

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591653

研究課題名(和文) EBウイルス感染リンパ球の再活性化が誘発する宿主免疫応答と皮膚病変の解明

研究課題名(英文) Studies on host immune responses induced by reactivation of EB virus-infected lymphocytes and resultant skin lesions

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：種痘様水疱症(HV)、蚊刺過敏症(HMB)と慢性活動性EBウイルス感染症(CAEBV)など50例超の診断的検査を実施し、病態探求した。EBウイルス(EBV)は、古典的HVでは T細胞、全身性HVでは多くは T細胞に、HMBではNK細胞に感染し、感染リンパ球サブタイプと病型は関連した。

集積した症例から予後因子として、病型と発症年齢に加えて、EBV再活性化マーカーであるBZLF1発現が重要であることを明らかにした。すなわち、皮膚病変部におけるEBV抗原発現と宿主免疫応答が重症病型を起こすと考えられた。高齢発症の非定型的HV症例を見出し、細胞学的特性とEBV遺伝子発現データを論文報告した。

研究成果の概要(英文)：We performed diagnostic examinations on more than 50 cases of EB virus-associated T/NK lymphoproliferative disorders including hydroa vacciniforme (HV), hypersensitivity to mosquito bites (HMB), chronic active EB virus infections(CAEBV) and so on, and studied the pathogenesis. EB virus was found to be infected mainly in gdT cells in classical HV, abT cells in systemic HV, and NK cells in HMB. These results indicate that EB virus-infected lymphocyte subsets are closely related to the clinical phenotypes.

We found prognostic factors in our series of patients: clinical phenotypes, age of the disease onset, and the expression of EB virus reactivation marker, BZLF1. The results suggest that host immune responses against the EBV antigens expressed in the skin lesions induce the severe clinical symptoms. Furthermore, we found elderly patients with atypical HV, and reported their cytological characteristics and EB virus gene expression patterns.

研究分野：皮膚科

キーワード：EBウイルス 種痘様水疱症 蚊刺過敏症 慢性活動性EBウイルス感染症 T細胞 NK細胞
遺伝子発現 診断キット

1. 研究開始当初の背景

(1) EBV 関連 T/NK リンパ球増殖症 (種痘様水疱症、蚊刺過敏症、慢性活動性 EBV 感染症など) の病因は謎が多い。われわれは、種痘様水疱症、蚊刺過敏症、慢性活動性 EBV 感染症、鼻型 NK/T 細胞リンパ腫が EBV 関連 T/NK リンパ球増殖症として同一疾患スペクトラムを形成し (Arch Dermatol 1997, Br J Dermatol 1999, Eur J Dermatol 2003) その多様な臨床症状発現が、複数の EBV 感染細胞クローンと宿主免疫応答の結果として生じる可能性を報告した (Br J Cancer 2001, Eur J Dermatol 2005, Arch Dermatol 2006)。悪性化する症例は東アジア諸国と中南米に集積している。

(2) 地域特異的発症には EBV サブタイプ (J Med Virol, 2000) よりも、EBV 抗原に対する宿主遺伝免疫学的背景が重要と考えられた。申請者らは、EBV 感染が成立するリンパ球分化段階、各病型に関わるリンパ球サブセット、EBV 再活性化の機序について研究を進めている。我々は種痘様水疱症患者に EBV 感染 T 細胞数が増加していることを証明した (Hirai et al. J Invest Dermatol, 2012)。

(3) また、蚊刺過敏症では、EBV 感染 NK 細胞が末梢血で増加し、皮膚病変部に浸潤し、EBV 再活性化が起きていることを見出し、患者から樹立した EBV⁺細胞株の EBV 再活性化を証明した (論文準備中)。すなわち、EBV 関連 T/NK リンパ球増殖症の病型および臨床症状の多様性は、EBV 感染リンパ球の多様性と、再活性化あるいは感染様式の変化、およびそれに対応する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を主体とする免疫応答の違いによって生じると考えている。この仮説を実証するために、1) EBV 感染が成立するリンパ球分化段階、2) 各病型に関わるリンパ球サブセット解析、3) EBV 再活性化の機序を解明することが必要と考え研究を進める。

2. 研究の目的

(1) 申請者らのこれまでの研究成果から、EB ウイルス (EBV) 関連 T/NK リンパ球増殖症では、各病型に対応して EBV 感染リンパ球サブセットが異なり、それぞれの標的組織において再活性化あるいは感染様式が変化する結果、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導して特有の臨床像を形成するものと考えられる。

