

平成 20 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790787  
 研究課題名（和文）  
 EBウイルス関連疾患による全身・局所皮膚症状が引き起こされるメカニズムの解明  
 研究課題名（英文）  
 Analyses of systemic and topical cutaneous symptoms caused by Epstein-Barr virus related disorders  
 研究代表者  
 山本 剛伸（YAMAMOTO TAKENOBU）  
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員  
 研究者番号：50379799

## 研究成果の概要：

EBウイルス関連疾患が皮膚症状、発熱などの全身症状をきたすメカニズムとして、宿主側の反応であるEBウイルス感染細胞に対する細胞傷害性T細胞の役割が大きい。細胞傷害性T細胞の皮膚病変部への浸潤が強い例は、重篤な症状を引き起こしやすい。一方、EBウイルス側にとって、細胞傷害性T細胞の反応は不利になるため、発現する抗原を必要最低限にし、さらに抗原の発現・消失を状況に応じて調節することにより宿主に認識されにくいようにしている。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：皮膚感染症

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚感染症、EBウイルス、細胞傷害性T細胞、潜伏感染、溶解感染

## 1. 研究開始当初の背景

EBウイルス関連疾患には、伝染性単核症、Gianotti症候群、種痘様水疱症、蚊刺過敏症、慢性活動性EBウイルス感染症、NK/T細胞リンパ腫などが含まれる。各疾患にはそれぞれ血液検査異常、特徴的な皮膚症状を呈する。例えば、伝染性単核症は頸部を中心としたリンパ節腫脹、発熱、さまざまな皮疹を形成する。種痘様水疱症は日光照射

後にEBウイルス感染細胞の皮疹部への浸潤に加え、水疱形成などがみられる。また、(重症型)種痘様水疱症は種痘様水疱症に似た臨床症状を呈するが、発熱・肝機能障害などの全身症状を引き起こす。蚊刺過敏症は蚊などに刺された部位にEBウイルス感染細胞の浸潤があり水疱、潰瘍を形成する。さらに発熱・肝機能障害などの全身症

状を形成する。(重症型)種痘様水疱症と蚊刺過敏症は高率に血球貪食症候群、悪性リンパ腫を引き起こし予後不良である。

このように各疾患の特徴はよく知られた事実であるが、なぜEBウイルスがこのような水疱・潰瘍などの皮膚症状、発熱などの全身症状をひきおこすのか、また、なぜごく一部の患者のみ発症するのかについては、全くといっていいほど解明されていない。

## 2. 研究の目的

EBウイルス関連疾患が全身症状・局所皮膚症状を引き起こすメカニズムを解明することを目的とする。

### (1) ウイルス側要因の確認。

感染ウイルス種の特徴を明らかにする。

### (2) ウイルス感染細胞側要因の確認。

EBウイルス関連疾患で発現される遺伝子について検討し、EBウイルス感染細胞がなぜ宿主の細胞傷害性T細胞(CTL)などに認識されにくいのか、なぜアポトーシスに陥りにくいのか、なぜ発熱などの全身症状、水疱・潰瘍などの皮膚症状を形成するのかを解明する。

EBウイルス感染様式には溶解感染と潜伏感染がある。このうち大半の細胞は潜伏感染しており、ごく一部の細胞が溶解感染(再活性化)している。このうち潜伏感染は発現遺伝子の違いによりLatency I型~III型に分けられ、宿主細胞に認識されにくいようになっている。溶解感染の時には多数の発現遺伝子があることが分かっている。しかし詳細はまだ解明されていない。

(3) EBウイルス感染細胞に伴って反応性に浸潤するEBウイルス非感染細胞の役割について確認する。病変部にはEBウイルス非感染細胞の浸潤が認められることが判明しているが、そのメカニズムは不明である。今

回この細胞の正常、役割を確認する。

## 3. 研究の方法

研究対象とする疾患は、EBウイルス感染を伴う皮膚疾患で、種痘様水疱症、蚊刺過敏症、慢性活動性EBウイルス感染症、鼻および鼻性リンパ腫、伝染性単核症、Gianotti症候群などである。

