

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390307

研究課題名 (和文) EB ウイルス潜伏感染による疾患スペクトラムと病態解明

研究課題名 (英文) A disease spectrum induced by EB virus latent infections and the pathogenesis

研究代表者

岩月 啓氏 (IWATSUKI KEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80126797

研究成果の概要 (和文) : EBV (EBV) 関連疾患の種痘様水疱症、蚊刺過敏症や慢性活動性 EBV 感染症の疾患スペクトラムを明確にし、各病態を細胞・分子生物学的に解析した。これらの疾患では、1) 皮膚病変と血液症状に加えて、眼・口内・食道・腸管浸潤が重要な合併症であること、2) 疾患関連 EBV 感染細胞は、種痘様水疱症では $\gamma\delta$ T 細胞、蚊刺過敏症では NK 細胞であること、3) 発症には EBV の再活性化と潜伏感染様式の変化が重要であること、4) 患者は溶解感染関連 EBV 抗原に対して激しい細胞傷害性免疫応答を示すこと、5) EBV DNA 量モニターの臨床的意義、6) 治療薬としての HDAC 阻害剤の可能性について知見を得た。

研究成果の概要 (英文) : We have established a disease spectrum of EB virus (EBV)-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorders (LPD), including hydroa vacciniforme (HV), hypersensitivity to mosquito bites (HMB) and chronic active EBV infections, and analysed their pathogenesis by cellular and molecular basis. In these disorders, we found that 1) in addition to the cutaneous and hematological symptoms, oculomucosal and gastrointestinal lesions were major complications, 2) EBV-infected cell types related to the development of these disorders were of $\gamma\delta$ T cells in HV, and of NK cells in HMB, 3) reactivation of EBV from the latent infection, or alterations of latency infection patterns were important to induce the clinical symptoms, 4) host cytotoxic T lymphocyte (CTL)-mediated immune responses were induced against lytic-cycle infection-associated EBV antigens, 5) clinical significance of monitoring EBV DNA load, and 6) a possible therapeutic use of HDAC inhibitors.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,500,000 | 2,550,000 | 11,050,000 |
| 2009年度 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 2010年度 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,500,000 | 4,350,000 | 18,850,000 |

研究分野：一般皮膚科学、ウイルス性皮膚疾患、皮膚リンパ腫、自己免疫性皮膚疾患

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：種痘様水疱症、蚊刺過敏症、EBV、慢性活動性 EBV 感染症、T/NK リンパ球増殖症、 $\gamma\delta$ T細胞、NK細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) われわれは、種痘様水疱症、蚊刺過敏症、慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症、鼻型リンパ腫が EBV 関連 T/NK 細胞増殖症であることを報告した (Arch Dermatol 1997, Br J Dermatol 1999, Eur J Dermatol 2003)。多様な臨床症状発現は、末梢血にオリゴクローナルな EBV 感染細胞が存在し、異なった感染細胞クローンが対応臓器に浸潤し、宿主免疫応答の結果、特徴的臨床症状を発現するものと考えた (Br J Cancer 2001, Eur J Dermatol 2005, Arch Dermatol 2006)。蚊刺過敏症は NK 細胞増多症と関連していることが知られていたが、他疾患の発症に関連した EBV 感染細胞は不明であった。

(2) 臨床症例の検討から、悪性化する症例はアジア諸国と中南米に集積していることが明らかになった。われわれは、地域特異的発症を規定するウイルス側要因として、本邦症例の EBV サブタイプを報告したが (J Med Virol, 2000)、これは特殊なウイルスサブタイプとは言えない。地域特異的発症には EBV 抗原に対する宿主免疫の遺伝的不応答性が重要と考えられる。しかし、単純な免疫不全ではなく、患者はある種の EBV 抗原に対しては激しい免疫応答を示すものと考えられた。

2. 研究の目的

(1) EBV 潜伏関連抗原と宿主免疫反応の解析

皮膚病変と末梢血を材料に、①各症状発現にかかわる EBV 感染細胞の特定と、②EBV 再活性化に伴う遺伝子発現様式の変化、および③それに対する宿主免疫応答を解析する。

