

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16341

研究課題名(和文) 種痘様水疱症における紫外線曝露による皮疹形成機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of skin eruption due to ultraviolet rays in hydroa vacciniiforme patients

研究代表者

平井 陽至 (HIRAI, YOJI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10756068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス関連T/NK細胞増殖症として主に小児に発症する光線過敏症で種痘様水疱症があるが、紫外線による皮疹形成機序は不明で、また、発熱などの全身症状や血液異常、悪性化も認める全身型種痘様水疱症も病態について不明な点が多い。本研究により、CXCL12がEBウイルス感染 T細胞の皮膚への遊走に関与し、紫外線により表皮角化細胞からMDCが放出され増殖能を得ることを解明した。非バイアス次世代TCRレパトア解析にて皮疹部には末梢組織型V<sub>1</sub>が選択的に浸潤する可能性を見出した。さらに全身型種痘様水疱症ではEBV感染大顆粒リンパ球においてCD16/56共発現が腫瘍量の代用マーカーになる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種痘様水疱症は稀な小児の光線過敏症で、通常は遮光や対症療法で自然軽快するが、発熱や血液学的検査異常を伴い、慢性活動性EBウイルス感染症の合併例が多い全身型種痘様水疱症への移行例や全身型種痘様水疱症の成人/高齢発症例が存在する。全身型種痘様水疱症は確立した治療法が無く、また東南アジア・中南米などの限られた地区で報告されており、病態解析と新治療薬の開発が急がれる。本研究では、種痘様水疱症の皮疹形成機序、また全身型種痘様水疱症における腫瘍量の代用マーカーを探求し意義あるものとする。

研究成果の概要(英文)：Hydroa vacciniiforme (HV) is a rare photosensitivity disorder of childhood associated with Epstein-Barr virus (EBV)+ T-cell infiltration, although the precise mechanism of eruption due to UV rays remains unknown. There are also many unclear pathomechanisms in cases of systemic HV (sHV), which shows systemic symptoms such as fever, blood abnormalities, and malignant changes. The present study revealed that C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) is involved in the migration of EB virus-infected T cells to the skin, and that macrophage-derived chemokines (MDCs) are released from epidermal keratinocytes by ultraviolet rays to obtain proliferative ability. T-cell receptor (TCR) repertoire analysis using next-generation sequencing showed that peripheral tissue type EBV+V<sub>1</sub> could selectively infiltrate skin lesions. Furthermore, the percentages of coexpression of CD16 and/or CD56 by T-cell large granular lymphocytes might serve as a surrogate marker for the tumor burden in sHV patients.

研究分野：ウイルス感染症

キーワード：種痘様水疱症 EBウイルス 非バイアス次世代TCRレパトア解析 T細胞 蚊刺過敏症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

EBV 関連 T/NK 細胞増殖症の表現型として、主に小児に発症する光線過敏症に種痘様水疱症 hydroa vacciniforme;HV がある。HV では末梢血、皮疹部共に EBV 感染 T細胞が増加し病態に大きく関わることを報告した。しかし、紫外線曝露による皮疹形成機序については不明である。また、重症化 HV が東南アジア・中南米などの限られた地区で報告されており、病態解析と新治療薬の開発が急がれる。

申請者らは、1999 年に HV が EBV 感染 T細胞によって発症することを発見し (Br J Dermatol,1999)、EBV 関連 T/NK 細胞増殖症 (種痘様水疱症、蚊刺過敏症 hypersensitivity to mosquito bites;HMB、慢性活動性 EBV 感染症、鼻型 NK/T 細胞リンパ腫) が同一疾患スペクトラムを形成し (Arch Dermatol 1997, Eur J Dermatol 2003)、その多様な臨床症状は、EBV 感染細胞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, Eur J Dermatol 2012)。発熱などの全身症状や血液検査異常を伴う全身型 HV や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。この地域特異的発症は EBV ジェノタイプ (J Med Virol, 2000) よりも、EBV 抗原に対する患者の遺伝免疫学的要因が重要と考えられる。また、自施設は、HV 皮膚病変から得た痂皮より EBV 潜伏感染を証明するべく独自に開発した非侵襲的検査法 (J Microbiol Methods,2007) を有するため、本疾患群の診断拠点として国内外問わず多数の症例が紹介され、生体試料が集積されてきた。

