

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16461

研究課題名(和文) EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症における分子生物学的検討

研究課題名(英文) Molecular biological study of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis

研究代表者

坂本 謙一 (Sakamoto, Kenichi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：20782048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HLH-2004に登録されたEBV-HLH 48例を対象として全ゲノム解析を行うことによりゲノム異常と臨床情報を統合することによりEBV-HLHの新たな予後因子を解明する事を目的とする。EBV-HLH48例中、全ゲノム解析を行うための十分な検体量が確認できた23例について全ゲノム解析を開始した。解析症例23例全体の発症時EBV-DNA量平均は白血球中357,626コピー/ml、血漿中1,793,562コピー/mlであり、T細胞受容体クロナリティは14例に認められた。ゲノム解析結果が得られ次第、臨床情報との統合を行い、ゲノム異常の有無による予後や検査値の比較や治療標的の探索を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBV-HLHは軽症例から重症例までさまざまな重症度の症例が存在する。これまで重症度や治療反応性を決定する因子についてさまざまな検討がなされてきたが、網羅的ゲノム解析技術を用いてEBV-HLHの中心的役割を果たすクローン化したリンパ球のゲノム異常およびホスト側のバリエーションを検討した報告は認められない。EBV-HLH発症の背景にあるゲノム異常を明らかにすることは、幅広い臨床像を示す本疾患の病態を明らかにするだけでなく、適切なリスク分類が可能となることにより適切な治療選択を可能とするため、その意義は非常に高いと思われる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate new prognostic factors for EBV-HLH by integrating genomic abnormalities and clinical information using whole genome sequence (WGS) of 48 EBV-HLH cases enrolled in HLH-2004. We began WGS of 23 of the 48 EBV-HLH cases for which we had confirmed sufficient sample volume for WGS. In all 23 cases analyzed by WGS, the average amount of EBV-DNA at the onset of EBV-DNA was 357,626 copies/ml in white cell blood and 1,793,562 copies/ml in plasma in all 23 cases analyzed, and T-cell receptor clonality was positive in 14 cases. As soon as the results of WGS are obtained, we will be integrated with clinical information and laboratory values. Finally, we will explore new prognostic factors and therapeutic targets for EBV-HLH.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：EBウイルス 血球貪食性リンパ組織球症 EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症 全ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

EBV ウイルス (EBV) はヘルペスウイルス属の一つであり、さまざまな疾患の原因ウイルスとして広く認知されている。EBV を原因とする疾患は、伝染性単核症 (IM)、慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV)、血球貪食性リンパ組織球症 (HLH)、さらには移植後リンパ増殖性疾患 (PTLD) や B あるいは T/NK リンパ腫といった腫瘍性疾患まで幅広く存在する。EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) は、日本において最も頻度の高い HLH の原因疾患である (Ishii, et al. 2007)。小児および成人を対象とした HLH 567 例の全国調査では、約半数が EBV (28.7%) もしくは他の感染症 (28.7%) に続発した感染症関連 HLH であった。EBV は代表的な腫瘍ウイルスの 1 つであり、EBV-HLH では、EBV が T 細胞に感染し、不死化に加えて腫瘍様に増殖 (クローン増殖) した T 細胞が異常に活性化し、大量の炎症性サイトカインを放出し、さらにマクロファージを活性化させる。その結果、重篤な臓器障害と汎血球減少が生じる。EBV-HLH の臨床像は幅広く、無治療またはステロイド投与のみで軽快する症例から、急速に臓器障害が進行しエトポシドを含む多剤併用化学療法さらには造血細胞移植までを必要とする重症例までさまざまである。予後因子としては、診断時フェリチン値、年齢、EBV-DNA 定量値などが報告されているが、EBV が感染した T 細胞に生じたゲノム異常について解析された報告は認められない。