(2) ウイルス感染細胞の宿主免疫回避とアポトーシス阻害機序の解析

EBV 関連リンパ腫では、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の監視を回避するかのようになり、限られたウイルス抗原しか発現しない。また、ウイルスが産生する viral IL-10 は宿主免疫応答を減弱させ、bcl-2 ホモログは感染細胞のアポトーシスを阻害し、感染細胞を生存させる (Br J Cancer, 2001)。ウイルス潜伏感染に伴う免疫回避機序を打破することは、有効な CTL 反応を誘導し、本症を制御するストラテジーになると考え、①各病型における潜伏感染関連ウイルス遺伝子発現様式、②免疫制御分子、③アポトーシス関連分子発現、④再活性化誘導因子の解析を実施する。

(3) EBV 潜伏感染の生物学的意義の解析

これまで、EBV 潜伏感染細胞は病的な面だけが注目されてきたが、「潜伏感染」の真の生物学的意義は知られていない。ウイルス再活性化に伴い、さまざまなウイルス性スーパー抗原やサイトカインが産生されることは、CTL を賦活化させる有益な生物学的活性であ

る反面、不適切な自己反応性クローンの誘導により、I 型糖尿病などの合併症発現という不利益を導く可能性がある。本研究では、EBV 感染によって発現する内因性レトロウイルス関連遺伝子産物の HERVK18 に注目して研究を進める。

(4) 疾患活動性のモニター

EBV DNA 量のモニターは疾患の重症度と活動性を反映するとされているが、その臨床的意義は不明である。われわれは臨床例における EBV DNA 量を末梢血単核球分画と血漿分画で測定し、臨床経過と比較する。

(5) EBV 関連疾患の臨床統計に関する研究

新規開発した非侵襲的診断法 (J Microbiol Method, 2007) は、国内外から送付されてくる検体を用いた臨床診断を可能にした。本法で得られるウイルスおよび宿主遺伝子発現の結果は、各症例の活動性や予後と関連するバイオマーカーとして役立つ。さらに症例を集積し、臨床・病理・予後データとの関連を解析し、臨床診断や病勢モニターとしての意義を継続検討する。

(6) 新規治療法に関する研究

EBV 関連 T/NK 細胞増殖症に対する治療法は確立していない。前駆症状だけの段階や、症状が顕性化しない時期にこそ適切な治療が望まれる。低悪性度リンパ腫に用いられるヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害薬を取り上げ、ウイルス感染細胞への効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) EBV 潜伏関連抗原と宿主免疫反応の解析

①研究対象疾患は、種痘様水疱症、蚊刺過敏症、慢性活動性 EBV 感染症、ウイルス関連血球貪食症、節外性 T/NK 細胞リンパ腫 (鼻型)、免疫不全に伴うリンパ腫などの EBV 関連 T/NK 細胞増殖症である。

②国内外から送付される検体を用い、臨床症状および病理組織学的検討を行ない、EBV 潜伏感染のスクリーニングテストを実施する。

③EBV 検出とクロナリティー解析のために、In situ ハイブリダイゼーション法、PCR 法、ザザンプロット法、免疫染色法によりを施行した。われわれが開発した痂皮を用いた検査法によって海外からの検体にも対応する。

④EBV 遺伝子発現 (EBNAs, LMPs, BARF0, BZLF1 など) を RT-PCR 法および免疫染色を用いて調べる。

⑤予後因子として重要と考えられる EBV DNA コピー数を、血球、血清、血漿について real time PCR 法を用いてモニターし、NK 細胞数や他の臨床データと比較する。

(2) ウイルス感染細胞の宿主免疫回避とアポトーシス阻害機序の解析

①ウイルス遺伝子発現様式：流血中と病変部

におけるウイルス遺伝子発現の違いとそのメカニズムを解明し、EBV 感染様式が変化することを証明する。

②免疫制御分子の解析：免疫回避に重要と思われるウイルス由来の vIL-10, EB13, BARF1 産物, gp42 などの免疫制御分子 (virokine) を RT-PCR 法にて解析する。

③アポトーシス関連分子発現の解析：bcl-2 ホモログなどのウイルス由来抗アポトーシス因子の発現、および 宿主細胞内 bcl ファミリー発現を RT-PCR を用いて検討する。

