

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10134

研究課題名(和文) 小児肝移植後EBウイルス持続感染に関する分子生物学的診断・治療アルゴリズムの開発

研究課題名(英文) Development of molecular biological diagnosis and treatment algorithm for persistent EB virus infection after pediatric liver transplantation

研究代表者

福田 晃也 (Fukuda, Akinari)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器移植センター・診療部長

研究者番号：60455417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：小児肝移植後にEBウイルスに初感染する割合は約60%でEBVゲノム数の高値が持続することが多く、致死率の高い移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)を発症する可能性がある。PD-1(programmed cell death-1)受容体は活性化T細胞の表面に発現する。EBV感染細胞が表出するPD-1の発現量を測定することによりPTLD発症のhigh risk群を同定できる可能性がある。PTLD発症high risk群を特定する治療アルゴリズムを構築することを目的として検討を行い、CD8陽性Tリンパ球中のPD-1陽性率とRecent thymic emigrantsの組み合わせが有用であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBV自体、EBV感染細胞、宿主であるレシピエントの免疫細胞の状態という因子を新規のbiomarkerを組み合わせることによりhigh risk群を特定することで効率的かつ効果的にEBV感染に対する治療を行うことでPTLDの発症リスクを最小限とし、さらに不要な免疫抑制剤の減量による拒絶反応の頻度を減らすことができれば最終的に小児肝移植成績の向上につながる。

研究成果の概要(英文)：The primary infection rate of EB virus after pediatric liver transplantation is about 60%, and the high EBV genome number often persists, which may lead to post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD), which is highly fatal. PD-1 (programmed cell death-1) receptor is expressed on the surface of activated T cells. By measuring the expression level of PD-1 expressed by EBV-infected cells, it may be possible to identify the high risk group of PTLD onset. A study was conducted with the aim of constructing a therapeutic algorithm for identifying the high risk group of PTLD onset, and the combination of PD-1 positive rate in CD8+ T lymphocytes and Recent thymic emigrants was useful.

研究分野：小児肝移植

キーワード：EBウイルス 小児肝移植 ウイルス感染症 分子生物学的診断

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr Virus (EBV)はBリンパ球を主な標的細胞として感染を受けたナイーブB細胞は活性化されEBVを内在した状態で増殖することにより免疫チェック機構を逃れて長期の潜伏感染が成立する。このように、EBVのライフサイクルはB細胞の正常な増殖・分化の機構を巧みに利用したものとなっている。

伝染性単核球症、バーキットリンパ腫、ホジキン病、PTLD (post-transplant lymphoproliferative disorder)などはEBV感染B細胞の増殖を伴う疾患である。また、EBVは時にT細胞やNK細胞にも感染し、慢性活動性EBV感染症、血球貪食症候群などの原因となる。このようなリンパ球への感染の他に、上皮細胞へのEBV感染が疾患の原因として報告されているものに胃癌、上咽頭癌などがある。PD-1 (programmed cell death-1)受容体は活性化T細胞の表面に発現し、リガンドであるPD-L1は通常抗原提示細胞の表面上に発現する。PD-1、PD-L1は、T細胞応答を抑制もしくは停止させる共同抑制因子として働く免疫チェックポイント・タンパク質である。PD-L1は進行肺小細胞癌、腎癌などの進行上皮腫瘍だけでなくEBV関連のホジキンリンパ腫やPTLDにおいてもPD-L1が高発現することが報告されており³⁾、このPD-L1が活性化している細胞傷害性T細胞表面のPD-1に結合するとT細胞の活動が抑制されることから、PD-1/PD-L1を介したメカニズムは腫瘍免疫に対する腫瘍細胞の抵抗性を示すものである。EBV感染細胞が表出するPD-L1の発現量を測定することによりPTLD発症のhigh risk群を同定できるとともにPD-1やPD-L1に対する抗体製剤による治療への展望が開ける可能性がある。

