リンパ球やマクロファージの異常活性化と高サイトカインが生じる結果、HLH が引き起こされる。FHL において、EBV-HLH における EBV 感染 CD8<sup>+</sup> T 細胞と同様な表面マーカーの特徴を示す CD8<sup>+</sup> T 細胞が出現するか否かを検討した。

FHL2型(パーフォリン欠損)5例とFHL3型(Munc13-4欠損)1例を対象とした。全例において、高サイトカイン血症が存在する急性期に、CD5発現が低下した異常な活性化CD8<sup>+</sup>T細胞が共通して存在することが明らかになった。同細胞の比率は、ネオプテリンやIFN- $\gamma$ などのサイトカインに反映される炎症の程度と相関し、生存例では治療とともに減少した。TCR V $\beta$ レパトア解析を行ったところ、FHLで認められるCD5発現の低下した活性化CD8<sup>+</sup>T細胞は、オリゴクローン性であり、反応性に増殖していることが示唆された。EBV-HLHでは、感染細胞のモノクローナルな増殖を反映して、特定のTCR V $\beta$ レパトアを有することが多い点と異なっていた。以上より、活性化CD8<sup>+</sup>T細胞におけるCD5発現低下は、EBV-HLHのみならずFHLでも認められ、EBV-HLHに特異的な所見ではないものの、レパトア解析を併用することで、EBV-HLHの診断に極めて有用であることがあらためて示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計24件)

1. Tsuma Y, Imamura T, Ichise E, Sakamoto K, Ouchi K, Osone S, Ishida H, Wada T, Hosoi H. Successful treatment of idiopathic colitis related to XIAP deficiency with allo-HSCT using reduced-intensity conditioning. *Pediatr Transplant*. 2015;19:E25-28. doi: 10.1111/petr.12405. [査読有]
2. Vu QV, Wada T, Tran TT, Ngo DN, Van Dinh T, Nguyen CH, Le HT, Yachie A, Nguyen SN. Severe congenital neutropenia caused by the ELANE gene mutation in a Vietnamese boy with misdiagnosis of tuberculosis and autoimmune neutropenia: a case report. *BMC Hematol*. 2015;15:2. doi: 10.1186/s12878-015-0020-x. [査読有]
3. Wada T, Matsuda Y, Muraoka M, Toma T, Yachie A. Fecal eosinophil-derived neurotoxin in cow's milk-sensitive enteropathy: A case report. *Allergol Int*. 2015;64:99-100. doi: 10.1016/j.alit.2014.11.001. [査読有]
4. Wada T, Toma T, Muraoka M, Matsuda Y, Yachie A. Elevation of fecal eosinophil-derived neurotoxin in infants with food protein-induced enterocolitis syndrome. *Pediatr Allergy Immunol*. 2014;25:617-619. doi: 10.1111/pai.12254. [査読有]
5. Wada T, Matsuda Y, Muraoka M, Toma T, Takehara K, Fujimoto M, Yachie A. Alu-mediated large deletion of the CDSN gene as a cause of peeling skin disease. *Clin Genet*. 2014;86:383-386. doi: 10.1111/cge.12294. [査読有]
6. Koura U, Sakaki-Nakatsubo H, Otsubo K, Nomura K, Oshima K, Ohara O, Wada T, Yachie A, Imai K, Morio T, Miyawaki T, Kanegane H. Successful treatment of systemic cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficiency using allogeneic bone marrow transplantation followed by adoptive immunotherapy. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2014;24:200-202. [査読有]
7. Wada T, Yasumi T, Toma T, Horii M, Maeda S, Umeda K, Heike T, Adachi S, Usami I, Yachie A. Munc13-4 deficiency with CD5 downregulation on activated CD8<sup>+</sup>T cells. *Pediatr Int*. 2014;56:605-608. doi: 10.1111/ped.12290. [査読有]
8. Vu QV, Wada T, Le HT, Le HT, Van Nguyen AT, Osamu O, Yachie A, Nguyen SN. Clinical and mutational features of Vietnamese children with X-linked agammaglobulinemia. *BMC Pediatr*. 2014;14:129. doi: 10.1186/1471-2431-14-129. [査読有]
9. Wada T, Toma T, Hamaguchi Y, Yachie A. Increased expression of epidermal thymic stromal lymphopoietin in inflammatory peeling skin syndrome. *J Dermatol*. 2014;41:448-449. doi: 10.1111/1346-8138.12449. [査読有]
10. Wada T, Itoh M, Maeba H, Toma T, Niida Y, Saikawa Y, Yachie A. Intermittent X-linked thrombocytopenia with a novel WAS gene mutation. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61:746-748. doi: 10.1002/pbc.24787. [査読有]
11. Shigemura T, Nakazawa Y, Yoshikawa K, Hirabayashi K, Saito S, Kobayashi N, Sakashita K, Shiohara M, Wada T, Shimodaira S, Agematsu K, Koike K. Successful cord blood transplantation after repeated transfusions of unmobilized neutrophils in addition to antifungal treatment in an infant with chronic granulomatous disease complicated by invasive pulmonary aspergillosis. *Transfusion*. 2014;54:516-521. doi: 10.1111/trf.12325. [査読有]
12. Wada T, Kanegane H, Ohta K, Katoh F, Imamura T, Nakazawa Y, Miyashita R, Hara J, Hamamoto K, Yang X, Filipovich AH, Marsh RA, Yachie A. Sustained elevation of serum interleukin-18 and its association with hemophagocytic lymphohistiocytosis in XIAP deficiency. *Cytokine*. 2014;65:74-78. doi: 10.1016/j.cyto.2013.09.007. [査読有]
13. Wada T, Sakakibara Y, Nishimura R, Toma