④ウイルス再活性化分子の検出：樹立した EBV 感染細胞株を用いて、再活性化誘導因子について検討する。

(3) EBV 潜伏感染の生物学的意義の解析

①内因性レトロウイルス (HERV) 遺伝子発現：ウイルス感染に同期して発現される内因性遺伝子は自己反応性 T 細胞クローンをはじめ、さまざまな CTL 誘導を起こし、ウイルス感染に合併する I 型糖尿病などに関与すると考えられる。HERV 関連遺伝子産物を RT-PCR で確認する。

②ウイルス再活性化関連分子の生物学的意義：HERV 関連分子が確認できれば、その生物学的活性を調べる。

(4) 疾患活動性のモニター

患者末梢血単核球および血漿中の EBV DNA 量を real time PCR 法にて定量し、臨床症状および合併症と比較する。

(5) EBV 関連 T/NK 細胞増殖症の地域特異的発症の解明。

①アジア諸国から送付される検体と臨床データをもとに地域特異的発症の実態を調査する。

②患者の免疫応答プロフィール：EBV 特異的 CTL 活性低下とともに液性免疫の優位性についての検討を継続する。患者 HLA-DNA タイプを集積する。

(6) 新規治療法に関する研究

①EBV 感染細胞株や皮膚リンパ腫細胞に対するヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害薬の効果、細胞傷害性試験とアポトーシス誘導について検討する。

②EBV 感染細胞に対する HDAC 阻害薬の細胞傷害活性とアポトーシス誘導を MTT 法、FACS 解析を実施する。

4. 研究成果

EBV 関連 T/NK リンパ球増殖症である種痘様水疱症、蚊刺過敏症や T/NK 細胞リンパ球増殖症を主な研究対象として以下の研究成果を得た。

(1) 種痘様水疱症と蚊刺過敏症における EBV 感染細胞

①種痘様水疱症においては $\gamma\delta$ T 細胞に、蚊刺過敏症では NK 細胞に EBV が感染していることが明らかになった。蚊刺過敏症患者は、

CD56 陽性細胞が末梢血中平均 47% を占めるが、種痘様水疱症患者では平均 11% であった (図 1)。種痘様水疱症患者において T 細胞数は健常人とは差が見られなかったが、リンパ球サブセットを調べると、患者群では平均 15.7% の $\gamma\delta$ T 細胞が認められた (正常; 5% 以下) (図 2)。

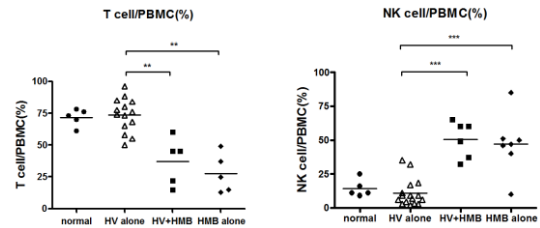


図 1. 種痘様水疱症と蚊刺過敏症の末梢血リンパ球分画

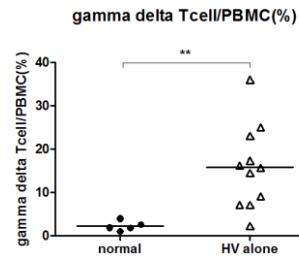


図 2. 種痘様水疱症患者末梢血の $\gamma\delta$ T 細胞

②種痘様水疱症と EBV 感染 $\gamma\delta$ T 細胞の病的関連

EBV 感染細胞を独自の方法 (J Infect Dis, 2009) で解析した結果、種痘様水疱症患者では、増加している $\gamma\delta$ T 細胞分画が主たる EBV 感染細胞であることが判明した (論文投稿中) (図 3)。

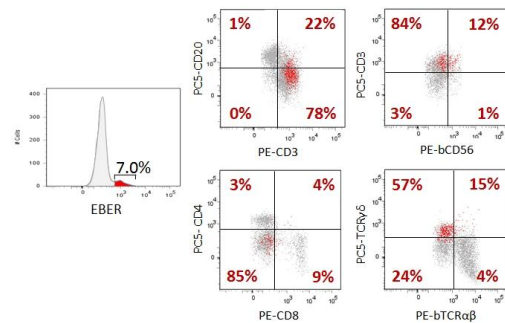


図 3. 種痘様水疱症の $\gamma\delta$ T 細胞の多くが EBER 陽性

(2) EBV 潜伏関連抗原と宿主免疫反応

同一患者においても、流血中ウイルス感染細胞と、病変部におけるウイルス遺伝子発現に相違があることが分かった。蚊刺過敏症患者では、流血中の EBV 感染細胞は、BZLF1 を発現せず、latency I あるいは II の感染様式

