

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591353

研究課題名（和文）

早期治療介入のための新しい EBV 関連リンパ増殖性疾患診断指標の確立

研究課題名（英文）

Establishment of novel diagnostic parameters for the early therapeutic intervention of EBV-associated lymphoproliferative diseases.

研究代表者

谷内江 昭宏 (YACHIE AKIHIRO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40210281

研究成果の概要（和文）：

EBV-HLHは著しい高サイトカイン血症と血球減少を特徴とし、急激な全身状態の悪化によりしばしば致命的経過をたどる。数時間の治療の遅れが不可逆的な臓器傷害を惹起することから、超早期の診断と治療の介入が必須の、救急疾患である。その本態が主としてCD8⁺ T細胞への選択的EBV感染と、感染クローンの強い活性化、選択的増殖であることは我々がすでに明らかにしている。したがってその診断にはTCR構造解析により特定のCD8⁺ T細胞クローンへのEBV感染を証明することが重要となる。しかし、このような高度に特殊な解析が可能な医療機関は多くなく、代替となるより簡便な検査法の開発が必要とされる。

本研究ではEBV-HLH症例においてEBVが感染するCD8⁺ T細胞クローンの特徴について、特にその表面抗原発現プロファイルと、サイトカイン産生プロファイルを中心に解析した。さらにその結果をもとにして、簡便で迅速な診断プロトコルの提示を試みた。EBV-HLHではほぼ例外なく、特定のTCR V β を発現する CD8⁺ T 細胞にEBVが感染、CDR3サイズ分布解析によりそれらの細胞がクローン性増殖を示すことが明らかにされた。さらに、異常クローンはHLA-DR強陽性、CD5陰性の特徴を示した。その後の検討では、FHL2を背景としたEBV-HLHの場合はB細胞にEBVが感染、多クローン性にCD5陰性CD8⁺ T細胞が増殖することも明らかにされ、診断の際に留意すべきであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

EBV-HLH is characterized by extreme cytokinemia and cytopenia, frequently leading to aggressive deterioration and fatal outcome. It is of paramount importance to make correct diagnosis and start therapeutic intervention as soon as possible, as the delay in the treatment may result in irreversible damage to vital organs within several hours. We now understand that the essential pathogenesis of EBV-HLH is selective activation and expansion of an ectopically EBV-infected CD8⁺ T cell clone. Thus the definitive diagnosis of EBV-HLH can be made by identifying the target of EBV infection and by proving the clonality of the EBV-infected cells.

In this study, we analyzed the profiles of surface antigen expression of the infected CD8⁺ T cells and serum cytokines. With these results, we tried to establish a simplified method to establish parameters for the early diagnosis of EBV-HLH. As was expected, EBV infection in most cases of EBV-HLH was confined to a single clone of CD8⁺ T cells, expressing a particular TCR V β . CDR3 size distribution analysis indicates that these cells are of a single clone. The abnormal clones exhibited high levels of HLA-DR and decreased levels of CD5. Therefore, EBV-infected cells were identifiable as HLA-DR⁺⁺ CD5⁻ cell population within CD8⁺ T cells. Further analysis revealed that similar cell population was observed in patients with FHL2 during acute viral infection, including EBV.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：EBウイルス・CAEBV・EBV-HLH・CD5・フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景 はじめに

Epstein-Barr virus (EBV)はヒトに感染するヘルペスウイルスの一種であり、我が国においては乳幼児期から罹患し、その多くが無症状あるいは軽度の感冒様症状で経過することが知られている。一方で、EBV感染が強力な免疫応答を惹起すること、そのため急性期には「伝染性単核症」と呼ばれる強いキラーT細胞の活性化・増殖病態が起こることも特徴的である。このことは、ある種の免疫不全症においてEBV感染が致死的な経過をたどることと深く関連している。したがって、EBV感染症の複雑な病態を理解するためには患者の背景にあるウイルス特異的免疫応答に関する深い洞察が必要とされる。EBVは多彩なリンパ増殖性疾患の発症要因となることが知られており、その多くは難治性ないし致死的な経過をたどる。これらの疾患では病初期の正確な診断と病態評価、早期治療介入がきわめて重要であり、診断の遅れはそのまま治療の失敗と患者の死亡に直結する。しかしながら、EBV関連リンパ増殖性疾患の多くは初発症状が非特異的でありその診断が困難であることから、適切な診断がなされずに病態が進行して発見される例をしばしば経験する。圧倒的多数の良性に経過するEBV感染症と、EBV関連リンパ増殖性疾患の発症機序の差異や本質的な病態についてはあまりにも不明な点が多く、後者が多発するわが国からの研究成果が期待されている。この疾患では早期診断が重要であるにも関わらず、多くの医療機関においては必ずしも高度に専門的な特殊検査が可能なのではない。したがって、臨床症状や一般検査所見からEBV

