

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09744

研究課題名(和文) EBウイルス関連リンパ球増殖性皮膚疾患の病態と予後に関わる分子・細胞マーカー解析

研究課題名(英文) Molecular and cytological markers related to the development and prognosis of EB virus-associated lymphoproliferative disorders

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：種痘様水疱症(HV)と蚊刺過敏症(HMB)の診断基準とガイドラインを作成。古典的および全身性HV、HMB、HMBとHV合併の4型に病型分類可能。クローン解析から、古典的HVはEBV感染 T細胞、HMBはNK細胞、全身性HVは T細胞と T細胞により発症することが判明。痂皮を用いたEBER検査法の鋭敏度と特異度検定はともに90%以上で、診断的検査として有用。血漿EBV DNAコピー数の異常高値は血球貪食症候群合併と関連する。生命予後因子は、臨床病型、発症年齢、リンパ球サブセットと、EBウイルス再活性化マーカーBZLF1の発現。オミクス解析結果からエピジェネティックな悪性化機序の一部が判明。

研究成果の概要(英文)：Cutaneous EBV-associated T/NK lymphoproliferative disorders (LPDs) include hydroa vacciniforme (HV) and hypersensitivity to mosquito bites (HMB). We have proposed a clinical spectrum of EBV-associated T/NK LPDs including HV and HMB, and launched guidelines for managements of these disorders. Patients with HV are divided into two groups: a benign subtype designated classic HV (cHV), and more serious systemic HV (sHV). Patients with cHV have increased numbers of EBV-infected gdT cells, and show a favorable prognosis. Patients with sHV are further classified into two groups: gdT-cell- and abT-cell-dominant types. Patients with HMB, with or without HV-like eruptions, have increased numbers of EBV-infected NK cells in the blood. Patients with abT-cell-dominant sHV and HMB have a poor prognosis. In addition to our clinical subtypes and the responsible lymphocyte subsets, the poor prognostic indicators include onset age over 9 years, and the expression of the reactivation marker, BZLF1 mRNA.

研究分野：皮膚自己免疫疾患、皮膚リンパ腫、ウイルス性皮膚疾患

キーワード：EBウイルス T/NKリンパ異常増殖症 種痘様水疱症 蚊刺過敏症 慢性活動性EBV感染症 ウイルス関連リンパ腫 予後因子

1. 研究開始当初の背景

我々はEBウイルス感染によって種痘様水疱症と蚊刺過敏症が皮膚症状として発症し、慢性活動性EBウイルス感染症や血球貪食性リンパ組織球症と関連疾患であることを報告してきた。種痘様水疱症はEBウイルス感染T細胞、蚊刺過敏症はNK細胞増多が特徴である。本疾患の臨床病型、病態、予後を規定する分子マーカーは未だに謎が多い。

2. 研究の目的

EBウイルス関連T/NKリンパ異常増殖症を基盤に特異な皮膚病変を起こす蚊刺過敏症と種痘様水疱症の病態および予後を解析し、治療選択および治療介入を決定するバイオマーカーを探究する。特に、EBウイルス感染T/NK細胞クローン解析とT細胞レパトア解析から、皮膚病変を形成するリンパ球サブセットを解析し、その遺伝子変異とウイルス遺伝子のエクソーム解析の準備をする。

3. 研究の方法

倫理委員会承認のもとで症例集積を行い、EBウイルス感染リンパ球サブセット解析、クローン解析、T細胞受容体レパトア解析を進め、他施設と共同してエクソーム解析を進めた。臨床データとEBウイルス再活性化に関する遺伝子発現から、重症・悪性化に関わる分子マーカーを探索した。診断的検査法についての検証を行った。

4. 研究成果

【臨床病型と疾患スペクトラム】

臨床病型は、1)古典的種痘様水疱症、2)全身性種痘様水疱症(WHO分類のHV-like LPD)、3)蚊刺過敏症、4)蚊刺過敏症と種痘様水疱症合併の4型に分類すると病態と予後を反映する。本疾患群を病因の視点からは慢性活動性EBウイルス感染症として一括できるが(論文投稿中および図書)、病態や予後解釈と治療選択の点から注意が必要である。そこで、我々は、種痘様水疱症と蚊刺過敏症については独立した診断基準と診療ガイドラインを作成し、公開した(厚労省木村班との共同作業)。

【発症に関連するリンパ球サブセット】

古典的種痘様水疱症は、EBV感染 T細胞によって発症し、予後は良好なので、強力な治療は必要としない。しかし、他病型への移行が10%程度起こるため注意深い経過観察が必要である。全身性種痘様水疱症は、