申請者らは、種痘様水疱症は EBV 感染 T細胞、HMB は EBV 感染 NK 細胞と関連していることを証明し (J Invest Dermatol 2012)、EBV 再活性化により誘導される細胞傷害性 T細胞 (CTL) が病態に関与する研究結果を得た (Exp Hematol 2010, J Med Microbiol 2012)。

集積されたデータをもとに、生存率と危険因子を解析した (Br J Dermatol,2015)。その結果、HV 患者において 9 歳以上での発症や皮膚病変における EBV 再活性化シグナル BZLF1 の発現は、予後不良因子として密接に関与することが判明した。

本研究は、これまでの研究成果をさらに発展させるために、HV 皮膚病変の形成機序に迫るべく紫外線照射による EBV 感染 T細胞の遊走・活性化機序を研究した。さらに、発熱・肝機能障害などの全身症状や血球貪食症候群・NK/T 細胞リンパ腫を合併例も認める全身型 HV の病態、Biomarker、治療法の探求を目的とした。



## 2. 研究の目的

光線過敏症 (特に UVA 領域紫外線) である HV の紫外線曝露による皮膚病変形成機序の解明を主眼に置き、現在遮光などの対症療法しかない HV に対する治療法開発のみならず、発熱・肝機能障害などの全身症状や血球貪食症候群・NK/T 細胞リンパ腫を合併例も認める全身型 HV に対し、病態解明や Biomarker の検討、新治療を提案することを目標とする。

## 3. 研究の方法

HV 患者の皮膚病変形成機序について、EBV 感染 T細胞と紫外線照射の関係、各種ケ

モカイン・ケモカイン受容体の発現解析を行った。

また、非バイアス次世代 TCR レパトア解析による EBV 関連リンパ増殖性疾患への応用解析を行った。さらに、HMB 患者における、EBV DNA 測定異議の検討や、全身型 HV 患者における、EBV 感染大顆粒リンパ球の CD16/56 共発現について検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) HV 患者の皮膚病変形成機序について、EBV 感染 T細胞と紫外線照射の関係、各種ケモカイン・ケモカイン受容体の発現解析;

EBV 感染 T細胞の走化性を EZ-TAXIScan™ 簡易型細胞動態解析装置 (Effect Cell Institute 社製) を用いて測定し、CXCR4 のケモカインリガンドである CXCL12/SDF1 が遊走に大きく関与していることが判明した(図1)。

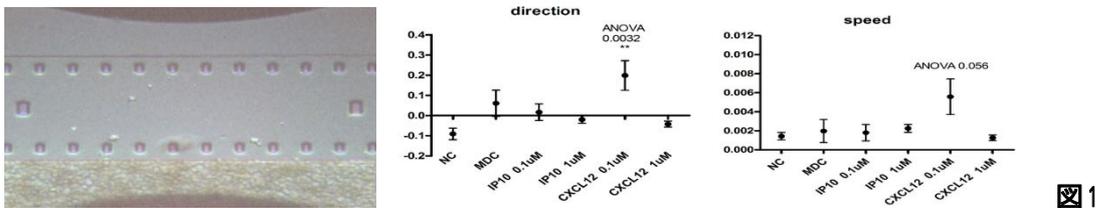


図1

次に、CXCL12 発現細胞同定を目的に、表皮角化細胞 (NHEK)やその他間葉系細胞(血管内皮細胞等)を用い、紫外線刺激(UVA)や IFN- $\gamma$  等の刺激実験を行ったがいずれの細胞も CXCL12 発現増強は現在まで見られておらず条件検討や刺激細胞などについても検討中である。

