

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591404

研究課題名（和文）小児生体肝移植における分子生物的手法を用いた EB ウィルス感染機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by molecular EBV monitoring

研究代表者

福田晃也（FUKUDA AKINARI）

独立行政法人 国立成育医療研究センター・移植外科・医員

研究者番号：60455417

研究成果の概要（和文）：生体肝移植後の免疫不全状態で発症する EB ウィルス（EBV）関連リンパ増殖性疾患は移植患児の生命予後に重大な影響を与える。ドナー肝組織 82 検体中 61 検体（74.4%）において EBV 感染細胞を検出したことから、移植肝グラフトを介したレシピエントへの EBV 移行の可能性が強く示唆された。EBV に感染したレシピエントの中には免疫抑制剤減量を施行しても EBV 感染リンパ球を障害する T リンパ球（CTL）誘導が無く EBV が高値で持続するものが存在し、CD8+/HLA-DR+が CTL 誘導のマーカーになり得ることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Epstein-Barr virus (EBV)-associated post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) is a serious complication of liver transplantation. We performed periodical molecular EBV monitoring in pediatric living donor liver transplantation. Transmission from donor to recipient via graft was highly suspected, because EBV infected cells were identified in 61 grafts of the 82 donors (74.4%). The increase of HLA-DR+CD8+ cells were observed in parallel with the decrease in EBV DNA load following the reduction of immunosuppressive drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学、小児生体肝移植、EB ウィルス

1. 研究開始当初の背景

ヘルペスウイルスに属する Epstein-Barr Virus (EBV) は B リンパ球を主な標的細胞とする

1). EBV の感染を受けたナイーブ B 細胞は活性化され増殖した後、胚中心を通過して記憶 B 細胞に分化し長期の潜伏感染が成立する。EBV による B 細胞の活性化・増殖は、抗原刺激と T 細胞ヘルプによる生理的な活

性化と共通の細胞内分子機構によると考えられている。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、免疫抑制（不全）状態におけるリンパ増殖性疾患(lymphoproliferative disorder: LPD)などは EBV 感染 B 細胞の増殖を伴う疾患である。一般的に小児肝移植症例の多くは移植

前には EBV-seronegative な状態であるが移植後 3 か月の間にその 60% が無症候性のもも含めて seroconvert すると報告されている

2). 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, 鼻腔リンパ腫, 末梢 T 細胞リンパ腫などの原因となる. 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. さらに, EBV 感染は全身性エリテマトーデス, シェーグレン症候群など自己免疫疾患の誘因となることも知られている.

研究の着想に至った経緯及び独創性:

国立成育医療センターでは, 2005 年 11 月より 2007 年 10 月までの 2 年間に 42 例の小児生体肝移植術を施行してきた. 症状の有無は別として 42 例中 13 例 (31.0%) が移植後に EBV の定量 PCR 解析にて陽性を示したため, アシクロピルの経口あるいは経静脈投与による治療を要した. 術前には EBV 感染のスクリーニングとして血清学的検査しかしていない点, 術後の検索も全例にスクリーニングとして EBV の定量 PCR 解析を施行していないので, 全例で定量 PCR 解析を行うと陽性となるレシピエントは 2 倍以上になる可能性があるとして予測される. さらに, 生体肝移植術後に EBV 感染を起こした症例はドナー由来の EBV 感染 (グラフト経路の transmission) なのか, それ以外の経路による初感染なのかを明らかにした研究報告はない.

2. 研究の目的

本研究により小児生体肝移植患者の術後 EBV 感染状況が正確に把握でき, EBV の subtype 解析により感染経路を同定することにより, われわれが目的とする EBV 関連疾患の診断, 予防および治療法を開発することが可能となる. 小児生体肝移植後の Epstein-Barr Virus (EBV) 感染症の発症頻度は非常に高く, 移植後リンパ増殖性疾患へと移行することも稀ではない. 生体肝移植後の EBV 感染機構の解明のために, ドナー・レシピエント双方の血液サンプルを分子生物学的手法により解析し, 感染予防の確立, 診断法・治療法の確立を目指す. EBV 感染症の克服により, 生体肝移植の移植成績と安全性を向上させることが可能となる.

3. 研究の方法

国立成育医療センターにおける「適応評価委員会」にてドナー・レシピエントともに承認を得た小児生体移植初回手術症例で, 本研究に対するインフォームド・コンセントによる同意が得られた症例を対象とする.

