

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591573

研究課題名(和文)慢性活動性EBウイルス感染症において特異的に発現変化する細胞遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Identification of cellular genes associated with pathogenesis of chronic active Epstein-Barr virus infection

研究代表者

藤枝 幹也 (FUJIEDA, MIKIYA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：60209020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性活動性EBウイルス感染症は小児に多くみられる予後不良の疾患である。これまでの慢性活動性EBウイルス感染症の研究では、細胞側遺伝子の解析データは十分に蓄積されているとは言えない現状である。しかも従来の研究は細胞株を使ったin vitroのデータが多く、患者in vivoでの病態を正確に反映しているとは限らない。本研究では生体内に近い状態にある細胞側の遺伝子発現を解析し、本疾患において発現変化する遺伝子の同定を行った。PCRアレイ法と定量的RT-PCR法で、対照コントロール群と比べ10倍以上の発現亢進がみられた遺伝子として、IL10、IL2、IFNGR1、INHBAが挙げられた。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV) remains unclear. Previous studies have determined a number of candidate cellular genes associated with CAEBV. However, few data are available on the gene expression levels in freshly isolated cells from patients with CAEBV. In the present study, peripheral blood samples were obtained from patients with CAEBV. We investigated the host cellular gene expression profiles in CAEBV using a PCR array analysis that focused on T-cell and B-cell activation. We identified that four genes (IL-10, IL-2, IFNGR1, and INHBA) were upregulated in the CAEBV patients based on the PCR array analysis and the subsequent quantitative real-time PCR assay, where these four genes exhibited tenfold differences compared with the control subjects. These genes may be associated with inflammatory responses and with cell proliferation, and they may contribute to the development and progression of CAEBV.

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：ウイルス 感染症

## 1. 研究開始当初の背景

慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (Chronic active EBV infection: CAEBV) は小児に多くみられる予後不良の疾患であり、その本態は EBV 感染 T 細胞あるいはナチュラルキラー (NK) 細胞を主体とする単または寡クローン性増殖である。通常 EBV は B 細胞に感染し、細胞傷害性/キラー T 細胞による免疫反応により潜伏感染状態に移行する。CAEBV では、EBV の感染標的細胞が T 細胞の場合、病勢が進行し T 細胞リンパ腫に発展することが知られている。また、NK 細胞に感染がある場合には、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。すなわち、CAEBV は単なる感染症として位置づけられるものではなく、EBV の感染が T 細胞か NK 細胞に限られる EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患であり、腫瘍、もしくは前腫瘍状態である。近年、分子生物学的診断法、疾患活動性の評価法はほぼ定着し、CAEBV の診断基準の提案がなされるに至った。しかし CAEBV の病態形成機序の全貌はなお不明のままである。

これまでの CAEBV の病態に関する研究では、T/NK 細胞の無制限増殖に働く責任 EBV 遺伝子の同定に主眼が置かれていた。その一方で CAEBV 患者において、どのような細胞側遺伝子が発現され、それがどう動くかについてのデータは十分に蓄積されていない状態であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、CAEBV 患者の病態をより正確に把握するために、CAEBV 患者末梢血から得られたサンプルを用い(培養に供することなく)、本疾患に特異的に発現される細胞側遺伝子の同定を行い、CAEBV の新規診断法、病勢予測法さらには新規治療法の確立へと展開できる礎を作ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプル

日本人 6 症例を本研究の対象とした。その内訳は、CAEBV 3 症例、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis: EBV-HLH) 2 症例、EBV 陽性 NK リンパ腫 1 症例であった。健常者 14 人の末梢血を対照コントロールとした。CAEBV 患者の末梢血 EBV DNA 量は  $9.9 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^5$  コピー/ $\mu\text{g}$  DNA であり、EBV-HLH では  $2.1 \times 10^5 \sim 4.6 \times 10^5$  コピー/ $\mu\text{g}$  DNA、EBV 陽性 NK リンパ腫では  $2.6 \times 10^5$  コピー/ $\mu\text{g}$  DNA であった。全ての対照健常人末梢血から EBV が検出され、そのウイルスコピー数は  $1.3 \sim 180$  コピー/ $\mu\text{g}$  DNA であった。

