

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15116

研究課題名(和文)臓器移植後 EB ウイルス関連リンパ増殖症の発症機構の解明研究

研究課題名(英文)The elucidation study about an onset mechanism of the EB virus-related PTLD

研究代表者

今留 謙一 (Imadome, Ken-Ichi)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・高度感染症診断部・部長

研究者番号：70392488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：「臓器移植後EBウイルス関連リンパ増殖症の発症機構の解明研究」  
EBウイルス(EBV)関連移植後リンパ増殖症(PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorder)の予防と治療法の確立を目指した。移植片とともに移行した感染細胞は先ず肝臓内で増殖した後に末梢血中に供給され、他臓器やリンパ節にニッチを作りPTLD発症につながることを示された。また、免疫抑制剤投与下ではPTLD発症率の上昇(3倍以上)が人がマウスにより示された。本研究により免疫抑制剤量の至適量の決定が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed at the establishment of prevention and the therapy of lymphatic hyperplasia (PTLD:post-transplant lymphoproliferative disorder) after EB virus (EBV)-related transplant.After at first having multiplied in liver, the infected cells which shifted with a graft were supplied in peripheral blood, and it was shown that we made niche to the other organ and lymph nodes and were connected for the PTLT onset.Also, increase (more than 3 times) of the PTLT incidence was shown by a person or a mouse under the immunosuppressive drug administration. This study suggested that choice of the optimal quantity of the quantity of immunosuppressive drug was important.

研究分野：感染免疫

キーワード：EBウイルス 肝移植 PTLT 生体イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

2010年7月の改正臓器移植法の施行により、従来は年齢制限でドナーとなりえなかった15歳未満の小児からの臓器提供が可能となった。それに伴い小児ドナーからの臓器移植実施施設も決まり、今後症例数も増加することが予想されるが、同時に、普及にあたっては今後小児臓器移植にかかわる様々な分野での整備が必要とされる。その一つが移植後リンパ増殖症 (PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorder)の予防と治療法の確立である。PTLDは移植成績に大きな影響を及ぼすばかりでなく移植患者の予後にもかかわる最重要な合併症の一つと言える。非常に経過が早く致死的なものから、免疫抑制剤の減量に伴い自然退縮するものまで幅広い疾患である。PTLDは、小児臓器移植後に発生する悪性腫瘍の90%以上を占め、遠隔成績に左右する重要な合併症である。PTLDは、拒絶反応を抑制するために免疫抑制薬を回避できない臓器移植後に発症率が高い。PTLD発症頻度は患者の年齢・免疫抑制薬の使用状況・EBV監視状況などに左右される。一方、小児期PTLDの大多数がEbstein-Barrウイルス(EBV)に起因するB細胞型であるが、日本では成人のEBV保有率が欧米に比して有意に高く、ドナー・レシピエントミスマッチ、移植後の初感染のリスクが高いため、欧米以上に発症率・重症化率が高く、本症を克服することが我が国の小児臓器移植の成績を向上させるのに回避できない課題であり、EBVの予防・治療を念頭に置いた診断・治療体系を構築する必要がある(R.Chinnock, et al., A 16-year multi-institutional study of the Role of age and EBV status on PTLD incidence among pediatric heart transplant recipients, *American Journal of Transplantation*, 2012)。即ち、これまでほとんど解明されていないEBVによるPTLD (EBV-PTLD)発症メカニズムの解明が急務である。

### 2. 研究の目的

移植後リンパ球増殖症 (PTLD: Posttransplant lymphoproliferative disorder)は、小児の臓器移植後に発生する悪性腫瘍の90%以上を占め、移植医療成績を左右する重要な合併症である。毎年臓器移植自体は成功してもPTLDでなくなる亡くなる患者の報告は後を絶たない。特にEBウイルス(EBV)によるPTLD発症(EBV-PTLD)は危険度が高い。しかしEBV-PTLD発症メカニズムはほとんど解明されていない。ドナー臓器と一緒にEBV感染細胞がレシピエントに移行すると考えられているが確たる証拠は得られていない。また、移植臓器と一緒に移行する感染細胞は非常