次に、NHEK を用い、紫外線照射刺激によって CCR4 リガンドである TARC/CCL17 や MDC/CCL22、また HMGB1 や danger signal、さらに種々のサイトカインの発現を定量 RT-PCR、ELISA 法で確認した。UVA10J 刺激により表皮角化細胞において各種サイトカイン・ケモカインの mRNA 発現を定量 RT-PCR で検討した所、MDC/CCL22 が高発現していることが判明した(図2)。また、表皮角化細胞を IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  で刺激すると MDC/CCL22 を誘導する(Ann Dermatol 2015) という報告があり、我々の検証でも IFN- $\gamma$  刺激において表皮角化細胞から蛋白レベルで MDC/CCL22 が誘導されることを確認した(図3)。実際に HV 患者皮膚病変部の痂皮から得た RNA から同様に種々のサイトカイン・ケモカインの発現を定量 RT-PCR を用いて検討した結果、IFN- $\gamma$  が有意に上昇しており(図4)、UVA 10J での刺激により表皮角化細胞において MDC/CCL22 が mRNA レベルで高発現し、Th1 細胞で産生された IFN- $\gamma$  の刺激により MDC/CCL22 が放出されるという仮説のもと、IFN- $\gamma$  と UVA10J 共刺激など更なる検証を進めている。MDC/CCL22 による EBV 感染 T細胞の遊走能はみられなかったが、HV 患者由来の EBV 感染 T細胞において細胞増殖能を MTT assay にて検証した所、MDC/CCL22 により増殖能が亢進する傾向がみられた(図5)。

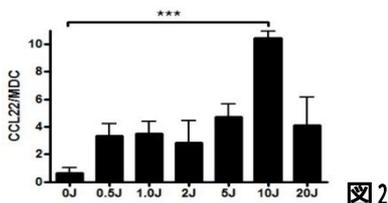


図2

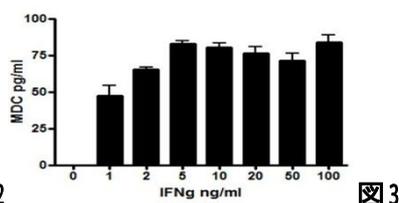
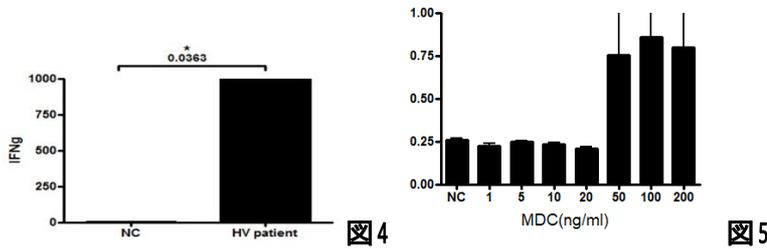


図3



## 2) 非バイアス次世代 TCR レパトア解析による EBV 関連リンパ増殖性疾患への応用;

従来の方法では検出し得なかった HV 患者における微量の TCR クローンを、PCR バイアスがつかない非バイアス次世代 TCR レパトア解析 (Repertoire Genesis Inc. Japan) を用いて解析した。心筋浸潤を来した T 細胞優位の全身型 HV 患者において TCR 解析をしたところ、末梢血に少なくとも2つの TCR クローン (major な T 細胞クローンと minor な T 細胞クローン) を見出し (図6A)、従来の方法では検出し得なかった微量の TCR クローンを検出することができこれを報告した (The European Journal of Dermatology 2019 Feb 1;29(1):21-28.)。サザンプロット法にて EBV-TR のクロナリティは見られるものの (図6B)、従来の TCR 遺伝子再構成では検出できない TCR クローンであった (図6C)