EBV-HLH では T 細胞のモノクロナリティーが検出され、治療開始後もこのクローン化した T 細胞が残存する例では有意に再発が多いことが知られている (Matsuda K, et al. 2011)。また、EBV-HLH の治療においては早期に抗腫瘍薬であるエトポシドを投与した症例の予後が有意に良好であったことから、EBV-HLH はクローン化した T 細胞に起因する疾患である、つまり白血病やリンパ腫に非常に類似した病態をもつ疾患であると考えられる (Imashuku S, et al. 2001)。さらに近年、EBV 関連悪性疾患である NK/T 細胞性リンパ腫や CAEBV において、*DDX3X* 遺伝子変異を始めとした多くの体細胞変異が存在することが報告された (Okuno Y, et al. 2019)。このように腫瘍ウイルスである EBV が遺伝子変異を誘発することにより、NK/T リンパ腫や CAEBV の病態を形成している可能性が示唆される。

このように EBV-HLH は軽症例から重症例までさまざまな重症度の症例が存在する。これまで重症度や治療反応性を決定する因子についてさまざまな検討がなされてきたが、網羅的ゲノム解析技術を用いて EBV-HLH の中心的役割を果たすクローン化したリンパ球のゲノム異常および宿主側のパリアントを検討した報告は認められない。EBV-HLH 発症の背景にあるゲノム異常を明らかにすることは、幅広い臨床像を示す本疾患の病態を明らかにするだけでなく、適切なリスク分類が可能となることにより適切な治療選択を可能とするため、その意義は非常に高いと思われる。さらには分子標的治療薬の存在する遺伝子変異が同定された場合には、EBV-HLH の新規治療薬開発の糸口ともなり得る。

以上より、われわれは、HLH-2004 に登録された EBV-HLH 48 例を対象として、ゲノム異常の有無について全ゲノム解析を用いて網羅的に解析し、ゲノム異常と臨床情報を統合することにより EBV-HLH の新たな予後因子を解明する研究を立案した。

## 2. 研究の目的

HLH-2004 に登録された EBV-HLH 48 例を対象として全ゲノム解析を行うことによりゲノム異常 (*DDX3X* を含む白血病・リンパ腫関連の遺伝子異常など) の有無を検討し、ゲノム異常と臨床情報を統合することにより EBV-HLH の新たな予後因子を解明する事を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、臨床情報（診断時年齢、各種検査値、診断時 EBV-NDA コピー数、EBV クロナリ  
ティの有無、治療反応性、最終転帰など）、EBV 感染細胞のゲノム異常、  
ホスト側の生殖細胞系列のパリアントの 3 点の情報を統合して解析を行う。

特にゲノム異常と予後との関係を明らかにすることを主目的とし、EBV-HLH の新たな予後因子を抽出する。については、HLH-2004 登録時および治療開始後に収集した臨床情報を利用する。

については、HLH-2004 研究で得られた余剰検体を HLH-2004 中央検査施設である信州大学より解析施設へ分与し、解析を行う。

#### <症例の選択と試料の分与>

HLH-2004 登録症例のうち、診断時 EBV-DNA コピー数が 1,000copies/μg/DNA 以上であり EBV-HLH と診断された症例を対象とする。

発症時および初期治療終了後（治療開始 8 週後）に中央検査施設である信州大学へ提出された末梢血より抽出された DNA の余剰検体を今回の研究に用いる。

#### <ゲノム異常の解析>

##### 1) 全ゲノム解析

分与された DNA を用いて、全ゲノム解析により網羅的にゲノム異常を同定する。今回使用する EBV-HLH 発症時の末梢血から抽出した DNA 検体であり、全ゲノム解析を行う際の陰性コントロールとしての試料は今回取得することができていない。一部の症例では初期治療終了後（治療開始後 8 週後）の末梢血から抽出した DNA 検体が保管されている。初期治療終了後（治療開始後 8 週後）の検体が保管されている症例については、初発時検体の解析結果との比較を行う。