に少数であることが予想されるが、感染細胞がどこで・どのように増殖および活性化しPTLDを発症するかもほとんど解明されていない。本研究ではヒト化マウスと生体イメージングによる感染細胞のin vivo可視化を用いてEBV-PTLDの発症機構の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究ではほとんど解明されていないEBV-PTLD発症メカニズムの解明を目指し以下の項目について研究を進めていく(図1)。

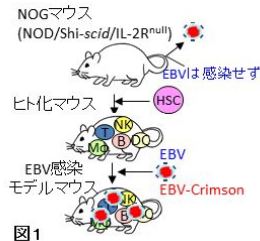


図1

(1) ドナーがEBV既感染でレシピエントがEBV未感染の場合、臓器とともにEBV感染細胞が

レシピエントに移行しているかを実際の余剰移植片で検証する。

(2) 赤く光る(crimson)遺伝子を導入した組み換えEBVおよび潜伏感染細胞株(LCL)にcrimsonを遺伝子導入した細胞株を作製し、感染細胞がイメージングアナライザーで可視化することで継続的に感染細胞の増殖・動向を追跡し伝播様式の解明をおこなう。この時、ヒト化マウスを用いてヒト免疫細胞(T, NK, B細胞など)存在下での免疫抑制剤投与下での感染細胞と宿主免疫細胞の動向を検討する。生体内での現象により近い環境下で検討することが可能である。

フローサイトメトリー(FCM)法・リアルタイムPCR法によるEBV定量解析、EBV遺伝子解析など免疫学的、分子生物学的手法を用いて増殖している感染細胞および宿主免疫細胞の詳細な検討を行う。

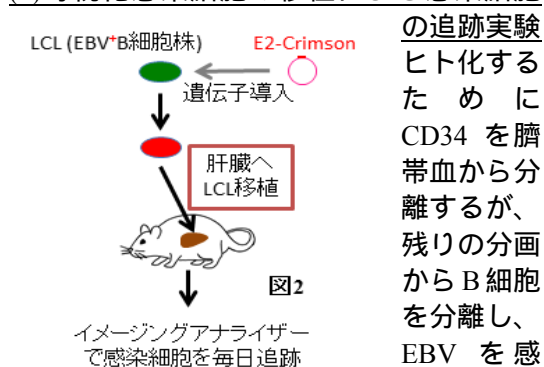
#### (1)患者検体でのPTLD発症細胞のドナー由来かどうかの検討

成育では年間40例近くの小児生体肝移植を行っている。ドナー肝の移植のための整形での余剰肝(およそ5mm<sup>3</sup>)からリンパ球を回収・培養する。細胞が増えたところでEBV定量解析し、ドナー肝に感染細胞が存在するかを検討し、合わせて感染細胞株(ds LCL: donor spontaneous LCL)の樹立を試みる。また、移植患者末梢血でEBVが検出された場合は速やかに感染細胞(rs LCL: recipient spontaneous LCL)の樹立を行う。rs LCLがドナー由来であるかを遺伝子解析で検討する。また、移植患者でEBV感染細胞が5 x 10<sup>2</sup> copies/μgDNA以上になったHLAを詳細に解析する。

## (2)ヒト化マウスの作製

臍帯血より CD34 陽性細胞を分離し、 $5 \times 10^4$  細胞を NOG マウスの尾静脈へ移植する。およそ3ヶ月でB細胞が分化し、6ヶ月くらいでT細胞の分化が確認できる。可視化感染細胞(LCL-Cri)の移植や可視化組換えEBV(EBV-Cri)の感染はT細胞の分化が確認でき、主要免疫細胞が全て揃ったところで行う。同じ臍帯血由来のCD34細胞でヒト化し、これらのマウス間での移植をおこなうことで拒絶の可能性は極めて低い。

## (3)可視化感染細胞の移植による感染細胞



の追跡実験  
ヒト化するためにCD34を臍帯血から分離するが、残りの分画からB細胞を分離し、EBVを感染させ潜伏感染B細胞株(タイプIII)LCLの樹立を行う。樹立後のLCLに生体内でイメー