PTLDの発症には宿主側の因子として、Tリンパ球、Bリンパ球、細胞傷害性T細胞(cytotoxic T-lymphocyte: CTL)やNK細胞の分化・増殖・活性化の状態が深く関わっている。EBV特異的な細胞傷害性T細胞の分化・増殖状態のbiomarkerとしてTRECs (T-cell receptor excision circles)を用いることでPTLD発症の予測と早期治療介入することができる可能性がある。

2. 研究の目的

小児肝移植後にEpstein-Barr Virus (EBV)に初感染する割合は約60%でEBVゲノム数の高値が持続することが多く、潜伏感染のため抗ウイルス薬の効果はなく致死率の高い移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)を発症する可能性がある。そこで、PTLDを発症するEBV自体の腫瘍化の素因と宿主であるレシピエント側の免疫能の素因として以下の因子を解析しEBVゲノム数高値の原因の解明、PTLD発症high risk群を特定する治療アルゴリズムを構築することを目的とした。

- ・EBV感染細胞の因子：免疫チェックポイント・タンパク質であるPD-1/PD-L1の発現解析。
- ・宿主側の免疫能の因子：リンパ球の分化・増殖に関するTRECsの発現解析。

3. 研究の方法

国立成育医療研究センターにて肝移植術を受けた407例から、採取した血液検体から、EBV、CMVおよびその他(アデノウイルス、HHV-6、HHV-7、ParboB19など)のDNAを抽出しPCR検査を行った。

また、Flow cytometry (FCM)を用いて、各種リンパ球表面マーカーを検出することにより以下の項目について検討した。

- ・PD-1およびPD-L1の発現とEBV感染状況
- ・Tリンパ球の分化・増殖過程で産生されるTRECsの発現レベルを検討した。TRECsの厳密な検討は1-2日用するため、簡便で迅速な診断とは言えない。そこでFCM法を利用してTRECsの結果と相関し、かつ簡便で迅速に解析できるマーカーとしてCD3+ / CD4+ / CD31+ / CD45RA+の細胞を検討した。

EBV-PCR検査にてEBVゲノムが検出されなかった群(N群; n=329検体)、viral loadが600未満のLow viral load群(L群; n=103検体)、viral loadが600以上のHigh viral load群(H群; n=126検体)の3群において、それぞれの測定時点における、末梢血CD8陽性Tリンパ球のPD-1の発現率を、またEBV感染があると考えられるCD19又はCD20陽性のBリンパ球のPD-L1の発現率について検討した。

さらに、新生T細胞の分化・増殖能の指標としてCD3+ / CD4+ / CD31+ / CD45RA+の発現率を同時に検討してEBV感染状況との相関に関して検討した。

4. 研究成果

肝移植時の患児のリンパ球の活動性の指標として、TRECs(T-cell receptor excision circles)およびKRECs(kappa deleting recombination excision circles)が、それぞれTリンパ

球およびBリンパ球の分化・増殖状態の biomarker となるか否かを検討するに当たり、臨床的には迅速さが要求されることが課題であった。すなわち、TREC_s の厳密な検討は1-2日を要するため、簡便で迅速な診断とはいえない。そこでFCM法を利用してTREC_sのかつ簡便で迅速に解析できるマーカーとしてCD3+/CD4+/CD31+/CD45RA+/CD45RO-の細胞を検討結果と相関を検討した。FCM法を利用してTREC_sよりも簡便で迅速に解析できるマーカーとしてCD3+ /CD4+ / CD31+ / CD45RA+の細胞を検討結果、大まかであるが、TREC_sの代替として用いることができることを肝移植後の患児末梢血検体で示された。

EBV Viral Loads レベル別のPD-1及びPD-L1の発現率を、EBV-DNAのPCR検査結果にて600 copies/μgDNA以上のHigh viral loads群、600 copies/μgDNAのLow viral loads群、検出感度以下の非検出群の3群において次のリンパ球分画におけるPD-1及びPD-L1の発現率を検討した。(A) CD8陽性Tリンパ球中PD-1発現率。EBVゲノムの非検出群とHigh群並びにLow群とでPD-1発現が有意に高かった。(B)CD19またはCD20陽性Bリンパ球におけるPD-L1発現率はEBVゲノム非検出群において有意に上昇していた。Kruskal-Wallisの検定(p-value < 0.05) (図1)