関連の病態であることを疑われた場合、できるだけ簡便な方法により確診に迫る早期診断システムの確立が望まれる。そのような方法論の確立は、短期的に患児の診断・治癒率を改善することが期待されるのみでなく、長期的にはEBV関連リンパ増殖性疾患の病態を解明するための有効な手段となることが予想される。

EBV関連リンパ増殖性疾患

小児期に遭遇するEBV関連リンパ増殖性疾患は、大きく分けて二つの群に区別される。一つは、きわめて急性の発症と経過を示す、EBV関連血球貪食症候群(EBV-HLH)である。EBV-HLHは著しい高サイトカイン血症と血球減少を特徴とし、急激な全身状態の悪化によりしばしば致死的な経過をたどる。数時間の治療の遅れが不可逆的な臓器傷害を惹起することから、超早期の診断と治療的介入が必須の、救急疾患である。その本態が主としてCD8⁺T細胞への選択的EBV感染と、感染クローンの強い活性化、選択的増殖であることは我々がすでに明らかにしている。したがってその診断にはTCR構造解析により特定のCD8⁺T細胞クローンへのEBV感染を証明することが重要となる。しかし、このような高度に特殊な解析が可能な医療機関は多くなく、代替となるより簡便な検査法の開発が必要とされる。我々はEBV-HLHの一例において、増加するCD8⁺T細胞がきわめてユニークな表面抗原プロファイルを示すことを明らかにしており、このような抗原発現の特徴を指標にして、より一般的なフローサイトメトリー解析による診断が可能となることが示唆されている。

もう一つは、慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) であり、この疾患では特定のリンパ球亜群に EBV が感染、年余の経過で次第に増殖・活性化し、最終的には悪性リンパ球や血球貪食症候群などの致命的な合併症を発症する。蚊刺過敏症や種痘様水疱症などを合併することも多い。本症は肝機能障害や遷延する発熱、リンパ節腫脹など、非特異的な症状をきっかけに診断されることが多いが、EBV 感染の関与が疑われない場合には、確定診断は困難である。発症当初はゆっくり進行する EBV 感染細胞の増殖が、ある時期を境に一気に進行し、治療抵抗性のリンパ球増殖病態が惹起される。同時に起こるリンパ球活性化に伴い血球貪食症候群を合併することも多い。このような初期の遷延性経過と、発症数年後に観察される急性転化が特徴的な疾患であるが、致死的な急性転化を早期発見し、あるいは予測する適切な指標は知られていない。候補となる指標は細胞表面抗原や、サイトカイン遺伝子発現プロファイルの変化であるが、具体的なデータは全く報告されていない。

臨床現場から行うべき病態解析のアプローチ

これまでの報告ならびに我々の観察から、EBV 関連リンパ増殖疾患の多くは、EBV 感染リンパ球の単クローン性増殖と活性化がその本態であることが示唆されている。したがって、その診断には、EBV 感染細胞の同定と、その細胞のクローン性増殖を示すことが重要となる。一方で、きわめて急激な経過をたどる EBV-HLH を適切なタイミングで診断することは、時期を失せずにそれを疑った場合でさえ困難である。また CAEBV の場合にはその存在を疑われないまま経過観察される可能性が高い。これらの疾患を適切に早期に診断し、治療的介入を行うためには、あらたに簡便な診断法の確立と病態の解明が必須である。さらに、研究の成果を臨床現場に還元し、EBV 関連疾患の早期診断を促す努力も望まれる。

2. 研究の目的

・ まず EBV 関連リンパ増殖性疾患の早期診断を TCR 構造解析と表面抗原プロファイリングにより行う方法を開発する。特に

EBV-HLH においては特定のリンパ球亜群への EBV 感染を確認する前に治療が開始されなければならない場合が多く、短時間で簡便に診断可能な代替診断法の確立を目指す。CAEBV に関しては、臨床症状や検査所見、EBV 関連抗体価などから疑われる症例について感染細胞を同定する簡便なシステムを確立する。