- T, Ueno Y, Horita S, Tanaka T, Nishi M, Kato K, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Down-regulation of CD5 expression on activated CD8<sup>+</sup> T cells in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with perforin gene mutations. *Hum Immunol.* 2013;74:1579-1585. doi: 10.1016/j.humimm.2013.09.001. [査読有]
14. Watanabe Y, Sasahara Y, Satoh M, Looi CY, Katayama S, Suzuki T, Suzuki N, Ouchi M, Horino S, Moriya K, Nanjyo Y, Onuma M, Kitazawa H, Irie M, Niizuma H, Uchiyama T, Rikiishi T, Kumaki S, Minegishi M, Wada T, Yachie A, Tsuchiya S, Kure S. A case series of CAEBV of children and young adults treated with reduced-intensity conditioning and allogeneic bone marrow transplantation: a single-center study. *Eur J Haematol.* 2013;91:242-248. doi: 10.1111/ejh.12151. [査読有]
  15. Wada T, Muraoka M, Yokoyama T, Toma T, Kanegane H, Yachie A. Cytokine profiles in children with primary Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60:E46-48. doi: 10.1002/pbc.24480. [査読有]
  16. Ikawa Y, Nishimura R, Kuroda R, Mase S, Araki R, Maeba H, Wada T, Toma T, Koizumi S, Yachie A. Expansion of a liver-infiltrating cytotoxic T-lymphocyte clone in concert with the development of hepatitis-associated aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2013;161:599-602. doi: 10.1111/bjh.12259. [査読有]
  17. Wada T, Muraoka M, Toma T, Imai T, Shigemura T, Agematsu K, Haraguchi K, Moriuchi H, Oh-Ishi T, Kitoh T, Ohara O, Morio T, Yachie A. Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol.* 2013;33:857-864. doi: 10.1007/s10875-012-9859-9. [査読有]
  18. Yokoyama T, Tokuhisa Y, Toga A, Fujiki T, Sakakibara Y, Mase S, Araki R, Nishimura R, Wada T, Fuseda T, Kato E, Yachie A. Agranulocytosis after infectious mononucleosis. *J Clin Virol.* 2013;56:271-273. doi: 10.1016/j.jcv.2012.11.016. [査読有]
  19. Vu QV, Wada T, Toma T, Tajima H, Maeda M, Tanaka R, Oh-Ishi T, Yachie A. Clinical and immunophenotypic features of atypical complete DiGeorge syndrome. *Pediatr Int.* 2013;55:2-6. doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03722.x. [査読有]
  20. Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, Ariga T, Santisteban I, Hershfield MS, Miyawaki T. Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Transplant.* 2013;17:E29-32. doi: 10.1111/j.1399-3046. [査読有]
  21. Wada T, Toga A, Sakakibara Y, Toma T, Hasegawa M, Takehara K, Shigemura T, Agematsu K, Yachie A. Clonal expansion of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T cells in patients with chronic active EBV disease and hydroa vacciniforme-like eruptions. *Int J Hematol.* 2012;96:443-449. doi: 10.1007/s12185-012-1156-0. [査読有]
  22. Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Ohmori K, Nakahata T, Heike T. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol.* 2012;32:690-697. doi: 10.1007/s10875-012-9684-1. [査読有]
  23. Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield MS, Ariga T, Miyawaki T. Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol.* 2012;95:692-696. doi: 10.1007/s12185-012-1055-4. [査読有]
  24. Wada T, Nishiura K, Kuroda M, Asai E, Vu QV, Toma T, Niida Y, Yachie A. A case of acute encephalopathy with hemophagocytic lymphohistiocytosis and clonal T-cell expansion. *Brain Dev.* 2012;34:376-379. doi: 10.1016/j.braindev.2011.07.005. [査読有]
- [学会発表](計10件)
1. 和田泰三, 東馬智子, 村岡正裕, 松田裕介, 榊原康久, 谷内江昭宏. FPIESにおける食物負荷後の便中EDN・カルプロテクチン・IgAの推移. 第51回日本小児アレルギー学会(2014.11.8, 四日市文化会館, 四日市)
  2. Wada T, Toma T, Yasui M, Inoue M, Kawa K, Imai K, Morio T, Yachie A. Different leaky phenotype in two siblings with X-linked severe combined immunodeficiency, 16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (2014.10.29, Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic)