### (2) PCR アレイ解析

末梢血単核球より RNA を抽出した後、RT<sup>2</sup> Nano PreAMP cDNA 合成キット (キアゲン社) を用いて cDNA を合成した。この cDNA を PCR

アレイ法に供した。アレイはキアゲン社の Human T-cell and B-cell Activation RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array を用いた。このアレイには 86 遺伝子が含まれており、B 細胞・T 細胞の活性化に關与する遺伝子群の他に、その増殖や分化に關わる遺伝子群、Th1 や Th2 細胞を制御する遺伝子群などが組み込まれている。さらにはマクロファージ、好中球、NK 細胞の活性化に關与する遺伝子群も含まれている。GAPDH 遺伝子発現の内部標準を基に Ct 値を算出し、Ct 法により患者サンプルと対照コントロール群間での比較解析を行った。

### (3) 定量的リアルタイム PCR 解析

抽出した RNA は SuperScript First-Strand Synthesis キット (インビトロジェン社) を用いて cDNA に変換した。遺伝子発現レベルは LightCycler 480 を用いて測定した。

### (4) ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法

血清の IL-10 と TNF- $\alpha$  濃度は ELISA 法で測定した。IL-10 測定のためのキットは Gen-Probe 社から、TNF- $\alpha$  測定のためのキットは R&D Systems 社から購入した。

## 4. 研究成果

### (1) PCR アレイ解析結果

PCR アレイ解析の結果、対照コントロールと比べて 4 倍以上の発現の差が認められた遺伝子は以下のとおりであった。

#### [CAEBV]

- ・発現亢進  
CXCR3, IFNGR1, IL-10, IL-12B, IL-2, IL-3, INHBA, SFTPD.
- ・発現低下  
APOA2, CCR2, CD86, CXCR4, IL-4, IL-8, TLR2, TLR4.

#### [EBV-HLH]

- ・発現亢進  
CCR5, CD8B, CSF2, CX3CL1, CXCR3, FASLG, IFNB1, IFNG, IFNGR1, IL-10, IL-11, IL-12B, IL-2, IL-3, INHBA, KIF13B.
- ・発現低下  
CCR2, CD4, GALNAC4S-6T, ICOSLG, INFR2, IL-8, TLR1, TLR2, TLR4, TLR6.

#### [EBV 陽性 NK リンパ腫]

- ・発現亢進  
CX3CL1, CXCR3, FASLG, IFNB1, IL-10, IL-12B, IL-2, IL-3, IL-4R, INHBA, NOS2A, SFTPD.
- ・発現低下  
CCL3, CCL4, CCR3, CD28, CLEC7A, FASLG, IL-4, IL-8, PVRL1, TLR6.

CAEBV に関して、さらに 10 倍以上の発現差異が認められた遺伝子は以下のとおりであった。

・発現亢進

IL-10 (10.7 倍), IL-2 (104.0 倍), IFN GR1 (10.9 倍), INHBA (90.5 倍), IL-12 B (104.0 倍), SFTPD (27.7 倍)

・発現低下

TLR4 (0.05 倍)

(2) 定量的リアルタイム PCR 解析結果

PCR アレイ解析の結果を確かめるために、10 倍以上の発現亢進が認められた上記の 6 遺伝子について、定量的リアルタイム PCR 法でその発現レベルを測定した。

定量的リアルタイム PCR 解析においても 10 倍以上の発現亢進がみられた遺伝子は以下のとおりであった。

・発現亢進

IL-10 (32.7 倍), IL-2 (43.7 倍), IFNG R1 (12.0 倍), INHBA (20.7 倍)

(3) ELISA 解析結果

上記の PCR アレイ解析および定量的リアルタイム PCR 解析の結果、亢進が認められたサイトカイン IL-10 の蛋白での発現レベルを ELISA 法で確かめた。

EBV 既感染の健常人の血清では IL-10 は検出感度以下であったが、CAEBV 患者血清では平均 21.6 pg/mL、EBV-HLH では 141.1 pg/mL、EBV 陽性 NK リンパ腫では 3.2 pg/mL であった。