をとっていたが、半数以上の皮膚病変では溶解感染をしめす BZLF1 mRNA の発現が認められた。一方、全身症状を伴わない典型的種痘様水疱症患者の病変部では BZLF1 mRNA 発現は認められなかった (図4)。すなわち、重症症例の皮膚病変では、EBV が潜伏感染から溶解感染に移行することによって新たな EBV 抗原が発現し、宿主免疫応答を誘発し、激しい炎症反応を起こすと考えられた (論文準備中)。一方、種痘様水疱症では潜伏感染 I から II へ移行することが炎症反応を誘導するデータをえたので、研究を継続している。

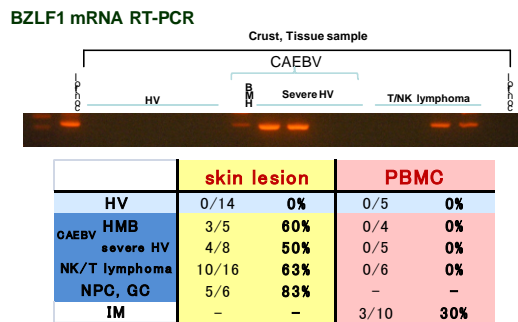


図4. 末梢血と皮膚病変における EBV 感染様式の変化

(3) ウイルス感染細胞の宿主免疫回避と再活性化機序

①EBV 感染 T/NK 細胞株を用いた解析: 細胞株を PMA で刺激すると潜伏感染から溶解感染を誘導することが可能であった。さらに、TNF α 刺激によっても BZLF1 mRNA の発現を誘導できる細胞株が認められた。このことは、末梢血にあっては潜伏感染様式であったものが、炎症性サイトカインの刺激の加わった部位 (皮膚など) で溶解感染 (再活性化) となり得ることを示す。上記 (2) でみられた皮膚病変でのデータを示唆する所見である (論文準備中)。

②樹立した EBV 感染 NK 細胞株 (NKED) の特性: 蚊刺過敏症患者から樹立した細胞株の NKED は、NK 細胞受容体の NKG2D を欠如するため低細胞傷害性を示すが、炎症惹起性サイトカインを放出した (図5) (Exp Hematol, 2010)。

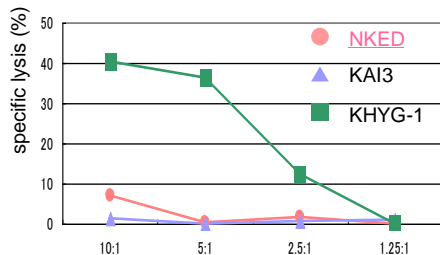


図5. EBV 感染 NK 細胞株(NKED)の細胞障害活性

(4) EBV 潜伏感染関連遺伝子産物 BARTs の多様性

EBV 感染細胞の違い (上皮系、リンパ球系など) によって BARTs/BARFO の発現が異なり、いくつかの splicing variant の存在を明らかにした (論文投稿中)。miRNA として感染細胞の増殖やアポトーシスをはじめ細胞機能を制御している可能性を検討中である。