3. 和田泰三，金兼弘和，太田和秀，谷内江昭宏．XIAP 欠損症における血清 IL-18 の持続高値 第 117 回日本小児科学会学術集会（2014.4.11，名古屋国際会議場，名古屋）
4. 和田泰三，村岡正裕，東馬智子，谷内江昭宏 蚊刺過敏症のNK細胞におけるCD160発現とsCD160の解析．第23回EBウイルス感染症研究会（2014.3.16，東京ステーションコンファレンス，東京都）
5. 和田泰三，村岡正裕，東馬智子，谷内江昭宏，今井耕輔，森尾友宏，安井昌博，井上雅美，河敬世．異なる phenotype を示した非典型的 XSCID の兄弟例 第7回日本免疫不全症研究会．（2014.1.25，レソラ NTT 夢天神ホール，福岡県）
6. 和田泰三，松田裕介，村岡正裕，東馬智子，谷内江昭宏．便中蛋白による慢性肉芽腫症における腸管炎症の評価．第45回日本小児感染症学会総会・学術集会（2013.10.26，札幌コンベンションセンター，北海道）
7. 和田泰三．血球貪食を伴うPIDとサイトカイン 第4回関東甲越免疫不全症研究会（2013.9.22，東京ステーションコンファレンス，東京都）
8. 和田泰三，村岡正裕，東馬智子，今井剛，重村倫成，上松一永，原口浩平，森内浩幸，森尾友宏，谷内江昭宏．フローサイトメトリーによる p47phox/p67phox 解析と慢性肉芽腫症の病型診断 第116回日本小児科学会学術集会（2013.4.19，広島国際会議場，広島県）
9. 和田泰三．EBV-HLH の免疫病態．第44回日本小児感染症学会総会・学術集会．（2012.11.24，西日本総合展示場，福岡県）
10. 和田泰三，榊原康久，梅暁子，東馬智子，長谷川稔，田中理砂，大石勉，重村倫成，上松一永，谷内江昭宏．T細胞感染型の慢性活動性EBV感染症3例におけるT細胞の解析．第115回日本小児科学会学術集会，（2012.4.21，福岡国際会議場，福岡県）

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ped.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

和田 泰三 (WADA, Taizo)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：30313646