・ 次に、その成果をもとに、これらの疾患の発症病態を明らかにすることを試みる。特に、1) EBV 感染細胞の増殖活性がどの時点で、どのような機序により増強するのか、2) 急性転化に伴う病態変換の際に表面抗原発現プロファイルやサイトカイン発現プロファイルの変化がどのような分子生物学的な背景をもとに誘発されるのか、3) これらの変化と細胞の behavior (悪性化・増殖活性の増強など) とがどのように関連するのか、などの疑問を明らかにする必要がある。

3. 研究の方法

1) EBV-HLH 解析対象の選定

急性 EBV 感染症の内、下記の疾患を解析対象に加える。

- ・ 急性伝染性単核症；良性に経過する典型的急性 EBV 感染症で、リンパ節腫脹や肝機能障害を認めるが、血球減少や高サイトカイン血症を伴わないもの。
- ・ 劇症型伝染性単核症；発熱の遷延、強い肝機能障害、フェリチン高値、高サイトカイン血症、血球減少など、発症早期には EBV-HLH が疑われる症例。ただし、後に感染細胞が B 細胞に局限し、単クローン性の T 細胞増殖を伴わないことが証明されたもの。
- ・ EBV-HLH；典型的な臨床症状、検査所見を伴い、後に感染細胞が T 細胞 (特に CD8⁺ T 細胞) に局限し、かつ単クローン性の増殖が示唆されたもの。

2) CAEBV 解析対象の選定

CAEBV 診断基準を満たす以下の疾患を解析対象に加える。

- ・ CD4⁺ T 細胞増殖型 CAEBV
- ・ NK 細胞増殖型 CAEBV
- ・ 種痘様水疱症
- ・ 蚊刺過敏症

・ その他

3) フローサイトメトリーによる表面抗原プロファイリングと感染細胞の同定

EBV 感染細胞が選択的に HLA-DR を強く発現、さらに CD5 発現が低下ないし消失する可能性が症例報告により示唆されている。対象となった症例について、フローサイトメトリーによる TCR V β 発現解析ならびに単離リンパ球に対する EBER-1 ISH を併用して、この点を検証する作業を行う。TCR 構造解析は CDR3 サイズ分布解析により行う。

4) EBV 感染細胞の分離と遺伝子発現プロファイリング試料の作成

EBV 感染細胞をフローサイトメトリー法ならびに EBER-1 in situ hybridization 法により同定、解析可能な細胞数が得られる場合には、さらに感染細胞を磁気ビーズ法などにより単離する。単離した細胞の純度を確認の上、cDNA を作成、遺伝子発現プロファイリングの試料とする。これは次年度以降の解析に用いる。また一部はサイトスピン標本作成の上、EBER-1 発現の解析に用いる。

4. 研究成果

1) EBV-HLHにおけるEBV感染細胞の特徴；

EBV-HLHでは CD8⁺T 細胞の単クローンにEBVが感染、同一クローンの選択的活性化と増殖が起こることが確認された。感染細胞の「単クローン性」の確認は、flowcytometry法によるTCR V β 鎖発現の多様性解析、ならびにTCR V β 鎖のCDR3サイズ分布解析により行った。選択的EBV感染は、IMag beads法により単離したリンパ球亜群について EBER-1 in situ hybridization法による感染細胞同定により行った。

さらに重要な知見は、これらの感染細胞が例外なくCD5抗原発現を低下、ないし欠如していただことである。CD5抗原発現の特徴は、強いHLA-DR発現とともに EBV-HLHにおけるEBV感染細胞の特徴であり、このような細胞集団の同定がEBV-HLH早期診断や治療反応性評価の指標となることが示唆された。これらの事実は、すでに論文に受理されている。

2) EBV-HLHにおける血清サイトカインプロファイリング；

EBV-HLHにおける強い炎症反応と血球貪食の発症機構を明らかにするために、EBV-HLH

急性期ならびに回復期における血清サイトカインプロファイルを解析した。その結果、急性期においては他の血球貪食症候群と同様、IL-6、neopterin、IL-18などが増加していることが示された。一方で、回復期のプロフィールはHLHの発症要因となる基本病態により差がある可能性が示唆されている。例えば、全身型若年性特発性関節炎のような病態では、急性炎症病態が終息しても、IL-18の高値のみが遷延するが、EBV-HLHでは全てのサイトカインはほぼ一様に正常化する。これらの違いはHLHを発症するに至る病態の違いを反映していると考えられ、その詳細は現在解析中である。この成果の一部も現在論文が受理されている。