##### 2) ターゲットシーケンスあるいはサンガー法による Validation

1) の全ゲノム解析により同定された遺伝子異常について、ターゲットシーケンスあるいはサンガー法により Validation を行う。

#### <臨床情報とゲノム異常の統合>

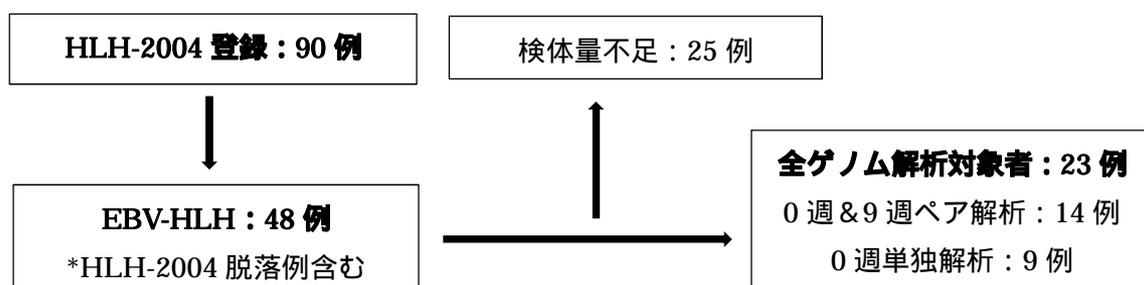
上記 6.1. と 6.2 で得られたゲノム異常の結果と HLH-2004 登録後に得られた臨床情報を統合して、ゲノム異常と発症時検査所見、治療反応性、最終予後との関係について明らかにする。

### 4. 研究成果

#### 1) 全ゲノム解析可能症例の抽出

HLH-2004 研究に登録された 90 例中、EBV-HLH は 48 症例であった。そのうち、今回の研究で行う全ゲノム解析が施行可能な十分な余剰検体がある症例を抽出した。全 48 症例のうち、十分な余剰検体が確保できたのは 23/28 例（47.9%）であり、初発時と治療開始 8 週後の検体が共に確保できたのは 14/23 例であった。HLH は初発時に血球減少を認めることが多いこと、年少児に発症することが多いこと、などの要素から十分な余剰検体が確保できなかった症例が多くなってしまったと考えられた。

#### 【解析対象症例】



全ゲノム解析を行った 23 例の HLH 発症時の臨床情報を Table.1 に示す。発症時年齢は中央値 3.5(0.8-6.9)歳、性別は男児 11 名、女児 12 名であった。初発時の患者の状態は、正常～軽症が 13 名、中等症～重症が 9 名（不明が 1 名）であった。臨床症状としては発熱、肝腫大を全例で認め、骨髄での血球貪食像、脾腫を半数以上の症例で認めており、神経症状は 5 例に認めていた。再発は 6 例に認めており、同種造血幹細胞移植は 3 例に行われていた。最終的に 21 例が生存、1 例が死亡という転帰であった。

Table.1 : Patient Characteristics

Total (N = 23)		
Age	Median(range)	3.5 (0.8 - 6.9)
Sex	Male/Female	11 / 12
Patient Activity	Normal / Mild / Severe / Unknown	3 / 10 / 9 / 1
Fever(>38.5 )	Yes/No/Unknown	22 / 0 / 1
Hemophagocytosis	Yes/No/Unknown	19 / 3 / 1
Hepatomegaly	Yes/No/Unknown	22 / 0 / 1
Splenomegaly	Yes/No/Unknown	16 / 6 / 1
Neurologic alterations	Yes/No/Unknown	5 / 17 / 1
Relapse	Yes/No/Unknown	6 / 11 / 4
HSCT	Yes/No/Unknown	3 / 19 / 1
Outcome	Alive/Dead/ Unknown	21 / 1 / 1

## 2) 解析対象症例の発症時検査値

全ゲノム解析を行った 23 例の HLH 発症時の血液検査所見を Table.2 に示す。多くの症例で血球減少、逸脱酵素の上昇、低フィブリノゲン血症、高フェリチン血症、可溶性 IL-2 受容体高値を認めていた。

Table.2 : Laboratory Data at the onset of HLH

Total (N = 23)		
ANC	861.2 ± 803.3	/mm <sup>3</sup>
Hb	83.1 ± 22.8	g/L
Plt	42136.4 ± 32907.2	/μL
AST	601.9 ± 514.8	U/L
ALT	201.0 ± 172.2	U/L
LDH	3710.7 ± 3581	U/L
T-Bil	1.7 ± 1.8	mg/dL
Na	130.6 ± 5.8	mmol/L
sIL2R	16966.2 ± 8465.1	U/mL
Ferritin	29191.7 ± 40644.1	ng/mL
Fibrinogen	84.8 ± 29.6	mg/dL

## 3) 解析対象症例の白血球中および血漿中 EBV-DNA コピー数と T 細胞クロナリティ

全ゲノム解析を行った 23 例の HLH 発症時および 8 週の初期治療終了時の白血球中および血漿中 EBV-DNA コピー数と T 細胞クロナリティ (TCR clonality) を Table.3 に示す。発症時は白血球および血漿中ともに EBV-DNA コピー数は著明な高値であり、TCR クロナリティは 14/23 例 (60.9%) に認めていた。初期治療終了時には EBV-DNA コピー数は低下しているものの、高値を維持している症例も認められ、2/23 例 (8.7%) で TCR クロナリティ残存を認めていた。

Table.3 : EBV-DNA load &amp; TCR clonality of EBV-HLH

Total (N = 23)				
EBV-DNA load (WBC)				
	0w	Average (range)	432,710 (5,236 - 2,162,606)	copies/ml
	8w	Average (range)	46,557 (515 - 306,776)	copies/ml
EBV-DNA load (Plasma)				
	0w	Average (range)	2,398,225 (634 - 12,318,730)	copies/ml
	8w	Average (range)	14,362 (<10 - 68,126)	copies/ml
TCR clonality				
	0w	Negative/Positive/N.E.	14 / 7 / 2	
	8w	Negative/Positive/N.E.	2 / 5 / 16	

#### 4) 全ゲノム解析結果

2021年11月末に、全ゲノム解析に23例の検体を提出した。コロナウイルス感染拡大の影響で、研究協力者施設での全ゲノム解析を行う人的要因や研究実施体制に多大な影響が持続的に生じている。23例の全ゲノム解析のデータ取得および結果解析には多大な時間を要するため、2022年3月末時点で、全ゲノム解析に提出したデータは取得できていない(2022年4月末にデータの取得ができたため、解析を開始している)。解析データを取得後に、ゲノム異常の有無によって上記の23例を群分けし、発症時検査所見、治療反応性、最終予後との関係性について検討を行う予定である。

#### 引用文献

Ishii, E., Ohga, S., Imashuku, S., Yasukawa, M., Tsuda, H., Miura, I., Yamamoto, K., Horiuchi, H., Takada, K., Ohshima, K., Nakamura, S., Kinukawa, N., Oshimi, K. & Kawa, K. (2007) Nationwide survey of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Int J Hematol*, **86**, 58-65.

Matsuda K, Nakazawa Y, Yanagisawa R, Honda T, Ishii E, Koike K. (2011) Detection of T-cell receptor gene rearrangement in children with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis using the BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction combined with GeneScan analysis. *Clin Chim Acta*. **412**, 1554-8.

Imashuku, S. (2002) Clinical features and treatment strategies of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Crit Rev Oncol Hematol*, **44**, 259-272.

Okuno Y, et al. (2019) Defective Epstein-Barr virus in chronic active infection and haematological malignancy. *Nat Microbiol*. **4**, 404-413.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------