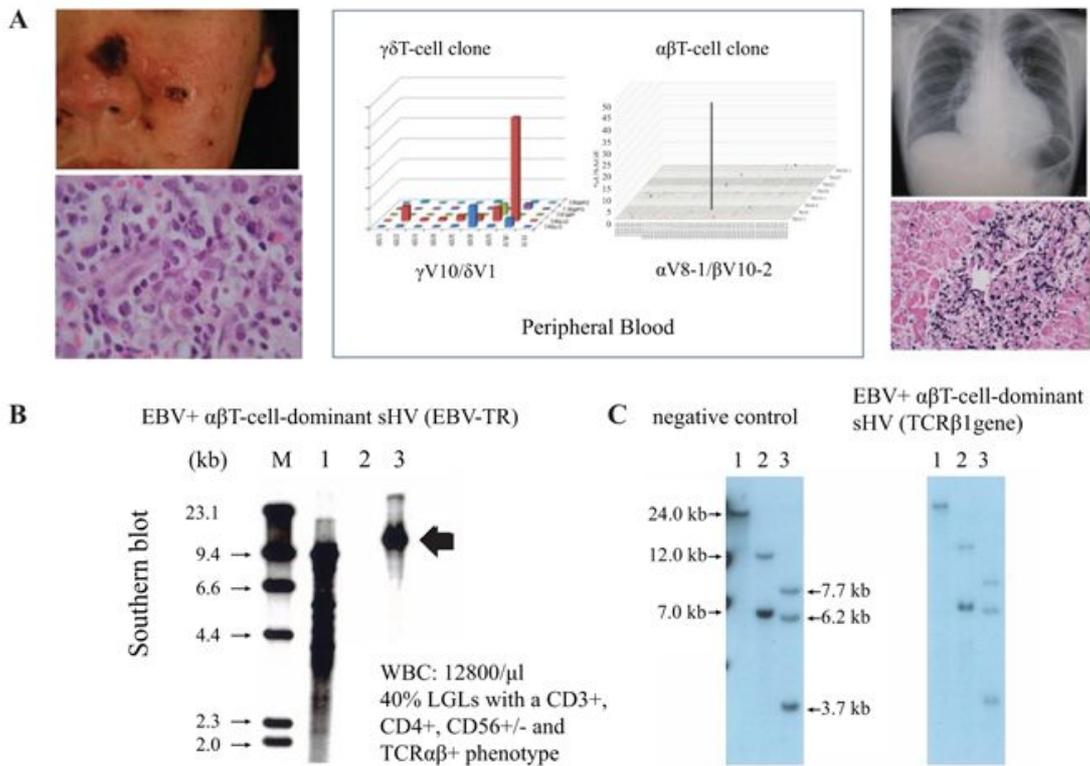


図6

また、HV 皮疹部には EBV 感染 T 細胞の中でも末梢組織型 V 1 が選択的に浸潤している可能性を見出し皮膚病変形成に参与している可能性がある (図7)。さらに、T 細胞における TCR CDR3 領域には多様なアミノ酸置換を認めた。これらは激しい増殖を繰り返し、変異が蓄積する為に、主たるクローンに類似した配列が検出された可能性を考えた。全身症状を伴わない予後良好の古典的 HV 患者では健常人と同様に Vd2+Vg9+ が major なクローンであったが、別の Vg を使ったクローンの存在を認めた。

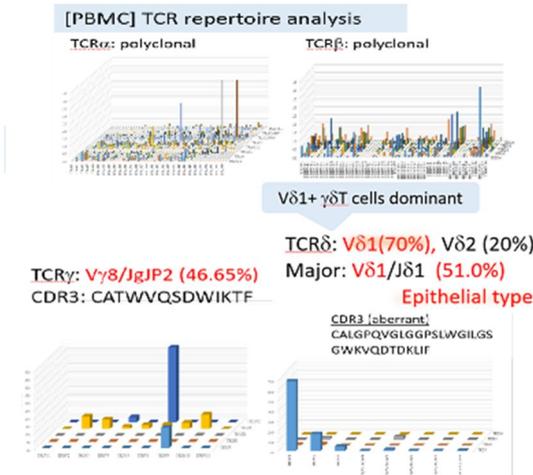


図7

### 3) 全身型 HV における CD16/56 共発現について;

また、全身型 HV 患者における、EBV 感染細胞分画の検討と、感染細胞の特徴についてフローサイトメトリー、非バイアス次世代 TCR レパトア解析にて検討を行った。