(2) 本研究は、1) 各病型に関与する EBV 感染リンパ球サブセットの特定、2) T 細胞受容体遺伝子 (TCR) 遺伝子を用いたクローナリティ解析、3) EBV 感染 T 細胞の紫外線照射皮膚との反応性、4) 病変部における EBV 再活性化と潜伏感染様式変化の証明、5) EBV 再活性化誘導因子、6) 重症免疫不

全 NOG マウスへの EBV 感染細胞移入による病態再現を目的にしている。

3. 研究の方法

(1) EBV 感染リンパ球サブセット解析や EBV DNA コピー数は、ルーチンの診断および病勢モニターとして必須であり、正確かつ確実に実施する。EBV 感染 T 細胞の解析は、患者検体からの選択的培地を用いた培養系で実施する。造血系幹細胞に EBV が感染し、その後 T、NK 細胞へ分化する可能性が考えられる。それを検証するために、患者末梢血の EBV 感染 T 細胞および T 細胞の TCR 遺伝子再構成が異なっているも、同一 EBV エピゾームを持つことを証明する。皮膚病変部における EBV 再活性化誘導に TNF のほか、紫外線により表皮角化細胞あるいは樹状細胞由来メディエーターが関与する可能性を検証する。

(2) EBV⁺ T 細胞の培養系が確立したのち、免疫不全 NOG マウスへ EBV⁺ T 細胞移入を行い、種痘様水疱症の動物モデル作成へと研究を展開する。

4. 研究成果

(1) 患者末梢血および皮膚病変部における EBV 感染リンパ球サブセット解析：国内外から紹介された症例の診断を行い、希少疾患ながら 50 例を超える症例が集積された。種痘様水疱症 (HV) 患者のうち、古典的 HV 症例では EBV 感染 T 細胞数が増加することを新たな症例で確認した。成人及び高齢発症の全身性 HV では、T 細胞増殖を認める症例が多かった。蚊刺過敏症 (HMB) は EBV 感染 NK 細胞増多症を伴うことを確認した。(Hirai Y et al. J Invest Dermatol, 2012, Tanaka C et al. Br J Dermatol 2012, Hamada T et al. J Dermatol, 2014)。

(2) EBV 感染 T 細胞、NK 細胞培養と細胞株樹立と解析：IL2、IL18 とビスホスフォネートを用いる培養系は樹立できたが、生体試料からの T 細胞細胞株は得られていない。他の EBV 感染株に対する HDAC 阻害薬の感受性を検討した (Fujii et al. Hematology 2012)。

(3) EBV 遺伝子発現解析：EBV 遺伝子発現では、溶解および潜伏感染における BARTs の発現様式についての結果を報告した (Yamamoto T et al. J Med Microbiol 2012)。我々が特許をもつ検査法を用いて、国内外から送られてくる検体の診断的検査とともに、EBV 遺伝子発現を網羅的に解析し、データを集積した。末梢血では Latency 1,2 の感染様式をとるリンパ球が、重症型 HV または HMB 患者の病変部では再活性化マーカーを発現することが分かった。軽症で予後の良い古典的種痘様水疱症の病変部では再活

性化マーカーは認められなかった。重症や予後不良を予測させる BZLF-1、BDRF1 などの再活性化シグナルが皮膚病変において認められた。

(4) EBV 感染細胞とクローン解析：患者末梢血を用いた解析では、EBV 感染はさまざまなリンパ球サブセットに感染していた。有意のクローンが単一、複数のものなど多様な感染様式をとった。EBV 遺伝子解析結果ではクローン性増殖が証明されるが、TCR 遺伝子再構成ではクローンを認めない症例が集積された。すなわち、EBV 感染は造血幹細胞に生じ、その後分化を起している可能性を示唆した。

(5) 予後因子解析：種痘様水疱症の粘膜・眼症状の特徴を報告した (Yamamoto T et al. Eur J Dermatol 2012)。各病型 (46 症例) のコホート研究に基づく予後解析では、典型的種痘様水疱症は他群と比べて良好であることが示され、我々の提唱する病型分類基準は重要な予後因子になることが証明された (Miyake T et al. Br J Dermatol 2015)。その他の予後不良因子として、9 歳以上の発症と、BZLF1 発現 (EBV の再活性化マーカー) の 2 因子が見出された。EBV 再活性化マーカー BZLF1 は、本症の合併症として重要な血球貪食症候群と関連し、重要なバイオマーカーになると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

Miyake T, Yamamoto T, Hirai Y, Otsuka M, Hamada T, Tsuji K, Morizane S, Suzuki D, Aoyama Y, Iwatsuki K. Survival rates and prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites. Br J Dermatol. 査読有 2015, 172(1):56-63.