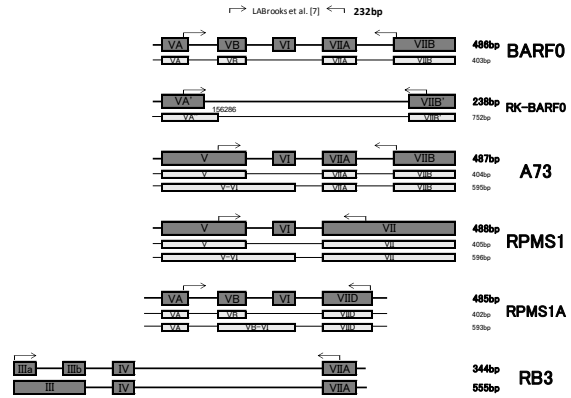


図6. BSRT s の多様性

(5) 潜伏感染の生物学的意義

内因性レトロウイルス遺伝子の HERV-K18 発現は検査した細胞株と組織では期待された結果が得られず、研究を中断した。

(6) 疾患活動性のモニター: 末梢血中の EBV DNA 量は、全身症状のない種痘様水疱症では中等度に上昇したが、全身症状や臓器障害を伴う蚊刺過敏症や慢性活動性 EBV 感染症では高度に増加していた (図7)。臨床症状の改善によって EBV DNA 量が低下する傾向にあるが、その低下が顕著であるにもかかわらず、腸管浸潤や血球貪食症候群が発症する症例が見られた (論文準備中)。すなわち、EBV DNA 量の高値は重症型に多いが、そのモニターだけでは正確な活動性を反映するとは言えなかった。

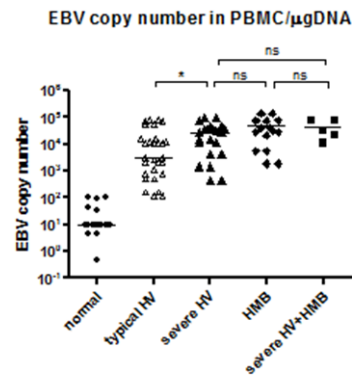


図7. 患者末梢血単核球の EBV DNA 量

(7) 臨床統計に関する研究: 種痘様水疱症、蚊刺過敏症の診断拠点として、全国・海外から送付される検体の診断と臨床的解析を実施した。アフタ性口内炎と胃腸症状が EBV 関連 T/NK リンパ球増殖症のスペクトラムであり、とくに消化管病変は重症型と関連することを見出した (論文投稿中)。

| | Typical HV (n=32) | Severe HV (n=16) | HMB (n=9) | HV+HMB (n=6) | Total (n=63) |
|--------------------------|-------------------|------------------|-----------|--------------|--------------|
| Oral lesions | 5 (15.6%) | 5 (31.3%) | 1 (11.1%) | 0 | 11 (17.5%) |
| aphthous stomatitis | 4 | 5 | 0 | 0 | |
| ulcerative gingivitis | 1 | 1* | 1 | 0 | |
| Gastrointestinal lesions | 0 | 2 (12.5%) | 0 | 0 | 2 (3.2%) |
| esophageal erosions | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| colon erosions | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| Ocular lesions | 2 (6.3%) | 1 (6.3%) | 0 | 0 | 3 (4.8%) |
| iritis | 2 | 0 | 0 | 0 | |
| conjunctival hyperemia | 1* | 1 | 0 | 0 | |

表 1 種痘様水疱症の眼・粘膜・胃腸管症状

(8) 新規治療に関する研究

EBV 感染細胞株に対する HDAC 阻害薬の効果は、ウイルス感染細胞に対する増殖抑制効果は G1 停止であることを見出した (論文執筆中)。さらに、プロテオーム解析結果から、HDAC 阻害薬抵抗性を誘導する 4 つのタンパクを見出した。それらのタンパクは抗アポトーシス、MAPK シグナルとグルタチオン代謝に関連することが分かった。

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 24 件)

- ① Nakai H, Sugata K, Usui C, Asano Y, Yamakita T, Matsunaga K, Mizokuchi Y, Katano H, Iwatsuki K, Yoshikawa T. A case of erythema multiforme associated with primary Epstein-Barr virus infection. *Pediatr Dermatol*. 査読有, 2011, Jan-Feb;28:23-5. doi:10.1111/j.1525-1470.
- ② Olsen E, Whittaker S, Kim Y, Duvic M, Iwatsuki K, Sugaya M, et al. (33 名の 18 番) Clinical Endpoints and Response Criteria in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: a Consensus Statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL), the United States Cutaneous Lymphoma Consortium (USCLC) and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *J Clin Oncol*, 査読有, in press
- ③ Kakimi K, Isobe M, Uenaka A, Wada H, Sato E, Doki Y, Nakajima J, Seto Y,

Yamatsuji T, Naomoto Y, Shiraishi K, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Oka M, Pan L, Hoffman EW, Old LJ, Nakayama E. A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. *Int J Cancer*. 査読有, 2011 Feb 3. doi: 10.1002/ijc.25955. Epub ahead of print.