図2では、EBVだけでなくCMV、HHV-6、HHV-7、アデノウイルスなどの罹患している群とウイルス感染が検出されなかった群に分けて、PD1およびPD-L1の発現率を検討した。PD-1では感染群にて有意に発現が亢進し、逆にCD19/20陽性Bリンパ球においてはPD-L1の発現は有意に減弱していた。

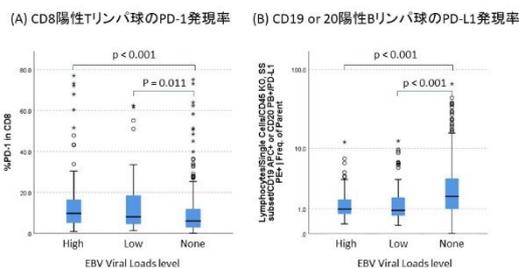


図1: EBV Viral Loadsレベル別のPD-1及びPD-L1の発現率を、EBV-DNAのPCR検査結果にて600 copies/μgDNA以上のHigh viral loads群、600 copies/μgDNAのLow viral loads群、検出感度以下の非検出群の3群において次のリンパ球分画におけるPD-1及びPD-L1の発現率を検討した。(A) CD8陽性Tリンパ球中PD-1発現率。EBVゲノムの非検出群とHigh群並びにLow群とでPD-1発現が有意に高かった。(B)CD19またはCD20陽性Bリンパ球におけるPD-L1発現率はEBVゲノム非検出群において有意に上昇していた。Kruskal-Wallisの検定(p-value < 0.05)

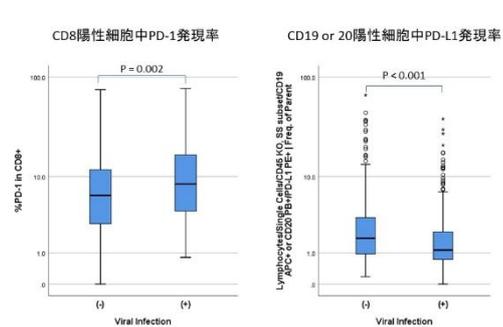


図2: ウイルス感染の有無とPD-1及びPD-L1の発現率Mann-WhitneyのU検定 (p-value < 0.05)

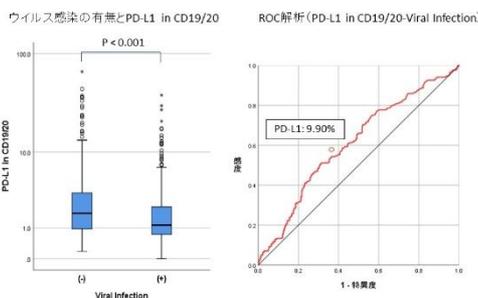


図3: ウイルス感染の有無とPD-L1発現率 (Mann-WhitneyのU検定p-value < 0.05) ROC-AUC: 0.608, 感度: 0.512, 特異度: 0.316

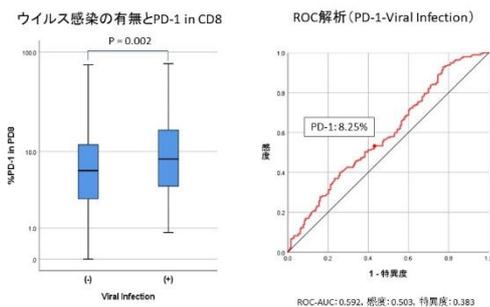


図4: ウイルス感染とPD-1発現率, Mann-WhitneyのU検定 (p-value < 0.05)