HV 患者でも全身型 HV と呼ばれる全身型は T 細胞より T 細胞が優勢である症例が多く、さらに進行性の致死的な症例では末梢血中の EBV 感染大顆粒リンパ球 (CD3+T 細胞) が HLA-DR の活性化マーカーと共に、NK 細胞マーカーである CD16/56 を共発現している傾向を認めた (図8)。しかし、非バイアス次世代 TCR レパトア解析にて NK 抗原が陽性ながら通常の NKT 細胞が発現している V 24 を認めず、通常の NKT 細胞とは異なる細胞群という事が判明し、全身型 HV 患者における surrogate marker となる可能性を見出し、これを報告中である (論文投稿中)。また、CD16/56 発現の EBV 感染大顆粒リンパ球は cytotoxic molecules を発現しており、全身型 HV 患者の全身症状に関与している可能性を見出した。

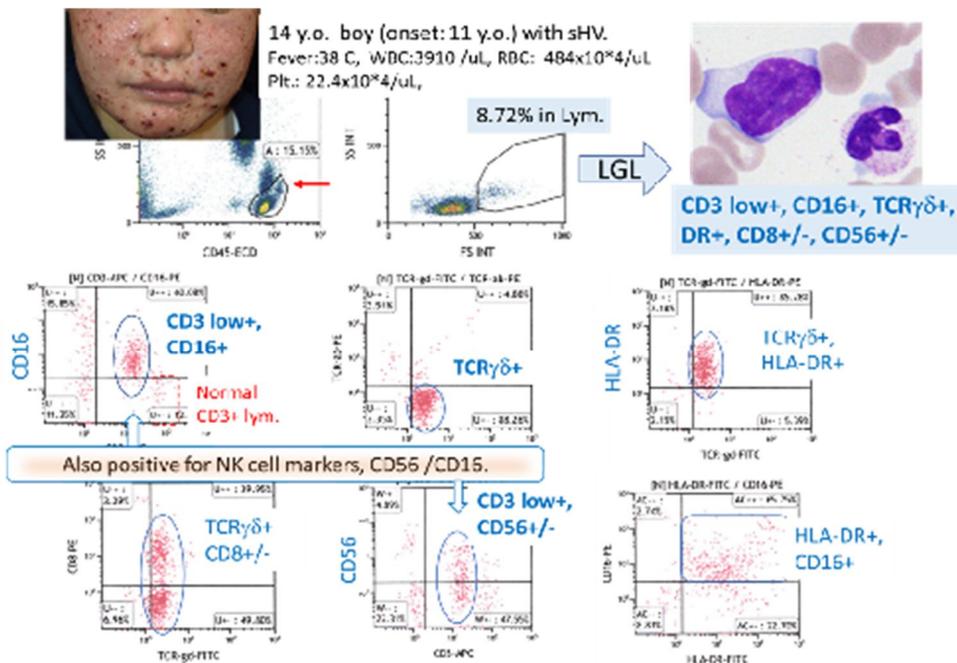


図8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwatsuki K, Miyake T, Hirai Y, Yamamoto T.	4. 巻 29(1)
2. 論文標題 Hydroa vacciniforme: a distinctive form of Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoproliferative disorders.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 21-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1684/ejd.2018.3490.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyake T, Iwatsuki K, Hirai Y, Yamamoto T, Hamada T, Fujii K, Imamura H, Morizane S.	4. 巻 ahead of print
2. 論文標題 The aim of the measurement of Epstein-Barr virus DNA in hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 ahead of print
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.25811.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoji Hirai, Keiji Iwatsuki, Tomoko Miyake, Yuki Nakagawa, Takahide Takahashi, Shogo Tanimoto, Osamu Yamasaki, Shin Morizane
2. 発表標題 Restricted and unusual usage of TCR gamma/delta chains in systemic hydroa vacciniforme.
3. 学会等名 第44回日本研究皮膚科学会学術大会・総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平井陽至
2. 発表標題 種痘様水疱症 hydroa vacciniforme; HV患者における 紫外線暴露による皮疹形成機序の解明
3. 学会等名 臨床皮膚科学研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----