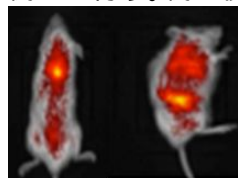


図3

ージング可能な波長のE2-Crimson遺伝子(励起波長:611nm;赤く光る)を導入しLCL-Criを作製し、可視化EBV感染細胞株を樹立する。樹立後、LCL-Criをヒト化マウス肝臓に直接移植する(図2)。LCL-Criをヒト化マウス尾静脈から移植したところ感染細胞を生体イメージング装置で検出された(図3)。LCL-Criは10個、 $10^2$ 個、 $10^3$ 個、 $10^4$ 個をそれぞれ5匹ずつ移植し、このセットを2セット計40匹使用する。1セットは免疫抑制薬(タクロリムス)を0.15mg/kg/day/2回投与する。移植に際し、エコーで肝臓の位置を把握し、同じ部位への移植を心がける。移植後1時間後の撮影の後には毎日1回の撮影を行う。また、毎週1回の末梢血採血を100 $\mu$ l行い、EBV定量解析とFCM解析(CD3, CD4, CD8, CD56, CD16, CD19, CD20, CD23, HLA-DR)を行い宿主免疫細胞の挙動をチェックし免疫応答の経時変化を追跡する。赤く光らないB細胞でEBV感染が検出されれば、感染細胞の再活性化によりウイルス複製があった一つの証拠になる。

## 4. 研究成果

EBウイルス(EBV)関連移植後リンパ増殖症

(PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorder)の予防と治療法の確立を目指した。

(A) EBV感染細胞の増殖には2通りある。(1) 潜伏感染細胞が再活性化しウイルス産生細胞へと様式を変え感染により感染細胞を増やす (2)潜伏感染細胞(タイプ0ないしI)が再活性化し増殖に適したタイプIIIの遺伝子発現に変わり細胞増殖により感染細胞を増やす の2通りであるが、臓器とともに移行すると考えられているEBV感染細胞はどちらの様式でPTLDに至るのかを明らかにするためにヒト化マウスを作成し、その肝臓にEBV感染細胞を $1 \times 10^5$  cells移植し、どちらの形態により感染細胞が増殖しPTLDを発症させるかを検討した。その結果、移植直後に感染細胞は子ウイルスを複製し、感染細胞を増やす。しかし、免疫細胞が機能している環境下では複製細胞は直ちに排除され感染細胞のパンデミックは起こらない。この場合感染細胞の細胞分裂による増殖が主なPTLDの原因であることが示された。5)免疫抑制薬の種類とPTLD発症の関連性について検討する。

(B) 移植片からの感染細胞の伝播の仕組みを解明した。感染細胞の動向と病態発現の関連を明らかにする事を目指し、マウス肝臓に蛍光を発する遺伝子導入されたEBV感染細胞を $1 \times 10^5$  cells移植感染細胞の動態を視覚的に生体内イメージングによりトレースした。その結果、まず肝臓内で感染細胞は増殖し、その後末梢血中に供給されPTLD発症に成る事が示された。

(C) 感染細胞を取り巻く免疫細胞の動向とPTLD発症の関連を明らかにした。マウス肝臓にEBV感染細胞を $1 \times 10^5$  cells移植し、免疫抑制剤を投与した。免疫抑制剤多量投与ヒト化マウス群ではPTLD発症の割合は60%以上であり、免疫抑制剤日投与群は10%以下であった。免疫細胞存在下では感染細胞の排除が機能しPTLDの発症が抑制されていることが示唆された。

## 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8件)

1. Clinically Mild Encephalitis /Encephalopathy With a Reversible Splenic Lesion Accompanied by Epstein-Barr Virus Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: A Case Report and Review of the Literature.