Nomura H, Suzuki H, Egami S, Yokoyama T, Sugiura M, Tomita K, Imada M, Taniguchi, K, Yoshino T, Iwatsuki K. A patient with elderly-onset atypical hydroa vacciniforme with an indolent clinical course. Br J Dermatol, 査読有 2015, in press.

山本 剛伸、痂皮も重要な診断材料 HSV、VZV 診断、Visual Dermatology, 査読有 3(6), 2014, 626-629

岩月 啓氏、渡辺 俊幸、能勢 資子、山本 剛伸、塗抹・擦過標本・痂皮から得られる診断のヒント、Visual Dermatology, 査読有 3(6), 2014, 642-645

Iwatsuki K, Hamada T; Japanese Skin Cancer Society - Lymphoma Study Group. Current therapy of choice for cutaneous lymphomas: Complementary to the Japanese Dermatological Association/Japanese Skin Cancer Society guidelines. J Dermatol. 査読有 2014, 41(1):43-49.

Hamada T, Nakamura S, Ko YH, Yoshino T, Ohshima K, Matsuzawa T, Miura K, Takahashi T, Nomura H, Hoshino T, Suzuki D, Shimada S, Iwatsuki K. Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphomas in the elderly: the first consensus meeting in Kofu 2013. J Dermatol. 査読有 2014, 41(1):40-42.

Hamada T, Iwatsuki K. A nationwide study of 1733 patients. J Dermatol. 査読有 2014, 41(1):3-10.

Nomura H, Egami S, Kasai H, Mori M, Yokoyama T, Fujimoto A, Sugiura M, Iwatsuki K. An elderly patient with chronic active Epstein-Barr virus infection with severe hydroa vacciniforme-like eruptions associated with T-cell proliferation. J Dermatol. 査読有 2014, 41(4):360-362.

Komori S, Asai J, Takenaka H, Kuroda J, Hirai Y, Iwatsuki K, Katoh N. Chronic active Epstein-Barr virus infection with progression to large granular lymphocytic leukemia. J Dermatol. 査読有 2013, 40(6):487-488.

Yamamoto T, Hirai Y, Miyake T, Yamasaki O, Morizane S, Iwatsuki K. Oculomucosal and gastrointestinal involvement in Epstein-Barr virus-associated hydroa vacciniforme. Eur J Dermatol. 査読有 2012, 22(3):380-383.

Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected T cells. J Invest Dermatol. 査読有 2012, 132(5):1401-1408.

Fujii K, Suzuki N, Ikeda K, Hamada T, Yamamoto T, Kondo T, Iwatsuki K. Proteomic study identified HSP 70 kDa protein 1A as a possible therapeutic

target, in combination with histone deacetylase inhibitors, for lymphoid neoplasms. J Proteomics. 2012, 査読有 75(4):1401-1410.

Tanaka C, Hasegawa M, Fujimoto M, Iwatsuki K, Yamamoto T, Yamada K, Kawa K, Saikawa Y, Toga A, Mase S, Wada T, Takehara K, Yachie A. Phenotypic analysis in a case of hydroa vacciniforme-like eruptions associated with chronic active Epstein-Barr virus disease of T cells. Br J Dermatol. 査読有 2012, 166(1):216-218.

Yamamoto T, Iwatsuki K. Diversity of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts and their expression patterns in lytic and latent infections. J Med Microbiol. 査読有 2012, 61(Pt 10):1445-1453.

Fujii K, Suzuki N, Yamamoto T, Suzuki D, Iwatsuki K. Valproic acid inhibits proliferation of EB virus-infected natural killer cells. Hematology. 査読有 2012, 17(3):163-169.

