

Clinical significance of cloned expansion and CD5 down-regulation in Epstein-Barr virus (EBV)-infected CD8 + T lymphocytes in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/32429

【総説】

第10回 高安賞最優秀論文賞受賞

論文 「Clinical significance of cloned expansion and CD5 down-regulation in Epstein-Barr virus (EBV)-infected CD8⁺ T lymphocytes in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis」

Journal of Infectious Diseases誌

第201巻第12号 1923頁～1932頁

2010年6月掲載

梅 暁子, 和田泰三, 榊原康久, 馬瀬新太郎, 荒木来太,
刀祢裕美, 東馬智子, 黒川敏郎, 柳沢 龍, 田村賢太郎,
西田直徳, 種市尋宙, 金兼弘和, 谷内江昭宏 共著

Epstein-Barr ウイルス (EBV) 関連血球貪食性リンパ組織球症における
EBV感染CD8陽性T細胞のクローン性増殖とCD5発現低下の臨床的意義

梅 暁子 (とが あきこ)

はじめに

血球貪食性リンパ組織球症 (Hemophagocytic lymphohistiocytosis; HLH) は, T細胞やマクロファージの異常活性化と過剰なサイトカイン産生により引き起こされる致死性の病態である。臨床的には発熱, 血球減少, 肝脾腫, 肝機能障害, 凝固能異常, 血球貪食像などを呈する¹⁾。HLHは大きく遺伝性, 二次性に分類され, 二次性HLHは感染症, 悪性腫瘍, 膠原病に続発する。本邦におけるHLHの原因として最も頻度が高いものはEBウイルス関連HLH (EBV-HLH) であり, 感染症に関連したHLHの過半数を占める。

通常EBVはB細胞に感染し, 初感染例の一部で伝染性単核症を発症するが, EBV-HLHではCD8陽性T細胞にEBVが選択的に感染する。このEBV感染T細胞はクローン性に増殖し, 高サイトカイン血症から様々な全身症状を引き起こす。EBV-HLHは発症後短期間で急速に症状が進展し, 無治療の場合にはしばしば致死性であるため, 早期診断・早期治療が重要である。しかしながらEBV-HLHの病初期には特徴的な症状や検査所見を呈さないことが多く, 伝染性単核症との鑑別が困難な場合もしばしば経験される。

従来, EBV-HLHにおけるEBV感染細胞がCD8陽性T細胞であることは知られていたが, EBV感染細胞の特徴は不明のままであった。以前に私たちは, EBV感染細胞をCD5陰性HLA-DR強陽性CD8陽性T細胞 (CD5^{-/dim}HLA^{-DR}⁺⁺CD8⁺T細胞) として同定できたEBV-HLHの一症例を経験した²⁾。CD5は分子量67kDaの単鎖膜糖蛋白で, T細胞, 一部のB細胞に発現しており, T細胞の細胞間認識, シグナル伝達などの機能を持つ (図1)。本研

究では, EBV-HLHの5症例を新たに加え, この所見がEBV-HLHにおけるEBV感染細胞に共通した特徴か否か, 早期診断や治療評価に有用な指標となるか否かを検討した。

対 象

対象は, HLHの典型的症状および検査所見を認め, HLHの診断基準を満たすEBV-HLHの6症例 (前述の症例を含む) とコントロール症例としての伝染性単核球症7例, 健康人10例である。いずれも, 従来健康で両親の血族結婚のない日本人である。

