

令和元年5月30日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16282

研究課題名(和文)造血幹細胞移植後HHV-6B再活性化と急性GVHD鑑別のためのバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Biomarkers for distinguishing acute GVHD from HHV-6B reactivation after hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

三浦 浩樹 (Miura, Hiroki)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：10751761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植患者のHHV-6Bモニタリングを行い、HHV-6B再活性化群(A群)17例、皮膚GVHD群(B群)13例、HHV-6B再活性化+皮膚GVHD群(C群)11例、ともに認めなかった群(D群)18例の4群に分類した。11種類の血清中サイトカイン/ケモカインを測定した。D群に比してA群は第2週でIL-2, 4, 6, 10、第3週でIL-10, IP-10、第6週でIP-10, TNF- α が、B群は第2週でIL-4, 17、第3週でIL-4, 10, IP-10、第6週でIL-10, 17が有意に上昇していた。レーダーチャートを作成し、A群とB群で第1, 2週では図形は類似したが、第3, 4, 6週で偏位を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HHV-6Bは同種造血幹細胞移植患者で移植後2から4週間に再活性化し、急性GVHDの好発時期に一致し、臨床症状からHHV-6B再活性化に伴うウイルス性発疹症と真の皮膚GVHDの鑑別は困難である。急性GVHDに対してはステロイド治療を行うが、HHV-6B再活性化に対しては抗ウイルス薬の投与が必要であり、ステロイド治療はむしろ感染を助長する危険性がある。本研究によって移植後のサイトカインプロファイルを行うことで両者を鑑別できる可能性を見出した。このことは移植後種々の合併症に対する適切な治療選択に有用であるだけでなく、不要な治療を回避することで医療費の削減にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Monitoring of HHV-6B reactivation was carried out in hematopoietic cell transplant patients. The group was divided into four groups: HHV-6B reactivation group: 17 cases, skin GVHD group: 13 cases, HHV-6B reactivation and skin GVHD group: 11 cases and control group which were not recognized both HHV-6B reactivation and skin GVHD: 18 cases. Eleven kinds of cytokines and chemokines were measured from serum that collected from patients at 1, 2, 3, 4 and 6 weeks after hematopoietic cell transplantation.

In HHV-6B reactivation group, IL-2, 4, 6, 10 at week 2, IL-10, IP-10 at week 3, IP-10, TNF- α at week 6 were significantly increased compared to the control group. In skin GVHD group, IL-4, 17 at week 2, IL-4, 10, IP-10 at week 3, and IL-10, 17 at week 6 were significantly increased compared to the control group.

Rader charts showed that the figures on the 1st and 2nd weeks were similar in the A and B groups, but the figures on the 3rd, 4th and 6th weeks were different between these groups.

研究分野：ヘルペスウイルス

キーワード：HHV-6B 急性GVHD サイトカイン バイオマーカー

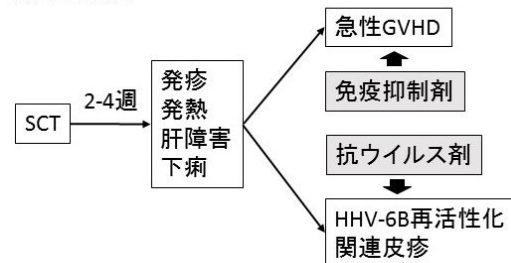
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は Human herpesvirus 6B (HHV-6B)が突発疹の起因ウイルスであることを証明 (*J Pediatr* 114:535-539, 1989.) した後、数多くのウイルス学的診断法を開発することで確実なウイルス学的解析を可能にした (*Pediatrics* 84:675-677, 1989., *J Med Virol* 30:14-19, 1990., *J Med Virol* 70:267-272, 2003., *J Clin Microbiol* 42:140-145, 2004., *J Clin Virol* 2007 39:22-26.)。その結果として、HHV-6 感染症の初感染ならびに再活性化時の臨床像解明に多大な貢献をしてきた。中でも約 25 年間にわたり造血細胞移植(SCT)患者を対象として継時的なウイルス分離とリアルタイム PCR 法による血中ウイルス DNA 量測定を行い、臨床現場にデータをリアルタイムに還元するとともに、移植後 2 から 4 週間に約半数の患者で HHV-6B が再活性化することを世界で初めて報告した (*Blood* 78:1381-1384, 1991.)。臨床的には発熱と皮疹を呈し (*Bone Marrow Transplant* 2001 28:77-81., *J Infect Dis* 2002 185:847-853.)、ドナー細胞生着に伴う種々のサイトカイン上昇が HHV-6B 再活性化に重要な役割を果たしている (*J Infect* 2008 57:241-248.) ことも明らかにした。その後海外からも HHV-6B 再活性化が急性 GVHD の発症に關与している (*Pediatr Infect Dis J* 2015 34:1118-1127)、あるいは IL-10 が発症に寄与する (*J Am Acad Dermatol* 2008 58:802-809) といった可能性が報告されているが、現在も HHV-6B 再活性化と急性 GVHD との関連性は明確になっていない。