CAEBV や EBV-HLH では、しばしば TNF- $\gamma$  遺伝子が活性化されることが知られている。そこで本研究の症例でも ELISA 法で TNF- $\gamma$  を測定した。結果は CAEBV では平均 4.1 pg/mL、EBV-HLH では 1.3 pg/mL、EBV 陽性 NK リンパ腫では 0.9 pg/mL で、EBV 既感染の健常人の血清では 0.5 pg/mL であった。

(4) 考察

本研究での PCR アレイ解析と定量的リアルタイム PCR 解析の結果、CAEBV で特異的に過剰発現される遺伝子として IL-10, IL-2, IFN GR1, INHBA を同定した。

IL-10 は Th2 細胞から産生されるサイトカインであるが、これまでの研究でも CAEBV 患者血清での IL-10 の増加は報告されている。本研究でも mRNA と血清蛋白レベルでの発現亢進を証明することができた。今回、IL-10 シグナル伝達系を制御する 3 つの遺伝子 (p38 MAPK, JAK1, STAT3) について、その発現を RT-PCR 法で調べたが、有意な差異は認められなかった。しかし、p38MAPK は対照群と比べて発現亢進の傾向が、また JAK1 と STAT3 は発現低下の傾向がみられた。今後、CAEBV における IL-10 シグナル伝達の関わりについてさらなる検討が必要である。

これまでの報告でも CAEBV 患者で IL-2 遺伝子の発現過剰が指摘されている。IL-2 は CAEBV での EBV 感染細胞の増殖に必要であることが示唆されており、IL-2 や INF- $\gamma$  といった Th1 サイトカインが CAEBV の病態を形成していると考えられる。実際、本研究でも INF- $\gamma$  遺伝子の発現レベルを RT-PCR 法で解析したが、コントロール群と比べて、3.8 倍の発現亢進が認められた。

INF- $\gamma$  受容体は INFGR1 と INFGR2 分子から成る。INF- $\gamma$  が INFGR1 に結合すると JAK-STAT 経路を活性化し、細胞核内において様々な遺伝子を制御することが知られている。例えば、炎症や免疫に関係する遺伝子、細胞増殖やリンパ球と内皮細胞との相互作用を制御する遺伝子などが含まれる。すなわち、本研究で明らかとなった CAEBV における INF- $\gamma$  と INFGR1 の過剰発現は CAEBV の病態に関与すると考えられ、この INFGR1 シグナル伝達をブロックすることは CAEBV の治療に繋がる可能性を示唆する。

INHBA 分子は TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属し、細胞の増殖・分化に関わる。その合成と分泌は活性化された Th2 細胞、単球、マクロファージで行われる。INHBA は様々な腫瘍で過剰発現され、細胞にアポトーシス抵抗性を賦与し、細胞の増殖や腫瘍の進展に関与する。したがって、CAEBV の炎症に伴って活性化される INHBA は EBV 感染細胞の生存、および増殖を促し、CAEBV の病態形成に携わっていると考えられる。

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 17 件)

Murakami M, Hashida Y, Imajoh M, Maeda A, Kamioka M, Senda Y, Sato T, Fujieda M, Wakiguchi H, Daibata M. PCR array analysis of gene expression profiles in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbes Infect.* 査読有. 2014 (掲載決定). doi: 10.1016/j.micinf.2014.04.004.

Tamaki W, Tsuda E, Igarashi T, Tanaka N, Fujieda M. Importance of evaluation of the right coronary artery by two-dimensional echocardiography in patients after Kawasaki disease: a right parasternal approach. *Heart Vessels.* 査読有. 2014 (掲載決定). doi: 10.1007/s00380-014-0476-9.

Fujieda M, Hattori M. Cancer-infection interface in children after transplantation: posttransplant lymphoproliferative disorder and Epstein-Barr virus infection. *Curr Opin Organ Transplant.* 査読有. 18, 2013, 54