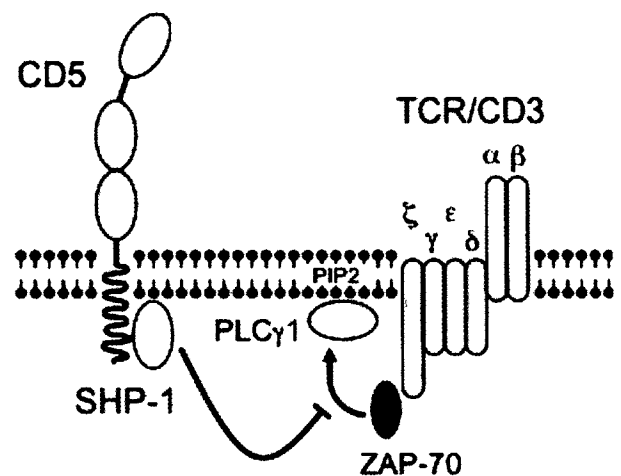


図1. CD5のシグナル伝達

単鎖膜糖蛋白であるCD5は, T細胞, 一部のB細胞に発現しており, T細胞の細胞間認識, シグナル伝達などの機能を持つ。CD5はシグナル伝達に抑制的に作用すると考えられている。

方 法

それぞれの患者の急性期における末梢血単核球中のCD8⁺ T細胞のCD5発現およびHLA-DR発現をフローサイトメトリー法により解析し、CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞の増加が見られるかどうかを検討した。同細胞のクローン性増殖の評価のため、T細胞レセプター (TCR) V β レパトア解析とCDR3サイズ分布を解析するスペクトラタイピング法を行った。またEBV感染細胞を同定するため、様々なリンパ球亜群についてEBER-1 in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法を行った。さらに、

CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞の数が治療に伴いどのように変化するか従来の病勢マーカーと比較し、病勢評価や治療効果判定の指標となりうるかどうかを検討した。

結 果

1) 急性期における末梢血単核球中のCD8⁺ T細胞のCD5発現およびHLA-DR発現

EBV-HLHの6症例すべてにおいてCD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞が著明に増加していた。これらの細胞は異常活性化を反映した大型化した細胞であることが判明した (図2)。末梢血単核球中に占めるCD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺

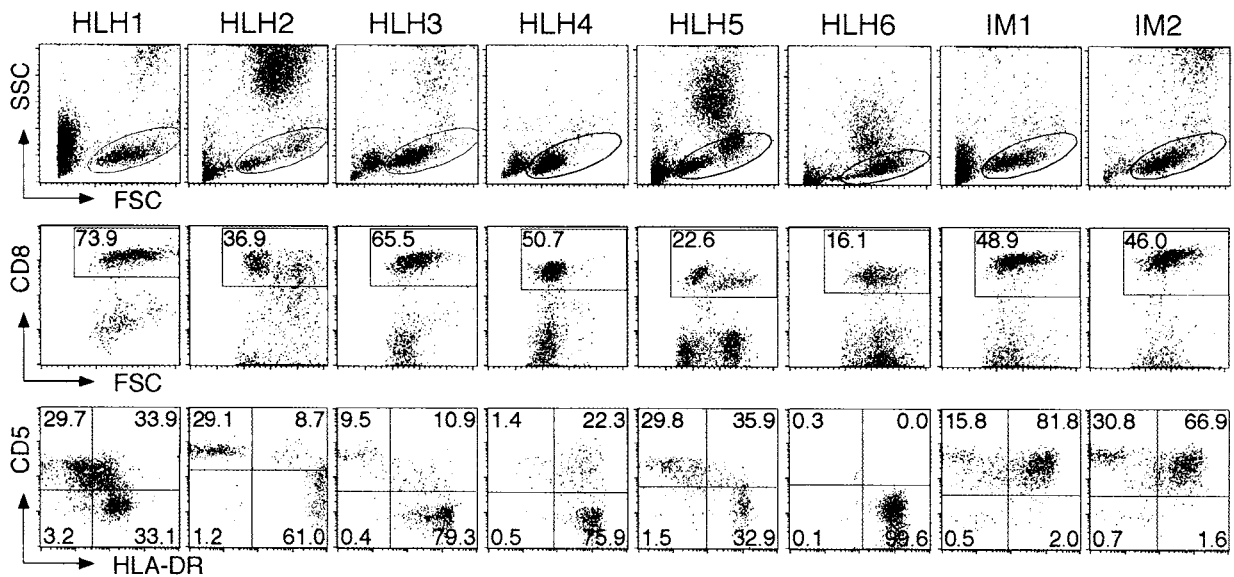


図2. CD8⁺ T細胞におけるCD5およびHLA-DR発現

単核球領域 (上段), さらにCD8⁺ T細胞 (中段) をゲーティングし, CD8⁺ T細胞におけるCD5およびHLA-DR発現をフローサイトメトリーにより解析した (下段). CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞は伝染性単核球症ではほとんど認められなかったが, EBV-HLHでは著明に増加していた。

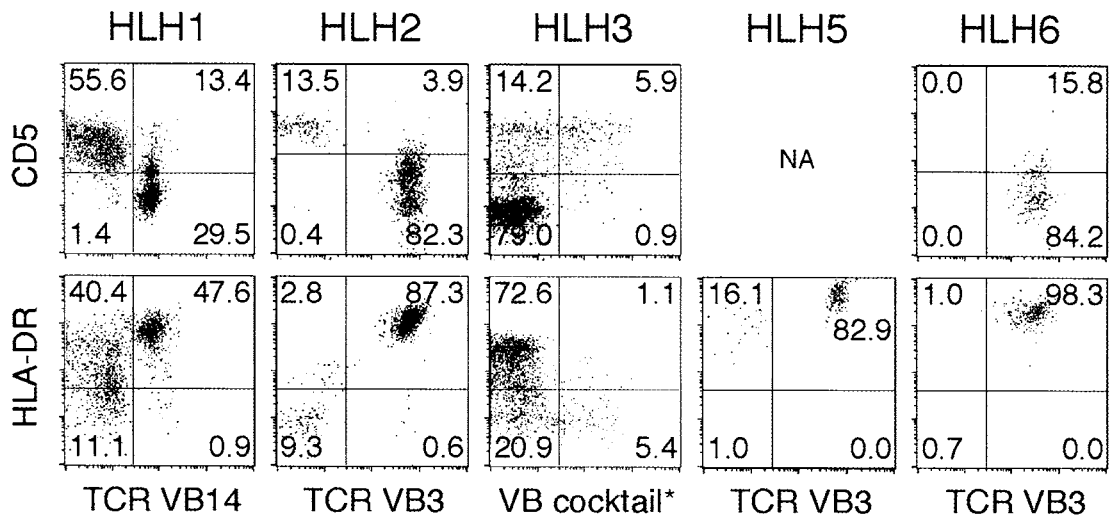


図3. CD8⁺ T細胞におけるTCR V β レパトア解析

抗TCR V β 抗体を用いてTCR V β レパトア解析を行った。ほとんどのEBV-HLH症例において、増加しているCD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞は、特定のTCR V β を有しており、クローン性に増殖していることが示された。

CD8⁺ T細胞の比率および絶対数は、EBV-HLHにおいてのみ著明に増加しており、伝染性単核球症の症例やコントロール群ではほとんど認められなかった。このことからCD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞の増加はEBV-HLHに特徴的な所見であると考えられた。

2) TCR Vβレパトア解析とCDR3スペクトラタイピング法

増加しているCD8⁺ T細胞がクローン性か否かを評価するため、TCR Vβレパトア解析を行った。HLH1, HLH2, HLH5, HLH6の症例において、それぞれ特定のTCR Vβに特異的な抗体で認識されるCD8⁺ T細胞の増加が認められた(図3)。HLH3については分子生物学的手法を用いることにより、Vβ13.3⁺ CD8⁺ T細胞の著しい増殖を確認することができた。以上より増加したCD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞はクローン性に増殖し

ていることが示唆された。

3) EBER-1 ISHによるEBV感染細胞の同定

CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞に実際にEBVが選択的に感染していることを確認するため、EBER-1 ISH法によるEBV感染細胞の同定を行った。様々なリンパ球亜群を検討した結果、CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞がEBV感染の標的であることが強く示唆された(図4)。

4) CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞の推移

いずれの症例においても著明に増加していたCD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞は治療に伴い血清フェリチンやEBVコピー数と並行して減少していた(図5)。このことから、CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞は病勢や治療評価の指標になりうると思われた。