(1) 臨床症状および病理組織学的検討を行い、確定診断を行うと同時に、EBウイルス潜伏感染のスクリーニングテストを痂皮・血液・組織などを用いて実施する。

(2) ウイルス関連抗原発現の検討、さらにEBウイルス溶解感染存在のスクリーニングを、in situ hybridization法、PCR法、サザンブロット法、免疫染色法により施行する。

(3) われわれは従来潜伏感染関連遺伝子とされていたBam HI A Rightward transcripts(BARTs) mRNAが溶解感染時でも発現していることを証明した。しかし、その意義についてはまだ解明できていない。このため、再活性化誘導した細胞株でのBARTs発現状況の確認をRT-PCR法で行う。

(4) ウイルス側要因の検討：EBウイルス感染細胞はアポトーシスに陥りにくく、宿主免疫から逃れる機構を持っている。その重要な役割を果たしているのは、LMP1であると考えられる。LMP1は細胞内シグナルに重要な役割を果たし、感染細胞をアポトーシスに陥らないように制御している。さらに、LMP1発現量を少なくし、宿主免疫に認識されにくいようにしている。このLMP1の発現を痂皮、皮膚組織、末梢血単核球を用いて確認する。

(5) EBウイルス感染細胞に伴って反応性に浸潤するEBウイルス非感染細胞の確認のために、誘導される細胞の種類の同定、さらに発現・分泌される蛋白の解析を免疫染色で行う。

## 4. 研究成果

### (1) ウイルス関連抗原発現の検討

### ① 再活性化(溶解感染)を示すBZLF1の発現

皮膚病変部においては、悪性度の高い疾患ほど、BZLF1の陽性例が多かった。つまり、鼻・鼻性リンパ腫における発現率が最も高く、次いで慢性活動性EBウイルス感染症((重症型)種痘様水疱症、蚊刺過敏症)の順であった。良性疾患とされる(古典的)種痘様水疱症では1例もBZLF1が検出されなかった。末梢血におけるBZLF1は伝染性単核症の少数に確認されたのみで、悪性疾患においてもBZLF1発現は確認されなかった。また、同一症例における継続的な発現を検討したところ、常にBZLF1が陽性であることはなく、一時的に陽性となっていた。

### ② 潜伏感染(Latency II, III)で発現するLMP1の確認

皮膚病変をきたす疾患(鼻性リンパ腫、種痘様水疱症、蚊刺過敏症など)は、主にLatency IIに属し、LMP1は発現しているとされている。しかし、皮膚病変部、末梢血血液をサンプルとした検討では、LMP1が発現していない例がかなりあった。同一症例における継続的な発現を検討したところ、BZLF1と同様に、常にLMP1が発現しているわけではなかった。このことより、EBウイルス関連疾患では、発現する蛋白を適宜調節する(Latency IIからIへ変化することにより、宿主免疫から逃れている可能性が考えられる。

### ③ 薬剤によるBZLF1発現誘導

EBウイルスの再活性化(溶解感染)は、上皮細胞、B細胞に感染している場合に起こりやすく、T細胞、NK細胞に感染している場合は起こりにくいとされている。しかし皮膚病変をきたすEBウイルス関連疾患はT細胞、NK細胞が主体となる。このため、これらのNK/T細胞が再活性化をきたすことができるかを、慢性活動性EBウイルス感染症から樹立した細胞株を用いて検討した。その結果、B細胞と同様に薬剤

(TPA)を用いて慢性活動性EBウイルス感染症のNK細胞、T細胞ともにBZLF1発現を誘導することができた。さらに、BZLF1誘導の割合は、B細胞の場合とほとんど変わらないことがわかった。これにより、皮膚病変部において、EBウイルスが感染したNK/T細胞が再活性化している可能性が高い。

### ④ BARTs mRNAと再活性化

BARTsの機能解析のために、BARTs発現量とEBウイルス再活性化の関係について検討した。

従来、BARTsは潜伏感染関連遺伝子と考えられており、実際にすべての潜伏感染パターンで発現することを確認した。さらに、細胞株を用いて、再活性化を誘導したところ、ほとんどの細胞株においてBARTs mRNA発現量が亢進していた。このことより、BARTsは潜伏感染、溶解感染両方において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### (2) EBウイルス感染細胞に伴って反応性に浸潤するEBウイルス非感染細胞の役割