生体肝移植周術期の術前 (ドナーとレシピエントの血液サンプル)・術中 (ドナー及びレシピエントの肝組織)・術後 1 年目まで, レシピエントの血液サンプルを採取し, 主に以下の項目につき検討する.

1) 移植後レシピエントの末梢血中で再活性化している EBV がレシピエント由来のものかドナー由来のものかを同定する.
2) B, T, NK 細胞をはじめとする免疫細胞表面抗原の発現解析をフローサイトメーター (FCM) 法を用いて, 感染前後比較検討する. 本研究により小児生体肝移植術後における, EBV 感染経路の確定によりその予防法が確立できる. レシピエント生体内では明らかとされていない感染初期での EBV 遺伝子発現および免疫細胞の挙動を, 時間経過を追い解析することで, 移植後の免疫応答も含めた EBV 感染機構の解明により診断法, 治療法を確立できる.

ドナーの条件:

- ・ 3 親等以内の家族
- ・ 年齢が 20 歳以上 65 歳未満
- ・ 肉体的・精神的に健康
- ・ 自発的な臓器提供の意志があること

血液・組織サンプリングのタイミング

- 1) 術前 (入院時, ドナー及びレシピエント)
- 2) 生体肝移植手術中 (ドナー及びレシピエントの血液及び肝組織)
- 3) 術後 7 日目, 14 日目, 30 日目, 2 ヶ月, 3 ヶ月目, 6 ヶ月目, 9 ヶ月目, 1 年目にレシピエントの血液サンプルを採取する.

EBV-PCR によるスクリーニング検査: ドナー・術前及びレシピエント移植後の末梢血中の EBV-DNA コピー数をモニタリングし, 病状と合わせて検討する.

EBV-subtype の同定: レシピエントに EBV 感染が検出された際には, EBV 膜遺伝子である Latent Membrane Protein-1 の繰り返し配列と point mutation の位置と個数から, その感染 EBV-subtype 解析を行い, EBV がドナー由来なのか, レシピエントの既感染の EBV なのか, あるいは third party からの新規感染なのかその profiling をおこなう.

フローサイトメーター (FCM) 法による profiling: EBV は B リンパ球に特に強い指向性を持つが, T リンパ球, NK 細胞にも感染する. 免疫細胞表面抗原の発現解析をフローサイトメーター (FCM) 法を用いて, 感染前後比較検討することにより, レシピエントの移植後の感染のターゲット細胞の変化の有無, 感染細胞の違いによる臨床症状の差違の有無などを検証する.

4. 研究成果

肝移植後の免疫不全状態で発症する EB

ウイルス (EBV) 関連リンパ増殖性疾患は治療が困難であり、移植の治療成績のみならずレシピエントの生命予後にも重大な影響を与える。本研究は移植片を介した EBV 感染のメカニズムの解明を目的とし、その予防法を開発することを目指す。移植後の EBV 制御を可能にすることは早急に実現しなくてはならない課題といえる。当センターで生体肝移植をするドナー肝(0.5cm³)における EBV 感染細胞の存在を検討した。また、レシピエントにおいて移植前後において定期的に細胞表面抗原マーカー解析 (FCM 解析) をおこない EBV 感染が検出された前後における遺伝子発現比較解析を行った。平成 21 年度肝移植したドナー 25 例における肝組織からは EBV ゲノムは直接の検出はできなかった。しかし、肝組織を 1 ヶ月培養したところ 16 例で EBV 感染 B 細胞の増殖を認めた。そのうち 4 例において EBV 感染 B 細胞株(LCL)の樹立に成功した。このドナー肝を移植したレシピエントは現在 EBV 感染を認めていないが、EBV ゲノムを末梢血から検出したところで EBV の繰り返し配列やポイントミューテーションを比較し同じドナー肝に存在した EBV であるのかを検討する。FCM 解析により感染時における感染細胞の活性化が免疫抑制剤下でも検出でき B 細胞への感染では CD69, CD71 よりも CD23 が有用であることが示された。現在 TPA を指標とした免疫抑制剤量と拒絶・感染症の相関評価値の設定を合わせて試みている。肝移植後の EBV ゲノム量の定量解析モニタリングを移植後毎週行ない検討した結果、EBV が末梢血中に検出された時に直に免疫抑制剤減量による EBV 特異的 CTL 誘導により PTLD 発症は抑えられることが示された。今後モニタリング開始時や免疫抑制剤の検討を行っていく。

平成 22 年度肝移植した中で、ドナー肝 27 例において EBV ゲノムは直接の検出はできなかった。しかし、肝組織を 1 ヶ月培養したところ 20 例で EBV 感染 B 細胞の増殖を認めた。そのうち 1 例において EBV 感染 B 細胞株(LCL)の樹立に成功した。このドナー肝を移植したレシピエントは移植後 EBV 初感染を認めた。現在 EBV の繰り返し配列やポイントミューテーションを比較し同じドナー肝に存在した EBV であるのかを検討している。FCM 解析による CD8+/HLA-DR+, CD4/CD8 比で EBV 特異的 CTL の誘導の有無をある程度予測できることが明らかとなった。これにより各病院検査部での FCM 解析による EBV 特異的 CTL に関して検討可能となった。また、誘導される CTL が認識するエピトープは EBV 膜遺伝子のひとつである LMP2 である

ことが多いことが初めて明らかとなった。

平成 23 年度肝移植した中で、ドナー肝 30 例において EBV ゲノムは直接の検出はできなかった。しかし、肝組織を 1 ヶ月培養したところ 25 例で EBV 感染 B 細胞の増殖を認めた。そのうち 1 例において EBV 感染 B 細胞株(LCL)の樹立に成功した。このドナー肝を移植したレシピエントは移植後 EBV 初感染を認めた。現在 EBV の繰り返し配列やポイントミューテーションを比較し同じドナー肝に存在した EBV であるのかを検討している。肝移植後の患児は免疫抑制剤量にともない、EBV 特異的 CTL に誘導が可能となることが示された。しかし、患児の中には免疫抑制剤量をどんなに施しても CTL 誘導は無く EBV コピー数が高値で持続するものが存在する。これらの群では CD8+/HLA-DR+が増加してこないことが今回の研究で示された。一方、免疫抑制剤減量にともない CTL が誘導され EBV 感染細胞が排除された群では CD8+/HLA-DR+が増加してきた。3 年間の移植患児におけるデータ集積により CD8+/HLA-DR+が CTL 誘導のマーカーになり得ること、続けて CD8+/HLA-DR+が増加しない患児においては免疫抑制剤減量を中止し、拒絶を防ぐことが可能となった。

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 2 件)

- ① Imadome K, Fukuda A, Umezawa A, Effective control of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by monitoring of viral DNA load and lymphocyte surface markers, *Pediatric Transplantation*, 査読有、2012、p100-125 E-pub.
- ② Shigeta T, Imadome K, Fukuda A, Umezawa A, Epstein-Barr virus infection after pediatric living-related liver transplantation-management and risk factors. *Transplant Proc.*, 査読有、Vol.42, No.10, 2010, p4178-4780.
[DOI:10.1016/j.transproceed.2010.09.134](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.09.134)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Fukuda A, Imadome K, Umezawa A, Prevention of Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder by Monitoring of Epstein-Barr Virus Load and Lymphocyte Phenotypes. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the study of liver diseases, 2011/11/05, San Francisco, U.S.A.
- ② 福田晃也, 今留謙一, 梅澤明弘, 免疫抑

制剤減量にともなう EBV 特異的 CTL の誘導. 第 21 回 EBV 感染症研究会 2012/03/17, 東京.

- ③ Shigeta T, Imadome K, Fukuda A, Umezawa A, Epstein-Barr virus infection after pediatric living-related liver transplantation: Management and risk factor. The International Colleges of Surgeons, The 56th Annual Congress of the Japan Section, 2010/06/12, Tokyo.
- ④ Shigeta T, Imadome K, Fukuda A, Umezawa A, Epstein-Barr virus infection after pediatric living-related liver transplantation: Management and risk factor. XXIII International Congress of the Transplantation Society, 2010/08/15, Vancouver, Canada.
- ⑤ 福田晃也, 今留謙一, 梅澤明弘, 小児生体肝移植後の EBV 感染に関連した合併症例の報告. 第 10 回 京都肝移植周術期研究会 2010/03/27, 京都市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 晃也 (FUKUDA AKINARI)
独立行政法人 国立成育医療研究センター・
移植外科・医員
研究者番号: 60455417

(2) 研究分担者

今留 謙一 (IMADOME KEN-ICHI)
独立行政法人 国立成育医療研究センター・
母児感染研究部・室長
研究者番号: 70392488

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)
独立行政法人 国立成育医療研究センター・
生殖・細胞医療研究部・部長
研究者番号: 70213486