T細胞優位型と T細胞優位型に分かれ、そのうち、 T細胞優位型の予後は良好であるが、 T細胞クローン優位型は、発症年齢が高く、成人や高齢者発症があり、再活性化マーカーBZLF1発現が皮膚病変に高率に認められ、死亡例が多い。

【診断的検査法の確立と臨床的意義の検証】

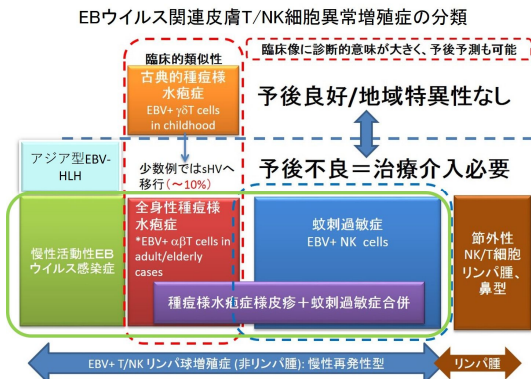
我々が開発した痂皮を用いるEBER検査法の鋭敏度と特異度はともに90%以上であり、診断的検査として有用である(論文)。患者血液中のEBV DNAコピー数は、種痘様水疱症と蚊刺過敏症の診断に重要であるが、生命予後を予測することはできない。血球と血漿と分けてEBV DNAコピー数を測定すると、血漿のcell-free EBV DNAが著増を示す症例がみられ、そのような症例では血球貪食症候群を合併していた。すなわち、血漿EBV DNAコピー数が著増する場合には、血球貪食症候群による細胞崩壊と関連し、その発症を予測できる可能性が示唆された(論文準備中)。

【予後因子と分子マーカー】

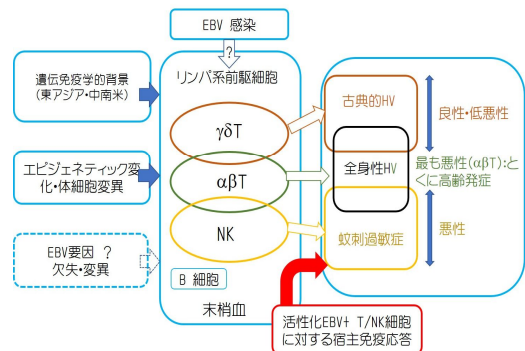
統計的に有意な生命予後因子は、1)臨床病型、2)発症年齢(9歳以上)、3)リンパ球サブセットと、4)EBウイルス再活性化マーカーBZLF1の発現であった。

【クローン解析と変異遺伝子のエクソーム解析】

クローン解析結果では、EBウイルス遺伝子TR領域を標的とした検査では単一クローンであるが、T細胞系であってもT細胞受容体遺伝子再構成ではクローンが同定されない症例が複数見られた。すなわち、EBウイルスはリンパ球系前駆細胞に感染し、引き続きT細胞、NK細胞への分化が起きている可能性があり、エクソーム解析でもその仮説を支持するデータを得た。エクソーム解析では特徴的な体細胞変異とEBV遺伝子の特定領域に欠損多いことが示された(論文投稿中)。



EBV関連T/NK細胞異常増殖症の病態と予後



【EB ウイルス感染細胞の遊走と再活性化】

患者の EB ウイルス感染 T/NK 細胞は、末梢血中では潜伏感染状態であり、宿主免疫応答は惹起されないため無症状であるが、重症の皮膚病変部においては約半数の例で再活性化シグナルが認められた。しかし、その再活性化シグナルの下流シグナルは、一部の例外を除いて検出されないことが判明した。一方、*in vitro* の培養細胞株においては、再活性化に関わる下流シグナルが検出でき、EB ウイルス粒子 (virion) 由来の DNA が検出できた (論文)。すなわち、EB ウイルス感染細胞は、皮膚での炎症刺激で、再活性化カスケードに入るが、新たに発現する EB ウイルス関連分子に対する宿主免疫応答によって再活性化の途中で排除されるものと考えられた。EB ウイルス感染 T 細胞株を用いて、紫外線照射後の表皮由来因子に対する細胞遊走と活性化を検討してきたが、その因子の特定はできていない。細胞株を用いた EB ウイルス再活性化は、*in vitro* においては TNF 添加で誘導されるが、*in vivo* (皮膚) における再活性化因子については絞り込めていない。