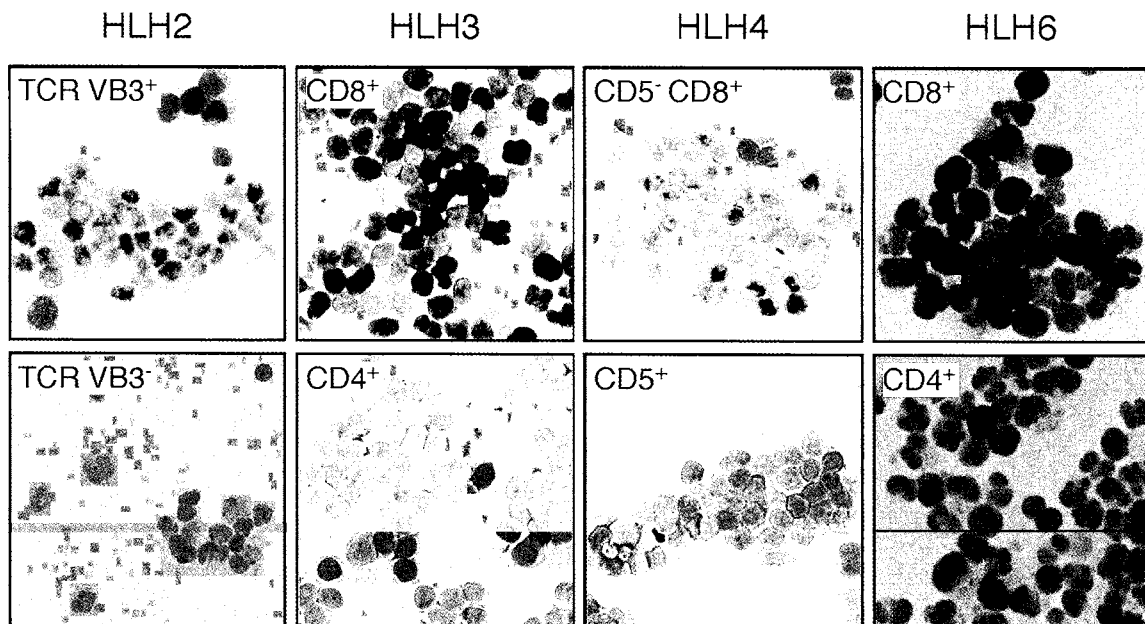


図4. EBER-1 in situハイブリダイゼーション

単離したリンパ球亜群を用いて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を行った。CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞がEBV感染細胞であることが示唆された。

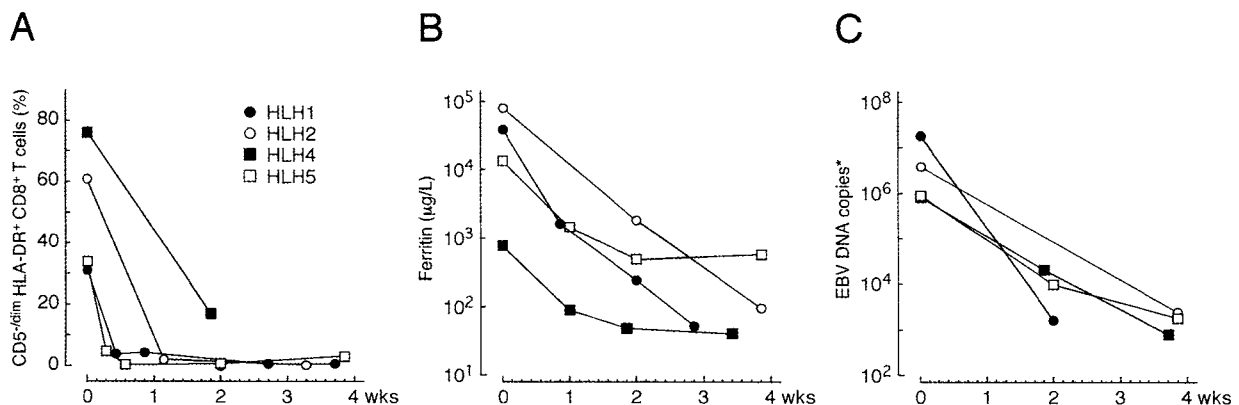


図5. EBV-HLHの臨床経過

(A) CD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞の比率, (B) 血清フェリチン値, (C) EBV DNAコピー数の治療に伴う変化を示す。いずれの症例においても、著明に増加していたCD5^{-dim} HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞は、血清フェリチンやEBVコピー数と並行して減少した。