- ④ Fujita A, Hamada T, Iwatsuki K. A retrospective analysis of 133 patients with cutaneous lymphomas from a single Japanese medical center between 1995 and 2008. *J Dermatol*, 査読有, in press.
- ⑤ Suzuki D, Tsuji K, Yamamoto T, Fujii K, Iwatsuki K. Production of proinflammatory cytokines without invocation of cytotoxic effects by an Epstein-Barr virus-infected natural killer cell line established from a patient with hypersensitivity to mosquito bites. *Exp Hematol* 査読有, 2010; 38: 933-44.
- ⑥ Shirafuji Y, Maeda Y, Iwatsuki K. Cold agglutinin-induced acrocyanosis in a patient with subclinical chronic lymphocytic leukemia: a beneficial response to rituximab. *Eur J Dermatol* 査読有, 2010; 20: 394-6.
- ⑦ Suzuki R, Suzumiya J, Yamaguchi M, Nakamura S, Kameoka J, Kojima H, Abe M, Kinoshita T, Yoshino T, Iwatsuki K, Kagami Y, Tsuzuki T, Kurokawa M, Ito K, Kawa K, Oshima K. NK-cell Tumor Study Group. Prognostic factors for mature natural killer (NK) cell neoplasms: aggressive NK cell leukemia and extranodal NK cell lymphoma, nasal type. *Ann Oncol* 査読有, 2010; 21: 1032-40.
- ⑧ Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y. Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 査読有, 2009; 200: 1078-87.
- ⑨ Yamamoto T, Yamada A, Tsuji K, Iwatsuki K. Tracing of the molecular remnants of herpes virus infections in necrotic skin tissue. *Eur J Dermatol*, 査読有, 2008; 18: 499-503.

(他)

[学会発表] (計 17 件)

- ① □ Hirai Y. Iwatsuki K et al. Distinct infiltrating cell types of the lesional skin and the peripheral blood in EBV-associated T/NK lymphoproliferative disorders. The 35th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2010 年 12 月 3 日～4 日, 和歌山市
- ② □ Fujii K. Proteomics identified biomarker candidates to predict the effects of histone decetylase inhibitors on lymphoid neoplasm cell lines. 40th Annual ESDR meeting, 2010 年 9 月 8 日～11 日, ヘルシンキ (フィンランド)
- ③ □ Iwatsuki K. Cutaneous disorders associated with Epstein-Barr virus infections. 35th Annual Meeting of the Taiwanese Dermatological Association, 2009 年 11 月 21～22 日, 台中 (台湾)
- ④ □ Suzuki D. Production of proinflammatory cytokines without invocation of cytotoxic effects by an Epstein-Barr virus infected NK cell line established from a patient with hypersensitivity to mosquito bites. 39th ESDR annual meeting, 2009 年 9 月 9 日～12 日, ブダペスト (ハンガリー)
- ⑧ Iwatsuki K. Cutaneous disorders associated with Epstein-Barr virus-associated NK/T lymphoproliferative disorders: Cellular and molecular events. (Symposia) The 4th Joint Meeting of Japanese Dermatological Association and Australasian College of Dermatologists, 2009 年 7 月 10～12 日, 札幌市
(他)

[図書] (計 2 件)

- ① Iwatsuki K. Histiocytoses. ed. Dummer R, Pittelkow MR, Iwatsuki K, Green A, Elwan NM (ed): Skin Cancer - A World-wide Perspective. Springer, Heidelberg, 2011, p233-240.
- ② Iwatsuki K. ed. Other therapies: histiocytoses. ed. Dummer R, Pittelkow MR, Iwatsuki K, Green A, Elwan NM (ed): Skin Cancer - A World-wide Perspective. Springer, Heidelberg, 2011, p355-357.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩月 啓氏 (IWATSUKI KEIJI)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80126797

(2) 研究分担者

辻 和英 (TSUJI KAZUhide)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号: 30304356 (H20-H21 年)
藤井 一恭 (FUJII KAZUYASU)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号: 70452571
山本剛伸 (YAMAMOTO TAKENOBU)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号: 50379799 (H20 年)
鈴木大介 (SUZUKI DAISUKE)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号: 40549820
白藤宜紀 (SHIRAFUJI YOSHINORI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号: 90423285

(3) 連携研究者

山本剛伸 (YAMAMOTO TAKENOBU)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号: 50379799 (H21-H22 年)