- Yamaguchi H., Ishida T., Yokoi T., Tanaka T., Maruyama A., Nagase H., Hasegawa D., **Imadome K.**, Takeda H., Kosaka Y., Uetani Y.  
J Pediatr Hematol Oncol. 2017 Mar;39(2):e92-e96.
2. EBV induces persistent NF-κB activation and contributes to survival of EBV-positive neoplastic T- or NK-cells.  
**Imadome K\***, Takada H\*, Shibayama H., Yoshimori M., Wang L., Saitoh Y., Uota S., Yamaoka S., Koyama T., Shimizu N., Yamamoto K., Fujiwara S., Miura O., Arai A. ( \* *contributed equally to this work* )  
PLoS One. 2017 Mar 27;12(3):e0174136. doi: 10.1371/journal.pone.0174136. eCollection 2017 Mar 27.
3. Generation and analysis of humanized mouse model of EBV infection.  
**Imadome K.**, Fujiwara S.  
Methods Mol Biol. 2017; 1532:241-254
4. Transmission of chromosomally integrated humanherpesvirus 6 via cord blood transplantation.  
Yamada Y., Osumi T., **Imadome K.**, Takahashi E., Ohye T., Yoshikawa T., Tomizawa D., Kato M., Matsumoto K.  
Transpl Infect Dis. 2017 Feb;19(1):1-4
5. Chronic active Epstein-Barr virus infection with marked pericardial effusion successfully treated with allogeneic peripheral blood stem cell transplantation.  
Matsui S, Takeda Y, Isshiki Y, Yamazaki A, Nakao S, Takaishi K, Nagao Y, Hasegawa N, Togasaki E., Shimizu R., Kawajiri C., Sakai S., Mimura N., Takeuchi M., Ohwada C., Sakaida E., Iseki T., **Imadome K.**, Nakaseko C.  
Rinsho Ketsueki. 2016 May;57(5):624-9.
6. Hematopoietic stem cell transplantation for adults with EBV-positive T- or NK-cell lymphoproliferative disorders: efficacy and predictive markers.  
Arai A., Sakashita C., Hirose C., **Imadome K.**, Yamamoto M., Jinta M., Fujiwara S., Tomita M., Shimizu N., Morio T., Miura O.  
Bone Marrow Transplant. 2016 Jun; 51(6):879-82.
7. Epstein-Barr virus positive T cell lymphoproliferative disease following cord blood transplantation for acute myeloid leukemia.  
Yui S., Yamaguchi H., **Imadome K.**, Arai A., Takahashi M., Ohashi R., Asayama T., Kondo A., Moriya K., Nakayama K., Dan K., Shimizu S., Inokuchi K.  
J Nippon Med Sch. 2016 ;83(1):35-42.
8. P-glycoprotein is expressed and causes resistance to chemotherapy in EBV-positive T-cell lymphoproliferative diseases.  
Yoshimori M., Takeda H., **Imadome K.**, Kurata M., Yamamoto K., Koyama T., Shimizu N., Fujiwara S., Miura O., Arai A.  
Cancer Med. 2015 Jul 8.
- 〔学会発表〕(計5件)
1. CAEBV モデルマウスの応用とこれから  
古田頌子、児玉栄一、川野布由子、新井文子、伊藤守、清水則夫、松田剛、藤原成悦、今留謙一  
第12回EBウイルス研究会 2015年7月20日 - 7月21日 出雲
2. Six cases of late-onset EBV-associated PTLD  
Mariko Shimizu, Akihisa Sawada, Maho Sato, Ryu Okumura, Azusa Mayumi, Kohei Higuchi, Masahiro Yasui, Ken-Ichi Imadome, Keisei Kawa, Masami Inoue  
第77回日本血液学会 2015年10月16日 - 10月18日 金沢
3. 長期間全身EBV感染の再活性化を認めず咽頭 T-LPD を発症した CAEBV の1例  
東良紘、小林光、三宅晶子、太田陽香、市村卓也、田原晋作、原浩貴、山下裕司、今留謙一、藤原成悦、大島孝一、大賀正一  
第25回EBウイルス感染症研究会  
2016.3.20 東京
4. EBウイルスゲノムコピー数の簡単迅速定量系の構築  
外丸靖浩、渡邊健、清水則夫、今留謙一  
第13回EBウイルス研究会 2016.7.9 東京
5. Identification and functional analysis of Epstein-Barr virus EBNA3C Nuclear localization signal 4(NLS4)  
Go Matsuda, Ken-Ichi Imadome  
第64回日本ウイルス学会学術集会  
2016.10.24 札幌
- 〔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

6. 研究組織

- (1) 研究代表者 今留謙(IMADOME, Ken-Ichi)  
国立成育医療研究センター・高度感染症診断部・部長  
研究者番号：70392488
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし
- (3) 研究協力者 川野布由子(KAWANO, Fuyuko)  
国立成育医療研究センター・高度先進医療研究室・研究員  
研究者番号：80790469