- 9-554. doi: 10.1097/MOT.0b013e3283651b0d.
- Ishihara M, Urushibara M, Hamada K, Matsumoto T, Shimamura Y, Ogata K, Inoue K, Taniguchi Y, Horino T, Fujieda M, Fujimoto S, Terada Y. Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 査読有. 305, 2013, F495-509. doi: 10.1152/ajprenal.00642.2012.
- Karasawa E, Fujieda M, Ohta K, Yudoh K. Validation of a new biomarker in patients with Kawasaki disease identified by proteomics. *J Data Mining Genomics Proteomics*. 査読有. 4, 2013, 124. doi: 10.4172/2153-0602.1000124.
- 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. *J Med Virol*. 査読有. 84, 2012, 940-946. doi: 10.1002/jmv.23299.
- Fujieda M, Karasawa R, Takasugi H, Yamamoto M, Kataoka K, Kato T, Ozaki S, Wakiguchi H. A novel anti-peroxiredoxin autoantibody in patients with Kawasaki disease. *Microbiol Immunol*. 査読有. 56, 2012, 56-61. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00393.x.
- Fujieda M, Ishihara N, 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 nephritic syndrome. *Clin Nephrol*. 査読有. 78, 2012, 40-46. doi: 10.5414/CN106635.
- Ashida A, Fujieda M, Ohta K, Nakamura H, Matsumura H, Morita T, Igarashi T, Tamai H. Clinical characteristics of obstructive uropathy associated with rotavirus gastroenteritis in Japan. *Clin Nephrol*. 査読有. 77, 2012, 49-54. doi: 10.5414/CN107098.
- Morita T, Fujieda M, Acidosis with hyperuricemia and renal tubular damage in viral gastroenteritis. *Pediatric Nephrol*. 査読有. 26, 2011, 225
- 9-2260. doi: 10.1007/s00467-011-2003-x.
- Yokoyama T, Sugimoto N, Taniguchi K, Komoto S, Yuno T, Ohta K, Hashimoto H, Seno A, Ashida A, Fujieda M, Nishio S, Ueno K, Shimizu M, Yachie A. Molecular and immunohistochemical detection of rotavirus in urinary sediment cells of children with rotavirus gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 査読有. 17, 2011, 1190-1193. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03522.x.
- Ishihara M, Tanaka E, Sato T, Chikamoto H, Hisano M, Akioka Y, Dohno S, Maeda A, Wakiguchi H, Fujieda M. Epstein-Barr virus load for early detection of lymphoproliferative disorder in pediatric renal transplant recipients. *Clin Nephrol*. 査読有. 76, 2011, 40-48. doi: 10.5414/CN106572.
- 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. *Nephrol Dial Transpl*. 査読有. 26, 2011, 4023-4031. doi: 10.1093/ndt/gfr176.
- 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 Transplant*. 査読有. 15, 2011, 306-313. doi: 10.1111/j.1399-3046.2010.01465.x.
- Ishida K, Kaneda H, Uemura O, Ushijima K, Ohta K, Goto Y, Satomura K, Shimizu M, Fujieda M, Morooka M, Yamada T, Yamada M, Wada N, Takaai M, Hashimoto Y. Evaluation of limited sampling designs to estimate maximal concentration and area under the curve of mizoribine in pediatric patients with renal disease. *Drug Metab Pharmacokinet*. 査読有. 26, 2011, 71-78. doi: http://dx.doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-077.
- Fujieda M, Morita T, Naruse K, Hayashi Y, Ishihara M, Yokoyama T, Tomita T, Ohta K, Wakiguchi H. Effect of pravastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol*. 査読有. 30, 2011, 603-615. doi: 10.1177/0960327110376551

Tamaki W, Fujieda M, Maeda M, Hosokawa T, Morita H, Asami T, Wakiguchi H: A case of pseudohomozygous type II hyperlipoproteinemia. *Pediatr Int*. 査読有. 53, 2011, 110-113. doi: 10.1111/j.1442-200X.2010.03237.x.

〔学会発表〕(計 17 件)

石原正行, 藤枝幹也, 他. B Kウイルスによる生体腎移植後のウイルス腎症の一例. 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2013 年 10 月 27 日. 札幌コンベンションセンター(札幌市)

石原正行, 藤枝幹也, 他. 抗ドナー抗体陽性の二次性生体腎移植後に B Kウイルス腎症を発症した一小児例. 第 35 回日本小児腎不全学会学術集会, 2013 年 10 月 24 日, ホテル華の湯(郡山市)

Ishihara M, Fujieda M, 他. The usefulness of monitoring of Epstein-Barr viral load after renal transplantation in pediatric recipients with EBV seronegative. The 16 th Congress of the International Pediatric Nephrology Association. 2013 年 9 月 1 日, Shanghai International Convention Center, Shanghai, China. September 1, 2013

Ishihara M, Fujieda M, 他. A 14-year-old girl with fibronectin glomerulopathy: a rare cause of lobular glomerulopathy. The 11 th Korea-Japan Pediatric Nephrology Seminar, 2013 年 4 月 6 日, Seoul National University Children's Hospital, Seoul, Korea.