(2) HHV-6B 再活性化と急性 GVHD は同時期に好発し、皮疹の性状から両者を鑑別することは極めて困難である。海外から HHV-6B 再活性化が急性 GVHD のリスク因子となることが報告されている (*Clin Infect Dis* 2005 40:932-940.) が、そもそもウイルス感染に伴う皮疹と急性 GVHD の鑑別が極めて困難で、急性 GVHD とされたものに HHV-6B 再活性化関連皮疹が含まれていた可能性がある。急性 GVHD の治療はステロイド投与が基本であるが、HHV-6B 再活性化関連皮疹であれば抗ウイルス薬治療が基本であり、治療方策を考えるうえでも両者の鑑別は極めて重要である (図 1)。

図1. 急性GVHDとHHV-6B再活性化関連皮疹の鑑別の重要性



我々のこれまでの研究は、HHV-6B 再活性化のメカニズム解析のためにウイルス再活性化の有無で 2 群に分け、CBA アレイ (BD Biosciences) を用いて複数のサイトカイン、ケモカインを測定しデータを蓄積してきた (*J Med Virol* 2014 ;86:512-8.)。しかしながらこの手法では、臨床的に重要度の高い HHV-6B 再活性化関連皮疹と acute GVHD の鑑別にはつながらず、測定するバイオマーカーの数にも限界があった。そこで本研究では、いまだ明らかになっていない SCT 後 HHV-6B 再活性化関連皮疹と急性 GVHD を鑑別するためのバイオマーカーをどのように同定するかという点に焦点を絞って研究を立案した。現在我々が保有しているデータを解析すると、約 20% の患児で急性 GVHD を発症しているが、そのうち病理診断が実施されているものは 18% に過ぎない。つまり、小児を対象とした場合、侵襲的検査のハードルがあり、病理学的解析に基づく急性 GVHD 診断そのものが困難という現実がある。そこで本研究では、HHV-6B 再活性化群 (皮膚 GVHD 発症なし)、皮膚 GVHD 群 (HHV-6B 再活性化なし)、コントロール群 (HHV-6B 再活性化なし、皮膚 GVHD 発症なし) を対象として、より多数のバイオマーカー解析が可能な MILLIPLEX (Merck 社) を使用し網羅的にサイトカイン、ケモカイン、細胞増殖因子などを測定し、その結果を群間比較し臨床現場で使用可能なバイオマーカー探索を目指した。

2 . 研究の目的

SCT 後 HHV-6B 再活性化は移植後 2 ~ 4 週間に発症し、急性 GVHD の好発時期に一致し、HHV-6B 感染に伴うウイルス性発疹症と真の皮膚 GVHD の鑑別は困難である。両者の鑑別は治療方策を決めるうえでも極めて重要と考えられるため、本研究では両者を鑑別するためのバイオマーカー探索を目指す。有用なバイオマーカーの臨床応用により、各病態に適切な治療法選択が可能となり患者予後改善に寄与し得る。

3 . 研究の方法

(1) 解析対象の選択：名古屋大学医学部小児科で SCT を受けた 19 歳以下の小児が対象と。電子媒体に統一した様式で正確な患者情報が収集されている過去 10 年間に移植を受けた約 500 例の中から、移植後 60 日以降までフォローできた症例を抽出し対象(推定約 300 例)とした。その中から、バイオマーカー測定対象となる移植前から移植後 1 週、移植後 2 週、3 週、4 週、6 週の血清が 500 μ l 以上凍結保存されている症例をさらに絞り込んだ。測定のタイムポイントは過去の HHV-6B 再活性化に關与するサイトカイン解析時のデータ(*J Infect* 2008 57:241-248)を参考に設定した。

(2) HHV-6B 再活性化の評価：HHV-6B 分離培養またはリアルタイム PCR 法を行い、分離陽性または全血中 HHV-6B DNA > 10000 copies/mL のいずれかを満たした場合 HHV-6B 再活性化と定義する。その結果を基に、HHV-6B 再活性化群、HHV-6B 非再活性化群に分け、さらにそれらの症例を急性皮膚 GVHD の臨床診断の有無により 4 群に分類した(A : 再活性化+、皮膚 GVHD-、B : 再活性化-、皮膚 GVHD+、C : 再活性化+、皮膚 GVHD+、D : 再活性化-、皮膚 GVHD-)。

(3) バイオマーカー探索：移植前から移植後 1 週目、2 週目、3 週目、4 週目、6 週目の血清から MILLIPLEX (Merck 社)を使って 11 種類のサイトカイン、ケモカイン、細胞増殖因子 (IFN- γ 、IL-10、IL-12、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IP-10、TNF- α 、VEGF)を測定した。

(4) 統計学的解析：サイトカイン・ケモカインプロファイルの結果を各群間で比較統計解析をおこなった。検定には統計ソフト JMP 13 を用いて Mann - Whitney U 検定を行った。