考 察

EBVはHLHを引き起こす原因として最も頻度が高く、無治療の場合、EBV-HLHはしばしば致死性である。しかし、エトポシドやステロイドなどを用いた免疫化学療法により救命可能であるため、早期診断が非常に重要である。HLH診断基準2004は、EBV-HLHの診断にも有用であるが、病初期には基準を満たさない場合がある。また一過性の経過をたどる伝染性単核球症でも汎血球減少、高サイトカイン血症、血球貪食像などのHLHに典型的な症状を認める場合があり、病初期にはEBV-HLHとの鑑別が困難である。さらに診断に有用な炎症性サイトカインの測定、NK細胞活性、末梢血EBVコピー数の測定などの検査は限られた施設でしか施行できない。

本研究においてEBV-HLHにおけるEBV感染細胞は、特定のTCR V β を有したCD5⁻/dim HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞としてフローサイトメトリーにより簡便に同定可能であり、病勢や治療効果判定の指標となりうることが示された。本方法は、少量の末梢血で解析可能であり乳幼児にも適用しやすく、また迅速に実施できることから、EBV-HLHの疑いのある小児患者の病初期の診断に非常に有用と考えられる。

近年の研究から、EBV遺伝子産物であるLMP-1は、SAP遺伝子の発現を抑制し、T細胞の活性化を促進することが示されている³⁾。SAP遺伝子は、遺伝性HLHであるX連鎖リンパ増殖症候群(XLP)の原因遺伝子の一つである。XLPではSAPのアポトーシス促進性の機能の欠損により、T細胞の異常増殖がみられる⁴⁾。このことからEBV-HLHでは、XLP類似の機序によりHLHを発症する可能性がある。またCD5欠損マウスでは、CD5陰性T細胞がTCR刺激に対して過剰反応することが報告されており⁵⁾、EBV-HLHではCD5の発現低下がEBV感染T細胞のクローン性増殖に有利に働いている可能性がある。今後、CD5発現低下の機序を含めたさらなるEBV-HLHの病態解明が望まれる。

結 語

本研究により、EBV-HLHにおけるEBV感染細胞は、特定のTCR V β を有したD5⁻/dim HLA-DR⁺⁺ CD8⁺ T細胞としてフローサイトメトリーにより簡便に同定可能であることが示された。本方法は、重篤な疾患であるEBV-HLHの早期診断や病勢評価する上で有用な臨床指標になると考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導とご助言を頂いた谷内江昭宏教授、和田泰三先生に感謝の意を表します。また日頃さまざまなご協力・ご支援を頂きました金沢大学小児科学教室の皆様から感謝いたします。

文 献

- 1) Ishii E et al., Review of hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in children with focus on Japanese experiences. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53: 209-223.
- 2) Wada T et al., Immunophenotypic analysis of Epstein-Barr virus (EBV) -infected CD8⁺ T cells in a patient with EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Haematol* 2007; 79: 72-75.
- 3) Chuang HC et al., Epstein-Barr virus LMP1 inhibits the expression of SAP gene and upregulates Th1 cytokines in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome. *Blood* 2005; 106: 3090-3096.
- 4) Nagy N et al., The proapoptotic function of SAP provides a clue to the clinical picture of X-linked lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 11966-11971.
- 5) Tarakhovsky A et al., A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 1995; 269: 535-537.

Profile

所 属：金沢大学小児科
 2006年：富山大学医学部医学科卒業
 2009年：金沢大学大学院医学系研究科入学
 2012年：同上終了