佐藤哲也, 藤枝幹也, 他. 腸管出血性大腸菌 O-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総会・学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 北九州国際会議場(福岡市)

森下祐介, 藤枝幹也, 他. 1 か月女児の腸管出血性大腸菌(O-157)感染症. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 北九州国際会議場(福岡市)

藤枝幹也. ロタウイルス胃腸炎に関連した両側尿路結石による腎後性腎不全. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2012 年 11 月 24 日, 北九州国際会議場(福岡市)

佐藤哲也, 藤枝幹也, 他. トシリズマブ投与で軽快した赤芽球癆合併多関節型若年性特発性関節炎(JIA)の 1 例. 第 22 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会, 2012 年 10 月 7 日, ウィルあいち(名古屋市)

石原正行, 藤枝幹也, 他. 腎移植術前検査でクオンティフェロン陽性なため抗結核薬内服を行った男児例. 第 34 回

日本小児腎不全学会学術集会, 2012 年 9 月 14 日, ホテルニューアワジ(洲本市)

石原正行, 藤枝幹也, 他. 生後 1 か月で両側腎石灰化のみられた遠位尿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)

森田拓, 藤枝幹也, 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. 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会, 2012 年 6 月 29 日, 都市センターホテル(東京都)

佐藤哲也, 藤枝幹也, 他. 感染性硬膜下血腫の 1 例. 第 43 回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2011 年 10 月 29 日, 岡山コンベンションセンター(岡山市)

荒木まり子, 藤枝幹也, 他. 抗 LPL 抗体による高脂血症を伴った SLE の 10 歳女児例. 第 21 回日本小児リウマチ学会総会・学術集会, 2011 年 10 月 16 日, 神戸国際会議場(神戸市)

石原正行, 藤枝幹也, 他. AMPK を介して虚血再灌流 AKI モデルの腎尿細管での PGC-1 活性は増加し, ミトコンドリア関連酵素を亢進する. 第 54 回日本腎臓学会学術総会, 2011 年 6 月 15 日, パシフィコ横浜(横浜市)

Morita T, Fujieda M, 他. Conditional VHL gene deletion activates a local NO-VEGF axis in a balanced fashion to reinforce resistance to endothelium-targeted glomerulonephropathy. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. 2011 年 6 月 2 日, 福岡国際会議場(福岡市)

Ishihara M, Fujieda M, 他. Sestrin 2 induce renal tubular cells to autophagy in vitro acute kidney injury model. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. 2011 年 6 月 2 日, 福岡国際会議場(福岡市)

Ishihara M, Fujieda M, 他. Gain of function mutation of the calcium sensing receptor in a mother and her son with hypocalcemia. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology. 2011 年 6 月 2 日, 福岡国際会議場(福岡市)

〔図書〕(計 4 件)

藤枝幹也. 診断と治療社, 血管炎症候群, 小児腎臓病学(日本小児腎臓病学会編), 2012 年, pp.297-301.

藤枝幹也. 医学書院, 小児の慢性腎炎症候群, 今日の治療指針, 2012 年, pp. 179-180.

藤枝幹也, 他. 日本臨床社, ロタウイルス胃腸炎と尿酸結石症. 腎臓症候群

(第2版)下 - その他の腎臓疾患を含めて  
- .別冊腎臓症候群(下),新領域別症  
候群シリーズ,2012年,pp.652-655.  
藤枝幹也,他.京医学社,腎尿路結石  
症 小児疾患の診断治療基準 第4版 小  
児内科増刊号,2012年,pp.660-661.

〔その他〕

ホームページ等

高知大学医学部小児思春期医学講座

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_pdatr/](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_pdatr/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤枝 幹也 (FUJIEDA MIKIYA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号: 60209020

### (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

村上 雅尚 (MURAKAMI MASANAO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号: 80571017