4 . 研究成果

(1) 対象症例：A 群 17 例、B 群 13 例、C 群 11 例、D 群 18 例が対象となった。A 群のうち 4 例が皮疹を呈していたが、臨床症状や皮膚生検から GVHD は否定された症例だった。B 群は皮膚生検により GVHD と診断された症例 (7 例)を中心に対象に選んだ。HHV-6B 再活性化日は中央値移植後 19 日(10 - 27 日)、急性皮膚 GVHD による皮疹発症日は中央値移植後 21 日(9 - 83 日)だった。

(2) サイトカイン/ケモカイン/増殖因子測定結果：コントロール群 (D 群)に比して HHV-6B 再活性化群(A 群)は第 2 週で IL-2、4、6、10、第 3 週で IL-10、IP-10、第 6 週で IP-10、TNF- α が、皮膚 GVHD 群(B 群)は第 2 週で IL-4、17、第 3 週で IL-4、10、IP-10、第 6 週で IL-10、17 が有意に上昇していた。B 群では A 群にして比して第 6 週の IL-10 が有意に上昇していたが、HHV-6B 再活性化や GVHD の好発時期である 2 ~ 4 週では有意な差はなかった。サイトカイン/ケモカイン/増殖因子を測定し、コントロール群と比較することにより、HHV-6B 再活性化による皮疹と皮膚 GVHD の鑑別ができる可能性が見いだせた。今後はさらに症例数を増やしサイトカイン/ケモカイン/増殖因子の動態をより正確に分析することで、A 群と B 群の差異が明らかになる可能性がある。

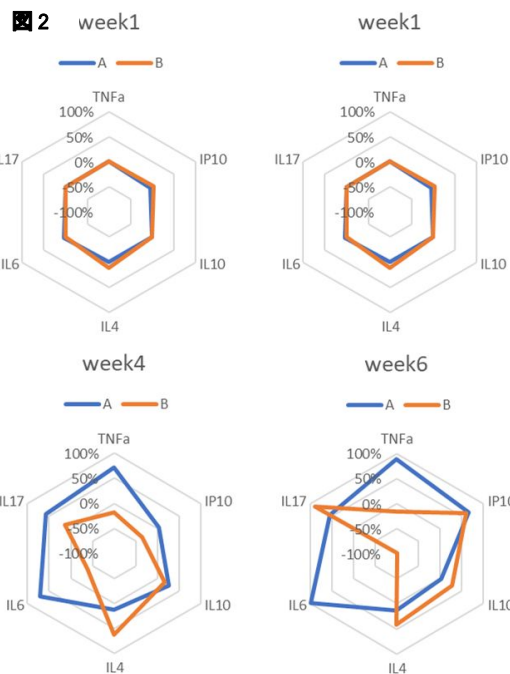
(3) サイトカイン/ケモカイン/増殖因子プロファイルの比較：いずれの測定ポイントでもD群と差のなかったIFN- γ 、IL-1 β 、VEGF、測定結果がほぼ検出感度以下であった、IL-2、IL-12を除いた6種類のサイトカイン/ケモカイン(TNF- α 、IL-4、6、10、17、IP-10)でレーダーチャートに表示した。A群、B群の各サイトカイン/ケモカインの中央値と、D群の各サイトカイン/ケモカイン/増殖因子の中央値の差を計算し、さらに任意の最大値を設定して、最大値に対するパーセンテージを計算し、レーダーチャート作成した。(図2)

定して、最大値に対するパーセンテージを計算し、レーダーチャート作成した。

(図2)

A群とB群の各サイトカイン/ケモカイン/増殖因子測定値の比較では第6週のIL-10を除いて有意な差はなかったが、レー

ダーチャートで視覚的に比較すると、第1,2週で図形は類似していた。一方、第3,4,6週では図形の偏位が認められた。B群では第3週にTh2サイトカインであるIL-4、6、10の上昇が目立った。一方、A群では第4,6週で炎症性サイトカインであるTNF- α やIL-6の上昇が目立つ傾向にあった。レーダーチャートでサイトカイン/ケモカイン/増殖因子を視覚的に示すことで、HHV-6B再活性化と皮膚GVHDの鑑別に寄与する可能性を見出した。



(4) C群 (HHV-6B再活性化+, 皮膚GVHD+)の鑑別：皮膚生検により皮膚GVHDと診断された7症例の中央値を(3)と同様の方法でレーダーチャートを作成した。A群、B群ともに類似しない図形を示した。一方、皮膚生検を施行していない4症例について、それぞれレーダーチャートを作成したが、A群、B群ともに類似しない図形を示した。これは、HHV-6B再活性化と皮膚GVHDが合併することでよりサイトカイン/ケモカイン/増殖因子の値に影響を及ぼした可能性が考えられた。今後皮膚生検によって確定診断された皮膚GVHD、かつHHV-6B再活性化が認められた症例をより多く解析し、レーダーチャートの特徴を示すことで、A群やB群との差異がより正確に示すことができると考えられる。その上でHHV-6B再活性化による皮疹か皮膚GVHDかの鑑別に困難な症例において、サイトカイン/ケモカイン/増殖因子プロファイルをレーダーチャートで示すことで両者の鑑別が可能になる可能性がある。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。