EBウイルス関連皮膚疾患の組織像では、EBウイルス感染細胞とともに、それ以上のEBウイルス非感染細胞の浸潤が確認される。免疫染色による確認では、浸潤しているEBウイルス非感染細胞はT細胞が大半であった。また、細胞傷害性因子であるTIA-1, granzyme B, granzyme Bの発現を免疫染色で確認したところ、T細胞の多くが陽性であった。このため、EBウイルス感染細胞とともに浸潤しているEBウイルス非感染細胞の多くはCTLであることがわかった。さらに、(古典的)種痘様水疱症と慢性活動性EBウイルス感染症((重症型)種痘様水疱症、蚊刺過敏症)でEBウイルス感染細胞とCTL浸潤の割合を検討したところ、慢性活動性EBウイルス感染症のほうが、有意差をもってEBウイルス感染細胞よりも多くのCTLが浸潤していた。

### (3) まとめ

以上のことより、潜伏感染状態では、表出する抗原が非常に限られており、CTLに認識されやすいEBNA3sなどはEBウイルス関連皮膚疾患では、ほとんど発現していない。また、LMP1は発現量が少なく、また状態によって、LMP1遺伝子を発現/消失するといった調節を行うことにより、免疫宿主に認識されるのを逃避しているものと考えられる。このため皮膚病変部にはCTL浸潤が少なくなるものと考えられる。

一方、溶解感染状態では、BZLF1をはじめとする、さまざまな溶解感染関連抗原が表出される。これに反応し、TIA-1, granzyme B, Granulysinなどを持ったCTLが誘導される。これらの細胞よりTNF- $\alpha$ 、Fas-Lなどが分泌され、アポトーシスを誘導する。さらにさまざまなサイトカインを放出することにより、発熱などの全身症状を誘導するものと考えられる。しかし、末梢血単核球では溶解感染が認められず、皮膚病変部でのみ確認されたことより、このような全身症状をきたすような反応は全身の反応ではなく、皮膚などの一部の場所でのみ惹起されることが予想される。

溶解感染はB細胞、上皮細胞に起こりやすいという報告があるが、今回の薬剤刺激で、T/NK細胞でも溶解感染が誘導されることが判明した。これにより皮膚病変部に浸潤しているEBウイルス陽性NK/T細胞が直接、再活性化している可能性が高い。

## 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 3 件)

- ① 山本 剛伸、岩月 啓氏、EBV関連皮膚疾患の診断と治療、Monthly Book Derma、147、2008、査読無
- ② 山本 剛伸、山田 晶子、岩月 啓氏、

EBウイルスとリンパ増殖症、日本皮膚科学会雑誌、118、3059-3068、2008、査読無

- ③ Takenobu Yamamoto, Akiko Yamada, Kazuhide Tsuji, Keiji Iwatsuki, Tracing of the molecular remnants of herpes virus infections in necrotic skin tissue, Eur J Dermatol., 18, 499-503, 2008, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Takenobu Yamamoto, Reactivation of Epstein-Barr virus is associated with severe cutaneous and systemic symptoms, International Investigative Dermatology 2008, 2008.5.16, Kyoto
- ② Takenobu Yamamoto, EBV gene expression and Host immune system, Satellite Workshop of IID 2008 in Kyoto, 2008.5.13, Kyoto
- ③ 山本 剛伸、EBV関連疾患の悪性化を評価するバイオマーカー、第18回岡山研究皮膚科フォーラム、平成20年1月19日、岡山市
- ④ 山本 剛伸、ヘルペスウイルス感染とアポトーシス、日本皮膚科学会岡山地方会、平成20年1月19日、岡山市

[図書] (計 1 件)

- ① 山本 剛伸、山田 晶子、岩月 啓氏、南江堂、皮膚感染症のすべて、2009

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 剛伸 (YAMAMOTO TAKENOBU)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50379799

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし