

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 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591182

研究課題名（和文）慢性活動性 EB ウイルス感染症に対する病態解明に基づく治療戦略に関する研究

研究課題名（英文）Study of pathogenesis of chronic active EB virus infection and its treatment strategy.

研究代表者

脇口 宏（WAKIGUCHI HIROSHI）

高知大学・学長

研究者番号：10116519

研究成果の概要（和文）：慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV)、伝染性単核球症、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症における EBV 遺伝子型を解析した結果、これら疾患を惹起する EBV の遺伝子型は日本と他のアジア地域で相似性が認められた。一方、CAEBV 細胞株解析により得られた過剰または低下する細胞遺伝子群について、検体を培養に供することなく、その発現レベルを解析した。その結果、2 つの遺伝子が *in vivo* CAEBV において、過剰発現していることが確認され、これら分子を標的にした新規治療法に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Epstein-Barr virus (EBV) genotypes can be distinguished based on gene sequence differences in EBV nuclear antigens 2 and 3C, and the BZLF1 promoter zone (Zp). EBV subtypes and BZLF1 Zp variants were examined in Japanese patients with chronic active EBV infection (CAEBV), infectious mononucleosis (IM), and EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH). EBV genotype in IM, CAEBV, and EBV-HLH all belonged to type 1. However, sequencing analysis of BZLF1 Zp found three polymorphic Zp variants. This is the first evidence that the EBV variant distribution in Japanese patients resembles that found in other Asian patients. Twenty-nine CAEBV-associated cellular genes were previously identified by microarray analysis of *in vitro* cultured cell lines derived from patients with CAEBV. In this study, we also investigated the expression levels of these cellular genes in the three EBV-related disorders including CAEBV, IM, and EBV-HLH, using real-time RT-PCR analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：感染症学、ウイルス学、微生物学

1. 研究開始当初の背景

Epstein-Barr ウイルス (EBV) はヒト腫瘍

ウイルスとしてバーキットリンパ腫細胞より分離された歴史を持ち、今日では様々な感染症や悪性腫瘍で EBV が関与することが明ら

かになっている。

通常、EBV は B 細胞に感染し、細胞傷害性キラー T 細胞 (CTL) による免疫反応により潜伏感染状態に移行する。しかし、慢性活動性 EBV 感染症患者においては CTL に異常があること、その他種々の免疫異常があるため、潜伏感染状態に移行しないことが明らかにされた。EBV の感染標的細胞が T 細胞の場合、病勢が急速に進行し T 細胞リンパ腫に発展する。また、NK 細胞に感染が認められた場合は、その多くの患者で蚊アレルギーの合併が認められることも報告されている。慢性活動性 EBV 感染症や種々の EBV 関連リンパ増殖性疾患の診断やウイルス活動性のモニタリングについてはほぼ確立されているが、その病態、病因メカニズムはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

(1) EBV 遺伝子型解析

慢性活動性 EBV 感染症は、日本人など東アジア人で好発する。本研究では、日本人発症の慢性活動性 EBV 感染症をはじめとして、伝染性単核球症および EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症における EBV 遺伝子型を解析し、東アジア地域で蔓延している EBV 遺伝子型と比較検討した。

(2) 過剰あるいは低下発現する細胞側遺伝子の同定

慢性活動性 EBV 感染症において、どのような細胞側遺伝子が過剰発現されているか、あるいはその発現の低下がみられるのかを解析した。これまでに慢性活動性 EBV 感染症細胞株を解析することにより、過剰あるいは低下発現する細胞遺伝子候補の報告は存在する。しかし細胞株を用いての遺伝子解析結果は必ずしも患者 *in vivo* での病態を正確に反映しているとは限らない。そこで本研究では、患者から得られた検体を培養に供することなく、それら遺伝子の発現レベルを解析した。

3. 研究の方法

慢性活動性 EBV 感染症 6 症例、EBV 陽性伝染性単核球症 18 症例、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 2 症例を検体とした。本研究の遂行にあたり、当該大学の倫理委員会の承認を得た。

まず慢性活動性 EBV 感染症および EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症症例の末梢血より T 細胞と NK 細胞を、伝染性単核球症末梢血より CD19 陽性 B 細胞をそれぞれ分離した。慢性活動性 EBV 感染症および EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症における EBV 感染細胞の同定は EBV LMP-1 領域を標的にした定量的リアルタイム PCR で行った。その EBV 感染細胞

の内訳は、慢性活動性 EBV 感染症では CD4 陽性 T 細胞 1 例、CD8 陽性 T 細胞 2 例、NK 細胞 3 例であり、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 2 症例ではともに CD4 陽性 T 細胞であった。

(1) EBV 遺伝子型解析

EBNA2 と EBNA3C 領域および EBV BZLF-1 プロモーター領域の遺伝子多型を解析することにより、EBV 遺伝子型を同定した。方法は検体より DNA を抽出し、PCR で標的領域を増幅し、得られた PCR 産物をシーケンス解析に供した。

(2) 過剰あるいは低下発現する細胞側遺伝子の同定

検体より RNA を抽出した後に cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法で遺伝子発現レベルを解析した。慢性活動性 EBV 感染症 2 症例、伝染性単核球症 4 症例、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 1 症例、および健康人末梢血 3 例のグループ間で比較検討した。相対的遺伝子発現レベルは、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で算出し、統計解析は Student t 検定で行い、P 値が 0.05 未満を以って「有意差」と判断した。

4. 研究成果

【結果】

(1) EBV 遺伝子型解析

EBV は EBNA2 と EBNA3C 遺伝子の塩基配列の違いにより、EBV 1 型と EBV 2 型に分けられる。EBV 1 型は EBV 2 型より細胞不死化効果が高いとされ、EBV 2 型は EBV 1 型よりウイルス溶解感染へと移行しやすいとされている。EBNA2 および EBNA3C 遺伝子を PCR で増幅する際に、PCR 産物の長さにより EBV 1 型と EBV 2 型が判別できるようにプライマーを設定した。すなわち、EBNA2 遺伝子 PCR 産物の長さが 168 bp であれば EBV 1 型、184 bp であれば EBV 2 型、また EBNA3C 遺伝子 PCR 産物の長さが 153 bp であれば EBV 1 型、246 bp であれば EBV 2 型と設定した。

調べた全ての症例 (慢性活動性 EBV 感染症 6 症例、EBV 陽性伝染性単核球症 18 症例、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 2 症例) で、得られた PCR 産物は EBNA2 168 bp および EBNA3C 153 bp であり、これら 3 種の日本人発症 EBV 関連疾患を惹起する EBV は 1 型であることが示された。

BZLF1 遺伝子は、EBV が潜伏感染状態から溶解感染へと移行する際に最初に活性化される遺伝子であり、EBV 再活性化カスケードの調節に重要な働きをする。BZLF1 遺伝子プロモーター領域 (Zp) はその配列の相違から、Zp-P prototype、Zp-V1 variant、Zp-V3 variant、Zp-V4 variant に分けられる。BZLF1

遺伝子プロモーター領域をPCRで増幅し、そのPCR産物のシーケンス解析を行った。

その結果、慢性活動性EBV感染症では、Zp-P variant (50%)とZp-V3 variant (50%)が検出された。伝染性単核球症では、Zp-P prototype (56%)、Zp-V1 variant (17%)、Zp-V3 variant (56%)がともに検出され、ここではZp-P prototypeとZp-V1 variantとの共在、およびZp-P prototypeとZp-V3 variantとの共在が認められた。EBV関連血球貪食性リンパ組織球症においては、Zp-V3 variantのみが検出された。Zp-V4 variantはいずれの症例でも検出されなかった。

(2) 過剰あるいは低下発現する細胞側遺伝子の同定

慢性活動性EBV感染症細胞株を用いた解析で、これまでに報告された発現変化する細胞側遺伝子群について、患者から分離された検体を培養に供することなく、その発現レベルをリアルタイムPCRで解析した。コントロール群として β -actin遺伝子と β 2-microglobulin遺伝子を用いた。

コントロール群と比して、統計学的有意差を以って慢性活動性EBV感染症で過剰発現が認められた遺伝子はRIPK2、CDH9、TP73であり、逆に発現が低下していた遺伝子はABCA2、CD44、CDK2、CUL5、EGR1、FCER2、FOS、NCOA3、NFE2L2、SAA2、TNFRSF10であった。これら遺伝子の中で、TP73、ABCA2、CD44、CDK2、CUL5、EGR1、FCER2、FOS、NCOA3、NFE2L2、SAA2、TNFRSF10Dは伝染性単核球症、あるいはEBV関連血球貪食性リンパ組織球症においても同様の発現プロファイルが確認された。したがって、RIPK2とCDH9遺伝子のみが慢性活動性EBV感染症で特異的に過剰発現される遺伝子であることが示唆された。

【考察】

(1) EBV遺伝子型解析

EBV 1型が慢性活動性EBV感染症、伝染性単核球症およびEBV関連血球貪食性リンパ組織球症に検出され、EBV 1型がこれらEBV関連疾患の病原ウイルスであることが示された。したがって、EBV遺伝子型は、これらのEBV関連疾患の臨床的特徴の差異に関係するものではないことが示唆された。

Gutiérrezら(2002)は、BZLF1遺伝子プロモーター領域のZp-V4 variantが米国人の慢性活動性EBV感染症および伝染性単核球症で優位に認められることを報告している。今回の研究では、日本人の慢性活動性EBV感染症、伝染性単核球症では、Zp-V4 variantは検出されなかったが、Zp-P prototypeとZp-V3 variantが相当数の症例で確認できた。これら米国からの報告との相違は、地理的あるいは

人種的要因の関与が考えられる。実際、今回の結果は、Tongら(2003)が報告したアジア地域での慢性活動性EBV感染症および伝染性単核球症におけるZp variantの分布と一致するものであった。

また、一部の日本人発症伝染性単核球症ではZp-V1 variantが検出された。Jinら(2010年)も中国人の伝染性単核球症においてZp-V1 variantを見出している。

以上の結果をまとめると、Zp-V4 variantは日本人発症の慢性活動性EBV感染症をはじめ伝染性単核球症やEBV関連血球貪食性リンパ組織球症の病原性への関与は認められず、Zp-V1 variantはアジア地域における伝染性単核球症に関連したユニークなタイプであることが示された。またZp variantsの共在は伝染性単核球症でのみ認められ、慢性活動性EBV感染症やEBV関連血球貪食性リンパ組織球症では認められなかった現象である。これはEBV関連疾患における“腫瘍性”疾患と“非腫瘍性”疾患との違いに関係している可能性を示唆している。

(2) 過剰あるいは低下発現する細胞側遺伝子の同定

今回の研究で、慢性活動性EBV感染症で特異的に過剰発現される遺伝子として、RIPK2遺伝子とCDH9遺伝子を同定した。

RIPK2はNF- κ Bの活性化に重要な役割を果たし、またMAPKシグナル系に関与することにより、JNK、ERK2、p38を活性化させることが知られている。このように過剰発現されたRIPK2がEBV感染細胞に恒常的なNF- κ Bの活性化をもたらし、さらに細胞の分化・増殖に密接に関わることにより、慢性活動性EBV感染症の病態形成に寄与することが示唆される。したがって、この分子を標的にした新規治療法開発への展開に繋がる可能性を示し得ることができた。

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16件)

- ① Imajoh M, Hashida Y, Murakami M, Maeda A, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H, Daibata M. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 gene promoter variants and comparison of cellular gene expression profiles in Japanese patients with infectious mononucleosis, chronic active EBV infection, and EBV-associated

- hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Journal of Medical Virology*. 査読有, 84, 2012, 940-946. doi: 10.1002/jmv.23299
- ② Asano T, Kogawa K, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Ohga S, Kudo K, Ohta S, Wakiguchi H, Tabuchi K, Kato S, Ishii E. Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: a nationwide survey in Japan. *Pediatric Blood & Cancer*. 査読有, 59, 2012, 110-114. doi: 10.1002/pbc.23384
- ③ Fujieda M, Ishihara M, Morita T, Hayashi A, Okada S, Ohta T, Sakano T, Wakiguchi H. Effect of single-dose oral mizoribine pulse therapy twice per week for frequently relapsing steroid-dependent nephrotic syndrome. *Clinical Nephrology*. 査読有, 78, 2012, 40-46.
- ④ Fujieda M, Karasawa R, Takasugi H, Yamamoto M, Kataoka K, Yudoh K, Kato T, Ozaki S, Wakiguchi H. A novel anti-peroxiredoxin autoantibody in patients with Kawasaki disease. *Microbiology and Immunology*. 査読有, 56, 2012, 56-61. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00393.x
- ⑤ Nakajima K, Wakiguchi H, Kodama H, Sano S. Neonatal lupus erythematosus in identical twins, showing transient bullous lesions. *Pediatric Dermatology*. 査読有, 28, 2011, 397-400. doi: 10.1111/j.1525-1470.2010.01197.x
- ⑥ Ishihara M, Tanaka E, Sato T, Chikamoto H, Hisano M, Akioka Y, Dohno S, Maeda A, Hattori M, Wakiguchi H, Fujieda M. Epstein-Barr virus load for early detection of lymphoproliferative disorder in pediatric renal transplant recipients. *Clinical Nephrology*. 査読有, 76, 2011, 40-48.
- ⑦ Nomura K, Kanegane H, Otsubo K, Wakiguchi H, Noda Y, Kasahara Y, Miyawaki T. Autoimmune lymphoproliferative syndrome mimicking chronic active Epstein-Barr virus infection. *International Journal of Hematology*. 査読有, 93, 2011, 760-764. doi: 10.1007/s12185-011-0877-9
- ⑧ Morita T, Kakinuma Y, Kurabayashi A, Fujieda M, Sato T, Shuin T, Furihata M, Wakiguchi H. Conditional VHL gene deletion activates a local NO-VEGF axis in a balanced manner reinforcing resistance to endothelium-targeted glomerulonephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 査読有, 26, 2011, 4023-4031. doi: 10.1093/ndt/gfr176.
- ⑨ Tanaka E, Sato T, Ishihara M, Tsutsumi Y, Hisano M, Chikamoto H, Akioka Y, Dohno S, Maeda A, Hattori M, Wakiguchi H, Fujieda M. Asymptomatic high Epstein-Barr viral load carriage in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplantation*. 査読有, 15, 2011, 306-313. doi: 10.1111/j.1399-3046.2010.01465.x
- ⑩ Fujieda M, Morita T, Naruse K, Hayashi Y, Ishihara M, Yokoyama T, Toma T, Ohta K, Wakiguchi H. Effect of pravastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Human & Experimental Toxicology*. 査読有, 30, 2011, 603-615. doi: 10.1177/0960327110376551
- ⑪ Tamaki W, Fujieda M, Maeda M, Hosokawa T, Morita H, Asami T, Wakiguchi H. A case of pseudohomozygous type II hyperlipoproteinemia in early infancy. *Pediatrics International*. 査読有, 53, 2011, 110-113. doi: 10.1111/j.1442-200X.2010.03237.x.
- ⑫ Hosokawa T, Kumon Y, Kobayashi T, Enzan H, Nishioka Y, Yuri K, Wakiguchi H, Sugiura T. Neutrophil infiltration and oxidant-production in human atherosclerotic carotid plaques. *Histology and Histopathology*. 査読有, 26, 2011, 1-11.
- ⑬ Hosokawa T, Fujieda M, Wakiguchi H, Oosaki Y. Pediatric Hirayama disease. *Pediatric Neurology*. 査読有, 43, 2010, 151-153. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2010.03.015
- ⑭ Morita T, Ashida A, Fujieda M, Hayashi A, Maeda A, Ohta K, Shimizu M, Sekine T, Igarashi T, Tamai H, Wakiguchi H. Four cases of postrenal renal failure induced by renal stone associated with rotavirus infection. *Clinical Nephrology*. 査読有, 73, 2010, 398-402.
- ⑮ Hoshiba H, Uchiyama J, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Daibata M, Wakiguchi H, Matsuzaki S. Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage, phiMR25, and its therapeutic

potential. Archives of Virology. 査読有, 155, 2010, 545-552. doi: 10.1007/s00705-010-0623-2

- ⑩ Dohno S, Maeda A, Ishiura Y, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H. Diagnosis of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus in infants. Pediatrics International. 査読有, 52, 2010, 536-540. doi: 10.1111/j.1442-200X.2010.03087.x.

〔学会発表〕(計 17 件)

- ① 佐藤哲也, 脇口宏, 他. 管出血性大腸菌 0-157 による溶血性尿毒症症候群の経過中に急性膵炎を合併した 1 例. 第 44 回日本小児感染症学会, 2012 年 11 月 25 日, 北九州国際会議場(北九州市)
- ② 菅秀, 脇口宏, 他. 全国多施設共同サーベイランスによる小児侵襲性細菌感染症の臨床疫学的解析～Hib および肺炎球菌ワクチン導入のインパクト～. 第 44 回日本小児感染症学会, 第 44 回日本小児感染症学会, 2012 年 11 月 24 日, 北九州国際会議場(北九州市)
- ③ 荒木まり子, 脇口宏, 他. 胆汁うっ滞が遷延し肝生検で肝内胆管減少症と診断された超低出生体重児の 1 例. 第 39 回日本小児栄養消化器肝臓学会, 2012 年 7 月 14 日, 新梅田シティ梅田スカイビル(大阪市)
- ④ 松下憲司, 脇口宏, 他. 高度な高ビリルビン血症を呈さなかったが後に核黄疸と診断された超低出生体重児の 1 例. 第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会, 2012 年 7 月 10 日, 大宮ソニックシティ(大宮市)
- ⑤ 山本雅樹, 脇口宏, 他. ミトコンドリア呼吸鎖の酵素活性低下により診断されたミトコンドリア心筋症の姉妹例. 第 48 回日本小児循環器学会, 2012 年 7 月 6 日, 国立京都国際会館(京都市)
- ⑥ 石原正行, 脇口宏, 他. 生後 1 ヶ月で両側腎石灰化のみられた遠位尿細管性アシドーシスの男児例. 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2012 年 6 月 30 日, 都市センターホテル(東京都)
- ⑦ 森田拓, 脇口宏, 他. 開窓 Fontan 術後進行する腎不全のため 10 歳台で腹膜透析を導入した Alport 症候群疑いの女児例. 2012 年 6 月 29 日, 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会, 都市センターホテル(東京都)
- ⑧ 吉川清志, 脇口宏, 他. 高知県の小児救急医療体制の現状. 第 23 回日本小児科医会総会フォーラム, 2012 年 6 月 10 日, ホテルさっぽろ芸文館(札幌市)
- ⑨ 森田拓, 脇口宏, 他. 後天的な VHL 遺伝

子の不活化による NO-VEGF 系活性化は、血管内皮細胞において糸球体腎症への抵抗を増強する. 第 55 回日本腎臓学会学術総会, 2012 年 6 月 2 日, パシフィコ横浜(横浜市)

- ⑩ 細川卓利, 脇口宏, 他. MRA、脳波所見が診断に有用であった家族性片麻痺性片頭痛の 13 歳男児例. 第 54 回日本小児神経学会総会, 2012 年 5 月 17 日, ロイトン札幌(札幌市)
- ⑪ 満田直美, 脇口宏, 他. 幼児期に言語発達遅滞を認めた小児の就学時の診断について. 第 54 回日本小児神経学会総会, 2012 年 5 月 17 日, ロイトン札幌(札幌市)
- ⑫ 藤枝幹也, 脇口宏, 他. 川崎病における抗 Peroxiredoxin2(Prx2)抗体の存在と意義. 第 115 回日本小児科学会, 2012 年 4 月 22 日, 福岡サンパレスホテル&ホール(福岡市)
- ⑬ 大石拓, 脇口宏, 他. X-linked Myotubular myopathy の一例. 第 115 回日本小児科学会, 2012 年 4 月 21 日, 福岡サンパレスホテル&ホール(福岡市)
- ⑭ 堂野純孝, 脇口宏, 他. 移植 15 カ月後、髄液中に LGL を認めた EBV 関連 NK リンパ腫の 1 例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2011 年 11 月 26 日, ベイシア文化ホール(前橋市)
- ⑮ 菊地広朗, 脇口宏, 他. 再生不良性貧血発症時に AML1/EBV-1 キメラ遺伝子が陽性であった AA-MDS の 1 例. 第 52 回日本小児血液学会, 2010 年 12 月 17 日, 大阪国際会議場(大阪市)
- ⑯ 佐藤哲也, 脇口宏, 他. EB ウイルス関連疾患における感染細胞の同定に関する検討. 第 42 回日本小児感染症学会, 2010 年 11 月 27 日, 仙台国際センター(仙台市)
- ⑰ 佐藤哲也, 脇口宏, 他. 低 γ -グロブリン血症と B リンパ球減少に慢性活動性 EBV 感染症を合併した 1 女児例. 第 113 回日本小児科学会, 2010 年 4 月 24 日, 盛岡市文化ホール(盛岡市)

〔図書〕(計 3 件)

- ① 佐藤哲也, 脇口宏, 他. 医歯薬出版社, 小児用ワクチン Update, ワクチンに関する基礎知識, 医学のあゆみ, 2013, 11-14.
- ② 前田明彦, 脇口宏, 他. 医薬ジャーナル社. Epstein-Barr ウイルスのさまざまな病態. 新編ウイルスの今日的意味, 2012, 178-188.
- ③ 脇口宏, 日本医事新報社, EB ウイルス感染症の様々な病態. 2012, 71-78.

[その他]

ホームページ等

高知大学医学部

<http://www.kochi-ms.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

脇口 宏 (WAKIGUCHI HIROSHI)

高知大学・学長

研究者番号：10116519

(2) 研究分担者

大畑 雅典 (DAIBATA MASANORI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：50263976