3) FHL2におけるEBV感染とCD5発現の低下；

EBV-HLH の病態解析の過程で、perforin 欠損によるキラー活性障害を示す症例では、EBV初感染に伴い異常な T 細胞活性化と高サイトカイン血症、血球貪食症候群を発症することが明らかにされた。これらの成果については現在論文作成中である。

4) キラーT細胞への選択的 EBV感染と遷延性肝機能障害の発症病態；

EBV-HLH と類似の病態を示す症例の中に、主としてキラー活性を示す細胞へのEBV感染が特徴的な臨床像を示すことが明らかとなった。このような症例の病態についての解析が進行中である。

5) XLPならびにXIAP欠損症におけるEBV-HLHの病態；

XLP や XIAP など、NK 活性の低下を伴う原発性免疫不全症における EBV-HLH では、①通常の EBV-HLH と異なり感染標的細胞が B 細胞であること、②NK 活性の低下が二次的な高サイトカイン血症を惹起すること、③このような病態においては、rituximab など、B 細胞を標的とした治療が有効である可能性を示した。

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 4 件)

1) Yang X, Wada T, Imadome K, Nishida N,

Mukai T, Fujiwara M, Kawashima H, Kato F, Fujiwara S, Yachie A, Zhao X, Miyawaki T, Kanegane H. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. *Herpesviridae*. 2012;3:1. (査読有)

2) Shimizu M, Yokoyama T, Yamada K, Kaneda H, Wada H, Wada T, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Yachie A. Distinct cytokine profiles of systemic-onset juvenile idiopathic arthritis-associated macrophage activation syndrome with particular emphasis on the role of interleukin-18 in its pathogenesis. *Rheumatology* 2010; 49:1645-53. (査読有)

3) Toga A, Wada T, Sakakibara Y, Mase S, Araki R, Tone Y, Toma T, Kurokawa T, Yanagisawa R, Tamura K, Nishida N, Taneichi H, Kanegane H, Yachie A. Clinical significance of clonal expansion and CD5 down-regulation in Epstein-Barr Virus (EBV)-infected CD8⁺ T lymphocytes in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Infect Dis*. 2010; 201: 1923-32. (査読有)

4) Wada T, Yokoyama T, Nakagawa H, Asai E, Toga A, Sakakibara Y, Shibata F, Tone Y, Shimizu M, Toma T, Yachie A. Flow cytometric analysis of skin blister fluid induced by mosquito bites in a patient with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Int J Hematol*. 2009;90:611-5. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1) Wada T, Sakakibara Y, Shimizu M, Nishimura R, Toma T, Ueno Y, Horita S, Yasumi T, Ohara O, Yachie A. Increased subpopulation of CD8⁺ T cells with CD5 down-regulation in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 2. XIVth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. 2010, Oct. 6-9, Istanbul Lutfi Kirdar Convention and Exhibition Centre (Turkey).

2) Wada T, Toga A, Sakakibara Y, Toma T, Yanagisawa R, Kanegane H, Yachie A. Characterization of EBV-infected CD8⁺ T cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. 第 7 2 回日本血液学会学術集会 2010, Sept. 24-26, パシフィコ横浜 (神奈川県)

3) Wada T, Toga A, Sakakibara Y, Toma T, Yanagisawa R, Kanegane H, Yachie A. Clinical significance of CD5 downregulation in Epstein Barr virus (EBV)-infected CD8⁺ T lymphocytes in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. 14th International Congress of Immunology 2010, Aug. 22-27, 神戸ポートピアホテル、神戸国際展示場 (兵庫県)

4) Shimizu M, Yokoyama T, Kaneda H, Wada T, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Yachie A. The diagnostic significance of interleukin-18 in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis predisposing to macrophage activation syndrome. The 9th World Congress on Inflammation. 2009, Jul 6-10, Keio Plaza Hotel (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷内江 昭宏 (YACHIE AKIHIRO)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号 : 40210281