[学会発表](計17件)

三宅智子、平井陽至、山本剛伸、岩月啓氏：痂皮と水疱蓋を用いた種痘様水疱症と蚊刺過敏症の低侵襲診断的検査の鋭敏度と特異度に関する研究。第114回日本皮膚科学会学術大会、横浜、2015.5.29-31

岩月啓氏、平井陽至、三宅智子、濱田利久、大熊 登、山本剛伸：種痘様水疱症：分子生物学的手法が実証した記載皮膚科学の確かさ。第438回京滋地方会、京都、2014.12.19-20

岩月啓氏：皮膚病変から小児造血・組織球系疾患を診る。第56回日本小児血液・がん学会学術集会、岡山、2014.11.28-30

Iwatsuki K. Proposal for nomenclature of EBV-associated T/NK lymphoproliferative disorders: From the cutaneous symptoms and cellular events. The 113th Annual Meeting of Japanese Dermatological Association: Agora for Asian Dermatologists: Consensus Meeting "EBV-associated Lymphomas", Kyoto, 2014.5.30-6.1

三宅智子、木村摩耶、山口麻里、野田和代、濱田利久、青山裕美、岩月啓氏：髄液より診断し得た自己免疫性水疱症に対

して免疫抑制療法中に発症したEBV関連中枢原発性リンパ腫の1例。第37回LCH研究会・第23回EBウイルス感染症研究会、東京、2014.3.16

岩月啓氏：皮膚リンパ腫の病期に応じた治療選択。第24回東播磨皮膚科研究会、兵庫、2014.3.13

木村摩耶、三宅智子、山口麻里、野田和代、濱田利久、青山裕美、岩月啓氏、山本剛伸：自己免疫性水疱症に対する免疫抑制療法中に発症した致死性EBウイルス関連中枢性リンパ腫。第65回日本皮膚科学会西部支部学術大会、鹿児島、2013.11.9-10

平井陽至、山本剛伸、三宅智子、岩月啓氏：種痘様水疱症皮疹を生じる adult-onset 例：early-onset および elderly-onset 例との比較。第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、山梨、2013.8.9-10

鈴木大介、長尾 洋、岩月啓氏：Extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type におけるT細胞受容体鎖の遺伝子再構成に関する検討。第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、山梨、2013.8.9-10

野村尚志、江上将平、笠井弘子、森 真理子、藤本篤嗣、杉浦 丹、岩月啓氏：高齢発症した重症型種痘様水疱症、慢性活動性EBウイルス感染症の1例。第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、山梨、2013.8.9-10

山田朋子、飯田絵理、小山尚俊、塚原理恵子、中村考伸、中村哲史、渡邊萌理、梅本尚可、加倉井真樹、出光俊郎、野口義久、三宅智子、岩月啓氏：T細胞(EBV陽性)の著明な増多を認めた種痘様水疱症の1例。第112回日本皮膚科学会総会、横浜、2013.6.14-16

Hirai Y, Yamamoto T, Morizane S, Miyake T, Takiguchi T, Iwatsuki K. Eradication of cutaneous herpesvirus infections by nucleic acid sensors and cytotoxic T lymphocyte-mediated apoptotic processes, 2013 International Investigative Dermatology Meeting, Edinburgh, UK, 2013.5.8-11

Iwatsuki K, Miyake T, Hirai Y, Yamamoto T, Fujii K, Suzuki D, Tsuji K, Morizane S. Pathogenic cell types, molecular mechanisms and prognostic factors in EB virus-associated cutaneous T/NK lymphoproliferative disorders, 2013

International Investigative
Dermatology Meeting, Edinburgh, UK,
2013.5.8-11

Hamada T, Iwatsuki K. Epidemiology of
cutaneous lymphoma in Japan: A
nationwide study of 1,871 patients.
2013 International Investigative
Dermatology Meeting, Edinburgh, UK,
2013.5.8-11

Iwatsuki K. Remodeling of the cutaneous
immune system and structures during
viral infections, The 23rd Annual
Meeting of Korean Society for
Investigative Dermatology, Seoul,
Korea, 2013.3.22-23

Iwatsuki K, Yamamoto T, Hirai Y, Miyake
T. Immediate-early gene reactivation
signal, BZLF1 expression, is a
molecular marker for a poor prognosis
of Epstein-Barr virus-associated T/NK
lymphoproliferative skin diseases, 2nd
World Congress of Cutaneous Lymphomas/
6th International Symposium on the
Biology and Immunology of Cutaneous
Lymphoma, Berlin, Germany, 2013.2.6-9

Iwatsuki K. Remodeling of the skin
immune system during viral infections.
3rd Skin Physiology International
Meeting (SPIM), Vichy, France,
2012.11.22-23

森実 真 (MORIZANE, Shin)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：80423333

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山本 剛伸 (YAMAMOTO, Takenobu)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：50379799