【まとめと考察】

病型分類に加えて、発症年齢、EB ウイルス感染細胞サブセットと皮膚病変部における再活性化マーカー BZLF1 発現を知ることは予後予測につながる。オミクス解析によって悪性化機序の一端が明らかになりつつある。皮膚病変における EB ウイルス再活性化因子についてさらに絞り込みが必要である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Fujii K, Suzuki N, Jimura N, Idogawa M, Kondo T, Iwatsuki K, Kanekura T. HSP72 functionally inhibits the anti-neoplastic effects of HDAC inhibitors. *J Dermatol Sci*, 査読有, 2018 Jan 30. pii: S0923-1811(18)30018-5. doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.01.002. [Epub ahead of print]

Hamada T, Kawata M, Maeda Y, Yoshino T, Miyake T, Morizane S, Hirai Y, Iwatsuki K. Epstein-Barr virus-positive mucocutaneous ulcer in a patient with polycythemia vera treated with oral hydroxyurea. *J Dermatol*, 査読有, 2017 Nov 15. doi: 10.1111/1346-8138.14127. [Epub ahead of print]

Hamada T, Aoyama Y, Shirafuji Y, Iwatsuki K. Phenotypic analysis of circulating T-cell subset and its association with burden of skin disease in patients with chronic actinic

dermatitis: a hematologic and clinicopathologic study of 20 subjects. *Int J Dermatol*, 査読有, 2017; 56: 540-546.

Miyake T, Yamamoto T, Hirai Y, Iwatsuki K. Differential diagnosis of herpetiform vesicles by a non-invasive, molecular method using crusts or blister roofs: Sensitivity, specificity and likelihood ratio. *J Dermatol Sci*, 査読有, 2016 Dec;84(3):358-359.

Yamamoto T, Hirai Y, Miyake T, Hamada T, Yamasaki O, Morizane S, Fujimoto W, Iwatsuki K. Epstein-Barr virus reactivation is induced, but abortive, in cutaneous lesions of systemic hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites. *J Dermatol Sci*, 査読有, 2016 Jun;82(3):153-159.

岩月啓氏、「皮膚 T 細胞リンパ腫研究」総論 皮膚と T リンパ球サブセットと腫瘍化細胞、査読無、2016 年 6 月、48(6):262-263.

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; 173:801-805.

〔学会発表〕(計 5 件)

Iwatsuki K, Hirai Y, Miyake T, Asada H, Kimura H, Ito Y, Yachie A, Fujiwara S, Ohga S. Prognostic factors of EBV-associated T/NK lymphoproliferative disorders: hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites. Seoul National University, Hamchun Symposium, Korea, 2017.12.9

Iwatsuki K, Hirai Y, Miyake T, Asada H, Kimura H, Ito Y, Yachie A, Fujiwara S, Ohga S. Another prognostic factor in hydroa vacciniforme-like lymphoproliferative disorder and hypersensitivity to mosquito bites: A dominant lymphocyte subset infected with Epstein-Barr virus. EORTC CLTF, London, UK, 2017.10.13-14

Iwatsuki K, Hirai Y, Miyake T, Yamamoto T. A reactivation signal, BZLF-1, is a biomarker for severe phenotypes of cutaneous EBV-associated T/NK

Lymphoproliferative disorders. 3rd World Congress of Cutaneous Lymphomas, Columbia University, New York, U.S.A. 2016.10.26-28

Iwatsuki K, Yamaguchi M, Hamada T, Sugaya M, Miura M, Ohshima K, Morishita K. Cell adhesion molecule 1 is a biomarker for leukemic cells in progressive or refractory Sezary syndrome. 3rd World Congress of Cutaneous Lymphomas, Columbia University, New York, 2016.10.26-28

Iwatsuki K. Lymphomas in Asia: Virus-related lymphomas. 10th Asian Dermatological Congress, Sahara Star International Convention Centre, Mumbai, India, 2016.10.13-16

〔図書〕(計 2 件)

Quintanilla-Martinez L, Iwatsuki K, Koh YH. Cutaneous manifestations of chronic active EBV infection. WHO, WHO Classification of Skin Tumours 4th Ed, 2018, 21-23.

Tokura Y, Iwatsuki K, Jaffe E. Adult T-cell leukemia/lymphoma (Cutaneous). WHO, WHO Classification of Skin Tumours 4th Ed, 2018, 18.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：8 0 1 2 6 7 9 7

(2)研究分担者

濱田 利久 (HAMADA, Toshihisa)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：7 0 3 4 6 4 3 5

(3)研究分担者

平井 陽至 (HIRAI, Yoji)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：1 0 7 5 6 0 6 8

(4)研究分担者

三宅 智子 (MIYAKE, Tomoko)
岡山大学・大学病院・助教
研究者番号：3 0 7 4 9 6 2 7