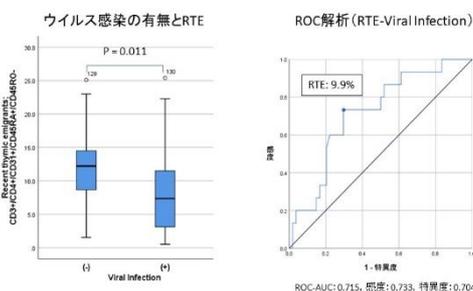


図5: ウイルス感染とnaïve-T-cell分画(RTE*) RTE* : Recent thymic emigrants (CD3+/CD4+/CD31+/CD45RA+/CD45RO-) Mann-WhitneyのU検定 (p-value < 0.05)

PTLDを検出するためのアルゴリズム

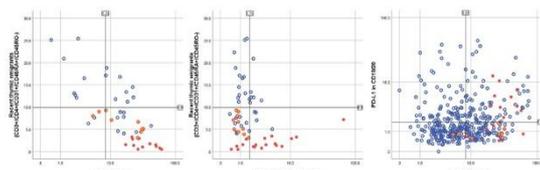


図6: ROC曲線から得られた、RTE、PD-1 in CD8、PD-L1 in CD19/20のcutoff値からPTLDを発症した症例と、リンパ腫を発症していた症例とが最も限られた領域に集積していたので、RTEの9.9%未満とPD-1 in CD8の8.3%以上が同時に認められる場合には、PTLDの発症を考慮してカルシニューリン阻害薬を減量し、全身CTにて腫瘍性病変の拡大の有無を検索する必要があると考えられた。

図3ではウイルス感染と naïve-T-cell 分画 (RTE*) RTE* : Recent thymic emigrants

(CD3+/CD4+/CD31+/CD45RA+/CD45RO-) を解析することにより、T 細胞の分化能および新生能とウイルス感染の有無の関係を検討したところ、ウイルス感染がある状況では T リンパ球の分化・新生能が有意に低下していることが示された。また、ウイルス感染の有無の分岐点となる RTE の cutoff 値を ROC 解析にて検討したところ RTE が 9.90% 未満となった場合にはウイルス感染の状態である確率が高くなると推測された。同様の以下解析を CD8 陽性 T リンパ球および CD19/20 陽性の B リンパ球においても検討し、それぞれウイルスに対する感染を引き起こす cutoff 値は 8.25% 以下および 1.75 以上と算出された (図 4, 5)。

最後に RTE の陽性率、CD8 陽性 T リンパ球中の PD-1 陽性率および CD19/20 陽性の B リンパ球 PD-L1 陽性率の 2 組毎に 3 通りに組み合わせで相関図を作製し、前述の cutoff 値を用いて各組み合わせにおいて 4 つの分画を策定した。今回検討した 407 例中 PTLD を発症した患児は 1 名、また術前には不明であったが、術中のリンパ節生検にてリンパ腫と判明した患児が 1 名おり、2 例の検査データをそれぞれ、色分けし散布図で示したところ、RTE 陽性率低値-CD8 陽性 T リンパ球中の PD-1 発現率高値の分画くにこれらリンパ腫症例の検査値が集中して認められた (図 6)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今留謙一
2. 発表標題 日和見感染症関連ウイルスと移植後リンパ増殖症の診断と病態把握
3. 学会等名 第3回日本移植学会オースタムセミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 今留謙一
2. 発表標題 EBV-T/NK-LPDの診断と病態把握
3. 学会等名 下野Hematology Seminar 2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今留謙一
2. 発表標題 EBV関連T/NK細胞リンパ増殖症の病態把握と診断および治療戦略
3. 学会等名 第2回血液疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阪本 靖介 (Sakamoto Seisuke) (00378689)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器移植センター・医長 (82612)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	笠原 群生 (Kasahara Mureo) (30324651)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・臓器移植センター・センター長 (82612)	
研究 分 担 者	今留 謙一 (Imadome Ken-Ichi) (70392488)	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 (82612)	